

# Klinisk molekylærmedisin (5): Eksempler på funksjonelle analyser

Pål Rasmus Njølstad<sup>1,2,3</sup>, Lise Bjørkhaug<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Seksjon for pediatri, Institutt for klinisk medisin og molekylærmedisin, Universitetet i Bergen;  
og <sup>2</sup>Seksjon for endokrinologi og metabolisme, Barneklivnikken, Haukeland Universitetssykehus, 5021 Bergen

## Innledning

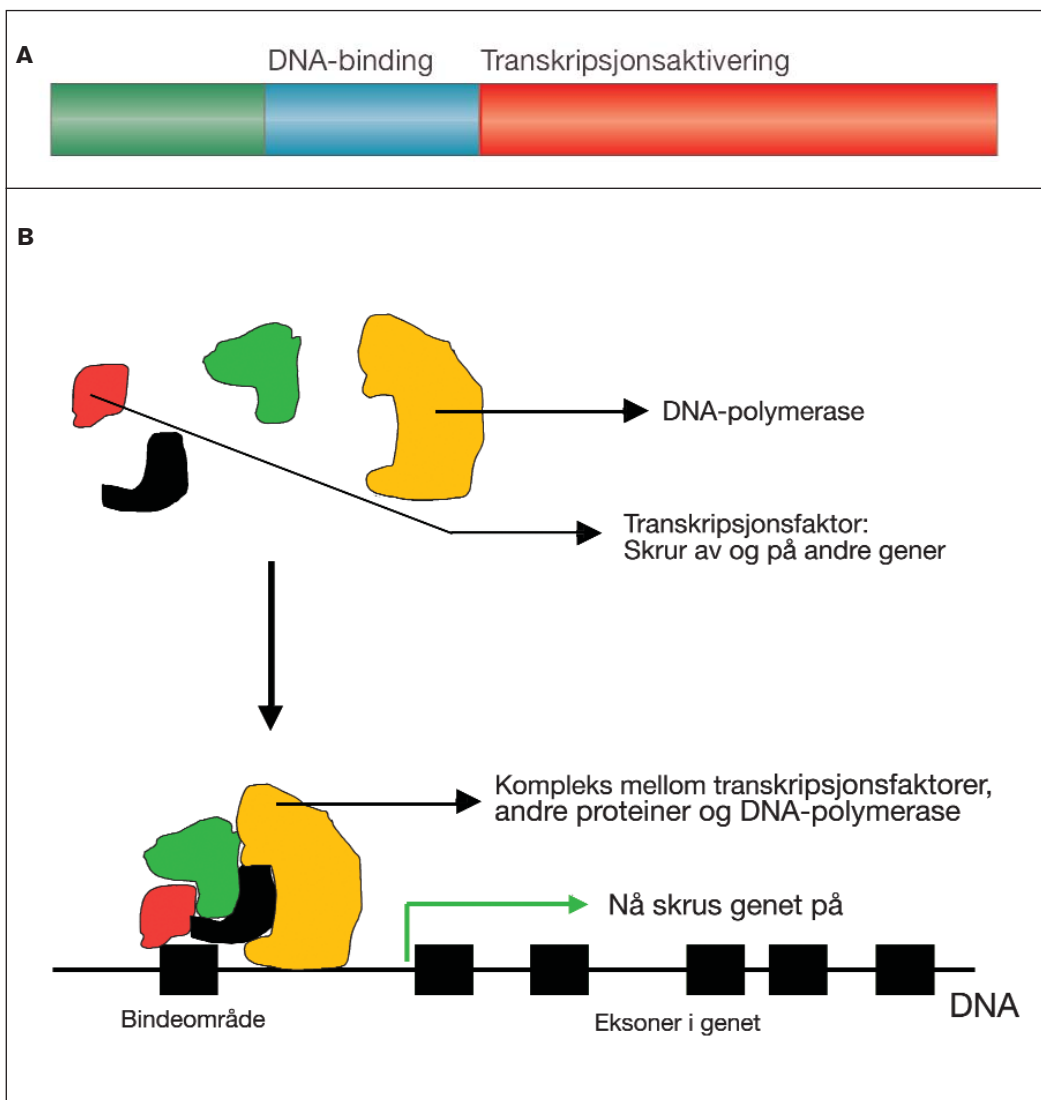
Genomet vårt inneholder millioner av små variasjoner som trolig har liten betydning, i alle fall med dagens viten. Som kontrast til dette har vi det faktum at sykdom kan oppstå på grunn av bare én ekstra sekvensvariasjon på et «uheldig» sted i et gen. Et eksempel på dette er at mutasjoner i genet GPR54, et G-proteinkoblet reseptorgen, fører til for tidlig puberteten (1). Et daglig problem i DNA-diagnostikken er å kunne bestemme om en sekvensvariasjon er ansvarlig for sykdom (mutasjon) eller ikke (polymorfisme). Vi har tidligere diskutert at et av de beste kriteriene for at en sekvensvariasjon er sykdomsfremkallende, er at den segregerer med sykdommen i en familie slik at den bare finnes hos de syke (og sykdomsbærerne) og ikke de friske (2). I mange tilfeller er det ikke mulig å undersøke slik ko-segregering mellom sykdom og mutasjon, oftest fordi det ikke er tilgjengelig prøver fra andre

