

Etablering av laboratorieanalyser for å studere effekt
av diabetes assosierte HNF4A genvarianter i en
nyrecellelinje

Masteroppgave

Trine Silgjerd



Masterprogram i helsevitenskap

Studieretning for radiografer og bioingeniører

Institutt for global helse og samfunnsmedisin

Det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I BERGEN

våren 2020

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved bioingeniørutdanningen ved Institutt for sikkerhet, kjemi- og bioingeniørfag, Høgskulen på Vestlandet (HVL), Campus Bergen, i samarbeid med Senter for Diabetesforskning, Universitetet i Bergen i perioden august 2019 til mai 2020.

Hovedveileder Professor Lise Bjørkhaug Gundersen hadde ideen til prosjektet og har bidratt med god veiledning underveis.

Jeg vil rette en stor takk til professor Lise Bjørkhaug Gundersen og biveiledere forsker Ingvild Aukrust og førsteamanuensis Gry Sjøholt for god hjelp og rettleiding med masteroppgaven. Jeg er takknemlig for deres kunnskap, verdifulle råd og for at dere har tatt dere tid til meg.

Jeg vil også takke alle ved bioingeniørutdanningen ved Høgskulen på Vestlandet for å ha tatt godt imot meg og vært veldig inkluderende. Bioingeniør Anne Grete Eriksen og bioingeniør Aud Valle Hansen har vært til uunnværlig hjelp ved bruk av laboratoriet og instrumenter.

Det må også rettes en takk til medlemmene av Senter for Diabetesforskning som har latt meg låne og bruke deres fasiliteter/ instrument, og spesielt til Alba Kaci, PhD og Marie H. Solheim, PhD som har lært meg laboratorieteknikker og delt deres erfaring med meg.

Tildeling av forskningsmidler fra Norges Diabetesforbund har gjort studien mulig.

Til slutt vil jeg takke min flotte familie og venner for å ha vært forståelsesfulle og for all støtte jeg har fått underveis.

Bergen, 15.05.2020

Trine Silgjerd

Sammendrag

Bakgrunn: Maturity Onset Diabetes of the Young er en sjelden form for arvelig diabetes og utgjør rundt 1-3 % av all diabetes i verden. Varianter av genet (*HNF4A*) som koder for Hepatocyte nuclear factor 4-alpha er assosiert med MODY1, og i ekstremt sjeldne tilfeller også nyresykdom. Til tross for at diabetes generelt er ledende årsak til nyresykdom, og også assosiert med andre typer MODY, så har det vært lite fokus på nyre i diabetessammenheng, og da spesielt relatert til MODY.

Hensikt: Optimalisere og etablere laboratorieanalyser for å studere effekten av MODY1-assosierte *HNF4A* varianter i en ny relevant nyrecellelinje (HK-2). Av laboratorieanalyser ville vi studere effekt av *HNF4A* varianter på HNF-4A transaktivering og endogent uttrykk av målgener i HK-2 celler ved kvantitative sanntids-PCR-analyser.

Metode: Optimalisering av dyrkingsbetingelser av HK-2 cellelinje ble utført og optimal protokoll etablert. Videre ble optimalisering av plasmid transfeksjon, transaktivering (Dual Luciferase Reporter Assay) og kvantitativ sanntids-PCR utført før endelig protokoll etablert. Effekt av villtype (WT) og *HNF4A* varianter (R76W, R76Q, R80W) på promotor-linkede reporter plasmider (transaktivering) og HK-2 målgener (kvantitativ sanntids-PCR) ble deretter studert.

Resultater: R76W viste en økt transaktiveringsaktivitet, spesielt på *HNF1A* promotor-linket reporter (650 %), men også på *G6PC* promotor-linket reporter (200 %), sammenlignet med WT *HNF-4A* (100 %). Bare *G6PC* genet viste et signifikant nedsatt uttrykk ved transfeksjon av variantene R76Q og R80W, basert på kvantitativ sanntids-PCR analyse, som korrelerer med at disse variantene viste lavere nivå av transaktiveringaktivitet av *G6PC* promotor (henholdsvis 90 % og 50 %).

Konklusjon: Cellelinjen HK-2 er en utfordrende men relevant cellelinje i forskning og relatert til diabetesstudier, og da også for å studere effekt av varianter av MODY gener assosiert med nyresykdom, på regulering av målgener.

Nøkkelord: Proksimal tubuli, MODY, Dual Luciferase Reporter Assay, kvantitativ sanntids-PCR, *HNF4A*

Abstract

Background: Maturity Onset Diabetes of the Young is a rare form of diabetes with autosomal inheritance, which represents around 1-3 % of all diabetes cases worldwide. Mutations in the gene (*HNF4A*) that encode for Hepatocyte nuclear factor 4-alpha are associated with MODY1, and in rare cases with kidney disorder. Even though diabetes causes kidney disease, and is also associated with other MODY types, not much attention has been paid to the kidney, in the context of diabetes and MODY.

Objective: Optimize and establish functional analyses to study the effect of MODY1- associated *HNF4A* mutations in a new relevant kidney cell line (HK-2). Furthermore, we wanted to study the effect of mutations on transactivation and endogen expression of target genes in HK-2 cells by real-time qPCR.

Method: Culturing conditions for a proximal tubular cell line was optimized, and a protocol was established. Then an optimization of plasmid transfection, transactivation (Dual Luciferase Reporter Assay) and real-time qPCR was performed, and a final protocol made. The effect of wild type and *HNF4A* mutations (R76W, R76Q and R80W) on promoter linked reporter plasmids (transactivation) and HK-2 target genes (real-time qPCR) was studied.

Results: R76W demonstrated an increased transactivation activity, especially on the *HNF1A* promoter-linked reporter (650 %), but also on the *G6PC* promoter-linked reporter (200 %), compared to the wild type *HNF4A* (100 %). Only the *G6PC* gene demonstrated a significantly reduced expression for the variants R76Q and R80W, based on the real-time qPCR, and this correlates with the variants which demonstrated a reduced level of transactivation activity on the *G6PC* promotor (respectively 90 % and 50 %).

Conclusion: The cell line HK-2 is challenging, but relevant in not only research related to diabetes, but also for studying the effects of mutations in MODY genes associated with kidney disease, in regulation of target-genes.

Keywords: proximal tubulus, MODY, Dual Luciferase Reporter Assay, Real time qPCR, *HNF4A*

Innholdsfortegnelse

1	INTRODUKSJON	1
1.1	Bakgrunn.....	1
1.1.1	Diabetes mellitus	1
1.1.2	Maturity-onset diabetes of the young (MODY)	3
1.1.3	HNF-4A isoformer og funksjonelle protein domener	5
1.1.4	Vevsspesifikk rolle til HNF-4A.....	7
1.1.5	<i>HNF4A</i> varianter – MODY1 og variantspesifikke fenotyper.....	8
1.1.6	Relevante cellelinjer i funksjonelle studier av HNF4A varianter.....	9
1.2	Hensikt og problemstilling.....	10
1.2.1	Hensikt.....	10
1.2.2	Problemstillinger.....	10
2	METODE	11
2.1	Valg av forskningsdesign.....	11
2.2	Utvalg.....	11
2.3	Datainnsamling	12
2.3.1	Kultivering og rensing av plasmider.....	12
2.3.1.1	Analyse av plasmid DNA ved gelelektroforese.....	12
2.3.2	Dyrking av HK-2 cellelinje	12
2.3.2.1	Kryopreservering av HK-2 celler	13
2.3.2.2	Tining av kryopreserverte HK-2 celler.....	13
2.3.2.3	Splitting av HK-2 celler.....	13
2.3.2.4	Telling av celler	14
2.3.2.5	Testing av eventuell Mycoplasma infeksjon i cellelinjer	14
2.3.3	Transfeksjon av HK-2 celler.....	14
2.3.3.1	Immunfluorescens analyse for optimalisering av transfeksjonseffektivitet	14
2.3.3.2	Analyse av transaktivering	15
2.3.4	Isolering av RNA.....	16
2.3.4.1	cDNA syntese	17

2.3.4.2	Kvantitative sanntids-PCR-analyser	17
2.3.4.3	Agarose gel elektroforese	18
2.3.5	Statistiske beregninger	18
2.4	Etiske betraktninger	19
3	RESULTATER	20
3.1	Mycoplasma testing av HK-2 cellelinjen.....	20
3.2	Optimalisering av betingelser ved dyrking av HK-2 cellelinje	21
3.3	Gelelektroforese analyse av plasmid DNA med ulike HNF-4A varianter	22
3.4	Optimalisering av transfeksjonseffektivitet ved fluorescens mikroskopi analyse	23
3.5	Optimalisering av transfeksjon av <i>HNF4A</i> og reporter plasmider for transaktivering i HK-2 celler	23
3.6	Effekt av <i>HNF4A</i> varianter på HNF-4A transaktivering i transfekterte HK-2 celler.....	26
3.7	Effekt av R76W på WT HNF-4A transaktivering.	28
3.8	Optimalisering av kvantitative sanntids-PCR analyser av målgene til HNF-4A .	31
3.9	Analyse av PCR-produkt ved agarose gelelektroforese	41
3.10	Effekt av <i>HNF4A</i> varianter på uttrykksnivået av HNF-4A målgener.....	43
4	DISKUSJON	45
4.1	HK-2 cellelinje som modellsystem for å studere MODY-relaterte genvarianter.	45
4.2	Optimalisering av transfeksjon i HK-2 cellelinje	46
4.3	Optimalisering av HNF-4A transaktivering i HK-2 celler	46
4.4	Effekt av <i>HNF4A</i> varianter på HNF-4A transaktivering	48
4.5	Valg av målgener for kvantitative PCR-analyser i HK-2 celler	50
4.6	Optimalisering av kvantitative PCR-analyser i HK-2 celler.....	52
4.7	Effekt av <i>HNF4A</i> varianter på uttrykk av HNF-4A målgener basert på kvantitativ sanntids PCR.....	53
4.8	Effekt av R76W variant på WT HNF-4A transaktivering	54
4.9	Studiens validitet.....	55

5	KONKLUSJON	57
6	REFERANSELISTE	59
7	VEDLEGG	67
7.1	Optimalisering primere	67
7.2	Amplifikasjonskurvene til de individuelle genene	78
7.3	Materiale	87

Forkortelser

AF-1	Activation function 1
AF-2	Activation function 2
DBD	DNA-binding domain
EV	Empty-vector
<i>G6PC</i>	Glucose-6-phosphatase (gen)
G6PC	Glucose-6-phosphatase (protein)
<i>GCK</i>	Glucokinase
GLUT-2	Glucose transporter-2
HI	Hyperinsulinism
HH	Hyperinsulinemic hypoglycemia
<i>HNF1A</i>	Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (gen)
HNF-1A	Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (protein)
<i>HNF4A</i>	Hepatocyte nuclear factor-4 alpha (gen)
HNF-4A	Hepatocyte nuclear factor -4 alpha (protein)
<i>HNF1B</i>	Hepatocyte nuclear factor -1 beta (gen)
kb	kilobase
LBD	Ligand binding domain
MODY	Maturity onset diabetes of the young
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline-Tween 20
RT-qPCR	Quantitative Real-Time PCR
PCR	Polymerase chain reaction
T1D	Type 1 diabetes
T2D	Type 2 diabetes
WT	Wild-type

1 INTRODUKSJON

1.1 Bakgrunn

Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) er en sjelden form for dominant arvelig type diabetes. All genetisk og klinisk forskning som utføres på norske MODY pasienter er samlet i det norske MODY registeret som administreres ved Senter for Diabetesforskning. I dag er det kartlagt 14 subtyper av MODY (MODY1-14), forårsaket av varianter av enkeltgen (monogen sykdom), hvorav noen subtyper (MODY1, MODY3 og MODY5) er karakterisert med en mer alvorlig fenotype enn andre (MODY2). Genetisk typebestemmelse av MODY er viktig for angivelse av eksakt diagnose, prognose og for valg av terapi, da noen subtyper av MODY behandles med sulfonylurea tablett som er foretrukket før insulin sprøyter (Søvik, 1998; Pearson E. R., 2006). Ettersom hovedårsaken til MODY pasienters diabetes er grunnet nedsatt insulinutskillelse fra bukspyttkjertelen, har tidligere forskning hovedsakelig fokusert på endringer relatert til bukspyttkjertelen og nærmere bestemt de insulin-produserende β -cellene i langerhanske øyer. Så langt har vært lite fokus på endring i funksjon av nyrene relatert til diabetes, og mer spesifikt MODY, derfor var målet med denne masteroppgaven på endringer i reguleringen av spesifikke målceller (proksimale tubuli; HK-2) i nyrene, forårsaket av R76W og R76Q varianter av *HNF4A* genet, assosiert med nyresvikt (Fanconi syndrom) og MODY1.

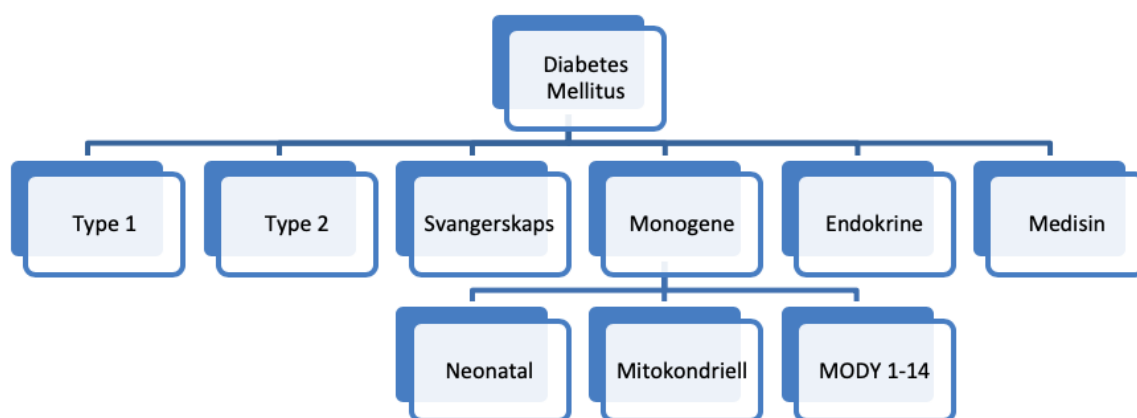
1.1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus er en gruppe metabolske lidelser som er karakterisert med et kronisk forhøyet nivå av glukose i blodet, også kalt hyperglykemi (American Diabetes Association, 2014). Diabetes er et resultat av at β -cellene i bukspyttkjertelen ikke produserer nok insulin, eller at cellene i kroppen ikke responderer optimalt på insulinet som produseres. Insulin er kroppens blodsukkersenkende hormon ved å stimulere cellene i insulinsensitivitet vev som muskel, lever og fett, til å ta opp glukose fra blodet som kilde til forbrenning (energi) eller for lagring i form av glykogen. Insulin er også viktig i omdannelsen av protein og fett som bidrar til lagring av fett som triglyserider og bruk av aminosyrer som byggesteiner i nydannelse av protein.

Over 400 millioner mennesker verden over har diabetes, og i 2012 var det 1,5 millioner dødsfall som kunne knyttes direkte til sykdommen (World Health Organization, 2016; American Diabetes Association, 2019). Diabetes øker stadig i omfang, spesielt i lav- og middelinntektsland, og i

alvorlige tilfeller kan hyperglykemi/diabetes føre videre til hjerte- og karsykdom, nedsatt nyrefunksjon, redusert syn og redusert nervefunksjon (diabetisk nevropati). Årsak til diabetes er kompleks, men inkluderer økt overvekt og mangel på fysisk aktivitet.

Diabetes mellitus deles inn i flere typer: diabetes type 1, diabetes type 2 og svangerskapsdiabetes. I tillegg er det flere karakteristiske diabetestyper som monogen diabetes, sekundær form av diabetes som resultat endokrin sykdom (f. eks. cystisk fibrose, Cushings sykdom), og medikament induisert diabetes (American Diabetes Association, 2019). Neonatal diabetes, mitokondriell diabetes og MODY er såkalte monogene former for diabetes som skyldes varianter av ett enkelt gen (for oversikt over ulike diabetes former se figur 1.1). Blant samtlige diabetes former er type 1 og type 2 de hyppigst forekommende. Type 1 diabetes debuterer ofte i ung alder og utgjør rundt 5-10 % av all diabetes (American Diabetes Association, 2014). Sykdommen skyldes en autoimmun ødeleggelse av β -cellene som gjør at bukspyttkjertelen ikke lenger produserer insulin. Pasienter er derfor avhengig av eksogen tilførsel av insulin. Type 2 diabetes utgjør rundt 90-95 % av alle diabetestilfeller og utvikler seg gradvis, noe som gjør at pasienter kan gå lenge udiagnostisert (American Diabetes Association, 2014). Denne formen for diabetes karakteriseres også av symptomer på insulinresistens. Pasienter kan kontrollere sitt blodsukkernivå med sunt kosthold og trening, og ved hjelp av antidiabetisk medisin og/eller insulin tilførsel. Ved både type 1 og type 2 diabetes er det et komplisert samspill mellom forskjellige genetiske og miljøfaktorer som er antatt å være underliggende årsak til individuell sykdom (American Diabetes Association, 2019). I Norge er det estimert at rundt 250 000 individer har diabetes (Diabetesforbundet, 2015), hvorav rundt 28 000 av disse individene er estimert å ha type 1 diabetes og 220 000 har diagnosen type 2 diabetes.



Figur 1.1 Diabetes Mellitus og subtyper: type 1 diabetes, type 2 diabetes, svangerskapsdiabetes. I tillegg er det flere karakteristiske diabetestyper som monogen diabetes, sykdom i det endokrine systemet og medisinrelatert diabetes.

1.1.2 Maturity-onset diabetes of the young (MODY)

MODY karakteriseres som ikke-insulinavhengig diabetes, autosomal dominant arvegang, og inntreffer vanligvis i ung alder (før 25-30 år) (Froguel, 1993; Horikawa, 1997; Yamagata, 1996).

MODY er en relativt sjelden sykdom og utgjør rundt 1-3 % av alle diabetestilfeller i verden.

Pasienter med MODY viser en progressiv dysfunksjon av β -cellene i bukspyttkjertelen som fører til redusert insulinutskillelse, redusert opptak av glukose fra blodet, og dermed hyperglykemi. Selv om MODY pasienter i utgangspunktet ikke er insulinavhengige, så kan sykdommen med årene utvikle seg til alvorlig diabetes som krever insulinbehandling. På lik linje med andre pasienter er også MODY pasienter disponert for å utvikle senkomplikasjoner som hjerte-kar sykdom, nedsatt nyrefunksjon og retinopati (Velho, 1996 ; Fajans, 1990; Isomaa, 1998; Iwasaki, 1998).

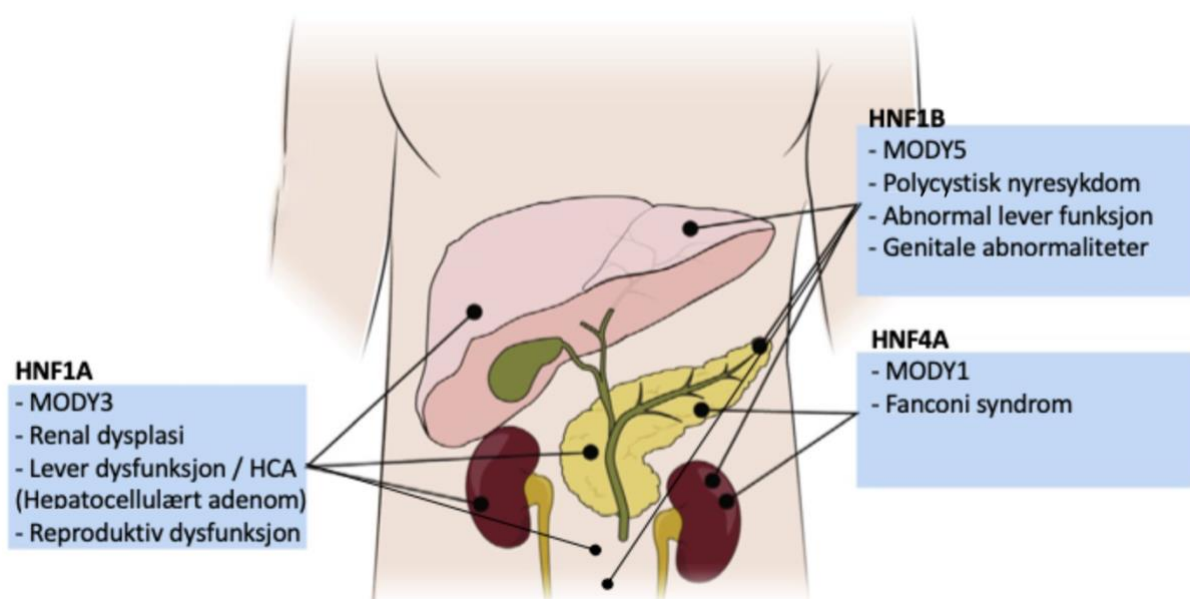
Tabell I Gener assosiert med Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY), frekvens og fenotype assosiert med hver MODY subtype. Tabellen er hentet og modifisert fra Urakami (2019).

MODY	GEN	Frekvens (% av alle MODY typer)	Fenotype
MODY1	<i>HNF4A</i>	5	β - celle dysfunksjon, Neonatal diabetes, hyperinsulinemi og hypoglykemi i barndom, lave triglyserider
MODY2	<i>GCK</i>	30-50	Glukose sensing defekt, mild hyperglykemi
MODY3	<i>HNF1A</i>	30-50	β - celle dysfunksjon, glukosuri
MODY4	<i>PDX1</i>	<1	β - celle dysfunksjon, permanent neonatal diabetes, bukspyttkjertel agenese
MODY5	<i>HNF1B</i>	5	β - celle dysfunksjon, renale malformasjoner, genital- og urinveis abnormaliteter

MODY6	<i>NEUROD1</i>	<1	β- celle dysfunksjon, neonatal diabetes, barn eller voksen diabetes debut
MODY7	<i>KLF11</i>	<1	β- celle dysfunksjon, lik type 2 diabetes
MODY8	<i>CEL</i>	<1	Bukspyttkjertel endokrin og eksokrin dysfunksjon, lipomatose
MODY9	<i>PAX4</i>	<1	β- celle dysfunksjon, ketoacidose
MODY10	<i>INS</i>	<1	Neonatal diabetes, barn eller voksen diabetes debut
MODY11	<i>BLK</i>	<1	Insulinsekresjon defekt, overvekt
MODY12	<i>ABCC8</i>	<1	ATP- sensitiv kalium kanal dysfunksjon, Homozygot, permanent neonatal diabetes
MODY13	<i>KNJ11</i>	<1	ATP- sensitiv kalium kanal dysfunksjon, heterozygot, transient neonatal diabetes
MODY14	<i>APPL1</i>	<1	Insulinsekresjon defekt, barn eller voksen diabetes debut

Det er i dag identifisert rundt 14 forskjellige subtyper av MODY, der hver subtype skyldes en variant av følgende 14 gener: *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *PDX1*, *HNF1B*, *NEURO1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11*, and *APPL1* (Urakami, 2019)(Tabell I). Type variant av type gen avgjør debutalder for diabetes, behandlingsrespons, og assosierte komplikasjoner (Hoffman, 2019). De hyppigste subtypene av MODY skyldes varianter av gen som koder for glukokinase (*GCK*) ved MODY2, hepatocyte nuclear factor 1-alpha (*HNF1A*) ved MODY3, hepatocyte nuclear factor 1-beta (*HNF1B*) ved MODY5, og hepatocyte nuclear factor 4-alpha (*HNF4A*) ved MODY1. Mens *HNF1A* og *HNF4A* koder for transkripsjonsfaktorer som spiller en viktig rolle ved reguleringen av gener essensielle for normal insulinproduksjon og utskillelse fra β-cellene i

bukspyttkjertelen, koder *GCK* genet for enzymet glukokinase som fungerer som en glukose sensor og katalyserer det første steget i glykolysen (Matschinsky, 1990). Der *MODY2* (*GCK*) er den mildeste subtypen av *MODY*, med en asymptomatisk, ikke-progressiv hyperglykemi, trenger vanligvis ikke disse pasientene medikamentell behandling. *MODY3* (*HNF1A*) og *MODY1* (*HNF4A*) pasienter har derimot en mer alvorlig fenotype, som behandles først og fremst med sulfonylurea tabletter, eventuelt i kombinasjon med insulin. I tillegg til at *MODY3* er assosiert med en progressiv hyperglykemi, er det også en risiko for at disse pasientene utvikler mikro- og makrovaskulære komplikasjoner (Steele, 2010). *MODY1* er karakterisert av medfødt neonantal hyperinsulinemi, og hypoglykemi, macrosomia, og i sjeldne tilfeller nyresvikt (Fanconi syndrom) (Pearson E. R., 2007; Hamilton, 2014). *MODY5* (*HNF1B*) har en mer karakteristisk fenotype som i tillegg til diabetes også kan inkludere renale cyster, hypoplasi av bukspyttkjertelen, utviklingsfeil i gonadene, og genital kanal malformasjoner (figur 1.2)(Bellanné-Chantelot C. C.-L.-M., 2005). Pasientene med *MODY5* behandles i hovedsak med insulin.

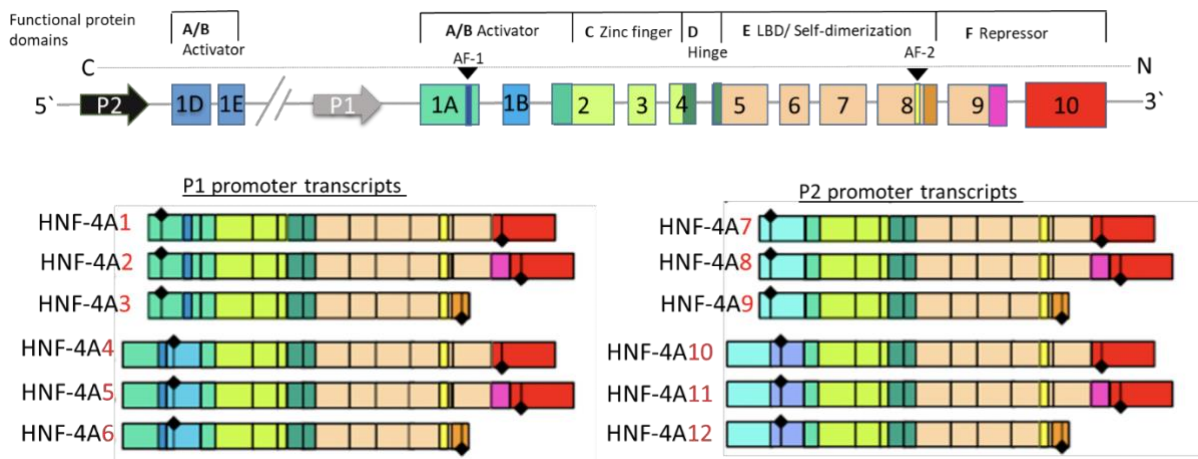


Figur 1.2 Oversikt over hovedimplikasjoner i lever, bukspyttkjertel, nyre og kjønnsorgan som er assosiert med varianter av *HNF* gener hos *MODY* pasienter. Figuren er hentet og modifisert fra Lau et al. (2018).

1.1.3 HNF-4A isoformer og funksjonelle protein domener

HNF4A genet er lokalisert på kromosom 20, består av 13 exoner og utgjør ca 30 kb genomisk DNA (Drewes, 1996). *HNF4A* koder for hepatocyte nucleær factor-4A (HNF-4A). Transkripsjon

av *HNF4A* reguleres av to vevsspesifikke promotorer; P1 og P2, som gir opphav til 12 forskjellige HNF-4A isoformer, også ved hjelp av alternativ spleising (figur 1.3). Disse isoformene er uttrykt temporalt (isoformer av HNF-4A kan bli uttrykt i forskjellige stadier i celledelingen) og vevsspesifikt (Huang, 2009; Lau, 2018; Sladek, 1999; Thomas H. J.-F., 2001). Generelt er P1 promotor-regulerte HNF-4A isoformer leverspesifikke, mens P2 promotor regulerte HNF-4A isoformer er bukspyttkjertelspesifikke (Thomas H. J.-F., 2001). Etersom det er begrenset tilgang på humant føtalt vev, så foreligger det relativt lite informasjon om uttrykksnivået av *HNF4A* og *HNF*-gener generelt under embryonal utvikling. Det man imidlertid vet er at isoform 1-6, styrt fra promotor P1, i tillegg til lever, er også uttrykt i nyre hos voksne og i bukspyttkjertelen hos foster (Harries, 2008). Isoform 7-12, styrt fra promotor P2, er uttrykt i lever hos foster og i gallegang, magesekk og bukspyttkjertel hos voksne (Tanaka, 2006).



Figur 1.3 *HNF4A* genet og promotor-spesifikk regulering av HNF-4A isoformer. Figuren er hentet fra Ko et al. (2019). Isoform HNF-4A 1-6 er leverspesifikke og styrt fra P1 promotor. Isoform HNF-4A 7-12 er bukspyttkjertelspesifikk og styrt fra P2 promotor.

HNF-4A proteinet er en transkripsjonsfaktor og tilhører den kjernereseptor-familien (Chandra, 2013; Lu, 2008). Proteinet har flere funksjonelle domener som inkluderer DNA bindende-domene (DBD)(C), ligand og dimeriserings-domene (LBD)(E), hinge domene (D), repressor domene (F) og to aktivator funksjon domener (AF-1 og AF-2)(figur 1.3). De to domene for aktiveringsfunksjon er lokalisert i N- og C- terminale enden av proteinet (Sladek, 1999). AF-1 som har en ligand-uavhengig funksjon ligger i aktiveringsdomenet og AF-2 som har en ligand-avhengig funksjon ligger i LBD domenet (Warnmark, 2003). AF-1 øker transkripsjonspotensialet ved å rekruttere fettsyrer som co-aktivatorer og ved å interagere med AF-2 aktivator funksjon

domenet (Erdmann, 2007; Lu, 2008). LBD inneholder en hydrofob ligandbindende lomme som er lokalisert ved siden av AF-2 domenet som aktiverer transkripsjon: Repressor domenet har en hemmende effekt på AF-2 domenet (Hadzpopoulou-Cladaras, 1997). Forskjellen på de ulike HNF-4A isoformene finnes i N- og C- regionen (figur 1.3) og er årsak til at de ulike isoformene har forskjellige transaktiveringspotensial (Briancon, 2006; Ruse, 2002). HNF-4A fungerer som en homodimer og regulerer uttrykket av målgener ved at DBD gjenkjenner og binder seg til DNA respons element DR1 (Lu, 2008). DBD har to zinkfinger strukturer som legger til rette for interaksjonen med DR1 lokalisert i major groove i DNA heliks. Når fettsyrer binder til ligand bindingslommen, vil LBD endre konformasjon som muliggjør interaksjon mellom co-aktivatorer og HNF4A (Duda, 2004).

1.1.4 Vevsspesifikk rolle til HNF-4A

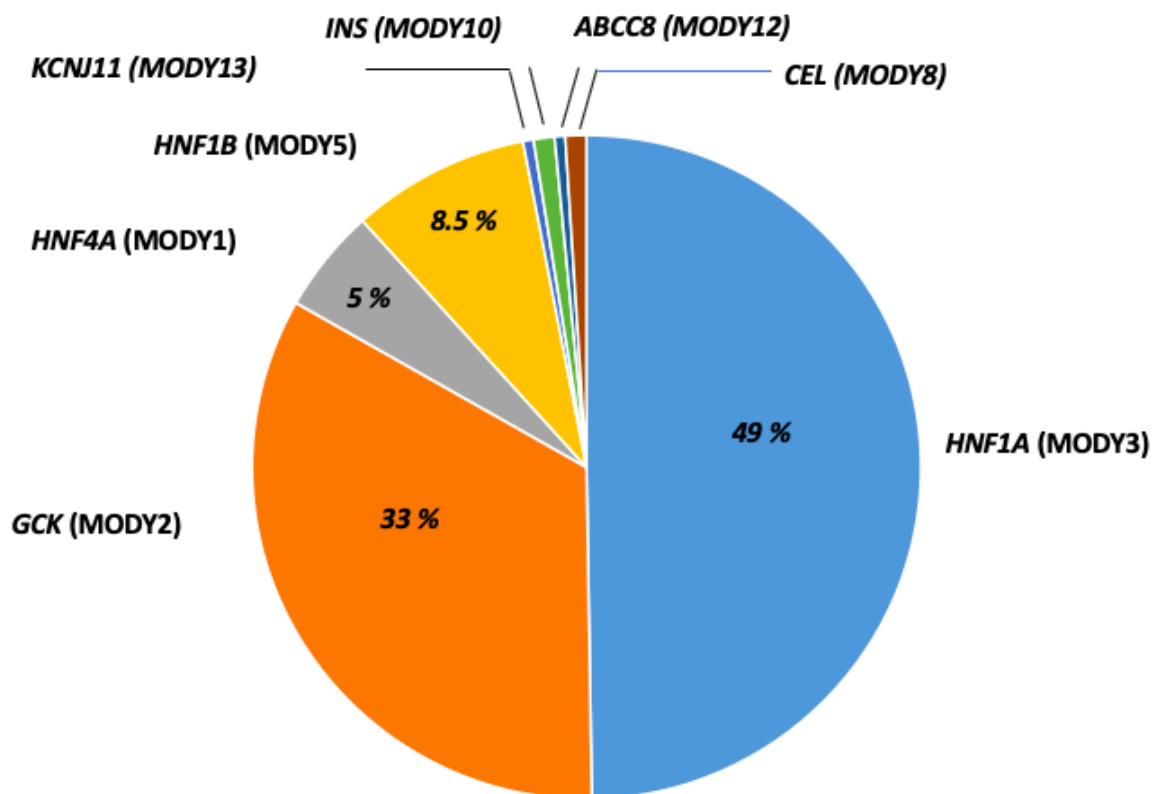
De mange isoformene av HNF-4A illustrerer kompleksiteten av regulering av *HNF4A* uttrykk og HNF-4A funksjon. I bukspyttkjertelens beta-celler er HNF-1A kjent å regulere uttrykk av *HNF4A* genet, via regulering av P2 promotoren til *HNF4A* genet (Thomas H. J.-F., 2001; Boj S. F., 2001). Ettersom HNF-4A også regulerer uttrykk av *HNF1A* genet, så er disse to transkripsjonsfaktorene omtalt å inngå i en kryss-regulatorisk loop (Eeckhoute, 2004). Studier har vist at HNF-1A og HNF-4A har felles transkriptom signaturer (RNA uttrykk) i langerhanske øyceller og at deres transkripsjonsfaktoraktivitet er avhengig av hverandre, og er vevsspesifikk (Boj S. F., 2010). Dette er viktig i vår forståelse av hvordan varianter av en av disse faktorene kan påvirke den andre, og gi nedsatt øycellefunksjon (insulinutskillelse) og diabetes. HNF-4A har vist seg å være en viktig transkripsjonsfaktor ikke bare i øycellene i bukspyttkjertelen, men også i lever, ved at den binder rundt 40% av promoter regionene i leverens hepatocytter (Odom, 2004). HNF-4A er derfor meget viktig for å opprettholde homeostasen i begge disse vevene (Sasaki, 2018). Studier utført i mus har blant annet vist at HNF-4A er viktig i reguleringen av mange gener involvert i leverfunksjon, slik som apolipoproteiner og metabolske proteiner, og at tap av HNF-4A påvirker utviklingen av epitelet i lever, og fører til fettlever og nedregulering av glukoneogenesen (Hayhurst, 2001). I leverens hepatocytter har HNF-4A også vist seg å ha en viktig rolle i regulering av lipoprotein biosyntesen, som kan forklare hvorfor MODY1 pasienter også viser lever-relaterte symptomer som reduserte HDL (High-Density Lipoprotein)- og økte LDL (Low-Density Lipoprotein) kolesterol verdier (Pearson E. R., 2005).

I nyrene har HNF-4A vist seg å være høyt uttrykt spesielt i proksimale tubular epitelceller (PTEC). En nylig rapport indikerer at HNF-4A spiller en viktig rolle i reabsorpsjon og

metabolisme av glukose i PTEC ved å positivt regulere flere membrantransport- og reseptorproteiner (megalin gener) (Sasaki, 2018; Bonnefond, 2012). Transport av glukose inn og ut av cellene er avhengig av spesialiserte transportproteiner som SGLT (Sodium coupled Glucose Transporter) og GLUT (Glucose Transporter). Av de forskjellige SGLT proteinene er SGLT2 betraktet som det viktigste i nyrene, da dyrestudier viser at SGLT2 står for reabsorpsjon av 90 % av glukose i glomerulus (Marsenic, 2009). SGLT1 bidrar med 10 % av glukose reabsorbasjon i proksimale tubuli. Av GLUT proteinene uttrykt i nyrene er GLUT2 hovedtransporteren og frigjør glukose, reabsorbert av SGLT, ut i sirkulasjonen (Triplitt, 2012). Det er derfor ikke utenkelig at varianter av *HNF4A* vil kunne påvirke funksjonen til HNF-4A proteinet og reguleringen av målgener i samtlige vevstyper der HNF-4A er uttrykt.

1.1.5 *HNF4A* varianter – MODY1 og variantspesifikke fenotyper

Varianter av *HNF4A* er hyppigst assosiert med MODY1. MODY1 er relativt sjelden blant subtypene av MODY (utgjør rundt 5 % av pasientene i det Norske MODY Registeret) (figur 1.4). Siste publiserte rapport på forekomst av MODY1 anslo at på verdensbasis har totalt 103 *HNF4A* varianter blitt identifisert i totalt 173 diabetesfamilier (Coclough, 2013). Varianter av *HNF4A* har også vært assosiert som risikofaktor for type 2 diabetes (Scott, 2017 ; Fogarty, 2014). I Coclough et al. har 28 *HNF4A* varianter vist seg å ha blitt identifisert i 33 familier med en annen klinisk fenotype (før videreutvikling til MODY1): medfødt neonatal hyperinsulinemi og hypoglykemi (HH) med macrosomi (høy vekt ved fødsel) (Coclough, 2013). Hos disse pasientene endrer den hypoglykemiske fenotypen seg senere til hyperglykemi som hos andre MODY1 pasienter. Nyresvikt (Fanconi syndrom) som tilleggssyndrom ved *HNF4A* variant har kun blitt observert hos 10-12 familier, og da hos dem som er bærere av en av to unike *HNF4A* varianter: c.226C>T (p.R76W) og c227.G>T (p.R76Q) i henhold til Chartier et al. nomenklatur (Flanagan, 2010; Stanescu, 2012; Hamilton, 2014; Numakura, 2015; Chartier, 1994). R76Q er i tillegg funnet i 5 franske familier assosiert med MODY, Fanconi syndrom og transient hypoglykemi (upubliserte data kommunisert fra Christine Bellane-Chantelot).



Figur 1.4 Forekomst av MODY i det Norske MODY Registeret. Tall basert på registreringsinformasjon fra 2019, og screening av totalt 2125 pasienter.

1.1.6 Relevante cellelinjer i funksjonelle studier av *HNF4A* varianter

Basert på at kun to varianter som påvirker samme aminosyre i *HNF-4A* (R76W og R76Q) er assosiert med Fanconi syndrom hos MODY1 pasienter, så har noen forsøk på å påvise en molekylær mekanisme for dette vært utprøvd. Tidligere forskning publisert på mulig funksjonell effekt av *HNF4A* varianten R76W har vist en nedsatt evne av *HNF-4A* til å binde målgener (strukturell studie) (Chandra, 2013). I senere tid har det blitt utført eksperimentelle studier av medlemmer i Diabetes forskningsgruppen i Bergen, for å bedre forstå hvilken effekt disse to *HNF4A* varianter har på normal proteinfunksjon av *HNF-4A*, som forklaring på hvorfor unike *HNF4A* varianter kan forårsake forskjellig fenotype hos pasienter og sykdom i spesifikke organ. To tidligere masterstudenter (Lorentze Hope Hornes og Jorunn Hjaltadottir) i Diabetes forskningsgruppen har fokusert på effekt av de to variantene på *HNF-4A* DNA-binding og aktivering av utvalgte målgener i ulike celledsystem (upublisert data). Valg av cellelinjer for disse eksperimentelle studiene var relatert til bukspyttkjertel- (MIN6) og lever (HepG2), som uttrykker endogent *HNF-4A*, samt i cellelinjer som ikke normalt uttrykker *HNF-4A* (HeLa/Hek293). Hvilken spesifikk effekt R76W og R76Q har på *HNF-4A* sin regulering av målgener i en human

nyrespesifikk cellelinje, ettersom er påvist hos familier med nyresykdommen Fanconi syndrom, har aldri tidligere blitt undersøkt.

1.2 Hensikt og problemstilling

1.2.1 Hensikt

- Optimalisere og etablere laboratorieanalyser for å studere effekten av MODY1-assosierte *HNF4A* varianter på normal HNF-4A funksjon, i en relevant nyrecellelinje (HK-2).
- Studere effekt av *HNF4A* varianter både assosiert/ikke-assosiert med Fanconi syndrom, på HNF-4A transaktivering av relevante promotor-linkede reporter system.
- Studere effekt av *HNF4A* varianter både assosiert/ikke-assosiert med Fanconi syndrom, på uttrykk av endogene HK-2 målgener ved kvantitative sanntid-PCR-analyser.

