

**Funktion des zellspezifischen Transkriptionsfaktors
HNF4 α bei der Zellproliferation in Nierenzellen:
Identifizierung der Signalwege und der
proliferationsrelevanten HNF4 α -regulierten Gene**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereiches Biologie und Geographie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Dipl. Biologin
Karen N. C. Grigo

aus Dortmund, Deutschland

Oktober 2007

**Funktion des zellspezifischen Transkriptionsfaktors
HNF4 α bei der Zellproliferation in Nierenzellen:
Identifizierung der Signalwege und der
verantwortlichen HNF4 α -regulierten Gene**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereiches Biologie und Geographie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Dipl. Biologin
Karen N. C. Grigo

aus Dortmund, Deutschland

Oktober 2007

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard J. Horsthemke
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusse: Prof. Dr. Helmut Esche

Tag der Disputation: 19.12.2007

Teile dieser Arbeit sind im Rahmen der von Claudia Krawczyk durchgeführten Bachelorarbeit entstanden, die von mir betreut wurde. Zusätzlich sind die Abschnitte III.4 und III.6 der Arbeit in die folgende Publikation eingegangen:

Karen Grigo, Andrea Wirsing, Belén Lucas, Ludger Klein-Hitpass and Gerhart U. Ryffel. HNF4 α orchestrates a set of 14 genes to down-regulate cell proliferation in kidney cells. (*zur Veröffentlichung angenommen*)

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
1	Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α	1
2	HNF4 α und Krankheiten beim Menschen	5
2.1	MODY1	5
2.2	Krebserkrankungen	6
3	Funktionsanalyse von HNF4 α	9
3.1	Funktionsanalyse am Mausmodell für HNF4 α	9
3.2	HNF4 α -Funktionsanalyse an Zellkulturen	10
4	Zielsetzung der Arbeit	14
II	MATERIAL UND METHODEN	16
1	Material	16
1.1	Chemikalien, Puffer und Enzyme	16
1.2	Zellkultur	16
2	Molekularbiologische Methoden	16
2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	16
2.2	Plasmide	17
3	Proteinbiochemische Methoden	18
3.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen	18
3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	19
3.3	SDS-Gelelektrophorese	19
3.4	Western Blot	19
4	Zellbiologische Methoden	21
4.1	Auftauen von Zellen	21
4.2	Kulturbedingungen	21
4.3	Subkultivierung von Zellen	22
4.4	Zellzahlbestimmung	22
4.5	Kryokonservierung	23
5	Immunfluoreszenzmikroskopie	23
6	Herstellung stabiler induzierbarer Zelllinien mit dem Flp-in T-Rex System	24
6.1	Flp-In T-Rex 293-Zellen	24
6.2	Induktion der Zelllinien mit Doxycyclin	25
7	Zellassays	25
7.1	Untersuchung der Zellmorphologie	25
7.2	Untersuchung der Zellproliferation	25
7.3	Untersuchungen der Zelladhäsion	26
8	Microarray	26
8.1	RNA-Isolierung für die Mikroarray-Analyse	26
8.2	Verwendete Mikroarray-Chips	27
8.3	Synthese der cDNA, Markierung und Hybridisierung	27
8.4	Auswertung der Daten	28
9	Quantitative Real-time PCR	29
9.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	29
9.2	Quantitative Real-time PCR mit TaqMan-Sonden und TaqMan Low Density Array	29

9.3 Berechnung der Genexpression	33
10 Gen-Inaktivierung mittels RNAi	33
10.1 esiRNA-Präparation	34
10.1.1 esiRNA-PCR	34
10.1.2 <i>In vitro</i> -Transkription	36
10.1.3 RNase III-Verdau	36
10.2 Transiente Transfektion und Messung der Zellproliferation	37

III ERGEBNISSE 38

1 Expression von HNF4 α hemmt die Proliferation von HEK293-Zellen auf Gelatine beschichtete Zellkulturschalen	38
2 Subzelluläre Lokalisation von HNF4 α in HEK293-Zellen	40
2.1 Die subzelluläre Lokalisation von HNF4 α bei einer Überexpression des Proteins	40
2.2 Die subzelluläre Lokalisation von HNF4 α bei einer physiologischen Menge des Proteins	42
2.2.1 Induktion von 10 ng / ml Doxycyclin erzeugte eine physiologische Menge von HNF4 α	42
2.2.2 Die subzelluläre Lokalisation von HNF4 α in HEK293-Zellen bei einer physiologischen HNF4 α -Menge	44
2.3 Lokalisation von HNF4 α in der Ratten-Insulinoma Zelllinie INS-1	46
2.4 Lokalisation von HNF1 α und HNF1 β in der HEK293-Zelllinie	47
2.5 Keine Co-Lokalisation von HNF4 α und des Basalkörpers	48
3 Die Expression von HNF4 α war nach einer langfristigen Induktion reprimiert	49
3.1 Aufhebung der Proliferationshemmung und der Morphologie-veränderungen bei einer vierwöchige Induktion von HNF4 α	49
3.2 HNF4 α Expression nach vierwöchiger Induktion	51
3.3 Lac-Z-Aktivität nach einer vierwöchigen HNF4 α -Induktion	53
4 Identifizierung von HNF4 α -regulierten Genen in der HEK293-Zelllinie	56
4.1 Vergleich des HG-U133 _Plus_2.0 Arrays mit dem HG-U133A Array	58
4.2 HNF4 α -regulierte Gene zeigen starke Beteiligung am Metabolismus, der Entwicklung und der Morphogenese	59
5 Identifizierung der proliferations- und morphologie- relevanten HNF4 α -regulierten Gene	60
5.1 Definition der Doxycyclin-Induktion, die die minimale HNF4 α -Expression erzeugte	62
5.2 Eingrenzung der proliferations- und morphologie-relevanten HNF4 α -Kandidatengene	67
6 Identifizierung der proliferationsrelevanten HNF4 α -regulierten Gene	73
6.1 Etablierung der esiRNA-Methode	74
6.2 esiRNA-Screen der reprimierten Kandidatengene	76
6.3 Etablierung des esiRNA-Screens für die induzierten Kandidatengene	80
6.4 Durchführung des esiRNA-Screens der induzierten Kandidatengene	81
6.5 Ermittlung der Signifikanz der 24 möglichen Kandidatengene für die Zellproliferationskontrolle	86
7 Zellproliferationshemmung der induzierten Gene in der HEK293-Zelllinien	88
8 Überprüfung der CDKN1A-Induktion durch HNF4 α -Expression in der HEK293 Zelllinie	91

IV DISKUSSION	92
1 HNF4 α hemmt die Proliferation von HEK293-Zellen auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen	92
2 HNF4 α bildet in HEK293-Zellen während der Mitose punktuelle Ansammlungen	93
3 Die langfristige Induktion von HNF4 α bewirkte die Reprimierung von HNF4 α in HEK293-Zellen	95
4 Identifizierung der HNF4 α -regulierten Gene in Nierenzellen	98
5 Eingrenzung der proliferations- und/ oder morphologie-relevanten Kandidatengene	102
6 Identifizierung der proliferationsrelevanten Kandidatengene mittels RNAi	103
V ZUSAMMENFASSUNG	109
VI LITERATURVERZEICHNIS	111
VII ANHANG	124
1 GO-Analyse der Mikroarray-Ergebnisse	124
2 Low Density Array Daten	131
3 Daten des esiRNA-Screenings	146
4 HNF4 α -regulierte Gene, die im NZK dereguliert sind	151
DANKSAGUNG	155
PUBLIKATIONSLISTE	157
Postervorträge	157
LEBENS LAUF	157

Abkürzungsverzeichnis

A	Agenin
Abb.	Abbildung
ADAMTS1	a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1
AF	Aktivierungsfunktion
AFF3	<i>AF4/FMR2 family, member 3</i>
ALDH6A1	<i>aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1</i>
ANK3	<i>ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL10	<i>B-cell CLL/lymphoma 10</i>
bp	Basenpaare
BPHL	<i>biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)</i>
C	Cytosin
Cdk6	cyclin-abhängige Kinase 6 (<i>cyclin dependent kinase 6</i>)
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIDEB	<i>cell death-inducing DFFA-like effector b</i>
CLN6	<i>ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6</i>
CMV	cytomegalievirus
cRNA	komplementäre RNA
CTCF	<i>CCTC-binding factor</i>
C-terminal	carboxyterminal
CXCR4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleoid-5'-triphosphat
Doxy	Doxycyclin
ds	doppelsträngig
DSC2	Desmocollin
DUSP1	<i>dual specificity phosphatase 1</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EFHD1	<i>EF-hand domain family, member D1</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Enzymimmuntest (enzyme-linked-immunoadsorbent-assay)
EMT	Epithelial zu Mesenchymal-Transition
EPHX2	<i>epoxide hydrolase 2, cytoplasmic</i>
esiRNA	endoribonuclease-prepared short interfering RNA
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
ETV1	<i>ets variant gene 1</i>
EV11	<i>ecotropic viral integration site 1</i>
EXT2	<i>exostoses (multiple) 2</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
F9	embryonale Maus Karzinoma Stamzellen
FAS	<i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6)</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FGFR2	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>

FGFR10P	<i>FGFR1 oncogene partner</i>
FRT	<i>Flp Recombination Target</i>
G	Guanin
G2	Gap2 (Phase des Zellzykluses)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
Glut 1	glucose transporter-like protein I
GO	Gen Ontologie
HEK293	humane embryonale Nierenzelle (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HepG2	humane hepatocelluläre Leberzelllinie vom Karzinom
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HIG2	<i>hypoxia-inducible protein 2</i>
HIP1	<i>huntingtin interacting protein 1</i>
HLA-F	<i>major histocompatibility complex, class I, F</i>
HNF	<i>hepatocyte nuclear factor</i>
HOX	Homeo Box
HZK	hepatozelluläres Karzinom
INS-1	Ratten Insulinoma Zelllinie
JAZF1	<i>juxtaposed with another zinc finger gene 1</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Lak-Z	β -Galactosidase codierendes Gen
LASP1	LIM and SH3 protein 1
let-7	microRNA let-7a-1
LHFP	<i>lipoma HMGIC fusion partner</i>
M	Mitose (Phase des Zellzykluses)
MAPKAP3	<i>mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3</i>
MET	<i>met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)</i>
miRNA	microRNA
MLLT11	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to, 11</i>
MME	<i>membrane metallo-endopeptidase</i>
MODY	maturity-onset diabetes of the young
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTM1	Myotubularin 1
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCOA4	<i>nuclear receptor coactivator 4</i>
n.d.	nicht determiniert
NELL2	<i>NEL-like 2 (chicken)</i>
NIN	<i>ninein (GSK3B interacting protein)</i>
NPR2L	<i>tumor suppressor candidate 4 (TUSC 4)</i>
N-terminal	aminoterminal
N-terminus	Aminoterminus
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	optische Dichte
OPT	Oct1/PTF/transcription domain
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered-saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

PDGF	<i>platelet derived growth factor F</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PICALM	<i>phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>
PRDM16	<i>PR domain containing 16</i>
PRPH	<i>peripherin</i>
PROS1	<i>protein S (alpha)</i>
PSIP1	<i>PC4 and SFRS1 interacting protein 1</i>
PTB	<i>neural polypyrimidine tract binding protein</i>
PTCH	<i>patched homolog (Drosophila)</i>
PTF	<i>Proximal sequence element-binding transcription factor</i>
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEPP1	Selenoprotein P
SH3GL1	<i>SH3-domain GRB2-like 1</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SLC7A5	<i>solute carrier family 7, member 5</i>
SYBR	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
TGF	Transforming growth factor
THEM2	<i>thioesterase superfamily member 2</i>
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen
WHSC1L1	<i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1</i>
wt	Wildtyp
Wt1	Wilms Tumor 1
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
XPC	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
ZO-1	zonula occludens-1

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt. Aminosäuren wurden mit dem international gebräuchlichen Einbuchstabencode abgekürzt.

I Einleitung

1 Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α

Ein mehrzelliger Organismus funktioniert nach dem Prinzip der Arbeitsteilung. Denn obwohl alle Zellen dasselbe Genom besitzen, bilden sie abhängig von Zelltyp und Entwicklungsstadium ein unterschiedliches Proteom. Um das spezifisch benötigte Proteom zu bilden, verfügt die Zelle über ein kompliziertes Regulationssystem. Eine Form der gezielten Regulation ist der Einsatz von Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren können in zwei Arten eingeteilt werden, in die basalen und in die zellspezifischen Transkriptionsfaktoren. Während die basalen Transkriptionsfaktoren in jeder Zelle zur Transkription beitragen, ist die Aktivität der zellspezifischen Transkriptionsfaktoren auf bestimmte Zelltypen beschränkt (Cooper, 2000).

Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α , NR2A1) ist ein zellspezifischer Transkriptionsfaktor und wird als ein hochkonserviertes Mitglied der Kernrezeptor-Familie der Gruppe A der Subfamilie 2 der Kernrezeptoren zugeordnet (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999). Die Gruppe umfasst neben HNF4 α auch noch die Kernrezeptoren HNF4 β (Holewa et al., 1997), der ausschließlich in *Xenopus* nachgewiesen wurde, und HNF4 γ (Drewes et al., 1996; Taraviras et al., 2000).

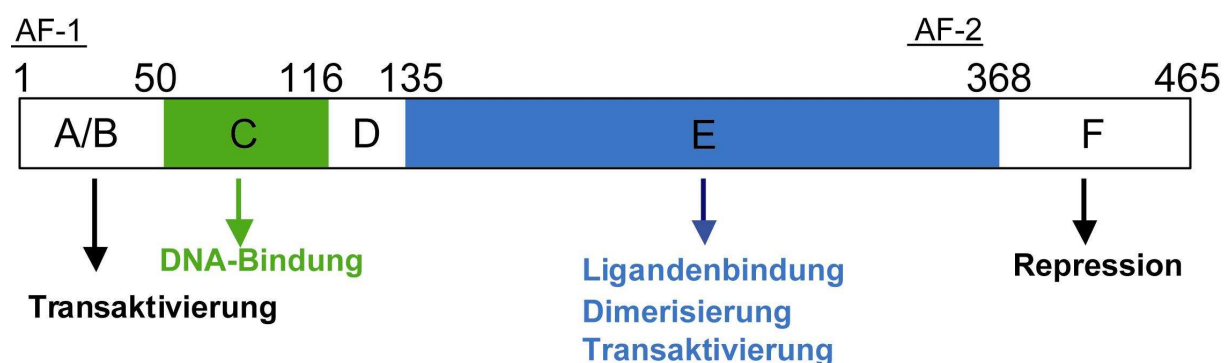


Abbildung 1: Schematische Darstellung der HNF4 α -Domänstruktur Dargestellt ist die humane Isoform HNF4 α 2 mit den insgesamt 465 Aminosäuren. Die Positionen der Aktivierungsdomänen AF-1 in der A/B Domäne und AF-2 in der E-Domäne sind angegeben. Die weniger konservierten Regionen sind in weiß dargestellt (nach Sladek und Seidel 2001).

In Abbildung 1 ist die Domänenstruktur von HNF4 α schematisch dargestellt. Am Amino-terminalen Ende liegt die A/B-Domäne, welche die Transaktivierungsdomäne AF-1 enthält (Gronemeyer et al., 2004; Green et al., 1998). Bei HNF4 α bilden die ersten 24 N-terminalen Aminosäuren die AF-1 Transaktivierungsdomäne (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Die DNA-Bindedomäne (DBD, C-Domäne) von HNF4 α verfügt über zwei Zinkfinger-Motive. Innerhalb der Liganden-Bindedomäne (LBD, E-Domäne) ist die Transaktivierungsdomäne AF-2 lokalisiert, welche an der Interaktion mit Ko-Regulatoren beteiligt ist (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Die LBD ist an der Homodimerisierung, der transkriptionellen Aktivierung und an Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren und Ko-Aktivatoren beteiligt (Jiang and Sladek, 1997; Ktistaki and Talianidis, 1997). Neben den drei Hauptdomänen enthält HNF4 α zwei weitere konservierte Domänen (D und F), wobei die flexible D-Domäne die C-Domäne mit der langen hydrophoben Ligandenbindungsdomäne verbindet (Jiang and Sladek, 1997). Die C-terminale F-Domäne enthält eine Repressorregion, die den Zugang zu AF-2 und die Bindung von Ko-Aktivatoren inhibiert und ist mit 97 Aminosäuren im Vergleich zu den meisten anderen Kernrezeptoren relativ groß (Suaud et al., 1999). Veröffentlichungen zeigen, dass die F-Domäne unter anderem für die Unterscheidung zwischen Ko-Aktivator und Ko-Repressor verantwortlich ist, wobei aber keine direkte Bindung zwischen F-Domäne und Ko-Faktor entsteht (Ruse, Jr. et al., 2002).

Die Liganden-Bindedomäne bildet bei allen Kernrezeptoren eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur aus. Insgesamt 11 Helices formen eine in der Größe variable, kompakte Liganden-Tasche. Der Eingang der Liganden-Tasche wird von der zwölften Helix gebildet, welche einen beweglichen Deckel darstellt und zusätzlich spezifische Reste für die Funktion der Transaktivierungsdomäne AF-2 aufweist. Die jeweilige Orientierung der zwölften Helix wird in den meisten Fällen durch die Anwesenheit von Ko-Repressoren und von Liganden bestimmt. Die Aktivität der Kernrezeptoren wird durch die Ko-Repressoren inhibiert und durch den Liganden wird die Bindung zwischen Repressor und Kernrezeptor gelöst, so dass der Kernrezeptor seine Aktivität aufnehmen kann. Diese durch den Liganden ausgelöste Konformationsänderung ist eine Manifestation auf Strukturebene, die die transkriptionelle Aktivierung des Kernrezeptors aufzeigt (Gronemeyer et al., 2004).

Bei den Säugern besteht die Familie der Kernrezeptoren bisher aus 49 bekannten Mitgliedern, wobei nur für 29 Mitglieder ein spezifischer natürlicher Ligand bekannt ist (Gronemeyer et al., 2004). HNF4 α zählt zu den Waisenrezeptoren (Orphan receptors), bei denen bisher kein natürlich vorkommender Ligand zugeordnet werden konnte, der die Aktivität von HNF4 α beeinflusst. Für HNF4 α wurden als natürliche Liganden in einigen Artikeln langkettige Fettsäuren vorgestellt (Hertz et al., 1998; Petrescu et al., 2002; Rajas et al., 2002). Die Bindung von HNF4 α zu den Fettsäuren konnte mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigt werden (Dhe-Paganon et al., 2002; Wisely et al., 2002; Sladek, 2002). Da aber ein nur sehr schwacher allosterischer Liganden-Effekt und kein Austausch der Fettsäuren beobachtet werden konnte, dient diese Verbindung der strukturellen Festigung und nicht der Aktivierung von HNF4 α (Bogan et al., 2000; Gronemeyer et al., 2004; Benoit et al., 2004). Die Aktivität von HNF4 α kann durch andere, ligandenunabhängige Mechanismen, gesteuert werden. So sind folgende Alternativen für HNF4 α gezeigt worden: Zum Einen kann durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die Aktivität von HNF4 α reguliert werden (z.B. HNF1 α) (Shih et al., 2001; Ferrer, 2002), zum Anderen wird die Aktivität durch die posttranskriptionelle Modifikation (Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Acetylierung) gesteuert (Gronemeyer et al., 2004). Aber auch über die Regulierung mittels Stickstoff-Monoxid (NO) ist für HNF4 α berichtet worden (Gronemeyer et al., 2004; Lucas et al., 2004; Vossen and Erard, 2002).

HNF4 α ist ein hochkonserviertes Gen, da selbst für Insekten (Sladek et al., 2001; Zhong et al., 1993) und für *Xenopus* (Holewa et al., 1997) ein HNF4 α -Ortholog nachgewiesen werden konnte. Das menschliche HNF4 α -Gen ist auf Chromosom 20 im Bereich q13.1-q13.2 lokalisiert und umfasst 12 Exons mit einer Länge von etwa 30kb (Argyrokastitis et al., 1997; Furuta et al., 1997). Aufgrund der Exon/Intron Struktur lassen sich neun verschiedene HNF4 α -Isoformen postulieren, von denen aber bisher nur sechs experimentell beschrieben wurden. Die in dieser Arbeit verwendete Splicevariante HNF4 α 2 besitzt im Vergleich zu der ersten isolierten HNF4 α 1-Variante (Sladek et al., 1990) eine Insertion von 10 Aminosäuren in der F-Domäne und zeigt eine verstärkte Interaktion mit Ko-Aktivatoren (Sladek et al., 1999). HNF4 α 2 wird im adulten Organismus in der Leber, im Pankreas, in der Niere,

im Magen-Darm-Trakt und im Nebenhoden exprimiert (Tanaka et al., 2006; Vincent and Robertson, 2004; Miquerol et al., 1994; Sladek et al., 1990).

HNF4 α wurde zuerst aus der Leber extrahiert (Costa et al., 1989) und die Funktion von HNF4 α ist in diesem Organ auch am besten charakterisiert. So zeigte sich, dass HNF4 α für die normale hepatische Funktion, für die Aufrechterhaltung des differenzierten Phänotyps und für die Homeostase des Lipid-Metabolismus essentiell ist (Hayhurst et al., 2001; Spath and Weiss, 1997; Naiki et al., 2005). Obwohl HNF4 α für die Differenzierung der Hepatozyten essentiell ist, spielt es für die primäre Leberentwicklung keine Rolle (Li et al., 2000). Im Pankreas wird HNF4 α sowohl in den endokrinen als auch in den exokrinen Zellen exprimiert, wobei das Expressionsniveau im Vergleich zur Leber deutlich geringer ausfällt (Miquerol et al., 1994; Tanaka et al., 2006). In den β -Zellen des Pankreas dient HNF4 α zur Regulation des Insulin-Metabolismus (Gupta et al., 2005). Im Gegensatz zu der Leber und dem Pankreas, in denen HNF4 α und seine Funktionen gut beschrieben sind, ist die spezifische Funktion von HNF4 α in der Niere nicht sehr gut charakterisiert. In der embryonalen Niere wird HNF4 α in den sich bildenden metanephrischen Tubuli und in sehr geringem Maße in der Henle-Schleife exprimiert (Taraviras et al., 1994). Im adulten Organismus wird HNF4 α in der Niere hauptsächlich in den proximalen Tubuli exprimiert (Chabardes-Garonne et al., 2003), welches auch auf Proteinebene bestätigt werden konnte (Jiang et al., 2003; Tanaka et al., 2006).

Die transkriptionelle Aktivität von HNF4 α erfolgt über die Bindung an spezifische Erkennungssequenzen („response elements“) in den regulatorischen Regionen der Zielgene (Mangelsdorf et al., 1995). HNF4 α ist homogen im Nukleus lokalisiert (Lucas et al., 2005) und es bindet als Homodimer an die als direkte Wiederholung vorliegende, von einer Base getrennte, spezifische Erkennungssequenz (A/G)GG(T/C)CA (Ellrott et al., 2002). Diverse Expressionsprofilstudien wurden mittels der Mikroarray-Technik für HNF4 α in ES-Zellen (Stoffel and Duncan, 1997; Duncan et al., 1997), in Leberzellen (Inoue et al., 2002; Spath and Weiss, 1997; Hayhurst et al., 2001; Parviz et al., 2003), in β -Zellen (Gupta et al., 2007), in der INS-1-Zelllinie (Erdmann et al., 2007; Wang et al., 2000; Thomas et al., 2004) und in der

HEK293-Zelllinie (Lucas et al., 2005) durchgeführt, dabei zeigte sich, dass die HNF4 α -regulierten Gene an dem Glukose-, dem Fettsäure-, dem Cholesterol-, dem Aminosäuren- und dem Medikamenten-Stoffwechsel beteiligt sind. Zusätzlich sind die HNF4 α -regulierten Gene an der Hämatopoese, der Blut-Gerinnung und der Zelladhäsion beteiligt (Sladek et al., 2001; (Gronemeyer et al., 2004). Die Anzahl der detektierten Gene schwankt bei den unterschiedlichen Analysen zwischen 56 - 910 Genen und ist abhängig vom untersuchten Zelltyp, dem verwendeten Array und der Auswertungsmethode.

Bei einer Kombination aus ChIP-Analyse und Mikroarray-Analyse aus Lebergewebe wurde gezeigt, dass HNF4 α an 1575 Gene bzw. deren Promotoren bindet (Odom et al., 2004). Das entspricht 12% der proteinkodierenden Gene. Ähnliche Daten wurden bei der selben Analyse an Pankreas-Gewebe für HNF4 α ermittelt. Bei beiden Gewebetypen hatte an 42% der RNA Polymerase II gebundenen Promotoren ebenfalls HNF4 α gebunden. Das bedeutet, dass annähernd die Hälfte der aktiven Gene in diesen Geweben durch HNF4 α -reguliert werden (Odom et al., 2004).

Bisher wurden nur in der von uns durchgeführten Studie HNF4 α -regulierte Gene in Nierenzellen identifiziert (Lucas et al., 2005). Diese Studie berücksichtigte die Hälfte der menschlichen proteinkodierenden Gene, so dass zu Beginn dieser Arbeit kein vollständiges Expressionsprofil für HNF4 α in Nierenzellen bekannt war.

2 HNF4 α und Krankheiten beim Menschen

2.1 MODY1

Eine Folge des Funktionsausfalls von HNF4 α im Pankreas ist die MODY1-Erkrankung. MODY1 (maturity-onset diabetes of the young 1) ist eine vererbte Form von Jugenddiabetes, welche durch ein frühes Ausbrechen der Krankheit (vor dem 25. Lebensjahr) und durch eine gestörte glukoseinduzierte Insulinsekretion der β -Zellen definiert ist (Yamagata et al., 1996; Ellard and Colclough, 2006). Die MODY1-Patienten, die mit einem mutierten und einem gesunden HNF4 α -Allel zur Welt kommen, sind nicht von Geburt an auffällig, sondern entwickeln erst nach mehreren Jahren Defekte im Insulin-Metabolismus. Obwohl HNF4 α heterozygot vorliegt, entwickeln bis zum Alter von 55 Jahren 95% der Träger die Stoffwechsel-

Störung (Frayling et al., 2001). Es ist nicht geklärt, warum der Ausbruch der Krankheit erst verzögert, dann aber mit einer hohen Penetranz auftritt. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang ein Zwei-Treffer-Model (ähnlich dem Two-Hit-Model von Knudson (Knudson, Jr., 1971) für die Tumorentwicklung), bei dem ein zweites Ereignis einen vollständigen Funktionsverlust von HNF4 α bedingt und dadurch die MODY1-Erkrankung ausbricht (Erdmann et al., 2007). Es sind 31 verschiedene heterozygote Mutationen im HNF4 α -Gen bekannt, welche zum Ausbruch von MODY1 führen, die sowohl kodierende als auch regulatorische Bereiche des Gens betreffen (Ellard and Colclough, 2006; Pearson et al., 2005). Der dadurch erzeugte Funktionsausfall von HNF4 α variiert hierbei von sehr gering bis nicht mehr vorhanden (Lausen et al., 2000). Eine in dieser Arbeit verwendete MODY-Mutation ist die R154X Mutation. Bei dieser Mutante ist das HNF4 α -Protein stark verkürzt und die Ligandenbindedomäne ist größtenteils deletiert (Lindner et al., 1997; Laine et al., 2000).

Bei den meisten Patienten, die eine heterozygote Mutation im HNF4 α -Gen tragen, ist hauptsächlich eine Beeinträchtigung der β -Zellen im Pankreas nachgewiesen, obgleich HNF4 α auch in anderen Geweben exprimiert wird. Studien, bei denen die metabolischen Prozesse der MODY-Patienten untersucht wurden, brachten allerdings auch Abweichungen in der Konzentration von Triglyceriden und Apolipoproteinen des Serums zu Tage. Diese Abweichungen deuten auf eine veränderte Genexpression der Hepatozyten hin, in welchen HNF4 α ebenfalls als ein wichtiger Transkriptionsfaktor fungiert (Lehto et al., 1999; Shih et al., 2000).

Bei Diabetes mellitus Typ 2 Studien und deren Ursachen beim Menschen wurde ein Defekt im HNF4 α -Gen als eine mögliche Ursache dargestellt (Gupta and Kaestner, 2004; Gupta et al., 2005; Gupta et al., 2007; Weedon et al., 2004). Unterstützt wird diese Vermutung durch den Befund, das HNF4 α in Diabetes-Patienten im Gegensatz zu einer gesunden Kontrollgruppe reprimiert wird (Gunton et al., 2005).

2.2 Krebserkrankungen

In chemisch induzierten hepatozellulären Karzinomen (HZK) konnte kein Funktionsausfall von HNF4 α nachgewiesen werden (Stumpf et al., 1995). Allerdings wurde später ein kausaler Zusammenhang zwischen der HNF4 α -Expression und der

Differenzierung des HZK berichtet (Ishiyama et al., 2003). Da HNF4 α eine wichtige Rolle in der Hepatocyten-Differenzierung spielt (Li et al., 2000) und es außerdem bekannt ist, dass die Expression von HNF4 α in unterschiedlichen Zelltypen zu einer verminderten Zellproliferation führt (Lucas et al., 2005; Chiba et al., 2005; Erdmann et al., 2007), wurde die Beteiligung von HNF4 α an der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms analysiert. In Mikroarray-Studien konnte in einigen HZK-Geweben eine Reprimierung von HNF4 α festgestellt werden (Choi et al., 2004). Allerdings bezog sich diese Beobachtung nicht auf alle untersuchten Proben (Xu et al., 2001). Bei einer Expressionsprofil-Analyse von HNF4 α induzierten Hepatoma-Zellen konnte gezeigt werden, dass HNF4 α ein zentraler Regulator des Metabolismus der Leber, wie z. B. dem Lipid-Stoffwechsel ist. Es konnten zwei HNF4 α -regulierte Gene identifiziert werden, für die ein direkter Bezug zu der Zellproliferation bekannt ist (p21 und CDK2) (Naiki et al., 2002).

Ein Funktionsausfall von HNF4 α in der Niere steht im Verdacht, die Bildung und/oder das Fortschreiten eines Nierenzellkarzinoms (NZK) zu begünstigen (Lucas et al., 2005). Bereits in einer Studie aus dem Jahr 1996 in unserem Labor konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit und die DNA-bindende Aktivität des HNF4 α -Proteins häufig im menschlichen Nierenzellkarzinom im Vergleich zu der korrespondierenden Normalniere reduziert sind (Sel et al., 1996). Zusätzlich ist die Expression von HNF4 α in NZK-Gewebeproben im Vergleich zu gesundem Nierengewebe 4,7-fach reprimiert (Lenburg et al., 2003). Diese Hinweise geben Anlass zur Vermutung, dass HNF4 α als ein Tumorsuppressorgen für Nierenzellkarzinome in Frage kommt.

Das Nierenzellkarzinom stellt mit nur ca. 3% eine relativ seltene Tumorerkrankung dar und wird in vier unterschiedliche Subtypen klassifiziert (Kovacs et al., 1997). Das klarzellige NRZ ist mit 70-80% der NZKe der am häufigsten diagnostizierte und im Krankheitsverlauf der aggressivste Typ (Linehan and Zbar, 2004; Jones and Libermann, 2007). Der zweithäufigste Subtyp ist mit 15% die papilläre Form des Nierenzellkarzinoms. Beide Formen haben ihren Ursprung in den Zellen des proximalen Tubulus, in welchen die Expression von HNF4 α spezifisch nachgewiesen werden konnte (Vincent and Robertson, 2004; Jiang et al., 2003; Taraviras et al., 1994). Ausgehend von den Zellen des Sammelrohres entfallen jeweils 5% der NZK auf die chromophobe und die onkozytome Form (Jones and Libermann, 2007; Linehan and Zbar, 2004; Weiss and Lin, 2006).

Das bekannteste Gen für die Tumorgenese des NZK ist das VHL-Gen. Es wurde bereits 1993 im Rahmen einer Studie zur Hippel-Lindau-Syndrom-Erkrankung beschrieben (Latif et al., 1993). Mutationen im VHL-Tumorsuppressor-Gen verursachen Akkumulationen der hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF1 α und HIF1 β), wodurch eine gesteigerte Transkription von mehreren HIF-induzierbaren Genen ausgelöst wird. Darunter sind mehrere bekannte Zielgene wie VEGF, EGFR, TGFA, Glut 1, PDGF (Linehan and Zbar, 2004; Gnarra et al., 1993), CXCR4 und HIG2 (Jones and Libermann, 2007). Bisher existieren keine Daten bezüglich einer Verbindung zwischen VHL und HNF4 α .

In den letzten Jahren wurden einige Expressionsstudien an Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen und gesundem Nierengewebe durchgeführt (Tabelle 1) (Lenburg et al., 2003; Sultmann et al., 2005; Takahashi et al., 2003; Vasselli et al., 2003; Jones et al., 2005; Jones and Libermann, 2007; Higgins et al., 2003; Boer et al., 2001; Perroud et al., 2006; Hirota et al., 2006; Higgins, 2006; Schuetz et al., 2005). Verglichen wurden entweder die unterschiedlichen NZK-Typen untereinander oder auch NZK-Gewebe zum korrespondierendem gesunden Nierengewebe. Dabei sind verschiedene Subtyp-spezifische Tumormarker und prognostische Marker der Nierenzellkarzinome identifiziert worden. Es sind auch Gene identifiziert worden, die differenziell im Nierenzellkarzinom exprimiert sind und deshalb vielversprechende Kandidaten für die Beteiligung an der Tumorgenese sind. Wenn man die Ergebnisse der Studien miteinander vergleicht, zeigen sich allerdings nur wenige Überlappungen der regulierten Gene und für die identifizierten Gene muss zudem noch ein kausaler Zusammenhang zur Tumorenstehung bzw. dem Fortschreiten der Krankheit bestätigt werden. Die geringe Zahl von Überlappungen mag zum Einen an den unterschiedlichen Gewebetypen liegen, aber auch an den verschiedenen Technologien und deren Auswertungsmethoden. Die wohl aussagekräftigste Publikation ist die von Lenburg et al veröffentlichte, da sie auf Daten aus fünf verschiedenen Studien zurückgreift und diese miteinander vergleicht (Lenburg et al., 2003).

Tabelle 1: Expressionsprofil-Studien zur Identifizierung von NZK-assoziierten Genen Aufgelistet wurden die Studien, die die Gesamtzahl an regulierten Genen ermittelt haben. Die Genregulation bezüglich der verschiedenen Differenzierungsgrade des NZKs wurde nicht berücksichtigt.

Publikation	Anzahl der identifizierten Gene
Boer et al 2001	1738
Higgins et 2004	1548
Hirota et al 2006	978
Jones et al 2005	1852
Jones et al 2007	1957
Lenburg et al 2003	1233
Schütz et al 2005	4030
Sültmann et al 2005	1224

3 Funktionsanalyse von HNF4 α

3.1 Funktionsanalyse am Mausmodell für HNF4 α

HNF4 α knock-out Mäuse zeigen eine defekte Entwicklung in der frühen Gastrula und sterben am neunten Tag. Da keine homozygoten knock-out Tiere überlebensfähig sind und Tiere mit einem heterozygoten Genotyp eine unauffällige Entwicklung zeigen, ist eine Haploinsuffizienz durch das Mausmodell auszuschließen (Chen et al., 1994).

Mittels β -Zell-spezifischer Deletionen am Mausmodell konnte bestätigt werden, dass HNF4 α für die Regulation des Insulin-Metabolismus verantwortlich ist (Gupta et al., 2005). Eine darmspezifische Deletionen am Mausmodell zeigte, dass HNF4 α essentiell für dessen Entwicklung ist, insbesondere für die Reifung der Becherzellen und für die Differenzierung der Darm-Epithelzellen (Garrison et al., 2006). Und durch leberspezifische Deletionen von HNF4 α in Mausembryos (Parviz et al., 2002) konnte gezeigt werden, dass HNF4 α für die Bildung des hepatischen Epitheliums und der charakteristischen Leberarchitektur entscheidend ist (Parviz et al., 2003). Dabei bewirkt die ektopische HNF4 α -Expression eine Transformation vom Mesenchymal-Gewebe zu einem Epithelial-Gewebe. Durch Mikroarray-Analyse konnte gezeigt werden, dass HNF4 α diese Transformation durch die orchestrierte Regulation von insgesamt 27 Adhäsions-Genen bewirkt. Für 25 der 27 Gene wurde im Promotor-Bereich mindestens eine HNF4 α -Bindestelle identifiziert und bei 18 der 27 Gene

konnte eine direkte Regulation durch HNF4 α nachgewiesen werden (Battle et al., 2006).

An einer aus Mäusen etablierten hepatozellulären Karzinom-Zelllinie wurde das Fortschreiten der Krebserkrankung untersucht. Es zeigte sich, dass die langsam wachsenden Zellen sich zu schnell wachsenden Zellen entwickeln konnten und dabei ihre Polarität verloren, ihre Zell-Zell-Adhäsion und ihre Zell-Extrazelluläre-Matrix-Adhäsion vermindert war und weniger leberspezifische Gene exprimiert wurden. Einher ging der Verlust von HNF4 α . Nach einer Reaktivierung von HNF4 α in den kultivierten schnell wachsenden Zellen erfolgte eine Verlangsamung der Proliferation, die Zellen bildeten erneut ein Epithel aus und auch die Adhäsion der Zell-Extrazellulären Matrix wurde erneut gebildet. Zusätzlich wurde ein Großteil der leberspezifischen Transkriptionsfaktoren re-exprimiert und so konnte der differenzierte Phänotyp von Hepatozyten wiederhergestellt werden. Die HNF4 α Re-Expression führte nicht nur zu einer Senkung der Zellproliferationsrate *in vitro*, sondern im Mausmodell ebenfalls zu einer Verminderung der Tumorbildung *in vivo* (Lazarevich et al., 2004).

Bisher ist keine nierenspezifische knock-out Maus generiert worden, so dass über die Funktion von HNF4 α in der Niere ausschliesslich mittels der Zellkultur-Analysen geforscht werden kann.

3.2 HNF4 α -Funktionsanalyse an Zellkulturen

Die HEK293-Zelllinie (human embryonic kidney 293) wurde ursprünglich aus embryonalem Nierengewebe mittels eines Adenovirus etabliert (Graham et al., 1977). Die ersten Versuche in unserem Labor zeigten, dass HNF4 α die Proliferation von HEK293-Zellen hemmt (Dissertation Lausen, 2001 <http://miless.uni-duisburg-essen.de>), so dass eine Funktionsanalyse mit einem konstitutiv aktiven HNF4 α -Gen nicht möglich war. Um die proliferativen Eigenschaften von HNF4 α zu untersuchen wurde daher eine Tetracyclin-induzierbaren HEK293-Zelllinie etabliert (Lucas et al., 2005).

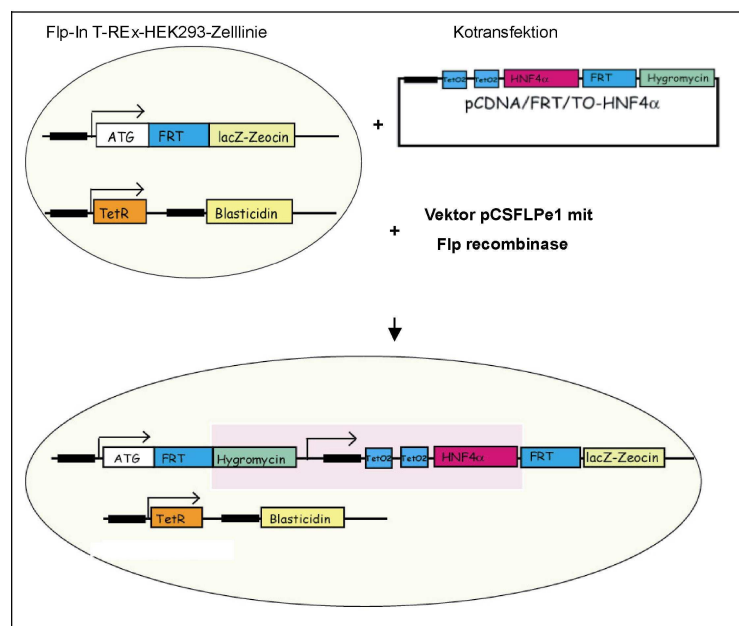


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Generierung der Flp-In T-Rex 293-Zelllinie In der Flp-In™ T-Rex™ 293-Zelllinie (Invitrogen) sind die Plasmide der FRT-Sequenz und der Tet-Repressor stabil ins Genom integriert. Die Zelllinie wurde mit dem pcDNA5/FRT/TO-HNF4 α -Vektor und dem Expressionsvektor pCSFLPe1 kotransfiziert und mittels Hygromycin selektioniert. Durch die homologe Rekombination wird das pcDNA5/FRT/TO-HNF4 α -Plasmid gezielt stabil ins Genom integriert.

In Abbildung 2 ist die Generierung der HEK293-Zelllinie für ein stabil integriertes HNF4 α -Gen dargestellt. Eine Kotransfektion des pcDNA5/FRT/TO-HNF4 α Plasmids zusammen mit dem Plasmid, welches die Flp-Rekombinase enthält (pCSFLPe1) führt zur Rekombination der zwei FRT-Sequenzen, wodurch das pcDNA5/FRT/TO-HNF4 α Plasmid an den FRT-Locus der Ursprungs-HEK293-Zelllinie integriert wird. Da das pcDNA5/FRT/TO-HNF4 α Plasmid ein Hygromycin-Resistenz-Gen enthält, können die Zellen selektioniert werden, bei denen die Rekombination stattgefunden hat. Der durch die Transfektion entstandene Funktionsverlust des Lac-Z-Gens dient dem Nachweis einer erfolgreichen Integration des Konstruktes. Dieses Zellsystem verfügt über zwei entscheidende Vorteile, erstens wird pro Zelle nur eine Kopie des gewünschten Gens integriert und zweitens findet diese Integration gezielt immer am selben Ort statt, so dass mit dieser Technik keine unterschiedlichen Zellklone entstehen.

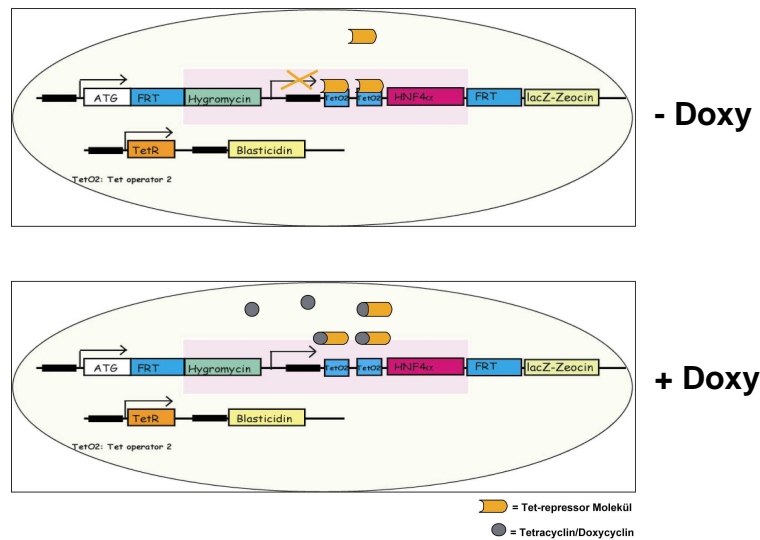


Abbildung 3: Die Expression des Gens wird durch die Zugabe von Tetracyclin induziert Die Expression des Gens wird in der Zelle durch den Tet-Repressor reprimiert und erst die Zugabe von Tetracyclin führt zu der Induktion der Expression. Dazu bindet das Tetracyclin an das Repressormolekül und bewirkt eine Konformationsänderung wodurch sich das Repressormolekül von dem Tet-Operator löst. FRT: Flp-Rekombinase Erkennungssequenz, lacZ: Lac-Z-Gen (kodiert für β -Galaktosidase), TetR: Tetracyclin-Repressor, 2xTetO2: zwei Tet-Operator Sequenzen

Die Induktion des gewünschten Gens (HNF4 α) mittels des Tetracyclins ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Durch die konstitutive Aktivität des Tet-Repressors ist die Expression des integrierten Gens reprimiert und erst durch die Zugabe von Tetracyclin in das Medium wird die Bindung zwischen dem Repressor und dem Tet-Operator gelöst und die Expression von HNF4 α ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass das integrierte Gen (HNF4 α 2) sehr effektiv mit 1000 ng / ml Tetracyclin induziert werden konnte (Lucas et al., 2005).

Nach Induktion von HNF4 α konnte mittels Zellproliferationsassays die zuvor beobachtete Proliferationshemmung bestätigt werden. Zusätzlich wurden noch zwei unabhängige HNF4 α -Mutanten stabil transfiziert, um die Spezifität von HNF4 α bei den Versuchen abzusichern. Bei der mit MODY1 assoziierten Mutante HNF4 α R154X handelt es sich um ein Protein, welches durch eine nonsense Mutation verkürzt ist (Lindner et al., 1997). Diese Mutante hat einen großen Teil ihrer transkriptionellen Aktivität verloren (Laine et al., 2000). Die Mutante HNF4 α C106R weist einen Aminosäureaustausch in der zweiten Zinkfinger-Domäne der DNA-Bindungsdomäne auf. Dieser dominant-negativ wirkenden Mutante ist es dadurch

nicht mehr möglich, an die DNA zu binden und eine transkriptionelle Kontrolle auszuüben (Taylor et al., 1996). Bei beiden Mutanten konnte keine Veränderung der Zellproliferation beobachtet werden (Lucas et al., 2005). Zusätzlich wurde eine Veränderung der Zell-Morphologie bei der Expression von HNF4 α beobachtet. Die Zellen verloren ihre typische Monolayer-Struktur und es bildeten sich Konglomerate von Zellen, die einen dreidimensionalen Wuchs aufwiesen. Die Induktion der beiden Mutanten-Zelllinien erzeugte keine Beeinflussung der Zellmorphologie (Lucas et al., 2005).

Um die Gene zu identifizieren, die in Nierenzellen durch HNF4 α -reguliert werden und die bei der Vermittlung der Zellproliferation beteiligt sind, wurde eine Expressionsprofilstudie anhand dieser induzierbaren HEK293-Zelllinie durchgeführt. Bei dieser Mikroarray-Analyse wurde die Hälfte aller menschlichen proteinkodierenden Gene bezüglich ihrer Regulation durch HNF4 α untersucht. Es wurden 65 Gene nachgewiesen, die durch HNF4 α mindestens zweifach reguliert waren. 13 dieser Gene waren sowohl durch HNF4 α reguliert (Lucas et al., 2005) als auch im NZK dereguliert (Lenburg et al., 2003). Es ist zu vermuten, dass diese Gene im NZK aufgrund der verminderten HNF4 α -Expression dereguliert sind.

Es wurden vier (WT1, DSC2, MTM1 und SEPP1) der 65 Gene ausgewählt, die mittels einer Überexpression in der HEK293-Zelllinie auf ihr Potential zur Vermittlung der Zellproliferationskontrolle überprüft werden sollten. Dazu wurde die Zellproliferation und auch die Morphologie der induzierten Zellen im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen analysiert. Die Überexpression der vier getesteten Kandidatengene konnte weder die Zellproliferation hemmen noch die Zellmorphologie beeinträchtigen. Demzufolge verfügt keines der vier Gene über das Potential die durch HNF4 α hervorgerufene Effekte auf Zellproliferation oder Zellmorphologie zu vermitteln (Lenburg et al., 2003).

Somit konnte die antiproliferative Wirkung von HNF4 α in HEK293-Zellen dokumentiert werden, aber die dadurch ausgelösten Signalwege, die zur Hemmung der Zellproliferation führen, blieben ungeklärt (Dissertation B. Lucas 2005; <http://miless.uni-duisburg-essen.de>).

4 Zielsetzung der Arbeit

Zunächst soll untersucht werden, ob die durch HNF4 α verursachte Proliferationshemmung unabhängig von der Morphologie-Veränderung erfolgt oder ob diese als ein sekundäres Ereignis der Morphologie-Veränderung entsteht. Hierzu wird eine mögliche Steigerung der Zellproliferation mittels einer Gelatine-Beschichtung der Zellkulturschalen untersucht.

Obwohl für HNF4 α eine homogene Verteilung im Zellkern beschrieben worden ist (Lucas et al., 2005), ist bei Zellen, die sich in der Mitose befinden, eine punktuelle Ansammlung des HNF4 α -Proteins in den Zellen aufgefallen. Daher wird ein möglicher Zusammenhang zwischen der HNF4 α -Lokalisation während der Mitose und der Proliferationskontrolle untersucht.

In Leberzellkulturen wurde nach einer langfristigen HNF4 α -Expression eine Differenzierung der Zellen nachgewiesen (Lazarevich et al., 2004). Daher wird eine langfristige HNF4 α -Expression in HEK293-Zellen induziert, um eine mögliche Ausdifferenzierung der HEK293-Zellen zu untersuchen.

Da bisher kein vollständiges Expressionsprofil für HNF4 α in Nierenzellen existiert, sollen alle durch HNF4 α -regulierten Gene in Nierenzellen identifiziert werden. Mit Hilfe der Mikroarray-Technologie soll ein Expressionsprofil der proteinkodierenden Gene für HNF4 α in den HEK293-Zellen erstellt werden.

Um die durch HNF4 α induzierten Signalwege der Proliferations- und Morphologiekontrolle aufzuklären, sollen die hierfür relevanten, HNF4 α -regulierten Gene identifiziert werden. Da einige Gene erst ab einer bestimmten Konzentration eines Transkriptionsfaktors reguliert werden (Magee et al., 2003), können Gene, die bei einer minimalen HNF4 α -Expression keine signifikante Regulation aufweisen, als Kandidaten für die Vermittlung der Proliferations- und Morphologiekontrolle ausgeschlossen werden.

Um möglichst viele Kandidatengene in kurzer Zeit bezüglich der Vermittlung der Proliferationskontrolle zu untersuchen, wird ein RNAi-Screen durchgeführt. Durch die Reprimierung einzelner Gene soll deren Einfluss auf die Zellproliferation ermittelt werden.

Weiterhin sollen die als proliferationsrelevant identifizierten Kandidatengene einzeln in den HEK293-Zellen überexprimiert werden, um diejenigen zu identifizieren, die unabhängig von anderen Genen das Potential aufweisen, die Proliferation der HEK293-Zellen zu beeinflussen.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in analytischer Qualität von den Firmen Aldrich, Amersham Biosciences, Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Fluka, Gibco, Merck, Roth, Serva oder Sigma bezogen. Falls nicht anders angegeben wurden die verwendeten Lösungen und Puffer nach Protokollen der Methodensammlung von Sambrook et al (1990) hergestellt. Restriktionsenzyme und modifizierte Enzyme stammten von den Firmen Roche, Invitrogen, New England Biolabs und Pharmacia. Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

1.2 Zellkultur

Zellkultur-Material wurden von den Firmen TTP und Nunc bezogen.

2 Molekularbiologische Methoden

2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Techniken wie Gelelektrophorese, Restriktionsverdauung, Ligationen, sowie Aufzucht und Transformation von Bakterien wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1990) durchgeführt. Zur Aufreinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet. Aus Gelen wurde DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert. Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (bis 20 µg) aus Bakterienkulturen erfolgte mit einer Methode, die auf alkalischer Lyse beruht (Sambrook et al., 1990). Große Mengen Plasmid-DNA (bis 500 µg) wurden mit dem „Nucleobond® PC500 AX Kit“ (Machery und Nagel) gewonnen.

Sequenzierungen wurden entweder vom Sequenzierservice der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen (Institut für Humangenetik, Essen) oder von der Arbeitsgruppe I (Prof. Küppers) des Instituts für Zellbiologie durchgeführt. Es wurde ausschliesslich mittels der Primer T₃, T₇ oder M13_{for} und M13_{rev} (Tabelle 6) sequenziert.

2.2 Plasmide

pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen): Alle cDNA-Konstrukte, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden in dieses Plasmid kloniert. Da das Plasmid eine FRT-Sequenz (Flp-Rekombinase Erkennungssequenz) enthält, kann es durch homologe Rekombination ins Genom der Flp-In T-Rex 293-Zelllinie (Invitrogen), die ebenfalls eine FRT-Sequenz enthält, integriert werden.

pcDNA5/FRT/TO ALDH6A1: Die humane ALDH6A1-Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pCMV6-XL5 (OriGene;TC116671) herausgeschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO BPHL: Die humane BPHL-Sequenz wurde mit *KpnI* und *NotI* aus dem Expressionsvektor pCR®-Blunt II-TOPO (RZPD;IRAMp995A0914Q) herausgeschnitten und in das *KpnI* und *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO CCNH: Die humane CCNH-Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pCMV6-XL5 (OriGene,TC119370) herausgeschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO CDKN1A: Die humane CDKN1A-Sequenz wurde mit *EcoRI* aus dem Expressionsvektor pOTB7 (RZPD;IRAUp969A0177D) herausgeschnitten und in den pBluescript SK+ Vektor kloniert. Anschließend wurde die CDKN1A-Sequenz aus dem pBluescript SK+ Vektor mit *HindIII* und *BamHI* herausgeschnitten und in das *HindIII* und *BamHI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO EFHD1: Die humane EFHD1-Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pCMV6-XL5 (OriGene;TC120618) herausgeschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO EPHX2: Die humane EPHX2-Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pCMV6-XL4 (OriGene;TC125312) herausgeschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO ICAM3: Die humane ICAM3-Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pCMV6-XL4 (OriGene;TC118788) herausgeschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO NELL2: Die humane NELL2-Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pCMV6-XL5 (OriGene;TC116281) herausgeschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO PROS1: Die humane PROS1-Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pCMV6-XL5 (OriGene;TC119963) herausgeschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO SMARCE1: Die humane SMARCE1-Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pCMV6-XL5 (OriGene;TC118214) herausgeschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO TGFA: Die humane TGFA-Sequenz wurde mit *EcoRI* und *BamHI* aus dem Expressionsvektor pDNR-LIB (Open Biosystems;MHS1011-62512) herausgeschnitten und in den *EcoRI* und *BamHI* geschnittenden pBluescript SK+ Vektor kloniert. Anschließend wurde die TGFA-Sequenz aus diesem pBluescript SK+ Vektor mit *HindIII* und *NotI* herausgeschnitten und in das *HindIII* und *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

Alle Sequenzen wurden durch eine Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

3 Proteinbiochemische Methoden

3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst, in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 900 rpm und RT zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 1 min, 4°C) wurden die Zellen in eiskaltem RIPA-Puffer (50mM TrisHCl pH 7,2, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Natriumdeoxycholat, 1% Triton X-100) mit Protease-Inhibitoren (Sigma; P8340,

1:500) resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (50.000 rpm, 10 min, 2°C) abgetrennt, und das Lysat bei -80°C gelagert.

3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen von Proteinen in einer Lösung wurde mit der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Dazu wurde das Bio-Rad Protein-Assay Reagenz (Bio-Rad) verwendet. Eine Eichgrade mit verschiedenen Mengen an Rinderserumalbumin (BSA) (2 bis 20 µg) wurde zu Beginn erstellt. 2-10 µl Proteinlösung wurden in 1600 µl H₂O in Plastik Küvetten verdünnt und mit 400 µl Bio-Rad Protein-Assay-Reagenz vermischt. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 596 nm mit einem Spectrophotometer (S2000 WPA) gemessen. Mit Hilfe der Eichgrade wurde die Konzentration der Proteinlösung ermittelt. Als Kontrolle wurde der RIPA-Puffer, in welchem die Proteine gelöst waren, verwendet.

3.3 SDS-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese in einem von Laemmli etablierten SDS-haltigen, Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem verwendet (Laemmli, 1970). Dafür wurde eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur (Mini-Protean 3 System von Bio-Rad) eingesetzt. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden 7,5% oder 10%ige Trenngele verwendet. Die darauf geschichteten Sammelgele wiesen eine Polyacrylamidkonzentration von 5% auf. Als Standard diente „Precision Plus protein Standards, Dual Color“ (Bio-Rad). Die Proben für die SDS-Gelelektrophorese wurden mit einem 2x Laemmli-Puffer (100mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden sie bei 100 V getrennt.