syke eller friske familiemedlemmer. Et annet viktig indisium på at en mutasjon er patogen, er om sekvensvariasjonen påvirker den normale funksjonen til genproduktet. I mange tilfeller finnes det ikke tilgjengelige tester for dette slik at det må gjøres teoretiske betraktninger (2). I denne artikkelen skal vi som et eksempel på funksjonelle analyser vise prinsippene for hvordan funksjonelle undersøkelser kan brukes for genet HNF-1A som er årsaken til MODY3.

## Den normale funksjonen til HNF-1A/MODY3

Transkripsjonsfaktorer har (minst) to ulike regioner eller domener i genproduktet: et domene som har med DNA-binding å gjøre, og et domene som står for genaktivering (transkripsjonsaktivering). Dette er illustrert i figur 1a. Hovedfunksjonen til transkripsjonsfaktorer er å skru på og av andre gener. For å kunne gjøre dette, må de kunne binde seg til DNA (Figur 1b). Genproduktet til HNF-1A/MODY3 er en transkripsjonsfaktor. Vi skal nå ta for oss analysemetoder for å påvise hvordan mutasjoner i både DNA-bindingsdomenet og transkripsjonsaktiveringsdomenet i HNF-1A påvirker den normale funksjonen til proteinet.

<sup>3</sup>: Korrespondanse til:  
Professor Pål Rasmus Njølstad  
Barneklivnikken  
Haukeland Universitetssykehus  
5021 Bergen  
Tlf. 55975153  
Fax. 55975147  
E-post: pal.njolstad@helse-bergen.no