1.2.2 Problemstillinger

- Hvilken spesifikk effekt har diabetes assosierte varianter (R76W, R76Q og R80W) på HNF-4A regulering av målgener i en human nyrespesifikk cellelinje?

Mer spesifikt:

- a) Vil en kunne påvise endring i aktivering av målgener ved å studere HNF-4A transkripsjonsfaktorfunksjon ved et transaktiveringsassay?
 - b) Vil en ved hjelp av kvantitative sanntids-PCR analyser av målgener, kan en påvise endring i deres uttrykk ved å analysere HNF-4A transkripsjonsfaktorfunksjon?
- Vil analyser av transaktivering og uttrykk av samme *HNF4A* målgener (a og b) kunne gi korrelerende svar på effekt av ulike *HNF4A* varianter?

2 METODE

2.1 Valg av forskningsdesign

For å besvare problemstillingene er det valgt et kvantitativt forskningsdesign. Et slikt design kjennetegnes ved at det man vil studere kan gjøres om til målbare data (Polit, 2017). Ved å samle inn data systematisk og ved å bruke statistiske tester kan en kartlegge og analysere materialet. Resultatene som blir presentert skal ha minst mulig påvirkning fra den som utfører studien. Ettersom dette arbeidet ikke begrenser seg til å studere, men å utføre eksperimenter, kan man si at dette er et eksperimentelt design. Man vil undersøke om, eller i hvor stor grad en manipulering vil føre til forandring. I eksperimentelle forskningsdesign er det vanlig å bruke kontroller for å forsikre seg om at endringen skyldes manipulasjonen, og vil da representere en prøve som ikke er utsatt for påvirkning. For å regnes som en randomisert kontrollert studie må testmaterialet være tilfeldig fordelt til kontroll eller eksperiment (Polit, 2017).

2.2 Utvalg

HNF4A genet, med ulike kjente varianter, var ved start av dette masterprosjektet allerede blitt konstruert i egnede mammalske uttrykks-plasmider (*HNF4A*-pcDNA3.1-FLAG) ved bruk av seterettet mutagenese. Disse muterte plasmidene har tidligere blitt analysert i cellelinjene HepG2 (human liver cancer cell line), Hela (human cervical cancer cell line), HEK293 (human embryonic kidney cell line) og MIN6 (mouse insulinoma cell line), av tidligere masterstudenter ved UiB. Videre ønsket man å studere effekt av uttrykk av disse *HNF4A* muterte plasmidene i en nyre cellelinje, for å også i en slik cellelinje kartlegge eventuelle funksjonelle forskjeller mellom uttrykt variant og villtype protein. De muterte *HNF4A* plasmidene ble derfor uttrykt i en HK-2 cellelinje, og analysert for sin transkripsjonsfaktorfunksjon opp mot det normale villtype proteinet. Denne cellelinjen er kommersiell og er derivert fra proksimal tubulær cortex (PTC) fra en normal nyre til en voksen mann (ATCC, 2016). Cellene er gjort udødelig ved transduksjon med papilloma virus 16 (HPV-16) E6/E7 gener (derivert fra proksimal tubulær cortex).

Nyresvikt (Fanconi syndrom) har blitt beskrevet som tilleggssyndrom til *MODY1* hos 10 familier med to unike *HNF4A* varianter (R76W og R76Q) (Coclough, 2013; Hamilton, 2014).

Årsakssammenhengen mellom disse to individuelle variantene og nyresvikt er i dag ukjent. R80W er også assosiert med *MODY1*, men ikke Fanconi syndrom, til tross for at varianten sitter nær R76 aminosyren i protein sekvensen (Flanagan, 2010). Dette dannet grunnlaget for ønske om å studere

effekt av R76W og R76Q i HK-2 celler, og bruke R80W som sammenligning, ved HNF-4A funksjonelle studier.

2.3 Datainnsamling

2.3.1 Kultivering og rensing av plasmider

Diabetesgruppen ved Klinisk institutt 2, UiB, har et bibliotek med fryste XL-gold *Escherichia coli* (*E. coli*) kompetente bakterieceller (celler som er permeabel for DNA) som inneholder uttrykksplasmid med de aktuelle *HNF4A* variantene og reporterplasmid HNF1A-FL, G6PC-FL og SV40-RL. En alikvot av disse har videre blitt fryst ned i biobank ved HVL. For å ha tilstrekkelig mengde plasmider til transfeksjonsforsøk i HK-2 cellelinjen ble en liten mengde (~100 µl) av individuelle alikvoter (glyserol stock) fra *E. coli*, med ulike plasmider, inokulert i 100 ml Lysogeny Broth (LB) medium tilsatt 75 µg/ml ampicillin eller kanamycin (sistnevnte spesifikk for pMAX GFP plasmidet). Bakteriekulturene ble dyrket ved 225 rpm over natt, ved 37 °C. Dagen etter ble bakteriekulturene sentrifugert ved 4000 rpm i 10 min, ved romtemperatur, og supernatant ble helt av. Plasmid rensing ble utført ved bruk av HiSpeed® Plasmid Midi Kit (Qiagen). Plasmidet ble rensert fra bakteriekultur i henhold til produsentens anbefalte prosedyrer. For å bestemme utbytte fra plasmidrens (DNA konsentrasjon og renhet), ble rensede plasmider analysert på Nanovue Plus™ Spektrofotometer. Tris EDTA (TE) buffer ble brukt som blankprøve og gjennomsnittet av to parallelle målinger ble brukt i videre konsentrasjonsberegninger.

2.3.1.1 Analyse av plasmid DNA ved gelelektroforese

Gelelektroforese er en metode for å analysere størrelse og kvalitet av DNA plasmid. De rensede plasmidene vil da føres gjennom en agarosegel ved hjelp av gelelektroforese parallelt med DNA størrelsesmarkør Lamda DNA/EcoRI Marker 1. Det ble brukt 1 % agarose (Fisher Scientific) og elektroforesen ble utført i 30 minutter ved 80 V og deretter 20 minutter ved 100 V. Etidiumbromid (EtBr) (Electran) ble tilsatt både i agaroseløsning og i elektroforesebufferen 50x TAE (Thermo scientific) og merker DNA. Deretter ble DNA visualisert med UV lys på Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad).

2.3.2 Dyrking av HK-2 cellelinje

HK-2 cellene ble dyrket i Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM) (Gibco) som på forhånd var tilsatt 0,05 mg/ml Bovine pituitary extract, 5 ng/ml human recombinant Epidermal growth factor og 1x streptomycin- penicillin (100U/ml). Cellene ble dyrket i inkubator ved 5 % CO₂ og i 37 °C, i

Poly-D-Lysine behandlede kulturflasker (Thermo scientific) av størrelsene 25 eller 75 cm² (med filter kork). Generelt arbeid med mammalske cellelinjer på cellelab ble utført basert på laboratoriets prosedyrer for sterilt arbeid, egne erfaringer med HK-2 cellene i løpet av masteroppgaven, og anbefalt protokoll fra ATCC (ATCC, 2016), samt tidligere publiserte arbeider basert på bruk av denne cellelinjen (Ryan, 1994).

2.3.2.1 Kryopreservering av HK-2 celler

Alikvoter av cellelinjen i vekstmedium ble fryst ned for å sikre celler til bruk gjennom masterprosjektet. Ved nedfrysing av celler hadde cellene oppnådd rundt 80 % tetthet. Cellene i en 25 cm² kulturflaske ble først vasket med PBS, trypsinert og suspendert, som beskrevet i seksjon 2.3.2.3. Cellesuspensjonen ble sentrifugert for å fjerne medium og cellepelleten ble resuspendert i 3 ml av en blanding av 7,5 % DMSO og K-SFM medium med tilsetninger (seksjon 2.3.2). Cellesuspensjon ble fordelt på 3 cryo-rør og oppbevart på -80 °C i en uke, før de ble overført til -150 °C for langtidslagring i henhold til generelle anbefalinger for lagring av mammalske cellelinjer.

2.3.2.2 Tining av kryopreserverte HK-2 celler

Ved opptak av nye cellealiquoter ble HK-2 celler, lagret ved -150 °C, fraktet på is. Cellene ble tint raskt, tilsatt 10 ml forvarmet medium (se seksjon 2.3.2.3) og sentrifugert ved 100 x g i 7 minutter, ved romtemperatur. Supernatanten ble sugd av og cellepelleten ble resuspendert i 5 ml forvarmet medium og overført til en 25 cm² kulturflaske for kultivering (se seksjon 2.3.2).

2.3.2.3 Splitting av HK-2 celler

Når cellene hadde nådd en tetthet på rundt 80 %, ble cellene splittet og overført til nye kulturflasker. Først ble mediet fjernet, og for å løsne cellene fra overflaten på kulturflasken ble de tilsatt 1,5 ml 0,05 % trypsin-EDTA (Gibco). Kulturflasken og cellene ble inkubert med trypsin ved 37 °C i 10 minutter, for å sikre løsning av celler. Cellene ble så tilført 10 ml nytt forvarmet medium. For å fjerne trypsin-EDTA fra mediet, ble cellesuspensjonen overført til 50 ml falcon rør, og sentrifugert på 100 x g i 7 minutter, ved romtemperatur. Supernatanten ble sugd av og cellene resuspendert i 15 ml nytt forvarmet medium, og overført til nye 75 cm² kulturflasker. HK-2 cellene brukt til disse eksperimentene nådde aldri høyere passasje nummer enn P17.

2.3.2.4 Telling av celler

Celler ble talt ved hjelp av celletelleren TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad). To parallelle celleprøver ble laget ved å blande 20 µl cellesuspensjon (se seksjon 2.3.2.2) og 20 µl Trypan Blue. 10 µl til hver parallell ble talt, og et gjennomsnitt av de to tallene ble brukt til å beregne antall celler.

2.3.2.5 Testing av eventuell Mycoplasma infeksjon i cellelinjer

Ut ifra anbefalte retningslinjer ved dyrking av mammalske cellelinjer, så ble HK-2 cellene testet for eventuell Mycoplasma infeksjon. Universal Mycoplasma Detection Kit (ATCC) ble benyttet i henhold til produsentens anbefalte prosedyrer. Cellene som ble testet var ikke trypsinert i henhold til produsentens protokoll, men ble skrapet løs mens i medium fra overflaten på kulturflasken.

2.3.3 Transfeksjon av HK-2 celler

For å analysere effekt av *HNF4A* varianter på regulering av målgener ble HK-2 celler transfektert med utvalgte *HNF4A* variant plasmider. Lipofectamine® 2000 Reagent ble brukt til å fremme at HK-2 cellene tar opp fremmed DNA (plasmider). Et optimalt antall celler ble sådd ut i brønner på plater eller i flasker, alt etter spesifikt eksperiment (se ulike seksjoner under med spesifisering på antall celler og type plater/flasker), og fikk vokse videre ved vanlige vekstbetingelser. Etter at cellene hadde nådd en tetthet på 80 % ble spesifikk mengde DNA (plasmider) løst i relevant mengde Opti-MEM®, og overført til eppendorfrør tilsatt en spesifikk mengde Lipofectamine® løst i Opti-MEM®. DNA - Lipofectamine® blandingen ble inkubert i 20 minutter ved romtemperatur og deretter overført dråpevis til cellene. Cellene ble inkubert videre ved 37 °C 1-2 dager før de ble videre analysert (for detaljer om spesifikke mengder, se ulike analyser i seksjoner under).

2.3.3.1 Immunfluorescens analyse for optimalisering av transfeksjonseffektivitet

For å undersøke transfeksjonseffektiviteten ble det utført immunfluorescens analyser av HK-2 celler transfektert med plasmid som uttrykker Green Fluorescence Protein (GFP). For dette ble 8×10^4 celler, i 1 ml medium, sådd ut i hver brønn i en 12 brønnersplate med dekkglass i bunn. Dekkglassene ble først vasket med etanol (70 %) og lufttørket, før plassering i brønnene. Etter 24 timer ble HK-2 cellene transfektert med 0 -1,5 µg av plasmidet pmax-GFP og 6 µl Lipofectamine® 2000 reagens. 24 timer etter transfeksjon ble vekstmedium fjernet og cellene vasket med 1 ml

1xPBS og deretter fiksert med 500 µl 3 % paraformaldehyd løsning i 30 minutter ved romtemperatur. Deretter ble cellene vasket 3 ganger med 1 ml 0,1 % Tween 20. For å permeabilisere cellene ble de inkubert med 1 ml 0,1 % Tween 20 og 0,1 % Triton X-100 i 20 minutter, ved romtemperatur. Permeabiliseringsløsningen ble så fjernet, og dekkglass ble løsnet med skalpell og overført til glass mikroskopslide med celledisken ned. Nivået av uttrykt GFP ble visualisert i fluorescens mikroskop, ved bruk av FITC filter (488 nm). Mengden transfektert pmax-GFP som gav høyest nivå av visuelt GFP uttrykt protein ble benyttet videre for optimalisering av *HNF4A* plasmid transfeksjon for transaktiveringsanalysene (se seksjon 2.3.3.2. under).

2.3.3.2 Analyse av transaktivering

Dual Luciferase Reporter Assay system (Promega) er et verktøy for å studere genuttrykk på transkripsjonsnivå basert på bioluminescense og ved hjelp av reporter plasmider som koder for luciferase enzymer (Firefly og Renilla). Reporterplasmidet *G6PC*-pGL3 inneholder promotor *G6PC* sekvens og *HNF1A*-pGL3 inneholder *HNF1A* sekvens klonet inn foran *Firefly Luciferase* genet. Tilsvarende inneholder reporterplasmidet *SV-40*-pRL promotor *SV-40* sekvens klonet inn foran *Renilla Luciferase* genet. Etter transfeksjon (se seksjon 2.3.3) vil HNF-4A proteinet, som er en transkripsjonsfaktor, binde seg til spesifikt sete i promotoren for målgenene *HNF1A* og *G6PC*, og dermed indusere uttrykk av Firefly luciferase proteinet. Renilla Luciferase fungerer som en intern kontroll i transaktiveringsassayet. Mens Firefly Luciferase er en eksperimentell reporter og varierer etter mengde HNF-4A uttrykt og fungerende protein, så er Renilla Luciferase en kontroll reporter som er konstant uttrykt, og avhengig av cellenes egne (endogene) uttrykte transkripsjonsfaktorer (ikke avhengig av eksogen HNF-4A). Dette betyr at *SV-40* er en kontroll for celledensitet som vil variere ved uspesifikk utsåing av celler i forskjellige brønner. Dette muliggjør normalisering av data mellom ulike prøver og eksperimenter, der Dual-Luciferase Reporter Assay System stimulerer til måling av henholdsvis Firefly og Renilla Luciferase.

Etter optimalisering av ulike betingelser, ble det sådd ut 50 000 HK-2 celler i hver brønn på 24 brønners plate som fikk vokse 48 timer i 0,5 ml vekstmedium. For å undersøke effekt av WT (villtype) HNF-4A og varianter ble de satt opp i to oppsett; ett med reporterplasmid, pGL3-*mG6PC* (oppsett 1) og ett med pGL3-*HNF1A* (oppsett 2). pGL3-*mG6PC* inneholder mus versjon av *G6PC*, som forøvrig har et identisk HNF-4A bindingssete som den humane versjonen. I et tredje oppsett (oppsett 3), ble det undersøkt en titrerende effekt av varianten R76W på WT *HNF4A*, det vil si en økende mengde variant plasmid mot en konstant mengde WT plasmid.

Miksen av plasmider ble løst i 50 µl Opti-MEM® og overført til Eppendorfrør tilsatt 3 µl Lipofectamine® i 50 µl Opti-MEM®. Plasmid - Lipofectamine® blandingen ble inkubert i 20 minutter ved romtemperatur, og så overført dråpevis til cellene. Cellene ble videre inkubert i en celleinkubator ved 37 °C i nye 48 timer, før mål på transaktivering ble gjort som beskrevet i seksjon 2.3.3.

Etter transfeksjon av HK-2 cellene, ble de lysert ved at medium ble fjernet, og cellene ble vasket lett med 0,5 ml kald PBS. PBS ble så fjernet før det ble tilsatt 1x PLB (Passive Lysis Buffer) til cellene som ble inkubert i 20 minutter ved romtemperatur på en roterende vippe. Cellelysaten ble overført til Eppendorfrør og rørene sentrifugert ved 13200 rpm i 10 minutter ved 4 °C, for å pelletere eventuelle celle debris. Supernatanten/cellelysatet ble så overført til nye Eppendorfrør og satt på is. Luciferase assay reagent (LAR II) og Stop and Glo reagent ble laget som anbefalt av leverandørens protokoll. Totalt 20 µl cellelysat ble tilsatt i en 96 brønners luminometer mikroplate for aktivering og måling av Firefly og Renilla Luciferase, ved at 100 µl av henholdsvis Stop and Glo reagens ble tilført av luminometerinstrumentet (automatisert). Aktiviteten til Firefly Luciferase og Renilla Luciferase ble detektert med foton emisjon ved bruk av LB 960 Microplate Luminometer Centro (målt på plattform ved Senter for Diabetesforskning). Aktiviteten av HNF-4A variant proteinene i HK-2 cellene baserer seg på 3 målinger over 3 dager (n=3), og standardavviket (STVD) mellom gjennomsnittet av disse ble beregnet.

2.3.4 Isolering av RNA

For å studere endring i regulering og uttrykk av HNF-4A målgener påvirket av en *HNF4A* variant, ved å sammenligne effekt av celler transfektert med WT versus *HNF4A* muterte plasmider, ble RNA renses fra transfekterte HK-2 celler, før videre cDNA syntese og kvantitativ sanntids-PCR. 7x10⁶ HK-2 celler ble først sådd ut i 15 ml medium, i 75 cm² flasker. Etter 48 timer ble medium fjernet og det ble tilført nytt medium uten antibiotika. Cellene ble så transfektert med plasmider som uttrykker enten WT, R76W, p.R76Q, eller p.R80W HNF-4A protein. Cellene ble så videre inkubert i celleinkubator i 24 nye timer, før de ble isolert ved skraping i 1,5 ml Lysis buffer (tilhørende RNA renseskitet PureLink RNA Mini Kit). Lyserte celler ble tilsatt 1 % 2-mercaptoethanol overført til RNase frie Eppendorfrør, på is og deretter vortexet til cellepelleten var fullstendig oppløst. Total RNA ble deretter isolert ved hjelp av PureLink™RNA Mini Kit (Invitrogen) i henhold til anbefalte prosedyrer fra produsent. Det isolerte RNAet ble midlertidig lagret på is og RNA konsentrasjonen ble målt ved hjelp av Nanovue Spektrofotometer. Det ble

målt to paralleller og tatt gjennomsnitt av disse. RNasefritt vann ble brukt som blankprøve. RNA prøvene ble oppbevart på -80°C før videre analyse.

2.3.4.1 cDNA syntese

Renset RNA ble videre brukt til å syntetisere cDNA ved bruk av qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quantabio). Fra 300 ng RNA ble cDNA syntetisert i henhold til qScript™ cDNA Synthesis Kit protokoll og mengde kit reagenser, i henhold til anbefalte prosedyrer fra produsenten. cDNA ble lagret på -20 °C.

2.3.4.2 Kvantitative sanntids-PCR-analyser

For å analysere mRNA-nivå for ulike målgener til HNF-4A i HK-2 celler ble det utført kvantitative PCR-analyser. Primersekvensene (Tabell II) er basert på publiserte og dermed tidligere testede primere. For hvert målgen (*G6PC*, *PRKC-b*, *GLUT1*, *GLUT2*, *SGLT1*, *SGLT2*, *HNF1A*, *RPL13* og *HNF4A*) ble det først utført en optimalisering av tilhørende primersett. PCR reaksjonsblandingen bestod av Forward og Revers primer (tilhørende målgen), Perfecta SYBRGreen Fast Mix, nukleasefritt vann, og cDNA, i et totalvolum på 20 µl. Prosedyre for Perfecta SYBRGreen Fast Mix (Quantabio) ble fulgt. StepOnePlus Real time PCR instrumentet og StepOne software v2.3 ble benyttet. Fast-program inkludert smeltekurve ble valgt. Etter optimalisering av ulike betingelser ble mengde mRNA, basert på cDNA syntesen, fra målgener i HK-2 celler påvirket av HNF-4A varianter, målt via kvantitativ sanntids-PCR.

Tabell II Primere brukt i PCR analyser

Primer navn*	Tm°	DNA sekvens i 5' - 3' retning
<i>G6PC_F</i>	55,8	ACTGTGCATACATGTTTCATC
<i>G6PC_R</i>	57,8	TGAATGTTTTGACCTAGTGC
<i>PRKC-b_F</i>	65,6	CTTCAAGCAGCCCACCTTCT
<i>PRKC-b_R</i>	70,8	TCCCCGAAGCCCCAGATG
<i>GLUT1_F</i>	63,2	CTGCTCATCAACCGCAAC

<i>GLUT1_R</i>	63,3	CTTCTTCTCCCGCATCATCT
<i>GLUT2_F</i>	63,7	TACATTGCGGACTTCTGTGG
<i>GLUT2_R</i>	61,1	AGACTTTCCTTTGGTTTCTGG
<i>SGLT1_F</i>	64,2	GTCATCTCCCTCCTCACCAA
<i>SGLT1_R</i>	64,2	TCCAGGTCAATACGCTCCTC
<i>SGLT2_F</i>	63,2	TACTTCGCCATTGTGCTGTT
<i>SGLT2_R</i>	64,4	CTCCCGTTCCTCCTTGCT
<i>HNF1A_F</i>	63,7	CCCTGGGTCCTACGTTCA
<i>HNF1A_R</i>	66,4	GGGTCACATGGCTCTGCA
<i>RPL13_F</i>	64,9	GAGACAGTTCTGCTGAAGAAGTAA
<i>RPL13_R</i>	67,5	TCCGGACGGGCATGAC
<i>HNF4A_F</i>	63,8	TCAACAAGTGGTTTGCCAACC
<i>HNF4A_R</i>	64,1	GGCTTCTGTACTCAGCAGGC

*F; Forward, R; Reverse; Tm, smeltetemperatur

2.3.4.3 Agarose gel elektroforese

For å bekrefte at riktig målgen har blitt amplifisert i den kvantitative sanntids-PCR reaksjonen (seksjon 2.3.4.2.), ble PCR produktet analysert ved gelelektroforese. En 2 % agarosegel tilsatt EtBr ble benyttet. 10 µl av PCR produktet ble blandet med 2 µl 6x DNA loading buffer og applisert parallelt med 6 µl TaKaRa DNA standard størrelsesmarkør (100 bp stige). Gelen ble kjørt på 60 V i 2 timer og DNA fragmentene ble visualisert ved UV lys på Molecular Imager ChemiDoc™XRS+ (Bio-Rad).

2.3.5 Statistiske beregninger

Transaktiveringeksperimentene ble utført i ni tekniske paralleller i tre biologiske forøk over tre uavhengige dager (n=3) (optimalisering av transaktiveringsanalysene ble utført i tre tekniske

paralleller i et biologisk forsøk i løpet av en dag (n=1)). Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm standard avvik (STDV), med mindre annet er oppgitt i figurtekstene. Det ble brukt two-tailed unpaired Student`s t-test for å teste om observerte forskjeller i ulike utvalg er signifikante (Software Excel).

De kvantitative sanntids-PCR analysene ble utført med tre tekniske paralleller i et biologisk forsøk i løpet av en dag. Dataene er også her oppgitt i gjennomsnitt og med standrdavvik, og det ble brukt two-tailed unpaired Student`s t-test for å teste om observerte forskjeller i ulike utvalg er signifikante (Software Excel).

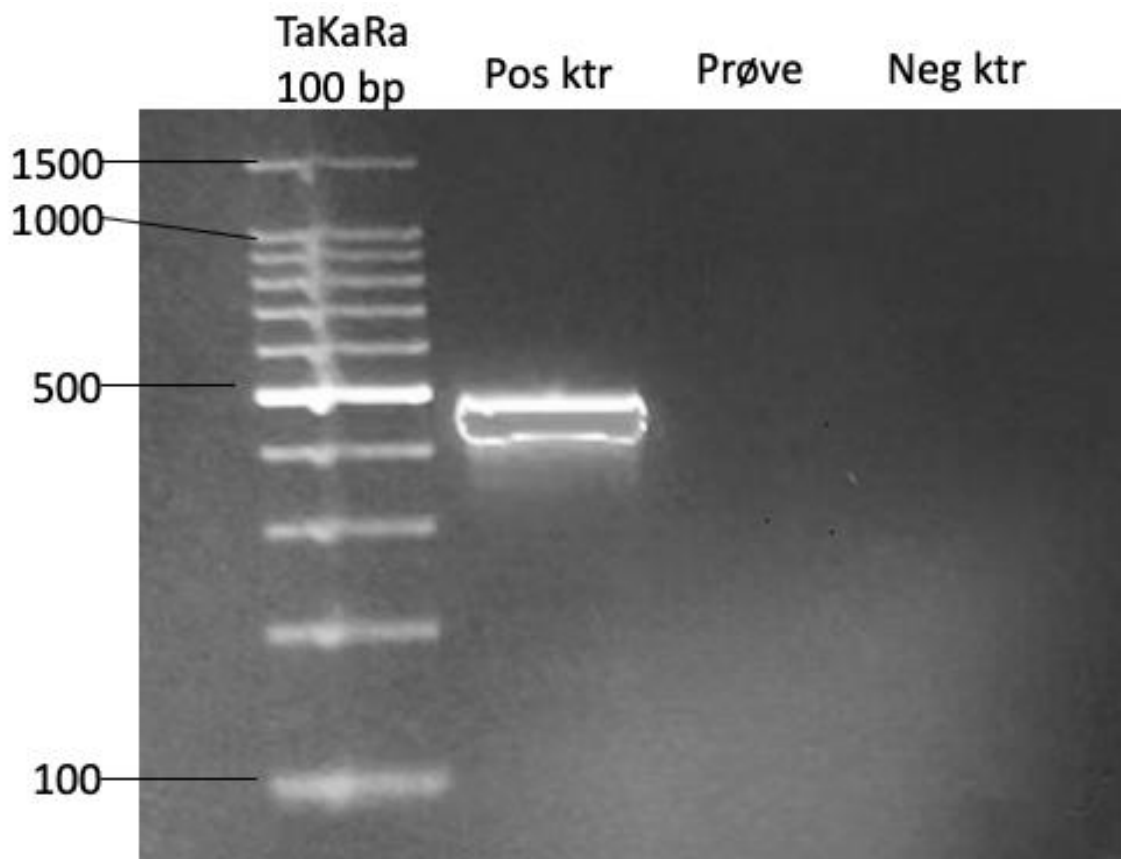
2.4 Etiske betraktninger

Analyser av pasientvariant er basert på data innhentet fra publiserte studier, fra publiserte databaser, og i kommersielt tilgjengelig i humane cellelinjer og bakterier (E. coli). Ingen av forsøkene utføres på forsøkspersoner eller pasienter, og ingen personopplysninger blir brukt. Det er derfor ikke nødvendig å innhente samtykke eller søke Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) og Norsk senter for forskningsdata (NSD). REK er hjemlet i forskningsetikkloven og helseforskningsloven, og utarbeidelse av prosjektplan og gjennomføring av studien er gjort i henhold til helseforskningsloven. Siden det ikke benyttes personopplysninger trenger ikke personvernombudet kontaktes, som har ansvar for at personopplysningsloven blir fulgt.

3 RESULTATER

3.1 Mycoplasma testing av HK-2 cellelinjen

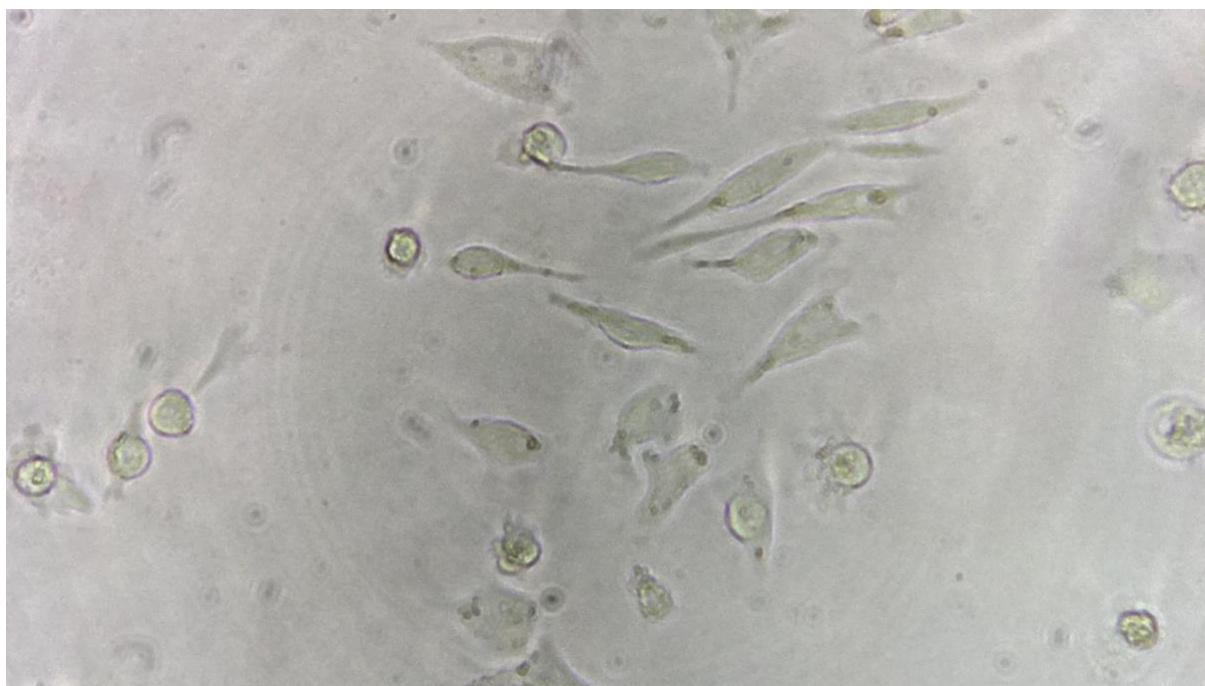
Alle cellelinjer, ny-importerte i laboratoriet eller tidligere nedfrosne, bør testes for forekomst av mycoplasmainfeksjon. Mycoplasma er de minste frittlevende, selvreplikerende, prokaryote organismene og infiserer mange ulike cellinjer (Drexler, 2002). Mycoplasmainfeksjon kan være vanskelig å observere og kan som eksempel gi morfologiske forandringer, kromosomale avvik og endre genuttrykk i cellelinjer, noe som vil interferere og påvirke resultatene ved ulike forsøk og analyser som utføres. HK-2 cellelinjen ble derfor testet for mycoplasmainfeksjon ved å bruke Universal Mycoplasma detection Kit (ATCC). Figur 3.1 viser ulike amplifiserte PCR produkter separert ved gelelektroforese. I den første gelbrønningen TaKaRa 100 bp DNA markør, med uthevet bånd ved 500 bp størrelse. Den andre gelbrønningen viser en positiv kontroll for mycoplasma som et 464 bp PCR produkt. De to påfølgende gelbrønnene viser ingen amplifiserte PCR produkt for henholdsvis HK-2 cellelinjen og negativ kit kontroll. Det indikerer at HK-2 cellelinjen var negativ for mycoplasmainfeksjon.



Figur 3.1 PCR-basert mycoplasma testing av HK-2 cellelinjen. Ikke -amplifisert PCR produkt fra HK-2 celler (prøve)sammenlignet med en positiv (Pos ktr) og negativ (Neg ktr) Kit kontroll, i tillegg til TaKaRa 100 bp DNA markør. DNA fragmentene ble separert på en 3 % agarosegel farget med ethidiumbromid og deretter visualisert ved hjelp av UV-lys.

3.2 Optimalisering av betingelser ved dyrking av HK-2 cellelinje

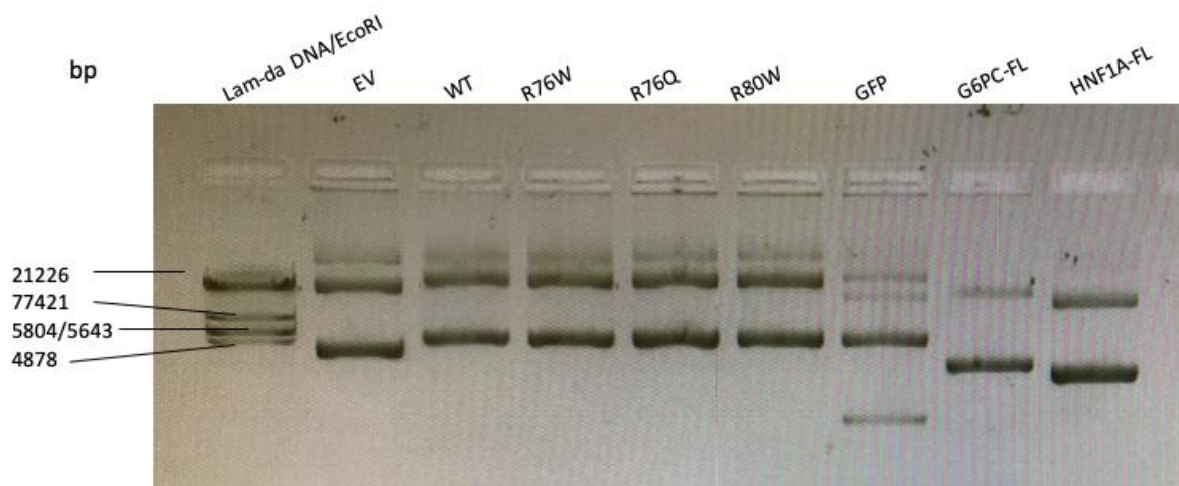
Ulike kulturflasker ble testet ut ved dyrking av HK-2 cellelinje før transaktiveringsforsøkene ble utført. Det ble testet ut ferdig behandlede flasker fra produsent (Nuncion Delta surface behandling), flasker som vi selv overflatebehandlet med Poly-L-Lysine, og i flasker som var ferdig behandlet med Poly-D-Lysine fra produsent. De sistnevnte viste seg å tillate størst grad av celler som fester seg til overflaten i kulturflasken og ble derfor brukt til videre dyrking av cellene. Siden HK-2 cellene dyrkes i serumfritt medium, gror de sent og trenger tid for å feste seg (ATCC, 2014). Mange av cellene var runde og flytende, i motsetning til de utstrakte og festede cellene man ønsket å ha, se illustrasjon i figur 3.2. For å ikke miste mye (flytende) celler, ble det skiftet medium hver tredje dag, slik at cellene fikk god tid til å feste seg på overflaten av kulturflaskene før trypsinering. I tillegg ble gammelt medium med celler i suspensjon ikke kastet, men sentrifugert, før celle-pellet ble re-suspendert med nytt medium og forsiktig ført tilbake i den adherente populasjonen (i samme flaske) (ATCC, 2014). Hvis celler suspendert ble kastet etter splitting, ble cellekulturen veldig fortennet og dyrking av HK-2 cellene tok lengre tid.



Figur 3.2 HK-2 celler forstørret 100 x i lysmikroskop. Her kan man se de adherente langstrakte proksimale tubuli cellene og de avrundede flytende cellene som ikke ennå har festet seg.

3.3 Gelelektroforese analyse av plasmid DNA med ulike HNF-4A varianter

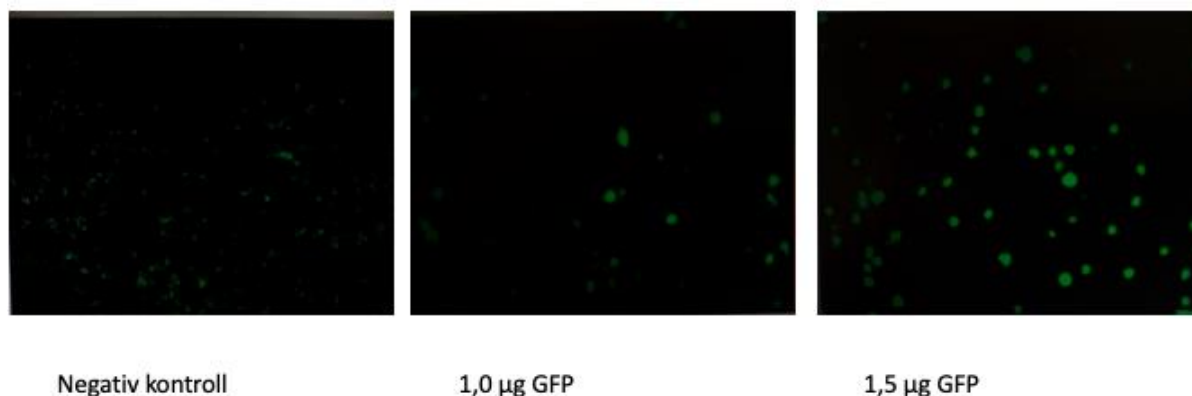
Nedfryste bakteriekulturer etablert i tidligere masterprosjekter (Jorunn Hjaltadottir og Lorentze Hope Hornes), som inneholder DNA plasmid med ulike *HNF4A* varianter samt andre reporter plasmid, ble rensset som beskrevet i metodeavsnittet 2.3.1, for påfølgende transfeksjon av HK-2 celler. 0,5 µg plasmid ble applisert på agarosegel for å vurdere kvaliteten etter plasmidrens ved hjelp av gelelektroforese. Som vist i figur 3.3. observeres det tre bånd for pcDNA3.1/FLAG plasmid med ulike varianter av *HNF4A*: EV (empty vector), WT, R76W, R76Q og R80W, og to tydelige bånd for reporter plasmidene pGL3-Firefly Luciferase med *G6PC*- og *HNF1A* promotor. GFP-pMAX plasmid viser ett sterkt bånd, i tillegg til ytterligere tre-fire svakere bånd. Samlet sett viste rensede plasmider god kvalitet, men litt mange bånd ble observert for GFP-pMAX.



Figur 3.3. Agarose gelelektroforese av rensede plasmider. 0,5 µg av de rensede plasmidene ble analysert på en 1% agarosegel sammen med DNA størrelsesmarkør Lamda DNA/EcoRI Marker 1.

3.4 Optimalisering av transfeksjonseffektivitet ved fluorescens mikroskopi analyse

For å finne optimal mengde av plasmid for effektiv transfeksjon av HK-2 celler ble det utført fluorescensanalyser av GFP-pMAX transfekterte HK-2 celler. Verifisering av GFP uttrykk ble visualisert via fluorescens mikroskop (figur 3.4). Sammenlignet med utransfekte celler og celler transfekterte med 1,0 µg plasmid DNA, viste celler transfektert med 1,5 µg GFP-pMAX plasmid flest celler med GFP uttrykk. Det ble dermed benyttet 1,5 µg total mengde plasmid i påfølgende eksperiment for HNF-4A.



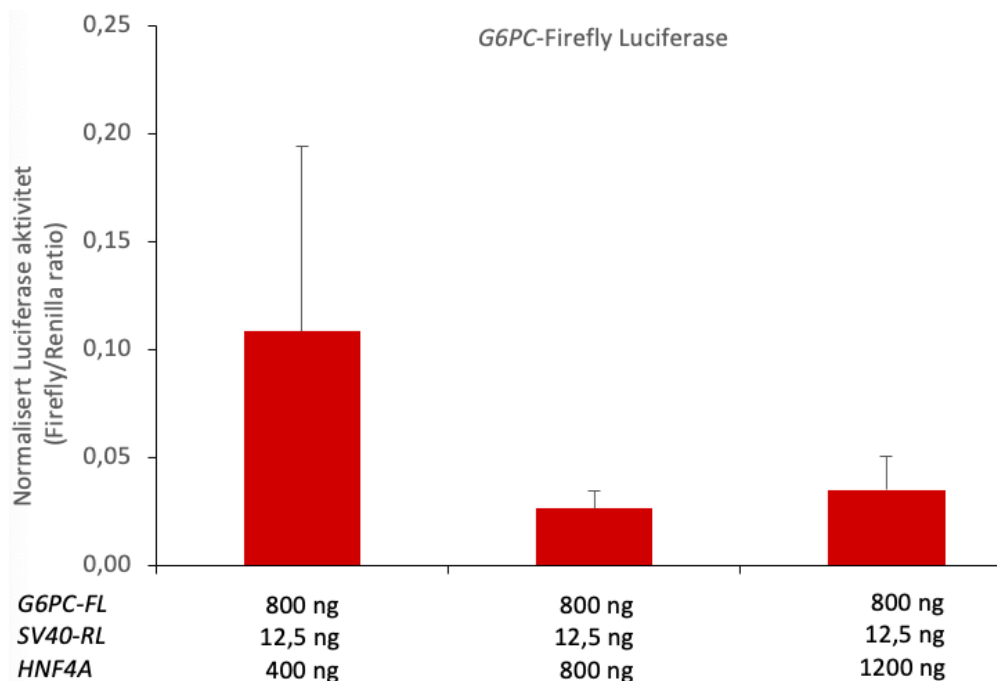
Figur 3.4. Fluorescens mikroskopianalyse av HK-2 celler transfektert med ulike mengder GFP-pMAX plasmid som mål på transfeksjonseffektivitet. 8×10^4 HK-2 celler ble sådd ut per brønn på 12 brønners plate. 24 timer etter transfeksjon ble GFP uttrykk i celler visualisert ved 488 nm i fluorescensmikroskopi.

