



Høgskulen
på Vestlandet

BACHELOROPPGAVE

Subkloning og ekspresjon av villtype og
MODY5 assosiert Q147X HNF-1B

Subcloning and expression of wild type
and MODY5 associated Q147X HNF-1B

Pernille Juuhl, June Vestbø Steien & Karin Glesne

Bachelor i bioingeniørfag

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap

Veiledere: Lise Bjørkhaug Gundersen og Eunice Mchaina

Innleveringsdato: 22. mai 2023

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 autosomal dominant arvelig form for monogen diabetes karakterisert av β -celledysfunksjon, som oftest oppstår før fylte 25-35 år. Avhengig av hvilket gen som er affisert kan MODY deles inn i 14 ulike subtyper, der mutasjoner i *HNF1B* genet er assosiert med MODY5. HNF-1B proteinet er en transkripsjonsfaktor som regulerer en rekke gener i bukspyttkjertelen, nyre og lever. I dette bachelorprosjektet har nonsense mutasjonen Q147X (439C>T) vært utgangspunktet for analysen.

Metode: Ved hjelp av et TOPO TA kloningskit ble WT *HNF1B* og Q147X cDNA subklonet fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His. Vellykket kloning ble verifisert ved bruk av PCR, gelelektroforese og Sanger sekvensering. HeLa-celler ble transient transfektert med WT og Q147X i pcDNA3.1/V5-His plasmid, for å studere deteksjon, ekspresjon og subcellulær lokalisering av HNF-1B ved immunfluorescens analyse via V5-tag.

Resultater og konklusjon: Vellykket subkloning av WT *HNF1B* og Q147X cDNA ble utført med nytt TOPO TA kloningskit og optimalisering av PCR-reaksjon. Ekspresjon og deteksjon av WT og Q147X i transfekterte HeLa-celler var vellykket, og viste svakere uttrykk for Q147X HNF-1B. Subcellulær lokalisering ved immunfluorescens analyse viste at HNF-1B var lokalisert i både cytoplasma og kjerne for WT, men primært i cytoplasma for Q147X.

Nøkkelord: MODY, *HNF1B*, Q147X, TOPO TA kloning, subcellulær lokalisering.

Abstract

Introduction: Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is a rare autosomal dominant inherited form of monogenic diabetes characterized by a β -cell dysfunction, which most commonly occurs before the age of 25-35. Depending on the affected gene, MODY can be divided into 14 different subtypes, where mutations in the HNF1B gene are associated with MODY5. The HNF-1B protein is a transcription factor that regulates a variety of genes in the pancreas, kidney and liver. In this bachelor's project, the nonsense mutation Q147X (439C>T) has been the basis for the analysis.

Method: Using a TOPO TA cloning kit, WT HNF1B and Q147X cDNA were subcloned from pcDNA3.1/HisB to pcDNA3.1/V5-His. Successful cloning was verified through PCR, gel electrophoresis, and Sanger sequencing. HeLa cells were transiently transfected with WT and Q147X in pcDNA3.1/V5-His plasmid, to investigate the detection, expression and subcellular localization of HNF-1B using immunofluorescence analysis with a V5-tag.

Results and conclusion: Successful subcloning of WT HNF1B and Q147X cDNA was performed using a new TOPO TA cloning kit and optimization of the PCR reaction. Expression and detection of WT and Q147X in transfected HeLa cells was successful, revealing weaker expression of Q147X HNF-1B. Subcellular localization by immunofluorescence analysis showed that HNF-1B was localized in both the cytoplasm and nucleus for WT, but primarily in the cytoplasm for Q147X.

Keywords: MODY, *HNF1B*, Q147X, TOPO TA cloning, subcellular localization.

Forord

Dette interne bachelorprosjektet inngår som en del av den treårige utdanningen innen bioingeniørfag ved Høgskulen på Vestlandet (HVL). Laboratoriearbeidet ble utført på laboratorium for forskning og utvikling (FoU) ved HVL campus Bergen i perioden mars-mai 2023.

Stor takk til vår interne veileder Lise Bjørkhaug Gundersen for utmerket veiledning i forbindelse med gjennomføring av prosjektet og skriving av oppgaven.

Vi vil også takke doktorgradsstipendiat Eunice Mchaina for veiledning, og hjelp til å utføre immunfluorescens analyse på fluorescensmikroskop ved Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen.

Takk til Solveig Wangsholm og de andre ingeniørene for nyttige innspill og hjelp til å finne frem essensielle reagenser og utstyr på FoU-laboratoriet.

Høgskulen på Vestlandet, 22. mai 2023.

Pernille Juuhl
Pernille Juuhl

June Vestbø Steien
June Vestbø Steien

Karin Glesne
Karin Glesne

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	1
Abstract	2
Forord	3
Definisjoner og forkortelser	6
1. Introduksjon	7
1.1 <i>Diabetes mellitus</i>	7
1.2 <i>Maturity-onset diabetes of the young (MODY)</i>	8
1.3 <i>MODY5</i>	9
1.4 <i>Q147X HNF-1B</i>	10
1.5 <i>Problemstilling og formål</i>	11
2. Materiale	11
2.1 <i>Produkter til agarose gelelektroforese</i>	11
2.2 <i>Produkter til PCR og Sanger sekvensering</i>	12
2.3 <i>Produkter til TOPO TA kloning</i>	12
2.4 <i>Primere</i>	13
2.5 <i>Produkter til immunfluorescensanalyse</i>	14
2.6 <i>Instrumenter og software</i>	14
3. Metode	15
3.1 <i>Verifisering av HNF1B cDNA sekvens i pcDNA3.1/HisB plasmid</i>	15
3.1.1 <i>Amplifisering av HNF1B cDNA ved PCR</i>	15
3.1.2 <i>Analyse av PCR-produkt ved agarose gelelektroforese</i>	16
3.1.3 <i>Rensing av PCR-produkt ved ExoSAP-It</i>	17
3.1.4 <i>Sanger sekvensering</i>	17
3.2 <i>Kloning av WT HNF1B og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid</i>	18

3.2.1 Gammelt TOPO TA kloningskit	18
3.2.2 Nytt TOPO TA kloningskit	21
3.3 Ekspresjon og deteksjon av WT og Q147X HNF-1B protein	24
3.3.1 Celledyrking	24
3.3.2 Splitting av celler.....	24
3.3.3 Telling av celler	25
3.3.4 Transfeksjon for immunfluorescens analyse.....	25
3.3.5 Immunfluorescens analyse	25
4. Resultater	26
4.1 Verifisering av HNF1B cDNA sekvens i pcDNA3.1/HisB plasmid	26
4.2 Første kloningsforsøk av WT HNF1B og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid	29
4.3 Andre kloningsforsøk av WT HNF1B og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid	33
4.3.1 Konsentrasjon og kvalitet av WT HNF1B og Q147X i pcDNA3.1/V5-His plasmid	37
4.4 Ekspresjon og deteksjon av WT og Q147X HNF-1B protein	38
5. Diskusjon.....	40
5.1 Verifisering av HNF1B cDNA sekvens i pcDNA3.1/HisB plasmid	40
5.2 Kloning av WT HNF1B og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid	40
5.3 Ekspresjon og deteksjon av WT og Q147X HNF-1B protein	43
6. Konklusjon.....	45
7. Referanser	46

Definisjoner og forkortelser

EtBr	Ethidiumbromid
Gendeleksjon	Sletting av gen
<i>HNF1B</i>	Hepatocyte nuclear factor-1 beta (gen)
HNF-1B	Hepatocyte nuclear factor-1 beta (protein)
Insulinsekretagoger	Stoffer som stimulerer til insulin sekresjon [1]
Leseramme mutasjoner	Mutasjon hvor en eller flere baser settes inn eller slettes i den kodende delen av DNAet, og fører til at alle de påfølgende aminosyrene kodene endres [2]
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
Missense mutasjon	Punktmutasjon hvor en base byttes ut med en annen, som gjør at kodonet koder for en annen aminosyre [2]
MQ-vann	Milli-Q vann
NLS	Nukleært lokaliseringssignal
NMD	Nonsense-mediert mRNA-decay
Nonsense mutasjon	Punktmutasjon som fører til et for tidlig stopp-kodon [2]
PCR	Polymerase chain reaction
Rpm	Rotation per minute (sentrifugehastighet)
Splice-site mutasjon	Mutasjon som skjer på grensen mellom intron og ekson som enten kan føre til sletting av ekson eller innsetting av intron, og dermed endrer proteinsekvensen [3]
TOPO TA cloning	Topoisomerase basert tymin adenin kloning
WT	Wild type (villtype)

1. Introduksjon

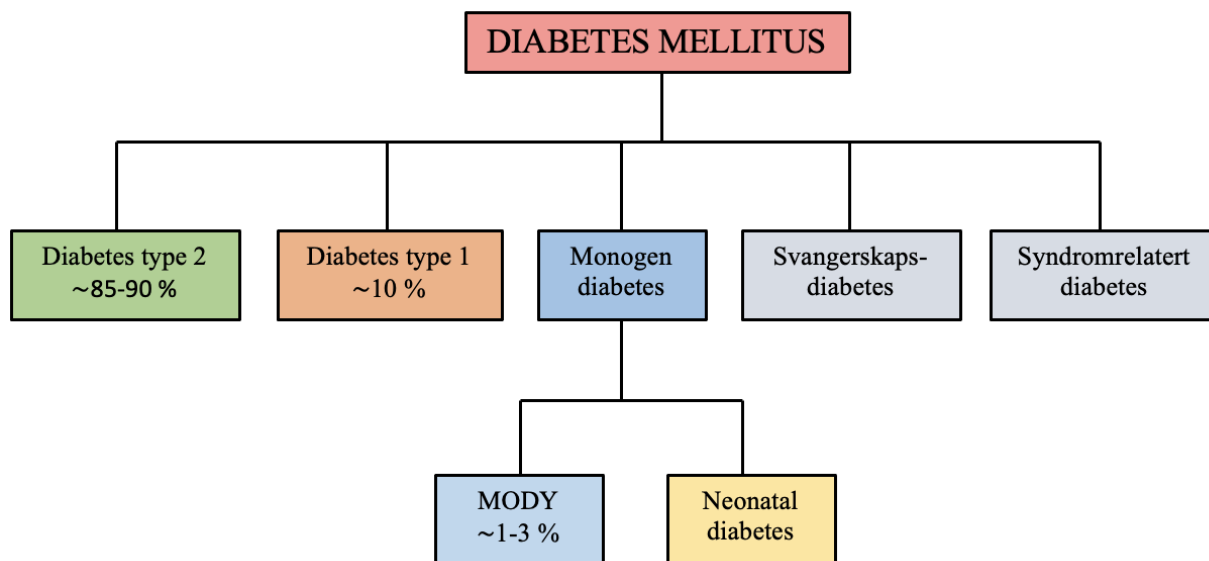
1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus er en gruppe metabolske sykdommer som oppstår når bukspyttkjertelens produksjon av hormonet insulin er nedsatt eller mangler helt [4]. Nedsatt eller manglende insulinproduksjon fører til en dysregulering av glukosekonsentrasjonen i blodbanen, som over tid kan føre til alvorlige skader på kroppens systemer [5]. Særlig øyne, nyrer, nerver, hjerte og blodårer er utsatt for dysfunksjon og svikt [4].

Glukose i blodet blir i hovedsak regulert av hormonene insulin og glukagon, og en balanse mellom disse hormonene er viktig for å opprettholde glukosehomeostase. Insulin produseres i β -cellene, og glukagon produseres i α -cellene i de Langerhanske øyene, som utgjør majoriteten av den endokrine delen av bukspyttkjertelen. Økt glukosenivå i blodet fører normalt til en sekresjon av insulin, som blant annet stimulerer til økt glukoseopptak i celler og vev. Primære celler og vev som forbruker glukose er hjerne, muskler, nyrer og røde blodlegemer. For hjernen er det spesielt viktig med en kontinuerlig tilførsel av glukose for at hjernecellene skal fungere optimalt [6, p. 241].

Glukose i cellene kan inngå i ulike metabolske prosesser, eksempelvis glykogenesen der glukose omdannes til glykogen i leveren for lagring. Et lavt glukosenivå i blodet stimulerer til sekresjon av glukagon som frigjør glukose fra glykogen i leveren, som igjen fører til økt glukose og opprettholdelse av glukosehomeostasen i blodet [6, p. 244].

Diabetes mellitus er en av de vanligste folkesykdommene i verden, og stadig flere mennesker utvikler og lever med diabetes. I Norge anslås det at omtrent 270 000 personer har en kjent diabetes diagnose som tilsvarer fem prosent av den norske befolkningen [7]. Diabetes mellitus kan grovt kategoriseres inn i diabetes type 1, diabetes type 2, svangerskapsdiabetes, sykdomsrelatert diabetes og monogen diabetes [8].



Figur 1: Inndeling av diabetes mellitus. Diabetes mellitus kan grovt deles inn i diabetes type 1, diabetes type 2, monogen diabetes, svangerskapsdiabetes og syndromrelatert diabetes. MODY kommer inn under monogen diabetes siden sykdommen skyldes mutasjon i ett enkeltgen.

1.2 Maturity-onset diabetes of the young (MODY)

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) er en autosomal dominant ikke-insulinavhengig form for monogen diabetes. Det er en sjelden type diabetes som rammer omtrent 1-3% av alle diabetikere, og oppstår som oftest før fylte 25-35 år [8]. MODY oppstår ved en enkelt genmutasjon som fører til at de insulinproduserende β -cellene i bukspyttkjertelen får nedsatt funksjon, som begrenser kroppens evne til å produsere nok insulin ut i blodet. Dette medfører høyere nivåer av blodsukker, og kan etter hvert føre til skadet kroppsvev i nyrene, nerver og øyne [9].

MODY deles inn i 14 ulike subtyper avhengig av hvilket gen som har blitt mutert. De hyppigst forekommende subtypene er MODY3, ved mutasjoner i *HNF1A*-genet, og MODY2 ved mutasjoner i *GCK*-genet. Mindre hyppige former er MODY1 som forårsakes av mutasjoner i *HNF4A*-genet, og MODY5 som oppstår ved mutasjoner i *HNF1B*-genet [10].