**Figur 1**

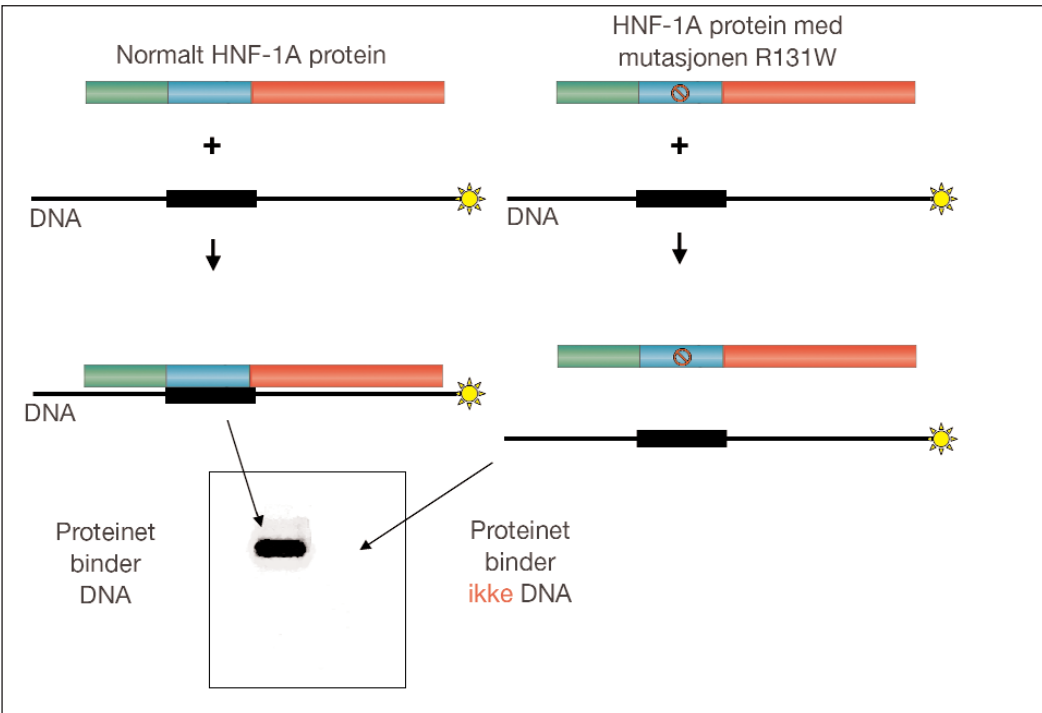
Skjematisk fremstilling av funksjonen til transkripsjonsfaktorer. A) Det er to hovedområder i en transkripsjonsfaktor: et domene som kan binde DNA (blått) og ett som står for transkripsjonsaktivering eller det å skru av eller på andre gener (rødt). B) For at en transkripsjonsfaktor (rød) skal kunne utføre sin funksjon, må denne binde seg til DNA og til andre faktorer (illustrert med grønt, svart og oransje) i et kompleks. Dette komplekset binder seg oftest til et eget bindeområde oppstrøms for startsetet i genet. Når komplekset er på plass, kan genet skrur på ved at DNA-polymerase (oransje) leser av genet.

## DNA-binding

I mange gener finnes helt bestemte regioner som koder for proteindomener som har den egen- skapen at dette kan binde seg til DNA. Det gjør at proteinet kan påvirke DNA på en rekke ulike måter. HNF-1A har en slik DNA-bindende region. I laboratoriet kan man undersøke denne funksjo- nen ved såkalte DNA-bindingsstudier. Man lager først et protein av det genet man er interessert i å studere. Dette proteinet tilsettes en reaksjons- miks som inneholder en helt bestemt målsekvens.

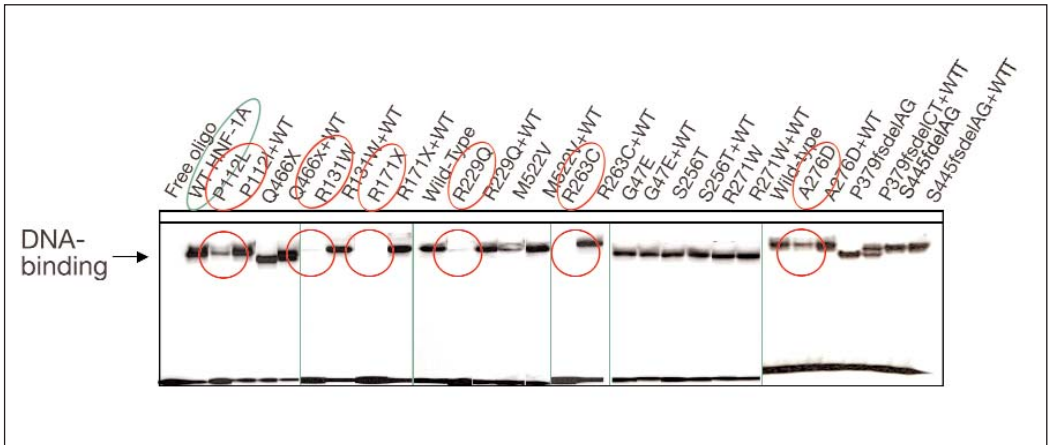
Denne genbiten vet man proteinet kan bindes seg til. Genbiten merkes med radioaktivitet. Etterpå analyseres dette med gelelektroforese. Dersom proteinet binder seg til den radioaktive genbiten, kan man lese dette av på gelen som et svart bånd. Dersom proteinet ikke bindes, vil det ikke oppstå et bånd på stedet i gelen der det er forventet.

I figur 2 ser vi dette skjematisk, mens i figur 3 er det et bilde av en virkelig gel med mange ulike MODY3-mutasjoner (3).



