

# **Aktivering av c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase i hepatocytter i primærkultur – effekter av ulike agonister og mulige signalmekanismer**

*Masteroppgave i farmakologi*

**Kanwal Akhtar**



Farmakologisk Institutt

og

Farmasøytisk Institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2008

## Forord

Denne oppgaven er utført som et siste ledd i å oppnå graden Master i farmasi, og ble utført ved Farmakologisk Institutt i perioden juni 2007 – mai 2008. Dagny Sandnes var ekstern veileder og Hege Thoresen var intern veileder. Først og fremst vil jeg takke Dagny for kjempegod oppfølging, hun har vært til utrolig stor hjelp både i forbindelse med planlegging og utførelse av forsøk, og skriving av oppgaven. Jeg vil også takke Hege for oppmuntring og gode råd, og opplæring i noe av det praktiske arbeidet.

Jeg vil takke Kristin Meisdalen Müller, Eva Østby, Monica Aasrum, John Ødegård, Ellen Johanne Johansen og Renuka Patel for hjelp i forbindelse med det praktiske arbeidet, og for nyttige diskusjoner og gode råd. Takk til Thoralf Christoffersen for figur 2 i oppgaven.

Takk til alle på Farmakologisk Institutt som har vist interesse for oppgaven min, og som har bidratt til at jeg har hatt et hyggelig og lærerikt år på Farmakologisk Institutt.

Til slutt vil jeg benytte anledningen til å takke mine foreldre, og også øvrig familie og gode venner, for at de har støttet og motivert meg gjennom hele studietiden.

Oslo, mai 2008

Kanwal Akhtar

---

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b> .....	<b>2</b>
<b>INNHOLDSFORTEGNELSE</b> .....	<b>3</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>6</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>11</b>
1.1 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN .....	11
1.2 CELLULÆR SIGNALOVERFØRING .....	11
1.3 MEMBRANRESEPTORER .....	12
1.3.1 <i>Epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR)</i> .....	12
1.3.2 <i>G-proteinkoblede reseptorer og G-proteiner</i> .....	14
1.4 PLC-SIGNALVEIEN .....	16
1.5 MITOGENAKTIVERTE PROTEINKINASER (MAP-KINASER) .....	18
1.5.1 <i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i> .....	19
1.6 GPCR-AGONISTER BENYTTET I DENNE OPPGAVEN .....	21
1.7 HEPATOCYTTER FRA ROTTE I PRIMÆRKULTUR SOM CELLEMODELL .....	22
1.8 MÅLENE MED OPPGAVEN .....	23
<b>2. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>24</b>
2.1 KJEMIKALIER .....	24
2.2 ISOLERING OG DYRKING AV HEPATOCYTTER .....	25
2.3 HØSTING AV CELLER TIL WESTERN BLOTTING .....	25
2.4 HØSTING AV CELLER TIL IMMUNPRESIPITERING OG KINASE-ASSAY .....	26
2.5 BUFFERE OG LØSNINGER .....	26

---

2.5.1	<i>Løsninger til støping av polyakrylamidgeler</i> .....	27
2.5.2	<i>Buffere og løsninger til Western blotting</i> .....	29
2.5.3	<i>Buffere og løsninger til immunpresipitering og kinase-assay</i> .....	31
2.6	WESTERN BLOTTING.....	33
2.7	IMMUNPRESIPITERING OG KINASE-ASSAY .....	35
2.8	BEREGNINGER OG STATISTISK ANALYSE.....	37
<b>3.</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>38</b>
3.1	JNK-AKTIVERING BESTEMT VED WESTERN BLOTTING .....	38
3.1.1	<i>Optimal inkuberingstid med VP</i> .....	38
3.1.2	<i>Effekt av agonister som aktiverer <math>G_q</math>-proteinkoblede reseptorer på JNK- fosforylering</i> .....	39
3.1.3	<i>Betydning av PLC-signalveien for aktivering av JNK</i> .....	41
3.1.4	<i>Betydning av <math>Ca^{2+}</math> og PKC for aktivering av JNK</i> .....	42
3.1.5	<i>EGF-indusert fosforylering av JNK</i> .....	49
3.2	MÅLING AV KINASE-AKTIVITET VED IMMUNPRESIPITERING OG KINASE-ASSAY .....	52
3.2.1	<i>Optimal inkuberingstid med VP</i> .....	53
3.2.2	<i>Effekt av agonister som aktiverer <math>G_q</math>-proteinkoblede reseptorer, og av thapsigargin, på JNK-aktivitet</i> .....	54
3.2.3	<i>Effekt av EGTA på VP-indusert JNK-aktivitet</i> .....	55
3.2.4	<i>Effekt av PKC-hemmer på VP- og TPA-indusert JNK-aktivitet</i> .....	56
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>58</b>
4.1	METODOLOGISKE ASPEKTER .....	58
4.2	STIMULERING MED GPCR-AGONISTER ØKER JNK-FOSFORYLING OG JNK-AKTIVITET.....	60
4.3	BETYDNING AV PLC-SIGNALVEIEN FOR JNK-FOSFORYLING.....	61

---

4.4	BETYDNING AV ØKT INTRACELLULÆRT $Ca^{2+}$ FOR JNK-FOSFORYLERING OG JNK-AKTIVITET .....	61
4.5	BETYDNING AV PKC FOR JNK-FOSFORYLERING OG JNK-AKTIVITET .....	63
4.6	BETYDNING AV $Ca^{2+}$ OG PKC FOR JNK- OG ERK-AKTIVITET UNDERSØKT I ANDRE STUDIER .....	65
4.7	KAN HEMMING AV MEK/ERK-SIGNALVEIEN PÅVIRKE FOSFORYLERING AV JNK? .....	66
4.8	HVILKEN EFFEKT HAR STIMULERING MED EGF PÅ FOSFORYLERING AV JNK? .....	66
4.9	ALTERNATIVE MEKANISMER FOR AKTIVERING AV JNK VIA GPCR-AGONISTER.....	67
4.10	KONKLUSJON.....	68
	<b>REFERANSER .....</b>	<b>69</b>

## Forkortelser

AC	Adenylyl-syklase
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
ATF-2	Aktiverende transkripsjonsfaktor 2 ( <u>A</u> ctivating <u>t</u> ranscription <u>f</u> actor <u>2</u> )
ATP	Adenosin trifosfat
BAPTA-AM	1,2-bis(o-aminofenoksy)etan-N,N,N',N'-tetraeddiksyre
BIS	N,N-metylen-bis-akrylamid
cAMP	Syklisk adenosin-monofosfat
DAG	Diacylglycerol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGF	Epidermal vekstfaktor
EGFR	Epidermal vekstfaktorreseptor
EGTA	Etylenglycol-bis(beta-aminoetyleter)-N,N,N',N'-tetraeddiksyre
EPAC	Utvekslingsprotein direkte aktivert av cAMP ( <u>E</u> xchange <u>p</u> rotein <u>d</u> irectly <u>a</u> ctivated by <u>c</u> AMP)
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERK	Ekstracellulært signal-regulert kinase
GEF	Guaninnukleotid utvekslingsfaktor ( <u>G</u> uanine <u>n</u> ucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor)
GF109203X	2-[1-(3-dimetylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)maleimid
GPCR	G-proteinkoblet reseptor
Grb2	Vekstfaktorreseptor-bundet protein 2 ( <u>G</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor- <u>b</u> ound <u>p</u> rotein <u>2</u> )
HRP	Pepperrot-peroksidase ( <u>H</u> orseradish <u>p</u> eroxidase)
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisfosfat
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
LPA	Lysofosfatidinsyre
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MAP-kinase	Mitogenaktivert proteinkinase
MAP2	Mikrotubulus-assosiert protein 2 ( <u>M</u> icrotubule- <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein <u>2</u> )
MKK	Mitogenaktivert proteinkinase-kinase

---

MKKK	Mitogenaktivert proteinkinase-kinase-kinase
MKKKK	Mitogenaktivert proteinkinase-kinase-kinase-kinase
NA	Noradrenalin
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumortovanadat
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI-PLC	Fosfatidylinositol-spesifikk fosfolipase C
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat
PI3K	Fosfoinositid 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Fosfolipase C
PTB	Fosfotyrosinbindende
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pyk2	Prolin-rik tyrosinkinase 2 ( <u>P</u> roline-rich <u>T</u> yrosine <u>K</u> inase <u>2</u> )
RTK	Reseptortyrosinkinase
SAPK	Stressaktivert proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese
SERCA	Sarcoplasmatisk eller endoplasmatisk retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SH2	Src homologi 2
Sos	Son of Sevenless
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TEY-motiv	Treonin-glutaminsyre-tyrosin-motiv
TGY-motiv	Treonin-glysin-tyrosin-motiv
Thr	Treonin
TPA	12-O-tetradecanoylforbol-13-acetat
TPY-motiv	Treonin-prolin-tyrosin-motiv
TRIS	Tris(hydroksymetyl)aminometan
Tyr	Tyrosin
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminofenylthio)butadien
U73122	1-[6-[[17 beta-3-metoksyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl] amino]heksyl]-1H-pyrrol-2,5-dionel
U73343	1-[6-[[17 beta-3-metoksyestra- 1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]heksyl]-2,5-

