

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin, I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. med. A. W. Lohse

**Differenzierung Telomerase-immortalisierter humaner
Hepatozyten mittels ektopter Expression von HNF4 α**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Kornelius Schulze
aus Wismar

Hamburg 2010

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 27.08.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. J. Petersen

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD. Dr. J.-M. Pollok

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. W. Fiedler

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2	Einleitung.....	6
2.1	Lebergerichtete Zelltherapie	6
2.2	Telomerase-immortalisierte fetale Hepatozyten	10
2.3	Differenzierung humaner Hepatozyten.....	11
3	Material und Methoden	14
3.1	Zellen.....	14
3.2	Plasmide	14
3.3	Plasmidpropagierung und -präparation.....	15
3.4	Qualitätskontrolle der propagierten Plasmide mittels Restriktionsverdau.....	16
3.5	Zellkultur.....	17
3.6	Stabile Transfektion	19
3.7	RNA Extraktion.....	20
3.8	Proteinextraktion	21
3.9	Quantitative Realtime RT-PCR	23
3.10	Immunoblot	25
3.11	Analyse der Zellproliferation.....	30
3.12	Microarray	31
3.13	Statistik.....	32
4	Abbildungen und Ergebnisse	33
4.1	Plasmidpropagierung und -präparation in E.coli	33
4.2	Plasmidcharakterisierung mittels EcoR1 Restriktionsverdau	33
4.3	RNA Extraktion aus den transfizierten fetalen Hepatozyten	34
4.4	Quantitative Realtime RT-PCR von HNF4 α	34
4.5	Immunoblot Analyse von HNF4 α	35
4.6	Quantitative Realtime RT-PCR von α 1-Antitrypsin	36
4.7	Immunoblot Analyse von α 1-Antitrypsin.....	37
4.8	Quantitative Realtime RT-PCR von Transferrin.....	38
4.9	Quantitative Realtime RT-PCR von Serumalbumin	39
4.10	Analyse der Zellproliferation.....	41
4.11	Microarray	42
5	Diskussion	44
5.1	Expression von HNF4 α	44

5.2	Expression von α 1-Antitrypsin.....	45
5.3	Expression von Transferrin	46
5.4	Expression von Serumalbumin	47
5.5	Zellproliferation.....	48
5.6	Microarray	49
5.7	Intrahepatische Reifung	56
5.8	Hepatozyten und deren Interaktionen	57
5.9	Leberspezifische Differenzierung trotz hoher Telomeraseaktivität	58
6	Zusammenfassung	59
7	Abkürzungsverzeichnis.....	60
8	Abbildungsverzeichnis.....	64
9	Tabellenverzeichnis.....	65
10	Literaturverzeichnis.....	66
11	Danksagung	75
12	Lebenslauf	76
13	Eidesstattliche Erklärung.....	77

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Differenzierung Telomerase-immortalisierter humaner Hepatozyten mittels ektopter Expression von HNF4 α

Einleitung: Telomerase-immortalisierte humane Hepatozyten lassen sich unbegrenzt in Zellkultur expandieren. Im Rahmen der Proliferation kommt es erwartungsgemäß zur Entdifferenzierung der Zellen. Die Zellen zeigen jedoch nach Transplantation in eine Mausleber eine hepatozelluläre Genexpression (Wege et al., 2003a). Es ist bekannt, dass die Differenzierung humaner Hepatozyten von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren gesteuert wird, von denen HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor*) eine entscheidende Rolle spielt (Hayhurst et al., 2001).

Hypothese: Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen zur Steuerung der hepatozellulären Genexpression wird die Hypothese aufgestellt, dass eine ektope Expression von HNF4 α in wenig differenzierten Telomerase-immortalisierten humanen Hepatozyten eine Differenzierung mit Expression hepatozellulärer Gene und Funktionen auslöst. Die in vitro vordifferenzierten Zellen könnten dann zur lebergerichteten Zelltherapie eingesetzt werden.

Methodisches Vorgehen: Mittels Transfektion eines entsprechenden Plasmids (pcDNA-HNF4 α ; von B. Laine, Lille, Frankreich) wird HNF4 α in den Telomerase-immortalisierten Zellen ektop exprimiert. Zur Erzeugung stabil transfizierter Zelllinien werden die Zellen selektiert. Dazu enthält das Plasmid ein Resistenzgen (Neomycin/Kanamycin). Eine erfolgreiche Transfektion wird durch Messung der HNF4 α mRNA (Realtime RT-PCR) und des Proteins (Immunoblot) nachgewiesen. Die Auswirkungen der ektopten Expression von HNF4 α auf den Phänotyp und die hepatozellulären Funktionen der transfizierten Zellen werden durch Einsatz der im Labor etablierten Methoden erfasst (Realtime RT-PCR, Immunoblot für humanes Serumalbumin, humanes α 1-Antitrypsin und humanes Serumtransferrin, photometrische Messung der Zellproliferation, Microarray). Dabei erfolgt jeweils ein Vergleich mit Zellen, die mit einem leeren Kontrollvektor stabil transfiziert wurden.

2 Einleitung

2.1 *Lebergerichtete Zelltherapie*

Die Leber übernimmt als zentrales Organ im menschlichen Organismus viele essenzielle Funktionen im Stoffwechsel. Die Kohlenhydrathomöostase wird unter anderem durch Speicherung, Auf- und Abbau von Glykogen sowie der Synthese von Glukose aus Laktat, Glyzerin oder Aminosäuren geregelt. Die Leber entgiftet unter anderem durch Gallebildung den Organismus von endogenen und exogenen Toxinen. Ausgenommen der γ -Globuline ist die Leber für die Produktion der Plasmaproteine zuständig und sorgt neben der Synthese von Enzymen auch für den Abbau aller Proteine über den Harnstoffzyklus. Im Fettstoffwechsel wird der Metabolismus von Fettsäuren, Cholesterinen und Phospholipiden übernommen.

Der Hauptanteil der Stoffwechselfunktionen wird durch die Hepatozyten gewährleistet, die als Parenchymzellen etwa 70 % des Gesamtvolumens der Leber ausmachen.

Eine terminale Leberinsuffizienz, hervorgerufen durch unterschiedliche Erkrankungen, wie zum Beispiel durch eine primär biliären Zirrhose (PBC), eine alkoholtoxische oder nicht-alkoholische Fettleberzirrhose, eine primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), eine chronisch aktive Virushepatitis oder eine autoimmune Hepatitis (AIH) (Qasim et al., 2007), bedarf einer Therapie mittels Lebertransplantation.

Für eine Organtransplantation im Kindesalter können genetisch vererbte Enzymdefekte der Leber, wie im Fall der hereditären Tyrosinämie Typ I, zugrunde liegen (Demers et al., 2003).

Am Beispiel des akuten Leberversagens, welches in den USA im Jahre 2005 einen Anteil von 7% aller orthotopen Lebertransplantationen (OLT) ausmachte (Khashab et al., 2007), wird ersichtlich, dass neben den elektiven Eingriffen ein Spenderorganmangel in den häufigen Notfallsituationen ein akutes Problem darstellt. Insgesamt gesehen waren im Jahre 2004 in den USA 10986 Patienten für eine Lebertransplantation gelistet

(www.optn.org/AR2006/105_dh.htm, Stand: 22.06.07) und für die Eurotransplant-Zone warteten im Dezember 2006 2249 Patienten auf eine Leber (www.eurotransplant.nl/files/statistics/yearly-statistics-2006.pdf, Stand: 22.06.07).

Neben dem Organmangel ergeben sich weitere Probleme der OLT. Als eine der teuersten medizintechnischen Leistungen in der westlichen Welt (Ishida et al., 2004) spielen vor allem Transplantatabstoßungen, und als Folge von Immunsuppression, Arzneimittelnebenwirkungen und Infektionen eine nennenswerte Rolle. Retransplantationsraten betragen etwa 6 % (Qasim et al., 2007), primäre Dysfunktionen treten in 15 % der Fälle auf (Porte et al., 1998) und primäres Transplantatversagen hat eine Inzidenz von 2-8 % (Porte et al., 1998; Uemura et al., 2007).

Die immunsuppressiven Medikamente Tacrolimus und Cyclosporin A sind nephro- und neurotoxisch (Hooks, 1994; Arora-Gupta et al., 2004). Arzneistoffe wie Kortison und Tacrolimus erhöhen die Wahrscheinlichkeit, einen Diabetes mellitus zu entwickeln (Marchetti, 2005).

Des Weiteren ist die Inzidenz von sekundären Malignomen nach immunsuppressiver Therapie erhöht (Guba et al., 2004; Benten et al., 2008). Im Rahmen einer retrospektiven Studie konnte bei pädiatrischen Lebertransplantationen eine *Posttransplant Lymphoproliferative Disorder* (PTLD) in 5% der Fälle diagnostiziert werden (Uribe et al., 2009).

Erreger wie das Cytomegalievirus (CMV) und das humane Herpesvirus (HSV) treten gehäuft nach Lebertransplantationen auf. Thomasini et al. berichten von Inzidenzen um 65,5% für CMV und 48,2% für HSV (Thomasini et al., 2007). Die CMV-Infektion kann zu einer primären Transplantatabstoßung führen, die Überlebensrate des Organs respektive des Patienten senken und opportunistische Infektionen sowie Malignitäten hervorrufen (Fishman et al., 2007).

Aufgrund der angeführten Nachteile der Organtransplantation wurde nach Alternativen des Leberersatzes gesucht. Eine interessante Variante besteht in der zellbasierten Therapie, die als Infusion einer Zellsuspension in die Vena

portae oder Milz (Zelltransplantation) durchgeführt werden kann. Ein weiterer Leberfunktionsersatz wird mittels physiologischer Hämoperfusion erwogen, bei der mit Hepatozyten beladene bioartifizielle Lebersysteme, *Extracorporeal Liver Perfusion* (ECLP) oder *Bioreactorsystems* eingesetzt werden würden.

Eine andere Alternative ermöglicht mit künstlichen Apparaturen, basierend auf Plasmapherese, Hämodialyse, Hämoperfusion, und Hämofiltration, das Blut zu entgiften. Limitiert wird letztere Methode insofern, als dass Funktionen des Metabolismus nicht substituiert werden können. Klinische Studien konnten entsprechend auch keinen signifikanten Vorteil für rein physikalische Methoden zeigen (O'Grady et al., 1988; Ellis et al., 1999). In den letzten Jahren sind aufgrund der benötigten hohen Mengen an gefrorenem Frischplasma beziehungsweise der resultierenden Kosten artifizielle Substitutionsmethoden mehr und mehr verlassen worden.

Naruse et al. untersuchten die verschiedenen bioartifiziellen Leberersatzsysteme auf Funktion, Sicherheit und Operabilität. Sie konnten die ECLP als die effizienteste Leberfunktionssubstitution anführen. Es bestätigte sich die Überlegenheit gegenüber Hämofiltration und Hämodialyse in Bezug auf Ammoniakmetabolismus, der Aminosäurebilanz im Blut sowie der Galleexkretion. Es konnte ein Benefit für die Überbrückung bis zu einer Lebertransplantation nachgewiesen werden. Der Nachteil besteht aber in dem enormen Laboraufwand und somit in den zu hohen Kosten (Naruse et al., 2007).

Die Hepatozytentransplantation auf der anderen Seite hat theoretisch eine Reihe von Vorteilen. Der Mangel an Organen könnte umgangen werden, weil eine Spenderleber genügend Hepatozyten für mehrere Transplantationskandidaten zur Verfügung stellen würde. Der operative Eingriff ließe sich auf gering traumatische und sichere Weise ambulant durchführen. Der Zugangsweg über die Vena portae oder die Milz ist sicher und etabliert. Hepatozyten erfüllen das gesamte Funktionsspektrum und sind somit der beste Ersatz für eine insuffiziente Leber. Auch können Hepatozyten-Vorläuferzellen

oder Hepatozyten-ähnliche Zellen, bei Ausschluss von Entartungsrisiken, eingesetzt werden.

Eine beispielhafte Indikation zur Hepatozytentransplantation bestünde in der Behandlung von kongenitalen Enzymdefekten, wie zum Beispiel dem Crigler-Najjar Syndrom Typ I (Fox et al., 1998) oder dem X-chromosomal dominant vererbten Ornithintranscarbamylase-Mangel (Strom et al., 1997).

Die Risiken dieser Methode, wie die Entwicklung einer portalen Hypertension, Verringerung des portalen Blutflusses, pulmonale Mikroinfarkte und einer Thrombose durch die portale Infusion von Zellsuspensionen, wurden bei Schweinen untersucht (Muraca et al., 2002). Bis zu 2,4 % der gesamten Hepatozytenmasse eines Schweines kann ohne größere Risiken transplantiert werden.

Hepatozyten als langfristige Ressource für Zelltransplantationen stellen nur eine zum Teil befriedigende Lösung dar. Der Mangel an Spenderorganen zur Zellgewinnung begrenzt auch hier die Hepatozytenverfügbarkeit.

Die *in vitro* Kultivierung von Hepatozyten ist aufgrund des fehlenden Proliferationspotenzials nur eingeschränkt möglich (Deurholt et al., 2006). Demgegenüber ist die humane Hepatoma-Zelllinie Hep G2 sehr gut für *in vitro* Proliferation geeignet, erfasst aber nicht das breite Funktionsspektrum von Hepatozyten (Nyberg et al., 1994).

Fetale Hepatozyten (FH) besitzen ebenfalls nicht die benötigte Differenzierung, zeigen aber einerseits eine spontane Proliferation (Lilja et al., 1998) und verfügen andererseits über ein gewisses Differenzierungspotenzial nach Transplantation (Dabeva et al., 2000).

Hieraus ergibt sich ein viel versprechender Ansatz, insbesondere wenn es möglich ist, die fetalen Hepatozyten stabil zu kultivieren und durch Induktion eine lebertypische Differenzierung auszulösen. Als potentielle Zellen stehen hierfür Telomerase-immortalisierte fetale Hepatozyten zur Verfügung.

2.2 *Telomerase-immortalisierte fetale Hepatozyten*

Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, das im Nukleus für die Stabilität von Chromosomen zuständig ist. Die Enden eukaryoter Chromosomen, die Telomere, bestehen aus repetitiven 5' -TTAGGG- 3' Hexanukleotiden. Diese können nach Verlust von bis zu 200 Basenpaaren während einer mitotischen Zellteilung mittels der katalytischen Untereinheit der Telomerase, der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT), mit identischen Nukleotiden erneuert werden (Collins, 2000).

Eine supprimierte Telomerase- bzw. hTERT-Expression führt langfristig durch den stetigen Verlust der Telomere nach Zellteilungen zu einem Wachstumsstopp (Seneszenz) der Zelle mit sehr kurzen und instabilen Telomeren. Seneszenz kann auch als das zellbiologische Altern und deren Konsequenzen definiert werden. Wege et al. zeigten in humanen Hepatozyten, in denen bei fehlender Expression von hTERT keine Telomeraseaktivität vorhanden ist, eine begrenzte Proliferationsfähigkeit (Wege et al., 2003a). Die replikationsassoziierte Telomerverkürzung verhindert die unbegrenzte Expansion von humanen Hepatozyten in vitro. Interessanterweise sind FH in der Lage in Zellkultur zu proliferieren, jedoch ist der Zeitraum auf wenige Monate begrenzt (Malhi et al., 2002).

Die Arbeitsgruppe Wege et al. hat zur Generierung einer Leberzelllinie in FH, die aus Lebergewebe von 22-24 Wochen alten humanen Feten gewonnen wurden, mittels Transduktion hTERT ektop exprimiert (Wege et al., 2003b). Die FH wurden verwendet, weil diese Zellen unabhängig von Wachstumsfaktoren proliferieren.

Infolge aktiver Telomerasefunktion konnte die Zelllinie FH-hTERT endlos in vitro kultiviert werden, ohne das Potenzial der Differenzierung einzubüßen und ohne Hinweise für eine maligne Transformation (Wege et al., 2003b; Haker et al., 2007).

Nicht-transfizierte oder mit einem Kontrollvektor transfizierte FH haben das Wachstum nach 30-35 Populationsverdoppelungen (PD) eingestellt,

wohingegen die Proliferation von FH-hTERT über 800 PD (Stand August 2009) noch nicht in Seneszenz endete.

Die Charakterisierung von FH-hTERT ergab nach 50 PD eine verminderte Expression der Differenzierungsfaktoren HNF4 α und *CCAAT/enhancer binding protein- α* (C/EBP- α). Die weiteren für die Proliferation und Differenzierung interessanten Gene aus den Gruppen der Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren wiesen keine Unterschiede auf. Einzig der Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (HGFR) wurde in den hTERT-transfizierten FH in einer höheren Konzentration nachgewiesen. Bei humanem Serumalbumin (HSA), das als Marker für die hepatozytenspezifischen Funktion stellvertretend betrachtet werden kann, wurde kein signifikanter Anstieg der Expression gemessen. Eine Aussage über die absolute Quantifizierung ist nicht getroffen worden. Eine onkogene Eigenschaft der kultivierten FH-hTERT ist in Langzeitkultur bis 150 PD bisher nicht beobachtet worden (Haker et al., 2007).