3.5 Optimalisering av transfeksjon av *HNF4A* og reporter plasmider for transaktivering i HK-2 celler

HNF-4A spiller en sentral rolle i reguleringen av transkripsjon av målgener som *HNF1A* og *G6PC* i bukspyttkjertel, lever og nyre. Etersom begge målgener samt *HNF4A* er uttrykt i nyre, så er HK-2 celler relevant for å teste funksjon av HNF-4A. For å kunne studere effekt av WT HNF-4A transaktivering av målgen, ble det først utført et optimaliseringsforsøk for å finne egnede mengder *HNF4A*- og reporterplasmid for effektiv HNF-4A transaktivering i HK-2 celler. Det ble tatt utgangspunkt i mengder som ga best transfeksjon basert av GFP i fluorescens analysene (figur 3.4).

Deretter ble det utprøvd optimale forholdsmengder mellom *HNF4A* og promotor-linkede Firefly Luciferase (FL) reporter plasmid for å få en effektiv og målbar HNF-4A transaktivering av henholdsvis *G6PC*- og *HNF1A* promotere. Aktiviteten av HNF-4A i HK-2 cellene, basert på FL uttrykk, ble målt i tre tekniske paralleller i et biologisk forsøk i løpet av en dag.. Resultater vist i

figur 3.5 indikerer at den mest effektive transaktivering av *G6PC-FL* reporter ble oppnådd ved å transfektere 1×10^5 celler med 400 ng WT *HNF4A* plasmid, i kombinasjon med 800 ng *G6PC-FL* og 12,5 ng kontroll reporter *SV40-RL*. Den mest effektive transaktiveringen viser imidlertid et høyt standardavvik ved parallelle målinger.

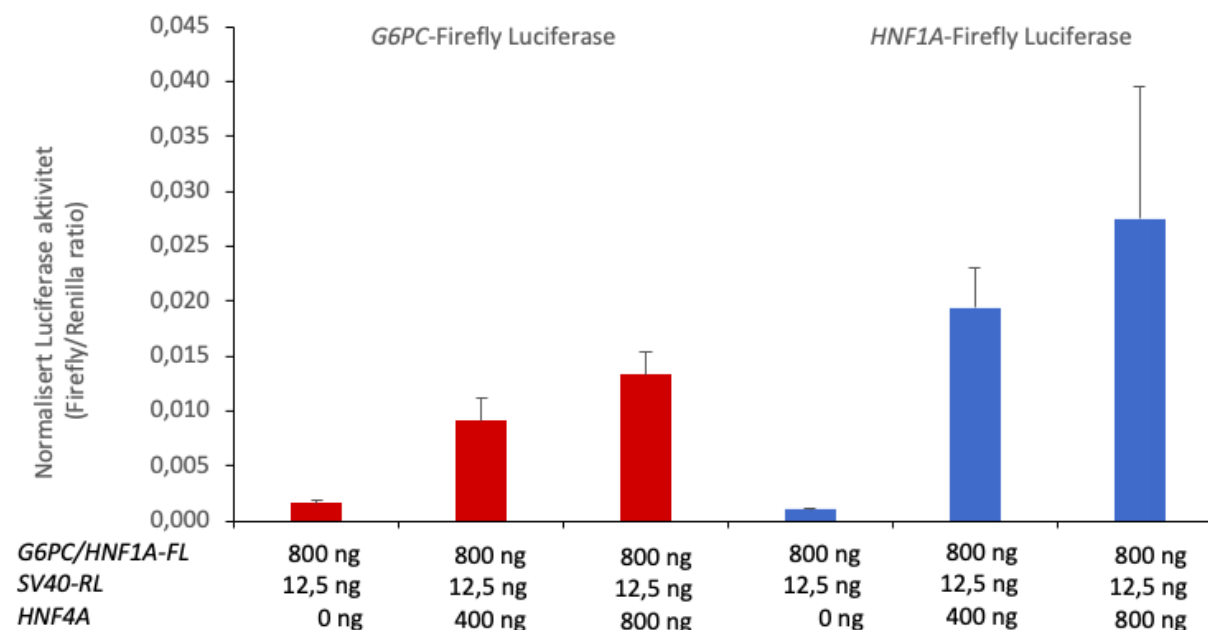


Figur 3.5. Optimalisering av WT HNF-4A transaktivering av *G6PC-FL* i transfekterte HK-2 celler.

Transaktivering, basert på Firefly/Renilla ratio, der Firefly Luciferase aktiviteten (uttrykt fra *G6PC-FL*) ble normalisert mot Renilla Luciferase aktivitet (uttrykt fra *SV40-RL*). Hver søyle representerer gjennomsnitt av tre tekniske paralleller i et biologisk forsøk i løpet av en dag (n=1).

Siden HNF-4A transaktivering basert på *G6PC* promotor var lav i dette første optimaliseringsforsøket, observert ved lav Firefly/Renilla ratio, ble *HNF1A* promotoren testet ved å inkludere *HNF1A-FL* reporter i neste optimaliseringsforsøk. Som kontroll for et eventuelt endogent bidrag av HNF-4A i HK-2 celler ble det også inkludert negative kontroller hvor celler kun ble transfektert med reporterplasmider (*G6PC-* eller *HNF1A-FL*) og *SV40-RL*, og da uten *HNF4A* plasmid. Data i figur 3.5.2 viser at den mest effektive transaktiveringen ved HNF-4A ble oppnådd ved å transfektere 1×10^5 celler med 800 ng *HNF4A* plasmid mot 800 ng *G6PC-FL* eller *HNF1A-FL*, i tillegg til 12,5 ng kontroll reporter *SV40-RL*. Resultatene viser også at HNF-4A mer effektivt regulerer *HNF1A* promotoren i HK-2 celler, enn *G6PC* promotoren, basert på en høyere Firefly/Renilla ratio. Videre er den normaliserte Firefly Luciferase aktiviteten lavere i forsøket vist i figur 3.6 enn i figur 3.5. Renilla Luciferase skal ta høyde for variasjon mellom forsøkene (hvis basert på forskjell i antall utsådde celler), men det sees ofte dag-til-dag forskjeller likevel. Det er

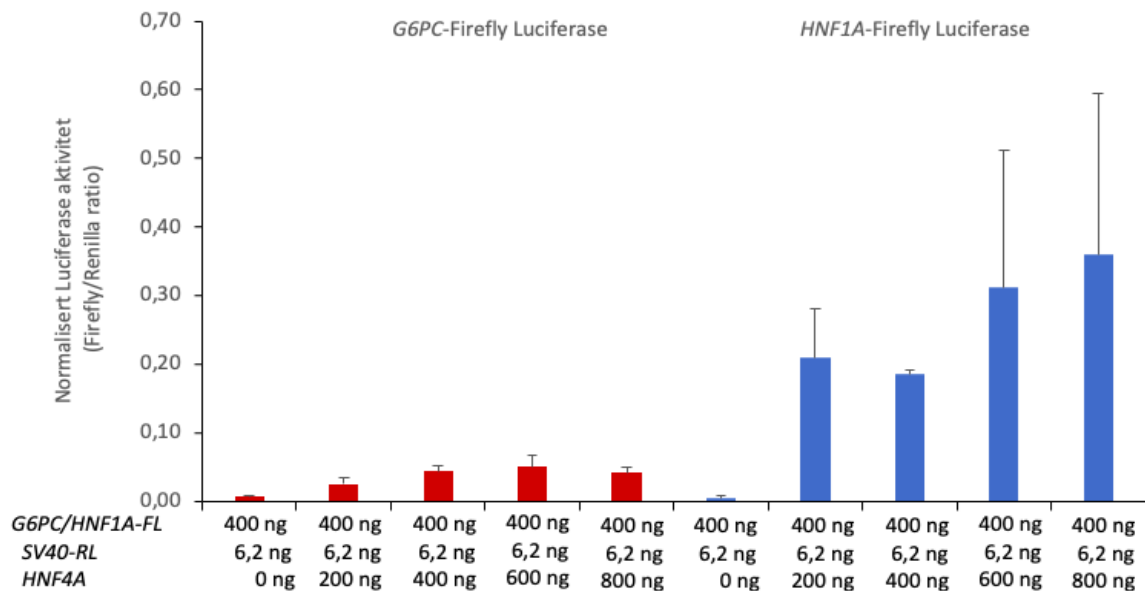
derfor viktig at WT *HNF4A*, som vi ønsker å sammenlikne mot, tas med i hvert forsøk.



Figur 3.6 Optimalisering av HNF-4A transaktivering av *G6PC*- og *HNF1A*- promotor i HK-2 celler.

Transaktivering basert på Firefly/Renilla ratio der Firefly Luciferase aktiviteten (uttrykt fra *G6PC/HNF1A* promotor) ble normalisert mot Renilla Luciferase aktivitet (uttrykt fra *SV40* promotor). Transaktivering av *HNF1A* promotor er vist med blå søyler og transaktivering av *G6PC* promotor er vist med røde søyler. Hver søyle representerer gjennomsnitt av tre tekniske paralleller med standardavvik i et biologisk forsøk i løpet av en dag (n=1).

Ettersom slike cellebiologiske eksperimenter er kostbare så kan det være fordelaktig å redusere omfanget av reagenser brukt i forsøk. Dette kan også være en fordel når man på sikt ønsker å studere effekt av et større antall *HNF4A* varianter. Siden de to første optimaliseringsforsøkene viste at mest optimal totalmengde plasmid for effektiv *HNF-4A* transaktivering av 1×10^5 celler var 1,6 μg , ble plasmidmengder halvert, for videre optimalisering av transaktivering med færre celler (5×10^4), i mindre cellebrettbrønner. I dette forsøket ble mengden reporterplasmid holdt konstant, mens mengden *HNF4A* plasmid varierte. Data i figur 3.7 viser at den mest effektive transaktiveringen av *HNF-4A* i det tredje optimaliseringsforsøket ble oppnådd ved å transfektere 5×10^4 celler med 600 ng *HNF4A* sammen med 400 ng *G6PC*-FL, og 800 ng *HNF4A* sammen med 400 ng *HNF1A*-FL, i tillegg til 6,2 ng kontrollreporter *SV40*-RL. Igjen viser resultatene at *HNF-4A* mer effektivt regulerer *HNF1A* promotoren i HK-2 celler, versus *G6PC* promotoren, med en høyere transaktiveringseffektivitet basert på Firefly Luciferase/Renilla Luciferase ratio.



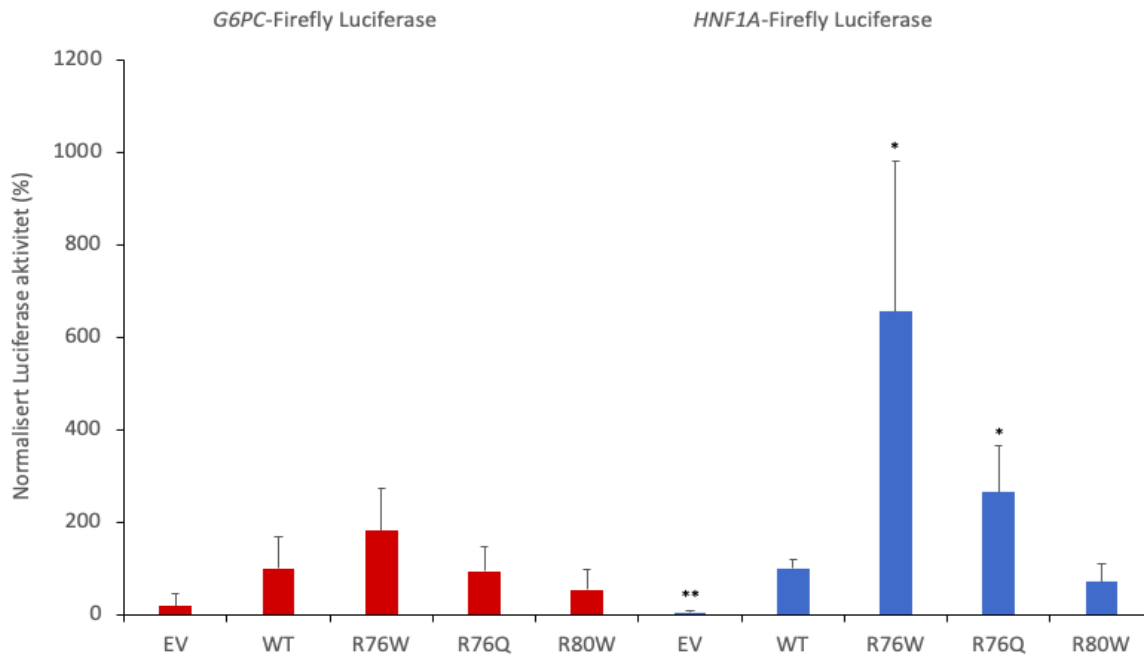
Figur 3.7 Optimalisering av HNF-4A transaktivering av *G6PC*- og *HNF1A* promotor i HK-2 celler.

Transaktivering basert på Firefly/Renilla ratio der Firefly Luciferase aktiviteten (uttrykt fra *G6PC/HNF1A* promotor) ble normalisert mot Renilla Luciferase aktivitet (uttrykt fra *SV40* promotor). Transaktivering av *HNF1A* promotor er vist i blå søyler og transaktivering av *G6PC* promotor er vist i røde søyler. Hver søyle representerer gjennomsnitt av tre tekniske paralleller med standardavvik utført på et biologisk forsøk på løpet av en dag (n=1).

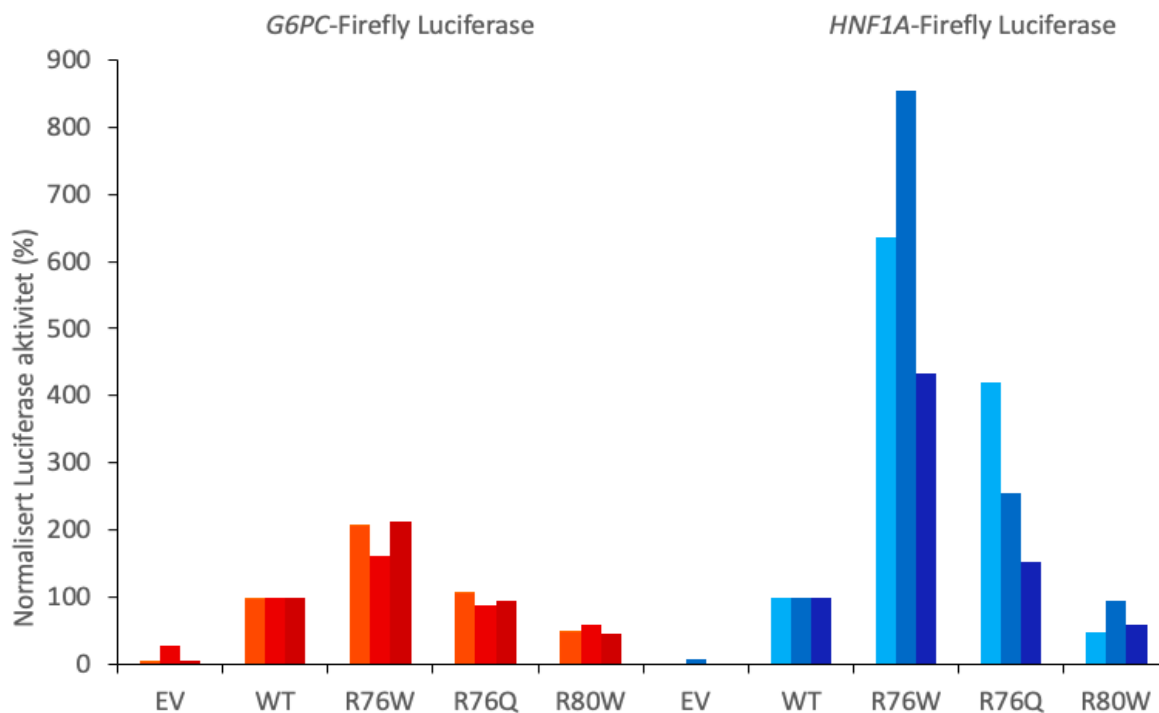
3.6 Effekt av *HNF4A* varianter på HNF-4A transaktivering i transfekterte HK-2 celler

Plasmidmengder av *HNF4A* varianter versus promotor-linkede reportere benyttet videre var basert på optimaliseringsforsøket illustrert i figur 3.7. Figur 3.8 A viser totale gjennomsnittsverdier for normalisert luciferaseaktivitet etter transaktivering med WT HNF-4A versus HNF-4A varianter, mens figur 3.8 B viser variasjon på transaktivering mellom de tre individuelle forsøksdagene. Aktivitet til HNF-4A varianter (%) er normalisert mot WT som er satt til 100 %. Variant R76W viser større effekt på HNF-4A transaktiveringsaktivitet av *G6PC* promotor (200 %) sammenlignet med WT HNF-4A (100 %), samt større effekt på HNF-4A transaktiveringsaktivitet av *HNF1A* promotor (650 %), sammenlignet med WT HNF-4A (100 %) (Figur 3.8 A). Variant R76Q derimot viser lavere effekt på HNF-4A transaktiveringaktivitet av *G6PC* promotor (90 %) sammenlignet med WT HNF-4A (100 %), og større effekt på HNF-4A transaktiveringsaktivitet (260 %) av *HNF1A* promotor. Transaktiveringsaktiviteten basert på effekt av R80W varianten er redusert til 50% av *G6PC*- og 70 % av *HNF1A* promotor, sammenlignet med WT HNF-4A (100 %). Et større standardavvik ble observert for målinger gjort på *HNF1A* promotor-linket reporter sammenlignet med *G6PC* promotor-linket reporter (figur 3.6.1 A), noe som gjenspeiler større variasjon for *HNF1A* promotor basert på målinger gjort på de tre individuelle dagene vist i figur 3.8 B, spesielt observert for R76W varianten.

A



B

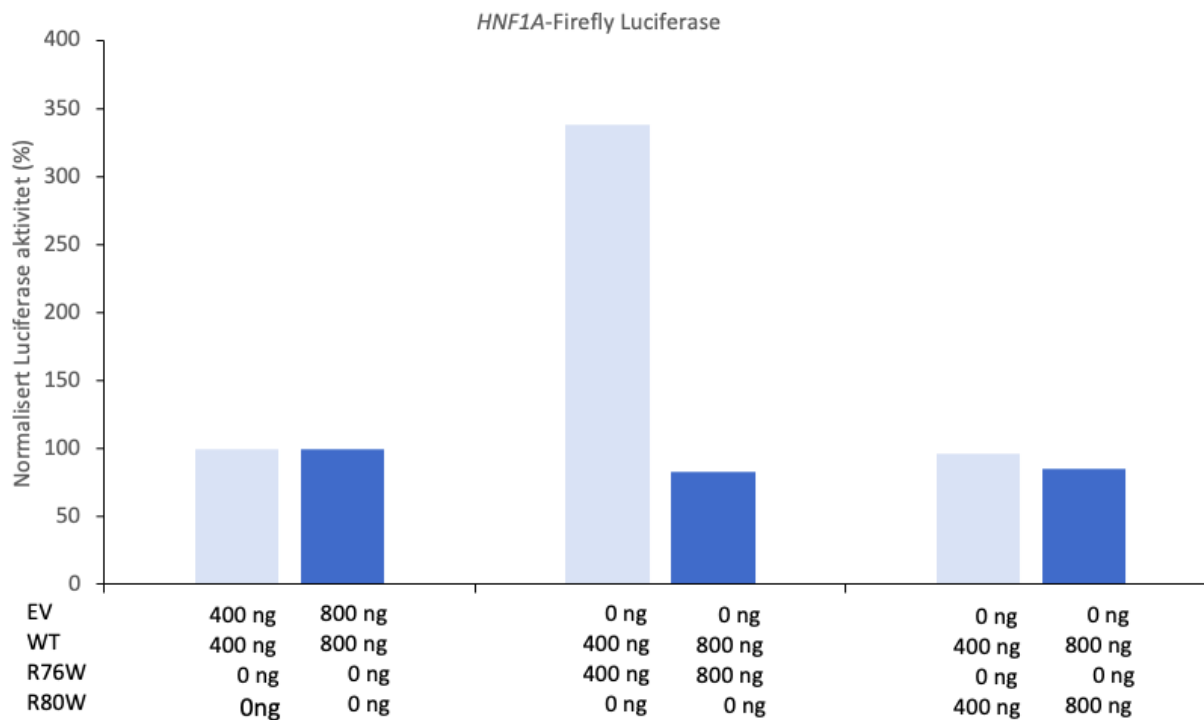


3.8 Effekt av *HNF4A* varianter ved transaktivering av *G6PC* og *HNF1A* promotor i transfekterte HK-2 celler.

5 x 10⁴ HK-2 celler ble transfektert med 600 ng *HNF4A* plasmid (WT eller varianter) sammen med 400 ng *G6PC*-FL og 6,2 ng *SV40*-RL plasmider. Parallelt ble 5 x 10⁴ HK-2 celler transfektert med 800 ng *HNF4A* plasmid (WT eller varianter) sammen med 400 ng *HNF1A* og 6,2 ng *SV40*-RL plasmider. Firefly Luciferase aktiviteten (basert på *G6PC* eller *HNF1A* uttrykk) ble normalisert mot Renilla Luciferase aktivitet (basert på *SV40* uttrykk) og ratioene omgjort til % der WT ratio ble satt til 100 %. I figur A) representerer hver søyle gjennomsnitt av ni tekniske paralleller med standardavvik utført i tre biologiske forsøk i løpet av tre dager (n=3). * indikerer p < 0,05, ** indikerer p < 0.001. Figur B) viser variasjon på transaktiveringsdata mellom de tre forsøksdagene. Hver søyle representerer gjennomsnitt av tre tekniske paralleller utført i et biologisk forsøk i løpet av en dag.

3.7 Effekt av R76W på WT HNF-4A transaktivering.

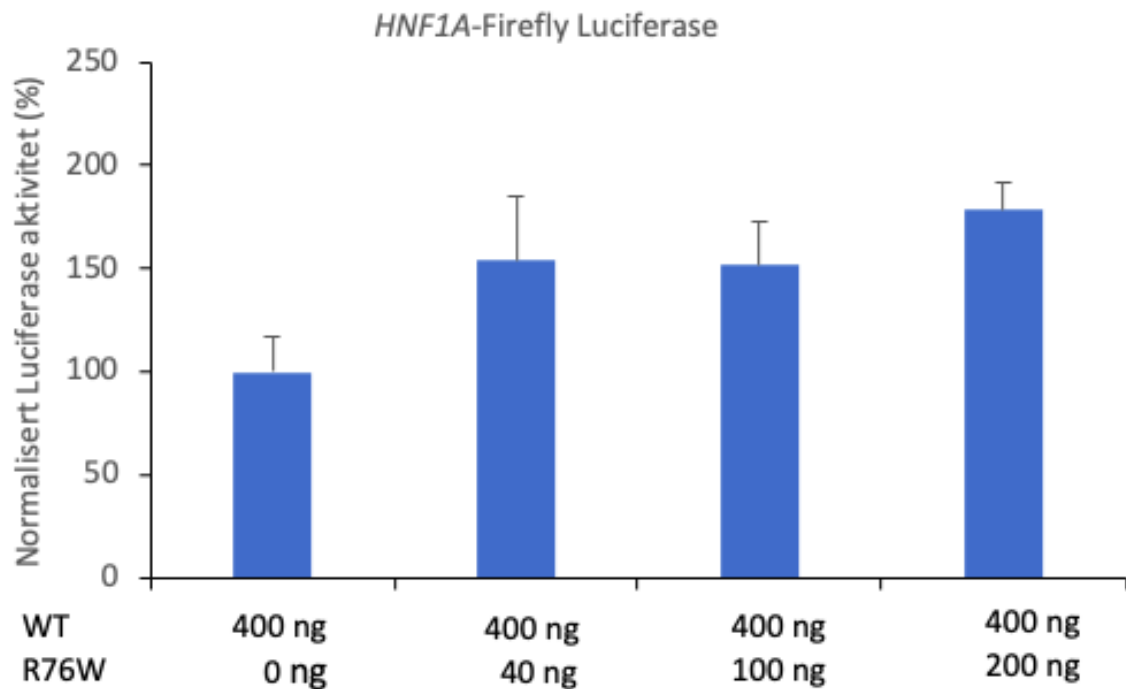
HNF-4A opererer som en dimer, og MODY pasienter med patogene varianter i *HNF4A* er heterozygote individer. Da noen patogene varianter kan opptre som dominant negative (hemmer aktiviteten til WT protein), var det ønskelig å undersøke om R76W, som viser høy transaktiveringsaktivitet, også har en positiv påvirkning på transaktivering av WT proteinet. Derfor, for å undersøke om HNF-4A variantene R76W og R80W (brukt som kontroll på lav aktivitet) har innvirkning på transaktiveringsaktiviteten til WT HNF-4A, ble det utført analyse av effekt av titrering av R76W og R80W variant plasmid, transfektert sammen med fast mengde WT *HNF4A* plasmid, på transaktivering av *HNF1A*-FL. For dette ble det først satt opp et forsøk med 400/800 ng WT-*HNF4A* plasmid, med/uten 400/800 ng R76W eller R80W variant plasmid, i henhold til tidligere optimalisering (se avsnitt 3.4 og 3.5). Der kun WT *HNF4A* ble transfektert inn, ble like mengder empty vector (EV) inkludert for å ha samme totale mengder DNA transfektert i HK-2 cellene. Resultatene i figur 3.9 viser at ved å halvere mengden av transfektert R76W og WT *HNF4A* plasmid, så opprettholdes økt aktivitet av R76W, sammen med WT HNF-4A (330 %), sammenlignet med WT HNF-4A alene (100 %), mens økning i aktiviteten til R76W ser ut til å være fraværende ved 800 ng plasmid mengder. Årsak til dette kan være at transfekterte mengder plasmid blir for mye i forhold til mengder *HNF1A*-FL reporter plasmid (800 ng), altså en mulig metningseffekt. For R80W variant transfektert sammen med WT *HNF4A* ser man ingen forandring i aktivitet (97 %), i forhold til WT *HNF4A* alene (100 %).



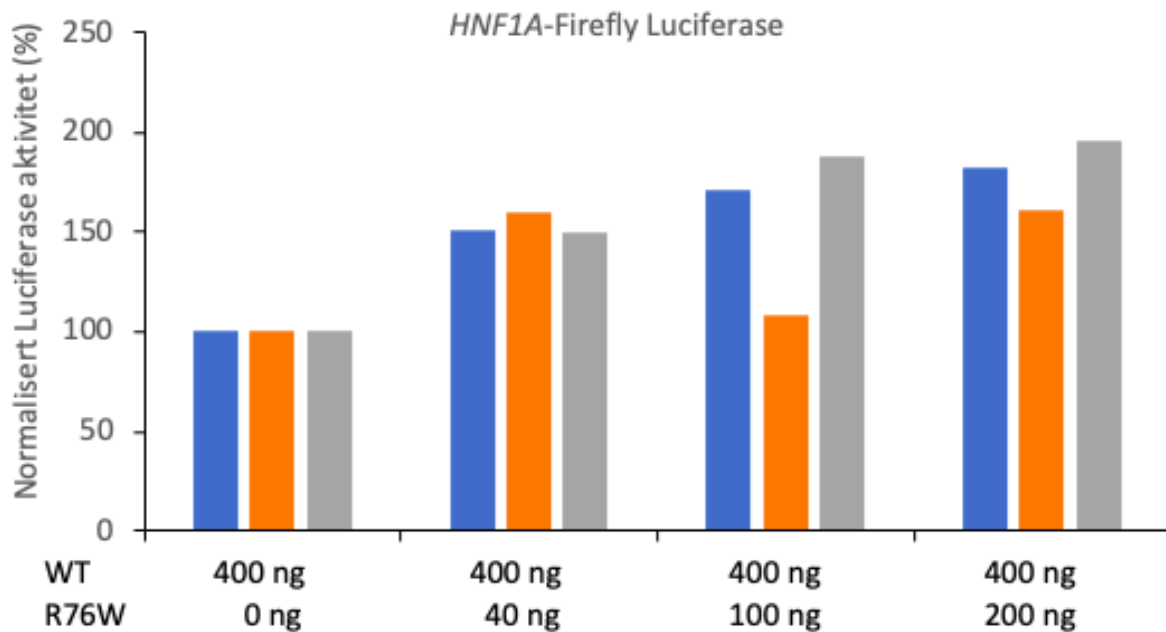
Figur 3.9 Effekt av R76W og p.R80W varianter på WT HNF-4A transaktivering av *HNF1A*-FL. Utover plasmid mengdene oppgitt figuren, ble 5×10^4 HK-2 celler også transfektert med 400 ng *HNF1A*-FL og 6,2 ng *SV40*-RL. Resultatene baserer seg på tre tekniske paralleller i et biologisk forsøk i løpet av en dag (n=1).

For å bedre undersøke hvilken effekt R76W varianten har på transaktiveringsaktiviteten til WT HNF-4A (heterozygot effekt), ble det videre utført transaktiveringsanalyse med titrerende mengde av R76W varianten, det vil si en økende mengde variant plasmid (0 ng, 40 ng, 100 ng og 200 ng) mot en konstant mengde WT *HNF4A* plasmid. Figur 3.10 A viser data på gjennomsnittlig målt transaktiveringsaktivitet på *HNF1A*-FL, der allerede kun 40 ng transfektert R76W plasmid viser en økning i aktivitet (150 %) mot WT HNF-4A alene (100 %). Aktiviteten øker ytterligere med 200 ng R76W. Figur 3.10 B viser variasjon på transaktiveringsdata mellom de tre forsøksdagene.

A



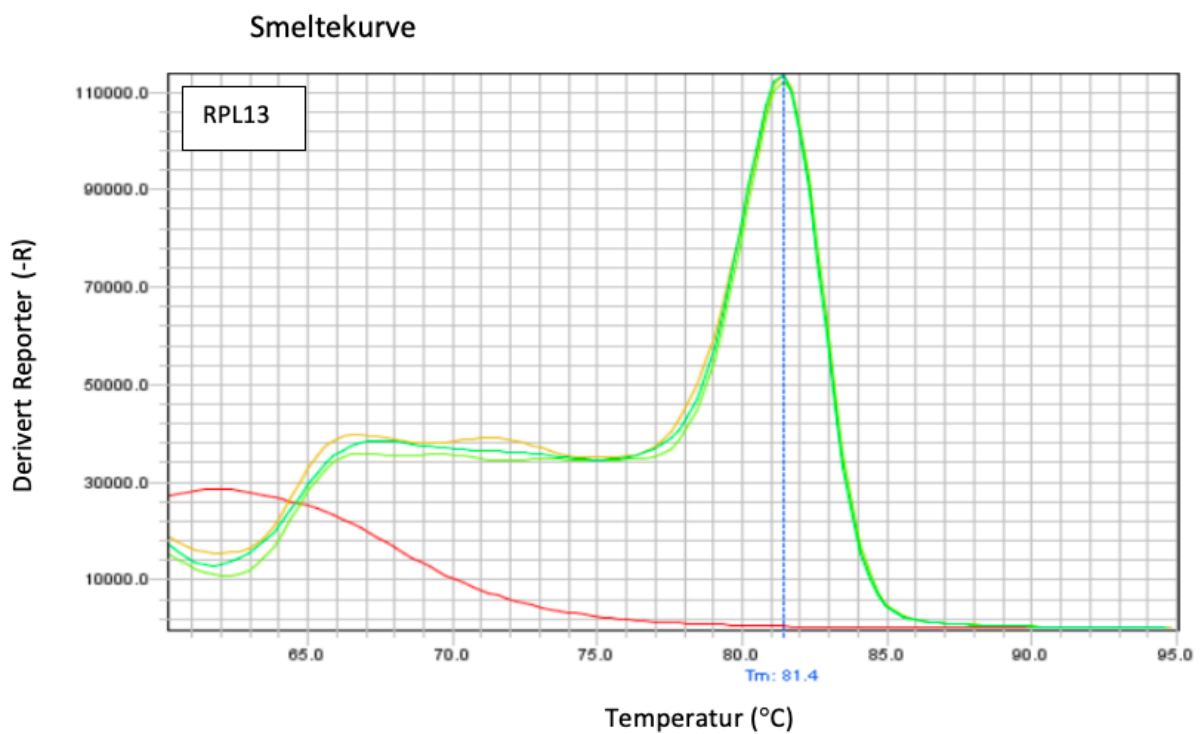
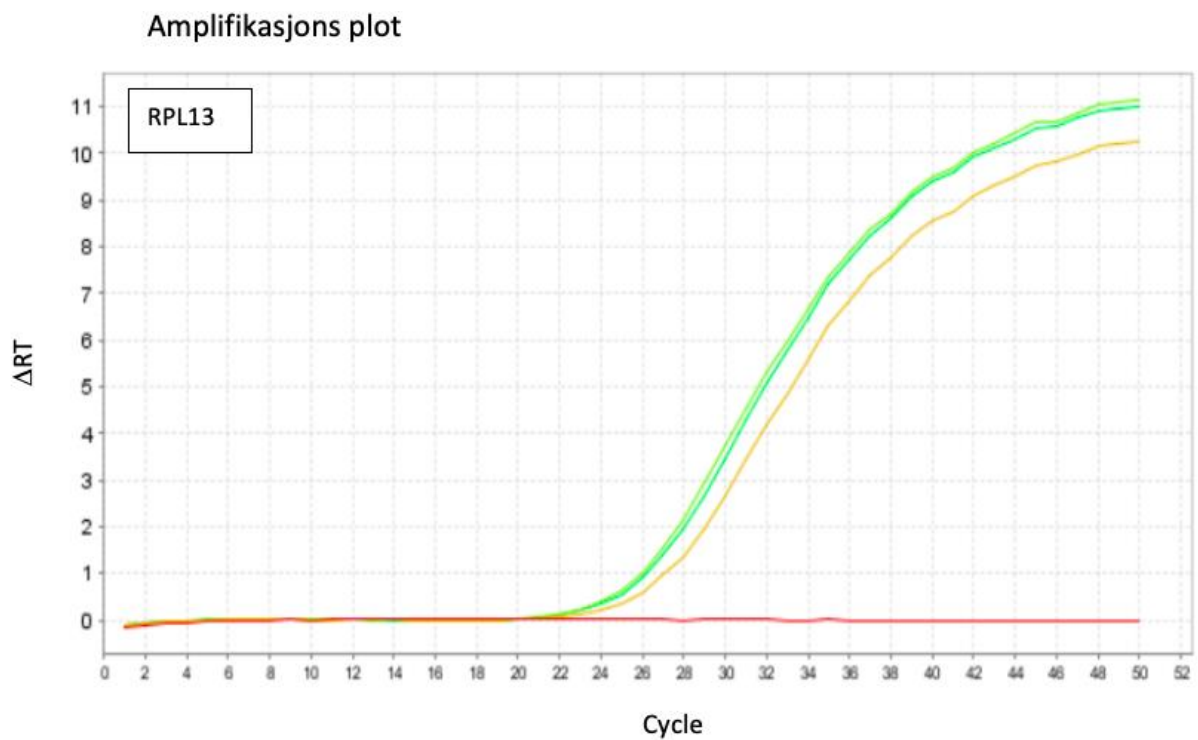
B



Figur 3.10 Titrering av mengde plasmid for varianten R76W transfektert sammen med konstant mengde WT *HNF4A*. 5×10^4 HK-2 celler ble transfektert med 800 ng WT sammen med økende mengde R76W plasmid (0 ng, 40 ng, 100 ng og 200 ng). Plasmidene ble transfektert sammen med 400 ng *HNF1A*-FL og 6,2 ng *SV40*-RL. Firefly Luciferase aktiviteten (*HNF1A* uttrykt) ble normalisert mot Renilla Luciferase aktivitet (*SV40* uttrykt) og ratioene sammenlignet med WT ratio, der WT aktivitet ble satt til 100 %. I figur A) representerer hver søyle gjennomsnitt av ni tekniske paralleller med standardavvik utført i tre biologiske forsøk over tre dager (n=3). Figur B) viser variasjon på transaktiveringsdata mellom de tre forsøksdagene. Hver søyle representerer tre tekniske paralleller utført i et biologisk forsøk i løpet av en dag (n=1).

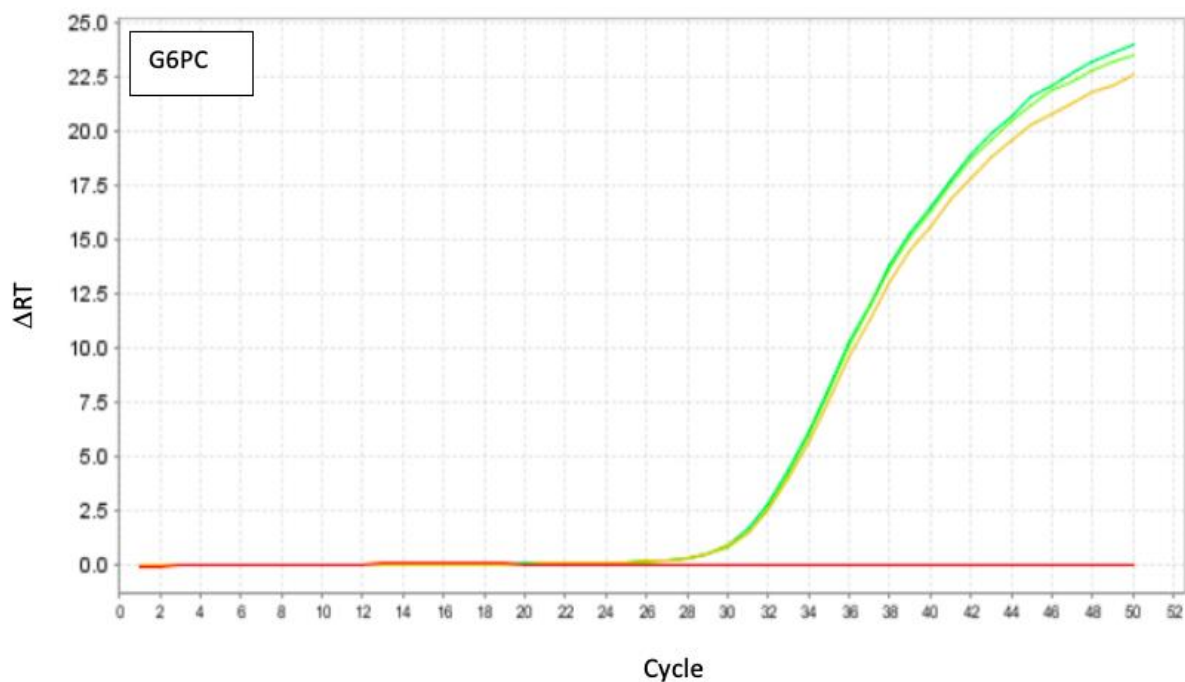
3.8 Optimalisering av kvantitative sanntids-PCR analyser av målgen til HNF-4A

Det ble utført kvantitativ sanntids-PCR for å studere om variantene har effekt på HNF-4A reguleringen av målgen i HK-2 celler. For å kunne gjøre dette, ble kvantitativ sanntids-PCR først optimalisert for hvert primersett. Total RNA ble rensset fra utransfekteerte HK-2 celler, og 300 ng RNA ble brukt i cDNA syntesen. Totalt ble det utført en optimalisering av kvantitative sanntids-PCR analyse for utvalget primersett spesifikk for ni målgener, ved å blant annet teste ut forskjellige mengder cDNA, forskjellige PCR temperaturer for annealing av primere, og forskjellige antall sykluser i PCR reaksjonen. For hver analyse ble det inkludert tre parallelle cDNA prøver og en blank, og smeltekurveanalyse ble utført for samtlige primersett. De mest optimale resultatene per primersett er vist i figur 3.11- 3.19 under, resten av optimaliseringsresultatene er vist i vedlegg 7.1. I ingen av de optimaliserte PCR-oppsettene observeres amplifikasjon av produkt i blankprøven (rød linje). Referansegenet brukt til normalisering for kvantitative sanntids-PCR analyser av HK-2 celler var *RPL13* (figur 3.11).