VP            pyrrolidin-dion  
              Vasopressin



---

## Sammendrag

Vasopressin (VP), angiotensin II (Ang II), noradrenalin (NA) og prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) er eksempler på agonister som aktiverer G<sub>q</sub>-proteinkoblede reseptorer i dyrkede hepatocytter fra rotte. Dette fører til aktivering av fosfolipase C (PLC) og nedstrøms økning av intracellulært kalsium (Ca<sup>2+</sup>) og aktivering av protein kinase C (PKC). Mekanismene for aktivering av c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) med agonister som aktiverer G-proteinkoblede reseptorer (GPCR) i hepatocytter er lite undersøkt. Hovedmålet med denne oppgaven var derfor å kartlegge hvordan GPCR-agonister aktiverer JNK i hepatocytter. Det ble hovedsaklig fokusert på PLC-signalveien, og hvilken rolle Ca<sup>2+</sup> og PKC spiller i aktivering av JNK med disse agonistene. En annen målsetning med oppgaven var å undersøke effekter av epidermal vekstfaktor (EGF) på JNK-aktivitet.

Hepatocytene ble i de fleste forsøkene dyrket i 5 timer før de ble inkubert med forskjellige agens. Aktivering av JNK ble bestemt ved henholdsvis Western blotting og immunpresipitering og kinase-assay. Deteksjon av fosforylert JNK ved Western blotting ble utført ved bruk av et spesifikt antistoff mot dobbeltfosforylert (aktivert) JNK1 og JNK2, mens et antistoff mot total JNK ble brukt som en "loading"-kontroll. Ved immunpresipitering og kinase-assay ble det utført immunpresipitering av JNK1 med påfølgende deteksjon av det [<sup>32</sup>P]-fosforylerte JNK1-substratet c-Jun (som blir et mål på JNK1-aktivitet) ved autoradiografi.

Alle agonistene stimulerte JNK-aktivering. Resultatene viste at både VP, Ang II, NA, PGE<sub>2</sub> og EGF kan stimulere JNK-aktivitet, og at VP førte til kraftigst aktivering blant disse agonistene. EGF førte til en forholdsvis langvarig aktivering av JNK. Thapsigargin, som fører til en økning i intracellulært Ca<sup>2+</sup> ved å hemme Ca<sup>2+</sup>-pumpen sarcoplasmatiske eller endoplasmatiske retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA), og 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetat (TPA), som fører til direkte aktivering av PKC, stimulerte også JNK-aktivering. Den thapsigargin-induserte aktiveringen av JNK var mye kraftigere enn effekten av TPA og agonistene som aktiverer GPCR. Effekten av TPA og av alle agonistene unntatt VP på aktivering av JNK ble svakt hemmet ved chelatering av ekstracellulært Ca<sup>2+</sup> med EGTA,

mens effekten av VP ikke ble påvirket. Effekten av thapsigargin, derimot, ble kraftig hemmet. Hemming av PKC med GF109203X endret ikke thapsigargin-indusert aktivering av JNK, mens effekten av VP ble noe økt. Effekten av TPA ble imidlertid fullstendig hemmet. Mens både EGTA og GF109203X førte til en svak økning i basal JNK-aktivitet, førte BAPTA-AM (som chelaterer intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ ) til en såpass kraftig økning i den basale aktiviteten at det ble vanskelig å tolke resultatene. Preinkubering med MEK-hemmeren U0126 hemmet både VP- og thapsigargin-indusert JNK-aktivitet. EGF stimulerte JNK-aktivitet i minst 5 timer både 5 og 24 timer etter utsæd av cellene.

Konklusjon: Økt nivå av intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ , indusert med thapsigargin, ga en kraftig stimulering av JNK-aktivitet i hepatocytene. Direkte aktivering av PKC med TPA aktiverte JNK, men i mindre grad. Verken økt intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  eller aktivering av PKC ser ut til å mediere effekten av VP på JNK-aktivitet i hepatocytene.

# 1. Innledning

## 1.1 Bakgrunn for oppgaven

Denne oppgaven er en del av et større prosjekt som undersøker intracellulære signalveier som regulerer cellevekst. Som cellemodell benyttes hepatocytter fra rotte i primærkultur. Det omfatter vekstregulerende signaler som formidles av to typer reseptorer lokalisert i plasmamembranen (membranreseptorer), henholdsvis reseptortyrosinkinaser (RTK), spesielt ErbB-familien, og G-proteinkoblede reseptorer (GPCR). Et viktig mål er å identifisere reguleringsmekanismer som kan tjene som angrepspunkter for ny kreftterapi.

Flere agonister, inkludert vasopressin (VP), angiotensin II (Ang II), noradrenalin (NA) og prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), aktiverer G<sub>q</sub>-proteinkoblede reseptorer i dyrkede hepatocytter fra rotte. Dette fører til aktivering av fosfolipase C (PLC) og nedstrøms økning av intracellulært kalsium (Ca<sup>2+</sup>) og aktivering av protein kinase C (PKC) (Lynch et al., 1985, Dajani et al., 1996). Det er tidligere vist at disse agonistene stimulerer den mitogenaktiverte proteinkinase (MAP-kinase) ekstracellulært signal-regulert kinase (ERK) via mekanismer som involverer Ca<sup>2+</sup> og PKC (Dajani et al., 1999, Melien et al., 2002). Nylig er det funnet at VP også stimulerer aktivering av en annen MAP-kinase, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) i hepatocytter (Sandnes et al., upublisert). Mekanismene for aktivering av JNK med agonister som aktiverer GPCR i hepatocytter er lite undersøkt. Hovedhensikten med denne oppgaven var derfor å kartlegge hvordan agonister som aktiverer GPCR i hepatocytter aktiverer JNK.

## 1.2 Cellulær signaloverføring

Cellene i en organisme er avhengige av å kunne kommunisere med hverandre, blant annet for å koordinere fundamentale prosesser som cellevekst, celledeling og celledød. Slik kommunikasjon foregår i stor grad ved hjelp av ekstracellulære signalmolekyler, som kan være hormoner, neurotransmittere, eller vekstfaktorer. Disse binder seg til reseptorer i

mottakercellene, og binding av agonist fører til en intracellulær respons (Alberts et al., 2002b).

## 1.3 Membranreseptorer

De fleste signalmolekyler er for store eller hydrofile til å kunne passere plasmamembranen til målcellen. De binder seg til spesifikke reseptorproteiner på overflaten til målcellene for å utøve sin effekt (Alberts et al., 2002a, Alberts et al., 2004). Disse reseptorene regulerer mange ulike typer cellulære effekter. Noen av effektene inntreffer hurtig, innen millisekunder, mens andre effekter tar sekunder eller atskillig lenger tid (Rang et al., 2003). De fleste membranreseptorene tilhører en av gruppene ionekanal-koblede reseptorer, G-proteinkoblede reseptorer og enzymkoblede reseptorer, herunder reseptortyrosinkinaser (RTK) (Alberts et al., 2002a, Alberts et al., 2004). De to sistnevnte reseptorgruppene er viktige temaer i denne oppgaven, og blir derfor beskrevet mer detaljert.