Nach Transplantation der Hepatozyten in immunsupprimierte Mäuse entwickelten die FH-hTERT nach vier Wochen ein für HSA, humanes α 1-Antitrypsin (HAT) und für humanes Transferrin (HTF) typisches Expressionsmuster, das mit reifen Hepatozyten vergleichbar ist. In vivo konnten relative Expressionsspiegel für HSA von etwa 27%, für HAT von etwa 40% und für HTF von etwa 30% im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten gemessen werden.

2.3 Differenzierung humaner Hepatozyten

Die von der Leber bewerkstelligten lebenswichtigen Funktionen werden hauptsächlich von den Hepatozyten ausgeführt. Um diese Aufgabe zu gewährleisten, ist die Expression einer Vielzahl von Genen notwendig. Eine Regulierung der Funktionen kann darüber hinaus auch auf verschiedenen Stufen der Proteinsynthese stattfinden.

Die Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Steuerung der Genexpression, indem sie über endo-, para- und autokrine Botenstoffe aktiviert

werden. In der Leber sind als lebergerichtete Transkriptionsfaktoren vor allem HNF1, HNF3, HNF6, C/EBP α und HNF4 identifiziert worden (Cereghini, 1996). Der Differenzierungsfaktor HNF4 α scheint dabei eine übergeordnete und initiierende Funktion zu haben. In FH, die einen HNF4 α Gen-Knockout aufwies, konnte ein typisches ausdifferenziertes Proteinprofil für Hepatozyten in der Leberentwicklung nicht nachgewiesen werden. Der Differenzierungsfaktor HNF1 wurde auch nicht exprimiert (Li et al., 2000). Knockout-Modelle der anderen Differenzierungsfaktoren ergaben dagegen nur minimale Abweichungen im Funktionsspektrum des Leberparenchyms (Wang et al., 1998; Hayhurst et al., 2001).

Als Teil der *Nuclear Receptor Superfamily* (NR2A1) findet sich der Transkriptionsfaktor HNF4 α (54 kDa) in hoher Konzentration in Hepatozyten und in geringer Konzentration in den Nieren, im Darm, im Pankreas (Sladek et al., 1990). Das entsprechende Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 20 (20q13.1-13.2). Nach alternativem Splicen können bis zu neun verschiedene Isoformen des Proteins von den Zellen synthetisiert werden.

Die für einen Transkriptionsfaktor notwendige Ligandenaktivierung für die Bindung an die DNA ist noch nicht vollständig verstanden und ein spezifischer Botenstoff konnte auch noch nicht identifiziert werden. Die Literatur beschreibt HNF4 α deswegen als Orphan-Rezeptor (Sladek et al., 1990). Eine modulierende Rolle übernehmen dagegen wahrscheinlich Acyl-CoA, dessen Anzahl an Bindungen und dessen Sättigungsgrad für einen agonistischen bzw. antagonistischen Effekt sorgen (Hertz et al., 1998) sowie Proteinkinase A (PKA), die durch Phosphorylierung einen inhibitorischen Einfluss auf die Bindung von HNF4 α an die DNA ausübt (Viollet et al., 1997).

Die Zielgene von HNF4 α stellen ein weites Expressionsspektrum der leberspezifischen Proteine für Nährstofftransport und -metabolismus, Leberdifferenzierung, Immunfunktionen, Zellstruktur und Wachstumsfaktoren dar. Zum Beispiel weisen HAT und HTF eine sich mehrmals durch ein Nukleotid abgrenzende AGGTCA Bindungssequenz für HNF4 α auf. HSA als

weiteres interessantes hepatozytenspezifisches Protein weist diese Sequenz dagegen nicht auf (<http://www.sladeklab.ucr.edu/hnf43.pdf>, Stand 01.07.07).

Abschließend kann konstatiert werden, dass HNF4 α als zentraler Initiationspunkt für die Differenzierung von Hepatozyten angesehen werden kann. In weiterer Konsequenz ist es in dieser Arbeit das Ziel, HNF4 α in wenig differenzierten Telomerase-immortalisierten humanen Hepatozyten ektop zu exprimieren, um somit einen differenzierten hepatischen Phänotyp in vitro zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Zellen

Hep G2

Als Vergleichszellkultur für die Expression von HNF-4 α (Jiang et al., 2003), HSA (Kono and Roberts, 1996), HAT (Kounnas et al., 1996) und HTF (Lodish and Kong, 1991) in Telomerase-immortalisierten fetalen Hepatozyten diente die human Hepatoma Zellline Hep G2.

3.2 Plasmide

Karte

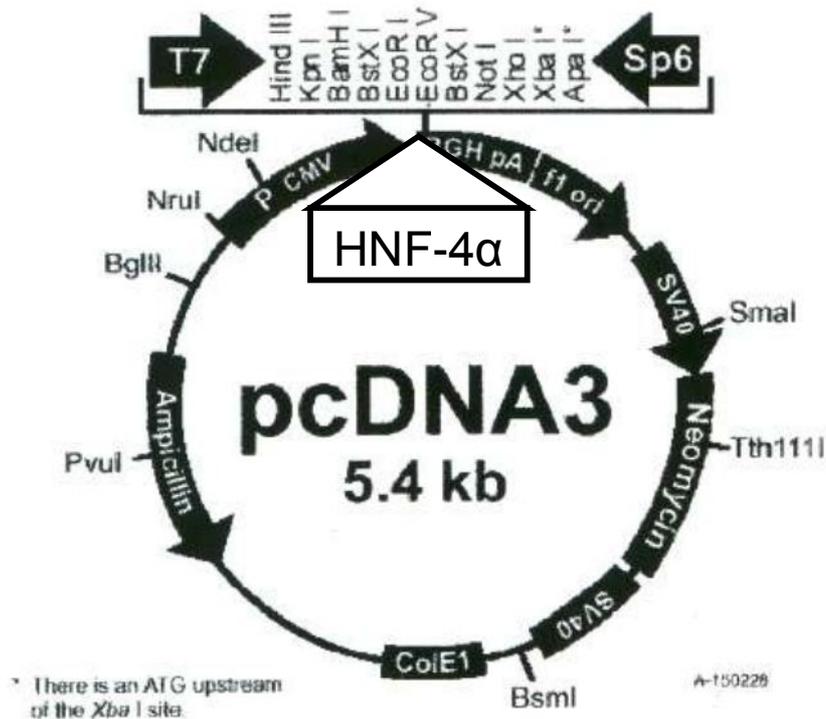


Abbildung 1: Plasmid pcDNA-HNF4 α

Der Vektor pcDNA-HNF4 α besteht aus 7745 bp, von denen 2299 bp vom *Insert* inklusive des Genes HNF4 α stammen. Aus der *Multiple Cloning Site*, die einen T7 Promoter enthielt, wurde die *Restriction Site* der Endonuklease *EcoR1*

verwendet, um HNF4 α einzuklonieren. Das Ampicillin-Resistenzgen (β -Laktamase) diente als Selektionskomponente für die Plasmidpropagierung in *E.coli* Stämmen. Des Weiteren verfügte der Vektor über ein Neomycin (G418)-Resistenzgen und erlaubt damit die Selektion transfizierter Zellen in Kultur. Die Expression des Selektionsgens wurde von einem SV40 Promoter gesteuert. Die Transkription des klonierten HNF4 α in den Zellen erfolgte über einen konstitutiven CMV Promoter.

3.3 Plasmidpropagierung und -präparation

Materialien für die Plasmidpropagierung und -präparation

- *E.coli* Kolonie
- Plasmid pcDNA HNF4 α (B. Laine, Lille, Frankreich)
- Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen)
- LB-Medium (*Luria broth*)
- Schüttler (Gerhardt, Schüttelmaschine RO 10)
- Ampicillin Stammlösung
- 500 ml-Erlenmeyerkolben
- Destilliertes H₂O
- Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R)
- 50 ml-Falconröhrchen
- 15 ml-Röhrchen
- LB-Agarplatte
- QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
- Photometer (Eppendorf BioPhotometer 6131)

Durchführung der Plasmidpropagierung und -präparation

100 ng pcDNA HNF4 α Plasmidlösung wurden zu 100 μ l *E.coli* Kultur gegeben. Dieser Ansatz wurde für 15 min auf Eis (4 °C) gestellt. Die

Bakterientransformation wurde anschließend für 90 sek unter Hitzeschock bei 42 °C und anschließend für 2 min auf Eis durchgeführt. Die transformierten Bakterien wurden daraufhin in 400 µl LB-Medium überführt und unter Schütteln (300 rpm) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte das Ausstreichen der Bakterienkultur auf eine mit Ampicillin versetzte LB-Agarplatte sowie die Übernachtinkubation bei 37 °C.

Am nächsten Tag wurden 5000 µl LB-Medium und 5 µl Ampicillin Stammlösung in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und mit einer auf der Agarplatte möglichst isoliert gelegenen Bakterienkolonie angeimpft. Anschließend erfolgte bei 37 °C die Übernachtinkubation.

180 ml destilliertes H₂O, 20 ml 10fach konzentriertes LB-Medium, 200 µl Ampicillin Stammlösung wurden mit 5 ml der Übernachtkultur in einen Erlenmeyerkolben überführt und erneut über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (300 rpm) inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Volumen auf vier 50 ml-Falconröhrchen zu gleichen Teilen gegeben und bei 6000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert.

Im Anschluss wurde nach dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit Protokoll ohne Veränderung einzelner Schritte oder Unterpunkte weiter gearbeitet.

Die Konzentrationsbestimmung fand mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einer Verdünnung von 1:100 (5 µl Plasmid DNA + 495 µl H₂O) statt.

3.4 Qualitätskontrolle der propagierten Plasmide mittels

Restriktionsverdau

Materialien für den Restriktionsverdau

- *Sea Plaque Agarose* (Biozym)
- TBE Puffer
- Ethidiumbromid (Sigma)
- DNA Größenmarker (Invitrogen, *Easy Ladder II*)

- Restriktionsendonuklease *EcoR1*
- *NEB 3 Buffer* (New England Biolab): - 50 mM Tris HCl
- 10 mg MgCl₂
- 100 mM Dithiothreitol
- Gelkammer (BioRad)
- *5xDNA Loading Buffer* (Bioline)

Durchführung des Verdauens und der Gelelektrophorese

Initial wurden 1 µl Plasmidansatz (900µg/ml) in 1 µl *NEB 3 Buffer*, 17 µl H₂O und 1 µl *EcoR1* Restriktionsendonuklease Lösung für 3 h verdaut. Für die anschließende Elektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel (0,5 g Agarose in 50 ml 1xTBE Puffer) gegossen.

In die erste Geltasche wurde daraufhin 7,5 µl *Easy Ladder II* gegeben. Die zweite Kammer enthielt 2,6 µl (2 µg pcDNA-HNF4α), 2 µl *NEB 3 Buffer*, 1 µl *EcoR1* (20 U/µl), 14,4 µl H₂O und 5 µl *5x DNA Loading Buffer red*.

Die Elektrophorese lief bei 100 V für 60 min.

3.5 Zellkultur

Materialien der Zellkultur

- *FH-Medium*: - 500 ml D-MEM (Gibco)
- 50 ml hitzeinaktiviertes FBS (Gibco)
- 5 ml P-S-A (Gibco; Penicilin, Streptomycin, Amphotericin B)
- 250 µl Insulin (5 µg/ml)
- 50 µl Hydrocortison (2,4 µg/ml)
- *Freezing-Medium*: - 80 % D-MEM
- 10 % hitzeinaktiviertes FBS
- 10 % DMSO (Sigma)

- T-75 Kulturflaschen (Garstedt)
- Sterile Pipetten, Pasteurpipetten zum Absaugen, Absaugvorrichtung
- PBS (Gibco)
- Trypsin/EDTA Lösung (Gibco)
- Zählkammer nach Neubauer
- Mikroskop (Leica DMIL)
- Sterile Arbeitsbank und Brutschrank (Heraeus)
- *Nalgene Freezing Container*

Auftauen und Ausplattieren

Es wurden 1 bis 3×10^6 FH-hTERT PD150 Zellen in 1 ml FH-Medium in 1 min auf 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde danach in mit 15 ml FH-Medium in eine T-75 Kulturflasche gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C erfolgte der erste Mediumwechsel am folgenden Tag.

Passagieren

Nachdem die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle eine Konfluenz von 90 % erreicht hatten, wurde das FH-Medium durch Absaugen entfernt. Die FHB PD 150 Zellen wurden danach vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin Lösung bei 37 °C für 5 min inkubiert. Durch Aufsättigung mit 10 ml FH-Medium stoppte die Trypsinierung und die Zellen konnten nach Resuspension auf drei neue T 75 Kulturflaschen verteilt werden. Im letzten Schritt wurde das FH-Mediumvolumen jeweils wieder auf 15 ml aufgefüllt.

Kryopreservieren

Die FHB PD 150 Zellen wurden, wie beim Passagieren beschrieben, trypsiniert, mit 10 ml FH Medium resuspendiert und anschließend mit Hilfe der Neubauerkammer gezählt. Die Zellen wurden danach bei 500 g und 4 °C für 3

min zentrifugiert und auf ein Verhältnis von 1 ml *Freezing-Medium* zu 3×10^6 Zellen resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden zuerst für 15 min bei Raumtemperatur, danach für 4 h im *Nalgene Freezing Container* mit Isopropanol bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und zum Schluss in flüssigen Stickstoff überführt.

3.6 Stabile Transfektion

Materialien für die Nukleofektion

- *Nucleofector* (Amaya Biosystems)
- *Nucleofector Solution V* (Amaya Biosystems)
- 6 *Well*-Platte
- 2 µg Plasmid pcDNA HNF4α
- 2 µg Plasmid pcDNA3.1
- Geneticin Antibiotikum (G418 Gibco)

Durchführung der Nukleofektion

Die FHB PD 150 Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst, mit FH-Medium resuspendiert, in der Neubauerkammer gezählt (siehe 3.4. Passagieren) und anschließend bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Der abgesaugte Überstand wurde verworfen und die Zellen mit auf Raumtemperatur vorgewärmter *Nucleofector Solution* auf eine Konzentration von $7,5 \times 10^5$ Zellen/100 µl resuspendiert.

Die FHB PD 150 Zellen wurden in folgenden Ansätzen in einer Konzentration von 2 µg Plasmid DNA zu 100 µl Zellsuspension in dem *Nucleofector* mit dem Programm T 30 transfiziert:

1. FHB PD 150 + *Nucleofector Solution* + pcDNA-HNF4 α
2. FHB PD 150 + *Nucleofector Solution* + pcDNA3.1
3. FHB PD 150 + *Nucleofector Solution*
4. Kontrolle ohne Nukleofektion

Nach der Nukleofektion wurden die Ansätze in 500 μ l vorgewärmtes FH-Medium auf eine 6 *Well*-Platte pipettiert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde die Selektion mit Geneticin G418 in einer Konzentration von 300 mg/l begonnen. Das Selektionsmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und die Zellen konnten nach dem sechsten Tag auf T-75 Kulturflaschen übertragen werden.

3.7 RNA Extraktion

Materialien für die RNA Extraktion

- *RNeasy Mini Kit* (Qiagen)
- β -Mercaptoethanol
- 96 – 100 % Ethanol
- 70 % Ethanol
- PBS
- Trypsin/EDTA
- 21 G Kanüle (BD Microlance)
- Photometer (Eppendorf BioPhotometer 6131)

Durchführung der RNA Extraktion

Die RNA Extraktion wurde anhand des *RNeasy Mini Kit* Protokoll durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien wurden in ihren Volumina auf die unterschiedlich hohen Zellausbeuten angepasst. Die FHB Zellen wurden trypsiniert und als Zellpellet gesammelt. Zur Homogenisierung wurde eine 21 G Kanüle

verwendet. Ein DNA Verdau wurde als Zwischenschritt eingebaut, um durch Depletion möglicher genomischer DNA *TaqMan RT-PCR* effizienter nutzen zu können.

Die RNA Konzentrationsbestimmung fand mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Verdünnung von 1:50 (3 µl RNA zu 147 µl H₂O) statt.

3.8 Proteinextraktion

Materialien für die zytosolische Proteinextraktion

- RIPA Pufferlösung: 49,5 ml 1xPBS
0,5 ml Igepal CA-630 (final: 1 %)
250 mg *Sodium deoxylate* (final: 0,5 %)
50 mg SDS (final: 0,1 %)
- *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche)
- *Cellscraper* (TRP, 38 cm)
- 21 G Kanüle (BD Microlance)
- *BCA Protein Assay Kit* (Pierce)
- 96 *Well*-Mikrotiterplatte (NUNC Apogent)
- *Ultra Microplate Reader EL 808* (Bio Tek Instruments)

Durchführung der zytosolischen Proteinextraktion

Die in einer T 75 Kulturflasche adhärenen FHB PD 150 Zellen wurden dreimal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl kaltem RIPA Puffer, dem zuvor *Protease Inhibitor Cocktail* (1 Tablette pro 10 ml RIPA Puffer) zugefügt wurde, gleichmäßig bedeckt. Die gelösten FHB Zellen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf *Tube* überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zelllysate mehrmals durch eine 21 G Kanüle aspiriert und für 45 min auf Eis

inkubiert. Im letzten Schritt sind die *Tubes* bei 10000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in 1,5 ml Eppendorf *Tubes* überführt worden. Die Proteinkonzentration wurde mittels *Ultra Microplate Reader EL 808* bei einer Wellenlänge von 562 nm und dem *BCA Protein Assay Kit* bestimmt. Die Lagerung fand bei –80 °C statt.