Diagnosen av MODY baserer seg på en glukosetest, i tillegg til at det utføres genetisk testing. Dersom resultatene fra glukosetesten indikerer diabetes, er det viktig med genetisk testing for avgjørelsen om det er MODY (og ikke diabetes type 1 eller 2), samt hvilken subtype av

MODY det gjelder. MODY kan ofte forveksles med diabetes type 1 eller type 2, men skiller seg ofte ut ved at det vanligvis foreligger en familiehistorie med diabetes i flere påfølgende generasjoner. Kliniske trekk ved MODY varierer avhengig av genmutasjoner, der noen pasienter kan oppleve mye mer påvirkelige symptomer og komplikasjoner enn andre gjennom livet [11]. Ett eksempel er MODY2, der pasienter har mild diabetes som ofte behandles med riktig kosthold, mens MODY1 og MODY3 pasienter behandles med insulin eller sulfonylureas (oralt medikament) [12].

En korrekt klassifisering av patologisk effekt av MODY-genmutasjoner har vist seg avgjørende for diagnostikk og persontilpasset medisin, og dermed videre optimal genetisk rådgivning og prediksjon av eventuelle komplikasjoner som oppstår senere i livet for pasienten [11]. Det har i denne bacheloroppgaven vært fokusert på *HNF1B* og mutasjon knyttet til den monogene diabetes formen MODY5.

1.3 MODY5

MODY5 (også kalt *HNF1B*-MODY) er den mest alvorlige av de 14 subtype. Sykdommen skyldes mutasjon i hepatocyte nuclear factor-1 beta (*HNF1B*) genet. HNF-1B er en transkripsjonsfaktor som regulerer transkripsjonen av en rekke gener i celler og vev i bukspyttkjertelen og andre organer, og er kritisk for normal embryonal utvikling og overlevelse [13]. Transkripsjonsfaktoren spiller også en viktig rolle i den tidlige utviklingen av nyre, lever, pankreas, kjønnsorgan og tarm [14].

Mutasjoner i *HNF1B*-genet assosiert med sykdom ble for første gang rapportert i 1997 av Horikawa Y et al, som en sjelden genetisk årsak til MODY [15]. Siden den gang har det i litteraturen blitt beskrevet over 100 ulike *HNF1B* mutasjoner, hvor 43 av disse er MODY relaterte [16]. Det har blitt rapportert om fullstendige gendeleasjoner, missense mutasjoner, leseramme mutasjoner, nonsense mutasjoner og splice-site mutasjoner [14]. Det finnes ingen klar genotype-fenotype-korrelasjon ved MODY5, da små genforandringer kan gi like alvorlige fenotyper som store gendeleasjoner. *HNF1B* mutasjoner er autosomt dominant arvelig, men oppstår også i flere tilfeller spontant [17].

Hos mennesker fører heterozygote mutasjoner i *HNF1B* genet til multiorgansykdom [17]. Pasienter med MODY assosierte *HNF1B* mutasjoner har først og fremst nedsatt insulinsekretorisk respons på glukose og insulinsekretagoger, og får gradvis svekket

insulinsekresjon [18]. MODY5 pasienter behandles derfor med insulin [8].

Heterozygote mutasjoner i *HNF1B* viser i tillegg svært variable fenotyper, der det mest fremtredende trekket har vært nyresykdom. Nefropatiene som er beskrevet er svært forskjellige, men skyldes alltid avvikende nyreutvikling. Hyppigst forekommende er nyrecyster, men enkelte pasienter opplever også å få nyremisdannelser (enkelt eller hestesko nyre), familiær hypoplastisk glomerulocystisk nyresykdom (GCKD) eller atypisk familiær hyperurikemi. Andre kliniske trekk er genitale misdannelser, unormale lever funksjonstester og pankreatisk atrofi [13].

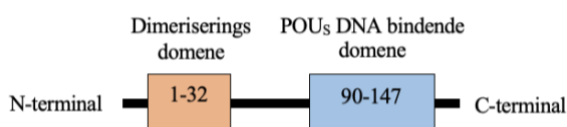


Figur 2: Skjematisk fremstilling av de funksjonelle domene i det kodende *HNF-1B* proteinet. Proteinets har tre funksjonelle hoveddomener; dimeriseringsdomene (aminosyre 1-32), et todelt DNA bindende domene (aminosyre 90-187 og 235-311) og et transaktiveringsdomene (aminosyre 312-557).

HNF1B er lokalisert på kromosom 17q12 og inneholder 9 eksoner. Det kodende *HNF-1B* proteinet har tre funksjonelle domener; dimeriseringsdomene, DNA-bindende domene og transaktiveringsdomene (Figur 2). Proteinets kan både binde til DNA som en homodimer og som en heterodimer med *HNF-1A* for å regulere transkripsjonen av gener [17].

1.4 Q147X *HNF-1B*

HNF1B mutasjonen som har vært i fokus i dette bachelorprosjektet er Q147X (439C>T) [19]. Dette er en nonsense mutasjon der glutamin i aminosyreposisjon 147 endres til et stoppkodon. Dette fører til at translasjonen av *HNF-1B* proteinet stopper ved aminosyre 147, i stedet for den fulle lengden på 557 aminosyrer.



Figur 3: Skjematisk fremstilling av det kodende trunkerte Q147X *HNF-1B* proteinet. Nesten halve det POU_S DNA bindende domenet, hele det POU_H DNA bindende domenet og transaktiveringsdomenet er fraværende som følge av det premature stoppkodonet.

Q147X mutasjonen ble først oppdaget hos to par kvinnelige søsken av fransk og italiensk opprinnelse [20]. De kliniske trekkene inkluderte diabetes, glomerulocystiske nyrer med redusert nyrestørrelse, i tillegg til kronisk nyresvikt som startet i løpet av de første levemånedene. Mødrene til begge søskenparene hadde også kronisk nyresvikt med lignende urografiske abnormiteter [21].

1.5 Problemstilling og formål

Underliggende molekylære årsaksmekanismer til MODY5 multiorgansykdom er ukjent. Dette er grunnet at de molekylære egenskapene til *HNF1B* og effekt av mutasjon på normalfunksjonen til HNF-1B i sykdomsvev og celler har blitt lite studert. For å få en bedre forståelse for de strukturelle og funksjonelle egenskapene til genet, vil det være nødvendig med flere molekylære (funksjonelle) studier. For å kunne utføre slike settes det krav til gode molekylære og cellebiologiske systemer, og robust deteksjon av villtype HNF-1B og HNF-1B mutanter. Prosjektet reiser ingen etiske spørsmål siden oppgaven omfatter en mutasjon som allerede er publisert, i tillegg til at prosjektet heller ikke genererer personsensitive data.

Formålet med denne bacheloroppgaven er å subklone WT *HNF1B* og mutant (Q147X) cDNA sekvens over i et mer optimalt mammalsk ekspresjonsplasmid for bruk i immunfluorescens analyse.

2. Materiale

2.1 Produkter til agarose gelelektroforese

Tabell 1: Produkter til agarose gelelektroforese.

Produkt	Produktnummer	Leverandør
SeaKem® LE Agarose	50002	Lonza
1 x TAE buffer	AC10089	OMEGA BIO-TEK
Ethidium Bromide Solution 1% BioChemica	A1152,0025	PanReac AppliChem
GelPilot Loading Dye, 5x	239901	QIAGEN
Lambda Hind III	3403	TAKARA BIO INC
Takara 100 bp Ladder	3407A	TAKARA BIO INC

2.2 Produkter til PCR og Sanger sekvensering

Tabell 2: Produkter benyttet til amplifisering av WT HNF1B og Q147X cDNA.

Produkt	Produktnummer	Leverandør
dNTPs	733-1363	VWR
VWR Taq DNA Polymerase	733-1302	VWR
10x Extra Buffer inkl MgCl ₂	733-1302	VWR
PCR-vann	SH30538.01	Fisher Scientific

Tabell 3: Produkter til rens av PCR-produkt før Sanger sekvensering.

Produkt	Produktnummer	Leverandør
ExoSAP-It	78201	Usb R
BigDye Seq. buffer	4336697	Thermo Fisher
BigDye v3.1	4336911	Thermo Fisher

2.3 Produkter til TOPO TA kloning

Tabell 4: Produkter for tillaging av agarskåler med ampicillin.

Produkt	Produktnummer	Leverandør
ImMedia TM Amp Agar pulver	10308022	Invitrogen TM
Agarskål	Ukjent	Ukjent
LB Broth with agar (Miller)	L3147-250G	Sigma-Aldrich

Tabell 5: Kit til kloningsreaksjoner.

Kit	Produktnummer	Leverandør
pcDNA TM 3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit	45-0005	Invitrogen

Tabell 6: Produkter til transformering og dyrkning av bakterier.

Produkt	Produktnummer	Leverandør
One Shot TM TOP10 Chemically Competent Cells	C404003	Invitrogen
S.O.C Medium	46-0700	Invitrogen
LB Broth (Lennox) Tablet microbial growth medium	L725-100TAB	Sigma life science

Tabell 7: Kit til rensing av plasmid.

Kit	Produktnummer	Leverandør
HiSpeed Plasmid Midi Kit (25)	12643	QIAGEN

2.4 Primere

Tabell 8: Primere til PCR, sekvenseringsreaksjon og kloningsreaksjon.

Primer	Nukleotidsekvens	Leverandør
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Sigma-Aldrich
BGH	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	Sigma-Aldrich
<i>HNF1B</i> cDNA 1F	5'-TTAGTGGAGGAATGCAAC-3'	Sigma-Aldrich
<i>HNF1B</i> cDNA 1R	5'-GTAGACACGGACCTCAGT-3'	Sigma-Aldrich
<i>HNF1B</i> cloning F	5'-ATGGTGTCCAAGCTCACGTCG-3'	Sigma-Aldrich
<i>HNF1B</i> cloning R	5'-CCAGGCTTGTAGAGGACACTG-3'	Sigma-Aldrich
Q147X cloning R	5'-CTGGTTCAGGCCGGTGACAT-3'	Sigma-Aldrich

2.5 Produkter til immunfluorescensanalyse

Tabell 9: Reagenser for kultivering og transfeksjon av HeLa-celler.

Produkt	Produktnummer	Leverandør
DMEM medium	2467189	Gibco
0,05% Trypsin-EDTA (1x)	2091505	Gibco
1xPBS	A9201,0010	AppliChem Panreac
OPTI-MEM (1x)	1858403	Gibco
Lipofectamine 2000	2117492	Invitrogen

Tabell 10: Reagenser til immunfluorescensanalyse.

Produkt	Produktnummer	Leverandør
Paraformaldehyd løsning 3%	8.18715	Merck
Tween-20	170-6531	Bio-Rad
Triton-X	9002-93-1	Sigma-Aldrich
BSA solution	9048-46-8	Sigma-Aldrich
ProLongTm Gold antifade reagent with DAPI	2491362	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific

2.6 Instrumenter og software

Tabell 11: Instrumenter.

Instrument	Leverandør
2720 Thermal Cycler	AB Applied Biosystems
NanoVue Plus™ Spektrofotometer	GE Healthcare
ChemiDoc™ XRS+	BioRad
SL 16R Centrifuge	Thermo SCIENTIFIC
TC20 TM Automated Cell Counter	BioRad
SL 16R Centrifuge	Thermo Scientific
ThermoMixer C	Eppendorf
Olympus FLUOVIEW FV3000	Olympus Life Science

Tabell 12: Software.

Software	Leverandør
Image Lab TM Software	BioRad
FinchTV	Gcospiza
ImageJ	National Institutes of Health

3. Metode

3.1 Verifisering av *HNF1B* cDNA sekvens i pcDNA3.1/HisB plasmid

Konsentrasjon av nedfrost pcDNA3.1/HisB *HNF1B* plasmid ble målt ved hjelp av optisk tetthet med NanoVue Plus™ Spektrofotometer (bølgelengde 260 nm). Konsentrasjonen av *HNF1B* plasmidet ble videre brukt til å lage en fortykning med sluttkonsentrasjon 40 ng/μL, som ble benyttet videre i PCR-reaksjoner.

3.1.1 Amplifisering av *HNF1B* cDNA ved PCR

PCR, polymerase chain reaction, er en metode som benyttes til å amplifisere korte DNA-sekvenser. Metoden bygger på DNA sin evne til å la seg denaturere ved høye temperaturer og hybridisere igjen ved lavere temperaturer. Reagenser som kreves i en PCR-reaksjon er enzymet DNA polymerase, de fire deoxyribonukleotid-trifosfatene dGTP (guanin), dATP (adenin), dCTP (cytosin) og dTTP (tymin), primere og et DNA templat. Reaksjonen krever både en revers og en forward primer, som må være komplementær med nukleotidsekvensen rett før starten av genet en ønsker å amplifisere på begge DNA-trådene [22, p. 342].

Polymerasekjedereaksjonen skjer i en tre trinns syklus i en PCR-maskin. Trinnene inkluderer denaturering, hybridisering og syntese. I første trinn (denaturering) varmes reaksjonen til 94-98 °C. Hydrogenbindingene mellom basene i DNA-tråden brytes opp, og resultatet er enkelttrådet DNA. I trinn to (hybridisering) senkes temperaturen igjen til 50-55 °C. Dette fører til at primerne hybridiserer til de enkelttrådede templat-trådene. I trinn tre (syntese) økes temperaturen igjen til cirka 70 °C. Dette fører til at DNA polymerase starter syntetiseringen av nye DNA-tråder utfra de frie 3'-OH-ende primerene [22, p. 342].

Primerkombinasjonene T7/BGH, T7/1R og 1F/BGH (Tabell 8) ble benyttet i hver sine respektive PCR-reaksjoner, med hver sin tilhørende negative kontroll. I et totalvolum på 50

μL i PCR-reaksjonen, ble det tilsatt 33,5 μL PCR-vann, 5,0 μL 10x Ekstra Buffer, 1,0 μL dNTPs (10 mM/nukleotid), 2,5 μL forward primer (10 μM), 2,5 μL revers primer (10 μM), 0,5 μL VWR Taq DNA polymerase (5 U/ μL) og 5 μL plasmid (40 ng/ μL). For de negative kontrollene ble det tilsatt 5 μL PCR-vann istedenfor 5 μL plasmid prøve. PCR-maskinen ble innstilt på følgende program (Tabell 13):

Tabell 13: Oppsett PCR-reaksjon for amplifisering av PCR produkt.

	Inneledende denaturering	PCR				Siste syntese	Hold
		25 sykluser			Syntese		
		Denaturering	Hybridisering	Syntese			
Temp.	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C	
Tid	3 min	30 sek	30 sek	1 min	7 min	∞	

3.1.2 Analyse av PCR-produkt ved agarose gelelektroforese

For å verifisere kvaliteten og bekrefte størrelse av PCR-produktene ved separasjon, ble produktene applisert på en 1,5% agarose gel for analyse ved gelelektroforese.

