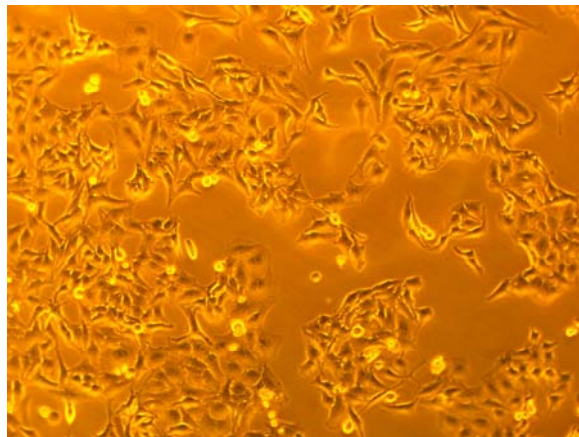


En rolle for MK5 i cellesyklus-progresjon?



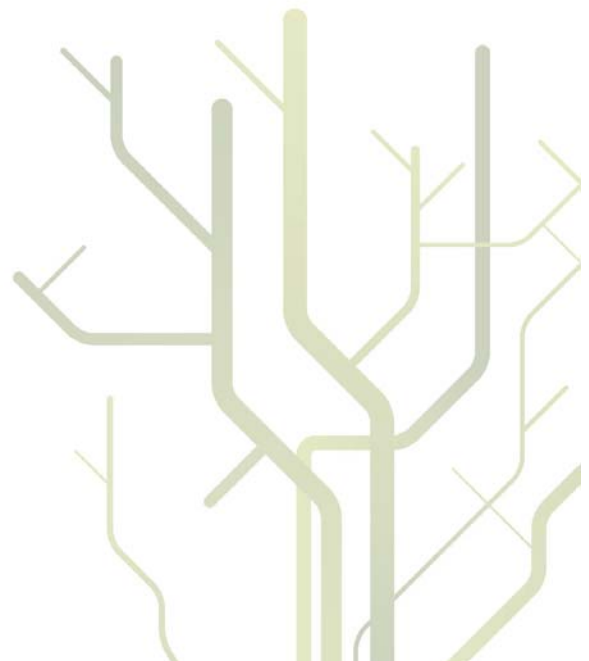
Mohammad Reza F. Aghdam

FAR-3901

Masteroppgave i Farmasi

Master's Thesis in Pharmacy

2011



FORORD

Masteroppgaven som her presenteres, ble utført ved avdeling for farmakologi, institutt for farmasi ved universitetet i Tromsø, høsten-2010 og våren-2011. Prosjektet ble veiledet av Professor Ole Morten Seternes.

Formålet med denne oppgaven var å finne en viktig rolle for MK5 i cellesyklus progresjon. Arbeidet med denne oppgaven har vært spennende og lærerikt samtidig litt stressende til tider. Jeg har alltid hatt stor glede av å jobbe i feltet farmakologi, noe som fikk meg til å velge denne masteroppgaven. Det har gitt meg mulighet til å lære enda mer og fordype meg i dette fagfeltet.

Jeg vil benytte anledningen til å takke min veileder Professor Ole Morten Seternes for god opplæring og veiledning gjennom hele oppgaven. Jeg vil også takke ingeniørene Bjarne Johansen og Hanne Kildalsen for all hjelp på labben.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke min familie på Gjøvik, særlig min mor for all hjelp, støtte, oppmuntring gjennom hele masterprosjektet.

Mohammad Reza F. Aghdam

Tromsø, mai 2011

FORKORTELSER

BM	Basal membran
dH2O	Destillert/deionisert vann (milliQ vann)
DNA	Deoksyribonukleinsyre
Dox	Doxycycline
ECM	Ekstracellulær matrix
ERK3	Extracellular signal-regulated kinase 3
FBS	Fetal bovine serum (kalveserum)
KDa	Kilodalton
LAF	Laminær luftstrøm
MAPK	Mitogen aktivert protein kinase
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPKK kinase
MAPKAPK	MAPK aktivert protein kinase
MK5	MAPK aktivert protein kinase 5
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline 0,1 % tween 20
RNA	Ribonukleinsyre
rpm	Rounds per minute (runder per minutt)
Scr	Scrambled
shRNA	Small hairpin RNA or short hairpin RNA
TBS-T	Trisbufret saltløsning med Tween
Tris	Tris(hydroksymetyl)-aminometan

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	3
FORKORTELSER	4
INNHALDSFORTEGNELSE	5
TABELL LISTE	8
FIGURLISTE	8
SUMMARY	10
SAMMENDRAG	11
1 INNLEDNING	12
1.1 Kreft.....	12
1.2 Invasjon og metastasering.....	14
1.3 Cellesyklus.....	15
1.4 Mitogen aktivert protein Kinase (MAPK).....	17
1.5 Formål.....	21
2 MATERIALER	23
2.1 Biologisk materialer.....	23
2.2 Antistoffer brukt i westernblott forsøk.....	23
2.3 Kjemikalier og reagenser.....	23
2.4 Løsninger brukt i celledyrkning.....	25
2.5 Løsninger brukt i synkronisering av Hela celler.....	26
2.6 Løsninger brukt i western blotting.....	26
3 METODER	27
3.1 Celledyrking.....	27
3.1.1 Tining og dyrking.....	28

3.1.2 Splitting.....	28
3.2 Celleforsøk.....	29
3.2.1 Utsåing.....	29
3.2.2 Høsting.....	29
3.3 Western blotting.....	30
3.4 Måling av totalprotein.....	33
3.5 Kryssbinding og immunopresipitering.....	33
3.6 Dobbelt thymidin.....	35
3.7 Transfeksjon med plasmid (Lipofectamin 2000).....	35
3.8 MTS for måling av celleviabilitet.....	37
3.9 Flow cytometry (FCM).....	37
4 RESULTATER.....	38
4.1 Nedregulere endogent uttrykket av MK5 med shRNA.....	38
4.2 Effekt på celleproliferasjon med og uten MK5.....	40
4.3 IP / kryssbinding med MK5.....	43
4.4 Synkronisering av Hela celler (S3).....	46
4.4.1 Direkte western av MK5 nivå gjennom cellyklus progresjon.....	46
4.4.2 Direkte western av ERK3 nivå gjennom cellyklus progresjon.....	47
4.4.3 MK5 og fosforylert MK5 nivå gjennom cellyklus progresjon.....	48
4.5 MYC gen ekspresjon i nedregulerte MK5 celler.....	48
5 DISKUSJON.....	52
6 FREMTIDSPERSPEKTIV.....	56
7 KONKLUSJON.....	57
8 REFERANSER.....	59

9 APPENDIKS.....	63
9.1 Cellesortering i flow cytometry (FCM) maskinen.....	63
9.2 Absorbans og SD for vekstkurven i figur 4.4.....	65
9.3 Absorbans og SD for vekstkurven i figur 4.7.....	66

TABELL LISTE

Tabell 2.1 Biologiske materialer

Tabell 2.2 Antistoffer brukt i westernblott forsøk

Tabell 2.3 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2.4 Løsninger brukt i celledyrking

Tabell 2.5 Løsninger brukt i synkronisering av Hela celler

Tabell 2.6 Løsninger brukt i Western blotting

Tabell 3.1 Antistoff brukt i Westernforsøk med respektive fortyninger

FIGURLISTE

Figur 1.1 Invasjon og metastasering

Figur 1.2 Cellesyklus

Figur 1.3 MAP Kinase signalveier fører til aktivering av MAPKAPK

Figur 1.4 MK5 aktivering via ERK3

Figur 1.5 miRNA og shRNA signalvei

Figur 3.1 Tetracyclin industert promotor som uttrykker for shRNA rettet mot MK5

Figur 3.2 Protein markør til western blott

Figur 4.1 Western blott analyse av endogent utrykk av MK5 og MK2 i Hela celler (MK5) med og uten dox behandling

Figur 4.2 Western blott analyse av endogent utrykk av MK5 i Hela celler (Scr) med og uten dox behandling

Figur 4.3 MK5 vs. ERK3

Figur 4.4 Cellevekst med og uten MK5

Figur 4.5 Nedregulering av endogent utrykk av MK5 i Hela celler (MK5) og ikke i Hela celler (Scr) med og uten dox behandling

Figur 4.6 Western blott analyse av endogent utrykk av MK5 i transfekterte celler

Figur 4.7 Cellevekst med forskjellige plasmider transfektert i Hela celler (MK5)

Figur 4.8 Western blott analyse av immunopresipitering med A7 og H-180 med og uten dox behandling

Figur 4.9 Western blott analyse av immunopresipitering med A7 og His PRAK med og uten dox behandling

Figur 4.10 Western blott analyse av immunopresipitering med H-180 og His PRAK med og uten dox behandling

Figur 4.11 Western blott analyse av kryssbinding med A7 med og uten dox behandling

Figur 4.12 Direkte western blot analyse av endogent utrykk av MK5 i synkroniserte Hela celler (S3)

Figur 4.13 Direkte western blot analyse av endogent utrykk av ERK3 i synkroniserte Hela celler (S3)

Figur 4.14 Western blot analyse av endogent utrykk av MK5 og fosforylert MK5 i synkroniserte Hela celler (S3)

Figur 4.15 MK5 er viktig for MYC protein nivå etter 4 dager med dox

Figur 4.16 Western blott av endogent utrykk av MYC i transfekterte Hela celler (MK5)

Figur 4.17 Nedregulering av endogent utrykk av MYC i utransfektete og transfektete Hela celler (MK5) med og uten dox behandling

Figur 4.18 Nedregulering av endogent utrykk av MK5 i utransfektete og transfektete Hela celler (MK5) med og uten dox behandling

SUMMARY

Cell Cycle is the sequence of events that produces two daughter cells from a cell. Cell cycle regulation is a process that is carefully controlled and regulated by the so-called cyclin-dependent kinase (CDK). Protein phosphorylation is a control mechanism that regulates most aspects of cellular life such as signal transmission, metabolism and cell cycle progression. The enzymes that catalyze the phosphorylation called protein kinase. Extracellular signal regulated kinase -3 (ERK3) is an atypical mitogen activated protein kinase (MAPK), which is regulated by protein stability. The function of ERK3 is not yet known, but it is shown that ERK3 is participating in a variety of biological processes including cell cycle progression and cell differentiation. MAPK activated protein kinase-5 [MAPKAPK-5 or MK-5], also known as PRAK (p38-regulated/activated kinase) is a kinase, which interact with ERK3. The physiological role for the specific interaction between ERK3 and MK5 is not yet clear. Our previous studies have shown that the MK5 is important for the regulation of ERK3 protein stability and that ERK3 can activate the MK5. In this study, we wanted to investigate whether MK5 like ERK3 has a function in cell cycle progression. In order to investigate this HeLa cell line was made that expresses a shRNA that specifically down-regulates expression of the MK5. By this way, we could investigate whether the MK5 is necessary for cell cycle progression in HeLa cells. This was attempted by analyzing proliferation and growth of HeLa cells both in presence and absence of the MK5. Induction of shRNA from a tetracycline induced promoter or transfection with plasmid vectors was performed, respectively, to turn out and reintroduce expression of MK5. Change of protein expression was examined by using Western blot. The results of this study show that down-regulation of MK5 in HeLa cells results in increased cell division. We also observed that lower regulation of MK5 can lead to an increased MYC levels in cells that in turn can explain the increased cell growth. This confirms previous findings indicating that the down-regulation of MK5 leads to increased levels of proto-oncogene MYC.

SAMMENDRAG

Cellesyklus er sekvensen av hendelser som produserer to datterceller fra en celle. Cellesyklus er en reguleringsprosess som er nøye kontrollert og regulert av såkalte cyklinavhengig kinaser (CDK). Protein fosforylering er en kontrollmekanisme som regulerer de fleste aspekter av cellulært liv som for eksempel signaloverføring, metabolisme og cellesyklus progresjon. Enzymene som katalysere fosforyleringen kalles for proteinkinaser. Ekstracellulær signalregulert kinase-3 (ERK3) er en atypisk mitogen aktivert protein kinase (MAPK) som reguleres av proteinstabilitet. Funksjonen til ERK3 er enda ikke kjent, men det er vist at ERK3 deltar i en rekke biologiske prosesser inkludert cellesyklus progresjon og celledifferensiering. MAPK aktivert protein kinase-5 [MAPKAPK-5 eller MK-5], også betegnet som PRAK (p38-regulert/aktivert kinase) er en kinase som interagerer med ERK3. De fysiologiske betydningene av den spesifikke interaksjon mellom ERK3 og MK5 er enda ikke klarlagt. Våre tidligere studier har vist at MK5 er viktig for regulering av ERK3 protein stabilitet og at ERK3 kan aktivere MK5. I denne oppgaven ønsket vi å undersøke om MK5 lik ERK3 har en funksjon i cellesyklus progresjon. Vi har lagd Hela cellelinje som uttrykker et shRNA, som spesifikt nedregulerer uttrykk av MK5. Slik kunne vi få undersøkt om MK5 er nødvendig for cellesyklus progresjon i Hela celler. Dette gjorde vi ved å analysere proliferering og vekst av Hela celler i nærvær og fravær av MK5. Induksjon av shRNA fra en tetracylin industert promoter eller transfeksjon med plasmidvektor ble utført for henholdsvis å slå ut og gjennomføre uttrykk av MK5. Forandring av proteinuttrykk ble undersøkt ved hjelp av Western blott. Resultatene i denne studien viser at nedregulering av MK5 i Hela celler fører til økt celledeling. Vi observerer også at nedreguleringen av MK5 kan føre til økt MYC nivå i celler som kan igjen forklare den økende celleveksten. Dette bekrefter tidligere funn som indikerer at nedregulering av MK5 fører til økt nivå av proto-onkogenet MYC.

1 INNLEDNING

1.1 Kreft

Kreft er fellesbetegnelsen på sykdommer som skyldes ukontrollert celledeling eller cellevekst. Kreft oppstår når cellene i varierende grad blir selvstyre (autonome) og blir resistente mot kroppens egne kontrollmekanisme [1]. I prinsippet er det to ting som fører til ukontrollert celledeling. Dels at cellene mottar ”sykt” signal om å vokse og dele seg, dels at en faktor som normalt hindrer ukontrollert celledeling, ikke virker som det skal. Disse prinsippene kan forårsakes av genetiske og eller av miljøfaktorer som for eksempel mutagener eller karsinogener [2,3].

I følge SSB har utbredelsen av Kreft i Norge (hele landet) økt siden 1991 til 2010. Kreft er nå den nest største folkesykdom etter hjertekarsykdommer både i Norge og i den vestlige delen av verden [4]. Denne økningen kan relateres til økt risiko for vanligste kreftformene, men kan også ses i sammenheng med en bedre diagnostisering og en aldrende befolkning [5].

Derfor er det mye innsats i leting etter legemidler for kreftterapi med tanke på at insidensen til kreft vil trolig fortsette å øke i årene som kommer.

Ved mutasjoner i gener som normal har sentrale reguleringsfunksjoner i cellen kan det oppstå kreftutvikling. En kreftcelle er resultat av en rekke suksessive mutasjoner. De mutasjonene som fører til kreft er ofte i proto-onkogener eller i tumor suppressor-gener [2,3]. Onkogener er betegnelsen på muterte gener som har potensialer til å forårsake kreft. De normale utgave av disse genene kalles proto-onkogener. Proto-onkogener koder for proteiner i ulike signal-systemer i cellen som regulerer cellevekst og differensiering. Disse genene stimulerer cellen til å vokse og dele seg. Disse kan sammenlignes med en bryter som i utgangpunktet er slått av, men som kan slås på av et signal. Onkogene er derimot den bryteren som står hele tiden i påstilling [2,3]. Det finnes mange forskjellige proto-onkogener. RAS, MYC og ERBB2 finner vi ved mange ulike kreftformer. Proto-onkogener aktiveres eller omdannes til onkogener via fem forskjellige mekanismer. Disse mekanismene er punktmutasjon, gen-amplifikasjon, kromosomal translokasjon, innsetting (insertional) mutagenese og lokal DNA omorganisering (rearrangements) [2,3]. Punktmutasjon kan føre til at en eller flere aminosyrer byttes ut slik at cellen uttrykker et onkoprotein med økt biologisk aktivitet. Punktmutasjon i RAS forekommer

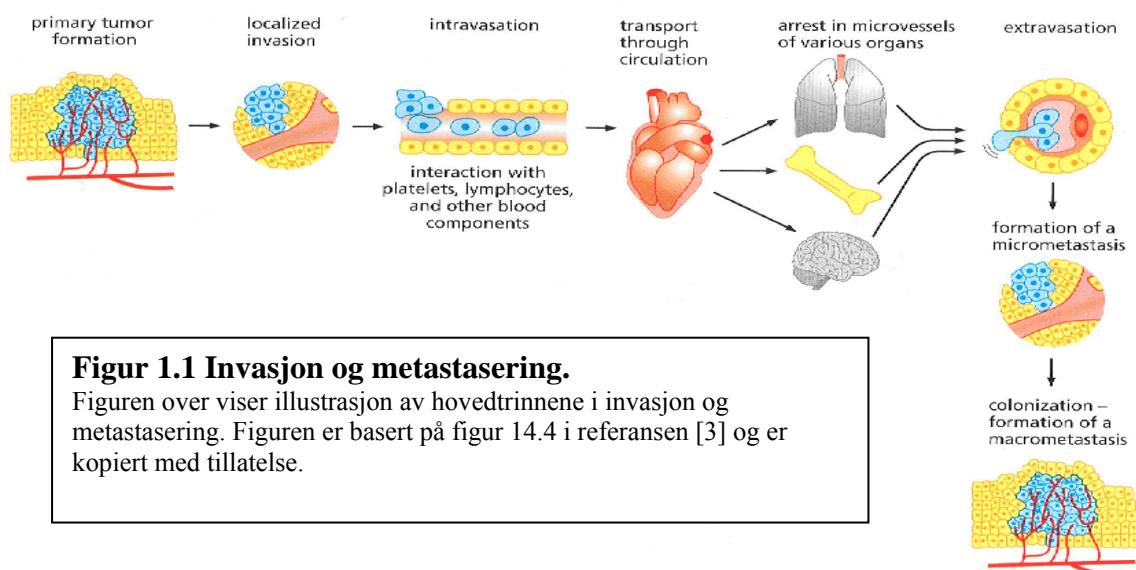
i en rekke kreftformer. Ved gen-amplifikasjon foreligger genet i flere enn de vanlige to kopier og uttrykkes derfor i økt mengde [2,3]. Proto-onkogenet ERBB2 aktiveres på denne måten i omlag 25% av brystkreftsvulster [2]. Kromosomal translokasjoner er omflytting av deler fra to ulike kromosomer. Disse omflyttingene fører til at det uttrykkes et funksjonsprodukt av to ulike gener. Disse funksjonsproduktene kan ha unormal biologisk aktivitet. En klassisk eksempel for en slik tilfelle Burkitt's lymfom, der den delen av kromosom 8 som inneholder regulerende sekvens for proto-onkogenet MYC, erstattes av deler av kromosom 14 som inneholder regulerende sekvens for høyt uttrykte immunoglobuliner [2,3]. Innsettingsmutagenese skjer ofte i virusinfiserte celler hvor virusets DNA er inkorporert i cellens DNA. Slik kan viruscellene fortsette å replikere seg. Endring av ulike gener vil ha varierende effekt på cellen. Hvis en slik mutasjon skjer i en viktig gen eller et gen som er involvert i celle-proliferasjon eller apoptose, kan det føre til svulstdannelse som igjen kan bli til en kreftsvulst [2,3]. Human papillomvirus er eksempel på en virusinfeksjon som kan føre til innsetting mutagenese i cellens DNA [3]. Lokal DNA omorganisering (rearrangements) er en annen mekanisme som kan føre til dannelsen av onkogener ved å endre basepar sammensettingen i proto-onkogener. Det kan skjes via gen-sletting, tilsetning, inversjon og transposisjon av gener fra et kromosom til annen [2,3].