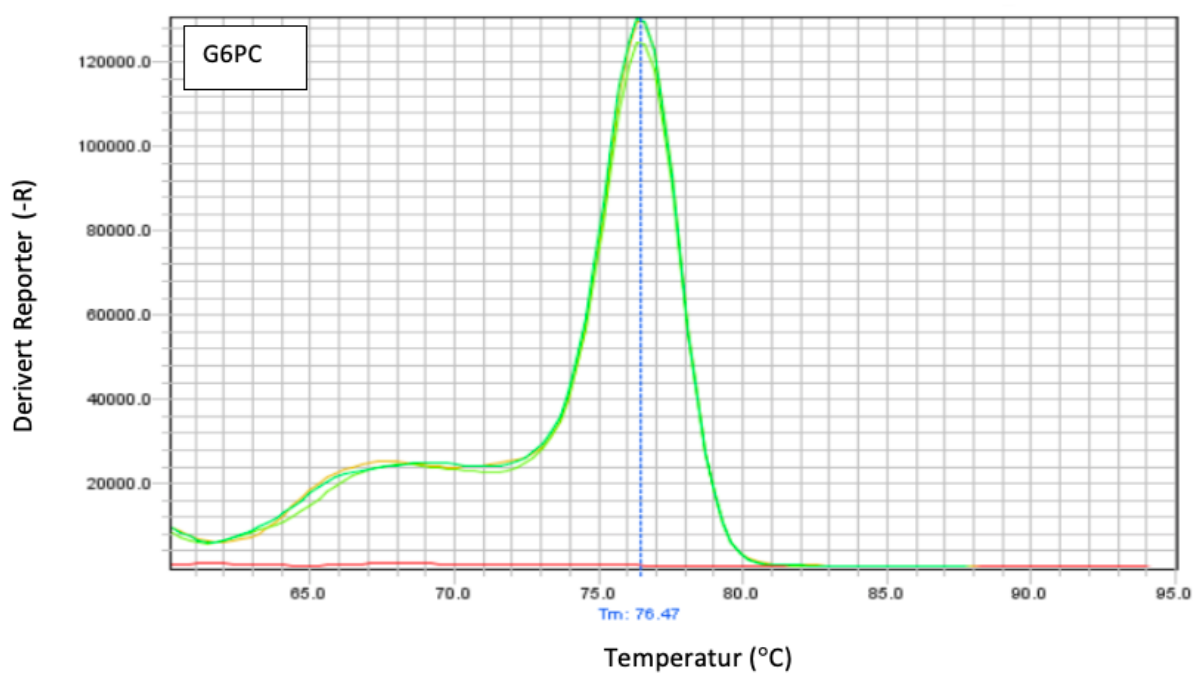


Figur 3.11 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av referansegnet *RPL13*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *RPL13_F* og *RPL13_R*. 40 ng cDNA og annealing temperatur 62 °C ble benyttet i PCR reaksjonen. Ct (threshold cycle) for *RPL13* var 27,2. Ct verdien er invers proporsjonal til mengde målt nukleinsyrer i prøven.

Amplifikasjons plot

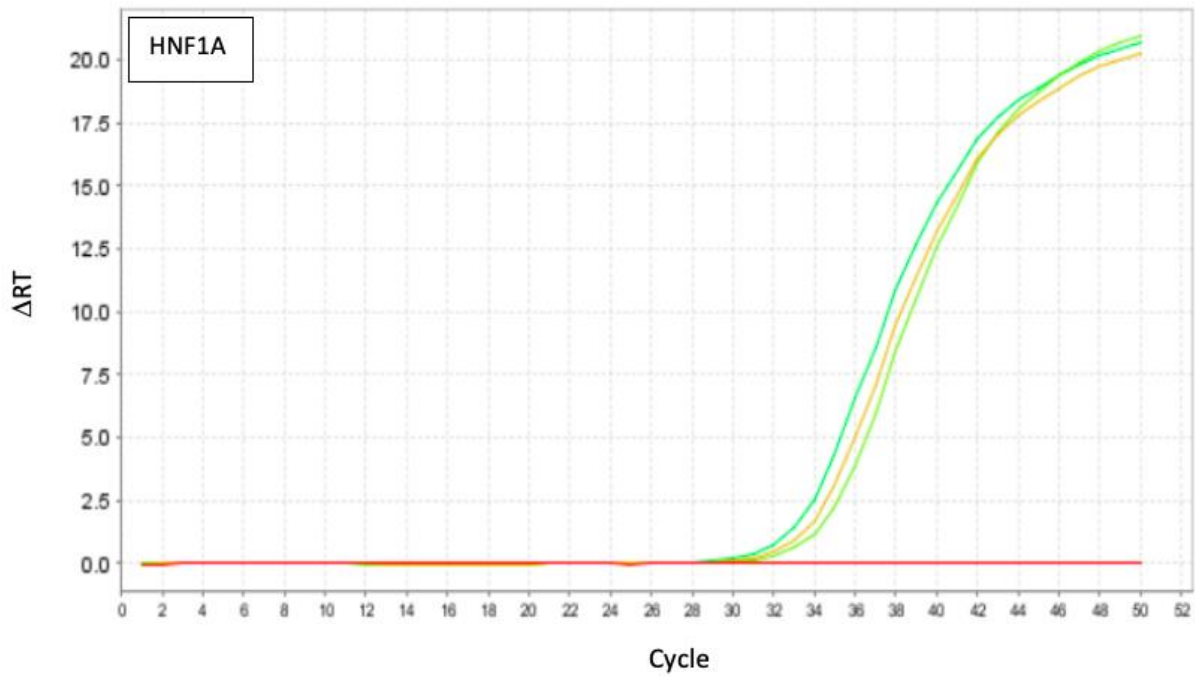


Smeltekurve

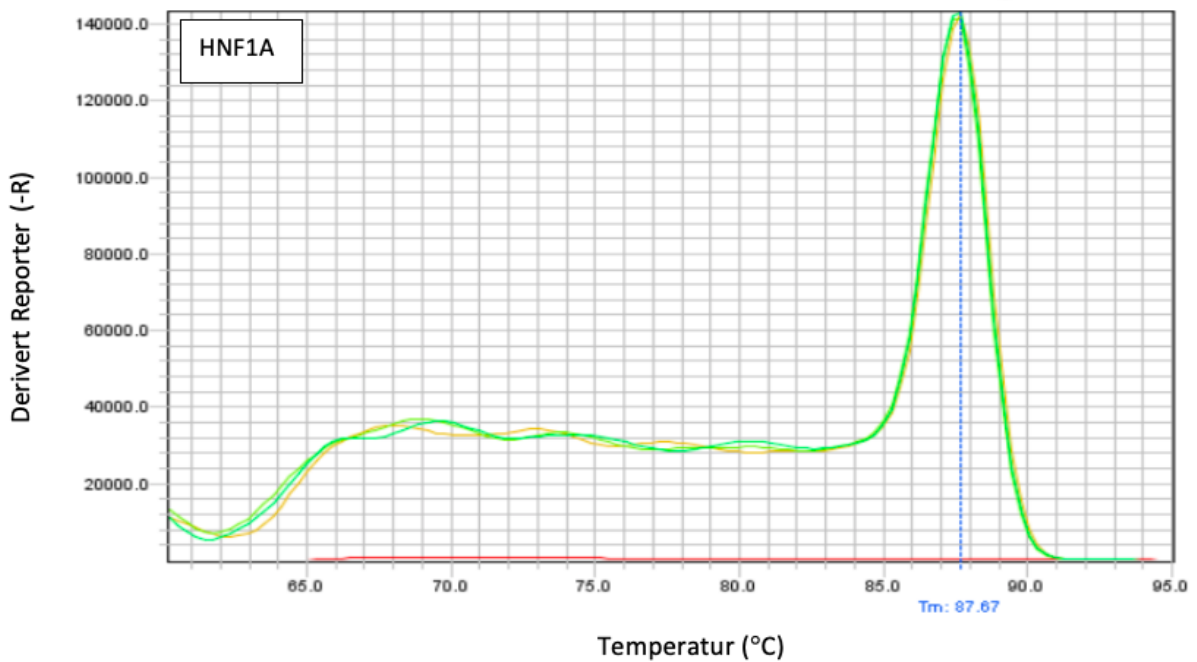


Figur 3.12 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *G6PC*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *G6PC_F* og *G6PC_R*. 40 ng cDNA og annealing temperatur 53 °C ble benyttet i PCR reaksjonen. Ct for *G6PC* var 31,9.

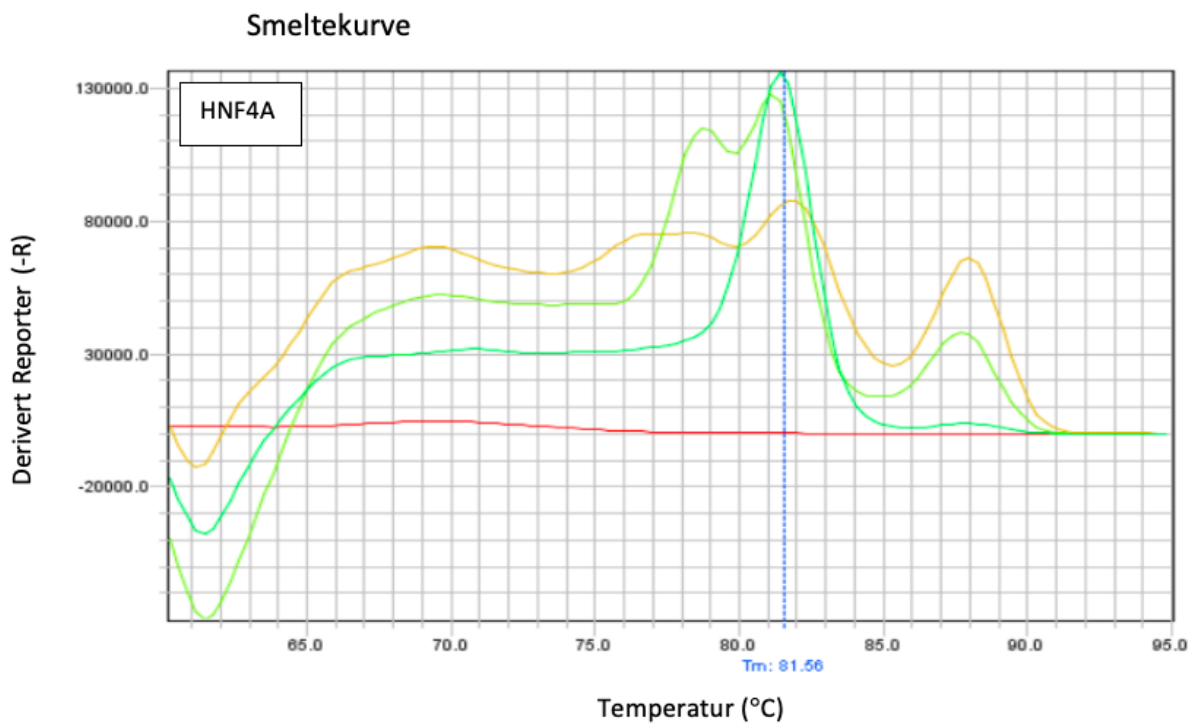
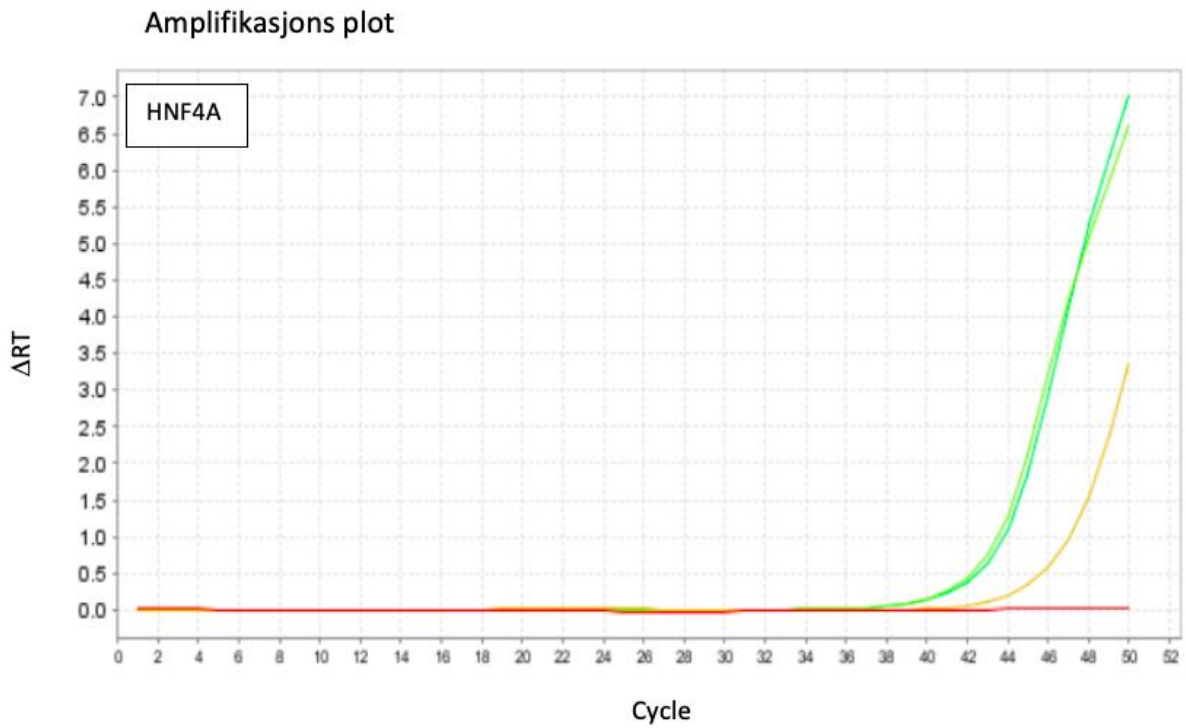
Amplifikasjons plot



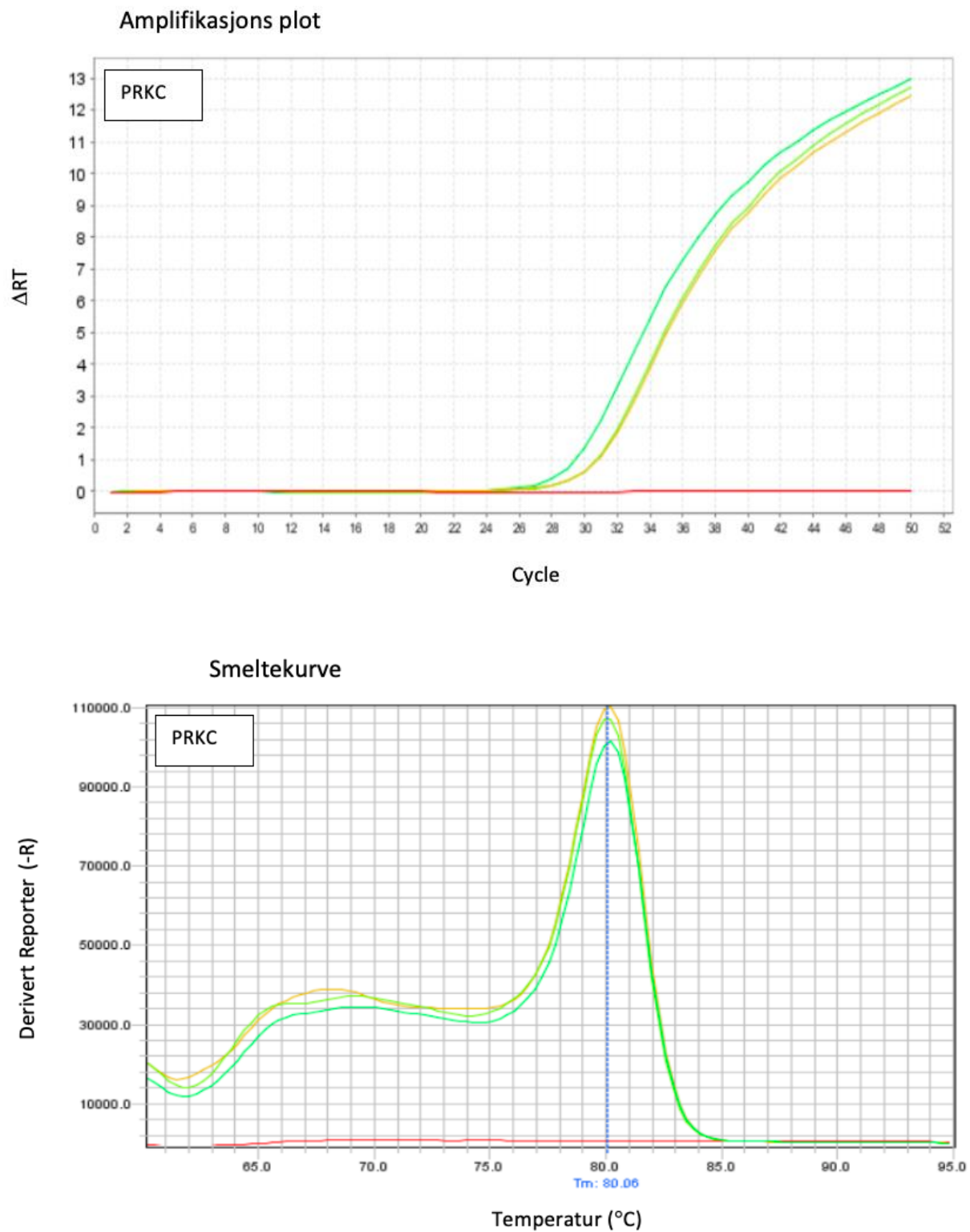
Smeltekurve



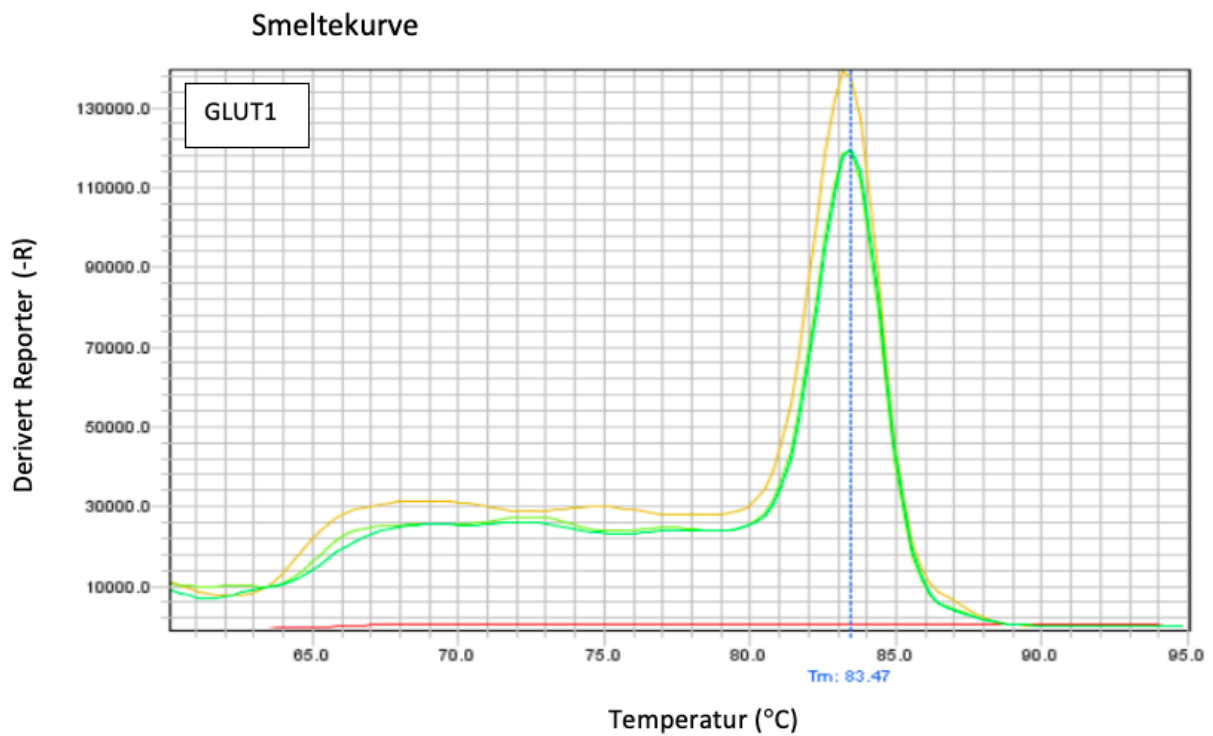
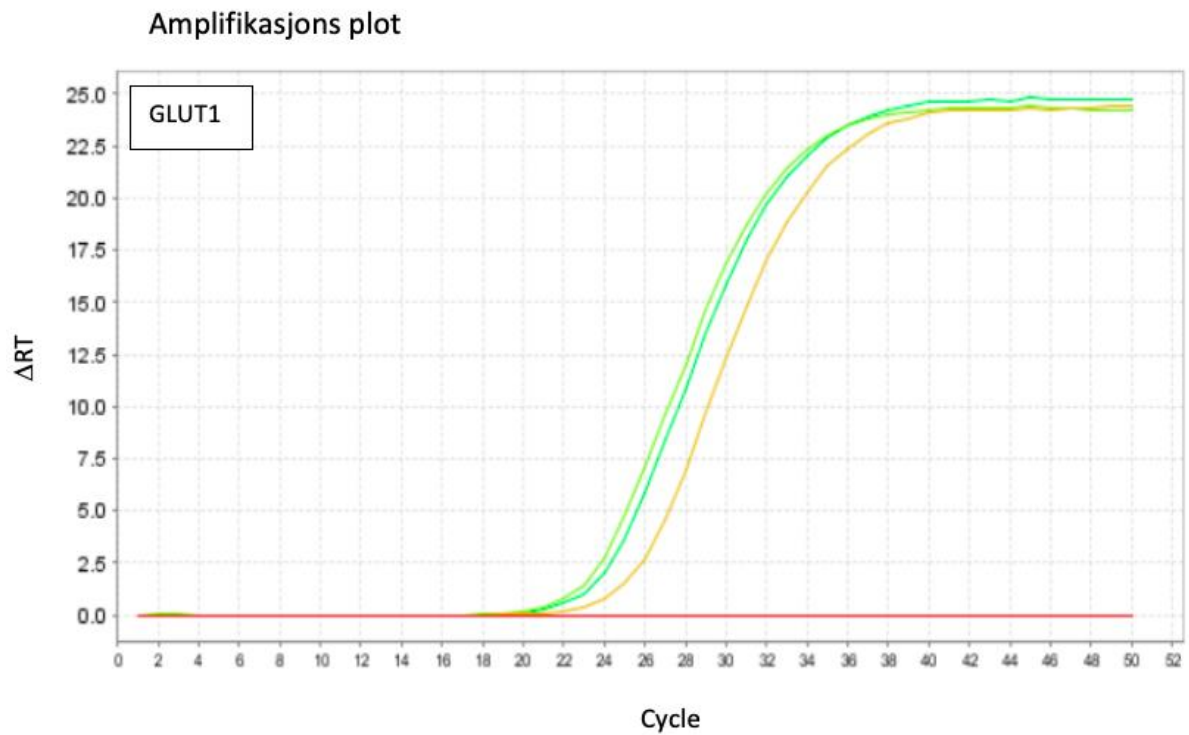
Figur 3.13 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *HNF1A*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *HNF1A_F* og *HNF1A_R*. 40 ng cDNA og annealing temperatur 61 °C ble benyttet i PCR reaksjonen. Ct for HNF1A var 34,9.



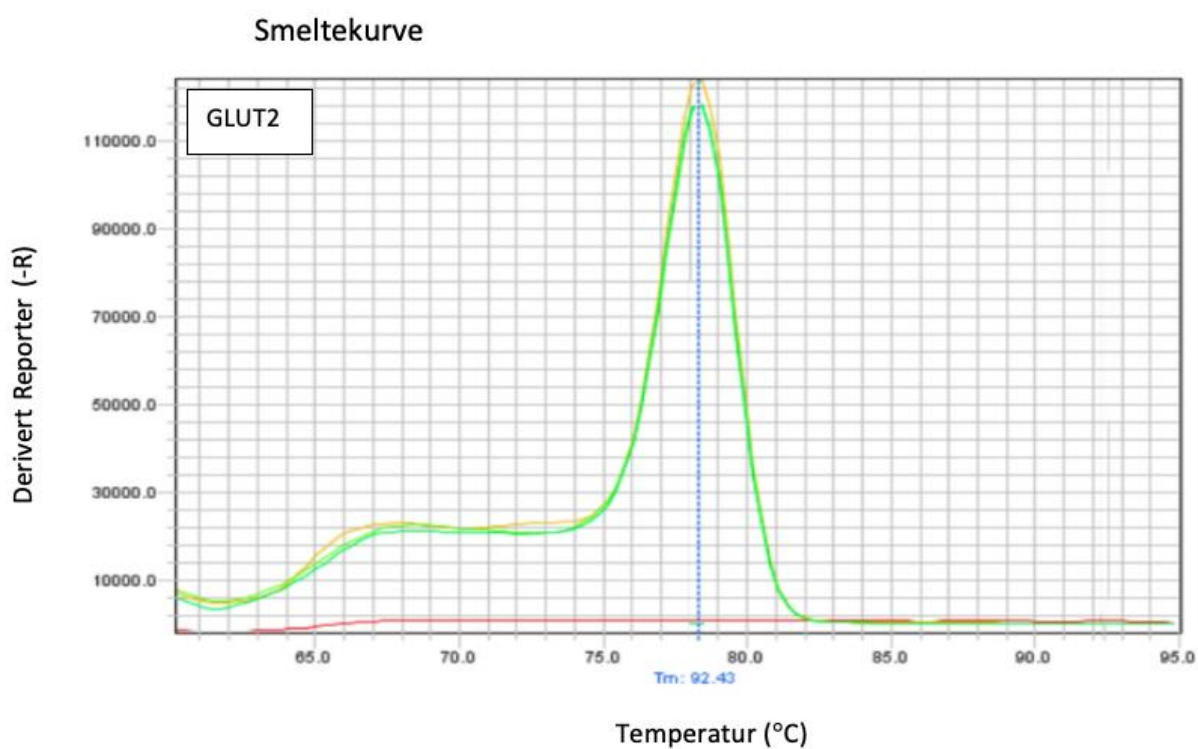
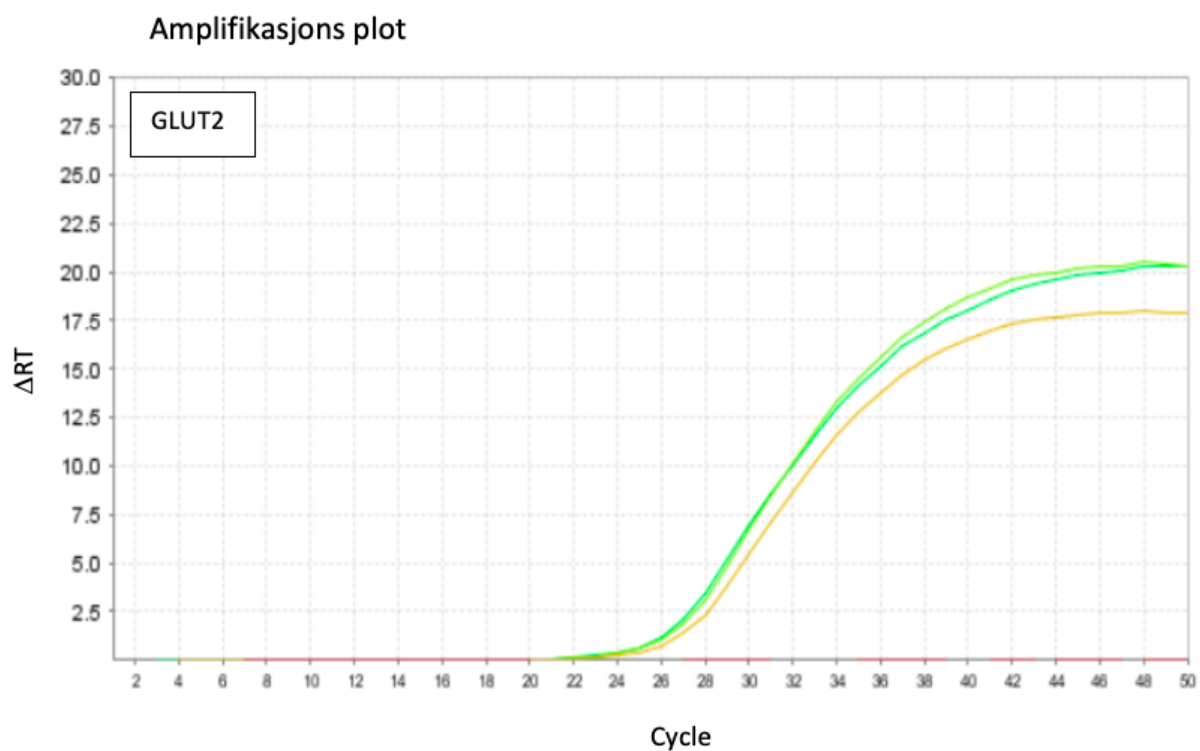
Figur 3.14 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *HNF4A*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *HNF4A_F* og *HNF4A_R*. 60 ng cDNA og annealing temperatur 57 $^{\circ}C$ ble benyttet i PCR reaksjonen. Amplifisert produkt kommer opp sent, Ct er 44,7, og der er en spredning av parallellene og smeltekurven ikke er optimal.



Figur 3.15 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *PRKC*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *PRKC-b_F* og *PRKC-b_R*. 60 ng cDNA og annealing temperatur 63 °C ble benyttet i PCR reaksjonen. Ct for *PRKC* var 31,3.

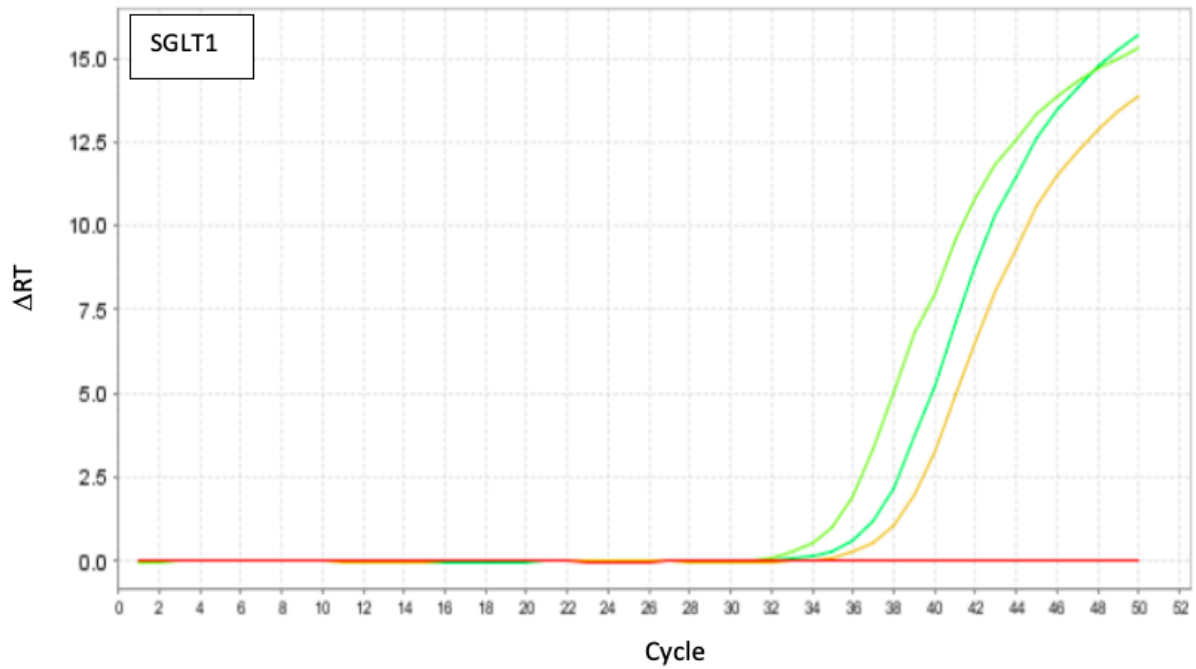


Figur 3.16 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *GLUT1*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *GLUT1_F* og *GLUT1_R*. 40 ng cDNA og annealing temperatur 58 $^{\circ}C$ ble benyttet i PCR reaksjonen. Ct for *GLUT1* var 25,3.

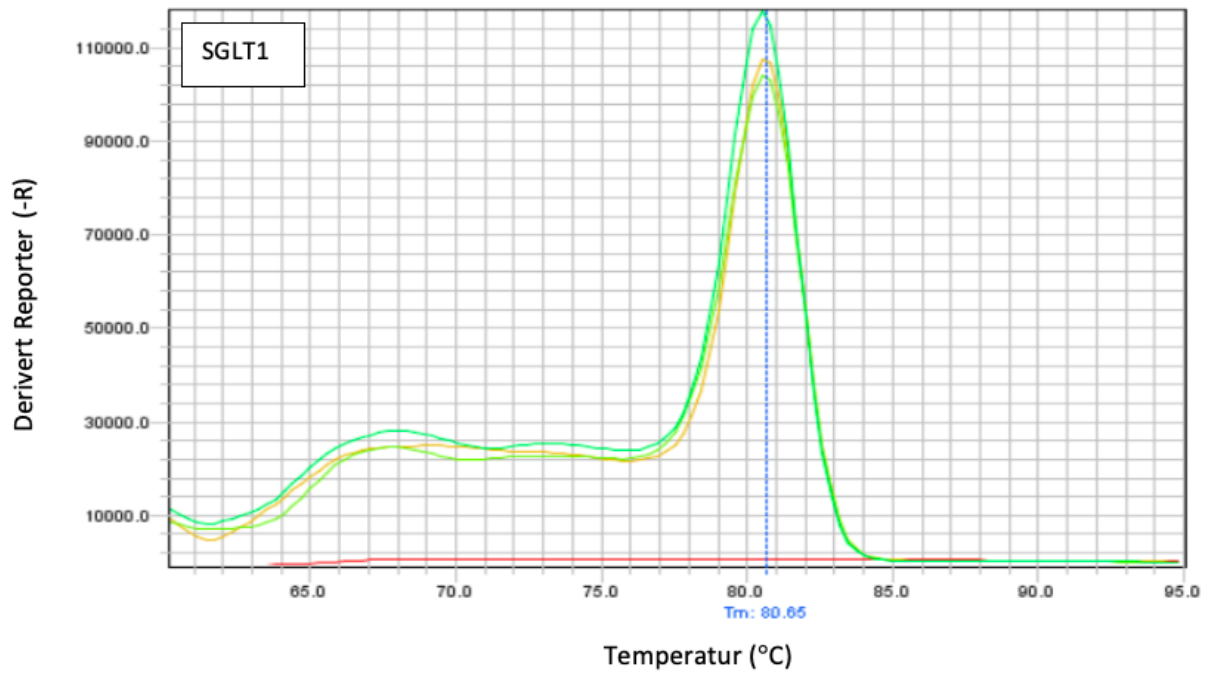


Figur 3.17 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *GLUT2*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *GLUT2_F* og *GLUT2_R*. 40 ng cDNA og annealing temperatur 58 °C ble benyttet i PCR reaksjonen. Ct for *GLUT2* var 27,3.

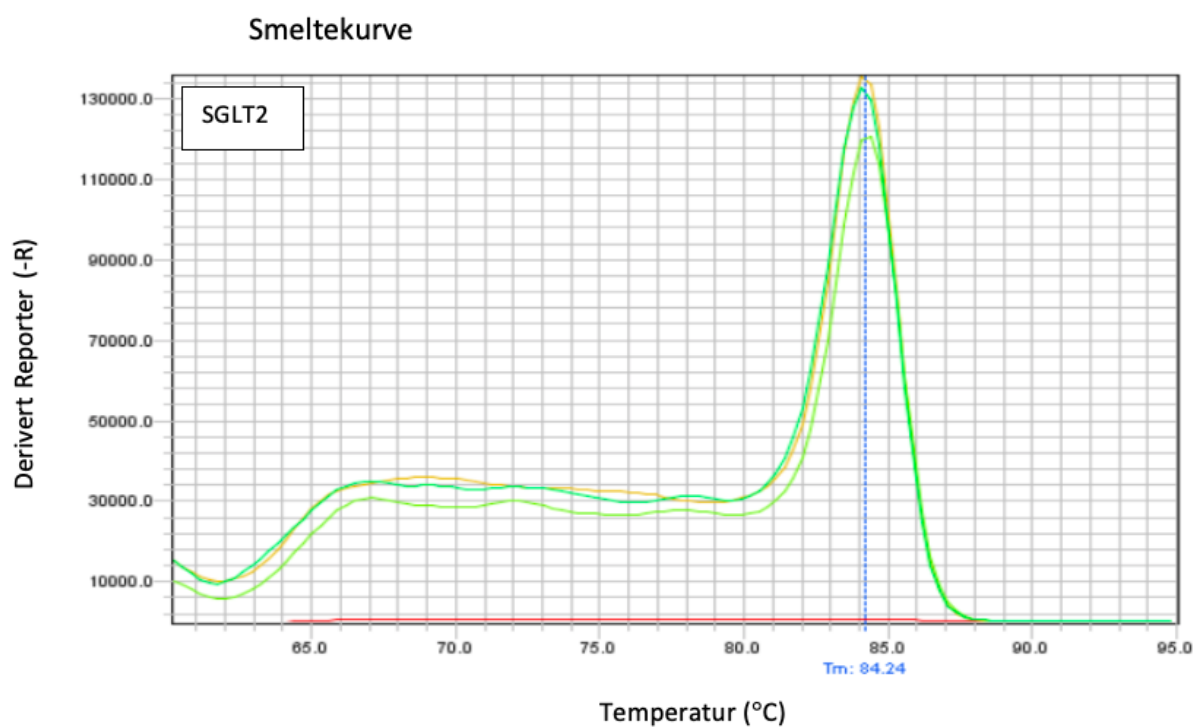
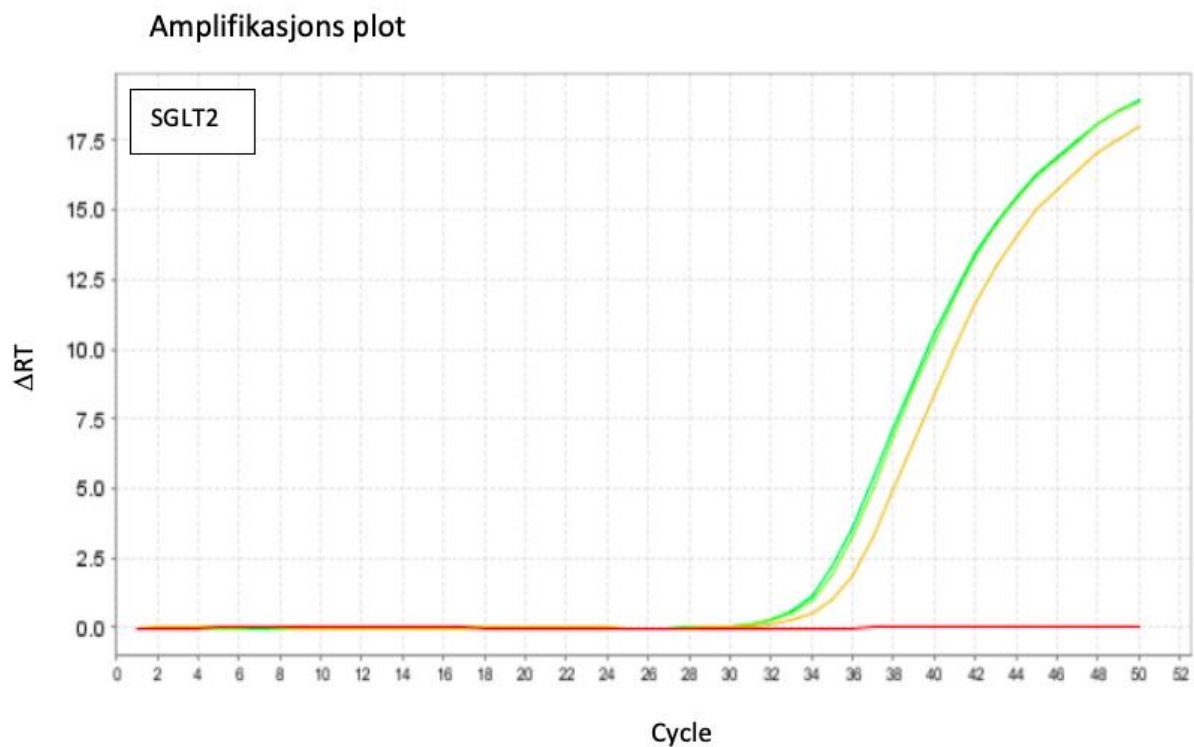
Amplifikasjons plot



Smeltekurve



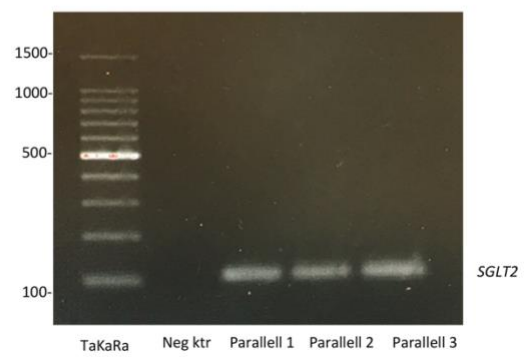
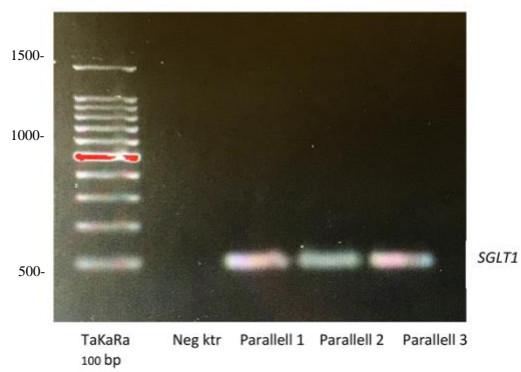
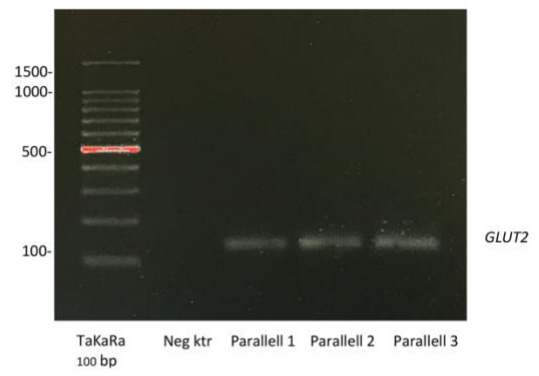
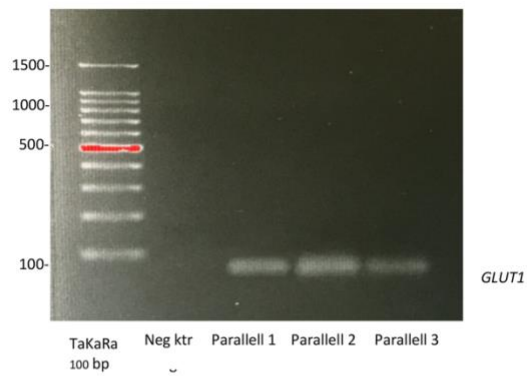
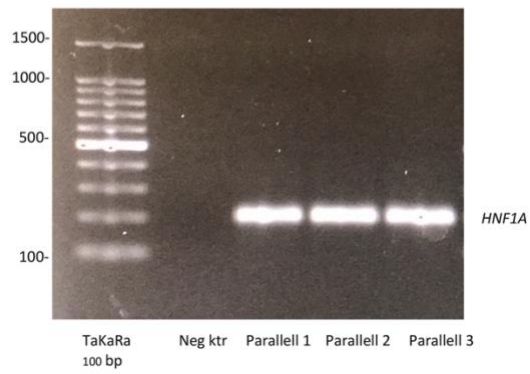
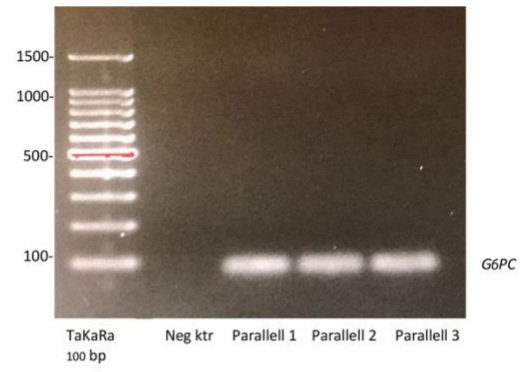
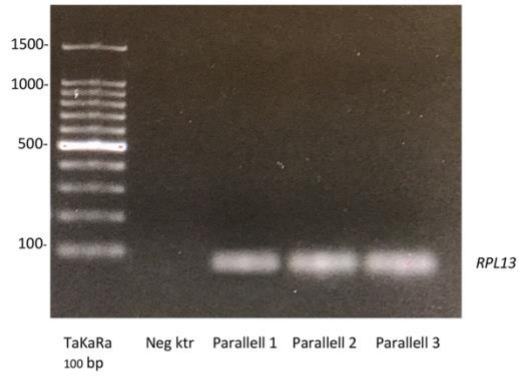
Figur 3.18 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *SGLT1*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *SGLT1_F* og *SGLT1_R*. 60 ng cDNA og annealing temperatur 61 °C ble benyttet i PCR reaksjonen. Ct for *SGLT1* var 39,0.