Gelelektroforese er en metode som benyttes til å adskille og identifisere fragmenter av DNA eller RNA. Ved strøm-påvirkning vil DNA fragmentene starte å vandre mot den positive polen, på grunn av negativ ladning i fosfodiester-binding. Gelen inneholder små porer som fragmentene vandrer gjennom. De korte fragmentene vandrer raskere gjennom gelen enn de lange, siden de møter mindre motstand. Både gelen og bufferen benyttet i gelelektroforese inneholder ethidiumbromid (EtBr). EtBr gjør det mulig å se DNA-fragmentene ved scanning med en UV-transilluminator. Ved å bruke en markør med kjente fragment størrelser er det mulig å bestemme størrelsen på ukjente DNA-fragmenter [22, p. 335].

For å oppnå en 1,5% agarose gel, ble 1,5 g agarosepulver løst i 100 mL 1x TAE buffer. Ved tillaging av 1x TAE buffer ble 50x TAE buffer fortynnet ved å tilsette 40 mL til 2000 mL MQ-vann. Etter koking og nedkjøling av gelløsningen ble det tilsatt 6,25 μL EtBr, og løsningen ble videre helt over i et geltrau. Stivnet gel ble plassert i et elektroforesekammer fylt med 1x TEA buffer, og 6,25 μL EtBr ble tilsatt til elektroforesebufferen ved den positive elektroden. 7,5 μL av hvert PCR-produkt ble blandet med 1,5 μL 5x Loading Buffer, for å oppnå en sluttkonsentrasjon på 1x. Prøvene ble applisert i hver sin brønn, og 4 μL Lambda

Hind III og 6 μL Takara 100 bp DNA Ladder ble benyttet som DNA-størrelsesmarkører. Deretter ble gelelektroforesen innstilt til 90 V i 45 minutter, før gelen ble analysert og resultater dokumentert ved bruk av ChemiDocTM XRS+.

3.1.3 Rensing av PCR-produkt ved ExoSAP-It

ExoSAP-It er et reagens som benyttes til å rense amplifisert PCR-produkt før DNA sekvensering. Reagenset virker enzymatisk ved å hydrolysere overflødige nukleotider og primere [23]. For tillaging av ExoSAP-It reaksjon for hvert PCR-produkt, ble det tilsatt 5 μL PCR-produkt, 3 μL ExoSAP-It reagens og 3 μL PCR-vann. Reaksjonene ble først inkubert ved 37 °C i 15 minutter, deretter ved 80 °C i tilsvarende tid på en PCR-maskin.

3.1.4 Sanger sekvensering

Sanger sekvensering er en metode som benyttes til å kunne lese av nukleotidsekvensen til en DNA tråd. En sekvenseringsreaksjon utføres på en PCR-maskin med kjede-avsluttende dideoxynukleotidtrifosfater (ddNTP), i tillegg til de andre PCR-reagensene (Tabell 2). ddNTP skiller seg fra vanlig dNTP ved at de mangler 3'OH-gruppen. Når ddNTPene blir lagt til den voksende nukleotidkjeden, vil de blokkere for videre forlengelse av kjeden. De fire basene er merket med fluorescein av ulik farge, som gjør dem mulig å detektere ved hjelp av en detektor. Siden de kjede-avsluttende ddNTPene bare blir inkorporert tidvis, vil hver syklus produsere et sett DNA-amplikoner som har blitt avsluttet ved forskjellige punkt i totalsekvensen. Produktene fra sekvenseringsreaksjonen blir så overført til en lang tynn kapillær gel, og separert ved elektroforese. En detektor leser av fargen til hvert bånd på gelen, og resultatene blir sendt videre til en programvare som presenterer baserekkefølgen som fargetopper i et diagram. Hver base har da sin representative fargetopp. Nukleotidsekvensen som leses av gelelektroforesen er komplementær til det originale DNA templatet [22, p. 346].

For oppsett av sekvenseringsreaksjon ble det tilsatt 5,8 μL PCR-vann, 1,5 μL BigDye Seq.buffer (5 x) og 1,0 μL BigDye v3.1 (2,5 x) til hvert rør i en PCR-strips. Det ble deretter tilsatt 0,5 μL primerløsning av enten T7, BGH, 1R eller 1F (10 μM). Til slutt ble det tilsatt 1,2 μL ExoSAP-It produkt fra PCR-produkt amplifisert med relevante primerkombinasjoner, til et totalvolum på 10 μL . Etter tilsetning av BigDye v3.1 ble prøvene lysbeskyttet, ettersom reagenset inneholder fluorescerende ddNTPs. Deretter ble prøvene satt på PCR-maskinen og innstilt til programmet angitt i Tabell 14.

Tabell 14: Oppsett av program for sekvenseringsreaksjon.

	Inneledende denaturering	Syklisk sekvenseringsreaksjon			Kjøling
		25 sykluser			
		Denaturering	Hybridisering	Syntese	
Temp.	96 °C	96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
Tid	1 min	10 sek	5 sek	4 min	∞

Etter endt sekvenseringsreaksjon ble prøvene sendt opp til avdeling for medisinsk genetikk (MGM) på Haukeland Universitetssykehus for Sanger sekvensering. Der ble prøvene rensset med et BigDye XTerminator Purification Kit, for så å bli analysert på ABI 3730 DNA Analyser. Analysen av DNA sekvensene for plasmidet ble visualisert ved hjelp av FinchTV. Sekvensen ble deretter sammenlignet opp mot GenBank accession no. X58840, som tilsvarende den opprinnelige klonede *HNF1B* cDNA sekvensen [24]. Sekvens for pcDNA3.1/HisB plasmidet ble sammenlignet med cDNA sekvens for *HNF1B* ved å utføre en BLAST.

3.2 Kloning av WT *HNF1B* og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid

3.2.1 Gammelt TOPO TA kloningskit

Det ble satt opp en TOPO TA kloning, topoisomerasebasert tymin adenin kloning, for WT *HNF1B* og Q147X fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid. Valg av kloningsplasmid var basert på å utvide mulighetene for deteksjon av HNF-1B proteinet uttrykt i celler, via V5-tag. TOPO TA kloning er en forenklet og effektiv molekylærbiologisk teknikk der DNA-fragmenter kan klones inn i et spesifikt plasmid. Denne kloningsmetoden krever ikke bruk av restriksjonsenzym, gel-basert rensing av cDNA/plasmid før kloning, eller tilførsel av DNA-ligase. Taq-polymerasen som benyttes har en ikke-templat avhengig terminal transferaseaktivitet slik at en enkel deoksyadenosin blir tilført til 3'-enden av PCR-produktene. Denne egenskapen utnyttes i TOPO TA kloning [25].

I forkant av kloningen ble det utført en PCR-reaksjon for amplifisering av WT *HNF1B* og Q147X cDNA. For WT ble primerkombinasjonen *HNF1B* cloning F/*HNF1B* cloning R

benyttet, og for Q147X ble *HNF1B* cloning F/Q147X cloning R benyttet. *HNF1B* cloning F starter ved og inkluderer *HNF1B* startkodonet ATG. *HNF1B* cloning R ekskluderer det normale stoppkodonet TGA i *HNF1B*, slik at leserammen fortsetter til og med V5-tag i plasmidet, som fusjoneres sammen med *HNF1B* og sikrer funksjonen via V5-tag. Kombinasjonen *HNF1B* cloning F/Q147X cloning R inkluderer kun de første 438 nukleotidene, som tilsvarer de 146 aminosyrene i HNF-1B proteinet ved translasjon, mens stopp-kodonet blir erstattet med aminosyren glutamin slik at leserammen fortsetter til og med V5-tag.

PCR-reaksjonen inkluderte 0,625 μL DNA templat *HNF1B* i pcDNA3.1/HisB (40 ng/ μL), 5 μL 10x Extra buffer inkl MgCl_2 , 0,5 μL dNTPs (10 mM/nukleotid), 2,5 μL *HNF1B* cloning F primer (10 μM), 2,5 μL *HNF1B* cloning R primer eller Q147X cloning R primer (10 μM), 1 μL VWR Taq Polymerase (5 U/ μL) og resterende med MQ-vann for å oppnå et totalvolum på 50 μL . Det ble satt opp en PCR-reaksjon for WT *HNF1B* og en for Q147X. PCR-programmet som ble brukt er angitt i Tabell 13, der siste syntese ble økt til 15 minutter basert på anbefalinger fra kit produsent.

Amplifisering, størrelse og kvalitet (renhet) av PCR-produktene ble verifisert ved gelelektroforese på en 1,5% agarosegel, og ved bruk av størrelsesmarkørene Takara og Lambda Hind III. PCR-produktene ble oppbevart i kjøleskap inntil videre bruk.

3.2.1.1 TOPO TA kloningsreaksjon

I et totalvolum på 5 μl ble det tilsatt 1,0 μL NaCl (1 M), 0,8 μL MgCl_2 (60 mM), 0,9 μL MQ-vann og 1,0 μL TOPO plasmid pcDNA3.1/V5-His, i tillegg til 1,3 μL av enten WT *HNF1B* eller Q147X PCR-produkt. For negativ kontroll ble det tilsatt PCR-vann istedenfor PCR-produkt. Reaksjonene inkuberte deretter ved romtemperatur i 10 minutter, og satt på is før videre arbeid med transformering av klonede plasmider (henviser til seksjon 3.2.1.3).

3.2.1.2 Tillaging av agarskåler med ampicillin

ImMedia TM Amp Agar pulver ble tilsatt 200 mL MQ-vann, varmet opp i mikrobølgeovn og løst til en homogen blanding. Løsningen ble fordelt på fire skåler for dyrking av *E. coli* bakterier (TOP10 celler) med innklonet WT *HNF1B* og Q147X, samt en positiv og en negativ kontroll.

3.2.1.3 Transformering av klonede plasmider

For transformering av plasmider ble 2 μL TOPO kloningsreaksjon fra WT og Q147X overført til hvert sitt forhåndstinte rør med One Shot TOP10 chemically competent *E. coli* celler. Som positiv kontroll ble det tilsatt 1 μL PUC plasmid og som negativ kontroll ble det tilsatt 2 μL PCR-vann, til hvert sitt rør med kompetente *E. coli* celler. Rørene ble inkubert på is i 15 min, før de ble utsatt for heat-shock i 30 sekunder i et 42 °C vannbad, for at bakterieveggen skal åpne seg og ta opp plasmidet. Umiddelbart etter heat-shock ble rørene satt på is for at bakterieveggen skulle lukke seg. Det ble tilsatt 250 μL romtemperert SOC medium til alle rørene, som deretter ble inkubert i risteinkubator (100 rpm) ved 37 °C i 1 time.

Bakteriesuspensjonen (100 μL) ble fordelt fra hvert rør til fire agarskåler, som deretter ble inkubert i varmeskap ved 37 °C over natten (rundt 16 timer). Dagen etterpå ble skålene undersøkt for kolonivekst. Utransformerte *E. coli* bakterier overlever ikke på agarskåler med ampicillin, mens ved vellykket kloning av WT *HNF1B* og Q147X forventes det vekst siden pcDNA3.1/V5-His plasmidet inneholder et ampicillin resistent gen.

3.2.1.4 Analyse av positive kloner/kolonier

Det ble først plukket 8 kolonier fra skål med WT *HNF1B* og 8 kolonier fra skål med Q147X ved hjelp av en pipettespiss. Koloniene ble overført til hvert sitt eppendorfrør tilsatt 20 μL PCR-vann. Suspensjonene ble blandet på vortex mixer i 10 sekunder, og deretter oppbevart i kjøleskap.

Det ble satt opp en PCR-reaksjon for hver av koloniene løst i PCR-vann, plukket fra skåler med henholdsvis WT og Q147X. PCR-reaksjonen for hver prøve bestod av 38,5 μL PCR vann, 5,0 μL 10x Extra Buffer inkl MgCl_2 , 1,0 μL dNTPs (10 mM/nukleotid), 2,5 μL T7 primer (10 μM), 2,5 μL BGH primer (10 μM), 0,5 μL VWR Taq DNA Polymerase (5 U/ μL) og 1,0 μL bakterie i vann, i et totalvolum på 51 μL . I tillegg ble det også satt opp en negativ kontroll der bakterie i vann ble erstattet med PCR-vann. Henviser til Tabell 13 for oppsett av PCR-reaksjonene.

PCR produktene, negativ kontroll og størrelsesmarkørene Takara og Lambda Hind III ble videre applisert på en 1,5% agarose gel. Elektroforesen ble innstilt til 90 V i 45 minutter, før gelen ble analysert og resultater dokumentert ved bruk av ChemiDocTM XRS+.

Basert på negativ kloning fra analyse av de første koloniene, ble det plukket ytterligere 10 kolonier fra hver av skålene med WT *HNF1B* og Q147X. Samtlige kolonier ble analysert ved PCR og gelelektroforese, ved samme oppsett som tidligere.

3.2.1.5 Rensing av PCR-produkt ved ExoSAP-It

Kolonier som viste mest lovende resultat med henhold til deteksjon av korrekt størrelse klonet cDNA, ble selektert for videre analyse. Fra WT ble PCR-produktene fra koloni #1, #2, #7 og #8 selektert til ExoSAP-It rensing, mens fra Q147X ble PCR-produktene fra koloni #2 og #3 selektert. Henviser til seksjon 3.1.3 for rensing av PCR-produkt ved ExoSAP-It.

3.2.1.6 Sekvenseringsreaksjon

Det ble satt opp en sekvenseringsreaksjon for rensert PCR-produkt for de selekterte koloniene (henviser til seksjon 3.2.1.5). For hvert ExoSAP-It produkt ble det satt opp 2 reaksjoner, der 2,5 µL T7 primer (10 µM) og 2,5 µL BGH primer (10 µM) ble benyttet individuelt. Hvert av PCR-rørene ble tilsatt 5,8 µL PCR-vann, 1,5 µL BigDye Seq.Buffer (5x), 1,0 µL BigDye v3.1 (2,5x) og 1,2 µL tilsvarende ExoSAP-It produkt for hver koloni, i et totalvolum på 12 µL. Henviser til Tabell 14 for oppsett på PCR-maskin. Sekvensreaksjonene ble så sendt til avdeling for medisinsk genetik (MGM) på Haukeland Universitetssykehus for avlesning. Sekvensene ble prosessert og analysert som oppgitt i seksjon 3.1.4, og sammenlignet med sekvensen for *HNF1B* cDNA (GenBank accession no. X58840) [24].