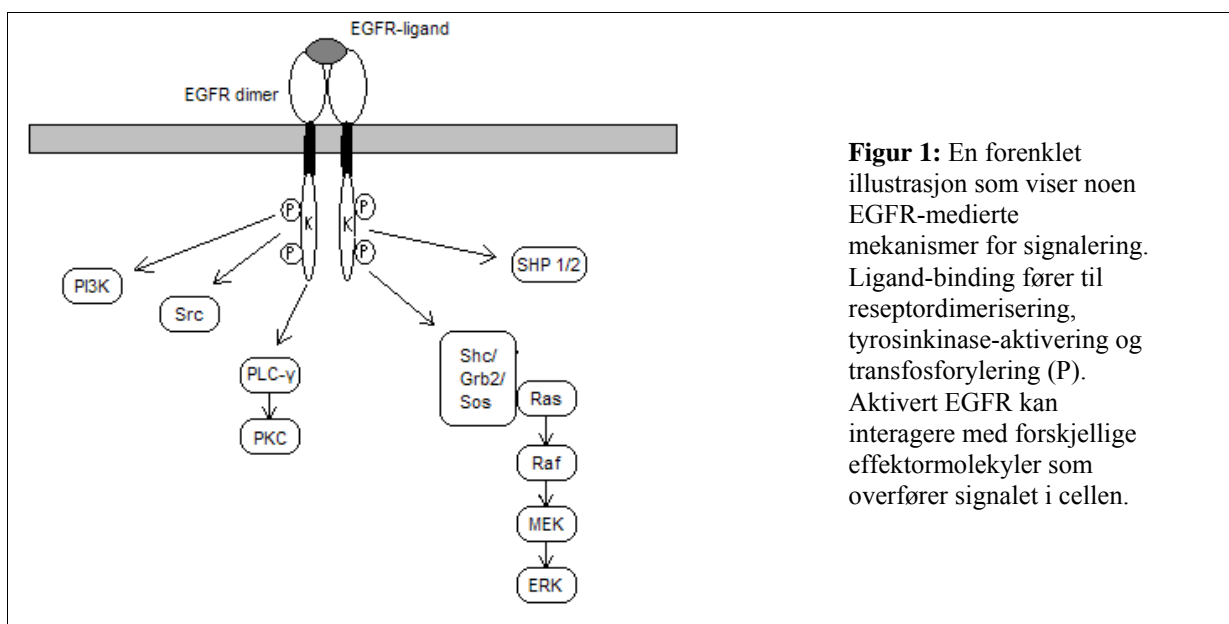
### 1.3.1 Epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR)

Det er identifisert 6 ulike grupper av enzymkoblede reseptorer, hvorav en av dem er transmembranale RTK (Alberts et al., 2002a). RTK har enzymaktivitet, og er i tillegg reseptorer for vekstfaktorer. RTK spiller en viktig rolle i regulering av de fleste fundamentale cellulære prosesser inkludert cellyklusen og cellens metabolisme, overlevelse, proliferasjon og differensiering. Hvis de er overaktive som følge av mutasjon, eller er til stede i unormalt høyt antall, kan de føre til ekspansiv vekst og bidra til malign transformasjon (Schlessinger, 2000, Guren et al., 2005). EGFR, også kalt ErbB1, tilhører ErbB-familien av RTK, og blir aktivert av vekstfaktorer fra EGF-familien (Schlessinger, 2000).

EGFR består av et ekstracellulært ligand-bindende domene, ett enkelt transmembranalt domene, og et cytoplasmisk tyrosinkinase-inneholdende domene. Ligand-binding fører til homo- eller heterodimerisering (med en av de tre andre reseptorene i ErbB-familien) av reseptoren med påfølgende aktivering av tyrosinkinase-domenet. Den aktiverte tyrosinkinasen transfosforilerer spesifikke tyrosin-enheter i det cytoplasmiske domenet.

Disse fosforylerte enhetene fungerer som docking-seter for proteiner som inneholder Src homologi 2 (SH2)- og fosfotyrosinbindende (PTB) domener, og rekruttering av disse proteinene fører til aktivering av intracellulære signalveier inkludert JNK-signalveien (Normanno et al., 2006).

Aktivert EGFR rekrutterer signalproteiner, inkludert Shc, vekstfaktorreseptor-bundet protein 2 (Grb2), PLC- $\gamma$ , de intracellulære kinasene Src og fosfoinositid 3-kinase (PI3K), og tyrosinfosfatase SHP1 og SHP2, og initierer dermed signaltransduksjon (figur 1). De forskjellige ErbB-reseptorene aktiverer diverse transkripsjonsfaktorer som for eksempel c-fos, c-Jun, STAT og NF- $\kappa$ B. Hvilke signalveier som aktiveres, avhenger blant annet av hvilke ligander som er involvert, og hvilke reseptorer som inngår i reseptordimeriseringen (Normanno et al., 2006). Det fins flere mekanismer for å hemme eller stanse den ligandinduserte aktiviteten av EGFR og de andre RTK. Disse inkluderer defosforylering med tyrosinfosfataser og endocytose og degradering av reseptorer (Schlessinger, 2000).



**Figur 1:** En forenklet illustrasjon som viser noen EGFR-medierte mekanismer for signalering. Ligand-binding fører til reseptordimerisering, tyrosinkinase-aktivering og transfosforylering (P). Aktivert EGFR kan interagere med forskjellige effektormolekyler som overfører signalet i cellen.

Blant de forskjellige mekanismene for EGFR-mediert aktivering av MAP-kinaser, er mekanismen for aktivering av ERK den best karakteriserte. Sos er en guaninnukleotid utvekslingsfaktor (GEF) for Ras, og dannelse av et Grb2-Sos-kompleks fører til aktivering

av Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien (Schlessinger, 2000). EGF-indusert aktivering av JNK antas å være mediert av de små GTPasene Ras og Rac, og av PI3K (Hashimoto et al., 1999).

### *Transaktivering av ErbB-reseptorer*

En annen mekanisme som induserer fosforylering av tyrosin-enheter på ErbB-reseptorer, med påfølgende stimulering av intracellulære signalveier, er transaktivering. Med det forstås aktivering av ErbB-reseptorer via signalveier aktivert av ligander som ikke binder seg til ErbB. Transaktivering via agonister som aktiverer GPCR er blitt studert spesielt nøye. Flere mekanismer er påvist. I noen celler fører aktivering av GPCR til stimulering av metalloproteinaser, som induserer kløyving av forløpere for EGF-lignende ligander som foreligger i plasmamembranen, og de frigjorte ligandene kan deretter aktivere ErbB-reseptorer (Normanno et al., 2006). Noen studier tyder på at kinaser fra Src-familien spiller en rolle i G $\beta\gamma$ -mediert aktivering av MAP-kinase ved at de fosforylerer tyrosin-enheter på og aktiverer EGFR uten å aktivere den innebygde reseptorkinaseaktiviteten (Zwick et al., 1999). Ding et al. (2007) viste at Ang II induserer JNK-aktivering via redoks-sensitiv transaktivering av EGFR i humane mesangiale celler. PKC ser ut til å kunne stimulere eller hemme EGFR-transaktivering avhengig av celletype (Gudermann et al., 2000). Transaktivering er imidlertid ikke påvist i hepatocytter (Nilssen et al., 2004, Dajani et al., 2008).

### **1.3.2 G-proteinkoblede reseptorer og G-proteiner**

G-proteinkoblede reseptorer (GPCR) er den største familien av membranmolekyler involvert i signaloverføring, og det er rapportert nesten 2000 forskjellige slike reseptorer. Disse reseptorene aktiveres av mange strukturelt forskjellige ligander, inkludert neurotransmittere (både peptider og ikke-peptider), hormoner, vekstfaktorer, og av signaler forbundet med sansing av smak, lukt og syn (Ji et al., 1998, Marinissen og Gutkind, 2001, Kobilka og Deupi, 2007).

GPCR, også kalt 7-transmembranale reseptorer eller serpentin-reseptorer, består av en enkel polypeptid-kjede bygd opp av opptil 1100 enheter (Rang et al., 2003). Den utbredte rollen til GPCR i signaloverføring kan tilskrives deres fleksible og dynamiske tredimensjonale

---

struktur (Kobilka og Deupi, 2007). Strukturen omfatter 7 transmembranale  $\alpha$ -helikser med et ekstracellulært N-terminalt domene med varierende lengde, og et intracellulært C-terminalt domene. En av de intracellulære sløyfene er større enn de andre, og interagerer med G-proteiner. GPCR kan, basert på sekvenshomologi, deles inn i flere ulike familier som deler den 7-transmembranale strukturen, men varierer i blant annet lengden av N-terminus og lokalisasjonen av det agonist-bindende domenet (Rang et al., 2003).

