



Høgskulen på Vestlandet

BIO160 Bacheloroppgave og Plakat Gruppe A - Bioingeniør

BIO160

Predefinert informasjon

Startdato:	26-05-2021 12:12	Termin:	2021 VÅR
Sluttdato:	28-05-2021 14:00	Vurderingsform:	Bestått/ikke bestått
Eksamensform:	Bacheloroppgave (skriftlig i gruppe)		
Flowkode:	203 BIO160 1 O 2021 VÅR		
Intern sensor:	Lise Bjørkhaug Gundersen		

Deltaker

Naun:	Emilie Hodneland
Kandidatnr.:	219
HVL-id:	572236@hvl.no

Informasjon fra deltaker

Antall ord *:	11696
----------------------	-------

Egenerklæring *: Ja

Inneholder besvarelsen Nei
konfidensielt
materiale?:

Jeg bekrefter at jeg har Ja
registrert
oppgavetittelen på
norsk og engelsk i
StudentWeb og vet at
denne vil stå på
vitnemålet mitt *:

Gruppe

Gruppenavn: A8
Gruppenummer: 2
Andre medlemmer i gruppen: Marte Haugland Jensen

Jeg godkjenner avtalen om publisering av bacheloroppgaven min *

Ja

Er bacheloroppgaven skrevet som del av et større forskningsprosjekt ved HVL? *

Nei

Er bacheloroppgaven skrevet ved bedrift/virksomhet i næringsliv eller offentlig sektor? *

Nei



Høgskulen
på Vestlandet

BACHELOROPPGAVE

Funksjonelle analyser av *HNF4A* varianter

Functional analysis of *HNF4A* variants

Marte Haugland Jensen & Emilie Hodneland

Bachelor i bioingeniørfag

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap

Institutt for sikkerheit, kjemi- og bioingeniørfag

Veiledere: Lise Bjørkhaug Gundersen og Alba Kaci

Dato: 27. mai 2021

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle

kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

Sammendrag

Introduksjon: Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) er en sjelden form for monogen diabetes karakterisert av β -celledysfunksjon og debut før fylte 25 år. Patogene varianter i genet *HNF4A* er assosiert med MODY1, diabetes type 2, og i sjeldne tilfeller Fanconi syndrom. I dette studiet ble det sett på om fem ulike varianter i HNF-4A (p.(R76W), p.(R76Q), p.(S78N), p.(R80W) og p.(R127W)) fører til en endring i i) den subcellulære lokaliseringen av HNF-4A (hovedfokus på kjerne), og/eller ii) evnen til å binde seg til et relevant DNA-bindingssete (i *HNF1A* promotor).

Metode: HeLa celler ble transient transfektert med EV, WT og *HNF4A* variant plasmider, før det ble utført en subcellulær fraksjonering. SDS-PAGE og immunoblotting ble benyttet for analyse av HNF-4A tilstedeværelse i kjerne (versus cytosolfraksjon). EMSA ble utført for å undersøke effekten av *HNF4A* varianter på HNF-4A proteinets bindingsevne til en kjent bindingssekvens i *HNF1A* promotor.

Resultater og konklusjon: Variantene assosiert med MODY1 (p.(S78N), p.(R80W)) og MODY1 + Fanconi syndrom p.(R76W)) viser størst reduksjon i DNA-bindingsevne, og kjernelokalisering av p.(R80W) er signifikant redusert i forhold til WT HNF-4A. For å kunne konkludere sikkert med at dette er molekylær årsak til pasienters sykdomsbilde, hadde det vært nyttig med flere biologiske variabler (transfeksjoner/fraksjoner) for sikrere datagrunnlag.

Nøkkelord: MODY, Hepatocyte nuclear factor-4 alpha, funksjonelle proteinanalyser, subcellulær lokalisering, DNA-binding.

Abstract

Introduction: Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) is a rare form for monogenic diabetes, characterized by β -celldysfunction presenting before the age of 25. Pathogenic variants in the *HNF4A* gene are associated with MODY1, diabetes type 2, and in rare cases Fanconi syndrome. In this study we examined whether five different HNF-4A variants (p.(R76W), p.(R76Q), p.(S78N), p.(R80W) and p.(R127W)) lead to changes i) the subcellular localization of HNF-4A (with focus on the nucleus), and/or ii) the ability to bind to a relevant DNA-binding site (in *HNF1A* promotor).

Method: HeLa cells were transiently transfected with EV, WT and *HNF4A* variant plasmids, before subcellular fractionation of cells was performed. The presence of HNF-4A in the nucleus (versus cytosol) was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. EMSA was performed to examine the effect of *HNF4A* variants on DNA-binding ability.

Results and conclusion: The variants associated with MODY1 (p.(S78N) and p.(R80W)) and MODY1 + Fanconi syndrome (p.(R76W)) exhibited the strongest reducing effect on DNA-binding, albeit not significant. Moreover, only p.(R80W) displayed significantly reduced levels of HNF-4A in the nucleus compared to WT HNF-4A. Additional biological variables (transfection/fractionations) would be useful in the future in order to conclude with certainty regarding functional and phenotype associated effects.

Keywords: MODY, Hepatocyte nuclear factor-4 alpha, functional studies, subcellular localization, DNA-binding ability.

Forord

Denne oppgaven er et internt bachelorprosjekt som er en del av en 3.årig bachelorutdanning innen bioingeniørfag. Prosjektet ble hovedsakelig utført ved laboratorium for forskning og utvikling (FoU) ved Høgskulen på Vestlandet (campus Bergen) i perioden mars-mai 2021. Deler av prosjektet ble utført ved Senter for Diabetesforskning ved Universitetet i Bergen.

Prosjektet har vært veldig kjekt og lærerikt, og vi sitter igjen med mye ny kunnskap og nyttige ferdigheter innen laboratoriearbeid.

Vi vil takke vår interne veileder Lise Bjørkhaug Gundersen og eksterne veileder Alba Kaci for god veiledning i forbindelse med gjennomføring av prosjekt, samt skriving av oppgaven. En ekstra stor takk til Lise som har stilt opp hele veien, og som vi har hatt tett dialog med i løpet av hele prosjektet.

Takk til Anne Grete Eriksen, og de andre lærerne som har vært innom laboratoriet, for nyttige bidrag/innspill i forbindelse med prosjektet, samt hjelp til å finne frem til nødvendig utstyr/instrumenter på FoU-laboratoriet.

Også takk til Senter for Diabetesforskning på HUS for at vi fikk utføre EMSA i de flotte lokalene deres. Vi følte oss veldig velkommen, og godt ivaretatt.

Til slutt vil vi takke Turid Aarhus Braseth for god prosessveiledning.

Høgskulen på Vestlandet, 27.mai 2021.

Marte H. Jensen

Marte Haugland Jensen

Emilie Hodneland

Emilie Hodneland

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
Abstract	3
Forord	4
1. Introduksjon.....	7
1.1 Diabetes mellitus	7
1.1.1 Hva er diabetes mellitus?	7
1.1.2 Diabetes mellitus type 1	7
1.1.3 Diabetes mellitus type 2	8
1.1.4 Andre former for diabetes mellitus	8
1.2 Maturity-onset diabetes of the young (MODY).....	9
1.3 HNF-4A.....	10
1.3.1 <i>HNF4A</i> -genet	10
1.3.2 HNF-4A (funksjon og oppbygning).....	10
1.3.3 <i>HNF4A</i> genvarianter og assosierte fenotyper.....	11
1.4 Formål og problemstilling.....	12
2 Materiale.....	13
2.1 Plasmider.....	13
2.2 Celledyrkning	13
2.3 Agarose gel.....	13
2.4 SDS-PAGE og immunoblotting	14
2.5 EMSA.....	14
2.6 Buffere og kjemikalier	15
2.7 Instrumenter og software.....	16
3 Metode.....	17
3.1 Bestemmelse av plasmidutbytte og kvalitet	17
3.2 Dyrking av HeLa-celler.....	17
3.2.1 Celledyrking	17
3.2.2 Splitting og subkultivering av celler	17
3.3 Celletransfeksjon	18
3.4 Fraksjonering av celler	18
3.4.1 Oppsamling av transfekterte celler.....	18
3.4.2 Fraksjonering.....	18
3.5 Proteinkonsentrasjon måling ved Bradford Assay	19
3.6 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelektroforese (SDS-PAGE)	20

3.7 Immunoblotting	20
3.7.1 Fremkalling	20
3.7.2 Stripping av membran	21
3.7.3 Statistiske analyser	21
3.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	21
3.8.1 Hybridisering av <i>HNF1A</i> oligos	21
3.8.2 EMSA	22
3.8.3 Statistiske analyser	23
4 Resultat	24
4.1 Konsentrasjon og kvalitet av <i>HNF4A</i> variant plasmid	24
4.2 Analyse av nivå HNF-4A varianter i cellefraksjoner	25
4.3 Analyse av DNA-bindingsevne til HNF-4A varianter ved EMSA	28
4.3.1 Bekreftelse av HNF-4A i DNA-bindingskompleks ved EMSA	29
4.3.2 Effekt av HNF-4A varianter på WT for DNA-binding ved EMSA	30
5 Diskusjon	31
5.1 Preanalyse (konsentrasjon og kvalitet) av <i>HNF4A</i> variant plasmider	31
5.2 Subcellulær lokalisering av HNF-4A varianter	32
5.3 Analyse av HNF-4A varianters DNA-bindingsevne ved EMSA	34
6 Konklusjon	36
7 Definisjoner og forkortelser	37
8 Litteraturliste	39

1. Introduksjon

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Hva er diabetes mellitus?

Diabetes mellitus er en metabolsk sykdom som karakteriseres av hyperglykemi (høyt glukosenivå i blodet). Hyperglykemi skyldes som oftest en defekt i sekresjonen av insulin, redusert insulinfunksjon, eller en kombinasjon av begge (Association, 2014; World Health Organization, 2021). Symptomer på hyperglykemi inkluderer blant annet polyuri (økt urinproduksjon), vekttap og tåkesyn. Retinopati, nefropati, amputasjoner og kardiovaskulær sykdom er noen av de alvorlige komplikasjonene som kan oppstå som følge av dårlig kontrollert diabetes (Association, 2014). Redusert sekresjon av insulin eller redusert insulinfunksjon fører til at transporten av glukose inn i cellene reduseres, slik at kroppens celler ikke får dratt nytte av sukkeret. De siste tiårene har forekomsten av diabetes økt kraftig, særlig i lav- og mellominntektsland, og i verden er det rundt 422 millioner mennesker som lever med en form for diabetes. Det er videre estimert at rundt 1.5 millioner dødsfall i 2019 var direkte forårsaket av diabetes (World Health Organization, 2021).

Det er i hovedsak de to hormonene glukagon og insulin, som begge produseres i pankreas, som regulerer glukosemengden i blodet (Wilcox, 2005). Glukagon skilles ut av α -cellene i Langerhanske øyer i pankreas, og fremmer glykogenolyse, glukoneogenese og ketogenese. Insulin produseres i og skilles ut fra β -cellene i Langerhanske øyer i pankreas. Sekresjonen av insulin øker ved inntak av glukose, og hovedoppgaven til insulin er å frakte glukosen inn i cellene. Ved hjelp av reseptorer (glukosetransporterproteiner) senkes blodsukkeret ved at økte mengder insulin i blodet øker transporten av glukose til leverceller, muskelceller og fettceller. Insulin senker også blodsukkeret ved å øke lipogenesisen og glykolysen (Wilcox, 2005).

De aller fleste tilfeller av diabetes mellitus faller inn under en av to kategorier; diabetes mellitus type 1 eller diabetes mellitus type 2. I tillegg deles diabetes også inn i andre spesifikke former for diabetes (Association, 2014).

1.1.2 Diabetes mellitus type 1

Diabetes type 1 utgjør rundt 10 % av alle diabetestilfellene globalt, og oppstår som oftest hos yngre pasienter, gjerne før 20-års alderen (Association, 2014). Diabetes type 1 kjennetegnes som oftest ved hyperglykemi, og skyldes en cellulær mediert autoimmun ødeleggelse av β -cellene i pankreas, som videre fører til en redusert insulinsekresjon. Mekanismen bak diabetes type 1 er ikke fullstendig kjent, men studier har indikert at det er et samspill av genetikk og gjennomgått virusinfeksjon som kan føre til at en utvikler diabetes type 1 (Precechtelova,

Borsanyiova, Sarmirova & Bopegamage, 2014). Pasienter med ubehandlet diabetes type 1 har en tendens til å utvikle ketoacidose. Hos noen pasienter, og da spesielt yngre pasienter, vil første tegn på sykdommen være alvorlig hyperglykemi og/eller ketoacidose (Association, 2014). Vanlige symptomer inkluderer polydipsi (overdreven tørst), polyuria, raskt vekttap, hyperventilasjon, og mulig tap av bevissthet. Det er flere komplikasjoner som er assosiert med diabetes type 1, og disse inkluderer mikrovaskulære problemer som nevropati (nedsatt følsomhet) og retinopati (endringer i netthinnen), samt at diabetespasienter har en økt forekomst av hjertesykdom (Association, 2014). Diabetes type 1 behandles med tilførsel av eksogent insulin.

1.1.3 Diabetes mellitus type 2

Diabetes type 2 er den vanligste formen for diabetes og utgjør rundt 90-95% av alle diabetestilfeller (Association, 2014). Denne formen for diabetes karakteriseres av utvikling av insulinresistens. Årsaken til den reduserte funksjonen til insulin skyldes trolig at reseptorene for insulin på cellene er svekket, og på den måten får ikke insulin utført sine normale oppgaver på cellens overflate. I motsetning til diabetes type 1 er ikke utvikling av ketose og acidose vanlig. Ved de fleste tilfellene av diabetes type 2 vil hyperglykemi som oftest utvikles gradvis over flere år, og sykdommen vil utvikle seg over en lengre periode før hyperglykemien blir så alvorlig at pasienten merker noen symptomer. Det er flere risikofaktorer for utvikling av diabetes type 2, og arv og fedme spiller en viktig rolle som årsak (Association, 2014). Diabetes type 2 er ofte assosiert med mangel på fysisk aktivitet og overvekt. Behandlingen vil i de fleste tilfeller bestå av vektreduksjon og diett, men vil også i noen tilfeller inkludere farmakologisk behandling av hyperglykemi. Det kreves sjelden behandling med insulin (Association, 2014).

