

Pro gradu-avhandling



En ny roll för värmechockfaktor 2 i TGF- β - signalräckan

Sandra Pihlström, 37672

spihlsto@abo.fi

Handledning:

Prof. Lea Sistonen

FM Mikael Puustinen

Utbildningsprogrammet i cellbiologi
Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Åbo Akademi

2018

Åbo Akademi / Åbo Akademi University

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik / Faculty of Science and Engineering

Sandra Pihlström, 2018

En ny roll för värmechockfaktor 2 i TGF- β -signalräckan

Pro gradu-avhandling, 77 s

Nyckelord: HSF2, TGF- β -signalräckan, EMT, extracellulär signalering, cancer

Heat shock factor 2, a new prominent player in the TGF- β signaling pathway

M.Sc.Thesis, 77 s

Keywords: HSF2, TGF- β signaling pathway, EMT, extracellular signaling, cancer

Tillväxtfaktorn TGF- β_1 stimulerar huvudsakligen aktiveringen av TGF- β -signalräckan, vars intracellulära Smad-proteiner kan reglera transkriptionen av olika målgener. Främst är TGF- β_1 involverad i en process som kallas för epitel-mesenkymal övergång (EMT), en process som kan förorsaka utvecklingen av cancer och stimulera cancers spridning. För att hindra uppkomsten av cancer finns olika försvarsmekanismer som skyddar cellerna från cytotoxiska stimuli. Värmechockresponsen är en mekanism, vars funktion är att skydda cellerna mot proteinskadande stress. Denna respons initieras av värmechockfaktorerna HSF1 och HSF2. Dessa faktorer har dock även visats vara involverade i utvecklingen av cancer. HSF1 har identifierats som en drivare av cancerprogression medan HSF2 kan fungera som en tumorsuppressör. I denna Pro gradu-avhandling undersöktes TGF- β -signalräckans förmåga att inducera EMT i humana MCF10A-celler och hur denna process kan inverka på uttrycket av HSF2. Resultaten visar att en induktion av EMT är korrelerad med ett minskat uttryck av HSF2 och att signalkaskaden som reglerar uttrycket, troligen använder sig av TGF- β -signalräckans Typ-I-receptor. Utgående från resultaten framkommer det även att det minskade uttrycket av HSF2 troligen är orsakad av förändringar i mRNA-nivåerna, eftersom att ett lägre hsf2-mRNA-uttryck kan detekteras hos celler som genomgått EMT.

The growth factor TGF- β_1 primarily stimulates the TGF- β signaling pathway, and consequently activates intracellular Smad proteins, which control the transcription of different target genes. TGF- β_1 is foremost involved in a process called epithelial mesenchymal transition (EMT) and this process is for example involved in the development of cancer and invasion. To prevent the initiation of cancer, various defense mechanisms protect the cell from cytotoxic stimuli. The heat shock response is one mechanism that protects cells against protein-damaging stress. This response is regulated by heat shock factors, HSF1 and HSF2, and these factors have also been shown to be involved in cancer progression. HSF1 has been shown to stimulate tumorigenesis while HSF2 has been identified as a tumor suppressor. In this master thesis, it was investigated if the TGF- β signaling pathway has the ability to induce EMT in human MCF10A cells, and if this process affects the expression of HSF2. Based on the results, it was showed that an induction of EMT is correlated with a reduced expression of HSF2, and the signaling cascade that is regulating the expression is likely to utilize the Type I receptor of the TGF- β signaling pathway. The results also show that decreased levels of hsf2 mRNA can be detected in cells undergoing EMT. Thus, the amount of HSF2 is most likely regulated by changes in hsf2 mRNA expression.

Innehållsförteckning

Förord	1
Förkortningar	2
1 Inledning	4
2 Litteraturoversikt	5
2.1 Extracellulär signalering	5
2.1.1 Extracellulära membranreceptorer	5
2.1.2 Autofosforylering på tyrosinkinasreceptorn	8
2.2 TGF- β -familjens historia	9
2.2.1 Undergrupperna TGF- β , BMP och aktivin	9
2.2.2 TGF- β -signalräckan	12
2.2.3 TGF- β i normala cellprocesser.....	14
2.2.4 TGF- β :s roll i EMT och cancer.....	15
2.3 Cellens förmåga att anpassa sig till proteinskadande stress	18
2.3.1 Värmechockresponsen, HSR	18
2.4 Värmechockfaktorer, HSFs.....	20
2.4.1 Värmechockfaktor 1, HSF1	22
2.4.2 Värmechockfaktor 2, HSF2	23
2.4.3 Heterotrimerisering av HSF1 och HSF2 under värmechock	25
2.4.4 Värmechockfaktor 3 och värmechockfaktor 4.....	26
2.5 Värmechockfaktorer i cancer	27
2.5.1 HSF1:s roll vid utvecklingen av cancer	28
2.5.2 HSF2, en potentiell tumör-suppressör.....	29
3 Målsättningar	31
4 Material och metod	32
4.1 Cellodling.....	32
4.2 Behandling och lysning av celler	32
4.3 Immunoprecipitering (IP)	33
4.3.1 Lysning av celler och immunoprecipitering	35
4.4 Western blot.....	36
4.4.1 SDS-PAGE samt överföring av proteiner till nitrocellulosamembran.....	37
4.4.2 Immunoblottnings och proteindetektering.....	38
4.5 Kvantitativ omvänt transkriptas-polymeraskedjereaktion, qRT-PCR	40
4.5.1 RNA-isolering.....	42

4.5.2 Produktion av cDNA med omvänd transkription.....	42
4.5.3 Amplifiering av cDNA med qRT-PCR.....	43
4.6 Statistisk analys.....	45
5 Resultat	46
5.1 TGF- β -signalräckan reglerar uttrycket av HSF2 i MCF10A-celler.....	46
5.2. Signal-transduktion genom Typ-I-receptorn (ALK5) reglerar mängden av HSF2.....	49
5.3 TGF- β -receptor-I-inhibitorn, en effektiv hämmare av en snabbt aktiverad TGF- β -signalräcka	50
5.4 En aktiverad TGF- β -signalräcka förändrar hsf2-mRNA-uttrycket.....	52
5.5 Svag detektering av ubiquitin-märkta HSF2-protein i MCF10A-celler.....	54
6 Diskussion	57
6.1 TGF- β_1 -inducerad EMT reglerar uttrycket av HSF2	58
6.2 Extracellulär signalering genom Typ-I-receptorn påverkar HSF2-uttrycket	60
6.3 TGF- β -signalräckan, en snabbt aktiverad signalkaskad.....	61
6.4 TGF- β_1 -signalräckan har förmågan att förändra genuttrycket för hsf2.....	62
6.5 Problem med att detektera ubiquitin-medierad nedbrytning av HSF2.....	64
6.6 Slutsatser	65
Litteraturförteckning	67
Bilaga 1	76

Förord

Jag vill rikta mitt främsta tack till Mikael Puustinen som har visat ett stort tålamod i sitt handledande av både den praktiska delen och själva skrivprocessen av min Pro gradu-avhandling. Jag uppskattar även de intressanta samtalsämnena vi diskuterat under min tid i labbet, såväl de forskningsrelaterade ämnena som diskussionerna om livet utanför Biocitys väggar. Jag vill även rikta ett stort tack till professor Lea Sistonen som gjorde det möjligt för mig att börja min utvalda väg mot en intressant framtid i ett labb där ingenting känns omöjligt. Samtidigt vill jag tacka alla labbmedlemmar i Sistonen labb för deras förmåga att våga uttrycka sin åsikt och på det sättet förbereda mig för framtida utmaningar. Ett kärleksfullt tack vill jag även rikta till mina Åbovänner Taru, Vilma, Emma, Helena, Niklas och Nico samt min barndomsvän Frida, ni har gjort mina fem år i Åbo underbara. Slutligen vill jag rikta ett varmt tack till min familj, speciellt Diana, för all uppmuntran och stöd under de mest stressiga och intensiva stunderna av mina studier.

Förkortningar

AD	Aktiveringsdomän
AMH	Anti-müllerian hormon
ATP	Adenosintrifosfat (eng. adenosine triphosphate)
BMP	Benmorfogenetiskt protein
BSA	Bovint serumalbumin
cDNA	Komplementärt DNA (eng. complementary DNA)
Ct-värde	(eng. cycle threshold)
DBD	DNA-bindande domän
DMEM/F12	(eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)
ECM	Extracellulärt matrix
EGF	Epidermal tillväxtfaktor (eng. epidermal growth factor, EGF)
EMT	Epitel-mesenkymal övergång (eng. epithelial-mesenchymal transition)
FSH	Follikelstimulerande hormon
GDF	Differentierande tillväxtfaktor (eng. growth differentiation factor)
GPCR	G-proteinkopplad receptor (eng. G-protein-coupled receptor)
GTP	Guanosintrifosfat (eng. guanosine triphosphate)
G-protein	GTP-bindande protein
HR-A/B/C	Heptadupprepning A/B/C (eng. heptad repeat A/B/C)
HRP	Pepparrotsperoxidas (eng. horse radish peroxidas)
HSE	Värmechockelement (eng. heat shock element)
HSF	Värmechockfaktor (eng. heat shock factor)
HSF1-4	Värmechockfaktor 1-4 (eng. heat shock factor 1-4)
Hsp	Värmechockprotein (eng. heat shock protein)
HSR	Värmechockrespons (eng. heat shock response)
I-Smad-protein	(eng. inhibitory Smad protein)
MAP-kinas	Mitogen-aktiverade proteinkinas
MMP	Matrixmetalloproteas

PBS	Fosfat-buffrad saltlösning (eng. phosphate-buffered saline)
PCR	Polymeraskedjereaktion (eng. polymerase chain reaktion)
qRT-PCR	Kvantitativ omvänt transkriptas-polymeraskedjereaktion (eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
RD	Regulatoriskdomänen
ROS	Reaktiv syreförening (eng. reactive oxygen specie)
RTK	Tyrosinkinasreceptor (eng. receptor tyrosine kinase)
R-Smad-protein	(eng. receptor-activated Smad protein)
SDS	Natriumdodekylsulfat (eng. sodium dodecyl sulphate)
SDS-PAGE	Natriumdodekylsulfat polyakrylamidelektrofores (eng. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)
SGF	Sarkomtillväxtfaktor (eng. sarcoma growth factor)
SH2-domän	Src-homolog 2-domän
TBS	Tris-buffrad saltlösning
Tbx2	(eng. T-box transcription factor 2)
TGF- α	Transformerade tillväxtfaktor alfa (eng. transforming growth factor alfa, TGF- α)
TGF- β	Transformerande tillväxtfaktor beta (eng. transforming growth factor beta, TGF- β)
VEGF	Endotelcellstillväxtfaktor (eng. vascular endothelial growth factor)

1 Inledning

Cellerna i en multicellulär organism upprätthåller en ständig kommunikation med varandra genom ett avancerat nätverk av signalräckor. Vid så kallad extracellulär signalering stimuleras en signalräcka då en signalmolekyl binder till en specifik receptor i cellmembranet, som i sin tur vidarebefordrar informationen in i cellen genom att aktivera en intracellulär signalkaskad. TGF- β (eng. transforming growth factor β), som är en evolutionärt välbevarad signalmolekyl, har förmågan att binda till och dimerisera två enzymkopplade membranreceptorer som tillsammans aktiverar ett intracellulärt komplex av Smad-proteiner. I cellkärnan kan komplexet sedan reglera transkriptionen av olika målgener. Tillväxtfaktorn TGF- β är främst känd för sin roll i epitel-mesenkymal övergång (eng. epithelial-mesenchymal transition, EMT), en process som krävs för organformation och embryogenes. Utöver dessa processer har TGF- β även visats ha en roll vid utvecklingen av cancer. Inledningsvis är TGF- β -signalräckan hämmad hos cancercellerna på grund av signalräckans tumörsuppressiva förmåga, men när utvecklingen av cancer framskrider kan cellerna utnyttja TGF- β till sin fördel och inducera EMT. Detta ökar i sin tur på cancercellernas förmåga att dedifferentiera till en celltyp som har en ökad förmåga att metastasera.

En annan välbevarad process i cellen är värmechockresponsen, som vid proteinskadande stress producerar värmechockproteiner, vars funktion är att upprätthålla proteinernas struktur och funktion. Värmechockresponsen styrs av olika värmechockfaktorer och dessa värmechockfaktorer har visats vara felaktigt reglerade i vissa cancerceller, där exempelvis värmechockfaktor 2 (eng. heat shock factor 2, HSF2) har identifierats som en tumörsuppressor. I en nyligen publicerad studie utförd av Björk med kollegor (2016) upptäcktes ett samband mellan ett minskat uttryck av HSF2 och en ökad invasion hos prostatacancerceller när cellerna genomgår EMT. Dessa resultat var utgångspunkten för denna Pro gradu-avhandling, och därmed var det huvudsakliga målet att undersöka om EMT-processen kan reglera uttrycket av HSF2.

2 Litteraturöversikt

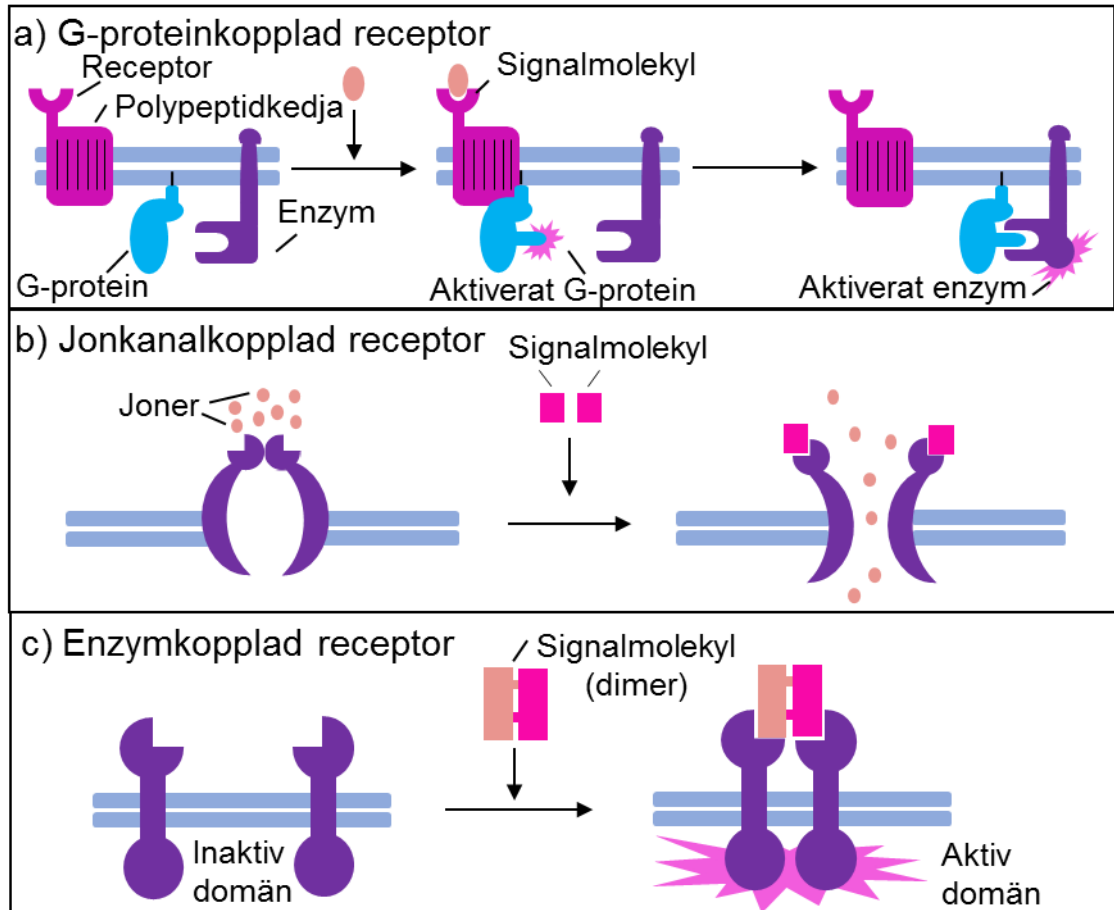
2.1 Extracellulär signalering

En multicellulär organism är uppbyggd utav miljarder enskilda celler, samt den extracellulära matrixen (ECM) som omger cellerna. För att organismen skall kunna fungera som en välorganiserad enhet måste ett avancerat kommunikationssystem förekomma mellan cellerna (Roy & Kornberg, 2015). Cellerna kommunicerar med varandra genom en process kallad extracellulär signalering, under vilken information transporteras mellan cellerna med hjälp av olika signalmolekyler och receptorer. Informationen kan antingen transporteras från en cell ut till dess yttre omgivning eller från den yttre omgivningen in till cellen. Informationen som upptas kan medföra markanta mekaniska eller funktionella förändringar hos cellen (Eungdamrong & Iyengar, 2004). Den extracellulära signaleringen kan klassificeras in i olika grupper beroende på hur cellerna kommunicerar med omgivningen och hurdana signalmolekyler som överför informationen. En cell kan stimulera sig själv genom att utsöndra en signalmolekyl som påverkar cellens egna mekanismer. Denna form av signalering kallas för autokrin signalering medan vid kontaktberoende signalering krävs cell-cellkontakt. Vid parakrin signalering utsöndrar cellen signalmolekyler som påverkar närliggande celler medan vid endokrin signalering stimuleras avlägsna celler via signalmolekyler i blodomloppet (Lodish et al., 2000; Hajimiri et al., 2014). Signalmolekyler som transporterar informationen kan bland annat vara tillväxtfaktorer, hormoner, neurotransmittorer eller komponenter i ECM (Lodish et al., 2000).

2.1.1 Extracellulära membranreceptorer

Extracellulär signalering initieras när en så kallad signalerande cell syntetiserar och frigör en signalmolekyl, som transporteras till mottagarcellen. Mottagarcellen är försedd med signalmolekylspecifika proteinreceptorer som binder signalmolekylen, vilket leder till en förändring i mottagarcellens tillstånd (Schlessinger, 2000). Hydrofoba signalmolekyler, såsom hormoner, diffunderar igenom cellmembranet innan de binder till intracellulära receptorer lokaliserade vid cellens inre membran eller i cellkärnan. För de hydrofila signalmolekylerna är receptorerna integrerade i cellmembranet och det krävs intracellulära signalproteiner för att vidarebefordra

informationen inne i cellen. Membranreceptorerna är klassificerade i tre grupper (figur 1), vars funktioner är att omvandla informationen i signalmolekylen till en intracellulär signalkaskad (Lodish et al., 2000).



Figur 1. Illustration av membranreceptorer involverade i extracellulär signalering. a) När signalmolekylen binder till den G-proteinkopplade receptorn ändrar polypeptidkedjan konformation, vilket leder till att G-proteinet kan aktiveras. Aktiveringen omformar G-proteinets konformation, vilket innebär att G-proteinet kan binda till enzymet som aktiveras och vidarebefordrar den extracellulära signalen. b) Jonkanalkopplade receptorer är kopplade med en jonkanal som tillåter passering av joner igenom cellmembranet. Vid bindning av signalmolekylen till receptorn öppnas jonkanalen och jonerna kan transporteras enligt koncentrationsgradienten. c) Enzymkopplade receptorer aktiveras när den dimera signalmolekylen binder till receptorerna, vilket resulterar i att receptorernas intracellulära domäner sammankopplas och erhåller enzymaktivitet. Den intracellulära domänen, med enzymaktivitet, kan aktivera andra intracellulära signalmolekyler som vidarebefordrar signalen in i cellen.

G-proteinkopplade receptorer (eng. G-protein-coupled receptor, GPCR) förekommer i samtliga eukaryoter och är den största gruppen av membranreceptorer. GPCR aktiveras vid bindning av olika signalmolekyler, exempelvis hormoner och neurotransmittorer, vilket reglerar aktiviteten av ett målprotein som är integrerat i

cellmembranet (Reiter et al., 2012). Det integrerade målproteinet är oftast en jonkanal eller ett enzym (figur 1a) (Lodish et al., 2000). Receptorn i GPCR är sammankopplad med en polypeptidkedja som genomkorsar cellmembranet sju gånger. Vid bindning av signalmolekylen till receptorn omformas polypeptidkedjan, vilket möjliggör en aktivering av ett GTP-bindande protein (G-protein). Som aktivt använder G-proteinet energi, i form av guanosintrifosfat (eng. guanosine triphosphate, GTP), för att ändra sin konformation, vilket resulterar i att G-proteinet kan binda till och aktivera enzymet. Ett aktiverat enzym leder signalkaskaden vidare in i cellen (Katritch et al., 2013).

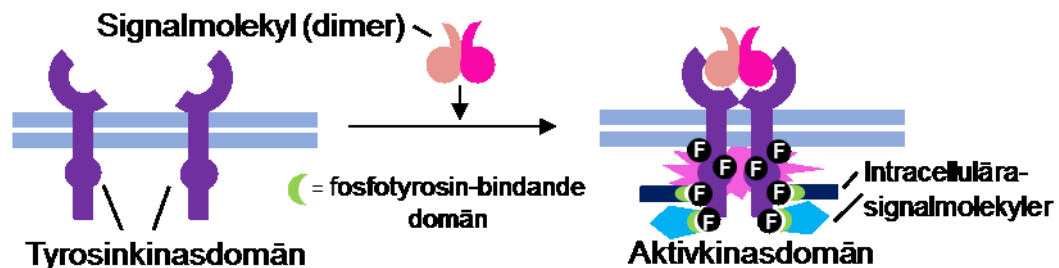
Jonkanalkopplade receptorer är belägna mellan elektriskt kopplade celler i nervsystemet och framkallar en snabb synaptisk signalering där den kemiska signalen övergår till en elektrisk impuls, som framskrider som en så kallad aktionspotential i cellmembranet (Sheng & Pak, 2000). Receptorn är ett transmembranprotein sammankopplad med en jonkanal, som tillåter olika joner att passera igenom cellmembranet. Skillnader i jonkoncentrationerna mellan cellens yttre och inre omgivning ansvarar över vilken riktning jonerna passerar igenom cellmembranet. Vid elektisk signalering fungerar neurotransmittorer som signalmolekyler och beroende på receptorns uppbyggnad öppnas, som i figur 1b, eller stängs jonkanalen när signalmolekylen fäster sig vid receptorn (Hucho & Weise, 2001). Joner som förflyttar sig mellan cellens yttre och inre omgivning är bland annat kalium-, klorid-, kalcium- och natriumjoner (Hucho & Weise, 2001).

Enzymkopplade receptorer är den näst största gruppen av membranreceptorer och kan som aktiva antingen vara sammankopplade med ett enzym eller, som i figur 1c, själva ha enzymaktivitet. Receptorn är ett transmembranprotein som har en signalmolekylbindande-domän på yttre sidan av cellmembranet medan komponenterna med enzymkapacitet är placerade på insidan av cellen (Lodish et al., 2000). De flesta enzymkopplade receptorer aktiveras av en dimer signalmolekyl, som genom dimerisering sammankopplar receptorernas intracellulära domäner (figur 1c). Det förekommer dock även enskilda enzymkopplade receptorer som direkt aktiveras av en monomer signalmolekyl (Ullrich & Schlessinger, 1990). Enzymkopplade receptorer är en heterogen grupp av proteinreceptorer där majoriteten av receptorerna är proteinkinaser eller samverkar med olika proteinkinaser. Proteinkinaser är enzymer som fosforylerar specifika målproteiner, vilka i sin tur vidarebefordrar

signalkaskaden. Den vanligaste enzymkopplade receptorn med associerat proteinkinas är tyrosinkinaserceptorn (eng. receptor tyrosine kinase, RTK) (Schlessinger, 2000).

2.1.2 Autofosforylering på tyrosinkinaserceptorn

RTK tillhör gruppen enzymkopplade receptorer och är involverad i de mest väsentliga cellulära processerna såsom överlevnad, proliferation och differentiering (Schlessinger, 2000). RTK:er är uppbyggda av en extracellulär domän med bindningsställe för signalmolekylen, samt en cytoplasmisk domän bestående av tyrosinkinaser och fosforyleringskapabla tyrosiner i en specifik sekvens som kallas för C-terminala svansen (eng. carboxy-terminal tail). (Ullrich & Schlessinger, 1990).



Figur 2. Tyrosinkinaserceptorn (RTK). I inaktivt tillstånd förekommer RTK:er som monomerer. När signalmolekylen binder till receptorena sker det en dimerisering, och tyrosiner på den intracellulära domänen autofosforyleras av tyrosinkinaser. Fosforylerade tyrosiner fungerar som bindningsställen för intracellulära proteiner, innehållande en fosfotyrosinbindande domän.

De flesta RTK:er är monomerer som dimeriseras när en signalmolekyl binder till receptorn (figur 2). Vissa RTK:er kan även förekomma som inaktiva disulfidkopplade dimerer, och då aktiveras receptorn när signalmolekylen orsakar en omorganisering av receptorns kvartärstruktur (Hubbard et al., 1998). Dimeriseringen sammanför receptorens intracellulära domäner, vilket leder till att tyrosinkinaser på respektive receptor genomför en så kallad korsfosforylering, även kallad autofosforylering, på varandra. Vid en fosforylering katalyserar proteinkinaser den kemiska reaktionen där en fosfatgrupp, som förflyttats från adenosintrifosfat (eng. adenosine triphosphate, ATP), överförs till aminosyrorna serin, treonin och tyrosin (Ullrich & Schlessinger, 1990). Tyrosinkinaser fosforylerar först tyrosiner på RTK och slutligen även tyrosiner på så kallade RTK-bindande proteiner (eng. docking

protein). De fosforylerade tyrosinerna kan fungera som bindningsställen för intracellulära proteiner. För att de intracellulära signalproteinerna ska klara av att binda till RTK innehåller de fosfotyrosinbindande domäner, exempelvis Src-homolog 2-domän (SH2-domän), som känner igen specifikt fosforylerade tyrosiner (figur 2) (Cadena & Gill, 1992). De intracellulära signalproteinerna, såsom fosfolypas-C, leder sedan signalen vidare i cellen. Eftersom RTK:er aktiveras via dimerisering kan även signalmolekylerna uppfylla samma kriterium. Vissa cytokiner är bivalent uppbyggda medan ett flertal tillväxthormoner existerar som homodimerer. Specifika tillväxthormoner som fungerar som signalmolekyler för RTK:er är bland annat epidermal tillväxtfaktor (eng. epidermal growth factor, EGF) och transformerande tillväxtfaktor beta (eng. transforming growth factor beta, TGF- β) (Schlessinger, 2000). Dessa tillväxtfaktorer är viktiga eftersom de är involverade i processer som styr cellproliferation och differentiering (Carpenter, 1979; Clark & Coker, 1998).