Som navnet tilsier, interagerer GPCR med G-proteiner. En individuell reseptor kan aktivere kun et begrenset antall G-proteiner blant de forskjellige G-proteinene uttrykt i en celle (Wess, 1998). Disse G-proteinene er heterotrimere guaninnukleotid-bindende proteiner som er bygd opp av  $\alpha$ -,  $\beta$ - og  $\gamma$ -subenheter.  $\alpha$ -subenheten inneholder det guaninnukleotid-bindende setet og har GTPase-aktivitet.  $\beta$ - og  $\gamma$ -subenhetene er bundet tett sammen, og blir ofte nevnt som én enkelt enhet kalt  $\beta\gamma$ -subenheten (Goldsmith og Dhanasekaran, 2007). Alle tre subenhetene er forankret til membranen via en fettsyrekjede som er koblet til G-proteinet gjennom en reaksjon kalt prenylering. G-proteiner ser ut til å kunne diffundere fritt i planet av membranen, og en samling av G-proteiner i en celle kan interagere med forskjellige reseptorer og effektorer (Rang et al., 2003). Per dags dato er 17 forskjellige  $\alpha$ -subenheter, 5  $\beta$ -subenheter og 12  $\gamma$ -subenheter blitt identifisert. Basert på aminosyresekvensen til  $\alpha$ -subenhetene, er G-proteinene delt inn i de fire gruppene  $G_s$  (definert ved  $G\alpha_s$ ),  $G_i$ ,  $G_q$  og  $G_{12}$ .  $G_i$ -familien inkluderer  $\alpha$ -subenhetene  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$ ,  $G\alpha_{i3}$ ,  $G\alpha_z$ ,  $G\alpha_{oA}$  og  $G\alpha_{oB}$ .  $G_q$ -familien består av  $\alpha$ -subenhetene  $G\alpha_q$  og  $G\alpha_{11}$ , som er uttrykt i alle vev, og  $G\alpha_{14}$  og  $G\alpha_{15/16}$ , som er spesifikke for hematopoetiske celler.  $G\alpha_{12}$  og  $G\alpha_{13}$  utgjør  $G_{12}$ -familien (Goldsmith og Dhanasekaran, 2007).

I GPCR-medierte signalveier katalyserer ligandaktiverte reseptorer utveksling av GDP med GTP i G-proteinets  $\alpha$ -subenhet. Den GTP-bundne  $\alpha$ -subenheten dissosierer fra reseptoren og fra  $\beta\gamma$ -subenheten, og disse to subenhetene stimulerer forskjellige nedstrøms effektorer. De to viktigste signalveiene som stimuleres, er adenylyl-syklase (AC) og fosfolipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ). AC katalyserer dannelsen av det intracellulære budbringeret syklisk adenosin-monofosfat (cAMP), som aktiverer proteinkinase A (PKA), utvekslingsprotein direkte aktivert av cAMP (EPAC) eller ionekanaler involvert i forskjellige cellulære prosesser. PLC- $\beta$  katalyserer dannelsen av de intracellulære

budbringer molekylene inositol 1,4,5-trisfosfat (IP<sub>3</sub>) og diacylglycerol (DAG), som regulerer mange cellulære funksjoner. I tillegg regulerer GPCR blant annet fosfolipase A<sub>2</sub>, som katalyserer dannelse av arakidonsyre og eikosanoider, og ionekanaler som for eksempel kalium- og kalsiumkanaler (Marinissen og Gutkind, 2001, Rang et al., 2003). G-proteiner regulerer dermed mange forskjellige signalveier inkludert de som er involvert i aktivering av MAP-kinaser (Goldsmith og Dhanasekaran, 2007). G<sub>i</sub>-gruppen av G-proteiner hemmer AC-signalveien, og G<sub>12</sub>-gruppen ser ut til å være involvert i reguleringen av små GTPaser (Radhika og Dhanasekaran, 2001). Aktiveringen av effektormolekyler avsluttes når det bundne GTP-molekylet hydrolyseres som følge av den innebygde GTPase-aktiviteten i  $\alpha$ -subenheten, og  $\alpha$ -subenheten vil da reassosiere med  $\beta\gamma$ -subenheten (Rang et al., 2003).

Mens effektene av GPCR på intermedier metabolisme er blitt grundig studert, har studier i løpet av de siste årene vist at GPCR spiller viktige roller i reguleringen av cellevekst, differensiering og transformasjon (Post og Brown, 1996, Gudermann et al., 2000, Marinissen og Gutkind, 2001). Mange potente mitogener, blant andre VP, Ang II, bradykinin og lysofosfatidinsyre (LPA), stimulerer celleproliferasjon ved å aktivere sine respektive GPCR i forskjellige celletyper. I overensstemmelse med rollen til GPCR i normal og malign cellevekst, har minst 10 av de 17 G $\alpha$ -subenhetene klonet så langt vist seg å kunne transformere celler når de overuttrykkes (Marinissen og Gutkind, 2001).

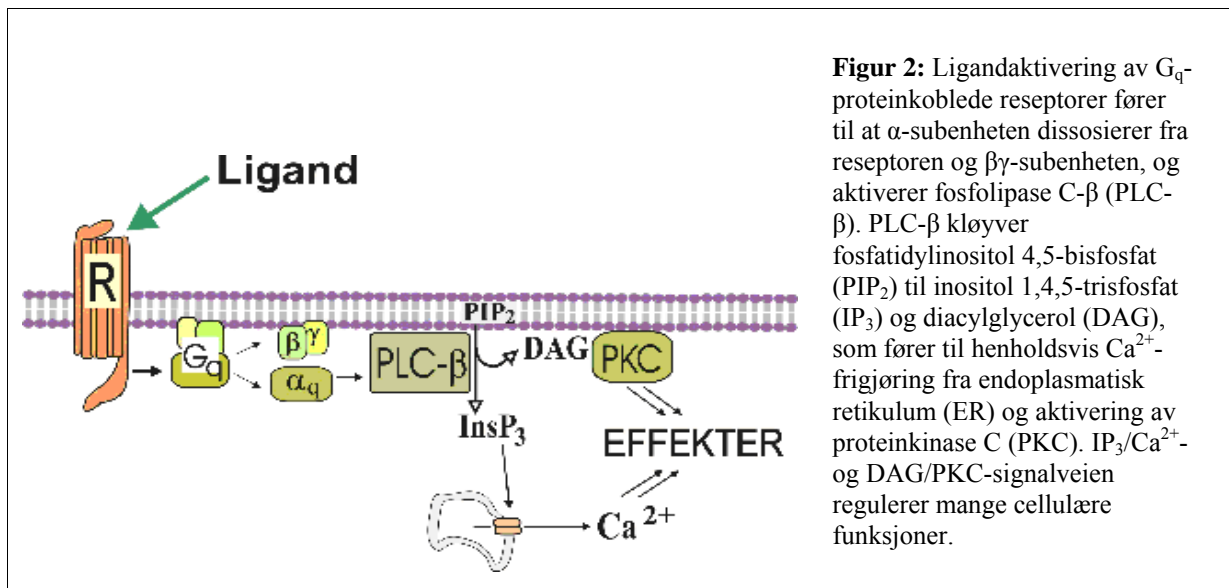
GPCR kan aktivere mer enn én G-protein-isoform, og nyere funn tyder på at de også kan signalere gjennom G-protein-uavhengige signalveier (Marinissen og Gutkind, 2001, Kobilka og Deupi, 2007). For eksempel kan adaptormolekylet arrestin binde seg til mange fosforylerte GPCR, og har primært en rolle i endocytose av disse reseptorene. Arrestin har imidlertid også vist seg å kunne koble GPCR til aktivering av kinaser i Src-familien og fremme dannelse av multimolekulære komplekser, som inkluderer komponenter av ERK- og JNK-signalveien (Luttrell et al., 1999, Marinissen og Gutkind, 2001).

## 1.4 PLC-signalveien

Forskjellige isoformer av fosfatidylinositol-spesifikk fosfolipase C (PI-PLC) er gruppert i seks familier (PLC- $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\zeta$  og - $\eta$ ) basert på deres struktur og aktiveringsmekanisme



(Visnjic og Banfic, 2007). Mange GPCR utøver sin effekt hovedsaklig via  $G_q$ -proteiner som aktiverer det plasmamembranbundne enzymet PLC- $\beta$  (figur 2). PLC- $\beta$  virker på et fosfolipid kalt fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat (PIP<sub>2</sub>), som er til stede i små mengder på innsiden av plasmamembranen. PLC- $\beta$  kløyver PIP<sub>2</sub> til de to budbringermolekylene IP<sub>3</sub> og DAG (Alberts et al., 2002a).



IP<sub>3</sub> diffunderer gjennom cytosolen til endoplasmatisk retikulum (ER), binder seg til IP<sub>3</sub>-reseptoren, en ligand-regulert  $Ca^{2+}$ -kanal som er til stede på ER-membranen, og åpner denne.  $Ca^{2+}$  frigjøres fra ER, og  $Ca^{2+}$ -konsentrasjonen i cytosolen øker raskt. Dette  $Ca^{2+}$ -signalet fjernes imidlertid raskt ved flere mekanismer. IP<sub>3</sub> blir enten defosforylert og omdannet til IP<sub>2</sub> og videre til inositol, eller det blir fosforylert til IP<sub>4</sub>. I tillegg blir  $Ca^{2+}$  i cytosolen raskt pumpet ut. Det meste blir pumpet ut av cellen, men noe blir også pumpet tilbake inn i ER igjen via  $Ca^{2+}$ -pumpen sarcoplasmatisk eller endoplasmatisk retikulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA). Det  $Ca^{2+}$ -bindende proteinet calmodulin medierer flere  $Ca^{2+}$ -regulerte prosesser. Mange av  $Ca^{2+}$ -effektene er imidlertid mer indirekte, og medieres via  $Ca^{2+}$ /calmodulin-avhengige proteinkinaser som fosforylerer forskjellige målproteiner (Alberts et al., 2002a).