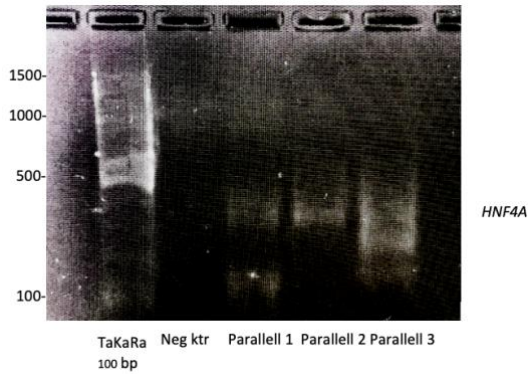


Figur 3.19 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *SGLT2*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet *SGLT2_F* og *SGLT2_R*. 40 ng cDNA og annealing temperatur 60 °C ble benyttet i PCR reaksjonen. Ct for *SGLT2* var 35,4.

3.9 Analyse av PCR-produkt ved agarose gelelektroforese

PCR produktene amplifisert ved kvantitativ sanntids-PCR (figur 3.11-3.19) ble videre analysert ved agarose gelelektroforese, for å bekrefte at riktig målgen var blitt amplifisert basert med korrekt produktstørrelse. TaKaRa DNA størrelsesmarkør (100 bp stige) ble applisert på gelen som kontroll på produktstørrelse for de amplifiserte PCR produktene på gelen. For å kunne bedømme PCR produktstørrelse for de ulike primersettene, ble forventet størrelse på PCR produktene for de ulike målgener cDNA sekvensene (human) for hvert individuelt målgen hentet ut fra Nucleotide database ved The National Center for Biotechnology Information (NCBI). PCR produktstørrelse for målgener basert på individuelle primersett ble beregnet å være som følgende: *RPL13* – 66 basepar (bp), *G6PC* - 163 bp, *HNF1A* - 209 bp, *HNF4A* – ikke funnet primersekvens, *PRKC-β* – ikke funnet primersekvens, *GLUT1* - 129 bp, *GLUT2* - 108 bp, *SGLT1* - 95 bp, og *SGLT2* - 132 bp. Resultat fra agarose gelelektroforese av de amplifiserte PCR-produktene vises i figur 3.20.

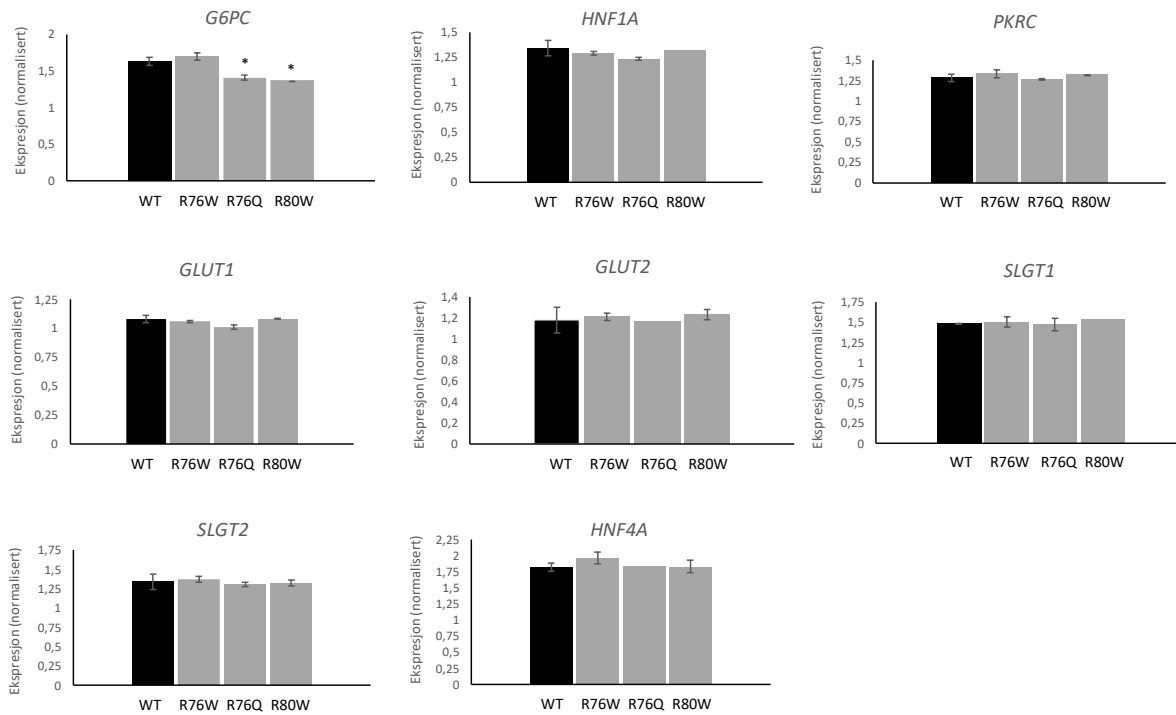




Figur 3.20 Elektroforesegel med amplifiserte PCR-produkter for ulike HNF-4A målgener. PCR produktene ble analysert på en 1 % agarose gel der det ble applisert en negativ kontroll (blank prøve) og tre parallelle prøver for hvert av målgen produktene. TaKaRa DNA størrelsesmarkør (100 bp stige) ble applisert i første gelbrønn, ved siden av PCR produktene, som kontroll for størrelsen på PCR produktene.

3.10 Effekt av *HNF4A* varianter på uttryksnivået av HNF-4A målgener

For å studere hvorvidt varianter i *HNF4A* (R76W, R76Q og R80W) påvirker HNF-4A regulering av målgener ble det utført kvantitative sanntids- PCR analyser. RNA ble først ekstrahert fra HK-2 celler transfektert med enten WT eller *HNF4A* variant plasmid. 300 ng RNA ble brukt i cDNA syntesen og optimaliserte mengder av cDNA og PCR annealing temperatur og antall PCR sykluser beskrevet i seksjon 3.8, ble brukt videre i de kvantitative PCR analysene. For hver WT og variant prøve (R76W, R76Q og R80W) ble det satt opp tre parallelle PCR reaksjoner, samt en negativ kontroll (blank prøve). Gjennomsnittet av de tre parallellene ble brukt videre i utregning av ratioverdier Ct målgen / Ct endogen kontroll (*RPL13*). Ct verdier for referansegnet *RPL13* ble brukt til normalisering av Ct verdier for HNF-4A målgener. Resultater er vist i figur 3.21. Kun signifikant nedgang i uttrykk av *G6PC* genet ble detektert, for variantene R76Q og R80W, sammenlignet med WT HNF-4A. En høyere uttrykk av *G6PC* gene ble observert for R76W, men økningen er ikke signifikant. Et tilsvarende økt uttrykk av endogen *HNF4A* ble observert for R76W, men også denne økningen ikke signifikant. For de andre genene var nivåene relativt jevne, når en sammenligner WT HNF-4A med HNF-4A variantene. Amplifikasjonskurvene for de individuelle genene er vist i vedlegg.



Figur 3.21 Effekt av HNF-4A varianter på HNF-4A målgener ved hjelp av kvantitative sanntids-PCR analyser. HK-2 celler ble transfektert med enten WT eller *HNF4A* variant plasmider. Total RNA ble rensset og 300 ng ble brukt i cDNA syntesen. For hver WT og variant cDNA prøve (R76W, R76Q og R80W), ble det satt opp tre parallelle PCR reaksjoner, samt en negativ kontroll. Dataene er presentert som ratioverdi: gjennomsnitt Ct målgen/ gjennomsnitt Ct endogen kontroll og standardavvik. Uttrykk av referansegnet *RPL13* ble brukt til normalisering av Ct verdier for individuelle målgener. * indikerer $p < 0,05$, ** indikerer $p < 0,001$

4 DISKUSJON

4.1 HK-2 cellelinje som modellsystem for å studere MODY-relaterte genvarianter.

Denne studien har undersøkt hvorvidt HK-2 celler, som er en cellelinje fra proksimale tubuli nyre, kan benyttes til funksjonelle analyser for å studere effekt av bestemte *HNF4A* varianter.

Proksimale tubuli i nyrene er involvert i reabsorpsjon av vann, elektrolytter og oppløste organiske forbindelser, tubuli-sekresjon og andre prosesser, der transportere blant annet spiller en viktig rolle i klarering av mange substrater. Valget av cellelinje er på bakgrunn av at pasienter med de unike *HNF4A* varianter R76W og R76Q, har nyresvikt (Fanconi syndrom) som del av det kliniske bildet, i tillegg til MODY1 (Stanescu, 2012; Hamilton, 2014; Numakura, 2015). Rollen til HNF-4A i nyre og proksimale tubuli funksjon har tidligere ikke vært godt studert. Det er tidligere vist at *HNF4A* er uttrykt i proksimale tubuli cellene i nyrene hos menneske (Jiang, 2003). Det har også blitt vist at varianter i *HNF4A* i mus resulterer i nedsatt genuttrykk av vanntransportere (*Aqp1*, *Aqp7*, *Aqp11*), glukosetransportere *Slc5a1*(*SGLT1*), *Slc5a2* (*SGLT2*), *Slc2a2* (*GLUT2*), og natrium-fosfat transportere (*Slc20a2*, *Slc34a1*, *Slc34a3*). Nedsatt uttrykk av disse genene i proksimal tubuli er forbundet med glukosuri, fosfaturi og polyuri (Marable, 2018; Jiang, 2003). Å studere effekten av *HNF4A* variantene assosiert med Fanconi syndrom i et mer passende modellsystem som en cellelinje som HK-2, kan forhåpentligvis gi mer informasjon om disse variantene som årsak til pasienters nyresykdom. Utover relevansen av å studere *HNF4A* varianter i HK-2 cellene, så kan HK-2 cellelinjen også vise seg å være et godt modellsystem for studier av annen MODY sykdom generelt, ettersom patogene *HNF1A* (MODY3) og *HNF1B* (MODY5) varianter viser seg assosiert med nyresykdom og kan gi nyrecyster hos pasienter (Haumaitre, 2006). Argumenter for dette er at HNF-1A blant annet regulerer uttrykk av *SGLT2* gen som koder for natrium-glukose transporter 2 som regulerer reabsorpsjon av glukose i de proksimale tubuli. I MODY3 pasientene er *SGLT2* uttrykket redusert og fører til glykosuri og nedsatt absorpsjon av glukose (Pontoglio M. P., 2000). Videre har delesjon i *HNF1B* gen (MODY5) vist seg å være årsak til renale cyster og diabetes syndrom (RCAD), og andre patogene varianter i *HNF1B* er assosiert med medfødt abnormiteter i nyre og urinvei (congenital abnormalities of kidney and urinary tract, CAKUT). De mest alvorlige CAKUT anormalitetene kan føre til nyreskade og livstruende nyresvikt (Montoli, 2002 Aug; Bellanné-Chantelot C. C.-L., 2004; Ulinski, 2006; Faguer, 2011).

4.2 Optimalisering av transfeksjon i HK-2 cellelinje

For å undersøke transfeksjonseffektiviteten, ble det først utført en fluorescens analyse av HK-2 celler transfektert med forskjellig mengde plasmid som uttrykker GFP, innenfor grove rammer anbefalt av transfeksjonskit produsent (Figur 3.4). Fluorescens data gitt ved uttrykt GFP i andel celler viste en relativt god transfeksjonseffektivitet på ca 30 % ved den høyeste plasmidkonsentrasjonen (1,5 µg), men det kunne ha vært testet ut flere transfeksjonskit, transfeksjonsmetoder og plasmid-mengder, for å se om en kan oppnå en enda mer optimal transfeksjon. En mer effektiv transfeksjon ville da også kunne ha positivt påvirket videre analyser av HNF-4A og effekt av *HNF4A* varianter på HNF-4A målgen.

Basert på tidligere artikler og erfaringsutveksling på ulike nettbaserte diskusjonsforum som omtaler transfeksjon av HK-2 celler så ble kun Lipofectamine® 2000 Reagent testet ut som transfeksjonsreagens (mest hyppig brukt) (Ali, 2010; Carmena, 2012). Lipofectamine er relativt ofte brukt i eksperimentelle celleforsøk for å fremme at HK-2 cellene tar opp fremmed DNA (plasmider). Toksisitet er vanlig å se ved bruk av Lipofectamine, spesielt ved høye konsentrasjoner (Wang, 2018; Zhong, 2008). I denne masteroppgaven ble Lipofectamine protokollen fulgt med en DNA: Lipofectamine ratio på 1:3. Innenfor det anbefalte området gikk det likevel en del celler tapt under transfeksjonen, noe som ble observert visuelt i lysmikroskop. For å løse dette problemet hadde det vært mulig å ytterligere titrere mengder Lipofectamine versus DNA, foruten å utsette cellene for Lipofectamine reagens en kortere periode (fjerne transfeksjonsmedium etter noen timer og tilsette ferskt medium), eller bedre bestemme den optimale celletettheten før transfeksjon. De mest optimale betingelsene som ble gjort i dette prosjektet for å hindre tap av celler ved transfeksjon, var å øke celletettheten (80 % konfluens) før Lipofectamine ble tilsatt, la transfeksjonsløsningen stå maksimalt 4 timer, og høste/analysere celler senest 24 timer senere. En viktig faktor etter mye erfaring med HK-2 cellene var å minimalisere stress på cellene som kunne oppstå ved splitting, vasking, bruk av antibiotika i medium under transfeksjon, samt bytte av medium 4 timer etter transfeksjon.

4.3 Optimalisering av HNF-4A transaktivering i HK-2 celler

Transaktiveringsassayet ble optimalisert ved å teste ulike forholdsmengder mellom HNF-4A kodende plasmider og promotor-koblede Firefly Luciferase (FL) reporter plasmid (figur 3.7). Reporter plasmid som ble testet var regulert av henholdsvis *G6PC* og *HNF1A* promotorer. Ettersom HNF-4A er beskrevet uttrykt i proksimale tubuli, så var det forventet at *G6PC/HNF1A* promotor binding av endogent uttrykt HNF-4A i HK-2 cellene ville skape en viss forstyrrelse og

bakgrunnsmåling i transaktiveringsassayet. Den negative kontrollen som inneholdt kun transfektert reporter plasmid (ingen *HNF4A* plasmid) gav derimot lave verdier av transaktiveringsaktivitet, noe som indikerer at aktivitetsresultatene for HK-2 celler transfektert med *HNF4A* baserer seg kun på eksogent (transfektet) *HNF4A*. Den lave bakgrunnsaktiviteten av endogent HNF-4A kan muligens forklare lave og ujevne mål på endogent *HNF4A* i nedstrøms analysen ved kvantitativ sanntids-PCR (figur 3.14), og videre vist av svake og uspesifikke *HNF4A* PCR produkt på agarosegel (figur 3.20), som er diskutert i seksjon 4.6.

Siden HNF-4A transaktivering basert på *G6PC* promotor (*G6PC*-Firefly Luciferase reporter) var lav i det første optimaliseringsforsøket (figur 3.5), observert ved lav Firefly/Renilla ratio, så ble *HNF1A* promotoren ved *HNF1A*-Firefly Luciferase reporter også inkludert i videre optimaliseringsforsøk. Transaktiveringaktivitet, basert på Firefly/Renilla ratio, var høyest ved transfeksjon med 800 ng *HNF4A* plasmid for begge promotor-linkede reporter plasmid (figur 3.6). Her var transaktivering av *HNF1A* promotor reporter plasmid mer effektiv basert på en høyere Firefly/Renilla ratio, sammenlignet med *G6PC* promotor reporter plasmid. Siden de to første optimaliseringsforsøkene viste at den mest optimale total mengde DNA plasmid for effektiv transaktivering var rundt 1,6 µg, sammen med 800 ng individuelle reporter plasmid, så ble totale mengder plasmider og transfeksjonsreagenser halvert, for videre utprøving av transaktivering i mindre skala (færre celler, plasmid og transfeksjonsreagens). Dette ble utført med hensyn på framtidige analyser av et større antall *MODY* genvarianter, og mer high-throughput analyser der en nedskalering av eksperimentelle forsøk og mindre kostnader er ønskelig. Transaktivering, basert på Firefly/Renilla ratio var da høyest ved transfeksjon med 600 ng *HNF4A* plasmid mot 400 ng *G6PC* promotor-linket reporter, og med 800 ng *HNF4A* plasmid mot 400 ng *HNF1A* promotor-linket reporter (figur 3.7). Totale erfaringer gjort i dette prosjektet er at HNF-4A regulerer *HNF1A* promotoren i HK-2 celler mer effektivt enn *G6PC* promotoren, basert på en høyere grad av transaktivering når Firefly Luciferase aktivitet er normalisert for Renilla Luciferase aktivitet. Basert på tidligere masteroppgaver så vet vi at HNF-4A binder begge promotorer like effektivt, men der man har sett en cellelinje spesifikk effekt på aktivitetsnivået til blant annet R76W (Jorunn Hjaltadottir).

I vev som nyre, lever og bukspyttkjertel, er både *G6PC* og *HNF1A* kjente HNF-4A målgener. For eksempel i bukspyttkjertelens β -celler er HNF-1A involvert i glukose metabolismen og regulerer uttrykk av gener som koder for GLUT1 og GLUT2 transportere (Luni, 2012; Pedersen, 2013). I både leverens hepatocytter og i bukspyttkjertelens β -celler er HNF-4A og HNF-1A avhengig av hverandre, og regulerer hverandres uttrykk i et komplisert signal-/reguleringsnettverk, som er avgjørende for normal celledifferensiering og organfunksjon (Duncan, 1998; Li, 2000). Hvis

HNF-4A mister evnen til å binde til *HNF1A* promotor i målceller ved variant, så blir nettverket brutt, og vil påvirke videre HNF-1A regulering av sine målgener i relevante vev. HNF-1A spiller også en viktig rolle i utviklingen av nyre (Lau, 2018). Den er også en nøkkelregulator i metabolske prosesser i nyre hos et voksent menneske, da HNF-1A regulerer glukosehomeostasen ved å regulere glukose-6-phosphatase (*G6PC*) og glukosetransportere i nyreceller, i tillegg til å regulere andre nyretransportere som påvirker aminosyremetabolismen ved nedsatt renal reabsorpsjon (Hatzis, 2001; Bonzo, 2010; Hiraiwa, 2001; Pontoglio M. , 2000). Martovetsky et al. demonstrerte at HNF-1A og HNF-4A sammen regulerer transkripsjon av legemiddel metabolisme enzymer og transportere (DME) i utvikling av proksimale tubuli (Martovetsky, 2013). I tillegg hevdet de at HNF-1A og HNF-4A spiller en nøkkelrolle i detektering av spesifikke metabolske endringer, noe som vil føre til nødvendig forandring i transkripsjon av DME. Vi vet at HNF-1A fremmer glukose reabsorpsjon i diabetisk nyre og oppregulering av *SGLT2* uttrykk i diabetes har blitt koblet nettopp til HNF-1A, basert på studier utført i rotte renal cortex (Pontoglio M. , 2000). Siden vi vet at HNF-4A regulerer *HNF1A* uttrykk, så er det en sannsynlighet for at også HNF-4A har en rolle i glukose reabsorpsjon i nyrene og proksimale tubuli. *G6PC* (Glukose-6-Phosphatase Catalytic Subunit) som koder for Glucose-6-phosphatase er et nøkkelenzym i glukose homeostasen, ved å katalysere trinn i både glykogenolysen og glukoneogenesen. Hvis ikke dette enzymet fungerer normalt, vil Glukose-6-fosfat ikke bli brutt ned til glukose, men omdannet til fett og glukagon. For høye lagringsnivå av disse komponentene i cellene er giftig og vil skade organer som lever og nyrer (Gerin, 2002). Resultatene for transaktivering i dette prosjektet, og det vi vet fra før om *HNF1A* og *HNF4A* sin regulering-loop, basert på tidligere publiserte studier, indikerer at HNF-4A spiller en større rolle med hensyn til regulering av *HNF1A* og HNF-1A funksjon enn av *G6PC* og dermed Glukose-6-fosfatase funksjon, i proksimale tubuli i nyre.

4.4 Effekt av *HNF4A* varianter på HNF-4A transaktivering

Effekten av *HNF4A* variantene ble sammenlignet med normal HNF-4A transaktivering i transfekterte HK-2 celler og relatert til regulering av *HNF1A*- og *G6PC* promotor-linkede reporter plasmider (Figur 3.8 A). Igjen viste den negative kontrollen (EV, «empty vector»: uten transfektert *HNF4A*) lave nivåer av transaktiveringsaktivitet, og indikerer at aktivitetsmålingene representerer transfektert HNF-4A. Resultatene basert på begge reporterne (*HNF1A*-FL og *G6PC*-FL) viste økt transaktiveringsaktivitet for R76W varianten, og høyest (650 %) for *HNF1A*-FL. Økt R76W aktivitet på *G6PC*-FL i HK-2 celler stemmer med funn i tidligere masteroppgaver (Jorunn Hjaltadottir og Lorentze Hope Hornes) basert på studier i HepG2 (lever) celler. Den høye

aktiviteten av R76W på *HNF1A*-FL i HK-celler, derimot, stemmer ikke med tidligere funn i den nevnte masteroppgaven (Jorunn Hjaltadottir), der en lettere redusert (MIN6, cellelinje med pankreasceller) og normal (HepG2, cellelinje med leverceller) aktivitet ble målt for R76W på *HNF1A*-FL. Dette kan indikere en celledoesifikk effekt og viser viktigheten av å utføre slike studier i flere cellelinjer og som er relevante for HNF-4A funksjon (både nyre, lever og pancreas relevante cellelinjer).

R76Q varianten, derimot, viste nær normalt aktivitetsnivå for *G6PC*-FL og 260 % økt nivå for *HNF1A*-FL, i forhold til WT HNF-4A (100 %) (Figur 3.8 A). Igjen, så stemmer funnene relatert til *G6PC*-FL med den tidligere masteroppgaven (Jorunn Hjaltadottir) på studier i HepG2 celler, mens en lavere aktivitet for *G6PC*-FL ble funnet i MIN6 celler. Resultat som viser at R76Q gir økt aktivitet for *HNF1A*-FL i HK-2 celler, stemmer heller ikke med tidligere funn i den nevnte masteroppgaven, der en lettere redusert aktivitet på *HNF1A*-FL ble målt i både MIN6 og HepG2 celler. Samlet sett er det mye som tyder på at effekt av R76W og R76Q kan være celledoesifikk, samt avhengig av relevansen av *G6PC* versus *HNF1A* promotorene i de forskjellige cellelinjene. *HNF1A* promotor er relevant for samtlige cellelinjer (HK-2, MIN6 og HepG2), mens *G6PC* promotor er mer relevant i HepG2 og HK-2, basert på hvor de er kjent å ha en funksjonell rolle. Forskjell i koaktivator rekruttering i ulike cellelinjer kan kanskje være en forklaring på den spesifikke forskjellen observert i transaktivering i disse forskjellige cellelinjene.

R80W, derimot, viste lavere aktivitet på begge promotorer og reportersystem testet i HK-2 celler (Figur 3.8 A). Dette stemmer overens med funn gjort i en annen tidligere masteroppgave (Lorentze Hope Hornnes), men der effekt av R80W på kun *G6PC*-FL ble målt i HepG2 celler og i HeLa celler.

Både R76W og R76Q er lokalisert i DNA bindende-domenet (DBD) i HNF-4A proteinet. Begge kan påvirke arginin i posisjon 76 som er vist å være i direkte kontakt med *HNF1A* promotor sekvensen (Lu, 2008). Denne varianten forandrer muligens strukturen til HNF-4A DNA bindings-domenet (DBD) binding motif og ved en endret binding så vil dermed transkripsjons-aktiveringsaktiviteten mest sannsynlig forandres (Chandra, 2013). R76 aminosyren har en viktig rolle i DNA binding og endring av denne kan medføre endret interaksjon mellom HNF-4A og DNA bindingssekvens i målgener (Hamilton A. J.-S., 2014). Arginin er en polar positivt ladet aminosyre som er viktig for ladning av proteinet, og DNA er negativt ladd. Dette kan derfor medvirke til DNA binding (pluss og minus tiltrekker hverandre). Ved forandring av arginine (R) til tryptophan (W) i R76W, vil være en stor forandring fra en polar positivt ladet aminosyre til en

ikke-polar og ikke-ladet aminosyre. I R76Q vil en forandring til glutamine(Q) som er polar, men ikke -ladet tenkes å gi en mindre forandring strukturelt. Hamilton et. al demonstrerte at R76W reduserte binding til DR1 sekvensen. Dette harmonerer ikke med mine eller de to tidligere masterstudentene sine funn på transaktivering. Hvis R76W fører til redusert DNA binding, burde vi ha forventet en redusert aktivitet. Koaktivator rekruttering kan være en forklaring for cellespesifikk forskjell observert for R76W transaktivering. HNF4A rekrutterer koaktivatorer til transkripsjonskomplekset og det muliggjør rekruttering av andre koaktivatorer og transkripsjons mediatorer. Det er mulig at HNF4A koaktivator interagerer med R76W i et transaktiverings-kompleks som er mindre spesifikt enn WT proteinet. For eksempel har Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coaktivator 1-alpha (Pgc1a) som er en kjent koaktivator for HNF4A mediert G6PC transaktivering vist seg å øke HNF4A transaktivering (Lin, 2005; Madsen, 2016; Puigserver, 2003).

HNF-4A isoform 2 ble brukt i disse forsøkene, og er samme isoform som ble testet i de to tidligere masteroppgavene referert til. Isoform 2 er ikke veldig ulik de andre isoformene, men er uttrykt kun i lever- og nyrevev (Harries, 2008). Det er kjent at hver isoform har en bestemt funksjon og regulerer, vevsavhengig, en spesifikk gruppe gener (Li K. Z., 2006). For å få en fullverdig oversikt over hvorvidt effekt av de testede *HNF4A* variantene også kan være isoform avhengig, så bør man lage og teste varianter for de vevsspesifikke isoformene, der de to masteroppgavene som tidligere har blitt utført på samme isoform 2, kommenterer at funn gjort i MIN6 celler (og HeLa) ikke er helt representative for den isoformen som er høyest uttrykt der (isoform 8).

4.5 Valg av målgener for kvantitative PCR-analyser i HK-2 celler

Ettersom det kliniske bildet av pasienter med de unike *HNF4A* variantene R76W og R76Q også inkluderer nyre dysfunksjon (Fanconi syndrom), i tillegg til neonatal hyperinsulinemi med hypoglykemi, som senere i livet endres til MODY1, var det ønskelig å undersøke effekt av disse patogene *HNF4A* variantene på transkripsjonsreguleringen av målgener forbundet med normal nyrefunksjon relatert til proksimale tubuli. Nyrenes funksjon ved opprettholdelse av glukose homeostase inkluderer glukoneogenese og glukose reabsorpsjon i nyrens proksimale tubuli. Relevansen for valg av *PCKβ1* genet, som koder for protein kinase *PCKβ1*, er fordi den promoterer glukose reabsorpsjon i diabetisk nyre (Pfaff, 2002). Ved glukoneogenesen, som også skjer i proksimale tubuli i nyrenes cortex, er det vist at mangel på glukose-6-fosfatase (*G6PC*) derimot fører til lavere glukosenivå og oppsamling av glukose-6 fosfat og glykogen i proksimal tubuli (Rajas, 2007). Ettersom HNF-4A regulering av *G6PC* har vært analysert i

transaktiveringsassayet (Figur 3.8 A), så var det relevant å parallelt inkludere analyser av effekt av *HNF4A* varianter på uttrykk av endogen *G6PC*.

Glukose transport inn i proksimal tubuli er insulin avhengig, og dette gjør de proksimale tubuli sensitiv for lave insulin-nivå og hyperglykemi ved diabetes (Vallon, 2011). Mens *SGLT2* er angitt å stå for 97 % reabsorpsjon av glukose i tidlige tubuli segmenter, så er *SGLT1* angitt å stå for 40 % av reabsorpsjon i senere segmenter.

Tidligere forsøk utført i rotter viser at HNF-1A binding av *SGLT2* medvirker til utvikling av diabetisk renal tubuli og glomerulus sykdommer (Freitas, 2007). HNF-4A har også blitt rapportert å spille en viktig rolle i *SGLT2* uttrykk (Bonner, 2015; Kothinti, 2010). Selv om *HNF4A* er uttrykt i andre vev, er ikke *SGLT2* det. Med tanke på samspillet mellom HNF-1A og HNF-4A, så er det ikke ulogisk å tenke seg at HNF-4A også kan ha en påvirkning på regulering av *SLGT2*.

Glukose transport over den basolaterale membranen i proksimal tubuli utføres av glukose transport proteinene *GLUT1* og *GLUT2*. *GLUT2* er blant annet involvert i frigjøring av glukose absorbert av *SGLT1* og *SLGT2*, til blodstrømmen (Augustin, 2014). *GLUT2* uttrykk har for eksempel vist seg å være oppregulert i renal proksimal tubuli i rotter med diabetes, og knyttes til transkripsjonsaktivitet av HNF-1A. I samme studie ble *GLUT1*, derimot, vist seg å være nedregulert i cortical tubuli i diabetes i diabetiske rotter. (Chin, 1997; Dominguez, 1994).

I tillegg til glukose, aminosyre, fosfat og ioner, blir en signifikant mengde albumin og plasmaproteiner reabsorbert i proksimale tubuli. Dette involverer interaksjon mellom reseptorene megalin og cubilin, som så blir omgjort til endosomer og lysosomer. Defekter i endocytosen utgjør en viktig rolle i proksimal tubuli dysfunksjon (Fanconi syndrom). HNF-1A spiller en nøkkelrolle i uttrykk av megalin og cubilin, og dermed regulering av endocytosen i proksimale tubuli (Terry, 2016).

I HK-2 cellene ble *RPL13* valgt som referansegene ettersom det er stabilt uttrykt i cytoplasma, og er et vanlig brukt referansegene i HK-2 celler (Hiroaki, 2018). Referansegene skal være konstant uttrykt i alle prøvene som er inkludert i studiet og skal eliminere variasjon i prøvematerialet. En slik endogen kontroll brukes som kontroll på at rensing av RNA har vært effektiv, at ingen kontaminering har oppstått under PCR reaksjon og eliminerer variasjon mellom de ulike assay på grunn av varierende mengde RNA som utgangspunkt for cDNA syntesen.

4.6 Optimalisering av kvantitative PCR-analyser i HK-2 celler

Optimalisering av kvantitativ sanntids-PCR ble først utført på utransfektete HK-2 celler.

Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av endogen *HNF4A* viste at amplifisert PCR produkt detekteres (ved Ct) sent i PCR reaksjonen, at det var spredning (variasjon i Ct) av de tre parallelle prøvene. Smeltekurven for primerne var heller ikke optimal. Disse ujevne parallellene skilte seg ut fra amplifiseringsdata og smeltekurver for de andre målgenene. Sen deteksjon av *HNF4A* produkt viser svakt endogent uttrykk av HNF-4A i denne cellelinjen.

Produktene amplifisert fra den kvantitative sanntids-PCR reaksjonen ble videre analysert ved agarose gelelektroforese, for å bekrefte at riktig og spesifikt målgen var blitt amplifisert basert på korrekt produktstørrelse. Resultatet fra gelanalysen av *HNF4A* amplifisert PCR produkt viste heller ikke noen tydelige bånd på gelen. Dette underbygger at det er lite endogent *HNF4A* i HK-2 cellene.

Ved optimaliseringen av transaktiveringsanalysen ble det som kontroll for et eventuelt endogent bidrag av HNF-4A i HK-2 celler også inkludert en negativ kontroll hvor celler ble kun transfektet med promotor-linket reporter plasmid (*G6PC*- eller *HNF1A*-FL) og *SV40*-RL. Den negative kontrollen gav lave verdier av transaktiveringsaktivitet, noe som indikerer lite *G6PC/HNF1A* promotor binding av endogent HNF-4A uttrykt i HK-2 cellene (Figur 3.5.3). Disse funnene styrker også mistanken om lavt uttrykk av HNF-4A i HK-2 cellene. I tillegg var det i innledende forsøk til masterprosjektet forsøkt å detektere og estimere mengden endogen uttrykt HNF-4A protein i HK-2 celler. Cellelysat fra utransfektete HK-2 celler ble analysert ved denaturerende gelelektroforese (SDS-PAGE), og videre immunoblot analyse ved bruk av HNF-4A spesifikke antistoff (data ikke vist). På grunn av manglende påvisning av HNF-4A protein på immunoblot, muligens på grunn av dårlig antistoff eller ikke-optimale mengder lysat/overføring av protein til membran, så ble ikke disse data inkludert i oppgaven. Av fare for å miste verdifull tid så ble det valgt å gå videre med analyser som fungerte (transaktivering og RNA-basert deteksjon av *HNF4A*). Den svake deteksjonen av endogen *HNF4A* basert på kvantitativ sanntids-PCR og agarose gelelektroforese korrelerer imidlertid med mangel på endogen deteksjon av HNF-4A protein i HK-2 celle lysatet. Men å vise at HNF-4A muligens har en mindre rolle i proksimale tubuli og dermed ikke relevant i HK-2 celler, ville kreve videre optimalisering og bevis for å kunne påstå dette, og vil være motstridende til tidligere publiserte rapporter på relevans. Det kan tenkes at *HNF4A* har en mer spesifikk rolle i utviklingsstadiet av nyrer. HK-2 cellelinjen vil da ikke egne seg for å se hvilken effekt *HNF4A* har på utvikling av nyrer. Da vil en dyremodell eller stamceller egne seg bedre.

Med hensyn til en utbedring av kvantitative sanntids-PCR analyser så er annealing for det *HNF4A* spesifikke primerparet muligens ikke helt optimal til tross for at det i oppgaven ble utprøvd en rekke forskjellige optimaliseringer av PCR reaksjonen. Primersekvensene for *HNF4A* var hentet fra tidligere publiserte og testede primere, men ved søk i NCBI ble primersekvensene ikke funnet. Dette kan tyde på at denne sekvensen ikke har vært optimal eller har at det har vært noe gale med dem. Det kunne videre ha vært testet om primersettet var i orden ved å bruke transfekterte *HNF4A* HK-2 celler som positiv kontroll. De uspesifikke toppene vist i smeltekurveanalysen utført kan være en indikasjon på dette (Figur 3.14). Videre kan primerlengde og nukleotidsammensetning ha betydning for hvor høy temperaturen kan være for optimal binding av primere til templatet. Dette ble det tatt hensyn til under optimaliseringen, der annealingtemperaturen ble senket 5 °C i forhold til lavest fungerende temperatur angitt per primer. Dette ble gjort for å sikre seg mot mulige uoverensstemmelser mellom primer og templat. At også amplifisering av *HNF4A* produkt kom sent i reaksjonen (høy Ct verdi) kan skyldes for lav mengde cDNA inn i PCR reaksjonen, selv om det også her ble gjort flere forsøk på å optimalisere disse mengdene uten at det ble oppnådd bedre resultatet.

Amplifikasjonskurvene, parallellene, og smeltekurveanalysene for de andre målgene og primersettene var derimot gode, basert på de optimaliseringene som ble gjort.

Amplifikasjonskurvene var sigmoide i formen, noe som indikerer optimal mengde primere. Smeltekurvene hadde ikke uspesifikke topper, men en spesifikk target topp som vitner om riktig annealing temperatur i PCR reaksjonen.

4.7 Effekt av *HNF4A* varianter på uttrykk av HNF-4A målgener basert på kvantitativ sanntids PCR.

Uttrykk av HNF-4A målgener ble videre studert basert på kvantitativ PCR-analyser av RNA rensset fra transfekterte HK-2 celler (WT versus *HNF4A* varianter) (Figur 3.8 A). Det ble ikke observert store endringer i uttrykk av genene: *HNF1A*, *HNF4A*, *PRKC*, *GLUT1*, *GLUT2*, *SGLT1* og *SGLT2* fra celler transfektert med R76W, R76Q eller R80W, sammenlignet med WT *HNF4A*. Kun signifikant nedgang i uttrykk av *G6PC* genet ble detektert for variantene R76Q og R80W, sammenlignet med WT *HNF4A*. Dette stemmer med data der variant R76Q viser kun litt lavere nivå av transaktiveringaktivitet på *G6PC*-FL (90 %), sammenlignet med WT HNF-4A (100 %). Transaktiveringsaktiviteten til R80W varianten, derimot, var redusert til 50 % på *G6PC*-FL,

sammenlignet med WT HNF-4A (100 %). Å direkte sammenligne disse to analysene kan være utfordrende. Real time qPCR måler mRNA transkripter for spesifikke gener, men forteller deg ingenting om transkripsjonskontroll av genet. Luciferase assayet måler promotor aktivering eller transkripsjonsregulering. Mens transaktiveringsassayet er et meget sensitivt assay, så er man ved kvantitativ sanntids PCR avhengig av det endogene uttrykket til gener som blir målt og amplifisert. For å kunne differensiere på effekt av *HNF4A* varianter så antas det at et tilstrekkelig uttrykk av målgener er nødvendig for å kunne differensiere mellom varianter med stor/liten effekt på HNF-4A sin regulering av disse.