2.2 TGF- β -familjens historia

Signalmolekyler från TGF- β -familjen isolerades för första gången under 1970-talet och kallades då för sarkoma tillväxtfaktorer (eng. sarcoma growth factor, SGF) tack vare deras förmåga att transformera njurfibroblaster till cancerceller hos råttor (Roberts et al., 1981). Efter vidare studier framkom det dock att SGF omfattar två olika grupper av signalmolekyler; transformerande tillväxtfaktor alfa (eng. transformig growth factor alfa, TGF- α) och transformerande tillväxtfaktor beta (TGF- β) (Anzano et al., 1982). Såväl TGF- α som TGF- β är namngivna efter deras förmåga att transformera celler, men nuförtiden är namnen till en viss grad felaktiga, eftersom signalmolekylerna även har betydande roller i andra biologiska processer (Kingsley, 1994). Idag är TGF- α en komponent i gruppen EGF, vilka reglerar signalräckor som är involverade i cellproliferation, differentiering samt utveckling (Carpenter, 1979). TGF- β har bildat en egen familj av ett flertal signalmolekyler som bland annat är involverade i processer som reglerar celltillväxten, fosterutvecklingen och vävnadsreparationer (Clark & Coker, 1998).

2.2.1 Undergrupperna TGF- β , BMP och aktivin

TGF- β -familjen är en grupp evolutionärt välbevarade proteiner som existerar i alla vertebrater och evertebrater, där sammanlagt 23 stycken gener har identifierats (Clark

& Coker, 1998; Nickel et al., 2009). Signalmolekylerna i TGF- β -familjen kan indelas i olika undergrupper (tabell 1), där de största undergrupperna är TGF- β -proteiner, benmorfogenetiska proteiner (BMP) samt aktivin och inhibin. Ytterligare förekommer bland annat anti-müllerian hormon (AMH) och differentierande tillväxtfaktorer (eng. growth differentiation factor, GDF) (Kingsley, 1994; Lebrun & Vale, 1997; Clark & Coker, 1998). Samtliga TGF- β och de flesta BMP syntetiseras som stora inaktiva proteiner, vilka aktiveras när proteinerna klyvs och frisätter sekvenser som möjliggör en bildning av disulfidkopplade-dimerer, antingen homodimerer med sig själv eller heterodimerer med andra proteiner från TGF- β -familjen (Kingsley, 1994).

Tabell 1. Undergrupper i TGF- β -familjen

Undergrupp	Förkortning	Funktion
Transformerande tillväxtfaktor beta	TGF- β	Kontrollera differentiering och proliferation
Benmorfogenetiskt protein	BMP	Inducerar formation av brosk- och benvävnad
Aktivin	-	Reglerar produktion av follikelstimulerande hormon, sårhäkning
Inhibin	-	Reglerar produktion av follikelstimulerande hormon, sårhäkning
Anti-müllerian hormon	AMH	Involverad i tillväxt och differentiering (Visser et al., 2006)
Differentierande tillväxtfaktor	GDF	Involverad i utvecklingsprocesser (Herpin et al., 2004)

Aktivin och inhibin uttrycks främst i äggstockarna där de reglerar produktionen av follikelstimulerande hormon (FSH), men har även visats reglera celldelning och differentiering i andra celltyper (Massagué, 1990). Aktivin är dessutom en essentiell reglerare vid sårhäkning. I en studie där möss användes som modellsystem, påvisades ett ökat uttryck av aktivin i epidermis då ett sår uppkom. Uttrycket av Aktivin ökade speciellt i keratinocyter som är belägna i det skadade epidermisskiktet (Sulyok et al., 2004). Aktivin består av två underenheter, vilka är strukturellt lika varandra, och som tillsammans bildar homo- eller heterodimerer. Ytterligare kan de båda underenheterna av aktivin bilda dimerer med proteinet inhibin. Vid signalering har aktivin och inhibin motsatta effekter på signalräckorna som styr sårhättningsprocessen (Kingsley, 1994).

BMP identifierades ursprungligen för sin förmåga att inducera formationen av brosk- och benvävnad, men är även involverad i andra cellulära processer (Wu et al., 2007). Ett tjugotal olika BMP-proteiner har identifierats och utgående från deras funktion och struktur, exempelvis likheter i proteinernas aminosyrasekvens, har BMP indelats i olika subgrupper (Sakou, 1998; Miyazono, 2000). De flesta BMP-proteinerna har en viktig roll i såväl embryogenesen som morfogenesen för olika vävnader och organ (Chen et al., 2004). Vid tidig gastrulation i embryogenesen inaktiveras BMP av proteinerna nogging och chordin för att skapa en BMP-gradient i embryot. BMP-gradienten är väsentlig för att upprätta mag- och ryggsidan i embryot (De Robertis & Kuroda, 2004). BMP-signalering spelar även en kritisk roll i regleringen av tillväxt, differentiering och apoptos i celltyper såsom osteoplaster och epitelceller (Sakou, 1998). BMP-2 kan stimulera osteogenetisk differentiering av mesenkymala celler genom att stoppa deras differentiering till myoblaster. Osteoblaster och myoblaster härleds alltså från samma odifferentierade mesenkymala celler, men differentieringen är beroende av olika reglerande faktorer (Katagiri et al., 1994). BMP-2 reglerar även uttrycket av viktiga osteogenetiska transkriptionsfaktorer, till exempel osterix, som krävs för att bilda mineraler i skelettet (Wu et al., 2007).

TGF- β förekommer i fem olika isoformer, varav tre av dem uttrycks i de flesta normala celler och vävnader hos människan genom hela embryonala utvecklingen och in i vuxen ålder (Cheifetz et al., 1990). TGF- β_1 , TGF- β_2 och TGF- β_3 produceras av såväl normala som transformerade celler och har egenskaper som både gynnar och hindrar celltillväxten (Keski-Oja et al., 1987). TGF- β_1 produceras bland annat av lymfocyter, makrofager samt dendritceller, var signaleringen löper såväl autokrint som parakrint för att kontrollera celldifferentiering och cellproliferation (Letterio & Roberts, 1998). TGF- β_1 :s involvering i olika cellulära processer diskuteras i ett senare stycke av texten (stycke 2.2.3). TGF- β_{1-3} är, precis som andra signalmolekyler i TGF- β -familjen, dimeriserade i aktivt tillstånd. TGF- β_1 - och TGF- β_2 -dimerer är sammanbundna med endast en disulfidbrygga, vilket betyder att de hydrofoba interaktionerna mellan polypeptidkedjorna är viktiga för att stabilisera dimermolekylen (Sporn & Roberts, 1992). TGF- β_3 -dimeren är däremot uppbyggd av tre disulfidbryggor, som formar en knutliknande struktur, och som ersätter de hydrofoba interaktionerna som påträffas i TGF- β_1 och TGF- β_2 (Mittl et al., 1996). Gemensamt för signalmolekylerna i TGF- β -familjen är att de reglerar processer i cellen genom att interagera med två strukturellt

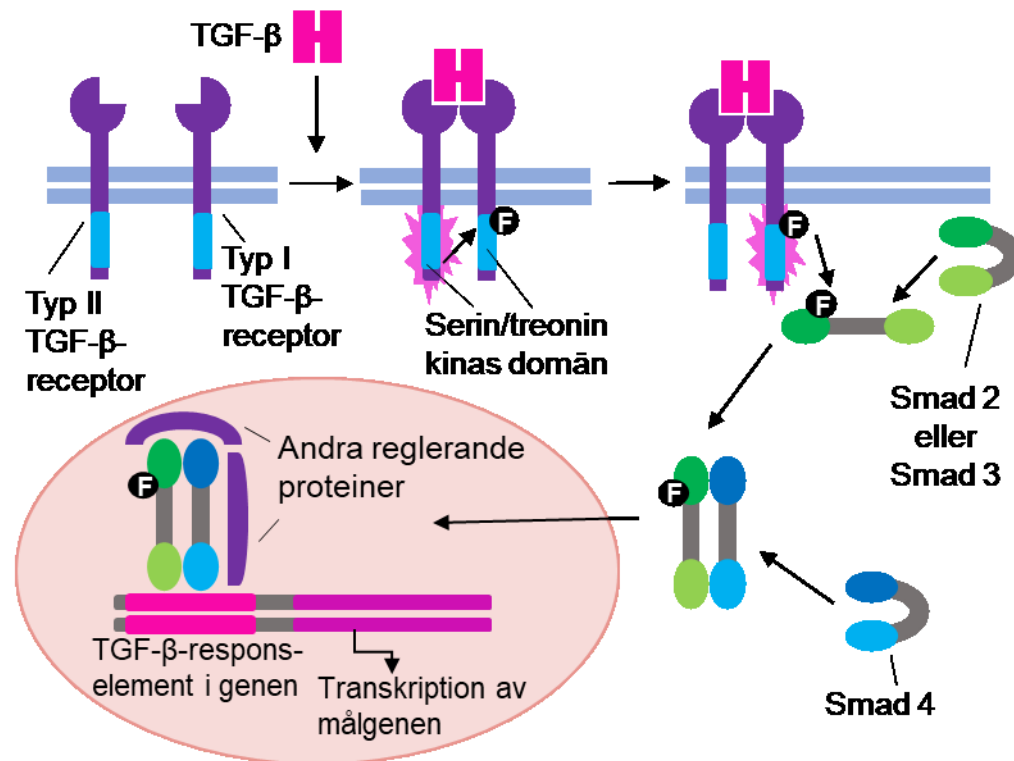
relaterade klasser av enzymkopplade receptorer, som vid aktivering dimeriseras och vidarebefordrar signalen in i cellen (Lebrun & Vale, 1997).

2.2.2 TGF- β -signalräckan

Signalmolekyler från TGF- β -familjen framkallar en signal i cellen genom att binda till specifika enzymkopplade receptorer som fungerar som tyrosinkinaser, men innehåller serin/treonin-kinasdomäner (Massagué, 2012). De olika TGF- β -medlemmarna aktiverar signalräckor, som medför en liknande effekt på cellen, antingen genom Smad-beroende signalering (figur 3) eller via signalräckor som saknar Smad-proteiner. Smad-beroende signalering framkallar en transkriptionsrespons i cellen medan signalering utan Smad-proteiner kan framkalla en transkriptionsrespons och direkt aktivera mitogen-aktiverade proteinkinaser (MAP-kinaser), små GTPaser eller kinaserna fosfatidylinositol-3 och protein B (Akt) (Horbelt et al., 2012). TGF- β -signalräckan initierar bland annat epitel-mesenkymal övergång (eng. epithelial-mesenchymal transition, EMT) via båda signalkaskaderna medan en omorganisering av de cytoskeletala proteinet aktin främst regleras av signalkaskaden utan Smad-proteiner (Horbelt et al., 2012).

Signalmolekyler från TGF- β -familjen binder till specifika receptorer på cellmembranet, vilket resulterar i en dimerisering av två membranreceptorer (Typ-I och Typ II) där receptorernas intracellulära domäner sammanförs (Nickel et al., 2009). I däggdjur har det identifierats sju stycken Typ-I-receptorer och fem stycken Typ-II-receptorer. Receptorernas affinitet för de olika signalmolekylerna varierar, exempelvis binder TGF- β_1 och aktivin till Typ-II-receptorn medan ett flertal BMP binder till Typ-I-receptorn (Derynck & Zhang, 2003). Under dimeriseringen fosforylerar Typ-II-receptorn en glycin/serin rik plats på Typ-I-receptorns serin/treonin-kinasdomän, vilken kallas för GS-boxen. Fosforylering av GS-boxen aktiverar serin/treonin-kinaset på Typ-I-receptorn samt hindrar bindningen av ett inhibitor protein (FKBP12), som vanligtvis låser serin/treonin-kinaset i en inaktiv form (Horbelt et al., 2012). Det aktiverade kinaset kan sedan aktivera och fosforylera Smad-proteiner, i den Smad-beroende signalkaskaden, eller andra sekundära signalmolekyler som leder signalen in i cellen (Massagué, 2012).

Smad-familjen består av åtta stycken intracellulära signalmolekyler som är uppdelade i tre undergrupper; R-Smad-proteiner (eng. receptor-activated Smad protein), Smad 4 och I-Smad-proteiner (eng. inhibitory Smad proteins). R-Smad-proteinerna kan ytterligare indelas i TGF- β -Smad-proteiner, som inkluderar Smad 2 och 3, och BMP-Smad-proteiner, som utgörs av Smad 1, 5 och 8. TGF- β -Smad-proteinerna samverkar med Typ-I-receptorn vid TGF- β -signalering medan BMP-Smad-proteinerna aktiveras av Typ-II-receptorn under BMP-signalering (Wrighton et al., 2009). Vid TGF- β -signalering binder R-Smad-proteinerna till den aktiverade kinasdomänen på Typ-I-receptorn, som fosforylerar Smad 2 och Smad 3 på ett så kallat SSXS-motiv i C-terminalen (Horbelt et al., 2012). SSXS-motivet består utav en aminosyrasekvens, inom vilken serin 465 och serin 467 fosforyleras vid aktiveringen (Souchelnytskyi et al., 1997). Fosforylerade Smad 2 och Smad 3 frigörs sedan från Typ-I-receptorn, varefter de bildar ett komplex med Smad 4 (Horbelt et al., 2012). R-Smad-proteinerna och Smad 4 har en liknande MH2-domän på C-terminalen vilket möjliggör komplexbildning (Smad-2/3/4) (Qin et al., 2001). Komplexet Smad-2/3/4 förflyttas sedan till cellkärnan där det tillsammans med andra reglerande proteiner stimulerar eller hämmar transkriptionen av olika målgener (Horbelt et al., 2012). En negativ återkoppling av TGF- β -signaleringen styrs av I-Smad-proteiner, inklusive Smad 6 och 7, som genom olika mekanismer inhiberar signalräckan. I-Smad-proteiner hindrar bland annat Smad 2 och Smad 3 att binda till Typ-I-receptorn samt stimulerar nedbrytningen av TGF- β -receptorerna och Smad-proteinerna genom ubiquitin-medierad nedbrytning i proteasomen (Yan et al., 2016). Signalräckan är illustrerad i figur 3.



Figur 3. Smad-beroende signalering med TGF- β som signalmolekyl. Signalkäntan aktiveras när TGF- β binder till Typ-II-receptorn, vilket leder till en dimerisering av receptorerna. Vid dimeriseringen sammanförs serin/treonin-kinasdomänerna på Typ-I- och Typ-II-receptorerna, vilket medför att Typ-II-receptorn fosforylerar och aktiverar kinasdomänen på Typ-I-receptorn. Den aktiverade kinasdomänen på Typ-I-receptorn binder och fosforylerar Smad 2 och Smad 3. Fosforylerad Smad 2 och 3 frigörs från Typ-I-receptorn och bildar ett komplex med Smad 4. Komplexet förflyttas till cellkärnan där det tillsammans med andra reglerande proteiner stimulerar eller hämmar transkriptionen av målgener (Horbelt et al., 2012).

2.2.3 TGF- β i normala cellprocesser

TGF- β är en mångsidig tillväxtfaktor som är involverad i en mängd olika fundamentala processer i cellen (Nickel et al., 2009). Under fosterutvecklingen främjar TGF- β bland annat regleringen av celledelning, formationen av olika organ samt celledifferentiering. I en studie där TGF- β_2 -knockout möss undersöktes, framkom det att frånvaron av TGF- β_2 orsakade problem vid utvecklingen av hjärtat, lungor och ögon (Sanford et al., 1997). Dessutom har TGF- β_3 -knockout möss visats ha svårigheter att utveckla en gom, vilket ytterligare fastställer TGF- β :s roll vid organformation under utvecklingen (Taya et al., 1999). TGF- β :s inverkan på celledelning och differentiering framkom i en annan studie, där TGF- β_1 -knockout möss uppvisade en högre grad av nekros i flera organ, vilket i allvarliga fall kunde leda till

döden. TGF- β_1 är även en viktig reglerare av immunresponser, bland annat genom att reglera proliferationen av B-celler (Shull et al., 1992).

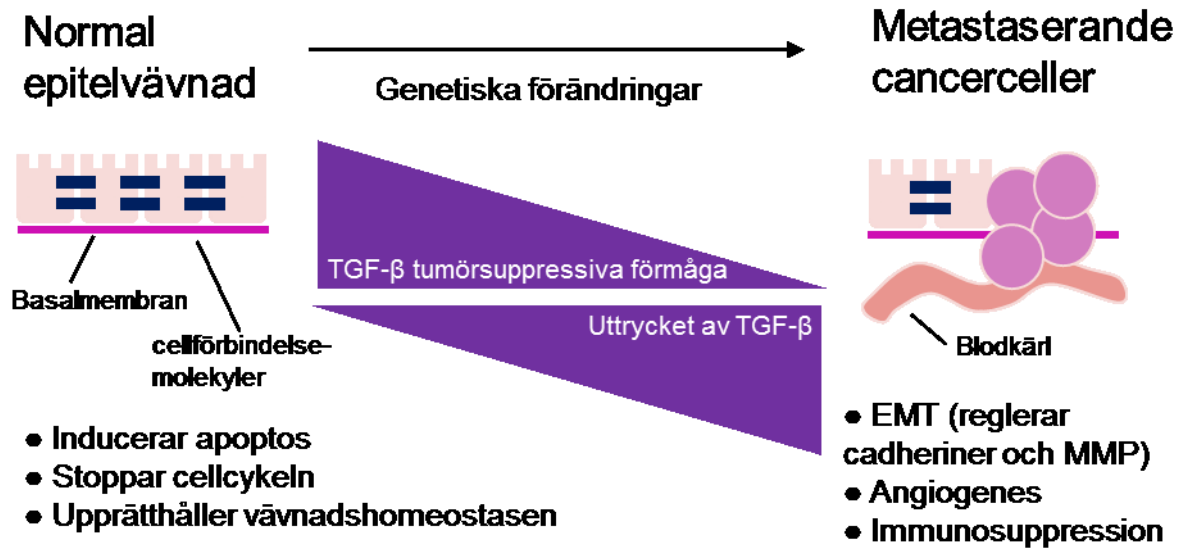
I utvecklade vävnader är TGF- β involverad i processer som styr fibros samt upprätthållandet av vävnadshomeostasen. TGF- β_1 har visats ha en essentiell roll i bildandet av fibrös vävnad i en skadad urinblåsa genom att öka på produktionen av kollagen i cellen (Deveaud et al., 1998). I normala celler samt i transformerade epitelceller och fibroblaster har TGF- β identifierats som en stark inhiberare av celledelning. TGF- β upprätthåller därmed vävnadshomeostasen men fungerar samtidigt som en tumorsuppressor (figur 4) (Massagué, 1990). TGF- β inhiberar en ökad celledelning genom att stoppa celcykeln eller aktivera olika apoptotiska signalräckor (Massagué, 2008). Celcykeln stoppas av att TGF- β ökar på produktionen av inhibitorerna p21 och p15, vilket stoppar cyklinberoende kinaser, som är essentiella proteiner för att driva fram celcykeln. TGF- β hindrar även uttrycket av Myc, en transkriptionsfaktor som inducerar celledelning (Ikushima & Miyazono, 2010). Ytterligare inducerar TGF- β apoptos i cellen genom att aktivera apoptotiska proteiner som Bim och caspas-9 (Ohgushi et al., 2005). Störningar i TGF- β -signalräckan kan förorsaka olika sjukdomar, bland annat missbildning av skelettet, osteoporos, kardiovaskulära och metaboliska sjukdomar samt cancer (Nickel et al., 2009).

2.2.4 TGF- β :s roll i EMT och cancer

TGF- β har en komplex roll i en process som kallas för epitel-mesenkymal övergång (EMT), som sker i såväl normala cellulära processer som vid utvecklingen av cancer (Xu et al., 2009). EMT är en process där polära epitelceller genomgår olika biokemiska förändringar, vilket orsakar att cellerna får en fenotyp som är mera lik mesenkymala celler (Micalizzi et al., 2010). Denna fenotyp ökar cellernas förmåga att migrera. Det har bland annat visat att cellerna blir mera invasiva genom att omorganisera cytoskeletala proteiner och öka på produktionen av ECM-nedbrytande proteiner (Kalluri & Weinberg, 2009). Under EMT kan epitelcellerna nedbryta basalmembranet, som är beläget mellan epitelcellerna och den underliggande vävnaden, samt förlora kontakten mellan cellerna och cellernas kontakt med matrix (Lee et al., 2006). Cellernas kontakt med varandra upprätthålls av kalciumberoende cellförbindelsemolekyler kallade cadheriner medan integriner upprätthåller cellernas kontakt med ECM (Micalizzi et al., 2010). Under EMT förändras uttrycket av dessa

cellförbindelsemolekyler, vilket kan bidra till cellmigration, -proliferation och -överlevnad (Lamouille et al., 2014).

I normala celler reglerar EMT främst utvecklingsprocesser såsom embryogenes och organformation. I studier där myokardium har behandlats med TGF- β_1 , induceras EMT i atrioventrikulära kanalen, som krävs för att bilda de fyra olika delarna i hjärtat (Boyer et al., 1999). En annan process som regleras av EMT i normala celler är fibros (Meng et al., 2016). Fibros är en del av den normala sårläkningsprocessen där fibrös vävnad bildas utav bindvävnadskomponenter såsom kollagen och andra ECM-proteiner. Fibros ger upphov till en fulländad sårläggning i små sår, men vid svårare skador och sjukdomar sker fibros på bekostnad av att den skadade vävnaden bildar en styv och överväxt vävnadstruktur (Wynn, 2008). TGF- β_1 är en essentiell reglerare av fibros i flera olika organ, till exempel i njurar. Formationen av njurfibros regleras främst av den Smad-beroende signalräckan men TGF- β_1 kan även initiera fibros via signalräckor som saknar Smad-proteiner. Studier har visat att ett ökat uttryck av TGF- β_1 inducerar fibros genom att aktivera proliferation och migration av njurfibroblaster, samt genom att öka på produktionen av kollagen och andra molekyler som främjar fibros. I studierna framkom det även att en inhibering av TGF- β_1 begränsar framskridningen av fibros, genom att minska på aktiveringen av njurfibroblaster och produktionen av kollagen (Meng et al., 2016).



Figur 4. TGF- β :s roll i normala celler och vid utvecklingen av cancer. TGF- β upprätthåller vävnadshomeostasen samtidigt som proteinet fungerar som en tumörsuppressor genom att inducera apoptos och stoppa cellcykeln. Vid utvecklingen av cancer hämmas TGF- β :s tumörsuppressiva förmåga, samtidigt som cancercellerna använder TGF- β till sin fördel. TGF- β styr olika biologiska processer som inducerar EMT och angiogenes, samt att TGF- β hämmar immunförsvaret. Dessa processer stimulerar cancercellernas förmåga att metastasera.

Vid utvecklingen av cancer är TGF- β involverad i flera olika processer där cancercellerna antingen inhiberar TGF- β -signalräckan eller använder TGF- β till sin fördel (Siegel & Massagué, 2003). TGF- β -signalräckan är inhiberad, på grund av sin tumörsuppressiva förmåga, i olika slags av maligna cancerceller, för att uppnå ökad celldelning (Horbelt et al., 2012). En inhiberad TGF- β -signalräcka kan uppnås på olika sätt. I tarmcancer har det hittats en mutation som inaktiverar TGF- β -receptor 2 medan uttrycket av Smad 4 har visats vara minskat i bland annat bukspottkörtelcancer (Ikushima & Miyazono, 2010). Cancerceller som har förlorat sin tumörsuppressiva förmåga kan därefter använda TGF- β till sin fördel (figur 4). På transkriptionsnivå kan TGF- β inducera EMT via transkriptionsfaktorerna Snail och Slug (Massagué, 2008). Dessa transkriptionsfaktorer minskar på uttrycket av cellförbindelsemolekyler såsom E-cadherin och claudin, medan produktionen av cytoskeletala proteiner vimentin och aktin samt cellförbindelsemolekylen N-cadherin ökar. Snail ökar på produktionen av matrixmetalloproteaser (MMP-2 och MMP-9), som krävs för att nedbryta ECM-komponenter (Xu et al., 2009). Dessa förändringar ökar cancercellernas förmåga att dedifferentiera till en invasiv fenotyp samt etablerar och ökar på cellernas förmåga att metastasera (Massagué, 2008). Ett annat sätt att utnyttja TGF- β , som är en viktig

reglerare av immunresponser, är att skapa en omgivning runt cancercellerna där immunsystemet är inaktiverat. Cancerceller som utsöndrar TGF- β undviker immunförsvaret genom att hämma aktiveringen och differentieringen av T- och B-lymfocyter (Torre-Amione et al., 1990). Ytterligare kan TGF- β framkalla produktionen av nya blodkärl genom att öka på bland annat uttrycket av vaskulära endotelcellstillväxtfaktorer (eng. vascular endothelial growth factor VEGF) (Pertovaara et al., 1993). Med tanke på TGF- β :s markanta roll i cancer har flera TGF- β -inriktade behandlingsmetoder för cancer utvecklats (Katz et al., 2013). Behandlingsmetoderna kan stoppa syntesen av TGF- β med hjälp av specifika inhibitorer eller inhibera TGF- β :s bindning till receptorn genom användning av monoklonala antikroppar med hög affinitet för receptorn (Hau et al., 2007; van Meeteren et al., 2012).

2.3 Cellens förmåga att anpassa sig till proteinskadande stress

Flera fundamentala mekanismer har evolutionärt utvecklats för att hjälpa cellen att överleva i olika förhållanden, och skyddar därmed cellen mot olika cytotoxiska stimuli (Wong, 2005). En fundamental mekanism är antioxidant systemet, som motverkar oxidationen av reaktiva syreföreningar (eng. reactive oxygen specie, ROS). En annan essentiell mekanism är värmechockresponsen (eng. heat shock response, HSR), som skyddar cellen mot proteinskadande stress (Richter et al., 2010; Liou & Storz, 2010). Dessa mekanismer upprätthåller homeostasen i cellen, vilket betyder att om homeostasen rubbas kan förödande effekter uppkomma. I flera olika cancertyper har det detekterats ett avvikande uttryckt av olika molekylära chaperoner, som syntetiseras under HSR. Det har framkommit att det finns en koppling mellan oreglerad celldelning och en ökad produktion av chaperoner, där chaperonerna upprätthåller proteinstrukturen hos proteinerna involverade i signalkaskader som styr proliferation (Calderwood, 2016).