3.2.2 Nytt TOPO TA kloningskit

3.2.2.1 Tillaging av nye agarskåler med ampicillin

For tillaging av agarskåler ble 7 g LB Broth agar målt opp og tilsatt 200 mL MQ-vann. Blandingen ble videre varmet opp i mikrobølgeovn til alt pulver var løst opp. Deretter ble løsningen noe avkjølt og tilsatt 200 µL ampicillin (100 µg/µL), før agar ble fordelt på skåler.

3.2.2.2 Ny PCR-reaksjon for amplifisering av WT HNF1B og Q147X

Det ble satt opp en ny PCR-reaksjon for amplifisering av WT *HNF1B* og Q147X mutant med nye betingelser. I PCR-programmet (Tabell 13) ble hybridiseringsgraden økt til 56 °C og siste syntese ble økt til 20 minutter. Henviser til seksjon 3.2.1 for oppsett av PCR-reaksjon, men

der mengde DNA-templat (40 ng/ μ L) ble endret til 0,375 μ L og MQ-vann ble erstattet med sterilt vann.

PCR-produktene og størrelsesmarkørene Takara og Lambda Hind III ble applisert på en 1,5% agarose gel innstilt til 90 V i 45 min. Gelen ble fotografert ved bruk av ChemiDoc™ XRS+.

3.2.2.3 Ny TOPO TA kloningsreaksjon og transformering for WT og Q147X

Det ble satt opp en ny TOPO TA kloningsreaksjon for WT og Q147X med et nytt reagenskitt fra Invitrogen by Thermo Fisher scientific. I tillegg ble mengden av PCR-produkt endret til 0,8 μ L for WT og 1 μ L for Q147X. Saltløsningene fra gammelt kit ble erstattet med en ny saltløsning (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂), som det ble tilsatt 1,0 μ L av. Kittet inneholdt også sterilt vann som ble benyttet istedenfor PCR-vann. Ellers ble det satt opp samme TOPO TA kloningsreaksjon som tidligere. Henviser til seksjon 3.2.1.1 for videre detaljer.

Henviser til seksjon 3.2.1.3 for fremgangsmåte av transformeringen av WT og Q147X inn i E. coli bakterier, og spredning av bakterier på agarskåler med ampicillin.

3.2.2.4 Plukking av nye kolonier fra WT og Q147X for analyse

Det ble totalt plukket 16 kolonier fra nye tillagde agarskåler med WT og 10 kolonier fra Q147X. Henviser til seksjon 3.2.1.4 for fremgangsmåte. Vi gikk så videre med bakterie #11, #14 og #15 fra WT og #1, #2, #3, #6, #7, #9 og #10 fra Q147X.

For å teste ut teorien om positivt PCR-produkt er en indikasjon på at Q147X er klonet inn “riktig vei”, ble det satt opp en ny PCR-reaksjon for Q147X med primerkombinasjonen T7/Q147X cloning R. Henviser til seksjon 3.2.1.4 for oppsett av PCR-reaksjon.

3.2.2.5 Analyse av klonede plasmider

PCR-produkt fra koloni #11, #14 og #15 fra WT og #1, #3, #6 og #9 fra Q147X ble rensset ved ExoSAP-It (henviser til seksjon 3.1.3). Rensset PCR-produkt ble benyttet i en sekvenseringsreaksjon, se seksjon 3.2.1.6 for fremgangsmåte. Henviser til seksjon 3.1.4 for fremgangsmåte til analyse av DNA sekvenser.

3.2.2.6 Kultivering av bakterier

For tillaging av LB medium ble 10 LB Broth (Lennox) tabletter tilsatt 500 mL MQ-vann. Løsningen ble autoklavert for å gjøre mediet sterilt, deretter ble det tilsatt 500 µL ampicillin (100 µg/µL). Det ble laget prekulturer der 3 µL av koloni #1 og #6 fra Q147X og #1 og #4 fra WT ble blandet med 3 mL LB medium med ampicillin. Prekulturene ble så satt i varmeskap ved 37 °C på risting (80 rpm) i 5,5 timer. Videre ble 1 mL fra prekulturene tilsatt i 50 mL LB medium med ampicillin. Kulturene ble så satt i varmeskap ved 37 °C på risting (100 rpm) over natten.

3.2.2.8 Rensing av plasmid

Kulturene #11 og #14 for WT og #1 og #6 for Q147X ble overført til 50 mL falcon rør, og sentrifugert ved 6000 x g i 15 min ved 4 °C. Supernatantet ble fjernet, og 6 mL Buffer P1 ble tilsatt bakteriepelleten og resuspendert til en homogen blanding. Deretter ble 6 mL Buffer P2 tilsatt, og inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. Etter inkuberingen ble det tilsatt 6 mL Buffer P3. Buffer P1, P2 og P3 lyses bakterieveggen slik at plasmidet skilles ut.

Lysatet ble overført til en QIAfilter Cartridge, og inkubert ved romtemperatur i 10 minutter. En HiSpeed Tip ble ekvilibrert med 4 mL Buffer QBT, ved å la bufferløsningen renne gjennom filteret. Deretter ble lysatet filtrert fra QIAfilter Cartridge over i HiSpeed Tip. HiSpeed Tip ble så vasket med 20 mL Buffer QC. DNA ble deretter eluert med 5 mL Buffer QF og utfelt ved tilsetning av 3,5 mL isopropanol, som ble blandet godt før videre inkubering i 5 minutter. Etter inkuberingen ble det benyttet en QIAprecipitator Module til å overføre eluat-isopropanol miksturen til et avfallsrør. DNA ble deretter vasket ved å tilsette 2 mL 70% etanol, og videre ble luft presset gjennom QIAprecipitator Module gjentatte ganger for å tørke membranen. QIAprecipitator ble festet til en 5 mL sprøyte og tilsatt 1 mL Buffer TE som eluerte DNA over i et eppendorfrør. Til slutt ble DNA repetert eluert i sitt respektive eppendorfrør.

Konsentrasjonen til plasmidene ble målt ved hjelp av optisk tetthet med NanoVue Plus™ Spektrofotometer (bølgelengde 260 nm).

3.2.2.9 Kvalitet på rensede plasmider

Det ble laget en ny agarosegel på 1% for plasmid #11 og #14 fra WT og #1 og #6 fra Q147X, for å vurdere renheten til de rensede plasmidene. 0,5 µg av plasmidene ble applisert på agarosegelen sammen med størrelsesmarkøren Lambda Hind III. Videre ble det utført en gelelektroforese på 90 V i 1 time, før gelen ble analysert og fotografert ved bruk av ChemiDoc™ XRS+.

3.3 Ekspresjon og deteksjon av WT og Q147X HNF-1B protein

3.3.1 Celledyrking

Cellelinjen som ble benyttet i dette bachelorprosjektet er HeLa-celler. Dette er en immortalisert cellelinje som er hentet fra human livmorhalskreft (cervix cancer). HeLa-celler uttrykker ikke endogen HNF-1B, og er dermed en ideell cellelinje for diverse funksjonelle analyser av WT og Q147X mutant uten interferens av endogen HNF-1B. Arbeid med HeLa-cellene ble utført i avtrekk på cellelab. Cellene ble dyrket i DMEM medium tilsatt pyruvat (110 mg/L), L-glutamin (584 mg/L), glukose (4500 mg/L) og 10% FBS (fetal bovint serum), i tillegg til en Pen-Strep løsning med penicillin (100 U/mL) og streptomycin (100 U/mL). HeLa-cellene ble dyrket opp i 25 cm² flasker i 5% CO₂ ved 37 °C. Etter opptining fra -150 °C frys ble det tilsatt 500 µL forvarmet (37 °C) cellemedium. Cellene ble så overført til et 15 mL falcon-rør med 7 mL ferskt medium, før de ble sentrifugert på 1300 rpm i 3 minutter ved romtemperatur. Supernatantet ble aspirert vekk, og cellepelleten ble resuspendert i 7 mL ferskt medium. HeLa-cellene ble deretter fordelt i to 25 cm² flasker, hvor det ble tilsatt 3,5 mL ferskt medium. Cellene ble så satt i inkubatorskap over helgen ved samme betingelser som oppgitt over.

3.3.2 Splitting av celler

HeLa-cellenes konfluens ble først visualisert og vurdert i lysmikroskop. For splitting av cellene ble cellemediumet fjernet, og cellene ble vasket med 10 mL romtemperert 1x PBS. Etter å ha aspirert vekk PBS, ble det tilsatt 1 mL 0,05% Trypsin-EDTA som svekker cellenes adhesjon til flasken [26]. Cellene ble så satt til inkubering i 5% CO₂ ved 37 °C i 5 minutter. Etter inkubering ble det bekreftet ved lysmikroskopi at cellene hadde løsnet fra bunnen av flasken. Det ble så tilsatt 9 mL romtemperert cellemedium, før løsningen ble overført til et 15

mL falcon-rør og sentrifugert på 1300 rpm i 3 minutter ved romtemperatur. Etter sentrifugeringen ble supernatantet aspirert vekk, og cellepelleten ble resuspendert i 10 mL cellemedium.

3.3.3 Telling av celler

For å beregne riktig volum cellesuspensjon å tilsette i 6-brønners platen, ble cellene talt ved hjelp av Countless™ Automated Cell Counter. Det er anbefalt å tilsette 200 000 celler per brønn for en optimal transfeksjon.

3.3.4 Transfeksjon for immunfluorescens analyse

Før tilsetning av celler for transfeksjon, ble det plassert et dekkglass i bunnen av brønnene i et 6-brønners platen merket utransfektet, WT og Q147X. Brønnene og dekkglassene ble vasket med 1 mL 70% EtOH, inkubert 5 minutter på benk, og så vasket to ganger med 2 mL 1x PBS. Det ble tilsatt 100 µL Opti-MEM til tre eppendorfrør merket følgende; utransfektet, WT og Q147X. Deretter ble det tilsatt 2 µg av WT plasmid og Q147X plasmid til sine respektive rør. Videre ble det tilsatt 6 µL Lipofectamin til alle eppendorfrørene. Løsningene ble blandet og inkubert på benk i 5 minutter. Etter inkuberingen ble løsningene tilsatt dråpevis i sine respektive brønner. Platen ble “swirlet” forsiktig før cellene ble satt til inkubering i 5% CO₂ ved 37 °C i 5 timer. Etter inkuberingen ble cellemediumet aspirert vekk og cellene tilsatt 2 mL ferskt medium, dette for å unngå toksisk effekt av Lipofectamin over tid. Deretter ble cellene satt tilbake i inkubatorskapet over natten.

3.3.5 Immunfluorescens analyse

Videre arbeid med cellene i 6-brønners platen ble utført på FoU-lab. Cellene ble først vasket med 2 mL forvarmet (37 °C) 1x PBS, og så fiksert med 150 µL 3% paraformaldehyd (PAF) løsning i 30 minutter ved romtemperatur. Formålet med PAF er å skape kovalente tverrbindinger mellom molekylene, som binder dem sammen i et uløselig nettverk. Dette endrer celleoverflaten sine mekaniske egenskaper. Cellefiksering er viktig for å bevare celleprøver til biologiske analyser [27].

Etter inkuberingen ble cellene vasket med 2 mL vaskebuffer (0,1% Tween-20 in 1xPBS) i 3 x 5 minutter, under risting (300 rpm) ved romtemperatur på en ThermoMixer C. Videre ble cellene permeabilisert ved tilsetning av 500 µL permeabiliseringsbuffer (1xPBS, 0,1%

Tween-20, 0,1% Triton-X) og inkubert i 20 minutter ved romtemperatur, før cellene ble vasket på nytt med vaskebuffer i 3 x 5 minutter under risting (300 rpm).

Permeabiliseringsbuffer forbedrer interaksjonen mellom primære antistoff med nukleære og cytoplasmatiske målproteiner, og lar antistoffet passere inn i cellen via cellemembranen. Det gir tilgang til intracellulære antigener [28].

400 μL blocking buffer (2% BSA i vaskebuffer) ble tilsatt til cellene, og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. Blocking buffer forsterker sensitiviteten til analysen ved å fjerne bakgrunnsinterferens, og forhindrer uspesifikk binding med antistoff [29].

Det ble så laget en løsning med 1 μL primært antistoff anti-V5 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) i 1000 μL 0,1% BSA løsning, som tilsvarte et fortynningsforhold på omtrent 1:1000. Det ble også laget en 1:1000 løsning med 1 μL av det sekundære antistoffet Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor plus 488 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), og 1000 μL blocking buffer. Først ble 100 μL av løsningen med primært antistoff tilsatt dråpevis direkte på cellene i hver brønn, og så inkubert i 2 timer ved romtemperatur. Etter inkuberingen ble cellene vasket med 1 mL vaskebuffer i 3 x 5 minutter under risting (300 rpm), før 100 μL av løsningen med sekundært antistoff ble tilsatt dråpevis direkte på cellene i hver brønn, og inkubert lysbeskyttet i 1 time ved romtemperatur.