Materialien für die nukleäre Proteinextraktion

- Extraktionspuffer:
 - 7,16 ml deionisiertes H₂O
 - 200 µl 1 M *HEPES Buffer*, pH 7,9 (Sigma)
 - 2 ml 100 % *Glycerol* (Sigma)
 - 20 µl 5 M NaCl
 - 4 µl 0,5 M EDTA (pH 8,5)
 - 600 µl 25 mM MgCl₂
 - 10 µl 100 % Triton X-100 (Sigma)
- PBS
- *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche)
- 0,1 M DTT (Invitrogen)
- 5 M NaCl
- *BCA Protein Assay Kit* (Pierce)
- 96-Well Mikrotiterplatte (NUNC Apogent)
- *Ultra Microplate Reader EL 808* (Bio Tek Instruments)

Durchführung der nukleären Proteinextraktion

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, nach Trypsinierung gezählt und dreimal bei 500 g für 7 min bei 4 °C abzentrifugiert und jeweils mit PBS gewaschen. Der Extraktionspuffer wurde in einem Verhältnis von 10 µl zu 1 ml Puffer mit *Protease Inhibitor Cocktail* und 0,1 M DTT komplettiert. Die Zellextrakte wurden in 1,5 ml Eppendorf *Tube* ein weiteres Mal zentrifugiert und die Pellets danach mit 100 µl Extraktionspuffer auf 2×10^6 Zellen resuspendiert. Nach Zentrifugation für 10 min wurde der Überstand verworfen und ein zweites Mal

mit Extraktionspuffer (100 µl zu 1×10^6 Zellen) resuspendiert. Nachdem 6,25 ml 5 M NaCl tröpfchenweise hinzu gegeben wurden, sind die Ansätze für 45 min auf Eis gelagert und danach bei 10000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert worden. Im letzten Schritt wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde mittels *Ultra Microplate Reader EL 808* bei 562 nm und dem *BCA Protein Assay Kit* bestimmt.

3.9 Quantitative Realtime RT-PCR

Materialien für die cDNA Generation

- *ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen)
- PCR System 9700 (GenAmp)

Durchführung der cDNA Generation

Die bei der reversen Transkription verwendete RNA unterlief zuvor einem DNase Verdau (siehe RNA Extraktion). Es wurde auf Eis gearbeitet, um einen potenziellen RNase Verdau zu verhindern.

1 µg RNA wurde in ein RNase-freies PCR-*Tube* pipettiert und bis zu einem Endvolumen von 10 µl mit H₂O aufgefüllt. Im nächsten Schritt wurde 1 µl Oligo(dT)₂₀-Primer Mix hinzu pipettiert und der Ansatz bei 65 °C für 5 min denaturiert. Währenddessen wurde der *Mastermix* wie folgt zusammengestellt:

Volumina je Ansatz:

- 4 µl 5 x *cDNA Synthesis Buffer*
- 1 µl 0,1 M DTT
- 1 µl *RNaseOUT* (40 U/µl)
- 2 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl *ThermoScript RT* (15 U/µl)

Die 9 µl aus dem *Mastermix* wurden anschließend zu der denaturierten Probe gegeben. Dieser Ansatz mit einem Endvolumen von 20 µl wurde im letzten Schritt nach folgendem Schema inkubiert:

- 45 min bei 55 °C (Reverse Transkription)
- 5 min bei 85 °C (Termination)
- 5 min bei 4 °C (*Cool down*)

Die cDNA mit einer Endkonzentration von 50 ng/µl wurde bis zum Beginn der *Realtime RT-PCR* bei -20 °C gelagert.

Materialien für die quantitative *Realtime RT-PCR*

- *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems)
- PCR-reines Wasser (Sigma)
- 384 *Well*-Mikrotiter Platte (NUNC Apogent)
- *Primer / Probe Mix*: *Forward-Primer* (F), *Reverse-Primer* (R) und *Probe/Target* (T)

HSA-1: F: AGTTTGCAGAAGTTTCCAAGTTAGTG (900 nM)
T: ACATTCAAGCAGATCTCCATGGCAGCA (300 nM)
R: AGGTCCGCCCTGTCATCAG (300 nM)

HAT-1: F: TCGCTACAGCCTTTGCAATG (300 nM)
T: AGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGG (300 nM)
R: TTGAGGGTACGGAGGAGTTCC (300 nM)

HTF-2: F: GTGTATCAGCAGAGACCACCGA (300 nM)
T: TTCTCCATTCATGATCTTGGCGATGCA (300 nM)
R: CATCCAAGCTCATGGCATCA (900 nM)

HNF-4α: F: GCGATCCAGGGAAGATCAAG (50 nM)
T: TTCAAGCTCACCTGCACCTGGGA (300 nM)
R: CATACTGGCGGTCGTTGATGT (50 nM)

hGAPDH: F: AGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAA (300 nM)
 T: TGTTGCCATCAATGACCCCTTCATTG (300 nM)
 R: CATGGGTGGAATCATATTGGAAC (300 nM)

Durchführung der Realtime RT-PCR

Zu 1 µl cDNA Ansatz (Konzentration 50 ng/µl) wurden 5 µl *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 1 µl 10facher *Primer/Probe Mix* und 3 µl PCR-reines Wasser pipettiert.

Das Endvolumen von 10 µl pro Well einer 384 *Well*-Mikrotiter Platte durchlief in 40 Zyklen folgendes *Realtime RT-PCR* Protokoll:

Stufe	Temperatur [°C]	Dauer [min:sec]
Denaturierung	95	0:10
Primerhybridisierung/ Amplifikation	60	1:00
40 Wiederholungen		

Abbildung 2: TaqMan Realtime RT-PCR Protokoll

3.10 Immunoblot

Materialien für den Immunoblot

- *Elektrophoresis Buffer:* - 15,0 g Tris Base
 - 72,0 g Glycin
 - 5,0 g SDS
 - bis zu 500 ml mit deionisiertem H₂O auffüllen
 und bei 4 °C lagern
- *2x Sample Buffer:* - 1,0 ml *Glycerol*
 - 0,5 ml β-Mercaptoethanol
 - 3,0 ml 10 % SDS

- 1,25 ml 1 M Tris HCl, pH 6,7
 - 1,5 mg Bromphenol Blau
 - und in Aliquots einfrieren
- *Transfer Buffer:*
 - 2,91 g Tris Base
 - 1,47 g Glycin
 - 0,19 g SDS
 - 100 ml Analytical Grade Ethanol
 - bis zu 500 ml mit deionisiertem H₂O auffüllen
 - und bei 4 °C lagern
- *Washing Buffer (10x):*
 - 45,0 g NaCl
 - 50 ml Tris-HCl, pH 8,0
 - bis zu 500 ml mit deionisiertem H₂O auffüllen
 - und bei 4 °C lagern
- *Washing Buffer (1x):*
 - 10 ml *Washing Buffer (10x)*
 - 90 ml deionisiertes H₂O
 - 50 µl Tween-20
 - und bei 4 °C lagern
- *Blocking Buffer:*
 - 50 ml 1x *Washing Buffer*
 - 2,5 g Proteinpulver (*Resource*)
 - und bei 4 °C lagern
- *Stripping Buffer:*
 - 2,0 ml 10 M NaOH
 - 98 ml deionisiertes H₂O
- *Trenngelbuffer:*
 - 18,17 mg 1,5 M Tris HCl
 - 0,4 g 0,4 % SDS
 - 90 ml deionisiertes H₂O
 - pH auf 8,8 mit 1 M NaOH und 1 M HCl einstellen
 - bis zu 100 ml mit deionisiertem H₂O auffüllen
 - und bei 4 °C lagern
- *Sammelgelpuffer:*
 - 6,05 g Tris HCl
 - 0,4 g 0,4 % SDS
 - 90 ml deionisiertes H₂O

- pH auf 6,7 mit 1 M NaOH und 1 M HCl
einstellen
- bis zu 100 ml mit deionisiertem H₂O auffüllen
und bei 4 °C lagern

- Minigelkammer (BioRad)
- 40 % Acrylamid
- 10 % SDS
- 10 % Ammoniumpersulfat/APS
- TEMED
- 70 % Ethanol
- mit H₂O gesättigtes Butanol
- *RIPA Buffer*
- PCR System 9700 (GenAmp)
- *Benchmarker* (Invitrogen)
- *Molecular Weight Marker* (Cruz Marker, sc-2035)
- Blottingkammer (BioRad)
- Blottingfilter und –membran (BioRad Blottingsandwich, Nitrocellulose 0,45 µm, *extra thick Blotting Paper*)
- Schüttler (GFL)
- Primäre Antikörper:
 - HNF4α (sc- 6556)
 - α1Antitrypsin (DAKO #A0012)
 - Albumin (DAKO #A0001)
 - Aktin (sc- 8432)
- Sekundäre Antikörper:
 - *Donkey anti-Goat* (sc-2020)
 - *Goat anti-Rabbit* (sc-2030)
 - *Goat anti-Mouse* (sc-2031)
- Filmkassette (Rego NPR, 18 x 24)
- Röntgenfilm (Fuji Medical Super RX X-Ray Film)
- ECL Reagenz (*Western Blotting Analysis System*, Amersham Pharmacia Biotech)

Durchführung des Immunoblots

Zuerst wurde die Minigelkammer vorbereitet, indem die Säuberung der Glasscheiben mit 70-%igem Ethanol erfolgte und der Zusammenbau auf seine Dichtigkeit mit H₂O geprüft worden war. Währenddessen wurde das 12,5-%ige Trenngel mit 2,35 ml 40 % Acrylamid, 1,87 ml Trenngelpuffer, 3,13 ml destilliertem H₂O, 75 µl 10 % SDS, 75 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS) und 3,75 µl TEMED hergestellt und die Kammer nach Entleeren von Aqua dest. mit dem Trenngelansatz gefüllt. Um den gleichmäßigen und horizontalen Abschluss des Trenngels nach oben zu gewährleisten, wurden 80 µl mit H₂O gesättigtes Butanol auf das Trenngel pipettiert. Der Polymerisationsprozess dauerte 25 min. In dieser Zeit wurde das Sammelgel mit 250 µl 40 % Acrylamid, 625 µl Sammelgelpuffer, 1,6 ml destilliertem H₂O, 25 µl SDS, 25 µl Ammoniumpersulfat (APS) und 5 µl TEMED fertig gestellt. Das Butanol wurde abgegossen und das durch das Trenngel ausgesparte obere Drittel der Kammer mit dem Sammelgelpuffer aufgefüllt. Ein 15-Taschenkamm wurde anschließend vorsichtig in das Gel geschoben. Die fertige Gelkonstruktion wurde in die Kammer gesteckt und mit dem Elektrophoresepuffer ausreichend aufgefüllt.

Die Proteinproben der Zellen wurden wie folgt vorbereitet:

Das Ziel war es, 20 µg Proteinprobe pro Geltasche aufzutragen und ein Verhältnis von Probe zu 2x *Sample Buffer* von 1:1 zu erhalten. Es wurde mit einem Endvolumen von 40 µl gearbeitet. Die Differenz zwischen berechnetem Volumen und Endvolumen wurde mit *RIPA Buffer* ausgeglichen. Zügig danach wurden die Ansätze für 3 min auf 90 °C erhitzt.

35 µl Zelllysate der vorbereiteten Proben sind in die entsprechenden Taschen pipettiert worden. Als optische Bezugsgrößen auf dem Gel, respektive auf den Röntgenfolien, dienten 10 µl *Benchmark* und 5 µl *Molecular Weight Marker* in jeweils einer Tasche. Die Taschen mussten vor dem Beladen sorgfältig vorgespült werden und das Pipettieren erfolgte luftblasenfrei.

Die Proteinproben in dem Gel sammelten sich nach 15 min bei 90 V auf einer Höhe. Nach weiteren 45 min bei 211 V waren die Zelllysate vollständig aufgetrennt.

Im nächsten Schritt wurden die in für 15 min in Transferpuffer gelagerten Blottingfilter und –membranen sowie das Gel auf die zuvor sorgfältig gesäuberte und mit Transferpuffer befeuchtete Platte der Blottingkammer wie folgt gelegt:

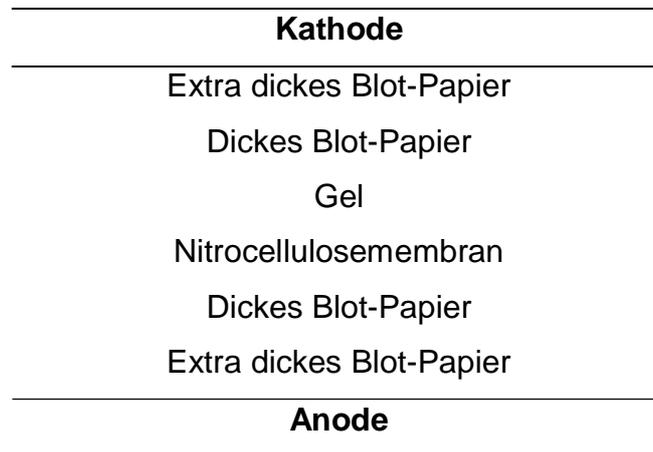


Abbildung 3: Immunoblot Schema

Die Blottingzeit betrug 1,5 h und die Stromstärke 85 mA.

Nach vorsichtiger Säuberung mit H₂O wurde die Membran in 20 ml *Blocking Buffer* auf einem Schüttler bei Raumtemperatur geblockt.

Folgende Primärantikörper wurden im nächsten Schritt verwendet:

Primärer Antikörper	Verdünnung in Blockingbuffer
HNF-4α (sc- 6556) / <i>Goat</i>	1:200
α1-Antitrypsin (DAKO #A0012) / <i>Rabbit</i>	1:1000
Albumin (DAKO #A0001) / <i>Rabbit</i>	1:1000
Aktin (sc- 8432) / <i>Mouse</i>	1:100

Abbildung 4: Primäre Antikörper und Konzentrationen

Die Nitrocellulosemembran wurde für 1 h in 10 ml Primärantikörperlösung inkubiert und danach dreimal für 10 min mit 1x *Washing Buffer* bei Raumtemperatur gewaschen.

Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 45 min nach dargestelltem Schema; wiederum bei Raumtemperatur:

Sekundärer Antikörper	Verdünnung in Blockingbuffer
<i>Donkey anti-Goat</i> (sc- 2020)	1:1000
<i>Goat anti-Rabbit</i> (sc- 2030)	1:1000
<i>Goat anti-Mouse</i> (sc- 2031)	1:1000

Abbildung 5: Sekundäre Antikörper und Konzentrationen

Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran viermal 10 min mit 1x *Washing Buffer* von nicht gebundenem sekundärem Antikörper gereinigt.

Für die Detektion wurden jeweils 600 µl ECL Reagenz I und II zusammen pipettiert, auf die in einer Fotokassette liegende Membran gleichmäßig verteilt und nach 1 min vorsichtig mit Zellstoff entfernt. Die Belichtungszeit war 3 min.

Für die Strippingprozedur wurde zu Beginn die Cellulosemembran 5 min in deionisiertem H₂O gewaschen und anschließend 5 min in 50 ml *Stripping Buffer* geschüttelt. Nachdem die Membran ein zweites Mal 5 min gewaschen worden war, konnte mit dem ersten Schritt der Immunodetektion, des Inkubierens mit *Blocking Buffer* 60 min, begonnen werden.

3.11 Analyse der Zellproliferation

Materialien für die Analyse der Zellproliferation

- *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega)
- 96 Well-Mikrotiterplatte (NUNC Apogent)
- *Ultra Microplate Reader EL 808* (Bio Tek Instruments)
- Geneticin G418 Selektionsmedium

Durchführung der Proliferationsanalyse

Am ersten Tag wurden in die Felder A1 bis H6 einer 96 *Well*-Mikrotiterplatte jeweils 5000 mit dem Kontrollvektor transfizierte FHB PD 150 Zellen in 100 µl FH-Medium und in die Felder A7 bis H12 jeweils 5000 mit pcDNA-HNF4α stabil transfizierte FHB PD 150 Zellen in 100 µl G418 Selektionsmedium pipettiert.

Nach 16-24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden am zweiten Tag die Wells der ersten und die der siebten Spalte mit jeweils 20 µl *CellTiter 96 AQueous One Solution Reagenz* für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die Absorption bei 490 nm in dem *Ultra Microplate Reader EL 808* gemessen und damit ein Maß für die Zellzahl bestimmt werden. Die optische Dichte wurde des Weiteren an den Tagen 4, 6, 8, 10 und 12 ermittelt.