1.1.4 Andre former for diabetes mellitus

I tillegg til diabetes type 1 og diabetes type 2 finnes det også andre former for diabetes (Association, 2014). Videre skilles det mellom svangerskapsdiabetes og monogene former som inkluderer MODY, nyfødt diabetes og mitokondriell diabetes. I tillegg finnes det sekundære former for diabetes som oppstår av andre endokrine sykdommer som pankreatitt, hormonrelaterte lidelser (Cushings syndrom) eller på grunn av bivirkninger forbundet med bruk av noen visse typer for medikamenter. Svangerskapsdiabetes gjenkjennes av glukoseintoleranse som oppstår under graviditet. De fleste tilfellene gir seg etter endt svangerskap, men i noen tilfeller vedvarer glukoseintoleransen. Nyfødt diabetes er diabetes

som diagnostiseres de første seks levemånedene, og kan være enten forbigående eller permanent (Association, 2014).

1.2 Maturity-onset diabetes of the young (MODY)

Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) er en sjelden form for diabetes, som står for 1-4 % av alle diabetes-tilfeller (Rubio-Cabezas et al., 2014). MODY karakteriseres av β -celle dysfunksjon som oppstår av en mutasjon i et enkelt gen (monogen diabetes) og resulterer i reduksjon av insulinproduksjon. MODY oppstår i hovedsak før fylte 25 år (Firdous et al., 2018). En slik monogen diabetes vil føres videre til neste generasjon ved autosomal dominant arv (Rubio-Cabezas et al., 2014; Thanabalasingham & Owen, 2011). Disse pasientene har som oftest ikke insulinresistens eller β -celle autoimmunitet, men en sterk familiehistorie med diabetes (Fajans & Bell, 2011; Thanabalasingham & Owen, 2011). Det skilles i dag mellom 14 subtyper av MODY (MODY1-14), avhengig av hvilket gen mutasjonen har oppstått i (Firdous et al., 2018). De 14 subtypene av MODY har til felles at de oppstår i gener som er viktig for utviklingen av eller funksjonen til β -celler i pankreas (Rubio-Cabezas et al., 2014). Av disse utgjør MODY1, MODY2 og MODY3 mesteparten av MODY tilfellene, og skyldes mutasjoner/patogene varianter i henholdsvis *HNF4A*-, *GCK*- og *HNF1A*-genet (Rubio-Cabezas et al., 2014; Thanabalasingham & Owen, 2011). MODY1, som er assosiert med patogene varianter i genet *HNF4A*, utgjør omtrent 5 % av MODY tilfellene (Firdous et al., 2018).

MODY diabetes blir ofte feildiagnostisert som diabetes type 1 eller diabetes type 2. Dette skyldes at symptomene og de kliniske egenskapene til MODY ligner på de til diabetes type 2 og i sjeldnere tilfeller diabetes type 1 (Johansson et al., 2017; Rubio-Cabezas et al., 2014; Thanabalasingham & Owen, 2011). Blant annet vil det i flere tilfeller av MODY forekomme typiske mikroangiopatiske og makroangiopatiske komplikasjoner med en tilsvarende hyppighet som hos pasienter med diabetes type 2 og lignende grad av hyperglykemi (Fajans & Bell, 2011). Denne overlappingen av symptomer og kliniske trekk, samt at MODY er en såpass sjelden form for diabetes, gjør det utfordrende å diagnostisere MODY (Thanabalasingham & Owen, 2011). I motsetning til diabetes type 2 ses overvekt sjeldent hos MODY-pasienter, men fedme og hyperinsulinemi er sporadisk til stede hos personer med MODY1, MODY3, og MODY6.

En MODY diagnose stilles på grunnlag av genetisk testing, som er både sensitiv og spesifikk for diagnostisering av bestemte subtyper av MODY (Rubio-Cabezas et al., 2014; Thanabalasingham & Owen, 2011). Å skille en MODY diagnose fra diabetes type 1 eller diabetes type 2, samt å skille mellom de ulike formene for MODY, har en klinisk relevans da behandlingen av disse typene er noe ulikt (Thanabalasingham & Owen, 2011). I motsetning til diabetes type 1 regnes MODY

hovedsakelig som insulinuavhengig. Pasienter med MODY forårsaket av patogene varianter i blant annet genene *HNF4A* (MODY1) eller *HNF1A* (MODY3), vil være sensitive for behandling med sulfonylurea, mens pasienter med en patogen varianter i *GCK* genet (MODY2) vil ha størst utbytte av en diett-basert behandling (Bjørkhaug et al., 2005; Firdous et al., 2018; Pearson et al., 2003; Søvik et al., 1998).

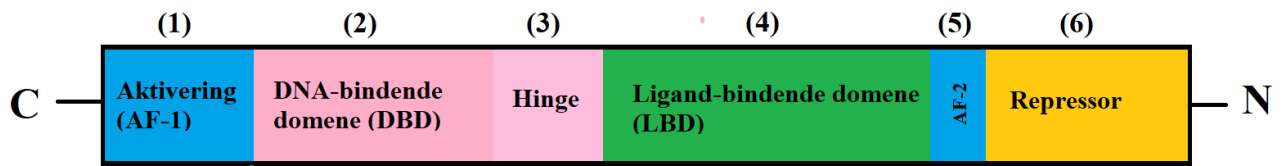
1.3 HNF-4A

1.3.1 *HNF4A*-genet

Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (*HNF4A*) genet er lokalisert på kromosom 20, og består av 13 eksoner. Genet koder for transkripsjonsfaktoren HNF-4A som regulerer viktige gener i flere organspesifikke vev. Transkripsjon av *HNF4A* reguleres av to ulike promotorer: P1 og P2. Regulering via de to ulike promotorene, sammen med alternativ spleising, resulterer i produksjon av totalt 12 forskjellige HNF-4A-isoformer som uttrykkes temporalt og vevsspesifikt (Eeckhoute et al., 2003; Lau, Ng, Loo, Jasmen & Teo, 2018). Isoform 1-6 er leverspesifikke og reguleres av promotor P1, mens isoform 7-12 er pankreasspesifikk og reguleres av promotor P2 (Lau et al., 2018).

1.3.2 HNF-4A (funksjon og oppbygning)

Transkripsjonsfaktoren HNF-4A tilhører kjernereseptor-familien, og har viktige funksjoner både i lever, pankreas, nyre og tarm (Marchesin et al., 2019). I lever er HNF-4A det mest forekommende DNA-bindingsproteinet, hvor det regulerer 60 % av alle levergener (Chandra et al., 2013; Ko, Zhuo & Ren, 2019). Proteinet har også en viktig rolle i pankreas hvor det regulerer gener forbundet med glukosemetabolisme og insulinsekresjon (Thomas et al., 2001). HNF-4A aktiverer blant annet insulingenet som er nødvendig for glukoseindusert insulinsproduksjon og sekresjon (Eeckhoute et al., 2003). Sammen med HNF-1A, er HNF-4A en del av et transkripsjonsfaktor-nettverk som er avgjørende for funksjonen til β -cellene i pankreas (Eeckhoute et al., 2003). HNF-1A og HNF-4A er dessuten omtalt å inngå i en kryss-regulatorisk loop, ettersom HNF-1A aktiverer transkripsjon av *HNF4A*-genet (via P2-promotor) før HNF-4A aktiverer transkripsjon av *HNF1A*-genet (Eeckhoute, Formstecher & Laine, 2004). Denne «avhengigheten» av hverandre er antatt som en forklaring på likhetene i fenotypen for MODY1 og MODY3 -pasienter, der begge viser økende tap av β -cellefunksjon, samt økt hyperglykemi ved økende alder (Thomas et al., 2001).



Figur 1.1 Funksjonelle domener i HNF-4A. Forenklet fremstilling av de funksjonelle domene (nummerert fra 1-6) i HNF-4A. AF-1 og AF-2 står for Activator function 1 og 2.

HNF-4A proteinet består av flere funksjonelle domener (figur 1). I C-terminalenden av proteinet finner vi AF-1 (1), som er en av to aktivatoromener i HNF-4A. AF-1 ligger i aktiveringsdomenet, og har en ligand-uavhengig funksjon. I N-terminalenden, i det ligand-bindende domenet (LBD) (4) finner vi det andre aktivatoromener, AF-2 (5). AF-2 har i motsetning til AF-1 en ligand-avhengig funksjon, altså er aktiviteten til AF-2 avhengig av at ligand binder til LBD. AF-2 sin aktivitet reguleres også av repressor-domenet (6) som har en hemmende effekt på AF-2 domenet (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). De to aktivatoromener (AF-1 og AF-2) har som oppgave å aktivere transkripsjon (Lau et al., 2018). DNA-bindingsdomenet (DBD) (2), med sine to zinkfinger-strukturer, sørger for at HNF-4A kan regulere uttrykk av ulike gener, via binding til DNA som en homodimer (Marchesin et al., 2019). DBD er tilknyttet LBD via Hinge-domenet (3), som er fleksibelt og tillater rotasjon mellom DBD og LBD når HNF-4A binder til målgen (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). LBD, med sin hydrofobe ligandbindende lomme, kan binde fettsyrer slik at konfirmasjonen til LBD endres. Denne konfirmasjonen gjør interaksjonen mellom co-aktivatorer og HNF4-A mulig (Duda, Chi & Shoelson, 2004). I dag er det kjent at DBD gjenkjenner og binder type DR1 bindingssekvens i flere ulike målgen, samt i promotoren til *HNF1A*-genet (Chandra et al., 2013; Lu et al., 2008).

Hoveddomene nevnt over er felles for alle isoformene. Ettersom forskjellen mellom de ulike HNF-4A isoformene ligger i det området som er ansvarlig for aktivering og hemming av transkripsjon, N- og C- terminalregionene, har de ulike isoformene ulikt transaktiveringspotensial (Briançon & Weiss, 2006).

1.3.3 *HNF4A* genvarianter og assosierte fenotyper

Heterozygote varianter i *HNF4A* er hyppigst assosiert med MODY1. I tillegg til MODY1, er varianter i *HNF4A* også assosiert med andre glykemiske fenotyper. Blant annet viser tidligere studier at spesifikke *HNF4A* varianter har blitt assosiert som risikofaktor for diabetes type 2 (Gaulton et al., 2015; Scott et al., 2017). Videre har man i ekstremt sjeldne tilfeller sett

at noen *HNF4A* varianter resulterer i både MODY1 og Fanconi syndrom (Hamilton et al., 2014). Fanconi syndrom kommer av defekter i nyrenes proksimale tubulus, og fører til økt tap av blant annet aminosyrer, glukose, fosfat, bikarbonat og urinsyre via urinen (Foreman, 2019; Marchesin et al., 2019). Det er også generelt rapportert tilfeller med forbigående og medfødt hyperinsulinisme hos nyfødte, som følge av varianter i *HNF4A* genen, som går over til MODY1 i voksen alder på grunn av progressiv dysfunksjon av β -celler. Mesteparten av slike tilfeller er og karakterisert med fenotype som høy fødselsvekt (makrosomi), og hyperinsulinemisk hypoglykemi (HH) første uken etter fødsel (Roženková, Güemes, Shah & Hussain, 2015).

1.4 Formål og problemstilling

Formålet med oppgaven er å studere konsekvens av fem ulike varianter av HNF-4A (R76W, R76Q, S78N, R80W og R127W), assosiert med forskjellige glykemiske fenotyper, ved funksjonelle proteinanalyser. Hensikten med å velge varianter rapportert med forskjellig glykemisk fenotype (MODY1/Fanconi syndrom/diabetes type 2), var også for å vurdere om man kunne differensiere mellom utslag i analysene, i forhold til alvorlighetsgrad på rapportert sykdom, og dermed kunne benytte de spesifikke analysene i framtiden, i studier av ytterligere flere *HNF4A* varianter.

Fokus for valgte proteinanalyser var å studere om de ulike variantene fører til en endring i i) den subcellulære lokaliseringen av HNF-4A (kjerne versus cytosol), og ii) evnen til å binde seg til et relevant DNA-bindingssete (i *HNF1A* promotor). Slike funksjonelle proteinanalyser vil kunne gi en bedre forståelse av molekylær årsak og mekanisme rundt konsekvens av *HNF4A* varianter for fenotype og sykdom. Tilsvarende funksjonelle proteinanalyser har tidligere vist seg å være avgjørende i kartlegging av effekt av blant annet *HNF1A* genvarianter for MODY3 og diabetes type 2, og for persontilpasset behandling av MODY3 pasienter med sulfonylurea (Bjørkhaug et al., 2005; Malikova et al., 2020; Pearson et al., 2003; Sjøvik et al., 1998).

2 Materiale

2.1 Plasmider

Tabell 2.1: Plasmider

Plasmid	Leverandør
EV – FLAG i pcDNA(3.1)	Invitrogen
WT– FLAG i pcDNA(3.1)	Subklonet av Diabetes forskningsgruppen
R76W– FLAG i pcDNA(3.1)	Mutagenese av Diabetes forskningsgruppen
R76Q– FLAG i pcDNA(3.1)	Mutagenese av Diabetes forskningsgruppen
S78N– FLAG i pcDNA(3.1)	Mutagenese av Diabetes forskningsgruppen
R80W– FLAG i pcDNA(3.1)	Mutagenese av Diabetes forskningsgruppen
R127W– FLAG i pcDNA(3.1)	Mutagenese av Diabetes forskningsgruppen

2.2 Celledyrkning

Tabell 2.2: Cellelinje

Cellelinje	Derivert fra	Leverandør
CCL2 (HeLa)	Human cervical epithelial cells	ATCC

Tabell 2.3: Reagenser til dyrkning og transfeksjon av HeLa-celler.