Ct-verdiene for engogen *HNF4A* gen i celler som er transfektert med *HNF4A* plasmid var høye. Man vil forventet at hvis transfeksjonen har fungert og man har god overuttrykking av *HNF4A* (fra plasmid transfektert), så ville Ct verdiene for *HNF4A* være markant lavere for transfekterte celler sammenlignet med ikke transfekterte celler. Disse resultatene tyder på at transfeksjonen muligens ikke har fungert optimalt. Testing av GFP transfeksjon var utført i 12 brønnersplate mens real-time forsøket ble utført i 25 cm² kulturflasker. Sett i etterkant skulle det muligens vært verifisert at *HNF4A* transfeksjon hadde fungert i 25 cm² kulturflasker med enten en fungerende western blot, ved bruk av HNF-4A (eller anti-Flag) antistoff, eller ved GFP uttrykk. Dette for å sikre en god overuttrykking av HNF-4A for den mengde celler som ble brukt i det aktuelle forsøket, før sanntids-PCR med de ulike endogene genene ble testet. Dette kan være en forklaring på at det ikke er så godt samsvar mellom transaktiverings- og kvantitative PCRdata. Transaktiveringsassay ble også gjort i 12 brønners- og 24 brønnersplate, og er derfor mer likt GFP oppsettet. Samtidig er transaktiveringsassayet mer sensitivt, der små utslag fanges lettere opp.

4.8 Effekt av R76W variant på WT HNF-4A transaktivering

I transaktiveringsanalysene som er utført i denne oppgaven, så studeres effekt av *HNF4A* varianter alene. I MODY1 pasienter er patogene *HNF4A* varianter tilstede i heterozygot form, og derfor i en *in vivo* situasjon, bør WT *HNF4A* allelets påvirkning tas med i betraktningen. I hvilken grad WT allelet er i stand til å gjøre opp for det patogene allelets mangler *in vivo*, det vil si hvilken (negativ) påvirkning har en patogen variant, på WT allel, er hyppigst studert når en patogen variant gir redusert funksjon og der denne «trekker ned» normal aktivitet til normal allelet (dominant negativ effekt). Etersom R76W, spesielt, viser høy transaktivering sammenlignet med WT HNF-4A, så var det ønskelig å se om R76W kan «positivt» påvirke aktiviteten til WT allelet (Figur 3.10). Derfor ble det utført transaktiveringsanalyse med titrerende plasmid-mengde av R76W, det vil si en økende mengde variant plasmid (0 - 200 ng), mot en konstant mengde WT *HNF4A* plasmid.

Allerede minimale mengder R76W plasmid (40 ng og dermed 1:10 ratio R76W: WT) gav en 50 % økning i transaktiveringsaktiviteten for WT. Aktiviteten til WT økte ytterligere med økende mengde R76W.

Det er blitt vist at en økt funksjonell diversitet kan oppnås ved dimerisering av forskjellige HNF-4A varianter (Ko, 2019). Strukturstudier av HNF-4A homodimer/DNA kompleks er viktig for å forstå effekten av varianter (Chandra, 2013). I dette komplekset danner homodimeren flere domene-domene overganger og en sone der de to LBD ene, DBD og hinge domene møtes. R76W er plassert nøyaktig i dette senteret, og fører til ladning og endring i struktur som trengs for DNA binding. Det kan dermed tenkes at R76W i dette forsøket dimeriserer med WT HNF-4A, og at det dermed er mulig at R76W har en aktiverende effekt på WT proteinet. Videre kan det hypotiseres at dette medføre et negativt stress i cellene.

4.9 Studiens validitet

Intern validitet.

Den interne validiteten beskriver hvor god empirisk sammenheng det er mellom uavhengige- og avhengige variabler. Graden av validitet vil med andre ord avhenge av om endringene i den avhengige variabelen kan utelukkende forklare av den uavhengige variabelen, eller om det kan være andre faktorer som spiller inn (Polit, 2017). I vårt studie vil en sterk intern validitet tilsvare at endringene i de aktuelle målte parameterne utelukkende kommer fra variasjonene i HNF4A genet. Derfor er det viktig at dyrking av celler følger standardiserte prosedyrer, noe som har vært vektlagt i dette masterprosjektet. Videre tiltak ble utført for å forhindre, og eventuelt avdekke andre faktorer som kan ha påvirket de målte variablene. Effekt av *HNF4A* varianter ved transaktivering i transfekterte HK-2 celler ble utført med ni tekniske paralleller i tre biologiske forsøk over tre dager. Dette vil ta høyde for tilfeldige og systematisk avvik og konfundere og øke den interne validiteten. I tillegg ble det brukt negativ kontroll som var HK-2 celler transfektert med EV i stedet for WT eller varianter. Dette for å utelukke bakgrunnsignaler fra endogene gener i HK-2 cellene og sikre oss at ikke noe annet enn de kontrollerte, tilførte variablene i forsøkene er årsak til resultatene. Ved kvantitativ sanntids -PCR analysene ble det brukt tre paralleller og en negativ kontroll. Den negative kontrollen var ikke tilsatt cDNA. I både transaktiveringsanalysene og sanntids PCR er dataene uttrykt i gjennomsnitt av målingene og oppgitt med standardavvik. Statistiske tester er utført for disse analysene for å vise at resultatene mest sannsynlig ikke skyldes tilfeldigheter.

Ekstern validitet.

Ekstern validitet beskriver hvor godt en sammenheng observert i et utvalg vil være allmengjellende i den helhetlige populasjonen (Polit, 2017). Dette vil med andre ord bety at resultatene i en studie med sterk ekstern validitet skal kunne reproduseres gjennom et nytt utvalg. Hvor generaliserbar en observasjon er vil avhenge av hvor godt den tåler variasjoner i den større populasjon. HK-2 cellelinjen som modellsystem er sentral for validitet av resultatene i denne studien. Reproduserbarhet er en kjent utfordring når man utfører forsøk med cellelinjer, forsøkene kan gi ulike resultater avhengig av ukjente variasjoner mellom laboratoriene. Standard protokoller fra produsentene er benyttet som utgangspunkt og modifiserte og optimaliserte prosedyrer er presisert i denne rapporten, dette for å sikre at alle eksperimenter og analyser utført på HK-2 skal kunne reproduseres ved andre laboratorier. En reduserende faktor med tanke på overførbarheten til andre laboratorier vil også være bruk av andre metoder og analyseinstrumenter. Standardiserte prosedyrer i forsøkene tilrettelegger imidlertid for at andre laboratorier kan anvende resultatene hvis de benytter lignende reagenser og utstyr. Videre vil det være aktuelt å utføre tilsvarende studier av *HNF4A* varianter for å reprodusere de her observerte effektene i nyreceller i andre modellsystemer, slik som andre cellelinjer og dyremodeller. For at andre forskningsgrupper skal få innsyn i dokumenterte resultater fra denne studien vedrørende effekter av *HNF4A* varianter i HK-2 cellelinjen, planlegger forskningsgruppen å rapportere utførte eksperimenter og publisere resultatene som del av en vitenskapelig artikkel sammen med resultat fra andre masterstudier som har studert effekt av tilsvarende *HNF4A* varianter i andre relevante modellsystemer for lever og pankreas celler.

5 KONKLUSJON

Til tross for at det er velkjent at HNF-4A som er en transkripsjonsfaktor, spiller et viktig regulativ rolle i både lever og bukspyttkjertel og for lipid og glukosemetabolismen, så er det mindre kjent hvilken rolle varianter i *HNF4A* og andre MODY gener har på de respektive proteiners normale funksjon i nyre. Nyresvikt som en del av det kliniske bildet hos pasienter med *HNF4A* variantene R76W og R76Q, illustrerer viktigheten av å studere mulige patogene mekanismer som oppstår i nyre og nyreceller. Det trengs en mer presis forståelse av den molekylære mekanismen av hvordan de patogene *HNF4A* variantene påvirker transkripsjon i humane cellelinjer fra nyre, og hvordan disse spesifikt påvirker de målgener som reguleres. Studier på endringen i transkripsjonsaktivitet og uttrykk av målgener kan til en viss grad gi noen svar, og korrelerer til en viss grad med variant og fenotype i pasienter. R80W ble inkludert i denne studien som kontroll og en variant som kun gir MODY1, der transaktiveringsdata viser at den skiller seg ut fra R76W og R76Q, og gir en lavere enn forventet aktivitet, sammenlignet med WT. I tillegg medførte R80W en signifikant nedgang i uttrykk av *G6PC* basert på kvantitativ sanntids-PCR analyser.

Pasienter med R76W er karakterisert med hyperinsulinisme og hypoglykemi (HH) samt Fanconi syndrom (renal kalsifikasjon), hvor HH fenotypen endrer seg senere til MODY1 (Hamilton, 2014; Numakura, 2015; Walsh, 2017; Liu, 2018; Stanescu, 2012; Clemente, 2017). Dette masterprosjektet har fokusert på fenotype relatert til nyrene (mens tidligere masteroppgaver fokuserte på fenotype koblet til lever funksjon og bukspyttkjertel funksjon). R76W viste en økt effekt på HNF-4A aktiviteten i HK-2 celler, spesielt på *HNF1A* promotoren, men også på *G6PC* promotoren. HNF-1A fremmer glukose reabsorpsjon i diabetisk nyre, og oppregulering av *SGLT2* uttrykk (glukose absorpsjon) i diabetes har også blitt koblet til HNF-1A (Freitas, 2007). R76Q varianten, derimot, er assosiert med forbigående hypoglykemi (uten hyperinsulinisme) og senere MODY1, og Fanconi syndrom. R76Q varianten viste nær normal aktivitet på *G6PC* transaktiveringsaktivitet og et svakt, dog signifikant, nedsatt uttrykk av *G6PC* ved kvantitativ sanntids-PCR. Mangel på glukose-6-fosfatase (*G6PC*) funksjon fører til oppsamling av glukose-6-fosfat og glykogen i proksimal tubuli (Chou, 2002). Effekt av R76Q på *HNF1A* promotor og transaktivering, derimot, var økt og nesten like høy som R76W. Til tross for mindre effekt av R76Q sammenlignet med R76W på funksjonelt nivå, så er begge varianter assosiert med sykdom i nyrene hos pasienter. Det kan tenkes at renal kalsifikasjon og nyresykdom hos pasienter med R76W og R76Q kan være et resultat av at for mye glukose taes opp i de proksimale tubuli, basert på sterkest effekt på *HNF1A* og tidligere vist rolle av HNF-1A i regulering av *SLGT2*. Ved sanntids PCR sees en svak effekt på *SGLT2*, men den er ikke signifikant. Det observeres en

mindre effekt av R76Q sammenlignet med R76W på funksjonelt nivå. Begge varianter viser imidlertid en svak effekt på regulering av SGLT2 uttrykket, men denne effekten er ikke signifikant.

For å videre bekrefte at R76W (og R76Q, men ikke R80W) binder bedre *G6PC* og *HNF1A* promotor, så burde det vært gjort et DNA bindingsstudie, eksempelvis ved Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Dette ville fungere som et supplement og bekreftelse av *HNF4A* variantene sin påvirkning på HNF-4A transaktiveringen, og ved utprøving av samme spesifikke DNA sekvens til *G6PC* og *HNF1A* som inkludert i reporter plasmidene i transaktiveringsassayet. Dette har blitt gjort i en tidligere masteroppgave (Jorun Hjaltadottir), men riktignok basert på HNF-4A uttrykt i HEK293 celler, som er en ikke-relevant cellelinje relatert til diabetes og MODY. Årsak til valg av tidligere testet cellelinje er for å unngå forstyrrelse av endogen binding av HNF-4A til målsekvens, når R76W og R76Q skulle testes, da det er kjent at HEK293 celler ikke uttrykker HNF-4A (The human protein atlas). Funn i disse cellene viste en redusert binding av begge varianter til både *G6PC* og *HNF1A* promotorsekvens. Det vil derfor være viktig å utelukke en vev- og celledespesifikk effekt med hensyn til en slik studie, ved å utføre slike bindingsstudier i cellelinjer som viser økt transaktivering av R76W og R76Q (HK-2 og HepG2).

Målet med denne studien var å etablere analyser for å studere effekten av MODY1 og Fanconi assosierte *HNF4A* varianter i en ny relevant nyrecellelinje (HK-2). Vi har studert effekten av *HNF4A* variantene på både *G6PC* og *HNF1A* promotor linket luciferase reporter i HK-2 celler samt effekten av *HNF4A* varianter på uttrykk av målgener i HK-2 celler med kvantitativ sanntids-PCR. R76W viste en økt effekt på HNF-4A aktivitet, spesielt på *HNF1A* promotoren, men også på *G6PC* promotor. Bare *G6PC* genet viste et signifikant nedsatt uttrykk for variantene R76Q og R80W med kvantitative sanntids-PCR, og dette korrelerer med at disse variantene viste lavere nivå av transaktiveringaktivitet av *G6PC* promotor. Selv om HK-2 cellelinjen var litt utfordrende å kultivere, er det et passende modellsystem for å undersøke MODY varianter og effekten på målgener og i nyre celle generelt. Ved å etablere laboratorieanalyser på denne cellelinjen, har vi nå muligheten til å studere effekten av andre MODY gener og varianter, og effekten på forskjellige målgener, sammenlignet med tidligere cellelinjer.

6 REFERANSELISTE

- Ali, Q. S. (2010, Nov). High glucose up-regulates angiotensin II subtype 2 receptors via interferon regulatory factor-1 in proximal tubule epithelial. *Mol Cell Biochem*, pp. 344(0): 65–71.
- American Diabetes Association. (2014 , Januar). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, pp. 81-90. Retrieved from https://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S81.
- American Diabetes Association. (2019, Januar). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care*, pp. 13-28. Retrieved from https://care.diabetesjournals.org/content/42/Supplement_1/S13
- ATCC. (2014). Retrieved from HK-2: https://www.lgcstandards-atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cHK%2f-2%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000559&searchTerms=HK-2&geo_country=de&redir=1
- ATCC. (2016). Retrieved from HK-2 ATCC CRL-2190 Homo sapiens kidney, cortex/proximal t: www.atcc.org
- Augustin, R. M. (2014, June 18). Mammalian sugar transporters. *Intechopen*, pp. 204 3-36.
- Bellanné-Chantelot, C. C.-L. (2004, Apr 6). Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med*, pp. 140(7):510-7.
- Bellanné-Chantelot, C. C.-L.-M. (2005 , Nov). Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. . *Diabetes.*, pp. 54(11):3126-32. .
- Boj, S. F. (2001, Desember 4). A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *PNAS*, pp. 14481-14486.
- Boj, S. F. (2010, Mai 27). Epistasis of Transcriptomes Reveals Synergism between Transcriptional Activators Hnf1 α and Hnf4 α . *Plos Genetics*.
- Bonnefond, A. P. (2012). Whole-exome sequencing an high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PLoS One*, p. 7 e37423.
- Bonner, C. K.-C. (2015). Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med*, pp. 21:512–517.

- Bonzo, J. A. (2010). Metabolomics identifies novel HNF1 α -dependent physiological pathways in vivo. *Mol Endocrinol*, pp. 24:2343-2355.
- Briancon, N. W. (2006). In vivo role of the HNF4 α AF-1 activation domain revealed by exon swapping. *Embo j*, pp. 25, 1253-62.
- Carmenaa, J. V.-M.-C. (2012, October). Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits human renal cell carcinoma proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, pp. Volume 1823, Issue 10, Pages 1676-1685.
- Chandra, V. H. (2013). Multidomain integration in the structure of the HNF-4 α nuclear receptor complex. *Nature*, pp. 495, 394-8.
- Chartier, F. L. (1994, Sep). Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver. *Gene*, pp. 30;147(2):269-72.
- Chin, E. Z. (1997). Changes in facilitative glucose transporter messenger ribonucleic acid levels in the diabetic rat kidney. *Endocrinology*, pp. 1267-1275.
- Chou, J. Y. (2002, Mar 2). Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med*, pp. 2:121-143.
- Clemente, M. V. (2017, Mars 16). Hyperinsulinaemic hypoglycaemia, renal Fanconi syndrome and liver disease due to a mutation in the HNF4A gene. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*, pp. pii: 16-0133.
- Coclough, K. B.-C.-M. (2013). Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 α and 4 α in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat*, pp. 34, 669-85.
- Courtoy J., B.-C. C.-L. (2016, May). Tubular proteinuria in patients with HNF1 α mutations: HNF1 α drives endocytosis in the proximal tubule. *Kidney International Volume*, pp. 89, Issue 5, Pages 1075-1089.
- Delezoide, A. L. (2006, August 1). Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1 β /MODY5 mutations. *Human Molecular Genetics*, pp. Volume 15, Issue 15, Pages 2363–2375.
- Diabetesforbundet. (2015). *DIabetesforbundet*. Retrieved from <https://www.diabetes.no/om-diabetes/>.
- Dominguez, J. H. (1994). Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubulus of diabetic rats. *Am J Physiol Renal Fuid Electrolyte Physiol*, pp. 283-290.

- Drewes, T. S. (1996, Mars). Human Hepatocyte Nuclear Factor 4 Isoforms Are Encoded by Distinct and Differentially Expressed Genes. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, pp. 925–931.
- Drexler, H. G. (2002, Jul). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, pp. 39(2):75–90.
- Duda, K. C. (2004). Structural Basis for HNF-4a Activation by Ligand and coactivator Binding. pp. 23311-23316.
- Duncan, S. A. (1998, Jul 31). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science*, pp. 281(5377):692-5.
- Eeckhoutte, J. F. (2004, May 11). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α enhances the Hepatocyte Nuclear Factor 1 α -mediated activation of transcription. *Nucleic Acids Research*, pp. 2586–2593.
- Erdmann, S. S.-H. (2007). Tissue-specific transcription factor HNF4 α inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 beta-cell line. *Biol Chem*, pp. 91-106.
- Faguer, S. D.-C. (2011, Oct). Diagnosis, management, and prognosis of HNF1B nephropathy in adulthood. *Kidney Int*, pp. 80(7):768-76.
- Fajans, S. S. (1990, Jan). Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care*, pp. 13(1):49-64.
- Flanagan, S. E.-C. (2010). Diazoxide- responsive hyperinsulinemic hypoglycemia caused by HNF4A gene mutations. *Eur J Endocrinol*, pp. 162, 987-92.
- Fogarty, M. P. (2014, Sep 11). Identification of a regulatory variant that binds FOXA1 and FOXA2 at the CDC123/CAMK1D type 2 diabetes GWAS locus. *PLoS Genet.*, p. 10(9):e1004633.
- Freitas, H. S.-S. (2007, October 25). Na⁺-Glucose Transporter-2 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Kidney of Diabetic Rats Correlates with Glycemic Levels: Involvement of Hepatocyte Nuclear Factor-1A Expression and Activity. *Endocrinology*, pp. 717-724.
- Froguel, P. Z. (1993). Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*, pp. 328:697-702.
- Gerin, E. V. (2002, Mar 15). The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*, pp. 362(Pt 3): 513–532.
- Hadzopoulou-Cladaras, M. K. (1997). Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*, pp. 272, 539-550.
- Hamilton, A. J.-S. (2014). The HNF4A R76W mutation causes atypical dominant Faconi syndrome in addition to a beta cell phenotype. *J Med Genet*, pp. 51, 165-9.

- Harries, L. W. (2008, Jun). The diabetic phenotype in HNF4A mutation carriers is moderated by the expression of HNF4A isoforms from the P1 promoter during fetal development. *Diabetes*, pp. 57(6):1745-52.
- Hatzis, P. T. (2001). regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4A gene expression. *Mol Cell Biol*, pp. 21:7320-7330.
- Haumaitre, C. F. (2006 , Aug 1). Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1beta/MODY5 mutations. . *Hum Mol Genet*, pp. 15(15):2363-75.
- Hayhurst, G. P. (2001, Februar). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol*, pp. 21, 1393-403.
- Hiraiwa, H. P. (2001). A molecular link between the common phenotypes of type 1 glycogen storage disease and HNF1A- null Mice. *J Biol Chem*, pp. 276:7963-7967.
- Hiroaki, T. T. (2018, September). Nucleosome Positioning and Gene Regulation of the SGLT2 Gene in the Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *Molecular Pharmacology*, pp. 94 (3) 953-962.
- Hoffman, L. S. (2019, Januar 16). Diabetes, Maturity Onset in the Young (MODY). *NCBI*.
- Horikawa, Y. I. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nature genetics* , pp. 17:384-385.
- Huang, J. L. (2009, April). Novel P2 promoter-derived HNF4alpha isoforms with different N-terminus generated by alternate exon insertion. *Exp Cell Res.*, pp. 315, 1200-11.
- Isomaa, B. H. (1998, Apr). Chronic diabetic complications in patients with MODY3 diabetes. *Diabetologia*, pp. 41(4):467-73.
- Iwasaki, N. O. (1998, Dec). Liver and kidney function in Japanese patients with maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care.*, pp. 21(12):2144-8.
- Jiang, S. T. (2003, Aug 8). Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms in human and rats. *Nucl Recept*, p. 1: 5.
- Ko, H. L. (2019). HNF4alpha Combinatorial Isoform Heterodimers Activate Distinct Gene Targets that Differ from Their Corresponding Homodimers. *Cell Rep*, pp. 26, 2549-2557.e3.
- Kothinti, R. K. (2010, May 1). Cadmium down-regulation of kidney Sp1 binding to mouse SGLT1 and SGLT2 gene promoters: possible reaction of cadmium with the zinc finger domain of Sp1. . *Toxicol Appl Pharmacol*, pp. 244(3):254-62.

- Lau, H. H. (2018). The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver. *J Hepatol*, pp. 68(5):1033-1048.
- Li, J. N. (2000, Feb 15;). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α . *Genes Dev*, pp. 14(4):464-74.
- Li, K. Z. (2006, Oct 1). Differential expression of HNF4 α isoforms in liver stem cells and hepatocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, pp. 99(2):558-64.
- Lin, J. H. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, pp. 1, 361-70.
- Liu, J. J. (2018). HNF4A-related Fanconi syndrome in a Chinese patient: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*, pp. 12, 203.
- Lu, P. R. (2008, Nov 28). Structural basis of natural promoter recognition by a unique nuclear receptor, HNF4 α . Diabetes gene product. *J Biol Chem*, pp. 283(48):33685-97.
- Luni, C. M. (2012). Computational modeling of glucose transport in pancreatic β -cells identifies metabolic thresholds and therapeutic targets in diabetes. *PLOS ONE*, p. 7(12): e53130.
- Madsen, A. B. (2016). The cAMP- dependent protein kinase downregulates glucose-6-phosphatase expression through ROR α and SRC-2 coactivator transcriptional activity. *Mol Cell Endocrinol* , pp. 419, 92-101.
- Marable, S. S. (2018, Jul 26). Hnf4a deletion in the mouse kidney phenocopies Fanconi renal tubular syndrome. *JCI Insight*, p. 3(14): e97497.
- Marsenic, O. (2009, May). Glucose control by the kidney:an emergig target in diabetes. *Am J Kidney Disease*, pp. 53(5):875-883.
- Martovetsky, G. T. (2013 , December). Hepatocyte nuclear factors 4 α and 1 α regulate kidney developmental expression of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Mol Pharmacol*, pp. 84(6):808-23.
- Matschinsky, F. M. (1990, Juni). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator inpancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes*, pp. 39(6):647-52.
- Montoli, A. C. (2002 Aug, Aug). Renal cysts and diabetes syndrome linked to mutations of the hepatocyte nuclear factor-1 beta gene: description of a new family with associated liver involvement. *Am J Kidney Dis*, pp. 40(2):397-402.
- Numakura, C. H. (2015). Two patients with HNF4A-related congenital hyperinsulinism and renal tubular dysfunction:A clinical variation which includes transient hepatic dysfunction. *Diabetess Res Clin Pract*, pp. 108, e53-5.
- Odom, D. T. (2004, Februar 27). Control of Pancreas and Liver Gene Expression by HNF Transcription Factors. *Science*, pp. 1378–1381.

- Pearson E. R., P. S. (2005, April 14). Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4alpha mutations in a large European collection. *Diabetologia*, pp. 48, 878-85.
- Pearson, E. R. (2006, August). Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *PubMed*, pp. 467-77.
- Pearson, E. R. (2007). Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozgous mutations in the HNF4A gene. *PLoS medicine*, p. 4:e118.
- Pedersen, K. B. (2013, November). The transcription factor HNF1 α induces expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in pancreatic islets from evolutionarily conserved promoter motifs. *Biochimica et Bioph*, pp. 829(11):1225-35.
- Pfaff, I. L. (2002). Protein kinase C beta isoenzymes in diabetic kidneys and their relation to nephroprotective actions of the ACE inhibitor lisinopril. *Kidney Blood Press Res.*, pp. 25(5):329-40.
- Polit, D. F. (2017). *Nursing Research*. Philadelphia: Wolters Kluwer.
- Pontoglio, M. (2000, 11). Hepatocyte Nuclear Factor 1, a Transcription Factor at the Crossroads of Glucose Homeostasis. *American Society of Nephrology*, pp. 140-S143;.
- Pontoglio, M. P. (2000). HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep*, pp. 1:359-365.
- Puigserver, P. S. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, pp. 24, 78-90.
- Rajas, F. J.-P. (2007, May). Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol*, pp. 127(5):555-65.
- Ruse, M. D. (2002). Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1: modulation by the F domai. *Mol Cell Biol*, pp. 22, 1626-38.
- Ryan, M. J.-S. (1994, Jan). HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International*, pp. 45(1):48-57.
- Sasaki, S. H. (2018, Mar). Hepatocyte nuclear factor 4A regulates megalin expression in proximal tubular cells. *Biochem Biophys Rep*, pp. 17:87-92.
- Søvik, O. N. (1998). Hyperexcitability to sulphonylurea in MODY3. *Diabetologia*, pp. 41, 607-608.
- Scott, R. A. (2017 , Nov). An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans . *Diabetes*, pp. 66(11): 2888-2902.

- Sladek, F. M. (1999, Oktober). Modulation of Transcriptional Activation and Coactivator Interaction by a Splicing Variation in the F Domain of Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4 α 1. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, pp. 19(10):6509–6522.
- Stanescu, D. E. (2012). Novel presentations of congenital hyperinsulism due to mutations in the MODY genes:HNF1A and HNF4A. *J Clin Endocrinol Meta*, pp. 97, E2026-30.
- Steele, A. M. (2010). Increased all-cause and cardiovascular mortality in monogenic diabetes as a result of mutations in HNF1A gene. . *Diabet Med.*, pp. 27:157-161.
- Tanaka, T. J. (2006). Dysregulated expression of P1 and P2 promotor-driven hepatocyte nuclear factor-4A in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol*, pp. 208:662-672.
- Terryn, S. T.-L.-C. (2016, May). Tubular proteinuria in patients with HNF1 α mutations: HNF1 α drives endocytosis in the proximal tubule. *Kidney International*, pp. 89(5):1075-1089.
- Thomas, H. J.-F. (2001, September 15). A distant upstream promoter of the HNF-4 α gene connects the transcription factors involved in m. *Hum Mol Genet.*, pp. 10, 2089-97.
- Thomas, H. J.-F. (2001, July 11). A distant upstream promoter of the HNF-4 α gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Human Molecular Genetics*, pp. 2089–2097.
- Triplitt, C. L. (2012, Januar). Understanding the Kidneys Role in Blood Glucose Regulation. *The American journal of managed care*, pp. 11-16.
- Ulinski, T. L.-C. (2006, Feb). Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J Am Soc Nephrol*, pp. 17(2):497-503.
- Urakami, T. (2019, Juli 8). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. *PubMed*, pp. 1047-1056.
- Vallon, V. (2011, May). The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, pp. 300(5): R1009-R1022.
- Velho, G. V. (1996 , Sep). Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 locus on chromosome 12q. *Diabetes Care.*, pp. 19(9):915-9.
- Walsh, S. B. (2017). Fainting Fanconi syndrome clarified by proxy: a case report. *BMC nephrology*, pp. 18, 230-230.
- Wang, T. L. (2018, October 8). Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Molecules*, p. 23(10)2564.
- Warnmark, A. T. (2003, Oktober 1). Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcrip. *Molecular Endocrinology*, pp. 1901-1909.

World Health Organization. (2016). *Global Report on Diabetes Executive summary*. WHO.

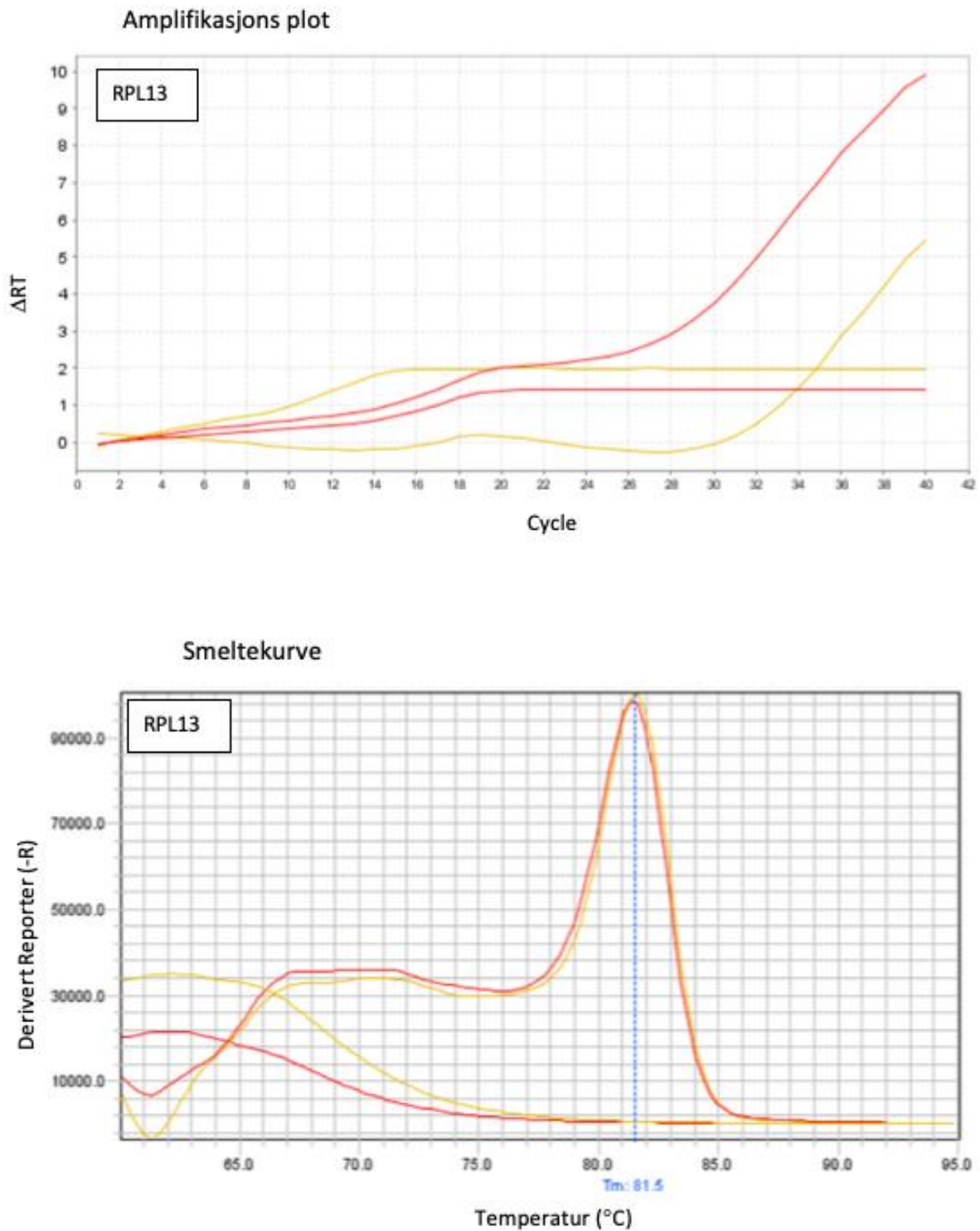
Retrieved from <https://www.who.int/publications-detail/global-report-on-diabetes>

Yamagata, K. O. (1996). Mutations in hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene in maturity-onset diabetes of the young(MODY3). *Nature*, pp. 384:455-458.

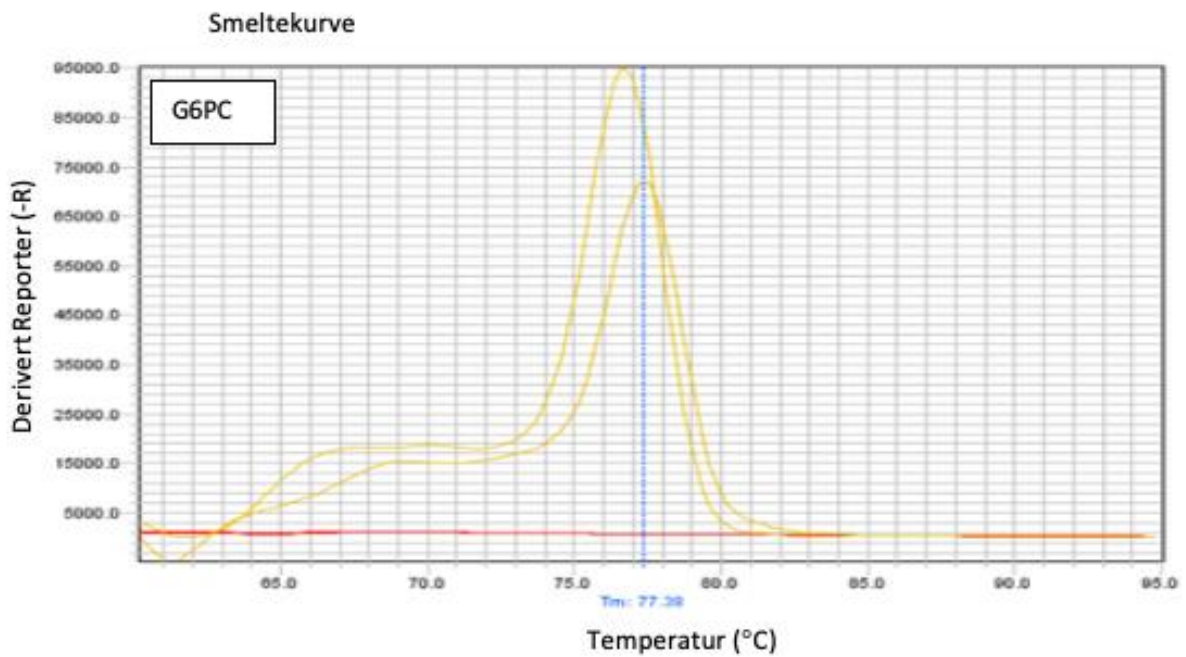
Zhong, Y. Q. (2008, Nov). Toxicity of cationic liposome Lipofectamine 2000 in human pancreatic cancer Capan-2 cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, pp. 28(11):1981-4.

7 VEDLEGG

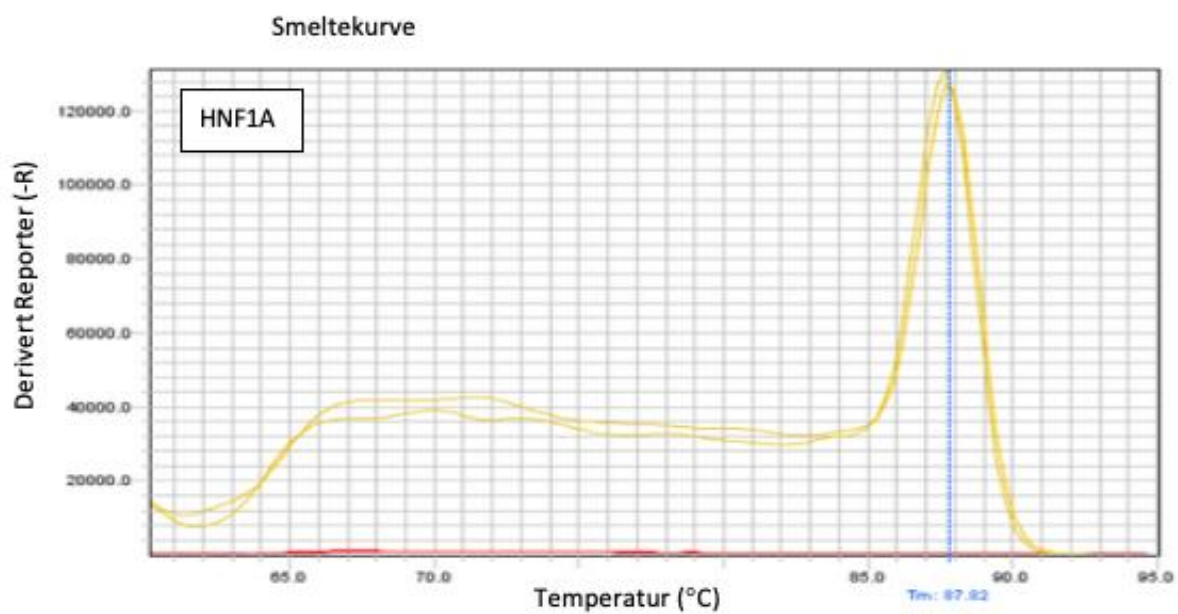
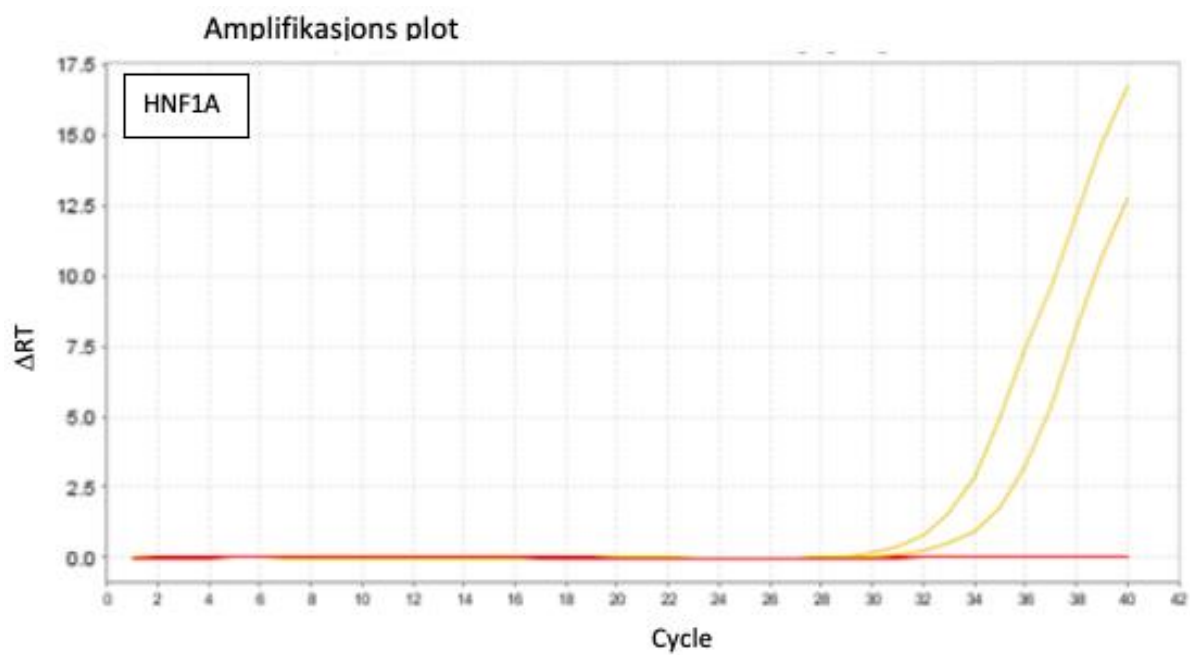
7.1 Optimalisering primere



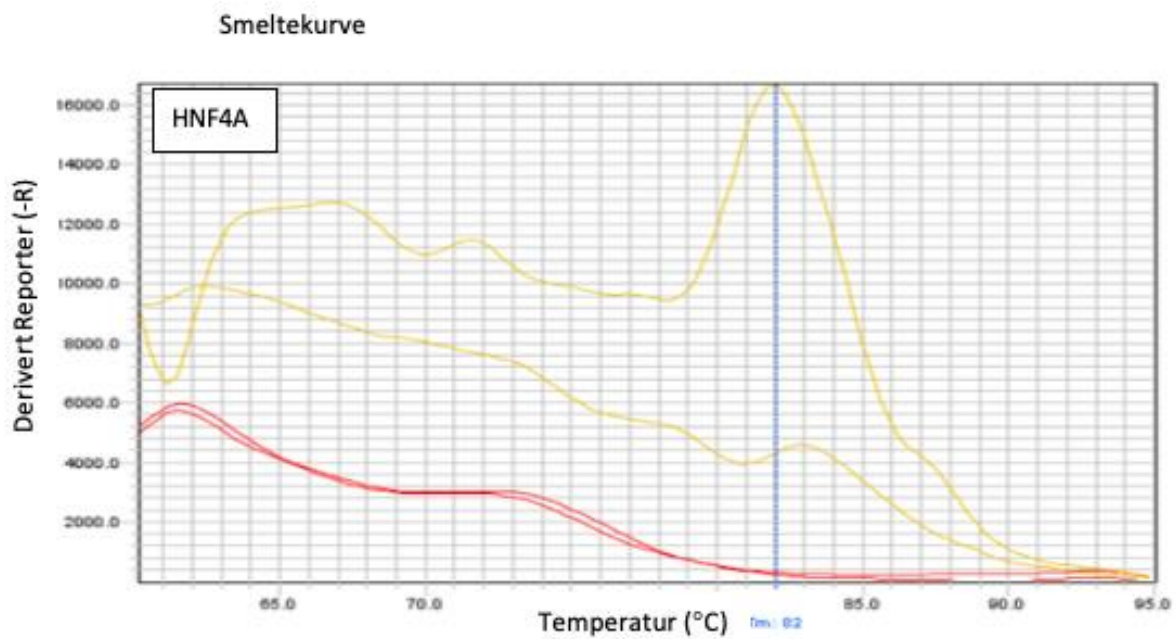
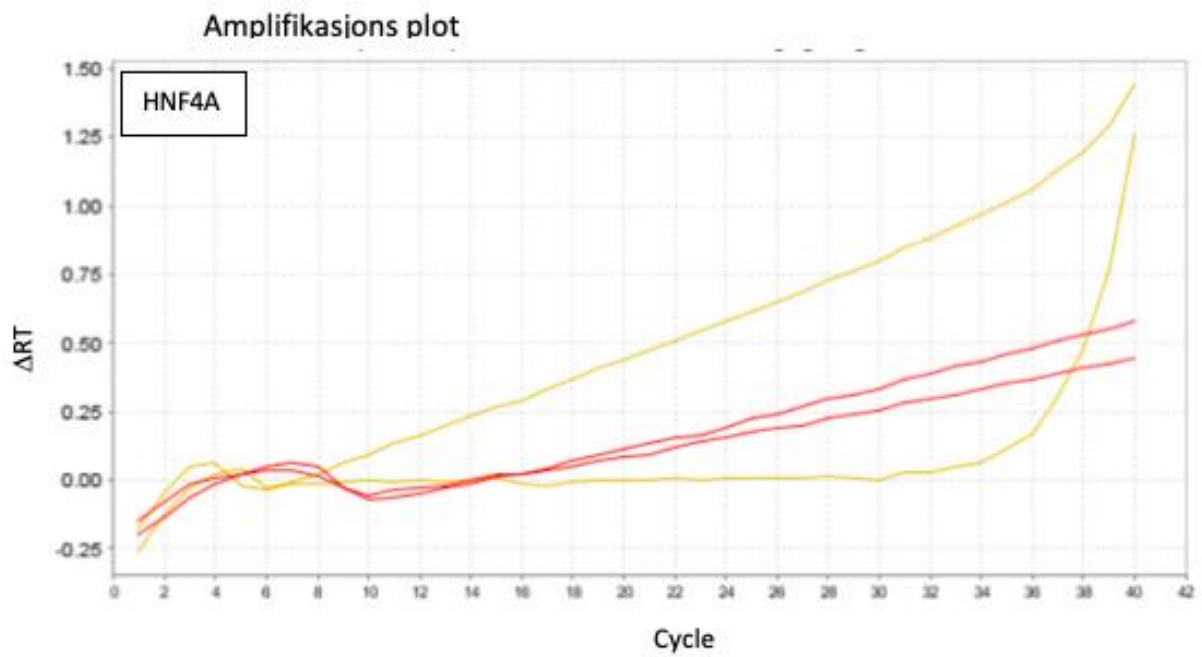
Figur 7.1 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av referansegenet *RPL13*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet RPL13_F og RPL13_R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 60 °C ble benyttet i PCR reaksjonen.