DAG forblir i membranen og aktiverer den  $Ca^{2+}$ -avhengige serin/treonin-proteinkinase kalt proteinkinase C (PKC). Det fins minst 12 forskjellige PKC-subtyper. Den IP<sub>3</sub>-induserte

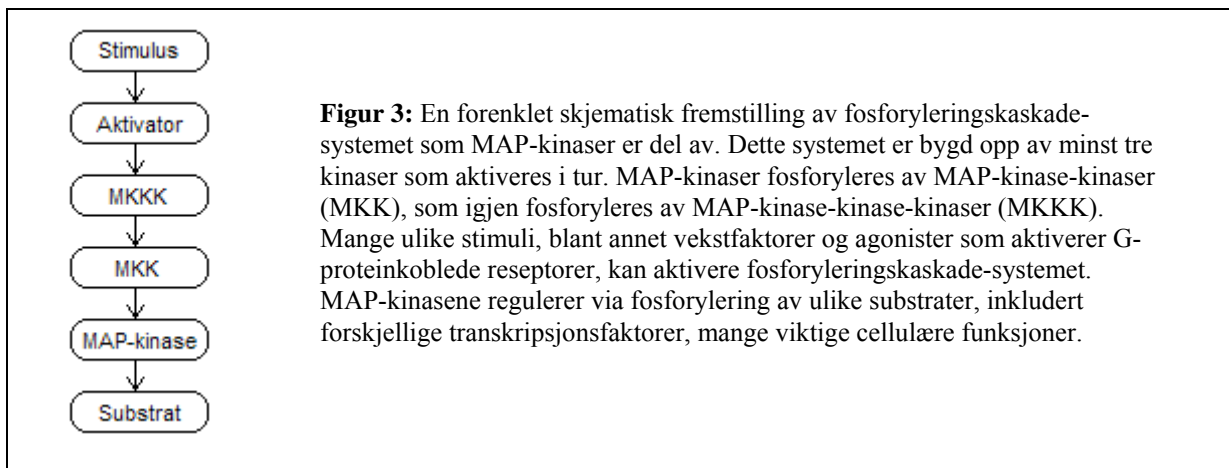
$\text{Ca}^{2+}$ -økningen i cytosolen fører til at PKC translokerer fra cytosolen til plasmamembranen, hvor PKC aktiveres på grunn av kombinasjonen av  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG og et negativt ladet membranfosfolipid, fosfatidylserin. DAG inaktiveres ved å bli fosforylert og omdannet til fosfatidinsyre, som reagerer med inositol for igjen å danne  $\text{PIP}_2$ . Aktivert PKC fosforylerer forskjellige målproteiner, inkludert ionekanaler, reseptorer og enzymer, avhengig av celletype. Ofte må det et samarbeid til mellom  $\text{Ca}^{2+}$ - og PKC-signalveien for maksimal cellulær respons (Alberts et al., 2002a, Rang et al., 2003).

## 1.5 Mitogenaktiverte proteinkinaser (MAP-kinaser)

MAP-kinaser, en familie av serin/treonin proteinkinaser, regulerer mange viktige cellulære funksjoner inkludert celleproliferasjon, celledifferensiering og apoptose (Marinissen og Gutkind, 2001, Goldsmith og Dhanasekaran, 2007). MAP-kinase-katalysert fosforylering av substratproteiner fungerer som en bryter som slår av eller på aktiviteten av substratproteinet. Eksempler på substrater er andre proteinkinaser, fosfolipaser, transkripsjonsfaktorer og cytoskjelett-proteiner. Fosfat som blir overført til substrater via MAP-kinaser, blir fjernet av proteinfosfataser.

Tre store subfamilier av MAP-kinaser, ERK1/2, JNK og p38, er blitt identifisert i multicellulære organismer. ERK1/2-subfamilien består av ERK1 og ERK2, også kalt p42 og p44 MAPK, og aktiveres av mange ulike stimuli som for eksempel vekstfaktorer og agonister som aktiverer G-proteinkoblede reseptorer. ERK1/2 er involvert i regulering av blant annet celleproliferasjon. Subfamilien p38 inkluderer de fire kinasene p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  og p38 $\delta$ . p38 aktiveres blant annet av cellulært stress, hormoner og agonister som aktiverer G-proteinkoblede reseptorer, og er med på å regulere celleoverlevelse, apoptose og celledifferensiering. Den tredje subfamilien er JNK som vil bli beskrevet i mer detalj i avsnittene under. En fjerde subfamilie, ERK5, er blitt karakterisert forholdsvis nylig, og ser ut til å spille en viktig rolle i tidlig genekspressjon. ERK5 blir også stimulert av agonister som aktiverer G-proteinkoblede reseptorer. (Marinissen og Gutkind, 2001, Johnson og Lapadat, 2002, Ding et al., 2007).

MAP-kinaser er del av et fosforyleringskaskade-system bygd opp av minst tre kinaser som aktiveres i tur. MAP-kinaser fosforyleres av MAP-kinase-kinaser (MKK), som igjen fosforyleres av MAP-kinase-kinase-kinaser (MKKK) (figur 3) (Johnson og Lapadat, 2002). MKK aktiverer JNK, ERK1/2 og p38 ved å fosforylere både en tyrosin (Tyr)- og en treonin (Thr)-enhet lokalisert i henholdsvis et Thr-prolin-Tyr (TPY)-, Thr-glutaminsyre-Tyr (TEY)- eller Thr-glysin-Tyr (TGY)-motiv i kinasedomenets aktiveringsloop (Li et al., 1997).



### 1.5.1 c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase

#### *Aktivering og effekter av JNK-signalveien*

JNK-subfamilien (også kalt stressaktivert proteinkinase (SAPK)-subfamilien) består av de tre kinasene JNK1, JNK2 og JNK3. De to førstnevnte kalles også henholdsvis p46 og p54 JNK (Nishina et al., 2004). JNK1 og JNK2 fins i mange vev, og antas å ha lignende funksjoner, mens JNK3 er uttrykt overveiende i nervesystemet (Schwabe et al., 2003, Nishina et al., 2004). JNK aktiveres blant annet av mange typer cellulært stress, som for eksempel UV- og  $\gamma$ -stråling, proteinsyntesehemmere, hyperosmolaritet, varmesjokk, DNA-skade og oksidativt stress (Nishina et al., 2004). GPCR og vekstfaktorer som for eksempel EGF kan også aktivere JNK (Wylie et al., 1999, Goldsmith og Dhanasekaran, 2007). JNK-signalveien regulerer en rekke cellulære prosesser, inkludert celleproliferasjon, differensiering, transformasjon, apoptose, migrasjon og regulering av cytoskjelettstrukturen. JNK kan ha enten pro- eller antiapoptotiske effekter avhengig av celletype, stimuli, og

latenstiden før JNK blir aktivert (Nishina et al., 2004). Flere studier tyder på at JNK-signalering induserer proliferasjon av hepatocytter, og medierer effekten av leverkarsinogener (Schwabe et al., 2003, Thevananther et al., 2004, Sakurai et al., 2006, Hui et al., 2007, Wada et al., 2008).

Aktivering av JNK ved dobbelfosforylering katalyseres av MKK4 (også kalt SEK1) og MKK7 (også kalt SEK2), som er JNK-spesifikke og i stand til å katalysere fosforyleringen av både Thr- og Tyr-enheter (Nishina et al., 2004). Det er identifisert 13 forskjellige MKKK som regulerer JNK via disse to MKK (Johnson og Lapadat, 2002). Aktivert JNK translokeres fra cytosol til kjernen og regulerer der aktiviteten til flere transkripsjonsfaktorer, blant annet c-Jun, ATF-2, p53 og c-Myc, ved fosforylering. JNK kan i tillegg også fosforylere ikke-transkripsjonsfaktorer som for eksempel Bcl-2, paxillin og MAP2 (Nishina et al., 2004, Goldsmith og Dhanasekaran, 2007).

### *Mekanismer for aktivering av JNK via G-proteinkoblede reseptorer*

Mekanismer for aktivering av JNK varierer avhengig av stimulus, celletype og fysiologiske betingelser (Zohn et al., 1995, Cadwallader et al., 1997, Li et al., 1997, Wylie et al., 1999, Goldsmith og Dhanasekaran, 2007). GPCR kan aktivere JNK via både  $G_i$ ,  $G_q$  og  $G_{12}$ .  $G_s$  har ikke vist seg å aktivere JNK, men kan stimulere andre MAP-kinaser (Goldsmith og Dhanasekaran, 2007).