Reagens	Leverandør
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) (1 x) med 4500 mg/L D-glukose, 584 mg/L L-glutamin og 110 mg/L natriumpyruvat	Gibco (#11995-065)
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	Biowest® (#L0022-100)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biowest® (#S1810-500)
0,05 % Trypsin-EDTA (1 x)	Gibco (#25300-054)
Lipofectamin® 2000 Reagent	Invitrogen (#11668-027)
OPTI-MEM® I Reduced Serum medium (1 x)	Gibco (#31985-062)

2.3 Agarose gel

Tabell 2.4: Reagenser til agarose gelelektroforese.

Reagens	Leverandør
SeaKem ® LE Agarose	Lonza (#50004)
DNA-størrelsesmarkør: Lambda DNA/EcoRI	Fermentas (#SM0281)
6 x Loading Buffer	TaKaRa (#9156)

2.4 SDS-PAGE og immunoblotting

Tabell 2.5: Reagenser til SDS-PAGE og immunoblotting.

Reagens	Leverandør
10 % Mini-PROTEAN TGX Stain-Free™ Precast Gel	BioRad (#456-8033)
Magic Mark™ XP Western Standard	Invitrogen (#LC5602)
Precision Plus Protein™ All Blue Standard	BioRad (#161-0373)
Trans-Blot®Turbo™ Transfer Pack 0,2 µm PVDF	BioRad (#1704156)
Clarity™ Western ECL Substrate Luminol/enhancer solution	BioRad (#170-5060)
Clarity™ Western ECL Substrate Peroxide solution	BioRad (#170-5060)
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x)	Novex (#NP0008)
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific (#46430)

Tabell 2.6: Primære antistoffer

Primært antistoff	Vert	Fortynning	Leverandør
HNF4α (C11F12) Rabbit mAb	Kanin	1:2000	Cell signalling (C11F12)
Topoisomerase IIα (D10G9) XP®	Kanin	1:1000	Cell signalling (D10G9)
GAPDH (0411)	Mus	1:2000	Santa-Cruz (sc-47724)

Tabell 2.7: Sekundære antistoffer

Sekundært antistoff	Vert	Fortynning	Leverandør
Mouse anti-rabbit IgG-HRP	Mus	1:5000	Santa-Cruz (sc-2357)
Donkey anti-mouse	Esel	1:5000	Santa-Cruz (sc-2306)

2.5 EMSA

Tabell 2.8: Reagenser til EMSA.

Reagens	Leverandør
Odyssey® EMSA Buffer Kit	LI-COR (#829-07910)
6 % DNA Retardation Gel	Invitrogen (#EC63652BOX)

Tabell 2.9: Primere til EMSA.

Primer	Primersekvens (5'til 3')
[Cy5]-HNF1a_R (revers primer)	[Cyanine5]GCCAAGGGACTGAACTTTGGACTTCAGCC
[Cy5]-HNF1a_F (forward primer)	[Cyanine5]GGCTGAAGTCCAAAGTTCAGTCCCTTCGC

2.6 Buffere og kjemikalier

Tabell 2.10: Buffere og løsninger.

Buffer/løsning	Innhold	Bruksområde
1 x TAE-buffer	50 x TAE- elektroforesebuffer (VWR) fortynnet 1:50 med dH ₂ O.	Gelelektroforese
1 x PBS-buffer	2 PBS-tabletter løst i 1 L dH ₂ O.	Celledyrkning, fraksjonering.
1 x PBS-T buffer	1 mL Tween® 20 i 1 L 1 x PBS-buffer.	Immunoblotting
3 % / 5 % fettfri tørrmelk	3 g / 5 g fettfri tørrmelkspulver løst i 100 mL 1 x PBS-T	Immunoblotting
Fraksjoneringsbuffer A	10 mM HEPES (pH 7,8), 1,5 mM MgCl ² , 10 mM KCl, 0,10 % IGEPAL, 0,5 mM DTT, 1 x Protease Inhibitor Cocktail og dH ₂ O. Fersk ved fraksjonering.	Fraksjonering og Bradford Assay (cytosolfraksjon)
Fraksjoneringsbuffer B	20 mM HEPES (pH 7,8), 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl ² , 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 1 x Protease Inhibitor Cocktail og dH ₂ O. Fersk ved fraksjonering.	Fraksjonering og Bradford Assay (kjernefraksjon)
Bradford fargeløsning	20 % BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate og 80 % dH ₂ O (lages fersk). Filtreres med hvittbånd filterpapir.	Bradford Assay
1 x TG-SDS-buffer	10 x TG-SDS-buffer (VWR) fortynnet 1:10 med dH ₂ O.	SDS-PAGE
Annealing Buffer	10 mM Tris pH 7,5-8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA og dH ₂ O.	EMSA
0,5 % TBE Running Buffer	5 x TBE Running Buffer (Novex) fortynnet 1:10 med dH ₂ O.	EMSA

Tabell 2.11: Kjemikalier og reagenser

Kjemikalie/reagens	Leverandør
Ethidium Bromide (EtBr) (10 µg/µL)	Electran
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	Merck
Magnesiumklorid (MgCl ²)	Sigma Aldrich
Kaliumklorid (KCl)	Sigma Aldrich
Natriumklorid (NaCl)	Sigma Aldrich
10 % IGEPAL	Sigma Aldrich
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Complete Mini, EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets	Roche
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma Aldrich
BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad
PBS-tabletter	Gibco
Tween@20	Fisher Scientific

2.7 Instrumenter og software

Tabell 2.12: Instrumenter

Instrument	Produsent	Bruksområde
NanoVue Plus TM spektrofotometer	GE Healthcare	Plasmidkonsentrasjonsmåling.
ChemiDoc TM XRS+	BioRad	Gel-deteksjon, immunoblotting-deteksjon.
iMark plateleser	BioRad	Bradford Assay.
TC20 automated cell counter	BioRad	Celletelling
Trans-Blot [®] Turbo TM Transfer System	BioRad	Immunoblotting
Eppendorf ThermoMixer C	Eppendorf	SDS-PAGE
Thermo Scientific TM SL16R centrifuge	Thermo Fisher	Sentrifugering
ChemiDoc TM MP Imaging System	BioRad	EMSA

Tabell 2.13: Software

Software	Produsent	Bruksområde
Image Lab TM Software	BioRad	Gel-deteksjon, immunoblotting-deteksjon.
Microplate Manager [®] Software	BioRad	Bradford Assay

3 Metode

3.1 Bestemmelse av plasmidutbytte og kvalitet

Rensede *HNF4A* isoform 2 cDNA plasmider (pcDNA3.1/FLAG), som inneholder *HNF4A* varianter studert i dette prosjektet, samt plasmid uten *HNF4A* cDNA (empty vector (EV)), og *HNF4A* villtype cDNA plasmid (WT) var tilgjengelige ved oppstart. Før bruk i prosjektet ble konsentrasjonen til disse plasmidene først bestemt ved måling av optisk tetthet ved hjelp av instrumentet NanoVue Plus™ Spektrofotometer. For å verifisere kvaliteten på plasmidene ble det utført gelelektroforese på en 1 % agarose gel. Gelen ble først laget ved å veie opp 0,7 g agarosepulver som deretter ble løst i 70 mL 1 x TAE-buffer, før tilsetning av 5 µL EtBr. Videre ble 500 ng plasmid blandet med 2 µL 6 x Loading Buffer (sluttkonsentrasjon på 1 x) til et totalt volum på 10 µL. Hver prøve ble pipettert over i hver sin brønn, og 5 µL Lambda DNA/EcoRI ble benyttet som DNA størrelsesmarkør. Gelelektroforesen ble kjørt ved 30 V i 15 minutter, etterfulgt av 80 V i 1 time, før den til slutt ble kjørt ved 100 V i 30 minutter. Da elektroforesen var ferdig ble elektroforeseresultatet fotografert ved hjelp av ChemiDoc™XRS+.

3.2 Dyrking av HeLa-celler

3.2.1 Celledyrking

Cellelinjen som ble benyttet ved dette prosjektet heter HeLa, og er hentet fra tumorvevet til en kvinne i USA som var diagnostisert med livmorhalskreft. Cellene er tilhørende epiteliale adherente celler. HeLa-celler formerer seg raskt, de uttrykker ikke HNF-4A, og er dermed en ideell cellelinje for å studere konsekvens av *HNF4A* variant på HNF-4A protein funksjon (uten interferens av endogent HNF-4A). Cellene ble dyrket i DMEM dyrkningsmedium som inneholdt pyruvat (110 mg/L), L-glutamin (584 mg/L) og glukose (4500 mg/L) og tilsatt 10 % varmeinaktivert fetal bovin serum, penicillin (100 U/mL) og streptomycin (100 U/mL). Cellene ble dyrket i en fuktet atmosfære i en 5 % CO₂ celleinkubator ved 37 °C. Alt arbeid med cellene ble utført under sterile forhold i et Scanlaf Mars Safety Class 2 avtrekk. Omplussing/flytting av celler ble minimert for å hindre kontaminering av cellene. For nedstrøms celleprosedyrer tilsvarer oppgitte volum 75 cm² flasker hvis ikke annet er oppgitt.

3.2.2 Splitting og subkultivering av celler

Cellene ble subkultivert til nye flasker med ferskt medium for å kunne proliferere og øke i antall. For splitting av celler ble først gammelt medium fjernet. Deretter ble 10 mL romtemperert 1 x PBS tilsatt kulturflasken for vasking av cellene og fjerning av rester av gammelt medium. 1 x PBS ble så fjernet og 1 mL 0.05 % Trypsin-EDTA, som spalter adherente proteiner, tilsatt cellene og inkubert i 5 minutter ved 37 °C. Når cellene hadde

løsnet (visualisert i mikroskop) ble videre 9 mL medium tilsatt for å hemme effekten av trypsin, før cellesuspensjonen ble overført til et 50 mL falcon rør og sentrifugert ved 1300 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellepelletten resuspendert i ca. 10 mL cellemedium ved pipettering opp/ ned noen ganger. Til slutt ble cellene fordelt i nye flasker (splittet ca. 1:4) og tilsatt 10 mL ferskt medium, og videre dyrket.

3.3 Celletransfeksjon

HeLa-celler ble transient transfektert med EV, WT og *HNF4A* variant plasmider ved bruk av Lipofectamine® 2000. For dette ble resuspenderte celler først talt ved hjelp av en TC20™ Automated Cell Counter. Deretter ble 2×10^6 celler sådd ut i 10 cm² skåler, i 10 mL medium. Da cellene hadde nådd 80-90 % konfluens var de klar for transfeksjon. 5 µg plasmid ble tilsatt 500 µL Opti-MEM®. Deretter ble 15 µL Lipofectamin tilsatt Opti-MEM/plasmidløsningen. Løsningene ble videre inkubert i 5 minutter ved romtemperatur før den ble tilsatt i cellene dråpevis. Cellene ble plassert i en CO₂ inkubator ved 37 °C og transfeksjonsmediet ble erstattet med ferskt medium etter 5,5 timer. Subcellulær fraksjonering av cellene ble utført 24 timer etter transfeksjonen.

3.4 Fraksjonering av celler

HNF-4A er en transkripsjonsfaktor som har sin funksjon i cellekjernen (regulerer transkripsjon av målgener). For å kunne vurdere effekt av *HNF4A* varianter på kjernelokaliseringen til transkripsjonsfaktoren HNF-4A, ble det benyttet subcellulær fraksjonering og analyse av HNF-4A tilstedeværelse i kjerne versus cytosol fraksjonen. Fraksjoneringen omfatter separasjon av cellulære komponenter mens de beholder deres funksjonelle egenskaper.

3.4.1 Oppsamling av transfekterte celler

24 timer etter transfeksjon ble cellene i 10 cm² skåler vasket med 5 mL kald 1 x PBS etter at mediet først ble sugd av. 1 x PBS ble så fjernet. Cellene ble løsrevet ved hjelp av en celskraper i 500 µL kald 1 x PBS. Når cellene var skrapet løs ble det tilsatt ytterligere 750 µL 1 x PBS ved å skylle over skålen og for oppsamling av cellene i bunnen. Deretter ble cellene overført til individuelle eppendorfrør og sentrifugert ved 1300 rpm i 5 minutter, etterfulgt av forsiktig fjerning av 1 x PBS. Eppendorfrør med cellepelletten ble oppbevart på is og lagret ved -80 °C til videre fraksjonering.

3.4.2 Fraksjonering

Fraksjoneringen ble utført ved å resuspendere cellepelletten i 500 µL fraksjoneringsbuffer A (tabell 2.10) tilsatt proteasehemmer (1 x), etterfulgt av inkubering på is i 30 minutter. Deretter

ble cellene samlet i en pellet ved å sentrifugere ved 17 900 x g i 5 minutter ved 4 °C, etterfulgt av oppsamling av supernatanten (cytologisk fraksjon). Cytologisk fraksjon ble overført til nye og merkede eppendorfrør og lagret på is, før videre lagring på -80 °C. Videre ble pelleten med kjernefraksjonen forsiktig vasket 2 x med 100 µL fraksjoneringsbuffer A. For hver vask ble fraksjonen spunnet ned raskt (17 900 x g i 2 min). Vaskebuffer ble så fjernet. Deretter ble cellepelleten med kjernefraksjonen resuspendert i 100 µL fraksjoneringsbuffer B (tabell 2.10) tilsatt proteasehemmer ved å pipettere opp og ned 30 ganger, og videre inkubert på is i 30 minutter mens jevnlig blandet via vortexing hvert minutt. Videre ble suspensjonen sentrifugert ved 17 900 x g i 15 minutter ved 4 °C. Deretter ble supernatanten (kjernefraksjonen) samlet opp og overført til ytterligere nye og merkede eppendorfrør, på is, før videre lagring på -80 °C.