3.12 Microarray

Expressionsanalytik

Für das Expressionsmuster von Zellen konnte die *Microarray* Technologie zur Hilfe genommen werden. Hierbei wurde die Expressionsrate von FHB pcDNA3.1 vs. FHB pcDNA-HNF4α miteinander verglichen. Die Expressionsanalyse mittels Microarray wurde in Kooperation mit der Abteilung Klinische Chemie durchgeführt.

Protokoll

- *One Cycle Protocol*
- Startmenge: 15 µg total RNA
- *cDNA-Synthese: IVT Labeling Kit (Affymetrix)*
- *Array: Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix)*
- Software:
 - GCOS 1.4
 - *Target Value Scaling: - Target Value: 300*

3.13 Statistik

Die gewonnenen Datensätze wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben und mit der Software Microsoft Excel[®] berechnet. Zur Signifikanztestung sind die Ergebnisse dem Zweistichproben t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen unterzogen worden. Für das Signifikanzniveau wurde der p-Wert $<0,05$ verwendet. Den durchgeführten Experimenten und Messungen lagen jeweils mindestens Triplet-Ansätze zu Grunde und es wurden mehrere Wiederholungen vorgenommen.

4 Abbildungen und Ergebnisse

4.1 *Plasmidpropagierung und -präparation in E.coli*

Die nach der Plasmidpropagierung und –präparation gewonnenen Vektoren zeigten bei der Konzentrationsbestimmung eine $^{260}/_{280}$ Ratio von 1,81 und konnten für eine Transfektion genutzt werden.

4.2 *Plasmidcharakterisierung mittels EcoR1 Restriktionsverdau*

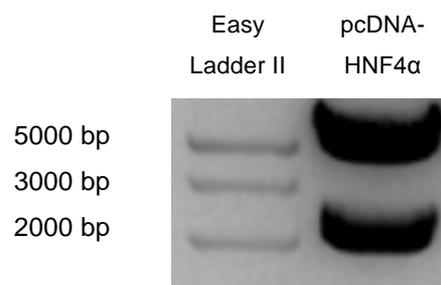


Abbildung 6: Plasmidcharakterisierung mittels Gelelektrophorese

Das mit der Restriktionsendonuklease *EcoR1* aus dem pcDNA-Plasmid heraus getrennte HNF4α Fragment besaß eine Größe von 2299 Basenpaaren. Auf der Abbildung ist ebenso das aus 5446 Basenpaaren bestehende linearisierte pcDNA3.1 Plasmid ohne *Insert* erkennbar und stellte somit die Qualität der propagierten Plasmide sicher.

4.3 RNA Extraktion aus den transfizierten fetalen Hepatozyten

Die aus den kultivierten HEP G2 und den mit pcDNA3.1 und pcDNA-HNF4 α nukleofizierten FHB PD 150 Zellen gewonnene RNA ergab bei den Konzentrationsbestimmungen eine $^{260}/_{280}$ Ratio von mindestens 1,6.

4.4 Quantitative Realtime RT-PCR von HNF4 α

Nach stabiler Transfektion wurde mittels *Realtime RT-PCR* und der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ein signifikanter Anstieg der Expression von HNF4 α in FHB-HNF4 α Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle (FHB-pcDNA3.1) beobachtet (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Zellen	ΔCt HNF4 α - GAPDH	$\Delta\Delta\text{Ct}$ vs. FHB- pcDNA3.1	Relative Expression HNF4 α
FHB-pcDNA3.1	11,32 \pm 0,43		1
FHB-HNF4 α	1,43 \pm 0,68	-9,89 \pm 0,80	949 (545-1652)
HEP G2	6,91 \pm 0,50	-4,41 \pm 0,66	21 (6-80)

Tabelle 1: Relative Expression, HNF4 α

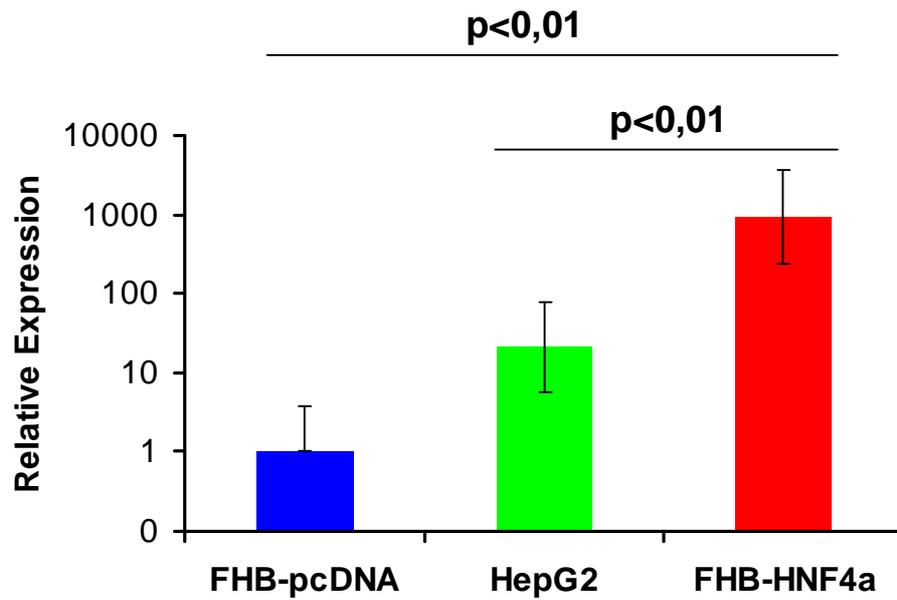


Abbildung 7: Relative Expression, HNF4α

4.5 Immunoblot Analyse von HNF4α

Die aus der nukleären Proteinextraktion gewonnenen Proben wurden auf die Expression von HNF4α hin in einem Immunoblot analysiert. Als Positivkontrollen wurden Hep G2 Zellen verwendet. Hierbei zeigte sich eine positive Bande für HNF4α in FHB-HNF4α. In der anschließenden Densitometrie konnte der Nachweis von HNF4α in FHB-HNF4α erhärtet werden.

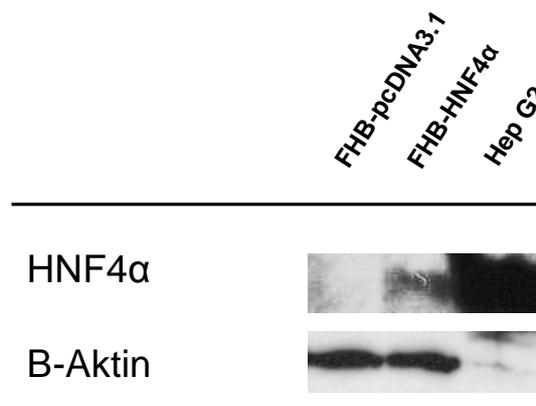


Abbildung 8: Immunoblot, HNF4α

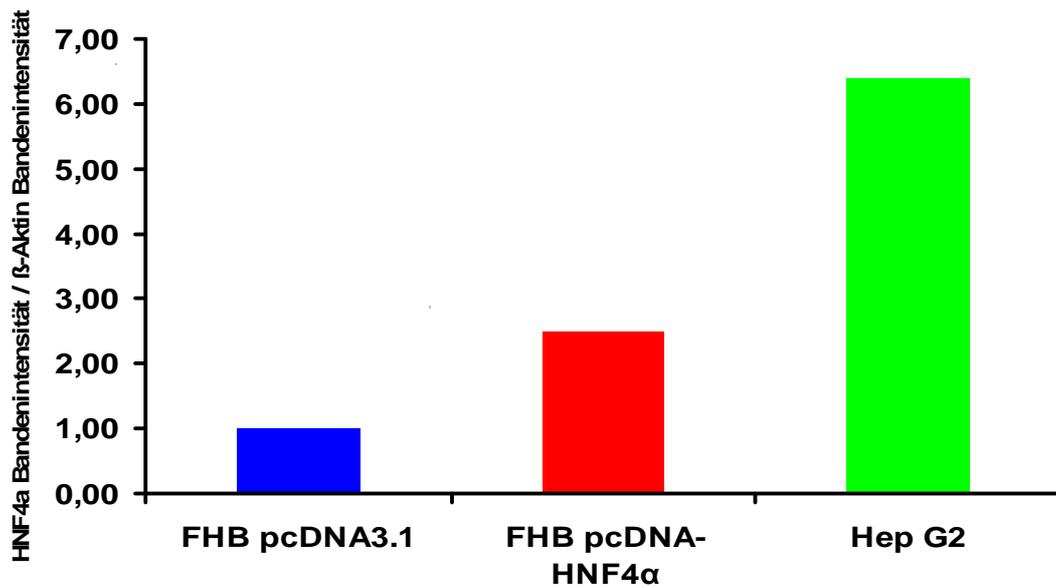


Abbildung 9: Grafische Darstellung, Immunoblot, HNF4α

4.6 Quantitative Realtime RT-PCR von α1-Antitrypsin

Im Vergleich zur Vektorkontrolle (FHB-pcDNA3.1) zeigte sich in FHB-HNF4α Zellen ein signifikanter Anstieg der HAT Expression (Mittelwert ± Standardabweichung).

Zellen	ΔCt HAT- GAPDH	ΔΔCt vs. FHB- pcDNA3.1	Relative Expression HAT
FHB-pcDNA3.1	9,25±0,24		1
FHB-HNF4α	1,58±0,52	-7,67±0,57	204 (137-302)
HEP G2	-0,69±0,32	-9,94±0,40	982 (744-1296)

Tabelle 2: Relative Expression, HAT

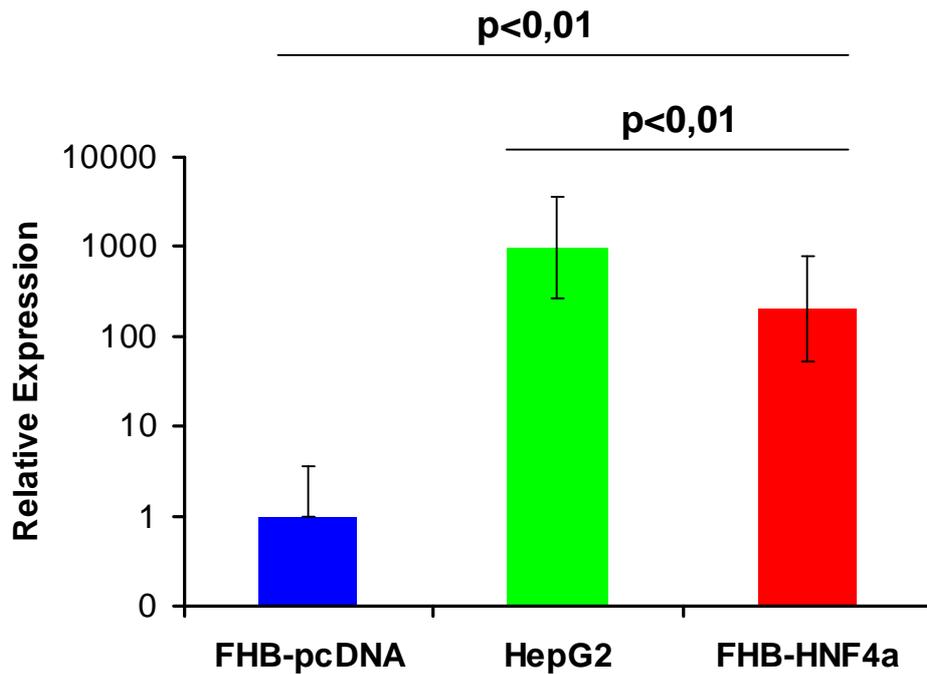


Abbildung 10: Relative Expression, HAT

4.7 Immunoblot Analyse von α 1-Antitrypsin

Die aus Zellyse gewonnenen Proteinextraktionen wurden auf die Expression von HAT hin in einem Immunoblot analysiert. Als Positivkontrollen wurden Hep G2 Zellen verwendet. Hierbei zeigte sich eine positive Bande für HAT in FHB-HNF4 α . In der anschließenden Densitometrie konnte der Nachweis von HAT in FHB-HNF4 α erhärtet werden.

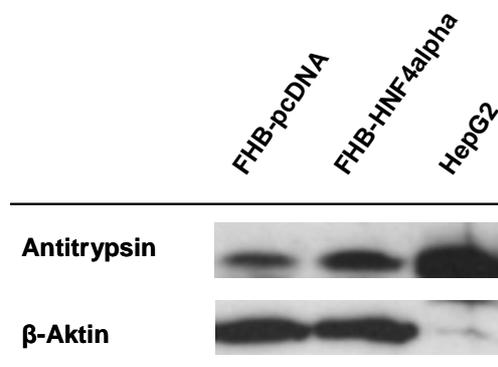


Abbildung 11: Immunoblot, HAT

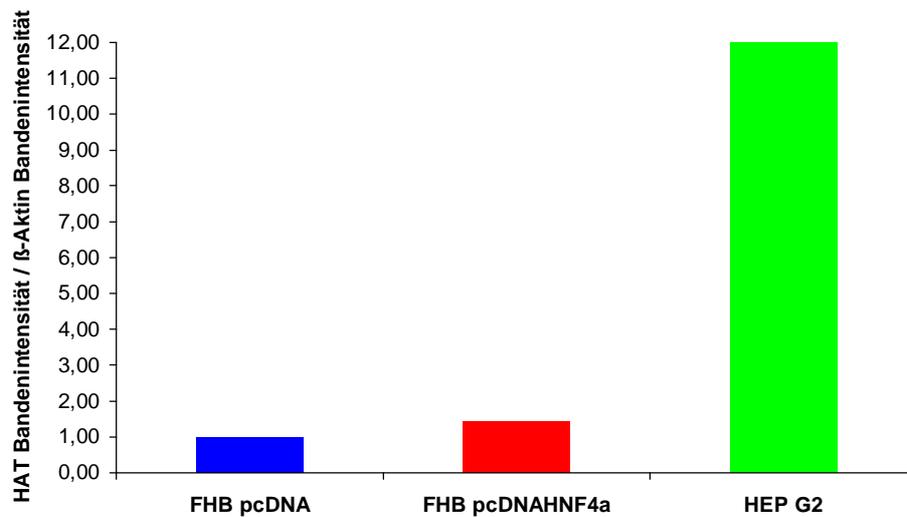


Abbildung 12: Grafische Darstellung, Immunoblot, HAT

4.8 Quantitative Realtime RT-PCR von Transferrin

Für HTF fand sich in FHB-HNF4 α Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle (FHB-pcDNA3.1) ein signifikanter Anstieg der Expression (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Zellen	Δ Ct HTF- GAPDH	$\Delta\Delta$ Ct vs. FHB- pcDNA3.1	Relative Expression HTF
FHB-pcDNA3.1	11,53 \pm 1,23		1
FHB-HNF4 α	6,53 \pm 0,15	-5,00 \pm 1,24	32 (14-76)
HEP G2	-0,72 \pm 0,41	-12,25 \pm 1,30	4871 (1978- 11994)

Tabelle 3: Relative Expression, HTF

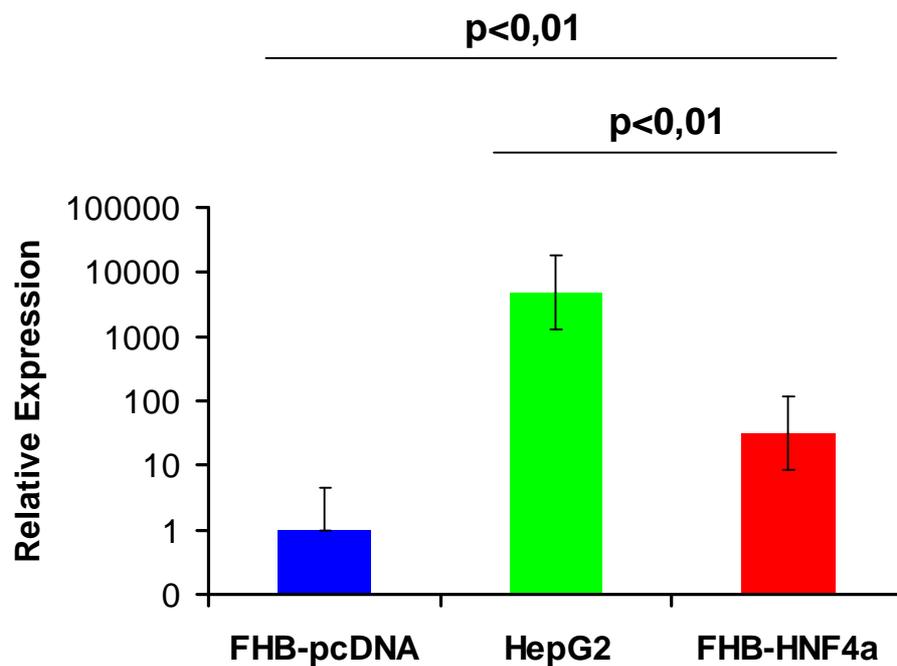


Abbildung 13: Relative Expression, HTF

4.9 Quantitative Realtime RT-PCR von Serumalbumin

Für HSA konnte kein signifikanter Anstieg der Expression in FHB-HNF4 α Zellen nachgewiesen werden (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Zellen	Δ Ct HSA- GAPDH	$\Delta\Delta$ Ct vs. FHB- pcDNA3.1	Relative Expression HSA
FHB-pcDNA3.1	15,08 \pm 0,11		
FHB-HNF4 α	15,90 \pm 0,63	0,82 \pm 0,64	1
HEP G2	-1,27 \pm 0,03	-16,35 \pm 0,11	83529(77398- 90147)