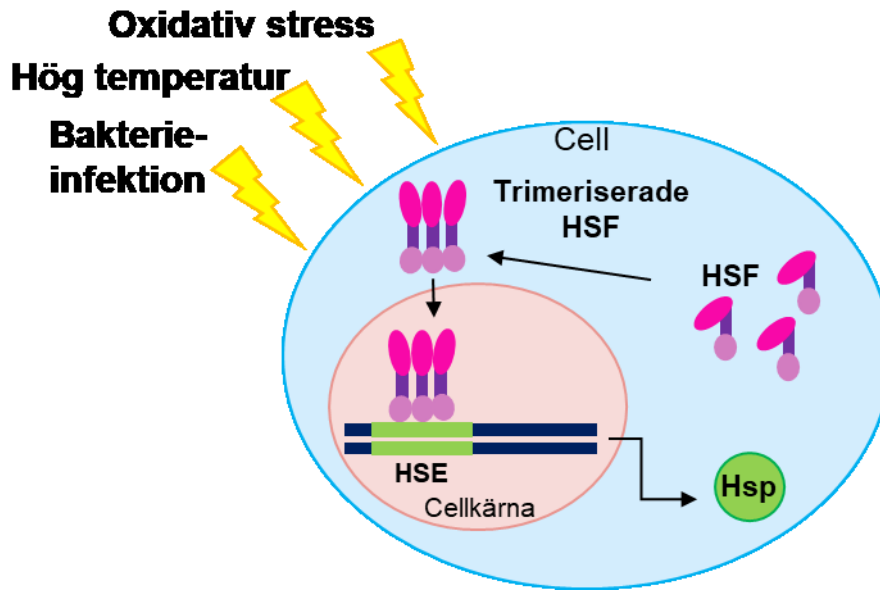
2.3.1 Värmechockresponsen, HSR

Värmechockresponsen, HSR, är en väsentlig mekanism som upptäcktes av Ferruccio Ritossa i början av 1960-talet. Ritossa studerade syntesen av nukleinsyror i kromosomala utvidgningar på spottkörtelceller hos bananflugans larver (*Drosophila melanogaster*), och upptäckte en förändring i RNA-syntesen vid värmebehandling

(Ritossa, 1962). Vidare forskning, som utfördes kring 1970-talet, bevisade att den ökade transkriptionen i de kromosomala utvidgningarna kodade för värmechockproteiner (eng. heat shock protein, Hsp), vilka produceras vid olika förhållanden som skapar proteinskadande stress (Tissiéres et al., 1974).

HSR initieras främst av värme men kan även aktiveras av andra cytotoxiska stimuli såsom oxidativ stress, tungmetaller och bakterieinfektioner (Schlesinger, 1990). Förutom att HSR initieras vid cellulär stress har responsen visats ha en viktig roll i normala fysiologiska processer, såsom organutvecklingen och differentiering (Zhang et al., 2014). HSR är en universell mekanism som har identifierats i så gott som alla organismer, allt från bakterier till växter och djur. Responsen har även observerats i nästan alla cell- och vävnadstyper hos multicellulära organismer (Lindquist, 1986). HSR har även visats skydda cancercellerna samt stimulera utvecklingen och spridningen av cancer. HSR:s roll vid utvecklingen av cancer diskuteras i ett senare skede av denna Pro gradu-avhandling (stycke 2.5).

Hos eukaryoter initieras HSR, som är illustrerad i figur 5, av aktiverade värmechockfaktorer (eng. heat shock factor, HSF), vilka är transkriptionsfaktorer. Aktiveringen av HSR sker via en komplex process som inkluderar trimerisering, förflyttning till cellkärnan samt bindning av HSF till DNA (Åkerfelt et al., 2007). Trimeriserade HSFs binder till värmechockelement (eng. heat shock element, HSE), som är en DNA-sekvens inom promotorregionen hos gener som kodar för Hsp (Amin et al., 1988). Interaktionerna mellan transkriptionsfaktorerna och DNA kan sedan medföra strukturella förändringar på kromatinet, vilket antingen stimulerar eller hämmar transkriptionen av värmechockgenerna. I cellen fungerar Hsps som molekylära chaperoner, vars roll är att upprätthålla proteinernas struktur och funktion (figur 5) (Åkerfelt et al., 2010). Under HSR är transkriptionen och translationen av många proteiner hämmade, troligen på grund av felveckade proteiner i cellen (Fulda et al., 2010)



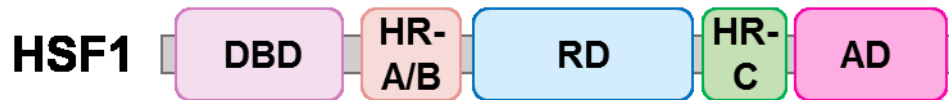
Figur 5. Schematisk illustration av värmechockresponsen. Värmechockresponsen initieras vid olika stressförhållanden som oxidativ stress, hög temperatur och bakterieinfektion. Vid värmechockresponsen trimeriseras värmechockfaktorer (HSF), varefter de binder till värmechockelement (HSE) i promotorregionen hos gener som kodar för värmechockproteiner (Hsp). Den ökade transkriptionen av hsp-gener, ökar på uttrycket av Hsp, vilka upprätthåller strukturen och funktionen av andra cellulära proteiner.

2.4 Värmechockfaktorer, HSFs

Reglering av genuttrycket i cellen är en fundamental process hos alla levande organismer, och denna process styrs av olika grupper av transkriptionsfaktorer (Latchman, 1997). Värmechockfaktorer, HSFs, är en familj av transkriptionsfaktorer som styr regleringen av genuttrycket under HSR genom att stimulera produktionen av Hsp (Åkerfekt et al., 2010). HSFs har identifierats hos samtliga eukaryoter, där de är delaktiga i olika biologiska processer. De styr bland annat cellens förmåga att anpassa sig till cellulär stress, vid veckning av proteiner samt vid utvecklingsprocesser såsom testikelutveckling, spermatogenes samt utvecklingen av ögats lins (Björk & Sistonen, 2010). Hos evertebrater såsom jäst och bananflugan har endast en typ av HSF identifierats medan ett flertal HSFs existerar hos vertebrater (Santoro, 2000). I däggdjur har fyra hsf-gener upptäckts, hsf1, hsf2, hsf3 och hsf4 (Pirkkala et al., 2001). Värmechockfaktor 1, HSF1, och värmechockfaktor 2, HSF2, är de mest studerade värmechockfaktorerna i däggdjur. HSF3 har främst identifierats i olika fågelarter, men har även upptäckts hos möss (Östling et al., 2007; Fujimoto et al., 2010). Hos möss reglerar HSF3 en specifik uppsättning av gener som skyddar cellen från stress (Fujimoto et al., 2010). HSF4 har detekterats i hjärnan samt linsen, och är den senaste

identifierade HSF i däggdjur (Östling et al., 2007). De enskilda värmechockfaktorerna kommer ytterligare att diskuteras i ett senare skede av Pro gradu-avhandlingen (stycke 2.4.1-2.4.4).

HSFs består, precis som andra transkriptionsfaktorer, av olika funktionella domäner. Dessa domäner har främst karakteriserats hos HSF1 och är illustrerade i figur 6 (Åkerfelt et al., 2010). Den mest bevarade domänen, som har identifierats hos alla HSFs, är en DNA-bindande domän (DBD) som är belägen i den N-terminala delen av proteinet. Alla HSFs binder till HSE på DNA-sekvensen, som består av ett flertal upprepningar av sekvensen nGAAn. DBD på HSF känner igen en nGAAn-sekvens, vilket möjliggör bindningen av HSFs till DNA (Björk & Sistonen, 2010; Anckar & Sistonen, 2011). HSF1 och HSF2 innehåller även en oligomeriseringsdomän, som krävs vid formationen av HSF-trimerer. Oligomeriseringsdomänen är belägen intill DBD och består av hydrofoba heptaduppteppningar A och B (eng. heptad repeat A/B, HR-A och HR-B), som tillsammans bildar en trippelsträngad spolstruktur som krävs vid trimeriseringsprocessen (Wu, 1995; Anckar & Sistonen, 2011). Däremot har en annan heptadupprepning, heptadupprepning C (eng. heptad repeat C, HR-C) identifierats, vars uppgift är att hämma spontan trimerisering av HSFs (Björk & Sistonen, 2010). En annan viktig funktionell domän är den regulatoriska domänen (RD), som är essentiell för cellens förmåga att reagera på stresstimuli (Åkerfelt et al., 2010). RD är uppbyggd av olika aminosyror, och dessa aminosyror är kända mål för olika post-translationella modifieringar. Fosforylering av specifika aminosyror i RD har exempelvis visats förlänga tiden det tar för HSF1 att aktiveras, samt hämmar HSF1:s förmåga att inducera transkription av olika målgener (Budzynski et al., 2015). Slutligen är en aktiveringsdomän (AD) belägen i den C-terminala delen, vars uppgift är att främja transkriptionen av olika målgener samt reglera aktiveringen av HSFs (Åkerfelt et al., 2010).



Figur 6. De funktionella domänerna hos HSF1. Den DNA-bindande domänen (DBD) krävs för att HSF1 skall kunna binda till HSE-sekvensen på DNA. Heptaduppreppningarna A och B (HR-A/B) i oligomeriseringsdomänen krävs för trimerisering av HSF1 medan heptaduppreppning C (HR-C) har i uppgift att hämma spontan trimerisering. Aktiveringsdomänen (AD) främjar transkriptionen av olika målgener medan regulatoriska domänen (RD) är viktig för cellens förmåga att reagera på stress och modulera HSF1:s transkriptionella kapacitet under stress.

2.4.1 Värmechockfaktor 1, HSF1

Värmechockfaktor 1, HSF1, är däggdjurens variant av den enda HSF hos evertebrater och den huvudsakliga regleraren av HSR. Under HSR reglerar HSF1 transkriptionen av olika Hsps, vilket upprätthåller proteinhomeostasen i cellen (Anckar & Sistonen, 2011). Det har även visats att HSF1 är oersättlig av andra HSFs, eftersom HSF1-knockout möss inte klarade av att återhämta sig från stressbehandling (McMillan et al., 1998). HSF1 är ett protein som konstant uttrycks i cellen, och huvudsakligen regleras aktiviteten av HSF1 genom olika protein-proteininteraktioner eller post-translationella modifieringar (Kline & Morimoto, 1997; Vihervaara & Sistonen, 2014). Hos däggdjur förekommer det två stycken isoformer av HSF1, HSF1- α och HSF1- β , som uppkommer genom alternativ splitsning (Björk & Sistonen, 2010). HSF1 uttrycks i de flesta vävnadstyper i kroppen som testiklar, skelettmuskler samt hjärtat och lungor, medan ett svagare uttryck av HSF1 förekommer i lever och njurar (Fiorenza et al., 1995).

Under normala förhållanden förekommer HSF1 i en inaktiv monomer form, men vid cellulär stress aktiveras HSF1 genom att bilda transkriptionellt aktiva trimerer (Vihervaara & Sistonen, 2014). Främst bildar HSF1 homotrimerer sinsemellan, men HSF1 kan även bilda heterotrimerer med HSF2 på grund av likheter i oligomeriseringsdomänerna (Loison et al., 2006). Inaktiva HSF1 är främst lokaliserade i cytoplasman, där de bland annat är bundna till olika chaperoner. Dessa chaperoner kan reglera aktivering av HSF1 via protein-proteininteraktioner. Vissa chaperoner, till exempel Hsp90, upprätthåller den inaktiva monomera formen av HSF1 under normala förhållanden, men under HSR när felveckade proteiner ökar, frisläpps HSF1 från chaperonerna (Anckar & Sistonen, 2011). Fria HSF1 trimeriseras,

varefter de förflyttas till cellkärnan där HSF1 reglerar uttrycket av olika målgener (Fulda et al., 2010). HSF1:s aktivering regleras ytterligare av olika post-translationella modifieringar som fosforylering, acetylering och sumoylering (Kline & Morimoto, 1997; Hong et al., 2001; Westerheide et al., 2009). Fosforylering av HSF1 kan såväl öka som minska proteinets transkriptionsaktivitet (Vihervaara & Sistonen, 2014).

HSF1 är även involverad i andra biologiska processer som åldrandet och utvecklingen, och de reglerar gener som är involverade i bland annat cellcykeln och syntesen av proteiner (Åkerfelt et al., 2010; Björk et al., 2016) HSF1 har en viktig roll vid fertilitet och gematogenesen. (Christians et al., 2000; Nakai et al., 2000). Studier med HSF1-knockout möss visar att reproduktionsproblem förekommer hos såväl honor som hanar. HSF1-knockout honor klarar av att utvecklas till vuxen ålder men innehar en minskad kroppsvolym samt en ofullbordad utveckling av placentan (Xiao et al., 1999; Su et al., 2016). En outvecklad placenta hos HSF1-knockout honor leder därmed till infertilitet, eftersom dess embryon är oförmögna att fullborda embryogenesen (Christians et al., 2000). En annan studie, där HSF1-knockout hanar studerades, framkom det att reproduktionsproblem hos hanar uppkommer genom störningar i spermatogenesen, som orsakas av att en aktiv form av HSF1 uttrycks i testiklarna (Nakai et al., 2000). Hos HSF1-knockout möss förblir hanen däremot fertil men produktionen av spermier minskar (Salmand et al., 2008). Möss med dubbel knockout av HSF1 och HSF2 saknar förmågan att producera mogna spermier, vilket indikerar att såväl HSF1 som HSF2 är essentiella för den normala spermatogenesen (Wang et al., 2004).

2.4.2 Värmechockfaktor 2, HSF2

Värmechockfaktor 2, HSF2, har först och främst associerats med biologiska processer som utveckling och differentiering men reglerar även HSR, tillsammans med HSF1, genom att aktivera gener som kodar för Hsps (Björk & Sistonen, 2010). Under normala förhållanden är HSF2 inaktiv och i motsats till HSF1, som är monomer i inaktiv form, bildar HSF2 dimerer (Sistonen et al., 1994). När cellen utsätts för stress bildar HSF2 trimerer, vilket möjliggör en bindning till DNA. Förutom att HSF2 kan bilda homotrimerer och därmed reglera gener som är associerade med utveckling och differentiering, kan en heterotrimer bildas mellan HSF1 och HSF2. Heterotrimerer mellan HSF1 och HSF2 kan tillsammans reglera HSR (Loison et al., 2006).

Regleringen av HSF2 är inte lika väl karakteriserad som hos HSF1. Medan HSF1 regleras av protein-proteininteraktioner samt genom mångfaldig post-translationell modifiering, regleras HSF2 främst av post-translationella modifieringar vid olika intracellulära processer (Björk & Sistonen, 2010; Vihervaara & Sistonen, 2014). HSF2 är ett kortlivat protein, vars mängd i cellen bland annat regleras av ubiquitin-medierad nedbrytning under värmechock (Björk & Sistonen, 2010). HSF2:s aktivitet anses bero på dess mängd i cellen, en högre koncentration ökar trimeriseringen och därmed på DNA-bindningskapaciteten (Sarge et al., 1993). Ytterligare har en studie visat att DNA-bindningskapaciteten för HSF2 ökar när HSF2 är sumoylerad (Goodson et al., 2001).

HSF2:s roll vid utveckling och differentiering framkom i en studie där K562-erytroleukemicellernas differentiering undersöktes. I studien framkom det att en ökad syntes av Hsp70 inträffade i K562-celler som behandlats med hemin, en metabolit som är viktig vid differentiering till erythrocyter. HSF2, som aktiveras av hemin, inducerar transkriptionen av hsp70, och förmedlar därmed differentieringen av K562-erytroleukemicellerna (Sistonen et al., 1992). HSF2 har även visats vara ansvarig för regleringen av olika hsp-gener, och uttrycks markant vid olika utvecklingsprocesser. Uttrycket av HSF2 är rikligt vid spermatogenesen eller vid utvecklingen av hjärtat (Sarge et al., 1994; Eriksson et al., 2000). Ytterligare har HSF2 en viktig roll under mitosen där HSF2 reglerar genuttrycket hos prolifererande celler (Xing et al., 2005; Elsing et al., 2014). Vanligtvis under mitosen är DNA kondenserat, vilket förhindrar att generna uttrycks och cellerna är mera känsliga för stress (Belmont, 2006). HSF2 kan dock binda till promotorn för hsp70, vilket hindrar nedtystningen av hsp70-genen. Detta möjliggör att hsp70-genen avskrivs, vilket resulterar i att Hsp70-proteinet syntetiseras och kan därmed medföra skydd åt delande celler även under stressförhållanden (Xing et al., 2005). Vid kraftig stress genomgår HSF2 dock ubiquitin-medierad nedbrytning, vilket i sin tur bidrar till att HSF1 binder till hsp70-genens promotor. Detta resulterar i en kraftigare transkription av värmechockproteiner, och därmed en mera intensiv värmechockrespons (Elsing et al., 2014).

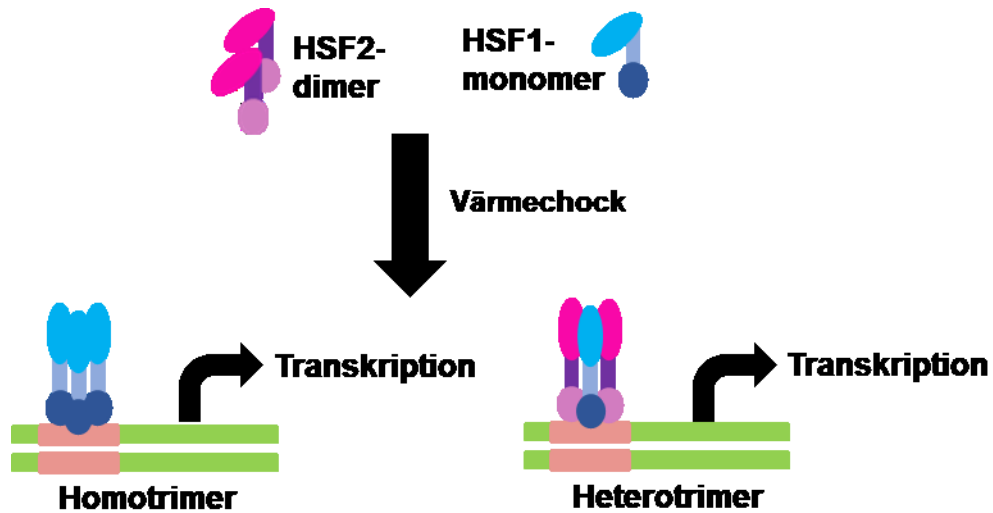
Hos däggdjur förekommer det, precis som med HSF1, två stycken HSF2-isoformer; HSF2- α och HSF2- β (Björk & Sistonen, 2010). Dessa isoformer uppkommer genom

alternativ splitsning av hsf2 pre-mRNA (eng. precursor mRNA). HSF2- α är en mera potent aktiverare av transkriptionen än HSF2- β , vilket medför att transkriptionsaktiviteten hos HSF2 kan regleras genom alternativ splitsning av hsf2 pre-mRNA (Goodson et al., 1995). Uttrycket av HSF2 är inte lika kraftigt utbrett i olika vävnadstyper som HSF1, men HSF2- α förekommer främst i testiklarna medan HSF2- β uttrycks i såväl hjärtat som hjärnan (Fiorenza et al., 1995; Goodson et al., 1995).

2.4.3 Heterotrimerisering av HSF1 och HSF2 under värmechock

HSF1 är den främsta regleraren av värmechockresponsen, men även HSF2 anses delta i regleringen av genuttrycket under HSR (Fulda et al., 2010). HSF1- och HSF2-proteinerna består av ungefär lika många aminosyror men de är för övrigt relativt olika i struktur, med en identitet på endast 38 %. Likheten mellan proteinerna påträffas i den DNA-bindande domänen samt i oligomeriseringsdomänen (Sarge et al., 1991). Samverkan mellan HSF1 och HSF2 sker via oligomeriseringsdomänerna som behövs för bildningen av heterotrimerer (figur 7), vilka inducerar transkriptionen av värmechockgener (Loison et al., 2006; Östling et al., 2007)

HSF1 och HSF2 reglerar uttrycket av såväl egna som gemensamma målgener under HSR, och ibland krävs samverkan av båda transkriptionsfaktorerna för att erhålla en korrekt transkription av målgenen. Studier har visat att HSF1 har en inverkan på HSF2:s DNA-bindningskapacitet. En nedreglering av HSF1 inverkar negativt på HSF2:s förmåga att binda till hsp70-promotorn under värmechock (Östling et al., 2007). Dessutom har HSF2-knockout möss ett lägre uttryck av olika hsp-gener fastän HSF1 är den primära regleraren av HSR, vilket intygar om en samverkan mellan HSF1 och HSF2 under värmechock (Östling et al., 2007). Ytterligare uppkommer interaktioner mellan HSF1 och HSF2, när proteinerna ansamlas i så kallade nukleära stresskroppar (eng. nuclear stress bodies) under värmechock. Nukleära stresskroppar är troligen viktiga reglerare av stressresponsen och upprätthållandet av cellhomeostasen (Alastalo et al., 2003; Sandquist et al., 2009). Vidare forskning är dock nödvändig för att fastställa de nukleära stresskropparnas roll vid stressresponsen.



Figur 7. Formation av olika HSF-trimerer under värmechock. HSF1 är i inaktiv form en monomer medan HSF2 bildar dimerer. Under värmechock trimeriseras HSFs, varefter de flyttas till cellkärnan där de reglerar transkriptionen av olika målgener. HSF1 kan trimeriseras med sig själv och bilda homotrimerer. Ytterligare är det möjligt för HSF1 att bilda heterotrimerer med HSF2, på grund av likheter i HR-A och HR-B i oligomeriseringsdomänen.

2.4.4 Värmechockfaktor 3 och värmechockfaktor 4

Förutom HSF1 och HSF2 har ytterligare två stycken HSFs identifierats hos däggdjur, värmechockfaktor 3, HSF3, och värmechockfaktor 4, HSF4. HSF3 är, precis som HSF1, den primära regleraren av värmechockresponsen i fåglar och ödlor (Björk & Sistonen, 2010; Takii et al., 2017). Främst anses HSF3 vara en fågelspecifik HSF, men proteinet har även identifierats hos möss och ödlor (Fujimoto et al., 2010; Takii et al., 2017). Under normala förhållanden uttrycks HSF3 konstant i dimer form, men under cellstress trimeriseras och aktiveras HSF3, orsakat av en nukleär lokaliseringsignal. Trimeriserade HSF3 transporteras till cellkärnan där proteinet reglerar transkriptionen av värmechockgener (Nakai et al., 1995; Nakai & Ishikawa, 2000). Aktiveringen av HSF3 sker vid högre temperaturer än för HSF1. Medan HSF1 aktiveras vid mild värmechock, krävs det en kraftig värmechock för att aktivera HSF3. Vid kraftig värmechock ökar mängden HSF3 medan HSF1:s nivåer sjunker, vilket indikerar att HSF3 har en viktig roll vid kraftig cellulär stress hos olika fågelarter (Tanabe et al., 1997). HSF3 har dessutom visats vara essentiell vid aktiveringen av HSF1 under värmechock. HSF3-knockout fåglar är inte kapabla att trimerisera HSF1 under värmechock, vilket minskar på uttrycket av hsp-gener (Tanabe et al., 1998). Fastän HSF3 har identifierats hos möss fungerar proteinet inte som en reglerare av den

klassiska värmechockresponsen. HSF3 hos möss aktiverar dock en specifik klass av värmechockproteiner som skyddar cellen mot stress (Fujimoto et al., 2010).

HSF4 har endast hittats hos däggdjur där den uttrycks i ett fåtal vävnader som hjärtat, hjärnan, skelettmuskler och bukspottskörteln (Nakai et al., 1997; Östling et al., 2007). I motsats till de övriga HSFs saknar HSF4 den funktionella domänen HR-C, som förhindrar trimerisering, vilket betyder att HSF4 konstant är trimeriserad och bunden till DNA (Nakai et al., 1997). Dock har forskare inte lyckats att detektera denna konstanta bindning till DNA, exempelvis mellan HSF4 och HSE på hsp70-promotorn (Abravaya et al., 1991). HSF4 uttrycks, precis som HSF1 och HSF2, i två isoformer; HSF4- α och HSF4- β . Dessa isoformer har olika inverkan på transkriptionsaktiviteten. Medan HSF4- α inhiberar det konstanta uttrycket av värmechockgener, har HSF4- β en aktiverande inverkan på transkriptionen. Detta intygar att varierande splitsning av hsf4 pre-mRNA kan reglera uttrycket av vävnadsspecifika värmechockgener (Tanabe et al., 1999). HSF4 är precis som HSF2, mest känd som en faktor som reglerar utvecklingen. Till exempel är HSF4 viktig för utvecklingen av ögats lins samt upprätthållandet av luktepitelet (Björk & Sistonen, 2010). I en undersökning där hsf4-genen studerades hos tre kinesiska familjer med genetisk katarakt, identifierades en mutation i hsf4-genen som troligen påverkar den DNA-bindande domänen hos HSF4. (Bu et al., 2002). I en annan studie utvecklades en musmodell som imiterade human katarakt genom att nedtysta HSF4, vilket resulterade i en blind fenotyp. Därmed anser man idag att HSF4 har en viktig funktion i regleringen av proteiner som är viktiga vid utvecklingen av ögats lins (Shi et al., 2009).