$G_q$ -koblede reseptorer kan bruke både  $IP_3/Ca^{2+}$ - og DAG/PKC-signalveien for å aktivere JNK avhengig av celletype (Goldsmith og Dhanasekaran, 2007). Det er for eksempel vist i en leverderivert cellelinje fra rotte at Ang II aktiverer et  $Ca^{2+}$ -signal og den  $Ca^{2+}$ -avhengige tyrosinkinase Pyk2, og disse signalene stimulerer JNK-aktivitet. Ang II aktiverer imidlertid også PKC, som hemmer aktiviteten av JNK i denne celletypen (Li et al., 1997). Src eller en Src-lignende kinase ser ut til å være involvert i aktiveringen av JNK via begge signalveiene i hvert fall i noen celletyper (Goldsmith og Dhanasekaran, 2007).

---

Visse isoformer av  $G_i$ -proteiner kan aktivere JNK, og JNK-aktiveringen involverer både  $\alpha$ - og  $\beta\gamma$ -subenheten. Aktiveringsmekanismene involverer tyrosinkinaser og små GTPaser fra Rho-familien (Goldsmith og Dhanasekaran, 2007).

$G\alpha_{12}$  og  $G\alpha_{13}$  aktiverer JNK via de små GTPasene Ras, CDC42, Rac eller Rho, avhengig av celletype og fysiologiske betingelser (Marinissen og Gutkind, 2001, Goldsmith og Dhanasekaran, 2007).

## 1.6 GPCR-agonister benyttet i denne oppgaven

De forskjellige reseptorene som blir aktivert av agonistene som er tatt i bruk i denne oppgaven, er medlemmer av samme GPCR-familie (Wess, 1998).

### *Vasopressin*

VP er et peptidhormon som utøver viktige effekter på nyrene og er en kraftig vasokonstriktor i blant annet huden. Det fins tre typer reseptorer for VP;  $V_1$ ,  $V_2$  og  $V_3$ .  $V_2$ -reseptorer er koblet til AC-signalveien, mens  $V_1$ - og  $V_3$ -reseptorer er koblet til PLC-signalveien (Rang et al., 2003). VP utøver effekt via  $V_1$ -reseptorer i rotte-hepatocytter (Morell et al., 1992, Nilssen et al., 2005).

### *Angiotensin II*

Ang II er et peptid og er en potent vasokonstriktor som hovedsaklig påvirker kutan, visceral og renal blodgjennomstrømning. Ang II utøver hovedeffektene sine via de to reseptorene  $AT_1$  og  $AT_2$ .  $AT_1$  er en G-proteinkoblet reseptor, mens  $AT_2$ -reseptorer er dårligere karakterisert. De uttrykkes under fosterlivet og i forskjellige regioner av hjernen (Rang et al., 2003). Ang II utøver effekt via  $AT_1$ -reseptorer i rotte-hepatocytter (Bauer et al., 1991).

### *Noradrenalin*

NA er en transmitter som blant annet utøver vasokonstriktive effekter på det kardiovaskulære systemet. Det fins to hovedtyper av reseptorer for NA, henholdsvis  $\alpha$ - og  $\beta$ -adrenoseptorer.  $\alpha$ -adrenoseptorer deles inn i de to subgruppene  $\alpha_1$  og  $\alpha_2$  (hver av dem er

videre delt inn i tre subgrupper), mens  $\beta$ -adrenoseptorer deles inn i  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  og  $\beta_3$ . Alle tilhører reseptorgruppen GPCR.  $\alpha_1$ -adrenoseptorer aktiverer PLC,  $\alpha_2$ -adrenoseptorer hemmer AC, og  $\beta$ -adrenoseptorer stimulerer AC (Rang et al., 2003). NA utøver effekt via  $\alpha_1$ -adrenoseptorer og  $\beta$ -adrenoseptorer i rotte-hepatocytter (Refsnes et al., 1992, Christoffersen et al., 2000). Ved å hemme binding av NA til  $\beta$ -adrenoseptorer, er det de  $\alpha_1$ -adrenerge effektene av NA som er studert i denne oppgaven.

### *Prostaglandin E<sub>2</sub>*

PGE<sub>2</sub> er et prostanoid som blant annet er med på å regulere inflammatoriske responser. PGE<sub>2</sub> virker primært på EP-reseptorer, men kan også aktivere andre prostanoid-reseptorer, blant annet FP-reseptoren. EP-reseptorene er delt inn i fire subgrupper, henholdsvis EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> og EP<sub>4</sub>. EP<sub>2</sub>- og EP<sub>4</sub>-reseptorer er koblet til AC-signalveien. EP<sub>3</sub> hemmer AC. EP<sub>1</sub> øker intracellulært Ca<sup>2+</sup> via mekanismer som ikke er helt klarlagt. Alle subgruppene av EP-reseptorer er uttrykt i rotte-hepatocytter. I tillegg uttrykker de også FP-reseptorer. Vekststimulerende effekter av prostaglandiner i rotte-hepatocytter ser ut til å være mediert hovedsaklig via EP<sub>3</sub>-reseptorer, med et lite bidrag fra FP-reseptorer, som er G<sub>q</sub>-koblet (Meisdalen et al., 2007).

## 1.7 Hepatocytter fra rotte i primærkultur som cellemodell

Leveren er det eneste organet som kan regenerere hele sin celled masse etter skade. Under regenereringen erverver hepatocytterne endret evne til å respondere på forskjellige agonister (Jarvis et al., 1997). Flere egenskaper ved hepatocytter gjør dem til en verdifull cellemodell for studier av cellulær vekstkontroll. Hepatocytter uttrykker reseptorer og har intakte signaltransduksjonsmekanismer som gjør at de er i stand til å respondere på et bredt utvalg av hormoner. De har et høyt antall EGF-reseptorer sammenlignet med de fleste andre normale celler. De fleste andre *in vitro* cellemodeller består ofte av transformerte cellelinjer med begrenset evne til å respondere på ulike hormoner, og hepatocyttmodellen er derfor et nyttig supplement til disse modellene. Hepatocytter er unike celletyper i den forstand at de er høyt differensierte samtidig som de er i stand til å raskt gå inn i cellyklusen (Christoffersen et al., 2000).

---

I en normal lever er de fleste leverceller i hvilefasen  $G_0$  (Alberts et al., 2002b). Isolering og dyrking av hepatocytter overfører cellene til  $G_1$ -fasen i cellyklusen med påfølgende endringer i ekspresjonsnivået av diverse leverspesifikke proteiner, antakelig på grunn av disrupsjon av kontakten mellom cellene (Etienne et al., 1988, Christoffersen et al., 2000). Hepatocytene gjennomgår også fenotypiske endringer under dyrkingen som påvirker ekspresjonen av reseptorer og andre komponenter av signaltransduksjonsveier, og disse endringene fører ofte cellene mot dedifferensiering. I studier som utforsker molekylære mekanismer for vekstkontroll, tas det ofte i bruk definerte, relativt enkle dyrkningsbetingelser (slik som vi har gjort) som kan føre til at hepatocytter trekkes enda lenger vekk fra den fysiologiske situasjonen (Christoffersen et al., 2000). Dyrkingen fører også til en hurtig nedregulering av agonist-stimulert PLC-aktivitet (Sandnes et al., 1999). I tillegg blir ekspresjon og funksjon av  $\alpha_1$ - og  $\beta_2$ -adrenoseptorer henholdsvis nedsatt og økt slik at cellenes mottakelighet for inhibitorisk stimulus øker sent i  $G_1$ -fasen (Refsnes et al., 1992, Christoffersen et al., 2000).