Proteinkonsentrasjonen til cytosol- og kjernefraksjoner ble målt før de ble analysert ved SDS-PAGE (beskrevet i seksjon 3.6) og immunoblotting (beskrevet i seksjon 3.7). Fraksjonene ble langtidsoppbevart ved -80 °C.

3.5 Proteinkonsentrasjon måling ved Bradford Assay

Proteinkonsentrasjonen i cellefraksjonene ble bestemt ved hjelp av Bradford Assay. Dette er en kolorimetrisk metode hvor fargestoffet Coomassie brilliant blue G-250 sørger for en fargeendring fra brun til blå ved binding til protein. Etersom det blå fargestoffet absorberer lys ved 595 nm, kan man beregne proteinkonsentrasjon ved å lese av absorbansen til fargestoffet. En standard Bovin Serum Albumin (BSA) stamløsning med en kjent konsentrasjon på 1 mg/mL løst i dH₂O ble brukt til å lage syv ulike standardkonsentrasjoner (25, 125, 500, 750, 1000, 1500 og 2000 µg/µL) i relevant fortynningsbuffer (fraksjoneringsbuffer A versus fraksjoneringsbuffer B). For cytosolfraksjonene ble fraksjoneringsbuffer A benyttet, mens det for kjernefraksjonene ble brukt fraksjoneringsbuffer B. En blankprøve, standardene og prøvene (cellefraksjonene i form av ufortynnet prøve og fortynnet 1:1 i relevant fraksjoneringsbuffer (A/B)) ble blandet med 1 mL Bradford fargeløsning, samt 1 µL relevant buffer. Blanken, standardene og prøvene ble målt ved 595 nm i tripletter ved bruk av en iMark plateleser med Microplate Manager Software – MPM6. Absorbansen av blanken ble trukket fra både standarden og prøvene før proteinkonsentrasjonene ble kalkulert basert på lineær regresjonsanalyse av standardprøver.

3.6 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelektroforese (SDS-PAGE)

For å studere effekten av *HNF4A* varianter på HNF-4A proteinnivå i cytosol versus kjerne ble SDS-PAGE etterfulgt av immunoblotting utført. SDS-PAGE ble utført for å separere proteiner basert på størrelse, før proteiner ble visualisert og kvantitert etter immunoblotting (kapittel 3.7). Til SDS-PAGE ble det benyttet en 10 % Mini-PROTEAN TGX Stain-Free gel. Før loading ble 10 µg proteinfraksjon tilsatt 4 µL NuPAGE LDS Sample Buffer (4 x) og destillert vann til et totalvolum på 20 µL, før denaturering ved 95 °C i 5 minutter vha. thermomixer. For å bestemme molekylærvekten til de separerte proteinene ble 7 µL Magic Mark proteinstørrelsesmarkør loadet på hver gel. 3 µL av Precision Plus Protein All Blue Standards ble også applisert på gel for å få en visuell referanse på proteinoverføring. SDS-PAGE ble kjørt i 1 x TG-SDS buffer ved 150 V i ca. 50 minutter.

3.7 Immunoblotting

Etter SDS-PAGE, og ved hjelp av Trans-Blot Turbo Transfer System, ble proteiner i gelen overført til en nitrocellulosemembran ved 25 V i 7 minutter. Nitrocellulosemembranen ble videre blokkert med 5 % fettfri tørrmelk oppløst i 1 x PBS-T i 1 time ved romtemperatur; dette for å hindre uspesifikk binding av antistoff til membranen. Deretter ble membran vasket to ganger i 1 x PBS-T i 5 minutter. Videre ble membraner inkubert i primært antistoff fortynnet i 8 mL 3 % fettfri tørrmelk (tabell 2.6), ved 4 °C over natten. Dagen etter ble membran vasket to ganger i 1 minutt, og en gang i 15 minutter med 1 x PBS-T. Deretter ble sekundært antistoff konjugert med HRP (horseradish peroxidase), fortynnet i 8 mL 3 % fettfri tørrmelk (tabell 2.7), tilsatt før videre inkubering i 45 minutter ved romtemperatur. Til slutt ble membran vasket to ganger i 1 minutt, en gang i 15 minutter og fire ganger i 5 minutter med 1 x PBS-T.

3.7.1 Fremkalling

For å visualisere antigen-antistoff-komplekset ble like mengder luminol/enhancer og stabil peroksidasebuffer (Clarity™ Western ECL Substrate) blandet sammen og tilført membran direkte. Det ble benyttet 1,5 mL blandet substrat per mini membran. Etter inkubering i mørke i 5 minutter, ble chemiluminescence signal detektert vha. ChemiDoc™ XRS+.

Ved hjelp av tre ulike primær antistoffer (tabell 2.6) og to sekundær antistoff (tabell 2.7) ble proteinuttrykk av HNF-4A, samt TOPO og GAPDH (proteinmarkører/loadingkontroller i henholdsvis kjerne og cytosol), bestemt. For å kvantitere båndintensiteten på de ulike proteinene ble programvaren ImageLab™ benyttet. Proteinuttrykket til HNF-4A i cytosolfraksjon og kjernefraksjon ble normalisert mot henholdsvis GAPDH

(cytosolfraksjonen) og TOPO (kjernefraksjonen), før HNF-4A variant protein ble normalisert mot WT HNF-4A nivå, i cytosol versus kjernefraksjon.

3.7.2 Stripping av membran

For å kunne merke membran med forskjellige antistoff, ble stripping av membran benyttet.

Membranen ble da først vasket to ganger med 1 x PBS-T i 5 minutter for å fjerne substrat fra fremkallingen. Deretter ble membran inkubert i 30 minutter med Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, før vask med 1 x PBS-T fire ganger i 5 minutter. Strippet membran ble så blokkert og vasket som spesifisert over, før nytt antistoff ble tilsatt.

3.7.3 Statistiske analyser

Data ble presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik. Det ble utført to biologiske reaksjoner ($n=2$) og analysert tre paralleller (to fra ett biologisk eksperiment og ett fra et annet).

Signifikansen av resultatene ble evaluert ved å gjennomføre en tosidig uparet t-test. En p -verdi $< 0,05$ ble sett på som signifikant.

3.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

For å vurdere effekt av *HNF4A* varianter på HNF-4A proteinets bindingsevne til en kjent bindingssekvens (dobbeltrådig DNA oligonukleotid) ble det utført en Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). EMSA brukes for å undersøke om det dannes et kompleks mellom et protein og en kjent oligonukleotid som man vet at proteinet normalt binder seg til. I denne analysen ble det benyttet en Cy5-merket oligonukleotid tilhørende *HNF1A* promotoren, da det er kjent fra tidligere at HNF-4A regulerer transkripsjon av *HNF1A* gen (kapittel 1.3).

3.8.1 Hybridisering av *HNF1A* oligos

For å lage dobbeltrådig oligonukleotid til EMSA, ble først like mengder forward og revers Cy5-*HNF1A* primere (100 μ M) (tabell 2.9) blandet sammen. Deretter ble primerne hybridisert ved å kjøre de på PCR-maskin innstilt på følgende program:

- Denaturering: 95 °C i 2 minutter
- Annealing: 25 °C i 45 minutter
- Hold: 4 °C ∞

Ved endt hybridisering var stock-konsentrasjon på 50 μ M. For å verifisere at hybridiseringen var vellykket ble den hybridiserte dobbeltrådig oligonukleotiden kjørt på en 2 % agarosegel sammen med ubehandlet forward og revers primer. 5 μ L prøve blandet med 1 μ L 6 x Loading Buffer, ble loadet på gel og kjørt ved 80 V i 30-40 minutter. Båndene på gelen tilhørende den

dobbeltrådig oligonukleotiden eller enkeltrådig oligoer (primer) ble visualisert vha. ChemiDoc™ XRS+.

Før oligonukleotiden ble benyttet i EMSA, ble de seriefortynnet fra konsentrasjon på 50 µM til 100 nM på følgende måte:

1. Fortynning til 5 µM (1:10): 2 µL stock-løsning (50 µM) + 18 µL annealingbuffer
2. Fortynning til 1 µM (1:5): 4 µL stock-løsning (5 µM) + 16 µL annealingbuffer
3. Fortynning til 500 nM (1:2): 10 µL stock-løsning (1 µM) + 10 µL annealingbuffer
4. Fortynning til 100 nM (1:5): 20 µL stock-løsning (500 nM) + 80 µL annealingbuffer

Binding av dobbeltrådig oligonukleotid ble verifisert via gelanalysen (resultater ikke inkludert).

3.8.2 EMSA

Bindingsreaksjonen ble utført vha. Odyssey® EMSA Buffer Kit. 10 µg totalprotein fra hver kjernefraksjon ble blandet med 1 µL hybridisert oligonukleotid (100 nM) og utvalgte reagenser fra Odyssey® EMSA Buffer Kit. Tabell 3.1 viser hvilke rør som ble benyttet fra kittet, samt mengder tilsatt fra hvert rør.

Tabell 3.1: Oversikt over reagenser som ble benyttet fra Odyssey® EMSA Buffer Kit.

Odyssey® EMSA Buffer Kit reagenser	Volum (µL)
10 x Binding Buffer (rør 1)	2
25 mM DTT/2,5 % Tween 20 (rør 2)	2
1 µg/ µL Poly (dI·dC) (rør 3)	1
0,5 µg Sheared salmon sperm DNA (rør 4)	1
1 % NP-40 (rør 6)	1
Inkubering i 30 minutter	
Orange Loading Dye (rør 10)	2

Etter at alle reagenser var tilsatt, ble de blandete prøvene beskyttet mot lys (hindre tap av Cy5-fluorokrom signal) og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. Etter inkubering ble 2 µL med Orange loading dye (rør 10) tilsatt hver reaksjonsmiks, før prøver ble loadet på en 6% DNA Retardation gel. Gelen ble kjørt vha. NuPage gel running system i 30 minutter ved 180 V, i 0,5 % TBE running buffer. Bundne DNA-HNF-4A komplekser ble visualisert vha. ChemiDoc™ MP Imaging System og Cy5-filer. Styrken på bindingskomplekser ble til slutt kvantitert vha. programvaren ImageLab™.

For å bekrefte at det var HNF-4A som ble detektert i bindingsreaksjonen ble EMSA også kjørt med HNF-4A spesifikt antistoff tilsatt i bindingsreaksjonen. Bindingsreaksjonen ble utført som beskrevet over, bortsett fra at 0,5 µL anti-HNF-4A (tabell 2.6) ble tilsatt reaksjonsmiksen etter vanlig inkubering i 30 minutter. Binding av antistoff til DNA-HNF-4A bindingskomplekset ble tillatt i 15 minutter ved romtemperatur, før Orange Loading Dye ble tilsatt og supershift i vandring av bindingskomplekset ble analysert.

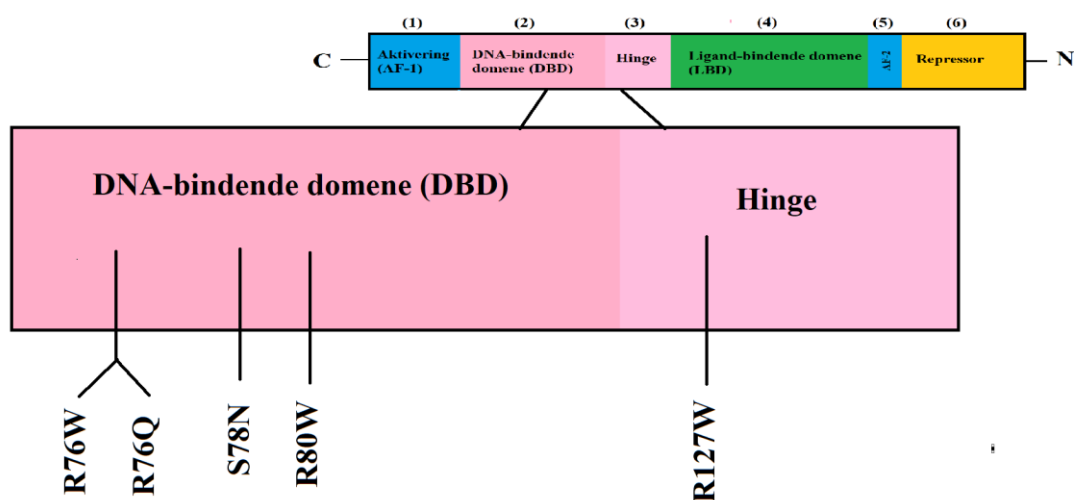
Til slutt ble EMSA også benyttet for å se på heterozygot effekt (WT og HNF-4A variant) på binding av den dobbeltrådige *HNF1A* oligonukleotiden. Bindingsreaksjonen ble også her utført på tilsvarende måte som beskrevet ovenfor, bortsett fra at det her ble benyttet 5 µg totalprotein fra hver HNF-4A variant kjernefraksjon, og der hver slik fraksjon ble blandet med 5 µg fra WT kjernefraksjonen.

3.8.3 Statistiske analyser

Data ble presentert som gjennomsnitt ± standardavvik. Det ble utført to biologiske reaksjoner (n=2) og analysert fire paralleller (to fra hver fraksjon). Signifikansen av resultatene ble evaluert ved å gjennomføre en tosidig uparet t-test. En p-verdi < 0,05 ble sett på som signifikant.