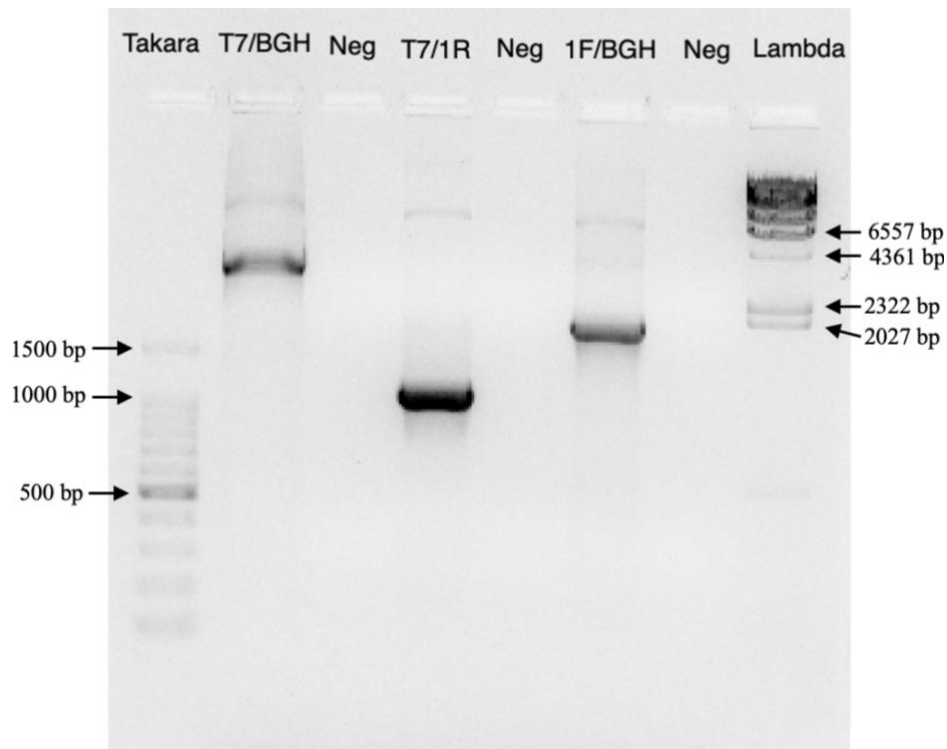
Etter inkubering ble cellene vasket med 1 mL vaskebuffer og inkubert ved 4 °C over natt under risting (300 rpm). Dagen etter ble cellene vasket på nytt med 2 mL vaskebuffer i 10 minutter ved romtemperatur. Dekkglassene fra hver av brønnene ble overført til en glassplate tilsatt 10 μL mounting løsning, som inneholder DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole). Glassplatene med dekkglassene ble til slutt inkubert lysbeskyttet i 12 timer ved romtemperatur, før cellene ble analysert på fluorescensmikroskopet Olympus Fluoview FV3000, ved Institutt for biovitenskap, Universitetet i Bergen.

4. Resultater

4.1 Verifisering av *HNF1B* cDNA sekvens i pcDNA3.1/HisB plasmid

For å verifisere cDNA sekvensen til et lenge lagret *HNF1B* plasmid før subkloning, ble først konsentrasjonen til *HNF1B* cDNA i pcDNA3.1/HisB plasmid målt på NanoVue Plus™ Spektrofotometer (bølgelengde 260 nm). Beregninger ut ifra to målte paralleller (479,0 ng/ μL og 427,5 ng/ μL) tilsvarer en gjennomsnittskonsentrasjon på 453 ng/ μL . Fortynningsformelen

ble benyttet til å lage en alikvot på 100 μ L med sluttkonsentrasjon 40 ng/ μ L. Plasmidet ble videre benyttet i en påfølgende PCR-reaksjon for amplifisering av hele cDNA sekvensen. For dette ble primerkombinasjonene T7/BGH, T7/1R og 1F/BGH benyttet. Produktene ble videre analysert ved agarose gelelektroforese (Figur 4).



Figur 4: Analyse av PCR-produkt amplifisert fra *HNF1B* cDNA i *pcDNA3.1/HisB* plasmid ved agarose gelelektroforese (1,5%). Størrelsesmarkørene Takara og Lambda *Hind III* ble benyttet til å beregne båndstørrelse av plasmidet. Størrelsen på båndene er angitt i basepar (bp).

Primerkombinasjonen T7/BGH skal amplifisere totalssekvensen av *HNF1B* cDNA, samt ekstra klonet intronsekvens (intron 9) og noe av plasmid sekvensen. PCR-produktet skal ha en teoretisk båndstørrelse på omtrent 4000 bp. T7/1R primerkombinasjonen skal amplifisere første del av *HNF1B* sekvensen, og ha en forventet båndstørrelse på omtrent 1100 bp. 1F/BGH primerkombinasjonen skal amplifisere siste del av *HNF1B* sekvensen, og ha en forventet båndstørrelse på omtrent 1800 bp. Størrelsene på PCR-produkt basert på gelelektroforesen (Figur 4) stemmer overens med det de teoretisk er forventet å være. I tillegg viser alle PCR-produktene antydning til noen uspesifikke bånd på rundt 6500 bp, samt noen svake “smears”. De tre negative kontrollene viser ingen bånd. Båndstørrelsene er beregnet ved hjelp av størrelsesmarkørene Takara og Lambda *Hind III*, der separasjonen av Takara er god, mens separasjonen av Lambda *Hind III* er mindre fullstendig og gjør vurdering av PCR-produkt størrelser noe unøyaktig.

PCR-produktene ble videre renset ved ExoSap-It før sekvensreaksjoner ble satt opp. Primere brukt til sekvensering var de samme som ble benyttet i den tidligere PCR-reaksjonen. Sekvensdata ble videre analysert i FinchTV og sammenlignet med oppgitt klonet cDNA sekvens (GenBank accession no. X58840) beskrevet i litteraturen [24]. Figur 5 viser en illustrasjon av sekvensen for *HNF1B* i pcDNA3.1/HisB amplifisert opp av T7, BGH, 1F og 1R.

Dobbeltrådet *HNF1B* cDNA sekvens:

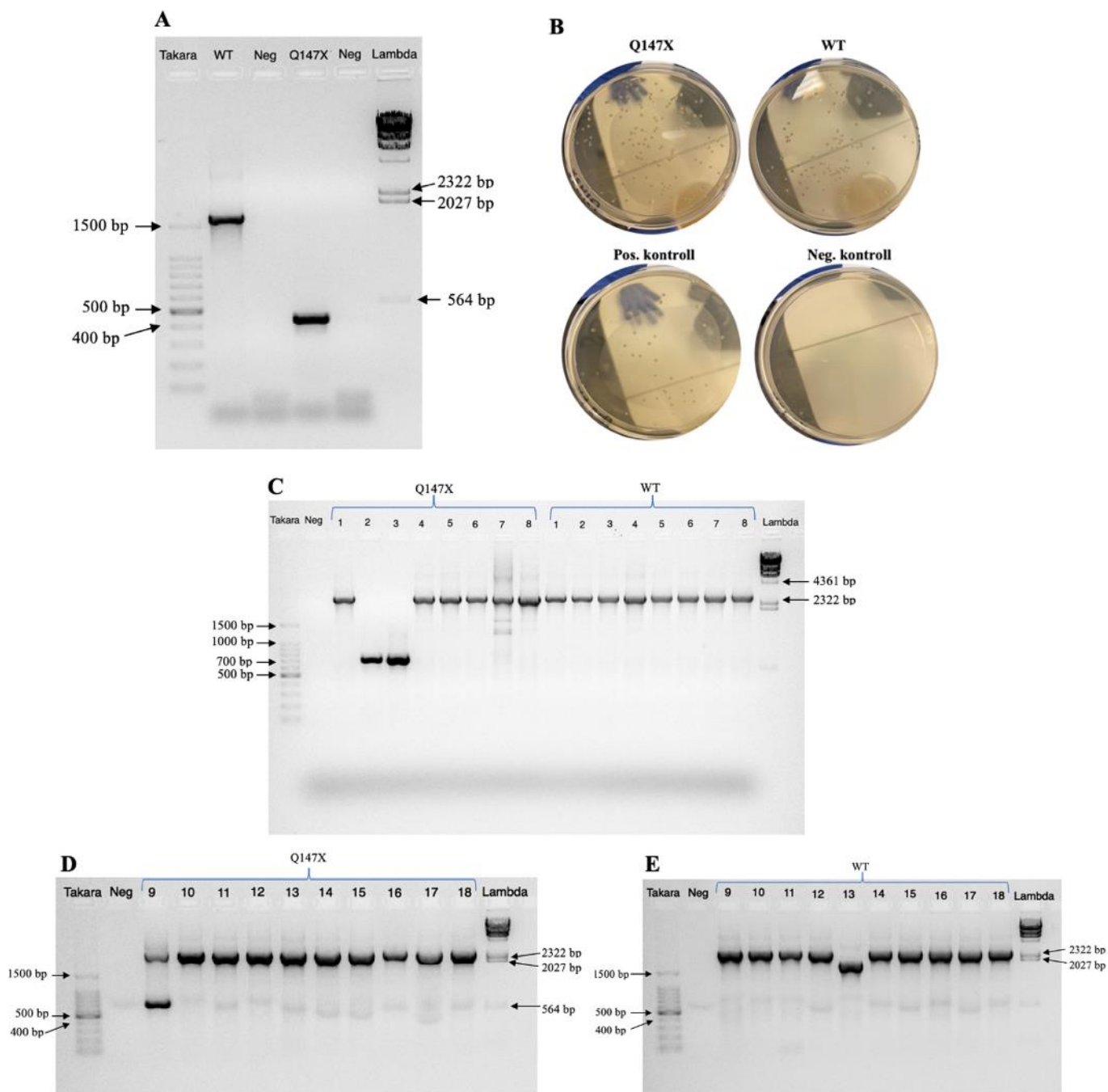


Figur 5: Sanger sekvensering av *HNF1B* i pcDNA3.1/HisB amplifisert opp med primerne T7, BGH, 1F og 1R. Det grønne markerte området indikerer startkodonet og det røde markerte området indikerer de siste nukleotidene i sekvensen. Gult markert området indikerer sekvensen for 1F primer og det blå markerte området indikerer sekvensen for 1R primer. Hvitt området indikerer lik sekvens mellom pcDNA3.1/HisB plasmid og cDNA sekvensen type A form av human *HNF1B* (GenBank accession no. X58840). T7 primer ligger i forkant av cDNA sekvensen til *HNF1B* mens BGH primer ligger i etterkant, og er dermed ikke markert i figuren.

Analyse av sekvensdata bekrefter at *HNF1B* i pcDNA3.1/HisB er cDNA sekvensen til type A form av human *HNF1B* tilsvarende GenBank accession no. X58840 [24].

4.2 Første kloningsforsøk av WT *HNF1B* og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid

Etter verifisering av *HNF1B* sekvensen i originalt plasmid (*HNF1B* i pcDNA3.1/HisB) ble det satt opp en PCR-reaksjon med kloningsprimere *HNF1B* cloning F/*HNF1B* cloning R for WT *HNF1B*, og *HNF1B* cloning F/Q147X cloning R for Q147X. Størrelse og spesifikt PCR-produkt ble verifisert ved agarose gelelektroforese, før TOPO TA kloning i pcDNA3.1/V5-His plasmid ble satt opp. Post kloning ble plasmider transformert (*E. coli*) og plattet ut på agarskåler. PCR-reaksjoner ble satt opp på selekterte kolonier for WT *HNF1B* og Q147X. Figur 6 viser resultatene for kloning av WT *HNF1B* og Q147X fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid, hvor det ble benyttet gamle rester av TOPO TA kloningskit som vi fikk låne fra UiB.



Figur 6: Resultat fra første kloningsanalyse av HNF1B i pcDNA3.1/V5-His plasmid. (A) Agarose gelelektroforese (1,5%) av amplifisert HNF1B PCR-produkt som skal subklones. **(B)** Vekst av *E. coli* bakteriekolonier med innklonet WT og Q147X på agarskåler. **(C)** Analyse av PCR-produkt fra 8 bakteriekolonier plukket fra agarskåler (B) med Q147X og WT. Her ble primerkombinasjonen T7/BGH benyttet for amplifisering av både Q147X og WT. **(D)** Analyse av PCR-produkt fra 10 bakteriekolonier med innklonet Q147X, hvor primerkombinasjon T7/BGH ble benyttet. **(E)** Analyse av PCR-produkt fra 10 bakteriekolonier med innklonet WT, hvor primerkombinasjon T7/BGH ble benyttet.

Amplifisert WT *HNF1B* ved bruk av spesifikke kloningsprimere (Figur 6A) viser et bånd (PCR-produkt) etter gelelektroforese på rundt 1700 bp, og Q147X med spesifikke kloningsprimere viser et bånd på rundt 450 bp. Begge produktene har samme størrelse som de teoretisk sett skal ha ut ifra hvilke primersett som ble benyttet. Videre ble det observert smearing rundt båndet til både WT og Q147X, som er noe mer fremtredende for WT. Resultatene fra agarskålene (Figur 6B) etter utplating av transformert plasmid viser vekst av kolonier på Q147X, WT og positiv kontroll. Negativ kontroll ga ingen vekst av kolonier. Amplifisering av PCR-produkt fra de utvalgte koloniene for WT og Q147X (Figur 6C) resulterte i en båndstørrelse på rundt 2300 bp, med unntak av koloni #2 og #3 for Q147X, som viste PCR-produkt med en båndstørrelse på omtrent 700 bp. PCR-produktene på rundt 2300 bp er for store, både for WT og Q147X, til at de kan inneholde vellykkede klonede pcDNA3.1/V5-His plasmider. Båndene basert på PCR-produkt fra koloni #2 og #3 for Q147X, er derimot mer lovende siden et klonet Q147X produkt skal gi et PCR-produkt på rundt 707 bp. Ytterligere flere kolonier ble derfor plukket fra WT og Q147X agarskåler og analysert (Figur 6D og 6E).

Koloni #9-18 for Q147X (Figur 6D) viser bånd med produktstørrelse rundt 2300 bp, der koloni #9 i tillegg viser ett ekstra bånd med størrelse rundt 800 bp. For WT (Figur 6E) viser de utvalgte koloniene PCR-produkt med størrelse på rundt 2300 bp, med unntak av koloni #13 som har et produkt på rundt 1800 bp. Her er det koloni #13 som ser mest lovende ut basert på at korrekt klonet WT *HNF1B* cDNA skal gi et PCR-produkt med størrelse rundt 1940 bp. Utover dette viser ikke de negative kontrollene noen bånd (Figur 6A og 6C), og det ble heller ikke vekst på den negative agarskålen som er transformert med vann (Figur 6B). Gelelektroforesene av Figur 6D og 6E viser noen uspesifikke bånd på rundt 500-700 bp, i tillegg til at de negative kontrollene har et svakt bånd ved 700 bp.

Basert på Figur 6D og 6E, ble PCR-produktet til koloni #1, #2, #7 og #8 fra WT, og #2 og #3 fra Q147X selektert for videre analyse ved Sanger sekvensering.

A



Note
TOPO® TA
Cloning® Site

Do not add 5' phosphates to your primers for PCR. The PCR product synthesized will not ligate into pcDNA[®] 3.1/V5-His-TOPO[®].

Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The vector is supplied linearized between base pair 953 and 954. This is the TOPO[®] Cloning site. Note that the full sequence of pcDNA[®] 3.1/V5-His-TOPO[®] may be downloaded from www.invitrogen.com or requested from Technical Support (see page 24). A map of pcDNA[®] 3.1/V5-His-TOPO[®] is provided on page 19.



