

UNIVERSITETET I TROMSØ UIT

DET MEDISINSKE FAKULTET
INSTITUTT FOR FARMASI
FORSKNINGSGRUPPE I FARMAKOLOGI

MASTER I FARMASI



Studier av mekanismer for subcellulær lokalisering av transkripsjonsfaktoren FoxO3a og regulering av FoxO3a-mediert transkripsjon

av

Andreas Aleksander Christensen
2012

Veileder

Professor Ole Morten Seternes



FORORD

Denne masteroppgaven representerer slutten på en fin studieperiode ved Universitetet i Tromsø. Jeg vil først og fremst rette en stor takk til Ole Morten Seternes for god veiledning og støtte. I tillegg ønsker jeg å takke Hanne Kildalsen og Bjarne Herold Johansen som gjorde det mulig for meg å gjennomføre det praktiske laboratoriearbeid.

En ekstra stor takk til min kjære Trine som har holdt ut med meg i denne travle studietiden.

Tromsø, 2012

Andreas Aleksander Christensen

SAMMENDRAG

Lokalisering av FoxO transkripsjonsfaktorer reguleres av posttranslasjonelle modifikasjoner (PTM) som involverer fosforylering, ubiquitinerings, acetylering og deacetylering. Disse modifikasjonene har betydning for subcellulær lokalisering av FoxO3a som videre kan regulere cellesyklus arrest, apoptose og autofagi. I tillegg spiller FoxO transkripsjonsfaktorer en viktig rolle for utvikling av kreft, og på bakgrunn av dette kan FoxO proteiner være nye terapeutiske mål for en rekke ulike kreftsykdommer. Hensikten med dette prosjektet var å studere subcellulær lokalisering av transkripsjonsfaktoren FoxO3a og regulering av FoxO3a-mediert transkripsjon. I tillegg ønsket vi å undersøke om FoxO3a regulerer uttrykket av p62.

I dette prosjektet har vi studert lokalisering av FoxO3a med bruk av levende celler og fluoriserende fusjonsproteiner av FoxO transkripsjonsfaktorer. Vi fant ut at lokalisering av EGFP- eller mCherry-tag enten i C-terminale eller N-terminale delen på FoxO3a er viktig for subcellulær lokalisering. Stress i form av serumsult, blokkering av PI3K signalveien og cytostatika resulterte i rask translokering av FoxO3a fra cytoplasma til kjernen og induksjon av FoxO3a-mediert transkripsjon. Kouttrykk av villtype og en aktivt mutert mutant av protein kinasen MK5, men ikke en kinasedefekt mutant, induserte en klar kjernelokalisering av FoxO3a. På tross av induksjon av kjernelokalisering førte ikke kouttrykk av MK5 til betydelig økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. Flere studier har også vist at FoxO3a er involvert i autofagi, og på bakgrunn av dette undersøkte vi om FoxO3a kunne regulere transkripsjon fra promotoren til autofagi reseptoren p62. Våre funn viser at p62 promotoren inneholder et funksjonelt FoxO3a motiv.

FORKORTELSER

AMPK	AMP-aktivert protein kinase
ATG	Autofagi-relaterte gener
BAD	Bcl-2-assosiert dødspromoter
BSA	Bovint Serum Albumin
CAD	Kaspase-aktivert DNase
CP	Current protocols
CTL	Cytotoksiske T lymfocyttene
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
dH₂O	Deionisert vann
ddH₂O	Autoklavert milliQ vann
dDB	Defekt DNA-bindende protein
EGF	Epidermal vekstfaktor
EGFP	Grønt fluoriserende protein
ER	Østrogenreseptor
ERK	Ekstracellulær signalregulert kinase
FBS	Føtalt Bovint Serum
FHRE	Forkhead respons element
FoxO	Forkhead box klasse O transkripsjonsfaktor
GPCR	G-protein-koblet reseptor
HA	Hemagglutinin
IKKβ	Inhibitor av kappa-B kinase β
JNK	c-Jun amino (N)-terminal kinase
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivert protein kinase
MK	MAPK-aktivert protein kinaser (MAPKAPK)
MNK	MAPK-interagerende kinase
MST1	Mammalian Ste-20-lignende kinase
MSK	Mitogen- og stress-aktiverende kinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin

NBR1	Nabo til Brca1 gen
NES	Nukleær eksport sekvens
NLK	Nemo-lignende kinase
NLS	Nukleær lokaliseringssekvens
PP2A	Fosfatase 2A
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF-R	Blodplatederivert vekstfaktor-reseptor
PFA	Paraformaldehyd
PI3K/Akt	Fosfoinositol 3'-kinase/Akt (PKB)
PKB	Protein kinase B (også kjent som Akt)
PKC	Protein kinase C
PTM	Posttranslasjonell modifikasjon
PTEN	Fosfatase og tensin homolog
p62	p62/SQSTM1 (sequestosome 1)
rpm	Runder per minutt
RSK	p90 ribosomal S6 kinase
RTK	Reseptor tyrosin kinase
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SGK	Serum og glukokortikoid-induserbar kinase
TAE	Tris-acetat EDTA
TGF-α	Transformerende vekstfaktor alfa
TNF	Tumor nekrose faktor
TM	Trippelmutert
VEGF	Vaskulær endotel vekstfaktor
WT	Villtype
4-OHT	4-Hydroksytamoksifen

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	II
SAMMENDRAG	IV
FORKORTELSER	VI
INTRODUKSJON	1
1 Protein kinaser og fosfataser	1
1. Tyrosin kinaser	1
2. Kinaser som mål for legemidler	2
2 MAP-kinase signalvei	2
1. Signalkaskaden	2
2. Gruppeinndeling av MAP-kinaser	3
3 Atypiske MAP kinaser	6
1. ERK3 og ERK4	6
4 MAPK-aktivert protein kinaser (MKs)	7
1. MK5	7
5 Fosfoinositol 3'-kinase/Akt (PI3K/Akt) signalveien	8
1. PI3K/Akt signalveien.....	8
6 Forkhead transkripsjonsfaktorer	9
1. Forkhead box klasse O.....	10
2. Regulering av FoxO subcellulær lokalisering	10
3. Regulering av mengden FoxO	12
4. Regulering av FoxO-mediert transkripsjon	12
7 Autofagi og p62.....	13
1. Autofagi	14
2. p62	15
8 Apoptose og FoxO3a.....	16
1. Signalveien til apoptose.....	17
9 Mål for prosjektet	20
MATERIALER OG METODER	21
1 Materialer	
1. Kjemikalier	21
2. Plasmider	24
2 Metoder	
1. Gateway® LR rekombinasjon reaksjon	26
2. Rensing av plasmid (Midi-prep og Mini-prep).....	26
3. Restriksjonsanalyse	26
4. Cellelinjer	27
5. Dyrking av celler	28
6. Splitting av celler.....	28
7. Celletelling.....	28
8. Så ut celler	29
9. Transfeksjon med Lipofectamine™ LTX med Plus™ reagens	29
10. Forskjellige metoder for å indusere kjernelokalisering av FoxO3a.....	30
11. Høsting.....	32

12. Luciferase reporter gen assay	32
13. Fiksering av celler og kjernefarging	33
14. Western blot	34
RESULTATER.....	35
1. Rekombinasjon av EGFP-FoxO3a og mCherry-FoxO3a.....	35
1. Konstruksjon av plasmidene EGFP-FoxO3a og mCherry-FoxO3a	35
2. Restriksjonsanalyse av mCherry-FoxO3a, EGFP-FoxO3a og ulike varianter av HA-tagget FoxO3a	36
3. Western blot viser at EGFP-FoxO3a, FoxO3a-EGFP og mCherry-FoxO3a uttrykker proteiner.....	37
4. EGFP tag i C-terminal til FoxO3a gav klarest cytoplasmatisk lokalisering ...	37
2. Lokalisering av de forskjellige FoxO.....	38
1. EGFP og FoxO6 påvirkes ikke av stress, mens FoxO3a lokaliseres til kjernen i forskjellig grad	39
2. FoxO3a var tydelig lokalisert i cytoplasma under ustressete forhold, men lokalisererte seg til kjernen i økende grad ved serumsult og behandling med etoposid eller wortmannin	40
3. Kinaseaktiv MK5 induerte klar kjernelokalisering av FoxO3a, men moderat økning av transkripsjonsaktivitet	43
1. Villtype- eller konstitutiv aktiv mutant av MK5 (L337G) induerte tydelig kjernelokalisering av FoxO3a.....	44
2. MK5 induerte en moderat økning av FoxO3a transkripsjonsaktivitet	46
3. Western blot av de ulike MK5 variantene viste at proteinene uttrykkes	48
4. ERK3 induerte en liten endogen aktivitet av MK5 som resulterte i en beskjeden økning i FoxO3-mediert transkripsjonsaktivitet	48
4. Aktivisering av FoxO3a-mediert transkripsjon via trippel mutant (TM) FoxO3a, østrogen reseptor (ER) tagget FoxO3a, overuttrykking av FoxO3a og ulike former for stress	49
1. Trippelmutant FoxO3a induerte tydelig økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet av reporter genen FHRE-luc.....	49
2. FoxO3a med østrogen reseptor (ER) fikk en høyere FoxO3a-mediert transkripsjon når cellene ble behandlet med 4-hydroksytamoksifen (4-OHT)	50
3. Serumsult alene eller i kombinasjon med wortmannin gav noe økt luciferaseaktivitet hos celler med overuttrykk av FoxO3a.....	51
4. Western blot av HA-tagget FoxO3a og FoxO3a-FLAG viste at proteinene uttrykkes.....	52
5. FoxO3a regulerer uttrykket av p62	53
1. Trippelmutant FoxO3a induerte en tydelig økt FoxO3a transkripsjon	54
2. ER-tagget trippelmutant FoxO3a induerte økt FoxO3 transkripsjon når cellene ble behandlet med 4-OHT.....	55
3. Endogen aktivitet til FoxO3a var økt ved behandling med etoposid, serumsult alene eller kombinert med wortmannin.....	56
4. Villtype- og konstitutiv aktiv mutant MK5 (L337G) induerte økt genuttrykk fra p62 promoteren	58
DISKUSJON	59
1 FoxO3a med EGFP tag i den C-terminal eller N-terminal enden	59
2 Lokalisering av FoxO proteiner	60
3 Effekt av MK5 på FoxO3a subcellulær lokalisasjon og transkripsjonsaktivitet	61

4	Effekt av ERK3/4 og MK5 på FoxO3a subcellulær lokalisasjon og transkripsjonsaktivitet	63
5	FoxO3a og effekt på p62 promoteraktivitet	64
KONKLUSJON		67
REFERANSER		68
VEDLEGG		74
1.	Vedlegg 1: Rekombinasjon av pEXP-EGFP-FoxO3a	74
2.	Vedlegg 2: Rekombinasjon av pEXP-mCherry-FoxO3a	74
3.	Vedlegg 3: pHA-FoxO3a-WT-ER	75
4.	Vedlegg 4: Telling i 10 synsfelt under vanlig mikroskop viste dominant kjernelokalisering av FoxO3a når proteinet var kotransfektet med villtype- eller konstitutiv aktivt mutant MK5 (L337G).	76
5.	Vedlegg 5: Villtype MK5 induerte en moderat økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet	77
6.	Vedlegg 6: Celler som ble kotransfektet med aktiv mutant MK5 (L337G) og FoxO3a induerte en dobbelt så høy transkripsjonsaktivitet.....	78
7.	Vedlegg 7: ERK3 induerte økt FoxO3a transkripsjonsaktivitet via aktivering av endogen MK5.	79
8.	Vedlegg 8: p62	80
9.	Vedlegg 9: Trippelmutant FoxO3a gav signifikant økt FoxO3a transkripsjonsaktivitet	81
10.	Vedlegg 10: Stimulering med hormonet 4-hydroksytamoksifen (4-OHT) induerte høyest luciferaseaktivitet ved konsentrasjonen 1 µM 4-OHT	82
11.	Vedlegg 11: Serumsult alene eller kombinert med wortmannin induerte økt luciferaseaktivitet hos celler som var overuttrykket med FoxO3a.....	83
12.	Vedlegg 12: Trippel mutant FoxO3a induerte økt FoxO3a-mediert aktivitet av p62 promoteren.	84
13.	Vedlegg 13: FoxO3a-ER-TM gav tydelig økt FoxO3a-mediert transkripsjon når cellene ble behandlet med 4-OHT.....	85
14.	Vedlegg 14: Endogen aktivering av FHRE-luc og promoteren villtype p62.....	86
15.	Vedlegg 15: MK5 induert transkripsjonsaktivitet via p62 promoteren er uavhengig av FoxO3a bindingssete	87
16.	Vedlegg 16: 1 kb plus DNA ladder	88
17.	Vedlegg 17: Magic Marker TM XP Western Protein Standard	88

INTRODUKSJON

1. Protein kinaser og fosfataser

Protein kinaser og fosfataser spiller en viktig rolle i regulering og koordinering av metabolisme, genuttrykk, cellevekst, celledeling, cellemotilitet, celledifferensiering og apoptose [1]. Protein kinaser er enzymer som kovalent overfører γ fosfatgrupper fra ATP til serin-, threonin- eller tyrosin enheter til et målsubstrat. Fosforyleringen kan kontrollere proteinets enzymatisk aktivitet, protein- eller andre molekylinteraksjoner, lokalisering i cellen og tilbøyeligheten for degradering av proteaser [2]. Fosfataser derimot fjerner disse fosfatgruppene fra substratet, og virker derfor som negative regulatorer til protein kinasene. Til sammen er disse to enzymene kritiske komponenter for cellens liv, og det er kritisk at kinasene og fosfatasene opererer på en velordnet måte [1].

Protein kinaser kan videre klassifiseres inn i tre kategorier basert på deres katalytiske spesifisitet: tyrosin spesifikke kinaser, serin/threonin spesifikke kinaser og serin/threonin og tyrosin spesifikke kinaser [3].

1.1 Tyrosin kinaser

Tyrosin kinaser kan inndeles i to primære kategorier: reseptor protein kinaser (RTK) og ikke-reseptor protein kinaser. Reseptor protein kinaser er transmembrane reseptorer som spiller en viktig rolle for ekstracellulær signalisering til cytoplasma, mens ikke-reseptor protein kinaser er cytoplasmiske proteiner som overfører disse ekstracellulære signaler til nedadgående signalveier [4]. Under normale betingelser vil en ligand (eks: vekstfaktorer) binde seg til reseptor og indusere dimerisering og aktivering (via autofosforylering) av tyrosin kinaser. Dette fører til at flere signalveier i cytoplasma aktiveres og blant disse er Ras/Raf mitogen-aktivert protein kinase (MAPK) signalveien og fosfoinositol 3'-kinase/Akt (PI3K/AKT) signalveien og protein C signalveien. Intracellulære mediatorer i disse signalveiene overfører signaler fra membranreseptorer gjennom cytosol til kjernen, og dette kan medføre endringer i DNA syntese, celledeling, cellevekst, migrering, differensiering og apoptose [5].

Kreft kan oppstå gjennom forskjellige mekanismer som inkluderer overuttrykking av forskjellige vekstfaktorer (eks: VEGF, TGF- α) eller vekstfaktor reseptorer (eks: PDGF-R, EGF-R), deregulering av kinaser (eks: ABL), aktivering av onkogener (eks: Ras/Raf

signalveien) eller ved tap av tumor suppressor funksjoner (eks: mutasjoner i p53). Denne kunnskapen om hvordan en celle responderer til ekstracellulære signaler har ført til at protein kinaser har blitt viktige mål for medikamentell behandling av kreft [6].

1.2 Kinaser som mål for legemidler

Helt fram til 1990-tallet har legemidler mot kreft vært rettet mot DNA, metabolske enzymer, DNA topoisomerase, hormonreseptorer (eks: brystkreft), antiandrogener (ved prostatakreft) og stabilisering av mikrotubli. I de siste årene har man i behandlingen mot kreft utviklet monoklonale antistoffer (eks: trastuzumab) og legemidler som hemmer protein kinaser (eks: imatinib og gefitinib) [6]. I og med at protein kinaser har en sentral rolle er de også viktige mål for behandling av inflammatoriske sykdommer, diabetes og nevrodegenerative sykdommer [7].

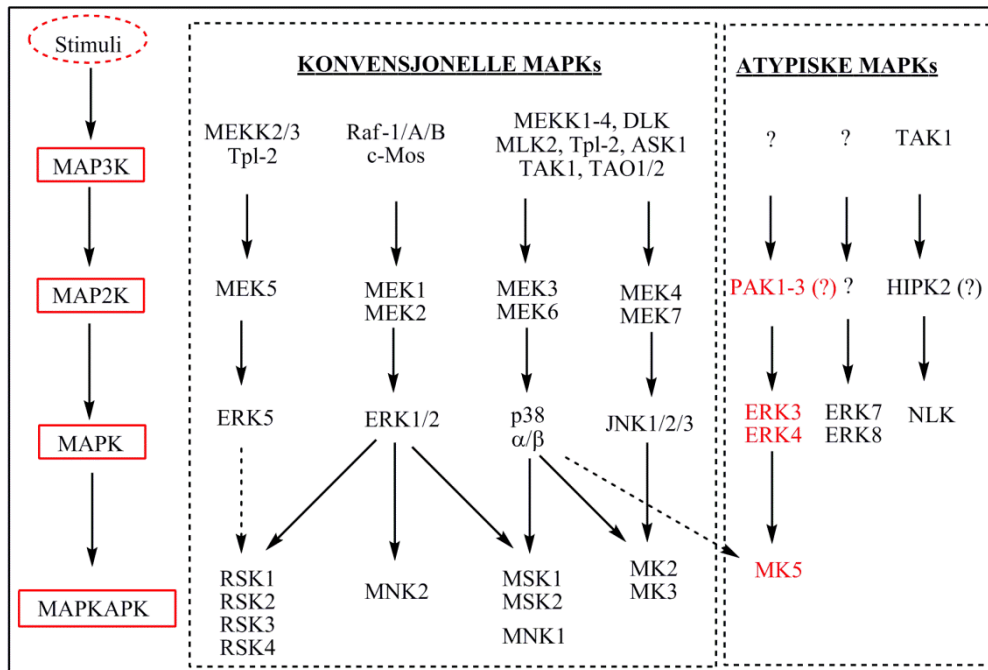
2. MAP-kinase signalvei

Mitogen-aktiverte protein (MAP) kinase signalveier er grundig studerte signalsystem som spiller en viktig rolle for signaloverføring hos alle eukaryote organismer. Signalveiene inkluderer MAP kinaser, og dette er en familie av serin/threonin protein kinaser som er essensielle for overføring av ekstracellulære signaler fra cellemembranen til kjernen [8]. MAP kinase signalveiene er involvert i mange cellulære prosesser som regulerer genuttrykk, celledeling, metabolisme, motilitet, differensiering, overlevelse og apoptose [9, 10].

2.1 Signalkaskaden

MAP-kinase kaskaden (figur 1) består av MAPK kinase kinase (MAP3K), MAPK kinase (MAP2K) og MAPK (MAP kinase) [10]. MAP3K er en serin/threonin kinase som blir aktivert gjennom fosforylering og/eller en interaksjon med GTP-bindende protein av Ras/Rho familiene i respons til ekstracellulære signal. MAP3K fosforylerer og aktiverer MAP2K som videre fosforylerer tyrosin og threonin enheter på MAPK slik at den blir aktiv. MAPK kan fosforylere flere målproteiner, inklusivt kinasene MAPKAPK (MAPK aktivert protein kinase, også kjent som MK), p90 ribosomal S6 kinase (RSK 1 – 4), mitogen- og stress-aktiverende kinase (MSK 1 – 2), MAPK-interagerende kinase (MNK 1 – 2), MAPK-aktivert protein kinase 2/3 (MK2/3) og MK5. Tilslutt vil disse nedstrøms kinasene og MAPK selv fosforylere målproteiner (protein kinaser, transkripsjonsfaktorer etc.) som er i cytoplasma eller kjernen slik at de gjennomgår en konformasjonsendring og påfølgende endring i aktivitet. Inaktivering

av MAPK i signalveien skjer via fosfataser, og disse kalles MAPK fosfataser. Disse fosfatasene reverserer fosforyleringen (fjerner fosfat) induisert at MAP2K slik at MAPK blir inaktivt [2, 8, 10].



Figur 1: MAPK signalkaskaden aktiverer MAPK eller MAPKAPK. Mitogener, stress og cytokinerner aktiverer forskjellige MAPK signalveier. Figuren er modifisert fra Cargnello M. og Roux P (2011) [10].

2.2 Gruppeinndeling av MAP-kinaser

Flere klassiske grupper MAP-kinaser finnes i pattedyr og disse er ERK1/2 (ekstracellulære signalregulerte protein kinase 1/2), JNK 1/2/3 (c-Jun amino (N)-terminal kinase 1/2/3), p38-MAPK og ERK5. I tillegg finnes de atypiske MAP-kinasene ERK3/4 (omtales senere i oppgaven), ERK7 og Nemo-lignende kinase (NLK) [10].

ERK1/2

ERK1 (MAPK1) og ERK2 (MAPK3) har 83 % aminosyreidentitet og uttrykkes i størst grad i hjernen, skjelettmuskulatur, thymus og hjertet [10, 11]. Disse ekstracellulære signalregulerte protein kinasene aktiveres av vekstfaktorer som inkluderer blodplatederivert vekstfaktorer (PDGF), epidermale vekstfaktorer (EGF), nerve vekstfaktorer (NGF) og insulin. I tillegg kan ERK1/2 bli aktivert gjennom G protein-koblede reseptorer (GPCR), cytokiner, osmotisk stress og mikrotubuli desorganisering [10]. I følge Seger og Krebs (1995) vil ERK fungere som en kommunikasjonsvei mellom overflatereseptorer og forskjellige intracellulære cellegrupper eller organeller [12]. Videre vil reseptor tyrosin kinaser (RTK) eller GPCR overfører signaler

til Raf/MEK/ERK kaskaden gjennom forskjellige isoformer av GTP-bindende proteiner i Ras familien (H-Ras, K-Ras og N-Ras). Dette fører til rekruttering av SOS (son of sevenless) som deretter kan stimulerer Ras til å omdanne GDP til GTP. Danningen av GTP gjør at Ras videre kan aktivere flere nedstrøms effektorproteiner, og serin/threonin kinasen Raf er en av disse. Når Raf stimuleres vil MEK1 (MAP2K1) og MEK2 (MAP2K2) bli fosforylert slik at MEK1/2 kan fosforylere og aktivere ERK1 eller ERK2 på det konserverte Thr-Glu-Tyr (TEY) motivet i aktivering-sløyfeselementet [10, 13]. Tilslutt kan de aktiverte kinasene ERK1/2 fosforylere en rekke andre substrater som inkluderer forskjellige membranproteiner (CD120a og calnexin), substrater i kjernen (Pax6, Elk-1, c-MYC og STAT3), cytoskjelettproteiner og flere andre kinaser (RSK, MSK og MNK) [10].

Normalt i hvilende celler er ERK1/2 lokalisert i cytoplasma, mens når de stimuleres av ekstracellulære stimuli transporteres en signifikant andel av ERK1/2 inn til kjernen [14]. ERK1/2 spiller en sentral rolle i regulering av cellevekst [15]. I tillegg har man funnet en korrelasjon mellom metastase og ERK1/2 aktivitet, og man tror at disse ekstracellulære kinasene kan bidra til å fremme cellemotilitet og migrering hos kreftceller. Siden metastase er en av hovedårsakene til at man dør av kreft, kan hemming av ERK (og muligens RSK) aktivitet ved bruk av små molekyler være en mulig metode for å hindre kreftcelleinvasjon og metastase [13].

JNK

JNK familien, også kjent som stress-aktiverende protein kinaser, består av isoformene JNK1, JNK2 og JNK3 (eller MAPK8, MAPK9 og MAPK10). JNK1/2 uttrykkes nesten overalt i kroppen, mens JNK3 er hovedsakelig uttrykt i hjernen, testiklene og hjertet [16]. I cellen er JNK1 mest lokalisert i cytoplasma, mens JNK2 er i hovedsak kjernelokalisert [17].

Alle disse kinasene aktiveres i respons på ulike typer stress som oksidativt stress, UV-stråling, cytokiner og ved redusert vekstfaktorstimulering (eks: serumsult). Signalveien som fører til JNK aktivering begynner med at MAP3K (figur 1) aktiverer MEK4 (MAP2K4) og MEK7 (MAP2K7) som videre katalyserer fosforylering av tyrosin og threonin enheter på det konserverte Thr-Pro-Tyr (TPY) motivet i aktiveringssløyfen til JNK. Aktivering av JNK vil videre medføre fosforylering av flere transkripsjonsfaktorer som c-jun, Elk-1, c-MYC, p53 og STAT3 [10].

I følge Xu *et al.* (2011) regulerer JNK autofagi ved å hemme FoxO-indusert uttrykk av autofagi-relaterte gener (eks: Atg8/Lc3b, Atg12 og Bnip3) og ved å øke uttrykket av proapoptotiske gener (eks: Bim) [18]. På denne måten er FoxO transkripsjonsfaktorer involvert i induksjon av apoptose og autofagi, og dette blir mer omtalt senere i oppgaven [19].

p38-MAPK

Der finnes fire gener for p38-MAPK i pattedyr, og disse er p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12) og p38 δ (MAPK13). p38 α og p38 β uttrykkes nesten overalt, mens p38 γ og p38 δ uttrykkes mer begrenset og kan derfor ha flere spesialiserte funksjoner [10]. I cellen tror man at p38 isoformene er mest lokalisert i kjernen og cytoplasma [20], mens under forskjellige typer stress vil de akkumulere seg i kjernen [10].

p38-MAPK signalveien (figur 1) aktiveres når enten stress (kjemisk, oksidativt, UV stråling hypoksi og iskemi) eller inflammatoriske cytokiner (IL-1 og tumor nekrosefaktor alfa (TNF- α)) aktiverer flere ulike typer MAP3K (eks: MEKK1-4, MLK2/3, ASK1, DLK, Tpl-2, TAK1 og TAO1/2) [10]. Videre kan kinasene MEK3 (MAP2K3) eller MEK6 (MAP2K6) fosforylere og aktivere p38-MAPK via det konserverte Thr-Gly-Tyr (TGY) motivet i aktiveringsløyfen [13]. Denne fosforyleringen vil kunne aktivere en rekke substrater i cytoplasma (eks: MNK1/2 og MK2/3) og kjernen (eks: MSK1/2, p53, MEF2 og GADD153) [10].

Cuadrado *et al.* (2010) har i sin review artikkel oppsummert at denne p38 MAPK signalveien spiller en viktig rolle i flere biologiske prosesser som stress og inflammasjon, og i tillegg regulering av celledeling, celledifferensiering og overlevelse [21].

ERK5

ERK5 (MAPK7) uttrykkes i størst grad i hjernen, thymus og milten [22]. I cellen er denne kinasen normalt lokalisert i cytoplasma under ustressede forhold, mens under stress eller stimuli fra MEK5 vil ERK5 transporteres til kjernen [10].

Signalveien som fører til aktivering av ERK5 starter med aktivering av kinasen MEKK2/3 (MAP3K) via serum, vekstfaktorer eller oksidativt stress. Videre vil MEKK2/3 fosforylere og aktivere MEK5 (MAP2K5) som deretter kan fosforylere tyrosin og threonin enheter på det

godt konserverte Thr-Glu-Tyr (TEY) motivet i aktiveringssløyfen til ERK5. Tilslutt kan ERK5 aktivere en rekke substrater som inkluderer MEF2, c-MYC, SGK og Bad [10].

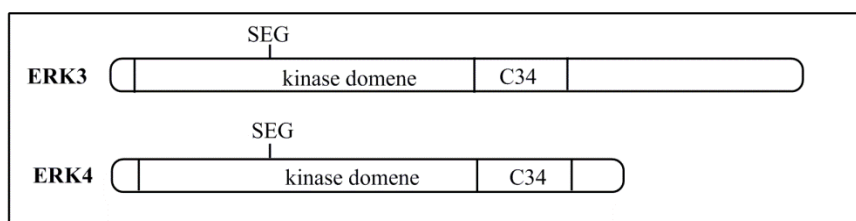
ERK5 er viktig for tidlig fosterutviklingen, utvikling av det vaskulære systemet og for overlevelse [10]. I tillegg har Wang *et al.* (2006) vist at ERK5 regulerer aktiviteten til FoxO3a transkripsjonsfaktorer via PI3K/Akt-SGK signalveien (omtales senere i oppgaven) [23].

3. Atypiske MAP kinaser

De atypiske MAP kinasene inndeles i ERK3 (MAPK6), ERK4 (MAPK4), ERK7 (MAPK15) og Nemo-lignende kinase (NLK). I denne delen omtales kun ERK3 og ERK4.

3.1 ERK3 og ERK4

Det som skiller de konvensjonelle MAP kinasene fra de atypiske MAP kinasene ERK3 og ERK4 er at tyrosin i aktiveringssløyfen (Thr-Xaa-Tyr = T-X-Y) har blitt erstattet med glutaminsyre. Dette gjør at ERK3 og ERK4 får et enkelt fosfoakseptor motiv (Ser-Glu-Gly = S-E-G) i aktiveringssløyfen mellom kinase subdomene VII og VIII (figur 2) [24]. I tillegg er APE (Ala-Pro-Glu) motivet i subdomene VIII erstattet med SPR (Ser-Pro-Arg) i ERK3 og ERK4, og det er kun disse to protein kinasene i det menneskelig genom som har en argininenhet i dette motivet [24].



Figur 2: Skjematisk fremstilling av de atypiske MAP kinasene ERK3 og ERK4. C34 er en konservert region. ERK3 har en C-terminal forlenging på 721 aminosyrer, mens ERK4 har 587 aminosyrer [24, 25].

Hovedforskjellen mellom ERK3 og ERK4 er at ERK 4 er et stabilt protein, mens ERK3 er et veldig ustabil protein som lett blir degradert av proteosomer [24, 25]. En annen viktig forskjell mellom de atypiske kinasene er lokalisasjon i cellen. ERK3 finner man både i cytoplasma og cellekjernen, mens ERK4 hovedsakelig befinner seg i cytoplasma [24]. ERK3/4 har et felles substrat som er MAPK-aktivert kinase 5 (MK5) [26, 27]. I tillegg har Long *et. al* (2012) nylig funnet ut at ERK3 interagerer med og fosforylerer steroid reseptor

koaktivator 3 (SRC-3). SRC-3 er et onkogent protein som er overuttrykket i en rekke ulike kreftformer som inkluderer lungekreft, brystkreft, pankreaskreft og tarmkreft [28].

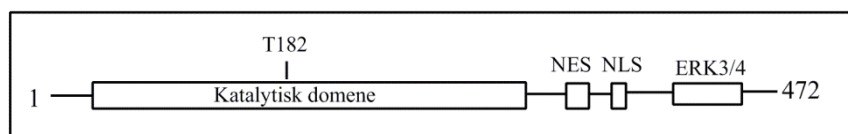
Den biologiske rollen til ERK4 er fortsatt dårlig forstått, men man vet at ERK3 spiller en viktig rolle for flere biologiske funksjoner som celleproliferasjon, celledifferensiering og celledifferensiering [10]. Klinger *et al.* (2009) har tidligere vist at tap av ERK3 funksjon har medført hemmet vekst av livmor, forsinket modning av lungene og tidlig neonatal død [29].

4. MAPK-aktivert protein kinaser (MKs)

Det finnes tre ulike medlemmer av MAPK-aktivert protein kinaser (MAPKAPK eller MK) familien, og disse er MK2, MK3/3pK og MK5/PRAK (p38- regulert/aktivert kinase). Disse serin/threonin kinasene kobler MAPK signalveien til spesifikke responser som inkluderer celledifferensiering, kromatin remodulering, reorganisering av cytoskjelett og celle migrering [30]. I denne delen velges det kun å fokusere på MK5.

4.1 MK5

MK5 har et katalytisk domene hvor threonin 182 (T182) fungerer som en enkel fosfoakseptor i aktiveringssløyfe segmentet (figur 3) [31]. I tillegg inneholder MK5 en nukleær eksport sekvens (NES), nukleær lokaliseringsssekvens (NLS) og et MAPK bindingssete for ERK3/4 [32, 33]. Noe som skiller MK5 fra MK2 og MK3 er at kinasen inneholder en 100 aminosyre lang C-terminal forlenging som inneholder viktige sekvenser for interaksjon med ERK3 og ERK4 [10, 25]. Alle MAPK-aktiverte protein kinaser kan bevege seg fra kjernen til cytoplasma på grunn av strukturene NES og NLS på C-terminalen. Det er fortsatt uklart om MK5 er mest lokalisert i kjernen eller cytoplasma, men ifølge Seternes *et al.* (2002) er MK5 mest dominerende i kjernen under ustressete forhold. Dersom cellen blir stresset vil MK5 kunne translokere til cytoplasma [33].



Figur 3: Skjematisert fremstilling av MK5. Figuren er modifisert fra Perander *et al.* (2008) [32].