## 1.8 Målene med oppgaven

Hovedmålet med oppgaven var å undersøke hvilke signalveier agonister som aktiverer  $G_q$ -proteinkoblede reseptorer bruker for å aktivere JNK. Det ble hovedsaklig fokusert på PLC-signalveien, og hvilken rolle  $Ca^{2+}$  og PKC spiller i aktivering av JNK med disse agonistene. En annen målsetning med oppgaven var å undersøke effekter av EGF på JNK-aktivitet.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Kjemikalier

- Dulbecco's modified Eagle's medium, penicillin og streptomycin var fra Gibco (Grand Island, NY, USA).
- William's medium E var fra Bio Whittaker (Walkersville, MD, USA).
- [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-adenosin trifosfat (ATP) (3000 Ci/mmol) var fra Amersham International (Buckinghamshire, UK) og senere fra PerkinElmer (Waltham, MA, USA). Rainbow Marker var også fra Amersham International (Buckinghamshire, UK).
- Ang II, PGE<sub>2</sub>, NA, VP, 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetat (TPA), 2-[1-(3-dimetylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)maleimid (GF109203X), ATP, dexametason, kollagen, etylenglycol-bis(beta-aminoetyleter)-N,N,N',N'-tetraeddiksyre (EGTA), benzamidin, leupeptin, pepstatin A, EGF, timolol,  $\beta$ -merkaptoetanol, natriumpyrofosfat, Ponceau S, Triton X-100, natriumdodecylsulfat (SDS), glycerol, dimetylsulfoksid (DMSO) og DL-dithiothreitol var fra Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).
- Thapsigargin, 1-[6-[[17 beta-3-metoksyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]heksyl]-1H-pyrrol-2,5-dionel (U73122), 1-[6-[[17 beta-3-metoksyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]heksyl]-2,5-pyrrolidin-dion (U73343), 1,2-bis(o-aminofenoksy)etan-N,N,N',N'-tetraeddiksyre (BAPTA-AM) og 1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminofenylthio)butadien (U0126) var fra Calbiochem (San Diego, CA, USA).
- Protein A sepharose (CL-4B) var fra Pharmacia Biotech. (Uppsala, Sverige).
- Ammoniumpersulfat (APS), N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED), Tween 20, geit-anti-kanin IgG (H+L)-HRP-konjugat og geit-anti-mus IgG (H+L)-HRP-konjugat var fra Bio-Rad (Hercules, CA, USA).
- SAPK/JNK polyklonalt kanin-antistoff og fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) monoklonalt mus-antistoff var fra Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).
- LumiGLO var fra Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) eller KPL (Gaithersburg, MD, USA).



- JNK1 (C-17) polyklonalt kanin-antistoff og c-Jun (79) fusjonsprotein var fra Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- Gefitinib var en gave fra AstraZeneca.
- Alle andre kjemikalier var av analytisk kvalitet.

## 2.2 Isolering og dyrking av hepatocytter

Rottene som ble brukt var Wistar hannrotter på 170-220 g som ble føret ad libitum.

Hepatocytterne ble isolert som beskrevet av Seglen (1976), men med noen modifikasjoner (Christoffersen et al., 1984). Cellenes viabilitet, målt som evnen til å ekskludere fargestoffet trypan-blått, var minst 95%. Cellene ble suspendert i medium bestående av en 1:1 blanding av William's E medium og Dulbecco's modified Eagle's medium tilsatt penicillin (100 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml), dexametason (25 nM), insulin (100 nM) og kollagen (3 µg/ml). Cellene ble sådd ut på 20 cm<sup>2</sup> Costar-plater med en celletetthet på 20.000 celler/cm<sup>2</sup>. Costar-platene ble plassert i inkubatorskap med en temperatur på 37 °C og gassinnhold på 95% luft og 5% CO<sub>2</sub>.

Cellene ble dyrket i 5 timer før de ble inkubert med forskjellige agens med mindre noe annet blir oppgitt. Basal JNK-aktivitet øker som følge av celleisoleringsprosessen, og studier utført ved dette laboratoriet har vist at denne økte basale aktiviteten har roet seg tilstrekkelig etter 5 timer (Sandnes et al., upublisert). I tillegg blir agonist-stimulert PLC-aktivitet nedregulert forholdsvis raskt ved dyrking av hepatocytter, men er til stede i tilstrekkelig grad 5 timer etter celleisolering (Sandnes et al., 1999, Melien et al., 2002). Etter 5 timer med dyrking av hepatocytter er det derfor optimale forhold for å undersøke effekt av PLC-aktivitet på JNK-aktivitet.

## 2.3 Høsting av celler til Western blotting

Hepatocytterne ble stimulert i varierende tid (jmfør figurtekstene) før reaksjonen ble stoppet ved at de ble skylt 2 ganger med 0,9% NaCl. Cellene ble tilsatt 345 µl 2 x Laemmlibuffer, skrapet til eppendorfrør og lysert ved koking av prøvene i 5 minutter. Koking med natriumdodecylsulfat (SDS) denaturerer proteinene i prøvene, og gir dem en uniform negativ

ladning ved at proteinene inngår bindinger med SDS. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C i opptil flere uker.

## 2.4 Høsting av celler til immunpresipitering og kinase-assay

Hepatocytterne ble stimulert i varierende tid (jamfør figurtekstene) før reaksjonen ble stoppet ved at de ble skylt 2 ganger med 0,9% NaCl. Cellene ble tilsatt 600 µl ekstraksjonsbuffer, skrapet til eppendorfrør og satt på is. Deretter ble de lysert ved opptrekk 6 ganger gjennom 27G (0.4 mm) sprøytespisser (på is). Cellelysaten ble sentrifugert ved 13.000 rpm i 10 minutter (4 °C) slik at store celleorganeller, rester av cellevegger og membraner sedimenterte, mens proteinene ble igjen i supernatanten. Supernatanten ble frosset ved -80 °C i 1-2 døgn.

## 2.5 Buffere og løsninger

Alle vandige løsninger ble laget med dobbeltdestillert vann, og fortynninger av de fleste agens ble gjort i 0,9% NaCl. Thapsigargin og TPA ble imidlertid løst i 50% DMSO i 0,9% NaCl, mens PGE<sub>2</sub> ble løst i 1% NaHCO<sub>3</sub>. Forøvrig var alt vannet som ble benyttet i forbindelse med utførelsen av metodene dobbeltdestillert.

### 2.5.1 Løsninger til støping av polyakrylamidgeler

**30% akrylamid/BIS** 100 ml:

Akrylamid..... 29 g

BIS..... 1 g

H<sub>2</sub>O..... ad 100 ml

Røres i minst 1 time til alt er løst før volumet justeres til 100 ml.

Filtreres gjennom Whatman nr. 1 filterpapir.

Oppbevares mørkt i kjøleskap. Holdbar i 1 måned.

**1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8** 100 ml:

TRIS..... 18.15 g

H<sub>2</sub>O..... ad 100 ml

pH justeres med konsentrert HCl.

**0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8** 100 ml:

TRIS..... 6 g

H<sub>2</sub>O..... ad 100 ml

pH justeres med konsentrert HCl.

**10% APS** 10%:

APS..... 100 mg

H<sub>2</sub>O..... 1 ml

---

<b>10% separasjonsgel (5 ml per gel)*</b>	<u>5 ml:</u>
H <sub>2</sub> O .....	2.0 ml
30% akrylamid/BIS .....	1.7 ml
1.5 M TRIS (pH 8.8).....	1.3 ml
10% SDS.....	50 µl
10% APS.....	50 µl
TEMED.....	2 µl

<b>12% separasjonsgel (5 ml per gel)*</b>	<u>5 ml:</u>
H <sub>2</sub> O .....	1.7 ml
30% akrylamid/BIS .....	2.0 ml
1.5 M TRIS (pH 8.8).....	1.3 ml
10% SDS.....	50 µl
10% APS.....	50 µl
TEMED.....	2 µl

<b>Stacking-gel (2.5 ml per gel)*</b>	<u>2.5 ml:</u>
30% akrylamid/BIS .....	325 µl
1.5 M TRIS (pH 6.8).....	625 µl
10% SDS.....	25 µl
10% APS.....	25 µl
H <sub>2</sub> O .....	1.5 ml
TEMED.....	2.5 µl

\*Løsninger tilsettes i oppsatt rekkefølge.

---

## 2.5.2 Buffere og løsninger til Western blotting

### 0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8

Som nevnt i Løsninger til støping av polyakrylamidgeler.

<b>Samplebuffer</b>	<u>85 ml:</u>
0.5 M TRIS/HCl pH 6.8.....	25 ml
Glycerol.....	20 ml
10% SDS.....	40 ml

### 2 x Laemmlibuffer (med 10 % $\beta$ -mercaptoetanol og 5% bromfenolblått)

Samplebuffer.....	1 ml
$\beta$ -merkaptetanol.....	100 $\mu$ l
Bromfenolblått.....	50 $\mu$ l

### 5 x elektroforesebuffer/5 x runningbuffer, pH 8,3

TRIS.....	30 g
Glycine.....	144 g
SDS.....	10 g
H <sub>2</sub> O.....	ad 1000 ml

pH justeres med konsentrert HCl. Oppbevares i kjøleskap.

<b>Elektroforesebuffer/runningbuffer</b>	<u>800 ml:</u>
5 x elektroforesebuffer.....	160 ml
H <sub>2</sub> O.....	640 ml

**10 x transferbuffer/10 x Towbinbuffer, pH 8,1-8,3**

0.25 M TRIS .....	30.3 g
1.92 M glycine .....	144 g
H <sub>2</sub> O .....	ad 1000 ml

pH skal ligge mellom 8.1 og 8.3. pH skal ikke justeres, kun sjekkes.