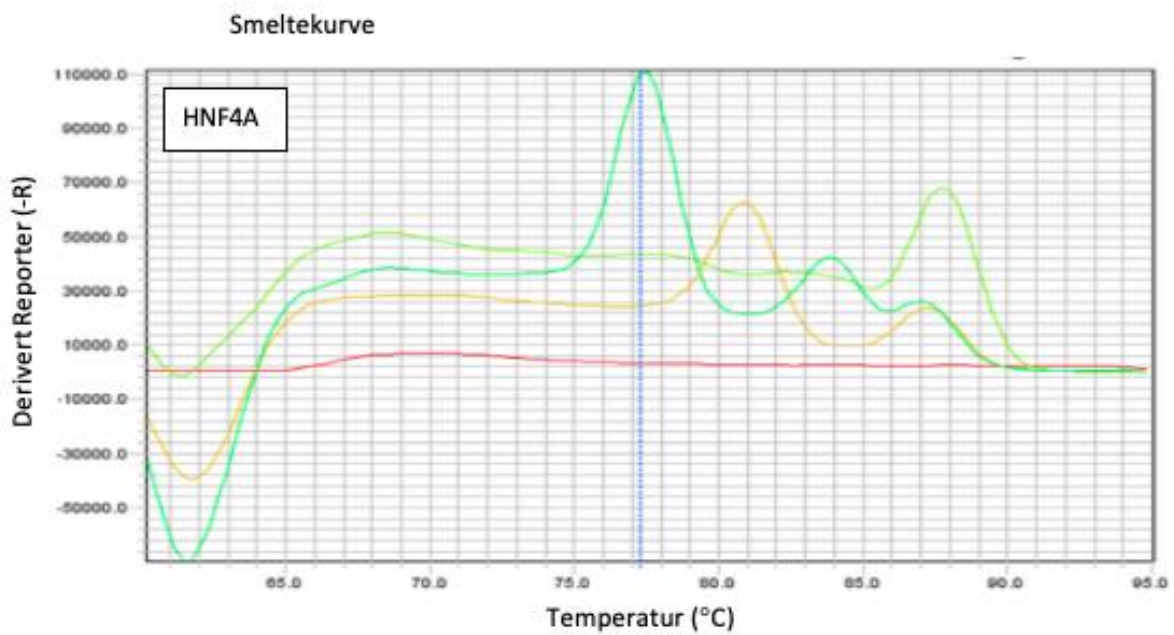
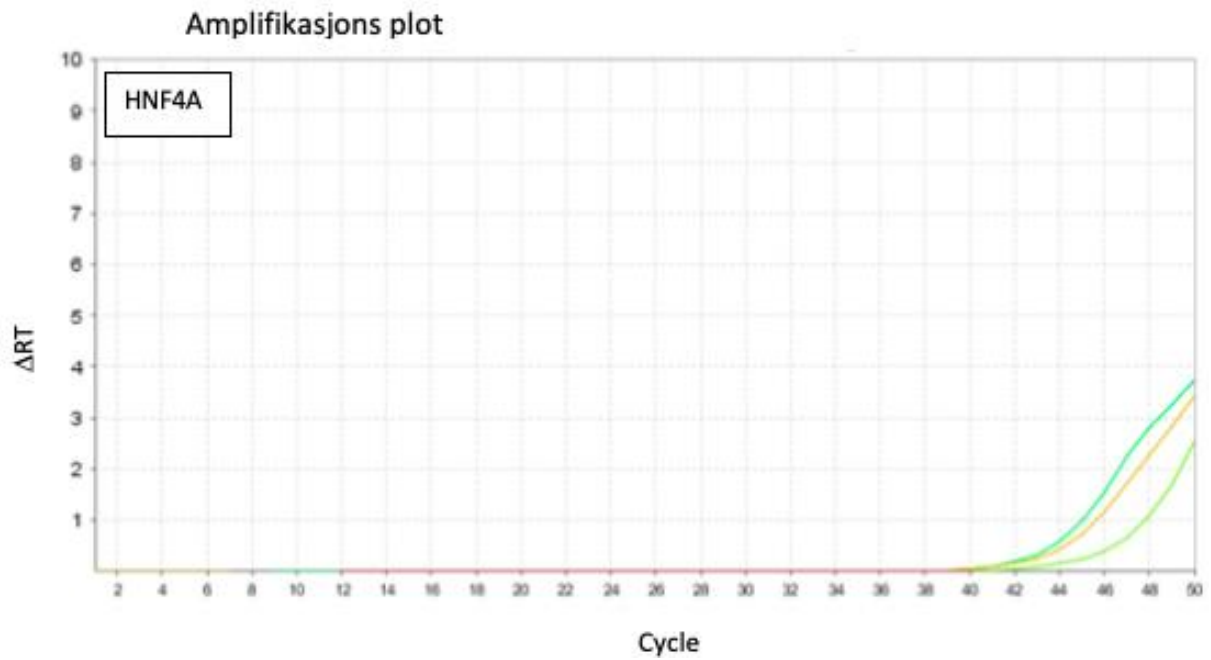
Figur 7.2 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *G6PC*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet G6PC_F og G6PC_R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 51 °C ble benyttet i PCR reaksjonen.



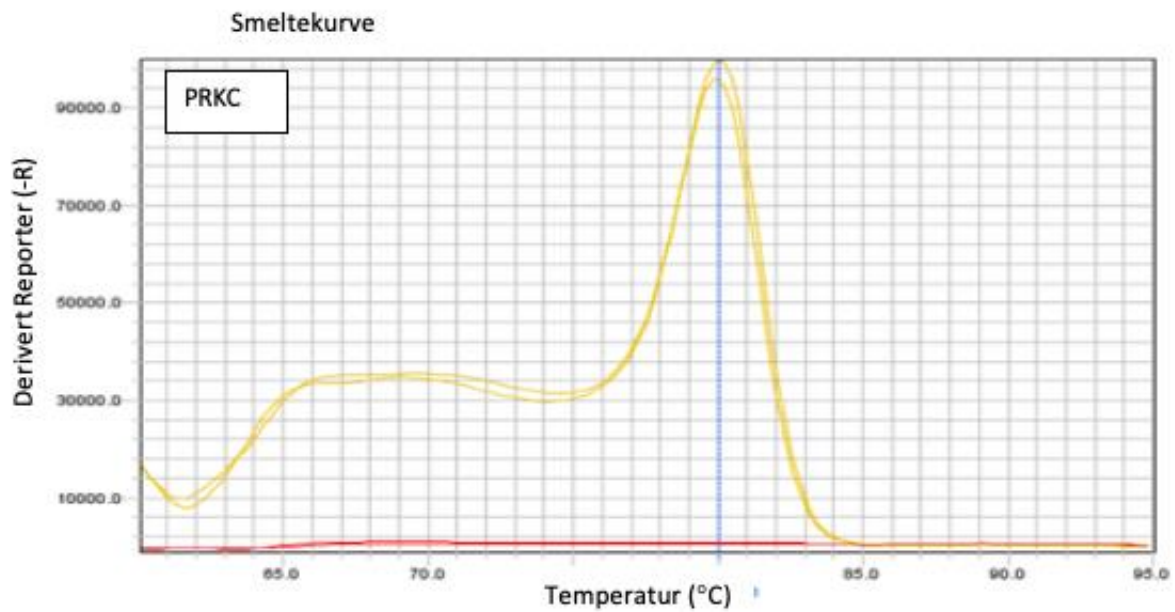
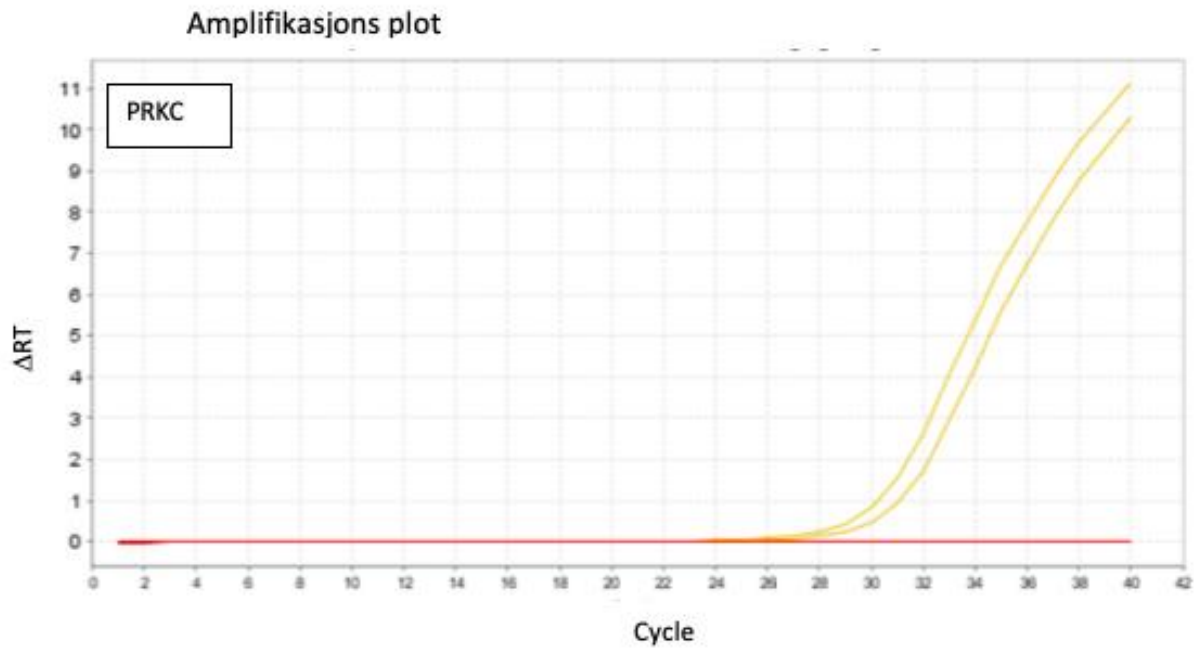
Figur 7.3 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *HNF1A*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet HNF1A _F og HNF1A _R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 59 °C ble benyttet i PCR reaksjonen



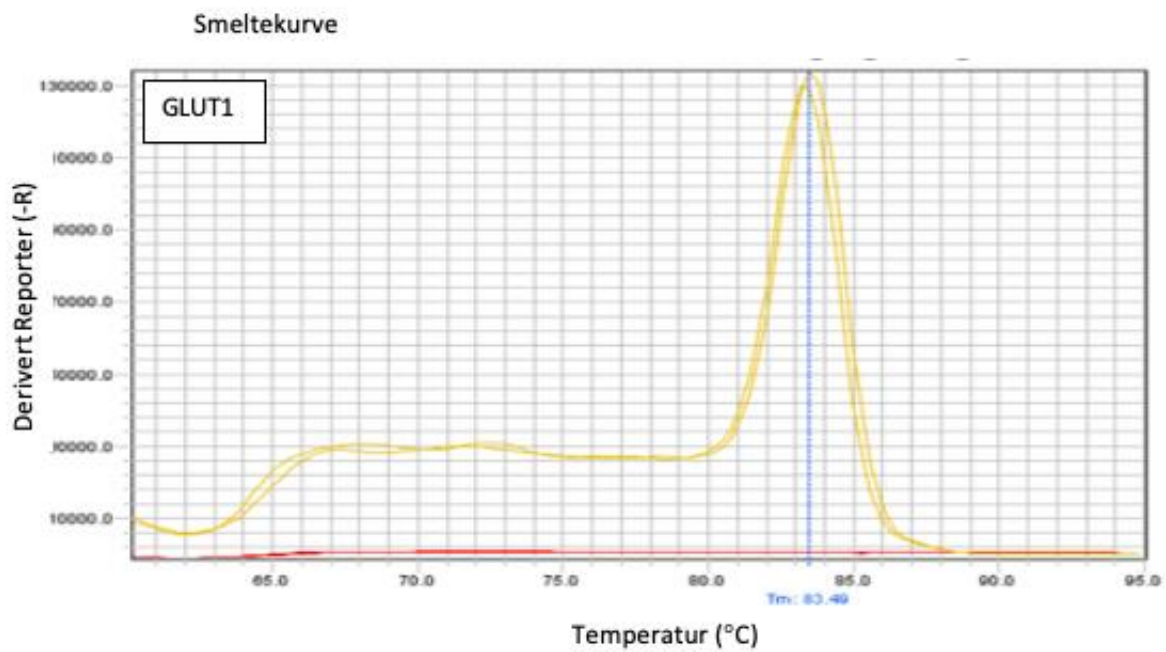
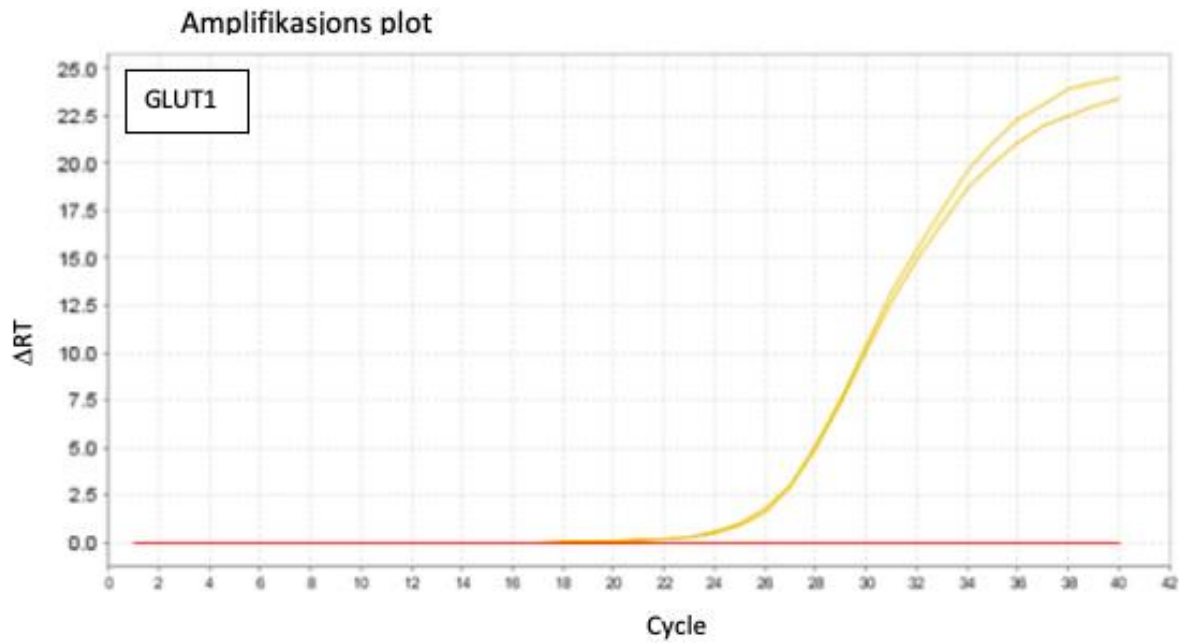
Figur 7.4 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *HNF4A*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet HNF4A_F og HNF4A _R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 59 °C ble benyttet i PCR reaksjonen



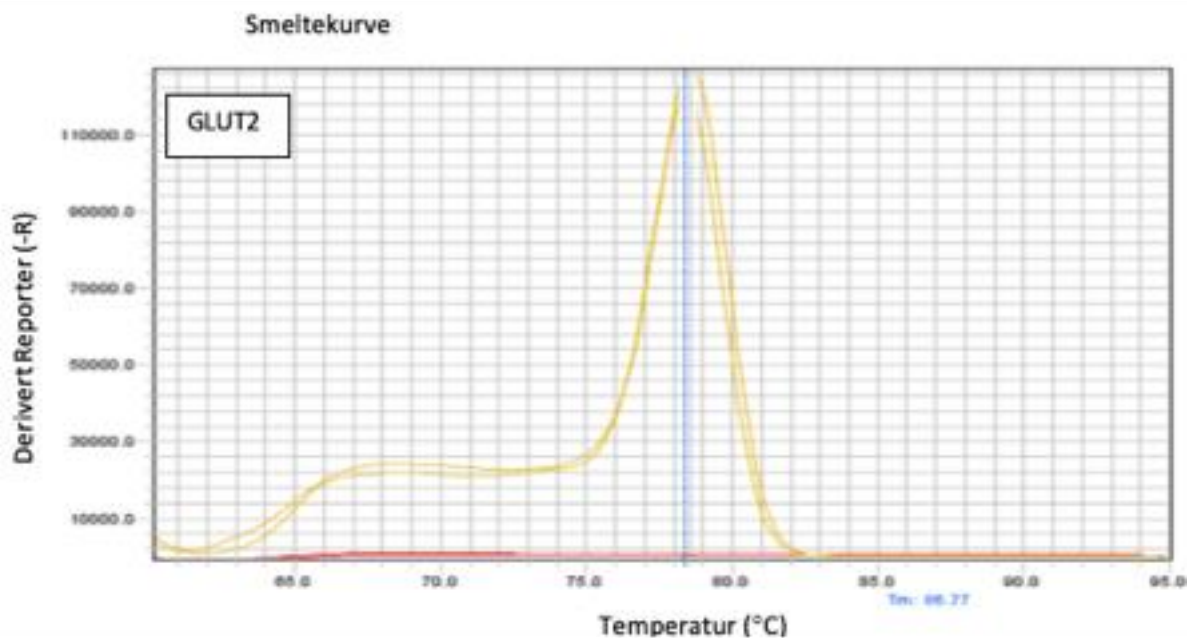
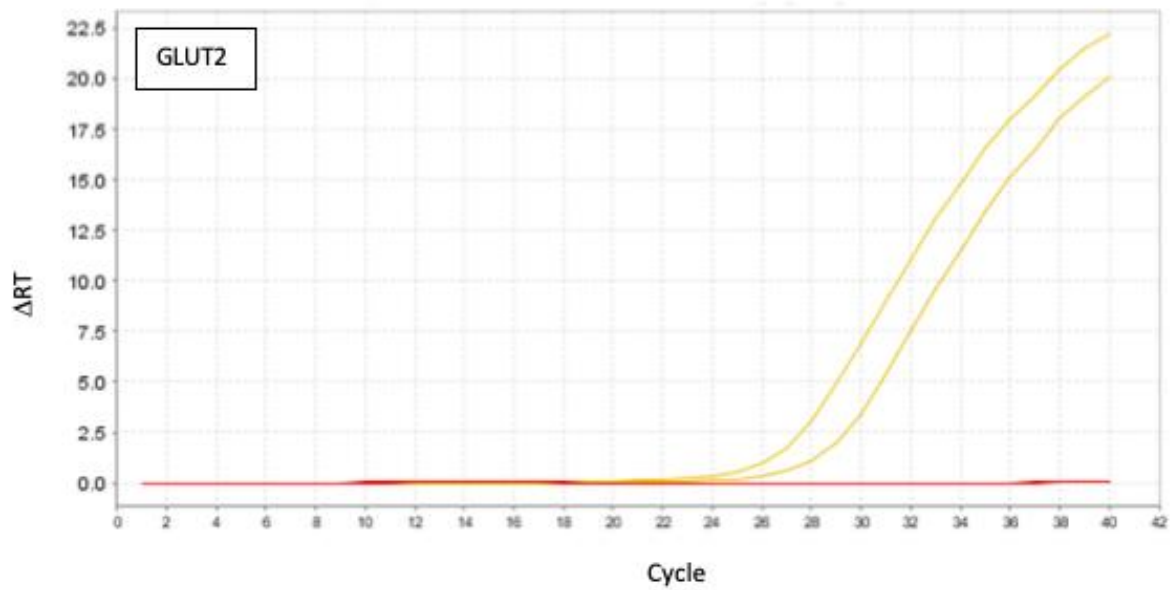
Figur 7.5 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *HNF4A RPL13*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet HNF4A_F og HNF4A_R. 40 ng cDNA og annealing temperatur 61 °C ble benyttet i PCR reaksjonen.



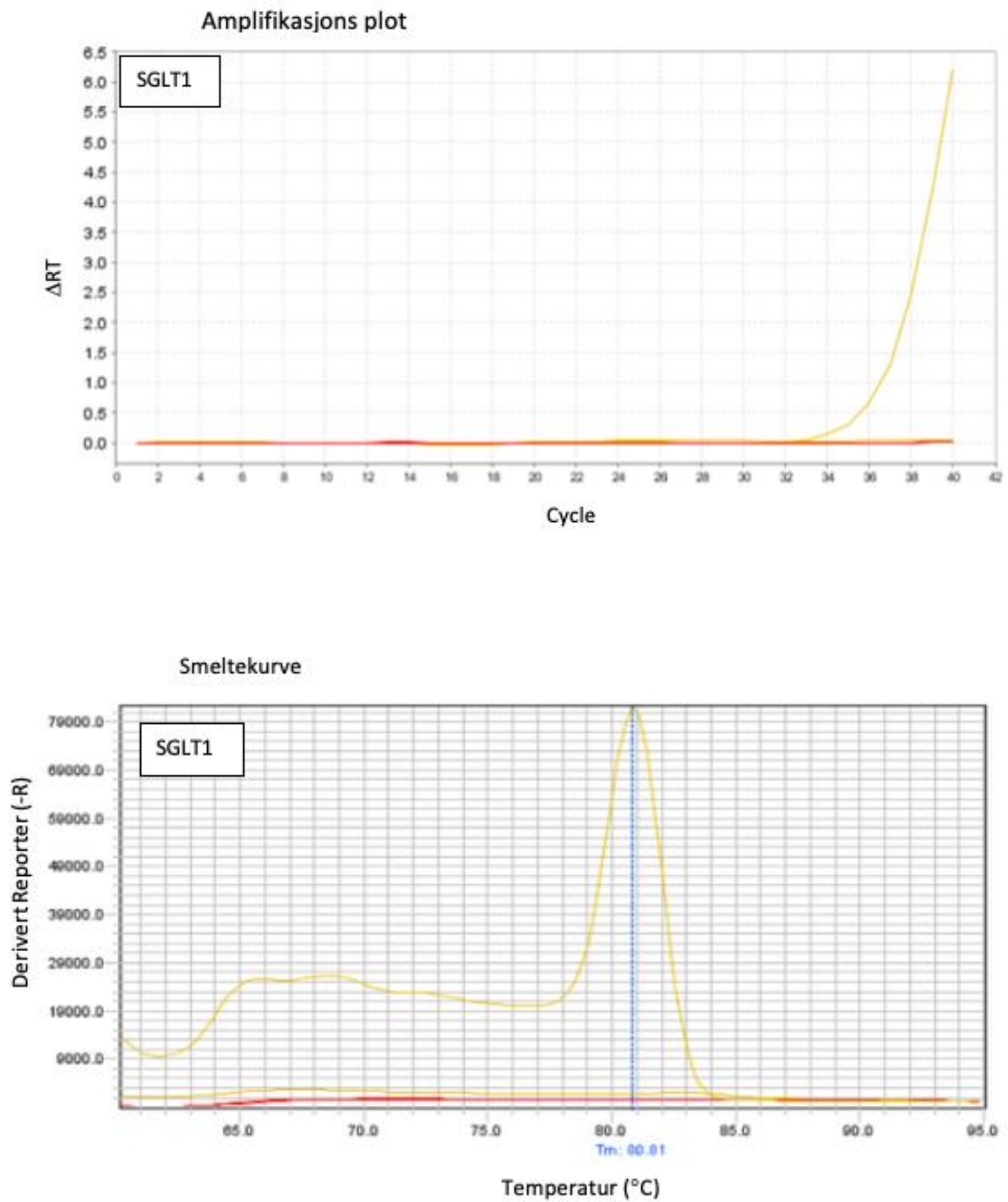
Figur 7.6 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *PRKC*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet PRKC_F og PRKC_R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 61 °C ble benyttet i PCR reaksjonen.



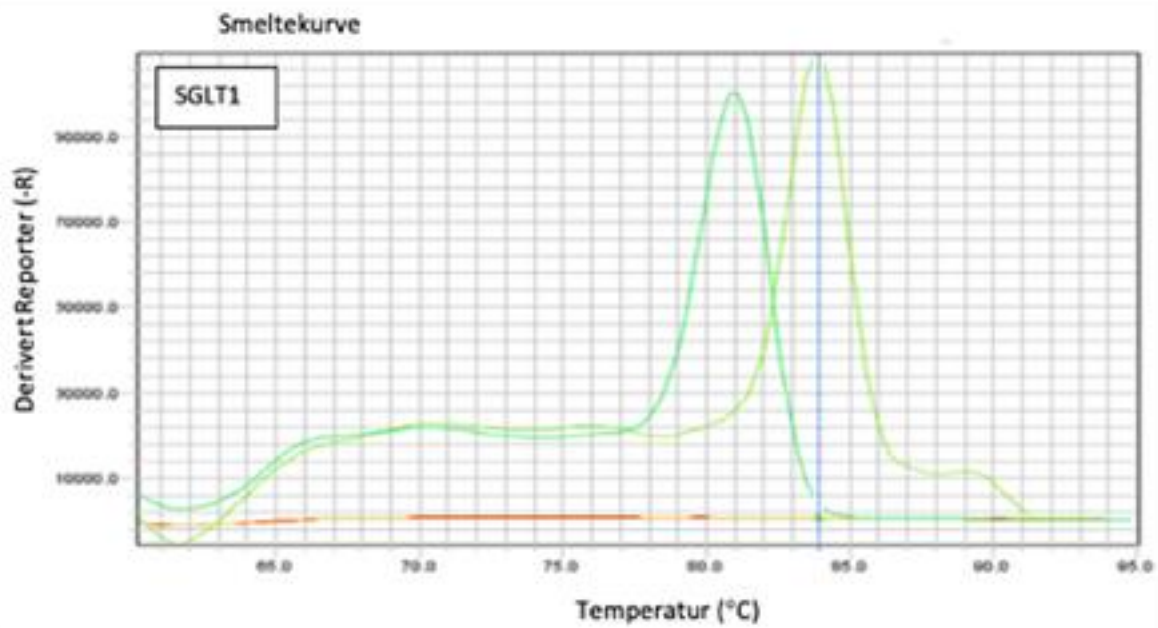
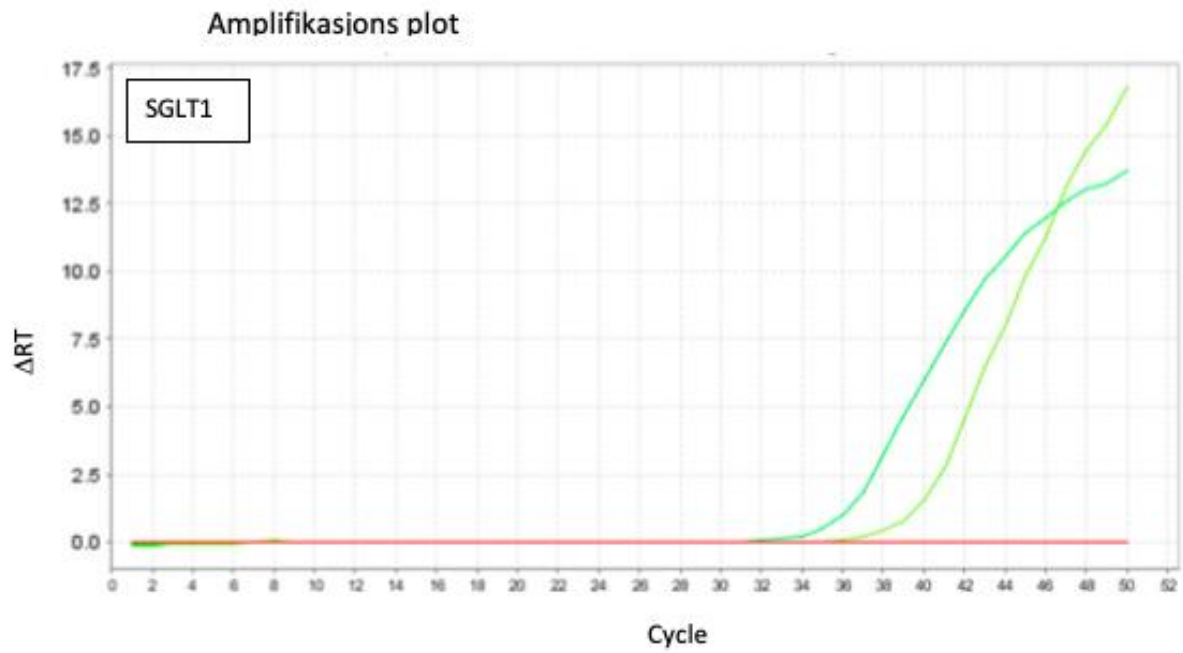
Figur 7.7 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *GLUT1*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet GLUT1_F og GLUT1_R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 58 °C ble benyttet i PCR reaksjonen.



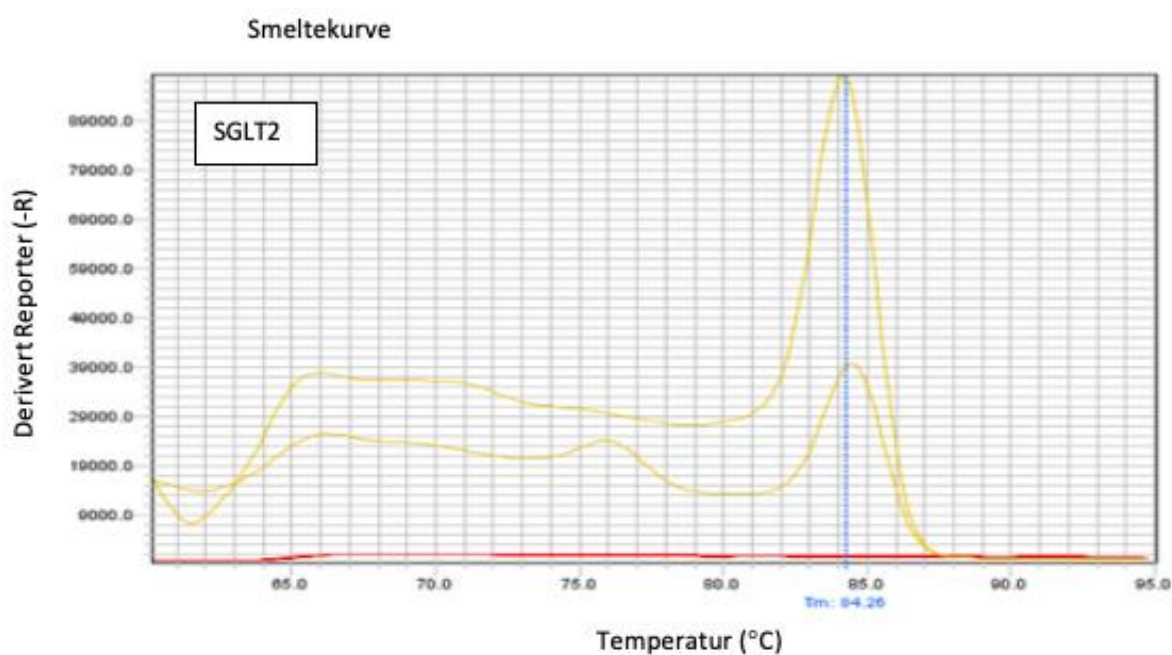
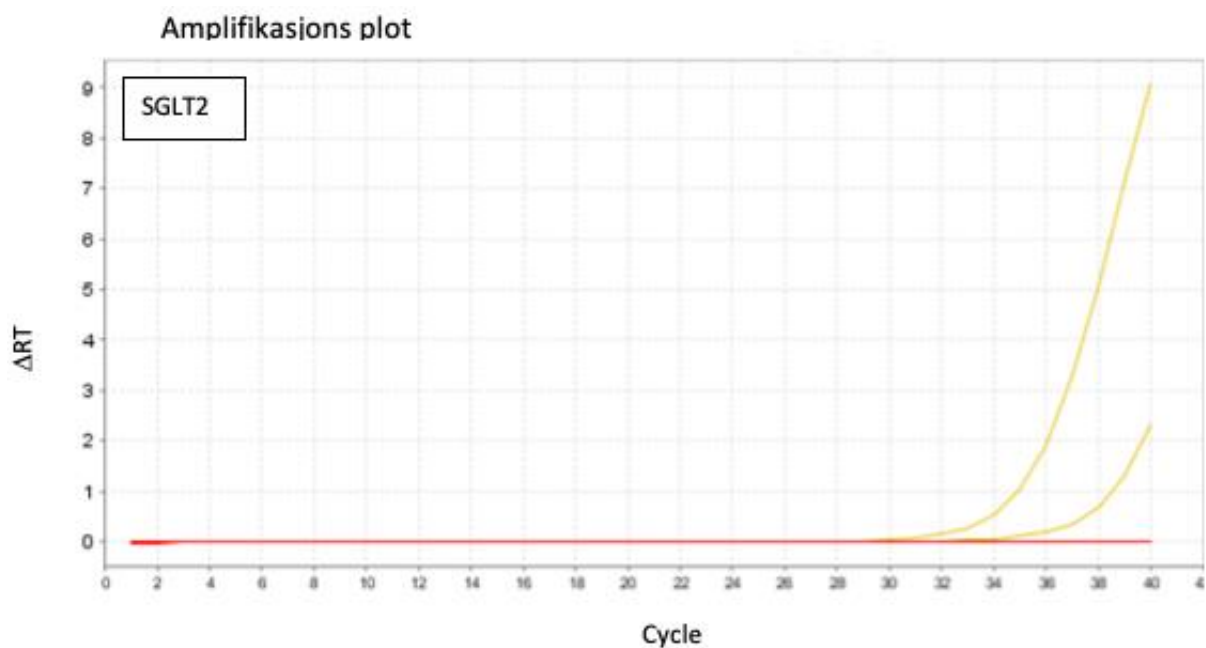
Figur 7.8 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *GLUT2* figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet GLUT2_F og GLUT2_R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 56 °C ble benyttet i PCR reaksjonen.