MK5 er en kinase som aktiveres av p38 og de atypiske MAP kinasene ERK3/4 [31, 34]. Aktivert MK5 skjer via en fosforylering av T182 i aktiveringssløyfen. Når ERK3 eller

ERK4 er kouttrykt sammen med MK5 ser man at T182 blir mer fosforylert samtidig som man også ser at MK5 lokaliseres til cytoplasma [10, 26]. Den eksakte biologiske funksjonen til MK5 er ennå ikke kjent, men mye tyder på at MK5 spiller en viktig rolle for onkogen-indusert senescence [35] og aktin remodulering [36]. I tillegg tror man at MK5 kan være et viktig ERK3-effektor protein som medierer disse effektene for å fremme tumor suppressjon og onkogen-indusert senescens [10]. Videre har Kress *et al.* (2011) funnet ut at MK5 kan spille en viktig rolle i en negativ feedback loop som regulerer uttrykket av onkogenet c-MYC som ser ut til å være viktig for utvikling av kolorektal kreft [37].

5. Fosfoinositol 3'-kinase/Akt (PI3K/Akt) signalveien

En annen viktig signalvei nedstrøm for Ras er fosfoinositol 3'-kinase/Akt (PI3K/Akt) signalveien. Denne signalveien omtales siden Akt-avhengig fosforylering er kritisk for regulering og funksjon av aktiviteten til transkripsjonsfaktoren FoxO3a, og i tillegg er økt aktivitet i PI3K/Akt signalveien kjennetegnet for mange typer kreft [38].

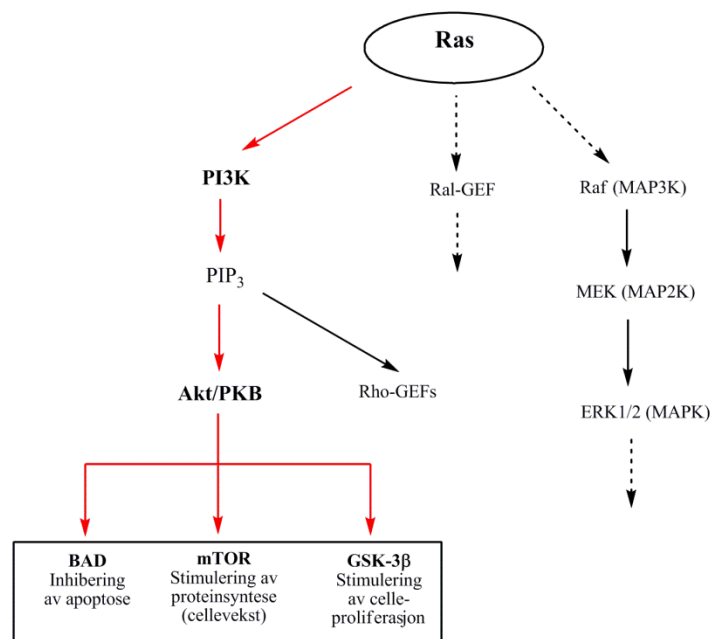
5.1 PI3K/Akt signalveien

I cellemembranen til eukaryote celler finnes fosfolipider som fungerer som en barriere mellom cellens ytre og indre vandige omgivelser. Biokjemien til disse fosfolipidene viser at de er amfifile, som betyr at de har en hydrofil- og hydrofob struktur. Noen fosfolipider inneholder en inositolgruppe, som er et vannløselig karbohydrat (polyalkohol). Denne inositolgruppen kan videre modifiseres til fosfoinositol. Fosfoinositol kan videre bli kløyd til inositol (1,4,5) trifosfat (IP_3) som videre kan diffundere ut fra membranen. På denne måten kan IP_3 fungere som en sekundær budbringer (second messenger) som sender signaler fra plasmamembranen til flere ulike deler i cellen. Et annet produkt som dannes fra kløyvingen av fosfoinositol er diacylglycerol (DAG). DAG kan aktivere protein kinase C (PKC) eller fungere som et forankringspunkt til forskjellige proteiner i cytoplasma [39].

Studier fra 1980 og fremover har vist at fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) spiller en nøkkelrolle for mange cellulære prosesser som inkluderer overlevelse, celleproliferasjon og celledifferensiering (figur 4). PI3K vil via aktivering av vekstfaktorer eller cytokiner danne intracellulære signaler som via dannelse av fosfolipider aktivere serin-threonin kinasen Akt/PKB. Tumor suppressoren PTEN (fosfatase og tensin homolog) er den viktigste negative

regulatoren til PI3K signalveien. Et tap av denne tumor suppressoren vil føre til uhemmet signalisering av PI3K signalveien og utvikling av kreft [38].

Akt, også kallet protein kinase B, er en serin/threonin protein kinase subfamilie som består av tre medlemmer: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β og Akt3/PKB γ . Når Akt fosforyleres via PI3K blir kinasen aktiv og kan fosforylere mange andre proteiner som for eksempel glykogen syntase kinase 3 (GSK-3), mTOR (mammalian target of rapamycin), BAD (Bcl-2-assosiert dødspromoter) og FoxO transkripsjonsfaktorer. På denne måten kan Akt regulere mange viktige funksjoner som involverer celledivisjon, proteinsyntese, metabolisme og overlevelse (inhibering av apoptose) [38].



Figur 4: PI3K/Akt signalveien. Figuren er modifisert fra Weinberg *et al.* (2007) [39].

6. Forkhead transkripsjonsfaktorer

Forkhead transkripsjonsfaktorer (Forkhead box eller Fox) er oppkalt etter bananfluen *Drosophila melanogaster* genet *fkh* (forkhead). Disse proteinene finnes i alle eukaryote celler og i mennesker finnes der 39 medlemmer som videre er inndelt i 19 subklasser av Fox-gener (A til S) [40, 41]. I denne oppgaven fokuseres det på Forkhead box klasse O (FoxO) transkripsjonsfaktorer med hovedvekt på FoxO3a.

FoxO proteinene kan fremme celledivisjon arrest, reparerer DNA skader og detoksifisere reaktive oksygenradikaler [42-44]. I tillegg spiller de en viktig rolle for autofagi og apoptose

[45-47]. En defekt i dannelsen av FoxO proteiner vil kunne resultere i økt celleoverlevelse som videre kan predisponere for utvikling av brystkreft, prostatakreft, leukemi, glioblastom og redusert levealder [48-50]. På bakgrunn av dette kan FoxO proteiner være nye terapeutiske mål for en rekke ulike kreftsykdommer [51].

6.1 Forkhead box klasse O

Det er kun et gen som koder for Forkhead box klasse O (FoxO) transkripsjonsfaktor i *Caenorhabditis elegans* (daf-16) og *Drosophila* (dFoxO), mens det er fire ulike gener for FoxO transkripsjonsfaktorer i pattedyr. Disse fire forskjellige FoxO proteinene er FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHRL1), FoxO4 (AFX) og FoxO6 [52] (fullstendig liste finnes på denne siden: <http://biology.pomona.edu/fox/>). FoxO transkripsjonsfaktorer har et godt konserverte 100 aminosyrelangt «winged-helix» struktur som utgjør det DNA-bindende domene (også kallet Forkhead box domenet). Dette forkhead domenet består følgelig av tre α -helikser (H1, H2 og H3), tre β -strands (S1, S2 og S3) og to vingelignende sløyfer (W1 og W2). [40, 53, 54]. FoxO transkripsjonsfaktorer regulerer gentranskripsjon ved at de binder seg til forkhead respons element (FHRE) motivet til DNA på 5'-TTGTTTAC-3' [55].

6.2 Regulering av FoxO subcellulære lokalisering

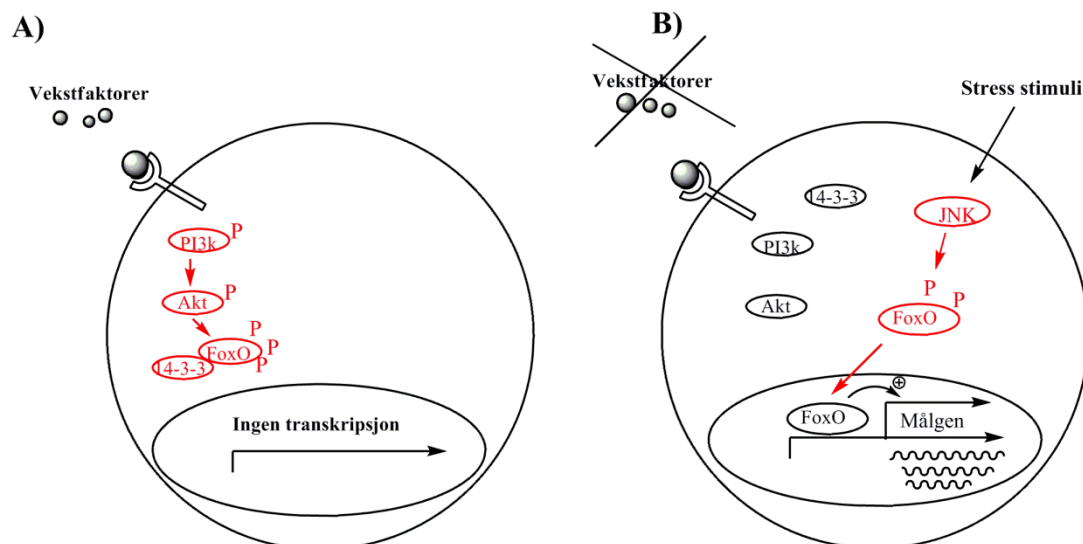
Lokaliseringen til FoxO proteiner reguleres av posttranslasjonelle modifikasjoner (PTM) som fosforylering, ubiquitinerings, acetylering og deacetylering. Når FoxO proteiner er lokalisert i kjernen kan disse proteinene kontrollere transkripsjonsprogrammer, mens i cytoplasma blir de utsatt for proteosomale degradering [56].

FoxO i cytoplasma: Fosforylering

Genetiske studier i *C. elegans* har vist at forkhead transkripsjonsfaktor daf-16 fungerer nedstrøms for Akt og SGK (serum og glukokortikoid-induserbar kinase) i PI3K signalveien [57]. Insulin, epidermale vekstfaktorer (EGF) og andre vekstfaktorer vil stimulere PI3K signalveien via Akt eller SGK slik at FoxO proteiner blir negativt regulerte [45, 58, 59]. Akt eller SGK kan fosforylere FoxO proteinene på tre konserverte steder (figur 6) slik at FoxO proteiner lokaliseres til cytoplasma (figur 5a) [45, 60]. Når FoxO proteiner får fosforylert de to første fosforyleringssetene (T32 og S253 for FoxO3a) dannes et bindingssete for 14-3-3 adapterproteiner (figur 6), og binding til disse adapterproteinene gjør at FoxO transporteres ut til cytoplasma [45, 61]. Et unntak er FoxO6 som er i følge Van Der Heide *et*

al. (2005) er mest lokalisert i kjernen [62]. Dette skyldes at FoxO6 mangler et fosforyleringssete i C-terminal som er nødvendig for transport ut til cytoplasma (figur 6) [48].

Lokalisasjon av FoxO proteiner er viktig fordi cytoplasmalokalisering vil medføre at FoxO-mediert transkripsjon (transaktivering) av målgener hemmes [45, 60], og i følge Hu *et al.* (2004) korrelerer cytoplasmalokalisering av FoxO3a med en dårligere prognose hos pasienter med brystkreft [63].



Figur 5: Regulering av FoxO-mediert transkripsjon. **A.** Når vekstfaktorer er tilgjengelig vil FoxO være fosforylert og være lokalisert i cytoplasma. **B.** Når vekstfaktorer ikke er tilgjengelig (B) vil FoxO ikke bli fosforylert og være lokalisert i kjernen. Når cellen blir stresset vil JNK signalveien fosforylere FoxO slik at FoxO translokeres inn til kjernen. Figuren er modifisert fra Reagan-Shaw *et al.* (2007) [41].

FoxO i kjernen: Defosforylering og fosforylering

Ved fravær av vekstfaktorstimulering (figur 5b) vil PI3k/Akt signalveien være inaktiv og FoxO vil være defosforylert. Fosfatase som er ansvarlig for defosforylering er ennå ikke blitt karakterisert, men man tror at protein fosfatase 2A (PP2A) er involvert i defosforyleringen av FoxO3a [64]. Defosforylering av FoxO svekker bindingsevnen til 14-3-3 proteiner som gjør at FoxO vil lokaliseres til kjernen. I tillegg vil stress signalering fremme transport av FoxO proteiner til kjernen ved at de blir fosforylert på et annet område (figur 6) [65]. I respons til oksidativt stress vil protein kinasen MST1 (mammalian Ste20-lignende kinase) fosforylere FoxO3a på Ser207 (S207) i det DNA-bindende domene. Denne fosforyleringen vil videre forstyrre bindingen mellom FoxO3a og 14-3-3 proteiner slik at FoxO3a translokeres til kjernen [66]. Når JNK blir stimulert vil dette føre til fosforylering av FoxO proteiner på et annet område enn Akt og SGK (figur 6; fosforylering av seter i C-terminal). I tillegg vil JNK

også fosforylere 14-3-3 proteiner, og dette forhindrer interaksjon mellom FoxO og 14-3-3 proteinene [67]. Kort oppsummert vil stress via MST1 eller JNK hemme PI3K-Akt/SGK signalveien slik at FoxO proteiner lokaliseres til kjernen. I kjernen vil FoxO proteiner binde seg til DNA via Forkhead box domenet for å inducere uttrykk av gener som kan resultere i cellyklus arrest, DNA reparasjon og apoptose [41]. I følge Chiacchiera *et al.* (2010) har de oppsummert at FoxO3a kan inducere transkripsjon av målgener som er involvert i cellyklus arrest (eks: p21, p27 og cyklin G2), apoptose (eks: GADD45, Bim, FasL og PTEN), autofagi (eks: Atg12, BNIP3 og BNIP3L), metabolisme og stress [68].

6.3 Regulering av mengden FoxO

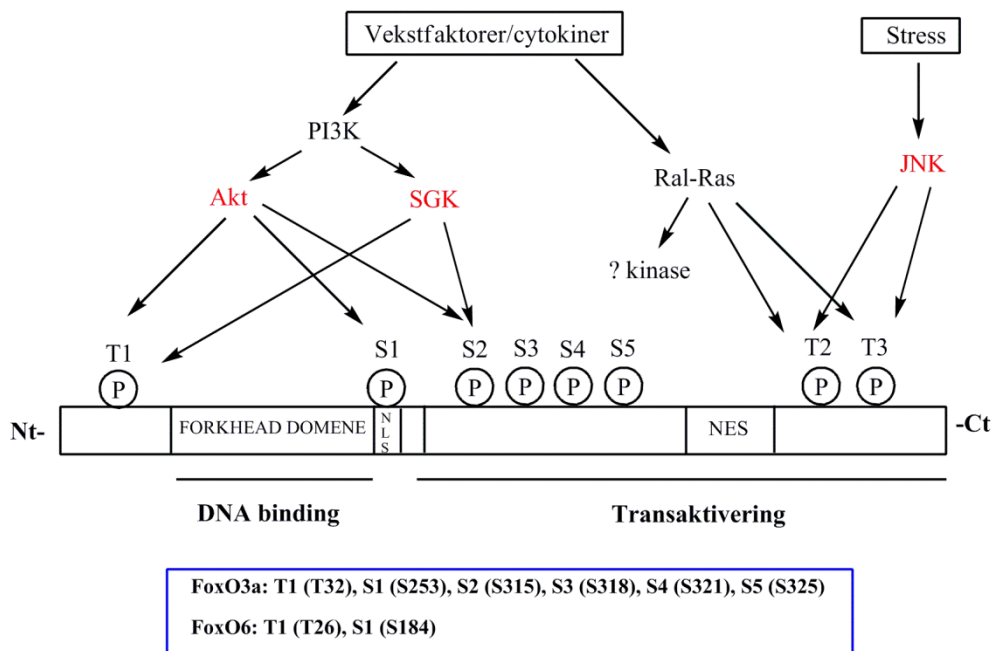
FoxO proteiner er generelt veldig stabile proteiner, men under tilgang til insulin eller vekstfaktorer kan FoxO proteiner først bli fosforylert og senere bli ubiquitinert for å bli degradert av proteosomer i cytoplasma [69, 70]. E3 ubiquitin ligase er ansvarlig for ubiquinering og proteosomal degradering av FoxO1 er SCF^{Skp2} (subenhet av Skp/Cull/F-box (SCF)) [71], mens for FoxO3a kalles den inhibitor av kappa-B kinase β (IKK β) [72]. Oksidativt stress vil derimot øke stabiliteten til FoxO ved at proteinet oppholder seg i kjernen slik at det ikke blir ubiquitinerte [65].

6.4 Regulering av FoxO-mediert transkripsjon

Insulin eller vekstfaktorer vil via fosforylering og cytoplasmalokalisering hemme FoxO-mediert transkripsjon. I tillegg til at FoxO proteiner er lokalisert i cytoplasma har Zhang *et al.* (2002) funnet ut at når FoxO1 fosforyleres på S256 vil dette introduserer en negativ ladning på det ellers positive ladete DNA-bindende domenet slik at binding til DNA hemmes [73].

Ved fravær av vekstfaktorstimulering kan AMP-aktivert protein kinase (AMPK) fosforylere FoxO3a på seks ulike seter *in vitro* (T179, S399, S413, S355, S588 og S626) for å øke FoxO3a-mediert transkripsjon [74]. I tillegg vil FoxO-mediert transkripsjon bli hemmet når p300/CBP (p300/CREB-bindende protein) acetylerer FoxO slik at proteinet ikke klarer å binde seg til DNA [75]. I kjernen vil acetylte FoxO proteiner rekruttere sirtuin protein (sirt1) som er en konstitutiv kjernelokalisert nikotinamid adenin dinukleotid-avhengig protein deacetylase. Sirt1 vil gjennom deacetylering av FoxO proteiner bidra til å fremme celleoverlevelse under stress og beskytte proteinene mot apoptose [41, 56]. I følge Brunet *et al.* (2004) vil deacetylering av FoxO3a via sirt1 aktiverer transkripsjon av stressresistente

gener (eks: p27, kip1 og GADD45) og samtidig hemme transkripsjon av apoptotiske gener som *Bim* og *Fas* ligand [65].



Figur 6: Fosforyleringssteder på FoxO3a og FoxO6. Vekstfaktorer eller cytokiner kan via PI3K/Akt (eller SGK) fosforylere FoxO3a på Threonin32 (T32), Serin253 (S253) og Serin315 (S315) [45]. FoxO6 er hele tiden kjernelokalisert fordi proteinet mangler fosforyleringssete i C-terminal [48]. NLS er en nukleær lokaliseringsskvens, mens NES er en nukleær eksport skvens (figuren er modifisert fra Arden, 2006) [48].

7. Autofagi og p62

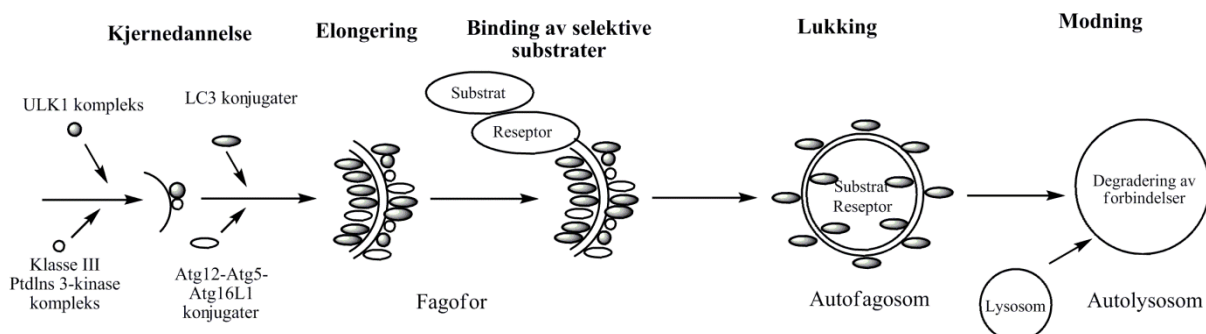
Autofagi og ubiquitin-proteosom systemet (UPS) er de to mest kjente signalveiene for degradering av intracellulære proteiner og organeller [76]. Autofagi (gresk ord for «selvspising») er hovedsignalveien for degradering av langlevende proteiner og organeller i cytoplasma [77]. Videre er autofagi tilpasset slik for å beskytte humane celler mot forskjellige patologier som kreft, neurodegenerative sykdommer, leversykdommer, muskelsykdommer, hjertesykdommer, alder og infeksjoner [78]. I følge Bjørkøy *et al.* (2005) er proteinet p62, også kjent som sequestosome 1 (SQSTM1 eller p62/SQSTM1), et viktig substrat for autofagi [79]. Flere studier har også vist at i tillegg til kreft spiller p62 en viktig rolle i neurodegenerative sykdommer som inkluderer Parkinson's sykdom, Alzheimer's sykdom og Huntington's sykdom [80-82].

7.1 Autofagi

Autofagi er en intracellulær katabolsk prosess som i hovedsak regulerer omsetningen av proteiner, nukleinsyrer, små molekyler og organeller. Når disse forbindelsene transporteres til lysosomet blir de degradert og følgelig resirkulert som næringsstoffer eller byggemateriale til cellens anabole prosesser [8, 83]. I denne delen fokuseres det på makroautofagi (heretter autofagi) som er en av tre ulike typer autofagi [84].

Hos nesten alle celler vil autofagi ha en basalaktivitet for å utføre homeostatiske funksjoner som involverer omsetningen av proteiner og organeller. Under sult eller mangel på vekstfaktorer (eller rapamycin) oppreguleres autofagi for å generere intracellulær næring og energi i form av ATP [78, 85]. I tillegg kan autofagi oppreguleres når cellen gjennomgår strukturelle remodulleringer under celleutvikling, og dette gjør at cellene kan kvitte seg med skadelige cytoplasmatiske komponenter (eks: proteinaggregater) og infeksjoner. Autofagi reguleres også av tilgjengelighet på næring (særlig aminosyrer), temperatur, hormoner, oksygenkonsentrasjon og celletetthet [78].

Aktivering av autofagi via sult eller mangel på vekstfaktorer fører til dannelse av en fagofor eller en isolert membran som former en vesikkel med dobbelt membran, også kallet et autofagosom (figur 7). Autofagosomet vil etter hvert fusjonere seg med lysosomer som da vil frigjøre lysosomale enzymer som tilslutt degraderer forbindelsene til frie nukleotider, aminosyrer og fettsyrer [78, 83].



Figur 7: Mekanismen til dannelse av autofagosom og katabolisme av proteiner og organeller i cytoplasma. Dannelse av autofagosom initieres av UKL1 komplekset og klasse III ptdlns 3-kinase kompleks. I tillegg vil Atg (AuTofagi-relaterte gener) proteinene være viktig for vekst av fagoforen (elongering). Videre vil fagoforen binde opp substrater slik at den lukkes til et autofagosom. Tilslutt degraderes substratet ved fusjonering med et lysosom. Figur er modifisert fra Johansen og Lamark (2011) [83].

En viktig negativ regulator til autofagi er mTOR kinase (mammalian target of rapamycin), og hemming av autofagi oppstår når vekstfaktorer via stimulering av klasse I PI3K/Akt signalveien aktiverer mTOR kinase [78]. I tillegg finnes der også flere andre viktige regulatormolekyler som er viktig for autofagi, og noen av disse er: 5'-AMP-aktiverende kinase (AMPK), tumor suppressor proteinet p53, ERK1/2, p38 MAPK og FoxO3a [85-87]. Flere eksperimenter har vist at når FoxO3a er defosforylert og kjernelokalisert i hjertemuskelceller vil dette aktivere viktige gener (eks: Atg12, LC3 og gabarapl 1) som er involvert i signalveien til autofagi [88]. I tillegg beskriver Mammucari et al. (2007) at FoxO3a kontrollerer transkripsjon av flere viktige autofagi-relaterte gener [47].

Nedstrøms for mTOR kinase finnes det mer enn 20 typer autofagi-relaterte gener (ATG) som koder for proteiner som er viktig for å iverksette autofagi [78]. ATG1 (ULK1) er en serin-threonin kinase som er viktig for aktivering av autofagi, og denne kinasen fosforylerer ATG13. Når autofagi aktiveres vil fosforyleringen av ATG13 være redusert slik at man får økt dannelse av kompleksene ATG1-ATG13. ATG6 (Beclin 1) spiller også en viktig rolle for signalering av autofagi, eller under dannelse av autofagosomet. Videre vil to proteinkonjugat systemer være nødvendig for autofagosom dannelse, og disse er ATG12-ATG5 og ATG8-fosfatidyletanolamin (også kallet LC3) (figur 7) [89]. Disse autofagosomene kan videre ta opp forskjellige cellulære strukturer som proteinaggregater, peroksisomer, mitokondrier og ribosomer. I tillegg vil autofagosomene fusjonere seg med lysosomer slik at de forskjellige strukturene bli hydrolysert av enzymer og resirkulert til forbindelser som til slutt kan brukes til energiproduksjon [76].

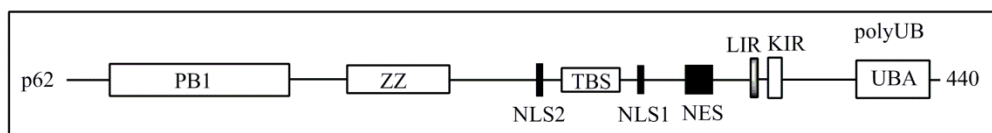
Tap av autofagi resulterer i akkumulering av ubiquitin-positive proteinaggregater (også kjent som inklusjonslegemer) i cytoplasma, og dette har følgelig ført til utvikling av neurodegenerative sykdommer [90, 91]. På bakgrunn av dette har man funnet ut at proteinet p62 spilte en kritisk rolle for autofagi ved at p62 både binder seg til polyubiquitinerte proteiner i proteinaggregater og til LC3 [92, 93].

7.2 p62

p62 er et multifunksjonelt ubiquitin-bindende scaffold protein som spiller en viktig rolle i celledatering, kontroll av proteiners katabole signalveier og autofagi [94]. I tillegg til kreft

og nevrodegenerative sykdommer er p62 også assosiert med Paget's sykdom, som er en beinsykdom karakterisert med økt osteoklastaktivitet [95].

Det humane p62 proteinet er 440 aminosyre langt og har en N-terminal med et PB1 domene (Phox og Bem1p), ZZ-type zink finger domene og TRAF6-bindende domene (TBS) (figur 8) [94]. PB1 domenet er et protein-protein interagerende domene som gjør at p62 kan interagere med protein kinaser som PKC, MEKK3, MEK5, ERK og autofagi-reseptoren NBR1 (nabo til Brca1 gen) [94]. I tillegg er PB1 domenet via binding til atypisk protein kinase C (aPKC) involvert i aktivering av transkripsjonsfaktor NF- κ B (kjernefaktor kappa beta) som spiller en viktig rolle for proinflammatorisk signalering og kreft [94, 96]. C-terminalen til p62 består av UBA (UB-assosiert) domene som er ansvarlig for å binde seg til ubiquitin. I følge Seibenhener et al. (2004) kan UBA domenet til p62 kan binde seg til polyubiquitinerte proteiner og frakte dem videre til proteosomal degradering [97]. p62 inneholder også to PEST sekvenser som er proteolytiske signaler som er viktig for hurtig degradering. I tillegg kan mange PEST sekvenser være viktige mål for kaspaser [98].



Figur 8: Skjematisk fremstilling av p62. Modifisert fra Johansen og Lamark (2011) [83].

p62 er en komponent av inklusjonslegemer som finnes i forskjellige proteinaggregat sykdommer. Dannelsen av p62 legemer har vist seg å være avhengig av ubiquitin-bindingsevnen til UBA-domenet og polymeriseringsmuligheten til PB1 domenet [94]. Autofagimarkøren LC3 har vist seg å lokalisere seg på p62 proteiner og i følge Johansen (2011) og Komatsu's gruppe vil p62 direkte binde seg til LC3 via LIR motivet, og denne interaksjonen er nødvendig for degradering av p62 proteiner via autofagi [83]. p62 proteiner kan danne aggregater med ubiquitinerte proteiner og merke dem for videre degradering, og på denne måten tror man at p62 spiller en viktig rolle for eliminasjon av proteiner gjennom autofagi [94].

8. Apoptose og FoxO3a

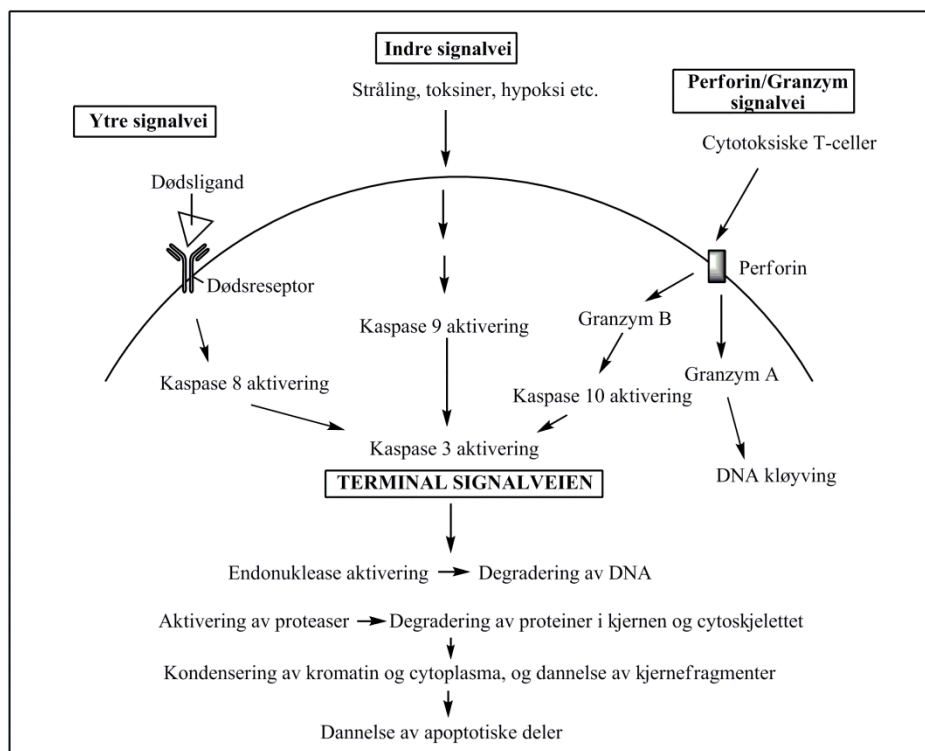
I følge Fu *et al.* (2008) spiller FoxO transkripsjonsfaktorer en viktig rolle for apoptose og kreft [99]. Apoptose har siden det ble introdusert av Kerr *et al.* (1972) i 1972 blitt definert

som en type «programmert celledød», og dette er en genetisk prosess som involverer eliminasjon av celler [100, 101]. Denne typen programmert celledød skjer normalt under utvikling og aldring, og er en homeostatisk mekanisme som opprettholder cellepopulasjoner i cellelev. I tillegg kan også apoptose fungerer som en forsvarsmekanisme når celler blir skadet av sykdom eller av andre skadelige stimuli som for eksempel stråling eller legemidler mot kreft (cytostatika) [100].

8.1 Signalveien til apoptose

Apoptose inndeles i tre signalveier som fører til den samme terminale signalvei (figur 9):

1. Ytre signalvei
2. Indre signalvei
3. Perforin/granzym signalvei



Figur 9: Sjematisk oversikt over signalveien til apoptose. Figuren er modifisert fra Elmore, 2007 [100].

Den ytre signalveien initierer apoptose via en dødsreseptor-dødsligand interaksjon. Disse dødsreseptorene tilhører tumor nekrose faktor (TNF) reseptor familien, og felles for alle disse er at de har et cysteinrikt ekstracellulært domene og et cytoplasmatisk domene på omtrent 80 aminosyrer som kalles for «dødsdomenet» [102]. Dette dødsdomenet er viktig for videreformidling av dødssignaler fra cellens overflate til cellen intreacellulære signalvei. De

best karakteriserte ligand og korresponderende dødsreseptorer er FasL/FasR og TNF- α /TNFR1 modeller. Binding av TNF ligand til TNF reseptor (eller FasL til FasR) resulterer også i en rekruttering av adapterprotein, men her er proteinet TRADD som rekrutterer FADD. FADD vil så assosiere seg med prokaspase 8 via dimerisering og aktivere kaspase 8 for så å trigge initiering av den terminale signalveien [100].