4 Resultat

I dette prosjektet undersøkte vi konsekvensen av fem unike *HNF4A* varianter på HNF-4A funksjon, ved et utvalg av funksjonelle analyser. Variantene er lokalisert i HNF-4A proteinets DNA-bindingsdomene eller Hinge-domene (figur 4.1). Av disse er p.(R76W) og p.(R76Q) assosiert med MODY1 og Fanconi syndrom (Marchesin et al., 2019), mens p.(S78N) og p.(R80W) er assosiert med MODY alene (Colclough, Bellanne-Chantelot, Saint-Martin, Flanagan & Ellard, 2013; Flanagan et al., 2010). p.(R127W), derimot, har blitt assosiert med både diabetes type 2 og MODY1, i forskjellige rapporterte studier (Laver et al., 2016; Yang et al., 2000).



Figur 4.1. Lokaliseringen av de fem ulike *HNF4A* variantene i HNF-4A protein domener.

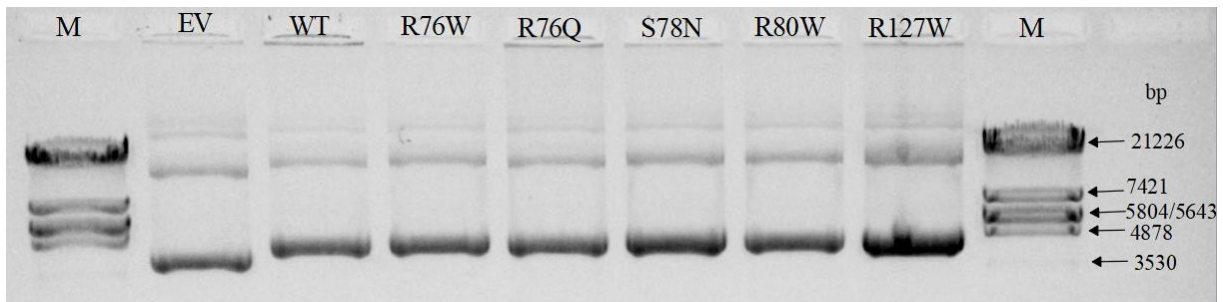
4.1 Konsentrasjon og kvalitet av *HNF4A* variant plasmid

Rensede *HNF4A* variant plasmider, uten *HNF4A* (EV) og *HNF4A* villtype plasmid (WT) var tilgjengelige ved oppstart. Konsentrasjonene til de ulike plasmidene ble kontrollert ved hjelp av NanoVue Plus™ Spektrofotometer, og resultatet (ng/μL) er presentert i tabell 4.1.

Tabell 4.1: Plasmidkonsentrasjon (ng/μL) i de ulike plasmidene, målt vha. NanoVue.

<i>HNF4A</i> plasmid	Konsentrasjon (ng/μL)
EV	623,5
WT	550,0
R76W	344,0
R76Q	443,5
S78N	472,5
R80W	352,5
R127W	787,5

For å undersøke kvaliteten til plasmidene ble 500 ng av hvert plasmid analysert ved agarose gelelektroforese (1 %). Resultatet av kjøringen er presentert i figur 4.2, der DNA er visualisert ved hjelp av EtBr og UV-bestråling på ChemiDoc™ XRS+.

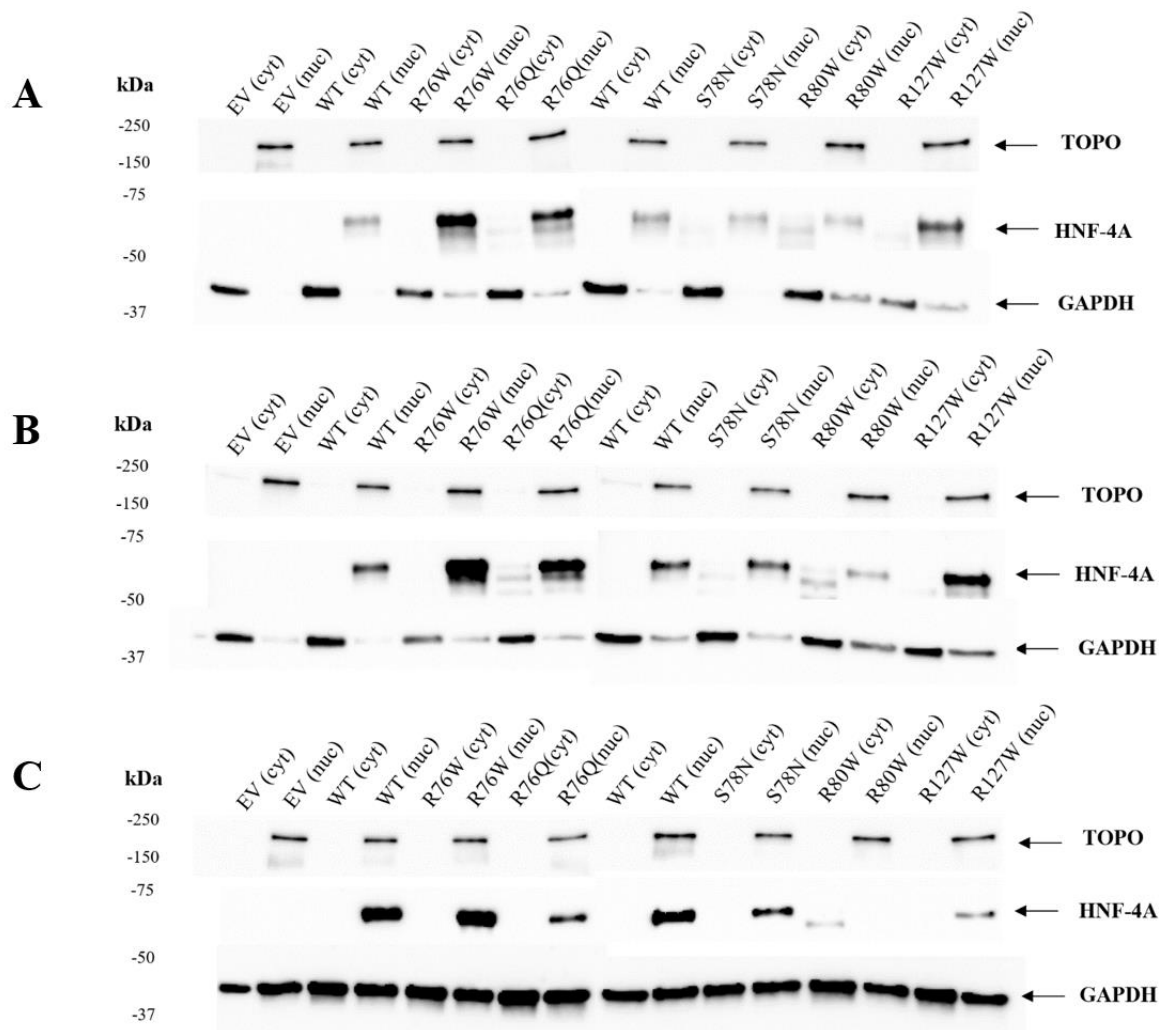


Figur 4.2. Gelelektroforese analyse av plasmider. 500 ng rensede plasmider ble analysert på en 1 % agarosegel sammen med DNA-størrelsesmarkøren Lambda DNA/EcoRI (M) (størrelse på bånd er oppgitt i basepar (bp) til høyre i figuren).

Resultatet fra gelelektroforesen (figur 4.2) viste flere bånd for hvert plasmid. Eksakt størrelse på de ulike båndene var vanskelig å bestemme da kjørelengden på gelelektroforesen var for kort til at størrelsesmarkøren Lambda DNA/EcoRI fikk tydelig adskilte bånd. Plasmidet EV vandret noe lenger basert på deteksjon av båndstørrelser, enn de andre *HNF4A* WT og variant plasmidene, som stemmer overens med at EV skal være et mindre plasmid (mangler *HNF4A* cDNA insert).

4.2 Analyse av nivå *HNF-4A* varianter i cellefraksjoner

For å bestemme mengden WT *HNF-4A* versus variant protein i kjerne (versus cytosol) ble det utført SDS-PAGE og immunoblotting på fraksjoner isolert fra transfekterte HeLa celler. Totalt ble det analysert tre parallelle fraksjoner fra to ulike transfeksjoner. Basert på proteinkonsentrasjonsmålinger (Bradford assay) ble det loadet 10 µg totalprotein fra hver fraksjon. For ytterligere kontroll på korrekt loading av proteinmengder ble markørene TOPO og GAPDH også analysert. TOPO, som kun finnes i cellekjernen, ble benyttet som kontroll for proteinmengder i kjernefraksjon, mens GAPDH, som hovedsakelig finnes i cytosol, ble brukt som kontroll for proteinmengder i cytosolfraksjon. Størrelsesmarkøren Magic Mark ble benyttet for å verifisere størrelsen (kDa) til *HNF-4A* og de ulike fraksjonsmarkørene. Resultat fra immunoblottingene er presentert i figur 4.3.

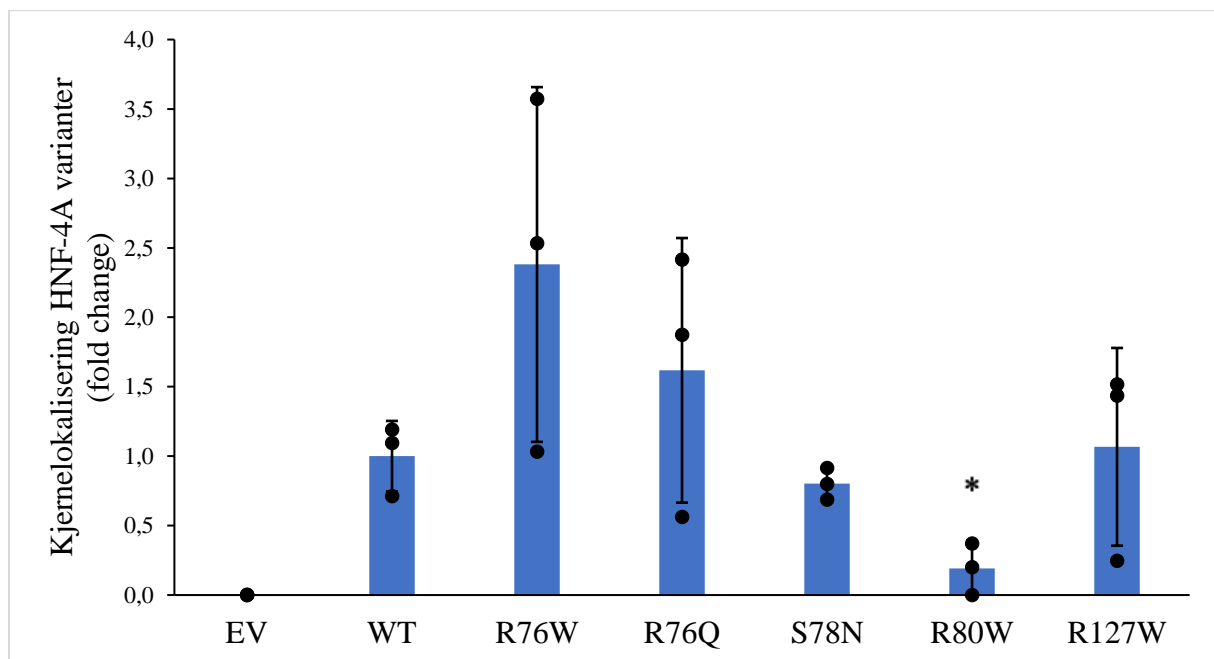


Figur 4.3. Analyser av nivå HNF-4A i cellefraksjoner. (A, B og C) HeLa celler ble transient transfektert med EV, WT *HNF4A* eller ulike *HNF4A* variant plasmid, og videre fraksjonert til cytosolfraksjoner (cyt) og kjernefraksjoner (nuc). HNF-4A mengder i cytosolfraksjon versus kjernefraksjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE, etterfulgt av immunoblotting, ved bruk av spesifikt anti-HNF-4A-antistoff. I tillegg til HNF-4A (~55 kDa) ble TOPO (220 kDa) og GAPDH (40 kDa) detektert ved hjelp av spesifikt anti-TOPO og anti-GAPDH antistoff, som kontroll på proteinloading. Figuren representerer tre kjøringar (A, B og C) basert på to ulike transfeksjoner/fraksjoner, hvor parallell A og B er fra første transfeksjon/fraksjon og parallell C er fra andre transfeksjon/fraksjon.

Basert på resultatet av immunoblottene (figur 4.3) så ble TOPO detektert i alle kjernefraksjoner (ikke cytosolfraksjoner), og TOPO mengder var relativt lik for EV, WT og alle HNF-4A variant fraksjoner. HNF-4A ble detektert hovedsakelig i kjernefraksjonen for WT og de ulike HNF-4A variantene (ingen HNF-4A detektert for EV). Ulik mengde HNF-4A i kjernefraksjonen ble observert, der variant p.(R76W), p.(R76Q) og p.(R127W) viste sterkere bånd enn WT HNF-4A, mens variant p.(S78N) og p.(R80W) viste mindre mengder. Når det gjelder cytosolfraksjonen ble det observert noen svakere bånd som var plassert under de andre båndene til HNF-4A for p.(R80W). I parallell B ble det også observert et svakt bånd i cytosolfraksjonen til p.(R76Q) og p.(S78N). For parallell A og B ble GAPDH hovedsakelig

funnet i cytosolfraksjon, men man så også spor mengder i noen kjernefraksjoner. Parallell C viste derimot like mengder GAPDH bånd i både cytosol- og kjernefraksjon.

Videre ble båndene (figur 4.3) for HNF-4A, TOPO og GAPDH for alle tre parallelle immunoblotts kvantitert ved bruk av programvaren ImageLab™. Mengder HNF-4A ble så normalisert mot mengder kvantitert TOPO og GAPDH, for henholdsvis kjernefraksjonen og cytosolfraksjonen. De normaliserte kvantiteringene for HNF-4A ble videre brukt til å regne ut nivå lokalisering av HNF-4A varianter versus WT HNF-4A, i kjernen, framstilt i figur 4.4.