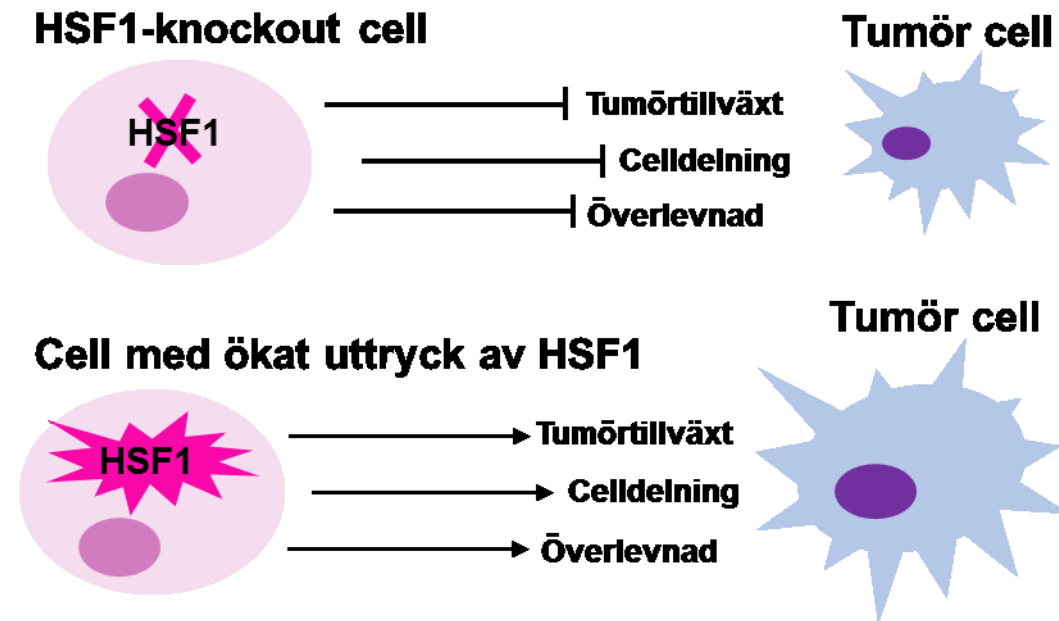
2.5 Värmechockfaktorer i cancer

Vid cancerprogression utvecklas normala celler gradvis till ett neoplastiskt stadium genom att utnyttja olika biologiska processer i cellen. De biologiska processerna ökar cellens förmåga till celledelning, undviker apoptos, inducerar angiogenes samt aktiverar invasion och metastasering. Grunden till dessa processer är en underliggande instabilitet i genomet som bland annat kan orsakas av en felaktig reglering av diverse faktorer (Hanahan & Weinberg, 2011). HSFs, som är essentiella vid regleringen av cellens överlevnadsförmåga, har visats vara felreglerade i vissa cancerceller. HSF1 har identifierats som en drivare av cancerprogression medan HSF2 kan fungera som en tumörsuppressorer (Björk et al., 2016). Dessutom har ett ökat uttryck av

värmechockproteiner, som regleras av HSFs, identifierats i flera cancertyper och dessa proteiner är involverade i reglering av de olika biologiska processerna (Ciocca & Calderwood, 2005).

2.5.1 HSF1:s roll vid utvecklingen av cancer

HSF1 är den primära regleraren av värmechockresponsen och upprätthåller proteinhomeostasen i cellen genom att styra transkriptionen av chaperoner (Björk et al., 2016). HSF1 reglerar även gener som styr diverse cellfunktioner som celledning, överlevnad samt proteinsyntes och glukosmetabolismen. Vid cancerprogression driver HSF1 utvecklingen av maligna celler genom att upprätthålla ett nätverk av dessa cellfunktioner, eftersom cancertillväxt till stor del är beroende av normala cellprocesser (Dai et al., 2007). I studier med HSF1-knockout möss framkom det att tumörutvecklingen, orsakad av mutationer i p53, minskar markant. Dessutom hämmas celledningen och överlevnad hos cancerceller som inte uttrycker HSF1. Detta indikerar om HSF1:s roll som främjare av cancerprogression (figur 8) (Min et al., 2007; Dai et al., 2007). Höga nivåer av HSF1 har identifierats hos ett flertal cancerceller, i jämförelse med normala celler, och tumörerna associeras ofta med hög metastaserande effekt och låg överlevnadsprognos. Trots det har varken somatiska mutationer i hsf1-genen upptäckts hos cancer eller att en ökad produktion av HSF1 leder till en mera malign fenotyp (de Thonel et al., 2011). Troligen är de signalräckor som HSF1 reglerar kraftigt modulerade hos cancerceller i jämförelse med normala celler (Mendillo et al., 2012). I normala celler styr HSF1 regleringen av hsp-gener, och ett ökat uttryck av såväl Hsp som HSF1 har identifierats i cancer. Trots det kunde inte ett minskat uttryck av Hsp identifierats hos HSF1-knockout möss, vilket intygar att HSF1 och Hsps inte alltid är korrelerade (Whitesell & Lindqvist, 2009). HSF1:s roll i cancer är väl etablerad men den underliggande mekanismen, gällande HSF1:s ständiga aktivitet samt funktion, förblir oklar (Dai et al., 2016).



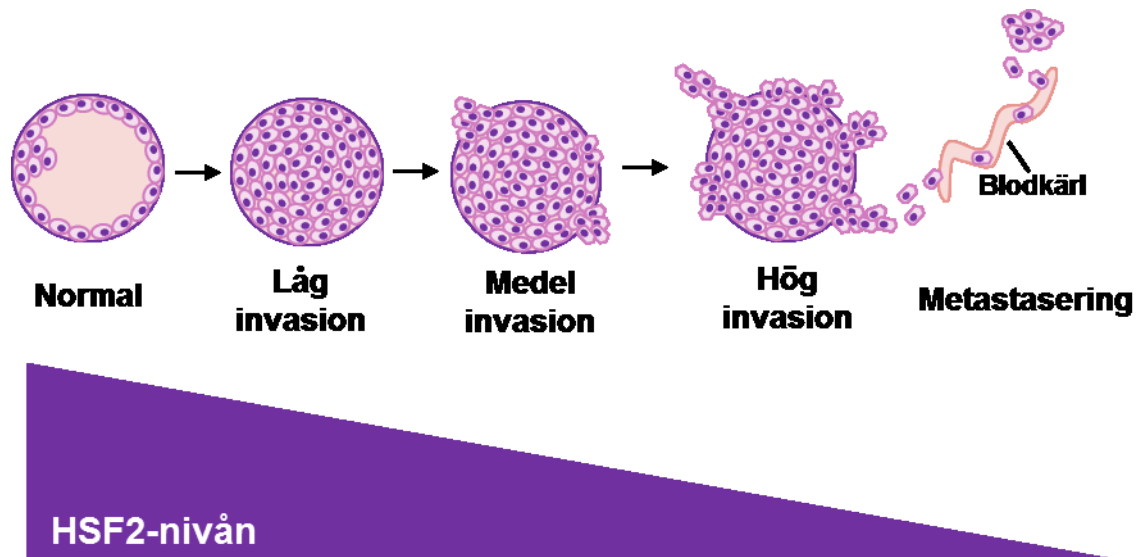
Figur 8. HSF1 roll som främjare av cancerprogression. HSF1 har en essentiell roll vid utvecklingen av tumörtillväxten genom att reglera cellens delning och överlevnad. Studier har visat att celldelning och överlevnad hämmas hos HSF1-knockout celler medan en markant hämning av tumörutvecklingen har påvisats hos HSF1-knockout möss.

2.5.2 HSF2, en potentiell tumörsuppressorer

HSF2 är en essentiell reglerare av biologiska processer men reglerar även värmechockresponsen tillsammans med HSF1 (Björk & Sistonen, 2010). Medan HSF1 har identifierats som en främjare av cancerprogression är HSF2:s inverkan på cancer ännu bristfällig. En ny studie indikerar dock att HSF2, i motsatt till HSF1, har en negativ effekt på cancerprogression och invasion (Björk et al., 2016). Björk med kollegor konstaterade att prostatacancer celler med liten invasionskapacitet innehåller en riklig mängd HSF2, medan lägre nivåer av HSF2 indikerar på en ökad invasiv fenotyp (figur 9). HSF2 fungerar troligen som en tumörsuppressorer genom att reglera uttrycket av gener involverade i invasion, cellförbindelsemolekyler och EMT (Björk et al., 2016). Björk med kollegor undersökte mRNA-nivåer för specifika EMT-markörer hos prostatacancer celler i jämförelse med prostatacancer celler där HSF2 nedreglerats med RNA-interferens. Resultatet visar att nedreglerad HSF2 inducerar en ökning i mRNA-nivåerna hos gener som inducerar EMT, vilket leder till migration och därmed en mera invasiv celltyp (Björk et al., 2016).

Nyligen har en annan, motsäggande, studie publicerats av Zhong med kollegor, som påvisar HSF2:s roll som främjare av cancerprogression. I studien framkom det att

HSF2 uttrycks i rikligare mängd hos lungcancerpitelceller i jämförelse med normala lungepitelceller. Resultatet påvisade att ett ökat uttryck av HSF2 i såväl normala lungepitelceller som lungcancer celler främjar celldelning samt migration genom att reglera värmechockproteiner (Zhong et al., 2016).



Figur 9. En schematisk bild av HSF2-nivåernas inverkan på cellinvasion. Höga nivåer av HSF2 identifieras hos normala prostataceller medan hos maligna cancer celler minskar nivåerna av HSF2. HSF2 fungerar som en tumörsuppressorer genom att reglera uttrycket av gener involverade i invasion, cellförbindelsemolekyler och EMT. Utan HSF2 uppkommer en mera invasiv cellstruktur som genom EMT kan inducera metastasering.

3 Målsättningar

Värmechockresponsen är en evolutionärt välbevarad överlevnadsmekanism i cellen, som aktiveras av olika cellulära stressförhållanden och har förmågan att upprätthålla proteinernas funktion och struktur genom att öka på mängden värmechockproteiner i cellen. De olika cellulära stressförhållandena aktiverar värmechockfaktorer, som i sin tur reglerar värmechockresponsen (Åkerfelt et al., 2010). En rubbad värmechockrespons har visats vara involverad i utvecklingen av cancer, där HSF1 stimulerar tumörtillväxt medan HSF2 fungerar som en tumörsuppressör (Björk et al., 2016). Björk med kollegor upptäckte ett minskat uttryck av HSF2 i prostatacancer celler som är invasiva och genomgår EMT (Björk et al., 2016). EMT är en process som i huvudsak initieras av en aktiverad TGF- β -signalräcka, som har en viktig roll vid utvecklingen av cancer (Xu et al., 2009). Syfte med denna undersökning var att studera om en aktiverad TGF- β -signalräcka hade förmågan att inducera EMT i humana bröstepitelceller (MCF10A-celler) och om denna process påverkar uttrycket av HSF2. För att uppnå detta ändamål undersöktes det hur TGF- β -signalräckan reglerar mängden av HSF2, om detta sker via en förändring i mRNA- eller proteinuttrycket. TGF- β -signalräckans inverkan på nivåerna av hsf2-mRNA undersöktes med hjälp av metoden qRT-PCR medan en ubikvitin-medierad nedbrytning av HSF2 studerades med hjälp av metoden immunoprecipitering, där HSF2-proteinet isolerades, innan ubikvitin-märkt HSF2 detekterades med hjälp av metoden SDS-PAGE och immunoblotting. Denna analys av hur uttrycket av HSF2 regleras under EMT ger en inblick i hur HSF2 fungerar som en tumörsuppressör.

En sammanfattning av målsättningarna i denna Pro gradu-avhandling:

- 1) Undersöka om det går att inducera EMT i MCF10A-celler genom att aktivera TGF- β -signalräckan
- 2) Bestämma om TGF- β -signalräckan påverkar proteinuttrycket av HSF2
- 3) Bestämma om TGF- β -signalräckan kan reglera mRNA-nivåerna av hsf2

4 Material och metod

4.1 Cellodling

I denna studie användes cellinjen MCF10A som är humana bröstepitelceller. MCF10A-cellerna är icke-transformerade celler och utsätts därmed för senescens efter ungefär tio passager. Eftersom MCF10A-celler är icke-transformerade epitelceller kan de användas som modellsystem för att studera de biologiska och funktionella rollerna av EMT, vilket även har framkommit i tidigare studier (Sarrió et al., 2008; Vuoriluoto et al., 2011). MCF10A-cellerna är fastsittande celler som odlades i DMEM/F12 (eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco) innehållande 5 % hästserum, 10 µg/ml insulin, 0,5 ng/ml hydrokortison, 20 ng/ml EGF, 100 ng/ml koleratoxin samt penicillin (50 U/ml)/streptomycin (50 µg/µl). Under odlingen inkuberades cellerna vid 37 °C i 5 % CO₂.

4.2 Behandling och lysering av celler

För att undersöka TGF-β-signalräckans inverkan på uttrycket av HSF2 stimulerades signalräckan via olika behandlingsmetoder. TGF-β-signalräckan aktiverades när cellerna behandlades med TGF-β₁ (eng. transforming growth factor β₁) (10 ng/ml, R & D system), som binder till Typ-II-receptorn i cellmembranet. För att inaktivera TGF-β-signalräckan behandlades cellerna med SB 431542 hydrat (TGF-β-receptor-I-inhibitor) (10 µM, Sigma-Aldrich), som genom att binda till och inaktivera Typ-I-receptorn stoppar Smad-proteinernas aktivering. Denna TGF-β-receptor-I-inhibitorn valdes utöver andra inhibitorer eftersom SB 431542 hydrat stoppar TGF-β-signalräckan vid det tidigaste skedet i signalkaskaden. Som positiv kontroll i detta arbete användes StemXVivo EMT Inducing Media Supplement (XV) (10 µl/ml, R & D systems), vars effekt har visats inducera EMT i ett flertal olika celltyper (Tang et al., 2013). XV innehåller olika komponenter som aktiverar Wnt- och TGF-β-signalräckan samt antikroppar som specifikt binder till E-cadherin och andra essentiella EMT-proteiner. Wnt aktiverar bland annat adhesions-kinaser och små GTPaser, vilket inducerar EMT, medan ett minskat E-cadherin-uttryck resulterar i en mesenkymal-fenotyp.

MCF10A-cellerna behandlades antingen enskilt med TGF- β_1 , TGF- β -receptor-I-inhibitorn eller XV, eller med olika kombinationer av dessa ämnen. Inför varje behandling upplöstes ämnena i DMEM/F12, men i motsats till deras tillväxtmedium innehöll behandlingsmediet endast 2 % hästserum och saknade EGF. Behandlingen pågick i 24 h varefter cellerna tvättades i fosfat-buffrad saltlösning (eng. phosphate-buffered saline, PBS). Proven som användes för qRT-PCR-analys skördades direkt i PBS genom skrapning, medan proven som användes för analys med immunoblottnings lyserades i 3 x Laemmlibuffert (receptbilaga). qRT-PCR-proven förvarades vid -20 °C medan Laemmli-lysaten förvarades vid 4 °C tills vidare användning.

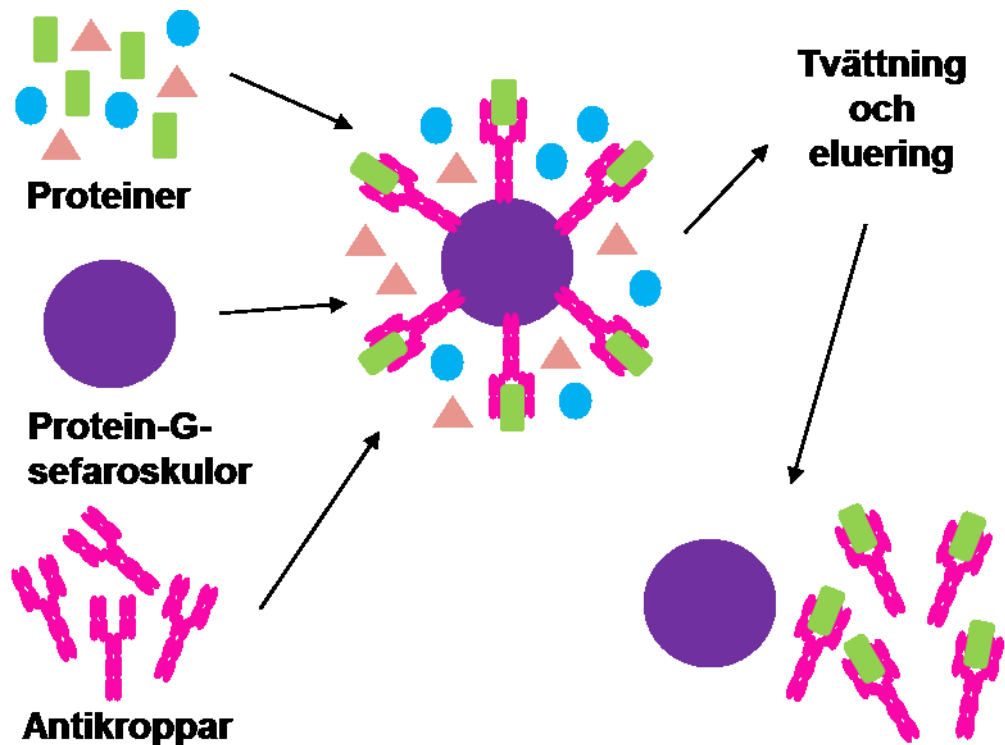
För att detektera ubikvitinerade HSF2-proteiner behandlades MCF10A-cellerna dessutom med 10 μ M av MG132 (Sigma-Aldrich) för 3 timmar samt värmechockades vid 42°C i 30 minuter. MG132 hindrar nedbrytningen av ubikvitinerade proteiner genom att blockera proteasomens proteolytiska aktivitet, vilket leder till en ackumulering av ubikvitin-märkta proteiner i cellen (Han et al., 2009). En ökning av ubikvitin-märkta proteiner sker även vid kort värmechock (Parag et al., 1987). Från de behandlade cellerna isolerades HSF2 med hjälp av immunoprecipiteringsmetoden, varefter ubikvitinerade HSF2-proteiner detekterades med SDS-PAGE och immunoblotting.

4.3 Immunoprecipitering (IP)

Metoden immunoprecipitation tillämpas när ett specifikt protein isoleras från ett lysat innehållande flera tusentals olika proteiner. Behovet att isolera ett specifikt protein kan vara nödvändigt i studier vars syfte är att undersöka proteinets post-translationella modifiering. Immunoprecipiteringsmetoden utnyttjar antikroppar som specifikt binder till proteinet av intresse, och dessa antikroppar sammankopplas även med agaros- eller magnetkulor. Tillsammans bildar proteinet av intresse, kulorna och antikropparna ett komplex. I detta arbete användes protein-G-sefarskulor (GE Healthcare) som är små agaroskulor bundna med bakteriellt G-protein. G-proteinerna har hög affinitet för olika antikroppar, samt deras bindning till agaroskulorna ger agaroskulorna en högre vikt. Denna vikt resulterar i en högre densitet hos komplexet än hos de resterande beståndsdelarna i lysatet, och komplexet kunde därmed separeras från lysatet genom centrifugering. Slutligen tvättas resterande proteiner bort och proteinet av intresse

frigörs från protein-G-sefarskulorna genom att koka kulorna i lysisbuffert. Processen är illustrerad i figur 10.

Metoden immunoprecipitering användes i detta arbete för att isolera HSF2 från MG132-behandlade och värmechockade MCF10A-celler för att därefter försäkra sig om att ubikvitinerade HSF2-protein kunde detekteras. Det har tidigare visats att HSF2-nivåerna kan regleras via ubikvitinering under cellstress (Ahlskog et al., 2010). Dessutom var planen att isolera HSF2 från TGF- β_1 -behandlade celler, för att undersöka om behandlingen inducerar ubikvitineringen av HSF2.



Figur 10. Principen för immunoprecipitering. Metoden immunoprecipitering använder sig av antikroppar som specifikt binder till ett protein. Dessa antikroppar är även bundna till protein-G-sefarskolor och tillsammans bildar dessa komponenter ett komplex. Komplexet kan avlägsnas från resten av lysatet genom cetrifugering, varefter övriga proteiner i supernatanten tvättades bort. Slutligen frigörs proteinet av intresse, med de bundna antikropparna, från protein-G-sefarskulorna vid en eluering med lysisbuffert.

4.3.1 Lysering av celler och immunoprecipitering

Cellpelleten från de behandlade MCF10A-cellerna löstes upp i 20-30 μ l kall PBS, varefter cellerna lyserades i 100 μ l kokande 1 % SDS-PBS (receptbilaga). Proverna kokades ytterligare på värmeblock (95 °C) i 10 minuter, med regelbunden omrörning. SDS (natriumdodekylsulfat, eng. sodium dodecyl sulphate) lyserar proteinerna genom att bryta deras icke-kovalenta interaktioner, vilket medför att proteinernas tertiärstruktur löses upp och de bildar enskilda linjära polypeptider. Den höga temperaturen stimulerar ytterligare denatureringen av proteinerna. Här efter tillsattes 300 μ l 1 % Triton-PBS (receptbilaga) till proven och lösningen suspenderades noga med en 21 G nål. Triton har en inverkan på provens fysikaliska egenskaper, vilket indirekt ökar på bindningen av antikroppen till proteinet av intresse. De suspenderade proverna centrifugerades sedan i 5 minuter (vid 10000 rpm) för att separera de icke-upplösta cellkomponenterna ur lösningen, som förblir belägna i supernatanten på grund av en lägre densitet än hos de övriga cellkomponenterna i lysatet.

Vid en immunoprecipitering framställs så kallade input-prov, vilka innehåller alla proteiner från respektive lysat. Genom att bestämma proteinuttrycket i input-proven är det möjligt att bekräfta att den totala proteinmängden mellan proven är den samma. Vid framställningen av input-proven togs en mängd av supernatanten och blandades med 3 x Laemmlibuffert. Laemmlibufferten innehåller SDS samt β -mercaptoetanol, som tillsammans lyserar proteinerna. β -mercaptoetanol bryter disulfidbryggorna i proteinet, vilket främjar bildandet av linjära polypeptider genom att förhindra de interna proteininteraktionerna. Input-prov förvarades vid 4 °C tills vidare användning. Av den återstående supernatanten framställdes IP-prov, ur vilka HSF2-proteinet isolerades. Till IP-proven tillsattes 350 μ l 1 % Triton-PBS samt 650 μ l 1 % BSA – 1 % Triton-PBS (receptbilaga), varefter IP-proven centrifugerades i 10 minuter (1000 rpm) vid 4 °C. Triton fungerar som ett tvättmedel medan BSA (bovint serumalbumin) mättar protein-G-sefároskulorna med proteiner, vilket minskar på ospecifik bindning av proteiner till kulorna. IP-proven tvättades även med protein-G-sefároskulor, för 1 timme under rotation vid 4 °C, för att avlägsna upplösta cellkomponenter som har naturlig hög affinitet för kulorna. Efter tvättningen överfördes supernatanten av IP-proven till nya eppendorfrör och 10 μ g antikropp, som specifikt binder till HSF2 (#58, Östling et al., 2007), sattes till proven som fick verka över natten vid 4 °C under rotation. Vid inkuberingen binder antikroppen till proteinet av intresse, vilket i detta

fall var till HSF2-proteinet. Antikroppen som används för att isolera proteinet vid en immuoprecipitering bör skilja sig i värdorganism från antikroppen som används för att detektera proteinet vid analys med western blot-metoden.

Följande dag centrifugerades IP-proverna i 4 minuter vid 5000 rpm, varefter supernatanten överfördes till nya eppendorfrör, innehållande protein-G-sefarioskulor. Protein-G-sefarioskulorna tvättades upprepade gånger med 1 % Triton-PBS innan användning. IP-proven och protein-G-sefarioskulorna inkuberades i 3 timmar under rotation vid 4 °C. Under inkuberingen binder protein-G-sefarioskulorna till antikropparna i IP-proven. Efter inkuberingen centrifugerades proven i 5 minuter vid 2000 rpm och supernatanten avlägsnades. I detta skede befinner sig protein-antikropp-komplexet bundet till protein-G-sefarioskulorna. Protein-G-sefarioskulorna tvättades sedan tre gånger med 1 % Triton-PBS för att avlägsna proteiner som inte är bundna till protein-G-sefarioskulorna. Efter den sista tvättningen avlägsnades all vätska från pelleten med G-sefarioskulorna och protein-antikropp-komplexet upplöstes i 50 µl 3 x Laemmli. IP-proven kokades i 5 minuter innan de förvarades vid 4 °C tills vidare analys med SDS-PAGE och immunoblotting.

4.4 Western blot

Western blot är en populär teknik inom cell-och molekylärbiologi, som används för att separera och detektera specifika proteiner ur ett cellysat. För att kunna identifiera ett specifikt protein delas western blot-metoden in i flera delsteg. Först separeras proteinerna i cellysatet, enligt deras storlek, i en polyakrylamidgel med hjälp av en elektroforesmaskin. Detta delsteg kallas för SDS-PAGE (natriumdodekylsulfat polyakrylamidgelelektrofores, eng. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis). I nästa delsteg överförs proteinerna från polyakrylamidgelen till ett nitrocellulosamembran med hjälp av en elektrisk spänning. Slutligen används immunoblotting för att identifiera specifika proteiner på nitrocellulosamembranet. Immunoblotting utnyttjar ett antikropp-enzym-komplex som specifikt binder till proteinet av intresse och avger en detekterbar signal.

Western blot-metoden användes i detta arbete vid upprepade tillfällen för att detektera uttrycket av olika proteiner. Proteinuttrycket från de TGF- β_1 -behandlade cellerna analyserades med immunoblott först och främst med HSF2-specifika antikroppar för

att utreda TGF- β -signalräckans inverkan på uttrycket av HSF2. För att utreda TGF- β -signalräckans aktivering hos TGF- β_1 -behandlade celler studerades Smad 2/3-uttrycket samt uttrycket för fosforylerade Smad-protein, med hjälp av Smad-specifika antikroppar. TGF- β_1 samt TGF- β -receptor-I-inhibitorn påverkar aktiveringen av TGF- β -signalräckan och därmed fosforyleringsstatusen av Smad 2 och Smad 3. Western blot-metoden användes även för att detektera ubikvitinerat HSF2 från MG132-behandlade och värmechockade MCF10A-celler. Detta gjordes genom att först isolera HSF2 med hjälp av immunoprecipiteringsmetoden, varefter närvaron av ubikvitin på HSF2 detekterades med ubikvitin-specifika antikroppar. Uttrycket av Hsc70 och tubulin detekterades även med western blot-metoden för att säkerställa en jämn proteinnivå i proven.

4.4.1 SDS-PAGE samt överföring av proteiner till nitrocellulosamembran

Samtliga proteinlysats i detta arbete analyserades med hjälp av western blot-metoden. Proteinlysaten denaturerades med 3 x Laemmelibuffert, innehållande bland annat β -mercaptoetanol och SDS, vars egenskaper beskrevs i stycket 4.3.1. Proteinlysaten kokades ytterligare i 5 minuter för att underlätta denatureringen av proteinerna. För att kunna separera proteinerna med SDS-PAGE, applicerades celllysaten i brunnarna på polyakrylamidgelen. I varje brunn pipetterades ungefär 20 μ l av celllysaten eller 8 μ l av en färgad proteinmarkör (eng. prestained protein marker), som gör det möjligt att estimerar den molekylära vikten av proteinerna i proven. Polyakrylamidgelen är uppdelad i ett övre och ett nedre lager, som består av olika polyakrylamidkoncentrationer samt pH-nivåer. Det övre lagret av gelen har ett lägre pH-värde (6,8) och en lägre polyakrylamidkoncentration, vilket resulterar i en porös gel med relativt stora porer. Denna porösa övre gel separerar proteiner dåligt och packar istället, tillsammans med glycinjoner, ihop proteinerna till ett tunt band (oberoende molekylvikt), som arrangeras där det övre lagret tar slut och det nedre tar vid. Det nedre lagret av gelen har ett högre pH-värde (8,8) och en högre polyacrylamidkoncentration, vilket ger upphov till en gel med tätare porstruktur. De trånga porerna i det nedre lagret av gelen separerar proteinerna enligt molekylvikt, där mindre proteiner vandrar snabbare igenom polyakrylamidgelen än de stora proteinerna. Samtidigt med proteinerna vandrar även jonerna från den övre till det nedre lagret av gelen. Glycinjonernas laddning övergår då till starkt negativ på grund

av den högre pH-koncentrationen i det undre lagret av gelen, vilket resulterar i mera rörliga glycinjoner som i sin tur främjar separeringen av proteinerna i undre gellagret. I detta arbete användes en 8 % polyakrylamidegel (receptbilaga). Polyakrylamidgelen placerades i en elektroforesmaskin, innehållande körbuffert (receptbilaga), som tillsammans separerar proteinerna. Under elektroforesen produceras en elektrisk spänning vid 60 V (övre lagret) och 120 V (undre lagret) som resulterar i att de negativt laddade proteinerna vandrar i gelen mot anoden enligt deras molekylära vikt.