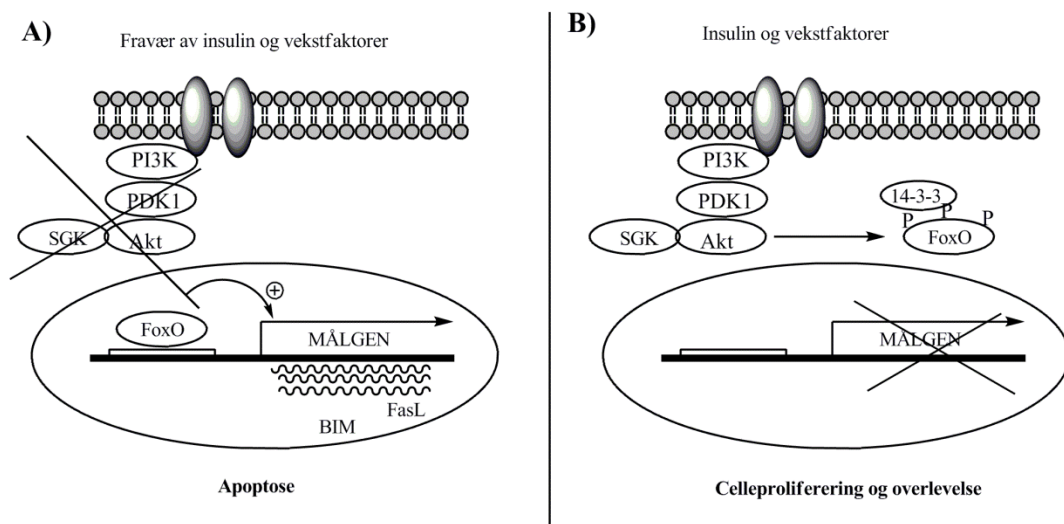
Den indre signalveien involverer en rekke av non-reseptor medierte stimuli som produserer intracellulære signaler som tilslutt aktiverer kaspase-9 og den terminale signalveien. Signaler som aktiverer apoptose via den indre signalveien er fravær av vekstfaktorstimulering, hormoner, cytokiner, stråling, infeksjoner og toksiner. Alle disse stimuliene kan forårsake endringer i mitokondriemembranen som resulterer i tap av mitokondrienes transmembrane potensiale og frigjøring av to grupper pro-apoptotiske proteiner til cytosol. Den første gruppen består av cytokrom c, Smac/DIABLO og serin-proteasen HtrA2/Omi. Cytokrom c binder seg og aktiverer Apaf-1 og prokaspase 9 som videre aktiverer Kaspase 9, mens Smac/DIABLO og HtrA2/Omi fremmer apoptose ved å hemme IAP (inhibitor til apoptose proteiner) aktiviteten. Den andre gruppen til pro-apoptotiske proteiner er AIF (apoptose induserende faktor), endonuklease G og CAD (kaspase-aktivert DNase), og disse proteinene frigjøres fra mitokondriene i et senere forløp av apoptosen [100].

For perforin/granzym signalveien skjer initiering av den terminale signalveien via cytotoksiske T-celler. Disse cytotoksiske T lymfocytene (CTL) kan drepe målceller via den ytre signalveien og FasL/FasR interaksjon. I tillegg kan de utøve cytotoksiske effekter i tumorceller eller virusinfiserte celler via stimulering av perforin. Perforin er et transmembran poreformet molekyl som kan frigjøre cytoplasmiske granuler inn til cellen. Disse granulene inneholder serin-proteasene granzym A og granzym B. Granzym B kan kløyve proteiner og aktivere pro-kaspase 10, mens granzym A aktiverer kløyving av DNA (via en DNase) som fører til apoptotisk degradering av DNA [100].

Tilslutt vil den ytre- og indre signalveien gå over til den terminale signalveien, som er den siste fasen før apoptose. Terminalfase kaspaser aktiverer cytoplasmiske endonukleaser som degraderer kjernemateriell, mens proteaser degraderer forskjellige proteiner i cytoskjelett og kjernen. Kaspase 3 er den viktigste kaspasen i denne signalveien, og den aktiveres av flere kaspaser nevnt ovenfor (kaspase 8, kaspase 9 eller kaspase 10). Kaspase 3 vil spesifikt

aktivere endonukleasen CAD slik at den kan degradere kromosomalt DNA i kjernen og forårsaker kromatin kondensering. Kaspaser 3 induserer også reorganisering av cytoskjelettet og bryter ned cellulære forbindelser til apoptotiske fragmenter som tilslutt blir fagocyttert av nærliggende celler [100].

Aktivering av FoxO transkripsjonsfaktorer kan direkte fremme transkripsjon av gener som er involvert i den indre- eller ytre signalveien til apoptose. I følge Brunet et al. (1999) vil kjernelokalisering av defosforylert FoxO3a indusere målgener for Fas ligand og trigge apoptose (figur 10) [45]. I tillegg kan MST1 indusere proapoptotiske signaler via FoxO3a ved å forstyrre interaksjonen mellom 14-3-3 proteiner og FoxO3a. Dette gjør at FoxO3a kan lokalisere seg til kjernen for å indusere gener som koder for apoptose. På denne måten kan MST1 motvirke effekten til Akt, som normalt fosforylerer FoxO3a og fremmer interaksjon med 14-3-3 proteiner slik at FoxO3a forblir i cytoplasma. Derfor har man foreslått at FoxO3a blir enten negativt eller positivt regulert via fosforylering av henholdsvis Akt og MST1 [66].



Figur 10: FoxO transkripsjonsfaktorer er involvert i apoptose. A. Ved fravær på insulin eller vekstfaktorer er FoxO lokalisert i kjernen og kan forårsake cellyklus arrest og apoptose. **B.** Når der er insulin eller vekstfaktorer tilgjengelig vil FoxO være lokalisert i cytoplasma. FasL; Fas ligand, BIM (BCL-2 interagerende protein BIM). Figuren er modifisert fra Greer *et al.* (2005) [50].

9. Mål for prosjektet

Mål for dette prosjektet er å studere subcellulær lokalisering av FoxO3a i ustresete forhold og ved forskjellige typer stress. Vi ønsker å verifisere Kress et al. (2011) sine resultater om at MK5 induert kjernelokalisering av FoxO3a bidrar til økt uttrykk av FoxO3a mediert genuttrykk [37]. Vi vil her undersøke om MK5 induerer kjernelokalisering av FoxO3a, og om denne eventuelle kjernelokaliseringen bidrar til økt FoxO3a-mediert transkripsjon. Tilslutt ønsker vi også å finne ut om FoxO3a regulerer uttrykket av p62.

Kort oppsummert blir hensikten med oppgaven:

1. Hvor er de forskjellige FoxO transkripsjonsfaktorene lokalisert i cellen
2. Hvordan påvirker stress i form av serumsult, wortmanin eller etoposid lokalisering av FoxO3a i våre celler?
3. Vil MK5 induere kjernelokalisering av FoxO3a?
4. Vil MK5 induere FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet?
5. Vil ERK3 som oppstrøms aktivator av MK5 påvirke FoxO3a transkripsjonsaktivitet?
6. Vil FoxO3a regulere uttrykk av p62

MATERIALER OG METODE

1. Materiale

1.1 Kjemikalier

Tabell 1: Oversikt over forskjellige kjemikalier som ble brukt i celleforsøk.

Kjemikalier	Firma	Forsøk
4-Hydroksytamoksifen (4-OHT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.10
Ampicillin natrium, sterilfiltrert	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.1, 2.2, 2.5
Wortmannin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.10
Etoposid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.10
Metanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.10

Tabell 2: Oversikt over forskjellige kjemikalier som er brukt til rekombinasjon, celledyrkning, splitting, transfeksjon, høsting, luciferase reporter gen assay, fiksering og farging av celler og western blot.

Kjemikalier	Firma/innhold	Forsøk
TE-buffer, endotoksinfri	Qiagen, GmbH Hilden, Tyskland	Metode 2.1
Gateway® LR Clonase™ II enzymblanding	Invitrogen, NY, Life technologies™	Metode 2.1
Protein kinase K	Invitrogen, NY, Life technologies™	Metode 2.1
S.O.C medium	Universitetssykehuset i Tromsø	Metode 2.1
NEBuffer 2	New England Biolabs inc	Metode 2.3
BsrGI	New England Biolabs inc	Metode 2.3
EcoRI buffer	New England Biolabs inc	Metode 2.3
EcoRI	New England Biolabs inc	Metode 2.3
SeaKem® LE agarose	Lonza	Metode 2.3
1xTAE buffer	Universitetet i Tromsø <u>50 x TAE</u> : 242 g Tris base, 57,1 mL eddiksyre, 37,2 g Na ₂ EDTA·2H ₂ O dH ₂ O til 1000 mL (CP A.2E.4) [103].	Metode 2.3
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.3

Gel loading Dye blue, 6X	New England Biolabs inc	Metode 2.3
1kb Plus DNA ladder	Invitrogen, NY, Life technologies TM	Metode 2.3
EB-Buffer	Qiagen, Gmbh Hilden, Tyskland	Til plasmider
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.5
Føtalt Bovint Serum (FBS)	BIOCHROM AG	Metode 2.5
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.5
L-glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.5
Trypsin-EDTA løsning	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.8
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Flere forsøk
Lipofectamine TM og Plus TM reagens	Invitrogen, NY, Life technologies TM	Metode 2.9
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	Gibco ® Invitrogen, Life technologies TM	Metode 2.9
Dithiotreitol (DTT)	Fluka analytica, Canada	Metode 2.11
Tropix ® lysisløsning	Applied biosystem, USA	Metode 2.11
MAPKK Lysis buffer	Tillaget på Universitetet i Tromsø (UIT) (til 100 mL): 20 mM Tris (pH 7.0), 1 % Triton X-100, 5 mM Tetra-natrium pyrofosfat (NaPPi), 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM vanadat (VO ₄ ²⁻), 0,27 M Sukrose, 10 mM β-Glycerofosfat, ad ddH ₂ O (eks: til 100 mL)	Metode 2.11
Protease inhibitor cocktail	Complete, Mini, EDTA-fri, Roche. 1 tablett proteasehemmer i 10mL lysisbuffer	Til MAPKK lysis buffer/høsting
Nupage ® LDS samplebuffer 4X	Invitrogen, NY, Life technologies TM	Metode 2.11
Nupage ® Sample reducing agent 10X	Invitrogen, NY, Life technologies TM	Metode 2.11
Tropix® Galacton-Plus®	Applied biosystem, USA	Metode 2.12
Buffer A (Dual-light® reagent)	Applied biosystem, USA	Metode 2.12
Buffer B (Dual-light® reagent)	Applied biosystem, USA	Metode 2.12
Accelerator-II	Applied biosystem, USA	Metode 2.12

Triton® X-100	Fluka. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Metode 2.13, 2.14
Paraformaldehyd (PFA)	VWR international	Metode 2.13
Albumin, Bovine serum, Fraksjon V	Calbiochem®	Metode 2.13
DRAQ5™	Biostatus	Metode 2.13
SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard 1X	Invitrogen, NY, Life technologies™	Metode 2.14
Magic Marker™ XP Western Protein standard	Invitrogen, NY, Life technologies™	Metode 2.14
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen, NY, Life technologies™ Carlsbad CA, USA	Metode 2.14
Blottebuffer	Inneholder: 29 g Tris base, 144 g glycin, 1 L metanol og Ad 5L vann (UIT)	Metode 2.14
Odyssey Blocking buffer	LI-COR Bioscience	Metode 2.14
Vaskebuffer Tris Buffered Saline (TBS, 10X)	Inneholder: 2 g KCl, 80 g NaCl, 40 mL Tris pH = 7,5 (UIT)	Metode 2.14
Anti-HA antistoff (12CA5) fra mus IgG _{2B} Primært antistoff (1:2000)	Cancer Research UK	Metode 2.14
Anti-FLAG fra mus Primært antistoff (1:1000)	Origene technologies Inc	Metode 2.14
GFP (FL) rabbit polyclonal IgG Primært antistoff (1:200)	Santa Cruz Biotechnology	Metode 2.13, 2.14
Anti-FoxO3a/FKHRL1 rabbit polyclonal (1:1000)	Millipore, Temecula California	Metode 2.14
IRDye® 800CW Donkey-anti- mouse IgG (H+L) Sekundært antistoff (1:10 000)	LI-COR Bioscience	Metode 2.14
Alexa Fluor® 680 goat-anti-rabbit IgG (H+L) Sekundært antistoff (1:10 000)	Invitrogen, NY, Life technologies™ Eugene, Oregon, USA	Metode 2.13
Alexa Fluor® 800 goat-anti-rabbit IgG (H+L) Sekundært antistoff (1:10 000)	Invitrogen, NY, Life technologies™	Metode 2.14
IRDye® 800CW Donkey anti- Rabbit IgG (H+L) Sekundært antistoff (1:10 000)	LI-COR Bioscience	Metode 2.14

1.2 Plasmider

Tabell 3: Plasmider. Oversikt over forskjellige plasmider som er brukt til forskjellige celleforsøk.

Plasmid	Informasjon
HA-FoxO3a-WT-ER	Dette FoxO3a plasmidet har en muse-østrogenreseptor på C-terminalen. Tran et al. (2002) [44] 5946 basepar sirkulært plasmid (vedlegg 3)
HA-FoxO3a-TM-ER	Dette FoxO3a plasmidet har mutert fosforyleringssetene T32A, S253A, S315A og har en muse-østrogenreseptor på C-terminalen. Tran et al. (2002) [44]
HA-FoxO3a-TM-ER-Ddb	Dette FoxO3a plasmidet har mutert fosforyleringssetene T32A, S253A, S315A og har en muse-østrogenreseptor på C-terminalen. I tillegg har plasmidet et defekt DNA bindende domene. Tran et al. (2002) [44]
FHRE-luc	Er et forkhead responsiv element (FHRE) som er koblet til luciferase. FHRE virker som en reporter for FoxO3a. Fra Addgene
GL3-Pp62-FoxO3a-WT	Er et reporterkonstrukt hvor p62 promoteren styrer uttrykk av reporter-genet luciferase. Dette konstruktet er villtype. Konstruktet er laget av Eva Sjøttem. Universitet i Tromsø (vedlegg 8)
GL3-Pp62-FoxO3a-mutert	Se ovenfor. Dette konstruktet har et mutert bindingssete for FoxO3a. Konstruktet er laget av Eva Sjøttem. Universitet i Tromsø (vedlegg 8)
FoxO3a-FLAG-WT	Dette FoxO3a plasmidet har en FLAG-tagget del. Fra Addgene
FoxO3a-FLAG-TM	Dette plasmidet har i tillegg til FLAG fått mutert fosforyleringssetene T32A, S253A og S315A. Fra Addgene
EGFP	Clontech
FoxO1-EGFP	FoxO1 plasmidet er tagget med EGFP. Jacobs et al. (2003) [104]
EGFP-FoxO3a	FoxO3a plasmidet er tagget med EGFP i N-terminal ved hjelp av LR rekombinasjonsreaksjon (vedlegg 1)
FoxO3a-EGFP	FoxO3a-EGFP. Jacobs et al. (2003) [104] Her er EGFP tagget i C-terminal.
Cherry-FoxO3a	FoxO3a plasmidet er tagget med mCherry i N-terminal ved hjelp av LR rekombinasjonsreaksjon (vedlegg 2)

FoxO6-EGFP	FoxO6 plasmidet er tagget med EGFP i C-terminal. Jacobs et al. (2003) [104]
EGFP-MK5-WT	MK5-WT er tagget med EGFP. Seternes et al. (2002) [33]
EGFP-MK5-L337G	MK5-L337G er tagget med EGFP. Seternes et al. (2002) [33]
EGFP-MK5-D148A	MK5-D148A er tagget med EGFP. O.M. Seternes (upublisert)
pCH-110	GE-Healthcare (Pharmacia)
ERK3-myc	ERK3 er tagget med myc. Seternes et al. (2004) [26]
ERK4-myc	ERK4 er tagget med myc. Åberg et al. (2006) [27]
pSG5 (vektor for ERK)	Stratagene
ERK3-D171A	Seternes et al. (2004) [26]
Entry-FoxO3a	Kildalsen og Seternes upublisert
pDest-mCherry	Pankiv et al. (2007) [93]
pDest-EGFP	Åberg og Seternes upublisert

2. Metoder

2.1 Gateway® LR rekombinasjon reaksjon

Gateway kloningsmetoden er en universell metode som utnytter de setespesifikke egenskapene til bakteriofagen lambda (λ) (CurrentProtocols (CP) 3.20) [103]. Til et 1,5 mL sentrifugerør ble det tilsatt 75 ng Entry klon, 75 ng Destinasjonsvektor og 4 μ L med TE-buffer med pH 8.0. Deretter ble 1 μ L LR ClonaseTM II enzymblanding overført til sentrifugerøret for inkubering ved 25 °C i 1 time. Etter 1 time ble 0,5 μ L av 2 μ g/ μ L Proteinkinase K løsning tilsatt for å avslutte reaksjonen, og dette ble inkubert i 10 minutter ved 37 °C [105]. Kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) ble hentet fra fryseren (-70 °C), tint opp og lagt på is. To microliter av rekombinasjonsmiksen ble deretter overført til et 15 mL sentrifugerør og mikset med 100 μ L av kompetente *E. coli* og satt på is i 15 – 30 minutt. Så ble blandingen varmesjokket ved 42 °C i 90 sekund. Etter dette ble 450 μ L S.O.C medium tilsatt sentrifugerøret for videre inkubering i 1 time ved 37 °C i ristemaskin før 100 μ L fra denne blandingen platet ut på agarplater med ampicillin 100 μ g/mL og inkubert ved 37 °C over natt [105].

De rekombinante ekspresjonskonstruktene fra Gateway reaksjonen ble senere rensset vha. Mini-prep og deretter analysert med restriksjonsanalyse. Riktig ekspresjonskonstrukt ble så selektert, dyrket og rensset med Midi-prep (punkt 2.2).

2.2 Rensing av plasmid (Midi-prep og mini-prep)

Plasmidene brukt i transfeksjonseksperimentene ble rensset ved hjelp av HiSpeed Plasmid Midi Kit fra Qiagen (cat.no 12643, Tyskland) og QIAprep® Spin Miniprep Kit fra Qiagen (cat.no 27106, Tyskland). Alle disse plasmidene ovenfor ble rensset i henhold til protokollene hos Qiagen [106, 107], og konsentrasjonene til de ulike prøvene ble målt ved hjelp av NanoDrop® ND-1000 spektrofotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Mengden plasmid (ng/ μ L) ble avlest i tilhørende program NanoDrop 1000 V 3.8.

2.3 Restriksjonsanalyse

Restriksjonsenzymmer gjenkjenner korte DNA sekvenser og kløyver DNA på spesifikke seter som ligger nær disse sekvensene. Plasmidene i denne oppgaven ble kuttet med restriksjonsenzymet BsrGI (T↓GTACA) eller EcoRI (G↓AATTC) (CP 3.1) [103]. Til kutting av plasmider

ble fire 1,5 mL eppendorfrør tilsatt 4 μL plasmid (x ng), 1 μL NEBuffer 2 (eller EcoRI buffer), 4 μL dH₂O og 1 μL restriksjonsenzym (1 – 5 U/ μg DNA). Disse blandningene ble først vortekset for så å bli sentrifugert. Deretter ble blandningene sett på varmebad ved 37 °C i 1 – 2 timer for kutting.

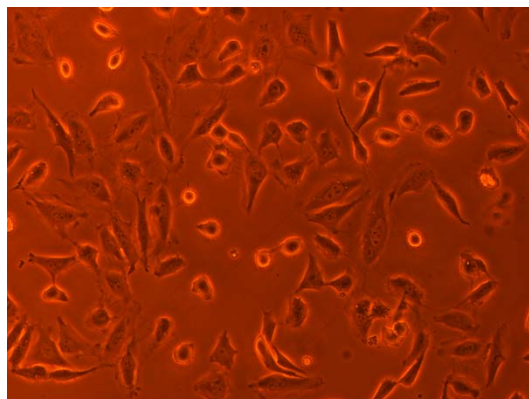
Mens kutting pågikk ble det laget klar til gelelektroforese. 1 g agarose ble veid opp og løst i 100 mL 1xTAE buffer (tabell 2). Denne løsningen ble varmet opp og avkjølt til ca. 60 °C. Til gelelektroforesekaret ble det først tilsatt 1 μL ethidiumbromid og deretter 20 mL agarløsning. Deretter ble en kam brukt for å lage brønner i gelen. Ethidiumbromid ble tilsatt for å visualisere DNA-fragmentene under ultrafiolett lys. Dette fikk stå i 20 minutt før det ble overført til gelektroforese apparatet. Tilslutt ble det tilsatt mer 1xTAE buffer. Før man kunne applisere prøvene til brønnene ble det tilsatt 2 μL 6X Gel loading Dye blue (1/6). Til første brønn ble 4 μL 1kb Plus DNA ladder tilsatt (vedlegg 18), og deretter 10 μL av hver av prøve. Gelen ble deretter satt på et elektrisk felt på 80 V i 1 time før den ble tatt bilde av i Gel Doc 2000 UV transilluminator Bio-Rad og tilhørende program Quantity One 4.30.

2.4 Cellelinjer

I dette prosjektet ble det brukt to cellelinjer:

1. HeLa S3 celler (figur 11)
2. U-2 OS celler

HeLa S3 celler (CCL-2.2TM) er humane adherente epitelceller som stammer fra et adenokarsinom i cervix. HeLa S3 er et klonalt derivat av HeLa sine opprinnelige cellelinjer. U-2 OS celler er humane adherente epitelceller som stammer fra et osteosarkom [108].



Figur 11: HeLa S3 celler mikroskopert med Nikon fluorescensmikroskop.

2.5 Dyrking av celler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ble brukt som dyrkingsmedium. Først ble 60 mL DMEM fjernet og erstattet med 50 mL Føtalt Bovint Serum (FBS), 5 mL penicillin-streptomycin og 5 mL L-glutamin. Antibiotika ble tilsatt for å redusere risiko for kontaminering. Fra nå av omtales DMEM med 10 % FBS, 1 % penicillin-streptomycin og 1 % L-glutamin som medium. Dyrkningsflaskene med HeLa S3 celler (eller U2-OS celler) ble dyrket i dyrkingsmedium ved 37 °C og 5 % CO₂ i en Galaxy® CO₂ inkubator med vannbad i bunnen.

2.6 Splitting av celler

Cellene ble splittet først og fremst etter behov, men oftest mandag og fredag (medium ble erstattet hver 3 dag). Medium, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) og Trypsin-EDTA løsningene ble først inkubert ved 37 °C i varmeskap i 30 – 60 minutt. Cellene ble først mikroskopert og konfluensen ble vurdert i prosent. Deretter ble medium fjernet fra celledyrkningsflasken og vasket med ca. 3 mL PBS. Etter dette ble det tilsatt 3 mL Trypsin-EDTA og dette ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 3 – 5 minutter. Etterpå ble cellene mikroskopert for å se om de hadde løsnet seg fra celledyrkningsflasken. Tilslutt ble 3 mL medium tilsatt slik at totalvolumet ble 6 mL. Av dette ble 1 – 3 mL overført til ny celledyrkningsflaske med 15 mL medium (75 cm²) eller 25 mL medium (175 cm²). Cellene ble så inkubert videre ved 37 °C og 5 % CO₂ i inkubator.

2.7 Celletelling

Celletelling ble gjort etter man hadde splittet celler med 3 mL Trypsin-EDTA (punkt 2.6). Etter at cellene hadde blitt mikroskoperte ble det tilsatt 3 mL medium, og disse 6 mL ble overført til et sentrifugerør. Sentrifugerøret ble så sentrifugert 1000 rpm i 3 minutter. Supernatanten ble så fjernet, og pelleten ble løst opp i en kjent mengde medium. Når cellene var klar for å telles ble 50 µL medium og 50 µL cellesuspensjon tilsatt i et 1,5 mL eppendorfrør. Dette ble overført til et Bürkerkammer med dekkglass, og antall celler per A-rute ble telt under mikroskop.

Antall celler/mL ble kalkulert ved hjelp av denne formelen:

$$\frac{\text{Celletall} \times 20\,000}{\text{Antall A - ruter}} = \text{Celler/mL}$$

2.8 Så ut celler

Celler ble sådd ut i ulikt antall avhengig av brønnstørrelsen:

1. Til et 6 brønners brett ble det sådd ut:
 1. HeLa S3 celler: 150 000 – 200 000 celler/brønn
 2. U-2 OS celler: 300 000 celler/brønn
2. Til et 8 brønners brett ble det sådd ut:
 1. HeLa S3 celler: 20 000 celler/brønn
 2. U-2 OS celler: 40 000 celler/brønn
3. Til et 24 brønners brett ble det sådd ut:
 1. HeLa S3 celler: 40 000 celler/brønn
 2. U-2 OS celler: 75 000 celler/brønn

For å finne ut hvor mange celler man trengte per brønn ble denne formelen brukt:

$$\frac{\text{Antall celler/mL} \times X \text{ mL}}{\text{Ønsket celletall i hver brønn}} = \text{Hver 1 mL tilsvarer ønsket antall celler}$$

Tilslutt ble ønsket antall celletall tilsatt hver brønn og dette ble videre inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ over natten i inkubator.

2.9 Transfeksjon med Lipofectamine™ LTX med Plus™ reagens

Transfeksjon er en metode som er utviklet for å introdusere genetisk materiell inn i eukaryote celler for å studere genets karakteristika (genuttrykk, genregulering og celledisignalisering).

Lipofectamine Plus er en kationsk lipid transfeksjonsreagens som sammen med Opti-MEM brukes for å transfektere DNA inn i adherente celler (CP 9.4.3) [103]. Før cellene kunne transfekteres ble de splittet, telt og sådd ut i petriskåler til de var 50 – 80 % konfluente til den dagen de skulle transfekteres (punkt 2.6 – 2.8). Protokollen for transfeksjon med Lipofectamin LTX og Plus reagens fra Invitrogen ble fulgt [109].

Til 6 brønners brett ble eppendorfrør tilsatt 250 – 600 ng plasmid-DNA, 250 µL Opti-MEM og 4 µL Plus™ reagens per brønn. Denne blandingen ble inkubert i 20 minutt. Deretter ble mastermiksen tilsatt hvert eppendorfrør, og den bestod av 246 µL Opti-MEM og 4 µL Lipofectamine™ LTX reagens per brønn. Etter nye 20 minutter med inkubering ble 500 µL av transfeksjonsblandingen (plasmid og mastermiks) tilsatt dråpevis til hver brønn før cellene

på nytt ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 4 – 6 timer. Etter inkubering ble medium erstattet med nytt medium for videre inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂ i inkubator over natten [109].

Til 8 brønners brett ble eppendorfrør tilsatt 75 – 100 ng plasmid-DNA, 25 µL Oti-MEM og 2 µL PlusTM reagens per brønn. Denne blandingen ble så inkubert i 20 minutt. Deretter ble mastermiksen tilsatt hvert eppendorfrør, og den bestod av 25 µL OptiMem og 1 µL lipofectaminTM LTX reagens per brønn. Etter nye 20 minutter med inkubering ble 50 µL av transfeksjonsblandingen overført dråpevis til brønnene for inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂ i 4 – 6 timer. Etter inkubering ble medium erstattet med nytt medium, og dette ble inkubert i inkubator over natten [109].

Til 24 brønner brett ble eppendorfrør tilsatt 100 – 200 ng plasmid-DNA, 49 µL Opti-MEM og 0,5 µL PlusTM reagens per brønn. Denne blandingen ble inkubert i 20 minutt. Etter dette ble mastermiksen tilsatt, og den utgjorde 49 µL OptiMem og 1 µL LipofectamineTM LTX reagens til hver brønn. Etter nye 20 minutt med inkubering ble 100 µL av transfeksjonsblandingen overført til hver sin brønn for videre inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂ i 4 – 6 timer. Etter inkubering ble medium erstattet med nytt medium, og dette ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i inkubator over natten [109].

2.10 Forskjellige metoder for å inducere kjernelokalisering av FoxO3a

Serumsult

Serumsult er en av de mest brukte prosedyrer i molekylær biologi som brukes for å studere molekylære mekanismer som omhandler proteindegradering, cellulær stressrespons, autofagi og apoptose [110]. I dette forsøket ble cellene serumsultet med 0,5 % Føtalt Bovint Serum (FBS) i 24 timer. Etter dette ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Serumsult ble også brukt til å kartlegge lokalisering av FoxO3a under stress.

Wortmannin

Wortmannin (figur 12) er en godt studert 1-generasjons PI3K-inhibitor som er isolert fra soppen *Penicillium wortmannin*. Wortmannin binder seg irreversibel til PI3K enzymet ved hjelp av en kovalent modifikasjon av lysinenheten som er nødvendig for katalytisk aktivitet [38]. Dette resulterer i en hemming av PI3K signalveien slik at fosforylering av mange proteiner hemmes (eks: FoxO3a blir ikke fosforylert). I denne oppgaven ble wortmannin

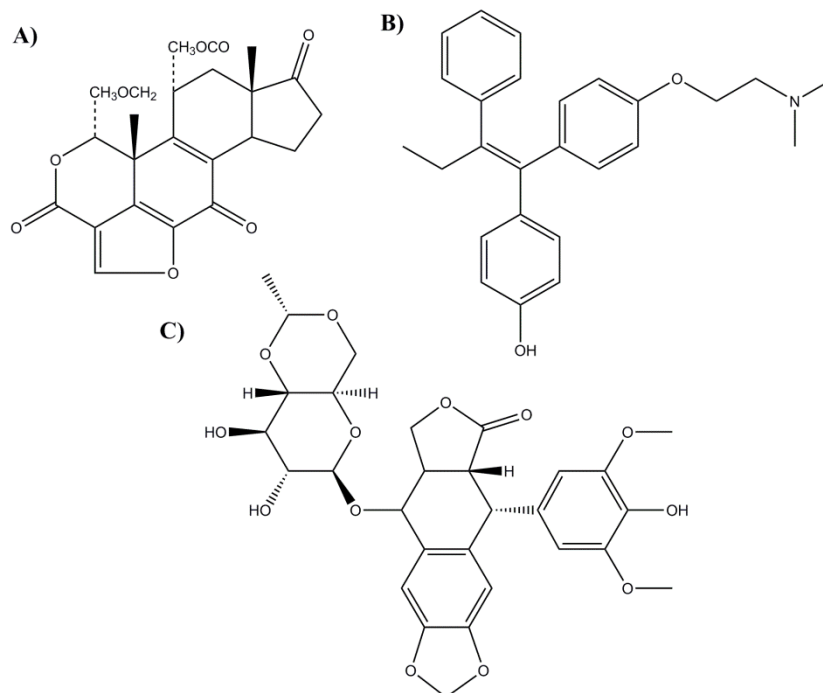
(tabell 1) brukt i konsentrasjonen 1 μM i 24 timer kombinert med 0,5 % FBS. Etter dette ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Wortmannin ble også brukt til å kartlegge lokalisering av FoxO3a under stress.

Etoposid

Etoposid (tabell 1) ble i denne oppgaven brukt i konsentrasjonen 12,5 μM i 24 timer sammen med medium (figur 12). Etter dette ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i luminoskan RT. Etoposid ble også brukt til å kartlegge lokalisering av FoxO3a under stress.

4-hydroksytamoksifen

Tamoksifen er et antiøstrogen som binder seg til østrogenreseptorer ($\text{Er}\alpha$ og $\text{Er}\beta$) for å blokkere effektene til østrogen. Tamoksifen vil via leverens CYP 2D6 omdannes til 4-OHT (figur 12), og dette metabolismeproduktet har 25 – 50 ganger høyere affinitet for begge østrogen-reseptorene enn hva tamoksifen har [111]. I dette forsøket ble 4-hydroksytamoksifen (4-OHT) brukt i konsentrasjonene 400 nm og 1 μM i 24 timer (tabell 1). Etter dette ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT.



Figur 12: Behandling med wortmannin, 4-OHT eller etoposid. A) Wortmannin, $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_8$, 428,43 g/mol. **B)** 4-OHT, $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_2$, 387,51 g/mol. **C)** Etoposid, $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$, 588,6 g/mol. Figurene er tegnet ved hjelp av ChemBioDraw Ultra 11.10 og formler og molekylvekter er hentet fra Sigma-Aldrich.

2.11 Høsting

Høsting av celler for luciferase assay

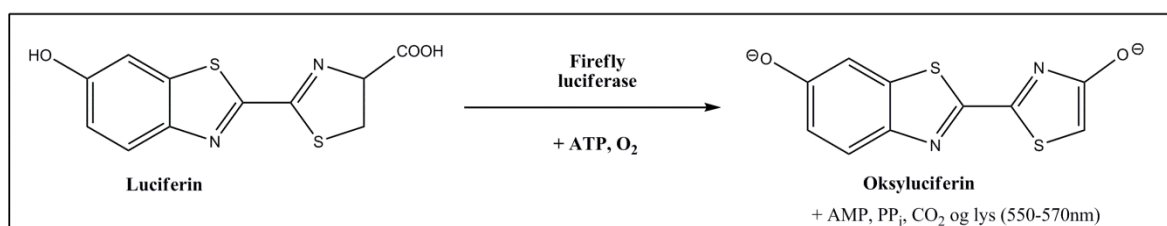
Cellene i 24 brønners brett ble vasket med 1X PBS (200 μ L). Deretter ble 60 μ L lysisbuffer (fersk tilsatt 0,5 mM DTT) tilsatt og brettet ble satt på svak risting i ca. 20 minutt. Lysatet ble overført til eppendorfrør og sentrifugert kjølig (4 $^{\circ}$ C) i to minutt ved 13.000 rpm. Tilslutt ble 20 μ L av supernatanten overført til et 96 brønners brett for luciferase assay.