3.4 Western Blot

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, wurden nach der „semi dry“-Methode elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher & Schuell) übertragen. Hierfür wurden Membran und Gel zwischen mehrere mit Transfer-Puffer getränkte Filterpapiere (Whatmann) gelegt und zwischen zwei Flächenelektroden eingespannt (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Der Transfer erfolgte innerhalb einer Stunde bei 2 mA/cm². Nach dem Proteintransfer

wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit 5%iger Trockenmilch (AppliChem) in TBS-T abgesättigt. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation der Membran mit dem entsprechenden spezifischen primären Antikörper. Zur Detektion des primären Antikörpers dienten Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper (Tabelle 2). Nach jeder Antikörper-Inkubation erfolgte dreimaliges Waschen mit TBS-T bei Raumtemperatur. Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurde das ECL-Kit der Firma Amersham Bioscience nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte je nach Antikörper innerhalb von 5 Sekunden oder 50 min durch Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Bioscience).

Die Aktin-Detektion erfolgte im Anschluß an die erste Detektion von CDKN1A als Kontrolle. Hierzu wurde die Membran für 30 min mit 100 mM Glycin (pH 2,9) für 30 min bei RT behandelt und anschließend erfolgte ein 5 minütiger Waschgang mit TBS-T. Daraufhin schloß sich die Detektion von Aktin an.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper und Bedingungen für Western Blot

	1. Antikörper	2. Antikörper
myc-tag	9E10 monoklonal, laboreigen (1:5 in PBS-T, 90 min RT)	Anti-Maus-HRPO, NXA 931 (Amersham) (1:5.000 in PBS-T, 60 min, RT)
HNF4 α	HNF-4 α , C-19 (Santa Cruz Biotechnologie) (1:1000 in TBS-T und 1% Trockenmilch, 60 min, RT)	Anti-Ziege-HRPO, A9452 (Sigma) (1:50.000 in TBST und 1% Trockenmilch, 60 min, RT)
CDKN1A	Anti-CDKN1A, C19 sc-397 (Santa Cruz Biotechnologie) (1:200 in TBS-T und 1% Trockenmilch, 60 min, RT)	Anti-goat und rabbit-HRPO (Dianova) (1:10.000 in TBS-T und 1% Trockenmilch, 60 min, RT)
Aktin	Anti-Actin, I-19 sc-1616 (Santa Cruz Biotechnologie) (1:1000 in TBS-T und 1% Trockenmilch, 60 min, RT)	Anti-goat-sheep HRPO, (Sigma) (1:50.000 in TBST und 1% Trockenmilch, 60 min, RT)

PBS-T:	PBS + 0,1% Tween20
Transferpuffer: 4	8mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375%SDS, 20% Methanol
Blockierungspuffer:	150 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7,5
TBS-T:	TBS + 0,05% Tween20

4 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit eukaryonten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar Flow Arbeitsbank durchgeführt.

4.1 Auftauen von Zellen

Zur Reaktivierung von Zelllinien, die in Kryoröhrchen als Suspension mit 10% DMSO (v/v) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, wurden die Zellen in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut. Dann wurden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen gegeben und mit 10 ml kaltem Medium verdünnt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium gewechselt um DMSO-Rückstände zu entfernen. Bei diesem Mediumwechsel wurden auch alle Antibiotika dem Medium zugesetzt.

4.2 Kulturbedingungen

Die Ausgangszelllinie Flp-In T-Rex 293 (Invitrogen) und die damit hergestellten stabilen Zelllinien wurden nach dem Invitrogen-Handbuch „Groth and Maintenance of Flp-In T-Rex Cell Lines“ kultiviert. In der Tabelle 3 sind die verwendeten Medien aufgeführt. Die Kulturbedingungen für die INS-1-HNF1 α und HNF1 β -Zelllinien sind ebenfalls in der Tabelle 3 aufgelistet. Abbildung 4 zeigt die verwendeten Konstrukte für die in der Arbeit hauptsächlich verwendeten HNF4 α -Zelllinien.

Die Zellen wurden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7,5% (HEK293) oder 8,5% (INS-1) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Tabelle 3: Kulturmedium für die verwendeten Zelllinien

Flp-In T-rax 293-Zelllinie Medium + Blasticidin+Zeocin	Flp-In T-Rex 293 + cDNA Konstrukt Zelllinie Medium + Blasticidin+Hygromycin	INS-1- + cDNA Konstrukt Zelllinie Medium + Blasticidin+Hygromycin
DMEM mit 4,5 g/l Glucose	DMEM mit 4,5 g/l Glucose	RPMI
10% FCS	10% FCS	10% FCS
1% Penicillin / Streptomycin (10.000U/ml)	1% Penicillin / Streptomycin (10.000U/ml)	1% Penicillin / Streptomycin (10.000U/ml)
1% L-Glutamin (200 mM)	1% L-Glutamin (200 mM)	1% L-Glutamin (200 mM)
15 μ g/ml Blasticidin	15 μ g/ml Blasticidin	15 μ g/ml Blasticidin
100 μ g/ml Zeocin	50 μ g/ml Hygromycin B	75 μ g/ml Hygromycin B

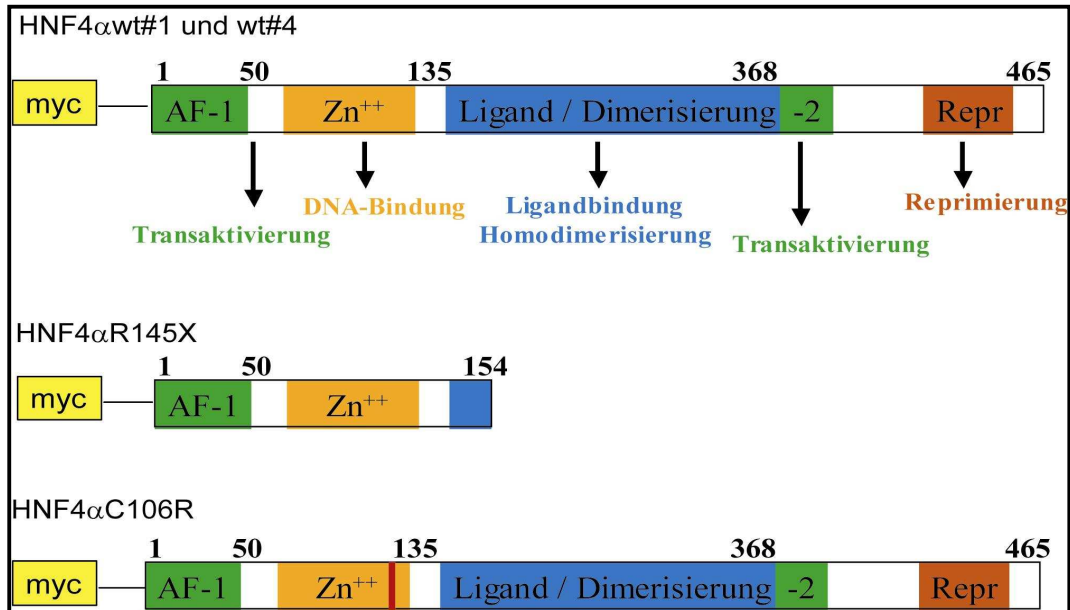


Abbildung 4: Stabil integrierte HNF4 α -Konstrukte in der HEK293-Zelllinie
 Dargestellt sind die verwendeten Konstrukte HNF4 α wt#1 und wt#4 sowohl wie HNF4 α R145X#1 und C106R#6. Diese Zelllinien waren zu Beginn der Arbeit bereits im Labor etabliert (Lucas et al., 2005).

4.3 Subkultivierung von Zellen

Die Zellen wurden jeweils bei annäherndem Erreichen der Konfluenz in eine neue Schale umgesetzt. Konfluenz war bei den HEK293-Zellen nach einer Aussaat von ca. 1×10^6 Zellen in einer 10 cm \varnothing -Schale mit 10 ml Kulturmedium nach drei bis vier Tagen erreicht. Unter den gleichen Bedingungen war bei den INS-1-Zellen die Konfluenz nach sieben Tagen erreicht. Zur Subkultivierung wurde zunächst das alte Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült und eine Lösung aus Trypsin-Versen wurde zugegeben. Die Abrundung und Ablösung der Zellen war nach maximal 3 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C abgeschlossen. Daraufhin wurde die Trypsinaktivität mit Kulturmedium gestoppt. Je nach Bedarf wurden die Zellen verdünnt und in neue Kulturgefäße überführt.

4.4 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Vor dem Zählen wurden die Zellen mit einer Trypsin-Versen-Lösung von der Gefäßoberfläche abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen in jedem der vier Eckquadrate und Mitteln dieser Zahlen sowie anschließender Multiplikation mit dem Faktor 1×10^4 wurde die Zellzahl pro ml Zellsuspension erhalten.

4.5 Kryokonservierung

Zur Erhaltung der Zelllinien wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden 10^7 Zellen in 3 ml kaltem Einfriermedium (Kulturmedium ohne Antibiotika + 10% FCS + 10% DMSO) aufgenommen und in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen (1,8 ml) überführt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst in einer Styroporbox auf -80°C heruntergekühlt. Nach 24 - 48 Stunden wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert.

5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde verwendet, um das Vorhandensein oder die Lokalisation von Proteinen in Zellen zu untersuchen. Dafür wurden die Zellen auf 6-well Platten verteilt, in die zuvor sterile Glasplättchen eingebracht wurden. 1×10^5 bis 3×10^5 Zellen wurden pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Methanol für 10 min bei RT fixiert und danach erneut zweimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation mit PBS / 10% Ziegen Serum für 1 Stunde bei 4°C gesättigt. Die Zellen wurden dann mit dem jeweiligen Erst- und Zweitantikörper inkubiert (Tabelle 4). Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte im Dunkeln. Das DNA-spezifische Fluorochrome Hoechst A 33342 (Sigma) wurde zur Kernfärbung eingesetzt. Dazu wurden die Zellen für 5 min mit Hoechst 33342 (1:1000 in H_2O) bei RT inkubiert und anschließend wurden die Zellen mit Vectashield (Vector-Laboratories) eingedeckt. Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (DM IRE2, Leica) analysiert. Die Dokumentation erfolgte mittels einer am Mikroskop installiert Digitalkamera (DC 500, Leica) und dem Bildverarbeitungsprogramm Qfluoro.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Induktionsbedingungen

	1.Antikörper	2.Antikörper
myc-tag	9E10 monoklonal, laboreigen (1:4 in DMEM, 60 min RT)	Anti-Maus-Cy3 (Jackson ImmunoResearch) (1:200 in PBS / 10% Ziegen Serum, 60 min, 4°C)
Doppelimmunfluoreszenz		
myc-tag	9E10 monoklonal, laboreigen (1:4 in DMEM, 60 min, RT)	Anti-Maus-FITC (Dianova) (1:200 in PBS / 10% Ziegen Serum, 60 min, 4°C)
γ -tubulin	Anti- γ -tubulin monoklonal (Sigma-Aldrich) (1: 600 in DMEM, 60 min, RT)	Anti-Kaninchen-Cy3 (Dianova) (1:400 in PBS / 10% Ziegen Serum, 60 min, 4°C)

6 Herstellung stabiler induzierbarer Zelllinien mit dem Flp-in T-Rex System

6.1 Flp-In T-Rex 293-Zellen

Zur Etablierung von HEK293-Zellen, die verschiedene Konstrukte konditional exprimieren, wurde die Flp-In T-Rex 293-Zelllinie (Invitrogen) eingesetzt. In dieser Zelllinie ist eine Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase (FRT-Sequenz) und ein Expressionsplasmid für den Tet-Repressor stabil in die genomische Sequenz integriert (Abbildung 2).

Zur Integration des pcDNA5/FRT/TO-Plasmids in die Flp-In T-Rex 293-Zellen durch Flp-vermittelte Rekombination wurden die Zellen mit dem pcDNA5/FRT/TO-Plasmid zusammen mit dem Flp-Rekombinase Expressionsvektor pCSFLPe1 (Werdien et al., 2001) im Verhältnis 1:1 kotransfiziert. Für die Transfektion wurden am ersten Tag 3×10^5 Zellen auf 6-well Platten ausplattiert. Am zweiten Tag erfolgte die Transfektion, wobei insgesamt 1,6 µg Plasmid-DNA pro well transfiziert wurden. In 4,5 ml Reaktionsgefäß mit rundem Boden wurden 100 µl Lipofectamine (Invitrogen) (1:17,5 in serumfreiem OptiMem-Medium (Invitrogen) verdünnt) vorgelegt. Dazu wurden 100 µl in OptiMem verdünnte DNA tropfenweise dazugegeben, das Gemisch geschüttelt und 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Zellkulturmedium durch 1,5 ml serumfreies OptiMem-Medium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Lipofectamine-DNA-Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit frischem Medium (Medium + Blasticidin, ohne Zeocin), versetzt.

Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und auf 10cmØ-Schalen ausgesät. 24 Stunden danach wurden die Zellen mit Hygromycin haltigem Medium (50µg/ml Hygromycin) (Tabelle 3) selektiert. Nach 10-14 Tagen war die Selektion abgeschlossen und es befanden sich nur noch Hygromycin-resistente Zellkolonien in den Schalen. Die Kolonien wurden entweder einzeln trypsinisiert und dann expandiert, oder aber gemeinsam trypsinisiert, vereinigt und expandiert. Sobald wie möglich wurden Aliquots von den entstandenen mono- und polyklonalen Zelllinien eingefroren und die Zelllinien wurden mit Hilfe des β-Galaktosidase-Tests auf die stabile Integration der Konstrukte überprüft.

In dem β-Galaktosidase-Test wird die Aktivität des Expressionsproduktes des Lac-Z-Reportergens, der β-Galaktosidase gemessen. Die Messung beruht auf der Fähigkeit

des Enzyms das Substrat X-Gal innerhalb der Zelle in ein blau gefärbtes Produkt umzuwandeln. Zum Nachweis der Aktivität der β -Galaktosidase wurden Hygromycin resistente Zelllinien, die in 6-well Platten ausgesät worden waren, zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS mit 1% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd fixiert. Danach wurden die Zellen erneut einmal mit PBS gewaschen und 1-24 Stunden in PBS mit 5 mM Kaliumferricyanid, 5 mM Kaliumferrocyanid, 2 μ M $MgCl_2$ und 1 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen im Lichtmikroskop auf ihre β -Gal-Expression hin untersucht. Die Anzahl der blau gefärbten Zellen wurde in zufällig ausgewählten Feldern ausgezählt.

6.2 Induktion der Zelllinien mit Doxycyclin

Für die Induktion der Expression der stabil eingeführten Gene wurden die Zellen, wenn nicht anders beschrieben, in Medium mit Doxycyclin (1000 ng / ml) kultiviert. Da Ethanol als Lösungsmittel für Doxycyclin dient, wurden die Kontrollzellen mit der gleichen Konzentration an Ethanol behandelt. In allen Experimenten wurden die Zellen 24 Stunden vor Doxycyclin-Zugabe ausgesät. Es wurde das Tetracyclin-Derivat Doxycyclin gewählt, da es eine höhere Halbwertszeit als Tetracyclin aufweist (48 Stunden versus 24 Stunden). Bei längeren Inkubationszeiten als zwei Tage, wurden das Medium alle zwei Tage ausgewechselt, wobei frisches Doxycyclin zugegeben wurde.

7 Zellassays

7.1 Untersuchung der Zellmorphologie

Im Verlauf der Experimente erfolgte täglich eine Kontrolle der Zellmorphologie im Phasenkontrastmikroskop (Diavert, Leitz). Phänotypische Veränderungen der Zellen wurden mittels digitaler Fotografie dokumentiert (Nikon Coolpix 4500).

7.2 Untersuchung der Zellproliferation

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde der MTS-Test (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) verwendet. Das Prinzip des MTS-Test basiert auf der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen. Das Tetrazoliumsalz MTS wird in lebenden Zellen durch das Reduktionsäquivalent

NADH + H⁺ unter Anwesenheit des Elektronenübeträgers Phenazinethosulfat (PES) zu einem Formazansalz umgewandelt. Die Absorption des Formazans kann bei 490 nm in einem Photometer gemessen werden und ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur.

Die Zellen wurden mit einer Multipipette auf 96-well-Platten in einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen in 100 μ l Medium pro well ausgesät und nach 24 Stunden mit Doxycyclin induziert oder mit Ethanol versetzt. Nach Ende der Inkubationsdauer wurde in jedes well 20 μ l MTS-Lösung mit der Multipipette zugegeben. Nach 30 oder 60 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde die Absorption bei 490 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Bio-Rad, Model 550) gemessen. Zur Festlegung des Hintergrunds dienten die Messwerte aus wells, in denen nur Medium enthalten war. Jedes Experiment wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

7.3 Untersuchungen der Zelladhäsion

Zur Analyse der Zelladhäsion wurden die Zellkulturschalen mit 0,1% Gelatine beschichtet. Hierzu wurde die Gelatine (Sigma; 61393) in H₂O gelöst und 10 ml auf die Platten gegeben. Nach einer Trocknungszeit von zwei Stunden bei RT wurden die Platten zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend waren die Schalen für die Aussaat der Zellen bereit.

8 Microarray

Die DNA-Microarray-Analyse wurde in Kooperation mit PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß durchgeführt.

8.1 RNA-Isolierung für die Microarray-Analyse

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen in 10cm \varnothing -Schalen kultiviert. Die RNA wurde zuerst mit peqGOLD RNA Pure (Peqlab) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei erfolgte die Lyse der Zellen mit 3 ml peqGOLD RNAPure pro Schale. Abschließend wurde die RNA in 30 μ l RNase freies Wasser aufgenommen und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Danach wurde die RNA ein zweites Mal mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt, wobei ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) durchgeführt wurde. Nach der Aufreinigung wurde die RNA-Konzentration erneut photometrisch bestimmt. Danach wurde die RNA mit Ethanol (absolut) und 3 M NaAc (10% des Gesamtvolumens) bei -20°C für

eine Stunde gefällt. Nach einer 40 minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C wurde das RNA-Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen (10 min, 13.000 rpm, 4°C). Die Pellets wurden an der Luft getrocknet und in RNase freies Wasser in einer Konzentration von 2,5 µg/µl aufgenommen. Abschließend wurde nach erneuter Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des UV-Spektrometers (S2000 Spectrophotometer) die Konzentration der isolierten RNA durch Verdünnung auf 1,5 µg/µl eingestellt. Die RNA wurde bis zur Mikroarray-Analyse bei -80°C gelagert.

8.2 Verwendete Mikroarray-Chips

Bei dem Affymetrix Genechip HG_U133_2.0_Plus handelt es sich um einen high-density Oligonukleotid-Mikroarray, welcher 54.000 Sondensätze (probe sets) und ca. 38.500 Gene detektiert. Bei diesem Genechip werden die Sonden direkt an der Glasoberfläche (Glas-wafer, Festphase) durch eine kombinierte Methode aus Nukleotidsynthese und Photolithographie synthetisiert. Für jede Gensequenz befindet sich auf dem Array ein Sondensatz. Ein Sondensatz besteht aus 16 verschiedenen Oligonukleotid-Probenpaaren, die wiederum aus einer „Perfect Match“ (PM)-und einer „Mismatch“ (MM)-Probenzelle bestehen. Jede Probenzelle (24 x 24µm) enthält ca. 10^7 Kopien einer DNA-Oligonukleotid-Probe (25mer). Das PM-Oligonukleotid ist 100% komplementär zu der Sequenz des Gens, das durch den Sondensatz repräsentiert wird. Das MM-Oligonukleotid enthält eine Punktmutation in der Mitte der Sequenz, wodurch die Bindung des entsprechenden Transkripts herabgesetzt wird. Dies ermöglicht die Bestimmung des Hintergrunds und der nicht spezifischen Hybridisierung sowie die Korrektur der für die PM-Oligonukleotide gemessenen Signale. Bei der Auswertung der Hybridisierungsdaten wird für ein Probenpaar die Intensität der MM-Probe von der Aktivität der PM-Probe subtrahiert.

8.3 Synthese der cDNA, Markierung und Hybridisierung

Die in der totalen RNA enthaltenen proteinkodierenden mRNAs (ca. 0,2-0,4%) wurden mit Hilfe eines T7-d(T)21 Primers und des Enzyms Reverse Transkriptase zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Danach wurde der komplementäre cDNA-Strang durch DNA-Polymerase I, DNA-Ligase und RNase H synthetisiert. Die Einführung der T7-Promotorsequenz erlaubt es, in einer sogenannten *in vitro* Transkriptionsreaktion mit Hilfe von T7-RNA-Polymerase die Umschreibung der cDNA in biotinylierte Antisense-cRNA, die partiell komplementär zu den auf dem Chip enthaltenen PM-Oligonukleotiden ist. Da jedes cDNA-Molekül

viele Male abgeschrieben wird (lineare Amplifizierung), erreicht man durch diesen Schritt genügend Material für eine Mikroarray-Hybridisierung (ca. 10µg cRNA). Die biotin-markierten cRNAs wurden nach Fragmentierung auf den Array hybridisiert. Nach dem Auswaschen nicht-komplementärer cRNA wurden die gebundenen komplementären cRNAs durch Bindung von Streptavidin gekoppeltem Phycoerythrin gefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde dann durch Aktivierung mit Laserlicht in einem speziellen GeneArray Scanner (25000, Agilent) gemessen und quantifiziert. Alle Schritte wurden nach den Angaben im Affymetrix Gene Expression Analysis Technical Manual durchgeführt.

8.4 Auswertung der Daten

Mit Hilfe der Genechip MicroArray Suite Version 5.0 Software wurde zunächst das Bild der Hybridisierung generiert, dann wurde eine absolute Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Signalintensitäten („Average Differences“) und die sogenannten „Absolute calls“ bestimmt. Die Absolute calls definieren ein Transkript als vorhanden (P für „Present“), nicht vorhanden (A für „Absent“) oder im Grenzbereich liegend für (M für „Marginal“). Dabei erfolgte eine Normierung der Intensitäten (globale Skalierung) jedes Mikroarrays auf eine Zielintensität von 1000 Einheiten, damit Unterschiede in der Menge und der Qualität der cRNA-Proben und andere Variablen kompensiert wurden. Um differentiell exprimierte Gene zu ermitteln, wurden die Daten zweier Hybridisierungen mit Hilfe der Software MicroArray Suite 5.0 (Affymetrix) verglichen. In dem „comparison analysis“ wurden die mit Doxycyclin induzierten Zellen (+ Doxy) mit den nicht behandelten Kontrollzellen (-Doxy) verglichen. Der Array mit den Kontrollzellen wurde als Basislinie (Kontrolle) definiert, der Array mit den behandelten Zellen als experimenteller Array (Experiment). Die Werte jeder Probe auf dem Kontroll-Array wurden mit den entsprechenden Werten des experimentelle Arrays verglichen. Die Daten wurden anschließend mit der Affymetrix Data Mining Tool 3.0 Software gefiltert.

9 Quantitative Real-time PCR

Die Quantifizierung von spezifischen mRNAs erfolgte durch eine Reverse Transkription mit nachgeschalteter quantitativer Real-time PCR (Echtzeit-PCR). Bei der Real-time PCR erfolgte eine Fluoreszenzmessung der DNA-Menge während oder nach jedem Zyklus der PCR und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge.

Als Parameter für die Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge wird in der exponentiellen Phase der PCR der C_T -Werte (threshold cycle) berechnet, der die Zykluszahl angibt, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet.

9.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Für den Einsatz in der Real-time PCR wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen einer 10cm \emptyset -Schale mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Der Zellaufschluß und die RNA-Isolierung erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) wurde durchgeführt. Abschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt, die RNA-Proben aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Zur Synthese der zur mRNA komplementären DNA (cDNA) wurde die isolierte Gesamt-RNA einer reverse Transkription mit Random Hexameren unterzogen.

Dazu wurde die cDNA mit dem High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Dabei wurden 5 μ g Gesamt-RNA in einem Endvolumen von 50 μ l revers transkribiert.

9.2 Quantitative Real-time PCR mit TaqMan-Sonden und TaqMan Low Density Array

Alle Real-time PCR Reaktionen wurden nach denselben Bedingungen durchgeführt. Nach einer 10 min Inkubation bei 95°C (Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase durch Denaturierung eines Inhibitorproteins) folgten 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C (Denaturierung) und 60 s bei 60°C (Annealing-Extension).

Die Amplifikation und die Detektion von cDNA erfolgte mit dem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) und der zugehörigen Software.

Der „TaqMan Gene Expression Assay“ von der Firma Applied Biosystems enthält die zwei Primer und die TaqMan-Sonde für die spezifische Amplifikation eines Gens. In der Real-time PCR-Reaktion mit dem HNF4 α -Assay (Hs00230853_m1) betrug das Reaktionsvolumen 20 μ l. 1 μ l einer 1:4 verdünnten cDNA wurde mit 1 μ l TaqMan Gene Expression Assay (20x), 10 μ l TaqMan PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems) und 8 μ l H₂O gemischt.

TaqMan Low Density Array

Bei diesem System sind die TaqMan-Sonden + Primer (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems) auf einer Micro-Fluidic-Karte lyophilisiert. Die Karte besteht aus 384 wells, die über Kanäle miteinander verbunden sind (Abbildung 5). Es sind mehrere Konfigurationen der „Custom made“-Karte möglich. Für die Eingrenzung der proliferations- und morphologierelevanten Kandidatengene wurde eine Konfiguration ausgewählt, in der 96 TaqMan Gene expression assays zweimal als Duplikate auf der Karte vorhanden waren und in der zwei cDNA-Proben pro Karte getestet werden konnten. Es wurden mit der Karte insgesamt 81 Kandidatengene getestet, wobei für einige der Gene mehr als ein Assay zur Verfügung stand. Zusätzlich wurden noch drei Referenzgene und HNF4 α im Low Density Array getestet (Tabelle 5).

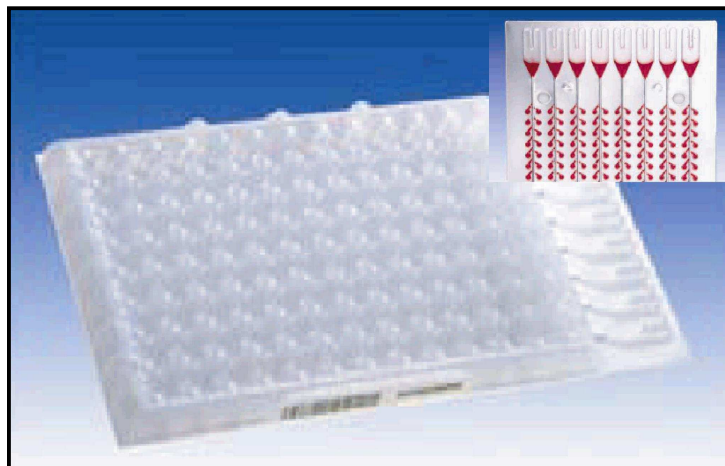


Abbildung 5: TaqMan Low Density Array Die Micro Fluidic Card besteht aus 384 wells, die über Kanäle miteinander verbunden sind.

Tabelle 5: Konfiguration des TaqMan Low Density arrays

Gen Symbol	Gen Name	Assay ID
18 rRNA	Eucaryotic 18S rRNA	Hs99999901_s1
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1
ACTB	actin, beta	Hs99999903_m1
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Hs00184500_m1
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Hs00184491_m1
ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	Hs00251620_m1
ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	Hs00240956_m1
ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	Hs00817723_g1
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Hs00244515_m1
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Hs00244513_m1
ACY1	aminoacylase 1	Hs00167402_m1
AGXT2L1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	Hs00229818_m1
AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1	Hs00177481_m1
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	Hs00233455_m1
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	Hs00542444_m1
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	Hs00153566_m1
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide (Wilson disease)	Hs00163739_m1
BIRC2	baculoviral IAP repeat containing 2	Hs00357350_m1
C14orf78 / NULL	chromosome 14 open reading frame 78	Hs00746838_s1
CCNH	cyclin H	Hs00236923_m1
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Hs270923_s1
CFI	I factor (complement)	Hs00173409_m1
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Hs00153439_m1
CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b	Hs00205339_m1
CLN6	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6, late infantile, variant	Hs00608557_m1
COBL	Cordon-bleu homolog (mouse)	Hs00323596_m1
COBL	Cordon-bleu homolog (mouse)	Hs00391205_m1
COI21A1	collagen, type XXI, alpha 1	Hs00229402_m1
CRAT	carnitine acetyltransferase	Hs00241350_m1
CRAT	carnitine acetyltransferase	Hs00241357_m1
CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versivan)	Hs00171642_m1
DBI	diazepam binding inhibitor	Hs00220950_m1
DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	Hs00203889_m1
DSC2	desmocollin 2	Hs00245200_m1
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	Hs00610256_g1
DYRK1B	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B	Hs00245076_m1
EPHA2	EphA2	Hs00171656_m1
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	Hs00176538_m1
FLJ13236	hypothetical protein FLJ13236 (Interim)	Hs00227689_m1
FLF13612	like ortholog of euronally expressed calcium binding protein (Interim)	Hs00368816_m1
FLJ14146	hypothetical protein FLJ14146 (Interim)	Hs00226770_m1
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	Hs00157646_m1
GAS1	growth arrest-specific 1	Hs00266715_s1
GPR49	G protein-coupled receptor 49	Hs00173664_m1
HEY1	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	Hs00232618_m1
HLA-F	major histocompatibility complex, class 1, F	Hs00606658_g1
HNF4a	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	Hs00230853_m1
IL18R1	interleukin 18 receptor 1	Hs00175381_m1
IRS2	insulin receptor substrate 2	Hs00275843_s1

ITGA6	integrin, alpha 6	Hs00173952_m1
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	Hs00158272_m1
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	Hs00742156_m1
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	Hs00794124_m1
KIAA0152	KIAA0152 gene product (Interim)	Hs00207082_m1
KIFAP3	kinesin-associated protein 3	Hs00183973_m1
LASP1	Lim and SH3 protein 1	Hs00196221_m1
LOC57228	hypothetical protein from clone 643 (Interim)	Hs00252748_s1
LOC57228	hypothetical protein from clone 643 (Interim)	Hs00377888_m1
MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	Hs00195458_m1
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase 11	Hs00176759_m1
MAPKAP3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	Hs00177957_m1
MCP	membrane cofactor protein (CD46)	Hs00611257_m1
MGC33190	hypothetical protein MGC33190 (Interim)	Hs00381305_m1
MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	Hs00182064_m1
MPP1	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	Hs00609971_m1
MTM1	myotubular myopathy 1	Hs00169680_m1
NEFL	neurofilament, light polypeptide 68kDa	Hs00196245_m1
NELL2	NEL-like 2 (chicken)	Hs00196254_m1
NID	nidogen (enactin)	Hs00159600_m1
NK4	natural killer cell transcript 4 (Interim)	Hs00170403_m1
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	Hs00196287_m1
NPRL2 / TUSC4	homologous to yeast nitrogen permease (Interim)	Hs00198012_m1
OATPX/SLC04C1	OATPX protein (Interim)	Hs00698884_m1
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	Hs00213454_m1
OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3	Hs00248922_m1
PEX3	peroxysomal biogenesis factor 3	Hs00186267_m1
PKP2	plakophilin 2	Hs00428040_m1
PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	Hs00272698_m1
PRPH	peripherin	Hs00196608_m1
RBKS	ribokinase (Interim)	Hs00223231_m1
SC4MOL	sterol_C4-methyl oxidase-like	Hs00198833_m1
SDC4	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	Hs00161617_m1
SEC23A1	Sec23 homolog A (S. cerevisiae)	Hs00197232_m1
SELENBP1	selenium binding protein 1	Hs00187625_m1
SELENBP1	selenium binding protein 1	Hs00259932_m1
SEPP1	seneloprotein P, plasma 1	Hs00193657_m1
SLC7A5	solute carrier family 7, member 5	Hs00185826_m1
SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	Hs00167093_m1
TACC2 / NULL	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	Hs00610617_m1
TACC2 / NULL	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	Hs00417537_m1
TM4SF5	transmembrane 4 superfamily member 5	Hs00187639_m1
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	Hs00188755_m1
TRIM9	tripartite motif-containing 9	Hs00364838_m1
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	Hs00163365_m1
VIL1	vilin 1	Hs00200229_m1
WT1	Wilms tumor 1	Hs00240913_m1

Die Real-time PCR wurde nach Angaben des Herstellers auf dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. 1xTaqMan Universal PCR Mix (Applied Biosystems) und 4 µl cDNA Probe (400 ng RNA) wurden

zu jedem Port der Low Density Card gegeben. Jede cDNA Probe wurde als Duplikat für jedes Gen bei jedem Messpunkt getestet. GAPDH wurde für die Normierung der RNA-Ladung verwendet. Die Genexpression wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, die den C_T -Wert der nicht induzierten und der induzierten Zelle vergleicht, quantifiziert.

9.3 Berechnung der Genexpression

In allen durchgeführten Real-time PCR Experimenten wurde das jeweilige Zielgen auf das ubiquitär nicht regulierte Referenzgen GAPDH normalisiert. Von jeder cDNA wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Bei der Real-time PCR mit der HNF4 α -TaqMan-Sonde wurde für die Quantifizierung eine Standardkurve, die auf einer Verdünnungsreihe basierte, für das Zielgen und das Referenzgen verwendet. Die C_T -Werte der analysierten Probe wurden dann anhand der Standardkurven umgerechnet. In dem durchgeführten Experiment wurden die ermittelten Werte für die Proben in den induzierten und den nicht induzierten Zellen ins Verhältnis gesetzt und so die Induktion („fold change“) für die jeweilige Probe errechnet.

Bei dem Low Density Array erfolgte die Auswertung der Expression mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Von jeder Doppelbestimmung wurde der Mittelwert gebildet und die Differenz der Mittelwerte von Ziel- und Referenzgen errechnet (ΔC_T). Die ΔC_T -Werte der Doxy-behandelten Zellen (+ Doxy) wurden dann von den ΔC_T -Werten der Kontrollzellen (- Doxy) subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$ -Wert). Anschließend wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte invers zur Basis 2 potenziert ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), so dass Werte > 1 einer stärkeren und Werte < 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen entsprechen.

10 Gen-Inaktivierung mittels RNAi

Zur Gen-Inaktivierung mittels RNAi wurde auf die kostengünstige und effiziente endoribonuclease-prepared short interfering RNA (esiRNA)-Methode zurückgegriffen, die erstmals 2003 publiziert worden war (Kittler and Buchholz, 2003; Kittler et al., 2004; Kittler et al., 2007). Bei der RNAi-Technik werden kleine (21-25 bp) RNA-Fragmente nach der transienten Transfektion in den RISC-Komplex (RNA induced silencing Complex) integriert. Der RISC-Komplex inklusive der kleinen RNA bindet an die komplementäre mRNA und vermittelt entweder den Abbau der mRNA, die Hemmung der Translation oder auch die Hemmung der Transkription. In allen

drei Fällen wird die Neubildung des Proteins verhindert und so die Aktivität des Gens vermindert. Die Effizienz der RNAi-Technik lässt sich nach 36-72 Stunden durch den Rückgang des Proteins überprüfen (Valencia-Sanchez et al., 2006; Echeverri and Perrimon, 2006).

10.1 esiRNA-Präparation

Die Herstellung der 56 esiRNAs und der vier Kontrollen-esiRNAs (DDX48, DHX8, tomato und HNF4 α) erfolgte mit zwei Modifikationen nach den Angaben der publizierten Methode (Kittler and Buchholz, 2003). Zum Schneiden der langen dsRNA in kleine ca. 25 bp langen Fragmente wurden die ShortCut[®] RNase III (MO025S; New England BioLabs) verwendet, da dieses Enzym nicht unkontrolliert die RNA schneidet, sondern spezifisch nach ca. 18-25bp. Die zweite Änderung betrifft die Aufreinigung der kleinen dsRNA Fragmente. Hier wurde die RNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen) aufgereinigt, wie es von Byrd und Watzl (Lab Times online, Lab Trick 4: Money saving siRNA purification: <http://www.labtimes.org/tricks/index.html>) beschrieben worden ist. Ein schematischer Ablauf von der kompletten esiRNA-Präparation ist im Ergebnisteil dieser Arbeit in Abschnitt III. 6 dargestellt.

10.1.1 esiRNA-PCR

Als Ausgangsmaterial wurden entweder die spezifischen esiWaySilencer (RZPD, Heidelberg) verwendet oder es wurde, falls kein esiWaySilencer Produkt für das gewünschte Gen zur Verfügung stand, ein cDNA-Klon (RZPD, Heidleberg) verwendet. EsiWay Silencer Produkte enthalten 300-500 bp des gewünschten Gens, welche mittels *in silico* Analysen als sehr potent für die RNAi-Technik ermittelt worden sind. Die Sequenz ist zur PCR-Amplifikation mit der T7-Promotor-Sequenz flankiert. Die Sequenzen der cDNA-Klone waren entweder T7 und T3 oder M13 rev und M13 for (Invitrogen) flankiert. Die cDNA-Klone wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Allen Primern außer dem T7-Primer wurde zusätzlich die T7-Sequenz angehängt, um die spätere *in vitro*-Transkription zu ermöglichen. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 6 aufgelistet und in Tabelle 7 sind die verwendeten esiWay Silencer und cDNA-Klone vermerkt. Die tomato-cDNA war bereits im Labor in den pBluescript II SK+ Vektor kloniert worden und wurde mittels der Primer T3 und T7 amplifiziert. Die HNF4 α -esiRNA wurde aus dem Vektor pcDNA5/FRT/TO HNF4 α 2 mittels eines genspezifischen Primerpaares amplifiziert, an welchem die T7-Sequenz angehängt worden ist. In den Tabellen 8 und 9 ist das

Pipettierschema und die PCR-Bedingungen aufgelistet. Alle PCRs wurden mit den Geräten „Gene AmpPCR System 2400“ von Perkin Elmer durchgeführt und anschließend wurden 4 µl der Proben in einem 1%igem Agarose-Gel bezüglich ihrer erwarteten Größen überprüft.

Tabelle 6: Verwendet PCR-Primerpaare zur Amplifikation der esiWay Silencer und cDNA-Klone

Primer Name	Sequenz (5'-3')
T7	TAATACGACTCACTATAGGGA
T3	TAATACGACTCACTATAGGGAAATTAACCCTCACTAAAGGGA
M13 for	TAATACGACTCACTATAGGGAGTAAAACGACGGCCAGT
M13 rev	TAATACGACTCACTATAGGGAAACAGCTATGACCATG
HNF4 α 2 for	TAATACGACTCACTATAGGGAACTGTTGC
HNF4 α 2 rev	TAATACGACTCACTATAGGGAACTTCCTGC

Tabelle 7: Für die esiRNA-Technik verwendeten esiWay Silencer oder cDNA-Klone

Gen Symbol	esiWay Silencer	Gen Symbol	cDNA-Klon
ADAMTS1	p3000H04517D	ABCB1	HU3_p983A03120D
ALDH6A1	p3000B05512D	ACY1	HU3_p983B106D
ANK3	p3000E054D	AGXT2L1	HU3_p983B03107D
BHLHB3	p3000D10529D	AKAP1	HU3_p983D01336D
BPHL	p3000D1040D	ATP7B	HU3_p983C04132D
CDKN1A	p300C0927D	CCNH	HU3_p983F0147D
CNTN1	p3000C128D	CFI	HU3_p983D0937D
COL14A1	p3000B035D	COL21A1	HU3_p983B12101D
ELF1	p3000F1210D	CSPG2	HU3_p983C0648D
EPHX2	p3000C05507D	DDX48	HU3_p983E08126D
FBN1	p3000A03512D	DHX8	HU3_p983A09149D
HOXA1	p3000H1016D	DSC2	HU3_p983A10266D
HOXB6	p3000G0813D	EFHD1	HU3_p983F1132D
HPGD	p3000G04529D	FLJ14146	HU3_p983H0418D
ICAM3	p3000B0121D	GAB1	DKFZ434E027Q
JUP	p300C126D	GCHFR	HU3_p983B02376D
LRP2	p3000B1133D	HEY1	HU3_p983C0136D
MCAM	p3000E0921D	IL32/NK4	HU3_p983G04249D
MME	p3000B0721D	ITGB4BP	HU3_p983A0130D
NELL2	p3000E07503D	MAP3K11	HU3_p983H0527D
NINJ1	p3000D072D	MPP1	HU3_p983G0651D
NOTCH2	p3000G09503D	MTM1	HU3_p983D1231D
NQO2	p3000B0510D	OGG1	HU3_p983C07371D
PROS1	p3000A1040D	PKP2	HU3_p983A043D
SFRP1	p3000D092D	PP1R1A	HU3_p983D0832D
SMARCE1	p3000E04512D	RBKS	IMAGp956F161Q
TGFA	p3000G1021D	SEPP1	HU3_p983E0217D
		THEM2	HU3_p983F06189D
		TM4SF5	HU3_p983C06378D
		UGDH	HU3_p983D1024D
		WT1	HU3_p983C05115D

Tabelle 8: Pipettierschema zur Amplifizierung der esiWay Silencer bzw. cDNA-Klone

PCR-Materialien	Menge (μ l)
10 x PCR-Puffer	5
25mM MgSO ₄	10
10mM dNTPs	4
10 μ M Forward Primer	1
10 μ M Reverse Primer	1
Pwo-DNA Polymerase (1U/ μ l)	2
Template	1
Wasser	ad 50

Tabelle 9: Verwendete PCR-Bedingungen Von den Schritten 2-4 wurden 30 Zyklen durchgeführt

Programm-Schritte	Zeit	Temperatur (in °C)
1. Aktivierung	3 min	95
2. Denaturierung	30 sec	94
3. Annealing	45 sec	54
4. Elongation	3 min	72
5. Abschluß-Elongation	7 min	72

10.1.2 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde nach Angaben des Herstellers mit dem MEGAscript Kit (Ambion) durchgeführt. Allerdings wurde ein kleinerer Ansatz angesetzt, der halb so groß war wie vom Hersteller angegeben. Es wurde jeweils ein 4 μ l Aliquot der PCR in die *in vitro*-Transkription eingesetzt und die Reaktion wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Probe zum Annealen für 3 min bei 95°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurde 1 μ l für die Überprüfung in einem 1%igem Gel zurückbehalten. Der Rest wurde in zwei gleiche Teile aufgeteilt und dem RNase III-Verdau unterzogen.

10.1.3 RNase III-Verdau

Die in Tabelle II. 9 angegebenen Materialien wurden zusammenpipettiert, kurz gevortext und für 20-30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein 3 μ l Aliquot des Verdau in einem 5%iges Agarose-Gel für kleine Fragmente (Roth) hinsichtlich der korrekten Größe von ca. 25 bp überprüft. Der restliche Ansatz wurde nach dem Protokoll von Byrd und Watzl (Lab Times online, Lab Trick 4: Money saving siRNA purification: <http://www.labtimes.org/tricks/index.html>) mittels des RNeasy Kits

(Qiagen) aufgereinigt. Ein 2 µl-Aliquot wurde nach der Aufreinigung von jeder Probe in einem 5%igem Agarose-Gel für kleine Fragmente (Roth) bezüglich der Größe überprüft. Abschließend wurden die esiRNAs im S2000 UV/Vis Spectrophotometer (WPA) quantifiziert und auf 0,1 µg/µl mit RNase freiem Wasser für die transiente Transfektion eingestellt.

10.2 Transiente Transfektion und Messung der Zellproliferation

24 Stunden vor der Transfektion wurden 2×10^3 Zellen der Zelllinie HNF4α#4 in eine 96-well Platte ausgesät. Als Medium wurde das DMEM-Medium ohne Antibiotika-Zusätze verwendet. Alle Experimente wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Transfektion mit dem ExtremeGene transfection reagent (Roche) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei pro well 0,1 µg esiRNA in 1 µl Transfektionsreagenz gelöst wurde. Vier Stunden nach der Transfektion erfolgte die Zugabe der Antibiotika und die Behandlung mit Ethanol oder mit 10 ng / ml Doxycyclin. Nach drei Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach vier Tagen wurde mittels des MTS-Assays (Promega) die Zellproliferationsrate ermittelt.

III Ergebnisse

1 Expression von HNF4 α hemmt die Proliferation von HEK293-Zellen auf Gelatine beschichtete Zellkulturschalen

In der Leber ist gezeigt worden, dass die Expression von HNF4 α essentiell für die Regulation vieler Adhäsionsgene ist. Die Regulation dieser Adhäsionsgene ist unter anderem entscheidend für die Bildung des Epithels in der sich entwickelnden Leber und während des Prozesses lässt sich eine Veränderung der Zellmorphologie beobachten (Battle et al., 2006).

Da die Expression von HNF4 α eine Morphologieveränderung erzeugt, stellt sich die Frage, ob eine durch HNF4 α hervorgerufene Adhäsionsverminderung der HEK293-Zellen zum Gefäßboden den primären Effekt darstellt und die Proliferationshemmung dadurch sekundär bedingt wird. Eine Gelatine-Beschichtung der Zellkulturschalen soll den HEK293-Zellen die Adhäsion zum Boden erleichtern und die Adhäsionsverminderung zum Gefäßboden möglicherweise mindern. Es soll untersucht werden, ob die Proliferationshemmung auch auf mit Gelatine behandelten Zellkulturschalen auftritt, oder ob eine verbesserte Adhäsion der Zellen zum Boden der Schale auch eine Erhöhung der Proliferationsrate bedingt.

Für diesen Versuch wurde die HEK293 HNF4 α wt#1-Zelllinie genutzt, welche nach Zugabe von Doxycyclin HNF4 α exprimiert. Die Zellen wurden jeweils auf mit Gelatine beschichtete (+ Gelatine) oder unbeschichtete (- Gelatine) Zellkulturschalen ausgesät. Zur Ermittlung der Proliferationsrate der Zellen wurde der MTS-Test (Promega) ausgewählt, welcher auf der Messung der metabolischen Aktivität von lebenden Zellen basiert. Dabei ist die metabolische Aktivität proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Abbildung 6 A zeigt die Ergebnisse der Proliferationsmessung nach zwei, vier und sechs Tagen mit (+ Doxy) bzw. ohne HNF4 α -Expression (- Doxy). Trotz der Gelatine Beschichtung der Zellkulturschalen weisen die induzierten Zellen im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen einen signifikanten Rückgang der Zellproliferation auf.

Der Vergleich der induzierten Zellen mit Gelatine zu den induzierten Zellen ohne Gelatine, zeigt in beiden Fällen einen Rückgang der Proliferationsrate auf 40%, bezogen auf die jeweiligen Kontrollzellen.

Zusätzlich zur Proliferationsmessung wurde die Auswirkung der Beschichtung auf die Adhäsion der HEK293-Zellen untersucht. Abbildung 6 B zeigt Aufnahmen der Zellmorphologie nach einer viertägigen Versuchsdauer, wobei auch hier bei den induzierten Zellen mit Gelatine beschichteten Schalen die Veränderung der Morphologie auftritt, welche vergleichbar mit den induzierten Zellen ohne Gelatine-Beschichtung ist.

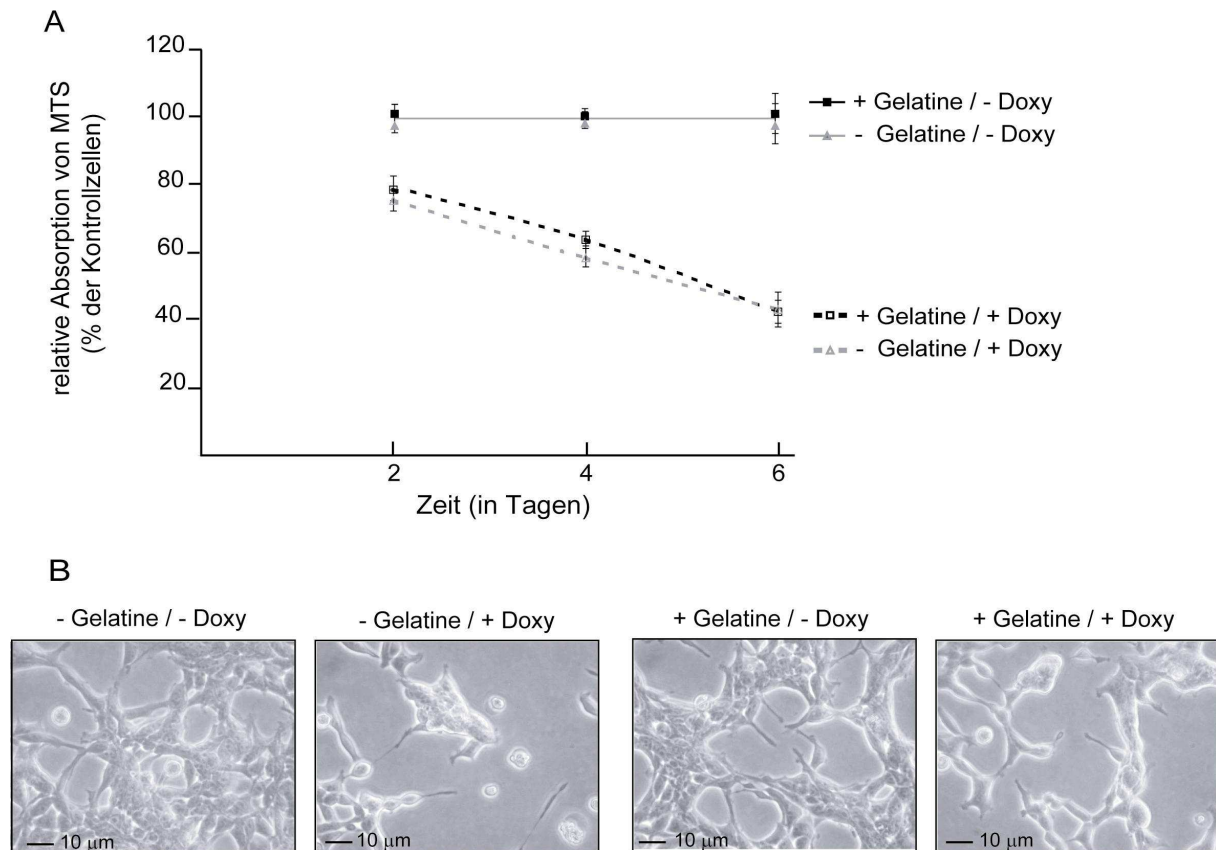


Abbildung 6: Beschichtung der Zellkulturschalen bewirkte weder eine Verminderung der Zellproliferationshemmung noch eine Erhöhung der Zelladhäsion zur Zellkulturschale A) Die Zelllinie HNF4 α wt#1 wurde entweder in unbeschichtete oder in mit Gelatine beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Über einen Zeitraum von sechs Tagen erfolgte die Induktion von HNF4 α und alle zwei Tage wurde mittels MTS-Test (Promega) die Zellzahl im Vergleich zu nicht induzierten Zellen bestimmt. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) eines als Dreifachbestimmung konzipierten Experiments sind angegeben. B) Die Phasenkontrastphotographien der Zelllinie HNF4 α wt#1 wurden nach einer viertägigen Versuchsdauer aufgenommen.

Die Gelatine-Beschichtung der Zellkulturschalen bewirkte somit weder eine Erhöhung der Zelladhäsion zum Gefäßboden noch eine Verminderung der Proliferationshemmung

2 Subzelluläre Lokalisation von HNF4 α in HEK293-Zellen

2.1 Die subzelluläre Lokalisation von HNF4 α bei einer Überexpression des Proteins

Für HEK293-Zellen ist es bekannt, dass HNF4 α homogen im Zellkern lokalisiert vorliegt (Lucas et al., 2005). Bei Immunfluoreszenz-Analysen zur Expression von HNF4 α , ist eine punktuelle Ansammlung des Proteins aufgefallen. Diese Ansammlung des Proteins war ausschließlich in Zellen zu beobachten, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der Mitose befanden. Da HNF4 α eine Hemmung der Proliferation in HEK293-Zellen verursacht, wurde die Ansammlung des Proteins während der Mitose bezüglich der Proliferationskontrolle näher untersucht.

Für diese Experimente wurden sowohl beide HEK293-Zelllinien von HNF4 α (wt#1 und wt#4) als auch die beiden HNF4 α -Mutanten (R154X#6 und C106R#1) verwendet. Die Zellen wurden mit 1000 ng / ml Doxycyclin für 24 Stunden induziert und anschließend mittels einer Immunfluoreszenz-Färbung analysiert.

In Abbildung 7 A und B ist zu erkennen, dass die beiden Zelllinien wt#1 und wt#4 eine homogene Verteilung des HNF4 α -Proteins in den Interphase-Zellkernen aufwiesen. In den Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der Mitose befanden, erkennt man eine punktuelle Ansammlung des Proteins (Dot). Die quantitative Auswertung ergab, dass 79% (wt#1) bzw. 48% (wt#4) der mitotischen Zellen eine Ansammlung an nur einem Ort in der Zelle zeigten. Das HNF4 α -Protein sammelt sich somit während der Mitose zu einem großen Prozentsatz an einem spezifischen Ort innerhalb der Zellen, während die Interphase-Zellkerne eine homogene Verteilung des Proteins aufwiesen.

Abbildung 7 C zeigt die Analyse der Zelllinie C106R#1. Die Protein-Lokalisation in den Mitosen und die Neigung zur Bildung eines Dots ähnelt der Zelllinie wt#4. Allerdings ist die Dot-Bildung bei dieser HNF4 α -Mutante nicht ausschließlich auf Mitosen-Zellen beschränkt, sondern es zeigten sich auch vermehrt punktuelle Ansammlungen bei Zellen in der Interphase. Im Gegensatz dazu wies die Zelllinie R154X#6 (Abbildung 7 D) ein deutlich anderes Lokalisationsverhalten auf. Hier zeigten nur 7% der mitotischen Zellen eine Ansammlung des Proteins und die Interphase-Zellkerne wiesen eine homogene Proteinverteilung auf.