B

WT-T7

```

AGCTGCGTTAACTTAAGCTTACCATTGGGGGGTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGT
GACAGCAAAATGGGTCGGGATCTGTACGAAGTACGATACGATAAGGTACCCATGGTGTCCAAGCTCACGTCGCTCAG
CAAGAAGCTCTGAGCGCCCTGCTGAGCTCCGGGGTCCCAAGGAGGTGCTGGTTCAGGCTTGGAGGAGTTGC
TGCCATCCCGAACTTCGGGGTGAAGCTGGAGACGCTGCCCTGTCCCTGGCAGCGGGGGCCGAGCCGACAC
CAAGCCGGTCTTCCACTCTCAACCAAGCCACGCAAGGCGCTGTCCGGCGCAGGAGGCTCCGAGGAC
GGCGAGCACTATGACACACCTCCATCTCAAGGAGCTGCAAGGCGCTCAACACCGAGGAGGCGGGCAGCAG
GGGCGGAGGTGGACCGGATGCTCAGTGAGGACCTTGGAGGGCTGCTAAATGATCAAGGGTTACATGCAGCA
ACACAACATCCCCAGAGGGAGGTGGTGCATGTACCGGCTGAACCAAGTCGACCTCTCCAGCATCTCAACA
AGGGCACCCCTATGAAGCCAGAGCGTCCGCTCTGTACACCTGTCAGCTCAGAAAGCAACGAGAGATCTCT
CGACAATCAACCAGACAGTCCAGAGTTCTGGAATATGACAGACAAAAGCAGTCAGGATCAGCTGCTGTTTCT
CTTTCAGAGTTAGTCAACAGAGCCATGGCCGTCGGCAGTCCGATGATGCTGCTGAGCCACACAGAAGA
TGCGCCGACGGTCAATGGGGCCGCTCCAGCAATTGTACAGCTACGATCGGCAAGACCCCAACAGAAAA
GAGAAGGCTTATGAGATGCAAGCAATGTGGCCGGGGGGTCCCCCAGCAGCCGCCCATGTCCGG
GGTGGTTTCAACGG

```

Startkodon Siste nukleotidene i sekvensen

V5 His

C

Q147X-T72

```

GGCAGTAGCTTGGTACGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTGCCCTTGGTTCAGGCGGGT
ACATCGACCACCTCCCTCTGGGGATGTGTGTGTGTCATGTAACCTTGATCATTTAGCAGCCCTCAAGG
GTCTCTACTGAGCATCCGGTCCACCTCCCGCGCTGCTCCGCGCCTCTCGGTGTGAGCGCTCGAGCTCT
TGAGGATGGGAGGTGTGTATAGTCTGCTGCCCTCTCGGAGCCCTCTGCCGCGGACAAAGCGCCCTTGGCGT
GGCCGTGTGAGAGTATGGAAGACCGGCTGGTGTGGGCTCGGCCCGCTGCCAGGGGACAGGGGACAG
GTCTCCAGCTTCAACCCGAAGTTCGGGGATGGCAGCAACTCTCAAGGCTGAACCAAGCAGCTCTTGGTGA
CCCCGAGCTCAGCAGGGCGCTCAGGAGTCTTGTCTGGAGCGACGTGAGCTTGGACACATGAAGGCAATTC
TGCAGATACCCAGCAGTGGCGCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGGTTGAAAGGTAAGCTATCCCTAA
CCCTCTCTCGGTCTCGATCTACCGTACCCGTCATCACCACCATCAGTGTAGTTAAACCCGCTGATCAGC
CTCGAGTGTGCTTCCAAAAA

```

Startkodon

Siste nukleotidene i Q147X sekvensen

V5 His

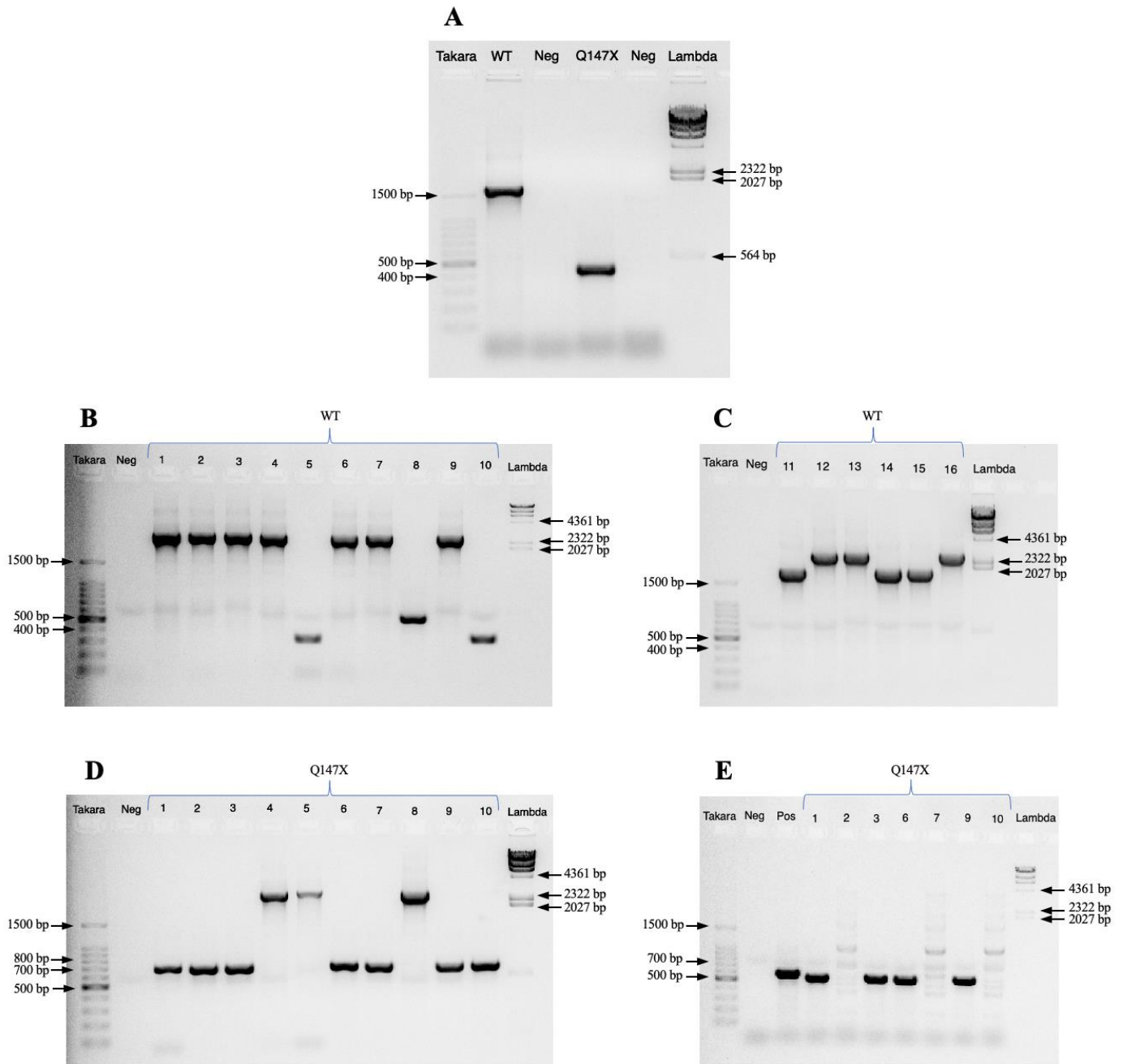
Figur 7: Illustrasjon av sekvensen for pcDNA3.1/V5-His plasmid, WT HNF1B og Q147X. (A) Kloningssete og flankerende DNA sekvens til pcDNA3.1/V5-His plasmid. (B) Eksempel på Sanger sekvensering av WT bakteriekoloni #7 klonet inn i pcDNA3.1/V5-His plasmid amplifisert ved bruk av T7 primer. Grønt markert området indikerer startkodonet av sekvensen og rødt området indikerer de siste nukleotidene i WT HNF1B sekvensen som T7 primeren har klart å detektere. Grått markert området indikerer sekvensen til WT som er klonet inn «riktig vei», og blått markert området indikerer His-tag i pcDNA3.1/V5-His plasmidet. (C) Eksempel på Sanger sekvensering av Q147X bakteriekoloni #2 klonet inn i pcDNA3.1/V5-His plasmid amplifisert ved bruk av T7 primer. Grønt markert området indikerer startkodonet for Q147X sekvensen og rødt markert området tilsvarende de siste nukleotidene i Q147X. Grått markert området viser Q147X sekvensen som er klonet inn «feil vei». Rosa området tilsvarende V5-tag, og blått området tilsvarende His-tag i pcDNA3.1/V5-His plasmidet.

Figur 7 viser eksempel på Sanger sekvensering av bakteriekoloni #7 fra WT og bakteriekoloni #2 fra Q147X innklonet i pcDNA3.1/V5-His plasmid, amplifisert ved bruk av T7 primer. Figur 7B viser at His-tag er i forkant av WT HNF1B sekvensen, mens V5-tag ikke er synlig da den ikke ble detektert i sekvensanalysen. Analysen av WT sekvens antyder at samtlige kolonier inneholdt originaltemplat (HNF1B i pcDNA3.1/HisB plasmid). Sekvensen for Q147X (Figur 7C) er klonet inn «feil vei», og må dermed forkastes. Da ingen av sekvensene for

kloning av Q147X og WT var korrekte, ble nytt kloningsforsøk satt opp ved å benytte et nytt TOPO TA kloningskit.

4.3 Andre kloningsforsøk av WT *HNF1B* og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid

Ettersom det første kloningsforsøket av WT *HNF1B* og Q147X fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid var mislykket, ble det satt opp et nytt kloningsforsøk med nytt reagenskitt for å optimalisere forholdene. Figur 8 viser resultatet fra andre kloningsforsøk med nytt reagenskitt.



Figur 8: Resultat fra andre kloningsanalyse av HNF1B i pcDNA3.1/V5-His plasmid. (A) Agarose gelelektroforese (1,5%) av amplifisert HNF1B PCR-produkt som skal subklones. (B) Analyse av PCR-produkt fra 10 bakteriekolonier plukket fra ny agarskål med WT, hvor primerkombinasjonen HNF1B cloning F/HNF1B cloning R ble benyttet for amplifisering. (C) Analyse av PCR-produkt fra 7 nye bakteriekolonier plukket fra agarskål med WT, hvor primerkombinasjonen HNF1B cloning F primer/HNF1B cloning R primer ble benyttet for amplifisering. (D) Analyse av PCR-produkt fra 10 bakteriekolonier plukket fra ny agarskål med Q147X, hvor primerkombinasjonen HNF1B cloning F primer/Q147X cloning R primer ble benyttet for amplifisering. (E) Analyse av 7 optimale bakteriekolonier fra gelelektroforese av Q147X, for å undersøke om Q147X var klonet inn «riktig vei». Positiv kontroll var tilsatt originalt HNF1B cDNA i pcDNA3.1/HisB plasmid. Her ble primerkombinasjonen T7/Q147X cloning R benyttet for Q147X og positiv kontroll.

Resultatet i Figur 8 viser kloningen av WT *HNF1B* og Q147X fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid med nytt kit. WT *HNF1B* med kloningsprimere (Figur 8A) viser et bånd på omtrent 1700 bp, og Q147X med kloningsprimere viser et bånd på omtrent 450 bp. Det ble fortsatt observert noe smearing rundt båndet til WT, men mindre rundt båndet til Q147X.

PCR-produktene fra de fleste koloniene av WT (Figur 8B) viste en båndstørrelse på omtrent 2300 bp, med unntak av koloni #5 og #10 som ga bånd ved omtrent 300 bp, og koloni #8 som ga bånd ved omtrent 500 bp. Blant de 7 nye koloniene av WT (Figur 8C) viser koloni #11, #14 og #15 bånd ved omtrent 1700 bp, og koloni #12, #13 og #16 viser bånd ved 2300 bp. Koloni #11, #14 og #15 virket mest lovende med henhold til en vellykket kloning ut ifra estimert teoretisk båndstørrelse.

PCR-produktene fra koloniene av Q147X (Figur 8D) viser bånd ved omtrent 700 bp, med unntak av produkt fra koloni #4, #5 og #8 som viser bånd ved omtrent 2300 bp. Koloni #1, #2, #3, #6, #7, #9 og #10 virket lovende ut ifra estimert båndstørrelse. Blant de 7 optimale koloniene av Q147X (Figur 8E) viser 5 av koloniene en båndstørrelse på omtrent 600 bp, ved bruk av primerkombinasjonen T7/Q147X cloning R.

Gelelektroforeseanalysene (Figur 8B-E) viser noen uspesifikke bånd, i tillegg til et svakt bånd på de negative kontrollene til analysene av positive kolonier for både WT og Q147X.

Basert på Figur 8C og 8E, ble PCR-produktet til koloni #11, #14 og #15 for WT og #1, #3, #6 og #9 for Q147X selektert for videre analyse ved Sanger sekvensering.

V5-tag og His-tag, men disse blir bekreftet i sekvens med BGH primer (Figur 9C). Dette indikerer at *HNF1B* er klonet inn i pcDNA3.1/V5-His plasmid «riktig vei», tilsvarende gjelder for samtlige WT kloner analysert i dette kloningsforsøket. Sekvensen for Q147X koloni #1 (Figur 9D og 9E) er klonet inn «riktig vei» og var vellykket. De andre sekvensene for kloning av Q147X var også vellykket.

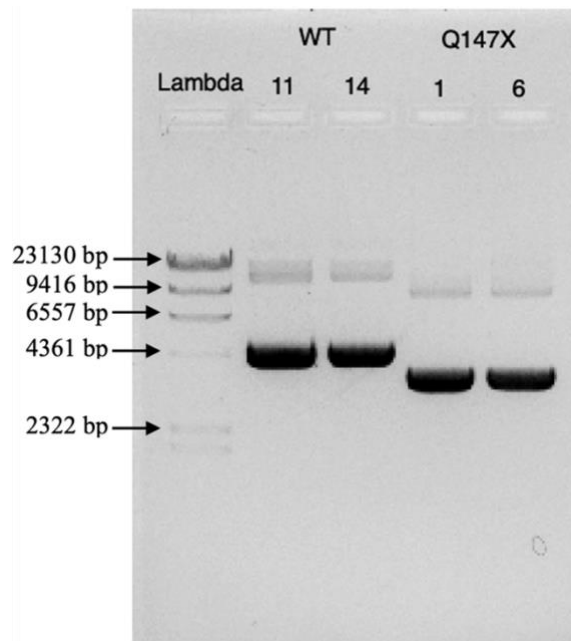
4.3.1 Konsentrasjon og kvalitet av WT *HNF1B* og Q147X i pcDNA3.1/V5-His plasmid

To kolonier fra korrekt klonet WT *HNF1B* (koloni #11 og #14) og Q147X (koloni #1 og #6) ble kultivert i større skala. Deretter ble plasmidene rensset ved bruk av et HiSpeed Plasmid Midi Kit. Konsentrasjoner til de rensede plasmidene ble målt på NanoVue Plus™ Spektrofotometer (bølglengde 260 nm), og gjennomsnittsverdier av to parallelle målinger vises i Tabell 15.