Høsting av celler til western blot

Cellene i 6 brønners brett ble vasket med 500 μ L romtemperert PBS. Deretter ble det tilsatt 250 μ L MKK-lysisbuffer (tabell 2) til hver brønn. En celledrøper ble brukt til å overføre lysatet til et eppendorfrør. Røret ble satt på is i 15 minutt og deretter sentrifugert kjølig (4 $^{\circ}$ C) med maks hastighet i 10 minutter (13.000 rpm). Tilslutt ble det til hvert eppendorfrør overført 39 μ L supernatant, 15 μ L Nupage $^{\circ}$ LDS samplebuffer 4X og 6 μ L Nupage $^{\circ}$ Sample reducing agent 10X. Denne blandingen ble så varmet i varmebad ved 70 $^{\circ}$ C i 10 minutter. Prøvene var nå klare for western blott.

2.12 Luciferase reporter gen assay

Reporter gen teknologi brukes i utstrakt grad for å studere forskjellige signalveier og genuttrykk. Luminescens-basert reporter gen assay er en type reporter gen assay som brukes for å måle aktiviteten til luciferase og β -galactosidase (β -gal) [112]. Denne metoden er avhengig av ATP, substratet luciferin og oksygen (figur 13). Luciferase er en familie av enzymer som katalyserer oksidasjonen av en rekke substrater, og under denne prosessen dannes fotoner som er synlig for emisjonsspekteret (400 – 620 nm) [8, 113]. β -galactosidase er et bakterielt enzym som lenge er blitt brukt for å måle transfeksjonseffektiviteten [113].



Figur 13: Luciferase reporter gen assay. En kjemisk reaksjon katalyseres av ildfluen (*Photinus pyralis*), ATP og oksygen. Produktet (oksyluciferin) er synlig i lys. Figuren er modifisert fra Schwab (2008) [8].

For å studere uttrykket til transfekterte genere ble cellene kotransfektet med reporterene FHRE-luc eller p62-luc (vedlegg 8). I tillegg ble transfeksjonsaktiviteten målt ved å kotransfektet inn reporterplasmidet pCH-110. Før man analyserte prøvene i Luminoskan RT ble cellene splittet (punkt 2.6), telt (punkt 2.7), sådd ut i 24 brønners brett (punkt 2.8), transfektet (2.9), eventuelt stimulert (punkt 2.10) og høstet (punkt 2.11).

Før avlesning i Luminoskan RT ble slangene til instrumentet vasket med autoklavert milliQ vann (ddH₂O), og etter dette ble hver brønn med cellelysat tilsatt 15 µL Buffer A og 60 µL Buffer B med Galactone-Plus 1:100 (rett før bruk). Buffer A inneholdt salter og komponenter som er viktig for luciferase reaksjonen, mens Buffer B inneholder luciferin og β-gal substratet Galacton-Plus. Cellelysatet ble først blandet med Buffer A for å klargjøre luciferase-reaksjonen, og deretter med Buffer B for å måle luciferasesignalet rett etter denne bufferen er tilsatt (halveringstid på 1 minutt). Etter 30 – 60 minutt inkubering ble Accelerator-II tilsatt for å måle lyssignalene som hadde blitt dannet fra de akkumulerte β-galactosidase/Galactone-Plus produktene. Slangene ble vasket med ddH₂O før Accelerator-II ble tilsatt, og når avlesningen i Luminoskan RT var ferdig [114].

2.13 Fiksering av celler og kjernefarging

Før man kunne fikse HeLa cellene med paraformaldehyd (PFA) ble de splittet (punkt 2.6), telt (punkt 2.7), sådd ut i 8 brønners brett (punkt 2.8), transfektet (2.9) og eventuelt stimulert (punkt 2.10). Medium ble først fjernet og brønnene ble vasket med PBS (1X). Deretter ble 200 µL 4 % PFA (med 1 % Triton X-100) tilsatt og dette ble inkubert i 5 minutt. Etter 5 minutt ble løsningen fjernet og erstattes med 200 µL 4 % PFA (uten triton X-100). Dette ble inkubert i romtemperatur i 20 minutt. Tilslutt ble løsningen fjernet og erstattet med 200 µL 3 % PBSA (1,5 g albumin i 50 mL PBS) og inkubert kjølig.

Neste dag eller etter noen timer ble cellene kjernefarget med DRAQ5. DRAQ5 ble først løst i 0,5 % PBSA løsning (eks: 1 µL til 10 mL 0,5 % PBSA løsning). Av dette ble 200 µL overført til hver brønn, og inkubert i 5 minutt. Deretter ble løsningen fjernet, og brønnene ble vasket 3 ganger med PBS. Helt tilslutt ble 350 µL PBS tilsatt hver brønn. Etter at 8 brønners brettene var ferdig fikserte og kjernefarget ble de studert i Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop.

2.14 Western blot

Western blot (også kallet immunblot) er en metode som separerer proteiner først ved hjelp av gel elektroforese (Sodium dodecyl sulfat; SDS-page), og deretter via blotting på en nitrocellulose membran. Etter dette blir proteinene identifisert av spesifikke antigen som gjenkjennes av polyklonale eller monoklonale antistoff, og dette detekteres tilslutt under et infrarødt mikroskop (CP 10.8.1) [103].

Polyakrylamidgel (NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini gels, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) med 10 kammer ble overført til et kar som ble fylt opp med runningbuffer (tabell 2). Etter dette ble 5 µL Prestained, 1µL magic marker (vedlegg 19) og 15 µL (eller 19 µL) proteinlysat overført til hver sin brønn. Deretter ble gelen kjørt i 1 time på 200 V i PowerEase® 500 (Invitrogen, NY, Life technologies™) før den var klar for blotting.

Til blottingen ble det brukt en 7,5 x 7 cm nitrocellulose membran (Odyssey Nitrocellulose Membran, LI-COR Bioscience), filterpapir (8 x 8 cm), «pads» og blottebuffer (tabell 2). Polyakrylgelen ble overført til membranen og deretter ble det på hver sin side lagt et filterpapir og flere «pads». Dette ble videre overført til et blottekar for så å bli fylt opp med blottebuffer og kjørt i 1,5 time på 20 V.

Etter 1,5 time ble membranen overført til et kar med blokkebuffer (ca. 10 mL) for 1 time inkubasjon på en vippemaskin (tabell 2). Etter dette ble primært antistoff (tabell 2) og Tween® 20 (1:1000) tilsatt et sentrifugerør med blokkebuffer (ofte 5 mL blokkebuffer og 5 µL Tween). Til dette røret ble membranen overført og videre inkubert over natt under stadig rotasjon på en rulle. Neste dag ble membranen først vasket i 3 x 5 minutt med vaskebuffer (TBS, tabell 2) for så å bli tilsatt sekundært antistoff (tabell 2, ofte i 20 mL vaskebuffer). Dette fikk stå i 1 time med aluminiumsfolie over seg før membranen igjen ble vasket i 3 x 5 minutt med vaskebuffer. Tilslutt ble membranen skannet i The Odyssey ® Sa Infrared Imaging System og resultatene ble hentet ut ved hjelp av PC-programmet Odyssey Sa Software.

RESULTATER

1. Rekombinasjon av EGFP-FoxO3a og mCherry-FoxO3a

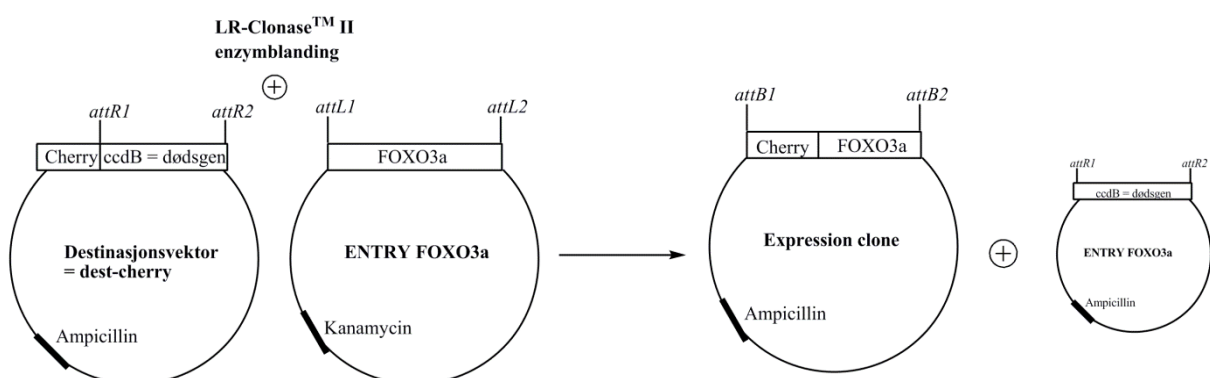
Vi ønsket å lage to FoxO3a plasmider som var fusjonert med enten grønt fluoriserende protein (EGFP) eller mutant av rødt fluoriserende protein (mCherry). Disse to proteinene fluoriserer når de utsettes for UV-lys med en bølgelengde på 488 nm for EGFP og 587 nm for mCherry [115]. På bakgrunn av dette ble disse to fluoriserende fusjonsproteinene rekombinert med FoxO3a for å finne ut hvor de lokaliserte seg i levende celler.

Plasmidet EGFP-FoxO3a ble laget for å identifisere subcellulær lokalisering av EGFP-FoxO3a under normale ustressede forhold og ved tilførsel av ulike typer stress. mCherry-FoxO3a ble laget fordi vi allerede hadde ulike varianter av EGFP tagget MK5, og slik kunne vi studere lokaliseringen til mCherry-FoxO3a under samtidig kotransfeksjon med ulike varianter av MK5.

1.1 Konstruksjon av plasmidene EGFP-FoxO3a og mCherry-FoxO3a.

Med bruk av Gateway® LR kloningsreaksjonen ble det laget to plasmider med EGFP- eller mCherry-tag i N-terminalen til FoxO3a (figur 14):

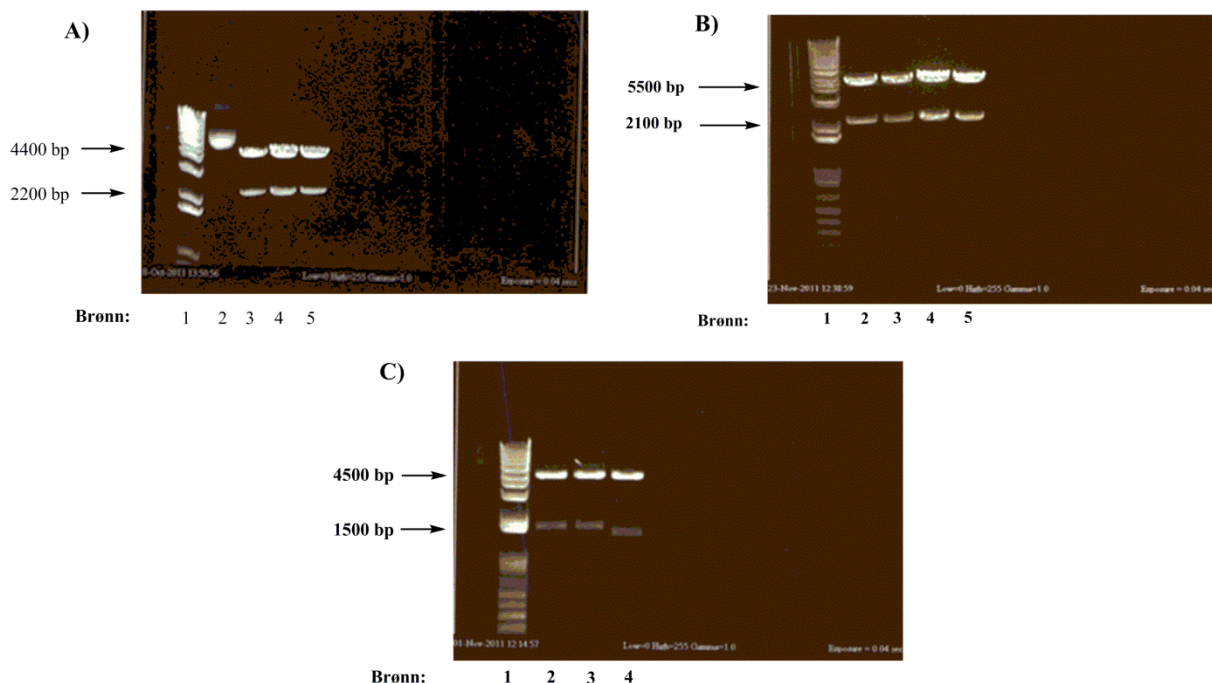
1. pEXP-mCherry-FoxO3a
2. pEXP-EGFP-FoxO3a



Figur 14: Lambda-basert rekombinasjon av pEXP-mCherry-FoxO3a og pEXP-EGFP-FoxO3a. LR-Clonase™ II enzymblandingen katalyserer *in vitro* rekombinasjon mellom ENTRY-FoxO3a og DEST-Cherry. FoxO3a erstatter dødsgenet ccdB og danner expression klon pEXP-mCherry-FoxO3a. Positiv seleksjon av pEXP-mCherry-FoxO3a skjer på grunn av at et antibiotika-resistent gen, og plasmider som inneholder dødsgenet (ccdB) er toksisk for klonebakterien *E. coli* (CP 3.20) [103]. Tilsvarende ble også gjort for å lage pEXP-EGFP-FoxO3a (erstattet her DEST-Cherry med DEST-EGFP).

1.2 Restriksjonsanalyse av mCherry-FoxO3a, EGFP-FoxO3a og ulike varianter av HA-tagget FoxO3a.

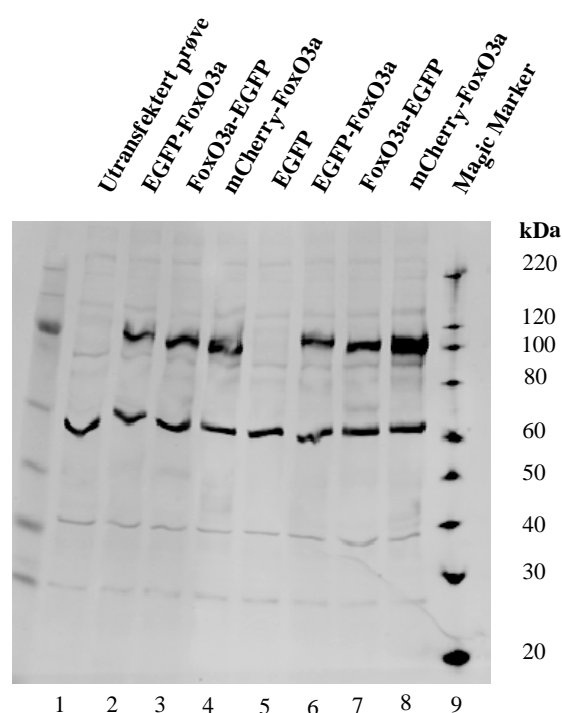
I dette forsøket ønsket vi å gjennomføre en kutting med restriksjonsenzymet BsrGI for å bekrefte om kloningen var vellykket. Når mCherry-FoxO3a (figur 15A) kuttes med restriksjonsenzymet BsrGI får vi DNA fragmenter ved ca. 4400 og 2200 basepar (vedlegg 1). Fragmentene i brønn 3 – 5 viser bånd ved ca. 4400 og 2200 basepar, og dette stemte bra med de forventede størrelsene. Når EGFP-FoxO3a (figur 15B) kuttes med restriksjonsenzymet BsrGI får vi DNA fragmenter ved ca. 5500 og 2100 basepar (vedlegg 2). Fragmentene i brønn 2 – 5 viser bånd ved ca. 5500 og 2100 basepar, og dette stemmer bra med de forventa størrelsene. Når HA-FoxO3a-TM-ER, HA-FoxO3a-WT-ER og HA-FoxO3a-TM-ER-dDB (figur 15C) kuttes med restriksjonsenzymet EcoRI får vi DNA fragmenter i området 4500 – 1500 basepar (vedlegg 3). Fragmentene i brønn 2 – 4 viser at HA-FoxO3a-TM-ER, HA-FoxO3a-WT-ER og HA-FoxO3a-TM-ER-dDB er ved ca. 4500 og 1500 basepar, og dette stemmer bra med forventet resultat.



Figur 15: Kutting med restriksjonsenzymet. A og B. Restriksjonsanalyse av mCherry-FoxO3a (A) viser DNA fragmenter kuttet med BsrGI ved 4400 og 1500 basepar (brønn 2 – 5). Kutting av EGFP-FoxO3a (B) med restriksjonsenzymet BsrGI viser DNA fragmenter ved ca. 5500 og 2100 basepar (brønn 2 – 5). Plasmidene mCherry-FoxO3a og EGFP-FoxO3a hadde tidligere blitt laget vha. LR-rekombinasjon og rensset med Mini-prep. Deretter ble de kuttet og kjørt på 1 % agarosegel i 1 time. C. Kutting av HA-FoxO3a-TM-ER (brønn 2), HA-FoxO3a-WT-ER (brønn 3) og HA-FoxO3a-TM-ER-dDB (brønn 4) med restriksjonsenzymet EcoRI viser DNA fragment i området 4500 og 1500. Disse plasmidene ble tidligere rensset vha. Mini-prep før de ble kuttet og kjørt på 1 % agarosegel i 1 time.

1.3 Western blot viste at EGFP-FoxO3a, FoxO3a-EGFP og mCherry-FoxO3a uttrykte proteiner.

For å bevise at fusjonsproteinene EGFP-FoxO3a, FoxO3a-EGFP og mCherry-FoxO3a ble uttrykt ønsket vi å gjennomføre et westernblot. FoxO3a er et relativt stort protein og vil i følge figur 32 vandre rundt 80 kDa, mens EGFP og mCherry er små fusjonsproteiner på henholdsvis 27- og 30 kDa (støtteinformasjon til Blackmore et. al 2012) [116]. Figur 16 viser to ulike band som befinner seg ved ca. 60- og 100 kDa. Bandet ved ca. 60 kDa er sannsynligvis uspesifikt alle prøvene har det, og også utransfektet prøve. Båndene i overkant 100 kDa (80 kDa + 30 kDa = 110 kDa) viser at EGFP-FoxO3a (brønn 2 og 6), Foxo3a-EGFP (brønn 3 og 7) og mCherry-FoxO3a (brønn 4 og 8) uttrykker proteiner.

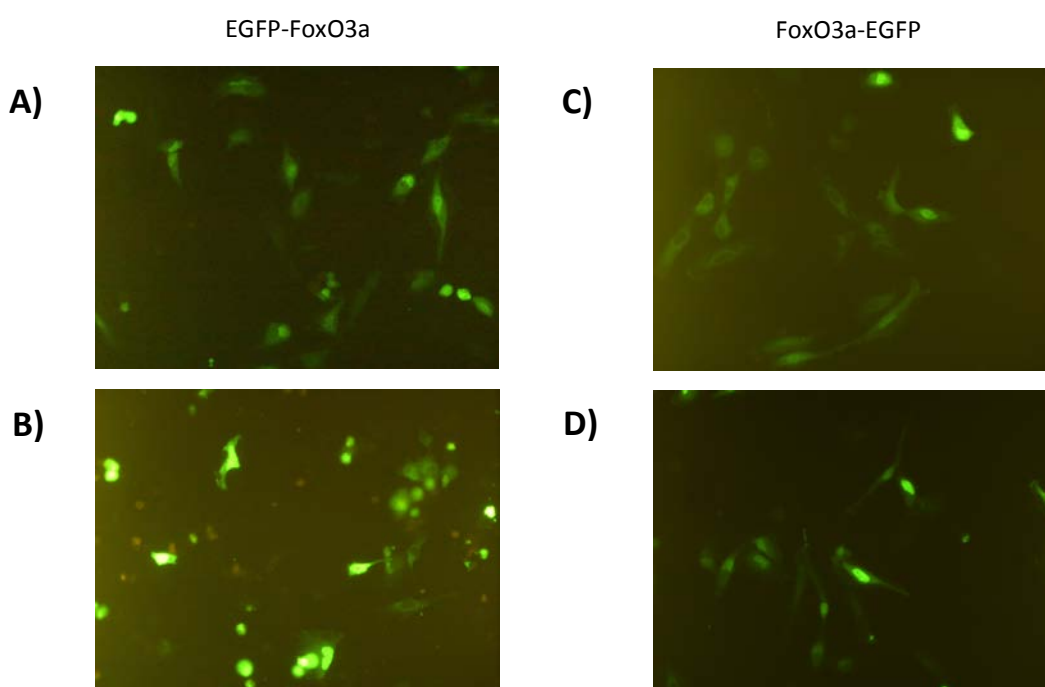


Figur 16: Western blot av EGFP-FoxO3a, FoxO3a-EGFP, mCherry-FoxO3a og EGFP. HeLa (150 000 celler/brønn) celler ble sådd ut i 6 brønners brett og dagen deretter transfektet med EGFP-FoxO3a (EGFP i N-terminal), EGFP-FoxO3a (EGFP i C-terminal), mCherry-FoxO3a og EGFP. Dagen deretter ble cellene høstet og kjørt i westernblot. Primært antistoff som ble brukt var anti-FoxO3a/FKHRL1 kanin (1:1000). Sekundært antistoff som ble brukt var 800 CW Donkey anti-kanin (1:10 000).

1.4 EGFP tag i C-terminal til FoxO3a gav klarest cytoplasmatisk lokalisering.

I denne delen av oppgaven ønsket vi å finne ut om rekombinasjon av EGFP i C-terminal eller N-terminal hadde betydning for subcellulær lokalisering av EGFP-FoxO3a. Først ble HeLa celler sådd ut i et 6 brønners brett og dagen deretter transfektet med EGFP, EGFP-FoxO3a (EGFP i N-terminal) og FoxO3a-EGFP (EGFP i C-terminal). Tjuefire timer senere ble subcellulær lokalisasjon av EGFP-tagget FoxO3a vurdert under fluorescensmikroskop. Når

EGFP blir uttrykt på N-terminalen til plasmidet FoxO3a (figur 17A og 17B) ser man at EGFP-FoxO3a er mye mer vanskelig å lokalisere under mikroskop både under ustressete forhold (10 % FBS) og under serumsult (0,5 % FBS). Det kom klart frem at EGFP-FoxO3a er lokalisert i cytoplasma og kjernen under ustressete forhold, men ved serumsult ser det ut som FoxO3a-EGFP akkumulerer seg mer i kjernen. FoxO3a med EGFP i C-terminalen (figur 17C og 17D) var lettere å lokalisere fordi man tydelig kan se at FoxO3a-EGFP er lokalisert i cytoplasma under ustressete forhold. I tillegg ser man ved serumsult at FoxO3a-EGFP lokaliserer seg til kjernen og på bakgrunn av disse observasjonene ønsket vi å bruke FoxO3a-EGFP til videre forsøk.



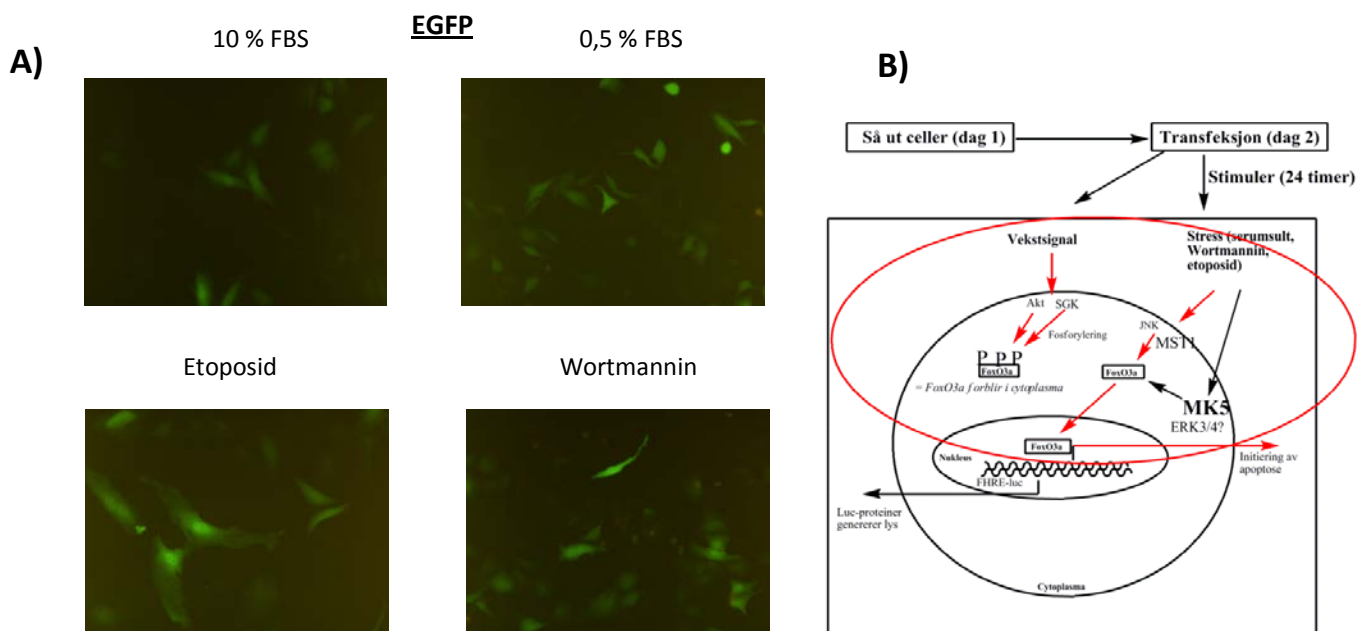
Figur 17: EGFP fusjonsprotein i C-terminal til FoxO3a gav klarest cytoplasmalokalisasjon. HeLa celler (150 000 celler/brønn) ble sådd ut og neste dag transfektert med EGFP-FoxO3a (EGFP i N-terminal, A og B) eller FoxO3a-EGFP (EGFP i C-terminal, C og D). Dagen deretter ble cellene tilsatt medium (10 % FBS, A og C) eller serumsultet (0,5 % FBS, B og D) i 24 timer. Bilder av cellene ble tatt i Nikon fluorescensmikroskop.

2. Lokalisering av de forskjellige FoxO

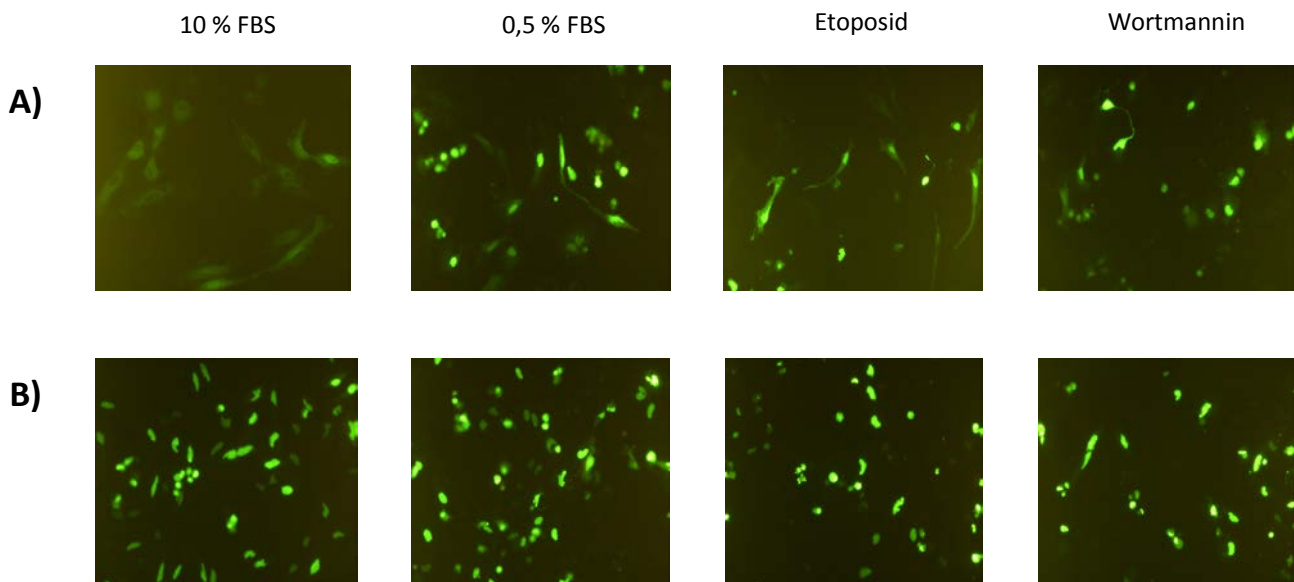
Siden de finnes flere ulike forkhead transkripsjonsfaktorer av O klassen (FoxO) ønsket vi å gjøre tre ulike stressforsøk for å kartlegge lokalisering av EGFP, FoxO3a-EGFP og FoxO6-EGFP. Som tidligere nevnt vil villtype FoxO3a være lokalisert i cytoplasma i ustressete celler [45], mens FoxO6 skal være mest lokalisert i kjernen [62] og EGFP skal være lokalisert i cytoplasma og kjernen. På bakgrunn av at FoxO6 er lokalisert i kjernen, mens EGFP finnes både i cytoplasma og kjernen er de tatt med som kontroller.

2.1 EGFP og FoxO6 påvirkes ikke av stress, mens FoxO3a lokaliseres til kjernen i forskjellig grad.

I dette forsøket ønsket vi å undersøke ved hjelp av fluorescensmikroskopi hvordan EGFP, FoxO3a-EGFP og FoxO6-EGFP lokaliseres i levende celler under normale ustressete forhold og under stress i form av serumsult, wortmannin eller etoposid. For å gjøre dette ble HeLa celler sådd ut i 6 brønners brett og dagen deretter transfektert med EGFP, FoxO3a-EGFP eller FoxO6-EGFP. Dagen etter transfeksjonen ble cellene enten serumsultet (0,5 % FBS) eller behandlet med wortmannin eller etoposid i 24 timer. Dette forsøket viste at hverken EGFP eller FoxO6-EGFP påvirkes av stress. Det vil si at EGFP er lokalisert både i kjernen og cytoplasma (figur 18A), mens FoxO6-EGFP er tydelig lokalisert i kjernen (figur 19B). I kontrast til dette ser vi at FoxO3a-EGFP blir påvirket av både serumsult, wortmannin og etoposid (figur 19A). Man kan tydelig se i figur 19A at FoxO3a-EGFP er mest lokalisert i cytoplasma ved dyrkning i 10 % serum, men ved stress i form av kombinert serumsult og wortmannin er FoxO3a-EGFP eksklusivt lokalisert i kjernen. Serumsult alene eller etoposid behandling resulterer i en delvis translokering av FoxO3a-EGFP slik at proteinene er lokalisert både i cytoplasma og kjernen.



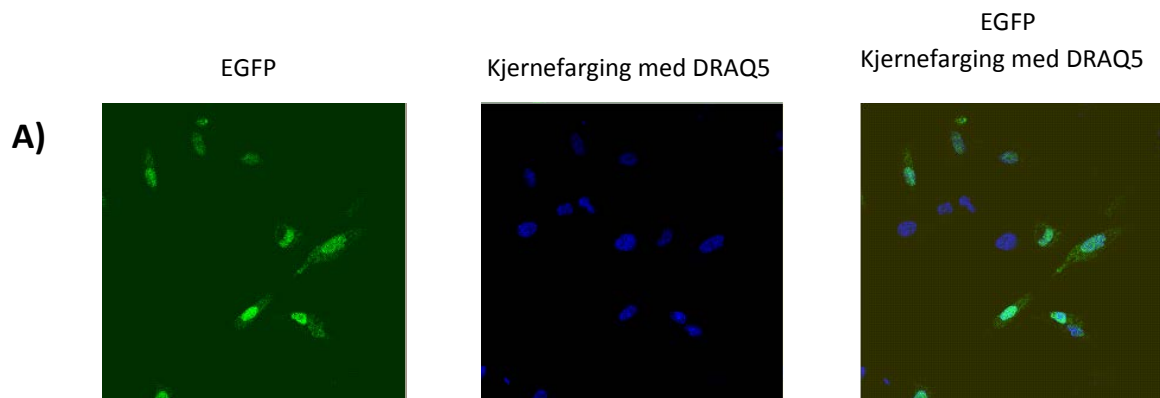
Figur 18: Lokalisering av EGFP i levende celler under vekstfaktorstimulering eller stress. A. HeLa celler (150 000 celler/brønn) ble sådd ut og neste dag transfektert med EGFP. Dagen deretter ble cellene serumsultet (0,5 % FBS) og behandlet med kombinert serumsult og 12,5 μ M wortmannin og 1 μ M etoposid i 24 timer. Bilder av cellene i figur A ble tatt i Nikon fluorescensmikroskop. B. Illustrasjon over mulige mekanismer bak resultatene som er oppnådd i figur 18 og 19.