Tumor suppressor-gener er gener som hindrer ukontrollert celledeling. Det finnes flere forskjellige tumor suppressor-gener. Mutasjoner i retinoblastom-genet (Rb-genet) og p53-genet finner vi ved mange ulike kreftformer, og vi kan sammenligne det med en nødbremsesvikt. Mutasjoner i tumor suppressor-gener kan føre til at denne bremsen ikke virker [2,3]. I motsetning til onkogener, må begge allelene i tumor suppressor-gener være mutert for å få full inaktivering av tumor suppressor funksjon. Dette skyldes at hvis bare ett allel er mutert, kan den andre fortsatt produsere de riktige proteinene som er nødvendig for tumor suppressor funksjon. Med andre ord, mutante tumor suppressor-gener er som regel recessive mens mutante onkogener er dominante [2,3].

For at en normal celle skal utvikle seg til en kreftcelle (full malignitet) må ofte flere karakteristiske trekk være tilstede: evnen til å proliferere uavhengig av ytre vekststimuli, unngå apoptose, manglende sensitivitet for veksthemmende faktorer, ubegrenset replikativt potensial, angiogenese, invasjon og metastasering [6], og kreftrelatert inflammasjon [7].

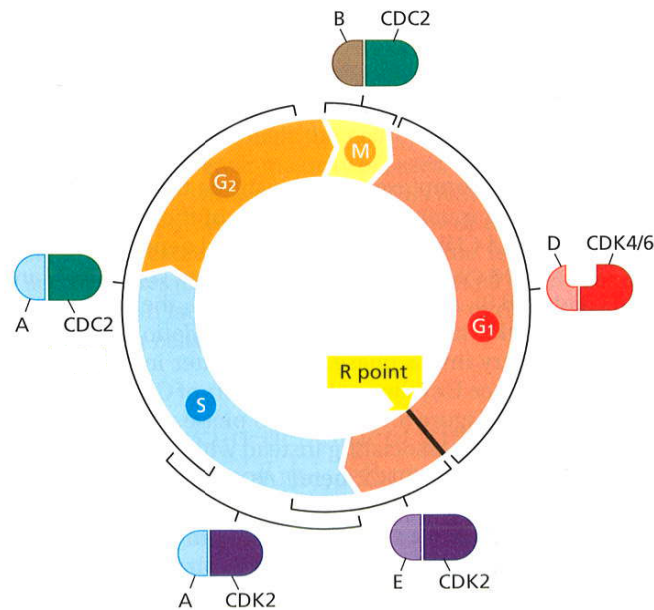
1.2 Invasjon og metastasering

Invasjon er direkte spredning av kreftceller fra primærtumor til nærliggende vev, mens metastasering er spredning av kreftceller via blod og lymfe til andre steder / organer i kroppen [2]. Metastasering er en komplisert prosess med flere trinn. Forskjellen på en ondartet tumor (malign) og en godartet tumor (benign) er at de ondartede har evnen til å metastasere og invadere nye vev i kroppen [8]. Metastasering og invasjon av kreftceller til nytt vev / andre organer er største problemet i behandling av kreft [9]. Den invasive veksten av kreftceller både til nærliggende vev og fjernliggende vev kan dels være pga mekaniske trykk som den ukontrollerte celleveksten medfører men kan skyldes også produksjon av vevsnedbrytende enzymer, også kalt proteolytiske enzymer. Maktriaks metalloproteinaser (MMP) og urokinase plasminogen er eksempler på slike enzymer. Disse enzymene bidrar til å bryte ned basalmembraner (BM) og ekstracellulær matriks (ECM), slik at tumorcellene kan løsne seg fra primærtumor og bevege seg bort fra opphavstedet [10]. Angiogenese og invasjon er på en måte forbundet prosess siden kreftcellene må ha tilgang til næring og O₂ til å vokse og kolonisere seg [8]. Angiogenesen skjer ved hjelp av et protein kalt vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF) som stimulerer endotelcellene til dannelsen av nye blodkar [11]. Dette proteinet blir laget av kreftceller og slippes ut i området rundt dem. VEGF fester seg deretter til en proteinreseptor kalt VEGF reseptor på overflaten av nærliggende endotelceller. Dette fører til at endotelcellene begynner å vokse og danne nye blodkar i kreftsvulsten [8,11]. Dermed kan behandlingen rettet mot angiogenese trolig også ha antimetastaserende og antiinvasjons effekt [12].



1.3 Cellesyklus

Cellessyklus: Cellenes delingssyklus er sekvensen av hendelser som produserer to datterceller fra en celle. Cellessyklus er en reguleringsprosess som er nøye kontrollert og som deles inn i fire trinn/faser: (G1) Gapfase-1, (S) syntesefase, (G2) Gapfase-2 og (M) mitosefase [13]. I tillegg finnes det (G0) Gapfase-0. G0 fasen er en hvilefase der cellen har forlatt syklusen, og har midlertidig sluttet å dele seg [14].



Figur 1.2 Cellesyklus. Figuren over viser cellenes fire delingsfaser: G1, S, G2, og M fase, samt deres CDK-cyclin komplekser i de ulike fasene. Figuren er basert på figur 8.19 i referansen [3] og er kopiert med tillatelse.

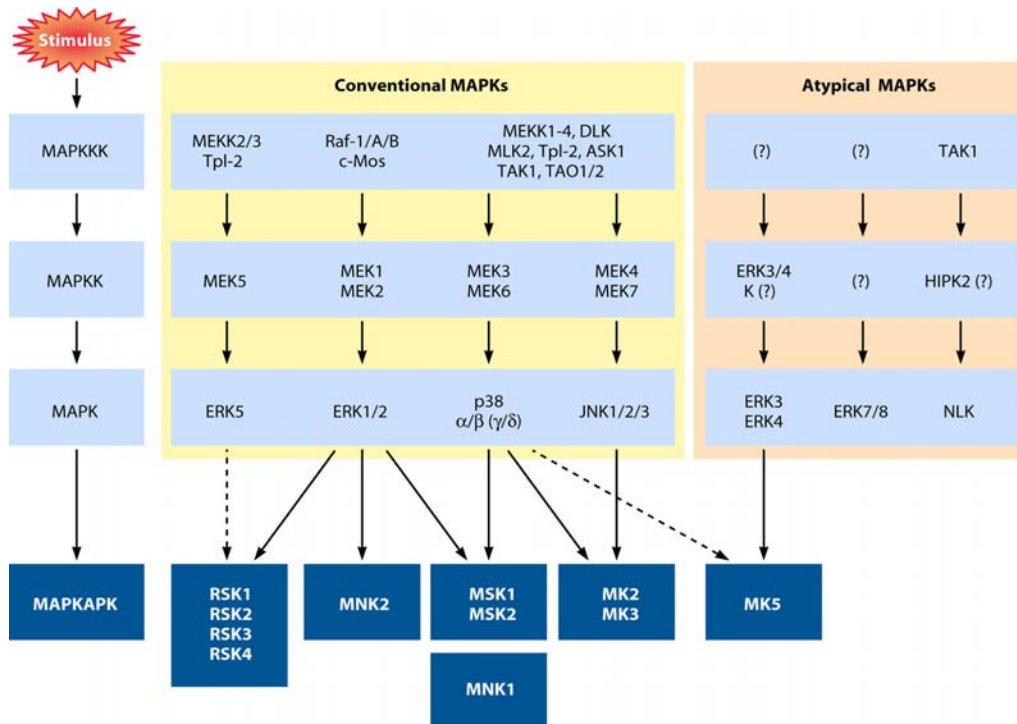
Hele syklusen er regulert av såkalte cyklinavhengig kinaser (CDK). Dette er enzymer som befinner seg i viktige kontrollpunkter i syklusen og sjekker at alt går riktig for seg. Kinase er sammensatt av en regulatorisk del kalt cyklin og en katalytisk subenhet kalt cyklinavhengig kinase (CDK), som er aktiv kun sammen med cyklin [15]. For at CDK-cyklin komplekset skal aktiveres må CDK bli først fosforylert på en serine eller threonine? og deretter defosforylert på et annen ser/thr?. Aktiviteten av CDK-cyklin komplekset reguleres via nedbryting av cyklinet som fører til inaktivering av kinasekomplekset. Denne nedbrytningen reguleres ved at en inhibitor binder seg til CDK-cyklin komplekset og nedsetter dens katalytiske aktivitet og deretter nedbrytes cyklinet [16]. Pattedyrceller har forskjellige CDK-cyklin komplekser i de ulike cellessyklus fasene slik det er vist på figur 1.2 [3]. Etter celledelingen går cellen inn i G1 fasen, som er tidsrommet fra mitosen til neste S-fase [17]. Cellene kan dessuten gå fra G1

fasen over til den såkalte G₀ fasen. I denne fasen er cellen lite metabolsk aktiv og har forlatt cellesyklusen noe som kan vare i uker eller måneder alt etter celletype [14]. I G₁ fasen øker cellens størrelse og det foregår en massiv proteinsyntese som forbereder cellen til DNA syntese som finner sted i S fasen [17]. I G₁ fasen etableres et CDK-cyklin kompleks kalt CDK4/6-cyklinD kompleks som forbereder cellen til neste fase ved å stimulere ekspresjonen av enzymer, som er nødvendig for DNA replikasjon [17]. Syntesen av cyklin-D stimuleres av vekstfaktorer som via binding til reseptorer på overflaten av cellen aktiverer intercellulære kaskader som resulterer i ekspresjon av cyklin-D [3]. Det aktive S-fase CDK-cyklin kompleks kalt CDK2-cyklinA/E kompleks fosforylerer proteiner i det såkalte pre-replikasjons komplekset og setter dermed DNA replikasjon i gang [14]. Pre-replikasjons komplekset starter med at ORC (origin recognition complex) binder seg til replikasjonsorigo. Deretter aktiveres MCM komplekset (Minichromosome maintenance proteins), som inneholder mange enzymer kalt DNA helikase som tilrettelegger for DNA replikasjon [16]. I G₂ fasen stopper celleveksten og cellulær energi blir fokusert på kromosomdeling [14]. Under G₂ fasen syntetiseres og aktiveres CDK-cyklin kompleks kalt CDK1-cyklinA kompleks som etter aktivering stimulerer kromosom-kondenseringen, nedbryting av kjernemembran, samt posisjonering av kromosomene i midtsone [14]. Det finnes flere sjekkpunkter i cellesyklus. Disse sjekkpunktene er for å kontrollere at alt går riktig for seg før cellen slippes til neste fase. To viktigste sjekkpunktene er DNA skade sjekkpunkt og mitotisk sjekkpunkt. I M fase deler kromosomene seg og cellen blir delt i to datterceller [14]. M fase eller mitose fasen er delt inn seks faser kalt, profasen, prometafasen, metafasen, anafasen, telofasen og cytokinese [16]. Den siste CDK-cyklin kompleks kalt CDK1-cyclinB er involvert i kontroll av cellesyklus i M fasen. Aktivering av CDK1-cyclinB fører til mitose og er strengt regulert [14]. I profasen danner kromosomene nøyaktige kopier av seg selv, ved at DNAet kopierer seg selv. Så lenge kromosomer henger sammen kalles de for kromatider. I tillegg vandrer centrosomene til hver sin pol i cellen. I prometafasen nedbrytes kjernemembranen og kromatidene binder seg til spindelpolene. I metafasen beveger kromatidene seg til midten av cellen. Fra hver pol dannes tynne tråd som kalles mikrotubuli og som fester seg til kromatidenes sentromeren (kinetokor). I anafasen adskilles søsterkromatidene og dermed trekkes til hver sin retning, mot hver sin pol ved hjelp av mikrotubuliene. I telofasen forsvinner mikrotubuliene og det dannes kjernemembraner i de to dattercellene, som nå har arvet hver sitt par av søsterkromatidene. Cytokinese er en prosess i den siste fasen av celledeling der cytoplasma deles og danner to datterceller [16].

1.4 Mitogen aktivert protein kinase (MAPK)

Måten cellene kommuniserer med hverandre kalles for celledesignering og er delt inn i 3 grupper: endokrin, parakrin og autokrin. 1) endokrin signalering: hvor signalmolekyler eller hormoner skilles ut av en endokrincelle og bringes til målcelle via blodbanen. Klassiske eksempler er veksthormoner. 2) parakrin signalering: hvor signalmolekylet som er skilt ut av en celle virker på nabocelle. En klassisk eksempel er sekresjon av neurotransmittere imellom nerveceller. 3) autokrin signalering: hvor cellene responderer på de signalmolekylene de selv produserer. En klassisk eksempel er T-lymfocytter som etter antigenstimulering produserer vekstfaktorer. Interacellulær kommunikasjon i cellene er viktige i omsetting av signalmolekyler til biologiske respons [18]. Protein fosforylering er en kontrollmekanisme som regulerer de fleste aspekter av cellulært liv som for eksempel signaloverføring, metabolisme og cellyklus progresjon. Enzymene som katalysere fosforyleringen kalles for protein kinaser. Proteinkinaser utgjør en av de største protein familiene i det humane genome (518 kinaser) [19].

Mitogen aktiverte protein kinaser (MAPK) er en familie av serin / treonin-spesifikke protein kinaser som aktiveres via ekstracellulære stimuli som vekstfaktorer, stress, inflammasjon og sjokk [20]. MAP kinaser finnes i alle eukaryote celler som planter, sopp og dyr. Det er blitt identifisert fjorten MAP kinase gener i det humane genom, som definerer syv distinkte MAP kinase signalveier [21]. Hver og en MAP kinase signalvei består av tre enzymer, MAP kinase (MAPK), MAP kinase kinase (MKK) og MAP kinase kinase kinase (MKKK) [22]. Vi kan dele MAP kinasene i to hovedgrupper. Klassiske og atypiske, basert på deres evne til å fosforylere og aktivere sine undergrupper i MAPK kaskaden. Klassiske MAP kinaser omfatter ERK1/ERK2, p38, JNK, og ERK5. Den best karakteriserende MAP kinase, er den ekstracellulære signal regulerte kinasene ERK1 og ERK2, som blir regulert av vekstfaktor og G-protein koblet signalering. Den andre er p38 MAPK som er knyttet til stressrespons. Den tredje klassiske MAP kinase er JNK kinasen som også er knyttet til stress respons. Den fjerde og siste klassiske MAP kinasen er ERK5, som aktiveres av både vekst faktorer og av stress stimuli. De atypiske MAP kinasene omfatter ERK3/ERK4, NLK og ERK7. Reguleringen og den fysiologiske rollen til de atypiske MAP kinaser er mindre kjent enn klassiske MAP-kinasene [23].

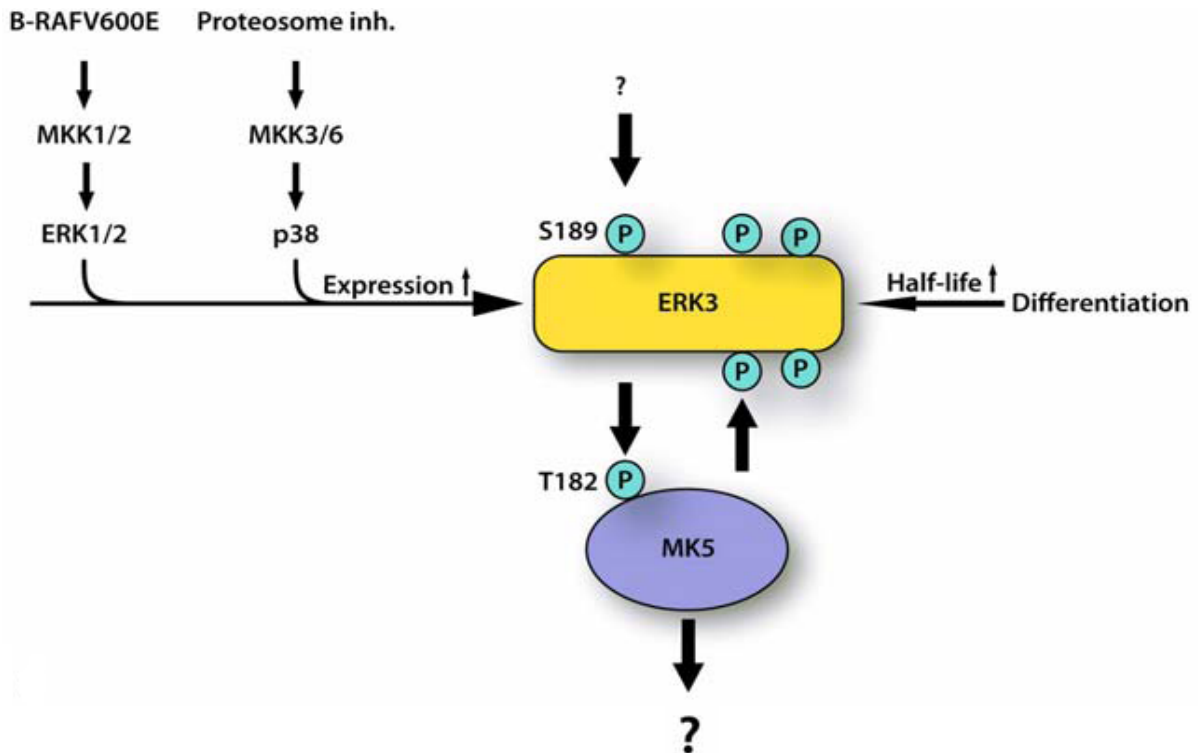


Figur 1.3 MAP kinase signalveier fører til aktivering av MAPKAPK. Den MAPK modellen består av MKKK, MKK, og MAPK. Figuren over viser hvordan MKKK aktiveres ved ekstracellulær stimuli som igjen fosforylerer MKK som deretter aktiverer MAP kinase gjennom fosforylering. MAPK signalveier fører til aktivering av MAPKAPK (RSK, MNK, MSK, MK2/3 og MK5). Figuren er basert på figur 2 i referansen [23] og er kopiert med tillatelse.