Tabell 15: Plasmidkonsentrasjoner til WT *HNF1B* og Q147X i pcDNA3.1/V5-His plasmid målt på NanoVue Plus™ Spektrofotometer (bølglengde 260 nm).

Plasmid	DNA konsentrasjon (ng/μL)
WT #11	207,8
WT #14	193,0
Q146X #1	228,0
Q146X #6	193,8

For WT viste plasmid #11 høyest DNA konsentrasjon, og for Q147X hadde plasmid #1 høyest DNA konsentrasjon. Videre ble også 0,5 μg plasmid analysert ved agarose gelelektroforese (Figur 10).



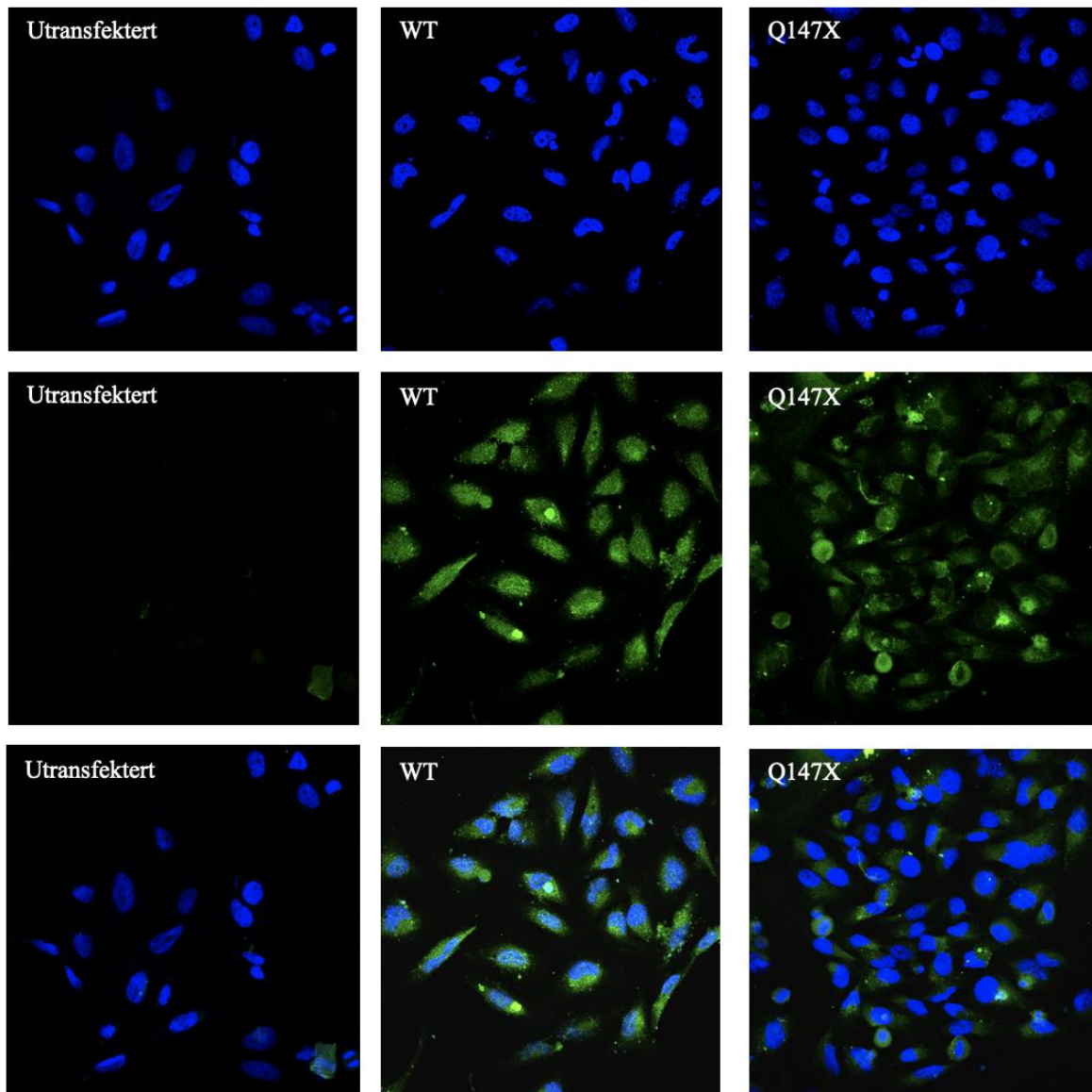
Figur 10: Gelelektroforese av rensede plasmider analysert på 1% agarose gel. Størrelsesmarkøren Lambda Hind III ble benyttet for deteksjon av båndstørrelse til plasmidene. Størrelsen på båndene er angitt i basepar (bp). 0,5 µg av hvert plasmid ble applisert på gelen.

Resultatet fra gelelektroforese av rensede WT *HNF1B* og Q147X pcDNA3.1/V5-His plasmid viser et tydelig bånd på rundt 4300 bp for WT, og et tydelig bånd på rundt 3800 bp for Q147X. Alle plasmidene viser også svakere høyere-molekylære bånd. Størrelsesmarkøren Lambda Hind III viste god separasjon som gir indikasjon på korrekt plasmidstørrelse. Forventet størrelse av WT *HNF1B* og Q147X i pcDNA3.1/V5-His plasmid er henholdsvis 7177 bp og 5947 bp.

Basert på konsentrasjonsmålingene (Tabell 15) og gelelektroforesen (Figur 10), ble plasmid parallell #11 for WT og parallell #1 for Q147X valgt til videre transfeksjon av HeLa-celler og funksjonell analyse ved immunfluorescens.

4.4 Ekspresjon og deteksjon av WT og Q147X HNF-1B protein

Basert på vellykket kloning av WT og Q147X *HNF1B* i pcDNA3.1/V5-His plasmid, var det videre aktuelt å bekrefte funksjonaliteten til plasmidene ved uttrykk av HNF-1B protein i mammalske celler. Ekspresjon, deteksjon og subcellulær lokalisering av WT HNF-1B og Q147X ble studert i transient transfekterte HeLa-celler, ved immunfluoresensanalyser via V5-antistoff.



Figur 11: Ekspresjon og subcellulær lokalisering av WT og Q147X HNF-1B i HeLa-celler. Immunfluorescens analyse av utransfekterte celler, samt plasmid transfekterte celler med WT og Q147X i pcDNA3.1/V5. Anti-V5 og Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor plus 488 ble benyttet som henholdsvis primært- og sekundært antistoff for å detektere HNF-1B. Cellene er også tilsatt mounting løsning med DAPI som binder DNA i kjernen, og fluorescerer blått lys ved UV-stråling med bølgelengde 405 nm. I første rad vises kun DAPI staining, i andre rad vises kun HNF-1B proteinet som fluorescerer ved 488 nm, mens i tredje rad vises overlay av første og andre rad.

Resultat fra immunfluorescensanalyse viser ekspresjon og deteksjon av HNF-1B i utransfekterte HeLa-celler, samt i HeLa-celler transfektert med WT og Q147X plasmid. De utransfekterte cellene fungerer som en negativ kontroll, og viser ingen deteksjon av HNF-1B, kun svake bakgrunns signaler. Det ble detektert sterke signaler for WT HNF-1B som viser jevn lokalisering i hele cellen, både i kjerne og cytoplasma. For Q147X HNF-1B ble det detektert svakere signaler (laser styrken ble økt for bildetaking), og lokaliseringen er primært i cytoplasma.

5. Diskusjon

I dette bachelorprosjektet ble det utført en subkloning av WT *HNF1B* og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid. Videre ble vellykket ekspresjon, deteksjon og subcellulær lokalisering av WT og Q147X HNF-1B protein studert i mammalske HeLa-celler ved immunfluorescensanalyser. Før selve subkloning og videre proteinekspressionsanalyser, ble cDNA sekvensen til *HNF1B* i originalplasmidet (pcDNA3.1/HisB) verifisert ved DNA og molekylærbiologiske analyser.

5.1 Verifisering av *HNF1B* cDNA sekvens i pcDNA3.1/HisB plasmid

Det er viktig å verifisere *HNF1B* cDNA sekvensen i pcDNA3.1/HisB plasmid før kloning til pcDNA3.1/V5-His plasmid, for å bekrefte at *HNF1B* cDNA sekvensen fortsatt er riktig. Dette gjøres ved å kontrollere at det ikke har oppstått noen mutasjoner, og for å verifisere at cDNA transkriptet stemmer overens med det som er oppgitt i litteratur fra plasmid kilden [24].

HNF1B cDNA sekvensen ble verifisert ved at den totale cDNA sekvensen ble amplifisert ved PCR, analysert ved agarose gelelektroforese og videre sendt til Sanger sekvensering ved avdeling for medisinsk genetikk (MGM) på Haukeland Universitetssykehus. Resultatet bekreftet at cDNA transkriptet var type A form av human *HNF1B* tilsvarende GenBank accession no. X58840.

5.2 Kloning av WT *HNF1B* og Q147X cDNA fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid

Subkloning av WT *HNF1B* og Q147X cDNA til pcDNA3.1/V5-His plasmid øker muligheten for deteksjon av HNF-1B proteinet når det skal uttrykkes i transfekterte celler. Plasmidet inneholder en C-terminal V5-epitoptag som er effektiv for påvisning av proteiner ved hjelp av V5-antistoff. HNF-1B kan også detekteres via HisB-tag eller HNF-1B spesifikke antistoff, men basert på at diabetes forskningsgruppen (UiB) har gode erfaringer med spesifisiteten av V5, har denne subkloning økt mulighet for en god deteksjon av *HNF1B* via V5-spesifikt antistoff. Valg av kloningsprosedyre falt på en TOPO TA kloningsmetode, ettersom det er en rask og enkel kloningsteknikk.

Amplifisering av WT og Q147X cDNA ved bruk av spesifikke kloningsprimere ga «rene» PCR-produkt av rett størrelse (Figur 6A). Agarose gelelektroforesen viser noe smearing som kan antyde noen uspesifikke PCR-produkt, der dette er noe mer fremtredende ved WT. Dette kan forårsakes av at PCR-reaksjonen ikke var helt optimal eller at tilberedelsen av agarosegelen ikke var tilfredsstillende, som fører til at gelen ikke polymeriserer jevnt og oppnår en jevn matrise. Andre årsaker til smearing rundt båndene kan skyldes at plasmidprøven er kontaminert med ukjent materiale, som for eksempel bakterielt DNA fra gammel plasmidrens [30]. Dersom PCR-reaksjonen hadde vært optimalisert ytterligere før kloning, eksempelvis ved å øke hybridiseringstemperaturen i PCR-reaksjonen, kunne det muligens ha ført til et litt «renere» PCR-produkt. Noen lavere molekylære bånd (skygger) er også observert helt nederst på gelen. Ut ifra størrelse, så representerer disse mest sannsynlig primer-dimer formasjoner. Dette er bi-produkt av PCR-reaksjonen hvor primerne har hybridisert sammen på grunn av komplementære sekvenser. En videre optimalisering av PCR-reaksjonen, ved å eksempelvis redusere mengde primers eller øke mengde plasmid templat, kunne også muligens resultere i et «renere» produkt før kloningsreaksjonen.

Fra første kloning og analyse av PCR-produkt viste de fleste koloniene en båndstørrelse på rundt 2300 bp, som er større enn teoretisk forventet. Ved DNA sekvensering viste det seg at koloniene inneholdt opprinnelig templat; pcDNA3.1/HisB plasmid. Det mistenkes at bakteriene kun har tatt opp «rester» av *HNF1B* i pcDNA3.1/HisB plasmidet, som har vært i overskudd og gjenværende i PCR-produktet til kloningsreaksjonen. PCR-produkt basert på koloni #2 og #3 fra Q147X kloningen viste derimot en mer lovende produktstørrelse for vellykket kloning, basert på forventet størrelse av Q147X PCR-produkt. En Sanger sekvensering av de klonede pcDNA3.1/V5-His plasmidene viste imidlertid at Q147X cDNA var klonet inn «feil vei». TOPO TA kloning er en ikke-retningsbasert kloningsmetode hvor DNA-fragmenter har 50% sjanse for å bli klonet inn i riktig/feil retning [31].

Basert på at første screening av bakterielle kolonier fra WT og Q147X kloning var negativ, ble ytterligere kolonier plukket fra agar-skåler for både WT og Q147X. Agarose gelelektroforesen viste at koloniene fortsatt tilhørte for store PCR-produkt, og mislykkede klonede pcDNA3.1/V5-His plasmider ble verifisert ved DNA sekvensering. Koloni #13 fra WT viste derimot en mer korrekt PCR-produktstørrelse basert på forventet størrelse av WT *HNF1B* cDNA, og kunne dermed tyde på en vellykket kloning. Også i denne andre screeningen av bakterielle kolonier ble det observert noen uspesifikke bånd på

gelelektroforesene. Basert på deres størrelse mistenkes det at bakteriene, under transformeringen av klonede plasmider, har tatt opp overskytende plasmidrester fra WT *HNF1B* i pcDNA3.1/HisB fra PCR-produktet som inngikk i kloningsreaksjonen, istedenfor *HNF1B* klonede pcDNA3.1/V5-His plasmider, som kanskje er i «underskudd». Årsak til de uspesifikke båndene kan også være at agarskålene med bakterielle kolonier, på dette tidspunktet hadde vært oppbevart over to uker, og ikke lenger inneholdt ferske kolonier. Båndene observert i negativ kontroll er muligens grunnet bruk av en annen Loading buffer kilde med en annen konsentrasjon. Det mistenkes at det har blitt tilsatt et større volum eller en høyere konsentrasjon til PCR-produktene før gelloading, enn det som er optimalt.