När gelelektroforesen var klar överfördes de separerade proteinerna till ett nitrocellulosamembran (Whatman Protran), som har en hög affinitet för proteiner. Överföringen utfördes med hjälp av en överföringsmaskin (Semi-Dry Transfer Trans-Blot SD, BioRad) som producerar elektrisk spänning. I överföringsmaskinen placerades gelen på nitrocellulosamembranet mellan sex lager Whatmanpapper (tre under membranet och tre ovanför gelen). Den elektriska spänningen gav sedan upphov till att de negativt laddade proteinerna vandrade från gelen till nitrocellulosamembranet, som var placerat på anodsidan. Överföringen utfördes i en överföringsbuffert (receptbilaga) men en elektrisk spänning på 400 mA under 45 minuter.

4.4.2 Immunoblotning och proteindetektering

Immunoblotning är en teknik som utnyttjar båda primära och sekundära antikroppar för att detektera ett specifikt protein på nitrocellulosamembranet. Ett viktigt steg innan membranet inkuberades med antikroppar är att mätta membranet med proteiner. Därmed behandlades membranet med proteiner från en mjölk- eller BSA-lösning, beroende på vilket protein som skulle detekteras. Blocklösningarna innehåller proteiner som mättar membranet, vilket hindrar ospecifika bindningar av antikroppar till membranet. Mjöklösningen bestod av 3 % fettfrimjök upplöst i PBS (receptbilaga) medan BSA-lösningen bestod av 5 % BSA upplöst i Tris-buffrad saltlösning (TBS) (receptbilaga). I båda lösningarna tillsattes även ett tvättmedel, 0,3 % Tween 20, som minskar de ospecifika bindningarna av antikroppar till membranet. För fosforylerings-specifika antikroppar användes BSA-TBS-lösningen medan de övriga antikropparna löstes upp i mjölk-PBS-blandningen. Membranet inkuberades i respektive blocklösning för en timme, varefter membranet tvättades 3 x 10 minuter i 1 x PBS-0,3 % Tween 20.

Efter tvättningen inkuberades membranet först i primära och sedan i sekundära antikroppar, beroende på vilket protein som detekterades. Antikroppar som användes i detta arbete är listade i tabell 2. Principen för immunoblottnings är att de primära antikropparna binder specifikt till antigenen på proteinet och sedan fäster sekundära antikroppar till den primära antikroppen. De sekundära antikropparna är ytterligare konjugerade med pepparrotsperoxidase (eng. horse radish peroxidase, HRP). Membranet inkuberades i den primära antikroppen över natten vid 4 °C, innan överflödiga antikroppar tvättades bort med 1 x PBS-0,3 % Tween 20 vid tre upprepningar (10 min). Den sekundära antikroppen inkuberades med membranet för en timme vid rumstemperatur, varefter överflödiga antikroppar tvättades bort med 1 x PBS-0,3 % Tween 20 (3 x 10 min). Den primära antikroppen blandades ut i en lösning bestående av PBS eller TBS med tillsatt BSA (0,5 %) och natriumazid (0,02 %) medan den sekundära antikroppen tillsattes i 3 % mjölk i PBS-0,3 % Tween 20 eller 5 % BSA i TBS-0,3 % Tween 20 (beroende på antikropp). Efter att överflödiga sekundära antikroppar tvättats bort behandlades membranet med en ECL-lösning innehållande luminol (GE Healthcare). När membranet behandlas med ECL-lösning fungerar pepparrotsperoxidase som katalysator i oxidationsreaktionen där luminol oxideras, och avger fotoner. Dessa fotoner kan registreras på en ljuskänslig film (Medical X-ray film Super RX, Fuji).

Tabell 2. Primära och sekundära antikroppar använda vid western blot

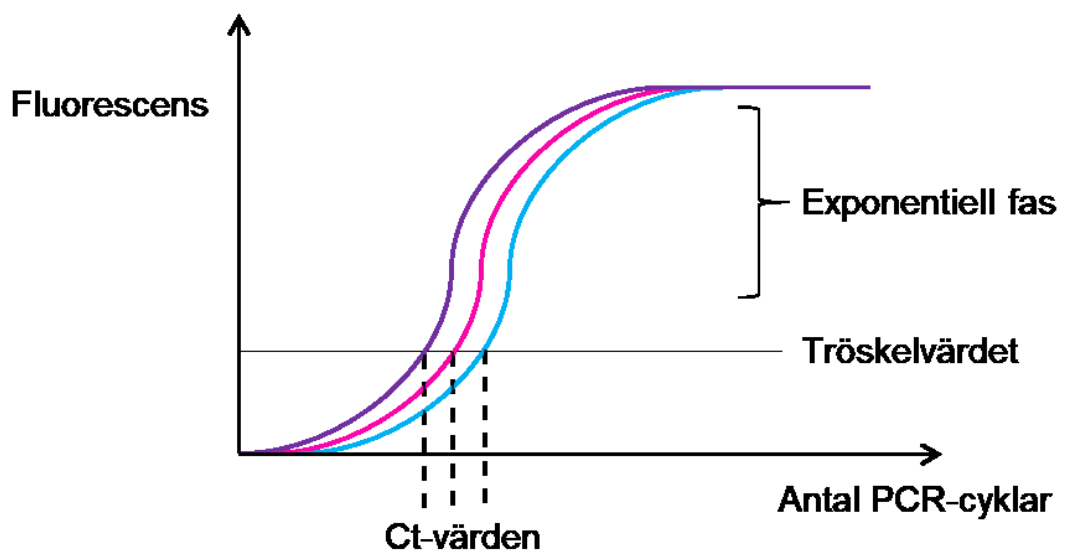
Primär antikropp	Utspädning	Organism	Tillverkare
E-cadherin	1: 5 000	Kanin	Abcam Cambridge, UK
FK1 och FK2	1: 1 000	Mus	Enzo life science Lausen, Schweiz
Hsc70	1: 1 000	Råtta	Stress Gen San Diego, USA
HSF1	1: 500	Råtta	Abcam Cambridge, UK
HSF2 Sigma	1: 500	Kanin	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
HSF2 (3e2)	1: 500	Råtta	Cayman chemical company Ann Arbor, USA
N-cadherin	1: 5 000	Kanin	Abcam Cambridge, UK
pSmad 2	1: 1 000	Kanin	Cell Signaling Technology Danvers, USA
Smad 2/3	1: 1 000	Kanin	Cell Signaling Technology Danvers, USA
Tubulin	1: 500	Mus	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Sekundär antikropp	Utspädning	Organism	Tillverkare
Kanin	1: 10 000	Get	ProMega Fitchburg, USA
Mus	1: 10 000	Får	GE Healthcare Chicago, USA
Råtta	1: 10 000	Get	GE Healthcare Chicago, USA

4.5 Kvantitativ omvänt transkriptas-polymeraskedjereaktion, qRT-PCR

Kvantitativ omvänt transkriptas-polymeraskedjereaktion (eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) är en metod som indirekt detekterar samt kvantifierar mängden specifika mRNA-molekyler. Metoden är känslig och kan kvantifiera mRNA-nivåer från väldigt små mängder, redan av enstaka celler. Inledningsvis isoleras RNA som omvandlas till komplementärt DNA (eng. complementary DNA, cDNA) via enzymaktivitet, men annars framskrider reaktionen som vid en standard polymeraskedjereaktion (eng. polymerase chain reaction, PCR). Ytterligare tillsätts en fluorescerande sond för att kunna detektera ampliferingen av DNA i realtid. Vid amplifering av cDNA ökar fluorescensen i reaktionsblandningen exponentiellt och kan därmed detekteras och kvantifieras. Fluorescensen som

detekteras i varje prov illustreras i kurvor, en individuell kurva för varje prov (figur 11). Utgående från kurvorna bestäms ett tröskelvärde, som är ett mått på mängden fluorescens som krävs för att överskrida bakgrundsfluorescensen. Vid det tillfälle som fluorescensen överstiger bakgrundsfluorescensen anges ett så kallat Ct-värde (eng. cycle threshold) som anger antalet PCR-cyklar som krävs för att amplifiera cDNA till tröskelvärdet. Utgående från Ct-värdet kan den relativa mängden mRNA bestämmas för varje prov, eftersom mängden fluorescens är i direkt proportion till mängden mRNA. Ett lägre Ct-värde återger ett prov med ett större antal specifika mRNA-molekyler. Ytterligare jämförs Ct-värdena från målgenen med Ct-värdena från en hushålls-gen för att möjliggöra en normalisering av genuttrycket.

I detta arbete användes metoden qRT-PCR för att mäta genuttrycket för hsf2 i MCF10A-celler som genomgått EMT. Genom att analysera mRNA-nivåerna för hsf2 är det möjligt att bestämma om TGF- β -signalräckan kan förändra genuttrycket. mRNA-nivåerna av hushålls-genen 18s användes för att normalisera genuttrycket.



Figur 11. Detektering av mängden fluorescens vid qRT-PCR. Mängden fluorescens som avges vid DNA-amplifiering av varje prov detekteras och illustreras i kurvor. De färgade kurvorna representerar olika prov av amplifierat cDNA. Ct-värdet anger antalet PCR-cyklar de krävs för att fluorescensen skall uppnå ett tröskelvärde.

4.5.1 RNA-isolering

Från de TGF- β -behandlade MCF10A-cellerna isolerades RNA genom användning av reagensserien RNeasy Mini Kit (Qiagen). Reagensserien består av olika buffertlösningar samt kolonner, innehållande kiseldioxidmembran, och tillsammans med centrifugering kan RNA isoleras. Cellerna lyserades och homogeniserades med RLT-buffert, innehållande β -mercaptoetanol, för att bryta upp cellmembranet och frigöra nukleinsyrorna. β -mercaptoetanol denaturerar ribonukleaser genom att bryta upp disulfidbryggorna i proteinet, vilket hindrar ribonukleaser från att bryta ned RNA under RNA-isoleringen. RLT-bufferten innehåller även guanidintiocyanat som lyserar cellerna samt inaktiverar ribonukleaser. Efter lyseringen tillsattes 70 % etanol till celllysaten. Etanolen skapar de rätta förhållandena för RNA att binda till kiseldioxidmembranet i kolonnen. Därefter centrifugerades kolonnerna med celllysaten, vilket resulterade i att RNA fastnade i kiseldioxidmembranet medan övriga cellkomponenter kastades bort. Kiseldioxidmembranet innehållande RNA tvättades sedan med RW1- och RPE-buffert upprepade gånger för att avlägsna orenheter. RW1- och RPE-bufferten innehåller guanidintiocyanat respektive guanidinhydroklorid som gynnar bindningen av RNA till kiseldioxidmembranet samt att samtliga buffertlösningarna innehåller höga saltkoncentrationer vilket underlättar bindningen av RNA till membranet. Slutligen eluerades RNA med hjälp av nukleasfritt vatten som tillsattes i kolonnen. De nukleasfria vattnet innehöll låga jonkoncentrationer, vilket resulterade i att RNA frigavs från kiseldioxidmembranet och samlades upp. RNA-koncentrationerna mättes ytterligare med maskinen NanoDrop (Thermo Scientific). Proverna förvarades vid $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ till dess att de användes vidare.

4.5.2 Produktion av cDNA med omvänd transkription

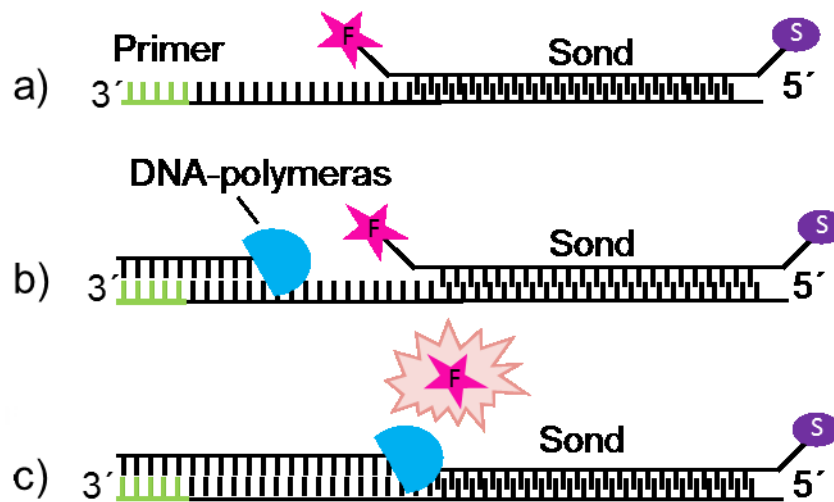
Vid en standard PCR, amplifieras DNA-sekvenser, så att slutresultatet består av miljontals identiska DNA-sekvenser. PCR använder DNA som templat vid amplifieringen. Det isolerade RNA, från TGF- β -behandlade MCF10A-celler, behövde därmed omvandlas till DNA-sekvenser för att kunna amplifieras med hjälp av PCR-tekniken. cDNA syntetiserades med hjälp av enzymet omvänt transkriptas (eng. reverse transcriptase), där RNA fungerar som templat. Syntesen av cDNA genomfördes med reagensserien iScript cDNA synthesis Kit (Bio-Rad).

Av samtliga prov omvandlades 1 µg RNA till cDNA. Totalvolymen som användes vid varje prov var 20 µl. Utgående från beräkningar av RNA-koncentrationerna bestod 15 µl av RNA respektive nukleasfritt vatten, medan 5 µl bestod av reagenserna från reagensserien. Av reagenserna tillsattes 1 µl iScript omvänt transkriptas-blandning och 4 µl iScript reaktionsblandning till varje prov. iScript omvänt transkriptas-blandning innehåller enzymet omvänt transkriptas (M-MLV RT RNase H⁺), som syntetiserar cDNA från RNA, samt inhibitorer mot olika ribonukleaser, iScript reaktionsblandning är en unik kombination av nukleotider och primer som möjliggör syntesen av enkelsträngat cDNA. Reaktionsblandningen inkuberades vid 25 °C i 5 minuter, vid 42 °C i 30 minuter och slutligen vid 85 °C i 5 minuter. Nukleotiderna fäster sig vid RNA-sekvensen vid 25 °C medan omvänt transkriptas syntetiserar cDNA vid 42 °C, och slutligen vid 85 °C sönderfaller omvänt transkriptasenzymet. Proverna innehållande cDNA förvarades vid -20 °C tills användning med qRT-PCR.

4.5.3 Amplifiering av cDNA med qRT-PCR

qRT-PCR reaktionen använder sig av den allmänna PCR-principen, där cDNA amplificeras genom uppvärmning och nerkyllning av reaktionen i så kallade termiska cyklar, som upprepas 39 gånger. Under termocyklarna denatureras vätebindningarna mellan DNA strängarna (ca 95 °C), primerna binder till DNA (ca 68 °C) samt att DNA-polymeraset tillsätter nukleotider till DNA-strängen (ca 72 °C). Vid qRT-PCR fungerar reaktionen liknande, men en TaqMan-sond tillsätts för att kvantitativt möjliggöra detekteringen av den specifika mängden cDNA som amplificeras. Sonden är försedd med en fluorofor på 5'-ändan medan en släckare (eng. quencher) är fastsatt på 3'-ändan. Så länge sonden är intakt, kontrollerar släckaren att fluoroforen förblir inaktiv och därmed inkapabel att emitterar ljus (figur 12). Sonden är uppbyggd av oligonukleotider som är komplementära till nukleotiderna i cDNA, detta möjliggör en bindning mellan sonden och cDNA (figur 12 a). Vid en amplifiering av cDNA behövs två stycken primer, en framåtriktad primer och en bakåtriktad primer. Primrarna binder till 3'-ändan på cDNA och fungerar som startpunkt vid addering av nya nukleotider. DNA-polymeraset adderar de nya nukleotiderna till den växande nukleotidkedjan enligt 5'-3'-riktning, och syntetiserar därmed en komplementär DNA-sträng (figur 12 b). Slutligen när DNA-polymeraset uppnår sonden, klyvs den av DNA-polymeraset, vilket frigör fluorofloren från släckaren och det emitterade

ljuset kan detekteras. Fluorescensens intensitet är direkt korrelerad med mängden amplifierad cDNA (figur 12 c).



Figur 12. Fluorescerande TagMan-sond vid qRT-PCR. a) Oligonukleotidsonden innehåller en fluoroflor (F) och en släckare (S). b) När sonden är intakt hindrar släckaren fluorofloren att emittera ljus. c) Vid en amplifiering av cDNA bryts sonden av DNA-polymeraset vilket medför att fluorofloren frigörs från släckaren och det emitterade ljuset kan detekteras.

I detta arbete amplifierades ca 10 ng cDNA av varje prov per brunn. Varje prov pipetterades även i triplikat på en 96-hålsplatta för att uppnå ett mera korrekt värde. Till varje brunn tillsattes, förutom cDNA, även kapamix (5 µl), TaqMan-sond samt genspecifika bakåt- och framriktade primer (3 µl). Koncentrationen av sonder och primerna (oligomer) är presenterade i tabell 3. Totalvolymen i brunnarna justerades sedan till 10 µl med nukleasfritt vatten. Kapamixen (KapaBiosystems) är en reaktionsbuffert, innehållande nukleotider och DNA-polymeraset, som krävs för cDNA amplifieringen. Ytterligare framställdes ett kontrollprov, innehållande mRNA som inte hade omvandlats till cDNA av enzymet omvänt transkriptions. Kontrollprovets funktion var att kontrollera att de övriga proven inte var kontaminerade med oväsentligt DNA. För att säkerställa att data erhållet från qRT-PCR är korrekt behövs en referensgen. I detta arbete användes hushållsgenen 18s, som kodar för den mindre enheten av den eukaryota cytoplasmiska ribosomen. Genen 18s användes som jämförelsegen till de andra generna eftersom mRNA-uttrycket av 18 hålls på en konstant nivå i cellen. Därmed normaliserades genuttrycket mellan hsf2-genen och 18s-genen.

Tabell 3. Koncentrationen av sonder och primer vid qRT-PCR

Gen	Primer/Sond	Konc. (µM)	Sekvens (5'-3')
hsf2	Framåtriktad primer	0,5	5'-GGA-GGA-AAC-CCA-CAC-TAA-CG-3'
	Bakåtriktad primer	0,5	5'-ATC-GTT-GCT-CAT-CCA-AGA-CC-3'
	Sond	0,2	# 36
18s	Framåtriktad primer	0,2	5'-GCA-ATT-ATT-CCC-CAT-GAA-CG-3'
	Bakåtriktad primer	0,2	5'-GGG-ACT-TAA-TCA-ACG-CAA-GC-3'
	Sond	0,2	5'-TTC-CCA-GTA-AGT-GCG-GGT-C-3'

4.6 Statistisk analys

Värdena från qRT-PCR analyserades i programmet Excel där parat t-test med tvåsidig fördelning användes när två grupper undersöktes medan när tre eller flera grupper undersöktes användes "One-Way" ANOVA med Holm-Sidak test. I analysen erhöles specifika p-värden och den statistiska signifikansen markerades med stjärnor. En stjärna indikerar på ett p-värde som är mindre än 0,05 medan två stjärnor indikerar på ett p-värde som är mindre än 0,01. Tre stjärnor indikerar på att p-värdet är mindre än 0,001 medan ns anger ett p-värde över 0,05, vilket betyder att resultatet inte är signifikant. Resultaten anges som medeltal + medelvärdes medelfel (SEM) Experimenten utfördes med tre biologiska replikat.

5 Resultat

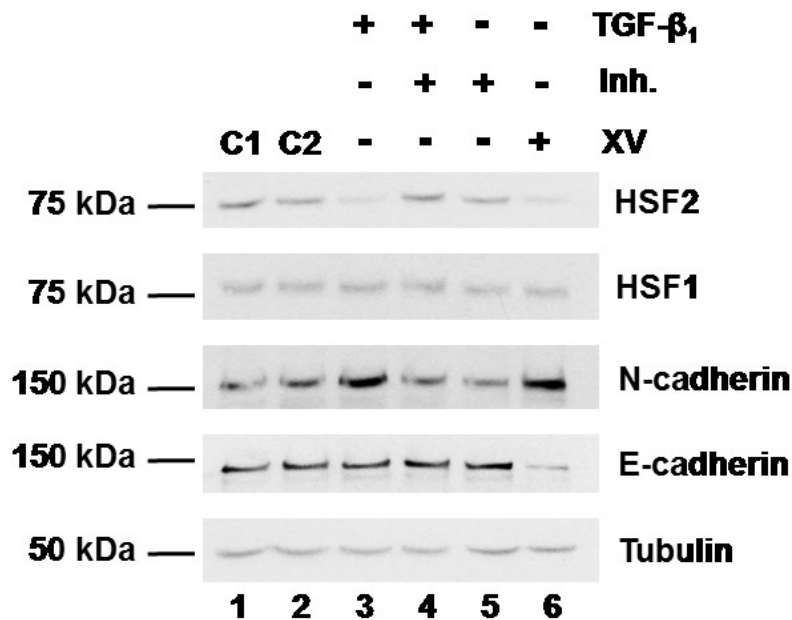
Syfte med denna studie var att vidare utforska HSF:s involvering vid cancerprogression. Den första publikationen av HSF2:s roll i cancer, som utfördes av Björk med kollegor, visade att HSF2 fungerar som en tumörsuppressorer i prostatacancer celler. I studien framkom det att ett minskat uttryck av HSF2 är korrelerad med en ökad invasion, vilket resulterar i att cellerna genomgår EMT (Björk et al., 2016). En av de signalräckor som har en essentiell roll vid EMT, vid såväl normala biologiska processer som vid utvecklingen av cancer, är TGF- β -signalräckan. Vid aktiveringen av TGF- β -signalräckan induceras förändringar som påverkar tumörformation och cellens förmåga att metastasera (Micalizzi et al., 2010). I denna Pro gradu-avhandling undersöktes mekanismerna som reglerar uttrycket av HSF2 i samband med EMT. I studien användes humana icke-transformerade bröstepitelceller, MCF10A, som är ett modellsystem för att undersöka EMT-processen.

5.1 TGF- β -signalräckan reglerar uttrycket av HSF2 i MCF10A-celler

För att undersöka TGF- β -signalräckans inverkan på uttrycket av HSF2 utfördes olika behandlingar på MCF10A-celler. Cellerna behandlades enskilt med varje ämne eller i form av olika kombinationer, som tillsattes i ett behandlingsmedium för 24 timmar. Ytterligare användes två olika kontrollförhållanden, C1 och C2, för att säkerställa att mediet som behandlingskomponenterna placerades i inte påverkade proteinkoncentrationerna. C1-förhållandet bestod av ämnen som placerades i cellernas normala tillväxtmedium medan i C2-förhållandet placerades ämnena i ett behandlingsmedium (figur 13). Skillnaden i medieinnehållet var att behandlingsmediet saknade EGF och hade en lägre serumhalt (2 %) i jämförelse med tillväxtmediet (5 %).

Vid en behandling med TGF- β_1 (10 ng/ml) aktiveras TGF- β -signalräcka när TGF- β_1 binder till Typ-II-receptorn i cellmembranet, medan TGF- β -receptor-I-inhibitor (10 mM) (SB 431542 hydrat) binder till och inhiberar Typ-I-receptorn (Derynck & Zhang, 2003; Hjelmeland et al., 2004). Ytterligare behandlades cellerna med den positiva kontrollen XV (10 μ l/ml) (StemXVivo EMT Inducing Media Supplement), vars komponenter inducerar EMT i cellen (Tang et al., 2013). Koncentrationerna för TGF- β_1 , TGF- β -receptor-I-inhibitor och XV valdes utgående från tidigare publicerade

studier (Nyati et al., 2011; Tang et al., 2013; Romano et al., 2016). Behandlingarnas inverkan på olika målproteiner undersöktes med hjälp av SDS-PAGE och immunoblotting genom att använda antikroppar med specifik bindning till de olika målproteinerna. TGF- β -signalräckans inverkan på uttrycket av HSF2 analyserades genom att detektera HSF2-nivåerna i cellen. Dessutom undersöktes TGF- β -signalräckans inverkan på HSF1, en annan viktig HSF, som kan samverka med HSF2. Ytterligare detekterades nivåerna av EMT-markörerna E- och N-cadherin för att säkerställa att TGF- β_1 - och XV-behandlingarna har förmågan att inducera EMT i MCF10A-celler. En jämn proteinnivå i proven påvisades genom att använda specifika antikroppar som binder till tubulin.



Figur 13. Representativ immunoblott av HSF2-uttrycket vid TGF- β_1 -behandling. MCF10A-celler behandlades enskilt eller i kombination av TGF- β_1 (10 ng/ml), TGF- β -receptor-I-inhibitorn (Inh.) (10 mM) och XV (10 μ l/ml) för 24 timmar. Ytterligare användes två olika kontrollförhållanden, C1 och C2. Cellerna lyserades och analyserades med hjälp av SDS-PAGE och immunoblotting där behandlingarnas inverkan på olika målproteiner undersöktes. Proteinuttrycket detekterades genom användning av antikroppar som specifikt binder till målproteinerna HSF2, HSF1, E- och N-cadherin. Uttrycket av tubulin detekterades för att säkerställa en jämn proteinnivå i proven. Proven är numrerade från 1-6.