Tabelle 4: Relative Expression, HSA

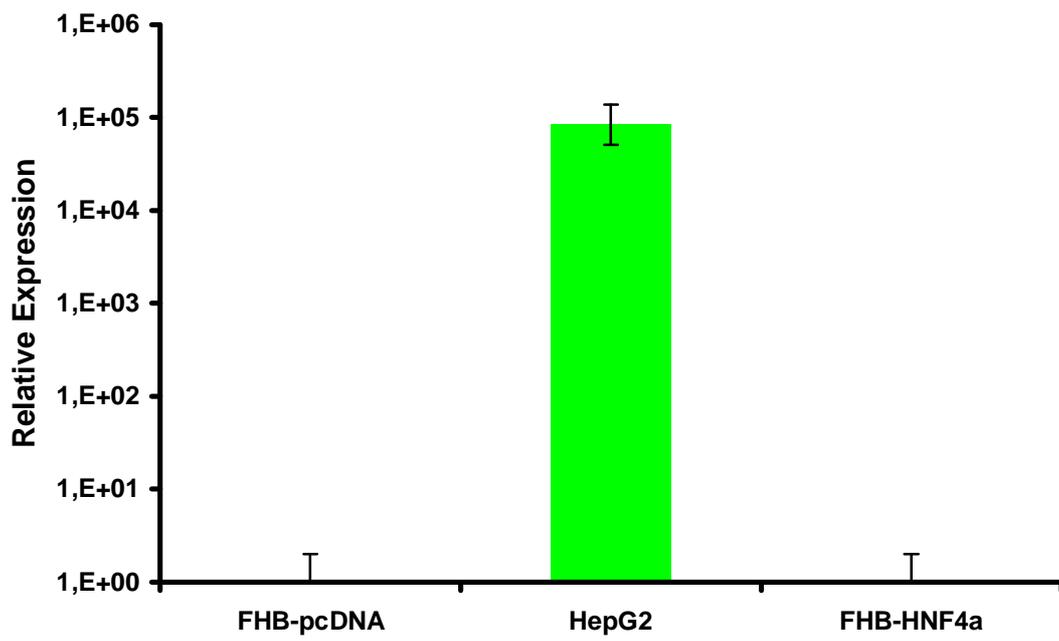


Abbildung 14: Relative Expression, HSA

4.10 Analyse der Zellproliferation

In einem zwölftägigen Wachstumsassay (*CellTiter96*) wurde die Proliferation von FHB-HNF4 α Zellen mit Kontrollzellen (FHB-pcDNA3.1) verglichen. Nach Normierung zeigten die FHB-HNF4 α Zellen eine verminderte Proliferation mit Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit im Verlauf des Experiments.

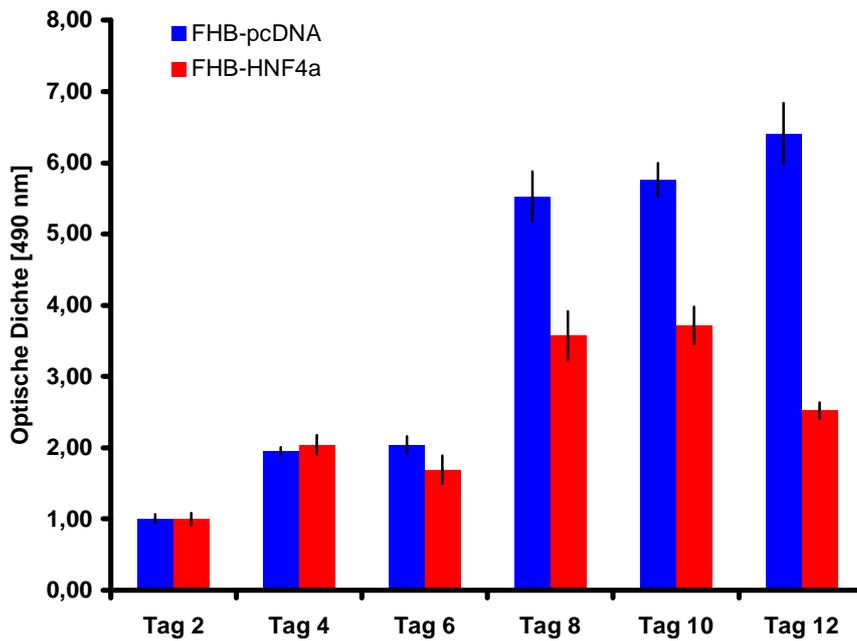


Abbildung 15: Zellproliferation

4.11 Microarray

4.11.1 Relative Expression

Da von der HNF4 α -Expression die Expression mehrerer Gene abhängt, wurde ein Expressionsmuster mittels Microarray erstellt. In den folgenden Darstellungen sind die relativen Expressionen nach Transfektion mit HNF4 α im Vergleich zur Vektorkontrolle zu sehen. Hierbei wurden jeweils die 16 höchsten Zunahmen (Tabelle 5) bzw. größten Abnahmen (Tabelle 6) im Expressionsprofil berücksichtigt. Des Weiteren sind die positiven und negativen Fehlerindikatoren aufgetragen.

	Relative Expression FHB HNF4 α vs. FHB pcDNA3.1 Signal Log Ratio	FHB HNF4 α vs. FHB 3.1 Signal Log Ratio Low	FHB HNF4 α vs. FHB 3.1 Signal Log Ratio High
1	HNF4a (hepatocyte nuclear factor 4, alpha)	5,3	2,4
2	Kollagen Type IV, alpha	4,8	1,5
3	HNF4a (hepatocyte nuclear factor 4, alpha)	4,7	1,9
4	V-erb-b2 (erythroblast leukemia viral oncogene homolog 3)	3,9	2,3
5	TRIM69 (Tripartite motif-containing 69)	3,7	2,3
6	Transcribed locus	3,4	1,3
7	Septin 4	3,3	2,3
8	PCDHA Protocadherin alpha 9	3,2	2,2
9	Sperm associated antigen 8	2,8	1,9
10	Alpha-2-Glycoprotein, Zinc binding	2,8	0,9
11	Gap junction protein 5a	2,6	1,0
12	OLR Oxidized low density lipoprotein (lectin like receptor)	2,4	0,8
13	Serum Amyloid A1	2,3	1,9
14	H19 (imprinted maternally expressed untranslated mRNA)	2,3	0,3
15	UDP-Gal, Beta 1,3 Galactosyltransferase	2,2	1,0
16	Kollagen Type IV, alpha	2,2	0,8

Tabelle 5: Expressionsmuster mittels HNF4 α Aktivierung

	FHB HNF4a vs. FHBpcDNA3.1 Signal Log Ratio	FHB HNF4a vs. FHBpcDNA3.1 Signal Log Ratio Low	FHB HNF4a vs. FHBpcDNA3.1 Signal Log Ratio High
1 Tissue Factor pathway inhibitor 2	-4,3	0,8	0,8
2 Amphiregulin	-2,5	0,3	0,4
3 Hydroxy steroid 11-beta Dehydrogenase 1	-2,4	0,5	0,4
4 Matrix Metallopeptidase 1	-2,3	0,8	0,9
5 cAMP responsive Element Binding Protein 5	-2,3	0,8	0,7
6 SPOC Domain containing 1	-2,3	0,7	0,7
7 235417_at	-2,3	0,9	0,9
8 Regulator of G-Protein signaling 4	-2,2	0,2	0,2
9 Ventricular Zone expressed PH domain homolog (Zebrafish)	-2,2	0,8	0,9
10 Dual Specificity Phosphatase 4	-2,1	0,5	0,5
11 Secretogranin II (Chromogranin C)	-2,1	0,8	0,8
12 Kynureninase	-2,1	0,6	0,5
13 cAMP responsive Element Binding Protein 5	-2,1	0,8	0,7
14 Transglutaminase 2	-2,0	0,4	0,3
15 5'-Nucleotidase (CD73)	-2,0	0,1	0,2
16 Hepatocyte Growth Factor (Hepapoetin A)	-2,0	0,3	0,3

Tabelle 6: Expressionsmuster mittels HNF4 α Inhibierung

5 Diskussion

5.1 Expression von HNF4 α

HNF4 α wird als zentraler Initiationspunkt der Hepatozytendifferenzierung angesehen. In dieser Arbeit ist es das Ziel, durch die ektopische Expression von HNF4 α einen hepatischen Pänotyp in Telomerase-immortalisierten Hepatozyten zu erreichen.

Als erster Schritt erfolgte die Transfektion mit dem dem Vektor pcDNA-HNF4 α . Das Plasmid ist zuvor in *E.coli* Bakterien propagiert und mittels Restriktionsverdau kontrolliert worden. Nach erfolgreicher Transfektion wurde zunächst die relative Expression von HNF4 α auf mRNA-Ebene gemessen. Die hierfür etablierte Methode ist die *Realtime RT-PCR* in Verbindung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierbei wird das Verhältnis der Expression eines Zielgens zwischen behandelten und unbehandelten Zellen berechnet. Des Weiteren wird die mRNA des Zielgens zuvor mit einem so genannten *Housekeeping-Gen* normalisiert, um mögliche Mengenunterschiede in der cDNA zu egalisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (hGAPDH) als *Housekeeping-Gen* verwendet, welches einer konstitutiven Genexpression unterliegt.

Die normalisierte relative Expression von HNF4 α in FHB-HNF4 α zeigte eine signifikante 2-3 log-Stufen Erhöhung im Vergleich mit FHB-pcDNA3.1. Es konnte somit nach einer erfolgreichen Nukleofektion auch die ektopische Überexpression des Transgens (HNF4 α) nachgewiesen werden.

Anhand einer zweiten Methode, dem Immunoblot, wurde anschließend auch sichergestellt, dass aus der mRNA via Translation das entsprechende Protein synthetisiert worden ist. Eine Bande für HNF4 α konnte nach Normalisierung mit beta-Aktin in FHB-HNF4 α Zellen nachgewiesen werden.

Die deutliche Überexpression von HNF4 α muss unter dem Aspekt der Genexpressionsregulation durch diverse Einflussgrößen betrachtet werden. HNF4 α als Teil eines Netzwerkes von hepatozytären Transkriptionsfaktoren wird die Rolle des Schlüsselproteins zugeschrieben (Kuo et al., 1992).

Allerdings finden ebenfalls Kreuz- sowie Autoregulationen der einzelnen Faktoren untereinander statt (Ktistaki and Talianidis, 1997). Beispielhaft kann HNF1 α genannt werden. In einer Studie von Zhong et al. wurde eine funktionale Bindungsstelle proximal zur Promoterregion von HNF4 α entdeckt (Zhong et al., 1994). In einer weiteren Untersuchung der Arbeitsgruppe Hatzis et Talianidis im Jahre 2001 ließ sich eine Erhöhung der Aktivität der Promoterregion von HNF4 α durch den Synergismus von HNF1 α und HNF6 respektive HNF1 β und *GATA binding Protein 6* (GATA6) nachweisen (Hatzis and Talianidis, 2001). Eine Repression der Regulation konnte in derselben Arbeit für den *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcriptionfactor 2* (COUP-TFII), welcher an die *Direct Repeat 1* (DR 1) Sequenz bindet, gezeigt werden (Hatzis and Talianidis, 2001).

Es stellt sich damit die Frage, inwiefern eine ektopische Expression von HNF4 α bei initial erhöhten intrazellulären Konzentrationen von HNF1 α , -1 β , -6 und GATA6 im Zellkern gesteigert werden kann. Auch könnte aus einer Co-Transfektion von HNF4 α und HNF1 α / β möglicherweise eine effizientere Expressionsrate resultieren.

Die Differenz der Expressionsprofile von mRNA zu Protein ist ein weiterer Aspekt, der diskutiert werden muss. Die Immunoblotergebnisse wurden aus nukleären Proteinextrakten gewonnen. Ein möglicher Transport aus dem Zellkern ins Cytosol oder ein rascher Abbau des Proteins könnten hierfür eine Ursache sein.

5.2 Expression von α 1-Antitrypsin

Nach erfolgreicher HNF4 α Überexpression wurde konsekutiv das Serumglykoprotein, α 1-Antitrypsin, als eines der Zielgene von HNF4 α untersucht. Eine signifikante, 204fache Überexpression konnte mittels der $\Delta\Delta$ Ct-Methode für α 1-Antitrypsin in FHB-HNF4 α im Vergleich zu FHB-pcDNA3.1 nachgewiesen werden. Nachfolgend konnte auch eine Bandenintensitätszunahme im Immunoblot nach Normalisierung mittels β -Aktin gefunden werden.

Das Serumglykoprotein α 1-Antitrypsin inhibiert in seiner physiologischen Funktion die neutrophilen Proteasen Elastase, Cathepsin G und Proteinase 3 (Hu and Perlmutter, 1999). Als solch ein Inhibitor gehört es zu der Gruppe der Serin Proteinase Inhibitoren (SERPINs), die wiederum Teil der Gruppe der Akute Phase Proteine sind.

Akute Phase Proteine nehmen an Konzentration im Verlauf einer Entzündung des Organismus zu. α 1-Antitrypsin erreicht zum Beispiel einen 3-4fach höhere Konzentration, die via induktiver Genexpression durch Interleukin 6 (IL-6) respektive auf Transkriptionsebene durch NF-IL6 entsteht (Morgan and Kalsheker, 1997). Die konstitutive α 1-Antitrypsin Genexpression wird mittels eines synergistischen Effekts von HNF1 α und HNF4 α auf Transkriptionsebene reguliert (Kalsheker et al., 2002).

Auch im Fall von α 1-Antitrypsin kann festgestellt werden, dass die 204fach erhöhte Genexpression möglicherweise nach einer Co-Transfektion mit HNF1 α gesteigert werden könnte. Daher dürfte nicht nur ein additiver Effekt messbar sein, denn bei einem zusätzlichen positiven Einfluss von HNF1 α auf die Genexpression von HNF4 α (siehe oben) wäre ein potenziertes Ergebnis denkbar. Inwiefern die 3-4fach erhöhte induktive Genexpression durch IL-6 während einer Inflammation in vivo eine Rolle spielt, muss im Mausmodell nachgewiesen werden.

5.3 Expression von Transferrin

Bei einem weiteren Zielgen, dem Transferrin, konnte wiederum mittels der $\Delta\Delta$ Ct-Methode eine relative Vervielfachung in der Genexpression festgestellt werden. In diesem Fall ergab die Realtime RT-PCR eine signifikante 32fache Überexpression.

Transferrin wird von den Hepatozyten in den Blutkreislauf sezerniert und gewährleistet den Eisentransport im Blut. Des Weiteren dient es auch als Wachstumsfaktor für eine Vielzahl von Zellen im menschlichen Organismus.

Die für die Genregulierung von Transferrin bestimmten Genloci, proximale Promotorregionen I und II (PR I und PR II), werden in humanen Hepatozyten

durch HNF4 α , den COUP-TF sowie CCAAT/*enhancer-binding proteins* (C/EBPs) gesteuert (Schaeffer et al., 1993). Diese Arbeit konnte zeigen, dass hauptsächlich HNF4 α , C/EBPs- α , C/EBPs- γ und in einem geringeren Maße COUP-TF die Genexpression von humanem Transferrin stimulieren. Eine wichtige Rolle spielt auch die *Enhancer Region* des Transferringens. Zakin et al. konnten eine positiv stimulierende Funktion von HNF3 α diesbezüglich aufdecken (Zakin, 1992).

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass mittels Transfektion von HNF4 α eine gesteigerte Expression von Transferrin erzielt werden konnte. Die Rolle von HNF3 α könnte auch hierbei eine Fragestellung für zukünftige Differenzierungsmodelle von Hepatozyten im Rahmen einer Co-Transfektion darstellen.

5.4 Expression von Serumalbumin

Um im Umkehrschluss feststellen zu können, ob Gene ohne eine Bindungssequenz für HNF4 α eine Veränderung in der Expressionsrate erfahren haben, wurde Serumalbumin untersucht. Die *Realtime RT-PCR* ergab erwartungsgemäß keine signifikante Überexpression von Serumalbumin im Vergleich der beiden Zelllinien FHB-HNF4 α - und FHB-pcDNA.

Serumalbumin spielt eine bedeutende Rolle im menschlichen Organismus. Es stellt einen Anteil von bis zu 60% der Plasmaproteinmenge dar. 25 % der synthetisierten Proteine der Leber sowie die Hälfte der hepatisch sezernierten Proteine entfallen auf Albumin. Als wichtigste Funktionen sind, aufgrund der hohen Quantität im Blut, die Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes in den Gefäßen und der Ligandentransport zu nennen. Unter anderem werden freie Fettsäuren, Calcium, Steroidhormone, Bilirubin oder Medikamente gebunden. (siehe auch: *Plasma Proteins and Immunglobulins, Chapter 49, Section VI, Special Topics, Lange Biochemistry, Robert K. Murray, MD, PhD, AccessMedicine*).