MAPK aktivert protein kinase (MAPKAPK) familien omfatter P90-ribosomal S6 kinaser (RSK1-4), mitogen-og stress-aktiverte kinaser (MSK1/2), MAPK-samspill (interacting) kinaser (MNK1/2) og MAPK-aktivert protein kinase (MK2/3 og MK5). MAPKAPK familie medlemmer har relativt høy homologi og aktiveres av hver sin MAP kinase. Aktivering av MAPKAPK fører til intracellulær transkripsjon og genuttrykk som har betydning i de cellulære funksjoner. For eksempel kan aktivert MAPKAPK i virusinfiserte celler som aktiveres via aktivering av p38 signalvei, fører til økt cytokin produksjon. En slik aktivering kan også bidra til onkogenese i virusinfiserte celler. MAPKAPK spiller en viktig rolle i de ulike biologiske prosesser, som mitogenese, onkogenese, stress, inflammasjon, spredning, differensiering, og overlevelse [24]. MAPK aktivert protein kinase-5 [MAPKAPK-5 eller MK-5], også betegnet som PRAK (p38-regulert/aktivert kinase) er en av mange proteinkinaser som katalyserer fosforyleringer [25].

Ekstracellulær signalregulert kinase-3 (ERK3) er en atypisk mitogen aktivert protein kinase (MAPK) som reguleres av protein stabilitet. Funksjonen til ERK3 er enda ikke kjent, men det

er vist at ERK3 deltar i en rekke biologiske prosesser som proliferasjon, cellesyklus progresjon og celledifferensiering [26]. ERK3 er en svært ustabil protein med en halveringstid på 30 minutter, og nedbrytningen av ERK3 er vist å være mediert gjennom 26s proteasome [27,28]. En spesifikk interaksjon mellom MK5 og ERK3 fører til kjerne-eksklusjon av både MK5 og ERK3. MK5 uttrykt alene befinner seg vanligvis i kjernen mens ERK3 uttrykt alene befinner seg vanligvis både i kjernen og i cytoplasma [29]. De fysiologiske betydningene av den spesifikke interaksjon mellom ERK3 og MK5 er enda ikke klarlagt. Vi vet at MK5 nivået i celler er proporsjonalt med ERK3 nivået. Reduksjon av MK5 fører til reduksjon i ERK3 i cellen også [26,30]. ERK3 og ERK4 er begge vist å kunne aktivere MK5 in vivo [30].



Figur 1.4 MK5 aktivering via ERK3. ERK3 binder seg til MK5 og aktiverer MK5 gjennom fosforylering av MK5 på T182. Fosforylert MK5 blir aktivert, så fosforylerer sin bindingspartner og aktivator ERK3. Så langt er det ingen agonist som er kjent til å stimulere ERK3 aktivitet. ERK3 er et ustabil protein med en kort halveringstid. ERK3 kan reguleres på transkripsjonsnivå ved aktivering av MEK-ERK signalveien via onkogene B-RAF, og ved aktivering av p38 signalveien via proteosom hemmere. Figuren er basert på figur 2 i referansen [25] og er kopiert med tillatelse.

MK5 er fortsatt en lite studert kinase og dermed er dens fysiologiske funksjon fortsatt noe uklar. Ulike studier har knyttet MK5 til ulike signalveier og fysiologiske prosesser. En studie viser at fravær av MK5 i embryonisk fibroblaster fra mus fører til cellesyklus blokkering og lavere vekstkurve [31]. En annen studie peker på at MK5 er ikke involvert i kun regulering av genekspressjon, men også involvert i andre cellulære reaksjoner som stress. MK5 er en viktig regulator i ulike stress stimuli signalveier, inkludert energi-stress signalvei [32].

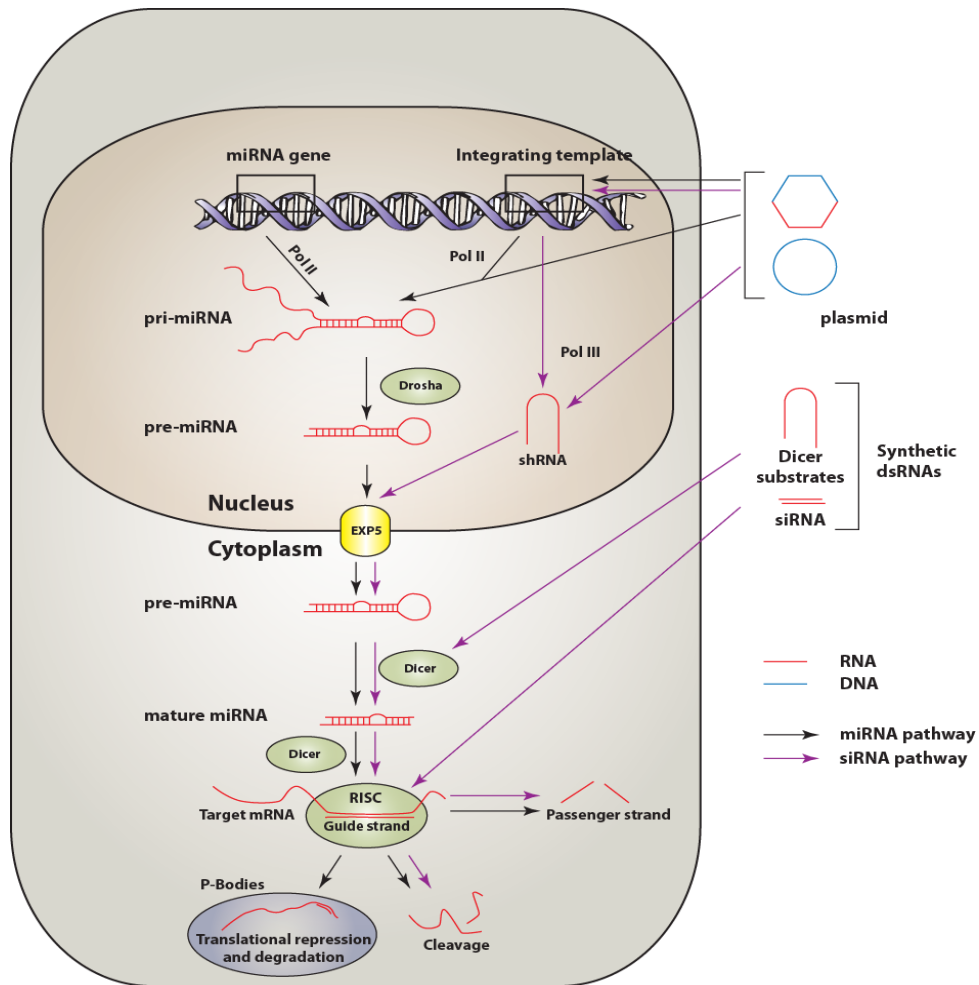
Andre in vivo studier fra mus viser at MK5 aktivering via ERK3 er uavhengig av ERK3 enzymatisk aktivitet, men er avhengig av sin egen katalytisk aktivitet. I embryoutvikling hos mus henger mRNA uttrykkmønsteret av ERK3 og MK5 sammen. Nedregulering av MK5 genet hos museembryo fører til sterk reduksjon av ERK3 protein nivå på dag 11 i embryonalperiode. ERK3 uttrykk i mus er maksimalt på embryo dag 11, noe som indikerer på en viktig rolle i dette stadiet. Sterk reduksjon av ERK3 pga nedregulering av MK5 fører til dødelighet av museembryo på tidlig stadiet [33].

Vedvarende signalveier som fører til aktivering av MAPK / ERK signalering er involvert i en rekke biologiske prosesser som celleproliferasjon, differensiering og motilitet og overlevelse [34,35]. Kinasene er viktige for regulering av de fleste aspekter ved utvikling av kreft. I kreftsykdommer er proteinkinaser ofte mutert eller på en eller annen måte deregulert, noe som gjør dem til et viktig angrep mål i kreftterapi [34,35]. Introduksjon av kinaseinhibitoren Gleevec (i 2001) har forandret behandlingen av kronisk myeloid leukemi radikalt. Kinasehemmere brukt i kreftterapi er ofte godt tolerert og gir ofte mindre bivirkninger enn tradisjonelle kjemoterapi (cytostatika behandling) [36]. En av utfordringene for utvikling av målrettet kreftterapi slik som kinaseinhibitorer er behovet for detaljert kunnskap på molekylært nivå om målet for terapien [36].

1.5 Formål

Flere studier har vist at bindingspartneren og aktivatoren til MK5, ERK3 er involvert i regulering av cellyklus. Våre tidligere studier har vist at MK5 er viktig for regulering av ERK3 protein stabilitet [25]. Vi har lagd Hela cellelinje som uttrykker et shRNA, som spesifikt nedregulerer uttrykk av MK5. ShRNAet mot MK5 er under kontroll av en tetracyclin induisert promotor. Dette betyr at vi kan ved hjelp av tetracyclin selektivt nedregulere endogent uttrykk av MK5 [37].

Vi vil i denne oppgaven bruke denne cellelinjen til å undersøke om MK5 er nødvendig for cellyklus progresjon i HeLa celler. Dette vil vi først og fremst gjøre ved å analysere proliferering og vekst av Hela celler i nærvær og fravær av MK5. Hvis MK5 viser seg å være viktig for proliferasjon og progresjon gjennom cellyklus ønsker vi å bestemme i hvilken fase av cellyklusen MK5 er nødvendig. Videre vil vi også undersøke om kinaseaktiviteten og nivået av MK5 varierer med progresjon gjennom cellyklus.



Figur 1.5 miRNA og shRNA signalvei. Figuren over viser hvordan shRNA som etterligner miRNA, går inn i RISC og degraderer mRNA. shRNA er ikke et mål for Drosha, men blir eksportert fra kjernen via exportin5. I Våre HeLa celler vil shRNA transkriberes fra en tetracyclin industert promotor som uttrykker for shRNA rettet mot MK5 eller en kontroll "scrambeled" (Scr) shRNA. Dersom Tet Repressor utsettes for tetracyclin analog endrer den konformasjon og mister sin evne til å binde til promotor og fører til at shRNA uttrykkes. Figuren er basert på figur 2 i referansen [37] og er kopiert med tillatelse.

2 MATERIALER

Tabell 2.1 Biologiske materialer

Kreftcellelinje (Human)	Kreft type	Produsent
Hela (MK5)	Cervix uteri cancer	UNN/UITØ, Tromsø
Hela (Scramble)	Cervix uteri cancer	UNN/UITØ, Tromsø
Hela (S3)	Cervix uteri cancer	ATCC-Company, USA

Tabell 2.2 Antistoffer brukt i westernblott forsøk

Anti-mus antistoff 680/800	Invitrogen, USA
Anti-kanin antistoff 680/800	Rockland, USA
Anti-sau antistoff 680/800	Invitrogen, USA
PRAK (A7) antistoff	Santa Cruz Biotechnology®, USA
Anti-tubulin antistoff	Cell Signaling Technology®, USA
Anti Myc (9E10)	Cancer Reaserch, UK
c-Myc (D84C12)	Cell Signaling Technology®, USA
Pan-Actin antistoff	Cell Signaling Technology®, USA
ERK2 antistoff	Santa Cruz Biotechnology®, USA
ERK3 antistoff	Abnova, Taiwan
ERK4 antistoff	Selvlagd, Skottland
His PRAK antistoff	Selvlagd, Skottland
H-180 antistoff	Santa Cruz Biotechnology®, USA
MK2 antistoff	Cell Signaling Technology®, USA
P62 antistoff	Abnova, Taiwan
Phospho-MAPK antistoff	Cell Signaling Technology®, USA
Phospho-MK5 antistoff	Selvlagd, Skottland

Tabell 2.3 Kjemikalier og reagenser

10000 U/ml Penicillin+10 mg/ml streptomycin	Sigma Aldrich, USA
Antioxidant (NuPAGE®)	Invitrogen, USA
Assay Buffer 10X (Enzo®)	Enzo Life Sciences, Sveits
Beta-merkaptotanol	Sigma Aldrich, USA
Beta-glycerophosphat	Applichem, Danmark
Bio-Rad DC kompatibel, Reagensene A, B og S	Bio-Rad, California, USA
Blasticidin	Sigma Aldrich, USA
Blockingsbuffer, ODYSSEY infrared imaging system	LI-COR/Biosciences, Tyskland

CellTiter 96® AQuenous One	Promega, USA
Complete mini Protease inhibitor (cocktail tablets)	Roche, Sveits
Dulbecco's Modofied Eagle's Medium	Sigma Aldrich, USA
Doxycycline	Sigma Aldrich, USA
EDTA (Ethylenedinitrilotetraacetic acid)	Merck, Tyskland
EGTA (Ethylene glycol tetraacetic acid)	Sigma Aldrich, USA
Ethanol	Sigma Aldrich, USA
FBS	VWR international, England
Gel (NuPAGE®), 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, USA
Glycerine	Merck, Tyskland
HCl	Merck, Tyskland
Lipofectamine TM 2000 Reagent	Invitrogen, USA
LDS Sample Buffer 4X (NuPAGE®)	Invitrogen, USA
KCl	Merck, Tyskland
MagicMark™ XP, Western standard	Invitrogen, USA
Magnetisk kule (PureProteome IgG Magnetic Beads)	Millipore, USA
Metanol	Sigma Aldrich, USA
MES SDS Runnings Buffer 20X, (NuPAGE®)	Invitrogen, USA
NaF	Sigma Aldrich, USA
NaPPi (Tetra-natrium pyrophospat)	Sigma Aldrich, USA
NaH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich, USA
Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich, USA
NaCl	Sigma Aldrich, USA
NaOH	Merck, Tyskland
Opti-Mem®	Invitrogen, USA
Plasmid (pEGFP-MK5 T 182A)	Seternes, artikkel 2002
Plasmid (pGFP)	Seternes, artikkel 2002
Plasmid (pEGFP-MK5)	Seternes, artikkel 2002
Plasmid (MK5 D148A)	Seternes, artikkel 2002
Plasmid (pEGFP-MK5 C3.5)	Seternes, artikkel 2002
Plasmid (L337G)	Seternes, artikkel 2002
Protein-G agarose	Millipore, California, USA
Puromycin	Sigma Aldrich, USA
RPMI 1640 medium "m/ L.glutamin og Na- bikarbonat"	Sigma Aldrich, USA
Sample Reducing Agent 10X, (NuPAGE®)	Invitrogen, USA
See Blue® Plus 2, Prestained	Invitrogen, USA
Suberic acid bis, sodium salt	Sigma Aldrich, USA
Sucrose	VWR international, England
Tris (Base)	Merck, Tyskland
Triton X-100	VWR international, England
Trypsin 0,25%, EDTA-løsning	Sigma Aldrich, USA
Thymidine	Sigma Aldrich, USA
Tween 20	VWR international, England
VO42- (Vandat)	Sigma Aldrich, USA

Tabell 2.4 Løsninger brukt i celledyrking

RPMI medium	
RPMI 1640 medium m/ L.glutamin og Na- bikarbonat	500 ml
FBS	50 ml
10000 U/ml Penicillin+10 mg/ml streptomycin	5 ml
Puromycin	0,5 µg/ml
Blasticidin	2,5 µg/ml
DMEM medium	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium m/ 4500 mg- glucose/L,	500 ml
FBS	50 ml
10000 U/ml Penicillin+10 mg/ml streptomycin	5 ml
MKK-Lysisbuffer	
20mM Tris (pH 7,0)	2 ml / 1M Tris (pH 7,0)
1% Triton X-100	1 ml / Triton X-100
5 mM NaPPi (Tetra-natrium pyrophosphat)	2 ml / 250 mM NaPPi
50 mM NaF	10 ml / 500 mM NaF
1 mM EDTA	0,2 ml / 0,5 M EDTA
1 mM EGTA	0,5 ml / 200 mM EGTA
1 mM VO ₄ ²⁻ (Vandat)	0,5 ml / 200 mM VO ₄ ²⁻
0,27 M Sucrose	54 ml
10 mM Beta-glycerophosphat	2 ml / 500 mM løsning
dH ₂ O	27,8 ml
MKK-Lysisbuffer m/inhibitor	
MKK-Lysisbuffer	10 ml
Roche Complete mini Protease inhibitor cocktail tablets	1 tbl
Beta-mercaptoetanol	10 µl
PBS	
NaH ₂ PO ₄	1,15 g
Na ₂ HPO ₄	5,75 g
NaCl	9,00 g
dH ₂ O	ad 900 ml
1M NaOH / 1M HCl	Juster pH til 7,4
dH ₂ O	ad 1 L

Tabell 2.5 Løsninger brukt i synkronisering av Hela celler

Dobbelt Thymidin løsning	
Thymidine	242 mg
1M NaOH	1 ml

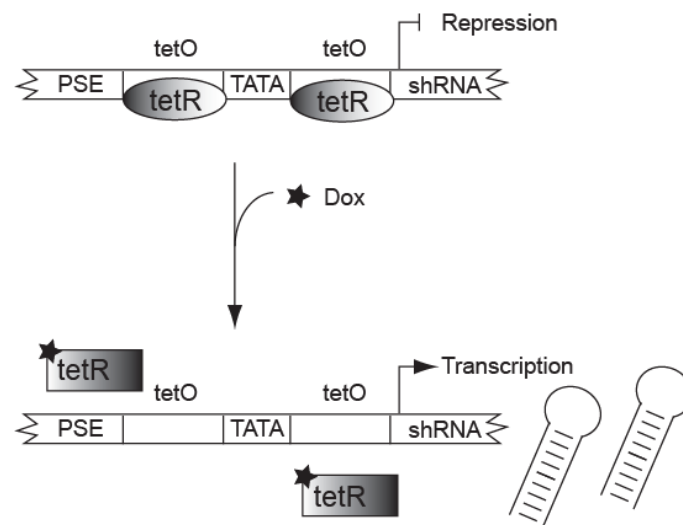
Tabell 2.6 Løsninger brukt i Westernblotting

Elektroforesebuffer	
MES 20X	50 ml
dH ₂ O	950 ml
Blottingbuffer	
Tris (base)	29 g
Glycine	144 g
Metanol	1 L
dH ₂ O	ad 5 L
TBS (10X)	
Tris 1M (pH 7,5)	200 ml
NaCl	400 g
KCl	10 g
dH ₂ O	ad 5 L
TBS-T (1X)	
TBS (10X)	500 ml
Tween 20	5 ml
dH ₂ O	ad 5 L
Loading buffer	
LDS sample-buffer 4X	90 µl
Sample reducing agent 10X	36 µl

3 METODER

3.1 Celledyrkning

Det ble dyrket en HeLa cellelinje som uttrykker shRNA mot MK5 fra en tetracyclin induisert promoter. Det vil si at vi kan ved hjelp av tetracyclin selektivt nedregulere det endogene uttrykket av MK5. Som kontroll dyrket vi en HeLa cellelinje (Scr) som uttrykker kontroll shRNA fra en tetracyclin induisert promoter. Slik kan vi undersøke MK5 aktiviteten intracellulær. Vi vil i denne oppgaven bruke disse cellene til å undersøke om MK5 er nødvendig for cellyklus progresjon. Dette vil vi først og fremst gjøre ved å analysere proliferering og vekst av HeLa celler i nærvær og fravær av MK5. Hvis MK5 viser seg å være viktig for proliferasjon og progresjon gjennom cellyklus ønsker vi å bestemme i hvilken fase av cellyklusen MK5 er nødvendig. Begge de to stabile cellelinjene er opprinnelig humane HeLa celler isolert fra Cervix uteri cancer (livmorhalskreft).