Ved andre kloningsforsøk ble det benyttet et omsider nyankommet pcDNA3.1/V5-His TOPO TA kloningskit, som inneholdt flere ferdige reaksjonsløsninger. Før oppsett av PCR- og kloningsreaksjon ble det valgt å implementere noen optimaliseringer av PCR-reaksjonen for å sikre en større sannsynlighet for vellykket kloning. Her ble det blant annet valgt å tilsette mindre plasmid for å sikre at primerne binder seg til alt av plasmidtemplat, og dermed redusere muligheten for uspesifikke PCR-produkt inn i kloningsreaksjonen. Det settes strengere krav til PCR-reaksjonen for å unngå smearing og uspesifikke PCR-produkt, ved å øke hybridiseringstemperaturen fra 55 til 56 °C i PCR-programmet. Amplifiseringen av WT og Q147X produkt viste at båndene har en størrelse lik forventet teoretisk størrelse, og at produktene ser «rene» ut. Det ble imidlertid fortsatt observert en smearing rundt båndet til WT PCR-produktet, men mindre tydelig rundt båndet til Q147X PCR-produktet.

Analyser av koloni #11 og #14 for WT og koloni #1, #3, #6 og #9 for Q147X fra kloningsforsøk med nytt kit, bekreftet en vellykket kloning ved DNA sekvensering. Analyse av koloni #13 for WT fra kloning med gammelt kit viste seg også å være vellykket. Totalt sett viser dette at det nye kitet, med de endringene som ble implementert av mengde reagenser og PCR-program, var mer effektivt og vellykket enn bruk av gammelt kit. Undersøkelsen om Q147X var klonet inn «riktig vei» ved bruk av primerkombinasjonen T7/Q147X cloning R viste seg å være effektiv i videre seleksjon av kolonier med vellykket klonet plasmid. Erfaringer gjort fra kloningen er at Q147X cDNA er «enklere» å klonere enn WT i pcDNA3.1/V5-HiB plasmid. En mulig forklaring på dette kan være at sekvensen til Q147X er kortere enn for WT, og dermed enklere å klonere inn.

Post kloning ble kvaliteten og renheten til plasmidene vurdert ut ifra en agarose gelelektroforese (1%), der størrelsesmarkøren Lambda Hind III alene ble benyttet som

indikasjon på korrekt plasmidstørrelse. Q147X *HNF1B* i pcDNA3.1/V5-His plasmid vandret raskere enn WT *HNF1B* i pcDNA3.1/V5-His plasmid, noe som stemmer overens med at plasmid av mindre størrelse vandrer lengst. Den sirkulære strukturen til plasmidene har en mer kompakt konformasjon, som fører til at de vandrer raskere enn størrelsesmarkøren Lambda med lineære bånd [22, p. 336]. Dette resulterer i at størrelsen på plasmidene ser mindre ut enn forventet. Plasmidene viser også et svakt høyere-molekylært bånd, som kan skyldes en annen form av plasmidkonformasjon. Dette kan oppstå ved gjentatt frysing og tining, eller annen grov behandling av plasmidet, som fører til brudd i en av de kovalente bindingene i sukker-fosfat-ryggraden langs en av de to nukleotidtrådene [32]. Denne sirkulære plasmidformen vandrer ikke like raskt gjennom agarosegelen, og resulterer i et høyere bånd med en større plasmidstørrelse.

5.3 Ekspresjon og deteksjon av WT og Q147X HNF-1B protein

For å videre verifisere en vellykket proteinekspresjon og deteksjon av HNF-1B fra klonede plasmider, ble det utført immunfluorescens analyse av WT og Q147X HNF-1B i transfekterte HeLa-celler via V5-antistoff. Ved denne analysen var det også mulig å studere den subcellulære lokaliseringen til WT og Q147X. Funksjonelle analyser gjør det mulig å sammenligne en potensiell dysfunksjon av Q147X sammenlignet med normalfunksjon til WT HNF-1B.

Resultat fra immunfluorescens analysen viser at de utransfektete cellene gir noen svake fluorescenssignaler. Dette er mest sannsynlig uspesifikk binding av enten primært og/eller sekundært antistoff. Analysen var et førstegangsforsøk, og ved videre optimalisering av immunfluorescensanalysen kunne en uspesifikk binding vært unngått. Vaskeprosedyren kunne eksempelvis ha blitt forlenget, og ulike konsentrasjoner av antistoff kunne ha blitt testet. Analysen viser også at WT HNF-1B er sterkere uttrykt i HeLa-cellene enn Q147X HNF-1B. For å få signalene til Q147X bedre frem, ble det i tillegg benyttet en høyere laser styrke ved bildetaking. Disse funnene indikerer at det er et mindre nivå av Q147X protein til stede. Lavere nivå av protein kan skyldes økt degradering, og med tanke på at Q147X er et trunkert HNF-1B protein, så kan degradering for en slik mutant skyldes nonsense-mediert mRNA-decay (NMD). NMD er en celle-mekanisme som bryter ned mRNA som inneholder premature stopp-kodoner [33]. På proteinnivå kan cellen oppdage at det er et ikke-funksjonelt trunkert protein som mangler viktige domener, og dermed sende proteinet til degradering.

Dette ville også gitt lavere proteinnivå.

Fluorescens analysen viser også at WT HNF-1B er jevnt uttrykt i hele cellen. HNF-1B er en transkripsjonsfaktor, og har dermed sin hovedfunksjon inne i kjernen hvor det binder DNA. Det er likevel på ribosomene i cytoplasma proteiner blir syntetisert, så dette kan være en forklaring på hvorfor det er så mye av proteinet ute i cytoplasma. HeLa-cellene transfektert med Q147X HNF-1B viser svakere uttrykk inne i kjernen i forhold til cytoplasma, i flere av cellene. Disse funnene tyder på at den trunkerte mutanten ikke blir fraktet inn i kjernen like effektivt som WT. Dette er som forventet siden det POU_H DNA bindende domenet mangler. Dette domenet inneholder et nukleært lokaliseringssignal (NLS) som er viktig for transport inn i kjernen [34].

Tidligere studier ved bruk av C33-celler viser at Q147X HNF-1B hovedsakelig er lokalisert i cytoplasma, mens WT HNF-1B hovedsakelig er lokalisert inne i kjernen [20]. Funnene for Q147X stemmer godt overens med våre, og er med på å underbygge teorien om at det trunkerte proteinet påvirker transporten inn i kjernen. Funnene for WT i vårt studie er derimot mer avvikende. Immunfluorescens analysen av WT i HeLa-cellene viser sterkere uttrykk i cytoplasma enn tidligere funn gjør. På grunn av manglende tid gikk transfeksjonen i kun 24 timer. Ved å øke denne tiden til 48 timer, kunne det kanskje ha ført til mer effektiv kjernetransport av WT.

Hvis det hadde vært mer tid til rådighet ville vi ha optimalisert analysen ved å inkludere flere biologiske replikater, som ved å utføre analysen minimum to ganger og med et par paralleller hver, for å underbygge funnene våre. Vi ville også ha utført en real-time qPCR for å studere om nonsense-mediert mRNA-decay av Q147X kan antyde en reduksjon i mRNA, og som mulig forklaring på redusert Q147X HNF-1B i celler. Veien videre ville da vært å utføre flere funksjonstester på denne mutanten. Det hadde vært interessant å undersøke DNA-bindingsevne siden proteinet blir terminert midt i det første DNA bindende domenet. Det hadde også vært relevant å undersøke om dimeriseringsevnen blir påvirket av at store deler av proteinet mangler.

6. Konklusjon

I dette bachelorprosjektet har WT og Q147X *HNF1B* blitt vellykket subklonet fra pcDNA3.1/HisB til pcDNA3.1/V5-His plasmid ved bruk av TOPO TA kloningskit. Det ferske kittet og optimalisering av PCR-reaksjon viste seg å gi mest suksessfulle resultater. Ekspresjon og deteksjon av WT og Q147X HNF-1B via V5-tag i transfekterte HeLa-celler, viste at HNF-1B proteinet lar seg vellykket detektere. WT er sterkere uttrykt sammenlignet med Q147X, som viser redusert proteinnivå. Immunfluorescens analysen viste også at WT er lokalisert i både cytoplasma og kjerne, mens Q147X hovedsakelig er lokalisert i cytoplasma.

7. Referanser

- [1] Hemmingsen B, Sonne DP, Metzendorf MI, Richter B. Insulin secretagogues for prevention or delay of type 2 diabetes mellitus and its associated complications in persons at increased risk for the development of type 2 diabetes mellitus. *Cochrane library*. 2016;10(10):CD012151. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012151.pub2>.
- [2] Institutt for biovitenskap. Mutasjon [Internett]. Universitet i Oslo; [oppdatert 21. desember 2020; hentet 26. april 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/m/mutasjon.html>.
- [3] National Cancer Institute. Splice-site mutation [Internett]. National Institutes of Health; [hentet 26. april 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/splice-site-mutation>.
- [4] American Diabetes Assosiation. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S81–90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>.
- [5] World Health Organization. Diabetes [Internett]. [oppdatert 5. april 2023; hentet 23. april 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- [6] Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Bjålie JG. Menneskekroppen: Fysiologi og anatomi. 3. utg. Oslo: Gyldendal Akademisk; 2018. 668 s.
- [7] Stene LCM, Ruiz PLD, Gulseth HL. Diabetes i Norge [Internett]. Folkehelseinstituttet; [oppdatert 31 mai 2021; hentet 15. april 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/ikke-smittsomme/diabetes/>.
- [8] Gundersen LB, Aukrust I. Diabetes Mellitus - analyser av genvarianter assosiert med subtyper av Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY). *Bioingeniøren*. 2022, 57(6), 30-36.
- [9] MODY.NO. MODY [Internett]. [hentet 1. mai 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.mody.no/mody>.
- [10] Diabetes UK. Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) [Internett]. [hentet 1. mai

- 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.diabetes.org.uk/diabetes-the-basics/other-types-of-diabetes/mody>.
- [11] National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. Monogenic Diabetes (Neonatal Diabetes Mellitus & MODY) [Internett]. National Institutes of Health; [oppdatert november 2017; hentet 1. mai 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes/monogenic-neonatal-mellitus-mody>.
- [12] Delvecchio M, Pastore C, and Giordano P. Treatment Options for MODY Patients: A Systematic Review of Literature. *Diabetes Ther.* 2020;11(8):1667-1685. <https://doi.org/10.1007/s13300-020-00864-4>.
- [13] Edghill EL, Bingham C, Ellard S, Hattersley AT. Mutations in hepatocyte nuclear factor-1B and their related phenotypes. *J Med Genet.* 2006;43(1):84-90. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2005.032854>.
- [14] Alvelos MI, Rodrigues M, Lobo L, Medeira A, Sousa AB, Simão C, et al. A Novel Mutation of the HNF1B Gene Associated With Hypoplastic Glomerulocystic Kidney Disease and Neonatal Renal Failure. *Medicine.* 2015;94(7):e469.
- [15] Horikawa Y, Iwasaki N, Manami H, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn, BN, et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1B gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet.* 1997;17(4):384-5. <https://doi.org/10.1038/ng1297-384>.
- [16] Cubuk H, Capan ÖY. A review of Functional Characterization of Single Amino Acid Change Mutations in HNF Transcription Factors in MODY Pathogenesis. *Protein J.* 2021;40(3):348-360. <https://doi.org/10.1007/s10930-021-09991-8>.
- [17] El-Kahari R, Vallier L. The role of hepatocyte nuclear factor 1B in disease and development. *Diabetes Obes Metab.* 2016;18 Suppl 1:23-32. <https://doi.org/10.1111/dom.12715>.
- [18] Kim EK, Lee JS, Cheong HI, Chung SS, Kwak SH, Park KS. Identification and Functional Characterization of P159L Mutation in HNF1B on a Family with Maturity-Onset of the young 5 (MODY5). *Genomics Inform.* 2014;12(4):240-6. <https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.4.240>.
- [19] ClinVar. NM_000458.4(HNF1B):c.439C>T (p.Gln147Ter) [Internett]. National Library

of Medicine; [oppdatert 7. februar 2023; hentet 11. mai 2023] Tilgjengelig fra:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/586799/>.

- [20] Barbacci E, Chalkiadaki A, Masdeu C, Haumaitre C, Lokmane L, Loirat C, et al. HNF1b/TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum Mol Genet.* 2004;13(24):3139-49.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh338>.
- [21] Rizzoni G, Loirat C, Levy M, Milanese C, Zachello G, Mathieu H. Familial hypoplastic glomerulocystic kidney. A new entity?. *Clin Nephrol.* 1982;18(5):263-8.
- [22] Alberts B, Hopkin K, Johnsen A, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Essential Cell Biology*. 5. utg. USA: Ww Norton & Co; 2019. 864 s.
- [23] Applied Biosystems. ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent [Internett]. Thermo Fisher Scientific; [hentet 28. april 2023]. Tilgjengelig fra:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78205.10.ML>.
- [24] Linder TH, Njolstad PR, Horikawa Y, Bostad L, Bell GI, Sovik O. A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum Mol Genet.* 1999;8(11):2001-8. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.11.2001>.
- [25] Snap Gene by Dotmatics. TOPO Cloning [Internett]. [hentet 1. mai 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.snapgene.com/guides/topo-cloning#>.
- [26] Biocompare. Trypsin-EDTA [Internett]. [hentet 30. april 2023] Tilgjengelig fra:
<https://www.biocompare.com/26363-Trypsin-EDTA/>.
- [27] Kim SO, Kim J, Okajimu T, Cho NJ. Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy. *Nano Converg.* 2017;4(1):5. <https://doi.org/10.1186/s40580-017-0099-9>.
- [28] Jamur MC, Constance O. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol.* 2010;588:63-6. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_9.
- [29] Mahmood T, Yang PC. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-434.

- [30] Thermo Fisher Scientific. Nucleic Acid Gel Electrophoresis Troubleshooting [Internett]. [hentet 8. mai 2023]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/na-electrophoresis-education/na-electrophoresis-troubleshooting.html#smear>.
- [31] Share Biology. TOPO TA Cloning [Internett]. [hentet 11. mai 2023]. Tilgjengelig fra: <https://sharebiology.com/topo-ta-cloning/>.
- [32] Whitfield CJ, Zhang M, Winterwerber P, Wu Y, Ng DYW, Weil T. Functional DNA–Polymer Conjugates. *Chem Rev.* 2021;121(18):11030-11084. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01074>.
- [33] Brogna S, Wen J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(2):107-13. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1550>.
- [34] Guizhi W, Bohn S, Ryffel GU. The HNF1b transcription factor has several domains involved in nephrogenesis and partially rescues Pax8/lim1-induced kidney malformations. *Eur J Biochem.* 2004;271(18):3715-28. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01074>.