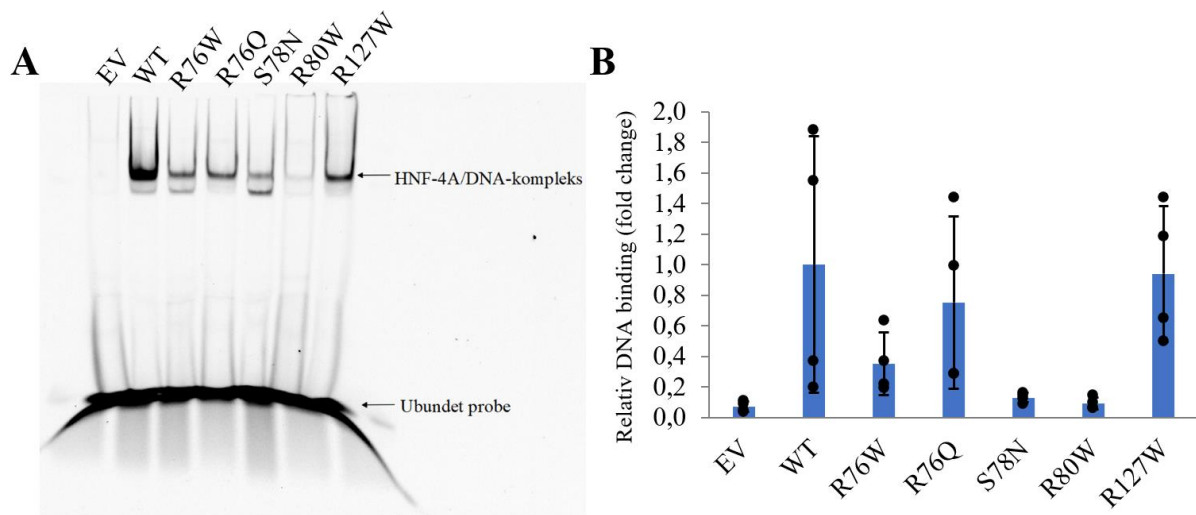
Figur 4.4. Nivå av HNF-4A i kjernefraksjoner. Data representerer gjennomsnittlig fold change nivå for de ulike variantene, beregnet ut fra de normaliserte kvantiteringene for HNF-4A til kjernefraksjonene, og viser forholdet mellom kjernenivå av HNF-4A varianter versus WT, (her er satt til 1,0). Standardavviket er markert i svart, sammen med de tre parallellene (●). For å undersøke om de ulike HNF-4A variantene viste signifikant forskjell i mengden HNF-4A i kjerne sammenlignet med WT ble det utført en tosidig uparet t-test. P-verdi <0,05 (*) ble vurdert til signifikant forskjellig.

Ut ifra resultatene presentert i figur 4.4 så man at kjernenivået av HNF-4A varierte mellom de ulike variantene. Variant p.(R127W) viste nær tilsvarende nivå lokalisering i kjernen som WT (1.07 fold change vs. 1.0), mens variant p.(R76W) og p.(R76Q) viste høyere nivå i kjernen (henholdsvis 2.38 og 1.62 fold change). Både p.(S78N) og p.(R80W) viste lavere mengder (0.80 og 0.19 fold change) i kjernen sammenlignet med WT. Mens nær samtlige normaliserte varianter viste rundt 100 % tilstedeværelse i kjernefraksjon (tilsvarende WT HNF-4A), så viste det reduserte nivået av p.(R80W) en videre fordeling på 59 % i kjernefraksjonen og 41 % i cytosolfraksjonen (data ikke inkludert som figur). Som observert i figur 4.3 ble ikke HNF

4A detektert i EV prøven, verken i kjernefraksjonen eller i cytosolfraksjonen, og hadde dermed en fold change lik 0.

4.3 Analyse av DNA-bindingsevne til HNF-4A varianter ved EMSA

HNF-4A variantenes evne til å binde en DNA målsekvens ble analysert ved hjelp av EMSA. For dette ble HNF-4A variant spesifikke kjernefraksjoner inkubert med en *HNF1A* oligonukleotid merket med et Cy5-fluorokrom. Det ble kjørt fire paralleller fra to ulike kjernefraksjoner og styrken på bundet kompleks ble kvantitert via programvaren ImageLab™. En representativ gel (A), sammen med gjennomsnittlig DNA-binding basert på de fire parallellene (B), er presentert i figur 4.5.



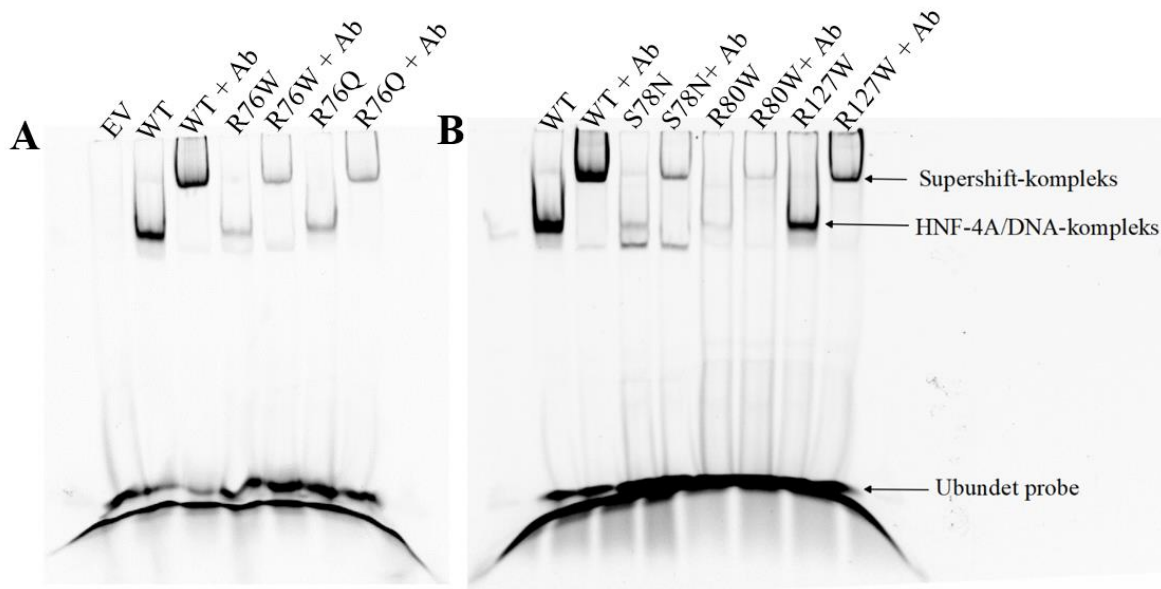
Figur 4.5. HNF-4A og bindingsaffinitet til *HNF1A* promotor bindingssete. EMSA ble utført for å vurdere bindingsevnen til de ulike HNF-4A variantene (p.(R76W), p.(R76Q), p.(S78N), p.(R80W) og p.(R127W)), og sammenlignet med normal HNF-4A proteinbinding (WT). Basert på kvantitering av HNF-4A i kjernefraksjoner fra immunoblott, ble 10 µg kjernefraksjon inkubert med *HNF1A* oligonukleotider merket med Cy5-fluorokrom (100 nM), og binding analysert på en 6 % DNA Retardation Gel. Det ble utført fire paralleller fra to ulike transfeksjoner. (A) Representativ EMSA gel visualisert med ChemiDoc™ MP Imaging System og Cy5-filer. HNF-4A/DNA-kompleks og ubundet probe er markert i figuren. (B) Gjennomsnittlig binding (Fold Change) basert på kvantitering av HNF-4A/DNA kompleks fra fire parallele reaksjoner (●), med standardavvik (markert i svart). For å undersøke om de ulike HNF-4A variantene viste signifikant ulik binding versus WT ble det utført en tosidig uparet t-test. P-verdi <0,05 ble vurdert til signifikant forskjellig.

EMSA analysen (figur 4.5A) viste variert dannelse av HNF-4A/DNA-kompleks for WT og alle HNF-4A varianter. EV viste ingen båndstrukturer. Blant HNF-4A variantene viste p.(S78N) (0,13 fold change) og p.(R80W) (0,09 fold change) spesielt svakere binding sammenlignet med WT (satt som 1 fold change) (figur 4.5B). Videre viste p.(R76W), p.(R76Q) og p.(R127W) bindingeffekt på henholdsvis 0,35, 0,75 og 0,94 fold change, sammenlignet mot WT. Størst variasjon i data, basert på at standardavviket var høyest, var for

p.(R76W), p.(R76Q) og p.(R127W). HNF-4A variantene p.(R76Q) og p.(R127W) viste størst standardavvik og var også nærmest WT med hensyn til binding (høyest fold change-verdi (0,75 og 0,94 fold)). Resultater fra uparet t-test viste at ingen av HNF-4A variantene hadde signifikant ulik DNA-bindingsevne sammenlignet med WT, da alle p-verdiene var over 0,05, og mest sannsynlig grunnet stort standardavvik på WT binding.

4.3.1 Bekreftelse av HNF-4A i DNA-bindingskompleks ved EMSA

For å bekrefte at det er HNF-4A som binder til *HNF1A* oligonukleotid ble anti-HNF-4A tilsatt prøvene i slutten av bindingsreaksjonen, før analyse ved EMSA. Ettersom anti-HNF-4A bundet til HNF-4A og *HNF1A* oligonukleotid, ga et større kompleks som vandret kortere i gelen (danner supershiftshift i gelen) i prøvene hvor HNF-4A antistoffet var tilsatt, så bekrefter dette HNF-4A i bindingskomplekset. Resultatet er presentert i figur 4.6 (n=1).

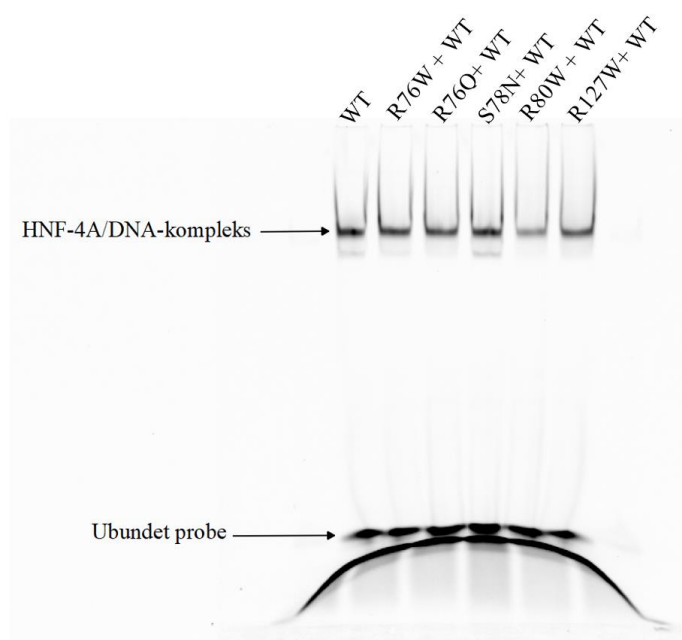


Figur 4.6. Bekreftelse av HNF-4A i DNA-bindingskompleks med *HNF1A* oligonukleotid ved EMSA. EMSA med tilsetning av anti-HNF-4A antistoff (Ab) ble utført for å bekrefte binding mellom HNF-4A og *HNF1A* oligonukleotid. For sammenligning ble det for hver variant også tilsatt en prøve uten anti-HNF-4A. 10 µg kjernefraksjon (basert på beregninger fra immunoblott (fold change)) ble inkubert med *HNF1A* oligonukleotider merket med Cy5-fluorokrom (hver prøve) og anti-HNF-4A (annenhver prøve), og kjørt på to 6 % DNA Retardation Gel. (A) og (B) viser henholdsvis gel 1 og 2 for alle variantene. HNF-4A/DNA-kompleks, supershift-kompleks og ubunde oligonukleotid er markert i figuren. Prøver tilsatt antistoff er markert med +Ab.

EMSA kjørt med anti-HNF-4A (figur 4.6) viste et supershift for de prøvene som var tilsatt antistoff (+ Ab). Som også observert i figur 4.5 var båndintensiteten til WT og p.(R127W) sterkere sammenlignet med de andre variantene, men supershift ble bekreftet for alle HNF-4A variantene.

4.3.2 Effekt av HNF-4A varianter på WT for DNA-binding ved EMSA

Ettersom HNF-4A fungerer som en dimer, og der MODY1 pasienter normalt sett er heterozygot for *HNF4A* variant, var det ønskelig å se på heterozygot effekt. Altså ønsket man å undersøke om en HNF-4A variant (eventuelt ved dimensering med WT HNF-4A) kunne påvirke HNF-4A binding. For å undersøke dette ble like kjernefraksjon mengder for WT og HNF-4A variant tilsatt i bindingsreaksjonen før EMSA analyse. Resultatet er presentert i figur 4.7.



Figur 4.7. Effekt av HNF-4A varianter på WT DNA-binding ved EMSA. 5 μ g WT og 5 μ g HNF-4A variant ble inkubert med *HNF1A* oligonukleotider merket med Cy5-fluorokrom, og kjørt på en 6 % DNA Retardation Gel, og sammenlignet mot 5 μ g WT alene WT alene (n=1). HNF-4A/DNA-kompleks og ubundet probe er markert i figuren.

Nær normal DNA-binding ble observert ved nær samtlige HNF-4A varianter, med WT HNF-4A, og tilsvarende effektivt som WT HNF-4A alene (figur 4.7). Binding av p.(R80W) med WT var noe svakere enn de andre variantene, basert på svakere båndstyrke.