Auf Transkriptionsebene konnten einige stimulierende Faktoren der Serumalbumin-Genexpression identifiziert werden: HNF-1, der CCAAT

Bindingfactor NFY (oder ACF), *C/EBP*, *D Site Binding Protein* (DBP), und das *Nuclear Factor I (NFI)-related protein* (Johnson, 1990).

Seit langem ist schon bekannt, dass die Albuminsynthese durch systemische Faktoren im Organismus induziert bzw. inhibiert werden kann. Im Stadium einer inadäquaten Ernährungslage, bei Tumorleiden, in Gegenwart von Hepatotoxinen und bei erhöhtem kolloidosmotischem Druck wird die Genexpression von Albumin inhibiert. Vor allem die Messung des kolloidosmotischen Drucks scheint einen Hauptanteil an der Expressionsregulation von Albumin einzunehmen (Rothschild et al., 1988).

Aus dieser Arbeit resultiert die Annahme, dass mit HNF4 α keine Albuminsynthese in den fetalen Hepatozyten stimuliert werden kann. Vielmehr muss, um einen leberspezifisch differenzierten Phänotyp zu erhalten, die Konzentration von HNF-1, C/EBP, DBP und *NFI-related Protein* gesteigert werden. Dies könnte unter anderem wiederum durch eine Co-Transfektion erreicht werden. Als zweiter Aspekt muss sicherlich *in vitro* berücksichtigt werden, dass der kolloidosmotische Druck der Nährmedien keine Induktion der Genexpression fördert. Für den Einfluss von HNF4 α als Regulationsgröße auf die Albuminsynthese ist ein *in vivo* Modell erforderlich.

5.5 Zellproliferation

Im nächsten Schritt zur Überprüfung des Wandels zum hepatischen Phänotyp sollte die Proliferationsgeschwindigkeit der FHB Zellen dienen. Das zellbiologische Phänomen, je differenzierter sich eine Zelle im Phänotyp zeigt, desto geringer ist ihre Wachstumsgeschwindigkeit, wurde vorausgesetzt. Für diesen Fall kam der *CellTiter96* Wachstumsassay zum Einsatz, bei dem die Zellpopulation jeden zweiten Tag in ihrer optischen Dichte bei 490 nm gemessen wurde. Die optische Dichte wiederum korreliert mit der Zellzahl. Verglichen wurden FHB-HNF4 α mit der Kontrollzelllinie FHB-pcDNA3.1 über einen Zeitraum, in dem sich nach Normierung am Tag 10 eine signifikante Differenz in der Dichtemessung ergab. Schlussfolgernd kann eine Abnahme in der Proliferationsgeschwindigkeit von FHB-HNF4 α nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis deutet einen differenzierteren Phänotyp nach Nukleofektion von HNF4 α an.

5.6 *Microarray*

Die *Microarray* Technologie ist imstande die Expressionsdynamik auf mRNA Ebene zwischen zwei Zelllinien zu vergleichen. In der Ergebnisauswertung wurden die jeweils sechzehn größten Zunahmen bzw. Abnahmen des Transkriptionsprofils von FHB-HNF4 α zu FHB-pcDNA3.1 dargestellt und im Folgenden werden die relevanten Bezüge zur Leber bzw. zu den Hepatozyten erläutert.

5.6.1 Abnahmen

- Die größte Abnahme zeigte sich bei der Transkription der mRNA vom *Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI). Bei diesem Protein handelt es sich um ein Enzym, das negativ in die Koagulation, Angiogenese und Inflammation eingreift. In den Blutkreislauf wird dieses durch die Induktion von niedermolekularem Heparin sezerniert. Vor allem im Rahmen von malignen Prozessen wurden diese Phänomene beobachtet (Mousa and Petersen, 2009).
- Ebenfalls hat die Expression von Amphiregulin stark abgenommen. Amphiregulin gehört mit dem *Epidermal Growth Factor* (EGF), dem *Transforming Growth Factor alpha* (TGF α), dem heparinbindenden EGF (HB-EGF) und dem Epiregulin (EREG) zur Gruppe der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-Liganden. Die AmphiregulinKonzentration steigt im Rahmen einer chronischen Leberschädigung respektive Hepatitis, in der Leberregeneration und nach Leberteilresektion an (Berasain et al., 2009a). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression im Speziellen durch Interleukin 1 β und Prostaglandin E₂ induziert beziehungsweise durch *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) und IL-6 inhibiert wird. Im Allgemeinen kann Amphiregulin eine Teilfunktion in der initialen Phase der Leberregeneration zugeteilt werden (Berasain et al., 2005).

Die Daten legen eine Abnahme der Zellproliferation nahe. Möglicherweise ist unter dem Aspekt der Differenzierung die Proliferation teillinhibiert. Auch stellt sich die Frage der in vivo vorhandenen Regulationsmechanismen, die in der Zellkultur nicht vorlagen.

- Die mRNA Konzentration von 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 zeigte ebenfalls eine Abnahme. Enzymatisch sorgt das Protein in den Mikrosomen der Leber für die Katalyse von aktivem Cortison in inaktives Cortisol (Muller et al., 2006). Metabolisch greift es hierdurch in den Fettstoffwechsel ein und es wird postuliert, dass erhöhte Konzentrationen primär zu gesteigerten Blutfettparametern und sekundär zu Adipositas bzw. dem Metabolischem Syndrom führen können (Morton and Seckl, 2008; Baudrand et al., 2009). Die in der Einleitung erwähnte regulierende Funktion von HNF4 α auf den Fettstoffwechsel könnte in Teilen über die Suppression der 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 erklärt werden.

- Die Synthese der Matrixmetalloproteinase (MMP) 1 zeigte sich verringert. Eine Schlüsselfunktion nimmt dieses Enzym zusammen mit den Gewebsinhibitoren der MMP in der Leberfibrose ein (Herbst et al., 1995). Zusammen sorgen diese für die Balance im Auf- und Abbau von Extrazellulärmatrix bei chronischen Inflammationen der Leber (Gomez et al., 1997; Roderfeld et al., 2006).

- Die Expression von *cAMP responsive Element Binding Protein 5* (CREB), welches eine Abnahme in der Expression zeigte, steht unter dem direkten Einfluss von HNF4 α ; *Binding site* (H4.77), *3.7 kb upstream of CrebH exon 1* (Luebke-Wheeler et al., 2008). In der zuletzt genannten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von CREB in Hepatozyten zu Großteilen in der fetalen Phase angereichert sind. Die adulte Leber wies geringere Konzentrationen auf. Funktionell wirkt sich die Überexpression von CREB positiv auf HGF und somit auf die Proliferation von Hepatozyten aus (Takami et al., 2004). HGF wurde in den HNF4 α transfizierten Zellen ebenfalls reduziert exprimiert. Die aktuellen Ergebnisse dieser Arbeit würden daher die These des Wechsels vom undifferenzierten, proliferierenden, fetalen Phänotyp zum adulten Hepatozyt möglicherweise erklären.

- Die Expression von Transglutaminase 2 (TG2) mRNA zeigte sich vermindert. Es ist beschrieben, dass TG2 Apoptose in Hepatozyten induzieren kann (Tatsukawa et al., 2009). Weiterhin konnte auch die TG2-abhängige Fibrogenese bei alkoholinduzierten Leberschäden dargestellt werden. Der Nukleofaktor κ B (NF κ B) wurde als ein Transkriptionsfaktor von TG2 identifiziert (Chen et al., 2008). In derselben Arbeit konnte auch eine verminderte Expression von TG2 in HCC Zellen nachgewiesen werden. Im Kontext von HNF4 α lässt sich wie schon bei DUSP eine kanzerogene Wirkung aufgrund der verminderten Apoptoseschwelle nicht sicher ausschließen. Inwiefern die Fibrogenese beeinflusst wird, muss sicherlich im Mausmodell erarbeitet werden.

5.6.2 Zunahmen

- Die größte Zunahme transkribierter mRNA in FHB-HNF4 α Zellen zeigte sich erwartungsgemäß bei HNF4 α .

- Eine gesteigerte Expression ließ sich des Weiteren bei Kollagen Typ IV finden. Kollagen Typ IV ist ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran, die sich in der Leberkapsel, an den Gefäßwänden, an den den Gallengängen zugewandten Basalmembranen der Hepatozyten sowie diskontinuierlich im perisinusoidalen Raum zu finden ist. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass Kollagen Typ IV im Rahmen der Hepatogenese bereits 12,5 Tage nach Gestation in den genannten Leberbestandteilen nachgewiesen werden konnte (Amenta and Harrison, 1997). Es könnte daraus geschlossen werden, dass via HNF4 α nicht nur eine Differenzierung der Hepatozyten geschaffen wird, sondern vielmehr auch die Initiierung des Zellverbands in der Hepatogenese ausgelöst wird.

- *Erythroblast Leukemia viral Oncogene Homolog 3* (V-erb-b2) gehört zu den EGFR (Al-Dasooqi et al., 2009) und zeigte einen Expressionsanstieg in FHB-HNF4 α . Die durch den aktivierten EGFR ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade führt zu Zellzyklusprogression, Differenzierung und Zellmigration (Berasain et al., 2009b).

- Das *Tripartite Motif-containing 69* (TRIM69) oder auch *TIR Domain-containing Adaptor-inducing Interferon- β* (TRIF) gehört zu den Transkriptionsfaktoren, die in der Leber in Verbindung mit dem *Toll-like-Receptor* (TLR) eine Hemmung der Proliferation induzieren (Zorde-Khvalevsky et al., 2009). Resultierend aus dem antiproportionalen Effekt von Differenzierung und Proliferation könnte wiederum auf den Beginn eines hepatischen Phänotyps rückgeschlossen werden.
- Für das GTP-bindende Protein Septin 4 fand sich eine gesteigerte Expression. Die Zytokinese, die Exozytose sowie der intrazelluläre Transport von Vesikeln sind als Aufgaben von Septin 4 in Zellen von Säugetieren beschrieben (Garcia et al., 2006). Des Weiteren konnte in einer Arbeit dargestellt werden, dass Septin 4 die Proliferation sowie das Wachstum von Carcinomen beeinflusst; im Besonderen bei kolorektalen Carcinomen (Tanaka et al., 2002). Die Expression von Septin 4 ist in fetalen Hepatozyten bis dato noch nicht beschrieben worden und könnte ebenfalls eine regulierende Einflussgröße auf die Zellaktivität darstellen.
- Inhibierend auf die Zellproliferation wirken sich Protocadherine aus. Insbesondere zeigte sich dies bei den Protocadherinen LKC (*Liver Kidney Colon*). Es fand sich eine hochregulierte Expression in den transfizierten Hepatozyten. Eine herabgesetzte Expression zeigte sich dagegen beim HCC (Wang et al., 2009) und bei kolorektalen Carcinomen (Okazaki et al., 2002). Interpretiert werden kann diese Beobachtung als Differenzierungstendenz und Proliferationsstopp der Telomerase-immortalisierten fetalen Hepatozyten. Verglichen mit dem zuvor beschriebenen kanzerogenen Potenzial, scheint auch eine mögliche protektive Funktion vorzuliegen.
- Die Expression des zinkbindenden $\alpha 2$ -Glykoproteins wurde in den transfizierten Zellen hochreguliert. Die Synthese und Sezernierung in das Blut erfolgt in der Leber. In einer Arbeit konnte eine verminderte Serumkonzentration bei Patienten mit Leberzirrhose nachgewiesen werden (Gangadharan et al., 2007). Prinzipiell ist die Funktion weiterhin unklar, es wird aber postuliert, dass $\alpha 2$ Glykoprotein eine regulierende Wirkung auf den Lipidhaushalt ausübt (Hirai et al., 1998). Aufgrund von Strukturähnlichkeiten zu

Major Histokompatibilitätskomplexen Klasse I (MHC) werden auch Einflüsse auf die Immunregulation angenommen (Burmeister et al., 1994a; Burmeister et al., 1994b; Sanchez et al., 1999) und im Rahmen von Tumorerkrankungen konnte eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation und den Tumorprogress gezeigt werden (He et al., 2001). Aufgrund der Syntheseleistung eines Plasmaproteins kann die hochregulierte Expression in den transfizierten Hepatozyten für einen teildifferenzierten Phänotyp sprechen. Auch lässt sich möglicherweise eine karzinogenprotektive Funktion von HNF4 α nachweisen.

- Erhöht zeigte sich die Expression von *Gap Junction Protein 5 alpha* (Connexin 40). Die Gap Junctions im Zellverband führen über die *Gap Junctional Intercellular Communication* (GJIC) zur Regulation der Differenzierung und Proliferation sowie des apoptotischen Zelltods der Hepatozyten (Vinken et al., 2008). In einer Arbeit konnte auch dargelegt werden, dass HNF1 eine *Binding Site* für das Gen von Connexin32 besitzt und über diese zu einer vermehrten Expression führt (Koffler et al., 2002). In einer weiteren Arbeit aus der Arbeitsgruppe von Sladek et al. wurde nachgewiesen, dass HNF4 α essentiell durch die Expression der interzellulären Adhäsionsproteine für die Organogenese ist (Battle et al., 2006). Es kann somit angenommen werden, dass eine Hochregulierung von Gap Junction 5 Protein alpha unter direkter oder indirekter Kontrolle von HNF4 α steht und als Teil des differenzierten Phänotyps beschrieben werden kann. Weiterhin kann die Expression als Teilaspekt einer beginnenden Hepatogenese vermutet werden.

- Die Expression von oxidiertem *Low Density Lipoprotein* (oxLDL) steht unter dem indirekten und direkten Einfluss von HNF4 α . Dies konnte in der Arbeit von Pramfalk et al. anhand der Regulierung via HNF1 und Acyl-CoA Transferase gezeigt werden (Pramfalk et al., 2009). Verminderte Expressionsraten von LDL in HNF4 α -Knockout Mäusen konnten auch in der bereits in der Einleitung erwähnten Arbeit von Hayhurst et al. gefunden werden (Hayhurst et al., 2001).

- Serum Amyloid A 1, Teil der Akute Phase Antwort der Leber im Rahmen von Entzündungsgeschehen, zeigte sich ebenfalls gesteigert. Die Expression wird durch Bindung von IL-1, IL-6 sowie dem TNFa an die Zellmembran von

Hepatozyten und konsekutiv mittels intrazellulärer Messenger induziert. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor in diesem Schema scheint C/EBP zu sein (Jensen and Whitehead, 1998). Wie in der Einleitung erwähnt, ist C/EBP neben HNF4 α ein wichtiger Transkriptionsfaktor im Rahmen der Differenzierung. Inwiefern eine Interaktion von HNF4 α in die immunologisch ausgelöste Entzündungsreaktion stattfindet, muss in weiteren Schritten untersucht werden. Als lebertypisches Serumprotein stellt es des Weiteren einen positiven Indikator eines hepatischen Phänotyps der transfizierten Zellen dar.

- UDP-Galactosyltransferase, Mitglied der Familie der Glycosyltransferasen, zeigte eine gesteigerte Expressionsrate. In anderen Arbeiten konnte bereits dargestellt werden, dass UDP-Glucoronosyltransferasen unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors HNF4 α steht (Mackenzie et al.). Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit könnte auch UDP-Galactosyltransferase einer Regulation von HNF4 α unterliegen.

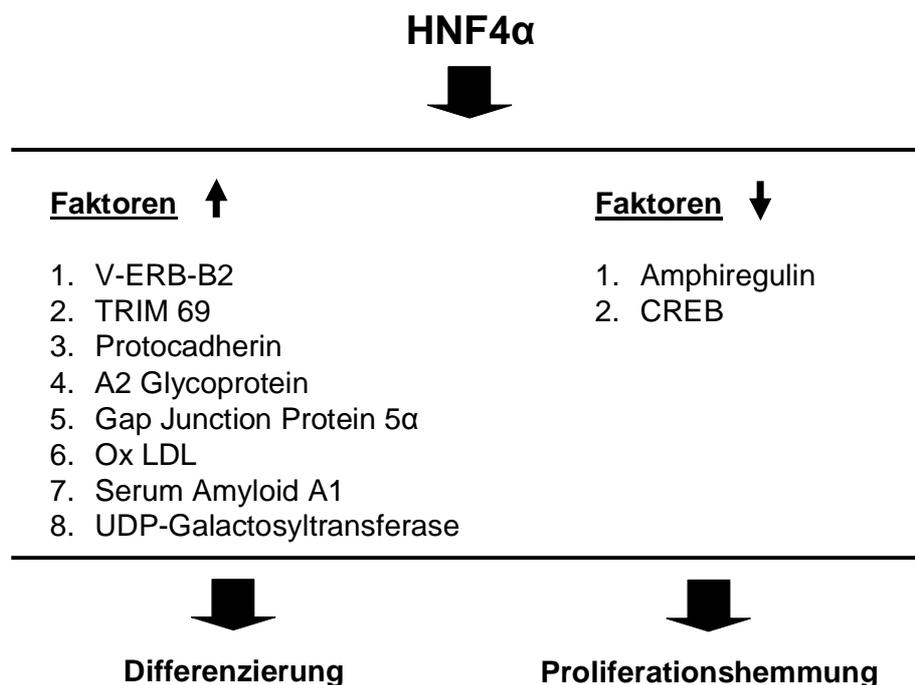


Abbildung 17: Einfluss von HNF4 α auf Differenzierung und Proliferation

Zusammenfassend spricht die Auswertung der vorliegenden Daten für eine leberspezifische Teildifferenzierung, für den Abbruch der Proliferationstendenz

(siehe Abbildung 17) sowie die beginnende Initiierung der Hepatogenese der fetalen Hepatozyten.