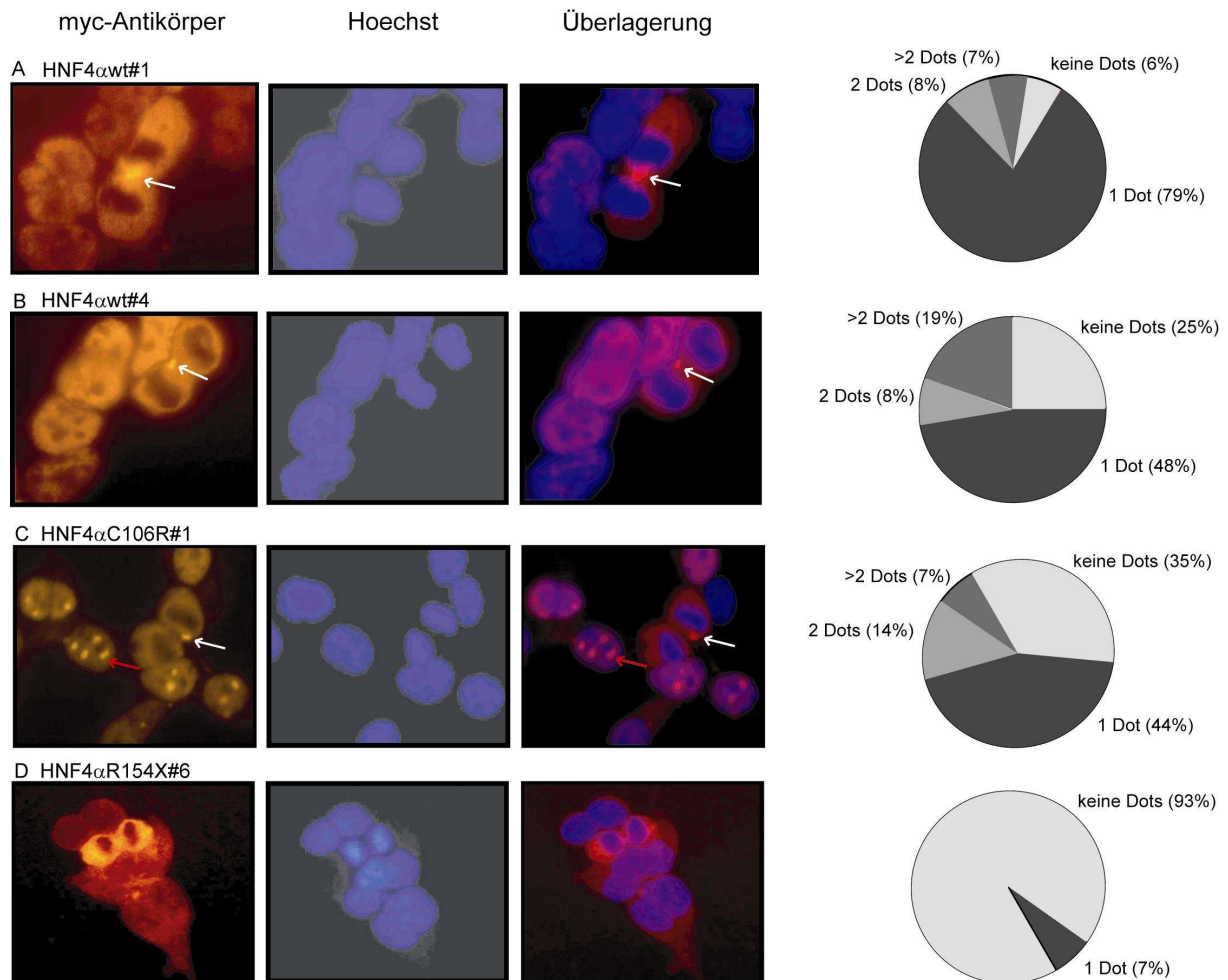


Abbildung 7: HNF4 α lokalisierte in HEK293-Zellen während der Mitose an einem spezifischen Ort. Die HEK293-Zelllinien HNF4 α wt#1, wt#4, C106R#1 und R154X#6 wurden jeweils für 24 Stunden mit 1000 ng / ml Doxycyclin behandelt und anschließend wurde mittels des myc-Antikörpers 9E10 HNF4 α innerhalb der Zelle detektiert. Zur Kontrolle der Mitosen wurde die DNA mit Hoechst angefärbt, die Überlagerung der beiden Färbungen zeigt die Lokalisation von HNF4 α in Bezug zum Zellkern. A)-D) Repräsentative Darstellung der Lokalisation von HNF4 α bei den vier untersuchten Zelllinien mit der jeweilig entsprechenden quantitativen Analyse zur Dot-Bildung. Die weißen Pfeile bezeichnen die Position der Dots in mitotischen Zellen, die roten Pfeile in Interphase-Zellkernen. Die quantitative Auswertung dieser Analyse wurde von Claudia Krawczyk im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Für die Zelllinie wt#1 wurden 33 Mitosen, für wt#4 36 Mitosen, für C106R#1 43 Mitosen und für R154X#6 61 Mitosen ausgewertet.

Die Untersuchungen ergaben somit, dass die Mutante R154X#6 selten punktuelle Lokalisationen während der Mitose in den HEK293-Zellen aufwies. Die Mutante C106R#1 sowie die beiden HNF4 α -Zelllinien wt#1 und wt#4 zeigten häufig eine spezifische punktuelle Ansammlung des Proteins in den Zellen während der Mitose. Allerdings wies die Mutante C106R#1 diese punktuellen Ansammlung ebenfalls in Interphase-Zellkernen auf, während die beiden Zelllinien wt#1 und wt#4 eine homogene Proteinverteilung im Interphasen-Zellkern aufwiesen.

Um bei der Analyse der Protein-Lokalisation einen Artefakt der Überexpression auszuschließen, wurden die Lokalisationsuntersuchungen zusätzlich bei einer physiologischen HNF4 α -Proteinkonzentration durchgeführt.

2.2 Die subzelluläre Lokalisation von HNF4 α bei einer physiologischen Menge des Proteins

Für die Analyse im physiologischen Bereich von HNF4 α , musste zunächst die entsprechende Doxycyclin-Konzentration ermittelt werden, bei der eine physiologische Menge an HNF4 α erreicht wurde. Als Vergleichszelllinie wurde die Hepatoma-Zelllinie HepG2 ausgewählt, da diese über eine endogene HNF4 α -Expression verfügt (Rodriguez-Antona et al., 2002).

2.2.1 Induktion von 10 ng / ml Doxycyclin erzeugte eine physiologische Menge von HNF4 α

Zur Ermittlung eines physiologischen Expressionsniveaus von HNF4 α wurde eine Induktion von 10 ng / ml Doxycyclin der HEK293-Zellen mit der endogenen Expression von HNF4 α in der Hepatoma Zelllinie HepG2 verglichen.

Abbildung 8 A zeigt die vergleichende Analyse der beiden Zelllinien mittels eines Western Blots. Das HNF4 α -Protein der HEK293-Zelllinie läuft im Gel aufgrund seines myc-Tags und der dadurch erhöhten Größe langsamer als die endogene Form der HepG2-Zelllinie. Der Vergleich von 10 μ g Gesamt-Protein der HEK293-Zelllinie mit 10 μ g und 5 μ g Gesamt-Protein der HepG2-Zelllinie zeigte, dass eine Induktion von 10 ng / ml Doxycyclin eine ungefähr halb so starke HNF4 α -Expression in der HEK293-Zelllinie erzeugte als die endogene Expression von HNF4 α in der HepG2-Zelllinie aufwies.

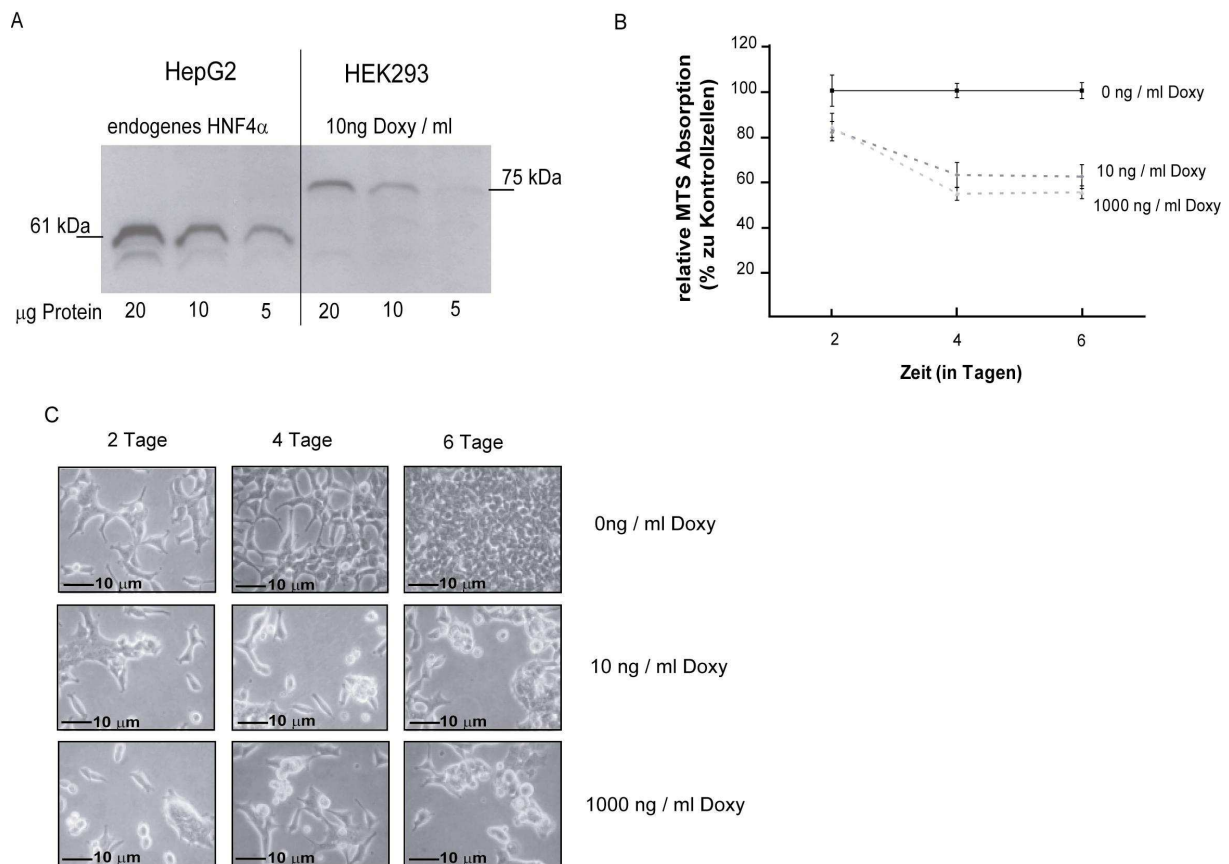


Abbildung 8: Eine Induktion von 10 ng / ml Doxycyclin erzeugte eine physiologische HNF4 α -Menge, bei der die Veränderungen der Zellproliferation und der Morphologie zu beobachten waren A) Die Zelllinie HNF4 α wt#1 wurde für 24 Stunden mit 10 ng / ml Doxy induziert und 20, 10 und 5 μ g Gesamt-Protein wurden im Western Blot eingesetzt. Zum Vergleich für ein endogenes Proteinniveau wurden ebenfalls 20, 10 und 5 μ g Gesamt-Protein der HepG2-Zelllinie im gleichen Western Blot analysiert. Das induzierte HNF4 α -Protein der HEK293-Zelllinie und das endogene HNF4 α -Protein der HepG2-Zelllinie wurden mit dem anti-HNF4 α Antikörper (c-19, Santa Cruz Biotechnology) detektiert. B) Die Zelllinie HNF4 α #1 wurde für Proliferations-Messungen entweder mit Ethanol (0 ng / ml Doxy) oder mit zwei unterschiedlichen Doxycyclin Konzentrationen (10 ng / ml bzw. 1000 ng / ml Doxy) behandelt. Nach zwei, vier und sechs Tagen wurde die Zellproliferation mittels des MTS-Tests (Promega) analysiert. Die Proliferation ist in Prozent der Ethanol behandelten Kontrollzellen angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. C) Phasenkontrast-Aufnahme der Zelllinie HNF4 α wt#4, die über sechs Tage entweder keiner (0 ng / ml Doxy), einer physiologischen Menge (10 ng / ml Doxy) oder einer Überexpression (1000 ng / ml Doxy) von HNF4 α ausgesetzt war.

Da eine Behandlung von 10 ng / ml Doxycyclin eine im physiologischen Expressionsbereich liegende HNF4 α -Menge in den HEK293-Zellen induzierte, wurde bei dieser Doxycyclin-Konzentration sowohl die Proliferations- als auch die Morphologie-Veränderung analysiert.

Abbildung 8 B zeigt, dass die Proliferationshemmung im Vergleich zur HNF4 α -Überexpression etwas verringert aber dennoch spezifisch bei der physiologischen HNF4 α -Menge auftritt. Auch die in Abbildung 8 C gezeigte morphologische Veränderung lässt sich bei einer physiologischen Menge von HNF4 α beobachten.

Somit erzeugte eine Induktion von 10 ng / ml Doxycyclin eine physiologische Menge von HNF4 α , welche ausreichend ist, die in der Überexpression beobachteten Proliferations- und Morphologie-Veränderungen hervorzurufen.

2.2.2 Die subzellulären Lokalisation von HNF4 α in HEK293-Zellen bei einer physiologischen HNF4 α -Menge

Nachdem eine Induktion von 10 ng / ml Doxycyclin als optimal für eine physiologische Menge von HNF4 α nachgewiesen worden war, wurden die Lokalisationsanalysen mittels der Immunfluoreszenz in diesem Konzentrationsbereich wiederholt.

In Abbildung 9 A und B ist zu erkennen, dass die beiden Zelllinien wt#1 und wt#4 eine homogene Verteilung des Proteins in den Interphase-Zellen aufwiesen. In den Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der Mitose befanden, erkennt man erneut eine punktuelle Ansammlung des Proteins. Die quantitative Auswertung zeigte, dass 64% bzw. 53% der Mitosen der Zelllinie wt#1 bzw. wt#4 eine Ansammlung an einem Ort aufwiesen.

Abbildung 9 C zeigt die Analyse der Mutante C106R#1. Es wurden in etwa gleich viele Mitosen mit einer homogenen Verteilung, mit nur einer, mit zwei und mit mehr als zwei punktuellen Ansammlungen beobachtet. Die Dot-Bildung der Interphase-Zellen ist auch bei diesem Proteinniveau erhalten geblieben. Bei der zweiten Mutante R154X#6 blieb die Verteilung ähnlich wie zuvor bei der Überexpression. Diesmal zeigten nur 4% der mitotischen Zellen eine Ansammlung und die übrigen Mitosen zeigten keinerlei Ansammlung des Proteins. Die Interphase-Zellen wiesen eine homogene Verteilung auf.

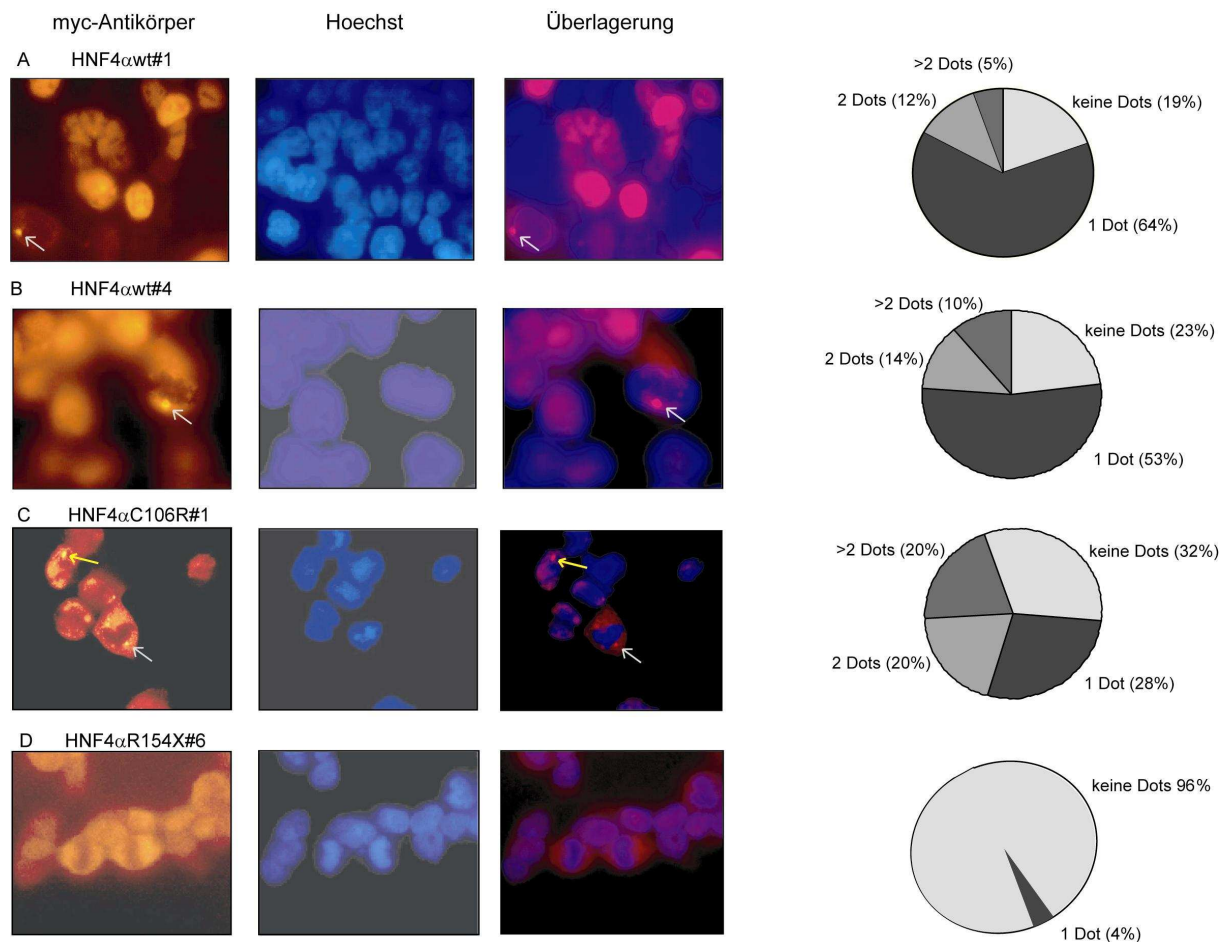


Abbildung 9: HNF4 α lokalisierte bei physiologischer Proteinmenge in HEK293-Zellen während der Mitose an einem spezifischen Ort. Die HEK293-Zelllinien HNF4 α wt#1, wt#4, C106R#1 und R154X#6 wurden jeweils für 24 Stunden mit 10 ng / ml Doxycyclin behandelt und anschließend wurde mittels des myc-Antikörpers 9E10 HNF4 α innerhalb der Zelle detektiert. Zur Kontrolle der Mitosen wurde die DNA mit Hoechst angefärbt und die Überlagerung der beiden Färbungen zeigt die Lokalisation von HNF4 α in Bezug zum Zellkern. A)-D) Repräsentative Darstellung der Lokalisation der vier untersuchten Zelllinien mit der jeweilig entsprechenden quantitativen Analyse zur Dot-Bildung. Die weißen Pfeile bezeichnen die Position der Dots in mitotischen Zellen, die gelben Pfeile in Interphase-Zellen. Die quantitative Auswertung dieser Analyse und die Fluoreszenzbeispiele für die beiden Mutanten-Zelllinien wurden von Claudia Krawczyk im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Für die Zelllinie wt#1 wurden 113 Mitosen, für wt#4 wurden 100 Mitosen, für C106R#1 wurden 65 Mitosen und für R154X#6 wurden 105 Mitosen ausgewertet.

Obgleich der Unterschied zwischen der Mutante C106R#1 und wt#4 größer geworden ist, zeigten bei der Mutante immer noch 28% der beobachteten Mitosen eine Ansammlung. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Lokalisation des Proteins und der Proliferation ist somit unwahrscheinlich, da die Expression der Mutante keine Proliferationshemmung im MTS-Test aufweist (Lucas et al., 2005).

2.3 Lokalisation von HNF4 α in der Ratten-Insulinoma Zelllinie INS-1

Die punktuelle Ansammlung des HNF4 α -Proteins und seine ausschließliche Ausprägung während der Mitose ist eine Besonderheit für die HNF4 α -Zelllinien wt#1 und wt#4, weil die Zelllinie C106R#1 sowohl während der Mitose als auch während der Interphase punktuelle Ansammlungen zeigte und die Zelllinie R154X keine signifikanten punktuellen Ansammlungen zeigte. Daher sollte geprüft werden, ob der Effekt spezifisch für die embryonale Nierenzelllinie HEK293 war, oder ob die Ansammlung des Proteins unabhängig von dem Zelltyp auftritt.

Hierzu wurde die Ratten-Insulinoma-Zelllinie (INS-1) verwendet, welche ebenfalls nach dem Flp-In-System generiert wurde und somit auch eine konditionale Expression von HNF4 α erlaubte (Thomas et al., 2004).

Abbildung 10 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die mehrheitlich auftretende homogene Verteilung des HNF4 α -Proteins in der INS-1-Zelllinie in Interphase-Zellkernen, ebenso wie in mitotischen Zellen. Die entsprechende quantitative Auswertung zeigte für nur 5% der Mitosen eine Ansammlung an einem Ort.

Ins-1-HNF4 α wt#1.1.2

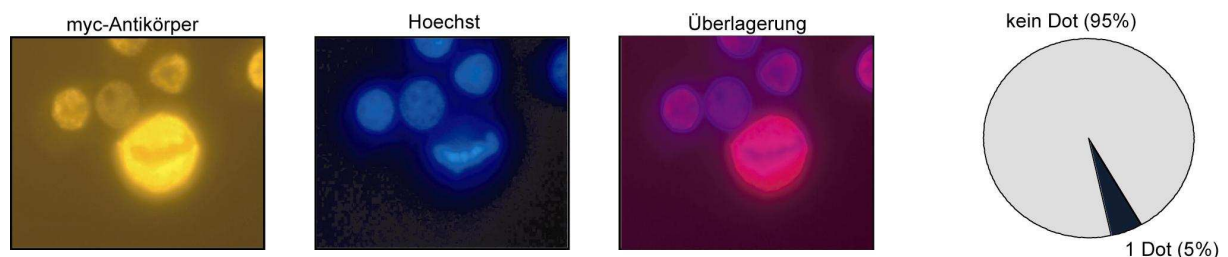


Abbildung 10: HNF4 α zeigte eine homogene Verteilung während der Mitose in INS-1-Zellen Die INS-1-Zelllinie HNF4 α wt#2 wurde für 24 Stunden mit 1000 ng / ml Doxycyclin behandelt und anschließend wurde mittels des myc-Antikörpers 9E10 HNF4 α innerhalb der Zelle detektiert. Zur Kontrolle der Mitosen wurde die DNA mit Hoechst angefärbt und die Überlagerung der beiden Färbungen zeigte die Lokalisation von HNF4 α in Bezug zum Zellkern. Gezeigt wird eine repräsentative Darstellung der Lokalisation mit der entsprechenden quantitativen Analyse zur Dot-Bildung. Die quantitative Auswertung dieser Analyse wurde von Claudia Krawczyk im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Es wurden insgesamt 59 Mitosen ausgewertet.

Da die Lokalisationsanalysen des HNF4 α -Proteins in den INS-1-Zellen eine homogene Verteilung in den Zellen während der Mitose aufwiesen, ist die punktuelle Ansammlung des HNF4 α -Proteins zellspezifisch für die HEK293-Zelllinie.

2.4 Lokalisation von HNF1 α und HNF1 β in der HEK293-Zelllinie

Da durch die Untersuchung der INS-1-Zelllinie die Zelltyp-Spezifität für die Dot-Bildung von HNF4 α gezeigt worden war, ergab sich die Frage, ob diese Ansammlung proteinspezifisch für HNF4 α in der HEK293-Zelllinie ist, oder ob dies ein generelles Phänomen für Transkriptionsfaktoren in der Mitose von HEK293-Zellen darstellt.

Hierzu wurden die beiden gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren HNF1 α und HNF1 β aus der Familie der Homeodomänen Familie (Cereghini, 1996) betrachtet. Für beide Transkriptionsfaktoren ist eine konditional exprimierbare HEK293-Zelllinie etabliert worden, wobei die Proteine ebenfalls mittels eines myc-Tag detektiert werden können (Senkel et al., 2005).

Abbildung 11 zeigt jeweils ein repräsentatives Beispiel für HNF1 α (Abbildung 11 A) und für HNF1 β (Abbildung 11 B) und die entsprechende quantitative Auswertung der Mitosen. Beide Proteine zeigten eine homogene Verteilung im Interphase-Zellkern. Bei den analysierten Mitosen konnte bei beiden Proteinen nur selten eine punktuelle Ansammlung des Proteins in den Zellen beobachtet werden (3% bzw. 2%).

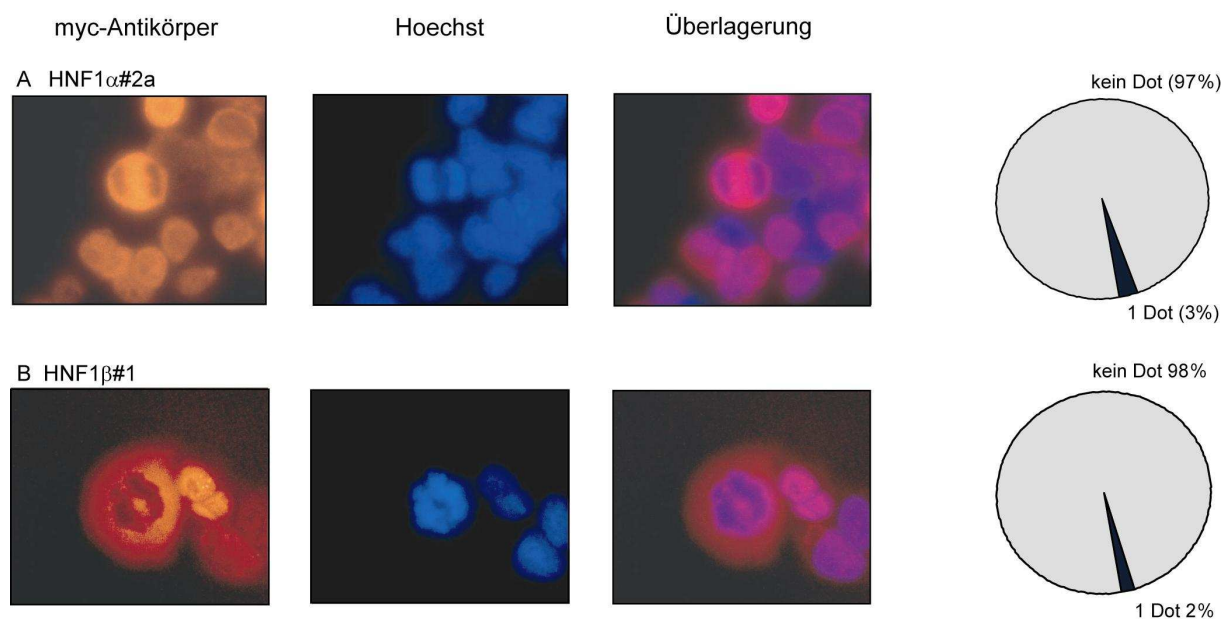


Abbildung 11: HNF1 α und HNF1 β zeigten eine homogene Verteilung während der Mitose in HEK293-Zellen

Die HEK293-Zelllinien HNF1 α und HNF1 β wurden für 24 Stunden mit 1000 ng / ml Doxycyclin behandelt und anschließend wurde mittels des myc-Antikörpers 9E10 HNF1 α bzw. HNF1 β innerhalb der Zelle lokalisiert. Zur Kontrolle der Mitosen wurde die DNA mit Hoechst angefärbt und die Überlagerung der beiden Färbungen zeigte die Lokalisation der Proteine in Bezug zum Zellkern. Gezeigt werden repräsentative Darstellungen der Lokalisation mit der entsprechenden quantitativen Analyse zur Dot-Bildung. Die quantitative Auswertung und auch die Immunfluoreszenzen dieser Analyse wurden von Claudia Krawczyk im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Für die Zelllinie HNF1 α wurden 68 Mitosen, für HNF1 β 104 Mitosen ausgewertet.

Die punktuelle Ansammlung des HNF4 α -Proteins in den HEK293-Zellen erfolgte somit sowohl zell- als auch proteinspezifisch und weitere Untersuchungen sollten den Lokalisationsort des HNF4 α -Proteins während der Mitose in den HEK293-Zellen spezifizieren.

2.5 Keine Co-Lokalisation von HNF4 α und des Basalkörpers

Da während der Mitose der genaue Lokalisationsort von HNF4 α und HNF4 α C106 nicht definiert ist, ist es möglich dass sich beide Proteine an unterschiedlichen Orten in der Zelle ansammeln und demnach auch unterschiedliche Wirkungen ausüben. Eine Doppel-Immunfluoreszenz für ein Markerprotein des Basalkörpers (γ -Tubulin) und für HNF4 α sollte eine mögliche Ko-Lokalisation von HNF4 α am Spindelapparat oder an der Cilie detektieren.

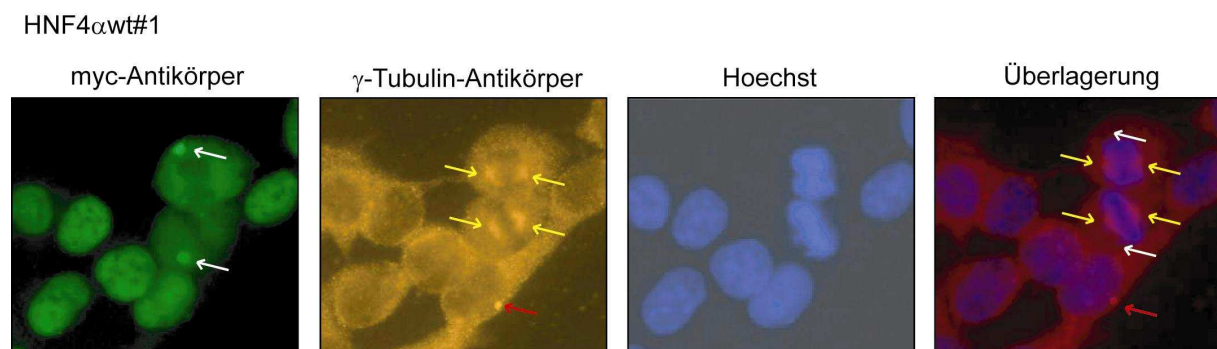


Abbildung 12: Es bestand keine Co-Lokalisation zwischen HNF4 α und dem Basalkörper Die HEK293-Zelllinie HNF4 α wt#1 wurde für 24 Stunden mit 1000 ng / ml Doxycyclin behandelt und anschließend wurde mittels des myc-Antikörpers 9E10 HNF4 α innerhalb der Zelle detektiert. Der Basalkörper wurde parallel zu HNF4 α mittels eines Antikörpers spezifisch gegen γ -Tubulin (Santa Cruz, T3559) angefärbt. Zur Kontrolle der Mitosen wurde die DNA mit Hoechst angefärbt und die Überlagerung der drei Färbungen zeigte die Lokalisation der Proteine in Bezug zum Zellkern. Weiße Pfeile bezeichnen die Position des HNF4 α Proteins, gelbe Pfeile die des Spindelapparates und rote Pfeile die der Cilie.

In Abbildung 12 ist die Lokalisation von HNF4 α und des Basalkörpers in Bezug zum Zellkern gezeigt. In zwei Zellen war der Spindelapparat mit seinen beiden Spindelpolen deutlich beidseitig der DNA zu erkennen (gelbe Pfeile), welche sich an der Äquatorialebene zu Beginn der Mitose sammelte. Die Ansammlung von HNF4 α wurde links oberhalb bzw. links unterhalb des linken Spindelpols detektiert (weiße Pfeile). Es lag somit eindeutig keine Co-Lokalisation von HNF4 α an den Spindelpolen vor.

Im Bildausschnitt ist ebenfalls eine Interphasen-Zelle zu erkennen, bei der der Basalkörper angefärbt ist (roter Pfeil). Eine Co-Lokalisation wurde allerdings auch hier ausgeschlossen.

Diese Analyse der subzellulären Lokalisation von HNF4 α zeigte, dass sich das HNF4 α -Protein in der HEK293-Zelllinie während der Mitose an einem spezifischen Ort innerhalb der Zelle sammelt. Die Ansammlung ist ebenfalls bei einer physiologischen Proteinmenge von HNF4 α zu beobachten und die punktuelle Ansammlung ist sowohl zell- als auch proteinspezifisch für HNF4 α in HEK293-Zellen. Allerdings konnte kein kausaler Zusammenhang zwischen dieser spezifischen Lokalisation des Proteins und der Hemmung der Zellproliferation ermittelt werden und es bestand keine Co-Lokalisation zwischen HNF4 α und dem Basalkörper.

3 Die Expression von HNF4 α war nach einer langfristigen Induktion reprimiert

3.1 Aufhebung der Proliferationshemmung und der Morphologieveränderungen bei einer vierwöchigen Induktion von HNF4 α

Bisher wurde HNF4 α ausschließlich über einen relativ kurzen Zeitraum von bis zu sechs Tagen induziert. Dabei konnte eine deutliche Hemmung der Proliferation und eine Veränderung der Morphologie beobachtet werden. Daten über einen längeren Expressions-Zeitraum sind für HNF4 α in Zellen einer Hepatozellulären Karzinomzelllinie vorhanden (Lazarevich et al., 2004).

Da die HEK293-Zelllinie keine endogene HNF4 α -Expression aufweist, sollte eine vierwöchige Expression von HNF4 α hergestellt werden. Im Anschluss an die vierwöchige HNF4 α -Expression sollten die Zellen bezüglich ihrer Differenzierung analysiert werden.

Abbildung 13 A zeigt zwei unabhängige Versuche der Zelllinie wt#1 und der HNF4 α -Mutante C106R#1. Zu Beginn des Versuches wurden von jeder Zelllinie je eine Million Zellen auf zwei Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde je eine Schale zur Kontrolle mit Ethanol behandelt, die andere Schale wurde mit

1000 ng / ml Doxycyclin induziert. Im Laufe der ersten 13 Tage zeigte sich die erwartete Zellproliferations-Hemmung ausgelöst durch HNF4 α , denn die HNF4 α exprimierenden Zellen befanden sich nach 13 Tagen in der achten Passage, die nicht induzierten Kontrollzellen dagegen in der zehnten Passage. Die Zellen, die die Mutante C106#1 exprimierten und auch deren Kontrollzellen befanden sich nach 13 Tagen in der zehnten Passage. Innerhalb der letzten 15 Tage entstand kein größerer Abstand zwischen den HNF4 α exprimierenden Zellen und den Kontrollzellen (Ethanol behandelte und Zelllinie C106R). Die zu Beginn beobachtete Proliferationsverzögerung schritt demnach nicht kontinuierlich über den gesamten Zeitraum von 28 Tagen fort. Die Daten des zweiten Versuches bestätigten die Ergebnisse des ersten Versuches, auch hier tritt die Hemmung der Zellproliferation ausschließlich in den ersten Tagen des Versuches auf.

Die Morphologie der Zellen wurde während der gesamten Versuchsdauer regelmäßig mittels der Phasenkontrast-Photographie dokumentiert und Beispiele sind in Abbildung 13 B dargestellt. Im Falle der Zelllinie wt#1 zeigten die Bilder bis zum 13. Tag deutlich die erwartete Veränderung der Morphologie, dabei runden sich die Zellen ab und zeigen nicht mehr die typische Monolayer-Struktur. Die Kontrollzellen, die mit Ethanol behandelt wurden, zeigten keine Veränderungen der Monolayer-Struktur. Ab der dritten Woche ließ sich bei der Zelllinie wt#1 eine Aufhebung der Morphologie-Veränderung in beiden Versuchsreihen dokumentieren. Die Zelllinie HNF4 α C106R#1, zeigte weder mit noch ohne Expression des Proteins eine Veränderung der Morphologie.

Die durch HNF4 α hervorgerufenen Effekte auf die Proliferation und die Morphologie der Zellen ließen sich somit nur innerhalb der ersten beiden Versuchswochen beobachten.

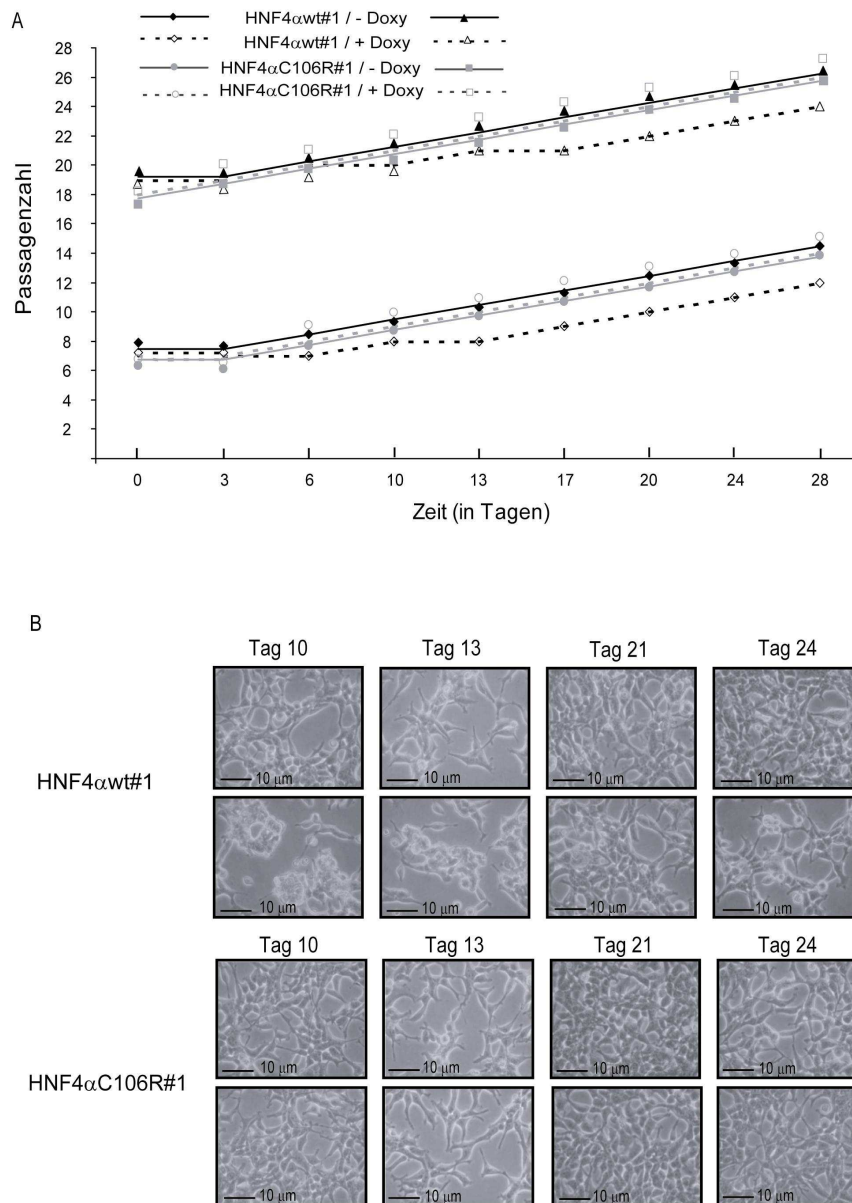


Abbildung 13: Langfristige Expression von HNF4 α bewirkte eine Aufhebung der Zellhemmung und der Morphologie-Veränderungen Die Zelllinien HNF4 α wt#1 und HNF4 α C106R#1 wurden über einen Zeitraum von vier Wochen entweder mit Ethanol (-Doxy) oder mit 1000 ng / ml Doxycyclin (+ Doxy) behandelt. A) Die Zellen wurden zweimal in der Woche gesplittet oder es wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. B) Über den Versuchs-Zeitraum von vier Wochen wurde die Morphologie der Zellen regelmäßig mittels der Phasenkontrast-Photographie festgehalten.

3.2 HNF4 α Expression nach vierwöchiger Induktion

In Abbildung 14 A ist die Expression von HNF4 α wt#1 mittels eines Western Blots und mittels einer Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Expression wurde nach 24 Stunden, nach vier Tagen und nach vier Wochen jeweils für die induzierte und die nicht induzierte Probe im Western Blot analysiert. Die HNF4 α -Zelllinien (Daten von wt#4 nicht gezeigt) zeigten in den induzierten Proben nach 24 Stunden und nach vier

Tagen eine detektierbare HNF4 α -Expression. Nach Ablauf der vier Wochen Induktion ist kein Protein im Western Blot mehr nachweisbar. Zusätzlich wurde mittels einer Immunfluoreszenz die HNF4 α -Expression der Zellen untersucht, wobei eine deutlich verminderte Anzahl an HNF4 α exprimierenden Zellen detektiert wurde (Tabelle 10). Es zeigte sich für die Zelllinie wt#1 ein deutlicher Rückgang auf 13%, allerdings ist, anders als im Western Blot, noch eine Expression in einigen Zellen detektierbar. Im Vergleich dazu zeigte sich in den mit Ethanol behandelten Zellen die erwartete geringe Expressionsrate von 3% (Tabelle 10). Die Zelllinie wt#4 zeigte ebenfalls einen klaren Rückgang der Expressionsrate von üblicherweise annähernd 100% auf 25% der Zellen. Die entsprechende Ethanol-Kontrolle wies den erwarteten geringen Anteil von nur 2% auf (Tabelle 10).

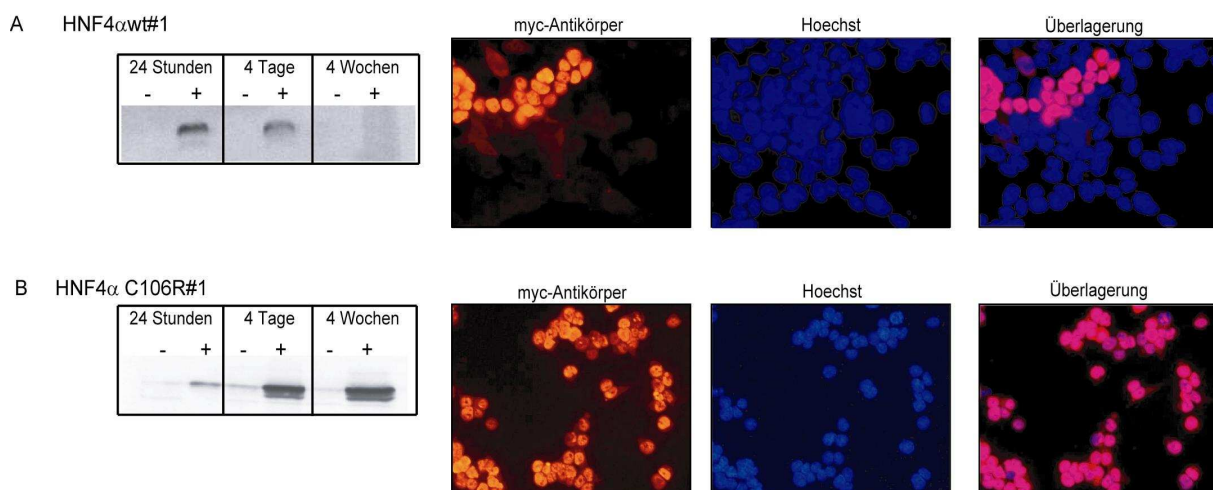


Abbildung 14: Die Anzahl der HNF4 α exprimierenden Zellen war nach einer vierwöchigen Induktion auf 13% zurückgegangen A) Die Zelllinie HNF4 α wt#1 wurde über 24 Stunden, vier Tage oder vier Wochen konstant entweder mit Ethanol (-) oder mit 1000 ng / ml Doxycyclin (+) behandelt. Nach Ablauf der jeweiligen Versuchszeiten wurden die Proteine isoliert und im Western Blot mittels des myc-Antikörpers 9E10 detektiert. Die Expression des Proteins auf Zellebene wurde nach vier Wochen konstanter Induktion von 1000 ng / ml Doxycyclin anhand einer Immunfluoreszenz ebenfalls mittels des myc-Antikörpers 9E10 nachgewiesen. B) Derselbe Versuchsablauf wurde mit der Mutante C106R#1 durchgeführt.

Im Unterschied zu der Analyse von HNF4 α zeigte sich im Western Blot der Mutante C106R eine deutliche Bande sowohl nach 24 Stunden, nach vier Tagen als auch nach vier Wochen Induktion (Abbildung 14 B). Die Immunfluoreszenz, die nach vier Wochen Induktion durchgeführt wurde, demonstrierte eine Expression des Proteins in annähernd allen der HNF4 α C106R#1-Zellen. Die qualitative Auswertung der Immunfluoreszenz-Daten ergab eine 96%ige Expression der Zellen (Tabelle 10). Die entsprechende Ethanol-Kontrolle zeigte die erwartete niedrige Induktionsrate von nur

2%. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Aufnahmen für die Zelllinie R154X#6 ergab die selben Ergebnisse wie für die Zelllinie C106R (Tabelle 10).

Tabelle 10: Die HNF4 α -Zelllinien zeigten einen dramatischen Rückgang der HNF4 α -positiven Zellen nach vierwöchiger Induktion Die Zelllinien HNF4 α wt#1, wt#4, C106R#1 und R154X#6 wurden nach Ablauf der vierwöchigen Behandlung mit Ethanol (- Doxy) oder 1000 ng / ml Doxycyclin (+ Doxy) mittels einer Immunfluoreszenz auf die Anzahl der noch HNF4 α exprimierenden Zellen untersucht. Dabei wurden mindestens vier Bilder der jeweiligen Immunfluoreszenz, auf denen insgesamt mindestens 200 Zellen abgelichtet waren, beurteilt.

Zelllinie	Induktion	Zellzahl	HNF4 α positive Zellen (%)
HNF4 α #1	- Doxy	541	3
HNF4 α #1	+ Doxy	312	13
HNF4 α #4	- Doxy	237	2
HNF4 α #4	+ Doxy	325	25
HNF4 α C106R	- Doxy	216	2
HNF4 α C106R	+ Doxy	249	96
HNF4 α R154X	- Doxy	765	2
HNF4 α R154X	+ Doxy	626	96

Die Expression von HNF4 α war somit ausschließlich bei den beiden Zelllinien HNF4 α wt#1 und HNF4 α wt#4 nach einer vierwöchigen Induktion reprimiert und war nicht mehr im Western Blot nachweisbar. Die beobachtete Aufhebung der durch HNF4 α ausgelösten Veränderungen bezüglich der Zellproliferation und der Zell-Morphologie war somit auf eine verminderte Expression des Proteins im Verlauf der vier Wochen zurückzuführen.

3.3 Lac-Z-Aktivität nach einer vierwöchigen HNF4 α -Induktion

Bei der Generierung der Flp-In-Zelllinien verlieren die erfolgreich stabil transfizierten Zellen die Aktivität des Lac-Z-Gens, da das Hygromycin-Resistenzgen das Lac-Z-Gen ersetzt (Abbildung 2). Durch den Einsatz von Hygromycin im Medium wird ein Selektionsdruck auf die transfizierten Zellen ausgeübt, so dass nur die Zellen, die die Hygromycin-Resistenz und das gewünschte Gen integriert haben, überleben. Diesen Zellen ist es nun nicht mehr möglich bei einem β -Galaktosidase-Test die Zellen blau zu färben, da sie die Aktivität des Lac-Z-Gens zugunsten des gewünschten Gens und der Hygromycin Resistenz verloren haben.

Die stabil transfizierten Zelllinien wiesen nach ihrer Generierung teilweise einen geringen Prozentsatz von Lac-Z-positiven Zellen auf (wt#1: 0% und C106R#1: 1%)

(Dissertation B. Lucas 2005; <http://miles.uni-duisburg-essen.de>). Bei diesen Zellen ist es somit möglich, dass die Lac-Z-positiven Zellen die negativen Zellen im Laufe des vierwöchigen Versuchszeitraumes überwachsen, da sie nicht das proliferationshemmende HNF4 α -Konstrukt stabil integriert haben. Dieser Proliferationsvorteil der Lac-Z-positiven Zellen würde zu einem Überwachsen der Lac-Z-negativen Zellen führen und damit eine mögliche Erklärung für die beobachtete Abnahme des HNF4 α -Proteins und die damit verbundene Aufhebung der Proliferationshemmung und der Morphologie-veränderungen darstellen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Zelllinien HNF4 α wt#1 und HNF4 α C106R#1 nach Ablauf einer vierwöchigen Induktion einem β -Galaktosidase-Test unterzogen.

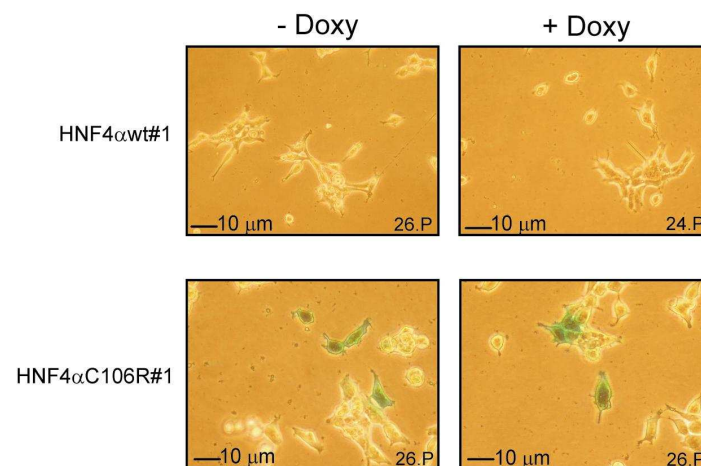


Abbildung 15: Nach einer vierwöchigen HNF4 α -Induktion ist keine Zunahme der Lac-Z-Aktivität detektierbar Die Zelllinien HNF4 α wt#1 und HNF4 α C106R#1 wurden nach Ablauf der vierwöchigen Induktion mittels eines β -Galaktosidase-Tests auf die Aktivität des Lac-Z-Gens untersucht. Hierzu wurden jeweils 2×10^3 Zellen der unterschiedlichen Proben in eine Zellkulturschale (6-cm) nach Ablauf der vier Wochen ausgesät. Nach 48 Stunden wurde die Lac-Z-Färbung durchgeführt. Eine Lac-Z-Aktivität wird durch die Blaufärbung der Zellen sichtbar. Die erreichte Passagenzahl nach Ablauf des Versuches ist jeweils unten rechts angegeben.

Abbildung 15 zeigt Phasenkontrastaufnahmen nach Durchführung des β -Galaktosidase-Tests der beiden untersuchten Zelllinien jeweils über vier Wochen induziert und nicht induziert. Alle Zellen der Zelllinie HNF4 α wt#1 blieben nach dem β -Galaktosidase-Test weiß, so dass nach vierwöchiger kontinuierlicher HNF4 α -Induktion keine erhöhte Lac-Z-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Tabelle 11).

Bei der Zelllinie HNF4 α C106R#1 zeigte nur ein geringer Prozentsatz von 0,2% der Zellen eine Lac-Z-Aktivität (Tabelle 11). Der geringe Anteil an positiven Zellen (1,2%

und 0,2%) wurde allerdings auch erwartet, da bei der Induktion der funktionslosen Mutante kein Selektionsdruck durch einen Proliferationsnachteil entstehen kann und somit die anfänglichen Lac-Z-positiven Zellen keinen Proliferationsvorteil gegenüber den Lac-Z-negativen Zellen besitzen.

Tabelle 11: Die vierwöchige Induktion von HNF4 α bewirkte keine Proliferationsvorteil der Lac-Z-positiven Zellen Die Zellen wurden bei einer 125-fachen Vergrößerung fotografiert und der Anteil an Lac-Z-positiven Zellen durch Zählung der weißen und blauen Zellen ermittelt.

Zelllinie	Induktion	Zellen mit Lac-Z-Aktivität (%)	Zellzahl
HNF4 α wt#1	- Doxy	0	340
HNF4 α wt#1	+ Doxy	0	398
HNF4 α C106R#1	- Doxy	1,2	453
HNF4 α C106R#1	+ Doxy	0,2	410

Der untersuchte Expressionsrückgang des HNF4 α -Proteins und die dadurch resultierende Aufhebung der Effekte auf Zellproliferation und Zellmorphologie ließ sich somit nicht mit einer Selektion gegen Lac-Z-negative Zellen und deren Überwachsen durch Lac-Z-positive Zellen erklären, sondern beruht auf einer Expressions-Reprimierung der HNF4 α exprimierenden Zellen.

Eine Analyse bezüglich einer möglichen Differenzierung HEK293-Zellen nach Ablauf der vierwöchigen HNF4 α -Expression konnte mangels HNF4 α -Expression nicht durchgeführt werden.

4 Identifizierung von HNF4 α -regulierten Genen in der HEK293-Zelllinie

Die Expression von HNF4 α verursacht eine Proliferationshemmung und eine Veränderung der Morphologie. Da diese Veränderungen nicht bei den beiden mutierten Zelllinien HNF4 α C106R#1 und HNF4 α R154X#6 zu beobachten sind, ist eine transkriptionelle Übertragung der Signale wahrscheinlicher als eine Protein-Protein-Interaktion. Zur Identifizierung aller HNF4 α -regulierten Gene in den HEK293-Zellen wurde ein Expressionsprofil der HNF4 α exprimierenden Zellen mit Hilfe von Oligonukleotid-Mikroarrays ermittelt. Mit dieser Technologie ist es möglich, die Expression von nahezu allen humanen proteinkodierenden Genen zu analysieren (Affymetrix).

Mit dieser Technologie wurde für die Zelllinien HNF4 α wt#1, wt#4, C106R#1 und R154X#6 jeweils ein Vergleich der Doxycyclin-induzierten Zellen mit den entsprechenden Ethanol-Kontroll-Zellen durchgeführt, um Expressionsveränderungen der durch HNF4 α -regulierten Gene zu ermitteln. Die Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit Ethanol oder mit 1000 ng / ml Doxycyclin behandelt und anschließend wurde die RNA isoliert. Die markierten cRNAs wurden auf den HG-U133 _Plus_2.0 Genechip hybridisiert, mit welchem 54.000 Sondenproben (probe sets) bzw. 38.500 humane proteinkodierende Gene analysiert werden können.

Es wurden ausschließlich Proben als HNF4 α -regulierte Gene identifiziert, die in den beiden Zelllinien wt#1 und wt#4 reguliert waren und in keiner der beiden Mutantenzelllinien auftraten. Die jeweils regulierten Proben wurden durch mehrere Bedingungen gefiltert. Sie mussten induziert (I) oder reprimiert (D) sein, das „change p-value“ sollte für die induzierten Proben einen p-value von mindestens $p < 0,0045$ oder für die reprimierten Proben $p > 0,9955$ haben und die Probe sollte entweder in den Kontrollzellen oder in den induzierten Zellen als vorhanden gewertet worden sein (present call).

In Abbildung 16 ist die Ermittlung der Sondenproben als Venn-Diagramm dargestellt. Beide HNF4 α -Zelllinien regulierten jeweils über 3.800 Sondenproben, wobei annähernd die Hälfte, 1781 Sondenproben, in beiden Zelllinien reguliert wurde. Die Zelllinie R154X#6 regulierte wie erwartet mit 500 Sondenproben eine größere Anzahl

als die in der DNA-Bindedomäne mutierte Mutante C106R#1 (369 Sondenproben). Nur 26 Sondenproben wurden von beiden HNF4 α -Mutanten reguliert und diese 26 Sondenproben wurden mit den 1781 Sondenproben der beiden Zelllinien wt#1 und wt#4 verglichen. Nur vier Sondenproben wurden sowohl von den HNF4 α -Zelllinien als auch von den Mutanten-Zelllinien reguliert und wurden in folgenden Versuchen nicht weiter berücksichtigt. Somit regulierte HNF4 α 1777 Proben in der HEK293-Zelllinie.

Auf dem Mikroarray Chip waren für einige Gene mehr als eine Sonde vorhanden, deshalb entsprachen diese 1777 regulierten Sondenproben 1411 differenziell regulierten proteinkodierenden Genen, wobei 783 induziert und 628 reprimiert waren. Die Daten der Mikroarray Ergebnisse wurden unter der Nummer GSE8289 bei „NCBI Gene Expression Omnibus“ hinterlegt. Da bei der Analyse der beiden Mutanten nur 26 Genen reguliert worden waren, konnte man davon ausgehen, dass der Großteil dieser 1411 Gene tatsächliche HNF4 α -regulierte Gene darstellten, während die 26 Gene der Mutanten-Zelllinien als falsch-positive Ergebnisse der Mikroarray-Technik gewertet wurden.

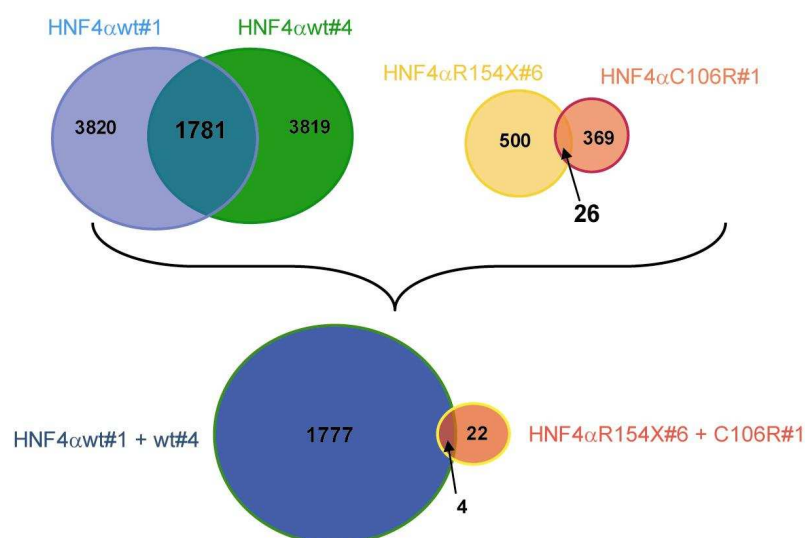


Abbildung 16: HNF4 α -regulierte 1777 Proben in den HEK293-Zellen Für die Zelllinien HNF4 α wt#1, wt#4, C106R#1 und R154X#6 wurde jeweils ein Expressionsprofil mittels der Mikroarray-Technik nach 24 Stunden Induktion erstellt. Verwendet wurde der HG-U133_Plus_2.0 Array, mit welchem die Expression von nahezu dem gesamten proteinkodierendem menschlichen Genom analysiert werden kann.