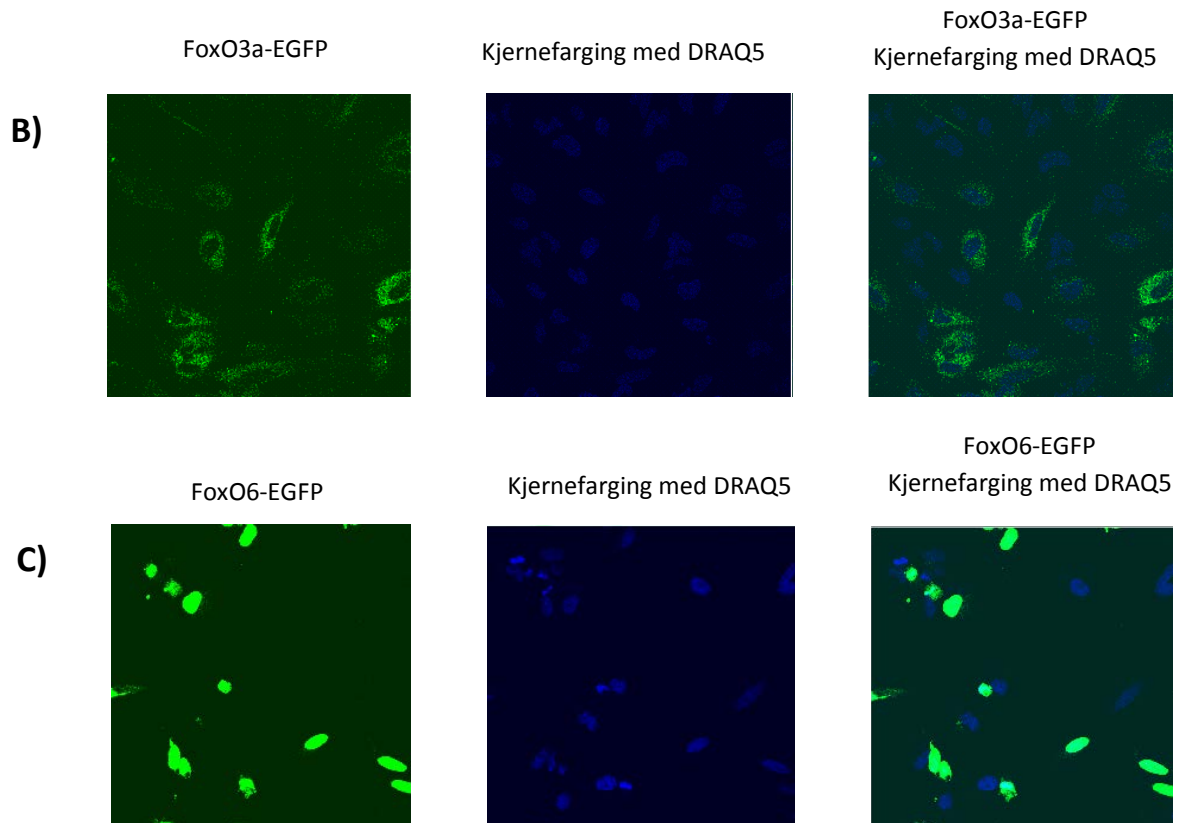


Figur 19: Lokalisering av FoxO3a-EGFP og FoxO6-EGFP i levende celler. A og B. HeLa celler (150 000 celler/brønn) ble sådd ut og neste dag transfektert med FoxO3a-EGFP (A) eller FoxO6-EGFP (B). Dagen deretter ble cellene serumsultet (0,5 % FBS) og behandlet med kombinert serumsult og 12,5 μ M wortmannin og 1 μ M etoposid i 24 timer. Bilder av cellene ble tatt i Nikon fluorescensmikroskop.

2.2 FoxO3a var tydelig lokalisert i cytoplasma under ustressete forhold, men lokaliserte seg til kjernen i økende grad ved serumsult og behandling med etoposid eller wortmannin.

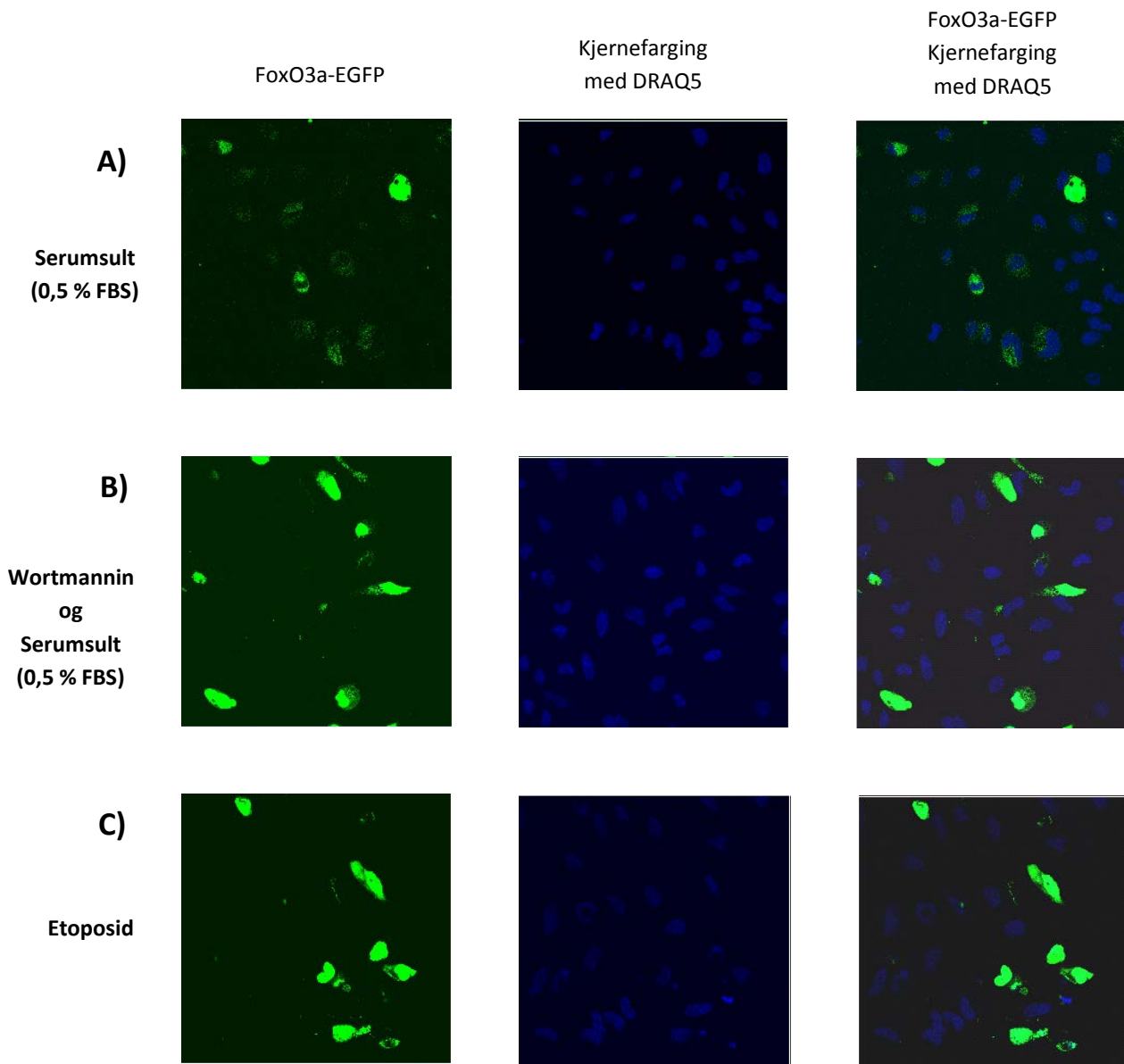
For å bekrefte resultatene fra fluorescensmikroskopi av EGFP, FoxO3a-EGFP og FoxO6-EGFP ble transfekterte HeLa celler fiksert og kjernefarget før de kunne mikroskoperes i Zeiss LSM konfokalmikroskop. Figur 20 viser EGFP (A), FoxO3a (B) og FoxO6 (C) før stimulering, altså under ustressete forhold med medium (10 % FBS). EGFP er som tidligere beskrevet fortsatt lokalisert i kjernen og cytoplasma, mens FoxO3a er tydelig lokalisert i cytoplasma og FoxO6 i kjernen.



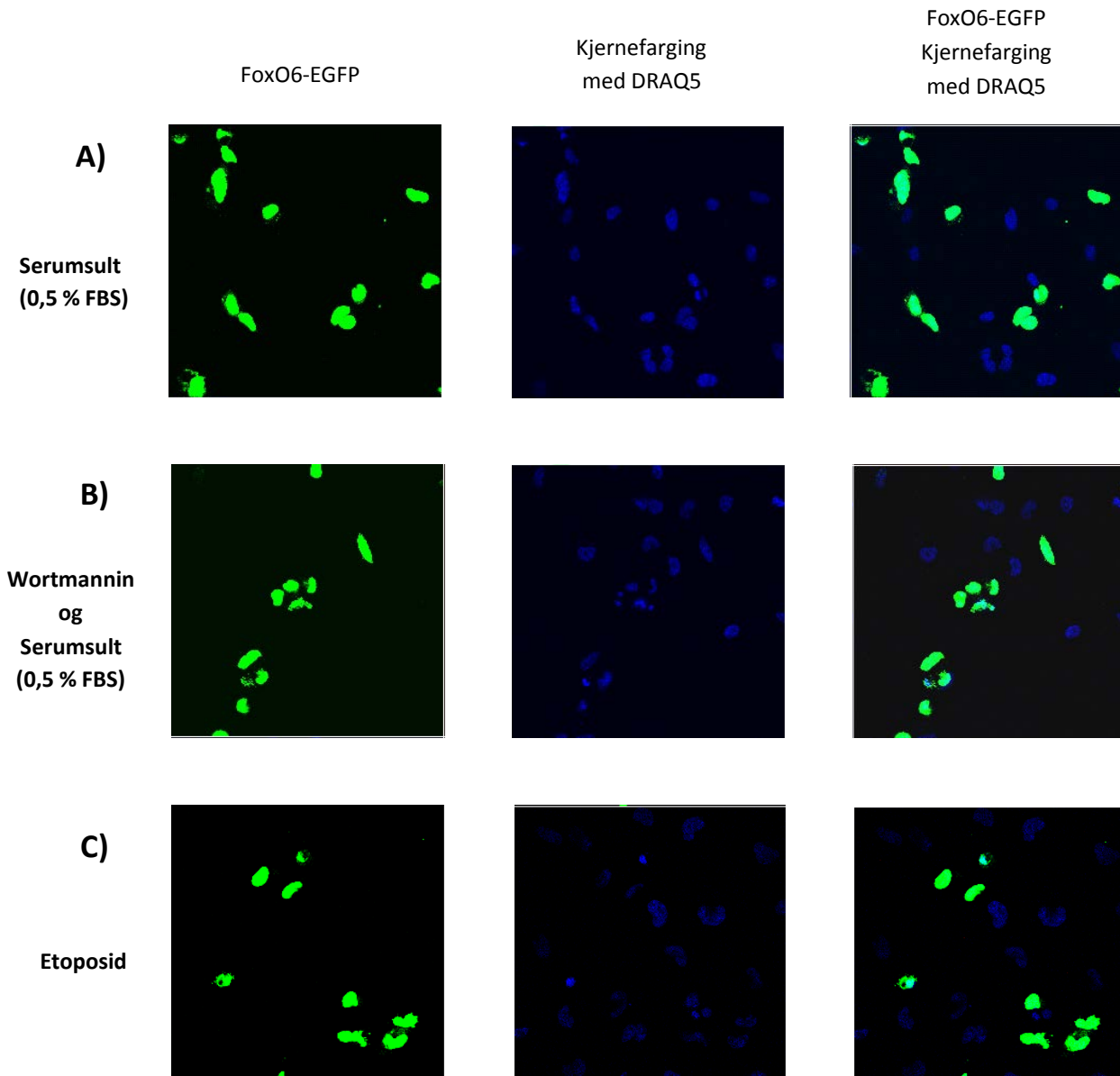


Figur 20: Lokalisering av EGFP, FoxO3a og FoxO6 i levende celler i ustresste forhold (10 % FBS). HeLa celler (20 000 celler/brønn) ble sådd ut og neste dag transfektert med EGFP (A), FoxO3a-EGFP (B) eller FoxO6-EGFP (C). Dagen deretter ble cellene fiksert og kjernefarget med DRAQ5. Bilder av fikserte celler ble tatt i Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop.

Figur 21 og 22 viser resultatene av FoxO3a og FoxO6 under behandling med serumsult (0,5 % FBS), wortmannin eller etoposid. Figur 21A viser FoxO3a under serumsult, og som forventet ut fra tidligere resultater er FoxO3a fortsatt lokalisert i cytoplasma og litt i kjernen. Figur 21B og 21C viser at FoxO3a-EGFP transporteres til kjernen når cellene behandles med wortmannin eller etoposid. Figur 22A, B og C viser at FoxO6-EGFP er konstitutivt lokalisert i kjernen og påvirkes ikke av stress i form av serumsult, eller behandling med wortmannin eller etoposid.



Figur 21: Lokalisering av FoxO3a i levende celler. A-C. HeLa celler (20 000 celler/brønn) ble sådd ut og neste dag transfektert med FoxO3a-EGFP. Dagen deretter ble cellene serumsultet (0,5 % FBS) i 24 timer (A) eller stimulert med 1 μ M wortmannin (B) eller 12,5 μ M etoposid (C) i 24 timer før de ble fiksert og kjernefarget med DRAQ5. Senere ble de fikserte cellene studert og fotografert i Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop.



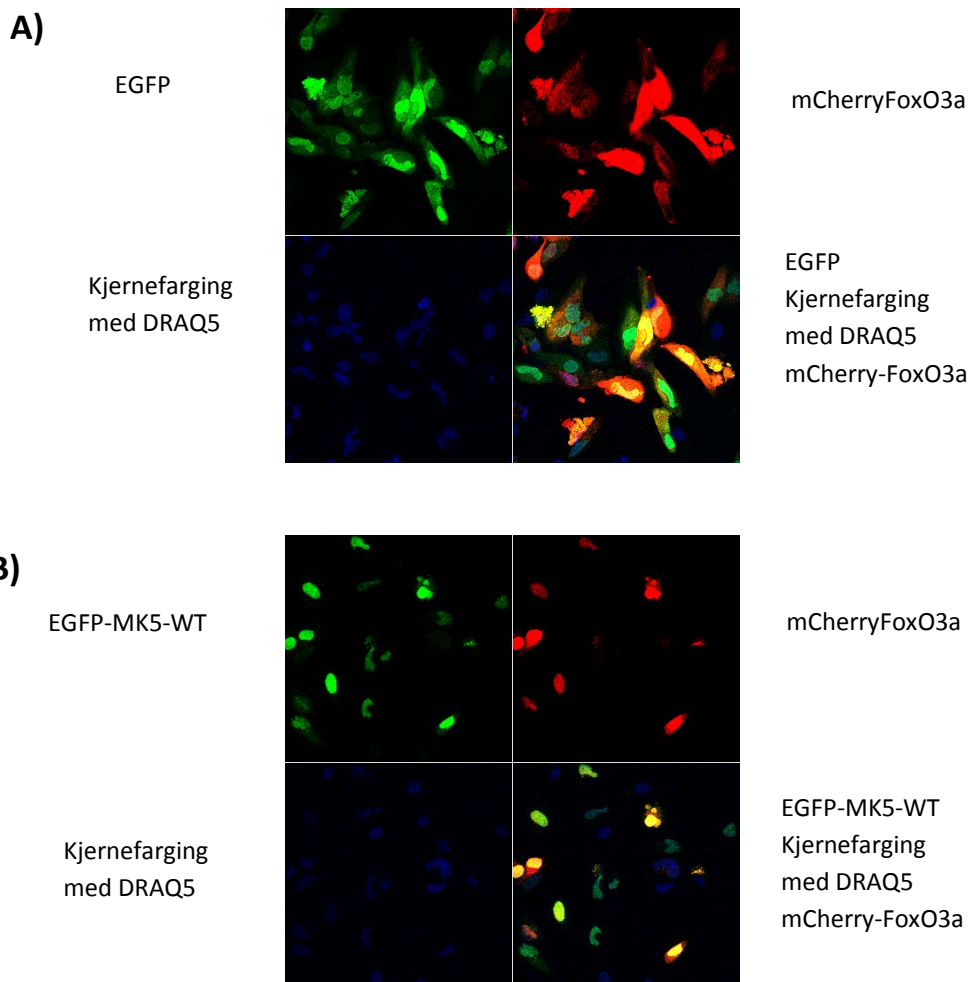
Figur 22: Lokalisering av FoxO6 i levende celler. A-C. HeLa celler (20 000 celler/brønn) ble sådd ut og neste dag transfektert med FoxO6-EGFP. Dagen deretter ble cellene serumsultet (0,5 % FBS) i 24 timer (A) eller stimulert med 1 μ M wortmannin (B) eller 12,5 μ M etoposid (C) i 24 timer før de ble fiksert og kjernefarget med DRAQ5. Senere ble de fikserte cellene studert og fotografert i Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop.

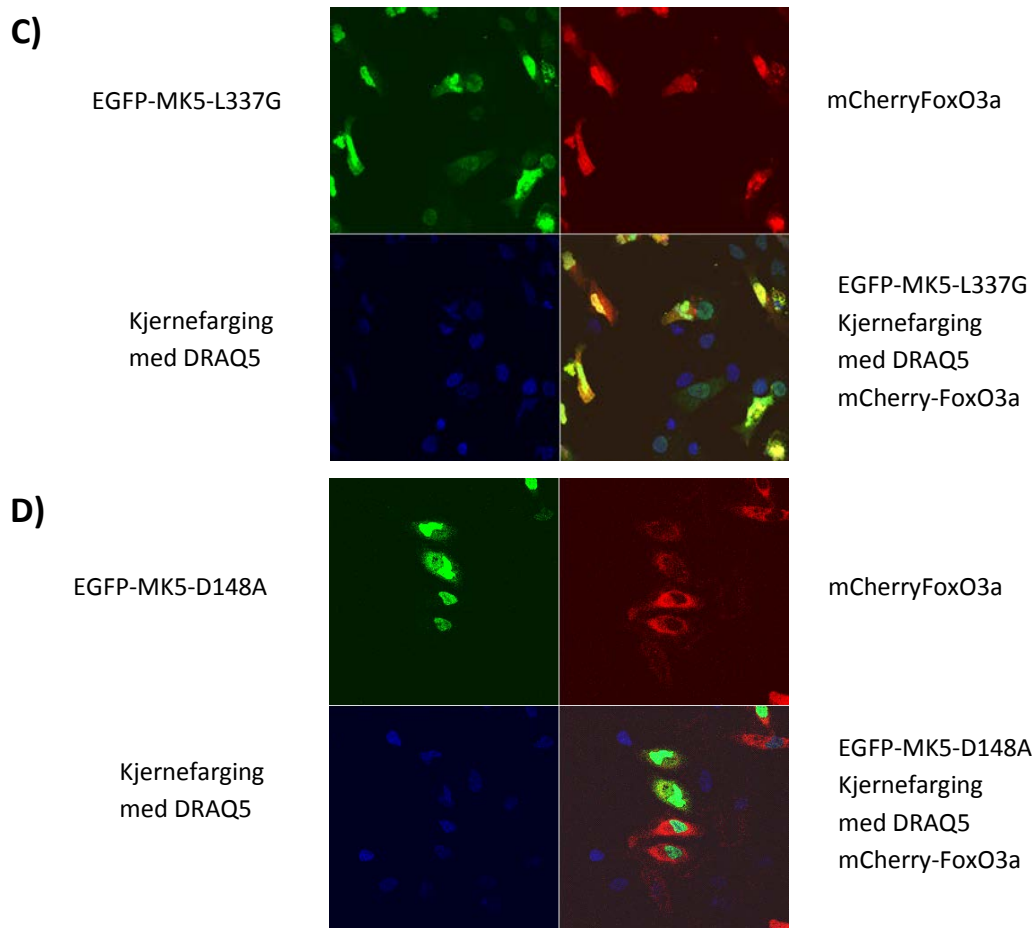
3. Kinaseaktiv MK5 induerte klar kjernelokalisering av FoxO3a, men moderat økning av transkripsjonsaktiviteten

Kress *et al.* (2011) har vist at FoxO3a fosforyleres av MK5, og at denne fosforyleringen medfører økt kjernelokalisering av FoxO3a og videre økt uttrykk av micro-RNAene miR 34b/c [37]. I dette forsøket ønsket vi først å reprodusere disse funnene for å se om ulike varianter av EGFP-MK5 kunne induere kjernelokalisering av mCherry-FoxO3a. Deretter ønsket vi å finne ut om en eventuell økt kjernelokalisering via MK5 kunne bidra til økt FoxO3a-mediert transkripsjon.

3.1 Villtype- eller konstitutiv aktivt mutant av MK5 (L337G) induerte tydelig kjernelokalisering av FoxO3a.

HeLa celler ble sådd ut i 8 brønners brett og neste dag transfektert med mCherry-FoxO3a sammen med ulike varianter av EGFP-MK5 (EGFP-MK5-WT, EGFP-MK5-L337G og EGFP-MK5-D148A) eller EGFP. Tjuefire timer senere ble cellene fiksert med paraformaldehyd og deretter kjernefarget med DRAQ5. Dagen deretter ble de fikserte cellene mikroskopert i Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop. I figur 23A ser man at EGFP er lokalisert både i cytoplasma og kjernen, mens FoxO3a er lokalisert i cytoplasma (og litt i kjernen). I figur 23B ser man at villtype MK5 og FoxO3a er begge lokalisert i kjernen. Figur 23C viser at konstitutiv aktiv mutant av MK5 (L337G) er i kjernen (og litt i cytoplasma), mens FoxO3a er mest kjernelokalisert. Figur 23D viser at kinasedød mutant av MK5 (D148A) er mest i kjernen, mens FoxO3a tydelig er lokalisert i cytoplasma.

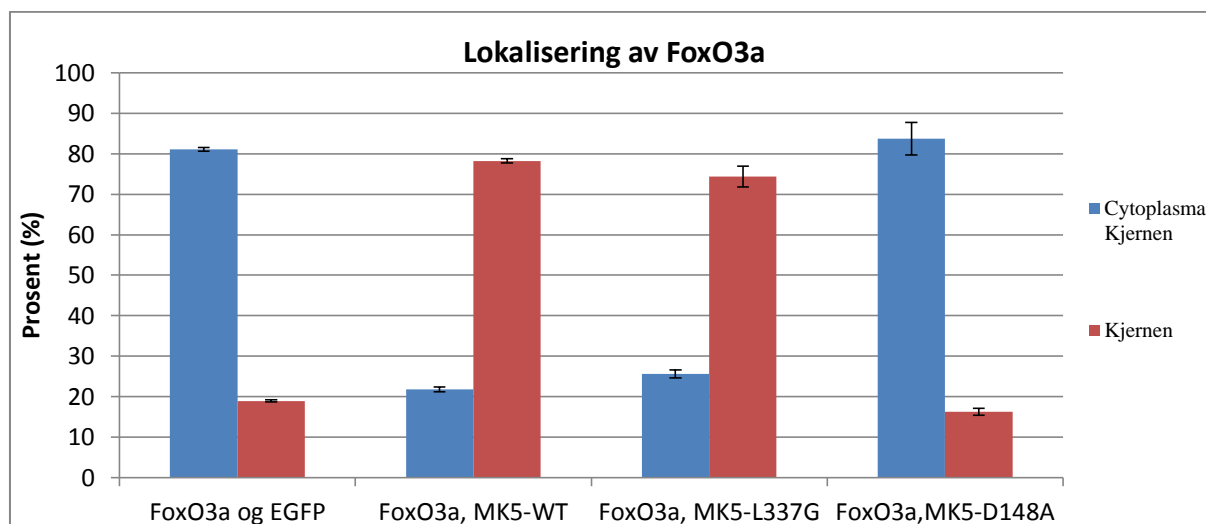




Figur 23: Villtype- og aktiv mutant MK5 (L337G) induerte kjernelokalisering av FoxO3a, mens kinasedød mutant av MK5 (D148A) induerte ikke kjernelokalisering av FoxO3a. A-D. HeLa celler ble sådd ut (20 000 celler/brønn) og neste dag transfektert med EGFP (A), EGFP-MK5-WT (B), EGFP-MK5-L337G (C), EGFP-MK5-D148A (D) og mCherry-FoxO3a (A, B, C og D). Dagen deretter ble cellene fiksert og kjernefarget med DRAQ5. Cellene ble studert og fotografert i Zeiss LSM 510 konfokalmikroskop.

For å få kvantitere effekten av MK5 induert kjernelokalisering av FoxO3a benyttet vi oss av fluorescensmikroskopering og scoring av celler for kjerne eller cytoplasmatisk lokalisering. HeLa celler ble sådd ut i 6 brønners brett og neste dag transfektert med mCherry-FoxO3a og ulike varianter av EGFP-MK5 (EGFP-MK5-WT, EGFP-MK5-L337G og EGFP-MK5-D148A) eller EGFP. Dagen deretter ble cellene studert i Nikon fluorescensmikroskop og scoret i 10 synsfelt på cytoplasma- og kjernelokalisering, og kun kjernelokalisering.

Figur 24 viser at FoxO3a er mest lokalisert i cytoplasma (og kjernen) ved kotransfeksjon av EGFP og kinasedød mutant MK5 (D148A). Figuren viser også at FoxO3a er mest lokalisert i kjernen når plasmidet er kotransfektert med villtype- og aktiv mutant MK5 (L337G). I tillegg ble det observert en økt andel av apoptotiske celler i de cellene som var kotransfektert med FoxO3a og villtype- eller mutant MK5 (L337G).

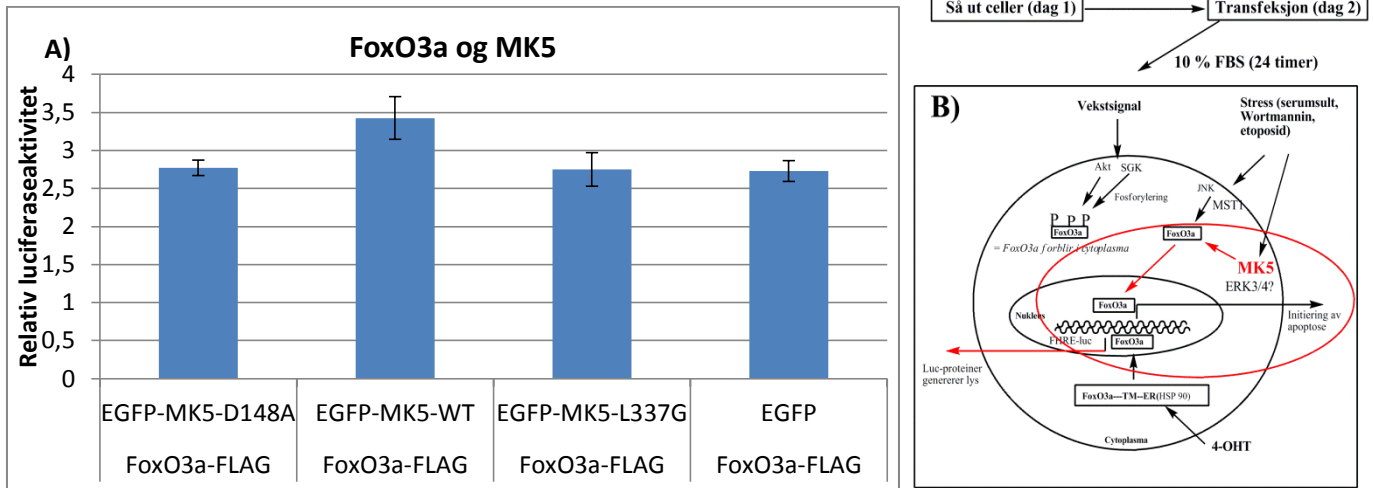


Figur 24: Telling i 10 synsfelt under vanlig mikroskop viste dominant kjernelokalisering av FoxO3a når proteinet var kotransfektet med villtype- eller konstitutiv aktivt mutant MK5 (L337G). HeLa celler (150 000 celler/brønn) ble sådd ut og neste dag transfektet med mCherry-FoxO3a, EGFP og ulike varianter av MK5 (EGFP-MK5-WT, EGFP-MK5-L337G og EGFP-MK5-D148A). 24 timer senere ble cellene studert i Nikon fluorescens mikroskop, og her ble de scoret etter lokalisering i kjernen eller cytoplasma og kjernen. \pm SEM (n = 3). (Vedlegg 4).

3.2 MK5 induerte en moderat økning av FoxO3a transkripsjonsaktivitet.

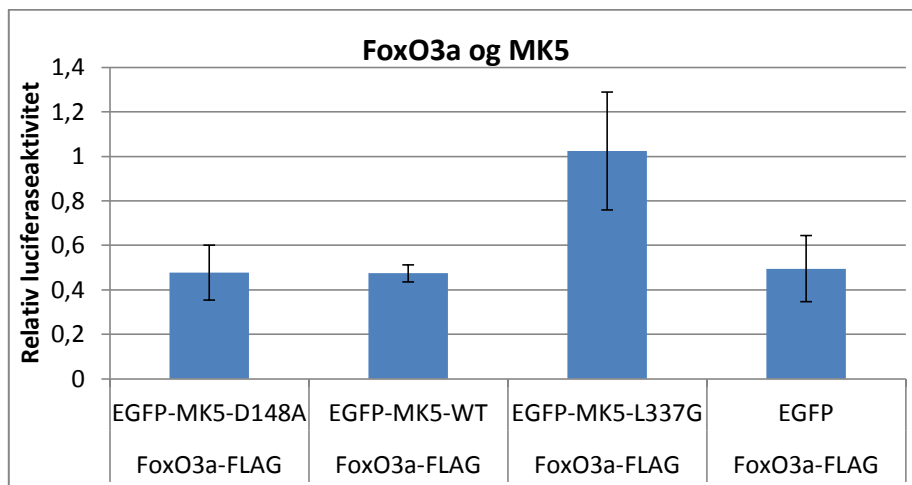
Vi observerte helt klart i eksperimentene beskrevet over at villtype MK5 og mutant L337G induerte kjernelokalisering av FoxO3a. I og med at MK5 så klart kunne induere kjernelokalisering av FoxO3a ønsket vi å undersøke om dette også medførte økt FoxO3a-mediert transkripsjon. For å undersøke dette ble HeLa celler sådd ut i 24 brønners brett og dagen deretter transfektet med FoxO3a-FLAG, MK5 (EGFP-MK5-WT, EGFP-MK5-L337G og EGFP-MK5-D148A), EGFP, pCH-110 og reporter-genet FHRE-luc. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT.

Figur 25A viser at når villtype MK5 er kotransfektet med FoxO3a og reporter-genet FHRE-luc får vi en liten moderat økning i relativ luciferaseaktivitet i forhold til de andre. Forsøket ble gjentatt i U2-OS celler som også viste en moderat økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet når FoxO3a var kotransfektet med villtype MK5.



Figur 25: Villtype MK5 induerte en moderat økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. A. HeLa celler ble sådd ut (40 000 celler/brønn) og neste dag transfektert med FoxO3a-FLAG sammen med forskjellige varianter av MK5 (EGFP-MK5-D148A, EGFP-MK5-WT og EGFP-MK5-L337G), EGFP, FHRE-luc og pCH-110. Dagen deretter ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferase aktiviteten dividert med β -galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. \pm SEM (n = 5) (Vedlegg 5). **B.** Illustrasjon over mulig signalvei til hvordan MK5 først kan induere kjernelokalisering av FoxO3a og deretter øke transkripsjonen av reporter-genet FHRE-luc.

Siden MK5 induerte bare en moderat økning i FoxO3a transkripsjonsaktivitet ønsket vi å repetere dette forsøket for å finne ut om det er metning av reporter-genet FHRE-luc som er årsaken til den moderate økningen i transkripsjonsaktivitet. Dette gjorde vi ved å øke mengden av reporter-genet FHRE-luc samtidig som vi reduserte mengden av plasmidene FoxO3a-FLAG, MK5 og EGFP. Figur 26 viser at kotransfeksjon med aktiv mutant MK5 (L337G) og FoxO3a-FLAG gir en dobbelt så høy FoxO3a transkripsjonsaktivitet.

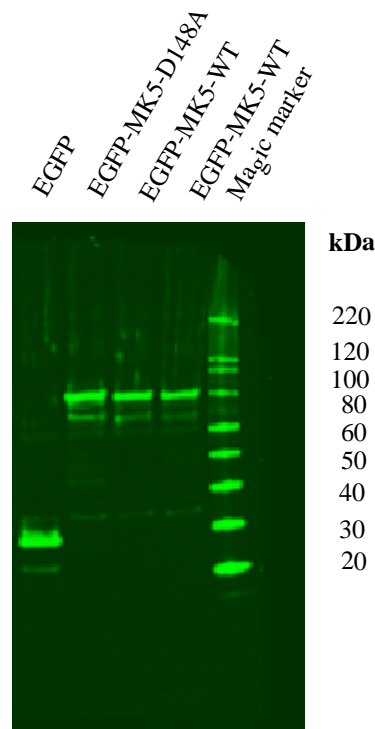


Figur 26: Celler som ble kotransfektet med aktiv mutant MK5 (L337G) og FoxO3a induerte en dobbelt så høy transkripsjonsaktivitet. HeLa celler ble sådd ut (40 000 celler/brønn) og neste dag transfektert med FoxO3a-FLAG sammen med forskjellige varianter av MK5 (EGFP-MK5-D148A, EGFP-MK5-WT og EGFP-MK5-L337G), EGFP, FHRE-luc og pCH-110. Dagen deretter ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferase aktiviteten dividert med β -galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. \pm SEM (n = 4) (Vedlegg 6).