Resultaten i figur 13 visar att TGF- β -signalräckan minskar på mängden av HSF2 i MCF10A-celler. TGF- β -signalräckan har förmågan att minska på uttrycket av HSF2 i TGF- β_1 -behandlade celler, jämfört med uttrycket av HSF2 under normala förhållanden (figur 13, prov 2 vs. prov 3). En liknade nedreglering av HSF2 kan

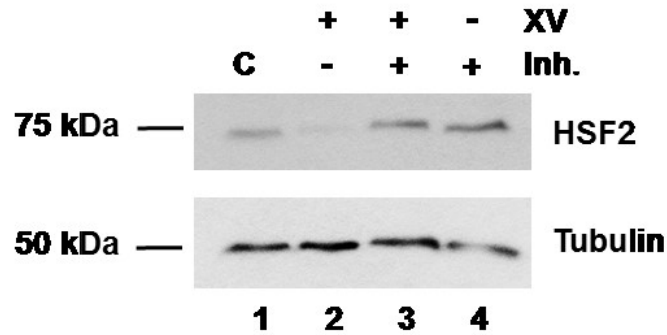
observeras i celler som behandlats med XV (figur 13, prov 3 vs prov 6). I figur 13 framkommer det även att HSF2 uttrycks till samma grad i celler under såväl normala förhållanden som vid behandling med TGF- β -receptor-I-inhibitor (figur 13, prov 2 vs. prov 5). Dessutom upprätthåller TGF- β -receptor-I-inhibitor uttrycket av HSF2 vid samma nivå som under normala förhållanden, fastän cellerna behandlats med en kombination av TGF- β_1 och TGF- β -receptor-I-inhibitor (figur 13, prov 2 vs. prov 4). Detta betyder att TGF- β -receptor-I-inhibitor har förmågan att inhibera TGF- β -signalräckan genom att inaktivera Typ-I-receptorn fastän TGF- β_1 binder till Typ-II-receptorn. I figur 13 framkommer det även att nivåerna av HSF1 uttrycks konstant i cellerna, oberoende av TGF- β -signalräckans aktivering (prov 1-6). Detta antyder att fastän det förekommer en samverkan mellan HSF2 och HSF1 i cellen, påverkar TGF- β -signalräckan inte uttrycket av HSF1.

Ytterligare visar resultaten i figur 13 att EMT kan induceras i MCF10A-cellerna med hjälp av TGF- β_1 och XV, vilket i sin tur leder till ett minskat uttryck av HSF2. En EMT-induktion kan identifieras utgående från EMT-markörernas proteinnivåer i cellen. I figur 13 kan ett ökat uttryck av N-cadherin identifieras i prov 3 och 6, i jämförelse med uttrycket av N-cadherin normala förhållanden, som indikerar att EMT har skett (figur 13, prov 2 vs. prov 3 och prov 2 vs. prov 6). I dessa prov detekterades även ett minskat uttryck av HSF2, där cellerna behandlats med TGF- β_1 (figur 14, prov 3) eller XV (figur 13, prov 6). Ett ökat uttryck av N-cadherin hos XV-behandlade celler uppstår eftersom XV är ett EMT-inducerande medel. Detta resultat indikerar att XV inducerar EMT i cellerna och kan användas som positiv kontroll. Det ökade uttrycket av N-cadherin hos TGF- β -behandlade celler indikerar på en korrelation mellan minskat uttryck av HSF2 och inducerad EMT. E-cadherin, som i regel uttrycks mindre i mesenkymala celler, uttrycks konstant i MCF10A-cellerna, med undantag i prov 6 (figur 13), där en markant nedreglering kan detekteras. Denna nedreglering uppstår troligen av att XV, som är ett EMT-inducerande medel innehåller E-cadherin antikroppar, har minskat på E-cadherin-uttrycket. Detta utesluter dock inte en induktion av EMT i cellerna, eftersom att detekteringen av ett reglerat E-cadherin-uttryck kan sträcka sig över 24 timmar. I figur 13 kan det ytterligare detekteras liknande mängder av de olika målproteinerna hos kontrollförhållandena, C1 och C2. Detta intygar att skillnaderna i proteinnivåerna inte orsakas av de olika medierna som

användes under behandlingen. Ett konstant uttryck av tubulin kan detekteras i samtliga prov, vilket säkerställer en jämn proteinkoncentration i proven.

5.2. Signal-transduktion genom Typ-I-receptorn (ALK5) reglerar mängden av HSF2

XV är ett EMT-inducerande ämne som innehåller olika signalmolekyler, som kan enskilt eller tillsammans inducera EMT i cellen. Komponenterna i XV aktiverar bland annat Wnt- och TGF- β -signalräckan samt innehåller antikroppar mot E-cadherin och andra proteiner som är essentiella vid induktionen av EMT (Tang et al., 2013). En aktivering av Wnt-signalräckan kan bland annat stimulera adhesions-kinaser och små GTPaser för att inducera EMT, medan förlusten av E-cadheriner ökar på cellernas invasionsförmåga (Lee et al., 2015). I figur 13 framkom det att i XV-behandlade celler kan ett lägre uttryck av HSF2 detekteras. För att vidare kartlägga signalkaskaden som reglerar denna nedreglering behandlades MCF10A-cellerna på liknande sätt som i figur 13, med skillnad att denna gång utsattes cellerna endast för XV (10 μ l/ml) eller med en kombination av XV och TGF- β -receptor-I-inhibitor (10 mM) för 24 timmar. TGF- β -receptor-I-inhibitor inaktiverar TGF- β -signalräckan genom att binda till och inaktivera Typ-I-receptorn (ALK5) (Hjelmeland et al., 2004). Behandlingarnas inverkan på HSF2 undersöktes med hjälp av SDS-PAGE och immunoblotting, där HSF2 detekterades med hjälp av specifika antikroppar som binder till proteinet. En jämn proteinnivå i proven garanterades genom att använda specifika antikroppar som binder till tubulin.



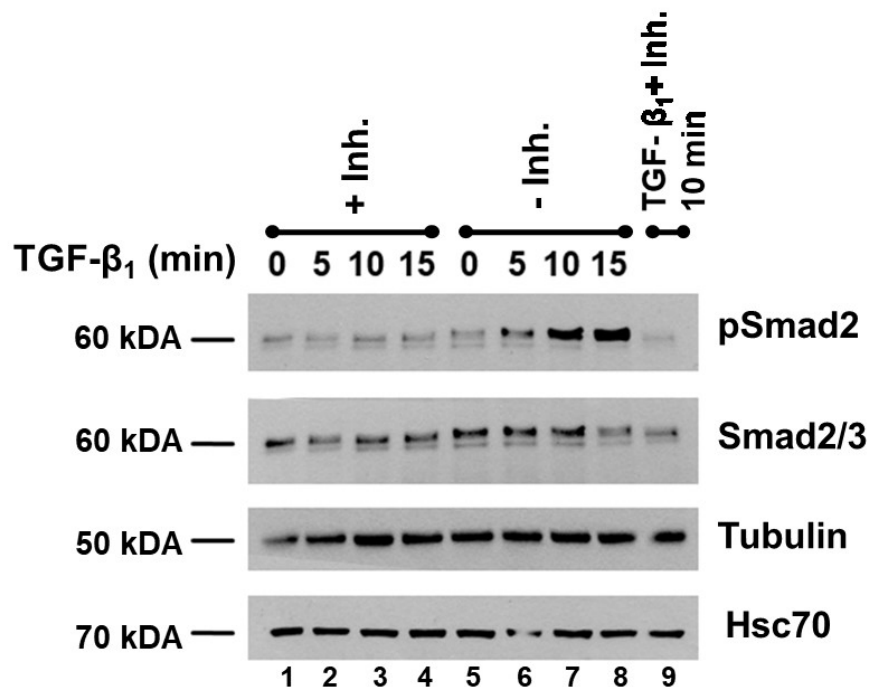
Figur 14. Analys av HSF2-uttrycket vid XV-behandling. Mängden av HSF2 undersöktes i MCF10A-celler, som behandlats antingen enskilt eller i kombination av TGF- β -receptor-I-inhibitor (Inh.) (10 mM) och XV (10 μ l/ml) för 24 timmar. Uttrycket av HSF2 i de behandlade cellerna detekterades med hjälp av SDS-PAGE och immunoblotting, genom användning av antikroppar som specifikt binder till HSF2. Slutligen detekterades tubulin för att säkerställa en jämn proteinnivå i proven. Proven är numrerade från 1-6.

Resultatet i figur 14 visar att signaltransduktionen, som minskar på uttrycket av HSF2, går igenom TGF- β -signalräckans Typ-I-receptor. Utgående från resultaten presenterade i figur 14, samt i likhet med resultaten från figur 13, kan ett minskat uttryck av HSF2 detekteras hos XV-behandlade celler jämfört med under normala förhållanden (figur 14, prov 1 vs. prov 2). Det framkommer även i figur 14 att TGF- β -receptor-I-inhibitor kan återställa uttrycket av HSF2 till normala nivåer (figur 14, prov 1 vs. prov 3). Detta tyder på att uttrycket av HSF2 regleras via TGF- β -signalräckans Typ-I-receptor, eftersom att signalkaskaden som aktiveras av en komponent i XV stoppas när Typ-I-receptorn inaktiveras. En jämn mängd av tubulin detekterades i samtliga prov, vilket intygar om en jämn proteinkoncentration i proven.

5.3 TGF- β -receptor-I-inhibitor, en effektiv hämmare av en snabbt aktiverad TGF- β -signalräcka

TGF- β är en signalmolekyl som via Smad-beroende signalering aktiverar TGF- β -signalräckan. Signalräckan aktiveras när TGF- β_1 binder till Typ-II-receptorn i cellmembranet, vilket resulterar i aktiverade Smad-protein som leder signalen in i cellen. Smad-proteinerna i signalkaskaden, bland annat Smad 2 och Smad 3, aktiveras genom fosforylering (Horbelt et al., 2012). MCF10A-cellerna behandlades under olika tidsintervall med TGF- β_1 för att undersöka hur snabbt TGF- β -signalräckan aktiveras. Det fosforylerade Smad-uttrycket detekterades med hjälp av antikroppar som specifik binder till fosforylerade Smad 2. Dessutom detekterades uttrycket av Smad 2/3, med

Smad 2/3-specifika antikroppar, för att försäkra sig om att en möjlig förändring hos fosforyleringen av proteinerna inte orsakades av ett ojämnt Smad-2/3-uttryck. Uttrycket av såväl Hsc70 som tubulin detekterades för att garantera en jämn proteinnivå i samtliga prov. Under samma experiment undersöktes även hur effektiv och snabb TGF- β -receptor-I-inhibitorn är att inaktivera TGF- β -signalräckan, eftersom detta krävdes för att optimera modellsystemet. TGF- β -receptor-I-inhibitorns effektivitet undersöktes genom att förbehandla MCF10A-celler med TGF- β -receptor-I-inhibitorn för en timme, och därefter behandlades cellerna ytterligare med TGF- β_1 för 5, 10 och 15 minuter. I analysen användes även prov från celler som behandlats vid samma tillfälle med såväl TGF- β_1 som TGF- β -receptor-I-inhibitorn för 10 minuter.



Figur 15. Representativ immunoblott av Smad-proteinernas uttryck och fosforylering vid TGF- β_1 -behandling. MCF10A-celler behandlades under olika tidsperioder (5-15 min) med TGF- β (10 ng/ml), varefter fosforylerade Smad-protein detekterades för att undersöka TGF- β -signalräckans aktivering. TGF- β -receptor-I-inhibitorns förmåga att inaktivera TGF- β -signalräckan undersöktes genom att först förbehandla cellerna med TGF- β -receptor-I-inhibitorn (10 mM) för en timme, varefter cellerna behandlades med TGF- β_1 (10 ng/ml) under olika tidsperioder (5-15 min). Dessutom framställdes ett prov där TGF- β_1 och TGF- β -receptor-I-inhibitorn samtidigt placerades på cellerna för 10 minuter. Fosforylerade Smad 2 (pSmad 2) detekterades med hjälp av antikroppar som specifikt binder till det post-translationellt modifierade proteinet. Ytterligare detekterades uttrycket av Smad 2/3, tubulin och HSc70, med antikroppar för respektive protein, för att verifiera en jämn proteinnivåer i proven. Proven är numrerade från 1-9.

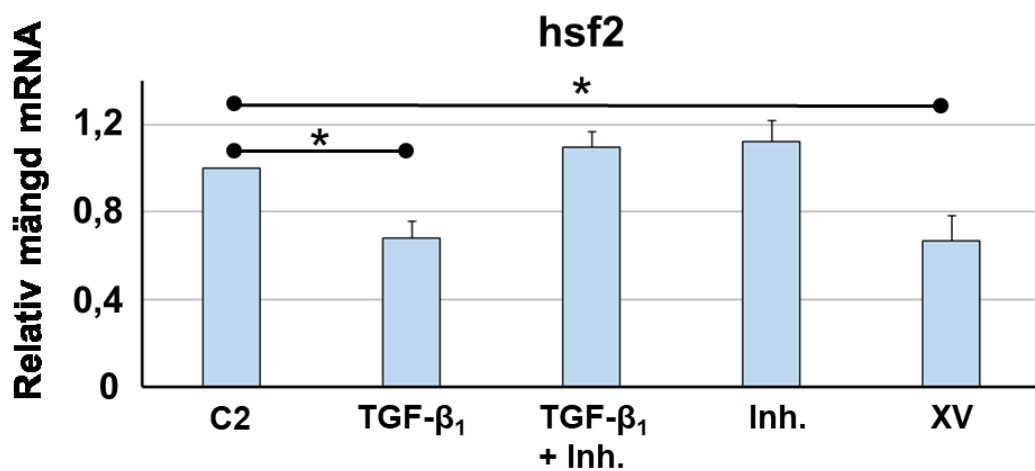
I figur 15 framkommer det att vid TGF- β_1 -behandling aktiveras TGF- β -signalräckan snabbt samt att TGF- β -receptor-I-inhibitorn är en effektiv och snabb hämmare av TGF- β -signalräckans aktivitet. Resultaten i figur 15 visar att redan efter en 5 minuters behandling med TGF- β_1 kan fosforylerade Smad 2 detekteras (figur 15, prov 5 vs. prov 6), och fosforyleringen ökar stadigt vid längre behandlingstid (figur 15, prov 5 vs. prov 7 och prov 5 vs. prov 8). I figur 15 observeras TGF- β -receptor-I-inhibitorns effektiva förmåga att inaktivera TGF- β -signalräckan. Fosforylerade Smad 2 kan inte detekteras hos celler som förbehandlades med TGF- β -receptor-I-inhibitorn och därefter utsattes för kortare behandlingar med TGF- β (5-15 min) (figur 15, prov 2-4). Dessa resultat indikerar att TGF- β -receptor-I-inhibitorn är en effektiv hämmare av TGF- β -signalräckan eftersom den ständigt klarar av att binda till och inaktivera Typ-I-receptorn, samt indirekt stoppa aktiveringen av Smad-protein. Förutom att TGF- β -receptor-I-inhibitorn är effektiv, framkommer det i figur 15 att den har en snabb inverkan på cellen. Fosforylerade Smad 2 kan inte detekteras hos celler som samtidigt behandlades med TGF- β -receptor-I-inhibitorn och TGF- β_1 (figur 15, prov 9). Detta resultat antyder att TGF- β -receptor-I-inhibitorn direkt inaktiverar Typ-I-receptorn och stoppar signalkaskaden förrän TGF- β_1 binder till Typ-II-receptorn i TGF- β -signalräckan.

Resultaten i figur 15 visar att uttrycket av Smad 2/3 är relativt jämt i samtliga prov (figur 15, prov 1-9), vilket försäkrar att de detekterade fosforyleringsskillnaderna hos Smad 2/3 inte är orsakade av ojämna Smad 2/3-nivåer. Dock kan en viss skillnad i migrationsfronten identifieras i band 7-8 (figur 15). Skillnaden beror troligtvis på en fosforylering av Smad 2/3, vilket ökar på proteinernas molekylära vikt. Slutligen kan jämna nivåer av Hsc70 och tubulin detekteras, vilket visar att proteinnivåerna är lika i proven.

5.4 En aktiverad TGF- β -signalräcka förändrar hsf2-mRNA-uttrycket

Transkriptionsfaktorer reglerar, tillsammans med andra reglerande proteiner, genuttrycket i cellen genom att styra transkriptionen av olika målgener (Levine et al., 2003). En aktiverad TGF- β -signalräcka resulterar i en signalkaskad där Smad 2 och Smad 3 transporteras in i cellkärnan där de tillsammans med andra reglerande proteiner reglerar genuttrycket av olika målgener (Horbelt et al., 2012). Från resultaten presenterade i figur 13 och 14 framkom det att en aktiverad TGF- β -signalräcka

minskar på uttrycket av HSF2. För att undersöka ifall de minskade uttrycket av HSF2 orsakas av förändringar i mRNA-nivåerna, mättes genuttrycket för hsf2 med hjälp av metoden qRT-PCR. Vid en qRT-PCR-analys omvandlas isolerat RNA till cDNA, som amplifieras i en kvantitativ PCR-reaktion. I detta arbete analyserades hsf2-mRNA-uttrycket hos MCF10A-celler som behandlats för 24 timmar enskilt eller i olika kombinationer med TGF- β_1 (10 ng/ml), TGF- β -receptor-I-inhibitorn (10 mM) eller den positiva kontrollen XV (10 μ l/ml). TGF- β_1 aktiverar TGF- β -signalräckan medan signalräckan inaktiveras av TGF- β -receptor-I-inhibitorn (Derynck & Zang, 2003; Hjelmeland 2004). Den positiva kontrollen XV inducerar EMT i cellerna (Tang et al., 2013).



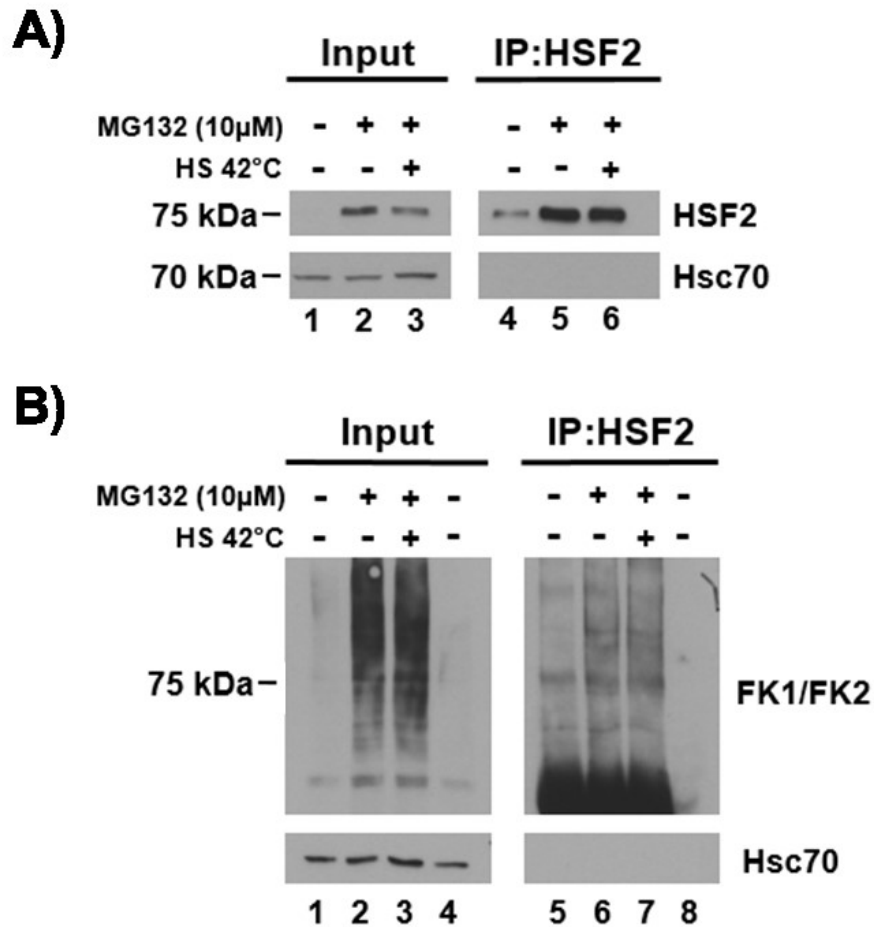
Figur 16. mRNA-uttrycket av hsf2 vid TGF- β_1 - och XV-behandling. mRNA-nivån av hsf2 undersöktes hos MCF10A-celler som behandlats enskilt eller i kombination av TGF- β (10 ng/ml), TGF- β -receptor-I-inhibitorn (Inh.) (10 mM) och XV (10 μ l/ml) för 24 timmar. hsf2-mRNA-nivåerna analyserades även hos celler i normala förhållanden (C2). Från qRT-PCR-analysen erhöles ett Ct-värde för varje prov, som med hjälp av en standardkurva bestämmer den relativa mängden mRNA per prov. Under analysen normaliserades Ct-värdet för hsf2 med Ct-värdet för hushållsgenen 18s, samt att uttrycket för hsf2 normaliserades till provet C2, vilket hade värdet 1. Vid den statistiska analysen utfördes parat t-test med tvåsidig fördelning när C2 jämfördes med TGF- β_1 , medan "One-Way" ANOVA utfördes när C2 jämfördes med XV. Analysen gjordes i programmet Excel. n= 3; medeltal + SEM; * anger p-värdet $\leq 0,05$.

En aktiverad TGF- β -signalräcka har förmågan att förändra genuttrycket för hsf2 i MCF10A-celler. I figur 16 kan minskade mRNA-nivåer av hsf2 detekteras hos celler som behandlats med TGF- β_1 i jämförelse hos celler i normala förhållanden, och skillnaden är statistiskt signifikant (p-värdet = 0,0366) (figur 16, C2 vs. TGF- β). En motsvarande förändring i genuttrycket för hsf2 kan detekteras hos XV-behandlade

celler i jämförelse med celler i normala förhållanden, och skillnaden är statistisk signifikant (p -värdet = 0,0395) (figur 16, C2 vs. XV). Dessa resultat antyder att det minskade proteinuttrycket av HSF2, som kan detekteras hos TGF- β_1 - och XV-behandlade celler i figur 13 (prov 3 och 6), troligen orsakas av en förändring i genuttrycket för hsf2. Resultaten från figur 16 visar även en liten ökning i hsf2-mRNA-nivåerna hos celler som behandlats med TGF- β_1 och TGF- β -receptor-I-inhibitorn i jämförelse med celler som behandlats med TGF- β_1 , men denna ökning är inte statistiskt signifikant (figur 16, TGF- β vs. TGF- β + Inh). Detta antyder att TGF- β -receptor-I-inhibitorn hämmar TGF- β -signalkaskaden längre ner i signalkaskaden än var TGF- β_1 aktiverar den. Därmed kan en inaktiverad TGF- β -signalkaskad högst sannolikt inte minska på mRNA-nivåerna av hsf2.

5.5 Svag detektering av ubikvitin-märkta HSF2-protein i MCF10A-celler

Proteinuttrycket i en cell regleras av proteinsyntesens hastighet samt i vilken takt proteinet nedbryts i proteasomen (Levine & Tjian, 2003; Herrmann et al., 2007). För att vidare undersöka orsaken bakom de minskade HSF2-nivåerna, som observerades i figur 13, var planen att studera TGF- β -signalkaskadens förmåga att inducera ubikvitin-medierad nedbrytning av HSF2. Först måste dock ett modellsystem optimeras för att försäkra sig om att ubikvitinerade HSF2-proteiner kan detekteras. För detta syfte behandlades MCF10A-cellerna med det proteasominhiberande ämnet MG132 (10 μ M) för 3 timmar samt att cellerna utsattes för värmechock vid 42 °C i 30 minuter, vilket orsakade en ansamling av ubikvitin-märkta proteiner i cellen. Från de behandlade cellerna isolerades sedan HSF2 med hjälp av immunoprecipiteringsmetoden genom att använda antikroppar som specifikt binder till HSF2. Det ubikvitinerade HSF2-proteiner detekterades med hjälp av immunoblotting, genom att använda specifika antikroppar som binder till ubikvitin-märkta proteiner. En jämn proteinnivå i Input-proven påvisades genom att använda specifika antikroppar som binder till Hsc70.



Figur 17. Representativ immunoblott av ubiquitinerat HSF2-protein vid MG132-behandling och värmechock. MCF10A-celler behandlades med MG231 (10 μ M) för 3 timmar samt värmechockades för 30 minuter vid 42 °C. Cellerna skördades i kall PBS och input- och immunoprecipiteringsprov (IP) framställdes. Input proven är fullständiga lysat, medan IP-proven är lysat bestående av isolerat HSF2-protein. Ett IgG prov (B, prov 8) framställdes som negativ kontroll. Uttrycket av HSF2 detekterades med hjälp av antikroppar som specifikt binder till HSF2. Ubikvitin-märkta proteiner detekterades med hjälp av antikroppar som specifikt binder till ubikvitin (FK1/FK2). Hsc70 detekterades för att säkerställa en jämn proteinnivå i proven.

Resultatet presenterat i figur 17 A visar en ökad mängd av HSF2 hos MG132-behandlade och värmechockade celler, i jämförelse med celler i kontrollförhållanden, i såväl Input- som IP-proven (figur 17 A, prov 1 vs. prov 2 och prov 3 samt prov 4 vs. prov 5 och prov 6). Mängden HSF2 ökar eftersom MG132 inhiberar proteasomens förmåga att bryta ned ubikvitin-märkta proteiner samt att ubiquitinerade proteiner ökar under värmechock. Därmed kan ett markant uttryck av ubiquitinerade proteiner detekteras, i figur 17 B, hos MG132-behandlade och värmechockade celler, i jämförelse med celler i kontrollförhållande (figur 17 B, prov 1 vs. prov 2 och prov 1

vs. prov 3). Det isolerade HSF2 proteinet från MG132-behandlade och värmechockade celler är dock endast svagt ubikvitinerat (figur 17 B, prov 5 vs. prov 6 och prov 5 vs. prov 7). Från modellsystemet med MCF10A-celler kan alltså en ökad mängd av HSF2 detekteras hos MG132-behandlade och värmechockade celler, men HSF2-proteinets ubikvitinering är svårare att detektera (figur 17, A prov 5 vs. B prov 6). Modellsystemet som byggdes upp för att undersöka TGF- β -signalräckans inverkan på HSF2-proteinets nedbrytning behöver därmed ytterligare optimering. I samtliga input-prov kan jämna nivåer av Hsc70 detekteras, vilket försäkrar att proteinnivåerna är jämna i proven (figur 17 A, prov 1-3 och figur 17 B, prov 1-4). Ubikvitinerat HSF2 kan inte detekteras vid 75 kDa i den negativa kontrollen IgG (figur 17 B, prov 8), vilket indikerar att isoleringen av HSF2 med hjälp av immunoprecipitering har fungerat.