5 Diskusjon

Transkripsjonsfaktoren HNF-4A tilhører kjernereseptor-familien, og regulerer viktige gener i flere organspesifikke vev, som for eksempel lever, pankreas, nyre og tarm (Marchesin et al., 2019). I pankreas deltar HNF-4A i regulering av glukosemetabolismen og insulinsekresjon, ved å aktivere blant annet insulingenet som er nødvendig for glukoseindusert insulinproduksjon og videre sekresjon (Eeckhoute et al., 2003; Thomas et al., 2001). I tillegg inngår HNF-4A i en kryss-regulatorisk loop sammen med HNF-1A, der HNF-1A aktiverer transkripsjon av *HNF4A* genet (via P2 -promotor), før HNF-4A aktiverer transkripsjon av *HNF1A* genet (Eeckhoute et al., 2004).

Patogene varianter i *HNF4A* genet er hyppigst assosiert med MODY1, men også rapportert assosiert med diabetes type 2, Fanconi syndrom (sjelden) og medfødt hyperinsulinisme hos nyfødte (Gaulton et al., 2015; Hamilton et al., 2014; Roženková et al., 2015; Scott et al., 2017). Etersom HNF-4A er en transkripsjonsfaktor med hovedfunksjon å regulere målgener i cellekjernen i relevante vev, så kan slike sykdomsassosierte varianter føre til endret funksjon hos HNF-4A proteiner i form av endret DNA-bindingsevne, endret transaktivering og/eller endret subcellulær lokalisering. I dette studiet ble det undersøkt om variantene p.(R76W), p.(R76Q), p.(S78N), p.(R80W) og p.(R127W) i HNF-4A fører til endring i subcellulært (kjerne) lokalisering, i transfekterte HeLa celler, og/eller endret evne til å binde DNA.

5.1 Preanalyse (konsentrasjon og kvalitet) av *HNF4A* variant plasmider

Ved oppstart av prosjektet var rensede plasmider (WT, *HNF4A* varianter, EV) med kjente DNA konsentrasjoner tilgjengelig. Før videre bruk var det nødvendig å kontrollere konsentrasjonen (tabell 4.1) og kvaliteten (figur 4.2) til disse plasmidene. Kvaliteten ble undersøkt ved hjelp av agarose gelelektroforese (1 %) hvor plasmidene ble kjørt parallelt med DNA-størrelsesmarkøren Lambda DNA/EcoRI. Resultat av gelelektroforesen viste flere bånd for hvert av plasmidene, der forventet størrelse basert på plasmider er antatt å være 5514 basepar (backbone) pluss 1395 basepar (*HNF4A* cDNA), totalt 6795 basepar stort. EV mangler *HNF4A* cDNA insert og er derfor forventet en størrelse på 5514 basepar. Størrelsen på plasmidene basert på gelelektroforesen er i dette tilfelle vanskelig å bestemme da markøren ikke har fått vandre tilstrekkelig for å skille de ulike båndene. Etersom mindre plasmider vandrer lengre i geler enn større plasmider er det forventet at EV vandrer lengre enn de andre plasmidene, noe som ble bekreftet (figur 4.2). Basert på den teoretiske størrelsen på *HNF4A* plasmidene burde de ha vandret tilsvarende som markørbåndet markert 5804/5643. Da markøren består av lineære bånd mens plasmid er sirkulært vil ikke plasmidene vandre

nøyaktig som den teoretiske størrelsen tilsier. Den reelle størrelsen på plasmidene kunne vært bedre verifisert dersom gelen hadde fått vandre lengre.

5.2 Subcellulær lokalisering av HNF-4A varianter

For å undersøke om de ulike *HNF4A* variantene førte til en endring i den subcellulære lokaliseringen av HNF-4A proteinet (hovedfokus kjerne), ble fraksjoner fra transfekterte HeLa celler analysert ved SDS-PAGE og immunoblotting. Som en kontroll på proteinloadingen av fraksjonene ble kjerne- og cytosolmarkørene TOPO og GAPDH også studert. For å verifisere korrekt størrelse på tilsvarende bånd for HNF-4A, TOPO og GAPDH ved immunoblotting, ble størrelsesmarkøren Magic Mark benyttet. HNF-4A har en forventet størrelse på ~55 kDa, TOPO har en størrelse på rundt 220 kDa, mens GAPDH har en størrelse på 40 kDa, noe som stemmer bra med hva som ble detektert på immunoblottene.

Videre viste immunoblottene for de tre parallelle kjøringene (figur 4.3) at TOPO ble detektert i alle kjernefraksjonene (ikke i cytosolfraksjonene), og at TOPO mengder detektert var relativt lik for EV, WT og alle HNF-4A variant fraksjoner. Dette indikerer at like mengder totalprotein fra kjernefraksjonene har blitt applisert, at konsentrasjonsmålinger av fraksjonene har vært gode, og at det derfor ikke er ujevn loading som eventuelt er årsak til ulike mengder av HNF-4A variantene i kjernefraksjonene. GAPDH finnes hovedsakelig i cytosol i celler, og ble derfor brukt som en loadingkontroll for proteinmengder i cytosolfraksjonene. Mens mesteparten av GAPDH er lokalisert i cytosol er den også funnet i andre deler av cellen, som blant annet kjernen og mitokondriene (Tristan, Shahani, Sedlak & Sawa, 2011). For cytosolfraksjon ble GAPDH funnet hovedsakelig i cytosol som forventet, mens noen svakere bånd ble også detektert i kjernefraksjonene. Mengder GAPDH var relativt lik for de fleste prøvene fra cytosolfraksjonene, med noe lavere nivå for p.(R76W) og p.(R127W) i den ene fraksjonen (figur 4.3. A og B). Dette antyder at det også her er applisert like mengder totalprotein for alle prøvene. Basert på at GAPDH ble ulikt detektert i cytosol versus kjernefraksjon mellom de to biologiske forsøkene, så kan det tenkes at GAPDH ikke er den mest optimale markøren for proteinloading i cytosol, og at man i framtiden burde benyttet en annen cytosolmarkør (eksempelvis alfa-tubulin eller actin).

Som forventet ble ikke HNF-4A detektert i EV fraksjoner, da EV er en negativ kontroll som ikke uttrykker HNF-4A, og der HeLa celler selv ikke uttrykker endogent HNF-4A. HNF-4A ble hovedsakelig detektert i kjernefraksjonen til WT og de ulike HNF-4A variantene. Da HNF-4A er en transkripsjonsfaktor som tilhører kjerne reseptorfamilien, er det derfor forventet at majoriteten av HNF-4A skal befinne seg i kjernefraksjonene. Det ble imidlertid observert

ulike mengder HNF-4A varianter i disse fraksjonene. Mens p.(R76W) viste jevnt over høyere nivå (sterkere bånd) enn WT, så viste p.(R80W) jevnt over lavere nivå (svakere bånd) i kjernefraksjonene. For p.(R80W), p.(R76Q) og p.(S78N) ble det detektert flere svake bånd og noen med ulik (lavere) molekylvekt, i cytosolfraksjoner. Her kan det ikke utelukkes hvorvidt dette er modifiserte/degraderte former for disse HNF-4A variantene (Figur 4.3B). Samlet sett kan data indikere at noen av variantene påvirker den subcellulære lokaliseringen av HNF-4A (kjerne versus cytosol), samt muligens ved å ha en negativ effekt for transporten av HNF-4A til cellekjernen. For p.(R80W) spesielt, ser totalnivået i cytosol og kjernefraksjonen ut til å være redusert, noe som kan antyde at p.(R80W) er ustabil, samt at eventuell transport av p.(R80W) er mindre effektiv (større opphoping i cytosol) enn for WT og de andre HNF-4A variantene. Dette er imidlertid kun hypoteser og må påvises ved ytterligere analyser. For å bekrefte redusert nivå av p.(R80W) og ko-lokalisering i cytosol (eventuelt andre organeller) kunne det vært relevant å utføre immunfluorescens analyser av HeLa-celler transfektert med WT versus ulike varianter med hovedfokus på p.(R80W). Videre kunne det vært relevant å sjekke stabiliteten til p.(R80W) ved å utføre stabilitetsstudie med cyclohexamidbehandling av transfekterte celler for å se på nivå av p.(R80W) versus WT protein over tid.

For å se på gjennomsnittlig nivå av HNF-4A varianter i kjernen ble HNF-4A kvantitert og normalisert mot TOPO nivå (figur 4.3). Fold change ble beregnet ut fra de normaliserte verdiene, hvor WT var satt til 1.0 (figur 4.4), for å sammenligne nivå av HNF-4A varianter mot WT. Her ser man at de ulike variantene har en innvirkning på hvor mye HNF-4A som befinner seg i kjernefraksjonen sammenlignet med WT. For p.(R76W) og p.(R76Q) er det høyere nivå i kjernen (henholdsvis 2.4 fold change og 1.6 fold change), mens for p.(S78N) og p.(R80W) er det mindre mengde HNF-4A (0.8 fold change og 0.2 fold change) som befinner seg i kjernen. Disse funnene stemmer overens med de observasjonene gjort av båndstyrken til HNF-4A i figur 4.3, hvor det er observert sterkere bånd for p.(R76W) og p.(R76Q) og svakere bånd for p.(S78N) og p.(R80W). En tidligere studie av p.(R76W) og p.(R80W) variantene, basert på mutagenese av *HNF4A* flue genet (ikke humane), viste at variantene uttrykt i nefrocytter viste enten en økning i kjerne periferien (p.(R76W)) eller en svakere lokalisering i kjernen (p.(R80W)) (Marchesin et al., 2019). Resultatene fra denne studien støtter resultatet fra våre *in vitro* analyser. For p.(R127W) er fold change 1.07, altså nær normale proteinmengden i kjernen sammenlignet med WT. I en tidligere studie, hvor p.(R127W) er assosiert med diabetes type 2 hos en japansk familie med MODY1, ble det funnet at denne

varianten ikke har påvirket den subcellulære lokaliseringen til HNF-4A (Yang et al., 2000). Dette stemmer også overens med våre resultater.

Standardavviket ble regnet ut for å få et bilde av verdiene til de tre parallellene, og viser de tre verdienes gjennomsnittlige avstand fra gjennomsnittet. Ut fra figur 4.4 ser man at standardavviket er størst for de variantene med høyest kjernenivå av HNF-4A, altså at det er størst variasjon mellom de tre parallellene for de høyeste verdiene. Det er derimot relativt små standardavvik for p.(S78N) og p.(R80W) som har et lavere kjernenivå av HNF-4A i forhold til resten. Det ble utført en tosidig uparet t-test for å undersøke om variantene gir en signifikant endring i kjernenivået av HNF-4A sammenlignet med WT, hvor en p-verdi på under 0,05 (*) ble vurder som en signifikant forskjell. Den uparede t-testen gav p-verdier over 0.05 for de fleste variantene (p.(R76W), p.(R76Q), p.(S78N) og p.(R127W)). Dette indikerer at kjernenivået av HNF-4A for disse variantene ikke er signifikant ulik WT. p.(R80W) har derimot en p-verdi under 0.05, som vil si at kjernenivået av HNF-4A for denne varianten er signifikant ulik WT.

5.3 Analyse av HNF-4A varianters DNA-bindingsevne ved EMSA

For å undersøke om de ulike HNF-4A variantene førte til endringer i HNF-4A proteinets evne til å binde seg til et relevant DNA-bindingssete (her studert *HNF1A* promotor sete) ble HNF-4A i kjernefraksjoner studert. For å verifisere at HNF-4A inngikk i *HNF1A* promotor bindingskomplekset, ble anti HNF-4A antistoff tilsatt en av analysene/kjøringen (figur 4.6). Økningen i gelskiftet som ble observert, og vist for samtlige HNF-4A varianter og WT, tyder på at det har blitt dannet et supershift-kompleks, som har vandret kortere i gelen. Fra dette kan man konkludere at EMSA data viser at HNF-4A som har bundet til *HNF1A* og er det som detekteres i EMSA gelene.

EMSA analyse av EV, WT og de ulike HNF-4A variantene (figur 4.5 og 4.6) viste variert dannelse av HNF-4A/DNA-kompleks. EV viste, som forventet, ingen dannelse av kompleks, ettersom EV ikke uttrykker HNF-4A. Når det gjelder variantene viste p.(S78N) og p.(R80W) svak binding til *HNF1A* oligo, sammenlignet med WT, noe som kan tyde på at variantene svekker DNA-bindingsevnen til HNF-4A, og ikke unaturlig da disse sitter i DNA-bindingsdomenet til HNF-4A. Den svake bindingsevnen kan også ha en sammenheng med reduserte nivå av variant proteinene i kjernefraksjonene (figur 4.4). For p.(R80W) krevde det derfor et større volum kjernefraksjon enn det som var tilgjengelig for at 10 µg av proteinet skulle bli tilsatt i EMSA analysen, og det er derfor vanskelig å vurdere nøyaktig DNA-bindingsevne til denne varianten. p.(R76W) viste også en lavere DNA-bindingsevne, mens

p.(R76Q) og p.(R127W) viste noe redusert/nær normal DNA-bindingsevne. Resultatet for p.(R76W) stemmer overens med simuleringer gjort i en tidligere studie hvor det kom fram at R76 (og R80) er aminosyrer viktig for interaksjon og binding til DNA, og der R76W, i denne modelleringstudien, fører til nedsatt DNA-bindingsaffinitet (Hamilton et al., 2014). I studien der flue *HNF4A* genet ble studert, viste EMSA analysene en normal binding for p.(S78N), mens p.(R76W) og p.(R80W) viste sterkt redusert DNA-bindingsevne til et HNF-4A bindingssete i apoA1 promotoren (Marchesin et al., 2019). Deres funn for p.(S78N) står i sterk kontrast til hva som ble funnet i dette prosjektet, men så er også utgangspunkt for analysene gjort her basert på human HNF-4A versus flue HNF-4A, der det antas at noen forskjeller kan eksistere mellom disse to species isoformene i form av struktur, og muligens også funksjon. I tillegg baserte de sine studier på HNF-4A uttrykt i nefrocytter, mens man i gjeldende studie har brukt HNF-4A uttrykt i HeLa celler. Når det gjelder p.(R127W) varianten er funn gjort tidligere motstridende. I en studie ble det observert at p.(R127W), som medfører en endring i Hinge-domenet, fører til nedsatt DNA-bindingsevne og transkripsjonsaktivering av blant annet *HNF1A* genet (Yang et al., 2000). I en annen studie, der EMSA og transaktivering ble undersøkt, viste p.(R127W) normale verdier (Navas, Munoz-Elias, Kim, Shih & Stoffel, 1999). Sistnevnte studie og EMSA funn stemmer overens med hva som ble observert i dette prosjektet.