4.1 Vergleich des HG-U133 _Plus_2.0 Arrays mit dem HG-U133A Array

Ein Vergleich mit einem zwei Jahre zuvor durchgeführten Expressionsprofil (Lucas et al., 2005) sollte zum einen darüber Aufschluss geben, wie stabil die generierte Zelllinie war und zum anderen wie verlässlich die ermittelten HNF4 α -regulierten Gene bei dieser Untersuchung sind. Beide Experimente waren den selben Versuchsbedingungen ausgesetzt. Im ersten Experiment wurden die Zellen allerdings mit Tetracyclin statt mit dessen Derivat Doxycyclin induziert, dieses hatte aber keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Expression von HNF4 α . Außerdem wurde bei dem ersten Expressionsprofil der HG-U133A-Genechip verwendet, welcher 18.400 humane proteinkodierende Gene detektiert. Die Filterbedingungen des zweiten Expressionsprofils wurden dem ersten zwecks des Vergleichs angepasst (Lucas et al., 2005). Abbildung 17 zeigt in einem Venn-Diagramm das Ergebnis des Vergleichs der beiden Expressions-Analysen.

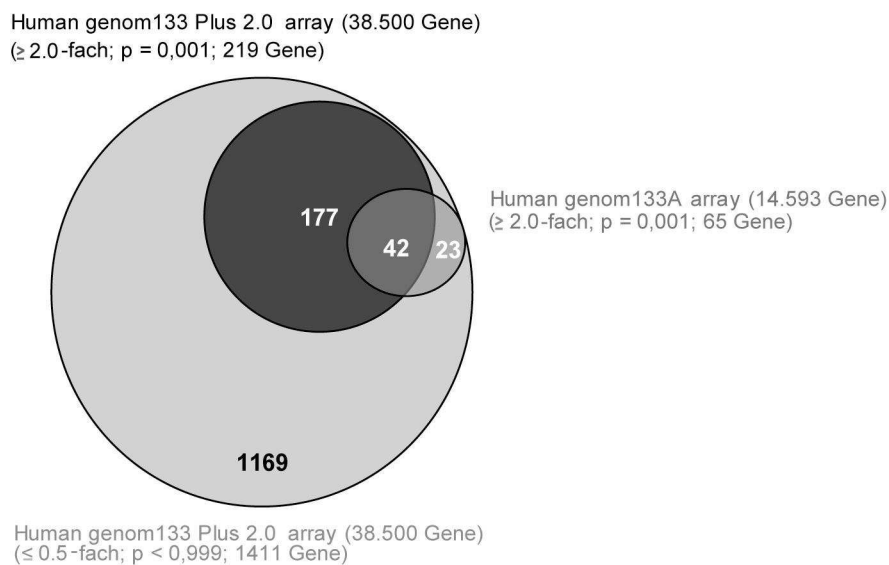


Abbildung 17: HNF4 α -regulierte 1411 proteinkodierende Gene in den HEK293-Zellen Vergleichende Analyse zwischen dem Genechip HG-U133A und HG-U133 _Plus_2.0. Das HNF4 α -Gen wurde nicht einbezogen. Unter Berücksichtigung einer mindestens 2-fachen Regulation wurden 219 regulierte Gene mit dem HG-U133 _Plus_2.0 Array detektiert, während zuvor 65 Gene mit dem HG-U133A Array detektiert worden waren.

Mit dem HG-U133A Genechip, wurden insgesamt 65 HNF4 α -regulierte Gene, die mindestens 2-fach reguliert waren, detektiert (Abb. III. 17 dunkelgrauer Kreis) (Lucas et al., 2005). Mit dem erweiterten Chip, der nahezu das komplette menschliche proteinkodierende Genom berücksichtigt, konnten 219 regulierte Gene detektiert

werden (Abb. 17 schwarzer Kreis), wobei 42 Gene in beiden Expressionsprofil-Analysen reguliert waren. Mit weniger strengen Filterbedingungen, wurden mit dem HG-U133 _Plus_2.0 -Genechip insgesamt 1411 regulierte Gene detektiert, inklusive der 65 HNF4 α -regulierten Gene des ersten Expressionsprofils.

Es zeigte sich somit, dass auch im Abstand von mehreren Jahren die selben HNF4 α -regulierten Gene detektiert wurden. Dies ließ auf einen sehr stabilen Zustand der Zelllinien rückschließen und es bewies ebenso eine hohe Verlässlichkeit der Mikroarray-Ergebnisse.

4.2 HNF4 α -regulierte Gene zeigen starke Beteiligung am Metabolismus, der Entwicklung und der Morphogenese

Um zu analysieren an welchen biologischen Prozessen die regulierten Gene maßgeblich beteiligt waren, wurde eine Gen-Ontologie-Analyse durchgeführt (Beissbarth and Speed, 2004). Die 1411 regulierten Gene bieten eine ausreichende Anzahl an Proben, um eine statistisch abgesicherte Analyse der beteiligten biologischen Prozesse durchzuführen.

Tabelle 12: HNF4 α -regulierte Gene waren überdurchschnittlich häufig an Metabolismus, Entwicklung und Morphogenese beteiligt Bei der GO-Analyse wurden die oben erwähnten 1411 Gene mit einem Pool von 24.800 Genen bezüglich der Häufigkeit der zuzuordnenden biologischen Prozesse analysiert. Es wurden hierbei nur 24.800 menschlichen proteinkodierende Gene berücksichtigt, da zum einen nicht von allen Genen die biologische Funktion bekannt ist, und zum anderen die Anzahl von 24.800 das Maximum des verwendeten Programms (GOstat) (Beissbarth and Speed, 2004) ist. Durch den p-Value (Signifikanz) wird angegeben, wenn überdurchschnittlich häufig HNF4 α -regulierte Gene an einem Prozess beteiligt waren, als dieses statistisch zufällig der Fall sein konnte. Die Analyse beruht auf den im Juni des Jahres 2007 zugänglichen Daten bezüglich der Zuordnung der Gene in die biologischen Prozesse.

Biologischer Prozess	Gene Ontologie Nummer	Anzahl beteiligter HNF4 α -regulierter Gene	gesamt Anzahl bekannter Gene des Prozesses	Signifikanz
Multizellulärer Organismus	GO:0006631	173	1240	4,38E ⁻⁰⁶
Metabolismus von				
Fettsäuren	GO:0032787	31	96	1,73E ⁻¹⁰
Monokarbolischen Säuren	GO:0032787	37	128	1,76E ⁻¹⁰
zellulären Lipiden	GO:0044255	64	311	1,92E ⁻⁰⁸
Lipiden	GO:0006629	70	364	9,11E ⁻⁰⁸
Carboxylsäuren	GO:0019752	56	300	1,80E ⁻⁰⁵
Organische Säuren	GO:0006082	56	302	2,17E ⁻⁰⁵
Aminoglycan Biosynthese	GO:0006023	8	14	0,00155

Glycosaminoglycan Biosynthese	<u>GO:0006024</u>	7	13	0,00644
Chondroitin Sulfat Proteoglycan Biosynthese	<u>GO:0050650</u>	5	7	0,0118
Steroiden	<u>GO:0008202</u>	18	81	0,0164
Chondroitin Sulfat Proteoglycan	<u>GO:0050654</u>	5	8	0,0232
Sterol Biosynthese	<u>GO:0016126</u>	9	26	0,0278
Aminoglycanen	<u>GO:0006022</u>	9	27	0,0347
Stickstoff Komponenten	<u>GO:0006807</u>	40	250	0,0347
Icosanoiden	<u>GO:0006690</u>	6	13	0,0347
Lipid Biosynthese	<u>GO:0008610</u>	28	158	0,0347
Lipid Katabolismus	<u>GO:0016042</u>	11	39	0,0354
Kurzkettigen Fettsäuren	<u>GO:0046459</u>	3	3	0,0374
Sulfur	<u>GO:0006790</u>	13	52	0,0375
Leukotrienen	<u>GO:0006691</u>	4	6	0,0375
Chondroitin Sulfat	<u>GO:0030204</u>	4	6	0,0375
Chondroitin Sulfat Biosynthese	<u>GO:0030206</u>	4	6	0,0375
Alkenen	<u>GO:0043449</u>	4	6	0,0375
Proteoglycan	<u>GO:0006029</u>	7	19	0,0439
Aminen	<u>GO:0009308</u>	37	234	0,0494

Entwicklung der / des				
anatomischen Struktur	<u>GO:0048856</u>	125	863	5,15E ⁻⁰⁵
Systems	<u>GO:0048731</u>	100	671	0,000212
Multizellulären Organismus	<u>GO:0007275</u>	130	930	0,000237
Organe	<u>GO:0048513</u>	75	506	0,00448
Nervensystems	<u>GO:0007399</u>	48	301	0,0153
Entwicklungsprozesse	<u>GO:0032502</u>	199	1677	0,0272
Pankreas	<u>GO:0031016</u>	4	6	0,0375

Morphogenese der				
anatomischen Struktur	<u>GO:0009653</u>	68	483	0,0347

In Tabelle 12 erkennt man eine überdurchschnittliche Beteiligung der durch HNF4 α -regulierten Gene an den Prozessen des Metabolismus, der Entwicklung und der Morphogenese. Besonders signifikant ist die Beteiligung am Metabolismus der Fettsäuren, der Monokarbolischen Säuren und der Lipide. Die vollständige Liste mit den entsprechenden zugehörigen Genen befindet sich im Anhang im Abschnitt VII. 1 (Tabelle 17).

5 Identifizierung der proliferations- und morphologie- relevanten HNF4 α -regulierten Gene

Die Zahl an 1411 HNF4 α -regulierten proteinkodierenden Genen war zu groß um proliferations- und / oder morphologierelevanten Genen zu identifizieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Gene eine bestimmte Konzentration des

entsprechenden Transkriptionsfaktors benötigen (Schwellenwerte), um eine Expressionsänderung zu zeigen (Magee et al., 2003).

Es sollte nun eine minimale HNF4 α -Expression erzeugt werden, bei der die Veränderungen der Proliferation und der Morphologie noch zu beobachten waren. Bei dieser minimalen HNF4 α -Expression wird anschließend die Expression der HNF4 α -regulierten Gene mittels einer Mikroarray-Analyse ermittelt. Die Kandidatengene die keine Expressionsänderung bei dieser minimalen HNF4 α -Konzentration aufweisen, werden als Kandidatengene für die Vermittlung der Zellproliferation und / oder der Morphologieveränderung ausgeschlossen, da die Effekte auf Proliferation und / oder Morphologie bei dieser HNF4 α -Expression noch zu beobachten waren.

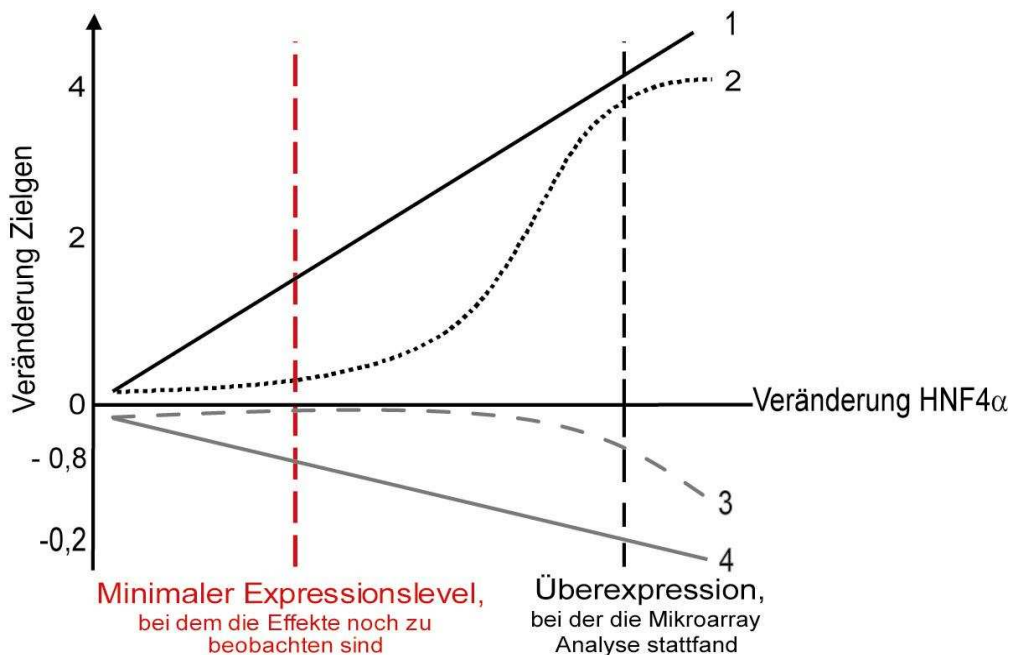


Abbildung 18: Schema zur Eingrenzung der proliferations- und morphologierelevanten Gene Stilisiert dargestellt sind mögliche Expressionsverläufe der Kandidatengene. Ermittelt werden soll die Expression der Kandidatengene bei einer HNF4 α -Überexpression (schwarz) und bei einer minimalen HNF4 α -Expression (rot), bei dem die Veränderungen der Proliferation und der Morphologie noch zu beobachten sind.

Abbildung 18 verdeutlicht diese Schwellenwert-These als schematische Grafik. Auf der x-Achse ist die Induktionsrate von HNF4 α dargestellt und auf der y-Achse die Veränderung der regulierten Kandidatengene in Abhängigkeit der HNF4 α -Konzentration. Schematisch wurden vier mögliche Expressions-Kurven der

Kandidatengene eingezeichnet und die Messpunkte bei einer minimalen Expression und bei der Überexpression von HNF4 α angegeben. Die durchgezogenen Linien der Kurven 1 und 4 stellen dabei die Reaktion der relevanten Kandidatengene dar. Die gestrichelten Linien 2 und 3 stellen die auszuschließenden Kandidaten dar, da diese bei dem minimalen Expressionsniveau von HNF4 α keine signifikante Expressionsänderung zeigen, obwohl die Veränderungen der Proliferation und der Morphologie bei dieser minimalen HNF4 α -Konzentration noch zu beobachten ist.

5.1 Definition der Doxycyclin-Induktion, die die minimale HNF4 α -Expression erzeugte

Um die geringste Konzentration an Doxycyclin zu definieren, bei der die Effekte auf Zellproliferation und Zellmorphologie durch eine minimale HNF4 α -Expression noch zu beobachten waren, wurde die Zellproliferationshemmung und die Morphologie-Veränderung unter Einsatz verschiedener Doxycyclin-Konzentrationen an den HNF4 α -Zelllinien wt#1 und wt#4 untersucht.

In Abbildung 19 A sind die Ergebnisse der Zellproliferationsbestimmung und der Morphologie-Veränderung dargestellt. Schon bei einer sehr geringen Induktion von HNF4 α (2 ng / ml Doxy) ließ sich ein leichter Rückgang der Zellproliferation nach vier und sechs Tagen erkennen. Am sechsten Versuchstag zeigten die Zellen einen Rückgang auf 81% im Vergleich zu der Ethanol-Kontrolle. Bei den ansteigenden Doxycyclin-Konzentrationen ließen sich in Abhängigkeit zu der Induktion ein stärkerer Rückgang der Zellproliferation beobachten. Am vierten Tag lag die Proliferationsrate dementsprechend jeweils im Vergleich zu der Ethanol-Kontrolle für 2 ng / ml Doxycyclin bei 87%, für 5 ng / ml Doxycyclin bei 77%, für 10 ng / ml Doxycyclin bei 63% und für 1000 ng / ml Doxycyclin bei 54%.

In Teil B der Abbildung 19 ist die zugehörige Morphologie-Veränderung der Zellen dokumentiert. Nach vier Tagen mit einer Induktion von 2 ng / ml Doxycyclin zeigte sich eine schwache Morphologie-Veränderung. Ab einer Induktion von 5 ng / ml Doxycyclin zeigten sich ab dem vierten Tag starke morphologische Veränderungen. Dabei gaben einige Zellen ihre typische Form als Monolayer auf, schlossen sich zu einem dreidimensionalen Konglomerat zusammen und zeigten eine verringerte

Adhäsion zum Gefäßboden. Diese Entwicklung zeigten ebenfalls die höheren Doxycyclin-Konzentrationen (10 ng / ml und 1000 ng / ml), allerdings traten bei ihnen bereits am zweiten Tag nach Beginn der Behandlung die ersten Anzeichen einer veränderten Morphologie auf. Für die Zelllinie HNF4 α wt#4 wurden ebenfalls Konzentrationen von 2 ng / ml Doxycyclin bis 10 ng / ml Doxycyclin als der minimale Induktionsbereich ermittelt (Daten nicht gezeigt).

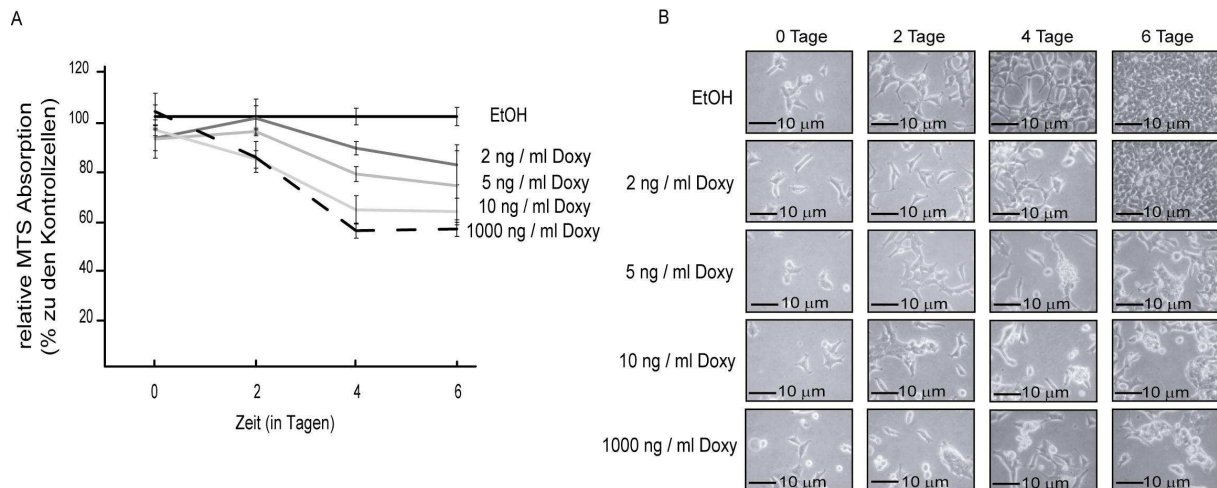


Abbildung 19: Bei einer Induktion von nur 2 ng / ml Doxycyclin ließ sich eine Hemmung der Zellproliferation und eine Veränderung der Zellmorphologie beobachten A) Die Zelllinie HNF4 α wt#1 wurde entweder mit Ethanol oder vier unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen (2 ng / ml; 5 ng / ml; 10 ng / ml und 1000 ng / ml) über einen Zeitraum von sechs Tagen induziert. An jedem zweiten Versuchstag wurde ein MTS-Test zur Bestimmung der Zellproliferation durchgeführt. Die Proliferation ist in Prozent der Ethanol behandelten Kontrollzellen angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. B) Parallel dazu wurden die Zellen in einer Zellkulturschale (6 cm) behandelt und zur Dokumentation der Zellmorphologie wurden alle zwei Tage mittels der Phasenkontrastphotographie Aufnahmen getätigt.

Aufgrund dieser Ergebnisse lag für beide HNF4 α -Zelllinien der minimale Induktionsbereich, bei der die Veränderungen noch zu beobachten waren, bei 2 ng / ml Doxycyclin bis 10 ng / ml Doxycyclin.

Nachdem der Bereich der optimalen Doxycyclin-Induktion definiert worden war, wurde das HNF4 α -Expressionsniveau auf Proteinebene analysiert. Hierzu wurden beide HNF4 α -Zelllinien einer 24-stündigen Induktion von 5 ng / ml Doxycyclin, 10 ng / ml Doxycyclin oder 1000 ng / ml Doxycyclin unterzogen. Die Induktion von nur 2 ng / ml Doxycyclin wurde wegen der nur schwachen Veränderungen bei der Morphologie nicht berücksichtigt.

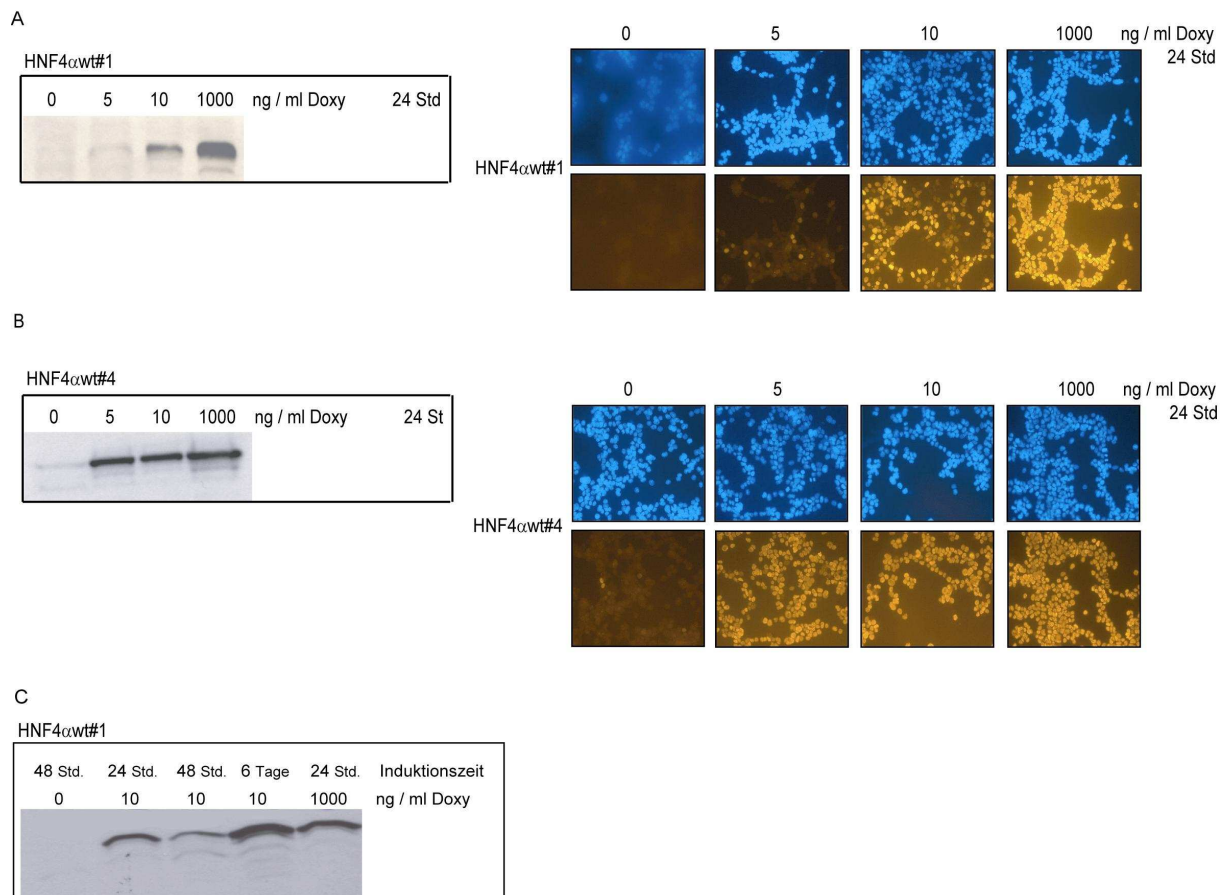


Abbildung 20: Die beiden HNF4 α -Zelllinien reagierten unterschiedlich sensitiv auf die Doxycyclin-Induktion A)+B) Die beiden Zelllinien HNF4 α wt#1 und wt#4 wurden für 24 Stunden mit drei unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen (5 ng / ml, 10 ng / ml und 1000 ng / ml) und zusätzlich mit der Ethanol-Kontrolle behandelt. Anschließend wurden die Proteine isoliert und im Western Blot mittels des myc-Antikörpers 9E10 detektiert. Ebenfalls nach einer 24-stündigen Induktion mit den oben angegebenen Doxycyclin-Konzentrationen wurde die Expression des Proteins auf Zellebene anhand einer Immunfluoreszenz mittels des myc-Antikörpers 9E10 nachgewiesen. C) Die Zelllinie HNF4 α wt#1 wurde über einen Zeitraum von bis zu sechs Tagen mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden die Proteine isoliert und im Western Blot mittels des myc-Antikörpers 9E10 das HNF4 α -Protein detektiert.

In Abbildung 20 A und B sind die Western Blot- und Immunfluoreszenz- Ergebnisse für beide HNF4 α -Zelllinien gezeigt. Die Zelllinie HNF4 α wt#1 zeigte in beiden Untersuchungen einen dosisabhängigen Anstieg der Proteinmenge. Im Vergleich dazu reagierte die Zelllinie HNF4 α wt#4 deutlich sensitiver auf eine geringe Induktion, so dass bereits bei einer 5 ng / ml Doxycyclin-Induktion eine ähnlich starke HNF4 α -Proteinexpression erreicht wurde, wie bei einer 1000 ng / ml Doxycyclin-Induktion.

Um die Expression des Proteins über einen längeren Zeitraum als 24 Stunden zu überprüfen, wurde mit einem der beiden Klone eine Zeitreihe von 24 Stunden bis sechs Tagen mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen durchgeführt und im

Western Blot analysiert (Abbildung 20 C). Bei der Induktion mit 10 ng / ml Doxycyclin ist eine leicht schwächere Expression nach 48 Stunden als nach 24 Stunden detektiert worden. Möglicherweise macht sich bei diesen geringen Konzentrationen bereits nach 48 Stunden der Abbau des Doxycyclins bemerkbar. Bei dem Vergleich zwischen einer geringen Induktion über einen längeren Zeitraum (10 ng / ml Doxycyclin; sechs Tage) mit einer maximalen Induktion über einen kurzen Zeitraum (1000 ng / ml Doxycyclin; 24 Stunden) zeigte sich bei dem längeren Zeitraum mit einer geringeren Induktion eine höhere HNF4 α -Expression. Dies demonstrierte die hohe Stabilität des Proteins, die im Laufe der sechs Tage zu einer Akkumulation führte.

Für den geplanten Versuch zur Eingrenzung der relevanten HNF4 α -regulierten Gene bedeuteten diese Ergebnisse zweierlei. Erstens, musste die Zelllinie wt#4 aufgrund der höheren Sensitivität mit einer geringeren Doxycyclin-Konzentration induziert werden, um eine minimale HNF4 α -Expression zu erzeugen. Zweitens, beide Zelllinien wurden bei Ansätzen über einen längeren Induktionszeitraum mit einer geringeren Dosis als 10 ng / ml Doxycyclin induziert, um der Akkumulation des Proteins entgegenzuwirken.

Bevor die Analyse zur Eingrenzung der relevanten regulierten Gene erfolgen konnte, wurden die ermittelten Doxycyclin-Konzentrationen, die entsprechenden Induktionszeiträume und die dadurch erzielte HNF4 α -Expression anhand einer Real-time PCR überprüft. Berücksichtigt wurden dabei die Ergebnisse der oben beschriebenen Vorversuche, so dass für jede Zelllinie ein spezifisches Induktionsschema durchgeführt worden ist.

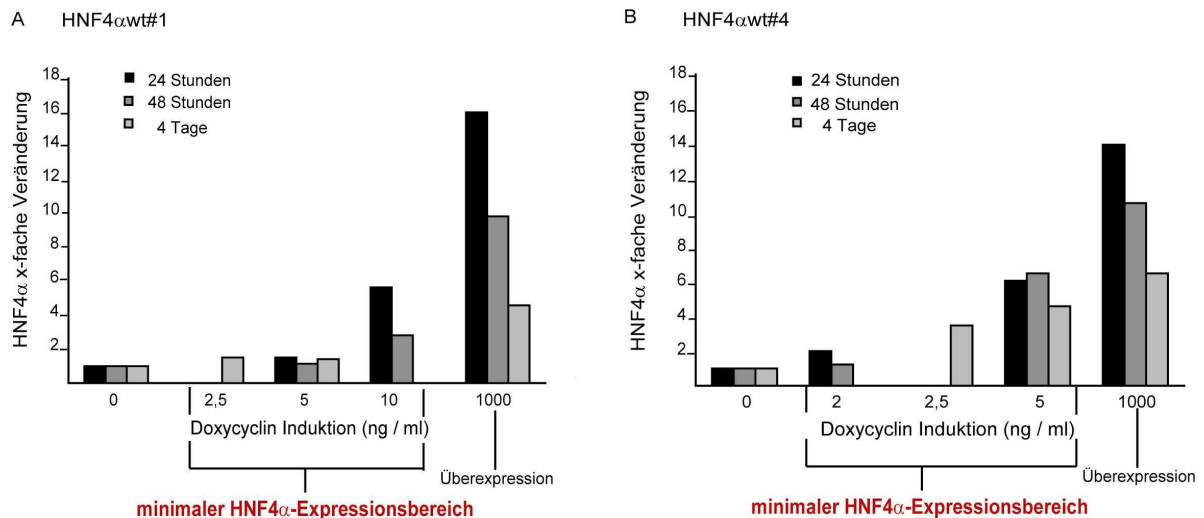


Abbildung 21: Validierung der unterschiedlichen Induktionen und Zeiträume für die Zelllinien HNF4 α wt#1 und wt#4 anhand ihrer mRNA-Expression

A) Die Zelllinie HNF4 α wt#1 wurde entweder über 24 Stunden, 48 Stunden oder vier Tage mit den angegebenen Doxycyclin-Konzentrationen und Ethanol behandelt. Die RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben, anschließend wurde die cDNA 1:4 verdünnt und in die Real-time PCR eingesetzt. Die RNA-Expression wurde mittels einer spezifischen HNF4 α -TaqMan Sonde (Hs00230853_m1) detektiert. B) Die RNA-Expression für die Zelllinie HNF4 α wt#4 mit den entsprechenden Doxycyclin-Induktionen und Zeiträumen wurde ebenso ermittelt.

Wie in Abbildung 21 A zu erkennen ist, wurde der zuvor ermittelte minimale HNF4 α -Expressionsbereich für die Zelllinie HNF4 α wt#1 mittels der real-time PCR validiert. Bei der Induktion von 2,5 ng / ml Doxycyclin bis 10 ng / ml Doxycyclin wurde eine minimale HNF4 α -Expression gemessen. Bis auf die viertägige 5 ng / ml Doxycyclin-Induktion zeigten alle Messreihen an den unterschiedlichen Zeitpunkten einen Anstieg der HNF4 α -mRNA-Expression mit steigender Doxycyclin-Induktion.

Für die Zelllinie wt#4 wurde aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber Doxycyclin ein etwas variiertes Induktionsschema entworfen. In Abbildung 21 B erkennt man den Anstieg der mRNA-Expression von HNF4 α wt#4 bei allen Konzentrationen und den entsprechenden Zeiträumen. Bei dieser Zelllinie lag der minimale Expressionsbereich zwischen 2 ng / ml Doxycyclin und 10 ng / ml Doxycyclin.

Überraschenderweise zeigten beide Zelllinien bei der maximalen Induktion von 1000 ng / ml Doxycyclin eine Verringerung der mRNA-Menge in Abhängigkeit zum Messzeitpunkt. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur beobachteten Proteinakkumulation (Abbildung 20) über einen längeren Zeitraum, so dass zu vermuten ist, dass die mRNA-Expression von HNF4 α über eine negative Rückkopplung reguliert wird.

Die HNF4 α -mRNA-Expressionen im Bereich 2 ng / ml Doxycyclin bis 10 ng / ml Doxycyclin erreichten somit bei beiden HNF4 α -Zelllinien eine minimale HNF4 α -Expression, bei welcher aber dennoch die Proliferationshemmung und die Morphologie-Veränderungen zu beobachten waren.

5.2 Eingrenzung der proliferations- und morphologie-relevanten HNF4 α -Kandidatengene

Um die Nutzung der minimalen HNF4 α -Expression für die Eingrenzung der relevanten Kandidatengene zu überprüfen, wurde eine kleine Auswahl der 1411 HNF4 α -regulierten Kandidatengene mittels einer Real-time-PCR getestet, bevor eine Microarray-Analyse durchgeführt wird. Für dieses Experiment wurde die Low Density Card-Technik von Applied Biosystems ausgewählt. Mit Hilfe dieser Karten können 384 TaqMan-Assays parallel mit einem sehr geringen Proben-Volumen durchgeführt werden, so dass eine große Anzahl an Kandidatengenen in kurzer Zeit untersucht werden kann (Applied Biosystems).

Insgesamt wurden 81 Kandidatengene ausgewählt. Von den 81 Kandidatengenen waren 69 durch HNF4 α in der Mikroarray-Analyse reguliert und zwölf nicht. Die zwölf nicht regulierten Kandidatengene dienten als Kontrolle. Zusätzlich wurden drei interne Kontrollen (GAPDH, beta-Aktin und 18sRNA) in die Real-time PCR miteinbezogen. Für einige der Kandidaten standen mehr als ein TaqMan-Assay zur Verfügung, so dass insgesamt 96 Assays, inklusive eines HNF4 α -Assays für die real-time PCR genutzt wurden.

Beide HNF4 α -Zelllinien wurden mit Induktionen von 2 - 10 ng / ml Doxycyclin über einen Zeitraum von 24 Stunden bis vier Tagen zur minimal Expression von HNF4 α behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die mRNA-Expression der ausgewählten Kandidatengene anhand einer Real-time PCR mittels der Low Density Cards bei den unterschiedlichen Konzentrationen und Zeiträumen ermittelt.

In Tabelle 13 sind die Mittelwerte für alle 81 Kandidatengene für 24 Stunden, 48 Stunden und vier Tage jeweils bei einer minimalen HNF4 α -Expression und bei der HNF4 α -Überexpression angegeben.

Tabelle 13: Ergebnisse der Real-time PCR Analyse zur Eingrenzung der proliferations- und / oder morphologierelevanten Kandidatengene Für die 81 untersuchten Kandidatengene ist der Mittelwert der Induktion der beiden Zelllinien HNF4 α wt#1 und wt#4 aufgelistet. Die Tabelle zeigt für jeden Messpunkt jeweils einen Messwert für den minimalen HNF4 α -Expressionsbereich und einen für die HNF4 α -Überexpression. Bei 24 Stunden und 48 Stunden Induktion wurde die Zelllinie wt#1 mit 10 ng / ml Doxycyclin für den minimalen Expressionsbereich induziert und die Zelllinie wt#4 mit 5 ng / ml Doxycyclin. Die Kandidatengene, für die mehr als eine TaqMan-Sonde vorhanden war, sind durchnummeriert. Bei den Mikroarray-Daten handelt es sich um den Mittelwert beider untersuchten HNF4 α -Zelllinien. Eine komplette Liste mit den vollen offiziellen Namen der Gene, den Mikroarray Daten, den TaqMan Probennummern, mit allen Zeiten und allen Induktionen inklusive der Ethanol-Kontrollen ist für jede HNF4 α -Zelllinie getrennt im Anhang VII. 2 (Tabelle 18 A und B) aufgeführt. n.d. = nicht determiniert

Probe	Mikroarray	Real-time PCR					
		24 Std. HNF4 α Expression		48 Std. HNF4 α Expression		4 Tage HNF4 α Expression	
		10 ng / ml 5 ng / ml	1000 ng / ml	10 ng / ml 5 ng / ml	1000 ng / ml	5 ng / ml	1000 ng / ml
HNF4α	15,2	4,1	7,5	4,0	7,4	3,7	7,3
Kategorie 1							
ABCB4_1	4,3	5,1	6,5	4,4	6,3	3,2	6,2
ABCB4_2		5,0	5,6	3,9	5,8	3,1	6,8
AGXT2L1	4,5	5,4	7,8	4,1	7,2	3,2	6,0
CRAT_1	4,2	4,6	6,2	6,9	8,7	4,9	9,3
CRAT_2		5,1	7,5	7,1	9,3	5,5	8,9
EFHD1	5,1	4,1	5,6	3,9	6,9	3,2	6,3
FLJ14146	4,7	3,8	5,4	4,0	6,6	5,0	7,9
MGC33190 / ATXN7L1	29,1	10,9	10,1	4,2	6,9	4,5	6,6
Kategorie 2							
ABCB1_1	3,4	2,8	3,6	3,1	4,4	2,6	4,5
ABCB1_2		3,0	3,7	3,2	4,7	3,2	5,0
ACADVL	2,0	2,0	2,9	1,9	2,5	2,4	3,3
ACOX1_1	2,5	2,2	2,7	2,6	3,1	1,6	3,0
ACOX1_2		2,0	2,7	1,9	2,8	1,8	2,9
ACY1	4,2	2,7	4,2	2,3	3,7	3,1	5,1
AKAP1	2,2	1,9	2,4	1,7	2,5	1,6	2,4
ALCAM	1,5	1,6	1,7	1,4	1,7	1,2	1,7
ALDH5A1_1	2,5	2,0	2,3	1,9	2,8	2,2	3,4
ALDH5A1_2		2,4	3,3	2,3	3,5	2,7	4,3
ATP7B	2,1	2,1	2,5	1,8	2,6	1,8	2,6
CFLAR	2,2	2,1	2,3	2,0	2,9	2,3	2,8
COBL_1	3,7	2,6	3,1	2,5	3,6	2,4	3,8
COBL_2		2,5	3,0	3,1	5,3	3,4	5,8
COL21A1	2,7	2,6	3,1	2,7	3,7	2,1	3,5
DSC2	2,4	2,0	2,5	1,6	2,1	1,3	1,9
DYRK1B	1,0	1,3	1,5	1,1	1,4	1,4	1,7
EPHA2	1,0	1,6	1,7	2,2	2,7	2,5	3,4
GAB1	2,7	2,3	2,7	1,2	2,6	1,5	2,4
ITGA6	1,0	1,3	1,4	1,5	1,6	1,2	1,5
KIFAP3	1,8	1,6	1,8	1,6	2,0	1,6	2,4
LOC57228_1	4,3	3,3	4,4	2,9	3,9	2,1	3,5
LOC57228_2		32,7	36,1	17,6	60,8	6,6	25,4
MCP	1,9	1,8	2,3	1,6	2,1	1,5	2,0
MGST2	2,5	2,0	2,2	2,2	2,9	2,1	3,1
MPP1	2,0	1,9	2,3	1,7	2,4	1,3	2,1
MTM1	2,3	2,2	2,5	2,1	2,8	1,9	2,8
NELL2	1,8	1,5	1,9	1,6	2,2	1,9	2,6

NULL / NFYC_1	1,0	1,9	2,2	1,6	1,9	1,6	2,6
NULL / NFYC_2		3,0	4,5	3,3	5,1	4,4	6,5
OGG1	4,2	2,6	3,7	2,1	3,5	2,4	4,5
PKP2	2,8	2,3	3,1	2,2	3,5	2,2	4,0
SELENBP1_1	4,3	3,7	4,9	3,3	5,9	3,9	6,1
SELENBP1_2		3,4	4,6	3,4	6,1	3,2	5,8
TACC2	3,1	3,0	3,7	2,1	3,4	1,9	3,5
TRAF4	1,8	2,0	2,4	2,1	3,2	2,5	3,7
WT1	2,2	2,6	2,6	2,6	4,7	2,2	4,2

Kategorie 3

DDAH2	10,5	9,4	18,9	9,3	19,0	15,0	24,1
ERBB3	5,1	4,9	7,9	5,2	9,2	6,0	10,6
IL18R1	8,2	6,8	10,0	8,8	13,2	7,5	14,2
NK4 / IL32	1,0	7,0	11,6	9,7	13,3	10,9	17,0
OATPX	1,0	6,2	8,9	6,9	12,7	9,3	15,5
PPP1R1A	11,4	9,1	15,3	9,8	20,2	7,4	17,2
RBKS	7,4	10,3	14,8	7,3	13,8	6,9	13,1

Kategorie 4

CFI	23,5	20,1	32,6	59,8	89,2	47,4	82,4
TM4SF5	22,9	1519,0	5370,4	5827,4	29243,2	313,9	15597,1
VIL1	56,1	375,5	418,0	555,1	1412,8	164,6	1183,5

Kategorie 5

BIRC2	2,1	2,3	2,5	2,4	3,4	2,2	3,3
CCNH	2,0	1,8	2,1	2,6	3,3	1,6	2,3
DBI	1,6	2,2	2,2	1,7	2,7	1,5	2,9
FLJ13236	6,4	9,8	12,7	8,2	12,4	9,1	16,9
ITGB4BP_1	2,0	1,8	1,9	1,8	2,4	2,0	3,1
ITGB4BP_2		1,3	1,4	1,0	1,2	1,1	1,1
ITGB4BP_3		1,7	2,1	1,5	1,8	1,9	2,4
KIAA0152	1,7	1,5	1,6	1,4	1,8	1,1	1,5
LASP1	1,7	1,9	2,1	1,9	2,4	1,7	2,2
MAN1A1	3,0	3,6	4,5	3,4	4,5	2,6	4,4
MAP3K11	2,5	4,5	5,0	4,3	6,0	4,2	6,8
NID	2,0	2,1	2,3	2,2	2,2	2,0	2,2
OSBPL3	2,2	2,1	2,3	1,6	2,2	1,7	2,5
PEX3	2,1	1,8	2,1	2,0	2,8	2,3	3,2
SC4MOL	1,4	1,5	1,5	1,5	2,3	1,8	2,3
SDC4	2,1	2,2	3,1	2,3	3,1	2,5	3,9
SEC23A	2,5	2,4	2,4	2,5	3,4	1,9	3,0
SEPP1	4,1	5,0	6,5	6,9	8,5	5,7	9,9
UGDH	1,9	2,1	2,2	1,6	2,3	1,4	2,2

Kategorie 6

CEBPB	1,0	0,8	0,5	0,7	0,4	0,6	0,7
CSPG2	0,6	0,9	0,6	0,7	0,7	0,8	0,7
GAS1	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6
GPR49 / LGR5	0,3	0,7	0,2	0,4	0,2	0,3	0,1
HEY1	0,6	0,9	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7
IRS2	0,6	0,7	0,6	0,7	0,5	0,6	0,5
NEFL	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5	0,6	0,4
TRIM9	0,4	0,7	0,5	0,6	0,4	0,7	0,5

nicht reguliert

CLN6	1,0	1,0	0,9	0,8	0,8	0,7	0,8
DUSP1	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	1,1
MAPKAPK3	0,7	0,9	0,8	0,9	0,8	0,8	0,9
NPR2L	1,0	1,1	0,9	1,2	1,0	0,8	1,0

SLC7A5	0,6	0,8	0,5	0,9	0,7	0,7	0,9
nicht determiniert							
CIDEB	26,2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
HLA-F	1,5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
NNMT	1,0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
PRPH	7,1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
SPP1	1,0	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Am Ende der Tabelle 13 sind fünf der 81 Kandidatengene aufgelistet, bei denen die Expression in der Real-time PCR nicht determiniert werden konnte, obwohl drei (CIDEB, HLA-F und PRPH) dieser fünf Gene im Mikroarray zuvor eine Regulation durch HNF4 α gezeigt hatten. Fünf weitere Gene zeigten keine Regulation nach HNF4 α -Induktion, wobei drei dieser fünf Gene auch im Mikroarray keine Regulation gezeigt hatten (CLN6, DUSP1 und NRR2L) und die übrigen zwei (MAPKAP3 und SLC7A5) nur eine sehr schwache Regulation im Mikroarray aufwiesen. Bei zwei Kandidatengenen (NPRL2 und CLN6) wurde später durch Affymetrix eine falsche Annotierung festgestellt, so dass in diesen Fällen ein falscher Assay durchgeführt worden ist. So sind diese beiden Gene in dieser Analyse nicht gemessen worden.

Anhand der Induktionswerte der verbleibenden 71 Kandidatengene ließ sich eine Dosisabhängigkeit, aber kein Schwellenwert für die Kandidatengene feststellen. Alle analysierten Kandidatengene zeigten an allen Messpunkten bei der jeweiligen minimal HNF4 α -Induktion eine signifikante Induktion, die ausreichend ist die Effekte auf die Proliferation und / oder die Morphologie zu vermitteln.

Die 71 verbleibenden Kandidatengene wurden in sechs unterschiedliche Kategorien eingeordnet, welche in Abbildung 22 dargestellt sind.

Dabei beruht die Einteilung der ersten vier Kategorien auf einem Vergleich der Induktion zwischen dem Kandidatengen und HNF4 α . Die erste Kategorie mit dem Beispiel CRAT (carnitine acetyltransferase) enthält insgesamt sechs Kandidatengene (9%), welche eine vergleichbare Induktion wie HNF4 α zeigten. So erreichte CRAT bei einer durchschnittlichen 7,4-fachen HNF4 α -Induktion eine 8,3-fache Induktion.

Die 30 Gene (42%) der zweiten Kategorie mit dem Beispiel TACC2 (transforming, acidic coiled-coil containing protein 2) wiesen dagegen eine deutlich schwächere Induktion als HNF4 α auf. So erreicht TACC2 bei der durchschnittlichen 7,4-fachen Induktion von HNF4 α seinerseits nur eine maximal 3,5-fache Induktion.

In der dritten Kategorie mit dem Beispiel DDAH2 (dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2) sind sieben Kandidatengene (10%) eingeordnet, die alle eine deutlich höhere Induktion als HNF4 α erreichten. So antwortete DDAH2 zum Beispiel bei einer durchschnittlichen 7,4-fachen Induktion von HNF4 α mit einer 20,7-fachen Induktion.

Die vierte Kategorie enthielt drei Kandidatengene (4%), welche erst durch die Induktion von HNF4 α exprimiert wurden und zuvor keinerlei RNA-Expression aufwiesen. Das Gen CFI (I factor (complement)) erzielte in dieser Kategorie von einem „absent“ Signal eine 68-fache Induktion durch HNF4 α .

Die 17 Gene (24%), die der Kategorie 5 zugeordnet wurden, erreichten während der ansteigenden HNF4 α -Induktion eine Sättigung. So wurde zwar eine Induktionssteigerung der Kandidatengene erreicht, aber wie bei dem Beispiel SC4MOL (sterol-C4-methyl oxidase-like) zu erkennen, antwortete das Kandidatengen unabhängig von einer ansteigenden HNF4 α -Induktion gleichbleibend mit einer 2,0-fachen Induktion.

Die Kategorie 6 beinhaltet insgesamt acht Kandidatengene (11%), welche alle durch die HNF4 α -Induktion reprimiert wurden. So wurde das hier gezeigte Beispiel LGR5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) auf eine bis zu 0,2-fache Induktion durch die 7,4-fache-HNF4 α -Induktion reprimiert.

Bei 67 der untersuchten 81 Kandidatengene stimmten die Ergebnisse der Low Density Card Analyse mit den der Mikroarray-Analyse überein, somit konnte für 83% der Gene die Mikroarray-Daten validiert werden, wodurch eine hohe Verlässlichkeit der Mikroarray-Ergebnisse dokumentiert wird.

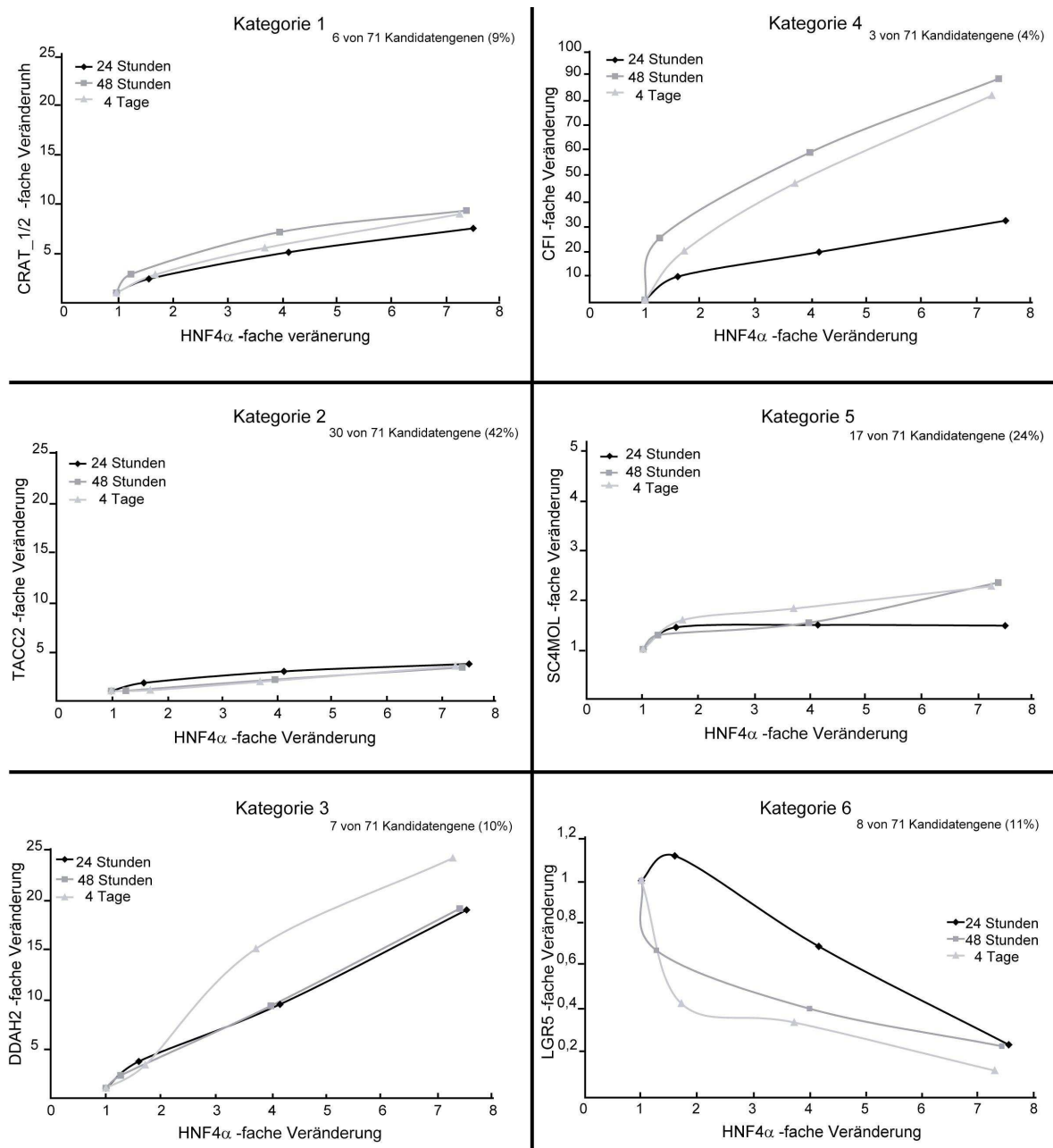


Abbildung 22: Die 71 Kandidatengene wurden aufgrund ihrer Induktion in sechs Kategorien eingeordnet Dargestellt sind die Induktionskurven von je einem Beispiel pro Kategorie. Die Gene der ersten vier Kategorien wurden aufgrund ihrer Induktion im Vergleich zu HNF4 α eingeordnet. Wobei die Kategorie 1 jene Gene enthält, die eine vergleichbare Induktion (mindestens 6-fach) zu HNF4 α zeigten (CRAT). Die Gene der Kategorie 2 (TACC2) zeigten eine geringere Induktion (weniger als 6-fach) und die Gene der Kategorie 3 (DDAH2) eine höhere Induktion (mindestens 10-fach). Die Gene der Kategorie 4 (CFI) wurden von HNF4 α induziert und die Gene der Kategorie 5 (SC4MOL) erreichten eine Sättigung bei ihrer Induktion. Die 6. Kategorie (LGR5) enthält alle Gene, die durch HNF4 α reprimiert wurden. Bei allen Diagrammen ist die Anzahl der Gene und der prozentuale Anteil an der Gesamtverteilung der Gene angegeben. Die Daten wurden aus den Mittelwerten beider HNF4 α -Zelllinien errechnet. Wenn mehr als ein TaqMan-Assay für ein Gen zur Verfügung stand, so wurde der Mittelwert der beiden Assays berücksichtigt.

Da alle der untersuchten Kandidatengene eine ausreichende Induktion aufwiesen und keines den theoretisch erwarteten Kurvenverläufen 2 oder 3 folgte (Abbildung 18), konnte keine Eingrenzung der proliferations- und / oder morphologie-relevanten Kandidatengene vorgenommen werden. Mit Ausnahme der fünf nicht regulierten und fünf nicht determinierten Kandidatengene kann jedes der verbleibenden 71 Kandidatengene für die Vermittlung der Effekte verantwortlich sein. Aufgrund dieser Daten wurde auf eine Mikroarray-Analyse bei einer minimalen HNF4 α -Konzentration verzichtet.

6 Identifizierung der proliferationsrelevanten HNF4 α -regulierten Gene

Nachdem der Versuch zur Eingrenzung der proliferations- und / oder morphologie-relevanten HNF4 α -regulierten Gene anhand der Low-Density-Card-Technik keine signifikanten Kandidatengene aufgezeigt hatte, sollten mittels der RNAi-Technik (RNA-Interferenz) die proliferationsrelevanten HNF4 α -regulierten Gene identifiziert werden. Die RNAi-Technik beruht auf der Fähigkeit, dass sich kleine RNA Fragmente (25 bp lang), die komplementär oder annähernd komplementär zu einer spezifischen mRNA sind, mittels des RISC-Faktors (RNA induced silencing Complex) an die entsprechende mRNA binden. Als Folge dieser Bindung wird die mRNA entweder abgebaut, die Translation des Proteins blockiert oder die Transkription verhindert. In allen Fällen ist das Endergebnis die Verhinderung der Neubildung des Proteins (Valencia-Sanchez et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die effiziente und kostengünstige endoribonuclease-prepared short interfering RNA (esiRNA)-Methode zur Herstellung der spezifischen esiRNA-Fragmente angewandt. Hiermit ließen sich mehrere Dutzend von HNF4 α -regulierten Genen bezüglich ihrer Vermittlung des Proliferationsrückgangs untersuchen. Diese Methode ermöglichte den Einsatz eines Pools an esiRNAs, der gegen die verschiedenen Bereiche einer spezifischen mRNA gerichtet ist (Buchholz et al., 2006; Kittler et al., 2007).

6.1 Etablierung der esiRNA-Methode

Als Grundvoraussetzung für diesen esiRNA-Screen musste die esiRNA-Methode für die im Labor verwendete HEK293-Zelllinie etabliert werden. In Abbildung 23 ist die Präparation der esiRNAs anhand des Kandidatengens SEPP1 und für HNF4 α repräsentativ für alle generierten esiRNAs dargestellt. Zunächst wird die Sequenz des zu hemmenden Gens mittels der PCR-Technik amplifiziert (Abbildung 23A), hierbei wird an beiden Enden der Sequenz eine T7-Sequenz für die spätere *in-vitro*-Transkription angehängt. Anschließend wird ein Aliquot der PCR mittels der T7-RNA-Polymerase in dsRNA umgeschrieben (Abbildung 23 B). Die dsRNA wird durch einen enzymatischen Verdau in kleine ca. 25 Basenpaar lange Fragmente geschnitten (Schritt 3; Abb.: 23 C), die abschließend aufgereinigt (Schritt 4; Abb.: 23 C) wurden. Größere Fragmente als 50 bp wurden bei der Aufreinigung in der Säule zurückgehalten und die kleineren gewünschten Fragmente wurden angereichert. Nachdem die Proben im 5%igen Agarose-Gel qualitativ beurteilt wurden, wurden sie quantitativ durch eine Photometermessung bestimmt. Die kleinen esiRNA-Fragmente werden anschließend mit Hilfe einer transienten Transfektion in die Zellen eingebracht und abhängig von der Stabilität des Proteins, kann 36 bis 72 Stunden später der Rückgang des Proteins nachgewiesen werden (Echeverri and Perrimon, 2006).