6 Diskussion

Cancer uppkommer när celler erhåller förmågan till antingen en ökad proliferation eller kapaciteten att undvika apoptos, vilket kan orsakas av fel i signalräckor som styr dessa olika biologiska processer (Hanahan & Weinberg, 2011). Värmechockresponsen, som är essentiell för cellernas överlevnadsförmåga under stress, har visats vara förändrad i vissa cancertyper. HSF1 har visats främja utvecklingen av cancer medan HSF2 kan fungera som en tumörsuppressorer (Björk et al., 2016). I en studie utförd av Björk med kollegor observerades en länk mellan ett minskat uttryck av HSF2 i prostatacancer celler och en ökad invasion när cellen genomgår EMT. EMT är involverad i både normala biologiska processer och vid utvecklingen av cancer, och styrs huvudsakligen av TGF- β -signalräckan (Xu et al., 2009). Vid utvecklingen av cancer kan cellerna utnyttja TGF- β -signalräckan och skapa en invasiv fenotyp genom att öka cellernas förmåga att dedifferentiera och migrera (Massagué, 2008). Fastän ett minskat uttryck av HSF2 är korrelerat med en ökad invasion, är det inte känt om TGF- β -signalräckan kan reglera uttrycket av HSF2 under EMT.

I denna undersökning analyserades det hur uttrycket av HSF2 regleras under EMT. För detta syfte inducerades EMT i celler genom att stimulera TGF- β -signalräckan med hjälp av olika signalmolekyler. Under studiens gång användes icke-transformerade humana bröstepitelceller, MCF10A, som modellsystem. I MCF10A-cellerna analyserades TGF- β -signalräckans inverkan på både protein- och mRNA-uttrycket genom att använda sig av metoderna immunoblotting och qRT-PCR.

6.1 TGF- β_1 -inducerad EMT reglerar uttrycket av HSF2

För att undersöka hur EMT inverkar på uttrycket av HSF2, stimulerades TGF- β -signalräckan i MCF10A-cellerna med olika signalmolekyler. TGF- β -signalräckan aktiverades genom att behandla cellerna med TGF- β_1 , som är en signalmolekyl som kan inducera EMT i cellen antingen genom olika Smad-protein eller via andra intracellulära signalprotein (Hobert et al., 2012). Vissa celler behandlades även med det EMT-inducerande ämnet StemXVivi (XV), vars komponenter stimulerar flera EMT-inducerande signalräckor, inklusive TGF- β -signalräckan (Tang et al., 2013). Ytterligare behandlades cellerna med en TGF- β -receptor-I-inhibitor, som genom att binda till och inaktivera Typ-I-receptorn stoppar TGF- β -signalräckans aktivering (Hjelmeland et al., 2004). EMT-processens inverkan på uttrycket av HSF2 och andra målproteiner analyserades med hjälp av SDS-PAGE och immunoblotting.

Utgående från resultaten som presenteras i figur 13, framkommer det att när EMT induceras i MCF10A-celler med hjälp av TGF- β_1 och XV kan minskade nivåer av HSF2 detekteras. Troligen minskar TGF- β_1 på mängden av HSF2 främst via en signalkaskad som aktiverar de olika Smad-proteinerna, eftersom detta är den kanoniska TGF- β -signalräckan (Horbelt et al., 2012). Denna iakttagelse stöds av att ett ökat uttryck av N-cadherin kan detekteras hos XV- och TGF- β_1 -behandlade celler (figur 13), vilket indikerar att en aktiverad TGF- β -signalräcka kan inducera EMT i cellen och därmed minska på uttrycket av HSF2. Dock borde flera EMT-markörer, som vimentin och fibronectin, studeras för att garantera en EMT-induktion. Det har dessutom tidigare framkommit att TGF- β_1 har förmågan att minska på uttrycket av andra transkriptionsfaktorer, exempelvis T-box transkriptionsfaktor 2 (eng. T-box transcription factor 2, Tbx2) (Li et al., 2014). Denna studie stöder därmed hypotesen att TGF- β -signalräckan kan reglera uttrycket av olika transkriptionsfaktorer som har en roll i invasion, inklusive HSF2. En annan observation som presenteras i figur 13 är att när TGF- β -signalräckans Typ-I-receptor inhiberas under TGF- β_1 -inducerad EMT, kan uttrycket av HSF2 återställas till normala nivåer. Denna upptäck indikerar att TGF- β -signalräckans Typ-I-receptor är involverad i regleringen av HSF2 under EMT. Detta kommer dock att diskuteras mera utförligt i stycke 6.2. För att ytterligare kartlägga TGF- β -signalräckans fullständiga effekt på regleringen av HSF2, borde även samtliga experiment i denna Pro gradu-avhandling upprepas med andra TGF- β -isoformer, främst TGF- β_2 och TGF- β_3 . Dessa experiment skulle vara intressanta

eftersom TGF- β förekommer i fem olika isoformer, varav tre av dem; TGF- β_1 , TGF- β_2 och TGF- β_3 , uttrycks i de flesta normala celler och vävnader hos människan under hela den embryonala utvecklingen och in i vuxen ålder (Cheifetz et al., 1990).

Resultaten som presenteras i figur 13 är även de första bevisen att HSF2 kan regleras av en extracellulär signalkaskad. Därtill har det nyligen publicerats en studie där det framkommer att HSF1, en annan värmechockfaktor som bildar heterotrimerer med HSF2, kan regleras av en extracellulär signalräcka. Kourtis med kollegor upptäckte att en aktiverad NOTCH1-signalräcka snabbt kan öka på uttrycket av HSF1 och därmed inducera värmechockresponsen (Kourtis et al., 2018). Denna upptäckt stärker hypotesen om att HSF2, precis som HSF1, kan regleras av signalkaskader som aktiveras av faktorer ytter om cellen. Utgående från resultatet som presenteras i figur 13 framkommer det dock att en EMT-induktion inte har en inverkan på uttrycket av HSF1, utan proteinet uttrycks likartat i samtliga prov. Alla resultat som presenteras i denna Pro gradu-avhandling är erhållna från experiment som endast är utförda i en specifik cellinje, MCF10A. Det förekommer dock opublicerade resultat från Sistonens forskningsgrupp som visar att TGF- β_1 -inducerad EMT kan minska på uttrycket av HSF2 i humana MDA-MB-231-celler som härstammar från bröstepitelcancer, vilket antyder att detta fenomen inte är cellinjespecifikt. Resultaten från MCF10A och MDA-MB-231-cellerna härstammar från endast en celltyp, epitelceller. Därmed skulle det vara intressant att undersöka hur HSF2 påverkas när mesenkymala celler, alltså celler som genomgått EMT, behandlas med TGF- β -receptor-I-inhibitor. Om TGF- β -receptor-I-inhibitor kan återställa uttrycket av HSF2 till normala nivåer i mesenkymala celler, skulle de innebära att fenomenet inte är celltypspecifikt.

En annan viktig observation är att experimenten i denna Pro gradu-avhandling utfördes med celler odlade i 2D-kultur, där en EMT-induktion initierades i cellerna genom att stimulera TGF- β -signalräckan, som i sin tur minskar på uttryck av HSF2. Björk med kollegor utförde däremot samtliga experiment med prostatacancer celler som odlades i 3D-kultur, där cellerna självmant genomgick EMT när de utvecklades till sfäroider. Resultatet från deras studie indikerar att uttrycket av HSF2 minskar vid utvecklingen av cancer (Björk et al., 2016). Därmed stöder resultaten publicerade av Björk med kollegor resultaten presenterade i denna Pro gradu-avhandling, det vill säga att en EMT-induktion minskar på uttrycket av HSF2. Detta medför även att det skulle vara intressant att undersöka om TGF- β -signalräckan är involverad i induktionen av

EMT när cellerna bildar sfäroider. Detta kunde undersökas genom att behandla cellerna i 3D-kultur med TGF- β -receptor-I-inhibitorn och studera om inhibitorn klarar av att stabilisera uttrycket av HSF2 under sfäroidutvecklingen.

6.2 Extracellulär signalering genom Typ-I-receptorn påverkar HSF2-uttrycket

Ett samspel mellan olika signalräckor, som exempelvis TGF- β -, Wnt- och Sonic Hedgehog-signalräckan, krävs för att cellen skall genomgå olika biokemiska förändringar och initiera EMT (Zhang et al., 2016). TGF- β inducerar EMT genom transkriptionsfaktorerna Snail och Slug som minskar på uttrycket av E-cadherin samt ökar på mängden N-cadherin, medan Wnt kan inducera EMT via en aktivering av PI3K/Akt-signalräckan (Xu et al., 2009; Lee et al., 2015). I detta arbete inducerades EMT i MCF10A-celler med hjälp av behandling med TGF- β_1 och XV, där de XV-innehållande komponenterna aktiverade Wnt- och TGF- β -signalräckan samt stimulerade andra essentiella EMT-proteiner (Tang et al., 2013). I figur 13 framkom det att ett minskat uttryck av HSF2 kan detekteras hos celler som genomgått TGF- β_1 - och XV-inducerad EMT. För att ytterligare kartlägga signalkaskaden som reglerar uttrycket av HSF2, behandlades MCF10-cellerna samtidigt med XV och en TGF- β -receptor-I-inhibitor. Behandlingarnas inverkan på uttrycket av HSF2 undersöktes med hjälp av SDS-PAGE och immunoblotting.

I figur 14 framkommer det som förväntat att ett minskat uttryck av HSF2 kan detekteras hos MCF10A-celler vid en XV-inducerad EMT, där TGF- β - eller Wnt-signalräckan har aktiverats. En intressant iakttagelse är dock att när Typ-I-receptorn i TGF- β -signalräckan blir inaktiverad, kan uttrycket av HSF2 återställas. Detta antyder att regleringen av HSF2 sker via en extracellulär signalkaskad som huvudsakligen går via TGF- β -signalräckans Typ-I-receptor. Detta utesluter dock inte möjligheten att andra signalräckor kan samspela med TGF- β -signalräckans Typ-I-receptor, och på det sättet reglera uttrycket av HSF2. Tidigare studier har visat att Wnt-signalräckans G-proteinkopplade receptor; Frizzled-8, kan samverka med TGF- β -signalräckans Typ-II-receptor och på det sättet indirekt aktivera TGF- β -signalräckan (Murillo-Garzon et al., 2018). Därmed kan man inte utesluta att komponenten i XV som reglerar uttrycket av HSF2 är TGF- β_1 , utan regleringen kan även utföras av andra signalmolekyler. Detta medför att nya experiment borde utföras där bland annat Wnt-signalräckans förmåga att minska på uttrycket av HSF2 undersöks. När den kanoniska Wnt-signalräckan

aktiveras via frizzled-receptorn fosforyleras en intracellulär signalmolekyl kallad Dishevelled, vilket leder till att β -catenin ackumuleras i cellkärnan och kan reglera transkriptionen av olika målgener (Logan & Nusse, 2004). Därmed kunde ett tillvägagångsätt vara att stimulera Wnt-signalräcka genom att uttrycka ett exogent Frizzled-protein, innehållande mutationer som medför att receptorn konstant är aktiv, och därefter analysera uttrycket av HSF2. För att sedan verifiera att Wnt-signalräckan är aktiverad borde specifika antikroppar för fosforylerat Dishevelled användas. Denna metodik har tidigare använts i en studie där Wnt-signalräckan undersöktes (Gonzalez-Sancho et al., 2004).

6.3 TGF- β -signalräckan, en snabbt aktiverad signalkaskad

När man studerar en signalräckas förmåga att reglera olika cellulära processer, borde även signalräckans kinetik undersökas. Utgående från tidigare presenterade resultat har en aktiverad TGF- β -signalräcka förmågan att reglera uttrycket av HSF2 via Typ-I-receptorn i cellmembranet. Det var därmed essentiellt att undersöka hur snabbt och effektivt TGF- β -receptor-I-inhibitorn klarade av att inaktivera TGF- β -signalräckan samt hur snabbt TGF- β -signalräckan blev aktiverad när cellerna behandlades med TGF- β_1 . En aktiverad TGF- β -signalräcka vidarebefordrar en signaltransduktion in i cellen genom att antingen fosforylera olika Smad-proteiner eller andra sekundära signalmolekyler som kinaser (figur 3) (Horbelt et al., 2012). Därmed kunde en aktiverad TGF- β -signalräcka identifieras genom att detektera fosforylerade Smad-protein med hjälp av SDS-PAGE och immunoblotting.

Resultatet som presenteras i figur 15 verifierar att det modellsystem som byggts upp i denna Pro gradu-avhandling har förmågan att reglera TGF- β -signalräckans aktivitet. TGF- β -signalräckan kan snabbt stimuleras av TGF- β_1 , vilket ökar på uttrycket av fosforylerade Smad 2-protein. Denna iakttagelse stöds av tidigare studier som visar att en TGF- β -behandling har förmågan att upprätthålla fosforyleringen av Smad 2-proteinet (Nyati et al., 2011). Dessutom framkommer det i figur 15 att TGF- β -receptor-I-inhibitorn är en effektiv hämmare av TGF- β -signalräckan eftersom inhibitorn kan inaktivera Typ-I-receptorn snabbare än vad TGF- β_1 kan stimulera den. Det hade tidigare verifierats i figur 14 att Typ-I-receptorn är essentiell för signaltransduktionen som reglerar uttrycket av HSF2 under EMT, men nu borde det utredas vilka intracellulära signalmolekyler som är involverade i signalkaskaden. För

att bekräfta Smad-proteinernas involvering och inverkan på regleringen av HSF2 kunde det i framtida experiment användas olika Smad-inhibitorer eller -aktivatorer. En möjlig inhibitor kunde vara SIS₃, som selektivt inaktiverar Smad 3 genom att hindra dess fosforylering utan att ha en inverkan på Smad 2 eller olika kinaser (Jinnin et al., 2006). Som Smad-aktivator kunde kartogenin användas, eftersom tidigare studier har visat att kartogenin kan selektivt öka på fosforyleringen av Smad 4/5 (Wang et al., 2014). En mindre specifik Smad-aktivator är alantolactone som enligt tidigare publicerade studier har en förmåga att aktivera Smad3 via aktivinsignalräckan (Shi et al., 2011). Inhibitorer och aktivatorer har även tidigare använts vid cancerforskning, exempelvis för att stimulera Map-kinaskaskaden, vilket antyder att detta är ett lämpligt tillvägagångssätt för att undersöka Smad-proteinerna (Burkhard & Shapiro, 2010). Smad 2 skulle även vara ett intressant målprotein för fortsatta studier, men inga ämnen som påverkar dess aktivering har ännu rapporterats. En metod som kunde användas för att undersöka Smad 2:s inverkan på regleringen av HSF2, är att nedreglera Smad 2-proteiner i cellerna med hjälp av RNA-interferens. Utgående från gensekvensen i hsf2-promotorn förekommer det dock inget bindningsställe, GTCTAGAC, för Smad-protein (Zawel et al., 1998). Detta antyder att Smad-proteinerna inte direkt reglerar uttrycket av HSF2 utan regleringen sker troligen indirekt med hjälp av olika regulator proteiner.

6.4 TGF- β ₁-signalräckan har förmågan att förändra genuttrycket för hsf2

I cellen kan proteinuttrycket regleras antingen genom transkriptionen av en målgen eller genom en ökad frekvens i nedbrytningen av proteinet, till exempel via ubiquitin-medierad nedbrytning (Levine & Tjian, 2003; Herrmann et al., 2007). Med tanke på att proteinuttrycket av HSF2 minskar när cellerna genomgår EMT, var det en aktuell aspekt att studera ifall denna reglering var orsakad av ett förändrat genuttryck för hsf2. Nivåerna av hsf2-mRNA mättes med hjälp av metoden qRT-PCR hos celler där EMT inducerats med hjälp av TGF- β ₁ och XV, samt i celler som behandlats med TGF- β -receptor-I-inhibitorn.

Utgående från resultatet i figur 16 framkommer det att när EMT induceras i cellerna med hjälp av TGF- β ₁ och XV kan signifikanta minskade nivåer av hsf2-mRNA detekteras. Detta resultat antyder att det minskade proteinuttrycket av HSF2, som har identifierats hos TGF- β ₁-och XV-behandlade celler, troligen är orsakad av ett

förändrat genuttryck för hsf2. En annan iakttagelse som presenteras i figur 16 är att mRNA-uttrycket av hsf2 går att återställas till normala nivåer då TGF- β -signalräckan inhiberas via en inaktiverad Typ-I-receptor. Detta resultat understöder antagandet att proteiner involverade i TGF- β -signalräckan troligen reglerar mRNA-nivåerna av hsf2. Sättet hur TGF- β -signalräckan påverkar genuttrycket av hsf2 förblir dock ännu oklart. En möjlighet är att de aktiverade Smad-proteinerna fungerar som en transkriptionsinhibitor, och har förmågan att hämma transkriptionen av hsf2 genom att binda till promotorn. Denna hypotes stöds av resultatet presenterat i en tidigare studie, där TGF- β /Smad-signalräckan visades kunna ha en hämmande effekt på transkriptionen av MMP-1. I studien framkommer det att Smad 3 fungerade som ett reglerande protein och hade förmågan att minska på transkriptionen av MMP-1 (Yuan & Varga, 2001). En möjlighet är dock att en Smad 3-medierade nedreglering initieras av en signalkaskad där TGF- β och Smad 3 fungerar som mellanliggande signalproteiner. Detta indikerar att det är potentiellt möjligt att TGF- β /Smad-signalräckan antingen kan stimulera transkriptionen av en annan transkriptionsfaktor eller aktiverar ett annat intracellulärt signalprotein, som i sin tur kan hämma transkriptionen av hsf2.

För att vidare undersöka hur TGF- β -signalräckan påverkar genuttrycket för hsf2, skulle det vara av intresse att studera om TGF- β -signalräckan har en direkt inverkan på promotoraktiviteten för hsf2. Detta kunde utredas med hjälp av luciferas-reporteranalys där promotoraktiviteten hos en specifik gen analyseras genom att kvantitativt mäta uttrycket för ett luciferasenzym. Genuttrycket mäts genom att detektera det emitterade ljuset som avges från luciferasenzymet när det reagerar med ett substrat i en kemiluminescensreaktion. Det emitterade ljuset är direkt proportionerligt med mängden luciferas som bildas (Barriscale et al., 2014). Därmed kunde det konstrueras en vektor innehållande två kilobaspar av hsf2-promotorn samt genen som kodar för luciferasenzymet. Genen placeras framför den förkortade hsf2-promotor. MCF10A-cellerna kunde sedan transfekteras med vektorn och behandlas med TGF- β_1 . Om genuttrycket för luciferasenzymet förändras vid en TGF- β -behandling, innebär det en identifiering av en gensekvens i hsf2-promotorn, som har förmågan att reglera transkriptionen av hsf2 vid en TGF- β -behandling. Den identifierade sekvensen kunde sedan analyseras vidare med oligonukleotid-precipitering för att undersöka vilka alla transkriptionsfaktorer som är bundna till den

förkortade hsf2-promotorn. De identifierade proteinerna kunde sedan analyseras med hjälp av masspektrometri, för att möjligen identifiera en eller flera transkriptionsfaktorer som fungerar som målproteiner för TGF- β -signalräckan.

6.5 Problem med att detektera ubikvitin-medierad nedbrytning av HSF2

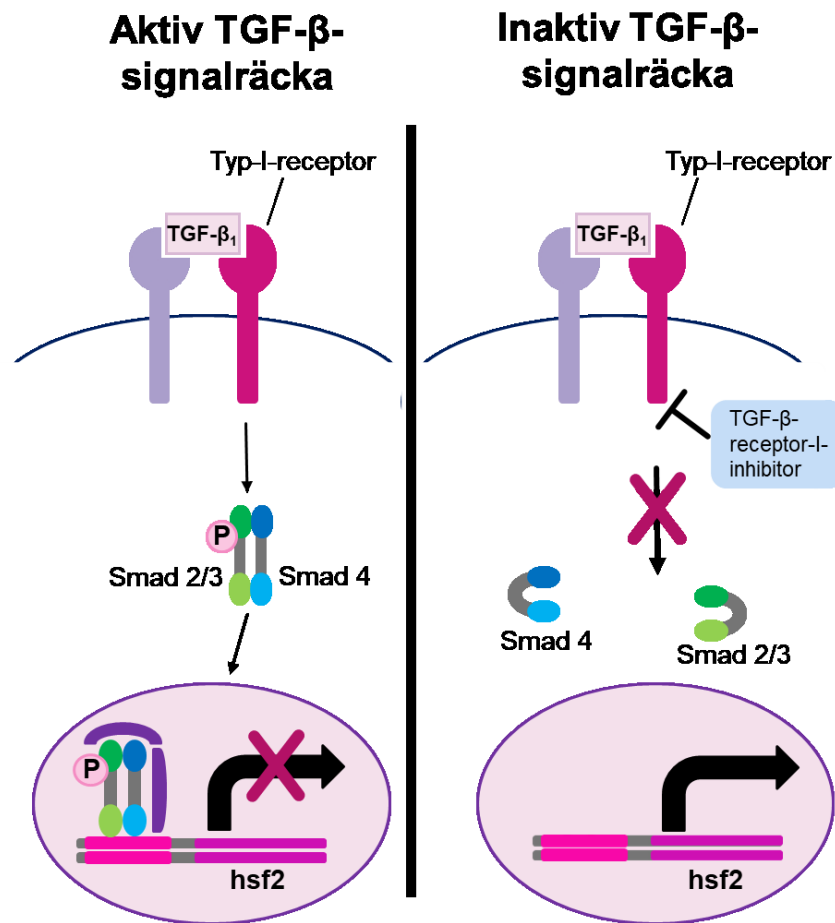
Förutom att en reglerad transkription kan påverka proteinuttrycket i cellen kan även mängden protein regleras av en ubikvitin-medierad nedbrytningsprocess. Utgående från iakttagelsen att uttrycket av HSF2 minskar när cellerna genomgår EMT, var det aktuellt att bestämma om detta orsakades av en inducerad nedbrytning av HSF2. Det har även tidigare visats i en studie utförd av Ahlskog med kollegor att uttrycket av HSF2 kan utsättas för ubikvitin-medierad nedbrytning under cellstress (Björk & Sistonen, 2010). I mitt Pro gradu-projekt byggdes först ett modellsystem upp för att garantera detektionen av ubikvitin-märkta HSF2-proteiner, genom att behandla cellerna med MG132 för tre timmar och värmechocka vid 42 °C i 30 minuter. HSF2 isolerades från cellerna med metoden immunoprecipitering och det ubikvitinerade HSF2-proteinet detekterades sedan med hjälp av SDS-PAGE och immunoblotting.

Det framkommer i resultatet från figur 17 att det modellsystem som byggdes upp inte fungerar för att detektera ubikvitineringen av HSF2. En markant ökning av ubikvitin-märkta proteiner kan detekteras i Input-proven från MG132-behandlade och värmechockade celler. Denna markanta ubikvitinering kan dock inte detekteras hos det isolerade HSF2-proteinet (figur 17). Detta betyder att modellsystemet kräver vidare optimering innan en fortsatt analys om EMT-processens förmåga att inducera ubikvitin-medierad nedbrytning av HSF2 är möjlig. Ett sätt att optimera modellsystemet kunde vara att öka på uttrycket av HSF2 genom att transfektera cellerna med en plasmid som producerar ett exogent HSF2-protein, vilket troligen skulle underlätta detekteringen av ubikvitinerat HSF2. En viktig observation är dock att i studien utförd av Ahlskog och kollegor kunde ubikvitinerat exogent HSF2 detekteras i humana embryonala njurceller (eng. human embryonic kidney cells, HEK), medan experimenten i denna Pro gradu-avhandling utfördes med MCF10A-celler. HEK-cellerna har förmågan till hög transfektionseffektivitet och är därmed ett optimalt modellsystem vid olika transfektionsexperiment. MCF10A-cellerna har däremot uppfattas som svåra att transfektera, och därmed kunde det vara lönsamt att

optimera det nya modellsystemet i en annan cellinje som är lättare att transfektera, till exempel cellinjen MDA-MB-231.

6.6 Slutsatser

Målsättningen med denna undersökning var att studera hur uttrycket av HSF2 regleras när MCF10A-cellerna genomgår EMT. För att åstadkomma en EMT-induktion i cellen stimulerades TGF- β -signalräckan genom behandling med olika signalmolekyler. Resultaten indikerar att EMT kan induceras i dessa celler genom att aktivera TGF- β -signalräckan och under denna EMT-process kommer uttrycket av HSF2 att minska (figur 18). Resultaten visar även att under EMT regleras uttrycket av HSF2 via en signalkaskad som använder sig av TGF- β Typ-I-receptorn. De minskade nivåerna av HSF2 under EMT anses även bero på ett förändrat genuttryck för hsf2. Resultaten från qRT-PCR-metoden visar att mRNA-nivåerna av hsf2 minskar när cellerna genomgår TGF- β -inducerad EMT. I denna undersökning var avsikten även att studera om EMT-processen kan inducera en ubikvitin-medierad nedbrytning av HSF2, och på det sättet reglera uttrycket av proteinet i cellen. Modellsystemet för att detektera det ubikvitinerade HSF2-proteinet orsakade dock problem, och denna analys förblev ofullständig. Denna form av reglering är inte cellinjesspecifik, i och med att opublicerade resultat från Sistonens forskningsgrupp har visat att TGF- β -signalräckan även har förmågan att reglera på uttrycket av HSF2 i cellinjen MDA-MB-231. Studier som utreder hur olika signalräckor är involverade i regleringen av EMT, är essentiella för att i framtiden klara av att framställa läkemedel som kan ha en negativ inverkan på utvecklingen av cancer.



Figur 18. En hypotetisk presentation av TGF- β -signalrÄckans fÄrmÄga att reglera *hsf2*-mRNA-nivÄerna under EMT. En aktiverad TGF- β -signalrÄcka inducerar EMT i cellen, och under denna process minskar uttrycket av HSF2. Signalkaskaden som reglerar uttrycket av HSF2 gÄr Även via TGF- β -signalrÄckans Typ-I-receptor eftersom uttrycket av HSF2 gÄr att ÅterstÄllas till normala nivÄer nÄr Typ-I-receptorn inaktiveras med hjÄlp av TGF- β -receptor-I-inhibitorn. Det minskade mRNA-uttrycket av *hsf2* Är troligen reglerad genom TGF- β -signalrÄckans fÄrmÄga att hÄmma transkriptionen av *hsf2*.