3.3 Western blot av de ulike MK5 variantene viste at proteinene uttrykkes.

I dette forsøket ønsket vi å se om de ulike MK5 proteinene uttrykkes siden vi fikk bare en moderat økning i MK5 industert FoxO3a transkripsjonsaktivitet. For å gjøre dette ble U2-OS celler sådd ut i 6 brønners brett og dagen deretter transfektert med FoxO3a-FLAG, EGFP eller forskjellige varianter av EGFP-MK5 (EGFP-MK5-D148A, EGFP-MK5-WT og EGFP-MK5-L337G). Tjuefire timer etter transfeksjonen ble cellene høstet og kjørt i western blot. MK5 er 55 kDa og EGFP er som tidligere beskrevet 27 kDa, og dette gir til sammen 82 kDa [33].

Figur 27 viser band ved omtrent 80 kDa og 30 kDa. Bandene ved ca. 80 kDa representerer de ulike MK5, mens bandet ved 30 kDa er EGFP. Disse bandene bekrefter at de ulike MK5 variantene uttrykkes like bra.

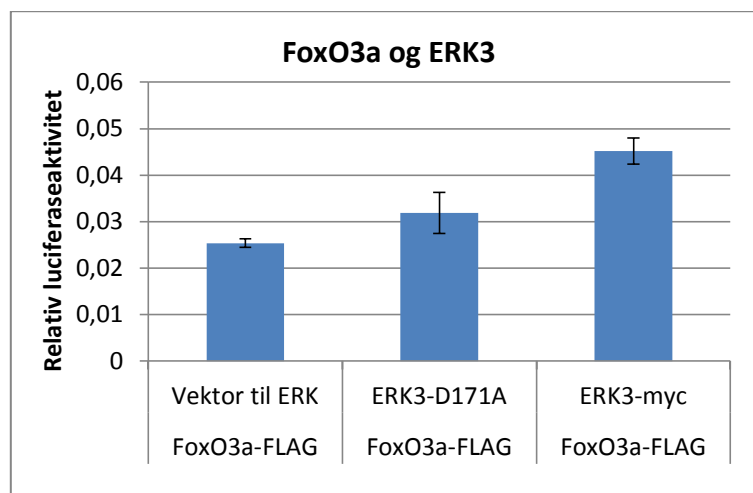


Figur 27: Uttrykk av MK5 proteiner i transfekterte U-2 OS celler. U-2 OS (300 000 celler/brønn) celler ble sådd ut i 6 brønners brett og neste dag transfektert med FoxO3a-FLAG, EGFP eller forskjellige varianter av EGFP-MK5 (EGFP-MK5- D148A, EGFP-MK5-WT og EGFP-MK5-L337G). Dagen deretter ble cellene høstet og kjørt i western blot. Primært antistoff (1:200) som ble brukt var GFP (FL) rabbit polyclonal IgG og sekundært antistoff (1:10 000) var IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG.

3.4 ERK3 induerte en liten endogen aktivitet av MK5 som resulterte i en beskjeden økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet.

I dette forsøket ønsket vi å finne ut om ERK3 alene kunne via endogen stimulering av MK5 induere økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. U2-OS celler ble først sådd ut i 24

brønners brett og dagen etterpå transfektert med FoxO3a-FLAG, ERK3 (vektor-ERK, kinasedød ERK3 eller ERK3-myc), FHRE-luc og pCH-110. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Figur 28 viser at ERK3 kan via aktivering av endogen MK5 inducere økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet.



Figur 28: ERK3 induerte økt FoxO3a transkripsjonsaktivitet via aktivering av endogen MK5. U-2 OS celler ble sådd ut (75 000 celler/brønn) og neste dag transfektert med FoxO3a-FLAG, ERK (vektor-ERK, kinasedød ERK3 (D171A) eller ERK3-myc), FHRE-luc og pCH-110. Dagen deretter ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferase aktiviteten dividert med β -galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. \pm SEM (n = 3) (Vedlegg 7).

4. Aktivering av FoxO3a-mediert transkripsjon via trippel mutant (TM)

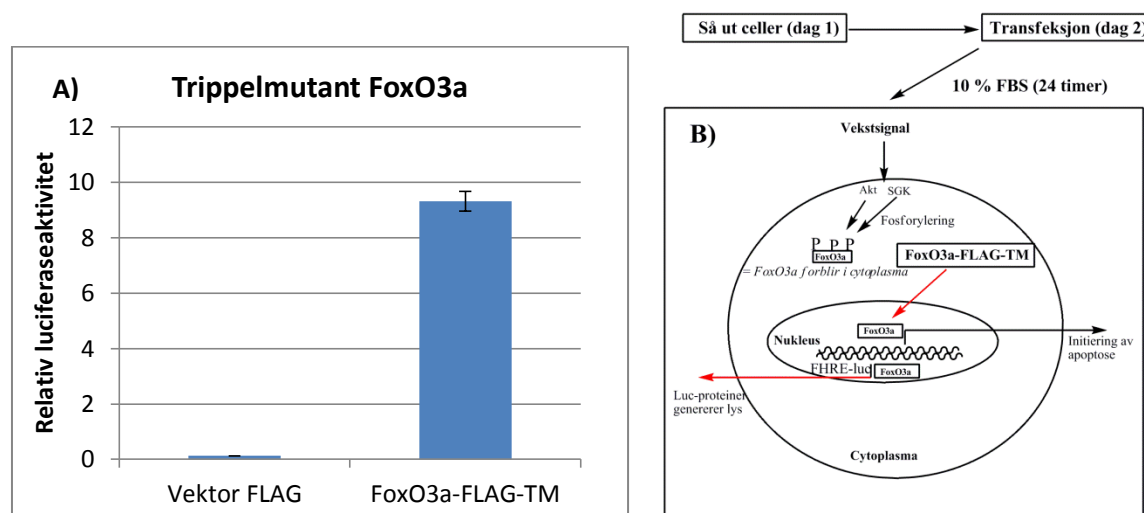
FoxO3a, østrogen-reseptor (ER) tagget FoxO3a, overuttrykking av FoxO3a og ulike former for stress.

I denne delen ønsket vi å kartlegge aktiveringen av FoxO3a-mediert transkripsjon ved å bruke reportergenene FHRE-luc, GL3-Pp62-FoxO3a-WT-luc eller GL3-Pp62-FoxO3a-mutert-luc (heretter p62-WT-luc eller p62-mut-luc, vedlegg 8).

4.1 Trippel mutant FoxO3a induerte tydelig økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet av reportergenet FHRE-luc.

Brunet *et al.* (1999) fant i sine forsøk ut at når FoxO3a (eller FKHL1) hadde mutert T32, S253 og S315 til alanin ville trippelmutert FoxO3a (FoxO3a-TM) være eksklusivt lokalisert i kjernen [45]. På bakgrunn av disse resultatene ønsket vi å finne ut om FoxO3a-FLAG-TM kotransfektet sammen med reportergenet FHRE-luc gav økt FoxO3a-mediert transkripsjon. For å gjøre dette ble HeLa celler sådd ut i 24 brønners brett og dagen deretter transfektert med FoxO3a-FLAG-TM, FHRE-luc og pCH-110. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og

luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Figur 29A viser at når FoxO3a-FLAG-TM er kotransfektet med reportergen FHRE-luc gav dette betydelig økt relativ luciferaseaktivitet enn når vektor-FLAG er kotransfektet med FoxO3a-FLAG-TM.

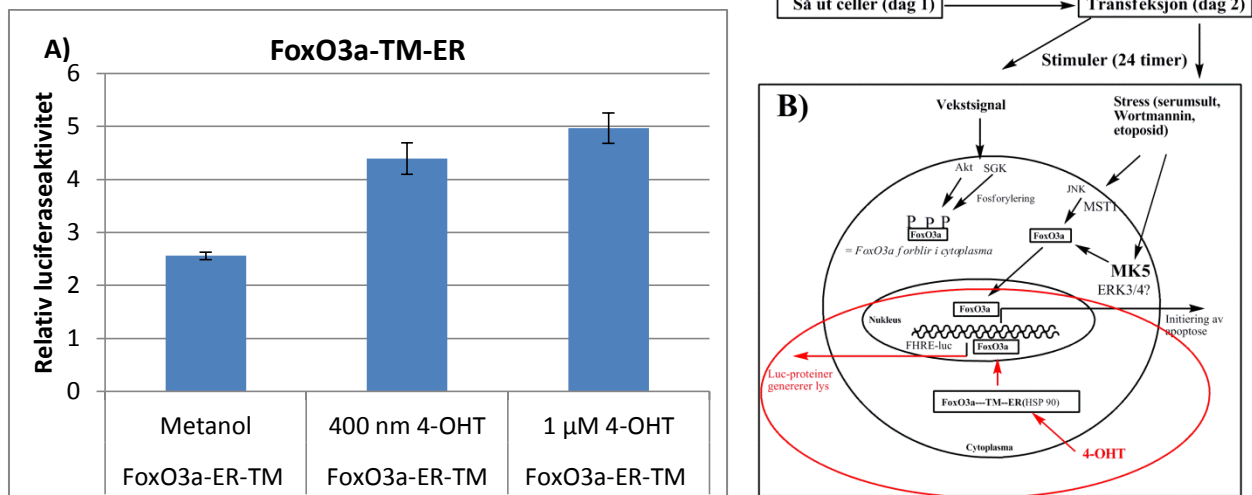


Figur 29: Trippelmutant FoxO3a gav signifikant økt FoxO3a transkripsjonsaktivitet. A. Første dag ble HeLa celler (40 000 celler/brønn) sådd ut i 24 brønners Brett. Neste dag ble Vektor-FLAG eller FoxO3a-FLAG-TM transfektet sammen med FHRE-luc og pCH-110. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferase aktiviteten dividert med β -galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. \pm SEM (n = 5) (vedlegg 9). **B.** Illustrasjon av hvordan trippel mutant FoxO3a transporteres til kjernen for å øke FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet.

4.2 FoxO3a med østrogen reseptor (ER) fikk en høyere FoxO3a-mediert transkripsjon når cellene ble behandlet med 4-hydroksytamoksifen (4-OHT).

Tran *et al.* (2002) har tidligere gjort forsøk med fusjonsproteiner hvor FoxO3a trippelmutant var fusjonert med østrogenreseptor (TM-ER) i C-terminal (TM-ER er heretter FoxO3a-TM-ER). Denne varianten av ER er i tillegg mutert slik at den er regulerbar med tamoksifen. Resultatet fra tidligere rapporter har vist at ved fravær av 4-OHT var TM-ER lokalisert i cytoplasma, mens allerede etter 1 time behandling med 4-OHT er TM-ER eksklusivt lokalisert i kjernen [44]. For å undersøke om dette systemet fungerte i HeLa celler, ble cellene sådd ut i 24 brønners Brett og dagen etter transfektet med FoxO3a-TM-ER, FHRE-luc og pCH-110. Neste dag ble cellene behandlet med enten metanol, 400 nM 4-OHT eller 1 μ M 4-OHT. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT.

Figur 30A viser at når FoxO3a-TM-ER behandles med 1 μ M 4-OHT får man dobbelt så høy relativ luciferaseaktivitet i forhold til de cellene som behandles med metanol.

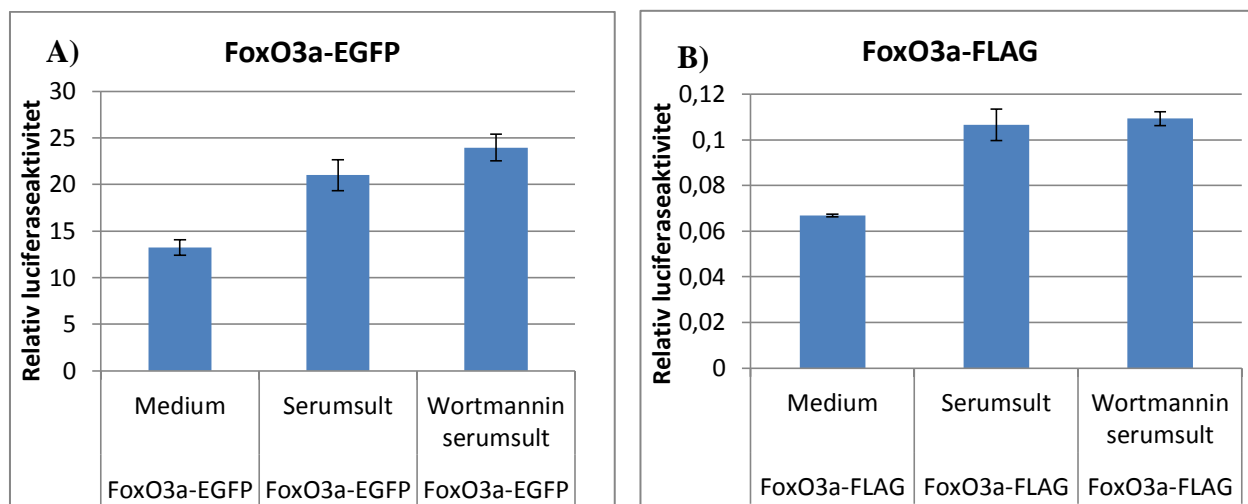


Figur 30: Stimulering med hormonet 4-hydroksytamoksifen (4-OHT) induerte høyest luciferaseaktivitet ved konsentrasjonen 1 µM 4-OHT. A. Første dag ble HeLa celler (40 000 celler/brønn) sådd ut i 24 brønners Brett. Neste dag ble FoxO3a-TM-ER transfektert sammen med FHRE-luc og pCH-110. Dagen etter transfeksjon ble cellene stimulert med metanol, 0,4 µM 4-OHT og 1µM 4-OHT i 24 timer. Etter dette ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferase aktiviteten dividert med β-galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. ±SEM (n = 4) (vedlegg 10). B. Illustrasjon som viser at når 4-OHT binder seg til ER-domenet på FoxO3a-TM-ER transporteres FoxO3a til kjernen slik at FoxO3a-mediert transkripsjon av reporter-genet FHRE-luc økes.

4.3 Serumsult alene eller i kombinasjon med wortmannin gav noe økt luciferaseaktivitet hos celler med overuttrykk av FoxO3a.

Serumsult alene eller i kombinasjon med wortmannin vil som tidligere beskrevet føre til at FoxO3a lokaliseres til kjernen. I tillegg har Brunet *et al.* (1999) funnet ut at ved fravær av vekstfaktorstimulering vil villtype FoxO3a lokalisere seg til kjernen for så å induere økt FoxO3a-mediert transkripsjon av reporter-genet FHRE-luc [45]. På bakgrunn av dette ønsket vi å reprodusere disse funnene i U2-OS celler. Disse cellene ble sådd ut i 24 brønners Brett og neste dag transfektert med FHRE-luc, pCH-110, FoxO3a-FLAG eller FoxO3a-EGFP. Dagen deretter ble cellene tilsatt vanlig medium, serumsultet eller serumsultet i kombinasjon med wortmannin. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT.

Figur 31A og 31B viser at når vi overuttrykker cellene med FoxO3a-EGFP eller FoxO3a-FLAG induerte dette økt relativ luciferaseaktivitet ved serumsult alene eller i kombinasjon med PI3K inhibitoren wortmannin.

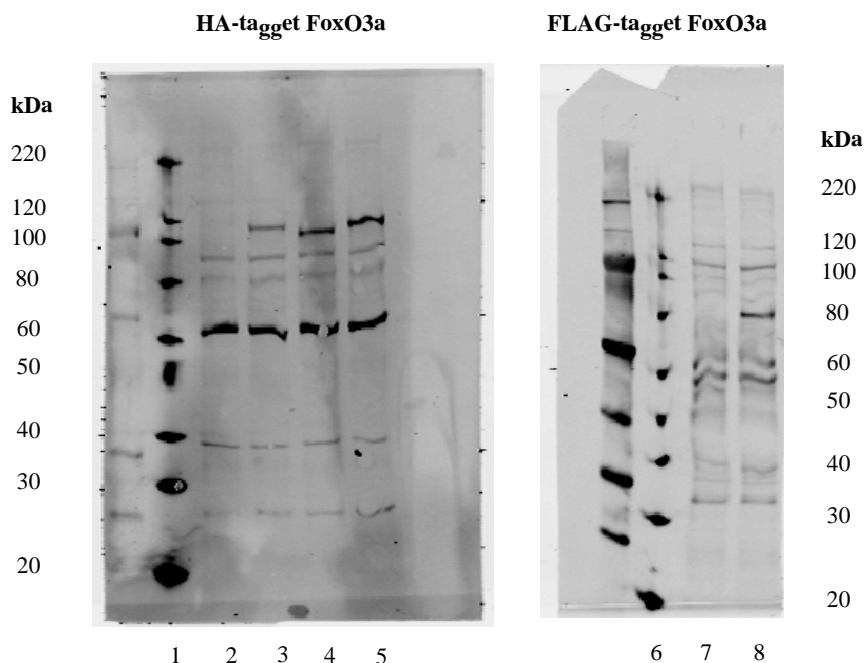


Figur 31: Serumsult alene eller kombinert med wortmannin induserte økt luciferaseaktivitet hos celler som var overuttrykket med FoxO3a. A og B. U-2 OS celler ble sådd ut (75 000 celler/brønn) og neste dag transfektert med FoxO3a-EGFP (A) eller FoxO3a-FLAG (B) sammen med FHRE-luc og pCH-110. Dagen deretter ble cellene tilsatt medium, serumsultet (0,5 % FBS) eller behandlet med serumsult og 1 μ M wortmannin i 24 timer. Etter dette ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferaseaktiviteten dividert med β -galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. \pm SEM (n = 4 og 3) (Vedlegg 11).

4.4 Western blot av HA-tagget FoxO3a og FoxO3a-FLAG viste at proteinene uttrykkes.

I dette forsøket ønsket vi å forsikre oss at plasmidene vi brukte uttrykte proteiner. For å gjøre dette ble HeLa celler sådd ut i 6 brønners brett og dagen deretter transfektert med HA-FoxO3a-WT-ER, HA-FoxO3a-TM-ER-dDB, HA-FoxO3a-TM-ER og FoxO3a-FLAG

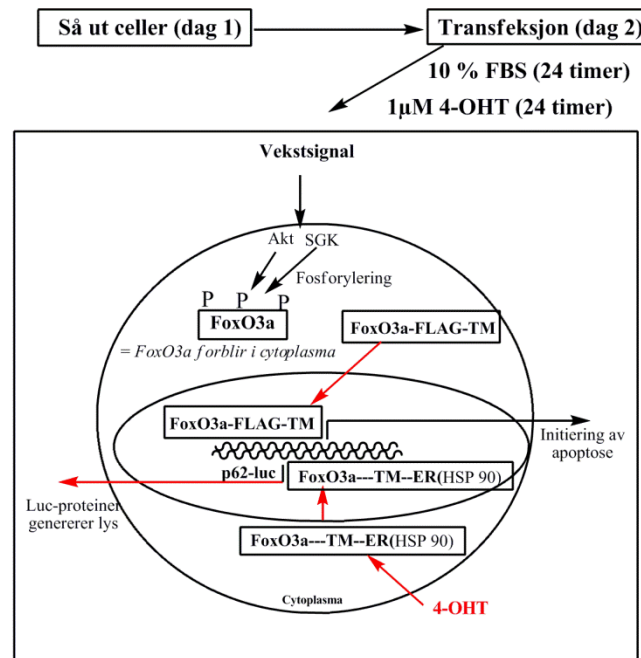
Figur 32 viser to forskjellige band hvor det ene båndet ved ca. 55 kDa er uspesifikt siden vi også finner det i utransfekterte celler. Størrelsen på mutert østrogenreseptor (ER) er ca. 300 aminosyrer, dvs. 35 – 40 kDa. Det andre er mellom 110- og 120 kDa, og dette bandet representerer ER tagget FoxO3a (band 3 – 5) (80 kDa + 40 kDa = 120 kDa). Figuren til høyre viser FLAG tagget FoxO3a som har et band i størrelsen på omtrent 80 kDa. FLAG taggen er en liten del på 8 aminosyrer, og vil derfor ikke ha betydning for størrelsen til FoxO3a proteinet [117].



Figur 32: Western blot av HA-tagget FoxO3a og FoxO3a-FLAG. HeLa celler (150 000 celler/brønn) ble sådd ut i 6 brønners Brett og transfektert med HA-FoxO3a-WT-ER (brønn 3), HA-FoxO3a-TM-ER-dDB (brønn 4), HA-FoxO3a-TM-ER (brønn 5) og FoxO3a-FLAG (brønn 8). Dagen deretter ble cellene høstet og kjørt i western blot. Primært antistoff som ble brukt var anti-FoxO3a kanin (1:1000) og Anti-FLAG mus (1:1000). Sekundært antistoff som ble brukt var (1:10 000) var 800CW Donkey anti-kanin IgG og 800CW Donkey anti-mus IgG. Brønn 1 og 6 er Magic marker, mens brønn 2 og 7 er utransfektet prøve.

5. FoxO3a regulerer uttrykket av p62

I denne delen av prosjektet ønsket vi å finne ut om FoxO3a kunne regulere uttrykket av p62. Bakgrunnen for dette er at FoxO3a er involvert i regulering av autofagi [47, 118], og i følge Bjørkøy *et al.* (2005) er p62 et viktig substrat for autofagi [79]. For å illustrere hvordan FoxO3a kan regulere uttrykket av p62 promoteren har vi laget en illustrasjonsfigur som oppsummerer de ulike metodene vi har brukt for å inducere til økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet (figur 33). For å finne ut om FoxO3a regulerte uttrykket av p62 fikk vi to reporterkonstrukt hvor p62 promoteren styrer uttrykk av reportergenet luciferase fra *Førsteamanuensis* Eva Sjøttem. Det ene p62-konstruktet var villtype (p62-WT-luc), mens det andre hadde et mutert bindingssete for FoxO3a (p62-mut-luc, vedlegg 8).

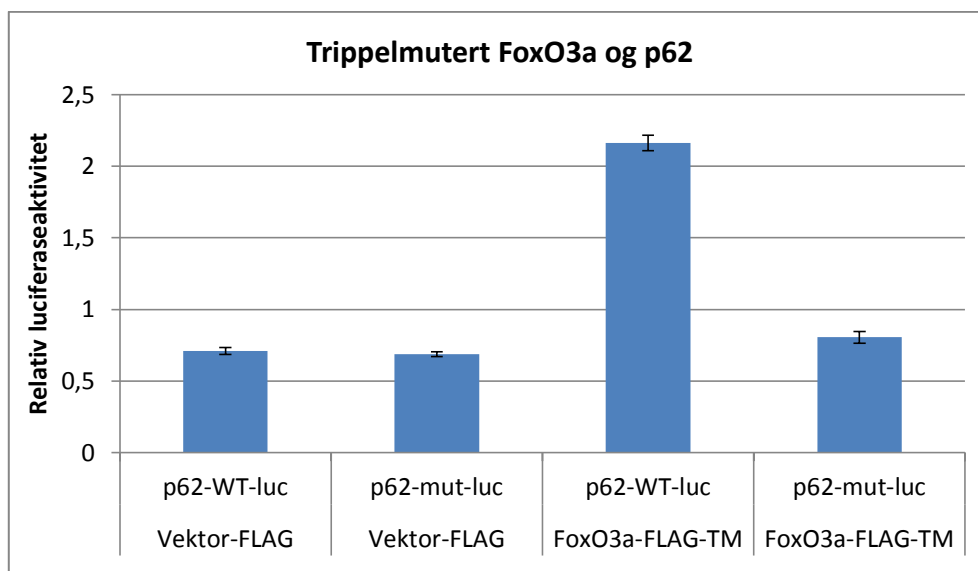


Figur 33: FoxO3a regulerer uttrykket av p62 promotoren. Trippelmutant FoxO3a går direkte inn i kjernen uten stimuli, mens FoxO3a med østrogenreseptor (ER) induserer kjernelokalisering når 4-OHT binder seg til FoxO3a-TM-ER(HSP90). I kjernen kan FoxO3a binde seg til FHRE (Forkhead responsiv element) for å danne luciferase proteiner som danner lys som kan måles ved hjelp av Luminoskan RT.

5.1 Trippelmutant FoxO3a induserer en tydelig økt FoxO3a transkripsjon.

Brunet *et al.* (1999) fant i sine forsøk ut at trippelmutant FoxO3a var eksklusivt lokalisert i kjernen [45]. På bakgrunn av dette ønsket vi å transfektere disse p62 reporterplasmidene inn i HeLa celler sammen med trippelmutant FoxO3a og pCH110 for å studere om FoxO3a regulerte uttrykket av p62 promotoren. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten målt i Luminoskan RT.

I figur 34 ser man at når reporterplasmidet villtype p62 er kotransfektet sammen med trippelmutant FoxO3a-FLAG får man mer enn to ganger økning i p62 promoteraktivitet. I tillegg viser figuren at trippelmutant FoxO3a-FLAG ikke vil indusere økning i p62 promoteraktivitet når den er kotransfektet med reporteren mutert p62.

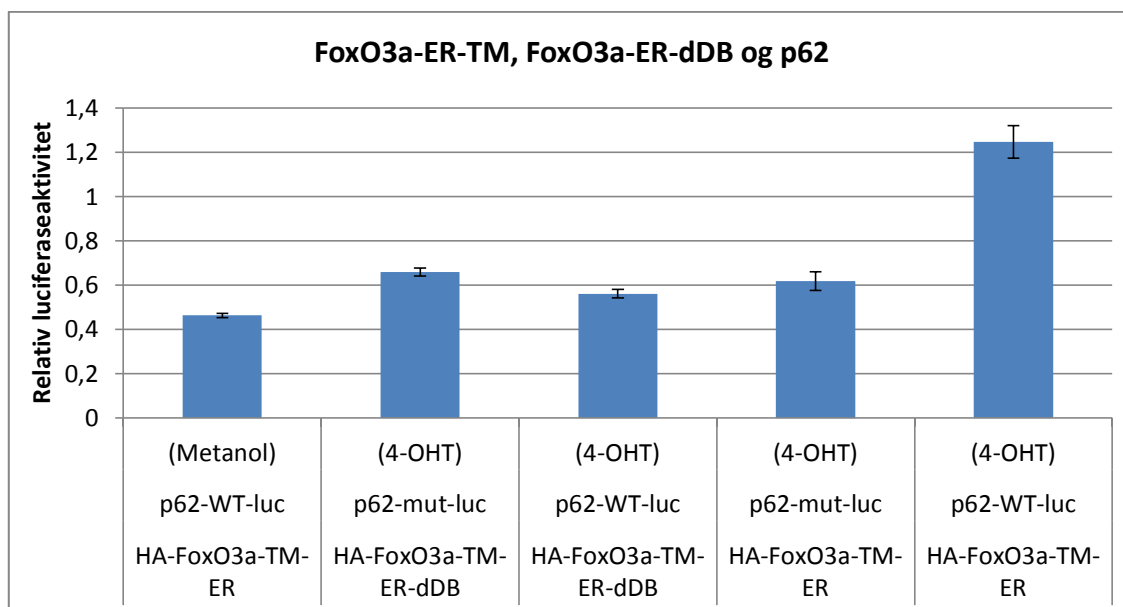


Figur 34: Trippel mutant FoxO3a induerte økt FoxO3a-mediert aktivitet av p62 promotoren. Første dag ble HeLa celler (40 000 celler/brønn) sådd ut i 24 brønners brett. Neste dag ble vektor-FLAG eller FoxO3a-FLAG-TM transfektert sammen med p62-WT-luc eller p62-mut-luc og pCH-110. Dagen etter transfeksjon ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferase aktiviteten dividert med β -galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. \pm SEM (n = 5) (vedlegg 12).

5.2 ER-tagget trippelmutant FoxO3a induerte økt FoxO3 transkripsjon når cellene ble behandlet med 4-OHT.

Tidligere i denne oppgaven er det beskrevet at 4-hydroksytamoksifen (4-OHT) vil via binding til ER-domenet induere kjernelokalisering av FoxO3a-TM-ER [44]. I dette forsøket ønsket vi å se om ER-tagget FoxO3a kunne via behandling med 4-OHT regulere uttrykket av p62 promotoren. For å gjennomføre dette ble HeLa celler sådd ut i 24 brønners brett og transfektert sammen med trippelmutant ER-tagget FoxO3a (HA-FoxO3a-TM-ER), mutant ER-tagget FoxO3a (HA-FoxO3a-TM-ER-dDB), p62-reporterplasmidene (p62-WT-luc og p62-mutert-luc) og pCH-110. Dagen deretter ble cellene behandlet med 4-OHT og løsemiddelet metanol. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT.

I figur 35 ser man at når celler som behandles med 1 μ M 4-OHT er kotransfektet med p62-WT-luc og FoxO3a-TM-ER får vi størst relativ luciferaseaktivitet. I tillegg viser figuren at vi får en nedgang i p62 promoteraktivitet når cellene er kotransfektet med enten ER-tagget trippelmutert FoxO3a med defekt DNA-bindende domene eller når p62 promotoren er mutert. Figuren viser også at metanol som kontroll ikke gir økt p62 promoteraktivitet.



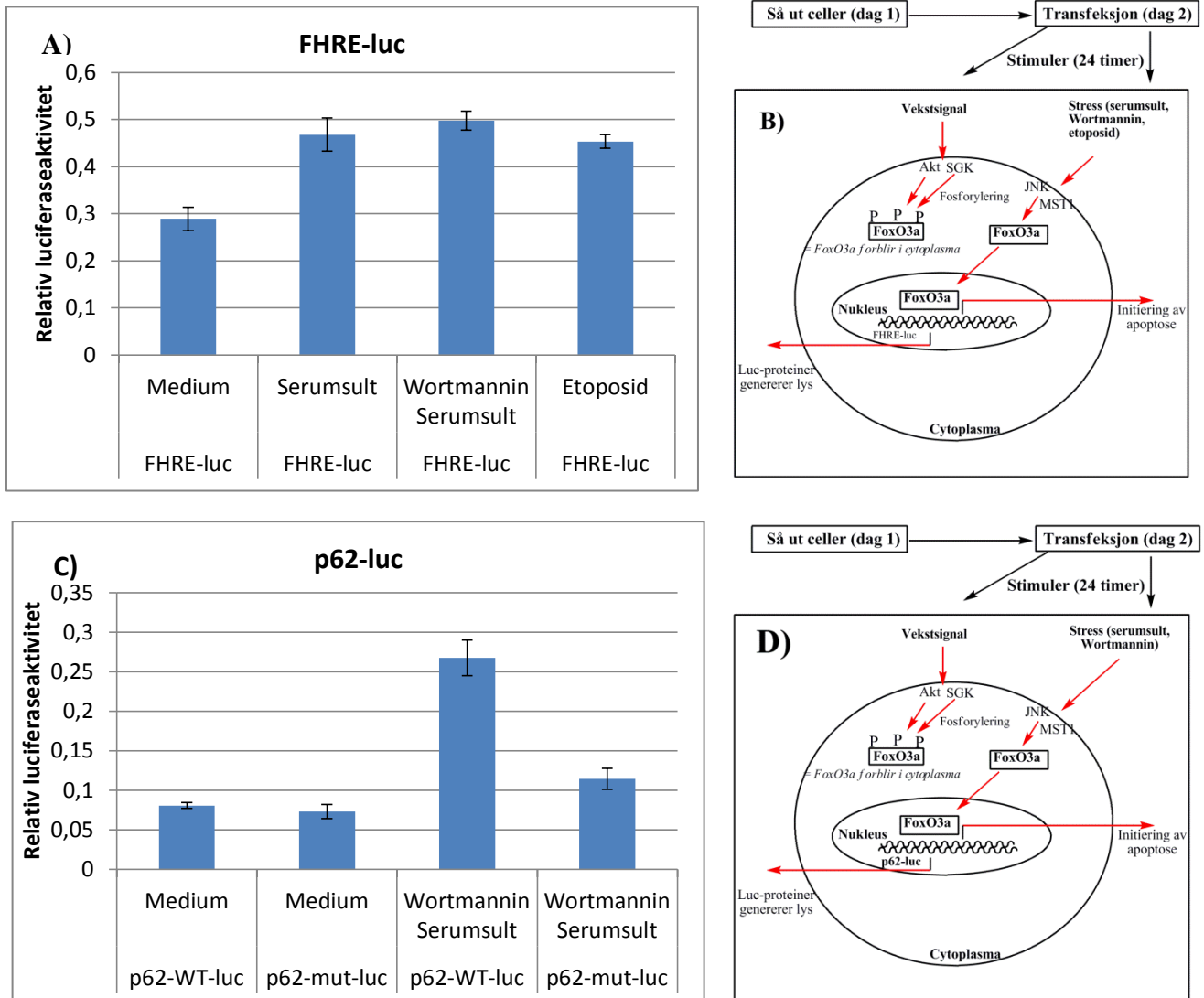
Figur 35: FoxO3a-ER-TM gav tydelig økt FoxO3a-mediert transkripsjon når cellene ble behandlet med 4-OHT. Første dag ble HeLa celler (40 000 celler/brønn) sådd ut i 24 brønners Brett. Neste dag ble FoxO3a-ER-TM eller FoxO3a-ER-TM-dDB kotransfektet sammen med p62-WT-luc eller p62-mut-luc og pCH-110. Dagen etter transfeksjon ble cellene stimulert med metanol og 1 μ M 4-OHT. Tjuefire timer senere ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferase aktiviteten dividert med β -galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. \pm SEM (n = 4) (vedlegg 13).