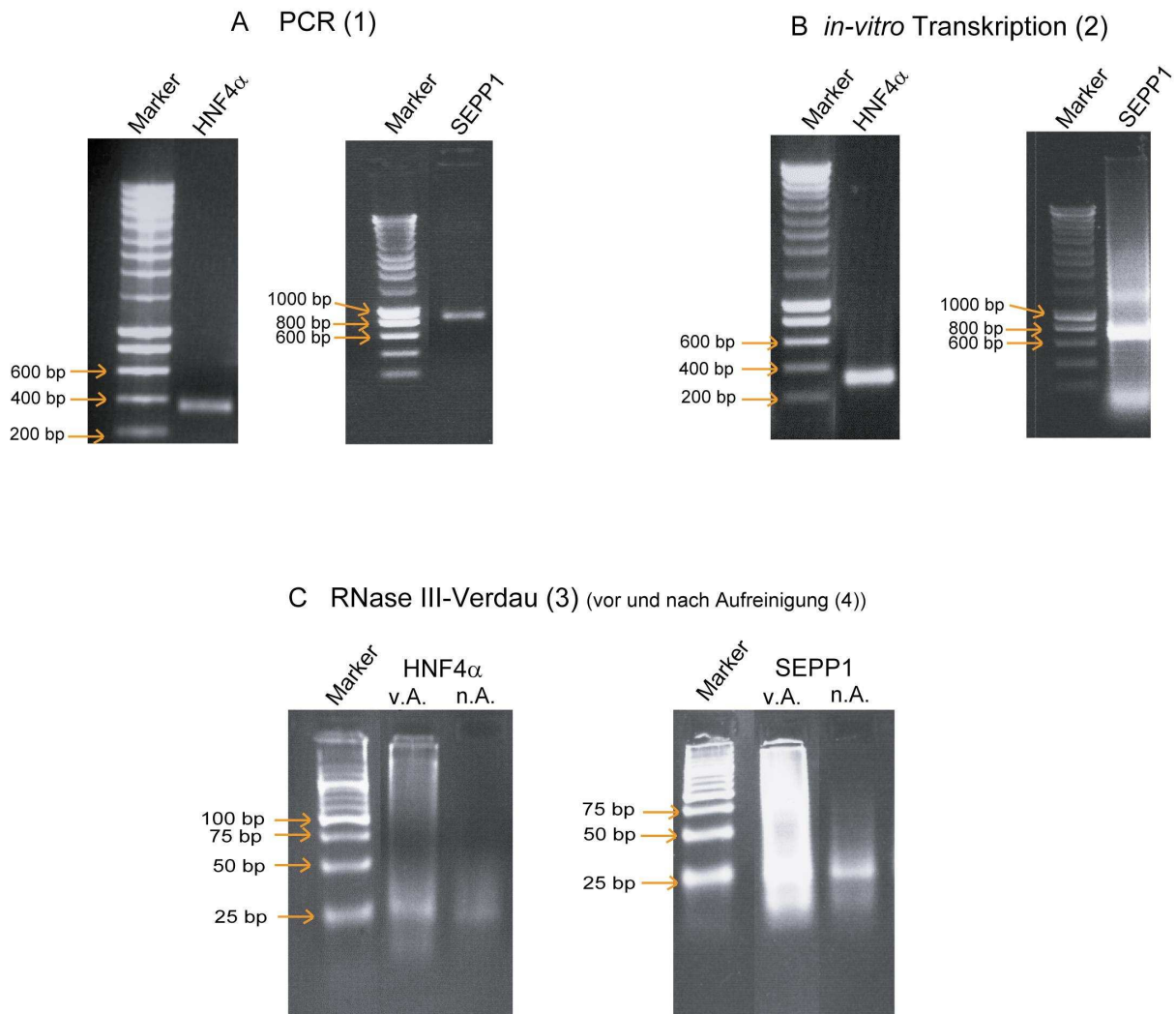


Abbildung 23: Etablierung der esiRNA-Präparation anhand der HNF4 α -esiRNA und der SEPP1-esiRNA Die esiRNA-Etablierung wird anhand zweier Beispiele (HNF4 α und SEPP1) dargestellt. A) In einem 1%igen Agarose-Gel ist jeweils ein 4 μ l-Aliquot einer insgesamt 50 μ l PCR Reaktion aufgetragen. Das HNF4 α -Transkript erzeugt eine Bande bei 382bp und das SEPP1-Transkript bei ca. 800bp. B) Jeweils 4 μ l der PCR sind in eine 10 μ l *in-vitro*-Transkription eingesetzt worden. Nach dem Annealing wurde in einem 1%igem Agarose-Gel jeweils ein Aliquot von 1 μ l der *in-vitro*-Transkription aufgetragen. C) Nach dem RNaseIII short Cut™ Verdau wurden 3 μ l des 50 μ l Gesamt-Ansatzes in einem 5%igem Agarose-Gel (Roth) aufgetragen. Direkt daneben wurden nach dem Aufreinigungsschritt 2 μ l von einem 30 μ l-Eluat ebenfalls in das 5%ige Agarose-Gel aufgetragen. Marker bei A) und B) 1 kb smart ladder von Eurogentec C) Hyperladder V von Bionline; v.A.= vor Aufreinigung; n.A.= nach Aufreinigung

Bei der Etablierung der esiRNA wurden einige Änderungen bezüglich der publizierten Methode vorgenommen. Zum Einen wurde ein spezielles RNase III Enzym, die RNase III short Cut™, zum Verdau der langen dsRNA verwendet. Desweiteren wurde die Aufreinigung vereinfacht. Hier wurde nicht die empfohlene, auf Q-Sepharose basierende Methode, sondern eine schnellere und einfachere Methode

verwendet, die im „Laborjournal“ Mai 2005 veröffentlicht worden war (Lab Times online, Lab Trick 4: Money saving siRNA purification: <http://www.lab-times.org/tricks/index.html>).

6.2 esiRNA-Screen der reprimierten Kandidatengene

Nachdem die Etablierung der esiRNA-Präparation erfolgreich abgeschlossen war, und die optimalen Versuchsbedingungen für die transiente Transfektion der HEK293-Zellen ausgetestet worden waren, wurde aus den 1411 regulierten Kandidatengene eine Auswahl der zu untersuchenden Gene getroffen. Zunächst wurden ausschließlich die reprimierten Kandidatengene berücksichtigt. Nach der Induktion bewirkte HNF4 α einen deutlichen Rückgang der Proliferation. Daher sollte ein Gen, welches an der Vermittlung dieses Signals beteiligt ist, bei einer Reprimierung (ohne HNF4 α -Induktion) ebenfalls einen signifikanten Zellproliferationsrückgang bewirken.

Von den mittels des Mikroarrays HG-U_133_2.0_Plus ermittelten 1411 Kandidatengenen wurden 628 durch HNF4 α reprimiert (Abschnitt III. 4). Obwohl die esiRNA-Methode als Screen eingesetzt wurde, war eine Analyse aller 628 reprimierten Gene im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar. Daher wurde eine Auswahl an interessanten Genen anhand ihrer biologischen Funktion getroffen. Die Auswahl erfolgte aufgrund der im September 2004 zur Verfügung stehenden Daten und umfasste alle Gene, die an der Proliferation, der Differenzierung, der Adhäsion, der Apoptose und / oder der Morphogenese beteiligt sind. Ebenso wurden reprimierte Kandidatengene in die Auswahl eingeschlossen, die auch bei der Analyse von Nierenzellkarzinomen (NZK) Geweben induziert waren (Lenburg et al., 2003). Es steht zu vermuten, dass diese Gene bei der Entwicklung des NZK aufgrund des HNF4 α -Ausfalles zur Entwicklung oder zum Fortschreiten der Tumor-Erkrankung beitragen. Zusätzlich mussten alle Kandidatengene durch die Induktion von HNF4 α mindestens einen 0,7-fachen-Rückgang bei der Mikroarray-Analyse aufweisen. Diese Auswahl führte zu einer Liste mit zwölf reprimierten Genen, deren cDNAs kommerziell erhältlich waren und die dem esiRNA-Screen unterzogen wurden.

Jedes der zwölf reprimierten Gene wurde in einer Dreifachbestimmung und in zwei unabhängigen Transfektionsassays untersucht. Dazu wurden Zellen der HNF4 α wt#4-Zelllinie ausgesät und 24 Stunden später mit der jeweiligen esiRNA gegen eins der zwölf Kandidatengene transient transfiziert. Nach vier Tagen wurde die Proliferation der Zellen mittels des MTS-Tests bestimmt.

In Abbildung 24 sind repräsentativ die Ergebnisse der Kandidatengene HEY1, HOXB6 und ADAMTS1 dargestellt. Zur Kontrolle der esiRNA Präparation und der Transfektion wurde die esiRNA gegen die RNA der Gene DDX48 und DHX8 eingesetzt, da Kittler in seinem Artikel deren proliferationshemmende Wirkung in HeLa-Zellen gezeigt hatte (Kittler et al., 2004). Die Inhibierung beider Gene bewirkte einen Arrest in der Mitose, so dass der zu erwartende Proliferationsrückgang auch in den HEK293-Zellen mittels des MTS-Tests nachgewiesen werden konnte (47% und 68%; Abbildung 24). Zur Standardisierung wurde ein Teil der Zellen ohne esiRNA behandelt, sondern erhielt das äquivalente Volumen an Transfektionsreagenz (Abbildung 24). Als Negativkontrolle wurde die esiRNA des tomato-Gens verwendet (Abbildung 24). Da es sich bei dem tomato-Gen um ein Fluoreszenz-Gen handelt, welches über keine endogene Ziel-mRNA in humanen Zellen verfügt, sollte das Einbringen dieser esiRNA keine Hemmung bewirken. Die Dreifachbestimmung der tomato-esiRNA ergab im Vergleich zur Standardisierung eine 100%ige Proliferationsrate der Zellen, daher wurde in allen folgenden Experimenten die Zellproliferationsrate der tomato-esiRNA als Referenz verwendet.

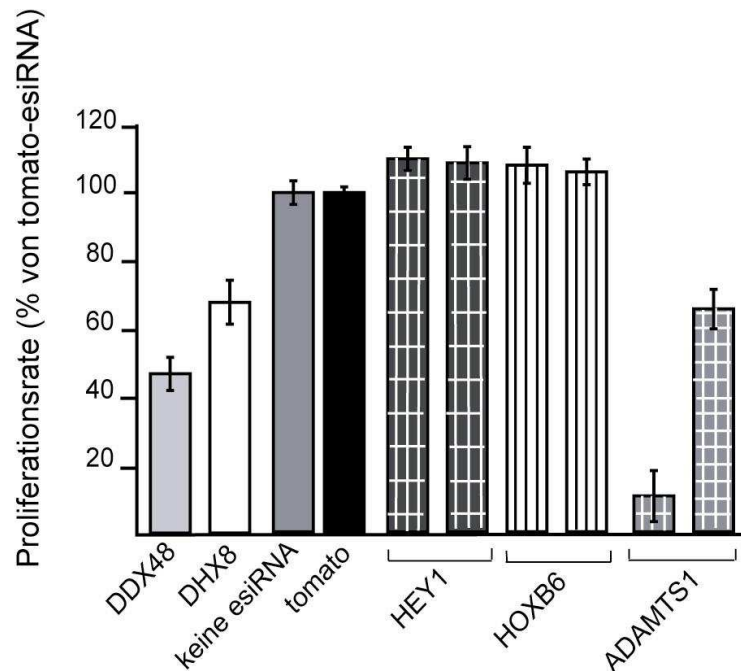


Abbildung 24: Hemmung des HNF4 α reprimierten ADAMTS1 Gens führte zu einer Hemmung der Zellproliferation Die Zelllinie HNF4 α wt#4 wurde mit esiRNAs gegen die Kandidatengene HEY1, HOXB6 oder ADAMTS1 oder mit den Kontrollen DDX48, DHX8 oder tomato transient mit dem ExtremeGene Transfection-reagent von Roche transfiziert. Nach einer Inkubation von vier Tagen wurde die Zellproliferation mittels des MTS-Tests ermittelt. Zur Standardisierung wurde die Proliferation der Zellen genutzt, die ausschließlich das Transfektionsreagenz, aber keine esiRNA erhalten hatten. Die Ergebnisse sind als \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung dargestellt. Im Fall von HEY1, HOXB6 und ADAMTS1 sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Versuche angegeben.

Die Ergebnisse zweier unabhängiger Transfektionen von drei repräsentativen Beispielen der reprimierten Gene sind im rechten Teil des Diagramms dargestellt. Bei zwei Beispielen (HEY1 und HOXB6) erfolgte kein Rückgang der Proliferation. Die esiRNA, die gegen die mRNA von HEY1 gerichtet war, erzielte eine 110%ige und 109%ige Zellproliferationsrate gegenüber der tomato-esiRNA. Ähnliche Werte erzielte die Hemmung der HOXB6-mRNA (108% und 106%). Die Inhibierung der ADAMTS1-mRNA (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1) dagegen führte in beiden Experimenten zu einem klaren Rückgang der Zellproliferation. So zeigten die Zellen im ersten Experiment im Vergleich zu der tomato-esiRNA eine 11%ige Zellproliferationsrate und im zweiten Assay eine 66%ige Zellproliferationsrate.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der zwei unabhängigen Versuche aller zwölf untersuchten Kandidatengene aufgelistet. Außer ADAMTS1 erzielte auch der Einsatz der esiRNAs gegen BHLHB3 (basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3) und NOTCH2 (Notch homolog 2 (Drosophila)) einen mehr als 10%igen Rückgang in mindestens einem der beiden Assays in der Zellproliferation. Bei NOTCH2 reduzierte sich die Proliferation im Vergleich zu den tomato-esiRNA transfizierten Zellen auf 87% und 78% und bei BHLHB3 zeigte sich ein Rückgang auf 88% und eine Erhöhung auf 105%.

Tabelle 14: Hemmung von ADAMTS1, NOTCH2 und BHLHB3 führte zu einem Rückgang der Zellproliferation Von der Zelllinie HNF4 α wt#4 wurden 2×10^3 Zellen in eine 96-well Zellkulturschale ausgesät und mit der entsprechenden esiRNA transfiziert. Nach vier Tagen wurde die Zellproliferationsrate mittels des MTS-Tests ermittelt. Die esiRNA-Daten sind Werte von zwei unabhängigen Transfektions-Assays und beruhen auf einer Dreifachbestimmung. Angegeben ist die Proliferationsrate in % nach esiRNA Einsatz im Vergleich zu der tomato-esiRNA, die eine 100% Zellproliferationsrate aufwies. * Diese Gene waren durch HNF4 α reprimiert (Mikroarray) und induziert in NZK-Gewebeproben (Lenburg et al., 2003). Fett gedruckt sind die drei proliferationsrelevanten Kandidatengene.

Gen Symbol	Gen Name	Induktion	biologische Funktion	esiRNA 1 (%)	esiRNA 2 (%)
ADAMTS1	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	0.6	Zellproliferation	11	66
NOTCH2	Notch homolog 2 (Drosophila)	0.7	Anti-apoptotisch	87	78
BHLHB3 *	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3	0.6	Zellproliferation	88	105
CSPG2*	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	0.6	Zell adhäsion	93	110
COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1 (undulin)	0.6	Zelladhäsion	96	96
CNTN1	contactin	0.4	Zelladhäsion	101	105
MCAM *	melanoma cell adhesion molecule	0.5	Zelladhäsion	101	101
SFRP1 *	secreted frizzled-related protein	0.6	Zell Differenzierung	101	106
HOXA1	homeo box A1	0.5	Zellproliferation	104	119
FBN1	fibrillin 1 (Marfan syndrome)	0.7	Zellproliferation	108	108
HOXB6	homeo box B6	0.6	Zellproliferation	108	106
HEY1*	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	0.6	Morphogenese	110	109

Diese drei reprimierten Gene waren somit interessante Kandidaten für die Vermittlung der von HNF4 α ausgelösten Zellproliferationskontrolle. Die übrigen neun analysierten reprimierten Kandidatengene (CSPG2, COL14A1, CNTN1, MCAM, SFRP1, HOXA1, FBN1, HOXB6 und HEY1) zeigten keinen aussagekräftigen negativen proliferativen Effekt auf die HEK293-Zellen und kamen somit nicht mehr als Kandidatengene für den von HNF4 α initiierten Proliferationsrückgang in Frage.

6.3 Etablierung des esiRNA-Screens für die induzierten Kandidatengene

Im Fall der durch HNF4 α induzierten Gene, die eine proliferative Beteiligung an der HNF4 α vermittelten Proliferationskontrolle ausüben könnten, wurde eine Neutralisation der Zellproliferationshemmung erwartet. Denn durch den Einsatz der esiRNAs sollte im positiven Fall der durch HNF4 α induzierte Signalweg unterbrochen werden und die Zellen eine höhere Proliferationsrate aufweisen. Hierzu wurde zunächst verifiziert, ob der Einsatz einer esiRNA gegen HNF4 α das Potential besitzt, die von HNF4 α induzierte Zellproliferationshemmung zu neutralisieren.

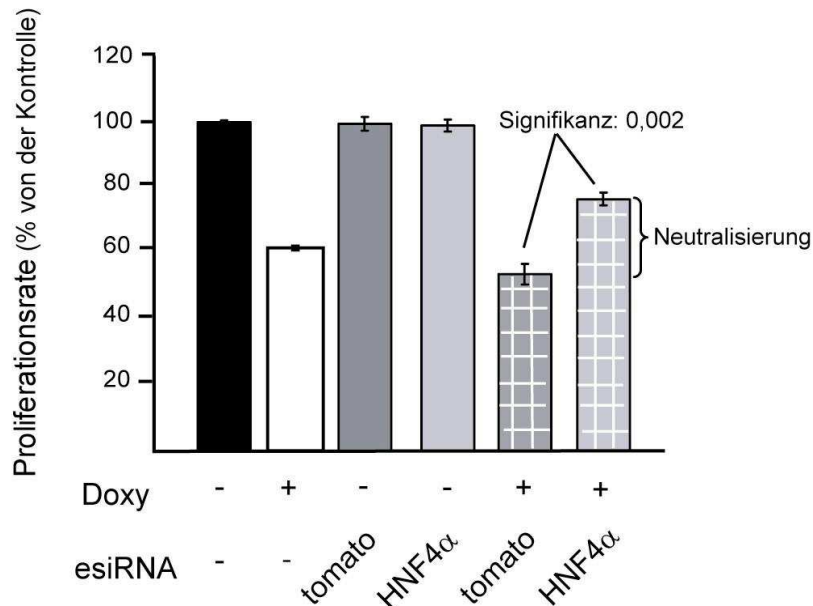


Abbildung 25: Der Einsatz von HNF4 α -esiRNA gegen induziertes HNF4 α führte zu einer signifikanten Neutralisation Die Zelllinie HNF4 α wt#4 wurde entweder mit keiner oder mit esiRNAs gegen tomato oder gegen HNF4 α transient mit dem ExtremeGene Transfection reagent von Roche transfiziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen entweder mit Ethanol oder mit 10 ng / ml Doxycyclin behandelt. Die Zellproliferation wurde nach einer Inkubation von vier Tagen mittels des MTS-Tests (Promega) ermittelt. Zur Standardisierung wurde die Proliferation der Zellen genutzt, die ausschließlich das Transfektionsreagenz, aber keine esiRNA erhalten hatten. Die Ergebnisse sind als \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung dargestellt und sind für mindestens drei Experimente repräsentativ.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse dieser Etablierung. Der schwarze und der weiße Balken sind die zur Standardisierung genutzten Proben. Sie wurden ohne eine esiRNA, aber mit Transfektionsreagenz und entweder mit Ethanol (- Doxy) oder mit 10 ng / ml Doxycyclin (+ Doxy) behandelt. Der durch die Induktion von HNF4 α ausgelöste Proliferationsrückgang war wie erwartet zu beobachten (100% auf 59%). Der Vergleich zwischen den beiden nicht induzierten, aber mit tomato-esiRNA bzw. mit HNF4 α -esiRNA transfizierten Zellen zeigte in beiden Fällen eine 100%ige Zellproliferationsrate, standardisiert auf Zellen ohne esiRNA-Behandlung. Dies zeigte, dass bei fehlender endogener Ziel-mRNA keine unspezifischen Effekte auf die Zellproliferation erfolgten. Bei den mit 10 ng / ml Doxycyclin induzierten Zellen (+ Doxy) hingegen, die ebenfalls entweder mit der esiRNA gegen tomato oder gegen HNF4 α transfiziert wurden, ist ein signifikanter Unterschied bei der Zellproliferation ermittelt worden. Die Zellen, die mit der esiRNA gegen HNF4 α behandelt wurden, zeigten eine signifikante Neutralisation bezüglich der tomato-esiRNA (54%ige Proliferationsrate gegenüber 77%ige Proliferationsrate). Die Neutralisation war nur partiell und obwohl mehrere Variationen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Reagenzes und / oder der esiRNA getestet worden sind, war es nicht gelungen, diesen Effekt zu erhöhen, ohne die Proliferation der mit Ethanol behandelten Zellen zu beeinflussen. Der Grund für die partielle Rettung liegt vielleicht an der Möglichkeit, dass die transient transfizierte esiRNA nicht über den gesamten Zeitraum aktiv war und / oder nicht alle Zellen transfiziert werden konnten. Aber die Neutralisation war ausreichend stabil und signifikant (p-Value: 0,002), so dass mit dem Screen der induzierten Kandidatengene fortgefahren werden konnte.

6.4 Durchführung des esiRNA-Screens der induzierten Kandidatengene

Von den anhand des Mikroarrays HG-U_133_2.0_Plus ermittelten Genen wurden 783 Gene induziert (Abschnitt III. 4). Da dieser Umfang bei einem Screen in diesem Rahmen nicht bewältigt werden konnte, wurde die Auswahl ebenso wie bei den reprimierten Kandidatengenen anhand der biologischen Funktion (Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Apoptose und Morphogenese) der Kandidatengene getroffen. Ebenso wurden Kandidaten in die Auswahl eingeschlossen, die sowohl durch HNF4 α induziert wurden als auch bei der Analyse von Nierenzellkarzinomen (NZK) Geweben reprimiert waren (Lenburg et al., 2003). Und zusätzlich mussten die

Kandidatengene durch die Induktion von HNF4 α eine mindestens 1,5-fache Induktion bei der Mikroarray-Analyse aufweisen. Diese Auswahl führte zu einer Liste mit 44 induzierten Genen, deren Sequenz erhältlich war und die dem esiRNA-Screen unterzogen wurden.

Jedes der 44 induzierten Gene wurde in einer Dreifachbestimmung in zwei unabhängigen Transfektionsansätzen untersucht. Dazu wurden Zellen der HNF4 α wt#4 Zelllinie ausgesät und 24 Stunden später mit der jeweiligen esiRNA gegen eins der 44 Kandidatengene transient transfiziert und entweder mit Ethanol oder mit Doxycyclin behandelt. Nach vier Tagen wurde die Proliferation der Zellen mittels eines MTS-Tests bestimmt.

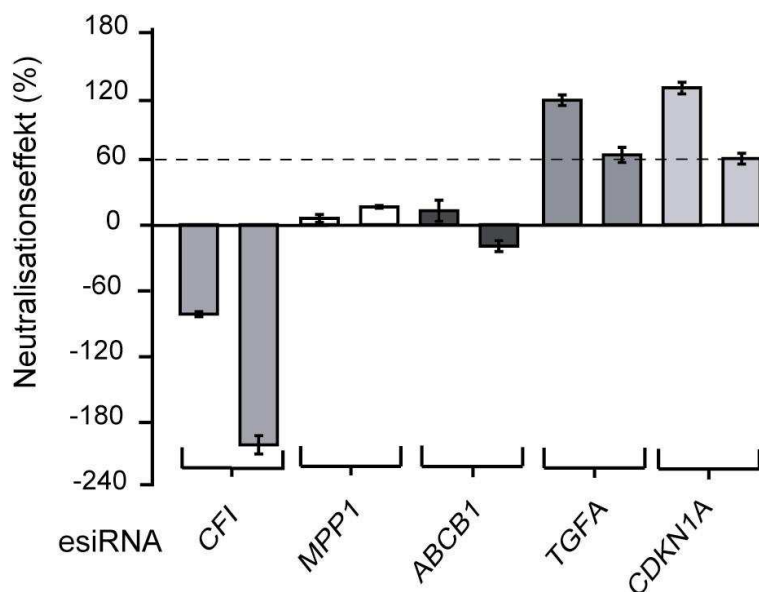


Abbildung 26: Die Hemmung von TGFA und CDKN1A führte zu einer Neutralisierung der Proliferationshemmung Die Zelllinie HNF4 α wt#4 wurde entweder mit esiRNAs gegen CFI, MPP1, ABCB1, TGFA und CDKN1A transient mit dem ExtremeGene Transfection reagent von Roche transfiziert und nach vier Stunden mit 10 ng / ml Doxycyclin behandelt. Nach einer Inkubation von vier Tagen wurde die Zellproliferation mittels des MTS-Test (Promega) ermittelt. Die Ergebnisse sind als \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung dargestellt und es werden zwei unabhängige Transfektionsansätze gezeigt.

Abbildung 26 zeigt fünf typische Beispiele der 44 analysierten Kandidatengene, wobei die Ergebnisse auf die jeweils mitgeführte tomato-esiRNA standardisiert wurden. Anschließend wurden die Werte auf die ebenfalls immer mitgeführte HNF4 α -esiRNA normiert. Ein Wert von 0% bedeutete somit, dass diese esiRNA keinen Unterschied zu der tomato-esiRNA aufwies. Ein Wert von 100% demonstrierte eine

Neutralisation, die gleich stark wie die Neutralisation von der esiRNA gegen HNF4 α war.

Das hier dargestellte Ergebnis der esiRNA gegen CFI (complement I factor) zeigte keine Neutralisation der Zellproliferationshemmung, sondern im Gegenteil einen extremen Rückgang der Zellproliferation (-83% und -203%). Die Ergebnisse von MPP1 (6% und 16%) und ABCB1 (13% und -20%) zeigten keine oder nur eine sehr schwache Neutralisation. Diese drei Kandidatengene wurden somit für die Vermittlung der durch HNF4 α ausgelösten Proliferationshemmung nicht weiter berücksichtigt. Dagegen wiesen die Zellen, die mit der esiRNA gegen TGFA oder CDKN1A transfiziert worden waren, eine mindestens 60%igen Neutralisation in mindestens einem Assay im Vergleich zu der HNF4 α -esiRNA auf. Diese beiden Gene kamen somit als mögliche Kandidatengene für die Vermittlung des durch HNF4 α initiierten Zellrückganges in Frage.

Die Ergebnisse aller 44 analysierten induzierten Gene sind in Tabelle 15 aufgelistet. Zu Beginn der Tabelle sind insgesamt 21 Kandidatengene, die die geforderte Neutralisation von mindestens 60% in einem der beiden Transfektionsansätze erreichten. Im Anschluß daran sind die 20 Gene aufgelistet, die keine oder eine nur sehr geringe Neutralisation ausgelöst haben. Am Ende der Tabelle befinden sich drei Gene (CFI, AGX2TL und AKAP1), deren Hemmung einen stark negativen proliferativen Effekt auslöste, sogar wenn HNF4 α nicht induziert worden ist (Anhang Tabelle VII. 3). Die Funktion dieser Gene war somit essentiell für das Überleben der Zelle, so dass bei dem esiRNA-Einsatz die Zellproliferation gehemmt wurde. Dieser Versuchsansatz ist demnach für die Analyse dieser drei Kandidatengene nicht adäquat.

Tabelle 15: Hemmung von 21 induzierten Kandidatengen führte zu einer Neutralisation der Zellproliferationshemmung Von der Zelllinie HNF4 α wt#4 wurden 2×10^3 Zellen in eine 96-well Zellkulturschale ausgesät und mit den entsprechenden esiRNA transfiziert. Die Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion entweder mit Ethanol behandelt oder mit 10 ng / ml Doxycyclin induziert. Nach vier Tagen wurde die Zellproliferationsrate mittels des MTS-Tests ermittelt. Die esiRNA-Daten sind Werte von zwei unabhängigen Transfektions-Assays und beruhen auf einer Dreifachbestimmung. Angegeben ist der Neutralisationseffekt in %, standardisiert auf die tomato-esiRNA und normiert auf den Neutralisationseffekt von der HNF4 α -esiRNA. Als Grenze wurde eine 60%ige Neutralisation in mindestens einem Transfektions-Assay gesetzt. * Diese Gene waren durch HNF4 α induziert (Mikroarray) und reprimiert in NZK-Gewebeproben (Lenburg et al., 2003). Die fett gedruckten Gene sind die 21 proliferationsrelevanten Kandidatengene.

Gene Symbol	Gen Name	Induktion	biologische Funktion	esiRNA 1 (%)	esiRNA 2 (%)
EFHD1 *	EF-hand domain family, member D1	5.1	Kalzium Ionen Bindung	304	106
ALDH6A1 *	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	1.9	Metabolismus	202	75
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	2.8	Zellproliferation	160	81
FLJ14146 *	chromosome 1 open reading frame 115	4.8	unbekannt	160	134
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1.6	Zellproliferation	126	61
WT1*	Wilms tumor 1	2.2	Transkription	121	55
BPHL *	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)	2.7	Metabolismus	118	100
TGFA	transforming growth factor, alpha	2.8	Zellproliferation	115	64
NELL2	NEL-like 2 (chicken)	1.8	Zelladhäsion	106	60
EPHX2 *	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	1.8	Metabolismus	101	92
ANK3 *	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	1.8	Zytoskelett - Bildung	97	87
PROS1	protein S (alpha)	2.5	Zelladhäsion	96	84
ICAM3	intercellular adhesion molecule 3	2.2	Zelladhäsion	91	86
MME *	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10)	4.0	Zell-Zell-Kommunikation	89	19
SMARCE1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	1.7	Zellproliferation	80	67
DSC2	desmocollin 2	2.5	Zelladhäsion	78	65
CCNH	cyclin H	2.0	Zellproliferation	78	50

MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase 11	2.5	Zellproliferation	76	33
THEM2*	thioesterase superfamily member 2	2.7	Hydrolase	75	43
SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	4.2	Oxidativer Stress	71	55
ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	1.8	Zellproliferation	61	61
NQO2 *	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	1.9	Elektronentransport	58	47
NK4	natural killer cell transcript 4	ind.	Zelladhäsion	57	12
RBKS	ribokinase	6.7	Metabolismus	57	-2
LRP2 *	Low density lipoprotein-related protein 2	1.8	Metabolismus	56	48
PPP1R1A*	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	11.4	Metabolismus	50	49
HPGD *	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	2.4	Metabolismus	48	39
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	4.2	Metabolismus	42	25
JUP	junction plakoglobin	2.1	Zelladhäsion	41	25
NINJ1	ninjurin 1	2.8	Zelladhäsion	35	9
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	2.0	Protein Biosynthese	28	27
PKP2	plakophilin 2	3.4	Zelladhäsion	25	2
GCHFR *	GTP cyclohydrolase I feedback regulator	3.3	Metabolismus	24	-42
TM4SF5	transmembrane 4 L six family member 5	22.8	Glykolysation	23	0
MPP1	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	1.9	Signal Weitergabe	16	6
ABCB1 *	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	3.5	Transport	13	-20
COL21A1 *	collagen, type XXI, alpha 1	2.7	Zelladhäsion	12	-57
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide (Wilson disease)	2.1	Transport	11	-36
MTM1	myotubularin 1	2.3	Entwicklung	6	-22
ACY1 *	aminoacylase 1	4.2	Metabolismus	-9	-85
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	1.9	Metabolismus	-29	-63
AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1	2.2	RNA-Bindung	-39	-198
AGXT2L1 *	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	4.5	Metabolismus	-69	-240
CFI *	I factor (complement)	22.5	Immunantwort	-83	-203

Somit waren diese 21 von HNF4 α induzierten Gene gemeinsam mit den drei reprimierten Kandidatengenen (Abschnitt III.6.2) die besten Kandidaten für die Vermittlung des durch HNF4 α ausgelösten Zellproliferationsrückgangs.

6.5 Ermittlung der Signifikanz der 24 möglichen Kandidatengene für die Zellproliferationskontrolle

Da das esiRNA-Screening bei den zu Beginn 56 Kandidatengenen (12 reprimierte und 44 induzierte) nur zweimal unabhängig durchgeführt wurde, wurden die 24 möglichen Kandidatengene (drei reprimierte und 21 induzierte Gene) ein drittes Mal mit einer zusätzlichen unabhängig hergestellten esiRNA erneut getestet. Anhand der so zur Verfügung stehenden Daten wurde die Signifikanz der Kandidatengene mittels des t-Tests gegen die tomato-esiRNA ermittelt.

Teil A der Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der drei reprimierten Kandidatengene. Basierend auf insgesamt drei durchgeführte Transfektions-Experimente war ausschließlich bei ADAMTS1 eine ausreichend hohe Signifikanz (p-Value: 0,002) bezüglich der negativen Zellproliferationsregulation zu beobachten. Teil B der Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der 21 induzierten Kandidatengene. Hier erreichten neun Gene (SEPP1, THEM2, BPHL, CDKN1A, MME, DSC2, ANK3, ALDH6A1 und TGFA) eine sehr hohe Signifikanz von p-value < 0,01. Vier weitere Gene (EPHX2, NELL2, EFHD1 und PROS1) erreichten mit einer Signifikanz von unter 0,05 eine immer noch ausreichende Validierung.

Tabelle 16: HNF4 α verminderte die Zellproliferation durch die orchestrierte Regulation von mindestens 14 Genen in HEK293-Zellen Bei den drei reprimierten Kandidaten dienten die Daten der tomato-esiRNA zur Berechnung der Signifikanz, bei den 21 induzierten Kandidaten entsprechend die mit Doxycyclin induzierten tomato-esiRNA Proben. Die Ergebnisse sind getrennt nach reprimierten und induzierten Kandidaten aufgelistet. Angegeben ist entweder der durchschnittliche Zellproliferationsrückgang in % oder die durchschnittliche Neutralisation in %. * Diese Gene waren durch HNF4 α reguliert (Mikroarray) und in NZK-Gewebeproben (Lenburg et al., 2003) dereguliert. Blau hinterlegt sind die Kandidatengene, die eine Signifikanz < 0,01 aufwiesen und fett geschrieben sind die Gene, die mindestens eine Signifikanz < 0,05 erreichten. Im Anhang VII.3 (Tabelle 19) sind alle drei Einzelwerte der Kandidatengene aufgelistet.

A Gen Symbol	Gen Name	Induktion	biologische Funktion	durchschnittlicher Zellproliferationsrückgang in % (Signifikanz)
ADAMTS1	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	0.6	Zellproliferation	57 \pm43 (0,002)
NOTCH2	basic helix-loop-helix domain containing, calss B, 3	0.7	Anti-apoptotisch	87 \pm 9 (0,08)
BHLHB3 *	Notch homolog 2 (Drosophila)	0.6	Zellproliferation	94 \pm 9 (0,4)
B Gen Symbol	Gen Name	Induktion	biologische Funktion	durchschnittlicher Neutralisationseffekt in % (Signifikanz)
SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	4.2	Oxidativer Stress	77 \pm25 (1 x 10⁻⁵)
THEM2 *	thioesterase superfamily member 2	2.7	Hydrolase	73 \pm30 (2 x 10⁻⁵)
BPHL *	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)	2.7	Metabolismus	129 \pm36 (7 x 10⁻⁵)
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1.6	Zellproliferation	98 \pm34 (2 x 10⁻⁴)
MME *	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10)	4.0	Zell-Zell-Kommunikation	65 \pm40 (3 x 10⁻⁴)
DSC2	desmocollin 2	2.5	Zelladhäsion	77 \pm12 (0,001)
ANK3 *	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	1.8	Zytoskelett-Bildung	70 \pm39 (0,002)
ALDH6A1 *	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	1.9	Metabolismus	106 \pm85 (0,003)
TGFA	transforming growth factor, alpha	2.8	Zellproliferation	61 \pm55 (0,009)
EPHX2 *	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	1.8	Metabolismus	94 \pm6 (0,02)
NELL2	NEL-like 2 (chicken) /// NEL-like 2 (chicken)	1.8	Zelladhäsion	78 \pm24 (0,02)
EFHD1 *	EF-hand domain family, member D1	5.1	Kalzium Ion-Bindung	157 \pm129 (0,04)

PROS1	protein S (alpha)	2.5	Zelladhäsion	103 ±24 (0,04)
SMARCE1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	1.7	Zellproliferation	43 ±54 (0,06)
CCNH	cyclin H	2.0	Zellproliferation	49 ±29 (0,1)
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	2.8	Zellproliferation	94 ±60 (0,2)
FLJ14146 *	chromosome 1 open reading frame 115	4.8	unbekannt	107 ±70 (0,3)
ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	1.8	Zellproliferation	63 ±4 (0,3)
ICAM3	intercellular adhesion molecule 3	2.2	Zelladhäsion	59 ±51 (0,4)
WT1 *	Wilms tumor 1	2.2	Transkription	130 ±80 (0,7)
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	2.5	Zellproliferation	55 ±21 (0,9)

Zusammengefasst konnten mittels dieses esiRNA-Screens von den insgesamt 56 analysierten Kandidatengenen 13 induzierte und ein reprimiertes Gen identifiziert werden, welche an der Vermittlung an dem durch HNF4 α -regulierten Zellproliferationsrückgang beteiligt sind.

7 Zellproliferationshemmung der induzierten Gene in der HEK293-Zelllinien

Um zu ermitteln, ob die Überexpression eines der induzierten Gene das Potential besitzt, unabhängig von HNF4 α , den Zellproliferationsrückgang auszulösen, wurden induzierbare HEK293-Zelllinien für die 13 Kandidatengene generiert. Für die Gene SEPP1 und DSC2 wurden bereits induzierbare HEK293-Zelllinien hergestellt (Lucas et al., 2005), so dass diese beiden Gene nicht berücksichtigt wurden. Für die Gene ANK3, MME und THEM2 waren keine Voll-Längen cDNA-Sequenzen erhältlich, so dass keine Generierung möglich war. Basierend auf der Flp-In-Technologie wurden durch Doxycylin induzierbare Zelllinien für acht (ALDH6A1, BPHL, EFHD1, EPHX2, NELL2, PROS1, TGFA und CDKN1A) der 13 signifikanten Kandidatengene generiert. Als Kontrolle wurde für die als nicht signifikant eingestuft drei Gene CCNH, ICAM3 und SMARCE1 ebenfalls eine induzierbare Zelllinie hergestellt.

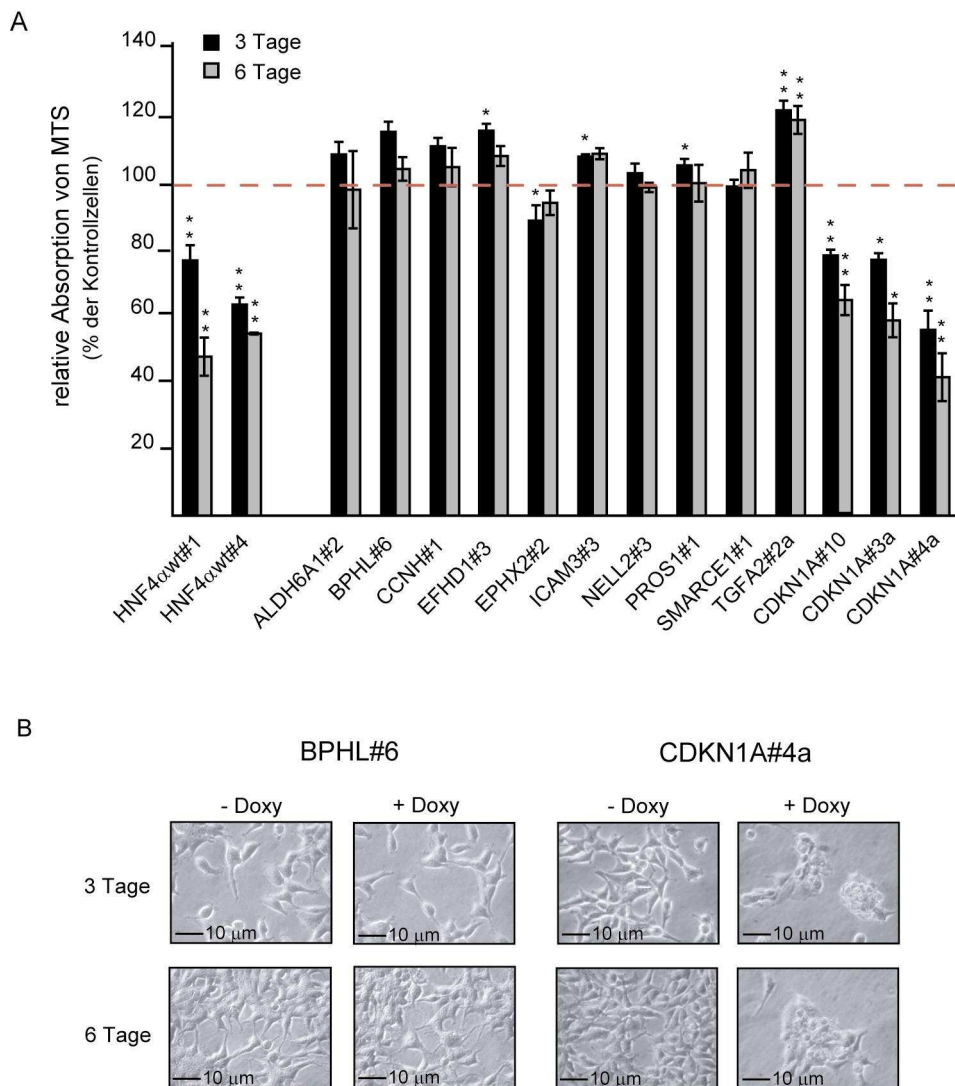


Abbildung 27: CDKN1A ist ein Schlüsselfaktor in dem von HNF4 α induzierten Netzwerk zur Proliferationskontrolle A) Die Zellproliferation der induzierten Zelllinien wurde an den angegebenen Messzeitpunkten mittels eines MTS-Tests, durch Vergleich der induzierten Zellen mit den jeweiligen nicht induzierten Zellen, bestimmt. Die Ergebnisse sind als \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten, jedes als Dreifachbestimmung durchgeführt, dargestellt. Die Zelllinien HNF4 α wt#1 und wt#4 dienen dem Vergleich und die Signifikanz der Analyse ist angegeben (* p-Value < 0,05; ** p-Value < 0,01). B) Zur Beurteilung der Morphologie der Zellen wurden von allen Zelllinien an den Messpunkten zusätzlich Phasenkontrastphotographien aufgenommen. Die Aufnahmen von BPHL dienen als repräsentatives Beispiel für alle Gene, die keine Morphologie-Veränderung zeigten.

In Abbildung 27 A sind die Ergebnisse des Zellproliferationsassays für die generierten Kandidaten-HEK293-Zelllinien nach drei und sechs Tagen Doxycyclin-Induktion dargestellt. Als jeweilige Kontrolle dienten die Zellen, die für die entsprechende Zeit mit Ethanol behandelt wurden. Die beiden Zelllinien HNF4 α wt#1

und wt#4 wurden als Positiv-Kontrollen mitgeführt und zeigten wie erwartet sowohl nach drei als auch nach sechs Tagen einen signifikanten Zellproliferationsrückgang. Die Induktion der Gene ALDH6A1, BPHL, CCNH, EFHD1, EPHX2, ICAM3, NELL2, PROS1 und SMARCE1 dagegen zeigten keinen einheitlichen Zellproliferationsrückgang über die gesamte Versuchsdauer. Obwohl EPHX2 am dritten Tag einen leicht signifikanten Rückgang aufwies, ist dieser nicht aussagekräftig, da dieser Trend am sechsten Tag nicht fortgesetzt wurde. Die Gene EFHD1, ICAM3 und PROS1 zeigten einen leichten Anstieg am dritten Messtag, aber auch hier war keine Kontinuität zu erkennen, so dass dieser Rückgang ebenfalls nicht aussagekräftig war.

Bei TGFA (transforming growth factor, alpha) hingegen war an beiden Messtagen eine deutliche Signifikanz zu ermitteln (p -value < 0,009 und p -value < 0,008). Die Induktion dieses Gens führte anders als von den Ergebnissen des esiRNA-Screen vermutet, zu einer Proliferationssteigerung. Dieses Ergebnis bestätigt allerdings die durch die Literatur bekannte onkogene Wirkung von TGFA (Kumar et al., 1995).

In der Abbildung sind die Ergebnisse drei unabhängig generierter Zelllinien für CDKN1A dargestellt, wobei CDKN1A#10 eine Mischkultur der selektionierten Klone darstellt, während die beiden CDKN1A-Zelllinien #3a und #4a aus Einzelklonen entstanden sind. Alleine CDKN1A hatte das Potential, die Zellproliferation negativ und ähnlich stark wie HNF4 α zu beeinflussen.

Zusätzlich zur Zellproliferationsrate wurde auch die Morphologie der induzierten Zellen im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen betrachtet. In Abbildung 28 Teil B ist als repräsentatives negatives Beispiel die Zelllinie BPHL#6 gezeigt. Es ist weder nach drei noch nach sechs Tagen ein Unterschied zwischen den induzierten und nicht induzierten Zellen zu beobachten. Als einziges der getesteten Kandidatengenen führte die Überexpression von CDKN1A (Abbildung 27 B) zu einem vergleichbar morphologischen Effekt, wie er bei HNF4 α (Abbildung 19) beobachtet werden konnte.

Somit erzeugte die Überexpression des durch HNF4 α -regulierten Gens CDKN1A in den HEK293-Zellen sowohl bei der Zellproliferation als auch bei der Morphologie dieselben Effekte wie sie bei HNF4 α auftraten.

8 Überprüfung der CDKN1A-Induktion durch HNF4 α -Expression in der HEK293 Zelllinie

In der Mikroarray-Analyse (Abschnitt 4) war für CDKN1A eine durchschnittlich 1,6-fache Expressionserhöhung in beiden HNF4 α -Zelllinien ermittelt worden. Eine Analyse mittels eines Western Blots sollte zeigen, ob diese Erhöhung auch auf Proteinniveau bestätigt werden konnte.

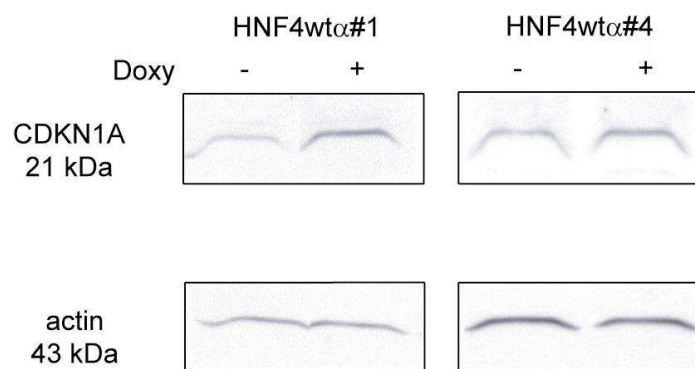


Abbildung 28: HNF4 α induzierte CDKN1A auf dem Proteinlevel Beide HNF4 α -Zelllinien wurden für 24 Stunden mit Ethanol (- Doxy) oder mit 1000 ng / ml Doxycyclin (+ Doxy) behandelt. Anschließend wurden die Proteine isoliert und jeweils 20 μ g wurden in einem 10%igem SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde geblottet und mit einem Antikörper spezifisch für CDKN1A (Santa Cruz, C19 sc-397) wurde auf der Membran das Protein detektiert. Die selbe Membran wurde anschließend mit einem Antikörper spezifisch für Aktin (Santa Cruz, I-19 sc-1616) zur relativen Quantifizierung behandelt. Die relative Quantifizierung wurde mit der Software AIDA 1D durchgeführt und ergab einen 2,0-fachen bzw. 1,2-fachen Anstieg von CDKN1A in den Zelllinien HNF4 α wt#1 und wt#4.

Abbildung 28 zeigt, dass in beiden HNF4 α -Zelllinien die schwache Erhöhung von CDKN1A durch die Induktion von HNF4 α auf Proteinniveau validiert werden konnte. Die selbe Membran wurde zur Kontrolle mit einem Antikörper gegen Aktin behandelt und anschließend wurde eine quantitative Auswertung mittels des AIDA 1D-Programms vorgenommen. Diese Quantifizierung bestätigte die durchschnittliche Erhöhung des CDKN1A Proteinniveaus auf 1,6-fach in beiden HNF4 α -Zelllinien (2,0-fach und 1,2-fach).

Somit korrelierte die im Mikroarray gemessene leichte Erhöhung der CDKN1A-mRNA nach HNF4 α -Induktion mit der im Western Blot nachgewiesenen Erhöhung des Proteins.

IV Diskussion

1 HNF4 α hemmt die Proliferation von HEK293-Zellen auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen

Es ist bekannt, dass Zell-Zell-Interaktionen und die Adhäsion der Zellen zur extrazellulären Matrix (EZM) in diversen Zelltypen eine regulierende Wirkung auf die Zellproliferation haben können. So ist z.B. ein positiver Zusammenhang zwischen Integrinen und Zellproliferation in Tumoren beschrieben worden (White and Muller, 2007). Und auch für die Zelladhäsionsproteine N-cadherin (Levenberg et al., 1999) und CEACAM1 (Hokari et al., 2007) ist ein Einfluss auf die Zellproliferation nachgewiesen worden.

Die Expression von HNF4 α in HEK293-Zellen erzeugt eine Proliferationshemmung und eine Morphologieveränderung, bei der die Zelladhäsion zum Gefäßboden verringert ist und die Zellen ihre Monolayer-Struktur aufgeben (Lucas et al., 2005). Die diesen Prozessen zugrunde liegenden Mechanismen konnten bislang nicht geklärt werden, deshalb wurde in dieser Arbeit die durch HNF4 α ausgelöste Morphologie-Veränderung näher untersucht (Abschnitt III.1). Ziel war es zu untersuchen, ob die beobachteten Veränderungen in den HEK293-Zellen bezüglich der Adhäsion und der Proliferation unabhängig voneinander auftreten oder ob die Proliferationsrate bei verbesserter Bodenadhäsion ansteigt.

Die Zellen wurden auf beschichteten und unbeschichteten Schalen ausgesät und die Zellproliferationsrate wurden nach einer zwei-, vier- und sechstägigen HNF4 α -Expression im Vergleich zu den nicht exprimierenden Zellen bestimmt (Abbildung 6). Die Zellproliferationsrate sank sowohl mit Gelatine-Beschichtung als auch ohne Gelatine-Beschichtung bei den induzierten Zellen auf 40% im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne HNF4 α -Induktion. Es ließ sich somit keine Erhöhung der Zellproliferation durch eine Beschichtung der Zellkulturschale mit Gelatine erzeugen. Allerdings ließ sich durch die Gelatine-Beschichtung auch keine Verbesserung der Zelladhäsion zum Gefäßboden erzielen.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Gelatine-Beschichtung nicht adäquat für die HEK293-Zellen war. Da noch andere Arten der Beschichtung zur Verfügung stehen

wie z. B. Collagen, Fibronectin, Galactin-1, Galactin-3 oder Laminin I, könnten weitere Versuche bezüglich der Zelladhäsion durchgeführt werden. Zeigt eine der Beschichtungen eine Verbesserung der Zelladhäsion zur extrazellulären Matrix, so ließe sich eine mögliche Abhängigkeit der Zellproliferationshemmung durch die Zelladhäsion untersuchen.

In der Literatur ist ebenso die umgekehrte Einflussnahme von Zell-Zyklus-Regulatoren wie Cyclin C (Liu et al., 1998) und cdk6 (Fahraeus and Lane, 1999) auf die Zelladhäsion beschrieben. Bei dem ermittelten Expressionsprofil für HNF4 α in HEK293-Zellen (Abschnitt III.4) werden die Zell-Zyklus-Gene Cyclin H (1,9-fach) und p21 (1,6-fach) induziert, während cdk6 (0,6-fach) reprimiert wird. Daher sollte in Zukunft auch diese mögliche Abhängigkeit der Adhäsion von der Proliferation überprüft werden.

2 HNF4 α bildet in HEK293-Zellen während der Mitose punktuelle Ansammlungen

Bisher wurde HNF4 α ausschließlich als homogen im Zellkern lokalisiert beschrieben (Lucas et al., 2005). Bei Immunfluoreszenz-Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurde in Abhängigkeit zum Zellzyklus der HEK293-Zellen eine Ansammlung des HNF4 α -Proteins beobachtet. Da HNF4 α eine Hemmung der Zellproliferation bewirkt, wurde diese Lokalisation des Proteins in mitotischen Zellen qualitativ und quantitativ näher untersucht. Die Analyse ergab, dass HNF4 α in Interphasen-Zellen homogen im Kern vorlag, während es sich in mitotischen Zellen überwiegend an einem Ort in der Zelle ansammelte (Abbildung 7) .

Da bisher keine Daten bezüglich einer Ansammlung des HNF4 α -Proteins während der Mitose in HEK293-Zellen publiziert wurden und ein Artefakt der HNF4 α -Überexpression ausgeschlossen werden sollte, wurde die Doxycyclin-Konzentration ermittelt, bei der eine physiologische Menge an HNF4 α erzielt wird. Die Induktion mit 10 ng / ml Doxycyclin erzeugte eine halb so starke HNF4 α -Expression in den HEK293-Zellen im Vergleich zur endogenen HNF4 α -Expression in der HepG2-Zelllinie, wobei sowohl die Hemmung der Zellproliferation als auch die Morphologie-Veränderung noch auftraten (Abbildung 8). Die anschließende Immunfluoreszenz-

Analyse mit einer physiologischen HNF4 α -Expression ergab vergleichbare qualitative und quantitative Ergebnisse für die Protein-Lokalisation wie zuvor bei der Überexpression von HNF4 α (Abbildung 9).

Weitere Untersuchungen bezüglich der HNF4 α -Lokalisation in der Rattenzelllinie INS-1 (Thomas et al., 2004) ergaben, dass die Ansammlung von HNF4 α zellspezifisch für die HEK293-Zellen ist (Abbildung 10). Desweiteren zeigten Immunfluoreszenz-Analysen der beiden gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren HNF1 α und HNF1 β (Cereghini, 1996) in der HEK293-Zelllinie, dass die HNF4 α -Ansammlung in mitotischen Zellen auch proteinspezifisch ist (Abbildung 11).

Aufgrund des zell- und proteinspezifischen Auftretens der Ansammlung von HNF4 α in HEK293-Zellen wurde der genaue Lokalisationsort für HNF4 α innerhalb der Zelle während der Mitose untersucht. Die erste Assoziation für einen möglichen Lokalisationsort von HNF4 α ergab sich aus den Daten eines anderen Proteins, welches deutliche Parallelen zu HNF4 α (Lucas et al., 2005) zeigte. Der Zinkfinger-Faktor CTCF (CCTC-binding factor) bewirkt ebenso wie HNF4 α eine Hemmung der Zellproliferation und ebenso wie bei HNF4 α (Lucas et al., 2005) zeigen sich keine Verzögerungen im Zell-Zyklus-Profil in Abhängigkeit mit der Expression des Gens (Rasko et al., 2001). Und obwohl MYC ein Zielgen von CTCF darstellt, ist der Zellproliferationsrückgang nicht alleine auf diese Verbindung zurückzuführen, denn Immunfluoreszenz-Untersuchungen von CTCF ergaben, dass während der Mitose CTCF mit dem Centrosom assoziiert vorliegt. Während der Telophase dissoziiert CTCF vom Centrosom und lokalisiert am Midbody und an den wiedergeformten Nuclei (Zhang et al., 2004). Zusätzlich zu der transkriptionellen Regulation von CTCF suggeriert diese mitotische Lokalisation von CTCF am Centrosom und dem Midbody eine weitere auf Protein-Protein-Interaktion beruhende Fähigkeit zur Zellproliferationskontrolle.