Figur 3.1 Tetracyclin induisert promotor som uttrykker for shRNA rettet mot MK5: Tet repressoren er en transkripsjonsfaktor hentet fra E.coli. Når Tet repressoren binder sekvensspesifikt til tet operatoren hemmer den transkripsjon. Tet operatoren kan binde tetracyclin og dette fører til en konformasjonsendring i repressoren slik at den mister sin affinitet til DNA og repressorens evne til å hemme transkripsjon opphører. Vi kan overuttrykke Tet repressoren i eukaryote celler og bruke den til å regulere genuttrykk fra eukaryote promotere, hvor vi har introdusert tet operatorene. Her er en skjematisk tegning av promotoren med tet operatoren som regulerer uttrykket av shRNA. I fravær av tetracyclin vil Tet repressoren (tetR) binde tet operatorene (tetO) og hindre transkripsjon av shRNA. I nærvær av tetracyclin analog (Dox) vil tet R forandre konformasjon og miste sin affinitet for tetO og dermed blir uttrykket av shRNA uttrykket induisert. Figuren er basert på figur 3 i referansen [37] og er kopiert med tillatelse.

3.1.1 Tining og dyrkning

- Hela MK5 cellelinje
- Hela Scramble cellelinje

Hela cellene (både MK5 og Scr) ble oppbevart i -70 graders freezer. De ble tint opp på vannbad ved 37 °C i ca ett minutt til det var en liten isklump igjen. Beholderne ble vasket med 70% etanol i LAF benken før vi overførte 1 ml celleduspensjon av hver beholder til to middelstore dyrkningsflasker med filterkork. Det ble tilsatt 10 ml RPMI medium med 10% føtalt kalveserum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0,5 µg/ml puromycin og 2,5 µg/ml blasticidin. Flaskene ble inkubert i inkubatorskap ved 37 °C og 5% CO₂ i 3 timer. Dermed ble mediet fra flaskene sugd av og nytt medium ble tilsatt til hver flaske. Dette gjøres for å hindre at dimetylsulfoksid (DMSO) skader cellene. 10% DMSO-løsning brukes for å hindre celledød under langsomt frysing og at cellene kan oppbevares i enten flytende nitrogen eller -70 graders freezer [38].

3.1.2 Splitting

Cellene ble splittet når cellekonsentrasjonen i flaskene var høyt dvs. at cellene var tettvokste. Cellene ble splittet ved å fjerne dyrkningsmediet, vaske med 10 ml steril PBS, løsne cellene fra plasten med 1-2 ml Trypsin og dermed nøytralisere med dyrkningsmediet igjen. 1 ml celleduspensjon fra dyrkningsmediet ble pipettert ut, overført til en ny dyrkningsflaske og tilsatt 30 ml RPMI mediet. Dette ble gjort ca 1 gang per uke.

Alt arbeid med cellene ble utført i aseptisk LAF benk for å hindre kontaminering av Cellekulturene.

3.2 Celleforsøk

3.2.1 Utsåing

Til utsåing ble mediet fjernet fra flasken og vasket med 1x PBS. Cellene ble trysinert med 2 ml trypsin per stor dyrkningsflaske. Løst cellene med forsiktig rysting. Deretter ble 8 ml RPMI / DMEM komplett mediet tilsatt. Før utsåing til forsøk ble 50 µl cellesuspensjon tilsatt 50 µl DMEM / RPMI mediet tatt av og antall celler ble telt i et Bürkers tellekammer. Cellekonsentrasjonen i cellesuspensjonen ble beregnet etter følgende formel:

$$\text{Celler / ml i cellesuspensjonen} = \frac{\text{Antall celler} \times 20\,000}{\text{Antall A-ruter}}$$

Det ble tilsatt $5,0 \times 10^5$ pr 100 mm skål med 5 ml tilsatt DMEM / RPMI mediet.

Til MK5 nedslag (Knock-down) forsøket ble det brukt RPMI mediet. Vi har undersøkt effektiviteten av MK5 nedslag (Knock-down) ved doxycyclin (dox) induksjon ved hjelp av western blot etter ulike tidspunkter (1, 2, 3 4 og 5 dager).

Vi har sammenlignet nivået av MK5 i cellelinjene med MK5 og Scr før og etter tilsetning av dox. Det ble bestemt at MK5 nivået forsvinner etter dag 2 med tilsatt dox. (se resultater).

Til synkronisering av Hela celler med dobbel thymidin ble det brukt DMEM mediet. Vi ønsket å undersøke om nivået og aktiviteten til MK5 varierer med progresjon gjennom cellyklus (se resultater og metode 3.6 dobbelt thymidin).

3.2.2 Høsting

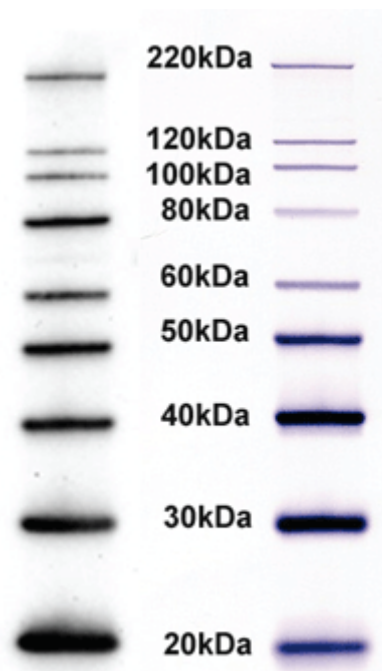
Cellehøsting er en prosess der man først isolerer et bestemt antall celler og deretter lar dem vokse over tid. Når antall celler har økt, høster vi cellene i bestemte tider vi ønsker. I denne prosessen lager vi celleekstrakter ved hjelp av MKK-Lysis buffer tilsatt betamercaptoetanol og protease hemmer, som vi skal ta med videre i forsøket. Før cellehøstingen ble cellene vasket 2 ganger med 5 ml PBS, og lysert med 300 µl MKK-lysisbuffer tilsatt betamercaptoetanol og protease hemmer. Ved høsting ble cellene spunnet ned ved hjelp av sentrifugering ved 13000 rpm i 20 minutter i kjølerom før lysatet ble forsiktig pipettert av. Lysatet ble pipettert av og tatt vare på ved hvert høstingstidspunkt [38].

En andel av prøven (39 μ l) ble blandet med loading buffer (21 μ l) og ble innkubert på 70 °C i 10 minutter deretter oppbevart ved -20 °C frem til analysering, resten snap-fryses på flytende nitrogen og ble lagret ved -70 °C Freezer.

3.3 Western blotting

Western blot er en analyseteknikk som brukes til å separere proteiner i en celleekstrakt ved hjelp av akrylamidgel. Proteinene blir separert etter størrelse/lengde. Deretter overføres proteinene til en membran, hvor en ved hjelp av spesifikke antistoffer rettet mot proteinet kan analysere eller detektere.

Det ble kjørt Western på lysater fra Hela (MK5) og Hela (Scr) celler. Cellelysaten ble tint igjen ved rom temperatur i isbad og applisert på gel. Som standard ble det brukt 15 μ l av prøvene, 1 μ l av MagicMark og 5 μ l Prestained (se resultater).



Figur 3.2 Protein markør til western blott: Molekylvekt estimering i western blotting med MagicMark TM XP western protein standard fra invitrogen, vist med 4-12% Bis-Tris gel. Figuren er hentet fra Invitrogen med tillatelse.

Tabell 3.1 Antistoff brukt i Westernforsøk med respektive fortyninger

Primærantistoff	Fortynning av primærantistoff	Sekundærantistoff	Fortynning av sekundærantistoff
PRAK (A7) antistoff	1 : 500	Anti-mus antistoff	1 : 5000
Anti-tubulin antistoff	1 : 1000	Anti-mus antistoff	1 : 20000
Anti-Myc (9E10)	1 : 200	Anti-mus antistoff	1 : 5000
c-Myc (D84C12)	1 : 500	Anti-kanin antistoff	1 : 5000
Pan-Actin	1 : 1000	Anti-kanin antistoff	1 : 10000
ERK2 antistoff	1 : 1000	Anti-kanin antistoff	1 : 10000
ERK3 antistoff	1 : 500	Anti-mus antistoff	1 : 5000
ERK4 antistoff	1 : 1000	Anti-Sau antistoff	1 : 10000
His PRAK	1 : 500	Anti-Sau antistoff	1 : 10000
H-180 antistoff	1 : 200	Anti-kanin antistoff	1 : 10000
MK2 antistoff	1 : 1000	Anti-kanin antistoff	1 : 5000
P62 antistoff	1 : 1000	Anti-mus antistoff	1 : 10000
Phospho-MAPK antistoff	1 : 1000	Anti-mus antistoff	1 : 10000
Phospho-MK5 antistoff	1 : 500	Anti-Sau antistoff	1 : 10000

Prosedyre for Western blotting:**Hva som må gjøres først:**

1. Elektroforesebuffer 1000 ml: (1x MES SDS running buffer: 50 ml 20x MES og 950 ml Deionisert vann).
2. Til innerkammeret: 500 µl NuPAGE Antioksidant + 200 ml 1xMES SDS running buffer fra step 1. Bland
3. Til blottingen: 50 ml blottebuffer

Elektroforese, SDS PAGE:

- Ferdige geler (4-12% Bis-Tris Gel) tas ut av plasten
- Rens kassetten med deionisert vann
- Ta av tapen nederst
- Ta ut kammen
- Tilsett buffer fra pkt.2 til brønnene
- Sett gelen i Novex Mini Cell kammer (liten plate innover)
- Fyll innerkammeret med buffer fra pkt.2, se at det er tett
- Fyll ytterkammeret med ca.600 ml 1x ”runningbuffer ”fra pkt.1.
- Kjør gel ved å velge NuPage gel fra menyen. Kjøres v/200 volt i 35 minutter for små proteiner eller i 50 minutter for større proteiner.

Blotting:

- Ta ut gelen
- Smaleste platen opp
- Brekk opp platen med en bred spatel
- Kast topplaten
- Ta vekk brønnene og nederste blå front med spatelen
- Filterpapir fuktet i blottebuffer legges oppå
- Snu gelen med filterpapiret ned (for eksempel i hånden)
- Press ut gelen ved å trykke nederst på plastplaten
- Legg på membran fuktet i blottebuffer
- Filterpapir fuktet i blottebuffer legges oppå
- To svamper fuktet med blottebuffer legges i blottedelen
- Legg gel med membran og filterpapir oppå svampene
- Rull over med et reagensrør for å få bort luftbobler
- En svamp fuktet med blottebuffer legges oppå
- Fyll opp med svamper fuktet i blottebuffer
- Sett i blottekaret
- Fyll på med 50 ml blottebuffer inni fra pkt. 3
- Fyll deionisert vann i ytterrommet ca. 2cm fra toppen av innerkammeret
- Velg NUPage blotting og kjøres i 1,5-2,5 timer ved 25 volt avhengig av protein størrelse.

Blokkning:

- Membranen legges i kommersiell blokkebuffer i 1 time
- Primærantistoff fortynnes i 50 ml rør med 5 ml blokkebuffer og 5 µl Tween 20.
- Innkuber på kjølerom over natt på rotering
- Vask membranen 3 x med TBS-T

Kan også inkuberes bare 1 time i romtemperatur før sekundært antistoff tilsettes.

- Sekundært antistoff fortynnes i 50 ml rør med 20 ml TBS-T.
- Innkuber i 1 time ved romtemperatur på rotering. (bruk aluminiumsfolie).
- Vask membranen 3 x med TBS-T (bruk aluminiumsfolie)

3.4 Måling av totalprotein

I enkelte forsøk målte vi proteinnivået i celleekstrakter for å få en jevn konsentrasjon av proteiner i alle celleekstraktene. Fordelen med denne metoden er å redusere feilskilde i form av forhøye proteinkonsentrasjon i celleekstraktene, som kan gi positivt utslag på enkelte bånd eller forsterke enkelte bånd i membran detektering.

Det ble brukt BioRad DC-kompatible for å måle totalkonsentrasjonen av protein i cellelysater. Proteinkonsentrasjonen i lysatene ble justert likt på grunnlag av proteinmålingene

Prosedyre for BioRad DC-kompatible:

- Bearbeidelse av reagens A': Det ble tilsatt 20 µl reagens S til hver ml av reagens A som er nødvendig for forsøket. DVS. $A' = 1000 \mu\text{l A reagens} + 20 \mu\text{l S reagens}$.
- Det ble laget 5 fortynninger av bovine serumalbumin standardløsning. 5 µl standardløsninger av bovine serumalbumin (BSA) fortynnet med MKK-lysisbuffer i konsentrasjonene 0,1 mg / ml til 3,2 mg / ml protein. Det benyttes 3 paralleller.
- 5 µl av standardløsninger og celleekstrakter ble overført til en ren, tørr mikrotiterplate.
- Det ble tilsatt 25 µl av reagens A' fra trinn 1 i hver brønn.
- Deretter ble det tilsatt 200 µl reagens B i hver brønn. De ble rystet forsiktig i 5 sekunder.
- Platen ble inkubert i romtemperatur i 15 minutter før absorbansen ble lest ved 750 nm på en mikrotiteravleser.

3.5 Kryssbinding og immunopresipitering

Immunopresipitering (IP) er en teknikk som brukes til å isolere og konsentrere et bestemt protein fra et celleekstrakt med flere tusen ulike proteiner. Dette gjøres ved hjelp av et magnetisk kule rettet mot et antistoff som binder seg spesifikt til et bestemt protein.

Ved hjelp av kryssbinding kan vi lage kovalente bindinger mellom magnetisk kule og primære antistoffet som skal brukes i immunopresipitering. Dette hindrer at hydrogenbindinger mellom magnetisk kule og primærantistoffet brytes ved oppvarming og tilsetning av samplebuffer (se resultater).

Prosedyre for kryssbinding:

- Lag konjugeringsbuffer ved å tilsette 25 mg suberic acidbis i 440 µl dH₂O.
- Deretter fortynde 50 µl av konjugeringsbuffer med 950 µl 1xPBS.
- Vask antistoffkoblet magnetiske kulene 3 ganger med 200 µl 1x PBS. Plasser på magnet og kast supernatanten.
- Tilsett 250 µl av fortyntet konjugeringsbuffer og la det stå på lykkehjul i 1 time ved romtemperatur.
- Deretter tilsett 12,5 µl Tris-HCl 1M (pH 7,5) å la det stå på lykkehjul i 15 minutter ved romtemperatur.
- Deretter vask dem 3 ganger med 200 µl MKK-lysisbuffer uten proteasehemmer og betamercaptoetanol
- Til sist blandes kulene med 200 µl MKK-lysisbuffer og er klar for IP

Prosedyre for IP:

- Tin celleekstrakt (fra -70 °C) på is og beregn 20 µl Protein G magnetisk kule pr. prøve (antall prøver x 20 µl tilsettes i en eppendorfrør)
- Magnetiske kuler equilibreres (vaskes) med iskald MKK-lysisbuffer, uten proteasehemmer og betamercaptoetanol (500 µl x 3)
- Plasser eppendorfrørene på magnet og helle av supernatanten. Mellom hver tilsetning
- Magnetiske kuler løses i iskald MKK-lysisbuffer nok til antall prøver, 20 µl pr. prøve
- 20 µl magnetisk kule tilsettes hvert rør med lysat og mikses på lykkehjul på kjølerom i minst 30 min.
- Plasser eppendorfrørene på magnet og overfør supernatanten til nytt eppendorfrør
- Tilsett 1 µl antistoff og mikses på lykkehjul på kjølerom i 60 min.
- Tilsett 20 µl Prot. G magnetisk kule (vasket og equilibrert) og innkuber på kjølerom i lykkehjul i 30-60 min.
- Vask med MKK-lysisbuffer 500 µl x 3, deretter plasser eppendorfrørene på magnet og kast supernatanten mellom hver vask
- Vask 2 gang med iskald 50 mM Tris, pH: 7,5 og plasser eppendorfrørene på magnet og kast supernatanten mellom hver vask
- Eluer ut med 40 µl 1x samplereducing buffer:
Eks.: 150 µl (4 x LDS) + 60 µl (Sampl.Red. agent.) + 390 µl (dH₂O) = 600 µl
- Sett i varmeblokk på 70 °C i 10 min.

3.6 Dobbel thymidin

Til synkronisering av HeLa celler med dobbel thymidin ble det brukt DMEM mediet. Vi ønsket å undersøke om nivået og aktiviteten til MK5 varierer med progresjon gjennom cellesyklus. HeLa (S3) cellene ble dermed synkronisert med en dobbel thymidin protokoll og sluppet fri. Cellene ble høstet etter 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22 og 24 timer (se resultater).

Prosedyre: (tidlig S-fase blokk)

- HeLa (S3) cellene ble vasket to ganger med 1xPBS og trypsinert
- Cellene ble overført til 10 cm skåler. 500,000 celler/skål ble overført i 5 ml DMEM mediet med 2 mM thymidin for 24 timer (første blokk)
- Etter første thymidin blokk ble mediet fjernet og cellene ble vasket med 1xPBS. Deretter ble nytt DMEM mediet uten thymidin tilsatt igjen for neste 12 timer
- Deretter ble mediet fjernet igjen og cellen ble vasket med 1xPBS før nytt DMEM mediet med 2 mM thymidin tilsatt for 14 timer (andre blokk)
- Etter andre blokken ble mediet fjernet igjen og cellene ble vasket med 1xPBS. Deretter ble nytt DMEM mediet tilsatt uten noe thymidin denne gangen
- Cellene ble høstet etter 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22 og 24 timer.

3.7 Transfeksjon med plasmid (Lipofectamin 2000)

Plasmider er små sirkulære DNA molekyler. Begrepet transfeksjon beskriver prosessen som overfører DNA inn i celler med hensikt i å formidle protein uttrykk for transgene MK5.

Ved transfeksjon av HeLa celler ble det brukt plasmid DNA laget med Midiprep. Det ble sådd ut 250.000 celler (MK5 og Scr med og uten dox) per 6cm skål (dag 1). Transfeksjonen ble utført neste dag (dag 2). Det ble brukt forskjellige plasmider til å transfektere inn plasmid for MK5 uttrykk. Mengde DNA-plasmid som ble brukt i hver transfeksjon var 200 ng. Cellene ble høstet 24/48 timer etter transfeksjon (dag 3/4). Det ble kjørt Western på transfeksjons lysatene fra HeLa MK5 og Scr med og uten dox. (se resultater).

Plasmider som er brukt i transfeksjon er: pEGFP-MK5 T 182A, pGFP, pEGFP-MK5, MK5 D148A, pEGFP-MK5 C3.5, L337G.

Prosedyre for Transfeksjon med Lipofectamin 2000

Dag 1:

- Så ut 250.000 celler (Hela) per 6cm skål.

Dag 2:

- Mastermix av Lipofectamin 2000 for N prøver: 3 ul Lipofect. 2000 x N = μ l
247ul OptiMem x N = μ l

Blandingen skal inkuberes ved romtemp. i minst 5 min.