5.3 Endogen aktivitet til FoxO3a var økt ved behandling med etoposid, serumsult alene eller kombinert med wortmannin.

I dette forsøket ønsket vi å studere den endogene aktiviteten til FoxO3a ved å bruke forskjellige substanser (wortmannin og etoposid) som induserer FoxO3a kjernelokalisering. For å gjøre dette ble HeLa- eller U2-OS celler sådd ut i 24 brønners Brett og dagen deretter transfektet med pCH-110, FHRE-luc eller p62-luc (mutert og villtype). Dagen deretter ble HeLa cellene tilsatt medium eller behandlet med etoposid, serumsult (0,5 % FBS) eller wortmannin kombinert med serumsult. U2-OS cellene ble tilsatt medium og serumsult kombinert med wortmannin. Tjuefire timer senere ble HeLa- og U2-OS cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT.

Figur 36A viser at når cellene med reporter-genet FHRE-luc ble behandlet med serumsult, wortmannin eller etoposid fikk man et økt relativ luciferaseaktivitet i forhold til de cellene som ble behandlet med medium. Figuren viser også at celler som ikke ble serumsultet eller behandlet med wortmannin eller etoposid hadde en lavere endogen FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. Figur 36C viser at celler som var transfektet med villtype p62 og som ble behandlet med serumsult kombinert med wortmannin fikk nesten tre ganger så høy p62

promoteraktivitet. Figuren viser også at celler som hadde fått kotransfektet mutert p62 promoteren fikk ikke en økning i p62 promoteraktivitet.

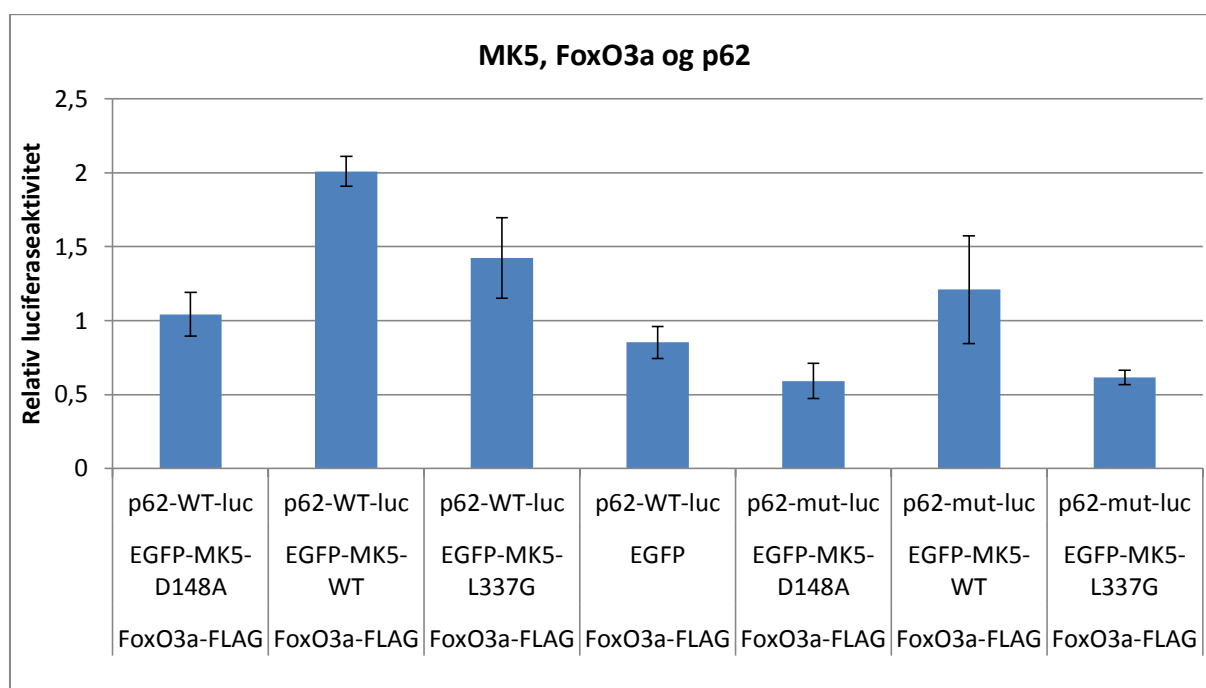


Figur 36: Endogen aktivering av FHRE-luc og promoteren villtype p62. **A.** HeLa celler ble sådd ut (40 000 celler/brønn) og neste dag transfektet med FHRE-luc og pCH-110. Dagen deretter ble de stimulert i 24 timer med medium, serumsult (0,5 % FBS), serumsult kombinert med 1µM wortmannin og 12,5µM etoposid. Etter dette ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. **C.** U-2 OS celler ble sådd ut (75 000 celler/brønn) og neste dag transfektet med p62-WT-luc eller p62-mutert-luc og pCH-110. Dagen deretter ble de stimulert i 24 timer med medium, serumsult og serumsult kombinert med 1 µM wortmannin. Etter dette ble cellene høstet og luciferase-aktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferaseaktiviteten dividert med β-galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. ±SEM (n = 4 og 3) (Vedlegg 14). **B og D.** Illustrasjon av hvordan FoxO3a kan øke luciferaseaktiviteten av reportergenene FHRE-luc og p62-luc.

5.4 Villtype- og konstitutiv aktivt mutant MK5 (L337G) induserte økt genuttrykk fra p62 promoteren.

Helt til slutt ble det forsøkt å se om MK5 industert kjernelokalisering av FoxO3a kunne bidra med å regulere uttrykket av p62. For å gjøre dette ble HeLa celler sådd ut i 24 brønners brett og dagen deretter transfektert med FoxO3a-FLAG, pCH-110, MK5 (EGFP-MK5-WT, EGFP-MK5-L337G og EGFP-MK5-D148A), EGFP og villtype- og mutant p62-luc, Tjuefire timer senere ble HeLa cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT.

Figur 37 viser at villtype MK5 kun induserte økt genuttrykk fra p62 promoteren, men at denne MK5 industerte transkripsjonsaktiviteten fra p62 promoteren er uavhengig av FoxO3a bindingssete.



Figur 37: MK5 industert transkripsjonsaktivitet via p62 promoteren er uavhengig av FoxO3a bindingssete. Første dag ble HeLa celler (40 000 celler/brønn) sådd ut i 24 brønners brett. Neste dag ble FoxO3a-FLAG transfektert sammen med p62-WT-luc eller p62-mutert-luc, ulike varianter av EGFP-MK5 (EGFP-MK5-D148A, EGFP-MK5-WT, EGFP-MK5-L337G), EGFP og pCH-110. Dagen etter transfeksjon ble cellene høstet og luciferaseaktiviteten ble målt i Luminoskan RT. Luciferase aktiviteten dividert med β -galactosidase aktiviteten (relativ luciferaseaktivitet) korrigerer for transfeksjonseffektiviteten. \pm SEM (n = 3) (vedlegg 15)

DISKUSJON

1. FoxO3a med EGFP tag i den C-terminal eller N-terminal enden

Vi observerte at lokalisering av EGFP taggen enten i C-terminale eller i N-terminale enden av FoxO3a påvirket lokaliseringen av fusjonsproteinet i ustressete celler. Jacobs *et al.* (2003) beskriver at konstruksjon og utprøving av FoxO3a og FoxO6 med EGFP i C-terminalen gir en fin cytoplasmatisk lokalisering av FoxO3a-EGFP [104]. I våre eksperimenter ble fusjonsproteinene EGFP og mCherry rekombinert inn på N-terminalen til FoxO3a (EGFP-FoxO3a), og dette påvirket cytoplasmalokaliseringen til fusjonsproteinene i våre celledsystem. Tidlige forsøk i fluorescensmikroskop viste at det var vanskelig å lokalisere EGFP-FoxO3a i HeLa celler, og på bakgrunn av dette ønsket vi å undersøke om lokalisering av EGFP tag i C- eller N-terminal hadde noen betydning for subcellulær lokalisasjon av FoxO3a. Vi fant ut at når EGFP var lokalisert i C-terminal gav dette tydeligere cytoplasmalokalisering av FoxO3a fusjonsproteiner i ustressete celler, mens FoxO3a med EGFP i N-terminal var mer utydelig og vanskeligere å lokalisere under fluorescensmikroskop.

FoxO3a proteiner som ikke er fosforylerte vil være lokalisert i kjernen, mens proteiner som er fosforylerte befinner seg i cytoplasma. Brunet *et al.* (1999) viste i sine forsøk at Akt-avhengig fosforylering av de tre fosforyleringssetene T32, S253 og S315 var viktig for cytoplasmalokalisering. I tillegg beviste de at fosforylering av FoxO3a på T32 og S253 resulterte i binding til 14-3-3 proteiner og følgelig transport ut til cytoplasma [45]. Dette tyder på at FoxO3a binding til 14-3-3 proteiner er avhengig av en fosforylert N-terminal (T32) og et fosforylert Forkhead domene (S253). Videre har Brunet *et al.* (1999) diskutert at siden fosforyleringssetet S253 i Forkhead domenet sitter så nært nukleært lokaliseringsssekvens (NLS) vil en mulig fosforylering her introdusere en negativ ladning som kan forstyrre funksjonen til NLS [45]. Dette indikerer at N-terminalen til FoxO3a er viktig for subcellulær lokalisasjon. Når EGFP fusjonsproteinet er lokalisert i N-terminal kan dette påvirke binding mellom FoxO3a-EGFP og 14-3-3 proteiner, og dette kan bidra til at FoxO3a proteiner ikke i like stor grad transporteres ut til cytoplasma ved ustressete forhold. En årsak til dette kan være at EGFP fusjonsproteinet sperrer for fosforylering av N-terminalen via PI3K signalveien. I tillegg kan MST1 fosforylering av FoxO3a forstyrre interaksjonen mellom 14-3-3 proteiner slik at FoxO3a lokaliseres til kjernen [66]. Dårlig fosforylering av FoxO3a sine bindingssteder via PI3K signalveien kan også være en årsak til at FoxO3a proteiner lokaliseres til kjernen

(eks: serumsult, stressa celler). Videre er også apoptose en signalvei som kan resultere i økt kjernelokalisering av FoxO3a, og ifølge Brunet *et al.* (1999) kan FoxO3a inducere målgener for Fas ligander og trigge apoptose via den ytre signalveien [45]. Andre muligheter som kan påvirke lokaliseringen av FoxO3a er transfeksjonsreagens (lipofectamin) og økt tilgjengelighet av fosfataser.

Til slutt kan det også nevnes at fluoriserende fusjonsproteiner er kunstige proteiner, og dette kan gi kunstige systemer som påvirker proteinenes evne til subcellulær lokalisering i cellen. Årsaken til dette kan være at fusjonsproteiner (eks: EGFP) sterisk hindrer FoxO3a proteinet i å folde seg ordentlig slik at subcellulær lokalisering ikke blir korrekt (CP 21.4) [103].

2. Lokalisering av FoxO proteiner

I følge Brunet *et al.* (1999), Jacobs *et al.* (2003) og van der Heide *et al.* (2005) er FoxO3a under ustressete forhold lokalisert i cytoplasma og FoxO6 lokalisert i kjernen [45, 62, 104]. EGFP var en god kontroll fordi dette grønne fluoriserende plasmidet (GFP) lokaliserer seg i cytoplasma og kjernen. Samtidig var også FoxO6-EGFP en god kontroll fordi dette plasmidet mangler et C-terminal Akt/PKB motiv som gjør at det ikke kan shuttle mellom cytoplasma og kjernen, og derfor befinner det seg kun i kjernen [119]. Nå som vi hadde kontroll på lokalisering av EGFP og FoxO6 fant vi ut at FoxO3a-EGFP var tydelig lokalisert i cytoplasma under ustressete forhold, og dette stemte bra i forhold til Brunet og van der Heide's tidligere studier.

Videre ønsket vi å se på hvordan FoxO3a-EGFP eller FoxO6-EGFP oppførte seg når de ble utsatt for forskjellige typer stress. Tidlig i denne masteroppgaven ble celler som var transfekterte med plasmidene EGFP, FoxO3a-EGFP og FoxO6-EGFP serumsultet med 0,5 % FBS. Når vi tok bort vekstfaktorstimuleringen, som ved serumsult, antok vi at PI3K signalveien var blokkert slik at FoxO3a var defosforylert og kjernelokalisert. Dette fylte ikke forventningene vi først hadde antatt, fordi etter 24 timers serumsult var cellene med FoxO3a-EGFP fortsatt lokalisert i cytoplasma og kjernen. I følge tidligere studier som har blitt gjort i *C.elegans* er det blitt vist at forkhead transkripsjonsfaktoren DAF-16 virker nedstrøms for Akt og SGK i PI3K signalveien [57]. Som tidligere beskrevet vil en aktivering av denne signalveien føre til at FoxO3a transporteres ut til cytoplasma. Dette førte til en midlertidig konklusjon om at PI3K signalveien ikke var fullstendig inhibert eller at HeLa cellene var

vanskelig å serumsulte. Det ble senere gjort forsøk i U2-OS celler (data ikke vist) for å bekrefte om HeLa cellen var vanskelig å serumsulte. Resultatet fra dette forsøket viste FoxO3a-EGFP var lokalisert i kjernen og cytoplasma (som for HeLa celler). En annen mulig årsak som vi spekulerte i var at dersom vi overuttrykket cellene med FoxO3a-EGFP kunne dette påvirke den subcellulære lokaliseringen til FoxO3a-EGFP. Overuttrykking av FoxO3a vil kunne gi en selvforsterkende effekt som gir litt økt FoxO3a i kjernen som videre fører til økt uttrykk av apoptose regulerende gener. Disse apoptose regulerende genene kan deretter indusere stress som igjen vil øke kjernelokalisering av FoxO3a. I mikroskop kan dette sees ut som apoptotiske celler eller at FoxO3a både er lokalisert i cytoplasma og kjernen. Disse forsøkene med serumsult alene førte til at vi gikk over til å bruke PI3K inhibitoren wortmannin kombinert med serumsult. Senere behandlet vi også cellene med etoposid som via stress også skulle indusere kjernelokalisasjon av FoxO3a.

For å finne ut om PI3K signalveien ikke var fullstendig blokkert behandlet vi HeLa celler med serumsult kombinert med PI3K inhibitoren wortmannin. De cellene som hadde fått transfektert inn EGFP eller FoxO6-EGFP var fortsatt upåvirket av blokkeringen i PI3K signalveien, mens celler med FoxO3a-EGFP viste tydelig at FoxO3a var lokalisert i kjernen. Dette tydeliggjorde at PI3K signalveien ikke var fullstendig blokkert ved serumsult alene, og ved serumsult kombinert med wortmannin fikk vi en tydeligere kjernelokalisering av FoxO3a. Ved hjelp av titrering fant vi ut at 1 μ M wortmannin var den mest optimale konsentrasjonen for å indusere kjernelokalisering av FoxO3a-EGFP. I tillegg reproduiserte vi resultatene fra van der Heide sine forsøk om at FoxO6 er lokalisert i kjernen uavhengig av PI3K signalveien [62].

3. Effekt av MK5 på FoxO3a subcellulær lokalisasjon og transkripsjonsaktivitet

Kress *et al.* (2011) har vist at FoxO3a kan fosforyleres av MK5 som igjen resulterer i økt kjernelokalisering av FoxO3a og videre økt uttrykk av micro-RNAene miR 34b/c [37]. For å bekrefte at MK5 kunne indusere kjernelokalisering av FoxO3a også i våre celledsystemer ble celler kotransfektet med ulike varianter av EGFP-tagget MK5 og mCherry-tagget FoxO3a og analysert i konfokalmikroskop. Her kunne man tydelig se at når villtype- eller en konstitutiv aktiv mutant av MK5 (L337G) var kotransfektet med FoxO3a var begge plasmidene lokalisert i kjernen. I tillegg forble FoxO3a hovedsakelig lokalisert i cytoplasma når plasmidet

var kotransfektet sammen med EGFP eller kinasedød mutant av MK5 (D148A). Senere ble disse resultatene bekreftet ved telling av celler i 10 synsfelt og scoret med vanlig mikroskop. Selv om disse resultatene gav klare indikasjoner på at MK5 kunne indusere kjernelokalisering av FoxO3a var der også en større andel av apoptotiske celler hos de cellene som hadde blitt kotransfektet med FoxO3a, villtype og aktiv mutant MK5 (L337G). Dette gjorde at tellingen ble vanskeligere fordi det ikke var lett å skille om FoxO3a var lokalisert i kjernen eller om cellen var apoptotisk. Det er tidligere blitt diskutert at når FoxO3a er kjernelokalisert kan proteinet aktivere gener som er involvert i apoptose, og det kan være mulig at MK5 induisert kjernelokalisering av FoxO3a bidrar til økt uttrykk av disse apoptose regulerende genene. En annen mulig årsak kan være at når vi overuttrykker FoxO3a kan dette føre til at mer av FoxO3a befinner seg i kjernen, og på denne måten aktiveres apoptose i større grad. Tilslutt bør det også nevnes at Kress *et al.* (2011) brukte kun villtype- og mutant MK5 (L337G) i sine forsøk, og manglet kontrollen kinasedød mutant MK5 (D148A). Dette er et viktig resultat å bemerke seg fordi kinasedød mutant av MK5 induiserte ikke kjernelokalisasjon av FoxO3a, og dette antyder at MK5 mediert fosforylering av FoxO3a er viktig for økt transport til kjernen.

Siden vi fant ut at villtype- og aktivt mutant MK5 (L337G) induiserte kjernelokalisering av FoxO3a ønsket vi også å finne ut om dette i tillegg gav økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. Resultatene fra dette forsøket viste at transkripsjonsaktiviteten til FoxO3a var noe økt når villtype MK5 var kotransfektet, men svært lav i forhold til hva vi forventet fra tidligere forsøk i konfokalmikroskop og telling i 10 synsfelt med scoring i vanlig fluorescensmikroskop. En mulig forklaring kan være at der har oppstått modifikasjoner mellom villtype MK5 (eller L337G) og FoxO3a som gjør at selv om FoxO3a translokeres til kjernen vil proteinet ikke binde seg til promoteren til FHRE-luc for å gi økt transkripsjonsaktivitet. Kress *et al.* (2011) har i sine forsøk også vist at MK5 hovedsakelig fosforylerer FoxO3a på Serin 215 (S215) i det DNA-bindende domenet, og det er denne fosforyleringen som er essensiell for MK5 mediert kjernelokalisering av FoxO3a [37]. Andre har vist at når S215 er fosforylert vil bindingen av FoxO3a til DNA bli svekket [120]. Dette kan være en av årsakene til at MK5 induisert kjernelokalisering ikke nødvendigvis øker FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. Hvis vi hadde hatt mer tid kunne vi ha kotransfektet ulike varianter av MK5 sammen med trippelmutant FoxO3a for å se om MK5 fosforylering av FoxO3a faktisk kan være hemmende på transkripsjonsaktivering. Hvis dette hadde vært tilfelle kunne vi videre ha mutert Serin 215 (S215) til en ikke fosforylerbar alanin i

trippelmutert FoxO3a og undersøkt om denne mutantene av FoxO3a ble hemmet av MK5 fosforylering.

En annen mulig årsak til den moderate økningen i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet kunne være metning av reporterogenet FHRE-luc. Kotransfeksjon med konstitutiv aktiv mutant MK5 (L337G) og FoxO3a induerte tydelig økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet, mens EGFP, villtype- og kinasedød mutant MK5 (D148A) ikke viste noen økt aktivitet. Dette tyder på at metning av reporterogenet FHRE-luc ikke er årsaken til at vi bare får en liten moderat økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. Dette forsøket ble gjort bare en gang og burde derfor gjort flere ganger for å kunne konkludere om den økte FoxO3a-medierte transkripsjonsaktiviteten av mutant MK5 (L337G) faktisk er reell.

4. Effekt av ERK3/4 og MK5 på FoxO3a subcellulær lokalisasjon og transkripsjonsaktivitet.

De atypiske kinasene ERK3 og ERK4 har i følge tidligere studier vist å regulerer MK5 aktivitet og subcellulær lokalisering [26, 27, 32]. For å teste om transkripsjonsfaktoren FoxO3a ble regulert av de atypiske MAP kinasene ERK3 eller ERK4 gjorde vi flere forsøk som gav varierende resultater og lite mening, og på grunn av lite tid ble ikke eksperimentene gjentatt. Først ønsket vi å finne ut hvor mCherry-FoxO3a var lokalisert i cellen (i konfokal-mikroskop) når vi kotransfekterte ERK3-myc eller ERK4-myc sammen med villtype- (EGFP-MK5-WT) og kinasedød mutant MK5 (EGFP-MK5-D148A). I mikroskop (ikke vist) var det vanskelig å skille de ulike parallellene fra hverandre, men der var en liten tendens til økt kjernelokalisering av FoxO3a når cellene var kotransfektet med villtype MK5 og ERK3. Etter dette forsøket ønsket vi å finne ut om ERK3 eller ERK4 kunne gjennom en eventuell MK5-indusert kjernelokalisering av FoxO3a også øke FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. Dataen fra dette forsøket (ikke vist) viste en mulig økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet når ERK3 var kotransfektet med villtype MK5.

På bakgrunn av dette ønsket vi å forsøke å overuttrykke systemet vårt med ERK3 sammen med FoxO3a for å se om endogen stimulering av MK5 via ERK3 kunne bidra til MK5 induert kjernelokalisering og følgelig økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. I dette forsøket fikk vi en liten økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet som vi tror kan skyldes MK5 induerte kjernelokalisering av FoxO3a eller andre årsaker. Som kontroller

hadde vi vektor til ERK og kinasedød ERK3, og disse viste begge en lavere FoxO3a transkripsjonsaktivitet.

5. FoxO3a og effekt på p62 promoteraktivitet

Autofagi er en godt regulert signalvei som involverer degradering proteiner, nukleinsyrer og organeller som befinner seg i cytoplasma. Ifølge Bjørkøy *et al.* (2005) er p62 et viktig substrat for autofagi [79], og i studien som ble gjort av Mammucari *et al.* (2007) fant de ut at FoxO3a kontrollerer transkripsjon av flere viktige autofagi-relaterte gener [47]. På bakgrunn av dette ønsket vi å finne ut om FoxO3a kunne regulere uttrykket av p62, og for å gjennomføre dette fikk vi to reporterkonstrukt (mutant og villtype) fra Førsteamanuensis Eva Sjøttem hvor p62 promoteren styrte uttrykket av reporter-genet luciferase.

Vi ønsket først å bruke trippelmutant FoxO3a-FLAG siden den på grunn av sine mutasjoner i fosforyleringssetene transporteres direkte inn til kjernen [45]. Når trippelmutant FoxO3a-FLAG var kotransfektet med reporteren villtype p62 (p62-WT-luc) fikk vi et økt uttrykk av luciferase. Trippelmutant FoxO3a transporteres direkte til kjernen for å binde seg til FoxO bindingssete på promoteren til villtype p62 gen for å skru på transkripsjonen av luciferaseproteiner. Kontrollen mutert p62 (p62-mut-luc) gav ikke økt luciferaseaktivitet, og dette tyder på at trippelmutant FoxO3a inducerer økt uttrykk av p62 promoteren og at denne økningen krevde et funksjonelt FoxO3a bindingssete.

Videre ønsket vi å bruke trippelmutert østrogenreseptor (TM-ER) fusjonsproteiner for å kartlegge om FoxO3a (HA-FoxO3a-TM-ER, heretter TM-ER) regulerte uttrykket av p62 promoteren til reporter-genet luciferase. Resultatet fra dette forsøket viste at når TM-ER var kotransfektet med villtype p62 og deretter behandlet med 4-OHT fikk vi en økt FoxO3a-mediert transkripsjon. Dette tyder på at når vi behandler cellene med 4-OHT vil FoxO3a transporteres inn til kjernen for å binde seg til FoxO bindingssete på promoteren til villtype p62 for å øke genuttrykket. Som kontroll i dette forsøket brukte vi reporteren p62 mutant og TM-ER som hadde et defekt DNA bindende domene (TM-ER-dDB). Når mutant p62 var kotransfektet sammen med TM-ER og senere behandlet med 4-OHT fikk vi ingen økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. Dette skyldes at når TM-ER transporteres til kjernen vil promoteren p62 ha mutert FoxO bindingssete slik at man ikke får induert uttrykk av p62 promoteren til reporter-genet luciferase. Siden TM-ER-dDB har et defekt DNA bindende

domene vil heller ikke 4-OHT mediert kjernelokalisering bidra til å øke genuttrykket til villtype p62. I tillegg ble effekten av TM-ER på villtype p62 målt ved å sammenligne celler som hadde blitt behandlet med 4-OHT eller metanol. Dette gav heller ingen økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet, og på bakgrunn av disse funnene kan vi si at DNA binding til FoxO bindingssteder er nødvendig for at FoxO3a skal kunne inducere økt genuttrykk av p62 promoteren.

Den endogene aktiveringen av villtype p62 promoteren var tydelig økt ved serumsult kombinert med wortmannin. Dette kan være et resultat av at manglende vekstfaktorstimulering (eks: serumsult) eller en direkte hemming av PI3K signalveien (eks: wortmannin) transporterer FoxO3a til kjernen slik at proteinet kan binde seg til FoxO bindingssete på promoteren til villtype p62 for å øke FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. På denne måten vil aktivering av FoxO3a også øke mengden av p62 proteiner og bidra til å være en viktig regulator for autofagi. Som tidligere beskrevet i oppgaven vil autofagi aktiveres ved sult eller mangel på vekstfaktorstimulering, og når FoxO3a er defosforylert og kjernelokalisert vil proteinet kunne kontrollere transkripsjonen av flere autofagi-relaterte gener som er viktig for å iverksette autofagi [47, 78]. Videre vil den økte mengden av p62 proteiner kunne regulere autofagi ved at proteinene kan danne aggregater med ubiquitinerte proteiner og eliminere dem via autofagi. Derfor kan FoxO3a gjennom oppregulering av mengden p62 proteiner spille en viktig rolle for regulering av autofagi.

Selv om disse resultatene gav økt transkripsjonsaktivitet kreves det flere forsøk for å bevise at det er faktisk FoxO3a som binder seg og ikke noe annet til p62 promotoren. Dersom vi hadde hatt mer tid hadde vi ønsket å gjøre et chip-assay (kromatin immunopresipitering) for å identifisere interaksjonen mellom p62 promoteren og FoxO3a. Etter dette hadde vi også ønsket å bruke siRNA (short interfering RNA) mot FoxO3a i luciferase reportegen assay for å kartlegge om den økte luciferaseaktivitet skyldes FoxO3a og ikke noe annet. I tillegg hadde vi ønsket å gjøre en qPCR (kvantitativ Polymerase chain reaction) og deretter westernblot for å detektere økt p62 uttrykk under betingelser som vi vet kan aktivere endogen FoxO3a.

Tidligere hadde vi funnet ut at villtype eller konstitutiv aktiv mutant MK5 (L337G) induserte tydelig kjernelokalisering av FoxO3a, og på bakgrunn av dette ønsket vi å finne ut om kjernelokaliseringen av FoxO3a var involvert i reguleringen av p62 promoteren. Resultatet fra

dette forsøket viste at villtype MK5 induerte økt genuttrykk fra p62 promoteren, men at denne MK5 induerte transkripsjonsaktiviteten fra p62 var uavhengig av FoxO3a bindingssete. Vi har også funnet ut at selv om MK5 induerte FoxO3a kjernelokalisering ville villtype MK5 bare induere en moderat økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. Våre funn indikerer at MK5 kan induere transkripsjonsaktivitet fra p62 promoteren, og dette ser ut til å være uavhengig av bindingssetene til FoxO3a transkripsjonsfaktorer.

KONKLUSJON

I denne oppgaven har vi funnet ut at lokalisering av fusjonsproteinene EGFP eller mCherry på den C-terminale eller N-terminale enden til FoxO3a er viktig for subcellulær lokalisering. Vi reproduserte funn fra tidligere studier og fant ut at FoxO3a er mest lokalisert i cytoplasma under ustresete forhold, mens FoxO6 er kjernelokalisert uavhengig av PI3K-Akt-SGK signalveien. FoxO3a vart også regulert av forskjellige typer stress, og ved hjelp av stress i form av serumsult, wortmannin eller etoposid fikk vi både en økt kjernelokalisering av FoxO3a og FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet.

Vi fant også ut at villtype og kinaseaktiv mutant MK5 (L337G) induserte kjernelokalisering av FoxO3a, men at denne kjernelokaliseringen ikke induserte noe betydelig økt FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet. I tillegg viste ERK3 å inducere en liten endogen aktivitet av MK5 som resulterte i en liten økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet.

Tilslutt fant vi ut at FoxO3a kan være en viktig faktor for regulering av p62 uttrykk, men at det krever flere studier for å bevise at det er faktisk FoxO3a som binder seg og ikke noe annet til p62 promoteren. I tillegg har vi bevist at MK5 indusert transkripsjonsaktivitet fra p62 promoteren ser ut til å være uavhengig av FoxO3a bindingssete.

REFERANSER

1. Johnson, L.N., M.E. Noble, and D.J. Owen, *Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation*. Cell, 1996. **85**(2): p. 149-58.
2. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1911.
3. Fabbro, D., et al., *Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs*. Pharmacology & therapeutics, 2002. **93**(2-3): p. 79-98.
4. Kolibaba, K.S. and B.J. Druker, *Protein tyrosine kinases and cancer*. Biochimica et biophysica acta, 1997. **1333**(3): p. F217.
5. Arora, A. and E.M. Scholar, *Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005. **315**(3): p. 971-979.
6. Johnson, L.N., *Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds*. Q Rev Biophys, 2009. **42**(1): p. 1-40.
7. Bain, J., et al., *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. The Biochemical journal, 2007. **408**(Pt 3): p. 297.
8. Schwab, M., *Encyclopedia of Cancer 2008*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
9. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
10. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011. **75**(1): p. 50.
11. Boulton, T.G., et al., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF*. Cell, 1991. **65**(4): p. 663-675.
12. Seger, R. and E. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. The FASEB Journal, 1995. **9**(9): p. 726-735.
13. Roux, P.P. and J. Blenis, *MAPK Signaling in Human Diseases. Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases*, R. Srivastava, Editor 2007, Humana Press. p. 135-149.
14. Chen, R., C. Sarnecki, and J. Blenis, *Nuclear localization and regulation of erk-and rsk-encoded protein kinases*. Molecular and cellular biology, 1992. **12**(3): p. 915-927.
15. Meloche, S. and J. Pouyssegur, *The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1-to S-phase transition*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3227-3239.
16. Bode, A.M. and Z. Dong, *The functional contrariety of JNK*. Molecular carcinogenesis, 2007. **46**(8): p. 591-598.
17. Tsuiki, H., et al., *Constitutively active forms of c-Jun NH2-terminal kinase are expressed in primary glial tumors*. Cancer research, 2003. **63**(1): p. 250.
18. Xu, P., et al., *JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons*. Genes & development, 2011. **25**(4): p. 310-322.
19. Salih, D.A.M. and A. Brunet, *FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging*. Current opinion in cell biology, 2008. **20**(2): p. 126-136.
20. Ben-Levy, R., et al., *Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2*. Current Biology, 1998. **8**(19): p. 1049-1057.
21. Cuadrado, A. and A. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochem. J, 2010. **429**: p. 403-417.
22. Yan, L., et al., *Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development*. BMC developmental biology, 2003. **3**(1): p. 11.
23. Wang, X., et al., *Activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 downregulates FasL upon osmotic stress*. Cell Death & Differentiation, 2006. **13**(12): p. 2099-2108.