**Figur 2**

Studier av DNA-binding. Normalt HNF-1A protein inneholder en region som kan binde DNA (blå). Man tilsetter proteinet en kort DNA-sekvens som man vet HNF-1A kan binde seg til. Denne korte sekvensen er merket med radioaktivitet (gult). Reaksjonsløsningen undersøkes med gelelektroforese og autoradiografi. Dersom DNA-bindingsregionen er intakt, oppstår et bånd på gelen (venstre). Dersom det er en mutasjon i DNA-bindingsregionen, vil den normale DNA-bindingen kunne forstyrres. I så fall får man ikke noe bånd på forventet sted i gelen fordi den ubundne, korte DNA-sekvensen forsvinner ut av gelen (høyre).



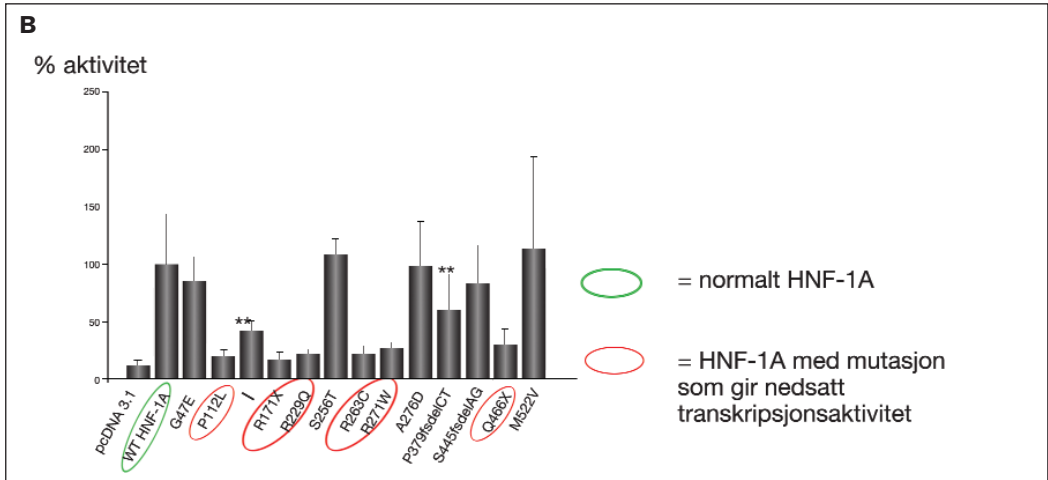
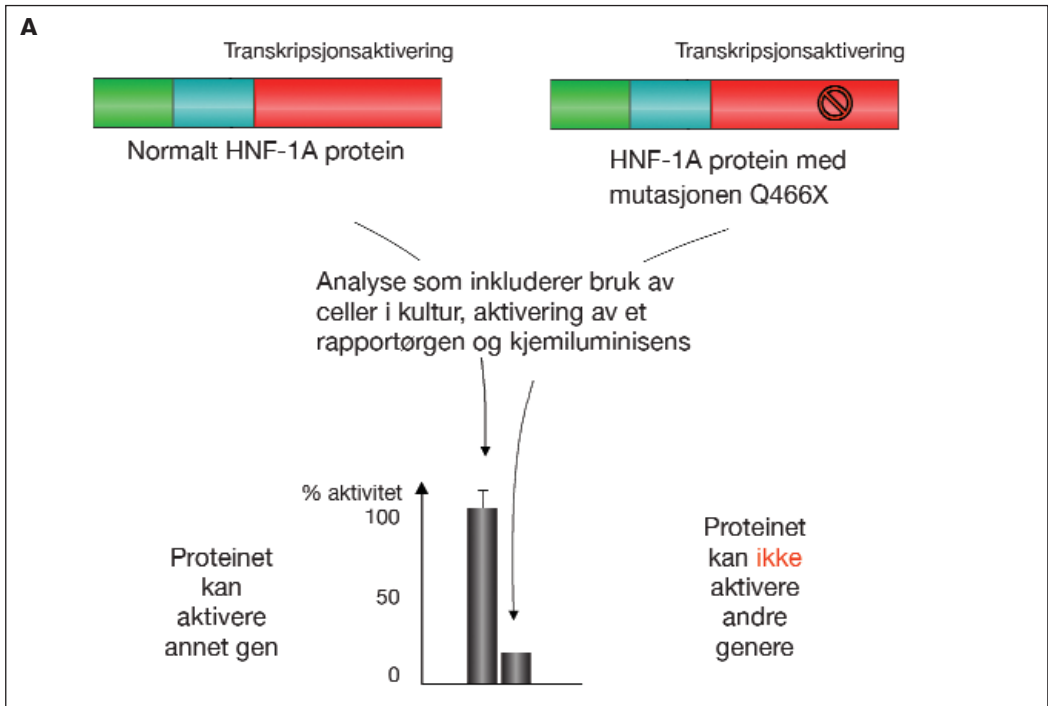
**Figur 3**