- Tilsett 250 μ l OptiMem i hvert eppendorfrør = N prøver
- Tilsett plasmid (ca. 200 ng) i hvert rør
- Tilsett 250 ul av Lipofectamin 2000 mix i hver eppendorfrør
- Innkuber i 20 min. i romtemp.
- I mellomtiden tas bort mediet fra cellene i skålene
- Tilsett 500 μ l OptiMem til cellene og sett dem i inkubatoren mens det ventes
- Etter 20 min. overfør alt innholdet i hver eppendorfrør til hver skål
- Innkuber i inkubator for 4-6 timer
- Tilsett 4 ml medium med serum til hver skål

Dag 3/4: (Cellehøsting)

- Vask cellen x 1 med 1x PBS
- Tilsett 300 mL MKK-lysisbuffer pr. 6 cm skål
- Løsne celler med celleskraping (bruk celleskraper, men skyll i vann mellom hver prøve)
- Overfør til 1,5 ml eppendorfrør
- Prøvene skal stå på is i 15 min.
- Sentrifuger med maks hastighet i 10 min.
- Overfør supernatanten til et nytt eppendorfrør
- Overfør 39 μ l av prøvene til Western Blot
- + NuPage LDS sample buffer x 4: 15 μ l
} 21 μ l
- + NuPage Sample reducing agent x 10: 6 μ l
- Sett i varmekblokk på 70 °C i 10 min.

3.8 MTS for måling av celleviabilitet

CellTiter 96® AQueous One er en reagens som blir brukt for bestemmelse av antall levedyktige celler i en cellekultur. CellTiter 96® AQueous One Solution reagens er en løsning sammensatt av tetrazolium forbindelsen [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) - 2 - (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, (MTS) og elektron kobling reagensen (phenazine ethosulfate, (PES). PES kan forbedre kjemisk stabilitet, noe som gjør at den kan kombineres med MTS å danne en stabil løsning. Inne i cellen blir MTS omdannet til formazan ved hjelp av en intracellulær bioreduksjons prosess. Det blir dannet en binding/bånd mellom MTS-formazan og NADPH eller NADH som er produsert av dehydrogenase enzymer i metabolsk aktive celler. Mengden av formazan produktet som blir målt ved absorbans 490 nm er direkte proporsjonal med antall levende celler i kulturen (se resultater).

Prosedyre:

- CellTiter 96® reagensen (20 ml) ble tint.
- 20 µl CellTiter 96® reagens ble overført til hver brønn (96-brønners plate) som inneholdt 100 µl RPMI mediet med 1000 celler per brønn fra før
- Deretter ble Platen inkubert ved 37 °C i 2 time med 5% CO₂
- Tilslutt ble absorbansen målt ved 490 nm ved hjelp av en ultra mikroplate leser (Ultra Microplate Reader).

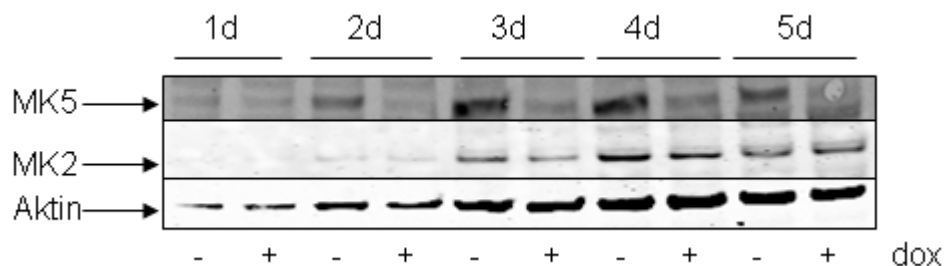
3.9 Flow cytometry (FCM)

Flow cytometri (FCM) er en måte å måle visse fysiske og kjemiske egenskapene til celler som passerer i en flytende strøm gjennom et laserlys. Begrepet ”flow cytometri” stammer fra måling (meter) av enkeltceller (cyto) som de strømmer forbi en rekke detektorer. Dermed kan vi analysere cellesyklusen/cellevekst i form av proliferasjon, differensiering, modning, apoptose og nekrose. Vi benytter denne maskinen til å sortere celler ved hjelp av fluorescens aktivert celledatering (FACS) (se resultater og Appendiks 9.1 Celledatering i flow cytometri (FCM) maskinen).

4 RESULTATER

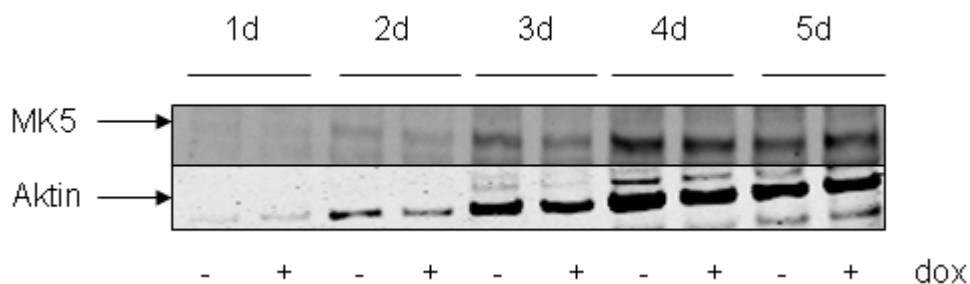
4.1 Nedregulere endogent uttrykket av MK5 med shRNA

Før dette forsøket hadde vi laget en Hela cellelinje (MK5) som uttrykker shRNA mot MK5 fra en tetracyclin induisert promotor [37]. I denne cellelinja ønsker vi ved hjelp av tetracyclin (dox) å inducere shRNA som selektivt nedregulere det endogene uttrykket av MK5. I dette eksperimentet ønsker vi å undersøke effektiviteten av MK5 nedslag (knockdown) ved tetracyclin induksjon med hjelp av western blott analyse. Figur 4.1 viser nivået av endogent uttrykk av MK5 med og uten tilsatt dox 1,2,3,4,5 dager etter tilsatt dox (1µg/ml medium). Det ble observert et tydelig bånd på 55 kDa som er forventet molekylstørrelse til MK5 i celler uten dox behandling. Etter andre dagen ser vi at MK5 forsvinner i celler med dox behandling. For å teste at det shRNA vi uttrykker faktisk nedregulerer kun MK5 og ikke den nært beslektede kinasen MK2, analyserte vi membranen med antistoff rettet mot MK2. Figur 4.1 viser også at MK2 er tilstedet selv med tilsatt dox. Det ble observert et tydelig bånd på 47 kDa som er forventet molekylstørrelse til MK2. Dataene presentert i figur 4.1 viser at på MK5 båndene er det ingen forskjell på dag 1, men på dag 2 ser vi at MK5 uttrykket forsvinner og det varer helt til dag 5. På MK2 båndene ser vi at det er likt fra dag 1 til dag 5.



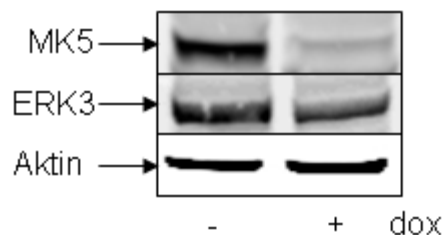
Figur 4.1 Western blott analyse av endogent uttrykk av MK5 og MK2 i Hela celler (MK5) med og uten dox behandling: 200 000 Hela celler MK5 ble sådd ut, og tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet hver dag fra dag 1 til dag 5. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (A7) rettet mot MK5. Deteksjon av aktin uttrykk på membranene er inkludert som kontroll på mengde protein fra hvert cellelysatsatt på gelen.

Som kontroll hadde vi en Hela cellelinje (Scr) som uttrykker kontroll shRNA (Scr) fra samme tetracyclin induisert promotor. Eksperimentet beskrevet i figur 4.2 er satt opp likt som i figur 4.1. Westernblottet med antistoff rettet mot MK5 med ekstrakter fra celler med og uten uttrykk av Scr shRNA viser at det ikke skjer noe nedregulering av MK5 uttrykk med Scr shRNA (figur 4.2). Protein nivået på western blottet ble undersøkt ved å analysere blottet med antistoff rettet mot aktin.



Figur 4.2 Western blott analyse av endogent uttrykk av MK5 i Hela celler (Scr) med og uten dox behandling: 200 000 Hela celler (Scr) ble sådd ut, og tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet hver dag fra dag 1 til dag 5. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (A7) rettet mot MK5. Deteksjon av aktin uttrykk på membranene er inkludert som kontroll på mengde protein fra hvert cellelysat satt på gelen.

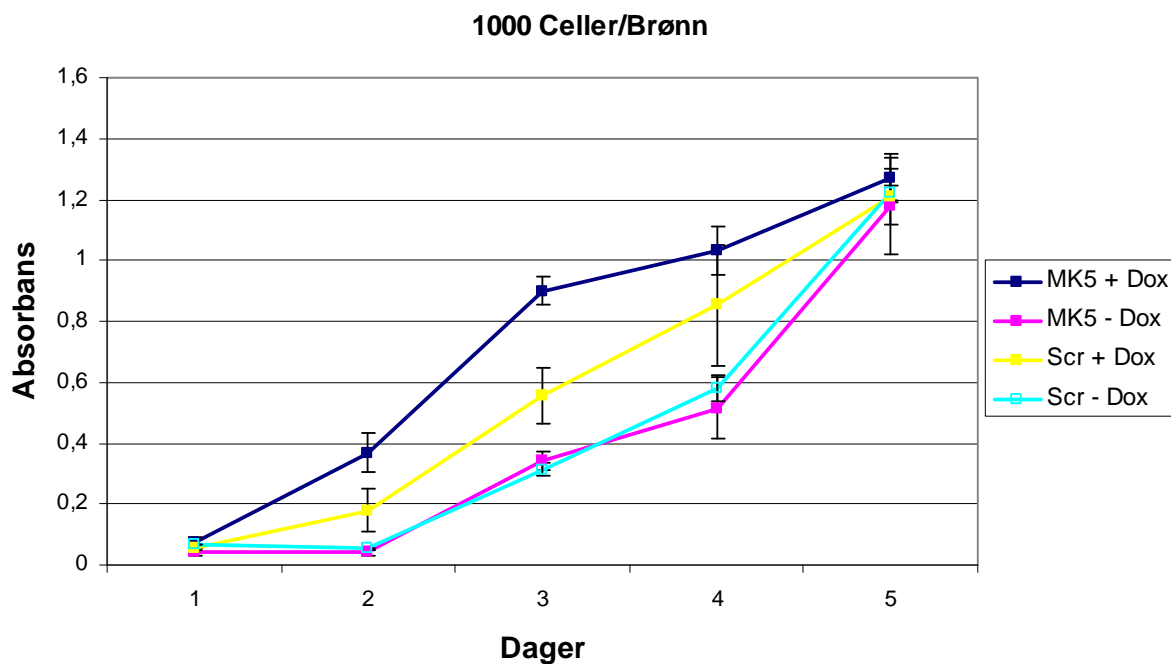
Tidligere publikasjoner har vist en klar sammenheng mellom protein nivået til MK5 og protein nivået til interaksjonspartneren ERK3 [26,30]. Vi ønsket derfor å undersøke om nedregulering av MK5 med shRNA i våre Hela celler også medførte nedregulering av proteinnivået av ERK3. Figur 4.3 viser endogent uttrykk av MK5 og ERK3 i Hela celler (MK5) med og uten tilsatt dox. Det ble observert et tydelig bånd på 55 kDa som er forventet molekylstørrelse til MK5 og et bånd på 84 kDa som er forventet molekylstørrelsen til ERK3. Når MK5 blir borte i Hela celler med tilsatt dox så går ERK3 nivået ned også.



Figur 4.3 MK5 vs. ERK3: 200 000 HeLa celler (MK5) ble sådd ut, og tilsatt dox (1 μ g/ml medium). Cellene ble høstet 2 dager etter tilsetning av dox. Lysatet ble separert med SDS-PAGE og blottet over på en nitrocellulose membran. Membranen ble analysert med spesifikke primære antistoffer rettet mot MK5 (A7) og ERK3 (ERK3). Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på lik mengde protein fra hvert cellelysat satt på gelen.

4.2 Effekt på celleproliferasjon med og uten MK5

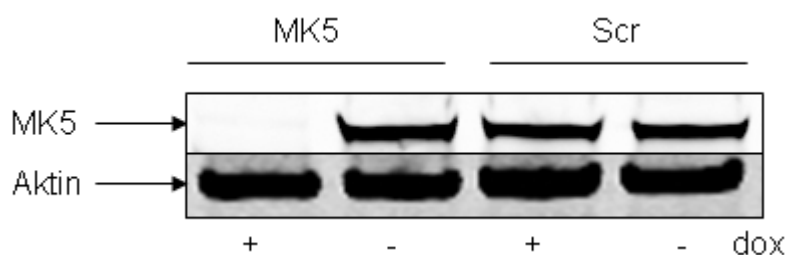
Tidligere studier har vist at fravær av MK5 i murine embryonale fibroblaster (MEF) resulterer i lavere proliferasjonsrate [31]. I dette forsøket ville vi undersøke om nedregulering av MK5 uttrykket i humane kreftceller (HeLa) har innvirkning på celleproliferasjon. HeLa celler med tetracyclin regulert uttrykk av shRNA spesifikt mot MK5 eller kontroll shRNA ble innkubert med dox for 48 timer før de ble sådd ut. Proliferasjon av cellene ble så undersøkt ved hjelp av MTS viabilitets assay i 5 dager. Figur 4.4 viser absorbansen av MTS / formazan i HeLa celler (MK5 og Scr) med og uten dox behandling. Absorbansen skal være proporsjonalt med celleviabilitet, som igjen er proporsjonal med antall celler. Ut fra observasjoner vises det at MK5 celler tilsatt dox vokser raskest. Når MK5 blir borte i MK5 celler tilsatt dox, vokser cellene raskere enn MK5 celler uten dox. Scr celler viser å vokse noe raskere enn Scr celler uten dox.



Figur 4.4 Cellevekst med og uten MK5: 1000 Hela celler (Scr og MK5) ble sådd ut i en 96 brønners dyrkningsbrett, og tilsatt dox (1 μ g/ml medium). Absorbansen ble målt fra dag 1 til dag 5. Forsøket ble utført med 3 paralleller hver. Stolpene indikerer (SD) Standardavvik (se Appendiks 9.2 Absorbans og SD for vekstkurven i figur 4.4).

For å teste at MK5 faktisk var borte i MK5 celler med tilsatt dox kjørte vi western blott av cellelysate av samme celletyper som det er brukt i MTS forsøket som ble vist i figur 4.4

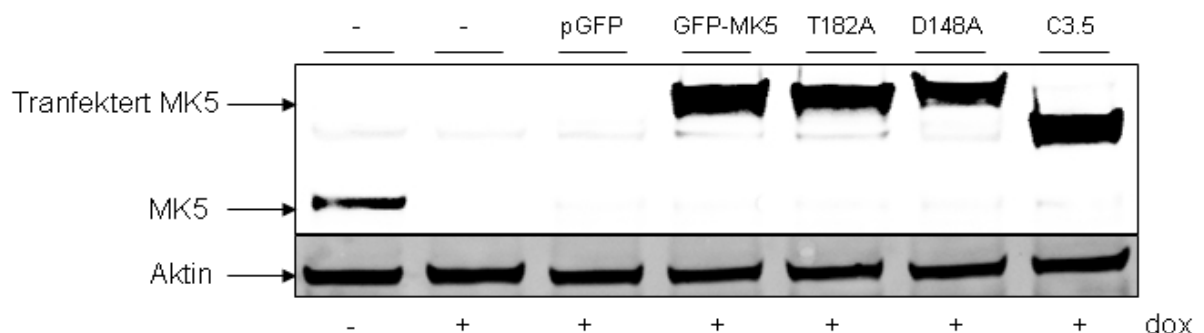
Figur 4.5 viser nedregulering av MK5 uttrykket med og uten dox i Hela celler (MK5 og Scr).



Figur 4.5 Nedregulering av endogent uttrykk av MK5 i Hela celler (MK5) og ikke i Hela celler (Scr) med og uten dox behandling: 250 000 Hela celler (Scr og MK5) ble sådd ut med og uten tilsatt dox (1 μ g/ml medium). Cellene ble høstet 2 dager etter dox behandling, rett før vi skulle starte med MTS forsøket. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (A7) rettet mot MK5. Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på lik mengde protein fra hvert cellelysate satt på gelen

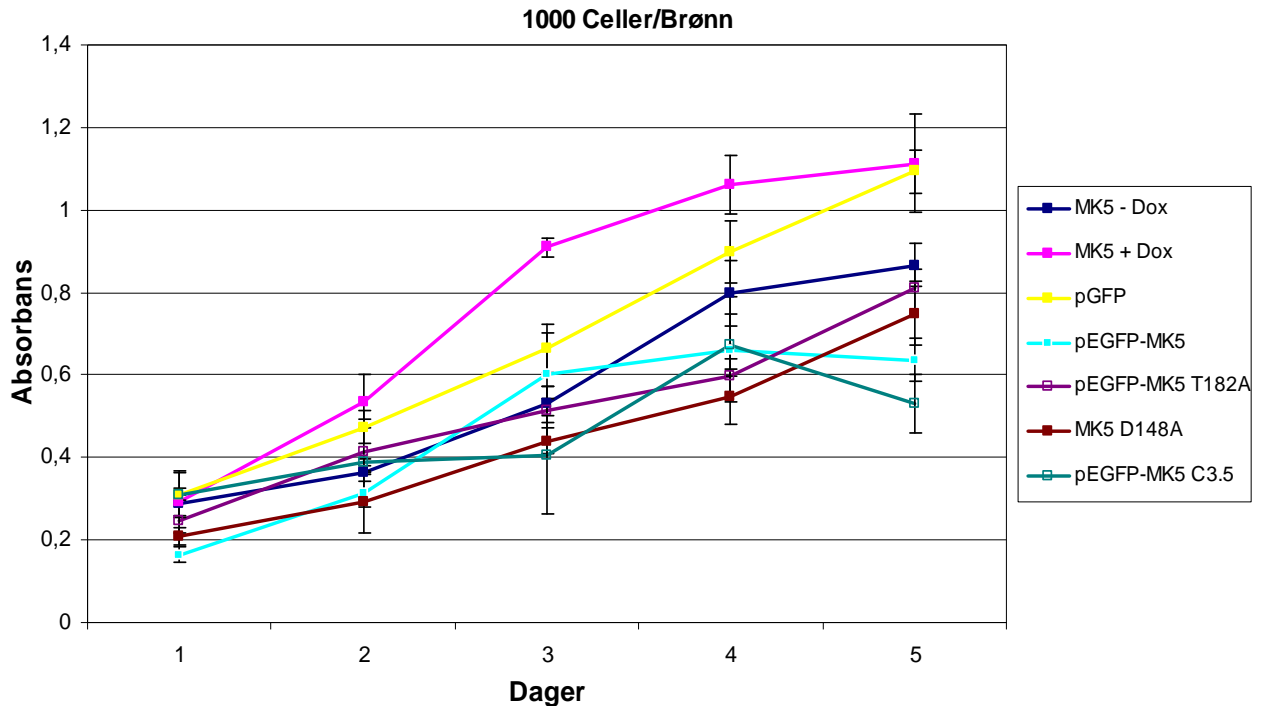
Nedregulering av MK5 uttrykk i Hela cellene viste at fravær av MK5 fører til økt proliferering. Hvis fravær av MK5 virkelig resulterer i økt celledeling burde reintroduksjon av MK5 uttrykk i de samme cellene motvirke denne økte celledelingen. Målsekvensen for shRNA rettet mot humant MK5 er ikke perfekt konservert i mRNAet for mus MK5 (3 mismatch). Vi kan derfor uttrykke fusjons protein av mus MK5 og EGFP i Hela cellene samtidig som uttrykket av endogent MK5 blir nedregulert av shRNA (Figur 4.6).