Die mitotische Lokalisation von CTCF und die funktionelle Ähnlichkeit zu HNF4 α bezüglich der Proliferationskontrolle zeigte eine mögliche Erklärung für die von HNF4 α hervorgerufene Proliferationshemmung und die Ansammlung während der Mitose. Daher wurde eine Doppelimmunfluoreszenz vom Spindelapparat und HNF4 α durchgeführt. Als Markerprotein für den Spindelapparat diente γ -tubulin, welches am Basalkörper im Zellkern lokalisiert ist. Während der Mitose dient der Basalkörper der

Bildung des Spindelapparats und während der Interphase bildet der Basalkörper den Ankerpunkt für die Cilie (Pan et al., 2005). Die Cilie dient als mechanischer und sensorischer Sensor der Zelle und der Auf- und Abbau dieser beiden Strukturen ist ein fließender Prozeß (Snell et al., 2004). Es konnte demonstriert werden, dass ein Defekt an der Cilie von Nierenzellen sich auf die Morphogenese und indirekt auf die Proliferation von Nierenzellen auswirkt (Pazour, 2004; Calvet, 2002; Calvet, 2003; Wheatley, 2005; Ong and Wheatley, 2003).

Die Auswertung der Daten ergab, dass eindeutig keine Co-Lokalisation zwischen HNF4 α und dem Basalkörper vorlag (Abbildung 12). Somit konnte der Ort der Ansammlung von HNF4 α während der Mitose in den HEK293-Zellen nicht lokalisiert werden.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Protein-Ansammlung von HNF4 α in HEK293-Zellen während der Mitose und der Hemmung der Zellproliferation ist als sehr unwahrscheinlich zu erachten, da in dieser Arbeit gezeigt worden ist, dass sich die Mutante C106R in mitotischen Zellen zu 28% an einem Ort in den Zellen ansammelt, dabei aber keine Hemmung der Zellproliferation hervorruft (Lucas et al., 2005). Zusätzlich demonstrierte die durchgeführte Doppelimmunfluoreszenz keine Co-Lokalisation zwischen dem Basalkörper und HNF4 α .

3 Die langfristige Induktion von HNF4 α bewirkte die Reprimierung von HNF4 α in HEK293-Zellen

Eine längere Expressionsdauer von HNF4 α wurde bisher ausschließlich in Zellen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) durchgeführt. Lazarevich und Kollegen etablierten langsam wachsende Zellen aus chemisch induzierten hepatozellulären Karzinomen von Mäusen. Eine dieser langsam wachsenden Zelllinien mutierte spontan zu einer schnell wachsenden Zelllinie, die sich unter anderem durch den Verlust der Adhäsion zur extrazellulären Matrix auszeichnete. Einher ging der Verlust der HNF4 α -Expression in den schnell wachsenden Zellen des HZKs. Die Re-Expression von HNF4 α in diesen Zellen bewirkte nach vier Wochen eine Verlangsamung des Zellwachstums, die Expression von leberspezifischen Genen,

die Wiederherstellung der Zelladhäsion zur extrazellulären Matrix und die Differenzierung der Zellen zu Epithelzellen (Lazarevich et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden eine vierwöchige HNF4 α -Expression in der Nierenzelllinie HEK293 induziert, um eine mögliche Ausdifferenzierung der HEK293-Zellen zu untersuchen. Bisher wurde HNF4 α ausschließlich über einen Zeitraum von maximal sechs Tagen in den HEK293-Zellen exprimiert, wobei innerhalb dieser Zeitspanne eine Proliferationshemmung und eine Morphologie-Veränderung beobachtet werden konnte. Bei der langfristigen Induktion zeigten sich die erwarteten Veränderungen der Zellproliferation und der Morphologie bei der Zelllinie HNF4 α wt#1 und HNF4 α wt#4 innerhalb der ersten zwei Wochen. Ab der dritten Wochen waren diese HNF4 α -typischen Veränderungen nicht mehr zu beobachten (Abbildung 13). Die zu Kontrollzwecken mitgeführten Zelllinien HNF4 α C106R#1 und R154X#6 zeigten wie erwartet über den gesamten Versuchszeitraum weder eine Veränderungen in der Proliferationsrate noch in der Morphologie der Zellen.

Die unerwartete Neutralisation der HNF4 α -typischen Veränderungen bedingte eine Expressionskontrolle nach Ablauf der vierwöchigen Expression (Abbildung 14). Im Western Blot ließ sich nach vier Wochen keine HNF4 α -Expression mehr nachweisen. Bei einer zusätzlich durchgeführten Immunfluoreszenz ließ sich ein dramatischer Rückgang der Zellen mit HNF4 α -Expression ermitteln (Tabelle 10). Die Aufhebung der Zellproliferationshemmung und der Morphologie-Veränderung ließ sich demnach mit der reduzierten HNF4 α -Expression in den beiden Zelllinien wt#1 und wt#4 erklären. Für die beiden Mutanten-Zelllinien ließ sich weder im Western Blot noch bei der Immunfluoreszenz eine Reprimierung der Expression beobachten (Abbildung 14).

Eine Hypothese, um diese Reprimierung der HNF4 α -Expression zu erklären, bestand in der Möglichkeit, dass die nach der Generierung der Zelllinien Lak-Z-positiven Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Lak-Z-negativen Zellen besitzen. Dieser Wachstumsvorteil begründet sich in der Annahme, dass die Lak-Z-positiven Zellen nicht erfolgreich mit dem HNF4 α -Konstrukt transfiziert werden konnten und demnach auch nicht der Zellwachstumshemmung ausgesetzt wurden. Der nach einer vierwöchigen HNF4 α -Expression durchgeführte β -Galaktosidase-Test

zeigte allerdings keine Zunahme an Lak-Z-positiven Zellen (Abbildung 15). Bei den Zellen die zu Beginn des Versuches HNF4 α exprimiert haben wurde im Verlauf des Versuches HNF4 α inaktiviert, ohne dabei die Hygromycin-Resistenz zu beeinträchtigen. Da die HNF4 α inaktiven Zellen einen Proliferationsvorteil gegenüber den HNF4 α aktiven Zellen aufweisen, baut sich ein Selektionsdruck gegen die HNF4 α aktiven Zellen auf. Im Falle der beiden Mutanten wird kein Selektionsdruck aufgebaut, da die Zellen ein funktionsloses HNF4 α -Protein exprimieren, welches keinen Proliferationsnachteil für die Zellen bedeutet.

Weil die HNF4 α -Expression nicht über den gesamten Zeitraum der vier Wochen induziert werden konnte, wurden weiterführende Experimente bezüglich einer möglichen Ausdifferenzierung der Zellen nicht weiter verfolgt.

Die spontane Reprimierung von HNF4 α und die daraus resultierende Aufhebung der Zellproliferationskontrolle und der Adhäsions-Veränderung innerhalb der vier Wochen stellt eine wichtige Erkenntnis dar, denn dieser Vorgang könnte die natürliche Situation bei einem Funktionsausfall von HNF4 α widerspiegeln. Die Entwicklung oder das Fortschreiten von Tumoren in der Leber (Lazarevich et al., 2004) oder auch der Nieren (Lucas et al., 2005) wird im Zusammenhang mit dem Ausfall von HNF4 α in diesen Organen diskutiert. So wird spekuliert, dass die Inaktivierung von HNF4 α in der Zelle zum Verlust der Proliferationskontrolle führt und dadurch überwächst diese Zelle mit der Zeit die anderen Zellen, die HNF4 α exprimieren. Zusätzlich verändert sich in den HNF4 α -inaktiven Zellen die Zell-Zell-Adhäsion, so dass eine Invasion und Metastasierung begünstigt werden könnte. Der Funktionsausfall von HNF4 α würde somit einen wichtigen Schritt in der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumoren darstellen. Weitere Versuche müssen klären, ob die Reprimierung von HNF4 α und damit der Verlust der Zellproliferationskontrolle auf eine Reprimierung spezifisch für den CMV-Promoter zurück zu führen ist (Gill et al., 2001), oder ob eine gezielte epigenetische HNF4 α -Reprimierung möglicherweise durch einen negativen Feedback-loop-Mechanismus stattfindet. Defekte, die die epigenetische Regulation betreffen, sind als Ursache für eine Tumorentstehung bekannt (Ting et al., 2006). Es wird sogar vermutet, dass epigenetische Defekte häufiger die Ursache darstellen als die Mutation eines Gens (Feinberg et al., 2006;

Baylin and Ohm, 2006). Da bisher keine tumorassoziierten Mutation des HNF4 α -Gens entdeckt werden konnten, ist ein epigenetischer Defekt, der zum Funktionsausfall von HNF4 α führt, denkbar. Untersuchungen bezüglich des Methylierungsstatus des Promoters und auch bezüglich eventueller Histon-Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung) (Martin and Zhang, 2005) könnten die Ursache der Reprimierung von HNF4 α aufzeigen.

Die Ursache der MODY1-Erkrankung in den Pankreas-Zellen beruht auf dem Ausfall von HNF4 α (Yamagata et al., 1996). Ein geeignetes Modell, welches weitere Erkenntnisse zur MODY1-Erkrankung liefern würde, wäre die induzierbare Ratten-Insulinoma-Zelllinie INS-1 (Thomas et al., 2004). Ein spontaner Ausfall von HNF4 α in den INS-1-Zellen, wie er in den HEK293-Zellen beobachtet werden konnte, würde wichtige Hinweise zur Entstehung von MODY1 liefern, da bisher der späte Ausbruch der Krankheit mit der hohen Penetranz nicht geklärt ist (Frayling et al., 2001). Als Erklärung für diese Entwicklung wird ein Zwei-Treffer-Modell diskutiert (Erdmann et al., 2007), welches mit diesem spontanen HNF4 α -Ausfall und dem daraus resultierenden Verlust der Proliferationskontrolle korrelieren würde. Denn Menschen, die zum Zeitpunkt der Geburt heterozygot für HNF4 α sind, weisen keine MODY1-Erkrankung auf. Fällt bei diesem Menschen HNF4 α in einer β -Zellen des Pankreas spontan aus, würde diese Zelle die anderen Zellen überwachsen. Mit dem Ausfall von HNF4 α verlieren die β -Zellen zusätzlich ihre spezifischen Eigenschaften für den Insulin-Metabolismus, im Laufe der Zeit wäre somit ein Großteil der β -Zellen funktionslos und der betroffene Mensch entwickelt daraufhin MODY1.

4 Identifizierung der HNF4 α -regulierten Gene in Nierenzellen

Zu Beginn dieser Arbeit existierte kein vollständiges Expressionsprofil von HNF4 α -regulierten Genen in Nierenzellen. Ein Expressionsprofil, bei dem annähernd die Hälfte aller menschlichen proteinkodierenden Gene untersucht wurde, stammt aus unserem Labor aus dem Jahr 2003 (Lucas et al., 2005). Zur Analyse der proliferations- und morphologierelevanten Gene war die Identifizierung aller menschlichen Gene, die durch HNF4 α in den HEK293-Zellen reguliert werden, notwendig. Hierzu wurde der Microarray HG-U133_Plus_2.0 von Affymetrix

verwendet. Durch die 24 stündige Überexpression von HNF4 α in beiden unabhängigen Zelllinien wurden 1777 Probensonden differentiell exprimiert (Abbildung 16) und obwohl die Zelllinien durch die gezielte Integration des Konstrukts keine Unterschiede zeigen sollten, wiesen die Expressionsprofile der Zelllinien HNF4 α wt#1 und wt#4 zellspezifische Unterschiede auf. Ein weiterer Hinweis, dass zellspezifische Unterschiede vorhanden sind, ist die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien auf die Doxycyclin Induktion (Abbildung 20).

Da für einige Gene mehr als eine Sonde auf dem Array vorhanden ist, entsprechen die 1777 Sondenproben 1411 durch HNF4 α differentiell exprimierten Genen (Abbildung 17), was ca. 3% der menschlichen Gene ausmacht. Davon wurden 783 durch HNF4 α induziert und 628 reprimiert, wodurch die bisherige Interpretation für HNF4 α als positiver Regulator in HEK293-Zellen nicht bestätigt wurde. In den beiden Kontrollzelllinien HNF4 α C106R#1 und HNF4 α R154X#6 wurden nur 26 Gene differentiell exprimiert. Da die Filterbedingungen bei dieser Auswertung gering gehalten wurden, sind diese 26 proteinkodierende Gene als „falsch-positive“ Ergebnisse gewertet worden. In den HEK293-Zellen werden demnach 1411 Gene differentiell durch HNF4 α reguliert.

Der Vergleich zwischen den beiden an HEK293-Zellen durchgeführten Expressionsprofilen (Abbildung 17) zeigte, dass die in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse einen Großteil der vier Jahre zuvor detektierten Gene bestätigen konnte. Wird bei der zweiten Array-Analyse die Filterbedingung des 2-fold change nicht berücksichtigt, so konnten alle 65 zuvor identifizierten Gene validiert werden. Dies zeigt die hohe Stabilität der verwendeten Zelllinien, da trotz eines mehrjährigen Unterschieds und einer unabhängigen RNA-Aufreinigung die zuvor 65 regulierten Gene (Lucas et al., 2005) in der zweiten Studie bestätigt wurden. In der letzten Zeit wurden Publikationen veröffentlicht (Irizarry et al., 2005), die von einer Nicht-Reproduzierbarkeit der Mikroarray-Studien sprechen. Dieser Aussage widersprechen die Ergebnisse der beiden unabhängigen Microarray-Versuchen. Zusätzlich untermauert wird die hohe Verlässlichkeit der Mikroarray-Daten durch die in Abschnitt III.5 durchgeführte real-time PCR von 81 Kandidatengenen, die eine 83%ige Validierung der Kandidatengene demonstrierte.

In Pankreas und Leberzellen wurde gezeigt, dass HNF4 α bei einer Chromatin-Immunopräzipitation-Studie aus 2004 (Odom et al., 2004) bei ca. 40% der aktiven Gene im Promoterbereich gebunden hat. Dies würde bedeuten, dass HNF4 α als globaler Regulator in diesen Zellen fungiert. Einer globalen Regulation durch HNF4 α widersprechen unsere Microarray-Daten, da in den HEK293-Zellen nur 3% der proteinkodierenden Gene durch HNF4 α reguliert wurden. Bereits in einem früheren Vergleich von Expressionsprofilstudien für HNF4 α in verschiedenen Zelltypen wurde gezeigt, dass HNF4 α die Transkription seiner Zielgene auf zellspezifische Weise reguliert (Lucas et al., 2005). Dass HNF4 α nicht als globaler Regulator fungiert, bestätigt ebenso eine Studie über β -Zellen des Pankreas aus dem Jahr 2007 (Gupta et al., 2007). Eine globale Regulation durch HNF4 α ist demnach nicht wahrscheinlich.

Untersuchungen haben gezeigt, dass ca. 1% der Gene als sogenannte „Krebsgene“ fungieren (Futreal et al 2004). Das sind Gene, die signifikant an der Entstehung oder Differenzierung von Tumoren entweder als Onkogene oder als Tumorsuppressorgene beteiligt sind. Ein Vergleich der 1411 durch HNF4 α -regulierten Gene zeigte, dass 31 von ihnen als Krebsgene in dieser Liste aufgeführt werden (AFF3, BCL2, BCL10, CDK6, ETV1, EVI1, EXT2, FAS, FGFR2, FGFR10P, HIP1, HOXA9, HOXA11, HOXA13, HOXC13, HOXD13, LASP1, JAZF1, LHFP, MET, MLLT11, NCOA4, NIN, PICALM, PRDM16, PSIP1, PTCH, SH3GL1, WHSC1L1, WT1, XPC). Aufgrund ihrer Funktion als Krebsgene stellen sie interessante Kandidatengene für die Entstehung oder das Fortschreiten einer Krebserkrankung in Nierenzellen dar, verursacht durch den HNF4 α -Funktionsausfall in HEK293-Zellen.

Bei der von Lenburg veröffentlichten Expressionsprofilstudie von Nierenzell-Karzinomen wurde HNF4 α als 4,7-fach reprimiert beschrieben (Lenburg et al., 2003). Bereits 1996 wurde die Reprimierung von HNF4 α in Nierentumoren auf Proteinebene publiziert (Sel et al., 1996). Die Ergebnisse beider Analysen deuten auf eine Tumorsuppressorfunktion von HNF4 α in Nierenzellen hin. Ein Vergleich der Daten von Lenburg mit den durch HNF4 α -regulierten Genen (Anhang VII. 4; Tabelle 20) identifizierte 69 Gene, die im NZK reprimiert und durch HNF4 α induziert wurden. Den umgekehrten Fall, Gene, die im NZK induziert und durch HNF4 α reprimiert waren,

zeigten 35 Gene. Eine Spekulation wäre demnach, dass die Deregulation dieser Gene im NKZ auf dem Ausfall von HNF4 α beruht. Zu erwähnen ist außerdem, dass HNF4 α in den proximalen tubulären Epithelzellen, welche die Vorläuferzellen des klarzelliges Nierenkarzinoms (Kovacs et al., 1997) darstellen, exprimiert wird (Jiang et al., 2003; Chabardes-Garonne et al., 2003). Das klarzellige Nierenkarzinom ist mit 75-85% der am häufigsten vorkommende und aggressivste Subtyp des Nierenkrebes (Linehan and Zbar, 2004; Jones and Libermann, 2007). Diese insgesamt 104 durch HNF4 α regulierten und im NZK deregulierten Gene sind somit interessante Kandidaten für die Entwicklung und das Fortschreiten von Nierenkrebs und stellen ein weiteres Indiz für die mögliche Tumorsuppressorfunktion von HNF4 α in Nierenzellkarzinomen dar.

Die Gen-Ontologie-Analyse (Beissbarth and Speed, 2004) der 1411 Gene zeigte, dass die HNF4 α -regulierten Gene an metabolischen Prozessen überproportional häufig beteiligt sind. Daneben wurde auch für Entwicklungsprozesse und für die Morphogenese der anatomischen Struktur eine überproportionale Beteiligung ermittelt. Sehr deutlich treten die Prozesse für den Lipidstoffwechsel und hier insbesondere für den Fettsäurestoffwechsel (Tabelle 12) in den Vordergrund. Diese Analyse bestätigt somit die in vielen Publikationen beschriebene Beteiligung von HNF4 α an der Homeostase des Lipidstoffwechsels (Hayhurst et al., 2001; Spath and Weiss, 1997; Naiki et al., 2005). Ebenso konnte die Beteiligung am Glucose-Metabolismus (Stoffel 1997) (Pankreas: GO:0031016), und am Aminosäure-Metabolismus (Sladek and Seidel, 2001) (Amine; GO: 0009308) bestätigt werden. Besonders hervorzuheben ist die erstmals nachgewiesene Beteiligung an der „Entwicklung des Pankreas“ (GO: 0031016) in der durchgeführten GO-Analyse, wodurch die Verbindung zwischen HNF4 α und MODY1 (Yamagata et al., 1996) und Diabetes mellitus II (Gupta and Kaestner, 2004; Gupta et al., 2007) untermauert wird.

In der Literatur wird die Hypothese diskutiert, dass die Deregulation des Glukose-Metabolismus (Ashrafian, 2006) und des Fettsäuren-Metabolismus (Swinnen et al., 2005) die Malignität von Tumoren erhöht. Da die GO-Analyse die signifikante Regulation des Fettsäure-Metabolismus in HEK293-Zellen für HNF4 α bestätigt hat (Tabelle III.3) und die essentielle Rolle von HNF4 α in dem Glukose-Stoffwechsel bereits nachgewiesen ist (Wang et al., 2000), ist eine mögliche Konsequenz, dass

der Funktionsverlust von HNF4 α einen Kontrollverlust für beide Metabolismen darstellt. Eine interessante Spekulation wäre somit, dass ein Funktionsausfall von HNF4 α an der Malignität einer Tumorerkrankung beteiligt ist.

5 Eingrenzung der proliferations- und/ oder morphologie-relevanten Kandidatengene

Der Einsatz eines möglichen Schwellenwertes der HNF4 α -regulierten Gene sollte die Eingrenzung der proliferations- und / oder morphologierelevanten Kandidatengene bewirken. Aus der Literatur ist bekannt, dass Gene entweder graduell oder binär auf die Aktivität eines Transkriptionsfaktor antworten (Biggar and Crabtree, 2001; Magee et al., 2003).

Um für die HNF4 α -regulierten Gene einen möglichen Schwellenwert zu erreichen, wurde die Doxycyclin-Konzentration ermittelt, welche eine minimale Expression von HNF4 α in beiden unabhängigen Zelllinien wt#1 und wt#4 induziert. Untersuchungen mittels Western Blot und Immunfluoreszenzen zeigten bei 2-10 ng / ml Doxycyclin eine minimale HNF4 α -Expression, die aber ausreichend für die Hemmung der Zellproliferation und für die Veränderungen der Zellmorphologie war (Abbildung 19 und 20). Zunächst wurde eine Auswahl der HNF4 α -regulierten Gene getroffen, um die Hypothese eines Schwellenwertes (Abbildung 18) für die Kandidatengene zu testen, bevor der Versuch auf die Nutzung von Mikroarrays ausgeweitet werden konnte. Die Auswahl wurde aus den 1411 zuvor identifizierten HNF4 α -regulierten Genen getroffen und beinhaltete insgesamt 81 Kandidatengene, von denen 69 signifikant durch HNF4 α reguliert wurden. Mit Hilfe der Low-Density-Card-Technologie von Applied Biosystems, die auf real-time-TaqMan-Proben für die Kandidatengene basierte, war eine effiziente und schnelle Durchführung der 81 Proben mit den unterschiedlichen Messpunkten möglich (Tabelle 13).

Die Analyse ergab für fünf Kandidatengene keine Regulation nach HNF4 α -Induktion, wobei drei dieser fünf Gene auch im Mikroarray keine Regulation gezeigt hatten (CLN6, DUSP1 und NPR2L) und die übrigen zwei (MAPKAP3 und SLC7A5) nur eine sehr schwache Regulation im Mikroarray aufwiesen. Die Expression von fünf weiteren der 81 Kandidatengene konnte in der Real-time PCR nicht determiniert

werden, obwohl drei (CIDEB, HLA-F und PRPH) dieser fünf Gene im Mikroarray zuvor eine Regulation durch HNF4 α gezeigt hatten. Bei zwei Kandidatengenen (NPRL2 und CLN6) wurde später durch Affymetrix eine falsche Annotierung festgestellt, so dass in diesen Fällen ein falscher Assay durchgeführt worden ist. Als Folge dieser falschen Annotierung sind diese beiden Gene in dieser Analyse nicht gemessen worden. Insgesamt konnte die signifikante Regulation von 83% der 81 Kandidatengene in der real-time PCR validiert werden.

Für die 71 regulierten Kandidatengene ließ sich eine Dosisabhängigkeit, aber kein Schwellenwert für die Regulation beobachten. Daher wurde auf eine Ausweitung dieses Verfahrens auf die Mikroarray-Technologie verzichtet.

6 Identifizierung der proliferationsrelevanten Kandidatengene mittels RNAi

Um die proliferationsrelevanten, HNF4 α -regulierten Gene zu identifizieren, wurde eine kostengünstige und auch effiziente siRNA-screening-Methode benötigt, damit mehrere Dutzend der 1411 Kandidatengene getestet werden können. Hierzu wurde die 2003 publizierte esiRNA-Methode ausgewählt (Kittler and Buchholz, 2003) und in unserem Labor etabliert. Die Wahl fiel auf diese RNAi-Methode, da sie im Gegensatz zu enzymatischen shRNA Bibliotheken und synthetisch hergestellten siRNAs die Vorteile der schnellen Herstellung, der nahezu unendlichen Ressourcen, eine hohe Spezifität (Buchholz et al., 2006) und eine geringere Wahrscheinlichkeit für off-target Effekte aufgrund des Einsatzes eines esiRNA-Pools (Kittler et al., 2007) aufweist. Ein weiterer Grund für diese RNAi-Methode lag in ihrer schnellen und simplen *in vitro*-Herstellung (Abbildung 23), bei der keine kostspieligen Spezialprodukte oder Geräte benötigt werden.

Entscheidend für die Vermeidung von off-target Effekten ist neben dem esiRNA-Pool die eingesetzte Konzentration von esiRNA in die Transfektion. Es wurde gezeigt, dass Duplexe von 25-30 bp Länge bis zu 100 mal effektiver bei geringen Konzentrationen das Zielgen hemmen als exakt 21 bp lange RNA-Fragmente (Kim et al., 2005). Dadurch, dass die längeren Fragmente effektiver sind, kann die eingesetzte Konzentration gesenkt werden und die Gefahr der off-target Effekte (Kim

et al., 2005) und einer möglichen Interferon-Antwort (Lorenz und Thiesen 2005) kann vermindert werden. Durch den Einsatz des shortCut RNase® III Enzyms, welches nach ca. 25 bp schneidet, konnte mit geringen esiRNA-Konzentrationen (33 nM) pro Transfektionsreaktion gearbeitet werden. Die Konzentration von 33 nM ist für die Vermeidung der Interferon-Antwort (Lorenz und Thiesen 2005) und der off-target-Effekte (Kim et al., 2005) geeignet.

Von den 1411 im Mikroarray durch HNF4 α -regulierten Genen (Abbildung 17) wurden insgesamt zwölf durch HNF4 α reprimierte Gene und 44 induzierte Gene dem esiRNA-Screen unterzogen. Die 56 Kandidatengene wurden aufgrund ihrer publizierten Funktionen in den Prozessen Zelladhäsion, Zellproliferation, Morphogenese und Tumorrelevanz ausgewählt. Von den zweimal unabhängig mit esiRNA transfizierten, zwölf reprimierten Kandidatengenen erzielten drei einen 10%igen Rückgang der Zellproliferation in mindestens einem Assay (Abbildung 24 und Tabelle 14). Von den ebenfalls zweimal unabhängig mit esiRNA transfizierten, 44 induzierten Kandidatengenen erreichten 21 Kandidaten in mindestens einem Assay eine 60%ige Neutralisation des durch HNF4 α ausgelösten Proliferationsrückganges (Abbildung 25 und Tabelle 15). Für die in den ersten beiden Screenings erfolgreichen 24 Kandidatengene (drei reprimierte und 21 induzierte) wurde eine weitere unabhängig hergestellte esiRNA für einen dritten Screen genutzt. Basierend auf drei unabhängigen Transfektionen für jedes dieser 24 Kandidatengene wurde die Signifikanz ermittelt und 14 der 24 Kandidatengene (ADAMTS1, SEPP1, THEM2, BPHL, CDKN1A, MME, DSC2, ANK3, ALDH6A1, TGFA, EPHX2, NELL2, EFHD1 und PROS1) zeigten eine signifikante Beeinflussung der Zellproliferation (Tabelle 16).

Die Gene DSC2 (Nuber et al., 1995; Greenwood et al., 1997), NELL2 (Gen-Ontologie), PROS1 (Pathway assistant), MME (Sumitomo et al., 2005) und ANK3 (Kordeli et al., 1995), welche eine signifikante Neutralisation der Zellproliferationshemmung im esiRNA-Screen zeigten, weisen alle eine Funktion in der Zelladhäsion auf oder dienen der Stabilität des Zytoskeletts. Da dieses Gene vermutlich den Zell-Zell-Kontakt verändern, wodurch die Zellproliferation beeinträchtigt werden könnte, ist für diese Gene eine mögliche Funktion bei der Zellproliferation gegeben.

Für mehrere Gene der 14 proliferationsrelevanten Kandidatengene ist bereits ihre Beteiligung bei der Entstehung oder dem Fortschreiten einer Tumorerkrankung bekannt. Dazu zählen SEPP1 (Mork et al 2003; Tanaka et al 2000), DSC2 (Khan et al 2006), EPHX2 (Cajas-Salazar et al 2003), NELL2 (Maeda et al 2001, DiLella et al 2001), MME (Jung and Kuo, 2005; Sumitomo et al., 2005) und ADAMTS1 (Liu et al., 2006; Li et al., 2006). Diese Gene spiegeln höchstwahrscheinlich die Tatsache wider, dass für die Auswahl der 56 Kandidatengene unter anderem die Beteiligung an der Tumorentstehung relevant war. Dieses Ergebnis unterstützt dennoch die Hypothese, dass die Deregulation dieser Gene eine direkte Konsequenz des Ausfalls von HNF4 α in NZK ist. Ein weiterer Aspekt für die Tumorrelevanz der identifizierten Gene ist die Beobachtung, dass sieben (THEM2, BPHL, MME, ANK3, ALDH6A1, EPHX2, EFHD1) der 14 bestätigten Gene in den Lenburg-Daten reprimiert waren (Lenburg et al., 2003) und somit interessante Kandidaten für die Tumorentwicklung speziell in der Niere sind.

Sieben (ALDH6A1, BPHL, EFHD1, EPHX2, NELL2, PROS1, TGFA) der acht überexprimierten Gene bewirkten keine Hemmung der Zellproliferation, als sie stabil in die Flp-In-HEK293-Zelllinie integriert waren, obwohl sie zuvor signifikant im esiRNA-Screen die Hemmung der Zellproliferation neutralisiert haben. Die Daten belegen somit, dass diese Gene ausschließlich in Kooperation mit anderen Genen ihr Potential zur Zellproliferationskontrolle ausüben. Die Gene DSC2 und SEPP1 wurden zuvor als Kandidatengene für die Vermittlung der Proliferationskontrolle aufgrund von Überexpressionsstudien ausgeschlossen (Lucas et al., 2005). Die neu gewonnenen Daten des esiRNA-Screens sprechen aber eindeutig für eine Vermittlung der Proliferationskontrolle, allerdings nur in Kombination mit anderen Genen.

TGFA ist ein gut charakterisiertes Onkogen, welches als Wachstumsfaktor in der Zelle über seinen Rezeptor EGFR die Zellproliferation und das Überleben der Zelle stimuliert (Kumar et al., 1995). Bereits 1994 wurde gezeigt, dass transgene Mäuse, die TGFA überexprimieren, häufig Zysten in der Niere entwickeln (Lowden et al. 1994). Die Proliferationssteigerung bei der Überexpression (Abbildung 27) und die signifikante Neutralisation bei dem esiRNA-Screen (Tabelle 16) durch TGFA scheinen auf den ersten Blick nicht mit einander vereinbar zu sein. Die Aktivität von

TGFA wird über einen Prozess gesteuert, der drei proteolytische Modifikationen von TGFA beinhaltet (Juanes et al., 2005). Berücksichtigt man die Komplexität dieses Prozesses, so kann durch ein weiteres Gen, welches durch HNF4 α parallel reguliert wird, dieser Prozess negativ beeinflusst werden. Da bei dem esiRNA-Screen alle 1411 Gene durch HNF4 α reguliert wurden, wird die Aktivität von TGFA bei dem esiRNA-Screen möglicherweise durch eines der 1410 Gene negativ beeinflusst. Bei der Überexpression von TGFA wird dagegen ausschließlich TGFA induziert und die Aktivität wird dabei nicht negativ beeinflusst. Diese Annahmen geben somit eine mögliche Erklärung für die beiden auf den ersten Blick unvereinbaren Ergebnisse. Die Identifizierung von TGFA als proliferationsrelevantes, durch HNF4 α -reguliertes Gen präsentiert eine mögliche Verbindung zu dem gut charakterisierten, Nierenzellkarzinom auslösendem, VHL-Gen. Es ist bekannt, dass TGFA als Folge der Deregulation des HIF-Komplexes, ausgelöst durch eine Fehlfunktion von VHL in Nierenzelltumoren, stark induziert wird (Kaelin, Jr., 2007). Durch die in der vorliegende Arbeit demonstrierte proliferationsrelevante Funktion für TGFA, in Abhängigkeit von HNF4 α , ist eine Verbindung zwischen dem VHL-Netzwerk und dem HNF4 α -Netzwerk entstanden.

Ausschließlich die Überexpression von CDKN1A erzeugte eine signifikante Hemmung der Zellproliferation nach drei und sechs Tagen Induktion. Es ließ sich ebenfalls eine morphologische Veränderung der Zellen, ähnlich der durch HNF4 α erzeugten Veränderung, beobachten (Abbildung 27). Diese Ergebnisse deuten auf eine Schlüsselrolle für CDKN1A im Netzwerk der 14 Kandidatengene hin (Abbildung 29) und die CDKN1A-Induktion durch HNF4 α in den HEK293-Zellen konnte auf Proteinebene bestätigt werden (Abbildung 28). CDKN1A, besser bekannt als p21, ist als Inhibitor der Cyclin-Cyclin-Kinase-Zellzyklusregulation beschrieben, welcher mit einigen Tumorsuppressor-Signalwegen wie z.B. p53, TGFB und APC (Rowland and Peeper, 2006) interagiert. Interessanterweise ist für p53 publiziert worden, dass es die Aktivität von HNF4 α reprimiert (Maeda et al., 2006). Die Regulation von CDKN1A durch HNF4 α ist aber unabhängig von p53 (Hwang-Verslues and Sladek, 2007; Chiba et al., 2005). Bei einer vergleichenden Expressionsprofilstudie von menschlichen Hepatoma-Zellen mit und ohne HNF4 α -Expression wurde CDKN1A ebenfalls als durch HNF4 α induziert nachgewiesen (Naiki et al., 2002). Und in embryonalen Karzinoma-Nagetier-Zellen (F9-Zellen) ist CDKN1A als direktes Zielgen

von HNF4 α beschrieben worden, da HNF4 α im Promoterbereich von CDKN1A bindet und dessen Expression im Luciferase-Test reguliert (Chiba et al., 2005). Von der selben Gruppe wurde auch eine morphologische Veränderung der Zellen durch HNF4 α -Induktion beschrieben und sie postulieren für HNF4 α einen Einfluss auf die Bildung von Mikrovilli (Chiba et al., 2006). Die Beschreibung für CDKN1A als direktes Zielgen von HNF4 α wurde kürzlich von einer anderen Gruppe eingeschränkt, da von ihnen gezeigt worden ist, dass in HCT116-Zellen (humane Darmkrebs Zelllinie) hauptsächlich die Interaktion von HNF4 α mit SP1 für die Regulation von CDKN1A verantwortlich ist und nicht die transkriptionelle Aktivität von HNF4 α . Bei der Interaktion mit SP1 konkurriert HNF4 α mit dem Onkogen c-Myc um die Regulation von CDKN1A (Hwang-Verslues and Sladek, 2007).

Obwohl sich diese Daten zu HNF4 α und CDKN1A als eine elegante und simple Erklärung für die Proliferationskontrolle und auch vielleicht für die morphologischen Veränderungen anbieten, ist die Funktion von CDKN1A weitaus komplexer. So bewirkt in Nierenzellkarzinomen eine erhöhte Expression von CDKN1A nicht wie erwartet die Hemmung der Zellproliferation, sondern die Patienten mit bereits metastasierenden Tumoren erwartet eine deutlich schlechtere Prognose als mit normaler CDKN1A-Expression. Deshalb wird die Expression von CDKN1A als Marker im NZK eingesetzt, nicht aber als Therapeutikum (Weiss et al., 2007). Auch der zuvor untersuchte Sachverhalt, dass die Hemmung der HEK293-Zellen durch die HNF4 α -Expression nicht auf eine Arretierung im Zell-Zyklus zurückzuführen ist (Dissertation B. Lucas 2005; <http://miless.uni-duisburg-essen.de>), spricht gegen eine exklusive Proliferationskontrolle über die Induktion von CDKN1A, da CDKN1A eine Zell-Zyklus-Arretierung bewirkt (Taylor and Stark, 2001). Die Vermittlung der Proliferationskontrolle in den HEK293-Zellen ist daher das Resultat des komplexen Zusammenspiels eines ganzen Netzwerkes, wie es anhand des esiRNA-Screens bestätigt wurde und in Abbildung 29 schematisch dargestellt wird.

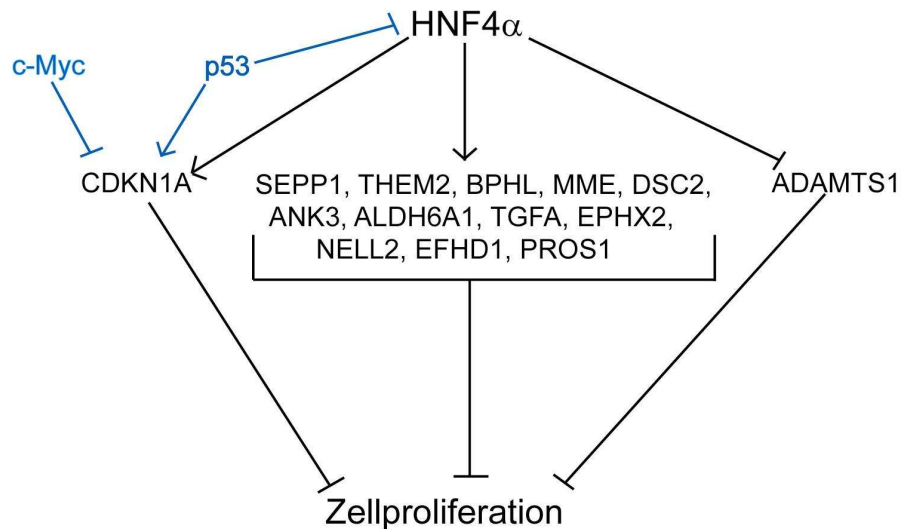


Abbildung 29: Das HNF4 α -Netzwerk Die Gene CDKN1A und ADAMTS1 können unabhängig von anderen Genen die Zellproliferation hemmen. Die übrigen zwölf Gene dagegen nur in Kombination mit anderen Genen. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten proliferationsrelevanten HNF4 α -regulierten Gene sind in schwarz dargestellt. Die in blau dargestellten Netzwerk-Komponenten beziehen sich auf Daten aus HCT116-Zellen und F9-Zellen (Hwang-Verslues and Sladek, 2007; Chiba et al., 2005).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit 14 Gene identifiziert wurden, die an der Vermittlung der durch HNF4 α ausgelösten Zellproliferationshemmung in HEK293-Zellen beteiligt sind (ADAMTS1, SEPP1, THEM2, BPHL, CDKN1A, MME, DSC2, ANK3, ALDH6A1, TGFA, EPHX2, NELL2, EFHD1 und PROS1; Abbildung 29).

Durch diesen Einblick in die durch HNF4 α initiierten Signalwege zur Zellproliferationskontrolle und durch die Identifizierung von tumorassoziierten Kandidatengenen ist in der vorliegenden Arbeit die Tumorsuppressoraktivität von HNF4 α im Nierenzell-Karzinom weiter unterstützt worden.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von HNF4 α in embryonalen Nierenzellen (HEK293) untersucht. Im Vordergrund stand die Identifizierung der Signalwege und der HNF4 α -regulierten Gene, die an der Proliferationsvermittlung beteiligt sind.

Es wurde erstmals gezeigt, dass HNF4 α häufig während der Mitose eine punktuelle Ansammlung bildet. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Ansammlung sowohl zell- als auch proteinspezifisch für HNF4 α in den HEK293-Zellen ist. Aber obwohl diese Lokalisation ausschließlich während der Mitose zu beobachten ist, konnte kein kausaler Zusammenhang zur Zellproliferation nachgewiesen werden.

Im Laufe der langfristigen Induktion von HNF4 α in Nierenzellen wurde die Expression von HNF4 α vermindert, so dass nach Ablauf von vier Wochen annähernd kein Protein mehr detektiert werden konnte. Der möglicherweise epigenetisch bedingte Funktionsausfall von HNF4 α und die dadurch verursachte Proliferationssteigerung zeigt, dass der Verlust von HNF4 α ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung und Metastasierung von Nierentumoren sein könnte.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war kein vollständiges Expressionsprofil für HNF4 α in HEK293-Zellen bekannt. Die durchgeführte Mikroarray-Analyse ermittelte 1411 Gene, die differenziell durch HNF4 α reguliert werden. Bei der an 81 Kandidatengenen durchgeführten real-time-PCR-Analyse zur Eingrenzung der proliferations- und / oder morphologierelevanten Kandidatengene konnte für 83% der Kandidaten eine Dosisabhängigkeit von HNF4 α nachgewiesen werden, aber kein Schwellenwert.

Zur Identifizierung der proliferationsrelevanten Kandidatengene und zur Aufklärung der Signalwege wurde ein esiRNA-Screen durchgeführt. Aus 56 Kandidaten konnten 14 identifiziert werden, die an der Vermittlung der Proliferationskontrolle beteiligt sind (ADAMTS1, SEPP1, THEM2, BPHL, CDKN1A, MME, DSC2, ANK3, ALDH6A1, TGFA, EPHX2, NELL2, EFHD1 und PROS1). Insbesondere THEM2, BPHL, MME, ANK3, ALDH6A1, EPHX2 und EFHD1 stellen interessante Kandidaten für die Tumorentwicklung speziell in Nieren dar, da ihre Expression in Nierenzellkarzinom-Analysen gegenüber gesunden Nierenproben reprimiert waren. Bei der konditionalen Überexpression von acht Kandidaten in HEK293-Zellen zeigte ausschließlich

CDKN1A sowohl eine antiproliferative Wirkung als auch eine Veränderung der Morphologie. CDKN1A ist somit ein Schlüsselfaktor in dem von HNF4 α reguliertem Netzwerk.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit ein Einblick in die durch HNF4 α gesteuerten Signalwege gelang, da 14 Gene identifiziert wurden, die in ein durch HNF4 α kontrolliertes Netzwerk eingebunden sind, um die Zellproliferation in HEK293-Zellen zu regulieren.

VI Literaturverzeichnis

- Argyrokastitis,A., Kamakari,S., Kapsetaki,M., Kritis,A., Talianidis,I., and Moschonas,N.K. (1997). Human hepatocyte nuclear factor-4 (hHNF-4) gene maps to 20q12-q13.1 between PLCG1 and D20S17. *Hum. Genet.* **99**, 233-236.
- Ashrafian,H. (2006). Cancer's sweet tooth: the Janus effect of glucose metabolism in tumorigenesis. *Lancet* **367**, 618-621.
- Battle,M.A., Konopka,G., Parviz,F., Gaggl,A.L., Yang,C., Sladek,F.M., and Duncan,S.A. (2006). Hepatocyte nuclear factor 4alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 8419-8424.
- Baylin,S.B. and Ohm,J.E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat. Rev. Cancer* **6**, 107-116.
- Beissbarth,T. and Speed,T.P. (2004). Gostat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinformatics.* **20**, 1464-1465.
- Benoit,G., Malewicz,M., and Perlmann,T. (2004). Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol.* **14**, 369-376.
- Biggar,S.R. and Crabtree,G.R. (2001). Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses. *EMBO J.* **20**, 3167-3176.
- Boer,J.M., Huber,W.K., Sultmann,H., Wilmer,F., von,H.A., Haas,S., Korn,B., Gunawan,B., Vente,A., Fuzesi,L., Vingron,M., and Poustka,A. (2001). Identification and classification of differentially expressed genes in renal cell carcinoma by expression profiling on a global human 31,500-element cDNA array. *Genome Res.* **11**, 1861-1870.
- Bogan,A.A., las-Yang,Q., Ruse,M.D., Jr., Maeda,Y., Jiang,G., Nepomuceno,L., Scanlan,T.S., Cohen,F.E., and Sladek,F.M. (2000). Analysis of protein dimerization and ligand binding of orphan receptor HNF4alpha. *J. Mol. Biol.* **302**, 831-851.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Buchholz,F., Kittler,R., Slabicki,M., and Theis,M. (2006). Enzymatically prepared RNAi libraries. *Nat. Methods* **3**, 696-700.
- Calvet,J.P. (2003). Ciliary signaling goes down the tubes. *Nat. Genet.* **33**, 113-114.
- Calvet,J.P. (2002). Cilia in PKD--letting it all hang out. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 2614-2616.
- Cereghini,S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* **10**, 267-282.

- Chabardes-Garonne,D., Mejean,A., Aude,J.C., Cheval,L., Di,S.A., Gaillard,M.C., Imbert-Teboul,M., Wittner,M., Balian,C., Anthouard,V., Robert,C., Segurens,B., Wincker,P., Weissenbach,J., Doucet,A., and Elalouf,J.M. (2003). A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 13710-13715.
- Chen,W.S., Manova,K., Weinstein,D.C., Duncan,S.A., Plump,A.S., Prezioso,V.R., Bachvarova,R.F., and Darnell,J.E., Jr. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* 8, 2466-2477.
- Chiba,H., Itoh,T., Satohisa,S., Sakai,N., Noguchi,H., Osanai,M., Kojima,T., and Sawada,N. (2005). Activation of p21CIP1/WAF1 gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Exp. Cell Res.* 302, 11-21.
- Chiba,H., Sakai,N., Murata,M., Osanai,M., Ninomiya,T., Kojima,T., and Sawada,N. (2006). The nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha acts as a morphogen to induce the formation of microvilli. *J. Cell Biol.* 175, 971-980.
- Choi,J.K., Choi,J.Y., Kim,D.G., Choi,D.W., Kim,B.Y., Lee,K.H., Yeom,Y.I., Yoo,H.S., Yoo,O.J., and Kim,S. (2004). Integrative analysis of multiple gene expression profiles applied to liver cancer study. *FEBS Lett.* 565, 93-100.
- Cooper , M. "The Cell", The flow of genetic information, Eukaryotic RNA Polymerases and general transcription factors (2000), 2. edition, Sunderland (MA), Sinauer Associates, Inc.
- Costa,R.H., Grayson,D.R., and Darnell,J.E., Jr. (1989). Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol. Cell Biol.* 9, 1415-1425.
- Dhe-Paganon,S., Duda,K., Iwamoto,M., Chi,Y.I., and Shoelson,S.E. (2002). Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J. Biol. Chem.* 277, 37973-37976.
- Drewes,T., Senkel,S., Holewa,B., and Ryffel,G.U. (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol. Cell Biol.* 16, 925-931.
- Duncan,S.A., Nagy,A., and Chan,W. (1997). Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* 124, 279-287.
- Echeverri,C.J. and Perrimon,N. (2006). High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat. Rev. Genet.* 7, 373-384.
- Ellard,S. and Colclough,K. (2006). Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Hum. Mutat.* 27, 854-869.

- Ellrott,K., Yang,C., Sladek,F.M., and Jiang,T. (2002). Identifying transcription factor binding sites through Markov chain optimization. *Bioinformatics*. 18 Suppl 2, S100-S109.
- Erdmann,S., Senkel,S., Arndt,T., Lucas,B., Lausen,J., Klein-Hitpass,L., Ryffel,G.U., and Thomas,H. (2007). Tissue-specific transcription factor HNF4alpha inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 beta-cell line. *Biol. Chem.* 388, 91-106.
- Fahraeus,R. and Lane,D.P. (1999). The p16(INK4a) tumour suppressor protein inhibits alphavbeta3 integrin-mediated cell spreading on vitronectin by blocking PKC-dependent localization of alphavbeta3 to focal contacts. *EMBO J.* 18, 2106-2118.
- Feinberg,A.P., Ohlsson,R., and Henikoff,S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.* 7, 21-33.
- Ferrer,J. (2002). A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes* 51, 2355-2362.
- Frayling,T.M., Evans,J.C., Bulman,M.P., Pearson,E., Allen,L., Owen,K., Bingham,C., Hannemann,M., Shepherd,M., Ellard,S., and Hattersley,A.T. (2001). beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* 50 Suppl 1, S94-100.
- Furuta,H., Iwasaki,N., Oda,N., Hinokio,Y., Horikawa,Y., Yamagata,K., Yano,N., Sugahiro,J., Ogata,M., Ohgawara,H., Omori,Y., Iwamoto,Y., and Bell,G.I. (1997). Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 46, 1652-1657.
- Garrison,W.D., Battle,M.A., Yang,C., Kaestner,K.H., Sladek,F.M., and Duncan,S.A. (2006). Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon. *Gastroenterology* 130, 1207-1220.
- Gill,D.R., Smyth,S.E., Goddard,C.A., Pringle,I.A., Higgins,C.F., Colledge,W.H., and Hyde,S.C. (2001). Increased persistence of lung gene expression using plasmids containing the ubiquitin C or elongation factor 1alpha promoter. *Gene Ther.* 8, 1539-1546.
- Gnarra,J.R., Glenn,G.M., Latif,F., Anglard,P., Lerman,M.I., Zbar,B., and Linehan,W.M. (1993). Molecular genetic studies of sporadic and familial renal cell carcinoma. *Urol. Clin. North Am.* 20, 207-216.
- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., and Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Green,V.J., Kokkotou,E., and Ladias,J.A. (1998). Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* 273, 29950-29957.

- Greenwood,M.D., Marsden,M.D., Cowley,C.M., Sahota,V.K., and Buxton,R.S. (1997). Exon-intron organization of the human type 2 desmocollin gene (DSC2): desmocollin gene structure is closer to "classical" cadherins than to desmogleins. *Genomics* 44, 330-335.
- Gronemeyer,H., Gustafsson,J.A., and Laudet,V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 950-964.
- Gunton,J.E., Kulkarni,R.N., Yim,S., Okada,T., Hawthorne,W.J., Tseng,Y.H., Roberson,R.S., Ricordi,C., O'Connell,P.J., Gonzalez,F.J., and Kahn,C.R. (2005). Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122, 337-349.
- Gupta,R.K., Gao,N., Gorski,R.K., White,P., Hardy,O.T., Rafiq,K., Brestelli,J.E., Chen,G., Stoeckert,C.J., Jr., and Kaestner,K.H. (2007). Expansion of adult beta-cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4alpha. *Genes Dev.* 21, 756-769.
- Gupta,R.K. and Kaestner,K.H. (2004). HNF-4alpha: from MODY to late-onset type 2 diabetes. *Trends Mol. Med.* 10, 521-524.
- Gupta,R.K., Vatamaniuk,M.Z., Lee,C.S., Flaschen,R.C., Fulmer,J.T., Matschinsky,F.M., Duncan,S.A., and Kaestner,K.H. (2005). The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion. *J. Clin. Invest* 115, 1006-1015.
- Hadzopoulou-Cladaras,M., Kistanova,E., Evagelopoulou,C., Zeng,S., Cladaras,C., and Ladias,J.A. (1997). Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J. Biol. Chem.* 272, 539-550.
- Hayhurst,G.P., Lee,Y.H., Lambert,G., Ward,J.M., and Gonzalez,F.J. (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell Biol.* 21, 1393-1403.
- Hertz,R., Magenheim,J., Berman,I., and Bar-Tana,J. (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 392, 512-516.
- Higgins,J.P. (2006). Gene array studies in renal neoplasia. *ScientificWorldJournal.* 6, 502-511.
- Higgins,J.P., Shinghal,R., Gill,H., Reese,J.H., Terris,M., Cohen,R.J., Fero,M., Pollack,J.R., van de,R.M., and Brooks,J.D. (2003). Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am. J. Pathol.* 162, 925-932.
- Hirota,E., Yan,L., Tsunoda,T., Ashida,S., Fujime,M., Shuin,T., Miki,T., Nakamura,Y., and Katagiri,T. (2006). Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 29, 799-827.

- Hokari,M., Matsuda,Y., Wakai,T., Shirai,Y., Sato,M., Tsuchiya,A., Takamura,M., Yamagiwa,S., Suzuki,K., Ohkoshi,S., Ichida,T., Kawachi,H., and Aoyagi,Y. (2007). Tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 potentates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* *81*, 336-345.
- Holewa,B., Zapp,D., Drewes,T., Senkel,S., and Ryffel,G.U. (1997). HNF4beta, a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* *17*, 687-694.
- Hwang-Verslues,W.W. and Sladek,F.M. (2007). Nuclear Receptor HNF4{alpha}1 Competes with Oncoprotein c-Myc for Control of the p21/WAF1 Promoter. *Mol. Endocrinol.*
- Inoue,Y., Hayhurst,G.P., Inoue,J., Mori,M., and Gonzalez,F.J. (2002). Defective ureagenesis in mice carrying a liver-specific disruption of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). HNF4alpha regulates ornithine transcarbamylase in vivo. *J. Biol. Chem.* *277*, 25257-25265.
- Irizarry,R.A., Warren,D., Spencer,F., Kim,I.F., Biswal,S., Frank,B.C., Gabrielson,E., Garcia,J.G., Geoghegan,J., Germino,G., Griffin,C., Hilmer,S.C., Hoffman,E., Jedlicka,A.E., Kawasaki,E., Martinez-Murillo,F., Morsberger,L., Lee,H., Petersen,D., Quackenbush,J., Scott,A., Wilson,M., Yang,Y., Ye,S.Q., and Yu,W. (2005). Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat. Methods* *2*, 345-350.
- Ishiyama,T., Kano,J., Minami,Y., Iijima,T., Morishita,Y., and Noguchi,M. (2003). Expression of HNFs and C/EBP alpha is correlated with immunocytochemical differentiation of cell lines derived from human hepatocellular carcinomas, hepatoblastomas and immortalized hepatocytes. *Cancer Sci.* *94*, 757-763.
- Jiang,G. and Sladek,F.M. (1997). The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* *272*, 1218-1225.
- Jiang,S., Tanaka,T., Iwanari,H., Hotta,H., Yamashita,H., Kumakura,J., Watanabe,Y., Uchiyama,Y., Aburatani,H., Hamakubo,T., Kodama,T., and Naito,M. (2003). Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4alpha) isoforms in human and rats. *Nucl. Recept.* *1*, 5.
- Jones,J. and Libermann,T.A. (2007). Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead. *Clin. Cancer Res.* *13*, 685s-692s.
- Jones,J., Otu,H., Spentzos,D., Kolia,S., Inan,M., Beecken,W.D., Fellbaum,C., Gu,X., Joseph,M., Pantuck,A.J., Jonas,D., and Libermann,T.A. (2005). Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.* *11*, 5730-5739.
- Juanes,P.P., Ferreira,L., Montero,J.C., Arribas,J., and Pandiella,A. (2005). N-terminal cleavage of proTGFalpha occurs at the cell surface by a TACE-independent activity. *Biochem. J.* *389*, 161-172.
- Jung,S.M. and Kuo,T.T. (2005). Immunoreactivity of CD10 and inhibin alpha in differentiating hemangioblastoma of central nervous system from metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Mod. Pathol.* *18*, 788-794.

- Kaelin, W.G., Jr. (2007). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13, 680s-684s.
- Kim, D.H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S., and Rossi, J.J. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* 23, 222-226.
- Kittler, R. and Buchholz, F. (2003). RNA interference: gene silencing in the fast lane. *Semin. Cancer Biol.* 13, 259-265.
- Kittler, R., Putz, G., Pelletier, L., Poser, I., Heninger, A.K., Drechsel, D., Fischer, S., Konstantinova, I., Habermann, B., Grabner, H., Yaspo, M.L., Himmelbauer, H., Korn, B., Neugebauer, K., Pisabarro, M.T., and Buchholz, F. (2004). An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432, 1036-1040.
- Kittler, R., Surendranath, V., Heninger, A.K., Slabicki, M., Theis, M., Putz, G., Franke, K., Caldarelli, A., Grabner, H., Kozak, K., Wagner, J., Rees, E., Korn, B., Frenzel, C., Sachse, C., Sonnichsen, B., Guo, J., Schelter, J., Burchard, J., Linsley, P.S., Jackson, A.L., Habermann, B., and Buchholz, F. (2007). Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *Nat. Methods.*
- Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 68, 820-823.
- Kordeli, E., Lambert, S., and Bennett, V. (1995). AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J. Biol. Chem.* 270, 2352-2359.
- Kovacs, G., Akhtar, M., Beckwith, B.J., Bugert, P., Cooper, C.S., Delahunt, B., Eble, J.N., Fleming, S., Ljungberg, B., Medeiros, L.J., Moch, H., Reuter, V.E., Ritz, E., Roos, G., Schmidt, D., Srigley, J.R., Storkel, S., van den, B.E., and Zbar, B. (1997). The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J. Pathol.* 183, 131-133.
- Ktistaki, E. and Talianidis, I. (1997). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4 and enhance hepatic gene expression. *Mol. Cell Biol.* 17, 2790-2797.
- Kumar, V., Bustin, S.A., and McKay, I.A. (1995). Transforming growth factor alpha. *Cell Biol. Int.* 19, 373-388.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laine, B., Eeckhoutte, J., Suaud, L., Briche, I., Furuta, H., Bell, G.I., and Formstecher, P. (2000). Functional properties of the R154X HNF-4alpha protein generated by a mutation associated with maturity-onset diabetes of the young, type 1. *FEBS Lett.* 479, 41-45.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., and . (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260, 1317-1320.