Inwieweit eine posttranslationelle Modifikation und Regulation stattfindet, müsste anhand von Immunoblots und Funktionsassays der verschiedenen Proteine untersucht werden. Bezüglich aller HNF4 α -Bindungssequenzen und -zielgene wäre als nächster Schritt der *Protein Binding Microarray* zu erwägen. In der Arbeitsgruppe von Sladek et al. wurde dieser für HNF4 α aktuell in der Zelllinie COS-7 erstmalig verwendet (Bolotin et al.).

5.7 Intrahepatische Reifung

Der Prozess der intrahepatischen Reifung und Differenzierung muss sicherlich unter dem Aspekt der komplexen Interaktionen der einzelnen Transskriptionsfaktoren gesehen werden. Kheolamai et al. haben in Ihrer Arbeit gezeigt, dass die Hepatozytenreifung in Mäusen in fünf Phasen eingeteilt werden kann (siehe Abbildung 18): Pluripotente Stammzelle, endodermale Zelle, fetaler Hepatozyt, perinataler Hepatozyt und reifer Hepatozyt (Kheolamai and Dickson, 2009). Hierbei spielen die Expression unterschiedlicher Hepatozyten-Markergene und primär vor allem ihre spezifischen Transskriptionsfaktoren die Hauptrolle für die Differenzierung (Schrem et al., 2002; Schrem et al., 2004). Daraus lässt sich die sequentielle Expression dieser Faktoren als entscheidender Schlüsselaspekt eruieren.

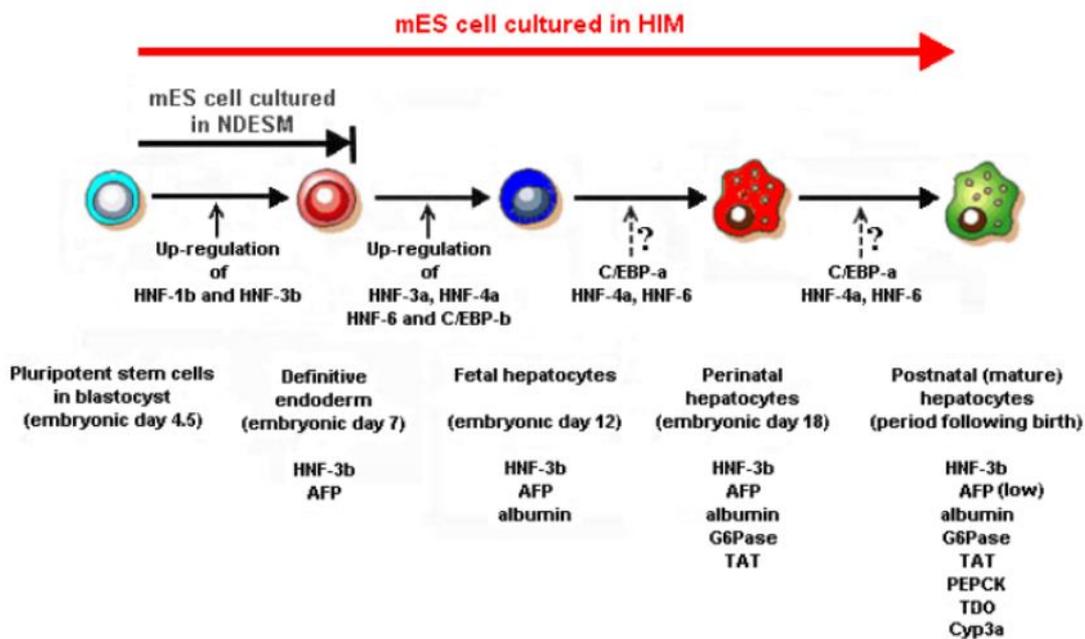


Abbildung 18: Kheolamai and Dickson, Fünf Reifephasen der Hepatozytengnese, 2009

Für fetale Hepatozyten konnten in dem oben genannten Artikel vor allem HNF4 α , HNF6 sowie C/EBP-a als spezifische Differenzierungsfaktoren bestimmt werden. In der Konsequenz scheint die alleinige Transfektion des Differenzierungsfaktors HNF4a nicht auszureichen; trotz der priorisierten Stellung von HNF4 α in der vernetzten Interaktion aller Differenzierungsfaktoren. Vielmehr muss die multiple und vor allem chronologisch-wachstumsadaptive Transfektion in den verschiedenen Reifestadien der Hepatozyten durchgeführt werden.

Schlussfolgernd ist die Differenzierung der Hepatozyten im fetalen Stadium nicht von der hohen Konzentration eines solitären Differenzierungsfaktors, sondern vielmehr von einer Auswahl an Differenzierungsfaktoren abhängig.

5.8 Hepatozyten und deren Interaktionen

Hepatozyten sind in vivo abhängig von einer Vielzahl an Einflussfaktoren. Zum einen spielt die extrazelluläre Matrix eine wichtige Rolle (Serandour et al., 2005), zum anderen endokrine und parakrine Messenger wie EGF, TGF, HGF

(Fausto et al., 1995) sowie die Zytokine IL-6 und TNF α (Serandour et al., 2005; Fausto et al., 2006). Die in vitro Ergebnisse dieser Arbeit können sicherlich nur einen Teilaspekt der in vivo Verhältnisse darstellen. Im Speziellen sind vor allem die Konzentrationen der Serumproteine α 1-Antitrypsin, Transferrin und Albumin nach Transplantation im Mausmodell zu untersuchen. Diese dürften als Gradmesser zu den aktuellen Ergebnissen den additiven respektive potentiellen Charakter der in vivo Verhältnisse repräsentieren.

5.9 Leberspezifische Differenzierung trotz hoher Telomeraseaktivität

Die gewonnenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine ektopische Expression von HNF4 α in den immortalisierten Zellen trotz hoher Telomeraseaktivität eine partielle leberspezifische Differenzierung in Zellkultur auslösen kann, jedoch alleine nicht ausreichend ist, um in Zellkultur einen differenzierten hepatozytischen Phänotyp zu induzieren. Schlussfolgernd muss vielmehr eine wachstumsadaptive Transfektion von verschiedenen Differenzierungsfaktoren erfolgen, um den hepatischen Phänotyp zu erreichen. Des Weiteren muss der mögliche Einfluss der Telomeraseaktivität einkalkuliert werden. Mittels Hemmung des Ribonukleoproteins könnten sich neue intrazelluläre Verhältnisse einstellen, die wiederum eine erweiterte Differenzierung zulassen würden.

6 Zusammenfassung

Telomerase-immortalisierte humane fetale Hepatozyten lassen sich im Gegensatz zu primären Hepatozyten unbegrenzt in Zellkultur expandieren, zeigen aber im Rahmen der gesteigerten Proliferation erwartungsgemäß einen wenig differenzierten Phänotyp. Wir haben daher untersucht, inwieweit die ektope Expression des Transkriptionsfaktors HNF4 α in diesen Zellen leberspezifische Funktionen in Zellkultur induziert.

Nach stabiler Transfektion der immortalisierten Zellen mit einem HNF4 α -Konstrukt (pcDNA3.1-HNF4 α) oder einem leeren Kontrollvektor, wurde mittels *Realtime RT-PCR* und der $\Delta\Delta$ Ct-Methode eine Überexpression von HNF4 α nachgewiesen. Bestätigend fand sich auch eine Zunahme der Bandenintensität von HNF4 α im Immunoblot. Konsekutiv wurden Zielgene von HNF4 α , insbesondere Transferrin und α 1-Antitrypsin, untersucht. Im Vergleich zu Kontrollzellen zeigten HNF4 α -transfizierte Zellen einen signifikanten Anstieg von α 1-Antitrypsin und Transferrin.

Des Weiteren wurde in einem zwölf-tägigen Wachstumsassay (*CellTiter 96*) die Proliferation von HNF4 α -transfizierten Zellen mit Kontrollzellen verglichen. HNF4 α -transfizierte Zellen zeigten eine verminderte Proliferation mit Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit im Verlauf. Eine *Microarray* Analyse konnte eine Überexpression von HNF4 α , das Expressionsprofil eines differenzierteren Zellcharakters sowie einer Proliferationshemmung erkennen lassen.

Die gewonnenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Überexpression von HNF4 α in den immortalisierten Zellen trotz hoher Telomeraseaktivität eine leberspezifische Differenzierung in Zellkultur auslöst. Inwiefern die Überexpression von HNF4 α auch die intrahepatische Reifung der Zellen begünstigt und eine Aktivierung von nicht direkt durch HNF4 α regulierte Gene, wie z. B. für das Albumin, unterstützt, wird im Mausmodell untersucht werden müssen.

Zusammenfassend bestätigen unsere Daten, dass eine leberspezifische Differenzierung von Telomerase-immortalisierten humanen Leberzellen möglich ist.

7 Abkürzungsverzeichnis

Acyl-CoA	Acyl Coenzym A
AIH	Autoimmunhepatitis
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BP	Basenpaar
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBP- α	<i>CCAAT/enhancer binding protein α</i>
CMV	Cytomegalie Virus
COUP-TF II	<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transkriptionsfaktor 2</i>
CREB	<i>cAMP responsive Element Binding Protein 5</i>
Ct Wert	<i>Cycle threshold Wert</i>
DBP	<i>D Site Binding Protein</i>
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR 1	<i>Direct Repeat 1</i>
DTT	Dithiothreitol
DUSP	<i>Dual-Specificity Phosphatase</i>
ECLP	<i>Extracorporeal Liver Perfusion</i>
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EcoR1	Escherichia coli Restriktionsendonuklease 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>

EREG	Epiregulin
ERK	Extrazellulär-signalregulierten-Kinase
F	<i>Forward-Primer</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FH	Fetale Hepatozyten
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA 6	<i>GATA binding Protein 6</i>
GJIC	<i>Gap Junctional Intercellular Communication</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HAT-1	Humanes α1-Antitrypsin
HB-EGF	Heparinbindender EGF
HCC	Hepatozellulären Carcinom
HCl	Chlorwasserstoff
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HGFR	<i>Hepatocyte Growth Factor-Receptor</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNF1	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1</i>
HNF3	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 3</i>
HNF4α	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha</i>
HNF6	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 6</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
HSV	Humanes Herpes Virus
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
HTF-2	Humanes Transferrin
IL-1	Interleukin 1

IL-6	Interleukin 6
LB-Medium	<i>Luria Broth Medium</i>
LKC	<i>Liver Kidney Colon</i>
M	Molar
MAPK-1	Mitogen aktiverter Proteinkinase-1
MHC	Major Histokompatibilitätskomplexen
min	Minute
MEK½ Protein	MAP-ERK Kinase ½
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolab
NF-IL-6	Nuklearfaktor Interleukin 6
NFγ	Nuklearfaktor gamma
NFκB	Nukleofaktor kappaB
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NR2A1	<i>Nuclear Receptor Superfamily</i>
OLT	Orthotope Lebertransplantation
oxLDL	Oxidiertes <i>Low Density Lipoprotein</i>
p	Wahrscheinlichkeit
PD	Populationsverdopplungen
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potentia Hydrogenii
PKA	Protein Kinase A
PR	Promoterregion
P-S-A	Penicilin, Streptomycin, Amphotericin
	B
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTLD	<i>Postransplant Lymphoproliferative</i>

R	<i>Disorder</i>
RAF-Protein	<i>Reverse-Primer</i>
RAS-Protein	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
RIPA Puffer	<i>Rat sarcoma protein</i>
	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
	<i>Puffer</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase</i>
	<i>Chain Reaction</i>
sc	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid</i>
sek.	<i>Sekunde</i>
SERPIN	<i>Serin Proteinasen Inhibitoren</i>
SV40	<i>Simian-Virus 40</i>
T	<i>Temperatur</i>
TBE Puffer	<i>TRIS- Borat- EDTA Puffer</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylendiamin</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TG2	<i>Transglutaminase 2</i>
TGF α	<i>Transforming Growth Factor alpha</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF α	<i>Tumor Nekrose Faktor alpha</i>
TRIF	<i>TIR Domain-containing Adaptor-</i>
	<i>inducing Interferon-β</i>
TRIM69	<i>Tripartite Motif-containing 69</i>
TRIS	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
U	<i>Unit</i>
UDP	<i>Uridindiphosphat</i>

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Plasmid pcDNA-HNF4 α	10
Abbildung 2	<i>TaqMan Realtime RT-PCR</i> Protokoll	21
Abbildung 3	Immunoblot Schema	25
Abbildung 4	Primäre Antikörper und Konzentrationen	25
Abbildung 5	Sekundäre Antikörper und Konzentrationen	26
Abbildung 6	Plasmidcharakterisierung mittels Gelelektrophorese	29
Abbildung 7	Relative Expression, HNF4 α	35
Abbildung 8	Immunoblot, HNF4 α	31
Abbildung 9	Grafische Darstellung, Immunoblot, HNF4 α	32
Abbildung 10	Relative Expression, HAT	33
Abbildung 11	Immunoblot, HAT	33
Abbildung 12	Grafische Darstellung, Immunoblot, HAT	34
Abbildung 13	Relative Expression, HTF	35
Abbildung 14	Relative Expression, HSA	36
Abbildung 15	Zellproliferation	37
Abbildung 16	Genetische und epigenetische Kontrolle über molekulare Alterationen in hepatozellulären Carcinomen, Feo et al.	47
Abbildung 17	Einfluss von HNF4 α auf Differenzierung und Proliferation	51
Abbildung 18	Fünf Reifephasen der Hepatozytengnese, Kheolamai and Dickson, 2009	53

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Relative Expression, HNF4 α	30
Tabelle 2	Relative Expression, HAT	32
Tabelle 3	Relative Expression, HTF	34
Tabelle 4	Relative Expression, HSA	35
Tabelle 5	Expressionsmuster mittels HNF4 α Aktivierung	38
Tabelle 6	Expressionsmuster mittels HNF4 α Inhibierung	39

10 Literaturverzeichnis

1. Al-Dasooqi, N., Gibson, R., Bowen, J. and Keefe, D.: HER2 targeted therapies for cancer and the gastrointestinal tract. *Curr Drug Targets* 10 (2009) 537-42.
2. Amenta, P.S. and Harrison, D.: Expression and potential role of the extracellular matrix in hepatic ontogenesis: a review. *Microsc Res Tech* 39 (1997) 372-86.
3. Arora-Gupta, N., Davies, P., McKiernan, P. and Kelly, D.A.: The effect of long-term calcineurin inhibitor therapy on renal function in children after liver transplantation. *Pediatr Transplant* 8 (2004) 145-50.
4. Battle, M.A., Konopka, G., Parviz, F., Gaggl, A.L., Yang, C., Sladek, F.M. and Duncan, S.A.: 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 (2006) 8419-24.
5. Baudrand, R., Carvajal, C.A., Riquelme, A., Morales, M., Solis, N., Pizarro, M., Escalona, A., Boza, C., Perez, G., Dominguez, A., Arrese, M. and Fardella, C.E.: Overexpression of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Hepatic and Visceral Adipose Tissue is Associated with Metabolic Disorders in Morbidly Obese Patients. *Obes Surg* (2009).
6. Benten, D., Sterneck, M., Panse, J., Rogiers, X. and Lohse, A.W.: Low recurrence of preexisting extrahepatic malignancies after liver transplantation. *Liver Transpl* 14 (2008) 789-98.
7. Berasain, C., Castillo, J., Perugorria, M.J., Latasa, M.U., Prieto, J. and Avila, M.A.: Inflammation and liver cancer: new molecular links. *Ann N Y Acad Sci* 1155 (2009a) 206-21.
8. Berasain, C., Garcia-Trevijano, E.R., Castillo, J., Erroba, E., Lee, D.C., Prieto, J. and Avila, M.A.: Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 128 (2005) 424-32.
9. Berasain, C., Perugorria, M.J., Latasa, M.U., Castillo, J., Goni, S., Santamaria, M., Prieto, J. and Avila, M.A.: The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Exp Biol Med* (Maywood) 234 (2009b) 713-25.
10. Bolotin, E., Liao, H., Ta, T.C., Yang, C., Hwang-Verslues, W., Evans, J.R., Jiang, T. and Sladek, F.M.: Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4alpha target genes using protein binding microarrays. *Hepatology* 51 642-53.