For å kunne undersøke om reintroduksjon av MK5 kunne reversere økt proliferering av Hela celler observert ved nedregulering av MK5 uttrykk, ble Hela celler transfektert med plasmider som koder for villtype og ulike mutanter av mus EGFP-MK5. De transfekterte Hela cellene ble så tilsatt dox og de EGFP uttrykkende Hela cellene ble sortert med FACS og sådd ut i 96 brønners dyrkningsbrett. Proliferering av utransfekterte og transfekterte celler ble undersøkt med MTS vialibilitets assay. Resultatene vist i figur 4.7 viser at reintroduksjon av EGFP-MK5 reverserer den økte prolifereringen observert ved fravær av MK5. Denne evnen av EGFPMK5 til å reversere de økte prolifereringen ser ut til å være uavhengig av MK5 sin kinase aktivitet i og med at de kinasedøde mutantene EGFPMK5 T182A og EGFPMK5 D148N hemmer prolifereringen like godt som villtype EGFPMK5. Evnen til MK5 i å regulere proliferering ser også til å være uavhengig av MK5 sin evne til å binde ERK3 siden en mutant av MK5 EGFPMK5 1-368 (EGFP MK5 C3.5) som ikke binder ERK3 [26] er like effektiv i å hemme proliferering som villtype MK5.



Figur 4.6 Western blott analyse av endogent uttrykk av MK5 i transfekterte celler:

250 000 Hela celler (MK5) ble sådd ut med og uten tilsatt dox (1 µg/ml medium). Cellene ble høstet 4 dager etter dox behandling og 2 dager etter transfeksjon, rett før vi skulle starte med MTS forsøket. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (A7) rettet mot MK5. Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på lik mengde protein fra hvert cellelysat satt på gelen.



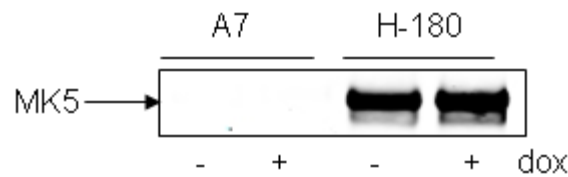
Figur 4.7 Cellevekst med forskjellige plasmider transfektert i Hela celler (MK5):

1000 Hela celler (MK5) med og uten transfeksjon ble sådd ut i en 96 brønners dyrkningsbrett, og tilsatt dox ($1\mu\text{g/ml}$ medium). Absorbansen ble målt fra dag 1 til dag 5. Forsøket ble utført med 3 paralleller hver. Stolpene indikerer (SD) Standardavvik (se Appendiks 9.3 Absorbans og SD for vekstkurven i figur 4.7).

4.3 IP / kryssbinding med MK5

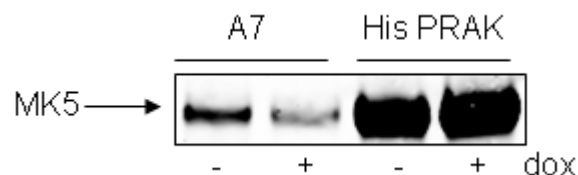
Hensikten med kryssbinding og IP var å finne et antistoff som egnet seg best til å isolere og konsentrere MK5 fra celleekstrakter med flere tusen ulike proteiner. Problemet er at MK5 og den tunge kjeden på IgG har samme molekylvekt og vil vandre likt på gelen. Dette gjør at vi kan få problemer med å detektere MK5 etter IP hvis de sekundære antistoffene vi bruker binder IgG som vi har brukt i IPen. Immunopresipiteringen ble utført med antistoffene A7, polyklonalt kanin H-180 og en sau polyklonalt His PRAK rettet mot MK5. Resultatene fra IPene skulle så sammenlignes og det beste antistoffet skulle bli brukt i selvet forsøket.

Figur 4.8 viser immunopresipitering med A7 og H-180. I dette forsøket ble det brukt cellelysatene fra MK5 Hela celler som er høstet etter 2 dager med og uten dox behandling. Det ble brukt et monoklonalt mus antistoff A7 og et polyklonalt kanin H-180 begge rettet mot MK5 for IP. Resultatet viser at IgG løsnes under oppvarming og tilsetning av samplebuffer og vi får et bånd på H-180 med dox som representer kryssbinding mellom IgG og sekundær antistoff. Andre ting som ble observert var ingen bånd på A7 verken med eller uten dox.



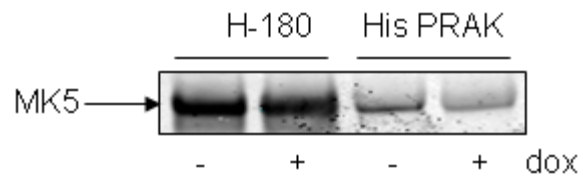
Figur 4.8 Western blott analyse av immunopresipitering med A7 og H-180 med og uten dox behandling: 200 000 Hela celler (MK5) ble sådd ut, og tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet 2 dager etter tilsetning av dox. Cellelysatene ble immunopresipitert med antistoffene A7 og H-180 koblet til magnetiske kuler. Membranen ble detektert med spesifikk primær sau antistoff (His PRAK) rettet mot MK5.

Figur 4.9 viser immunopresipitering med A7 og His PRAK. Også i dette eksperimentet ble det brukt cellelysatene fra MK5 Hela celler med og uten dox. Det ble brukt antistoffene A7 og sau polyklonalt His PRAK antistoff. Resultatet her viser også at IgG løsner etter tilsetning av samplebuffer og oppvarming og vi får et bånd på samme størrelse som MK5 som maskerer MK5 signalet fra His PRAK antistoffet. Andre båndene på A7 viser at MK5 forsvinner hos A7 med tilsatt dox.



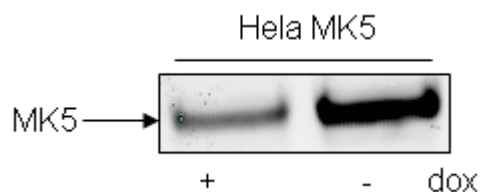
Figur 4.9 Western blott analyse av immunopresipitering med A7 og His PRAK med og uten dox behandling: 200 000 Hela celler (MK5) ble sådd ut, og tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet 2 dager etter tilsetning av dox. Cellelysatene ble immunopresipitert med antistoffene A7 og His PRAK koblet til magnetiske kuler. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (H-180) rettet mot MK5.

Figur 4.10 viser immunopresipitering med H-180 og His PRAK. I dette forsøket ble det brukt cellelysatsene fra MK5 Hela celler med og uten dox. Det ble brukt antistoffene H-180 og His PRAK antistoff. Resultatet her viser også at IgG løsner under oppvarming og tilsetning av samplebuffer og vi får et bånd på samme størrelse som MK5 som maskerer MK5 signalet fra H-180 antistoffet. Andre båndene på His PRAK viser at MK5 forsvinner hos His PRAK med tilsatt dox.



Figur 4.10 Western blott analyse av immunopresipitering med H-180 og His PRAK med og uten dox behandling: 200 000 Hela celler (MK5) ble sådd ut, og tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet 2 dager etter tilsetning av dox. Cellelysatsene ble immunopresipitert med antistoffene H-180 og His PRAK koblet til magnetiske kuler. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (A7) rettet mot MK5.

Etter tre forsøk med immunopresipitering kom vi frem til at vi skal kryssbinde magnetiske kuler og antistoffet slik at hydrogen bindinger mellom de to erstattes av kovalente bindinger. Dette fører til at disse bindingene ikke brytes ned under tilsetning av samplebuffer og oppvarming, sånn at vi slipper å få en ekstra bånd ved 55 kDa som er den opprinnelige størrelsen til MK5. Figur 4.11 viser kryssbinding med A7. I dette forsøket ble det brukt cellelysatsene fra Hela celler (MK5) med og uten uttrykk av shRNA mot MK5. Cellene ble høstet etter 2 dager med og uten tilsatt dox. Det ble brukt antistoffet A7 for kryssbinding til magnetiske kuler og His-PRAK for deteksjon av MK5. Resultatet som ble observert var vellykket. Et svakere bånd på MK5 i celler som uttrykker shRNA mot MK5 som reflekterer mindre uttrykk av MK5 i dette ekstraktet. Samtidig ser vi at MK5 båndet ser mye kraftigere ut pga isolert og konsentrert MK5 fra celleekstraktene.



Figur 4.11 Western blott analyse av kryssbinding med A7 med og uten dox behandling:

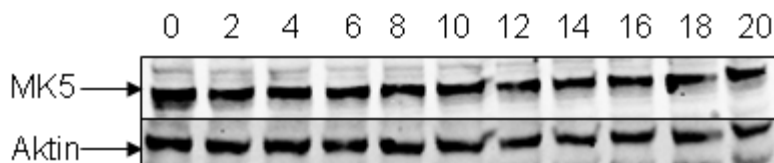
200 000 HeLa celler (MK5) ble sådd ut, og tilsatt dox (1 µg/ml medium). Cellene ble høstet 2 dager etter tilsetning av dox. Cellelysaten ble immunopresipitert med antistoffene A7 kryssbindet til magnetiske kuler. Membranen ble detektert med spesifikk primær polyklonalt sau-antistoff (His-PRAK) rettet mot MK5.

4.4 Synkronisering av HeLa celler (S3)

Ut i fra våre resultater ser det ut som MK5 kan ha en rolle i cellesyklus progresjon i HeLa celler. På bakgrunn av dette ønsket vi å undersøke om MK5, ERK3 eller MK5 aktivitet kunne variere under cellesyklus progresjon. Celler kan bli synkronisert på flere måter. Dobbelthymidin blokk er en av de mest vanlig måter å synkronisere HeLa celler. Thymidin Stopper celler i DNA-syntese fasen (S-fase). I Følge referansene [39,40] vil cellene gå gjennom S-fasen innen de første 4-5 timer etter løslatelse fra den andre blokken, og nå G2/M faseovergangen etter 6-10 timer. Cellene entrer G1 grensen etter ca 12 timer, og går gjennom G1-fasen innen 7-8 timer. Cellene går inn i en ny celle syklus 20-21 timer etter thymidin blokken. Siden vi ikke fikk tid til å kjøre flow cytometry på de synkroniserte cellene, så er det vanskelig å vite nøyaktig i hvilke cellesyklus fase disse cellene befinner seg til en hver tid.

4.4.1 Direkte western av MK5 nivå gjennom cellesyklus progresjon

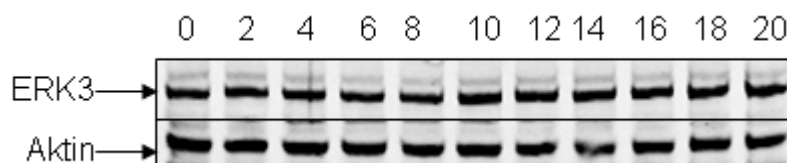
Det ble utført en direkte western blott for MK5 nivået i synkroniserte HeLa celler (S3) for å se om MK5 nivået varierer gjennom cellesyklus progresjon. Resultatet på figur 4.12 viser først en liten økning i MK5 nivå ved tidspunktet null, og deretter en jevn, liten nedgang av MK5 nivå utover gjennom cellesyklusen.



Figur 4.12 Direkte western blot analyse av endogent uttrykk av MK5 i synkroniserte Hela celler (S3): 500 000 Hela celler (S3) ble sådd ut, og synkronisert med dobbelt thymidin blokk. Cellene ble høstet hver 2. time. Proteinnivået i cellelysaten ble målt og justert til en jevn proteinkonsentrasjon i alle cellelysaten. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (A7) rettet mot MK5. Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på mengde protein fra hvert cellelysatt satt på gelen.

4.4.2 Direkte western av ERK3 nivå gjennom cellesyklus progresjon

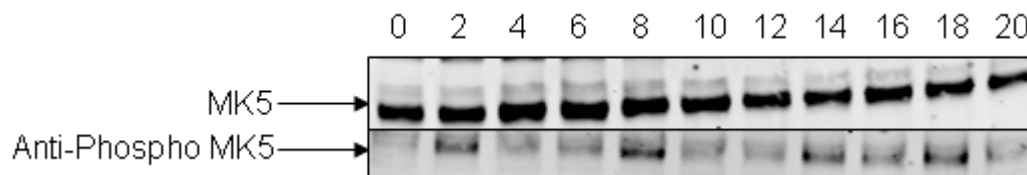
Det ble utført en direkte western blott for ERK3 nivået i synkroniserte Hela celler (S3) for å se om ERK3 nivået varierer gjennom cellesyklus progresjon. I motsetning til MK5 viser figur 4.13 en jevn nivå av ERK3 gjennom hele cellesyklusen. Dette resultatet viser at MK5 og ERK3 nivå trenger ikke å være likt i cellen selv om begge interagerer med hverandre og mengden er proporsjonal.



Figur 4.13 Direkte western blot analyse av endogent uttrykk av ERK3 i synkroniserte Hela celler (S3): 500 000 Hela celler (S3) ble sådd ut, og synkronisert med dobbelt thymidin blokk. Cellene ble høstet hver 2. time. Proteinnivået i cellelysaten ble målt og justert til en jevn proteinkonsentrasjon i alle cellelysaten. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (ERK3) rettet mot ERK3. Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på lik mengde protein fra hvert cellelysatt satt på gelen.

4.4.3 MK5 og fosforylert MK5 nivå gjennom cellesyklus progresjon

For å teste MK5 og fosforylert MK5 nivået i de synkroniserte cellene ble det benyttet IP med kryssbinding. Figur 4.14 viser MK5 og fosforylert MK5 nivå gjennom cellesyklusen. Figuren viser litt økt nivå av MK5 i tidspunktene 4, 6 og 8 timer. Samtidig ble det observert en økt aktivitet i form av MK5 fosforylering etter 2, 8, 14 og 18 timer. Det som er interessant å merkes seg er at fosforyleringen av MK5 skjer uavhengig av MK5 nivå i cellesyklusen. Det hadde hvert interessant å finne ut i hvilke del i cellesyklus fasen cellene befinner seg i de tidspunktene som det vises en økning i fosforyleringsaktivitet.



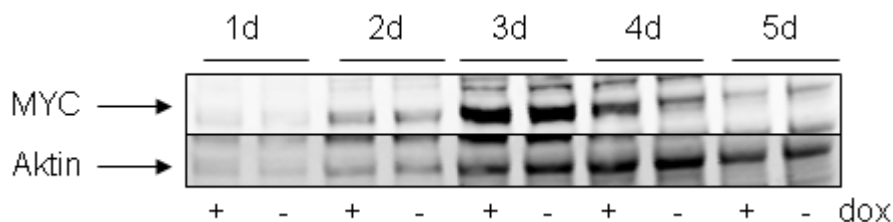
Figur 4.14 Western blot analyse av endogent uttrykk av MK5 og fosforylert MK5 i synkroniserte HeLa celler (S3): 500 000 HeLa celler (S3) ble sådd ut, og synkronisert med dobbelt thymidin blokk. Cellene ble høstet hver 2. time. Proteinnivået i cellelysaten ble målt og justert til en jevn proteinkonsentrasjon i alle cellelysaten. Cellelysaten ble immunopresipitert med magnetisk kule kryssbundet til A7. Membranene ble detektert med spesifikke primære antistoffer (A7 og phospho-MK5) rettet mot MK5 og fosforylert MK5.

4.5 MYC gen ekspresjon i nedregulerte MK5 celler

En studie viser fravær av MK5 i HeLa celler fører til økt celledeling og brattere vekstkurve pga økt mengde MYC uttrykk [41]. Proto-onkogenet MYC koder for proteiner i ulike signalsystemet som spiller en sentral rolle i cellevekst og celledeling. Uttrykk for Proto-onkogenet MYC er nedregulert som svar på stress signaler. I tillegg er MK5 nødvendig for transkripsjon av MYC-genet [41,42]. MK5 er nedregulert i mange former av kreft som for tykktarmskreft. MK5 regulerer transkripsjon av MYC, ved å aktivere Mir-34b/c via fosforylering av FOXO3a uttrykket. Uttrykk for MK5 blir igjen direkte aktivert av MYC, via negativ feedback loop MYC og dermed hindrer cellen i å vokse og dele seg [41,42]. I normale tarmepitel vev, fører MK5 fosforylering av FoxO3a til økt uttrykk av Mir34b/c, som fører til nedregulering av MYC proteinuttrykket i cellen [41,42]. Under kolorektal-adenom

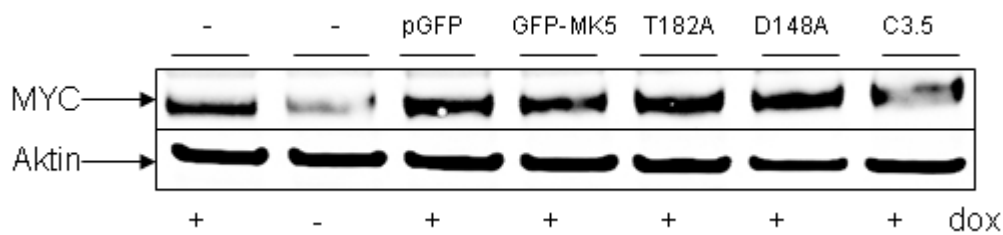
formasjonen (bening tumor), øker MYC uttrykk litt men er fortsatt delvis kontrollert av Mir34b/c uttrykk. Under kolorektal-adenokarsinom (malignt tumor) er kontroll av MYC uttrykk forstyrret via tap av MK5 og eller Mir34b/c uttrykk. Dette fører til at ytterligere akkumulering av MYC [41,42].

I dette forsøket ville vi se på nivået av MYC protein i celler hvor vi har nedregulert MK5 uttrykket. Figur 4.15 viser resultatene av western blott som er gjort for Hela celler MK5 med og uten tilsatt dox i fem dager. Det ble observert et bånd på ca 60 kDa i figur 4.15 som er forventet molekylstørrelse til MYC. I ekstrakter fra celler høstet etter dag 1 til 3 ser vi at MYC nivået er ganske like i celler med og uten MK5. Ved dag 4 ser vi ganske stor forskjell mellom celler med og uten uttrykk av MK5.



Figur 4.15 MK5 er viktig for MYC protein nivå etter 4 dager med dox: 200 000 Hela celler MK5 ble sådd ut, og tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet hver dag fra dag 1 til dag 5. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (c-Myc D84C12) rettet mot MYC. Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på mengde protein fra hvert cellelysat satt på gelen.