24. Coulombe, P. and S. Meloche, *Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2007. **1773**(8): p. 1376-1387.
25. Åberg, E., et al., *Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(29): p. 19392.
26. Seternes, O.M., et al., *Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway*. The EMBO Journal, 2004. **23**(24): p. 4780-4791.
27. Åberg, E., et al., *Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(46): p. 35499.
28. Long, W., et al., *ERK3 signals through SRC-3 coactivator to promote human lung cancer cell invasion*. The Journal of Clinical Investigation, 2012: p. 0-0.
29. Klinger, S., et al., *Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(39): p. 16710-16715.
30. Gaestel, M., *MAPKAP kinases—MKs—two's company, three's a crowd*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006. **7**(2): p. 120-130.
31. New, L., et al., *PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase*. The EMBO Journal, 1998. **17**(12): p. 3372-3384.
32. Perander, M., S. Keyse, and O. Seternes, *Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases?* Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2008. **13**: p. 4617.
33. Seternes, O.M., et al., *Both binding and activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) play essential roles in regulation of the nucleocytoplasmic distribution of MAPK-activated protein kinase 5 by cellular stress*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(20): p. 6931.
34. Ni, H., et al., *MAPKAPK5, a novel mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase, is a substrate of the extracellular-regulated kinase (ERK) and p38 kinase*. Biochemical and biophysical research communications, 1998. **243**(2): p. 492-496.
35. Sun, P., et al., *PRAK Is Essential for *ras*-Induced Senescence and Tumor Suppression*. Cell, 2007. **128**(2): p. 295-308.
36. Gerits, N., et al., *Modulation of F-actin rearrangement by the cyclic AMP/cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway is mediated by MAPK-activated protein kinase 5 and requires PKA-induced nuclear export of MK5*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(51): p. 37232.
37. Kress, T.R., et al., *The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis*. Molecular Cell, 2011. **41**(4): p. 445-457.
38. Liu, P., et al., *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer*. Nature Reviews Drug Discovery, 2009. **8**(8): p. 627-644.
39. Weinberg, R.A., *The biology of cancer 2007*, New York: Garland Science. XIX, 796 s.
40. Kaestner, K.H., W. Knöchel, and D.E. Martínez, *Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors*. Genes & development, 2000. **14**(2): p. 142.
41. Reagan-Shaw, S. and N. Ahmad, *The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer*. Toxicology and applied pharmacology, 2007. **224**(3): p. 360-368.
42. Medema, R.H., et al., *AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27^{k1} i¹ p¹*. NATURE-LONDON-, 2000: p. 782-786.
43. Kops, G.J.P.L., et al., *Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress*. Nature, 2002. **419**: p. 316-321.
44. Tran, H., et al., *DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein*. Science's STKE, 2002. **296**(5567): p. 530.
45. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-868.

46. Medema, R.H. and P.J. Coffey, *Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1*. *Current Biology*, 2000. **10**(19): p. 1201-1204.
47. Mammucari, C., et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. *Cell metabolism*, 2007. **6**(6): p. 458-471.
48. Arden, K.C., *Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer*. *Experimental gerontology*, 2006. **41**(8): p. 709-717.
49. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2011.
50. Greer, E.L. and A. Brunet, *FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7410-7425.
51. Yang, J.Y. and M.C. Hung, *A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2009. **15**(3): p. 752-757.
52. Katoh, M., *Human FOX gene family (Review)*. *International journal of oncology*, 2004. **25**(5): p. 1495.
53. Biggs lii, W.H. and W.K. CaveneeKaren C, *Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse*. *Mammalian Genome*, 2001. **12**(6): p. 416-425.
54. Kaufmann, E. and W. Knöchel, *Five years on the wings of fork head*. *Mechanisms of development*, 1996. **57**(1): p. 3-20.
55. Furuyama, T., et al., *Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues*. *Biochemical Journal*, 2000. **349**(Pt 2): p. 629.
56. Vogt, P.K., H. Jiang, and M. Aoki, *Review Triple Layer Control*. *Cell Cycle*, 2005. **4**(7): p. 908-913.
57. Paradis, S. and G. Ruvkun, *Caenorhabditis elegans Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor*. *Genes & development*, 1998. **12**(16): p. 2488-2498.
58. Guo, S., et al., *Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(24): p. 17184.
59. Jackson, J.G., et al., *Phosphorylation and nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FKHR after epidermal growth factor treatment in human breast cancer cells*. *Oncogene*, 2000. **19**(40): p. 4574.
60. Biggs, W.H., et al., *Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(13): p. 7421.
61. Brunet, A., et al., *14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport*. *The Journal of cell biology*, 2002. **156**(5): p. 817-828.
62. van der Heide, L.P., et al., *FoxO6 transcriptional activity is regulated by Thr26 and Ser184, independent of nucleo-cytoplasmic shuttling*. *Biochemical Journal*, 2005. **391**(Pt 3): p. 623.
63. Hu, M., et al., *IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a*. *Cell*, 2004. **117**(2): p. 225-37.
64. Rinner, O., et al., *An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks*. *Nature biotechnology*, 2007. **25**(3): p. 345-352.
65. Brunet, A., et al., *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. *Science's STKE*, 2004. **303**(5666): p. 2011.
66. Lehtinen, M.K., et al., *A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span*. *Cell*, 2006. **125**(5): p. 987-1001.

67. Sunayama, J., et al., *JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3*. The Journal of cell biology, 2005. **170**(2): p. 295-304.
68. Chiacchiera, F. and C. Simone, *The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment*. Cell Cycle, 2010. **9**(6): p. 1091-6.
69. Matsuzaki, H., et al., *Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(20): p. 11285.
70. Plas, D.R. and C.B. Thompson, *Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(14): p. 12361.
71. Huang, H., et al., *Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(5): p. 1649.
72. Hu, M.C.T., et al., *I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a*. Cell, 2004. **117**(2): p. 225-237.
73. Zhang, X., et al., *Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(47): p. 45276-45284.
74. Greer, E.L., et al., *The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(41): p. 30107.
75. Nasrin, N., et al., *DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(19): p. 10412.
76. Kraft, C., M. Peter, and K. Hofmann, *Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond*. Nature cell biology, 2010. **12**(9): p. 836-841.
77. Levine, B. and D.J. Klionsky, *Development by Self-Digestion:: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy*. Developmental cell, 2004. **6**(4): p. 463-477.
78. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. Cell, 2008. **132**(1): p. 27-42.
79. Bjørkøy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. The Journal of cell biology, 2005. **171**(4): p. 603-614.
80. Kuusisto, E., A. Salminen, and I. Alafuzoff, *Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation*. Neuropathology and applied neurobiology, 2002. **28**(3): p. 228-237.
81. Nagaoka, U., et al., *Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions*. Journal of neurochemistry, 2004. **91**(1): p. 57-68.
82. Mathew, R., et al., *Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1062-1075.
83. Johansen, T. and T. Lamark, *Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins*. Autophagy, 2011. **7**(3): p. 279.
84. Levine, B., *Cell biology: autophagy and cancer*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 745-747.
85. Meijer, A.J. and P. Codogno, *Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease*. Molecular aspects of medicine, 2006. **27**(5-6): p. 411-425.
86. Zhao, J., et al., *FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells*. Cell metabolism, 2007. **6**(6): p. 472-483.
87. Calnan, D. and A. Brunet, *The foxo code*. Oncogene, 2008. **27**(16): p. 2276-2288.
88. Sengupta, A., J.D. Molkentin, and K.E. Yutzey, *FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(41): p. 28319-28331.

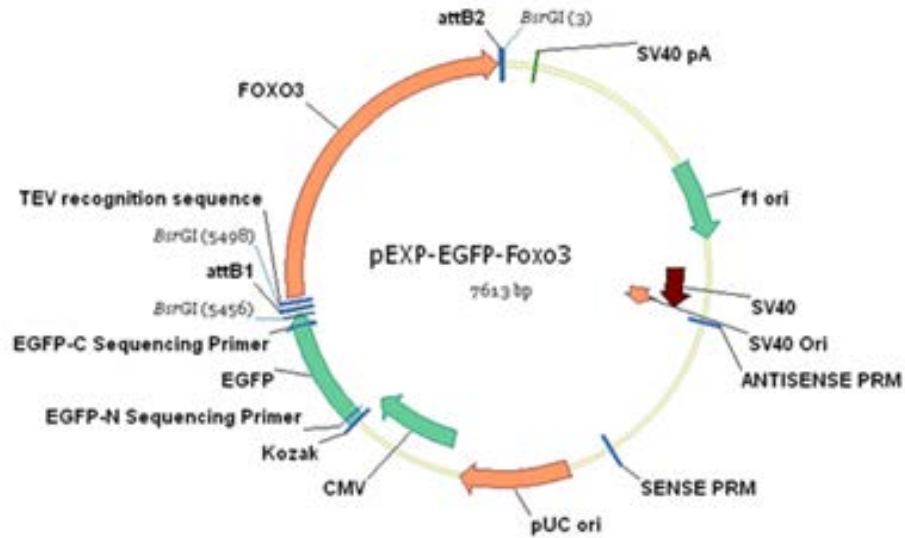
89. Eskelinen, E.L. and P. Saftig, *Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2009. **1793**(4): p. 664-673.
90. Komatsu, M., et al., *Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 880-884.
91. Hara, T., et al., *Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 885-889.
92. Komatsu, M., et al., *Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1149-1163.
93. Pankiv, S., et al., *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(33): p. 24131-24145.
94. Nezis, I.P. and H. Stenmark, *p62 at the interface of autophagy, oxidative stress signaling and cancer*. Antioxidants & redox signaling, 2011(ja).
95. Laurin, N., et al., *Recurrent Mutation of the Gene Encoding sequestosome 1 (< i> SQSTM1/p62</i>) in Paget Disease of Bone*. The American Journal of Human Genetics, 2002. **70**(6): p. 1582-1588.
96. Duran, A., et al., *The signaling adaptor p62 is an important NF-κB mediator in tumorigenesis*. Cancer cell, 2008. **13**(4): p. 343-354.
97. Seibenhener, M.L., et al., *Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(18): p. 8055-8068.
98. Salminen, A., et al., *Emerging role of p62/sequestosome-1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Progress in Neurobiology, 2011.
99. Fu, Z. and D. Tindall, *FOXOs, cancer and regulation of apoptosis*. Oncogene, 2008. **27**(16): p. 2312-2319.
100. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.
101. Vaux, D., *Apoptosis timeline*. Cell death and differentiation, 2002. **9**(4): p. 349-354.
102. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-1308.
103. Ausubel, F.M. *Current protocols in molecular biology*. 2012 02.09; Available from: <http://cda.currentprotocols.com/WileyCDA/CPTitle/isbn-047150338X.html>.
104. Jacobs, F.M.J., et al., *FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(38): p. 35959.
105. *Invitrogen™*. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lr_clonaseii_man.pdf (09.12.11).
106. *Qiagen Handbooks & Protocols*. <http://www.qiagen.com/literature/default.aspx?Term=midi&Language=EN&LiteratureType=1+2+3+4+53&ProductCategory=235> (09.12.11).
107. *Qiagen Handbook & Protocols*. <http://www.qiagen.com/literature/default.aspx?Term=QIAprep+Spin+Miniprep+Kit&Language=EN&LiteratureType=1+2+3+4+53&ProductCategory=0> (09.12.11).
108. *ATCC-LGC-standards*. <http://www.lgcstandards-atcc.org/> (08.12.2011).
109. *Invitrogen™*. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine_LTX_and_PLUS_man.pdf (08.12.11).
110. Pirkmajer, S. and A.V. Chibalin, *Serum starvation: caveat emptor*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2011. **301**(2): p. C272-C279.
111. Goodman, L.S., et al., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* 2008, New York: McGraw-Hill. XXIII, 2021 s.

112. Martin, C.S., et al., *Dual luminescence-based reporter gene assay for luciferase and β -galactosidase*. *BioTechniques*, 1996. **21**(3): p. 520-524.
113. Naylor, L.H., *Reporter gene technology: the future looks bright*. *Biochemical pharmacology*, 1999. **58**(5): p. 749-757.
114. *Dual-light(R) System. Chemiluminescent Reporter Gene Assay System for the Combined Detection of Firefly Luciferase and B-galactosidase*. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_058949.pdf. 2008.
115. Shaner, N.C., P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien, *A guide to choosing fluorescent proteins*. *Nature Methods*, 2005. **2**(12): p. 905-909.
116. Blackmore, M.G., et al., *Krüppel-like Factor 7 engineered for transcriptional activation promotes axon regeneration in the adult corticospinal tract*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(19): p. 7517-7522.
117. Einhauer, A. and A. Jungbauer, *The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins*. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 2001. **49**(1): p. 455-465.
118. Kroemer, G., G. Mariño, and B. Levine, *Autophagy and the integrated stress response*. *Molecular Cell*, 2010. **40**(2): p. 280-293.
119. Van Der Heide, L.P., M.F.M. Hoekman, and M.P. Smidt, *The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation*. *Biochemical Journal*, 2004. **380**(Pt 2): p. 297.
120. Brent, M.M., R. Anand, and R. Marmorstein, *Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification*. *Structure*, 2008. **16**(9): p. 1407-1416.

VEDLEGG

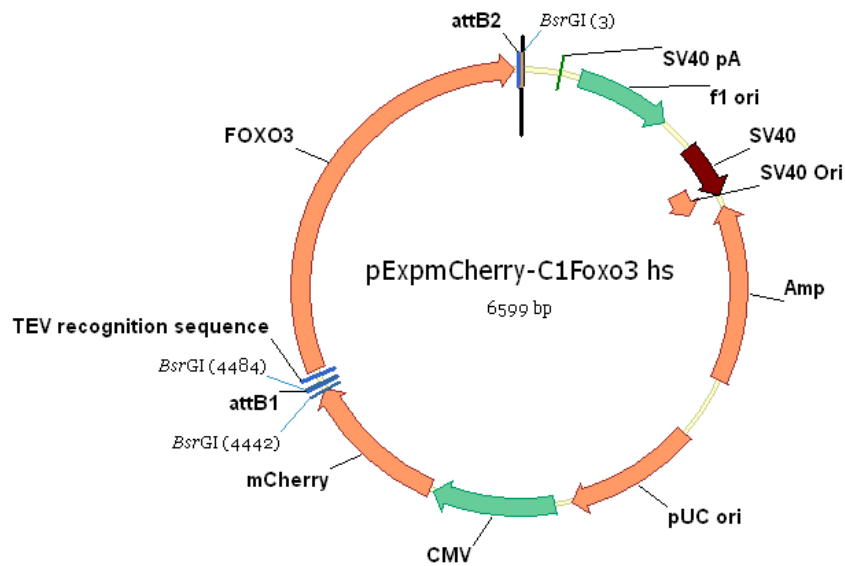
Vedlegg 1: Rekombinasjon av pEXP-EGFP-FoxO3a:

7613 basepar langt sirkulært plasmid. Laget vha. Vector NTI (Universitetet i Tromsø).
Kutting med BsrGI.



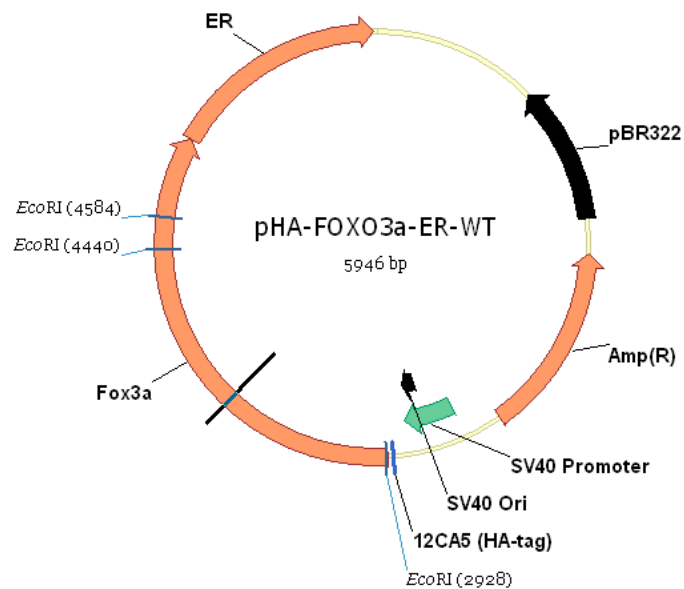
Vedlegg 2: Rekombinasjon av pEXP-mCherry-FoxO3a:

6599 basepar langt sirkulært plasmid. Laget vha. Vector NTI (Universitetet i Tromsø).
Kutting med BsrGI



Vedlegg 3: pHA-FoxO3a-WT-ER:

5946 basepar langt sirkulært plasmid. Data hentet fra Vector NTI (Universitetet i Tromsø).
Kutting med EcoRI.



Vedlegg 4: Telling i 10 synsfelt under vanlig mikroskop viste dominant kjernelokalisering av FoxO3a når proteinet var kotransfektet med villtype- eller konstitutiv aktivt mutant MK5 (L337G).

	mCherry-FoxO3a EGFP		mCherry-FoxO3a EGFP-MK5-WT	
Cytoplasma og kjernen	Antall	Prosent (%)	Antall	Prosent (%)
Parallell 1	100	27,8551532	34	7,87037037
Parallell 2	98	27,29805014	25	5,787037037
Parallell 3	93	25,90529248	35	8,101851852
Totalt i cytoplasma og kjernen	291	81,05849582	94	21,75925926
Standardavvik		0,820033507		1,040951972
SEM		0,473446566		0,600993902
Kjernen	Antall	Prosent (%)	Antall	Prosent (%)
Parallell 1	22	6,128133705	107	24,76851852
Parallell 2	21	5,849582173	117	27,08333333
Parallell 3	25	6,963788301	114	26,38888889
Totalt i kjernen	68	18,94150418	338	78,24074074
Standardavvik		0,473446566		0,969892368
SEM		0,273344502		0,55996762
Totalt	359		432	

	mCherry-FoxO3a EGFP-MK5-L337G		mCherry-FoxO3a EGFP-MK5-D148A	
Cytoplasma og kjernen	Antall	Prosent (%)	Antall	Prosent (%)
Parallell 1	35	10,32448378	124	33,06666667
Parallell 2	31	9,144542773	68	18,13333333
Parallell 3	21	6,194690265	122	32,53333333
Totalt i cytoplasma og kjernen	87	25,66371681	314	83,73333333
Standardavvik		1,736826129		6,917360519
SEM		1,002757033		3,993739957
Kjernen	Antall	Prosent (%)	Antall	Prosent (%)
Parallell 1	76	22,41887906	13	3,466666667
Parallell 2	71	20,9439528	25	6,666666667
Parallell 3	105	30,97345133	23	6,133333333
Totalt i kjernen	252	74,33628319	61	16,26666667
Standardavvik		4,421499932		1,399823622
SEM		2,552754176		0,808188545
Totalt	339		375	

Vedlegg 5: Villtype MK5 induerte en moderat økning i FoxO3a-mediert transkripsjonsaktivitet.

	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-D148A	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-WT	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-L337G	FoxO3a-FLAG EGFP
Luc. aktivitet	21,08	5,467	4,254	3,789
	62,52	4,776	3,634	6,456
	61,48	6,309	5,322	6,666
	35,8	8,035	5,541	5,146
	39,9	7,465	3,573	4,443
β-gal. aktivitet	7,747	1,42	1,733	1,408
	25,86	1,574	1,323	2,225
	21,13	2,594	1,508	2,063
	11,56	2,216	1,866	2,116
	14,77	1,782	1,747	1,855
Relativ luc. aktivitet	2,721053311	3,85	2,454702827	2,691051136
	2,417633411	3,034307497	2,746787604	2,901573034
	2,909607194	2,432151118	3,529177719	3,231216675
	3,096885813	3,625902527	2,969453376	2,43194707
	2,701421801	4,189113356	2,045220378	2,39514825
Gjennomsnitt	2,769320306	3,4262949	2,749068381	2,73018723
Standard avvik	0,226981565	0,623415944	0,497834996	0,473746714
SEM	0,101509242	0,278800086	0,222638579	0,211865972

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 6: Celler som ble kotransfektet med aktiv mutant MK5 (L337G) og FoxO3a induerte en dobbelt så høy transkripsjonsaktivitet.

	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-D148A	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-WT	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-L337G	FoxO3a-FLAG EGFP
Luc. aktivitet	0,891	80,41	3,228	6,521
	4,005	47,25	9,952	7,893
	7,462	55,7	7,59	7,158
	15,74	59,73	6,774	0
β-gal. aktivitet	5,712	139,1	8,79	8,468
	9,215	92,51	5,384	11,58
	15,89	133,6	8,228	13,53
	18,53	152,9	7,046	11,22
Relativ luc. aktivitet	0,155987395	0,578073329	0,367235495	0,770075579
	0,434617472	0,510755594	1,848439822	0,681606218
	0,469603524	0,416916168	0,922459893	0,529046563
	0,849433351	0,390647482	0,961396537	0
Gjennomsnitt	0,477410436	0,474098143	1,024882937	0,49518209
Standardavvik	0,246782296	0,074813767	0,530393039	0,298610319
SEM	0,123391148	0,037406884	0,26519652	0,149305159

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 7: ERK3induesrte økt FoxO3a transkripsjonsaktivitet via aktivering av endogen MK5.

	FoxO3a-FLAG	FoxO3a-FLAG	FoxO3a-FLAG
	Vektor til ERK	ERK3 kinasedød	ERK3-myc
Luc. aktivitet	0,185	0,49	0,791
	0,384	0,311	0,882
	0,58	0,482	1,328
β-gal. aktivitet	7,993	12,37	17,08
	14,6	9,021	17,43
	21,76	22,32	34,34
Relativ luc. aktivitet	0,023145252	0,039611964	0,046311475
	0,02630137	0,034475114	0,05060241
	0,026654412	0,021594982	0,038672103
Gjennomsnitt	0,025367011	0,03189402	0,045195329
Standard avvik	0,001577618	0,007578454	0,004934058
SEM	0,000910838	0,004375422	0,00284868

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 8: p62

Foxo bindingssetet er i sekvensen CCTTGTTTACCCTCC som er mutert i basene (uthevd) i primer: GGGTTCCCGCCGCGCCTTGTATGCCCTCCGGGAGGCCTCGG.

Primere som var benyttet for å mutere FOXO setet i p62 promoteren:

1. Forward 5'-GGGTTCCCGCCGCGCCTTGTATGCCCTCCGGGAGGCCTCGG-3'
2. Revers 5'-CCGAGGCCTCCCGGAGGGCATAACAAGGCGCGGCGGGAACCC-3'.

Vedlegg 9: Trippel mutant FoxO3a gav signifikant økt FoxO3a transkripsjonsaktivitet

	Vektor FLAG	FoxO3a-FLAG-TM
Luc. aktivitet	12,13	168,5
	9,916	192,6
	23,04	581,8
	20,6	487
	18,64	414,8
β-gal. aktivitet	91,6	18,91
	87,56	19,32
	189,6	55,53
	175,8	58,51
	127,8	46,67
Relativ luc. aktivitet	0,132423581	8,910629297
	0,113248058	9,968944099
	0,121518987	10,47721952
	0,117178612	8,323363528
	0,145852895	8,887936576
Gjennomsnitt	0,126044427	9,313618604
Standard avvik	0,011797443	0,788369112
SEM	0,005275977	0,352569385

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 10: Stimulering med hormonet 4-hydroksytamoksifen (4-OHT) induerte høyest luciferaseaktivitet ved konsentrasjonen 1 μ M 4-OHT.

	HA-FoxO3a-TM-ER	HA-FoxO3a-TM-ER	HA-FoxO3a-TM-ER
	Metanol	4-OHT (400 nM)	4-OHT (1 μ M)
Luc. aktivitet	177,9	79,19	42,93
	140,6	36,82	124,6
	124,7	61,09	126,8
	160,3	52,24	93,91
β-gal.	68,56	17,08	10,49
	56,55	10,79	25,85
	52,15	12,18	23,4
	57,83	11,61	16,9
Relativ luc. aktivitet	2,594807468	4,636416862	4,092469018
	2,486295314	3,412418906	4,820116054
	2,391179291	5,015599343	5,418803419
	2,77191769	4,499569337	5,556804734
Gjennomsnitt	2,561049941	4,391001112	4,972048306
Standardavvik	0,141464722	0,595768838	0,578418824
SEM	0,070732361	0,297884419	0,289209412

* Luc = luciferase, β -gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 11: Serumsult alene eller kombinert med wortmannin induserte økt luciferaseaktivitet hos celler som var overuttrykket med FoxO3a

	FoxO3a-EGFP Medium	FoxO3a-EGFP Serumsult	FoxO3a-EGFP Wortmannin og serumsult
Luc. aktivitet	103	106,6	44,12
	152,9	20,6	37,12
	162,1	35,24	32,84
	139,3	49,87	35,67
β-gal. aktivitet	7,047	4,654	1,929
	10,24	1,309	1,761
	12,73	1,43	1,146
	13,03	2,408	1,535
Relativ luc. aktivitet	14,61614872	22,90502793	22,87195438
	14,93164063	15,73720397	21,07893242
	12,73369992	24,64335664	28,65619546
	10,69071374	20,71013289	23,23778502
Gjennomsnitt	13,24305075	20,99893036	23,96121682
Standard avvik	1,696363484	3,342312801	2,831087866
SEM	0,848181742	1,671156401	1,415543933

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

	FoxO3a-FLAG Medium	FoxO3a-FLAG Serumsult	FoxO3a-FLAG Wortmannin og serumsult
Luc. aktivitet	41,97	49,31	46,78
	45,58	40,01	47,09
	36,62	41,02	43,35
β-gal. aktivitet	629,3	506,3	404,7
	670,5	405,2	458
	556,5	332,5	396,4
Relativ luc. aktivitet	0,066693151	0,09739285	0,115591796
	0,06797912	0,098741362	0,102816594
	0,065804133	0,123368421	0,109359233
Gjennomsnitt	0,066825468	0,106500878	0,109255874
Standard avvik	0,000892851	0,011939853	0,005215967
SEM	0,000515487	0,006893477	0,00301144

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 12: Trippel mutant FoxO3a induerte økt FoxO3a-mediert aktivitet av p62 promoteren.

	Vektor-FLAG p62-WT-luc	Vektor-FLAG p62-mut-luc	FoxO3a-FLAG-TM p62-WT-luc	FoxO3a-FLAG-TM p62-mut-luc
Luc. aktivitet	67,19	65,29	26,37	7,596
	56,87	68,39	116,3	7,19
	77,47	68,03	194,3	10,9
	54,58	62,64	180,4	8,154
	73,27	58,68	102,33	9,818
β-gal. aktivitet	91,65	90,73	11,33	8,733
	91,26	100,6	57,73	10,7
	98,02	97,29	85,93	11,78
	77,59	87,56	83,43	11,02
	104,1	93,7	49,99	11,95
Relativ luc. aktivitet	0,733115112	0,719607627	2,32744925	0,869804191
	0,623164585	0,679821074	2,014550494	0,671962617
	0,790348908	0,699249666	2,261142791	0,925297114
	0,703441165	0,715395158	2,162291742	0,739927405
	0,703842459	0,626254002	2,047009402	0,821589958
Gjennomsnitt	0,710782446	0,688065505	2,162488736	0,805716257
Standard avvik	0,054052784	0,033927963	0,120138114	0,09041795
SEM	0,02417314	0,015173046	0,053727398	0,040436136

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 13: FoxO3a-ER-TM gav tydelig økt FoxO3a-mediert transkripsjon når cellene ble behandlet med 4-OHT.

	FoxO3a-ER-TM p62-WT-luc (metanol)	FoxO3a-ER-TM- dDB p62-mut-luc (1µM 4-OHT)	FoxO3a-ER-TM- dDB p62-WT-luc (1µM 4-OHT)	FoxO3a-ER- TM p62-mut-luc (1µM 4-OHT)	FoxO3a-ER- TM p62-WT-luc (1µM 4-OHT)
Luc. aktivitet	24,15	42,11	21,13	31,83	65,22
	20,33	23,5	30,07	27,99	227,1
	28,94	33,2	26,2	25,76	338,3
	20,33	36	32,27	27,33	153,5
β-gal. aktivitet	51,35	67,1	37,9	63,31	62,38
	42,33	37,92	53,92	43,78	193,5
	61,71	46,98	42,28	35,03	237,3
	47,07	52,96	63,22	45,92	114,4
Relativ luc. aktivitet	0,47030185	0,62757079	0,557519789	0,502764176	1,045527413
	0,480274037	0,619725738	0,557678042	0,639333029	1,173643411
	0,468967752	0,706683695	0,619678335	0,735369683	1,425621576
	0,431909921	0,679758308	0,510439734	0,595165505	1,341783217
Gjennomsnitt	0,46286339	0,658434633	0,561328975	0,618158098	1,246643904
Standard avvik	0,018397295	0,036171904	0,038801423	0,083712827	0,1473613
SEM	0,009198647	0,018085952	0,019400712	0,041856414	0,07368065

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 14: Endogen aktivering av FHRE-luc og promoteren villtype p62

	p62-WT-luc Medium	p62-mut-luc Medium	p62-WT-luc Wortmannin Serumsult	p62-mut-luc Wortmannin Serumsult
Luc. aktivitet	14,53	10,76	28,62	19,96
	10,65	7,698	20,47	9,336
	13,89	13,97	35,82	13,12
β-gal. aktivitet	165,4	139,7	108,3	137
	146,1	147,4	92,5	102,1
	169,8	155,1	112,8	122,7
Relativ luc. aktivitet	0,087847642	0,07702219	0,264265928	0,145693431
	0,072895277	0,052225237	0,221297297	0,091439765
	0,08180212	0,090070922	0,317553191	0,106927465
Gjennomsnitt	0,080848346	0,073106117	0,267705472	0,114686887
Standard avvik	0,00614142	0,015696617	0,039371497	0,022818436
SEM	0,003545751	0,009062446	0,022731144	0,01317423

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

	FHRE-luc Medium	FHRE-luc Serumsult	FHRE-luc Wortmannin Serumsult	FHRE-luc Etoposid
Luc. aktivitet	10,71	43,73	35,62	23,34
	140,4	22,31	22,56	34,33
	156,9	21,18	26,34	30,62
	101,4	49,18	25,43	31,67
β-gal. aktivitet	49,86	102,6	73,83	49,5
	473,1	47,83	50,12	81,18
	442,6	36,44	53,16	62,42
	349,7	123,6	45,23	73,79
Relativ luc.aktivitet	0,21480144	0,42621832	0,482459705	0,471515152
	0,29676601	0,46644365	0,450119713	0,422887411
	0,35449616	0,58122942	0,495485327	0,490547901
	0,28996283	0,39789644	0,562237453	0,429190947
Gjennomsnitt	0,28900661	0,46794696	0,497575549	0,453535353
Standard avvik	0,04963973	0,06979171	0,04082302	0,028395195
SEM	0,02481986	0,03489585	0,02041151	0,014197597

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

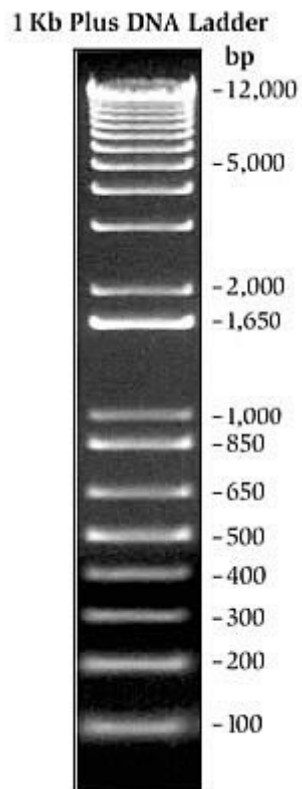
Vedlegg 15: MK5 induisert transkripsjonsaktivitet via p62 promoteren er uavhengig av FoxO3a bindingssete.

	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-D148A p62-WT-luc	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-WT p62-WT-luc	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-L337G p62-WT-luc	FoxO3a-FLAG EGFP p62-WT-luc
Luc aktivitet	217,7	64,28	14,38	7,979
	181,7	37,87	31,61	20,9
	120,7	65,38	24,29	19,9
β-gal. aktivitet	159,9	30,15	17,15	11,99
	176,3	21,47	22,03	26,7
	164	30,67	12,17	17,94
Relativ luc. aktivitet	1,361475922	2,132006633	0,838483965	0,665471226
	1,030629609	1,763856544	1,434861552	0,782771536
	0,73597561	2,131724813	1,995891537	1,109253066
Gjennomsnitt	1,042693714	2,009195997	1,423079018	0,852498609
Standardavvik	0,255501882	0,173481229	0,472583109	0,187762224
SEM	0,14751408	0,100159434	0,272845985	0,10840457

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-D148A p62-mut-luc	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-WT p62-mut-luc	FoxO3a-FLAG EGFP-MK5-L337G p62-mut-luc
Luc. aktivitet	24,95	169,4	13,04
	21,24	199	12,08
	58,02	141,9	12,23
β-gal. aktivitet	56,65	262,9	22,32
	46,97	222,1	22,66
	65,58	67,91	16,68
Relativ luc. aktivitet	0,440423654	0,644351464	0,584229391
	0,452203534	0,895992796	0,53309797
	0,884720952	2,089530261	0,733213429
Gjennomsnitt	0,59244938	1,209958174	0,61684693
Standardavvik	0,206723156	0,630378792	0,084890035
SEM	0,11935167	0,363949365	0,049011285

* Luc = luciferase, β-gal = beta-galactosidase, SEM = standard error of the mean.

Vedlegg 16: 1 kb plus DNA ladder (hentet fra invitrogen)**Vedlegg 17: Magic Marker™ XP Western Protein standard** (hentet fra invitrogen)