Kopi av en gel fra et virkelig eksperiment med ulike mutasjoner i HNF-1A og hvordan disse påvirker DNA-binding. Det normale HNF-1A er markert med grønn sirkel, mens mutasjoner i HNF-1A som påvirker DNA-bindingen, er markert med rød sirkel. Det er også en del mutasjoner som ikke er markert med sirkel. Disse fremviser normale bånd på gelen slik at mutasjonene ikke påvirker DNA-bindingen. pasient med transient neonatal diabetes.

## Transkripsjonsaktivering

Genavlesing eller transkripsjon krever at proteinproduktet kan binde seg til DNA (se over). Bindingen er ofte i et bindeområde like oppstrøms for starten av et gen (Figur 1b). Dernest er det en egen prosess der transkripsjonsfaktoren også bindes til andre faktorer inklusive DNA-polymerase. Dette komplekset aktiviserer DNA-polymerase og genet avleses (skrus på). Det finnes eksperimentelle oppsett for denne komplekse prosessen (Figur 4). Vi går ikke inn på detaljene i denne, men det ultimate resultatet er at aktiviteten

til det unormale proteinet (med mutasjon) måles opp mot det normale proteinet. Den normale aktiviteten settes til 100 % og så ser man hvor mange prosent aktivitet det muterte proteinet har i forhold til det normale. Flere eksperimenter må gjøres for å kunne si om en forskjell er statistisk signifikant. Dersom aktiviteten er lavere enn normalt, er det sannsynlig at mutasjonen fører til sykdom hos pasienten. Prinsippet er skissert i figur 4a, mens en reell undersøkelse av mange ulike MODY3-mutasjoner er vist i figur 4b (3).



**Figur 4**

Analyse av transkripsjonsaktivering. A) Man bruker et analyseoppsett som inkluderer bruk av cellekultur. Reagensene inneholder blant annet et såkalt rapportørgen. Dette vet man lar seg aktivere dersom proteinet man undersøker har transkripsjonsaktiverende evne. Effekten måles ved kjemiluminisens og man får dette visualisert med grad av aktivisering i forhold til det normale proteinet. Graden av aktivering av det normale HNF-1A måles og settes arbitrært til 100 %. Man måler så aktiviteten til det muterte HNF-1A proteinet. Denne aktiviteten relateres så til normalt HNF-1A. En lav aktivitet betyr redusert evne til genaktivering. Metoden er ikke robust, så det må gjøres mange målinger. A) er skjematisk fremstilt, mens B) viser resultatene fra en rekke reelle HNF-1A mutasjoner. Grønn sirkel viser det normale HNF-1A, mens de røde sirklene representerer muterte HNF-1A proteiner med signifikant nedsatt genaktivering. Mutantene som ikke har sirklene, har normal funksjon.

## Betydning av funksjonelle analyser

Funksjonelle analyser kan være av stor verdi for eventuelt å kunne si noen om en sekvensvariasjon er ansvarlig for sykdom eller ikke. Det må imidlertid presiseres at dette er eksperimenter utført i reagensglass, og resultatene må alltid sees i sammenheng med det som man finner hos pasientene.

## Referanser

1. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349: 1614-27.
2. Njølstad PR. Klinisk molekylærmedisin (2): Molekylær diagnostikk av mindre mutasjoner. *Pediatrisk Endokrinologi* 2002; 16 : 23-6.
3. Bjørkhaug L, Sagen JV, Thorsby P, Søvik O, Molven A, Njølstad PR Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene mutations and diabetes in Norway. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 920-31.