Når det gjelder standardavviket for de ulike HNF-4A variantene ser man at det er høyere for de variantene som har størst DNA-bindingsevne, noe som nok reflekterer de store variasjonene i kvantiteringene fra kjernelokaliseringen (figur 4.4). Uparet t-test ga p-verdier over 0,05 for alle HNF-4A varianter. Dette tyder på at ingen av HNF-4A variantene har en signifikant redusert binding til *HNF1A* oligoen sammenlignet med WT.

EMSA ble også kjørt for å se på heterozygot effekt, ettersom HNF-4A binder DNA som en dimer, og fordi MODY1 pasienter er heterozygot for *HNF4A* variant. Resultatet fra EMSA (figur 4.7) viser nær normal DNA-binding tilsvarende WT alene, av nær samtlige HNF-4A varianter. Kun p.(R80W), sammen med WT, viser fortsatt redusert DNA-binding. En mulig tolkning er at p.(R80W) kan ha en dominant negativ effekt på WT, men dette kreves ytterligere analyser for å kunne bekrefte. En annen og mer plausibel forklaring er at den svakere bindingsevnen til p.(R80W) kan, som nevnt tidligere skyldes, utilstrekkelig volum av p.(R80W) i kjernefraksjon på grunn av redusert nivå av varianten i nettopp kjernefraksjonen, og at det dermed er binding av WT alene som detekteres på gelen.

6 Konklusjon

Varianter i *HNF4A* har blitt assosiert med forskjellige glykemiske fenotyper, inklusiv MODY1, MODY1 + Fanconi syndrom, eller type 2 diabetes. For en bedre forståelse av effekt av variant og molekylær årsak til sykdom, har funksjonelle analyser vist seg viktig for andre MODY genvarianter og utslagsgivende for persontilpasset medisin (Malikova et al., 2020). Basert på et utvalg funksjonelle analyser (kjernelokalisering og EMSA), av fem *HNF4A* varianter, ble det observert at p.(R76W) og p.(R76Q) har et høyere kjernenivå, mens p.(S78N) og p.(R80W) har et lavere kjernenivå, enn WT, der kun p.(R80W) viste seg signifikant forskjellig. Når det kommer til proteinets bindingsevne til DNA (*HNF1A* promotor) viste p.(S78N) og p.(R80W) en redusert bindingsevne, noe som indikerer at variantene svekker DNA-bindingsevnen til HNF-4A, eller på grunn av redusert nivå i kjernefraksjonen (p.(R80W)). Når det gjelder heterozygot effekt viste alle HNF-4A variantene, med unntak av p.(R80W), nær normal DNA-binding i tilstedeværelse av WT HNF-4A.

Resultatet fra denne studien indikerer altså at av de fem variantene i HNF-4A (p.(R76W), p.(R76Q), p.(S78N), p.(R80W) og p.(R127W)), er det variantene assosiert med MODY1 (p.(S78N) og p.(R80W)) og MODY1 + Fanconi syndrom (p.(R76W)) som har en størst reduksjon av proteinets bindingsevne til DNA. I tillegg er det kun den subcellulære lokaliseringen til p.(R80W) som er signifikant endret i forhold til WT. Svakheter i denne studien er at det kun ble benyttet to biologiske paralleller (to ulike fraksjoner). For å kunne konkludere sikkert med hvilke påvirkning de ulike variantene har på den subcellulære lokaliseringen og proteinets bindingsevne til DNA, hadde det vært nyttig med flere biologiske variabler flere ganger for å få gode nok datagrunnlag.

7 Definisjoner og forkortelser

Ab: Antistoff

AF-1: Activation function 1

AF-2: Activation function 2

cDNA: Komplementær DNA

CO₂: Karbondioksid

Cy5: Cyanin5

DBD: DNA-bindende domene

dH₂O: Destillert vann

DNA: Deoksyribonukleinsyre

DR1: Direct repeat 1

EMSA: Electrophoretic mobility shift assay

EtBr: Ethidium Bromide

EV: Empty vector

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (protein)

GCK: Glucokinase (gen)

HNF1A: Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (gen)

HNF-1A: Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (protein)

HNF4A: Hepatocyte nuclear factor-4 alpha (gen)

HNF-4A: Hepatocyte nuclear factor-4 alpha (protein)

HRP: Horseradish Peroxidase

kb: Kilo baser

kDa: Kilo dalton

LBD: Ligand-bindende domene

MODY: Maturity-onset diabetes of the young

P1: Promotor 1

P2: Promotor 2

PBS: Phosphate buffered saline

PBS-T: Phosphate buffered saline-Tween 20

PCR: Polymerase Chain Reaction

Rpm: “revolutions per minute” (omdreiningen per minutt)

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelektroforese

TAE: Tris Acetate-EDTA

TBE: Tris-Borate-EDTA

TG-SDS: Tris-Glycine-SDS

TOPO: Topoisomerase (protein)

V: Volt

WT: Wild type (villtype)

8 Litteraturliste

- Association, A. D. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37 Suppl 1, S81-90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- Bjørkhaug, L., Ræder, H., Thorsby, P. M., Undilien, D. E., Søvik, O., Molven, A., ... Njølstad, P. R. (2005). Molekylærgenetisk diagnostikk ved diabetes mellitus Hentet fra <https://tidsskriftet.no/2005/11/tema-diagnostisk-molekylaerbiologi/molekylaergenetisk-diagnostikk-ved-diabetes-mellitus>
- Briançon, N. & Weiss, M. C. (2006). In vivo role of the HNF4alpha AF-1 activation domain revealed by exon swapping. *The EMBO journal*, 25(6), 1253-1262. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601021>
- Chandra, V., Huang, P., Potluri, N., Wu, D., Kim, Y. & Rastinejad, F. (2013). Multidomain integration in the structure of the HNF-4 α nuclear receptor complex. *Nature*, 495(7441), 394-398. <https://doi.org/10.1038/nature11966>
- Colclough, K., Bellanne-Chantelot, C., Saint-Martin, C., Flanagan, S. E. & Ellard, S. (2013). Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha and 4 alpha in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat*, 34(5), 669-685. <https://doi.org/10.1002/humu.22279>
- Duda, K., Chi, Y. I. & Shoelson, S. E. (2004). Structural basis for HNF-4alpha activation by ligand and coactivator binding. *J Biol Chem*, 279(22), 23311-23316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400864200>
- Eeckhoute, J., Formstecher, P. & Laine, B. (2004). Hepatocyte nuclear factor 4alpha enhances the hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of transcription. *Nucleic acids research*, 32(8), 2586-2593. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh581>
- Eeckhoute, J., Moerman, E., Bouckennooghe, T., Lukoviak, B., Pattou, F., Formstecher, P., ... Laine, B. (2003). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Isoforms Originated from the P1 Promoter Are Expressed in Human Pancreatic β -Cells and Exhibit Stronger Transcriptional Potentials than P2 Promoter-Driven Isoforms. *Endocrinology*, 144(5), 1686-1694. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0024>
- Fajans, S. S. & Bell, G. I. (2011). MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care*, 34(8), 1878-1884. <https://doi.org/10.2337/dc11-0035>
- Firdous, P., Nissar, K., Ali, S., Ganai, B. A., Shabir, U., Hassan, T. & Masoodi, S. R. (2018). Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 253. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00253>
- Flanagan, S. E., Kapoor, R. R., Mali, G., Cody, D., Murphy, N., Schwahn, B., ... Ellard, S. (2010). Diazoxide-responsive hyperinsulinemic hypoglycemia caused by HNF4A gene mutations. *Eur J Endocrinol*, 162(5), 987-992. <https://doi.org/10.1530/eje-09-0861>
- Foreman, J. W. (2019). Fanconi Syndrome. *Pediatr Clin North Am*, 66(1), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.09.002>
- Gaulton, K. J., Ferreira, T., Lee, Y., Raimondo, A., Mägi, R., Reschen, M. E., ... Consortium, D. I. G. R. A. M.-a. (2015). Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nature genetics*, 47(12), 1415-1425. <https://doi.org/10.1038/ng.3437>
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C. & Ladas, J. A. (1997). Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem*, 272(1), 539-550. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.539>
- Hamilton, A. J., Bingham, C., McDonald, T. J., Cook, P. R., Caswell, R. C., Weedon, M. N., ... Hattersley, A. T. (2014). The HNF4A R76W mutation causes atypical dominant

- Fanconi syndrome in addition to a β cell phenotype. *Journal of medical genetics*, 51(3), 165-169. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102066>
- Johansson, B. B., Irgens, H. U., Molnes, J., Sztromwasser, P., Aukrust, I., Juliusson, P. B., ... Njølstad, P. R. (2017). Targeted next-generation sequencing reveals MODY in up to 6.5% of antibody-negative diabetes cases listed in the Norwegian Childhood Diabetes Registry. *Diabetologia*, 60(4), 625-635. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4167-1>
- Ko, H. L., Zhuo, Z. & Ren, E. C. (2019). HNF4 α Combinatorial Isoform Heterodimers Activate Distinct Gene Targets that Differ from Their Corresponding Homodimers. *Cell Rep*, 26(10), 2549-2557.e2543. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.033>
- Lau, H. H., Ng, N. H. J., Loo, L. S. W., Jasmen, J. B. & Teo, A. K. K. (2018). The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver. *J Hepatol*, 68(5), 1033-1048. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.026>
- Laver, T. W., Colclough, K., Shepherd, M., Patel, K., Houghton, J. A., Dusatkova, P., ... Weedon, M. N. (2016). The Common p.R114W HNF4A Mutation Causes a Distinct Clinical Subtype of Monogenic Diabetes. *Diabetes*, 65(10), 3212-3217. <https://doi.org/10.2337/db16-0628>
- Lu, P., Rha, G. B., Melikishvili, M., Wu, G., Adkins, B. C., Fried, M. G. & Chi, Y.-I. (2008). Structural basis of natural promoter recognition by a unique nuclear receptor, HNF4 α . Diabetes gene product. *The Journal of biological chemistry*, 283(48), 33685-33697. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806213200>
- Malikova, J., Kaci, A., Dusatkova, P., Aukrust, I., Torsvik, J., Vesela, K., ... Bjørkhaug, L. (2020). Functional Analyses of HNF1A-MODY Variants Refine the Interpretation of Identified Sequence Variants. *J Clin Endocrinol Metab*, 105(4). <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa051>
- Marchesin, V., Pérez-Martí, A., Le Meur, G., Pichler, R., Grand, K., Klootwijk, E. D., ... Simons, M. (2019). Molecular Basis for Autosomal-Dominant Renal Fanconi Syndrome Caused by HNF4A. *Cell Rep*, 29(13), 4407-4421.e4405. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.066>
- Navas, M. A., Munoz-Elias, E. J., Kim, J., Shih, D. & Stoffel, M. (1999). Functional characterization of the MODY1 gene mutations HNF4(R127W), HNF4(V255M), and HNF4(E276Q). *Diabetes*, 48(7), 1459-1465. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.7.1459>
- Pearson, E. R., Starkey, B. J., Powell, R. J., Gribble, F. M., Clark, P. M. & Hattersley, A. T. (2003). Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet*, 362(9392), 1275-1281. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14571-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14571-0)
- Precechtelova, J., Borsanyiova, M., Sarmirova, S. & Bopegamage, S. (2014). Type I diabetes mellitus: genetic factors and presumptive enteroviral etiology or protection. *J Pathog*, 2014, 738512. <https://doi.org/10.1155/2014/738512>
- Roženková, K., Güemes, M., Shah, P. & Hussain, K. (2015). The Diagnosis and Management of Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 7(2), 86-97. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.1891>
- Rubio-Cabezas, O., Hattersley, A. T., Njølstad, P. R., Mlynarski, W., Ellard, S., White, N., ... Diabetes, I. S. f. P. a. A. (2014). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*, 15 Suppl 20, 47-64. <https://doi.org/10.1111/pedi.12192>
- Scott, R. A., Scott, L. J., Mägi, R., Marullo, L., Gaulton, K. J., Kaakinen, M., ... Consortium, D. I. G. R. A. M.-a. (2017). An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes*, 66(11), 2888-2902. <https://doi.org/10.2337/db16-1253>

- Søvik, O., Njølstad, P., Følling, I., Sagen, J., Cockburn, B. N. & Bell, G. I. (1998). Hyperexcitability to sulphonylurea in MODY3. *Diabetologia*, 41(5), 607-608. <https://doi.org/10.1007/s001250050956>
- Thanabalasingham, G. & Owen, K. R. (2011). Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). *BMJ*, 343, d6044. <https://doi.org/10.1136/bmj.d6044>
- Thomas, H., Jaschowitz, K., Bulman, M., Frayling, T. M., Mitchell, S. M. S., Roosen, S., ... Hattersley, A. T. (2001). 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*, 10(19), 2089-2097. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.19.2089>
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W. & Sawa, A. (2011). The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal*, 23(2), 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.003>
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26(2), 19-39.
- World Health Organization. (2021). Diabetes. Hentet fra <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Yang, Q., Yamagata, K., Yamamoto, K., Cao, Y., Miyagawa, J., Fukamizu, A., ... Matsuzawa, Y. (2000). R127W-HNF-4 α is a loss of function mutation but not a rare polymorphism and causes Type II diabetes in a Japanese family with MODY1. *Diabetologia*, 43(4), 520-524. <https://doi.org/10.1007/s001250051338>