11. Burmeister, W.P., Gastinel, L.N., Simister, N.E., Blum, M.L. and Bjorkman, P.J.: Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature* 372 (1994a) 336-43.
12. Burmeister, W.P., Huber, A.H. and Bjorkman, P.J.: Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature* 372 (1994b) 379-83.
13. Cereghini, S.: Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *Faseb J* 10 (1996) 267-82.
14. Chen, C.S., Wu, C.H., Lai, Y.C., Lee, W.S., Chen, H.M., Chen, R.J., Chen, L.C., Ho, Y.S. and Wang, Y.J.: NF-kappaB-activated tissue transglutaminase is involved in ethanol-induced hepatic injury and the possible role of propolis in preventing fibrogenesis. *Toxicology* 246 (2008) 148-57.
15. Collins, K.: Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 12 (2000) 378-83.
16. Dabeva, M.D., Petkov, P.M., Sandhu, J., Oren, R., Laconi, E., Hurston, E. and Shafritz, D.A.: Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. *Am J Pathol* 156 (2000) 2017-31.
17. Demers, S.I., Russo, P., Lettre, F. and Tanguay, R.M.: Frequent mutation reversion inversely correlates with clinical severity in a genetic liver disease, hereditary tyrosinemia. *Hum Pathol* 34 (2003) 1313-20.
18. Deurholt, T., ten Bloemendaal, L., Chhatta, A.A., van Wijk, A.C., Weijer, K., Seppen, J., Elferink, R.P., Chamuleau, R.A. and Hoekstra, R.: In vitro functionality of human fetal liver cells and clonal derivatives under proliferative conditions. *Cell Transplant* 15 (2006) 811-22.
19. Ellis, A.J., Hughes, R.D., Nicholl, D., Langley, P.G., Wendon, J.A., O'Grady, J.G. and Williams, R.: Temporary extracorporeal liver support for severe acute alcoholic hepatitis using the BioLogic-DT. *Int J Artif Organs* 22 (1999) 27-34.
20. Fausto, N., Campbell, J.S. and Riehle, K.J.: Liver regeneration. *Hepatology* 43 (2006) S45-53.
21. Fausto, N., Laird, A.D. and Webber, E.M.: Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *Faseb J* 9 (1995) 1527-36.
22. Feo, F., Frau, M., Tomasi, M.L., Brozzetti, S. and Pascale, R.M.: Genetic and epigenetic control of molecular alterations in hepatocellular carcinoma. *Exp Biol Med* (Maywood) 234 (2009) 726-36.

23. Fishman, J.A., Emery, V., Freeman, R., Pascual, M., Rostaing, L., Schlitt, H.J., Sgarabotto, D., Torre-Cisneros, J. and Uknis, M.E.: Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant* 21 (2007) 149-58.
24. Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufman, S.S., Goertzen, T.C., Chowdhury, N.R., Warkentin, P.I., Dorko, K., Sauter, B.V. and Strom, S.C.: Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 338 (1998) 1422-6.
25. Gangadharan, B., Antrobus, R., Dwek, R.A. and Zitzmann, N.: Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem* 53 (2007) 1792-9.
26. Garcia, W., de Araujo, A.P., Neto Mde, O., Ballesteros, M.R., Polikarpov, I., Tanaka, M., Tanaka, T. and Garratt, R.C.: Dissection of a human septin: definition and characterization of distinct domains within human SEPT4. *Biochemistry* 45 (2006) 13918-31.
27. Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. and Thorgeirsson, U.P.: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74 (1997) 111-22.
28. Guba, M., Graeb, C., Jauch, K.W. and Geissler, E.K.: Pro- and anti-cancer effects of immunosuppressive agents used in organ transplantation. *Transplantation* 77 (2004) 1777-82.
29. Haker, B., Fuchs, S., Dierlamm, J., Brummendorf, T.H. and Wege, H.: Absence of oncogenic transformation despite acquisition of cytogenetic aberrations in long-term cultured telomerase-immortalized human fetal hepatocytes. *Cancer Lett* 256 (2007) 120-7.
30. Hatzis, P. and Talianidis, I.: Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 7320-30.
31. Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J.: Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* 21 (2001) 1393-403.
32. He, N., Brysk, H., Tying, S.K., Ohkubo, I. and Brysk, M.M.: Zinc-alpha(2)-glycoprotein hinders cell proliferation and reduces cdc2 expression. *J Cell Biochem Suppl* 36 (2001) 162-9.
33. Herbst, H., Schuppan, D. and Milani, S.: [Fibrogenesis and fibrolysis in the liver]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 79 (1995) 15-27.

34. Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I. and Bar-Tana, J.: Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 392 (1998) 512-6.
35. Hirai, K., Hussey, H.J., Barber, M.D., Price, S.A. and Tisdale, M.J.: Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Res* 58 (1998) 2359-65.
36. Hooks, M.A.: Tacrolimus, a new immunosuppressant--a review of the literature. *Ann Pharmacother* 28 (1994) 501-11.
37. Hu, C. and Perlmutter, D.H.: Regulation of alpha1-antitrypsin gene expression in human intestinal epithelial cell line caco-2 by HNF-1alpha and HNF-4. *Am J Physiol* 276 (1999) G1181-94.
38. Ishida, K., Imai, H., Ogasawara, K. and Tamashiro, H.: [A review of health economic assessment for liver transplantation--toward social acceptance of liver transplantation in Japan]. *Nippon Koshu Eisei Zasshi* 51 (2004) 233-9.
39. Jensen, L.E. and Whitehead, A.S.: Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J* 334 (Pt 3) (1998) 489-503.
40. 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.: Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4alpha) isoforms in human and rats. *Nucl Recept* 1 (2003) 5.
41. Johnson, P.F.: Transcriptional activators in hepatocytes. *Cell Growth Differ* 1 (1990) 47-52.
42. Kalsheker, N., Morley, S. and Morgan, K.: Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans* 30 (2002) 93-8.
43. Khashab, M., Tector, A.J. and Kwo, P.Y.: Epidemiology of acute liver failure. *Curr Gastroenterol Rep* 9 (2007) 66-73.
44. Kheolamai, P. and Dickson, A.J.: Liver-enriched transcription factors are critical for the expression of hepatocyte marker genes in mES-derived hepatocyte-lineage cells. *BMC Mol Biol* 10 (2009) 35.
45. Koffler, L.D., Fernstrom, M.J., Akiyama, T.E., Gonzalez, F.J. and Ruch, R.J.: Positive regulation of connexin32 transcription by hepatocyte nuclear factor-1alpha. *Arch Biochem Biophys* 407 (2002) 160-7.
46. Kono, Y. and Roberts, E.A.: Modulation of the expression of liver-specific functions in novel human hepatocyte lines cultured in a collagen gel

- sandwich configuration. *Biochem Biophys Res Commun* 220 (1996) 628-32.
47. Kounnas, M.Z., Church, F.C., Argraves, W.S. and Strickland, D.K.: Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and alpha 1-antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 271 (1996) 6523-9.
 48. Ktistaki, E. and Talianidis, I.: Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 277 (1997) 109-12.
 49. Kuo, C.J., Conley, P.B., Chen, L., Sladek, F.M., Darnell, J.E., Jr. and Crabtree, G.R.: A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355 (1992) 457-61.
 50. Li, J., Ning, G. and Duncan, S.A.: Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* 14 (2000) 464-74.
 51. Lilja, H., Blanc, P., Demetriou, A.A. and Rozga, J.: Response of cultured fetal and adult rat hepatocytes to growth factors and cyclosporine. *Cell Transplant* 7 (1998) 257-66.
 52. Lodish, H.F. and Kong, N.: Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 266 (1991) 14835-8.
 53. Luebke-Wheeler, J., Zhang, K., Battle, M., Si-Tayeb, K., Garrison, W., Chhinder, S., Li, J., Kaufman, R.J. and Duncan, S.A.: Hepatocyte nuclear factor 4alpha is implicated in endoplasmic reticulum stress-induced acute phase response by regulating expression of cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein H. *Hepatology* 48 (2008) 1242-50.
 54. Mackenzie, P.I., Hu, D.G. and Gardner-Stephen, D.A.: The regulation of UDP-glucuronosyltransferase genes by tissue-specific and ligand-activated transcription factors. *Drug Metab Rev* 42 95-105.
 55. Malhi, H., Irani, A.N., Gagandeep, S. and Gupta, S.: Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *J Cell Sci* 115 (2002) 2679-88.
 56. Marchetti, P.: New-onset diabetes after liver transplantation: from pathogenesis to management. *Liver Transpl* 11 (2005) 612-20.
 57. Morgan, K. and Kalsheker, N.A.: Regulation of the serine proteinase inhibitor (SERPIN) gene alpha 1-antitrypsin: a paradigm for other SERPINs. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (1997) 1501-11.

58. Morton, N.M. and Seckl, J.R.: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and obesity. *Front Horm Res* 36 (2008) 146-64.
59. Mousa, S.A. and Petersen, L.J.: Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: preclinical evidence. *Thromb Haemost* 102 (2009) 258-67.
60. Muller, C., Hennebert, O. and Morfin, R.: The native anti-glucocorticoid paradigm. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100 (2006) 95-105.
61. Muraca, M., Neri, D., Parenti, A., Feltracco, P., Granato, A., Vilei, M.T., Ferrareso, C., Ballarin, R., Zanusso, G.E., Giron, G., Rozga, J. and Gerunda, G.: Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study. *Transplantation* 73 (2002) 890-6.
62. Naruse, K., Tang, W. and Makuuch, M.: Artificial and bioartificial liver support: a review of perfusion treatment for hepatic failure patients. *World J Gastroenterol* 13 (2007) 1516-21.
63. Nyberg, S.L., Remmel, R.P., Mann, H.J., Peshwa, M.V., Hu, W.S. and Cerra, F.B.: Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver. *Ann Surg* 220 (1994) 59-67.
64. O'Grady, J.G., Gimson, A.E., O'Brien, C.J., Pucknell, A., Hughes, R.D. and Williams, R.: Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 94 (1988) 1186-92.
65. Okazaki, N., Takahashi, N., Kojima, S., Masuho, Y. and Koga, H.: Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis* 23 (2002) 1139-48.
66. Porte, R.J., Ploeg, R.J., Hansen, B., van Bockel, J.H., Thorogood, J., Persijn, G.G., Hermans, J. and Terpstra, O.T.: Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. European Multicentre Study Group. *Transpl Int* 11 Suppl 1 (1998) S164-7.
67. Pramfalk, C., Karlsson, E., Groop, L., Rudel, L.L., Angelin, B., Eriksson, M. and Parini, P.: Control of ACAT2 liver expression by HNF4{alpha}: lesson from MODY1 patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009) 1235-41.
68. Qasim, A., McCormick, P.A., Tajuddin, T., Zaman, M.B., Traynor, O., Hegarty, J. and Geoghegan, J.: Improved survival outcomes for liver transplantation. *Ir Med J* 100 (2007) 389-90.

69. Roderfeld, M., Geier, A., Dietrich, C.G., Siewert, E., Jansen, B., Gartung, C. and Roeb, E.: Cytokine blockade inhibits hepatic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and up-regulates matrix metalloproteinase-9 in toxic liver injury. *Liver Int* 26 (2006) 579-86.
70. Rothschild, M.A., Oratz, M. and Schreiber, S.S.: Serum albumin. *Hepatology* 8 (1988) 385-401.
71. Sanchez, L.M., Chirino, A.J. and Bjorkman, P.: Crystal structure of human ZAG, a fat-depleting factor related to MHC molecules. *Science* 283 (1999) 1914-9.
72. Schaeffer, E., Guillou, F., Part, D. and Zakin, M.M.: A different combination of transcription factors modulates the expression of the human transferrin promoter in liver and Sertoli cells. *J Biol Chem* 268 (1993) 23399-408.
73. Schrem, H., Klemmner, J. and Borlak, J.: Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev* 54 (2002) 129-58.
74. Schrem, H., Klemmner, J. and Borlak, J.: Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol Rev* 56 (2004) 291-330.
75. Serandour, A.L., Loyer, P., Garnier, D., Courselaud, B., Theret, N., Glaise, D., Guguen-Guillouzo, C. and Corlu, A.: TNFalpha-mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* 41 (2005) 478-86.
76. Sladek, F.M., Zhong, W.M., Lai, E. and Darnell, J.E., Jr.: Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4 (1990) 2353-65.
77. Strom, S.C., Fisher, R.A., Rubinstein, W.S., Barranger, J.A., Towbin, R.B., Charron, M., Miele, L., Pizarov, L.A., Dorko, K., Thompson, M.T. and Reyes, J.: Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 29 (1997) 2103-6.
78. Takami, Y., Kanasaki, K., Tsubouchi, H., Ishii, T., Yamamoto, I. and Gohda, E.: Inhibition of hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by interleukin-1 and its prevention by interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 325 (2004) 676-82.
79. Tanaka, M., Kijima, H., Itoh, J., Matsuda, T. and Tanaka, T.: Impaired expression of a human septin family gene Bradeion inhibits the growth

and tumorigenesis of colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 9 (2002) 483-8.

80. Tatsukawa, H., Fukaya, Y., Frampton, G., Martinez-Fuentes, A., Suzuki, K., Kuo, T.F., Nagatsuma, K., Shimokado, K., Okuno, M., Wu, J., Iismaa, S., Matsuura, T., Tsukamoto, H., Zern, M.A., Graham, R.M. and Kojima, S.: Role of transglutaminase 2 in liver injury via cross-linking and silencing of transcription factor Sp1. *Gastroenterology* 136 (2009) 1783-95 e10.
81. Thomasini, R.L., Sampaio, A.M., Bonon, S.H., Boin, I.F., Leonardi, L.S., Leonardi, M. and Costa, S.C.: Detection and monitoring of human herpesvirus 7 in adult liver transplant patients: impact on clinical course and association with cytomegalovirus. *Transplant Proc* 39 (2007) 1537-9.
82. Uemura, T., Randall, H.B., Sanchez, E.Q., Ikegami, T., Narasimhan, G., McKenna, G.J., Chinnakotla, S., Levy, M.F., Goldstein, R.M. and Klintmalm, G.B.: Liver retransplantation for primary nonfunction: analysis of a 20-year single-center experience. *Liver Transpl* 13 (2007) 227-33.
83. Uribe, M., Hunter, B., Alba, A., Calabran, L., Flores, L., Soto, P. and Herzog, C.: Posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric liver transplantation. *Transplant Proc* 41 (2009) 2679-81.
84. Vinken, M., Henkens, T., De Rop, E., Fraczek, J., Vanhaecke, T. and Rogiers, V.: Biology and pathobiology of gap junctional channels in hepatocytes. *Hepatology* 47 (2008) 1077-88.
85. Viollet, B., Kahn, A. and Raymondjean, M.: Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 4208-19.
86. Wang, J.C., Stafford, J.M. and Granner, D.K.: SRC-1 and GRIP1 coactivate transcription with hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem* 273 (1998) 30847-50.
87. Wang, W., Peng, J.X., Yang, J.Q. and Yang, L.Y.: Identification of Gene Expression Profiling in Hepatocellular Carcinoma Using cDNA Microarrays. *Dig Dis Sci* (2009).
88. Wege, H., Chui, M.S., Le, H.T., Strom, S.C. and Zern, M.A.: In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere-dependent replicative aging. *Cell Transplant* 12 (2003a) 897-906.
89. Wege, H., Le, H.T., Chui, M.S., Liu, L., Wu, J., Giri, R., Malhi, H., Sappal, B.S., Kumaran, V., Gupta, S. and Zern, M.A.: Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 124 (2003b) 432-44.

90. Zakin, M.M.: Regulation of transferrin gene expression. *Faseb J* 6 (1992) 3253-8.
91. Zhong, W., Mirkovitch, J. and Darnell, J.E., Jr.: Tissue-specific regulation of mouse hepatocyte nuclear factor 4 expression. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 7276-84.
92. Zorde-Khvaleyevsky, E., Abramovitch, R., Barash, H., Spivak-Pohis, I., Rivkin, L., Rachmilewitz, J., Galun, E. and Giladi, H.: Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration. *Hepatology* 50 (2009) 198-206.

11 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Dr. med. Henning Wege, der mir diese interessante Aufgabenstellung vorschlug und mir mit exzellenter wissenschaftlicher Betreuung und Unterstützung in theoretischen und praktischen Fragen zu jedem Zeitpunkt die experimentelle Planung und Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jörg Petersen und bei Herrn Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse für die gute Betreuung der Arbeit sowie für die Bereitstellung der Räumlichkeiten im Forschungslabor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Nadine Knuth für das hervorragende Einarbeiten in die von mir verwendeten Methoden sowie ihrer steten Hilfsbereitschaft. Dieser Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden für die Unterstützung in theoretischen und praktischen Fragen.

An dieser Stelle gilt der Dank auch allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik.

Herrn Bernhard Laine (Lille, Frankreich) danke ich für die Bereitsstellung des von mir verwendeten Vektors.

Danken möchte ich auch meiner Schwester und meinem Schwager für die fachliche und tatkräftige Unterstützung.

Abschließend gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir das Studium und das wissenschaftliche Arbeiten überhaupt erst ermöglicht haben.

12 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Kornelius Schulze, geboren am 19. September 1978, versichere, dass ich die Dissertation selbst und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe, dass die Literatur, deren Ergebnisse in die Dissertation eingeflossen sind, vollständig angegeben und dass die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form nicht bei einer anderen Abteilung oder entsprechenden Einrichtung einer anderen Hochschule eingereicht wurde.

Kornelius Schulze