- Lausen, J. (2001) Einfluss Diabetes-assoziiierter Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF4alpha. Dissertation
- 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 HNF4alpha gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Res.* 28, 430-437.
- Lazarevich, N.L., Cheremnova, O.A., Varga, E.V., Ovchinnikov, D.A., Kudrjavitseva, E.I., Morozova, O.V., Fleishman, D.I., Engelhardt, N.V., and Duncan, S.A. (2004). Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* 39, 1038-1047.
- Lehto, M., Bitzen, P.O., Isomaa, B., Wipemo, C., Wessman, Y., Forsblom, C., Tuomi, T., Taskinen, M.R., and Groop, L. (1999). Mutation in the HNF-4alpha gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes* 48, 423-425.
- Lenburg, M.E., Liou, L.S., Gerry, N.P., Frampton, G.M., Cohen, H.T., and Christman, M.F. (2003). Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC. Cancer* 3, 31.
- Levenberg, S., Yarden, A., Kam, Z., and Geiger, B. (1999). p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry. *Oncogene* 18, 869-876.
- Li, C.L., Coullin, P., Bernheim, A., Joliot, V., Auffray, C., Zoroob, R., and Perbal, B. (2006). Integration of Myeloblastosis Associated Virus proviral sequences occurs in the vicinity of genes encoding signaling proteins and regulators of cell proliferation. *Cell Commun. Signal.* 4, 1.
- Li, J., Ning, G., and Duncan, S.A. (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev.* 14, 464-474.
- Lindner, T., Gagnoli, C., Furuta, H., Cockburn, B.N., Petzold, C., Rietzsch, H., Weiss, U., Schulze, J., and Bell, G.I. (1997). Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the hepatocyte nuclear factor-4alpha/MODY1 gene. *J. Clin. Invest* 100, 1400-1405.
- Linehan, W.M. and Zbar, B. (2004). Focus on kidney cancer. *Cancer Cell* 6, 223-228.
- Liu, Y.J., Xu, Y., and Yu, Q. (2006). Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* 25, 2452-2467.
- Liu, Z.J., Tanaka, Y., Mine, S., Morinobu, A., Yagita, H., Okumura, K., Taniguchi, T., Yamamura, H., and Minami, Y. (1998). Functional cooperation of cyclin C and c-Myc in mediating homotypic cell adhesion via very late antigen-4 activation and vascular cell adhesion molecule-1 induction. *Blood* 92, 4700-4711.
- Lorenz, P. and Thiesen H.-J. (2005) „Potent downregulation of a tripartite motif protein with siRNAs generated by DICER in vitro“, *Biochemica* No.3 22-24.

Lucas, B. (2005). Funktion des zellspezifischen Transkriptionsfaktors HNF4 α bei der Zellproliferation und Identifizierung von HNF4 α -regulierten Genen in Nierenzellen. Dissertation

Lucas,B., Grigo,K., Erdmann,S., Lausen,J., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2005). HNF4 α reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene* 24, 6418-6431.

Lucas,S.S., Lopez-Alcorocho,J.M., Bartolome,J., and Carreno,V. (2004). Nitric oxide and TGF-beta1 inhibit HNF-4 α function in HEPG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 688-694.

Maeda,Y., Hwang-Verslues,W.W., Wei,G., Fukazawa,T., Durbin,M.L., Owen,L.B., Liu,X., and Sladek,F.M. (2006). Tumour suppressor p53 down-regulates the expression of the human hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) gene. *Biochem. J.* 400, 303-313.

Magee,J.A., Abdulkadir,S.A., and Milbrandt,J. (2003). Haploinsufficiency at the Nkx3.1 locus. A paradigm for stochastic, dosage-sensitive gene regulation during tumor initiation. *Cancer Cell* 3, 273-283.

Mangelsdorf,D.J., Thummel,C., Beato,M., Herrlich,P., Schutz,G., Umesono,K., Blumberg,B., Kastner,P., Mark,M., Chambon,P., and Evans,R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

Martin,C. and Zhang,Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 838-849.

Miquerol,L., Lopez,S., Cartier,N., Tulliez,M., Raymondjean,M., and Kahn,A. (1994). Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J. Biol. Chem.* 269, 8944-8951.

Naiki,T., Nagaki,M., Asano,T., Kimata,T., and Moriwaki,H. (2005). Adenovirus-mediated hepatocyte nuclear factor-4 α overexpression maintains liver phenotype in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 496-500.

Naiki,T., Nagaki,M., Shidoji,Y., Kojima,H., Imose,M., Kato,T., Ohishi,N., Yagi,K., and Moriwaki,H. (2002). Analysis of gene expression profile induced by hepatocyte nuclear factor 4 α in hepatoma cells using an oligonucleotide microarray. *J. Biol. Chem.* 277, 14011-14019.

Nuber,U.A., Schafer,S., Schmidt,A., Koch,P.J., and Franke,W.W. (1995). The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. *Eur. J. Cell Biol.* 66, 69-74.

Odom,D.T., Zizlsperger,N., Gordon,D.B., Bell,G.W., Rinaldi,N.J., Murray,H.L., Volkert,T.L., Schreiber,J., Rolfe,P.A., Gifford,D.K., Fraenkel,E., Bell,G.I., and Young,R.A. (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303, 1378-1381.

- Ong,A.C. and Wheatley,D.N. (2003). Polycystic kidney disease--the ciliary connection. *Lancet* 361, 774-776.
- Pan,J., Wang,Q., and Snell,W.J. (2005). Cilium-generated signaling and cilia-related disorders. *Lab Invest* 85, 452-463.
- Parviz,F., Li,J., Kaestner,K.H., and Duncan,S.A. (2002). Generation of a conditionally null allele of *hnf4alpha*. *Genesis*. 32, 130-133.
- Parviz,F., Matullo,C., Garrison,W.D., Savatski,L., Adamson,J.W., Ning,G., Kaestner,K.H., Rossi,J.M., Zaret,K.S., and Duncan,S.A. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.* 34, 292-296.
- Pazour,G.J. (2004). Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2528-2536.
- Pearson,E.R., Pruhova,S., Tack,C.J., Johansen,A., Castleden,H.A., Lumb,P.J., Wierzbicki,A.S., Clark,P.M., Lebl,J., Pedersen,O., Ellard,S., Hansen,T., and Hattersley,A.T. (2005). Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4alpha mutations in a large European collection. *Diabetologia* 48, 878-885.
- Perroud,B., Lee,J., Valkova,N., Dhirapong,A., Lin,P.Y., Fiehn,O., Kultz,D., and Weiss,R.H. (2006). Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol. Cancer* 5, 64.
- Petrescu,A.D., Hertz,R., Bar-Tana,J., Schroeder,F., and Kier,A.B. (2002). Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF-4alpha). *J. Biol. Chem.* 277, 23988-23999.
- Rajas,F., Gautier,A., Bady,I., Montano,S., and Mithieux,G. (2002). Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 15736-15744.
- Rasko,J.E., Klenova,E.M., Leon,J., Filippova,G.N., Loukinov,D.I., Vatolin,S., Robinson,A.F., Hu,Y.J., Ulmer,J., Ward,M.D., Pugacheva,E.M., Neiman,P.E., Morse,H.C., III, Collins,S.J., and Lobanenkova,V.V. (2001). Cell growth inhibition by the multifunctional multivalent zinc-finger factor CTCF. *Cancer Res.* 61, 6002-6007.
- Reef, E. (2005) "Gene silencing using esiRNA-efficient, robust and not influenced by positional effects" *Biochemica* No.3 26-28.
- Rodriguez-Antona,C., Donato,M.T., Boobis,A., Edwards,R.J., Watts,P.S., Castell,J.V., and Gomez-Lechon,M.J. (2002). Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* 32, 505-520.
- Rowland,B.D. and Peeper,D.S. (2006). KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 11-23.

Ruse, M.D., Jr., Privalsky, M.L., and Sladek, F.M. (2002). Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1: modulation by the F domain. *Mol. Cell Biol.* 22, 1626-1638.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1990). 'Molecular cloning-a laboratory manual.' (Cold Spring Harbour Laboratory), Cold Spring Harbour, New York

Schuetz, A.N., Yin-Goen, Q., Amin, M.B., Moreno, C.S., Cohen, C., Hornsby, C.D., Yang, W.L., Petros, J.A., Issa, M.M., Pattaras, J.G., Ogan, K., Marshall, F.F., and Young, A.N. (2005). Molecular classification of renal tumors by gene expression profiling. *J. Mol. Diagn.* 7, 206-218.

Sel, S., Ebert, T., Ryffel, G.U., and Drewes, T. (1996). Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 alpha and HNF1 alpha. *Cancer Lett.* 101, 205-210.

Senkel, S., Lucas, B., Klein-Hitpass, L., and Ryffel, G.U. (2005). Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1731, 179-190.

Shih, D.Q., Dansky, H.M., Fleisher, M., Assmann, G., Fajans, S.S., and Stoffel, M. (2000). Genotype/phenotype relationships in HNF-4alpha/MODY1: haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein (CIII), lipoprotein(a), and triglyceride levels. *Diabetes* 49, 832-837.

Shih, D.Q., Screenan, S., Munoz, K.N., Philipson, L., Pontoglio, M., Yaniv, M., Polonsky, K.S., and Stoffel, M. (2001). Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* 50, 2472-2480.

Sladek, F. (2002). Desperately seeking...something. *Mol. Cell* 10, 219-221.

Sladek, F.M., Ruse, M.D., Jr., Nepomuceno, L., Huang, S.M., and Stallcup, M.R. (1999). Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol. Cell Biol.* 19, 6509-6522.

Sladek, F.M. and Seidel Hepatocyte nuclear factor 4alpha. San Diego: Academic Press: In 'Nuclear Receptors and Genetic Disease'. (Eds. T.B. Burris and E.R.B. McCabe.) pp.309-61.

Sladek, F.M., Zhong, W.M., Lai, E., and Darnell, J.E., Jr. (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 4, 2353-2365.

Snell, W.J., Pan, J., and Wang, Q. (2004). Cilia and flagella revealed: from flagellar assembly in *Chlamydomonas* to human obesity disorders. *Cell* 117, 693-697.

Spath, G.F. and Weiss, M.C. (1997). Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol. Cell Biol.* 17, 1913-1922.

Stoffel,M. and Duncan,S.A. (1997). The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 13209-13214.

Stumpf,H., Senkel,S., Rabes,H.M., and Ryffel,G.U. (1995). The DNA binding activity of the liver transcription factors LFB1 (HNF1) and HNF4 varies coordinately in rat hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* *16*, 143-145.

Suaud,L., Formstecher,P., and Laine,B. (1999). The activity of the activation function 2 of the human hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4 α) is differently modulated by F domains from various origins. *Biochem. J.* *340* (Pt 1), 161-169.

Sultmann,H., von,H.A., Huber,W., Kuner,R., Bunes,A., Vogt,M., Gunawan,B., Vingron,M., Fuzesi,L., and Poustka,A. (2005). Gene expression in kidney cancer is associated with cytogenetic abnormalities, metastasis formation, and patient survival. *Clin. Cancer Res.* *11*, 646-655.

Sumitomo,M., Shen,R., and Nanus,D.M. (2005). Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. *Biochim. Biophys. Acta* *1751*, 52-59.

Swinnen,J.V., Beckers,A., Brusselmans,K., Organe,S., Segers,J., Timmermans,L., Vanderhoydonc,F., Deboel,L., Derua,R., Waelkens,E., De,S.E., Van de,S.T., Noel,A., Foufelle,F., and Verhoeven,G. (2005). Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype. *Cancer Res.* *65*, 2441-2448.

Takahashi,M., Sugimura,J., Yang,X., Vogelzang,N., Teh,B.S., Furge,K., and Teh,B.T. (2003). Gene expression profiling of renal cell carcinoma and its implications in diagnosis, prognosis, and therapeutics. *Adv. Cancer Res.* *89*, 157-181.

Tanaka,T., Jiang,S., Hotta,H., Takano,K., Iwanari,H., Sumi,K., Daigo,K., Ohashi,R., Sugai,M., Ikegame,C., Umezu,H., Hirayama,Y., Midorikawa,Y., Hippo,Y., Watanabe,A., Uchiyama,Y., Hasegawa,G., Reid,P., Aburatani,H., Hamakubo,T., Sakai,J., Naito,M., and Kodama,T. (2006). Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer. *J. Pathol.* *208*, 662-672.

Taraviras,S., Mantamadiotis,T., Dong-Si,T., Mincheva,A., Lichter,P., Drewes,T., Ryffel,G.U., Monaghan,A.P., and Schutz,G. (2000). Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4 γ . *Biochim. Biophys. Acta* *1490*, 21-32.

Taraviras,S., Monaghan,A.P., Schutz,G., and Kelsey,G. (1994). Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* *48*, 67-79.

Taylor,D.G., Haubenwallner,S., and Leff,T. (1996). Characterization of a dominant negative mutant form of the HNF-4 orphan receptor. *Nucleic Acids Res.* *24*, 2930-2935.

Taylor,W.R. and Stark,G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* *20*, 1803-1815.

- Thomas,H., Senkel,S., Erdmann,S., Arndt,T., Turan,G., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2004). Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line. *Nucleic Acids Res.* 32, e150.
- Ting,A.H., McGarvey,K.M., and Baylin,S.B. (2006). The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes Dev.* 20, 3215-3231.
- Valencia-Sanchez,M.A., Liu,J., Hannon,G.J., and Parker,R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 20, 515-524.
- Vasselli,J.R., Shih,J.H., Iyengar,S.R., Maranchie,J., Riss,J., Worrell,R., Torres-Cabala,C., Tabios,R., Mariotti,A., Stearman,R., Merino,M., Walther,M.M., Simon,R., Klausner,R.D., and Linehan,W.M. (2003). Predicting survival in patients with metastatic kidney cancer by gene-expression profiling in the primary tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 6958-6963.
- Vincent,S.D. and Robertson,E.J. (2004). Targeted insertion of an IRES Cre into the Hnf4alpha locus: Cre-mediated recombination in the liver, kidney, and gut epithelium. *Genesis.* 39, 206-211.
- Vossen,C. and Erard,M. (2002). Down-regulation of nuclear receptor DNA-binding activity by nitric oxide--HNF4 as a model system. *Med. Sci. Monit.* 8, RA217-RA220.
- Wang,H., Maechler,P., Antinozzi,P.A., Hagenfeldt,K.A., and Wollheim,C.B. (2000). Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 275, 35953-35959.
- Weedon,M.N., Owen,K.R., Shields,B., Hitman,G., Walker,M., McCarthy,M.I., Love-Gregory,L.D., Permutt,M.A., Hattersley,A.T., and Frayling,T.M. (2004). Common variants of the hepatocyte nuclear factor-4alpha P2 promoter are associated with type 2 diabetes in the U.K. population. *Diabetes* 53, 3002-3006.
- Weiss,R.H., Borowsky,A.D., Seligson,D., Lin,P.Y., Ilard-Telm,L., Belldegrun,A.S., Figlin,R.A., and Pantuck,A.D. (2007). p21 is a prognostic marker for renal cell carcinoma: implications for novel therapeutic approaches. *J. Urol.* 177, 63-68.
- Weiss,R.H. and Lin,P.Y. (2006). Kidney cancer: identification of novel targets for therapy. *Kidney Int.* 69, 224-232.
- Werdien,D., Peiler,G., and Ryffel,G.U. (2001). FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res.* 29, E53.
- Wheatley,D.N. (2005). Landmarks in the first hundred years of primary (9+0) cilium research. *Cell Biol. Int.* 29, 333-339.
- White,D.E. and Muller,W.J. (2007). Multifaceted roles of integrins in breast cancer metastasis. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 12, 135-142.
- Wisely,G.B., Miller,A.B., Davis,R.G., Thornquest,A.D., Jr., Johnson,R., Spitzer,T., Sefler,A., Shearer,B., Moore,J.T., Miller,A.B., Willson,T.M., and Williams,S.P. (2002).

Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure*. 10, 1225-1234.

Xu,L., Hui,L., Wang,S., Gong,J., Jin,Y., Wang,Y., Ji,Y., Wu,X., Han,Z., and Hu,G. (2001). Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 61, 3176-3181.

Yamagata,K., Furuta,H., Oda,N., Kaisaki,P.J., Menzel,S., Cox,N.J., Fajans,S.S., Signorini,S., Stoffel,M., and Bell,G.I. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384, 458-460.

Zhang,R., Burke,L.J., Rasko,J.E., Lobanenkov,V., and Renkawitz,R. (2004). Dynamic association of the mammalian insulator protein CTCF with centrosomes and the midbody. *Exp. Cell Res*. 294, 86-93.

Zhong,W., Sladek,F.M., and Darnell,J.E., Jr. (1993). The expression pattern of a *Drosophila* homolog to the mouse transcription factor HNF-4 suggests a determinative role in gut formation. *EMBO J*. 12, 537-544.

VII Anhang

1 GO-Analyse der Mikroarray-Ergebnisse

Tabelle 17: GO-Analyse inklusive der beteiligten Genen an den biologischen Prozessen Bei der GO-Analyse wurden die 1.777 Sondenproben mit einem Pool von 24.800 Vergleichsproben bezüglich der Häufigkeit der zuzuordnenden biologischen Prozesse analysiert. Durch den p-Value (Signifikanz) wird angegeben, wenn überdurchschnittlich häufig HNF4 α -Zieltranskripte an einem Prozess beteiligt waren, als dieses statistisch zufällig der Fall sein konnte. Die Analyse beruht auf die im Juni des Jahres 2007 zugänglichen Daten bezüglich der Zuordnung der Gene in die biologischen Prozesse. ** Diese biologischen Prozesse zeigten eine Signifikanz von p-value < 0,01. * Diese biologischen Prozesse zeigten eine Signifikanz von p-value < 0,05. Kursiv dargestellte Prozesse sind statistisch nicht mehr signifikant

Best GOs	GO Number	Genes	Count 804	Total 8400	p-Value
Fettsäure Metabolismus	<u>GO:0006631</u>	PLA2G4A OXSM CRAT HPGD ELOVL4 LTA4H LTB4DH LPL PECR MGST2 HADHB ASAH1 EHHADH BDH2 PRKAR2B ACAA2 DCI SCD5 SC4MOL PCCB ACOT2 PEI HADHA HADH FADS1 ALDH5A1 ACSL3 LYPLA2 FASN ACADVL ABAT	31	96	1,73E-10
Monocarbolischer Säuren Metabolismus **	<u>GO:0032787</u>	OXSM CRAT HPGD ELOVL4 PECR MGST2 HADHB ASAH1 SULT2A1 TMLHE SCD5 ACOT2 UGDH ACSL3 ACADVL ABAT PLA2G4A LTA4H LTB4DH LPL EHHADH BDH2 ACAA2 PRKAR2B DCI PIPOX GBA2 SC4MOL PCCB PEI HADHA HADH IDH1 FADS1 ALDH5A1 LYPLA2 FASN	37	128	1,76E-10
zellulärer Lipid Metabolismus **	<u>GO:0044255</u>	OXSM SQLE PRDX6 CRAT ELOVL4 HPGD HMGCR MTM1 GPX4 PECR MGST2 DHRS3 TMEM23 HADHB SULT2A1 ASAH1 SCD5 OSBPL11 NSDHL BMP6 OSBPL3 ACOT2 DHCR24 ACSL3 CYB5R3 B4GALT4 NR1H3 ACADVL ABAT SULT1A1 PLA2G4A LTA4H CRLS1 PNPLA3 PNLIPRP2 LTB4DH ST3GAL6 LPL PCYT1A SCP2 BDH2 EHHADH ACAA2 PRKAR2B CEPT1 DCI PIGH PLA2G12A GBA2 SC4MOL SORL1 PCCB PEI HADH HADHA SULT1A2 FADS1 UGT8 ALDH5A1 AYTL2 LYPLA2 IDI1 FASN DHCR7	64	311	1,92E-08

Lipid Metabolismus **	<u>GO:0006629</u>	PRDX6 HMGCR GPX4 PECR DHRS3 TMEM23 SCD5 OSBPL11 BMP6 OSBPL3 FABP5 ABCB4 ACOT2 DHCR24 ACSL3 B4GALT4 HNF4A ACADVL LRP8 NR1H3 CRLS1 LTB4DH ST3GAL6 SCP2 EHHADH PRKAR2B CEPT1 DCI PLA2G12A SC4MOL ANXA1 PCCB PEI HADHA HADH ALDH5A1 LYPLA2 IDI1 DHCR7 SQLE OXSM CRAT HPGD ELOVL4 MTM1 MGST2 HADHB ASAH1 SULT2A1 LIPA NSDHL CYB5R3 SULT1A1 ABAT PLA2G4A LTA4H PNLIPRP2 PNPLA3 PCYT1A LPL BDH2 ACAA2 PIGH GBA2 SORL1 SULT1A2 FADS1 UGT8 AYTL2 FASN	70	364	9,11E-08
Multizellulärer Organismus	<u>GO:0032501</u>	HMGCR OLIG1 SLC1A1 CYP26B1 TWIST2 GPX4 PTPLA JAG2 NFKBIA GDF10 ATP7B BTG2 BMP6 TMOD2 NR3C2 FABP5 IRS2 DHCR24 NINJ1 TSHZ3 WT1 ADAMTS3 GCLM FZD2 ASH2L CLIC5 AMPH PTHLH AMBN CD46 QPRT HES4 SLIT2 CR2 GUCY1A3 SKI RBPSUH IFT81 NKX2-2 ZNF313 EFHD1 DHCR7 PROS1 TRAF4 PLSCR1 HPGD KCNMB4 MTM1 DIXDC1 HOXC13 TIA1 FGF13 DLX1 GCHFR KIF3A AES COBL FCGRT FOXD3 BCL10 MET TFPI2 CSPG2 ABAT DPYSL2 NTS UNC5B LHX2 NLGN1 TLE1 LPL HOXA1 BVES CD276 JARID2 BHLHB3 RAI2 SLC30A1 HOXA13 TRIM15 HEY2 RASA1 UGT8 SERPINF1 ABI2 HOXB9 CAMK1 NCAM1 WNT3 VANGL1 INSM1 NTN4 DHRS3 EXT2 POU4F1 SERPINE2 FLNA PAPSS2 SH3GL1 IL6R TSHZ1 UGDH HIRA MYO1A STX2 UTRN NCOA4 HNF4A ISL2 ROBO1 ZIC2 PROCR GPSM1 PKP2 ITGA8 DBN1 IAPP NOVA1 PICALM ANKH FZD3 FZD8 ADAMTS1 WNT5A ALDH5A1 EML1 TNFRSF11A CFI PBX3 MID1 PAX6 EPHX2 ELOVL4 ALDH1A2 PDGFC LRP4 GPM6B PEPD APP FKBP4 SULT2A1 CACNB3 SLC12A2 CACNB2 NSDHL EN2 HOXA9 SMARCA1 ACD ELF1 HEY1 CYB5R3 FHL1 BAD PRIMA1 RUNX2 CRIM1 CABLES1 NOTCH2 GRLF1 MEF2C PDE3B NKX3-1 GATA6 GUCY1B3 AQP3 KLF4 TFPI ERBB3 LMO4 HOXA11 HOXC4 ITGA4	173	1240	4,38E-06
Karboxycylsäuren Metabolismus **	<u>GO:0019752</u>	OXSM SDSL CRAT HPGD DDAH2 ELOVL4 AGXT2L1 ACY1 PECP PEPD MGST2 HADHB GLS2 ASS1 ASAH1 SULT2A1 TMLHE CBS SCD5 EPRS ACOT2 UGDH ACSL3 PDGFD ACADVL GLDC ABAT PLA2G4A GCLM DHFR LTA4H LTB4DH LPL OTC EHHADH BDH2 SHMT1 PRKAR2B ACAA2 DCI PIPOX GBA2 SC4MOL THNSL1 PCCB PEI HADHA HADH ALDH6A1 FADS1 IDH1 HMGCL ALDH5A1 LYPLA2 FASN SLC7A5	56	300	1,80E-05

Organische Säuren Metabolismus **	<u>GO:0006082</u>	OXSM SDSL CRAT HPGD DDAH2 ELOVL4 AGXT2L1 ACY1 PECP PEPD MGST2 HADHB GLS2 ASS1 ASAH1 SULT2A1 TMLHE CBS SCD5 EPRS ACOT2 UGDH ACSL3 PDGFD ACADVL GLDC ABAT PLA2G4A GCLM DHFR LTA4H LTB4DH LPL OTC EHHADH BDH2 SHMT1 PRKAR2B ACAA2 DCI PIPOX GBA2 SC4MOL THNSL1 PCCB PECI HADHA HADH ALDH6A1 FADS1 IDH1 HMGCL ALDH5A1 LYPLA2 FASN SLC7A5	56	302	2,17E-05
anatomische Struktur Entwicklung **	<u>GO:0048856</u>	HMGCR INSM1 OLIG1 CYP26B1 TWIST2 NTN4 DMAP1 EXT2 DLG1 NFKBIA JAG2 MCAM POU4F1 GDF10 BMP6 TMOD2 SERPINE2 FLNA FABP5 PAPSS2 SH3GL1 IRS2 UGDH HIRA DHCR24 STX2 UTRN NINJ1 NCOA4 WT1 CD2AP ASH2L FZD2 ROBO1 KRT18 MAB21L1 ZIC2 DLC1 GPSM1 PTHLH PKP2 ITGA8 DBN1 AMBN PICALM IER3 FZD3 ANKH HES4 SLIT2 ADAMTS1 WNT5A ALDH5A1 IGFBP5 SKI TNFRSF11A PBX3 RBPSUH NKX2- 2 MID1 PAX6 EFHD1 DHCR7 NOV TRAF4 ALDH1A2 DDX5 MTM1 PDGFC GPM6B LRP4 APP HOXC13 FGF13 CACNB2 NSDHL EN2 COBL AES KIF3A SMARCA1 ACD FOXD3 BCL10 SCML1 HEY1 MET FHL1 DPYSL2 BAD LHX2 NLGN1 RUNX2 TLE1 COVA1 CRIM1 HOXA1 BVES CD276 CABLES1 NOTCH2 JARID2 BHLHB3 SERTAD2 GRLF1 MEF2C EVA1 PDE3B NKX3-1 GATA6 HOXA13 TRIM15 HEY2 KLF4 RASA1 UGT8 ERBB3 LMO4 SERPINF1 HOXA11 NDNL2 ABI2 CAMK1 ITGA4 WNT3	125	863	5,15E-05
System Entwicklung **	<u>GO:0048731</u>	HMGCR INSM1 OLIG1 TWIST2 NTN4 EXT2 JAG2 NFKBIA POU4F1 GDF10 BMP6 TMOD2 FLNA SERPINE2 FABP5 PAPSS2 SH3GL1 IRS2 DHCR24 STX2 UTRN NINJ1 NCOA4 WT1 ROBO1 ASH2L ZIC2 GPSM1 PKP2 PTHLH DBN1 ITGA8 AMBN PICALM FZD3 ANKH HES4 SLIT2 ADAMTS1 WNT5A ALDH5A1 TNFRSF11A PBX3 RBPSUH NKX2-2 PAX6 EFHD1 DHCR7 TRAF4 ALDH1A2 PDGFC MTM1 GPM6B APP FGF13 CACNB2 EN2 NSDHL KIF3A AES COBL SMARCA1 FOXD3 ACD BCL10 HEY1 MET FHL1 DPYSL2 BAD LHX2 NLGN1 RUNX2 TLE1 CRIM1 HOXA1 BVES CD276 CABLES1 NOTCH2 JARID2 BHLHB3 GRLF1 MEF2C PDE3B NKX3-1 GATA6 HOXA13 TRIM15 HEY2 KLF4 RASA1 UGT8 ERBB3 LMO4 HOXA11 SERPINF1 ABI2 ITGA4 CAMK1	100	671	0,000212

Multizellulärer Organismus Entwicklung **	<u>GO:0007275</u>	HMGCR OLIG1 CYP26B1 TWIST2 GPX4 PTPLA JAG2 NFKBIA GDF10 BTG2 BMP6 TMOD2 FABP5 IRS2 DHCR24 NINJ1 TSHZ3 WT1 FZD2 ASH2L PTHLH AMBN HES4 SLIT2 SKI IFT81 RBPSUH NKX2-2 ZNF313 EFHD1 DHCR7 TRAF4 MTM1 DIXDC1 HOXC13 FGF13 DLX1 KIF3A AES COBL FOXD3 BCL10 MET DPYSL2 CSPG2 UNC5B LHX2 NLGN1 TLE1 BVES HOXA1 CD276 BHLHB3 JARID2 RAI2 SLC30A1 HOXA13 TRIM15 HEY2 RASA1 UGT8 SERPINF1 HOXB9 ABI2 CAMK1 WNT3 VANGL1 INSM1 NTN4 EXT2 POU4F1 SERPINE2 FLNA PAPSS2 SH3GL1 IL6R UGDH TSHZ1 HIRA STX2 UTRN NCOA4 ISL2 ROBO1 ZIC2 GPSM1 PKP2 ITGA8 DBN1 PICALM FZD3 ANKH ADAMTS1 FZD8 WNT5A ALDH5A1 TNFRSF11A PBX3 MID1 PAX6 ALDH1A2 PDGFC GPM6B LRP4 APP FKBP4 CACNB2 NSDHL EN2 HOXA9 SMARCA1 ACD HEY1 FHL1 BAD RUNX2 CRIM1 CABLES1 NOTCH2 GRLF1 MEF2C PDE3B NKX3-1 GATA6 KLF4 ERBB3 LMO4 HOXA11 HOXC4 ITGA4	130	930	0,000237
Aminoglycan Biosynthese **	<u>GO:0006023</u>	MGAT1 UGDH CHST11 CHST7 EXT2 SLC35D1 CHST13 CHST6	8	14	0,00155
Organ Entwicklung **	<u>GO:0048513</u>	HMGCR INSM1 TWIST2 EXT2 JAG2 NFKBIA POU4F1 GDF10 BMP6 FABP5 PAPSS2 IRS2 DHCR24 STX2 UTRN NINJ1 NCOA4 WT1 ASH2L ZIC2 PKP2 PTHLH ITGA8 AMBN PICALM ANKH FZD3 ADAMTS1 SLIT2 WNT5A TNFRSF11A PBX3 RBPSUH NKX2-2 PAX6 DHCR7 TRAF4 ALDH1A2 MTM1 APP CACNB2 EN2 NSDHL AES KIF3A SMARCA1 FOXD3 ACD HEY1 MET FHL1 BAD LHX2 RUNX2 TLE1 BVES HOXA1 CD276 JARID2 NOTCH2 BHLHB3 GRLF1 MEF2C PDE3B NKX3- 1 GATA6 HOXA13 TRIM15 KLF4 HEY2 RASA1 ERBB3 HOXA11 SERPINF1 ITGA4	75	506	0,00448
Glycosaminoglycan Biosynthese **	<u>GO:0006024</u>	SLC35D1 CHST13 UGDH CHST6 CHST11 CHST7 EXT2	7	13	0,00644
Chondroitin Sulfat proteoglycan Biosynthese *	<u>GO:0050650</u>	GALNACT-2 SLC35D1 CHST13 CHST11 CHST7	5	7	0,0118
Nervensystem Entwicklung *	<u>GO:0007399</u>	ALDH1A2 OLIG1 NTN4 PDGFC GPM6B APP POU4F1 FGF13 TMOD2 EN2 FLNA COBL SERPINE2 SMARCA1 IRS2 SH3GL1 BCL10 HEY1 MET NINJ1 DPYSL2 LHX2 NLGN1 ROBO1 CRIM1 HOXA1 ZIC2 GPSM1 CABLES1 DBN1 JARID2 NOTCH2 MEF2C FZD3 HES4 SLIT2 HEY2 UGT8 ALDH5A1 ERBB3 LMO4 SERPINF1 PBX3 ABI2 NKX2-2 EFHD1 PAX6 CAMK1	48	301	0,0153

Steroid Metabolismus *	<u>GO:0008202</u>	SQLE HMGCR SCP2 SULT2A1 ACAA2 OSBPL11 BMP6 GBA2 NSDHL SC4MOL OSBPL3 SORL1 SULT1A2 DHCR24 CYB5R3 IDI1 SULT1A1 DHCR7	18	81	0,0164
Chondroitin Sulfat proteoglycan Metabolismus *	<u>GO:0050654</u>	GALNACT-2 SLC35D1 CHST13 CHST11 CHST7	5	8	0,0232
Entwicklungsprozesse *	<u>GO:0032502</u>	HMGCR OLIG1 CYP26B1 TWIST2 GPX4 DMAP1 TMEM23 PTPLA DLG1 NFKBIA MCAM JAG2 GDF10 BTG2 BMP6 FASTKD1 TMOD2 FABP5 IRS2 CRADD DHCR24 CGI-09 NINJ1 TSHZ3 WT1 BNIP3 VIL1 AIFM1 FZD2 ASH2L PTHLH AMBN MNAT1 IER3 HES4 ANXA1 NDUFAF1 SLIT2 GNPTAB NAP1L2 SKI RBPSUH IFT81 NKX2-2 ZNF313 EFHD1 DHCR7 SFRS9 TRAF4 NME3 DDX5 HIP1 MTM1 DIXDC1 HOXC13 SLC7A11 TIA1 FGF13 CIDEB DLX1 KIF3A AES COBL CIB1 ITGB4BP RIPK1 FOXD3 BCL10 MET ANXA4 CSPG2 DPYSL2 UNC5B LHX2 CDKN1A NLGN1 TLE1 HOXA1 BVES BIRC2 CD276 JARID2 BHLHB3 RAI2 EVA1 SLC30A1 TNFRSF21 HOXA13 TRIM15 HEY2 FADS1 RASA1 UGT8 SERPINF1 NDNL2 ABI2 HOXB9 CAMK1 CYFIP2 WNT3 VANGL1 INSM1 MAP3K11 NTN4 PECR EXT2 KIAA0367 MRPS30 POU4F1 PEX13 RUNX3 FLNA EPRS SERPINE2 PAPSS2 SH3GL1 IL6R TSHZ1 UGDH HIRA STX2 UTRN NCOA4 ISL2 TNFRSF10B CD2AP ROBO1 MAB21L1 ZIC2 KRT18 DLC1 GPSM1 PKP2 ITGA8 DBN1 IAPP H1FX PICALM FZD3 ANKH ADAMTS1 FZD8 WNT5A ALDH5A1 IGFBP5 TNFRSF11A PBX3 MID1 PAX6 SLC9A3R1 GPX3 NOV ALDH1A2 DDAH2 COLEC12 PDGFC LRP4 GPM6B S100A13 APP PEA15 FKBP4 CACNB2 NSDHL EN2 HOXA9 SMARCA1 ACD NDRG1 SCML1 HEY1 FHL1 BAD AHR RUNX2 COVA1 CRIM1 SIRT5 BRE CABLES1 NOTCH2 SFRS2IP UBE2V1 SERTAD2 GRLF1 MEF2C GLRX2 PDE3B NKX3-1 GATA6 EIF3S9 KLF4 ERBB3 LMO4 HOXA11 FAS KIFAP3 HOXC4 ITGA4	199	1677	0,0272
Sterol Biosynthese *	<u>GO:0016126</u>	SQLE SC4MOL HMGCR DHCR24 CYB5R3 IDI1 ACAA2 NSDHL DHCR7	9	26	0,0278
Aminoglycan Metabolismus *	<u>GO:0006022</u>	MGAT1 UGDH CHST11 CHST7 EXT2 SLC35D1 CHST13 SUMF1 CHST6	9	27	0,0347
Nitrogen Komponenten Metabolismus *	<u>GO:0006807</u>	SDSL DDAH2 AGXT2L1 ACY1 CHST11 PEPD CHST7 EXT2 GLS2 ASS1 TMLHE CBS SLC35D1 GCHFR SULT1C1 EPRS MGAT1 UGDH PDGFD GLDC SULT1A1 ABAT NIT1 ISCU GCLM DHFR UAP1 ST3GAL6 ASMTL OTC SHMT1 CHST13 CHST6 THNSL1 ALDH6A1 SULT1A2 HMGCL ALDH5A1 SLC7A5 SUMF1	40	250	0,0347

anatomischer Struktur Morphogenese *	<u>GO:0009653</u>	CYP26B1 DMAP1 DLG1 JAG2 MCAM POU4F1 UGDH HIRA STX2 NINJ1 WT1 CD2AP ROBO1 FZD2 KRT18 MAB21L1 DLC1 PTHLH DBN1 ITGA8 AMBN IER3 FZD3 SLIT2 WNT5A SKI IGFBP5 RBPSUH MID1 PAX6 EFHD1 NOV ALDH1A2 DDX5 LRP4 APP HOXC13 COBL AES FOXD3 ACD BCL10 SCML1 HEY1 FHL1 RUNX2 COVA1 TLE1 CRIM1 HOXA1 JARID2 NOTCH2 BHLHB3 SERTAD2 GRLF1 EVA1 GATA6 TRIM15 HEY2 KLF4 RASA1 LMO4 NDNL2 SERPINF1 HOXA11 ABI2 WNT3 ITGA4	68	483	0,0347
Icosanoid Metabolismus *	<u>GO:0006690</u>	PLA2G4A HPGD LTA4H LTB4DH MGST2 FADS1	6	13	0,0347
Lipid Biosynthese *	<u>GO:0008610</u>	PLA2G4A SQLE OXSM HMGCR HPGD ELOVL4 LTA4H CRLS1 PNPLA3 PCYT1A PECR MGST2 TMEM23 SCP2 ACAA2 CEPT1 PIGH SCD5 NSDHL SC4MOL FADS1 UGT8 DHCR24 AYTL2 CYB5R3 IDI1 FASN DHCR7	28	158	0,0347
Lipid Katabolismus *	<u>GO:0016042</u>	PRDX6 PLA2G4A PCCB PNLIPRP2 PNPLA3 LPL ALDH5A1 SULT2A1 LIPA PLA2G12A ABAT	11	39	0,0354
Kurz-kettige Fettsäuren Metabolismus *	<u>GO:0046459</u>	OXSM ABAT ALDH5A1	3	3	0,0374
Sulfur Metabolismus *	<u>GO:0006790</u>	GALNACT-2 GCLM PAPSS2 CHST11 IDH1 CHST7 CBS SLC35D1 CHST13 TPST2 CHST6 GLRX2 SULF2	13	52	0,0375
Pankreas Entwicklung *	<u>GO:0031016</u>	INSM1 ALDH1A2 NKX2-2 PDE3B	4	6	0,0375
Leukitrienen Metabolismus *	<u>GO:0006691</u>	HPGD LTA4H LTB4DH MGST2	4	6	0,0375
Chondroitin Sulfat Metabolismus *	<u>GO:0030204</u>	SLC35D1 CHST13 CHST11 CHST7	4	6	0,0375
Chondroitin Sulfat Biosynthese *	<u>GO:0030206</u>	SLC35D1 CHST13 CHST11 CHST7	4	6	0,0375
Alkene Metabolismus *	<u>GO:0043449</u>	HPGD LTA4H LTB4DH MGST2	4	6	0,0375
Proteoglycan Metabolismus *	<u>GO:0006029</u>	GALNACT-2 HPSE SLC35D1 CHST13 CHST11 CHST7 SULF2	7	19	0,0439
Amine Metabolismus *	<u>GO:0009308</u>	SDSL DDAH2 AGXT2L1 ACY1 CHST11 PEPD CHST7 EXT2 GLS2 ASS1 TMLHE CBS SLC35D1 EPRS SULT1C1 MGAT1 UGDH PDGFD GLDC SULT1A1 ABAT GCLM DHFR UAP1 ST3GAL6 ASMTL OTC SHMT1 CHST13 CHST6 THNSL1 ALDH6A1 SULT1A2 HMGCL ALDH5A1 SLC7A5 SUMF1	37	234	0,0494
Gewebe Bildung	<u>GO:0048771</u>	ANKH TWIST2 RUNX2 CD276 TNFRSF11A PTHLH IAPP AMBN ITGA4 BMP6	10	36	0,0503

<i>biologische Adhesion</i>	<u>GO:0022610</u>	TSPAN2 APP DLG1 JAG2 MCAM PCDH9 COBL CIB1 NRXN3 COL14A1 BCL10 NINJ1 RND3 CSPG2 CNTN1 CD99 CD97 NLGN1 ROBO1 ICAM3 SRPX DLC1 PKP2 ITGA8 DSC2 C20ORF42 ALCAM EVA1 FZD3 SUSD5 NELL2 RASA1 TPBG LMO4 JUP CYFIP2 ITGA4 NCAM1	38	243	0,0511
<i>Zell-Adhesion</i>	<u>GO:0007155</u>	TSPAN2 APP DLG1 JAG2 MCAM PCDH9 COBL CIB1 NRXN3 COL14A1 BCL10 NINJ1 RND3 CSPG2 CNTN1 CD99 CD97 NLGN1 ROBO1 ICAM3 SRPX DLC1 PKP2 ITGA8 DSC2 C20ORF42 ALCAM EVA1 FZD3 SUSD5 NELL2 RASA1 TPBG LMO4 JUP CYFIP2 ITGA4 NCAM1	38	243	0,0511
<i>Epithelial Morphogenese</i>	<u>GO:0002009</u>	PTHLH LMO4 COBL FZD3 JAG2 ALDH1A2 NOTCH2 FZD2 WT1 BCL10	10	37	0,0555

2 Low Density Array Daten

Tabelle 18A: Daten der Zelllinie HNF4 α wt#1

Die Regulation der Gene in der Zelllinie HNF4 α wt#1 wurde nach 24 Stunden Inkubation mittels Real-time PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als fold change angegeben und die Gene sind alphabetisch geordnet. Die Kandidatengene, für die mehr als eine TaqMan-Sonde vorhanden war, sind durchnummeriert. Bei den Daten des Mikroarrays handelt es sich um den Mittelwert der beiden untersuchten HNF4 α -Zelllinien. n.d. = nicht determiniert

Gen Symbol	Gen Name	TaqMan Probeset	Mikroarray
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	Hs00230853_m1	12,8
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Hs00184491_m1	3,2
ABCB1		Hs00184500_m1	
ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	Hs00240956_m1	3,7
ABCB4		Hs00251620_m1	
ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	Hs00817723_g1	1,7
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Hs00244513_m1	2,1
ACOX1		Hs00244515_m1	
ACY1	aminoacylase 1	Hs00167402_m1	2,8
AGXT2L1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1 /// alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	Hs00229818_m1	3,9
AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1	Hs00177481_m1	2,1
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	Hs00233455_m1	1,4
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)	Hs00153566_m1	2,6
ALDH5A1		Hs00542444_m1	
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide (Wilson disease)	Hs00163739_m1	1,6
BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	Hs00357350_m1	2,0
CCNH	cyclin H	Hs00236923_m1	1,9
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Hs00270923_s1	1,0
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Hs00153439_m1	1,9
CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b	Hs00205339_m1	31,8
CLN6	ceroid-lipofiscinosis, neuronal 6, late infantile, variant	Hs00608557_m1	1,0
COBL	cordons-bleu homolog (mouse)	Hs00323596_m1	2,7
COBL		Hs00391205_m1	
COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1 /// collagen, type XXI, alpha 1	Hs00229402_m1	2,0
CRAT	carnitine acetyltransferase	Hs00241350_m1	3,4
CRAT		Hs00241357_m1	
CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	Hs00171642_m1	0,6
DBI	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	Hs00220950_m1	1,5
DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	Hs00203889_m1	9,9
DSC2	desmocollin 2	Hs00245200_m1	2,1

DUSP1	dual specific phosphatase 1	Hs00610256_g1	1,0
DYRK1B	dual specific tyrosine-(Y)- phosphorylation regulated kinase 1B	Hs00245076_m1	1,0
EPHA2	EPH receptor A2	Hs00171656_m1	1,0
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	Hs00176538_m1	5,6
FLJ13236	Hypothetical protein FLJ13236	Hs00227689_m1	5,6
(EFHD1) FLJ13612	EF-hand domain family, member D1	Hs00368816_m1	5,3
FLJ14146	chromosome 1 open reading frame 115	Hs00226770_m1	3,8
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	Hs00157646_m1	2,5
GAS1	growth arrest-specific 1	Hs00266715_s1	0,6
GPR49 / LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	Hs00173664_m1	0,3
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	Hs00232618_m1	0,7
HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	Hs00606658_g1	1,4
CFI	I factor (complement)	Hs00173409_m1	35,9
IL18R1	interleukin 18 receptor 1	Hs00175381_m1	7,8
IRS2	insulin receptor substrate 2	Hs00275843_s1	0,6
ITGA6	intergrin, alpha 6	Hs00173952_m1	1,0
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	Hs00158272_m1	2,1
ITGB4BP		Hs00742156_m1	
ITGB4BP		Hs00794124_m1	
KIAA0152	KIAA0152	Hs00207082_m1	1,6
KIFAP3	kinesin-associated protein 3	Hs00183973_m1	1,6
LASP1	LIM and SH3 protein 1	Hs00196221_m1	1,7
LOC57228	hypothetical protein from clone 643	Hs00252748_s1	3,4
LOC57228		Hs00377888_m1	
MAN1A1	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1	Hs00195458_m1	3,0
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	Hs00176759_m1	2,3
MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase- activated protein kinase 3	Hs00177957_m1	0,7
MCP	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	Hs00611257_m1	1,6
MGC33190 / ATXN7L1	ataxin 7-like 1	Hs00381305_m1	43,3
MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	Hs00182064_m1	2,6
MPP1	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	Hs00609971_m1	1,9
MTM1	myotubularin 1	Hs00169680_m1	1,9
NEFL	Neurofilament, light polypeptide 68kDa	Hs00196245_m1	0,6
NELL2	NEL-like 2 (chicken) /// NEL-like 2 (chicken)	Hs00196254_m1	1,7
NID	nidogen 1	Hs00159600_m1	1,9
NK4 / IL32	interleukin 32	Hs00170403_m1	1,0
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	Hs00196287_m1	1,0
NPR2L / TUSC4	tumor suppressor candidate 4	Hs00198012_m1	1,0
NULL	nuclear transcription factor Y, gamma	Hs00417537_m1	1,0
NULL		Hs00746838_s1	
OATPX	solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	Hs00698884_m1	1,0

OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	Hs00213454_m1	4,3
OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3	Hs00248922_m1	2,1
PEX3	peroxisomal biogenesis factor 3	Hs00186267_m1	2,0
PKP2	plakophilin 2	Hs00428040_m1	3,0
PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	Hs00272698_m1	14,7
PRPH	peripherin	Hs00196608_m1	5,4
RBKS	ribokinase	Hs00223231_m1	8,7
SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	Hs00198833_m1	1,5
SDC4	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	Hs00161617_m1	1,8
SEC23A	Sec23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	Hs00197232_m1	2,4
SELENBP1	selenium binding protein 1 /// selenium binding protein 1	Hs00187625_m1	3,6
SELENBP1		Hs00259932_m1	
SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	Hs00193657_m1	4,3
SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	Hs00185826_m1	0,6
SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	Hs00167093_m1	1,0
TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	Hs00610617_m1	3,2
TM4SF5	transmembrane 4 L six family member 5	Hs00187639_m1	41,4
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	Hs00188755_m1	1,7
TRIM9	tripartite motif-containing 9	Hs00364838_m1	0,5
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	Hs00163365_m1	2,0
VIL1	villin 1	Hs00200229_m1	97,0
WT1	Wilms tumor 1	Hs00240913_m1	1,8

Real-time PCR				
24 Stunden fold change				
Gen Symbol	EtOH	5 ng / ml Doxy	10 ng / ml Doxy	HNF4 α Überexpression
HNF4A	1	0,9	2,0	8,6
ABCB1	1	1,6	2,2	3,5
ABCB1	1	1,4	2,4	3,8
ABCB4	1	1,4	3,5	6,5
ABCB4	1	1,7	3,6	5,0
ACADVL	1	1,4	1,4	2,3
ACOX1	1	1,1	1,4	2,4
ACOX1	1	1,2	1,3	2,4
ACY1	1	1,9	1,9	3,5
AGXT2L1	1	1,8	4,1	8,5
AKAP1	1	1,0	1,3	2,3
ALCAM	1	1,0	1,1	1,5
ALDH5A1	1	1,2	1,2	2,0
ALDH5A1	1	1,2	1,6	3,3
ATP7B	1	1,0	1,2	2,0
BIRC2	1	1,2	1,7	2,4
CCNH	1	1,1	1,3	1,9
CEBPB	1	1,0	0,9	0,6
CFLAR	1	1,1	1,3	1,9
CIDEB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CLN6	1	1,1	1,1	1,0
COBL	1	1,4	2,1	2,9

COBL	1	1,1	1,6	3,0
COL21A1	1	1,6	1,8	2,4
CRAT	1	1,3	1,8	4,7
CRAT	1	1,5	3,1	7,0
CSPG2	1	1,3	1,1	0,7
DBI	1	1,6	2,5	2,4
DDAH2	1	1,7	5,6	20,4
DSC2	1	0,9	1,0	2,0
DUSP1	1	0,9	0,8	0,9
DYRK1B	1	0,9	0,9	1,7
EPHA2	1	1,1	1,0	1,2
ERBB3	1	1,3	2,8	8,0
FLJ13236	1	1,9	5,6	11,5
(EFHD1) FLJ13612	1	1,3	1,8	5,1
FLJ14146	1	1,1	2,1	5,7
GAB1	1	1,2	1,7	2,8
GAS1	1	0,9	0,7	0,5
GPR49 / LGR5	1	1,5	1,0	0,3
HEY1	1	1,5	1,1	0,6
HLA-F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CFI	1	2,2	9,0	27,5
IL18R1	1	1,3	3,4	9,9
IRS2	1	1,2	0,9	0,7
ITGA6	1	1,0	1,0	1,2
ITGB4BP	1	1,9	1,9	2,1
ITGB4BP	1	1,2	1,2	1,6
ITGB4BP	1	1,1	1,5	2,1
KIAA0152	1	1,2	1,3	1,7
KIFAP3	1	1,3	1,2	1,6
LASP1	1	1,3	1,6	2,0
LOC57228	1	1,3	1,8	3,6
LOC57228	1	0,6	2,5	11,4
MAN1A1	1	1,4	2,3	4,3
MAP3K11	1	1,7	3,3	4,9
MAPKAPK3	1	1,2	1,0	0,8
MCP	1	1,0	1,2	2,0
MGC33190 / ATXN7L1	1	5,5	10,9	10,1
MGST2	1	1,0	1,2	2,0
MPP1	1	1,2	1,5	2,3
MTM1	1	1,4	1,5	2,1
NEFL	1	1,2	0,9	0,6
NELL2	1	1,2	1,3	1,9
NID	1	1,1	1,4	2,0
NK4 / IL32	1	1,3	2,6	9,1
NNMT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NPR2L / TUSC4	1	1,1	1,1	0,9
NULL	1	0,9	1,5	2,3
NULL	1	1,1	1,7	3,5
OATPX	1	1,1	2,2	6,6
OGG1	1	1,2	1,7	3,8
OSBPL3	1	1,4	1,9	2,3
PEX3	1	1,2	1,5	2,0
PKP2	1	1,7	1,8	3,0
PPP1R1A	1	2,8	6,2	15,4
PRPH	1	2,6	3,4	3,5
RBKS	1	1,6	4,3	12,7
SC4MOL	1	1,2	1,3	1,3
SDC4	1	1,4	1,5	2,9
SEC23A	1	1,8	2,6	2,6
SELENBP1	1	2,7	3,4	4,6
SELENBP1	1	1,1	1,8	4,3
SEPP1	1	1,9	3,6	6,8
SLC7A5	1	1,1	1,1	0,6
SPP1	1	1,6	0,9	0,5
TACC2	1	1,3	2,1	3,7
TM4SF5		427,5	2820,5	10436,8
TRAF4	1	1,1	1,3	2,0
TRIM9	1	1,0	0,9	0,5

UGDH	1	1,3	1,6	2,2
VIL1	1	106,9	651,7	705,9
WT1	1	1,7	1,7	2,1

Real-time PCR				
48 Stunden fold change				
Gen Symbol	EtOH	5 ng / ml Doxy	10 ng / ml Doxy	HNF4α Überexpression
HNF4A	1	1,0	2,2	7,8
ABCB1	1	1,2	2,5	4,9
ABCB1	1	1,2	2,5	5,1
ABCB4	1	1,2	3,7	7,1
ABCB4	1	1,2	3,5	6,2
ACADVL	1	1,3	1,4	2,3
ACOX1	1	1,2	2,4	3,2
ACOX1	1	1,2	1,4	2,8
ACY1	1	1,6	2,0	4,8
AGXT2L1	1	1,2	2,7	7,8
AKAP1	1	1,2	1,3	2,5
ALCAM	1	1,2	1,2	1,7
ALDH5A1	1	1,1	1,5	3,2
ALDH5A1	1	1,2	1,9	3,8
ATP7B	1	1,0	1,3	2,5
BIRC2	1	1,2	2,2	3,9
CCNH	1	0,9	1,2	2,2
CEBPB	1	1,2	0,9	0,6
CFLAR	1	1,1	1,5	2,5
CIDEB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CLN6	1	1,0	0,9	0,9
COBL	1	1,1	2,0	3,8
COBL	1	0,9	1,8	5,0
COL21A1	1	1,3	1,6	3,5
CRAT	1	3,5	4,9	9,8
CRAT	1	1,6	4,4	9,3
CSPG2	1	1,1	1,0	0,9
DBI	1	0,9	1,6	2,8
DDAH2	1	1,3	5,7	20,7
DSC2	1	1,1	1,1	1,7
DUSP1	1	1,2	0,9	0,9
DYRK1B	1	1,2	1,1	1,5
EPHA2	1	1,2	1,8	2,4
ERBB3	1	1,5	3,7	11,0
FLJ13236	1	1,5	6,7	13,7
(EFHD1) FLJ13612	1	1,3	2,5	7,4
FLJ14146	1	1,2	2,0	6,2
GAB1	1	1,0	0,0	2,2
GAS1	1	1,0	0,8	0,6
GPR49 / LGR5	1	0,9	0,6	0,2
HEY1	1	0,8	0,6	0,5
HLA-F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CFI	1	2,4	24,2	92,2
IL18R1	1	1,4	5,5	13,3
IRS2	1	1,3	0,8	0,6
ITGA6	1	1,2	1,2	1,5
ITGB4BP	1	1,1	1,5	2,6
ITGB4BP	1	1,2	1,1	1,3
ITGB4BP	1	1,1	1,3	1,9
KIAA0152	1	1,5	1,5	2,2
KIFAP3	1	1,2	1,3	1,8
LASP1	1	1,5	1,8	2,6
LOC57228	1	1,3	1,6	3,3
LOC57228	1	3,1	6,7	71,8
MAN1A1	1	1,5	2,7	5,0
MAP3K11	1	1,6	3,4	5,7
MAPKAPK3	1	1,1	1,1	1,0