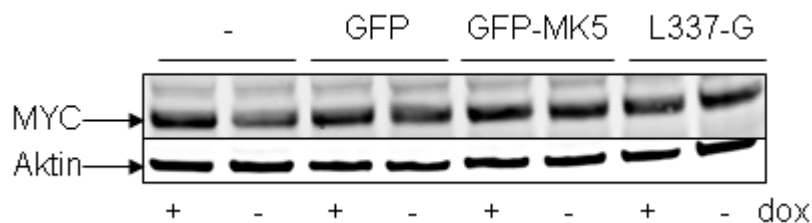
Hvis fravær av MK5 medfører økt nivå av MYC burde reintroduksjon av MK5 føre til nedregulering av MYC. For å kunne undersøke MYC nivået ved reintroduksjon av MK5 ble det brukt Hela celler transfektert med plasmider som koder for villtype og ulike mutanter av mus EGFP-MK5. Det ble kjørt western blott av cellelysater med og uten transfeksjon etter 4 dager med tilsatt dox. Vi hadde forventet at MYC nivået skulle bli noe mindre ved reintroduksjon av MK5 i transfekterte celler. Men resultatet på figur 4.16 viste noe annet i motsetningen til det vi hadde forventet, økte MYC nivå i transfekterte celler. Det ble observert et bånd på ca 60 kDa som er forventet molekylstørrelse til MYC.



Figur 4.16 Western blott av endogent uttrykk av MYC i transferte HeLa celler (MK5):

250 000 HeLa celler (MK5) ble sådd ut med og uten tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet 4 dager etter dox behandling og 2 dager etter transfeksjon. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (anti-Myc 9E10) rettet mot MYC. Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på lik mengde protein fra hvert cellelysat satt på gelen.

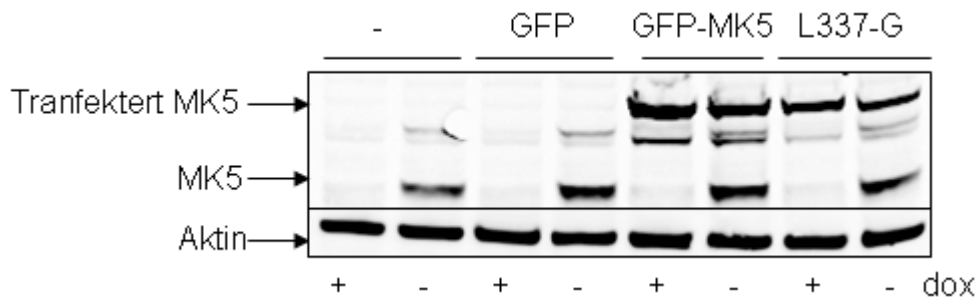
I Referansen [41] ble det sagt at i celler med MK5 mutanten (L337G) går MYC nivået ned dersom MK5 blir aktivert eller er tilstedet. Dermed kjørte vi en western blott for å dobbelt sjekke at MYC nivået virkelig går ned dersom MK5 ble reintrodusert. Figur 4.17 viser at MYC nivået er nesten likt både i GFP-MK5 og i L337-G, men i vanlige HeLa celler MK5 og litt i GFP, er MYC nivået litt mindre når MK5 er tilstedet.



Figur 4.17 Nedregulering av endogent uttrykk av MYC i utransferte og transferte HeLa celler (MK5) med og uten dox behandling:

250 000 HeLa celler (MK5) ble sådd ut med og uten tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet 4 dager etter dox behandling og 2 dager etter transfeksjon. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (anti-Myc 9E10) rettet mot MYC. Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på lik mengde protein fra hvert cellelysat satt på gelen.

For å teste om uttrykket fusjonsprotein av mus MK5 og EGFP i Hela cellene samtidig som uttrykket av endogent MK5 ble nedregulert av shRNA var vellykket, kjørte vi western blott analyse av celleekstraktene. Figur 4.18 viser nedregulering av MK5 uttrykket med og uten dox i transfekterte Hela celler (MK5) ved 55 kDa (nederste båndet) og mus MK5 uttrykk i transfekterte Hela celler (MK5) ved ca 70 kDa (øverste båndet).



Figur 4.18 Nedregulering av endogent uttrykk av MK5 i utransfekterte og transfekterte Hela celler (MK5) med og uten dox behandling: 250 000 Hela celler (MK5) ble sådd ut med og uten tilsatt dox (1µg/ml medium). Cellene ble høstet 4 dager etter dox behandling og 2 dager etter transfeksjon. Membranen ble detektert med spesifikk primær antistoff (A7) rettet mot MK5. Deteksjon av aktin uttrykk på membranen er inkludert som kontroll på lik mengde protein fra hvert cellelysat satt på gelen.

5 DISKUSJON

Resultatene i denne oppgaven er kort oppsummert i disse punktene:

- Nedregulering av MK5 i Hela cellelinje (MK5) med dox behandling, fører til raskere cellevekst.
- Reintroduksjon av MK5 reverserer den økte prolifereringen observert ved fravær av MK5.
- Evnen til MK5 i å reversere de økte prolifereringen er uavhengig av MK5 sin kinaseaktivitet og MK5 sin evne til å binde ERK3.
- Kinaseaktiviteten og nivået av MK5 varierer til en hver tid mens ERK3 nivået holder seg nesten stabil i cellyklusen.
- Både nedregulering og reintroduksjon av MK5 fører til økt MYC nivå.

Resultatene vil her bli diskutert videre.

For dette forsøket hadde vi lagd Hela cellelinje (MK5) som uttrykket et shRNA mot MK5 fra en tetracyclin induisert promotor, som spesifikt nedregulerte uttrykket av MK5. Som kontroll hadde vi en Hela cellelinje (Scr) som uttrykket kontroll shRNA fra en tetracyclin induisert promotor. For å kunne gå videre med det måtte vi først bli sikker på nedreguleringen av MK5 før vi startet med selvet forsøket. Det ble derfor kjørt flere kontroll forsøk for å være sikker på nedreguleringen av MK5 i Hela cellene. Det var tydelig fra observasjon av western blott analyse at MK5 forsvinner etter 2 dager med tilsatt dox. Denne nedreguleringen var selektiv rettet mot kun MK5 og ikke den nært beslektede kinasen MK2. Av western blott analysene på figurene 4.1 og 4.2 ser vi svake bånd i dagene 1 og 2 som etter vært blir sterkere. Det kan være pga lite antall celler som resulterer til lite mengde proteiner i cellelysatenene. Etter hvert som celletallet stiger, øker proteinkonsentrasjon i cellelysatenene og båndene blir sterkere. Konklusjonen fra dette forsøket er at vi selektivt får slått ned uttrykket av MK5 i våre Hela celler ved hjelp av dox induksjon. Vi kunne derfor gå videre med selve hovedprosjektet, nemlig å undersøke behovet for MK5 i celleproliferasjon.

Ved testing av hvilke effekt MK5 har på celleproliferasjon ble det observert at MK5 har en viktig rolle i cellyklus progresjon. I motsetning til en studie som viste at fravær av MK5 i murine embryonale fibroblaster (MEF) resulterer til lavere proliferasjonsrate [31], viste vår studie at fravær av MK5 i humane kreftceller (Hela-MK5) med dox behandling, fører til raskere proliferasjonsrate. Det er vanskelig å si hvorfor vi har fått to forskjellige resultater her. En av årsakene kan være at studiene har benyttet ulike cellysystemer. Vi har brukt Hela celler som er opprinnelig livmorhalskreft celler av human epitelceller mens i studien [31] har de brukt murine embryonale fibroblaster som er en bindevevs celle fra muse embryo. Forskjellen er at de to cellene er fra to forskjellige individer, fra to forskjellige cellytype og i to forskjellige miljøer.

For å undersøke om reintroduksjon av MK5 kunne reversere den økte proliferering av Hela celler ble det benyttet Hela celler transfektert med villtype og ulike mutanter av mus EGFP-MK5. Resultatene fra dette forsøket viste at reintroduksjon av EGFP-MK5 reverserer den økte prolifereringen observert ved fravær av MK5. Interessant nok ser det ut til at kinaseaktiviteten til MK5 ikke er nødvendig for evnen av EGFPMK5 til å reversere den økte prolifereringen, siden de kinasedøde mutantene EGFPMK5 T182A og EGFPMK5 D148N hemmet prolifereringen like godt som villtype EGFPMK5. Flere studier har vist at bindingspartneren og aktivatoren til MK5, ERK3 er involvert i regulering av cellyklus [26]. Våre resultater indikerer at evnen til MK5 i å regulere proliferering var uavhengig av MK5 sin evne til å binde ERK3 siden mutanten av MK5 EGFPMK5 1-368 (EGFP MK5 C3.5), som ikke binder ERK3, var like effektiv i å hemme proliferering som villtype MK5.

Ved testing av hvilken metode som ga best immunopresipitering av MK5 for analyse av fosforyleringsstatus ble det observert at immunopresipitering med kryssbinding var den eneste metoden som kunne brukes for å kunne dra ned MK5 selektiv på en best mulig måte benyttet vi derfor av kryssbinding og IP metoden. Kryssbindingen mellom magnetisk kule og primær antistoff er meget sterk og spesifikk, slik at IgG ikke løsner under oppvarming eller ved tilsetning av samplebuffer. Videre ville vi undersøke om aktiviteten (fosforylering av Threonine 182 aktiverings-loopen til MK5) og nivået av MK5 varierte med progresjon gjennom cellyklus. Tidligere publikasjoner har vist en klar sammenheng mellom protein nivået til MK5 og protein nivået til interaksjonspartneren ERK3 [26,30]. Vi observert at kinaseaktiviteten og nivået av MK5 varierer mens ERK3 nivået holder seg nesten stabil i cellyklusen. Resultatene fra dette forsøket viser økt MK5 nivå ved tidspunktet null, og

deretter en jevn, liten nedgang av MK5 nivå utover gjennom cellesyklusen. I motsetning til MK5 nivå ble det observert en jevn nivå av ERK3 nivå gjennom hele cellesyklusen. Når det gjelder fosforylering av MK5 virker det som fosforyleringen av MK5 skjer uavhengig av MK5 og ERK3 nivå i cellesyklusen. Det ble observert en økt aktivitet i fosforylering etter 2, 8, 14 og 18 timer. Det var vanskelig å fullføre dette forsøke helt pga tidsbegrensninger. Dermed var det vanskelig å fastslå nøyaktig i hvilke fase av cellesyklusen MK5 er nødvendig. Hvis jeg hadde fått nok tid ville jeg parallelt med cellehøstingen, fiksere synkroniserte Hela celler til bestemte tider og kjøre FACS i flow cytometry maskin til å fast slå i hvilke del av cellesyklus cellene befant seg i, ved ulike tidspunkt etter frislipp fra dobbelt thymidin blokkering.

Hela celler er et mye studert system for å studere cellesyklus progresjon og vi kan fra litteraturen estimere hvilken del av cellesyklus cellen er etter frislipp fra synkronisering med dobbelt thymidin behandling. [39,40] I følge disse to referansene stopper dobbelt thymidin behandlede celler i G1/DNA-syntese fasen (S-fase). Dermed vil cellene gå gjennom S-fasen innen de første 4-5 timer etter løslatelse, og nå G2/M faseovergangen etter 6-10 timer. Cellene entrer G1 grensen etter ca 12 timer, og går gjennom G1-fasen innen 7-8 timer. Cellene går inn i en ny celle syklus 20-21 timer etter thymidin blokken. Sånn som det er blitt observert økt aktivitet i fosforylering etter 2, 8, 14 og 18 timer viser det seg at den første økningen kan være i S-fasen hvor DNA syntetiseres, og den andre økte fosforyleringen kan trolig være i G2/M fase. Den tredje og fjerde økningen (14 og 18 timer) av fosforyleringen kan være i G1 fasen. Men det er litt uklar hvorfor to økte nivåer av MK5 fosforylering i samme fasen (G1). Det kan være fordi G1 fasen er den lengste cellesyklus fasen og den eneste fase som har to CDK-cyclin kompleksaktivitet tilstredet. De to CDK-cyclin kompleksene i G1 fasen er CDK4/6-cyclinD kompleks som forbereder cellen til neste fase som er S-fasen ved å stimulere ekspresjonen av enzymer, som er nødvendig for DNA replikasjon og CDK2-cyclin-E kompleks som fosforylerer proteiner i det såkalte pre-replikasjons komplekset og setter dermed DNA replikasjon i gang. CDK2-cyclinE komplekset starter hovedsakelig i sein G1 fase men varer til midten av S-fasen. ERK3 er vist i tidligere studier å danne et kompleks med cyclin-D3 [43]. En mulig forklaring kan være at et cyclin-D3/ERK3 dannet i sein G1/S fase kan påvirke MK5 aktiviteten.

I følge referansen [43] kan ERK3 interagere med cyklin-D3. Cyklin-D3 er samme som D1 og D2 en isomer av cyklin-D undergruppe som har en sentral rolle i cellesyklus progresjon i G1 fasen. Både in vitro og in vivo studiene viser at ERK3 interagerer direkte og spesifikt med cyklin-D3. Disse funnene utvider rollen til cyclin-D3 og potensialet til ERK3 aktivitet i celleproliferasjon. Det som gjør det funnet interessant er egenskapene cyklin-D3 har og som ikke finnes i verken cyklin-D1 eller cyklin-D2. Den fysiologiske og funksjonelle egenskapene av interaksjonen mellom cyklin-D3 og ERK3 må videre undersøkes for å belyse deres rolle i cellesyklusprogresjon [43].

En studie viser fravær av MK5 i Hela celler fører til økt celledeling og brattere vekstkurve pga økt mengde MYC uttrykk [41]. Proto-onkogenet MYC koder for proteiner i ulike signalsystemet som spiller en sentral rolle i cellevekst og celledeling. Disse genene stimulerer cellen til å vokse og dele seg. Uttrykk for proto-onkogenet MYC er nedregulert som svar på stress signaler. I tillegg er MK5 nødvendig for transkripsjon av MYC-genet og MK5 er nedregulert i mange former av kreft som for tykktarmskreft [41]. Vi ønsket derfor å undersøke nivået av MYC i våre Hela celler når vi nedregulerte MK5 uttrykket. Resultatene viste at dersom vi slår ut MK5 observerte vi at MYC nivået økte. Dette kan være en medvirkende årsak til at vi observerer økt cellevekst i fravær av MK5. I kontrast til dette observerte vi at reintroduksjon av EGFP-MK5 eller bare EGFP ved transfeksjon også gir økt nivå av MYC protein. Det er vanskelig å fastslå hva årsaken var til at MYC nivået økte ved reintroduksjon av MK5. Det hadde videre vært nyttig å kunne gjøre flere tester for å finne ut hva som gjør at MYC nivået øker ved reintroduksjon av MK5. I følge Kress et al gir overuttrykk av den aktive MK5 mutanten (L337G) nedregulering av MYC nivået [41]. Vi undersøkte derfor om overuttrykk av den samme mutanten også i våre celler kunne nedregulerer MYC nivået. Resultatet fra vårt eksperiment viste at MYC nivået blir uforandret i celler med mutantene GFP-MK5 og i L337-G, med derimot i vanlige Hela celler MK5 og litt i GFP, blir MYC nivået litt mindre når MK5 reintroduseres. Det er vanskelig her også å trekke noe bestemt konklusjon på hvorfor vi hadde fått to forskjellige resultater.

6 FREMTIDSPERSPEKTIV

Problemstillingen i denne oppgaven var å finne en rolle for MK5 i cellesyklus progresjon.

Problemstillingen var interessant fordi proteinkinaser er viktige for regulering av de fleste aspekter ved utvikling av kreft, inkludert ukontrollert celledeling, invasjon, angiogenese og metastasering. Det er derfor mye innsats i leting etter legemidler for kreftterapi med tanke på at insidensen til kreft vil trolig fortsette å øke i årene som kommer. Proteinkinaser er derfor blitt et ettertraktet mål for legemiddelutvikling. I dag brukes mer enn 30% R&D budsjettene til de store farmasøytiske selskapene til leting etter legemidler rettet mot proteinkinaser.

En av utfordringene for utvikling av målrettet kreftterapi slik som kinaseinhibitorer er behovet for detaljert kunnskap på molekylært nivå om målet for terapien. I denne oppgaven har vi funnet en rolle for proteinkinase MK5 i cellesyklus progresjon og neste steg vil være å teste MK5's rolle i kreftutviklingen.

De aller fleste cytostatika til nå blir designet med henblikk på å virke på bestemte cellulære substanser eller kinaser for å hemme deres interacellulære funksjoner. Hittil har det vært lite forskning på kinaseaktivatorer versus kinasehemmerens rolle i kreftbehandling. Ut i fra resultatene vi har fått i denne oppgaven blir aktivatoren til MK5 et ettertraktet mål i kreftbehandling siden økt MK5 nivå i cellen kan føre til nedsatt cellesyklus progresjon og cellevekst. Andre ting som ikke er undersøkt hittil og kan være interessant er MK5's rolle i invasjon og metastasering, siden to artikler peker på MK5/ERK3's rolle i aktivering av P21 aktivert kinase (PAK) [44,45]. PAK har en sentral rolle i invasjon og metastasering. Økt uttrykk av PAK (PAK1) fører til økt invasjon og metastasering, mens nedregulering av PAK1 uttrykk fører til redusert invasjon og metastasering ved kolorektal kreft [46].

7 KONKLUSJON

Kreft er nå den nest største folkesykdom etter hjertekarsykdommer i Norge og den nest andre viktigste årsak til død hos befolkningen [4]. Kunnskap om hvilke mekanismer som er involvert i kreftutviklingen er derfor viktige for forståelsen av sykdommen og utviklingen av nye behandlingsmetoder. Både mutasjoner og deregulering av MK5 genen kan være årsak til kreft (kolorektal cancer) hos mennesket [41,42].

Hovedfunnene som er gjort i forbindelse med de ulike forsøkene i denne studien viser at nedregulering av MK5 i HeLa celler fører til økt celledeling. Mekanismene bak dette er enda uklare, men MK5 er assosiert med uttrykk av MYC i forbindelse med cellevekst. Siden nedreguleringen av MK5 fører til økt MYC nivå i celler. Dette bekrefter tidligere funn som indikerer at nedregulering av MK5 fører til økt nivå av proto-onkogenet MYC.

8 REFERANSER

1. Dahl, O. Medikamentell kreftbehandling, Cytostatikaboken. (Farmakologisk institutt, Fakultetsdivisjon Rikshospitalet, Det medisinske fakultetet, Universitetet i Oslo, 2009).
2. Becker, W. M. The World of the cell. (Pearson/Benjamin Cummings, 2009).
3. Weinberg, R. A. The biology of cancer. (Garland Science, 2007).
4. <http://www.ssb.no/emner/03/01/10/dodsarsak/tab-2010-12-03-01.html>
5. Freddie, B., Cancer in Norway: Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway, (2008)
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674, doi:S0092-8674(11)00127-9 [pii] 10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
7. Mantovani, A. CANCER Inflaming metastasis. *Nature* 457, 36-37, doi:Doi 10.1038/457036b (2009).
8. Kumar, V. & Robbins, S. L. Robbins basic pathology. (Saunders Elsevier, 2007).
9. Fidler, I. J. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 70, 498-505, doi:S0301-4681(09)60460-6 [pii] 10.1046/j.1432-0436.2002.700904.x (2002).
10. Brooks, S. A., Lomax-Browne, H. J., Carter, T. M., Kinch, C. E. & Hall, D. M. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* 112, 3-25, doi:S0065-1281(08)00128-1 [pii] 10.1016/j.acthis.2008.11.022 (2010).
11. Webb, C. P. & Woude, G. F. V. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neuro-Oncol* 50, 71-87 (2000).
12. Duffy, M. J., McGowan, P. M. & Gallagher, W. M. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 214, 283-293, doi:10.1002/path.2282 (2008).
13. Nurse, P. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *Chembiochem* 3, 596-603, doi:10.1002/1439-7633(20020703)3:7<596::AID-CBIC596>3.0.CO;2-U (2002).
14. Lodish, H. Molecular cell biology. (Freeman, 2003).
15. Arellano, M. & Moreno, S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 559-573, doi:S1357-2725(96)00178-1 [pii] (1997).
16. Alberts, B. Essential cell biology. (Garland Science, 2010).