Figur 7.9 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *SGLT1*. I figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet SGLT1_F og SGLT1_R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 59 °C ble benyttet i PCR reaksjonen

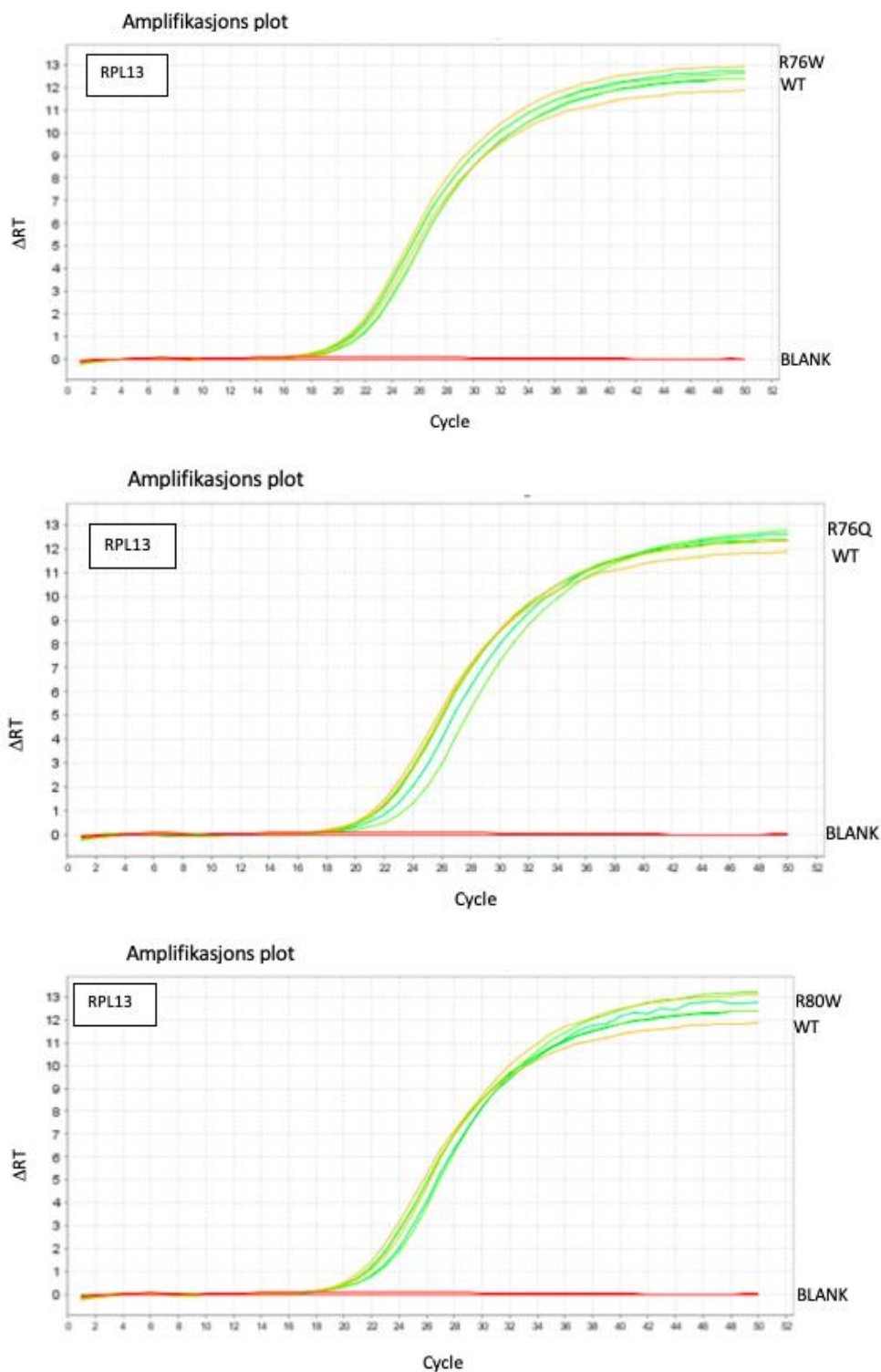


Figur 7.10 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *SGLT1* figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet SGLT1_F og SGLT1_R. 40 ng cDNA og annealing temperatur 61 °C ble benyttet i PCR reaksjonen

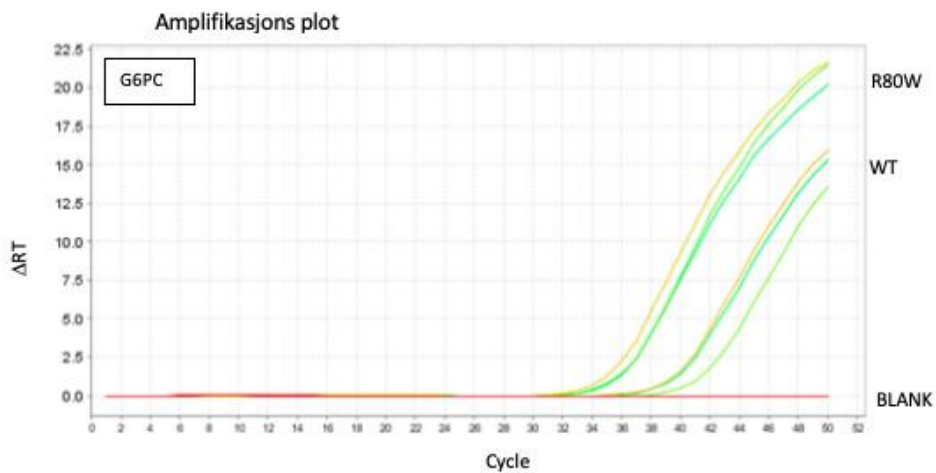
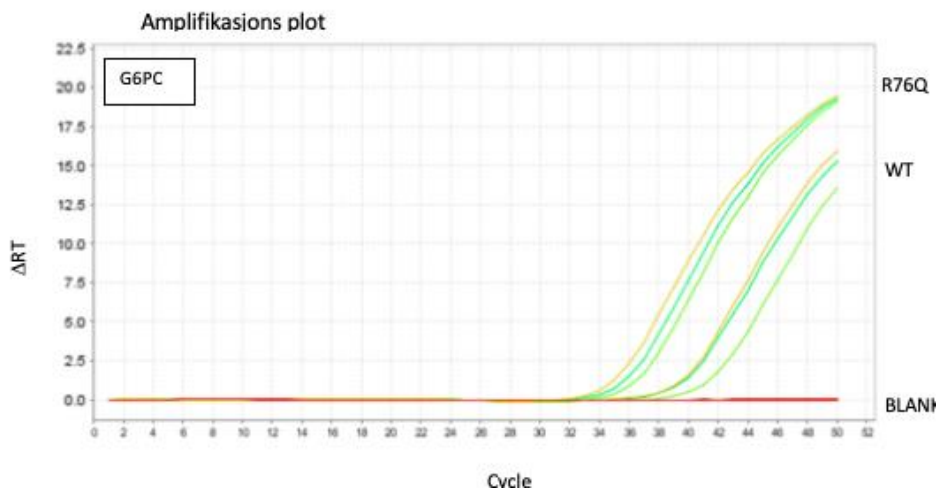
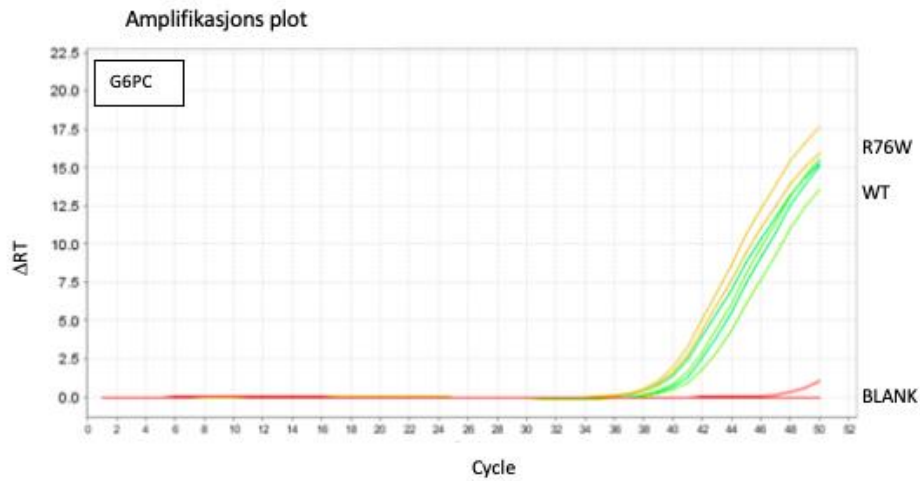


Figur 7.11 Kvantitativ sanntids-PCR og smeltekurveanalyse for amplifikasjon av målgenet *SGLT2* figuren presenteres amplifikasjonskurven og smeltekurve ved bruk av primersettet SGLT2_F og SGLT2_R. 20 ng og 40 ng cDNA og annealing temperatur 62 $^{\circ}C$ ble benyttet i PCR reaksjonen.

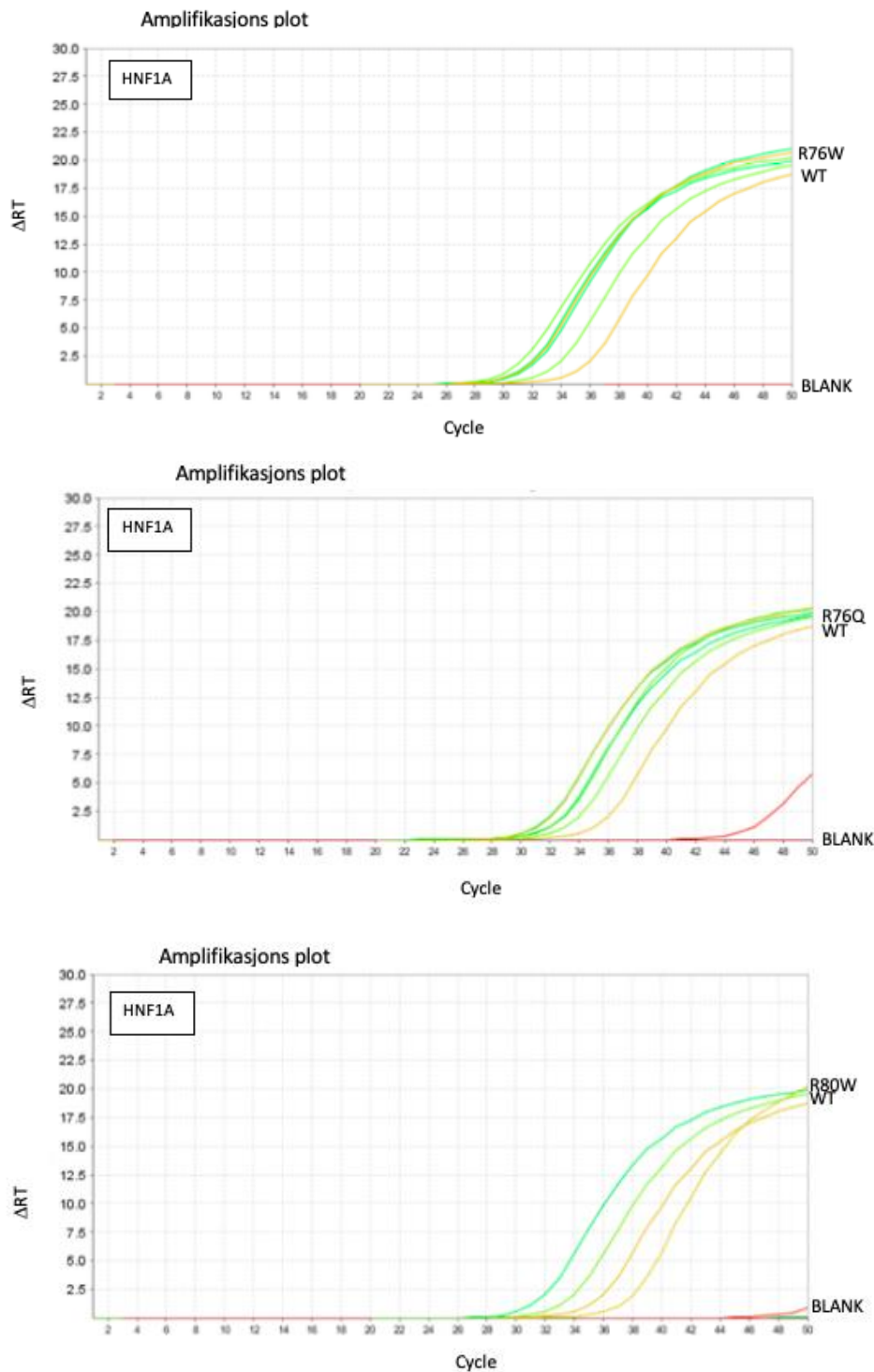
7.2 Amplifikasjonskurvene til de individuelle genene



Figur 7.12 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av referansegnet *RPL13* i *HNF4A* transfekterte HK-2 celler. I cDNA cyntesen ble det brukt 40 ng cDNA, og 50 syklere og annealing temperatur på 62 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var det ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *RPL13* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT HNF-4A transfekterte prøver var 22,5, for R76W transfekterte prøver var 21,9, for R76Q transfekterte prøver var 23,4, og i R80W transfekterte prøver var 23,3.

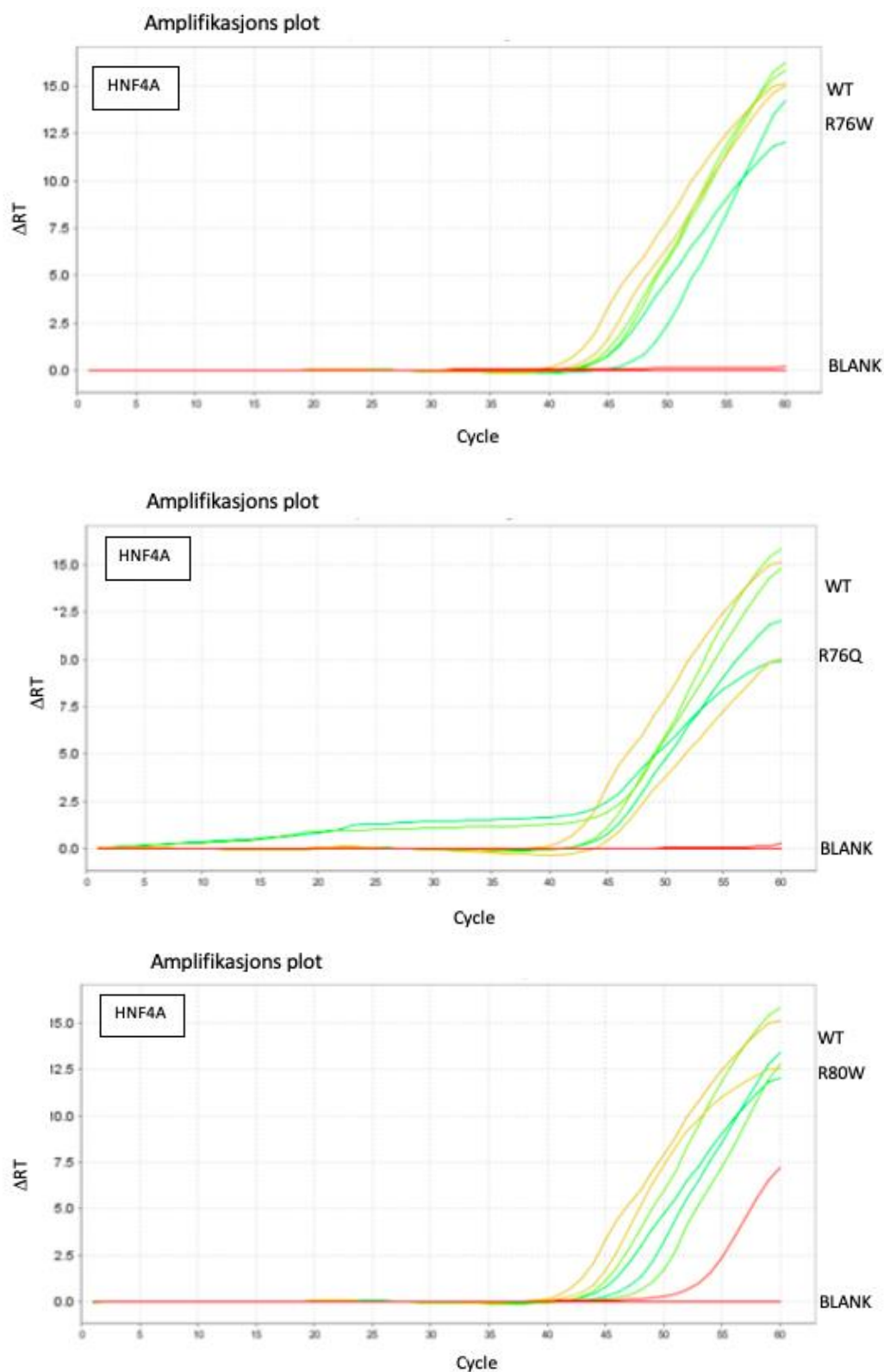


Figur 7.13 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av målgenet *G6PC* i *HNF4A* transfekterte HK-2 celler. I cDNA cyntesen ble det brukt 40 ng cDNA, og 50 syklr og annealing temperatur på 53 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var der ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *G6PC* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT *HNF-4A* transfekterte prøver var 36,8, for R76W transfekterte prøver var 37,3, for R76Q transfekterte prøver var 32,1, og i R80W transfekterte prøver var 32,1.

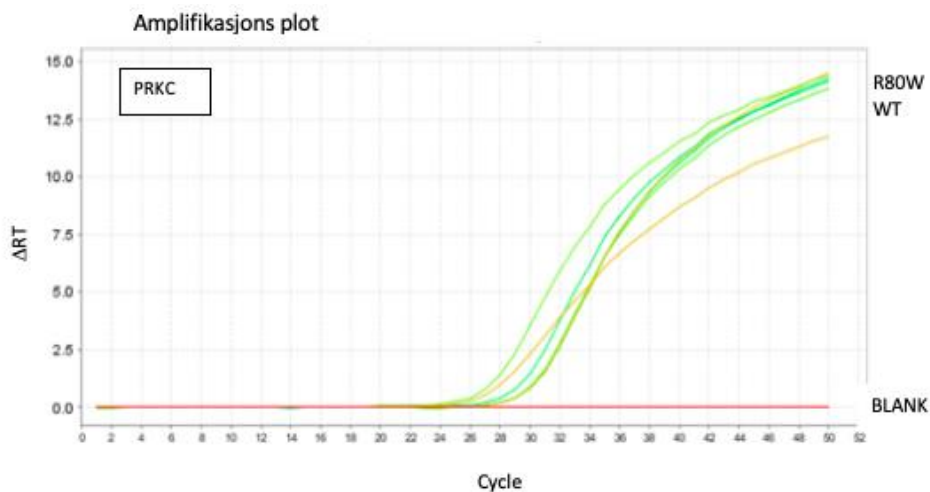
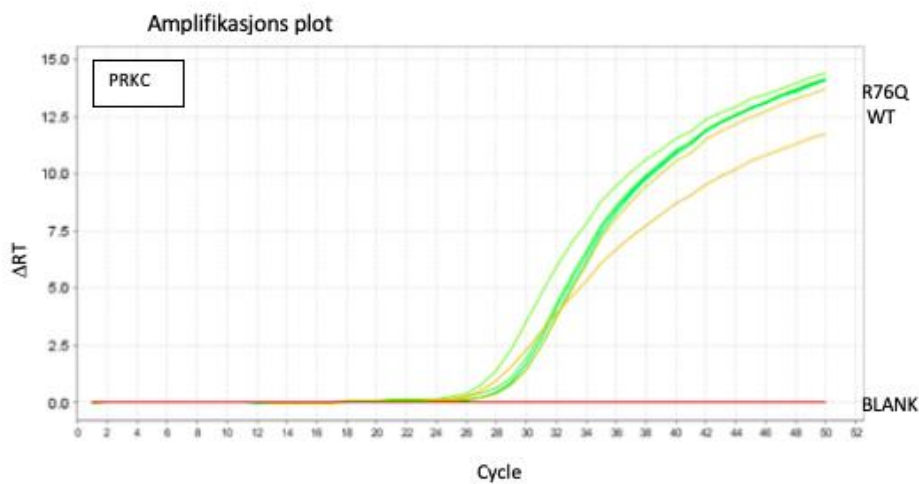
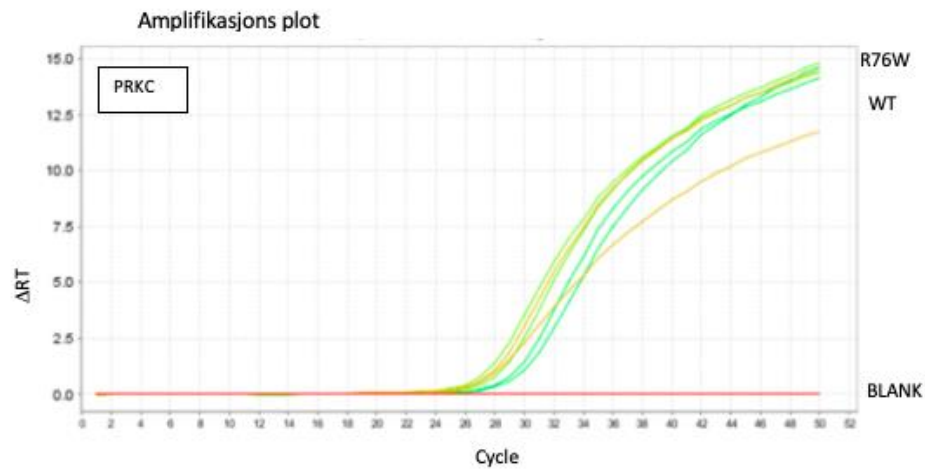


Figur 7.14 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av målgenet *HNF1A* i *HNF4A* transferte HK-2 celler.

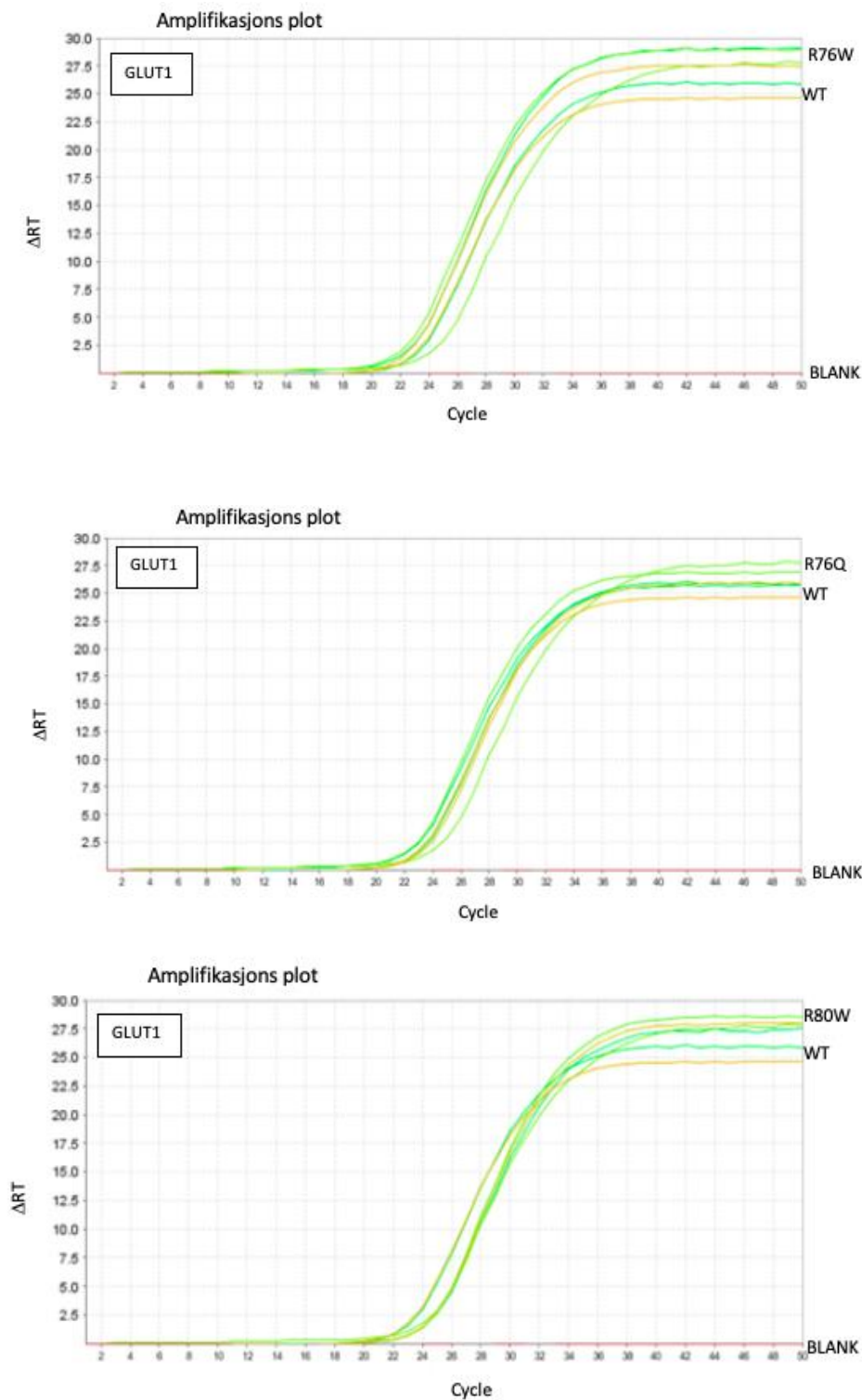
I cDNA cytesen ble det brukt 40 ng cDNA, og 50 syklene og annealing temperatur på 61 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var det ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *HNF1A* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT HNF-4A transferte prøver var 30,2, for R76W transferte prøver var 28,2, for R76Q transferte prøver var 28,9, og i R80W transferte prøver var 34,2 (er basert kun på en parallell, de to andre parallellene var ubestemt).



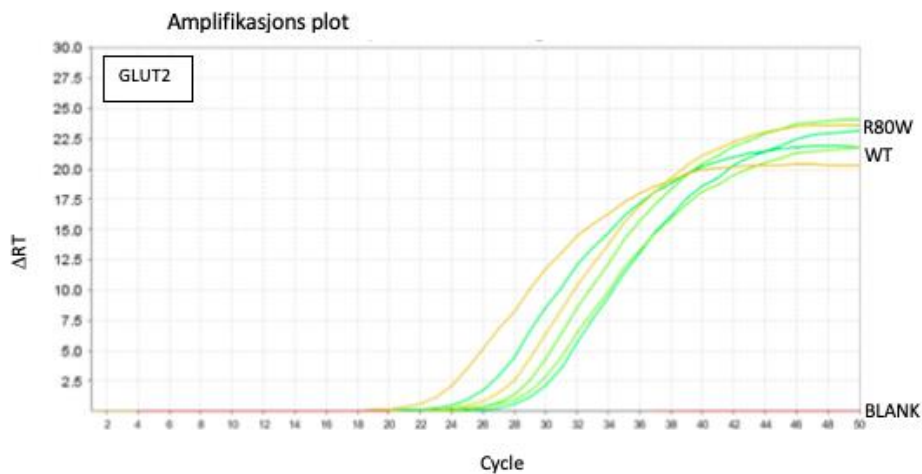
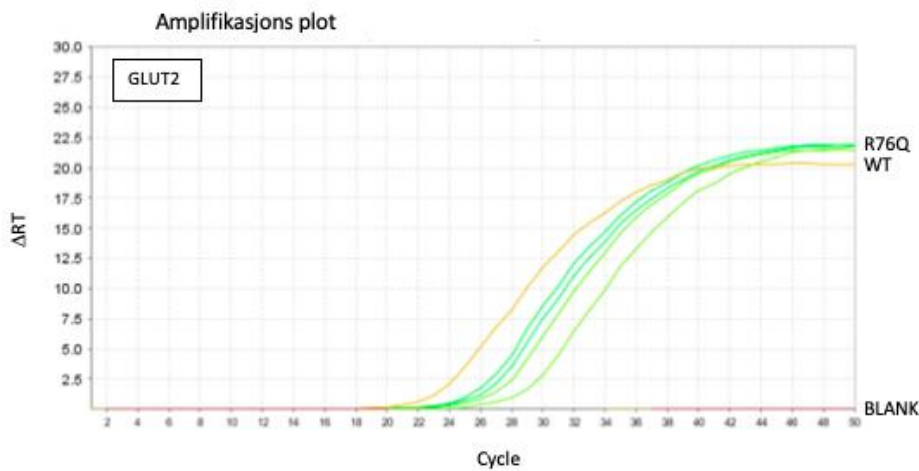
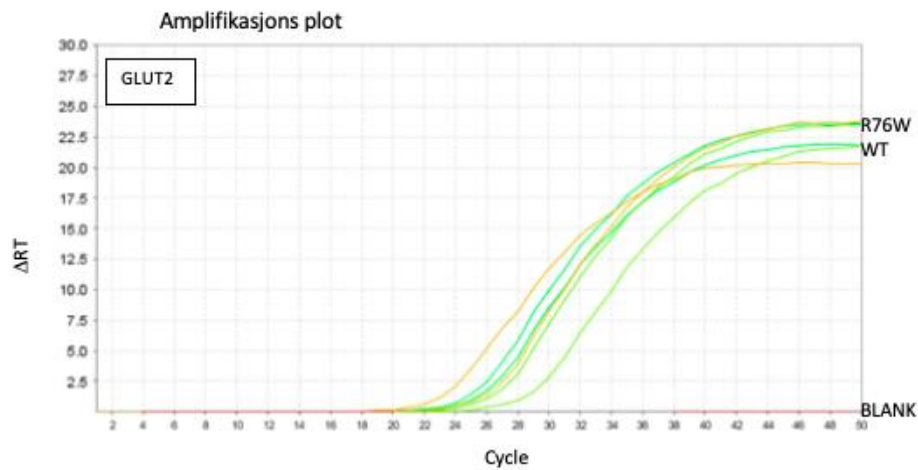
Figur 7.15 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av målgenet *HNF4A* i *HNF4A* transferte HK-2 celler. I cDNA cytesen ble det brukt 60 ng cDNA, og 60 syklene og annealing temperatur på 57 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var det ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *HNF4A* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT *HNF-4A* transferte prøver var 41,1, for R76W transferte prøver var 43,1 for R76Q transferte prøver var 44,1 (er basert på kun en parallel, de to andre var ubestemt) og i R80W transferte prøver var 42,7.



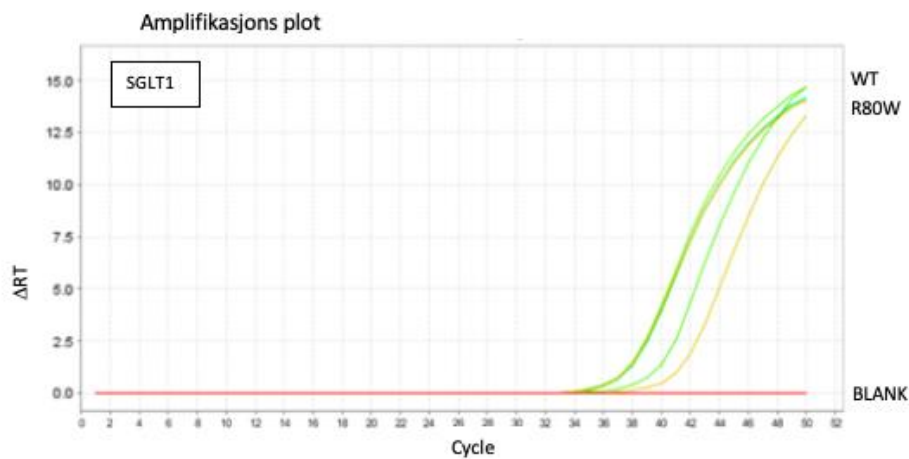
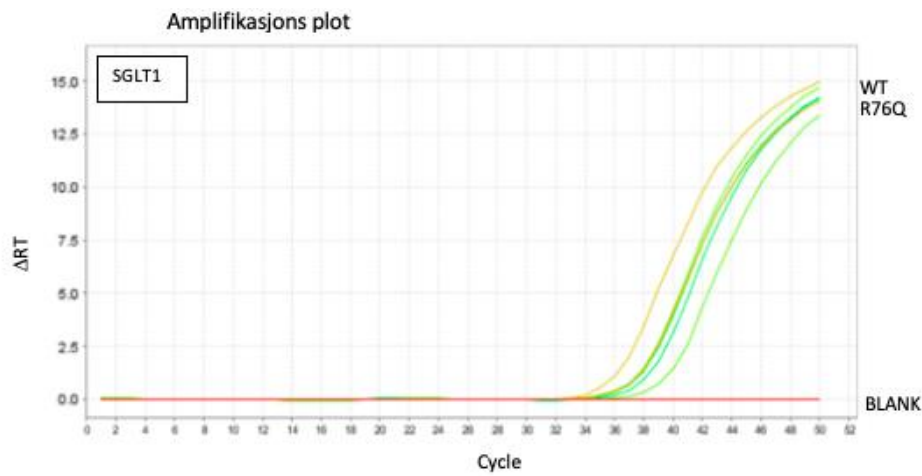
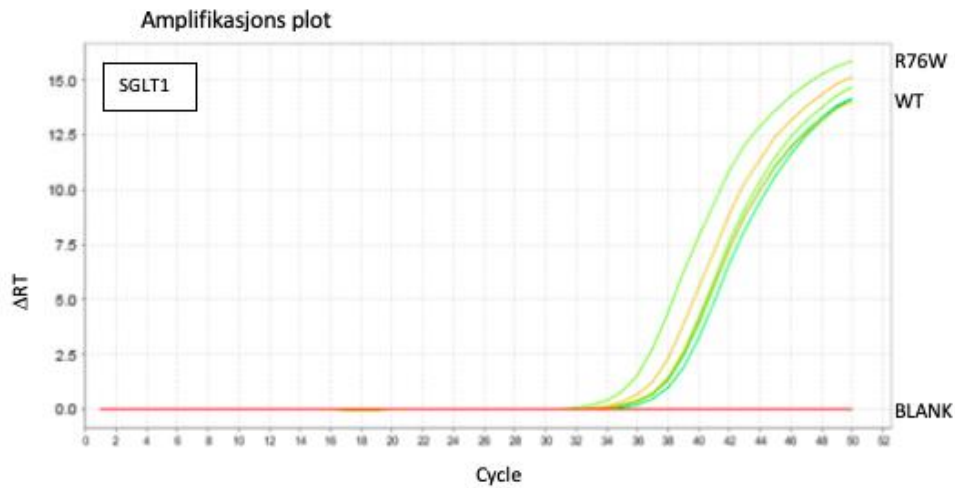
Figur 7.16 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av målgenet *PRKC* i *HNF4A* transferte HK-2 celler. I cDNA cyntesen ble det brukt 60 ng cDNA, og 50 syklene og annealing temperatur på 63 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var det ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *PRKC* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT HNF-4A transferte prøver var 29,0, for R76W transferte prøver var 29,3, for R76Q transferte prøver var 29,7 og i R80W transferte prøver var 30,2



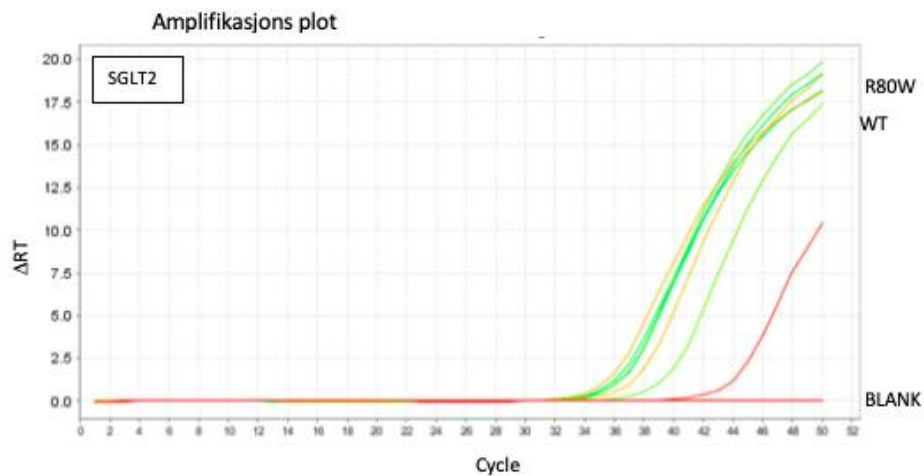
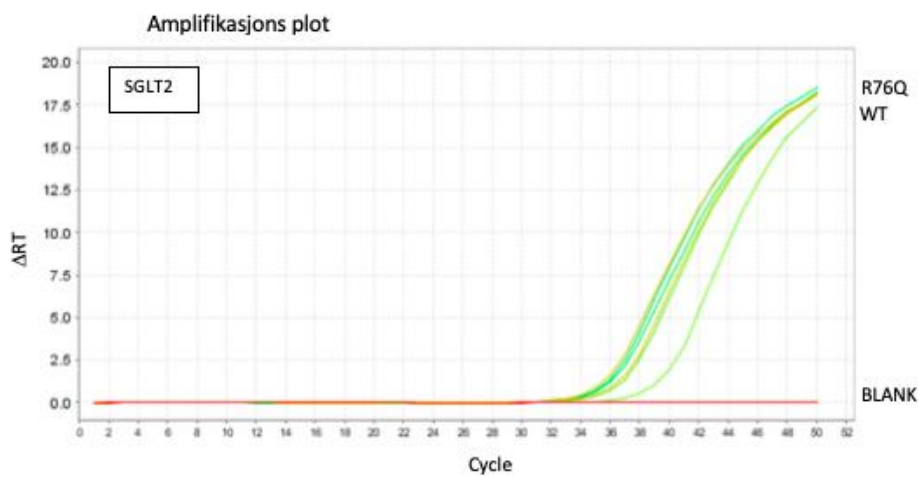
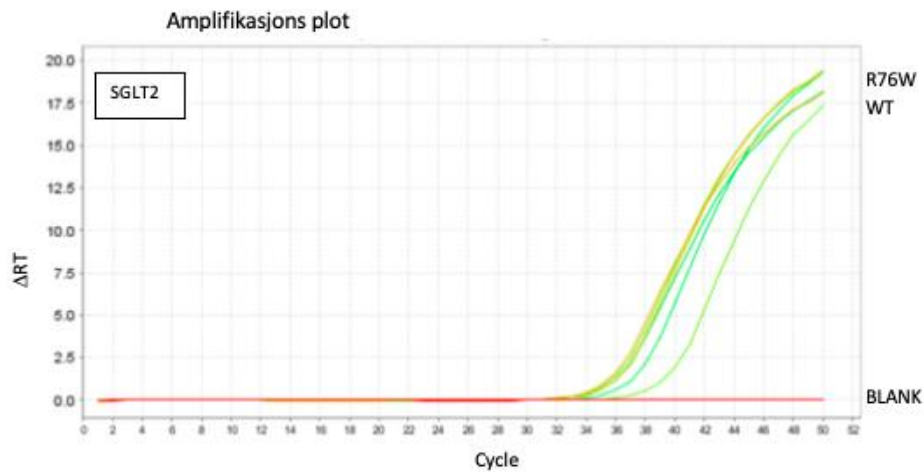
Figur 7.17 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av målgenet *GLUT1* i *HNF4A* transferte *HK-2* celler. I cDNA cytesen ble det brukt 40 ng cDNA, og 50 syklere og annealing temperatur på 58 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var det ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *GLUT1* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT HNF-4A transferte prøver var 24,4, for R76W transferte prøver var 23,2, for R76Q transferte prøver var 23,7, og i R80W transferte prøver var 25,3



Figur 7.18 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av målgenet *GLUT2* i *HNF4A* transfekterte HK-2 celler. I cDNA cytesen ble det brukt 40 ng cDNA, og 50 syklene og annealing temperatur på 58 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var det ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *GLUT2* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT HNF-4A transfekterte prøver var 26,6 for R76W transfekterte prøver var 26,5 for R76Q transfekterte prøver var 27,3 (gjennomsnitt av to paralleller, en parallell var ubestemt), og i R80W transfekterte prøver var 28,7.



Figur 7.19 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av målgenet *SGLT1* i *HNF4A* transfekterte HK-2 celler. I cDNA cytesen ble det brukt 60 ng cDNA, og 50 syklene og annealing temperatur på 61 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var det ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *SGLT1* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT HNF-4A transfekterte prøver var 33,5, for R76W transfekterte prøver var 32,9 for R76Q transfekterte prøver var 34,6, og i R80W transfekterte prøver var 35,9 (gjennomsnitt av to paralleller, en var ubestemt)



Figur 7.20 Kvantitativ sanntids-PCR og amplifikasjon av målgenet *SGLT2* i *HNF4A* transfekterte HK-2 celler. I cDNA cytesen ble det brukt 40 ng cDNA, og 50 syklene og annealing temperatur på 58 °C i PCR reaksjonen. For alle oppsettene var det ingen amplifikasjon av produkt i den negative kontrollen (blank prøve representerer rød linje). Ct for *SGLT2* for de tre parallelle prøvene i henholdsvis WT HNF-4A transfekterte prøver var 30,2, for R76W transfekterte prøver var 30,1, for R76Q transfekterte prøver var 30,5, og i R80W transfekterte prøver var 30,9.

7.3 Materiale

Tabell IIIa Celle linje

Celle linje	Derivert fra	Leverandør
HK-2	Human kidney, cortex/proximal tubule cells	ATCC® CRL-2190™, Manassas, VA, USA

Tabell IIIb Celle kultur media og reagenser

Produkt	Leverandør
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco
Penicillin-Streptomycin (PEST)	
Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM)	Gibco
Bovine pituitary extract (BPE)	Gibco
Human recombinant epidermal growth factor (EGF)	Gibco
Dimethylsulfoxide, anhydrous (DMSO)	Invitrogen
Opti-MEM® Reduced Serum Medium 1X	Gibco
Lipofectamine® 2000 Reagent	Invitrogen
Triton™ X-100 solution	Sigma
Tween 20	Bio-rad
Formaldehyd 16%	Thermo scientific

Tabell IIIc Plasmid constructs

Plasmid	Leverandør
WT HNF4A-FLAG I pcDNA(3.1)*	Invitrogen
EV HNF4A-FLAG I pcDNA(3.1)*	
R76W HNF4A-FLAG I pcDNA(3.1)*	
R76Q HNF4A-FLAG I pcDNA(3.1)*	
R80W HNF4A-FLAG I pcDNA(3.1)*	
pMAX GFP-FLAG I pcDNA(3.1)*	

pGL3-HNF1A Firefly luciferase reporter vector	Promega
pRL-SV40 Renilla Luciferase control reporter vector	Promega
pGL3-mG6Pase Firefly Luciferase reporter vector*	Promega

*Subklonet av en annen forskergruppe

Tabell III d Agarose gel reagenser

Agarose	Fisher Scientific
Electrophoresis Buffer 50x TAE	Thermo scientific
100 bp DNA ladder	TaKaRa
Ethidium bromide solution 10mg/ml	BDH Electran®
Loadingbuffer 6X	TaKaRa

Tabell III e Bakterie

Produkter	Leverandør
Lysogeny Broth (LB) tablets	Sigma
Kanamycin og Ampicilin	

Tabell III f Kommersielle kits

Produkt	Hensikt	Leverandør
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Transaktiverings assay	Promega
HiSpeed® Plasmid Midi Kit	Rense plasmider	Qiagen
PureLink™ RNA Mini Kit	Rense RNA	Invitrogen
Universal Mycoplasma Detection Kit	Teste for Mycoplasma	ATCC
qScript™ cDNA Synthesis Kit	Syntetisere cDNA	Quantabio
PerfeCT® SYBR® Green FastMix® ROX	Real time q-PCR	Quantabio

Tabell IIIg Kjemikalier og reagenser

Produkt	Leverandør
Phosphate-Buffered Saline tablets (PBS)	Gibco
Trypan Blue Stain (0.4 %)	gibco® by Life Technologies
Etanol	
2-Mercaptoethanol 99 %, extra pure	Acros organics
Nuclease-Free Water	Ambion

Tabell IIIh Analytiske instrumenter

Instrument	Hensikt	Leverandør
ChemiDoc™XRS+		Bio-Rad
NanoVue Plus™ Spektrofotometer	Måle DNA og RNA	Biochrom
StepOnePlus Real-Time PCR system	Detektere mengde mRNA	Applied Biosystems
Fluorescensmikroskop NIKON Eclipse CInter	Visualisere GFP uttrykk	NIKON
GeneAmp®PCR System 9700	Syntetisering av cDNA	Applied Biosystems
LB 960 Microplate Luminometer Centro	Måle transaktiverings aktivitet	Promega
TC20™ Automated Cell Counter	Celletelling	Bio-Rad

Tabell IIIi Analytisk software

Software	Leverandør
Image Lab™ software	Bio-Rad
Ice software	
NIS-elements BR 4.20	InterInstrument
StepOne™Software	Thermo Fisher Scientific
Excel	Microsoft