Litteraturförteckning

- Abravaya K., Phillips B., Morimoto R. I. (1991). Heat shock-induced interactions of heat shock transcription factor and the human hsp70 promoter examined by in vivo footprinting. *Mol Cell Biol.* 11:586-592.
- Ahlskog J. K., Björk J. K., Elsing A. N., Aspelin C., Kallio M., Mattjus P., Sistonen L. (2010). Anaphase-promoting complex/cyclosome participates in the acute response to protein-damaging stress. *Mol Cell Biol.* 30:5608-5620.
- Alastalo T., Hellesuo M., Sandqvist A., Hietakangas V., Kallio M., Sistonen L. (2003). Formation of nuclear stress granules involves HSF2 and coincides with the nucleolar localization of hsp70. *JCS.* 116:3557-3570.
- Amin J., Ananthan J., Voellmy R. (1988). Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol.* 8:3761-3769.
- Anckar J., Sistonen L. (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress responses: implications in aging and disease. *AR.* 80:1089-1115.
- Anzano M. A., Roberts A. B., Meyers C. A., Komoriya A., Lamb L. C., Smith J. M., Sporn M. B. (1982). Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. *Cancer Res.* 42:4776-4778.
- Barriscale K. A., O'Sullivan S. A., McCarthy T. V. (2014). A single secreted luciferase-based gene reporter assay. *Anal Biochem.* 453:44-49.
- Belmont A. S. (2006). Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Boil.* 18:632-638.
- Björk J. K., Sistonen L. (2010). Regulation of the members of the mammalian heat shock factors family. *FEBS.* 277:4126-4139.
- Björk J. K., Åkerfelt M., Joutsen J., Puustinen M. C., Cheng F., Sistonen L., Nees M. (2016). Heat-shock factor 2 is a suppressor of prostate cancer invasion. *Oncogene.* 35:1770-1784.
- Boyer A. S., Ayerinkas I. I., Vincent E. B., McKinney L. A., Weeks D. L., Runyan R. B. (1999). TGF β 2 and TGF β 3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Dev Biol.* 208:530-545.
- Bu L., Jin Y., Shi Y., Chu R., Ban A., Eiberg H., Andres L., Jiang H., Zheng G., Qian M., Cui B., Xia Y., Liu J., Hu L., Zhao G., Hayden M. R., Kong X. (2002). Mutant DNA-binding domain of HSF4 associated with autosomal dominant lamellar and Marner cataract. *Nature.* 31:276-278.
- Burkhard K., Shapiro P. (2010). Use of inhibitors in the study of MAP-kinase. *Methods Mol Biol.* 661:107-122.
- Budzynski M. A., Puustinen M. C., Joutsen J., Sistonen L. (2015). Uncoupling stress-inducible phosphorylation of heat shock factor 1 from its activation. *Mol Cell Biol.* 35:2530-2540.
- Cadena D. L., Gill G. N. (1992). Receptor tyrosine kinases. *FASEB J.* 6:2332-2337.
- Calderwood S. T. (2016). Heat shock proteins promote cancer: It's a protection racket. *Trends Biochem Sci.* 41:311-323.
- Carpenter G. (1979). Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem.* 48:193-216.

- Cheifetz S., Hernandez H., Laiho M., ten Dijke P., Iwata K. K., Massagué J. (1990) Distinct transforming growth factor- β (TGF- β) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- β isoforms. *J Biol Chem.* 33:20533-20538.
- Chen D., Zhou M., Mundy G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 22:233-241.
- Christians E., Davis A. A., Thomas S. D., Benjamin I. J. (2000). Embryonic development: Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature.* 407:693-694.
- Ciocca D. R., Calderwood S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress chaperones.* 10:86-103.
- Clark D. A., Coker R. (1998). Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF- β). *Int J Biochem Cell Biol.* 30:293-298.
- Dai C. (2016). HSF1: Guardian of proteostasis in cancer. *Trends Cell Biol.* 26:17-28.
- Dai C., Whitesell L., Rogers A. B., Lindqvist S. (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell.* 130:1005-1018.
- De Robertis E. M., Kuroda H. (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:285-308.
- de Thonel A., Mezger V., Garrido C. (2011). Implication of heat shock factors in tumorigenesis: Therapeutical potential. *Cancers.* 3:1158-1181.
- Derynck R., Zhang Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature.* 425:577-584.
- Deveaud C. M., Macarak E. J., Kucich U., Ewalt D. H., Abrams W. R., Howard P. S. (1998). Molecular analysis of collagen in bladder fibrosis. *J Urol.* 160:1518-1527.
- Elsing A. N., Aspelin C., Björk J. K., Bergman H. A., Himanen S. V., Kallio M. J., Roos-Mattjus P., Sistonen L. (2014). Expression of HSF2 decreases in mitosis to enable stress-inducible transcription and cell survival. *J Cell Biol.* 206:735-749.
- Eriksson M., Jokinen E., Sistonen L., Leppä S. (2000). Heat shock factor 2 is activated during mouse heart development. *Int J Dev Biol.* 44:471-477.
- Eungdamrong N. J., Iyengar R. (2004). Modeling cell signaling networks. *Biol Cell.* 96:355-362.
- Fiorenza M. T., Farkas T., Dissing M., Kolding D., Zimarino V. (1995). Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 23:477-474.
- Fujimoto M., Hayashida N., Katoh T., Oshima K., Shinkawa T., Prakasam R., Tan K., Inouye S., Takii R., Nakai A. (2010). A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock. *Mol Biol Cell.* 21:106-116.
- Fulda S., Gorman A. M., Hori O., Samali A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol.* 2010:1-23.
- Gonzalez-Sancho J. M., Brennan K. R., Castelo-Soccio L. A., Brown A. M. C. (2004). Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6-independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize β -catenin. *Mol Cell Biol.* 24:4757-4768.
- Goodson M. L., Hong Y., Rogers R., Matunis M. J., Park-Sarge O., Sarge K. D. (2001). Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *JBC.* 276:18513-18518.

- Goodson M. L., Park-Sarge O., Sarge K. D. (1995). Tissue-dependent expression of heat shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *MCB*. 15:5288-5293.
- Hajimiri M., Shahverdi S., Kamalinia G., Dinarvand R. (2014). Growth factor conjugation: Strategies and applications. *J Biomed Mater Res*. 103:819-838.
- Han Y. H., Moon H. J., You B. R., Park W. H. (2009). The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep*. 22:215-221.
- Hanahan D., Weinberg R A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144:646-674.
- Hau P., Jachimczak P., Schlingensiepen R., Schulmeyer F., Jauch T., Steinbrecher A., Brawanski A., Proescholdt M., Schlaier J., Buchroithner J., Pichler J., Wurm G., Mehdorn M., Strege R., Schuierer G., Villarrubia V., Fellner F., Jansen O., Straube T., Nohria V., Goldbrunner M., Kunst M., Schmaus S., Stauder G., Bogdahn U., Schlingensiepen K.H. (2007). Inhibition of TGF- β 2 with AP 12009 in recurrent malignant gliomas: from preclinical to phase I/II studies. *Oligonucleotides*. 17:201-212.
- Herpin A., Lelong C., Favrel P. (2004). Transforming growth factor- β -related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *DCI*. 28:461-485.
- Herrmann J., Lerman L. O., Lerman A. (2007). Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation. *Circ Res*. 100:1276-1291.
- Hjelmeland M. D., Hjelmeland A. B., Sathornsumetee S., Reese E. D., Herbstreith M. H., Laping N. J., Freidman H. S., Bigner D. D., Wang X., Rich J. N. (2004). SB-431542, a small molecule transforming growth factor- β -receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol Cancer Ther*. 3:737-745.
- Hong Y., Rogers R., Matunis M. J., Mayhew C. N., Goodson M., Park-Sarge O., Sarge K. D. (2001) *JBC*. 276:40263-40267.
- Horbelt D., Denkis A., Knaus P. (2012). A portrait of transforming growth factor β superfamily signaling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*. 44:469-474.
- Hubbard S. R., Mohammadi M., Schlessinger J. (1998) Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *JBC*. 273:11987-11990.
- Hucho F., Weise C. (2001). Ligand-gated ion channels. *Angew Chem Int Ed*. 40: 3100-3116.
- Ikushima H., Miyazono K. (2010). TGF β signaling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 10:415-424.
- Jinnin M., Ihn H., Tamaki K. (2006). Characterization of SIS₃, a novel specific inhibitor of Smad₃, and its effect on transforming growth factor- β ₁-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol*. 69:597-607.
- Kallur R., Weinberg R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 119:1420-1428.
- Katagiri T., Yamaguchi A., Komaki M., Abe E., Takahashi N., Ikeda T., Rosen V., Wozney J. M., Fujisawa-Sehara A., Suda T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblast into osteoblast lineage. *J Cell Biol*. 127:1755-1766.
- Katritch V., Cherezov V., Stevens R. C. (2013). Structure-function of the G-protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 53:531-556.
- Katz L. H., Li Y., Chen J., Munoz N. M., Majumdar A., Chen J., Mishra L. (2013). Targeting TGF- β signaling in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 17:743-760.

- Keski-Oja J., Leof E. B., Lyons R. M., Coffey R. J., Moses H. L. (1987). Transforming growth factors and control of neoplastic cell growth. *J Cell Biochem.* 33:95-107.
- Kingsley D. M. (1994). The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Dev.* 8:133-146.
- Kline M. P., Morimoto R. I. (1997). Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 17:2107-2115.
- Kourtis N., Lazaris C., Hockemeyer K., Balandran J. C., Jimenez A. R., Mullenders J., Gong Y., Trimarchi T., Bhatt K., Hu H., Shrestha L., Ambesi-Impiombato A., Kelliher M., Paietta E., Chiosis G., Guzman M. L., Ferrando A. A., Tsirigos A., Aifantis I. (2018). Oncogenic hijacking of the stress response machinery in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* 24:1157-1166.
- Lamouille S., Xu J., Derynck R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:178-196.
- Latchman D. S. (1997). Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol.* 29:1305-1312.
- Lebrun J. J., Vale W. W. (1997). Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activating receptors and human erythroid differentiation. *Mol Cell Biol.* 17:1682-1691.
- Lee J. M., Dedhar S., Kalluri R., Thompson E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *JCB.* 172:973-981.
- Lee S. C., Kim O., Lee S. K., Kim S. (2015). IWR-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells through suppressing Wnt/ β -catenin signaling as well as survivin expression. *Oncotarget.* 6:27146-27159.
- Letterio J. J., Roberts A. B. (1998). Regulation of immune responses of TGF- β . *Annu Rev Immunol.* 16:137-161.
- Levine M., Tjian R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature.* 424:147-151.
- Li J., Ballim D., Rodriguez M., Cui R., Goding C. R., Teng H., Prince S. (2014). The Anti-proliferative Function of the TGF- β 1 Signaling Pathway Involves the Repression of the Oncogenic TBX2 by Its Homologue TBX3. *JBC.* 289:35633-35643.
- Lindquist S. (1986). The heat-shock response. *Ann Rev Biochem.* 55:1151-1191.
- Liou G., Storz P (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 44:479-496.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000). Overview of extracellular signaling. *Molecular cell biology.* 4th edition. New York.
- Logan C. Y., Nusse R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Biochem.* 20:781-810.
- Loison F., Debure L., Nizard P., le Goff P., Michel D., le Dréan Y. (2006). Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *Biochem J.* 395:223-231.
- Massagué J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 6:597-641.
- Massagué J. (2008). TGF β in cancer. *Cell.* 134:215-230.
- Massagué J. (2012). TGF β signaling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:616-630.

- McMillan D. R., Xiao X., Shao L., Graves K., Benjamin I. J. (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *JBC*. 273:7523-7528.
- Mendillo M. L., Santaga S., Koeva M., Bell G. W., Hu R., Tamimi R. M., Fraenkel E., Ince T. A., Whitesell L., Lindqvist S. (2012). HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell*. 150:549-562.
- Meng X., Nikolic-Paterson D. J., Lan H. Y. (2016). TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 12:325-338.
- Micalizzi D. S., Farabaugh S. M., Ford H. L. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 15:117:134.
- Min J., Huang L., Zimonjic D. B., Moskophidis D., Mivechi N. F. (2007). Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in p53-deficient mouse model for spontaneous tumors. *Oncogene*. 26:5086-5097.
- Mittl P. R. E., Priestle J. P., Cox D. A., McMaster G., Cerletti N., Grutter M. G. (1996). The crystal structure of TGF- β 3 and comparison to TGF- β 2: implications for receptor binding. *Protein Sci*. 5:1261-1271.
- Miyazono K. (2000). Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J Cell Sci*. 113:1101-1109.
- Murillo-Garzon V., Gorron-Etxebarria I., Åkerfelt M., Puustinen M.C., Sistonen L., Nees M., Carton J., Waxman J., Kypta R. M. (2018). Frizzled-8 integrates Wnt-11 and transforming growth factor- β signaling in prostate cancer. *Nat Commun*. 9:1747.
- Nakai A., Ishikawa T. (2000). A nuclear localization signal is essential for stress-induced dimer-to-trimer transition of heat shock transcription factor 3. *JBC*. 275:34665-34671.
- Nakai A., Kawazoe Y., Tanabe M., Nagata K., Morimoto R. I. (1995). The DNA-binding properties of two heat shock factors, HSF1 and HSF3, are induced in the avian erythroblast cell line HD6. *MCB*. 15:5268-5278.
- Nakai A., Suzuki M., Tanabe M. (2000). Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J*. 19:1545-1554.
- Nakai A., Tanabe M., Kawazoe Y., Inazawa J., Morimoto R. I., Nagata K. (1997). HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *MCB*. 17:469-481.
- Nickel J., Sebald W., Groppe J. C., Mueller T. D. (2009). Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev*. 20:367-377.
- Nyati S., Schinske K., Ray D., Nyati M., Ross B. R., Rehemtulla A. (2011). Molecular imaging of TGF β -induced Smad2/3 phosphorylation reveals a role for receptor tyrosine kinases in modulating TGF β signaling. *Clin Cancer Res*. 17:7424-7439.
- Ohgushi M., Kuroki S., Fukamachi H., O'Railly L. A., Kuida K., Strasser A., Yonehara S. (2005). Transforming growth factor β -dependent sequential activation of smad, bim and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 25:10017-10028.
- Parag H. A., Raboy B., Kulka R. G. (1987). Effects of heat shock protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *EMBO J*. 6:55-61.
- Pertovaara L., Kaipainen A., Mustonen T., Orpanat A., Ferrara N., Saksela O., Alitalo K. (1993). Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- β in fibroblastic and epithelial cells. *JBC*. 269:6271-6274.

- Pirkkala L., Nykänen P., Sistonen L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* 15:1118-1131.
- Qin B. Y., Chacko B. M., Lam S. S., de Caestecker M. P., Correia J. J., Lin K. (2001). Structural Basis of Smad1 Activation by Receptor Kinase Phosphorylation. *Mol Cell.* 8:1303-1312.
- Reiter E., Seungkirl A., Shukla A. K., Leftkowitz R. J. (2012). Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 52:179-197.
- Richter K., Haslbeck M., Buchner J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell.* 40:253-266.
- Ritossa F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia.* 18:571-573.
- Roberts A. B., Anzano M. A., Lamb L. C., Smith J. M., Sporn M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 78:5339-5343.
- Romano G., Santi L., Bianco M. R., Giuffrè M. R., Pettinato M., Bugarin C., Garanzini C., Savarese L., Leoni S., Cerrito M. G., Leone B. E., Gaipa G., Grassilli E., Papa M., Lavitrano M., Giovannoni R. (2016). The TGF- β pathway is activated by 5-fluorouracil treatment in drug resistant colorectal carcinoma cells. *Oncotarget.* 19:22077-22091.
- Roy S., Kornberg T., B. (2015). Paracrine signaling mediated cell-cell contacts. *Bioessays.* 37:25-33.
- Sakou T. (1998). Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone.* 22:591-603.
- Salmand P. A., Jungas T., Fernandez M., Conter A., Christians E. S. (2008). Mouse heat-shock factor 1 (HSF1) is involved in testicular response to genotoxic stress induced by doxorubicin. *Biol Reprod.* 76:1092-1101.
- Sandqvist A., Björk J. K., Åkerfelt M., Chiikova Z., Grichine A., Vourc'h C., Jolly C., Salminen T. A., Numalm Y., Sistonen L. (2009). Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol Biol Cell.* 20:1340-1347.
- Sanford L. P., Ormsby I., Gittenberger-de Groot A. C., Sariola H., Friedman R., Boivin G. P., Cardell E. L., Doetschman T. (1997). TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development.* 124: 2659-2670.
- Santoro M. G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol.* 59:55-63.
- Sarge K. D., Murphy S. P., Morimoto R. I. (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear location and can occur in the absence of stress. *MCB.* 13:1392-1407.
- Sarge K. D., Park-Sarge O., Kirby J. D., Mayo K. E., Morimoto R. I. (1994). Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: Potential role as regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis. *BCR.* 50:1334-1343.
- Sarge K. D., Zimarino V., Holm K., Wu C., Morimoto R. I. (1991). Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev.* 5:1902-1911.
- Sarrió D., Rodríguez-Pinilla S. M., Hardisson D., Cano A., Moreno-Bueno G., Palacios J. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Relates to the Basal-like Phenotype. *Cancer Res.* 68:989-997.

- Schlesinger M. J. (1990). Heat shock proteins. *J Biol Chem.* 265:12111-12114.
- Schlessinger J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103:211-225.
- Sheng M., Pak D. T. S. (2000). Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rev Physiol.* 62:755-788.
- Shi X., Cui B., Wang Z., Weng L., Xu Z., Ma J., Xu G., Kong X., Hu L. (2009). Removal of Hsf4 leads to cataract development in mice through down-regulation of γ S-crystallin and Bfsp expression. *BMC Mol Biol.* Doi:10.1186/1471-2199-10-10.
- Shi Y., Bao Y. L., Wu Y., Yu C. L., Huang Y. X., Sun Y., Zheng L. H., Li Y. X. (2011). Alantolactone inhibits cell proliferation by interrupting the interaction between Cripto-1 and activin receptor type II A in activin signaling pathway. *J Biomol Screen.* 16:525-535.
- Shull M. M., Ormsby I., Kier A., Pawlowski S., Diebold R. J., Yin M., Allen R., Sidman C., Proetzel G., Calvert D., Annunziata N., Doetschman T. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory diseases. *Nature.* 359:693-699.
- Siegel P. M., Massagué J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 3:807-820.
- Sistonen L., Sarge K. D., Morimoto R. I. (1994). Human heat shock factor 1 and 2 are differently activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *MCB.* 14:2087-2099.
- Sistonen L., Sarge K. D., Phillips B., Abravaya K., Morimoto R. (1992). Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *MCB.* 12:4104-4111.
- Souchelnytskyi S., Tamaki K., Engström U., Wernstedt C., ten Dijke P., Heldin C. H. (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 272:28107-28115.
- Sporn M. B., Roberts A. B. (1992). Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 119:1017-1021.
- Su K. H., Cao J., Tang Z., Dai S., He Y., Sampson S. B., Benjamin I. J., Di C. (2016). HSF1 critically attunes proteotoxic-stress sensing by mTORC1 to combat stress and promote growth. *Nat Cell Biol.* 18: 527-539.
- Sulyok S., Wankell M., Alzheimer C., Werner S. (2004). Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. *MCE.* 225:127-132.
- Takii R., Fujimoto M., Matsuura Y., Wu F., Oshibe N., Takaki E., Katiyar A., Akashi H., Makino T., Kawata M., Nakai A. (2017). HSF1 and HSF3 cooperatively regulate the heat shock response in lizards. *PLoS One.* 12:e0180776.
- Tanabe M., Kawazoe Y., Takeda S., Morimoto R. I., Nagata K., Nakai A. (1998). Disruption of the HSF3 gene results in the severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J.* 17:1750-1758.
- Tanabe M., Nakai A., Kawazoe Y., Nagata K. (1997). Different thresholds in the responses of two heat shock transcription factors, HSF1 and HSF3. *JBC.* 272:15389-15395.
- Tanabe M., Sasai N., Nagata K., Liu X., Liu P. C. C., Thiele D. J., Nakai A. (1999). The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *JBC.* 274:27845-27856.
- Tang Y., Herr G., Johnson W., Resnik E., Aho J. (2013). Induction and Analysis of Epithelial to Mesenchymal Transition. *J Vis Exp.* 78:50478.

- Taya Y., O'Kane S., Ferguson M. W. J. (1999). Pathogenesis of cleft palate in TGF- β 3 knockout mice. *Development*. 126:3869-3879.
- Tissi eres A., Mitchell H. K., Tracy U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*. 84:389-398.
- Torre-Amione G., Beauchamp R. D., Koeppen H., Park B. H., Schreiber H., Moses H. L., Rowley D. A. (1990). A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type β 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 87:1486-1490.
- Ullrich A., Schlessinger J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 61:203-212.
- van Meeteren L. A., Thorikay M., Bergqvist S., Pardali E., Stampino C. G., Hu-Lowe D., Goumans M. J., ten Dijke P. (2012). Anti-human activin receptor-like kinase 1 (ALK1) antibody attenuates bone morphogenetic protein 9 (BMP9)-induced ALK1 signaling and interferes with endothelial cell sprouting. *J Biol Chem*. 287:18551-18561.
- Vihervaara A., Sistonen L. (2014). HSF1 at a glance. *J Cell Sci*. 127: 261-266.
- Visser J. A., de Jong F. H., Laven J. S. E., Themmen A. P. N. (2006). Anti-M ullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*. 131:1-9.
- Vuoriluoto K., Haugen H., Kiviluoto S., Mpindi J-P., Nevo J., Gjerdrum C., Tiron C., Lorens J. B., Ivaska J. (2011). Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 30:1436-1448.
- Wang G., Ying Z., Jin X., Tu N., Zhang Y., Philips M., Moskophidis D., Mivechi N. F. (2004). Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis*. 38:66-80.
- Wang J., Zhou J., Zhang N., Zhang X., Li Q. (2014). A heterocycling kartogenin induces collagen synthesis of human dermal fibroblasts by activating the smad4/smud5 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 450:568-574.
- Westerheide S. D., Anckar J., Stevens S. M., Sistonen L., Morimoto R. I. (2009). Stress-inducible regulation of the heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*. 323:1063-1066.
- Whitesell L., Lindquist S. (2009). Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin Ther Targets*. 13:469-478.
- Wong H. R. (2005). Endogenous cytoprotective mechanisms. *Neuro Immune Biology*. 5:49-65.
- Wrighton K. H., Lin X., Feng X. (2009). Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell Res*. 19:8-20.
- Wu C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11:441-469.
- Wu X., Shi W., Cao X. (2007). Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*. 1116:29-49.
- Wynn T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 214:199-210.
- Xiao X., Zuo X., Davis A. A., McMillan D. R., Curry B. B., Richardson J. A., Benjamin I. J. (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J*. 18: 5943-5952.
- Xing H., Wilkerson D. C., Mayhew C. N., Lubert E. J., Skaggs H. S., Goodson M L., Hong Y., Park-Sarge O., Sarge K. D. (2005). Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science*. 307:421-423.

- Xu J., Lamouille S., Derynck R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19:156-172.
- Yan X., Liao H., Cheng M., Shi X., Lin X., Feng X., Chen Y. (2016). Smad7 Protein Interacts with Receptor-regulated Smads (R-Smads) to Inhibit Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smad Signaling. *J Biol Chem.* 291:382-392.
- Yuan W., Varga J. (2001). Transforming growth factor- β repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves smad3. *JBC.* 276: 38502-38510.
- Zawel L., Le Dai J., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K. W., Vogelstein B., Kern S. E. (1998). Human Smad3 and Smad4 Are Sequence-Specific Transcription Activators. *Mol Cell.* 1:611-617.
- Zhang J., Tian X., Xing J. (2016). Signal transduction pathways of EMT induced by TGF- β , SHH and WNT and their crosstalks. *J Clin Med.* 5:41.
- Zhang L., Fok J. H. L., Davies F. E. (2014). Heat shock proteins in multiple myeloma. *Oncotarget.* 5:1132-1148.
- Zhong Y., Cheng H., Peng H., Tang S., Wang P. (2016). Heat shock factor 2 is associated with the occurrence of lung cancer by enhancing the expression of heat shock proteins. *Oncol Lett.* 12:5106-5112.
- Åkerfelt M., Morimoto R.I., Sistonen L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11:545-55.
- Åkerfelt M., Trouillet D., Mezger V., Sistonen L. (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann NY Acad Sci.* 1113:15-27.
- Åkerfelt M., Vihevaara A., Laiho A., Conter A., Christians E. S., Sistonen L., Hendriksson E. (2010). Heat shock transcription factor 1 localizes to sex chromatin during meiotic repression. *J Biol Chem.* 285:34469-34476.
- Östling P., Björk J. K., Roos-Mattjus P., Mezger V., Sistonen L. (2007). Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *JBC.* 282:7077-7086.

Bilaga 1

Receptbilaga

10 x PBS	
1,37 M	NaCl
26,8 mM	KCl
101,7 mM	Na ₂ HPO ₄
17,6 mM	KH ₂ PO ₄
→ Justera pH till 7,4	

10 x TBS	
1,37 M	NaCl
26,8 mM	KCl
247,6 mM	Tris-bas
→ Justera pH till 7,4	

3 x Laemmlibuffert	
30 %	Glycerol
187,5 mM	SDS
3 %	Tris-HCL (pH 6,8)
0,015 %	Bromfenolblå
3 %	B-merkaptotanol

10 x SDS-PAGE-körbuffert	
247,6 mM	Tris-bas
1,92 M	Glycin
0,1 %	SDS
→ SDS tillsätts innan användning	

2 x SDS-PAGE-gel		
Undre gel (8 %)	Övre gel (4 %)	
3 ml	-	1,5 M Tris-bas, pH 8,8
-	1,25 ml	0,5 M Tris-bas, pH 6,8
0,06 ml	0,025 ml	20 % SDS
3,2 ml	0,75 ml	Akrylamid/bis-akrylamid 30 %
5,8 ml	3 ml	Milli-Q H ₂ O
0,06 ml	0,02 ml	10 % APS
0,006 ml	0,01 ml	TEMED
→ APS och TEMED tillsätts sist, just innan användning		

5 x SDS-PAGE överföringsbuffert	
300,3 mM	Tris-bas
243,9 mM	Glycin
20 %	Metanol
→ Metanol tillsätts innan användning	

1 % SDS-PBS (1ml)	
50 µl	20 % SDS
950 µl	PBS

1 % BSA - 1% Triton-PBS (15 ml)	
150 mg	BSA
15 ml	1 % Triton - PBS

1 % Triton-PBS (50 ml)	
0,5 g	Triton
50 ml	PBS