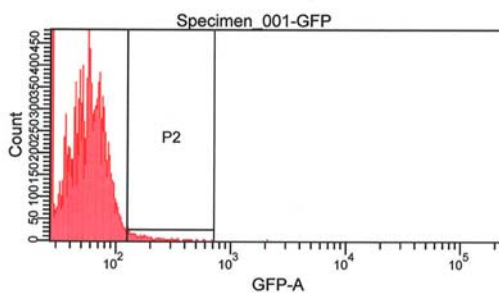
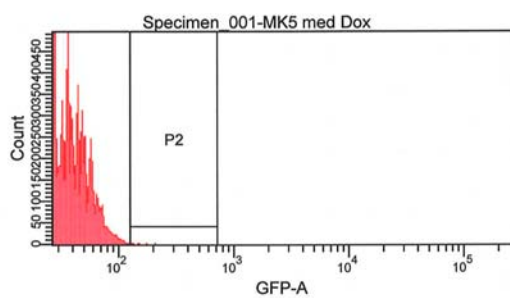
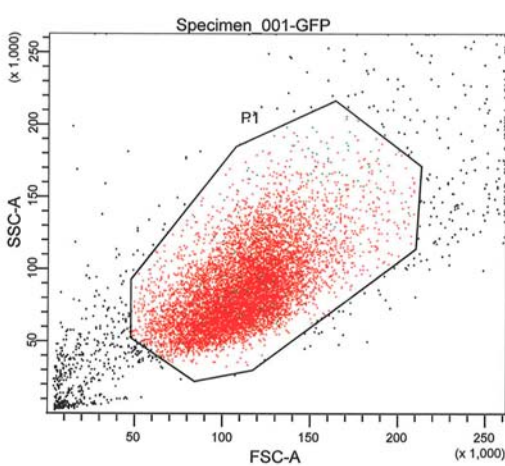
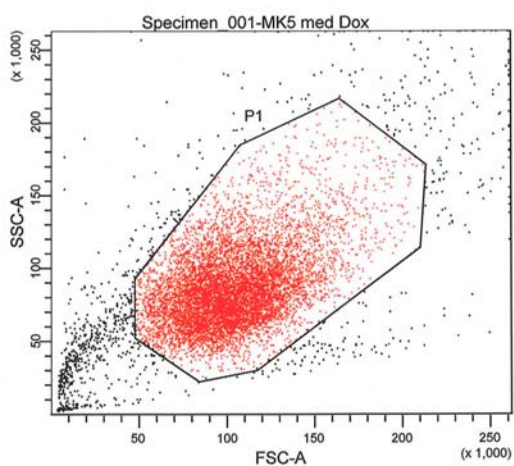
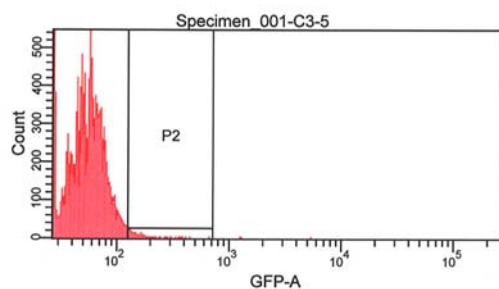
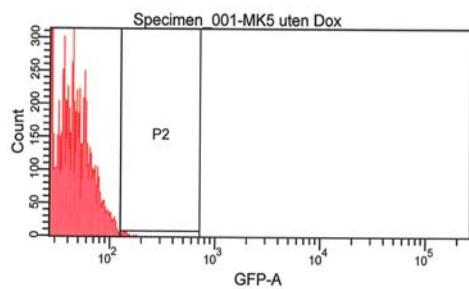
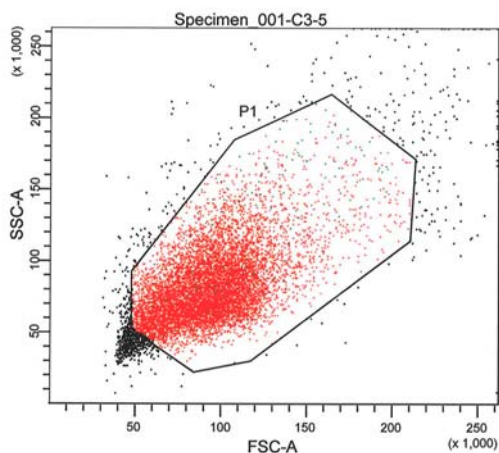
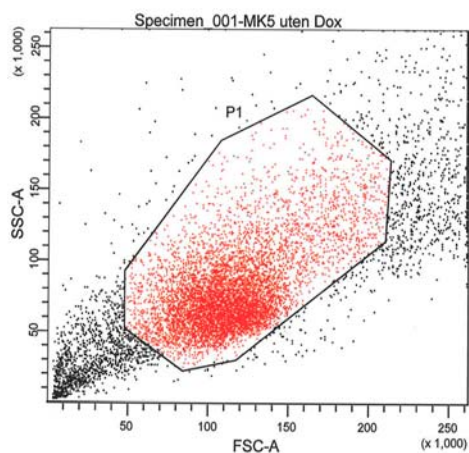
17. Massague, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298-306, doi:nature03094 [pii] 10.1038/nature03094 (2004).
18. Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T. & Vander, A. J. *Vander's Human physiology: the mechanisms of body function.* (McGraw-Hill, 2011).
19. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934, doi:10.1126/science.1075762 298/5600/1912 [pii] (2002).
20. Roux, P. P. & Blenis, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-344 (2004).
21. Coulombe, P. & Meloche, S. Atypical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. *Bba-Mol Cell Res* 1773, 1376-1387, doi:DOI 10.1016/j.bbamcr.2006.11.001 (2007).
22. Garrington, T. P. & Johnson, G. L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11, 211-218, doi:S0955-0674(99)80028-3 [pii] (1999).
23. Cargnello, M. & Roux, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol R* 75, 50-83, doi:Doi 10.1128/Mmbr.00031-10 (2011).
24. Gaestel, M. MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 120-130, doi:nrm1834 [pii] 10.1038/nrm1834 (2006).
25. Perander, M., Keyse, S. M. & Seternes, O. M. Does MK5 reconcile classical and atypical MAP kinases? *Frontiers in Bioscience* 13, 4617-4624 (2008).
26. Seternes, O. M. et al. Activation of MK5/PRAK by the atypical MAP kinase ERK3 defines a novel signal transduction pathway. *Embo Journal* 23, 4780-4791, doi:DOI 10.1038/sj.emboj.7600489 (2004).
27. Mikalsen, T., Johannessen, M. & Moens, U. Sequence- and position-dependent tagging protects extracellular-regulated kinase 3 protein from 26S proteasome-mediated degradation. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 2513-2520, doi:S1357-2725(05)00173-1 [pii] 10.1016/j.biocel.2005.06.007 (2005).
28. Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J. & Meloche, S. Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 4542-4558 (2003).
29. Aberg, E. et al. Regulation of MAPK-activated protein kinase 5 activity and subcellular localization by the atypical MAPK ERK4/MAPK4. *J Biol Chem* 281, 35499-35510, doi:M606225200 [pii] 10.1074/jbc. M606225200 (2006).

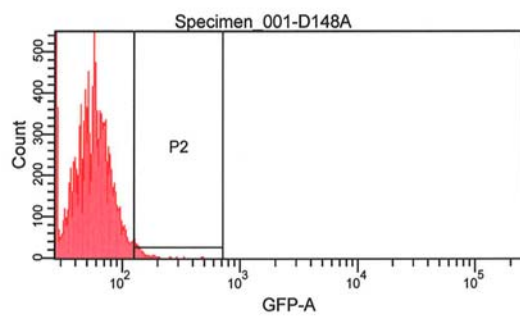
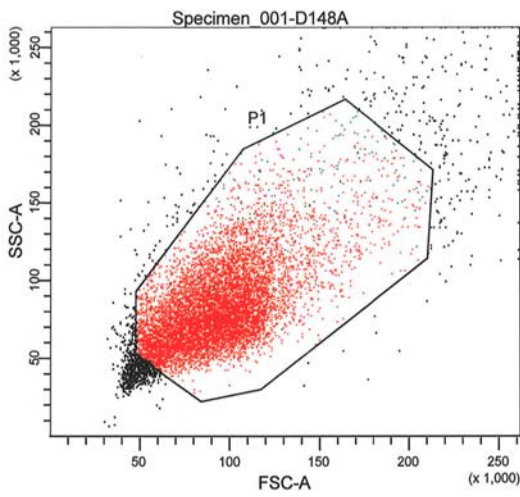
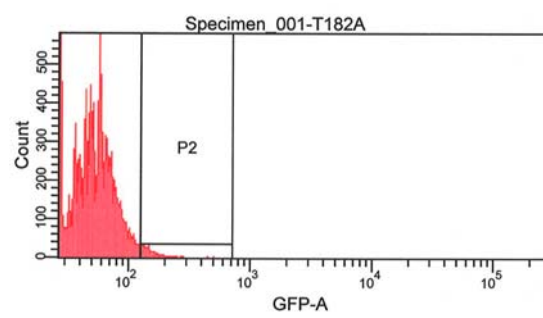
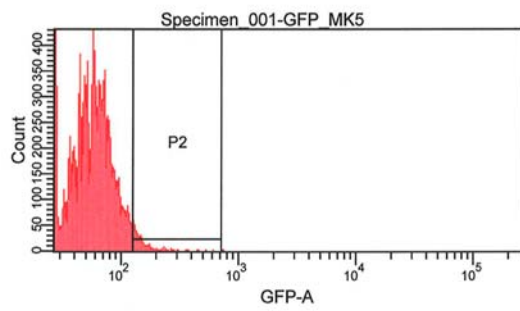
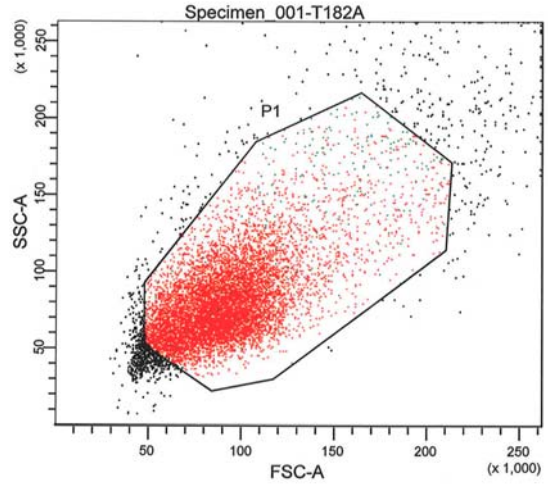
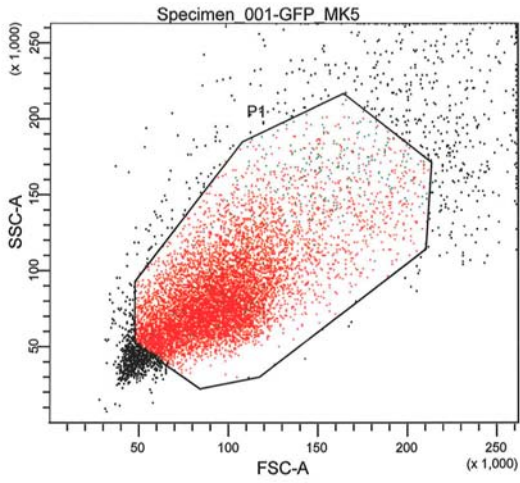
30. Aberg, E. et al. Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *J Biol Chem* 284, 19392-19401, doi:M109.023283 [pii] 10.1074/jbc.M109.023283 (2009).
31. Xiaowei GONG, A. L., Xiaoyan MING, Xu WANG, Daan WANG, Peng DENG, Yong JIANG. Effect of PRAK gene knockout on the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Front. Med. China* (2009).
32. Zheng, M. et al. Inactivation of Rheb by PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1. *Nature Cell Biology* 13, 263-U425, doi:Doi 10.1038/Ncb2168 (2011).
33. Srivastava, R. *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms*, Vol. 2 (Humana Press Inc., 2007).
34. Schumacher, S. et al. Scaffolding by ERK3 regulates MK5 in development. *Embo Journal* 23, 4770-4779, doi:DOI 10.1038/sj.emboj.7600467 (2004).
35. Kohno, M. & Pouyssegur, J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 38, 200-211, doi:H8ML183G442684U1 [pii] 10.1080/07853890600551037 (2006).
36. Cohen, P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1, 309-315 (2002).
37. Henriksen, J. R. Targeted MYCN suppression and its effect on miRNA in neuroblastoma, University of Tromsø, Faculty of Health Sciences, Department of Clinical Medicine, (2010).
38. Brent, R. et al. *Current Protocols in Molecular-Biology - Ausubel, Fm.* Nature (2010).
39. Jin, H. S. & Lee, T. H. Cell cycle-dependent expression of cIAP2 at G2/M phase contributes to survival during mitotic cell cycle arrest. *Biochemical Journal* 399, 335-342, doi:Doi 10.1042/Bj20060612 (2006).
40. Whitfield, M. L. et al. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Molecular Biology of the Cell* 13, 1977-2000, doi:DOI 10.1091/mbc.02-02-0030 (2002).
41. Kress, T. R. et al. The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. *Mol Cell* 41, 445-457, doi:S1097-2765(11)00050-5 [pii] 10.1016/j.molcel.2011.01.023 (2011).
42. Myant, K. & Sansom, O. J. More, more, more: downregulation of a MK5-FoxO3a-mir34b/c pathway further increases c-Myc levels in colorectal cancer. *Mol Cell* 41, 369-370, doi:S1097-2765(11)00083-9 [pii] 10.1016/j.molcel.2011.01.028 (2011).

43. Sun, M., Y. Wei, et al. (2006). "Identification of extracellular signal-regulated kinase 3 as a new interaction partner of cyclin D3." *Biochem Biophys Res Commun* 340(1): 209-214
44. De la Mota-Peynado, A., Chernoff, J. & Beeser, A. Identification of the Atypical MAPK Erk3 as a Novel Substrate for p21-activated Kinase (Pak) Activity. *Journal of Biological Chemistry* 286, 13603-13611, doi:DOI 10.1074/jbc.M110.181743 (2011).
45. Deleris, P. et al. Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway. *J Biol Chem* 286, 6470-6478, doi:M110.181529 [pii] 10.1074/jbc.M110.181529 (2011)
46. Li, L. H., M. H. Zheng, et al. (2010). "P21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910." *Int J Oncol* 37(4): 951-962.

9 APPENDIKS

9.1 Cellesortering i flow cytometry (FCM) maskinen





9.2 Absorbans og SD for vekstkurven i figur 4.4

	Dag	Absorbans	Gjennomsnitt	STD
MK5 + Dox	1	0,073	0,076	0,018148
		0,095		
		0,059		
	2	0,395	0,369	0,063151
		0,297		
		0,415		
	3	0,903	0,9	0,044095
		0,942		
		0,854		
	4	1,047	1,033	0,07741
		0,95		
		1,103		
	5	1,276	1,27	0,076696
		1,343		
		1,19		
Scr + Dox	1	0,045	0,056	0,010149
		0,058		
		0,065		
	2	0,126	0,179	0,071822
		0,261		
		0,151		
	3	0,615	0,557	0,091358
		0,452		
		0,605		
	4	0,869	0,852	0,198525
		0,646		
		1,042		
	5	1,107	1,21	0,090168
		1,276		
		1,246		
MK5 - Dox	1	0,031	0,043	0,010583
		0,047		
		0,051		
	2	0,032	0,041	0,010817
		0,053		
		0,038		
	3	0,37	0,343	0,029206
		0,312		
		0,347		
	4	0,551	0,516	0,101712
		0,401		
		0,595		
	5	0,997	1,18	0,158576
		1,26		
		1,282		
Scr - Dox	1	0,069	0,068	0,000577
		0,068		
		0,068		
	2	0,055	0,053	0,002082
		0,052		
		0,051		
	3	0,315	0,314	0,022517
		0,291		
		0,336		
	4	0,599	0,58	0,045214
		0,528		
		0,612		
	5	1,191	1,22	0,02512
		1,234		
		1,235		

9.3 Absorbans og SD for vekstkurven i figur 4.7

	Dag	Absorbans	Gjennomsnitt	STD
MK5 - Dox	1	0,263	0,287	0,02829
		0,318		
		0,279		
	2	0,369	0,365	0,003512
		0,362		
		0,365		
	3	0,488	0,529	0,045622
		0,578		
		0,52		
	4	0,714	0,798	0,081206
		0,876		
		0,805		
	5	0,875	0,867	0,053985
		0,809		
		0,916		
MK5 + Dox	1	0,337	0,293	0,075062
		0,335		
		0,206		
	2	0,585	0,537	0,063095
		0,459		
		0,516		
	3	0,892	0,91	0,023459
		0,937		
		0,903		
	4	1,101	1,062	0,070741
		0,98		
		1,104		
	5	1,188	1,112	0,118882
		0,975		
		1,173		
GFP	1	0,297	0,311	0,015822
		0,328		
		0,307		
	2	0,478	0,474	0,040067
		0,522		
		0,442		
	3	0,6	0,664	0,058106
		0,68		
		0,713		
	4	0,978	0,897	0,075798
		0,884		
		0,828		
	5	1,077	1,094	0,053163
		1,052		
		1,154		
GFP-MK5	1	0,163	0,164	0,019035
		0,184		
		0,146		
	2	0,296	0,312	0,030348
		0,347		
		0,293		
	3	0,511	0,601	0,100947
		0,581		
		0,71		
	4	0,677	0,662	0,127673
		0,442		
		0,646		
	5	0,585	0,637	0,053013
		0,691		
		0,636		

	Dag	Absorbans	Gjennomsnitt	STD
T182A	1	0,278	0,247	0,060178
		0,178		
		0,286		
	2	0,33	0,415	0,077151
		0,481		
		0,433		
	3	0,466	0,513	0,059408
		0,58		
		0,494		
	4	0,623	0,598	0,040464
		0,551		
		0,619		
	5	0,773	0,812	0,046318
		0,863		
		0,799		
D148A	1	0,214	0,209	0,019553
		0,187		
		0,225		
	2	0,254	0,292	0,072856
		0,246		
		0,376		
	3	0,414	0,439	0,03139
		0,474		
		0,428		
	4	0,626	0,549	0,067
		0,504		
		0,517		
	5	0,735	0,749	0,076514
		0,832		
		0,681		
C3.5	1	0,357	0,308	0,053529
		0,251		
		0,317		
	2	0,397	0,388	0,00781
		0,384		
		0,383		
	3	0,383	0,404	0,139689
		0,276		
		0,553		
	4	0,735	0,673	0,074746
		0,59		
		0,694		
	5	0,481	0,532	0,071501
		0,614		
		0,502		