MCP	1	1,1	1,4	2,1
MGC33190 / ATXN7L1	1	1,4	2,3	5,1
MGST2	1	1,3	1,6	3,0
MPP1	1	1,1	1,4	2,3
MTM1	1	1,1	1,5	2,6
NEFL	1	1,1	0,8	0,5
NELL2	1	1,3	1,3	2,3
NID	1	1,5	1,6	1,8
NK4 / IL32	1	1,3	4,2	13,7
NNMT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NPR2L / TUSC4	1	1,2	1,5	1,1
NULL	1	1,0	1,5	2,3
NULL	1	1,3	1,7	3,7
OATPX	1	1,3	2,7	10,3
OGG1	1	1,0	1,5	4,0
OSBPL3	1	0,9	1,5	2,4
PEX3	1	1,0	1,5	2,5
PKP2	1	1,1	1,8	3,6
PPP1R1A	1	1,9	6,9	24,9
PRPH	1	1,0	2,0	2,1
RBKS	1	1,0	3,0	10,8
SC4MOL	1	1,1	1,3	2,5
SDC4	1	1,5	2,0	3,5
SEC23A	1	1,1	2,1	3,3
SELENBP1	1	1,3	2,1	6,0
SELENBP1	1	1,2	2,6	6,7
SEPP1	1	1,8	5,1	8,9
SLC7A5	1	1,1	1,2	1,0
SPP1	1	0,4	0,7	0,1
TACC2	1	1,1	1,9	4,3
TM4SF5	n.d.	247,8	10924,9	57646,2
TRAF4	1	1,1	1,7	3,2
TRIM9	1	1,0	0,8	0,5
UGDH	1	1,1	1,6	2,7
VIL1	1	47,2	858,2	2607,9
WT1	1	1,2	1,8	5,2

Real-time PCR 4 Tage fold change				
Gen Symbol	EtOH	2,5 ng / ml Doxy	5 ng / ml Doxy	HNF4 α Überexpression
HNF4A	1	0,8	0,8	5,7
ABCB1	1	0,8	0,8	3,7
ABCB1	1	0,6	0,7	3,5
ABCB4	1	0,8	0,8	5,4
ABCB4	1	1,0	1,0	7,9
ACADVL	1	0,5	0,6	1,3
ACOX1	1	0,7	0,8	2,2
ACOX1	1	0,7	0,8	2,2
ACY1	1	0,7	0,5	1,7
AGXT2L1	1	0,4	0,5	4,6
AKAP1	1	0,8	0,8	2,0
ALCAM	1	0,7	0,7	1,5
ALDH5A1	1	0,5	0,4	1,8
ALDH5A1	1	0,8	0,9	3,3
ATP7B	1	0,8	0,8	2,1
BIRC2	1	0,8	0,7	2,9
CCNH	1	0,7	0,8	1,7
CEBPB	1	0,5	0,4	0,5
CFLAR	1	0,8	0,9	1,8
CIDEB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CLN6	1	0,7	0,7	0,7
COBL	1	0,7	0,7	2,9
COBL	1	0,8	0,8	4,1

COL21A1	1	0,7	0,7	2,3
CRAT	1	2,0	1,2	12,0
CRAT	1	0,7	0,9	6,7
CSPG2	1	0,8	0,9	0,7
DBI	1	0,6	0,7	2,2
DDAH2	1	0,8	0,8	15,7
DSC2	1	0,9	0,7	1,2
DUSP1	1	0,7	0,7	0,9
DYRK1B	1	0,7	0,6	1,2
EPHA2	1	0,9	0,8	1,9
ERBB3	1	0,6	0,9	8,8
FLJ13236	1	0,9	1,1	11,5
(EFHD1) FLJ13612	1	0,7	0,7	5,7
FLJ14146	1	0,8	0,7	4,7
GAB1	1	0,7	0,8	2,4
GAS1	1	0,8	0,8	0,5
GPR49 / LGR5	1	0,5	0,5	0,1
HEY1	1	0,8	0,7	0,6
HLA-F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CFI	1	0,6	1,3	58,0
IL18R1	1	0,7	0,7	11,3
IRS2	1	0,6	0,5	0,4
ITGA6	1	0,7	0,7	1,1
ITGB4BP	1	0,7	0,6	2,3
ITGB4BP	1	0,8	0,5	0,8
ITGB4BP	1	0,7	0,7	1,7
KIAA0152	1	0,6	0,5	1,3
KIFAP3	1	0,9	1,0	1,8
LASP1	1	0,8	0,7	1,6
LOC57228	1	0,7	0,7	2,6
LOC57228	1	2,2	0,3	24,6
MAN1A1	1	0,6	0,7	3,5
MAP3K11	1	1,0	0,9	5,6
MAPKAPK3	1	0,7	0,7	0,8
MCP	1	1,1	0,9	1,6
MGC33190 / ATXN7L1	1	0,7	0,7	4,7
MGST2	1	0,7	0,5	1,8
MPP1	1	0,8	0,8	1,7
MTM1	1	0,6	0,7	1,8
NEFL	1	0,8	0,8	0,4
NELL2	1	0,7	0,6	1,7
NID	1	1,1	1,1	1,8
NK4 / IL32	1	0,6	0,6	9,4
NNMT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NPR2L / TUSC4	1	0,9	0,7	0,9
NULL	1	0,5	0,6	2,1
NULL	1	0,5	0,6	1,9
OATPX	1	0,8	0,9	9,1
OGG1	1	0,7	0,7	3,7
OSBPL3	1	0,9	0,8	2,3
PEX3	1	0,7	0,8	2,2
PKP2	1	1,1	0,9	3,1
PPP1R1A	1	0,5	0,6	16,2
PRPH	1	0,7	0,5	0,9
RBKS	1	0,6	0,5	5,6
SC4MOL	1	1,2	1,0	1,8
SDC4	1	0,7	0,7	2,9
SEC23A	1	0,8	0,9	2,5
SELENBP1	1	0,5	0,5	4,5
SELENBP1	1	0,5	0,4	4,0
SEPP1	1	0,5	0,6	6,4
SLC7A5	1	0,5	0,6	1,0
SPP1	1	0,6	1,2	0,2
TACC2	1	0,6	0,6	3,2
TM4SF5	n.d.	41,3	43,0	30490,7
TRAF4	1	0,7	0,6	2,1
TRIM9	1	0,9	0,8	0,4
UGDH	1	0,6	0,7	1,8
VIL1	1	2,4	16,3	2009,0
WT1	1	0,5	0,6	3,4

Tabelle 18B: Daten der Zelllinie HNF4 α wt#4

Die Regulation der Gene in der Zelllinie HNF4 α wt#4 wurde nach 24 Stunden Inkubation mittels Real-time PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als fold change angegeben und die Gene sind alphabetisch geordnet. Die Kandidatengene, für die mehr als eine TaqMan-Sonde vorhanden war, sind durchnummeriert. Bei den Daten des Mikroarrays handelt es sich um den Mittelwert der beiden untersuchten HNF4 α -Zelllinien. n.d. = nicht determiniert

Gen Symbol	Gen Name	TaqMan Probe Set	Mikroarray
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	Hs00230853_m1	17,5
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Hs00184491_m1	3,7
ABCB1		Hs00184500_m1	
ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	Hs00240956_m1	4,9
ABCB4		Hs00251620_m1	
ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	Hs00817723_g1	2,3
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Hs00244513_m1	2,9
ACOX1		Hs00244515_m1	
ACY1	aminoacylase 1	Hs00167402_m1	5,5
AGXT2L1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1 /// alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	Hs00229818_m1	5,1
AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1	Hs00177481_m1	2,2
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	Hs00233455_m1	1,6
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)	Hs00153566_m1	2,4
ALDH5A1		Hs00542444_m1	
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide (Wilson disease)	Hs00163739_m1	2,6
BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	Hs00357350_m1	2,3
CCNH	cyclin H	Hs00236923_m1	2,1
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Hs00270923_s1	1,0
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Hs00153439_m1	2,5
CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b	Hs00205339_m1	20,7
CLN6	ceroid-lipofiscinosis, neuronal 6, late infantile, variant	Hs00608557_m1	1,0
COBL	cordon-bleu homolog (mouse)	Hs00323596_m1	4,7
COBL		Hs00391205_m1	
COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1 /// collagen, type XXI, alpha 1	Hs00229402_m1	3,4
CRAT	carnitine acetyltransferase	Hs00241350_m1	5,1
CRAT		Hs00241357_m1	
CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	Hs00171642_m1	0,5
DBI	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)	Hs00220950_m1	1,6

DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	Hs00203889_m1	11,2
DSC2	desmocollin 2	Hs00245200_m1	2,8
DUSP1	dual specific phosphatase 1	Hs00610256_g1	1,0
DYRK1B	dual specific tyrosine-(Y)- phosphorylation regulated kinase 1B	Hs00245076_m1	1,0
EPHA2	EPH receptor A2	Hs00171656_m1	1,0
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	Hs00176538_m1	4,7
FLJ13236	Hypothetical protein FLJ13236	Hs00227689_m1	7,2
(EFHD1) FLJ13612	EF-hand domain family, member D1	Hs00368816_m1	4,8
FLJ14146	chromosome 1 open reading frame 115	Hs00226770_m1	5,7
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	Hs00157646_m1	2,9
GAS1	growth arrest-specific 1	Hs00266715_s1	0,4
GPR49 / LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	Hs00173664_m1	0,3
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	Hs00232618_m1	0,5
HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	Hs00606658_g1	1,6
CFI	I factor (complement)	Hs00173409_m1	11,1
IL18R1	interleukin 18 receptor 1	Hs00175381_m1	8,6
IRS2	insulin receptor substrate 2	Hs00275843_s1	0,6
ITGA6	integrin, alpha 6	Hs00173952_m1	1,0
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	Hs00158272_m1	1,9
ITGB4BP		Hs00742156_m1	
ITGB4BP		Hs00794124_m1	
KIAA0152	KIAA0152	Hs00207082_m1	1,7
KIFAP3	kinesin-associated protein 3	Hs00183973_m1	2,0
LASP1	LIM and SH3 protein 1	Hs00196221_m1	1,8
LOC57228	hypothetical protein from clone 643	Hs00252748_s1	5,3
LOC57228		Hs00377888_m1	
MAN1A1	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1	Hs00195458_m1	2,9
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	Hs00176759_m1	2,7
MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase- activated protein kinase 3	Hs00177957_m1	0,6
MCP	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross- reactive antigen)	Hs00611257_m1	2,1
MGC33190 / ATXN7L1	ataxin 7-like 1	Hs00381305_m1	14,9
MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	Hs00182064_m1	2,5
MPP1	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	Hs00609971_m1	2,0
MTM1	myotubularin 1	Hs00169680_m1	2,7
NEFL	Neurofilament, light polypeptide 68kDa	Hs00196245_m1	0,4

NELL2	NEL-like 2 (chicken) /// NEL-like 2 (chicken)	Hs00196254_m1	1,9
NID	nidogen 1	Hs00159600_m1	2,2
NK4 / IL32	interleukin 32	Hs00170403_m1	1,0
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	Hs00196287_m1	1,0
NPR2L / TUSC4	tumor suppressor candidate 4	Hs00198012_m1	1,0
NULL / NFYC	nuclear transcription factor Y, gamma	Hs00417537_m1	1,0
NULL / NFYC		Hs00746838_s1	
OATPX	solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	Hs00698884_m1	1,0
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	Hs00213454_m1	4,0
OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3	Hs00248922_m1	2,2
PEX3	peroxisomal biogenesis factor 3	Hs00186267_m1	2,2
PKP2	plakophilin 2	Hs00428040_m1	2,6
PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	Hs00272698_m1	8,0
PRPH	peripherin	Hs00196608_m1	8,8
RBKS	ribokinase	Hs00223231_m1	6,2
SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	Hs00198833_m1	1,4
SDC4	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	Hs00161617_m1	2,4
SEC23A	Sec23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	Hs00197232_m1	2,5
SELENBP1	selenium binding protein 1 /// selenium binding protein 1	Hs00187625_m1	5,0
SELENBP1		Hs00259932_m1	
SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	Hs00193657_m1	4,0
SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	Hs00185826_m1	0,6
SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	Hs00167093_m1	1,0
TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	Hs00610617_m1	3,0
TM4SF5	transmembrane 4 L six family member 5	Hs00187639_m1	4,4
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	Hs00188755_m1	2,0
TRIM9	tripartite motif-containing 9	Hs00364838_m1	0,4
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	Hs00163365_m1	1,8
VIL1	villin 1	Hs00200229_m1	15,2
WT1	Wilms tumor 1	Hs00240913_m1	2,6

Real-time PCR					
24 Stunden					
Gen Symbol	EtOH	2 ng / ml Doxy	5 ng / ml Doxy	HNF4 α Überexpression	
HNF4A	1	2,3	6,3	6,5	
ABCB1	1	1,9	3,5	3,8	
ABCB1	1	2,1	3,7	3,7	
ABCB4	1	3,4	6,8	6,4	
ABCB4	1	3,4	6,4	6,1	
ACADVL	1	1,7	2,6	3,5	
ACOX1	1	1,9	3,0	3,1	
ACOX1	1	1,7	2,8	3,0	
ACY1	1	1,8	3,6	4,9	
AGXT2L1	1	3,6	6,7	7,1	
AKAP1	1	1,7	2,6	2,4	
ALCAM	1	1,5	2,2	1,9	
ALDH5A1	1	1,8	2,7	2,5	
ALDH5A1	1	1,9	3,3	3,3	
ATP7B	1	1,8	2,9	3,0	
BIRC2	1	1,8	2,9	2,5	
CCNH	1	1,7	2,4	2,3	
CEBPB	1	0,6	0,7	0,4	
CFLAR	1	1,8	2,9	2,7	
CIDEB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
CLN6	1	1,2	0,9	0,7	
COBL	1	1,9	3,0	3,4	
COBL	1	2,1	3,4	3,1	
COL21A1	1	1,6	3,4	3,8	
CRAT	1	3,2	7,4	7,6	
CRAT	1	3,3	7,1	8,0	
CSPG2	1	1,1	0,6	0,6	
DBI	1	2,4	2,0	2,0	
DDAH2	1	5,7	13,3	17,4	
DSC2	1	1,4	3,0	3,0	
DUSP1	1	0,9	1,0	0,9	
DYRK1B	1	1,1	1,8	1,4	
EPHA2	1	1,8	2,1	2,2	
ERBB3	1	3,1	7,0	7,9	
FLJ13236	1	9,8	14,0	13,9	
(EFHD1) FLJ13612	1	2,9	6,4	6,2	
FLJ14146	1	2,7	5,6	5,2	
GAB1	1	1,6	3,0	2,6	
GAS1	1	0,8	0,6	0,4	
GPR49 / LGR5	1	0,7	0,4	0,2	
HEY1	1	0,8	0,6	0,5	
HLA-F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
CFI	1	18,4	31,2	37,7	
IL18R1	1	5,8	10,1	10,0	
IRS2	1	0,7	0,6	0,5	
ITGA6	1	1,4	1,6	1,6	
ITGB4BP	1	1,7	1,7	1,7	
ITGB4BP	1	1,5	1,3	1,2	
ITGB4BP	1	2,0	1,9	2,0	
KIAA0152	1	1,6	1,7	1,4	
KIFAP3	1	1,5	1,9	1,9	
LASP1	1	2,0	2,3	2,2	
LOC57228	1	2,5	4,7	5,1	
LOC57228	1	7,8	63,0	60,8	
MAN1A1	1	2,7	4,9	4,7	
MAP3K11	1	3,1	5,7	5,1	
MAPKAPK3	1	1,3	0,8	0,7	
MCP	1	1,8	2,4	2,6	
MGC33190 / ATXN7L1	1	5,5	10,9	10,1	
MGST2	1	2,1	2,7	2,3	
MPP1	1	1,5	2,3	2,3	
MTM1	1	1,9	2,8	2,9	
NEFL	1	0,8	0,6	0,4	
NELL2	1	1,4	1,8	1,9	
NID	1	1,8	2,7	2,5	
NK4 / IL32	1	5,3	11,5	14,1	
NNMT	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

NPR2L / TUSC4	1	1,2	1,2	0,9
NULL / NFYC	1	1,3	2,2	2,2
NULL / NFYC	1	3,1	4,4	5,6
OATPX	1	3,9	10,1	11,1
OGG1	1	3,0	3,4	3,5
OSBPL3	1	1,8	2,3	2,2
PEX3	1	2,1	2,1	2,2
PKP2	1	1,7	2,8	3,3
PPP1R1A	1	6,3	12,0	15,3
PRPH	1	3,6	0,4	1,5
RBKS	1	7,5	16,3	16,8
SC4MOL	1	1,7	1,7	1,6
SDC4	1	2,4	3,0	3,4
SEC23A	1	1,8	2,2	2,2
SELENBP1	1	2,4	4,0	5,1
SELENBP1	1	2,5	5,0	4,8
SEPP1	1	3,8	6,4	6,2
SLC7A5	1	0,8	0,6	0,4
SPP1	1	1,4	0,3	0,4
TACC2	1	2,3	3,8	3,8
TM4SF5	1	167,4	217,5	304,0
TRAF4	1	2,0	2,7	2,7
TRIM9	1	0,9	0,6	0,4
UGDH	1	1,9	2,6	2,3
VIL1	1	94,0	99,4	130,0
WT1	1	2,3	3,5	3,2

Real-time PCR					
48h					
Gen Symbol	EtOH	2 ng / ml Doxy	5 ng / ml Doxy	HNF4 α Überexpression	
HNF4A	1	1,5	5,8	7,0	
ABCB1	1	1,4	3,7	4,0	
ABCB1	1	1,7	3,9	4,3	
ABCB4	1	1,9	5,0	5,4	
ABCB4	1	1,8	4,3	5,4	
ACADVL	1	1,1	2,5	2,6	
ACOX1	1	1,4	2,8	3,0	
ACOX1	1	1,1	2,3	2,8	
ACY1	1	1,0	2,6	2,7	
AGXT2L1	1	2,1	5,5	6,7	
AKAP1	1	1,2	2,1	2,5	
ALCAM	1	1,1	1,6	1,7	
ALDH5A1	1	1,5	2,4	2,3	
ALDH5A1	1	1,5	2,7	3,2	
ATP7B	1	1,3	2,3	2,7	
BIRC2	1	1,6	2,7	3,0	
CCNH	1	2,5	4,0	4,5	
CEBPB	1	0,9	0,5	0,3	
CFLAR	1	1,1	2,6	3,2	
CIDEB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
CLN6	1	0,9	0,7	0,7	
COBL	1	1,1	3,1	3,4	
COBL	1	1,9	4,5	5,7	
COL21A1	1	1,3	3,8	3,9	
CRAT	1	3,7	9,0	7,7	
CRAT	1	4,1	9,8	9,2	
CSPG2	1	0,9	0,5	0,5	
DBI	1	1,4	1,8	2,7	
DDAH2	1	3,2	12,8	17,4	
DSC2	1	1,0	2,2	2,4	
DUSP1	1	0,7	0,9	0,8	
DYRK1B	1	0,9	1,2	1,3	
EPHA2	1	1,3	2,6	3,0	
ERBB3	1	2,5	6,7	7,3	
FLJ13236	1	3,6	9,7	11,0	
(EFHD1) FLJ13612	1	2,3	5,3	6,3	

FLJ14146	1	1,9	6,0	6,9
GAB1	1	1,1	2,4	2,9
GAS1	1	0,7	0,4	0,4
GPR49 / LGR5	1	0,5	0,3	0,3
HEY1	1	0,5	0,5	0,6
HLA-F	n.d	n.d	n.d	n.d
CFI	1	49,0	95,4	86,2
IL18R1	1	5,0	12,1	13,1
IRS2	1	0,5	0,5	0,4
ITGA6	1	1,3	1,7	1,7
ITGB4BP	1	1,4	2,1	2,3
ITGB4BP	1	0,8	0,9	1,0
ITGB4BP	1	1,4	1,7	1,8
KIAA0152	1	1,5	1,4	1,4
KIFAP3	1	1,2	1,9	2,2
LASP1	1	1,3	2,1	2,3
LOC57228	1	1,5	4,2	4,4
LOC57228	1	5,4	28,5	49,9
MAN1A1	1	2,2	4,0	4,0
MAP3K11	1	2,5	5,2	6,3
MAPKAPK3	1	1,0	0,7	0,7
MCP	1	1,2	1,8	2,1
MGC33190 / ATXN7L1	1	2,6	6,0	8,8
MGST2	1	1,6	2,8	2,9
MPP1	1	1,2	2,1	2,4
MTM1	1	1,2	2,7	3,0
NEFL	1	0,7	0,5	0,5
NELL2	1	1,1	1,8	2,1
NID	1	1,7	2,8	2,6
NK4 / IL32	1	3,9	15,2	12,9
NNMT	n.d	n.d	n.d	n.d
NPR2L / TUSC4	1	0,9	0,8	0,8
NULL / NFYC	1	1,4	1,7	1,5
NULL / NFYC	1	1,1	5,0	6,4
OATPX	1	3,4	11,1	15,1
OGG1	1	1,6	2,8	3,1
OSBPL3	1	1,1	1,8	2,1
PEX3	1	1,9	2,5	3,1
PKP2	1	1,3	2,7	3,5
PPP1R1A	1	3,0	12,7	15,5
PRPH		1,8	2,5	4,2
RBKS	1	4,1	11,7	16,9
SC4MOL	1	1,5	1,8	2,2
SDC4	1	1,2	2,6	2,7
SEC23A	1	1,9	2,9	3,4
SELENBP1	1	2,0	4,6	5,9
SELENBP1	1	1,9	4,3	5,5
SEPP1	1	4,4	8,6	8,0
SLC7A5	1	1,2	0,6	0,4
SPP1	1	0,7	0,4	0,5
TACC2	1	1,0	2,4	2,5
TM4SF5	1	270,3	730,0	840,2
TRAF4		1,3	2,5	3,1
TRIM9		0,7	0,4	0,4
UGDH	1	1,5	1,7	1,9
VIL1	1	97,4	251,9	217,8
WT1	1	1,4	3,3	4,2

Real-time PCR					
4 Tage					
Gen Symbol	EtOH	2,5 ng / ml Doxy	5 ng / ml Doxy	HNF4 α Überexpression	
HNF4A	1	2,6	6,6	8,8	
ABCB1	1	2,8	4,4	5,3	
ABCB1	1	3,4	5,6	6,5	
ABCB4	1	3,2	5,7	7,0	
ABCB4	1	3,2	5,1	5,6	
ACADVL	1	2,3	4,3	5,3	
ACOX1	1	1,3	2,3	3,7	
ACOX1	1	1,6	2,9	3,7	
ACY1	1	2,4	5,7	8,6	
AGXT2L1	1	2,1	5,9	7,4	
AKAP1	1	1,4	2,5	2,9	
ALCAM	1	1,3	1,7	2,0	
ALDH5A1	1	2,6	3,9	5,0	
ALDH5A1	1	2,6	4,4	5,2	
ATP7B	1	1,5	2,7	3,1	
BIRC2	1	2,3	3,6	3,8	
CCNH	1	1,5	2,4	2,9	
CEBPB	1	0,6	0,9	0,9	
CFLAR	1	2,0	3,8	3,9	
CIDEB	n.d	n.d	n.d	n.d	
CLN6	1	0,6	0,7	0,8	
COBL	1	2,6	4,1	4,7	
COBL	1	3,2	6,0	7,4	
COL21A1	1	1,8	3,6	4,6	
CRAT	1	4,5	8,6	6,6	
CRAT	1	4,9	10,2	11,1	
CSPG2	1	0,8	0,7	0,6	
DBI	1	1,5	2,4	3,5	
DDAH2	1	5,9	29,2	32,4	
DSC2	1	1,1	1,9	2,5	
DUSP1	1	0,9	1,2	1,3	
DYRK1B	1	1,5	2,2	2,2	
EPHA2	1	1,6	4,2	4,9	
ERBB3	1	5,0	11,1	12,4	
FLJ13236	1	9,9	17,1	22,3	
(EFHD1) FLJ13612	1	2,7	5,8	7,0	
FLJ14146	1	3,4	9,3	11,0	
GAB1	1	1,5	2,1	2,5	
GAS1	1	0,7	0,6	0,7	
GPR49 / LGR5	1	0,4	0,2	0,1	
HEY1	1	0,6	0,6	0,7	
HLA-F	n.d	n.d	n.d	n.d	
CFI	1	40,4	93,6	106,9	
IL18R1	1	6,8	14,3	17,2	
IRS2	1	0,6	0,6	0,6	
ITGA6	1	1,0	1,6	1,9	
ITGB4BP	1	1,6	3,4	3,9	
ITGB4BP	1	1,0	1,6	1,5	
ITGB4BP	1	1,5	3,2	3,1	
KIAA0152	1	1,0	1,6	1,6	
KIFAP3	1	1,6	2,3	2,9	
LASP1	1	1,2	2,6	2,9	
LOC57228	1	1,9	3,6	4,4	
LOC57228	1	2,7	12,8	26,1	
MAN1A1	1	2,8	4,6	5,3	
MAP3K11	1	3,6	7,5	8,0	
MAPKAPK3	1	0,8	0,9	1,0	
MCP	1	1,2	2,0	2,4	
MGC33190 / ATXN7L1	1	4,1	8,3	8,4	
MGST2	1	1,7	3,7	4,3	
MPP1	1	1,1	1,9	2,5	
MTM1	1	2,0	3,2	3,7	
NEFL	1	0,7	0,5	0,5	
NELL2	1	1,8	3,3	3,5	
NID	1	3,0	2,8	2,7	
NK4 / IL32	1	7,5	21,2	24,6	
NNMT	n.d	n.d	n.d	n.d	
NPR2L / TUSC4	1	0,8	1,0	1,2	
NULL / NFYC	1	1,4	2,6	3,1	
NULL / NFYC	1	1,9	8,3	11,1	
OATPX	1	5,9	17,7	22,0	
OGG1	1	1,9	4,1	5,3	
OSBPL3	1	1,8	2,5	2,6	

PEX3	1	1,9	3,8	4,1
PKP2	1	2,3	3,5	4,8
PPP1R1A	1	4,8	14,3	18,3
PRPH	1	1,1	1,7	1,2
RBKS	1	3,0	13,3	20,7
SC4MOL	1	1,9	2,6	2,7
SDC4	1	2,1	4,3	4,9
SEC23A	1	1,7	2,9	3,5
SELENBP1	1	2,9	7,4	7,7
SELENBP1	1	2,2	6,0	7,7
SEPP1	1	6,1	10,8	13,4
SLC7A5	1	0,6	0,8	0,9
SPP1	1	0,3	0,1	0,3
TACC2	1	1,6	3,2	3,8
TM4SF5	1	151,0	584,7	703,4
TRAF4	1	1,9	4,3	5,2
TRIM9	1	0,7	0,5	0,5
UGDH	1	1,3	2,1	2,6
VIL1	1	142,5	312,9	358,1
WT1	1	2,1	3,9	5,0

3 Daten des esiRNA-Screenings

Tabelle 19: Dreifachbestimmung der esiRNA-Daten Von der Zelllinie HNF4 α wt#4 wurden 2×10^3 Zellen einer 96-well Zellkulturschale ausgesät und mit den entsprechenden esiRNA transfiziert. Die Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion entweder mit Ethanol behandelt oder mit 10 ng / ml Doxycyclin induziert. Nach vier Tagen wurde die Zellproliferationsrate mittels des MTS-Tests ermittelt. Die esiRNA-Daten sind Werte von drei unabhängigen Transfektions-Assays und beruhen auf einer Dreifachbestimmung. Bei den reprimierten Genen ist die Proliferationsrate in % standardisiert auf die tomato-esiRNA angegeben. Als ausreichende wurde eine 10%ige Proliferationsminderung in mindestens einem Assay gewertet. Bei den induzierten Genen ist der Neutralisationseffekt in % angegeben, standardisiert auf die tomato-esiRNA und normiert auf den Neutralisationseffekt von der HNF4 α -esiRNA. Als ausreichend wurde eine 60%ige Neutralisation in mindestens einem Transfektions-Assay gewertet.

Gen Name	Induktion	data 1	data 2	data 3	Proliferationsrate	
ADAMTS1	-	0,243	0,251	0,247	11%	
ADAMTS1	-	0,578	0,593	0,550	66%	
ADAMTS1	-	0,589	0,591	0,592	96%	
BHLHB3	-	0,648	0,645	0,624	88%	
BHLHB3	-	0,825	0,790	0,783	105%	
BHLHB3	-	0,652	0,724	0,695	89%	
CNTN1	-	0,677	0,677	0,655	101%	
CNTN1	-	0,695	0,715	0,667	105%	
COL14A1	-	0,655	0,644	0,639	96%	
COL14A1	-	0,639	0,631	0,673	96%	
CSPG2	-	0,641	0,692	0,673	94%	
CSPG2	-	0,714	0,747	0,744	93%	
CSPG2	-	0,732	0,767	0,776	110%	
FBN1	-	0,729	0,746	0,727	108%	
FBN1	-	0,768	0,775	0,759	108%	
HEY1	-	0,809	0,838	0,852	110%	
HEY1	-	0,745	0,765	0,713	109%	
HOXA1	-	0,745	0,711	0,695	104%	
HOXA1	-	0,810	0,818	0,841	119%	
HOXB6	-	0,761	0,743	0,705	108%	
HOXB6	-	0,736	0,776	0,763	106%	
MCAM	-	0,736	0,764	0,761	101%	
MCAM	-	0,661	0,672	0,685	101%	
NOTCH2	-	0,677	0,725	0,688	87%	
NOTCH2	-	0,573	0,600	0,591	78%	
NOTCH2	-	0,781	0,789	0,671	96%	
SFRP1	-	0,727	0,768	0,779	101%	
SFRP1	-	0,668	0,728	0,693	106%	
Gen Name	Induktion	data 1	data 2	data 3	Proliferationsrate	Rescueeffekt
ABCB1	-	0,775	0,756	0,765	100%	
ABCB1	-	0,713	0,750	0,770	90%	
ABCB1	+	0,519	0,505	0,461	54%	13%
ABCB1	+	0,499	0,530	0,506	52%	-20%
ACY1	-	0,700	0,692	0,743	91%	
ACY1	-	0,720	0,691	0,690	82%	
ACY1	+	0,448	0,450	0,442	46%	-9%
ACY1	+	0,455	0,468	0,480	45%	-85%
AGXT2L1	-	0,415	0,387	0,453	41%	
AGXT2L1	-	0,510	0,460	0,442	45%	
AGXT2L1	+	0,302	0,310	0,328	23%	-69%
AGXT2L1	+	0,361	0,367	0,359	28%	-240%
AKAP1	-	0,518	0,490	0,472	54%	

AKAP1	-	0,526	0,515	0,540	54%	
AKAP1	+	0,405	0,378	0,361	34%	-39%
AKAP1	+	0,398	0,384	0,391	32%	-198%
ALDH6A1	-	0,651	0,656	0,659	97%	
ALDH6A1	-	0,791	0,808	0,787	113%	
ALDH6A1	-	0,771	0,778	0,781	101%	
ALDH6A1	+	0,528	0,504	0,510	67%	75%
ALDH6A1	+	0,618	0,612	0,634	79%	202%
ALDH6A1	+	0,575	0,542	0,536	62%	41%
ANK3	-	0,722	0,693	0,688	106%	
ANK3	-	0,737	0,784	0,728	99%	
ANK3	-	0,475	0,481	0,476	106%	
ANK3	+	0,575	0,583	0,590	70%	87%
ANK3	+	0,545	0,562	0,545	74%	97%
ANK3	+	0,520	0,487	0,504	58%	25%
ATP7B	-	0,832	0,824	0,779	108%	
ATP7B	-	0,719	0,735	0,721	86%	
ATP7B	+	0,506	0,493	0,472	53%	11%
ATP7B	+	0,488	0,500	0,514	50%	-36%
BPHL	-	0,640	0,634	0,665	3%	107%
BPHL	-	0,772	0,752	0,808	107%	
BPHL	-	0,716	0,708	0,738	111%	
BPHL	+	0,639	0,596	0,546	72%	100%
BPHL	+	0,575	0,578	0,572	79%	118%
BPHL	+	0,533	0,560	0,651	93%	169%
CCNH	-	0,803	0,812	0,786	106%	
CCNH	-	0,770	0,745	0,761	92%	
CCNH	-	0,624	0,620	0,662	5%	106%
CCNH	+	0,582	0,578	0,573	68%	50%
CCNH	+	0,580	0,564	0,590	63%	78%
CCNH	+	0,440	0,418	0,468	63%	19%
CDKN1A	-	0,734	0,769	0,750	111%	
CDKN1A	-	0,804	0,796	0,805	106%	
CDKN1A	-	0,511	0,534	0,532	98%	
CDKN1A	+	0,559	0,568	0,551	67%	126%
CDKN1A	+	0,552	0,588	0,579	66%	61%
CDKN1A	+	0,484	0,570	0,574	69%	107%
COL21A1	-	0,790	0,762	0,719	97%	
COL21A1	-	0,700	0,706	0,655	80%	
COL21A1	+	0,545	0,525	0,518	58%	12%
COL21A1	+	0,475	0,474	0,510	48%	-57%
DSC2	-	0,716	0,697	0,688	101%	
DSC2	-	0,789	0,773	0,770	113%	
DSC2	-	0,579	0,582	0,627	6%	96%
DSC2	+	0,560	0,589	0,586	66%	65%
DSC2	+	0,556	0,553	0,548	69%	78%
DSC2	+	0,560	0,589	0,586	77%	89%
EFHD1	-	0,890	0,895	0,891	132%	
EFHD1	-	0,735	0,749	0,769	108%	
EFHD1	-	0,568	0,644	0,583	9%	98%
EFHD1	+	0,690	0,634	0,620	86%	304%
EFHD1	+	0,598	0,575	0,553	74%	106%
EFHD1	+	0,460	0,463	0,469	68%	62%
ELF1	-	0,799	0,792	0,765	108%	
ELF1	-	0,730	0,764	0,706	113%	
ELF1	-	0,499	0,484	0,502	90%	
ELF1	+	0,555	0,550	0,576	66%	61%

ELF1	+	0,517	0,507	0,502	65%	61%
ELF1	+	0,413	0,401	0,438	70%	68%
EPHX2	-	0,578	0,608	0,601	101%	
EPHX2	-	0,724	0,760	0,753	101%	
EPHX2	-	0,662	0,725	0,714	106%	
EPHX2	+	0,580	0,596	0,584	71%	92%
EPHX2	+	0,548	0,553	0,566	75%	101%
EPHX2	+	0,468	0,485	0,477	71%	90%
FLJ14146	-	0,861	0,799	0,816	119%	
FLJ14146	-	0,777	0,804	0,799	116%	
Fij14146	-	0,642	0,635	0,621	2%	105%
FLJ14146	+	0,558	0,552	0,467	69%	160%
FLJ14146	+	0,588	0,604	0,602	78%	134%
Fij14146	+	0,438	0,437	0,455	64%	28%
GAB1	-	0,793	0,763	0,779	101%	
GAB1	-	0,795	0,812	0,780	117%	
GAB1	-	0,702	0,667	0,702	94%	
GAB1	+	0,506	0,511	0,496	60%	81%
GAB1	+	0,632	0,622	0,605	83%	160%
GAB1	+	0,449	0,450	0,464	66%	41%
GCHFR	-	0,650	0,637	0,642	96%	
GCHFR	-	0,703	0,725	0,694	108%	
GCHFR	+	0,441	0,481	0,447	57%	24%
GCHFR	+	0,522	0,496	0,469	63%	-42%
HPGD	-	0,706	0,744	0,739	107%	
HPGD	-	0,674	0,647	0,700	90%	
HPGD	-	0,733	0,773	0,743	96%	
HPGD	+	0,546	0,546	0,555	61%	39%
HPGD	+	0,569	0,534	0,547	71%	51%
HPGD	+	0,492	0,500	0,495	55%	48%
ICAM3	-	0,768	0,780	0,788	117%	
ICAM3	-	0,737	0,691	0,750	100%	
ICAM3	-	0,669	0,634	0,653	3%	108%
ICAM3	+	0,606	0,597	0,569	79%	86%
ICAM3	+	0,539	0,520	0,533	62%	91%
ICAM3	+	0,380	0,420	0,471	59%	0%
IF	-	0,347	0,329	0,382	27%	
IF	-	0,483	0,449	0,467	53%	
IF	-	0,695	0,750	0,749	97%	
IF	+	0,317	0,334	0,339	23%	
IF	+	0,393	0,403	0,400	40%	-83%
IF	+	0,571	0,590	0,535	66%	53%
ITGB4BP	-	0,564	0,573	0,578	65%	
ITGB4BP	-	0,578	0,572	0,564	72%	
ITGB4BP	-	0,786	0,809	0,799	110%	
ITGB4BP	+	0,503	0,508	0,483	53%	
ITGB4BP	+	0,476	0,480	0,452	53%	27%
ITGB4BP	+	0,523	0,533	0,549	60%	28%
JUP	-	0,776	0,767	0,716	111%	
JUP	-	0,749	0,727	0,714	101%	
JUP	+	0,502	0,514	0,544	65%	25%
JUP	+	0,475	0,497	0,497	54%	41%
LRP2	-	0,658	0,726	0,730	102%	
LRP2	-	0,683	0,679	0,715	93%	
LRP2	+	0,549	0,533	0,558	70%	48%
LRP2	+	0,510	0,508	0,489	56%	56%
MAP3K11	-	0,778	0,751	0,753	98%	

MAP3K11	-	0,805	0,824	0,821	113%	
MAP3K11	-	0,483	0,489	0,476	101%	
MAP3K11	+	0,481	0,475	0,464	54%	33%
MAP3K11	+	0,590	0,595	0,597	71%	76%
MAP3K11	+	0,367	0,368	0,455	66%	55%
MME	-	0,653	0,681	0,673	100%	
MME	-	0,661	0,675	0,690	86%	
MME	-	0,592	0,592	0,709	79%	
MME	+	0,510	0,518	0,540	68%	89%
MME	+	0,554	0,549	0,580	65%	19%
MME	+	0,531	0,535	0,600	66%	87%
MPP1	-	0,692	0,615	0,720	90%	
MPP1	-	0,678	0,718	0,718	91%	
MPP1	+	0,485	0,497	0,508	54%	6%
MPP1	+	0,544	0,551	0,552	64%	16%
MTM1	-	0,738	0,744	0,734	96%	
MTM1	-	0,764	0,766	0,746	100%	
MTM1	+	0,486	0,480	0,467	50%	-22%
MTM1	+	0,529	0,541	0,548	62%	6%
NELL2	-	0,769	0,806	0,799	108%	
NELL2	-	0,718	0,730	0,742	113%	
NELL2	-	0,762	0,755	0,753	1%	97%
NELL2	+	0,599	0,612	0,592	73%	60%
NELL2	+	0,540	0,534	0,527	71%	106%
NELL2	+	0,488	0,479	0,497	73%	69%
NINJ1	-	0,793	0,786	0,799	108%	
NINJ1	-	0,728	0,687	0,694	107%	
NINJ1	+	0,482	0,487	0,495	61%	35%
NINJ1	+	0,539	0,561	0,553	64%	9%
NK4	-	0,752	0,781	0,751	100%	
NK4	-	0,802	0,767	0,779	105%	
NK4	-	0,674	0,678	0,686	87%	
NK4	+	0,507	0,476	0,485	52%	-5%
NK4	+	0,606	0,573	0,579	70%	57%
NK4	+	0,526	0,505	0,516	57%	12%
NQO2	-	0,704	0,767	0,787	100%	
NQO2	-	0,664	0,664	0,684	100%	
NQO2	+	0,593	0,609	0,596	72%	58%
NQO2	+	0,494	0,498	0,495	63%	47%
OGG1	-	0,707	0,752	0,752	95%	
OGG1	-	0,742	0,749	0,755	99%	
OGG1	+	0,520	0,507	0,503	56%	25%
OGG1	+	0,574	0,568	0,576	68%	42%
PKP2	-	0,760	0,790	0,549	102%	
PKP2	-	0,773	0,759	0,758	101%	
PKP2	+	0,494	0,530	0,507	56%	25%
PKP2	+	0,529	0,547	0,532	61%	2%
PPP1R1A	-	0,748	0,740	0,717	95%	
PPP1R1A	-	0,717	0,731	0,724	94%	
PPP1R1A	-	0,805	0,814	0,800	106%	
PPP1R1A	+	0,530	0,527	0,524	59%	50%
PPP1R1A	+	0,581	0,570	0,584	69%	49%
PPP1R1A	+	0,604	0,632	0,621	74%	103%
PROS1	-	0,808	0,827	0,819	112%	
PROS1	-	0,754	0,772	0,730	118%	
PROS1	-	0,535	0,568	0,620	96%	
PROS1	+	0,631	0,638	0,642	79%	96%

PROS1	+	0,526	0,512	0,521	68%	84%
PROS1	+	0,475	0,502	0,488	73%	71%
RBKS	-	0,751	0,749	0,769	103%	
RBKS	-	0,738	0,759	0,725	115%	
RBKS	-	0,711	0,756	0,719	97%	
RBKS	+	0,492	0,520	0,511	56%	-2%
RBKS	+	0,499	0,500	0,513	64%	57%
RBKS	+	0,503	0,477	0,476	51%	-12%
SEPP1	-	0,743	0,731	0,705	94%	
SEPP1	-	0,780	0,755	0,742	101%	
SEPP1	-	0,667	0,661	0,703	87%	
SEPP1	+	0,541	0,546	0,539	62%	71%
SEPP1	+	0,574	0,599	0,580	70%	55%
SEPP1	+	0,526	0,580	0,604	69%	105%
SMARCE1	-	0,654	0,672	0,687	101%	
SMARCE1	-	0,622	0,623	0,672	94%	
SMARCE1	-	0,729	0,734	0,732	97%	
SMARCE1	+	0,526	0,536	0,508	69%	-19%
SMARCE1	+	0,460	0,482	0,492	61%	80%
SMARCE1	+	0,573	0,587	0,590	69%	67%
TGFA	-	0,648	0,636	0,629	95%	
TGFA	-	0,683	0,692	0,689	104%	
TGFA	-	0,709	0,718	0,711	94%	
TGFA	+	0,500	0,474	0,500	64%	115%
TGFA	+	0,548	0,549	0,554	75%	4%
TGFA	+	0,560	0,609	0,570	69%	64%
THEM2	-	0,744	0,757	0,732	101%	
THEM2	-	0,662	0,678	0,658	99%	
THEM2	-	0,607	0,599	0,570	72%	
THEM2	+	0,557	0,542	0,536	63%	43%
THEM2	+	0,533	0,538	0,504	69%	75%
THEM2	+	0,564	0,580	0,561	68%	103%
TM4SF5	-	0,640	0,694	0,690	102%	
TM4SF5	-	0,765	0,763	0,773	121%	
TM4SF5	+	0,445	0,451	0,445	55%	0%
TM4SF5	+	0,584	0,576	0,557	80%	23%
UGDH	-	0,634	0,627	0,618	92%	
UGDH	-	0,779	0,749	0,716	117%	
UGDH	+	0,423	0,413	0,432	50%	-63%
UGDH	+	0,500	0,508	0,526	67%	-29%
WT1	-	0,645	0,685	0,655	98%	
WT1	-	0,529	0,581	0,580	93%	
WT1	-	0,547	0,524	0,552	90%	
WT1	+	0,493	0,511	0,500	64%	55%
WT1	+	0,500	0,520	0,541	84%	213%
WT1	+	0,466	0,478	0,459	72%	121%

4 HNF4 α -regulierte Gene, die im NZK dereguliert sind

Tabelle 20: 104 HNF4 α -regulierte Gene sind im NZK dereguliert Die Daten für das NZK stammen aus der Lenburg et al. Studie (Lenburg et al., 2003). Die Microarray-Werte für die Induktion in den HEK293-Zellen sind die Mittelwerte der zwei Zelllinien HNF4 α wt#1 und wt#4.

Proben ID im Mikroarray	Gen Symbol	fold change		Gen Name
		NZK	Microarray	
208429_x_at	HNF4alpha	0,04	15,16	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
Gene in NZK reprimiert und induziert im Microarray				
221588_x_at	---	0,07	1,87	---
239148_at	---	0,28	2,00	Transcribed locus, weakly similar to XP_521350.1 PREDICTED: similar to UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B isoform 2 [Pan troglodytes]
236586_at	---	0,23	2,33	Transcribed locus, moderately similar to XP_521389.1 PREDICTED: similar to UTY [Pan troglodytes]
209459_s_at	ABAT	0,07	1,90	4-aminobutyrate aminotransferase
209994_s_at	ABCB1 /// ABCB4	0,32	3,63	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 /// ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
205412_at	ACAT1	0,23	1,56	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)
207071_s_at	ACO1	0,27	1,47	aconitase 1, soluble
202740_at	ACY1	0,06	3,94	aminoacylase 1
221008_s_at	AGXT2L1	0,24	4,45	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1 /// alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1
201425_at	ALDH2	0,29	1,64	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
203608_at	ALDH5A1	0,24	2,58	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)
204290_s_at /221589_s_at/2 2159_s_at	ALDH6A1	0,11	1,85	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1
206385_s_at	ANK3	0,26	1,72	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
230238_at	ANKRD43	0,29	2,78	ankyrin repeat domain 43
211712_s_at	ANXA9	0,16	2,84	annexin A9 /// annexin A9
203381_s_at/20 3382_s_at/2128 84_x_at	APOE	0,15	2,84	apolipoprotein E
229526_at	AQP11	0,08	6,87	aquaporin 11
207076_s_at	ASS	0,09	2,12	argininosuccinate synthetase
209309_at	AZGP1	0,06	3,01	alpha-2-glycoprotein 1, zinc
205750_at	BPHL	0,17	2,67	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)
218546_at	C1orf115	0,32	3,62	chromosome 1 open reading frame 115
60474_at	C20orf42	0,21	1,95	chromosome 20 open reading frame 42
204238_s_at	C6orf108	0,25	1,30	chromosome 6 open reading frame 108
201432_at/ 211922_s_at	CAT	0,25	1,32	catalase
213317_at	CLIC5	0,08	4,64	Chloride intracellular channel 5
213050_at	COBL	0,22	3,45	cordon-bleu homolog (mouse)

208096_s_at	COL21A1	7,29	2,59	collagen, type XXI, alpha 1 /// collagen, type XXI, alpha 1
218285_s_at/23 5155_at	DHRS6	0,27	2,15	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 6
204720_s_at	DNAJC6	0,21	1,31	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6
208370_s_at	DSCR1	0,27	1,40	Down syndrome critical region gene 1
209343_at	EFHD1	0,23	5,05	EF-hand domain family, member D1
205222_at	EHHADH	0,26	1,84	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase
209368_at	EPHX2	0,11	1,77	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
224280_s_at	FAM54B	0,29	1,58	family with sequence similarity 54, member B
219525_at	FLJ10847	0,33	1,75	hypothetical protein FLJ10847
218035_s_at	FLJ20273	0,33	1,47	RNA-binding protein
218272_at	FLJ20699	0,29	3,04	hypothetical protein FLJ20699
234974_at	GALM	0,27	2,29	Galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)
204867_at	GCHFR	0,31	3,23	GTP cyclohydrolase I feedback regulator
204836_at	GLDC	0,10	2,05	glycine dehydrogenase (decarboxylating; glycine decarboxylase, glycine cleavage system protein P)
201348_at/ 214091_s_at	GPX3	0,24	1,71	glutathione peroxidase 3 (plasma)
201036_s_at/21 1569_s_at	HADHSC	0,13	1,48	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain
203913_s_at/20 3914_x_at/2115 48_s_at/211549 _s_at	HPGD	0,12	2,28	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
203790_s_at	HRSP12	0,15	1,65	heat-responsive protein 12
226781_at	HSPC268	0,23	1,48	hypothetical protein HSPC268
203854_at	IF	0,30	4,44	I factor (complement)
203474_at	IQGAP2	0,28	1,40	IQ motif containing GTPase activating protein 2
203434_s_at	MME	0,11	3,99	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10)
212095_s_at	MTUS1	0,33	1,74	mitochondrial tumor suppressor 1
203814_s_at	NQO2	0,25	1,92	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2
220183_s_at	NUDT6	0,12	1,44	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6
212694_s_at	PCCB	0,21	1,37	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide
205512_s_at	PDCD8	0,26	1,55	programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)
205380_at	PDZK1	0,28	3,47	PDZ domain containing 1
218025_s_at	PECI	0,26	1,35	peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase
202108_at	PEPD	0,21	1,44	peptidase D
221605_s_at	PIPOX	0,08	4,86	pipecolic acid oxidase
205478_at/ 235129_at	PPP1R1A	0,06	9,65	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A
223268_at/ 229851_s_at	PTD012	0,30	1,80	PTD012 protein
204044_at/ 242414_at	QPRT	0,11	1,77	quinolinate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating))

225272_at	SAT2	0,21	1,69	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 2
228730_s_at	SCRN2	0,21	1,57	secernin 2
228274_at	SDSL	0,15	2,59	serine dehydratase-like
214433_s_at	SELENBP1	0,22	4,26	selenium binding protein 1 /// selenium binding protein 1
209980_s_at	SHMT1	0,17	1,35	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)
205342_s_at/211470_s_at	SULT1C1	0,19	2,96	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 1
204565_at	THEM2	0,31	2,68	thioesterase superfamily member 2
206067_s_at	WT1	0,10	2,20	Wilms tumor 1
202982_s_at	ZAP128	0,19	2,17	peroxisomal long-chain acyl-coA thioesterase

Gene induziert in NZK und reprimiert im Microarray				
--	--	--	--	--

227719_at	---	3,31	0,75	CDNA FLJ37828 fis, clone BRSSN2006575
228955_at	---	3,20	0,55	Homo sapiens, clone IMAGE:4753714, mRNA
243366_s_at	---	9,98	0,50	Transcribed locus, weakly similar to XP_538162.1 PREDICTED: similar to ORF2 [Canis familiaris]
221530_s_at	BHLHB3	8,59	0,60	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3
228737_at	C20orf100	4,02	0,52	chromosome 20 open reading frame 100
204619_s_at/204620_s_at/211571_s_at/221731_x_at	CSPG2	4,95	0,55	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)
229800_at	DCAMKL1	3,48	0,55	Doublecortin and CaM kinase-like 1
201313_at	ENO2	19,21	0,58	enolase 2 (gamma, neuronal)
202345_s_at	FABP5	5,53	0,71	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
201540_at/210298_x_at	FHL1	4,79	0,77	four and a half LIM domains 1
201818_at	FLJ12443	8,21	0,56	hypothetical protein FLJ12443
210495_x_at/211719_x_at/212464_s_at/216442_x_at	FN1	5,37	0,70	fibronectin 1
218084_x_at	FXVD5	3,47	0,60	FXVD domain containing ion transport regulator 5
203066_at	GALNAC4S-6ST	4,10	0,69	B cell RAG associated protein
227347_x_at	HES4	3,86	0,74	hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)
218839_at/44783_s_at	HEY1	5,55	0,58	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
202934_at	HK2	11,01	0,72	hexokinase 2
229638_at	IRX3	4,39	0,55	iroquois homeobox protein 3
205884_at/205885_s_at/213416_at	ITGA4	4,17	0,52	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
231841_s_at	KIAA1462	4,66	0,43	KIAA1462
206364_at	KIF14	3,03	0,73	kinesin family member 14
204298_s_at/215446_s_at	LOX	6,18	0,62	lysyl oxidase
201932_at	LRRC41	3,07	0,65	leucine rich repeat containing 41

226084_at	MAP1B	3,38	0,61	microtubule-associated protein 1B
201669_s_at	MARCKS	3,15	0,72	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
209087_x_at/210869_s_at/211340_s_at	MCAM	4,35	0,51	melanoma cell adhesion molecule
213479_at	NPTX2	27,08	0,54	neuronal pentraxin II
230087_at	PRIMA1	6,07	0,66	Proline rich membrane anchor 1
218723_s_at	RGC32	3,09	0,73	response gene to complement 32
232231_at	RUNX2	3,29	0,53	runt-related transcription factor 2
204198_s_at	RUNX3	3,17	0,60	runt-related transcription factor 3
207714_s_at	SERPINH1	8,66	0,75	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)
224579_at	SLC38A1	3,89	0,76	Solute carrier family 38, member 1
203438_at	STC2	9,51	0,63	stanniocalcin 2
209859_at	TRIM9	7,24	0,44	tripartite motif-containing 9
225662_at	ZAK	5,17	0,77	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlichst bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, für die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion und die Unterstützung als Doktorvater. Weiterhin danke ich ihm für die Hilfestellung bei der Verfassung der Publikation sowie für die Durchsicht dieses Manuskripts und die Erstellung des Erstgutachtens.

Bei Dr. Ludger Klein-Hitpass möchte ich mich für die Durchführung der Mikroarrays und der TaqMan Low density Arrays bedanken, vor allem für die statistische Auswertung beider Experimente. Weiterhin danke ich für die Durchsicht der Publikation.

Ein herzliches Dankeschön an allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe! (Heike Thomas, Christoph Waldner, Karin Dudziak, Magdalena Roose, Gülüzar Turan, Belén Lucas, Silke Erdmann, Sabine Senkel, Andrea Wirsing, Kathrin Sauert, Christiane Drews und Renate Dreher). Ich bedanke mich für Eure Hilfsbereitschaft, Eure Geduld und die viele Schokolade. Ohne Euch wäre die Promotionszeit weniger großartig gewesen.

Insbesondere möchte ich mich bei Magdalena Roose und Karin Dudziak für die gemeinsamen Stunden im Labor und außerhalb des Labors in Restaurants bedanken. Ihr seid die Besten! Toi, toi, toi für Eure Promotion.

Bei Belén Lucas möchte ich mich für die hervorragende Einarbeitung zu Beginn der Promotion bedanke und ebenso möchte ich mich bei Ihr und Andrea Wirsing für die gute Zusammenarbeit in dem HNF4 α -Projekt bedanken. Bei Claudia Krawczyk bedanke ich mich für die praktische Mitarbeit an den Untersuchungen zur Lokalisation von HNF4 α während der Mitose.

Für Gülüzar Turan und Sabine Senkel ein sehr großes Dankeschön für die hilfreichen praktischen Tipps und die Beantwortung all meiner vielen Fragen. Auch danke ich herzlichst Angelika Warda für die Mitarbeit bei den Klonierungen. Bei Adriane Parchatka bedanke ich mich für die praktische Hilfe bei den Mikroarray-Experimenten und den Sequenzierungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden. Ohne Eure liebevolle und humorvolle Unterstützung wäre mein Leben nicht so reich an Glück, Zufriedenheit und Liebe. Danke, dass Ihr immer an meiner Seite, in meinem Herzen seid.

Zum Schluss möchte ich meinem Partner Christian von Herzen danken. Deine Unterstützung und Liebe ist wahrlich grenzenlos. Danke für all Deine wertvollen Worte, Blicke und Taten und das nicht nur während der Promotionszeit, sondern während der letzten 11 Jahren. Du bist wundervoll, ich liebe Dich.

Publikationsliste

Belén Lucas, Karen Grigo, Silke Erdmann, Jörn Lausen, Ludger Klein-Hitpass and Gerhart U. Ryffel (2005). HNF4 α reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene*

Karen Grigo, Andrea Wirsing, Belén Lucas, Ludger Klein-Hitpass and Gerhart U. Ryffel. HNF4 α orchestrates a set of 14 genes to down-regulate cell proliferation in kidney cells. (zur Veröffentlichung angenommen)

Postervorträge

European Journal of Cell Biology „Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie“ Heidelberg - 16.-19. März 2005

“The transcriptionfactor HNF4alpha:effects on cell proliferation and morphology“

Karen Grigo, Belén Lucas, Ludger Klein-Hitpass and Gerhart U. Ryffel

Karolinska Institute „Nuclear Receptors“ Stockholm, Sweden – 17.-20. September 2006

“The transcriptionfactor HNF4alpha:effects on cell proliferation and morphology“

Karen Grigo, Belén Lucas, Ludger Klein-Hitpass and Gerhart U. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs.2, Nr.8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das
Thema „Funktion des zellspezifischen Transkriptionsfaktors HNF4 α bei der
Zellproliferation in Nierenzellen: Identifizierung der Signalwege und der
verantwortlichen HNF4 α -regulierten Genen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre
vertrete und den Antrag von Frau Karen N.C. Grigo befürworte.

Essen, den 02. 10. 2007

Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation
selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel
bedient habe.

Essen, den 02.10. 2007

Karen N. C. Grigo

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math-Nat.-
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen
bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese
Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 02.10. 2007

Karen N. C. Grigo