**Transferbuffer/Towbinbuffer** 1 liter:

10 x transferbuffer .....	100 ml
Metanol .....	100 ml
H <sub>2</sub> O .....	800 ml

**10 x TBS, pH 7,6** 1 liter:

TRIS .....	12.1 g
NaCl .....	58.4 g
H <sub>2</sub> O .....	ad 1000 ml

pH justeres med konsentrert HCl.

**TTBS** 1 liter:

10 x TBS .....	100 ml
H <sub>2</sub> O .....	900 ml
Tween 20 .....	500 µl

**BLOTTO** 5%:

Fettfri tørrmelk .....	5 g
TTBS .....	100 ml

### 2.5.3 Buffere og løsninger til immunpresipitering og kinase-assay

<b>Ekstraksjonsbuffer</b>	<u>25 ml:</u>	
(Kan oppbevares ved -20 °C i minst 2 dager.)		
20 mM TRIS-HCl pH 7.4.....	0.5 ml	stock 1 M
1% Triton X-100.....	0.25 ml	til slutt etter at alt er løst
10% glycerol.....	2.5 ml	til slutt etter at alt er løst
137 mM NaCl.....	1.14 ml	stock 3 M
2 mM EDTA.....	100 µl	stock 0.5 M
25 mM β-glycerofosfat (Sigma G 6376).....	135 mg	
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sigma S 6508).....	250 µl	stock 100 mM
2 mM natriumpyrofosfat (Sigma MW 446.1).....	22.30 mg	
10 µg/ml leupeptin.....	250 µl	stock 1 mg/ml
10 µg/ml pepstatin.....	250 µl	stock 1 mg/ml
1 mM benzamidin.....	250 µl	stock 100 mM
H <sub>2</sub> O.....	19.51 ml	
<b>Kinasebuffer</b>	<u>10 ml:</u>	
(Må lages ny hver dag.)		
25 mM Hepes pH 7.4.....	250 µl	stock 1 M
25 mM β-glycerofosfat.....	54 mg	
25 mM MgCl <sub>2</sub> .....	250 µl	stock 1 M
0.1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> .....	10 µl	stock 100 mM
2.1 mM Dithiothreitol (6.4 mg til 20 ml).....	3.2 mg	
H <sub>2</sub> O.....	9.5 ml	

**ATP-mix (10 µl\* per prøve)**Per 20 prøver:

(Må lages ny hver dag.)

c-Jun (1 µg per prøve).....	20 µl	
[γ- <sup>32</sup> P]-ATP (5 µCi per prøve).....	10 µl*	
1 mM ATP.....	16 µl	stock 12 mM
20 mM MgCl <sub>2</sub> .....	4 µl	stock 1 M
H <sub>2</sub> O.....	160 µl	

\*Volumet gjelder ved 100% aktivitet i isotopkilden. Volumet justeres etter gjenværende aktivitet.

**2 x Laemmlibuffer (med 10 % β-mercaptoetanol og 5% bromfenolblått)**

Som nevnt i Buffere og løsninger til Western blotting.

**Coomassie blue**1 liter:

(Brukes mange ganger.)

Coomassie blue R.....	2.48 g	
Metanol.....	456 ml	
Konsentrert eddiksyre.....	104 ml	rør til oppløst
H <sub>2</sub> O.....	440 ml	

Filtreres gjennom Whatman no. 1 filterpapir til slutt.

**Avfargingsvæske**1 liter:

14% eddiksyre.....	140 ml
10% metanol.....	100 ml
H <sub>2</sub> O.....	760 ml



## 2.6 Western blotting

### *Prinsipper*

Med Western blotting kan man detektere ett eller flere bestemte proteiner i en proteinblanding (for eksempel et cellelysat). De forskjellige proteinene appliseres på en gel, og separeres fra hverandre ved gelelektroforese på bakgrunn av proteinenes molekylvekt. Proteinene i gelen overføres til en passende membran (oftest nitrocellulose- eller polyvinylidenfluorid (PVDF)-membran) ved blotting (som for eksempel elektroblotting), og blir detektert ved bruk av antistoffer som er spesifikke for målprotein(ene) i form av en farge- eller lysreaksjon.

### *SDS polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)*

Det ble støpt polyakrylamidgeler bestående av en 10% separasjonsgel med en stacking-gel over. Stacking-gelen har større porer (på grunn av lavere konsentrasjon av akrylamid) og lavere pH enn separasjonsgelen. Disse betingelsene konsentrerer proteinene i prøvene i smale bånd før de kommer til separasjonsgelen, hvor de separeres, noe som gir skarpere bånd etter separeringen. 12,5 µl prøve (totalt cellelysat løst i 2 x Laemmlibuffer) ble tilsatt i alle brønnene i gelen, bortsett fra en av brønnene som ble tilsatt 3 µl standard (Rainbow Marker). Rainbow Marker er en kommersielt tilgjengelig blanding av proteiner med definerte molekylvekter som gir synlige, fargede bånd. Proteinene i gelen ble separert etter molekylvekt ved SDS-PAGE kjørt i elektroforesebuffer. Spenningen ble først stilt inn på 100 V i cirka 10 minutter, og deretter på 125 V for at elektroforesen skulle gå fortere til blåfargen i prøvene (som vandrer fortere enn proteinene) hadde vandret ned til bunnen av gelen.

### *Blotting*

De forskjellige komponentene i blottingoppsettet ble gjennomfuktet med transferbuffer, og lagt på blottingmodulen i følgende rekkefølge: Filterpapir – nitrocellulosemembran – gel – filterpapir. Det ble utført semi-tørr elektroblotting i 30-40 minutter for å overføre proteinene i gelen til nitrocellulosemembranen. Effektiviteten av proteinoverføringen ble sjekket ved farging av membranen med Ponceau S, som synliggjorde proteinene på membranen.

Membranen ble skylt godt med destillert vann for å fjerne mest mulig av fargen. Utstyr til SDS-PAGE og semi-tørr elektroblotting var fra Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

### ***Blokkering av membranen, og inkubering med antistoff***

Membranen ble behandlet med BLOTTO i 1 time (på vippebrett) for å blokkere ledige bindingssteder på membranen og dermed unngå uspesifikke bindinger mellom antistoff og membran. Deretter ble membranen inkubert med primært antistoff (fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) monoklonalt mus-antistoff) fortynnet 1:2000 i BLOTTO over natt (på vippebrett i kjølerom). Dette antistoffet binder seg spesifikt til p46 og p54 JNK fosforylert ved både Thr183 og Tyr185 (det vil si den aktiverte formen av JNK). Dagen etter ble membranen vasket 3 x 5 minutter med TTBS for å fjerne ubundet primært antistoff etterfulgt av inkubering med HRP-konjugert sekundært antistoff (geit-anti-mus IgG (H+L)-HRP-konjugat) i 1 time. Det sekundære antistoffet inngår bindinger med artsspesifikke områder på det primære antistoffet. Membranen ble vasket 3 x 5 minutter med TTBS igjen for å fjerne ubundet sekundært antistoff, og skylt med vann.

### ***Deteksjon***

Membranen ble inkubert med det kjemiluminiserende reagenset LumiGLO, som inneholder HRP-substratet luminol, i 1 minutt. HRP-katalysert oksidasjon av luminol fører via flere intermediater til dannelse av et produkt med samtidig avgivelse av kjemiluminisens, hvor lysstyrken er proporsjonal med mengde protein. Lyset ble detektert med et CCD-kamera som tok et digitalt bilde av membranen. Bildet ble analysert ved densitometri, som evaluerte den relative mengden av proteinfarging og kvantifiserte resultatene i form av optisk tetthet ved bruk av programvaren LabWorks. Instrumentet som ble brukt var Epi Chemi II Darkroom fra UVP Laboratory Products.

### ***”Stripping”***

Antistoffene festet til membranen ble fjernet ved ”stripping” ved at membranen ble lagt i 0.5 M NaOH i 2 minutter. Så ble membranen vasket 3 x 5 minutter med vann. Membranen ble deretter brukt til deteksjon av total JNK i prøvene på samme måte som beskrevet for dobbelfosforylert JNK (p-JNK). (De samme trinnene som nevnt i Blokkering av membranen, og inkubering med antistoff og Deteksjon ble utført igjen.) Det primære antistoffet var

---

SAPK/JNK polyklonalt kanin-antistoff, og det sekundære antistoffet var geit anti-kanin IgG (H+L)-HRP-konjugat. Hensikten var å undersøke om ”loadingen” av total JNK var jevn i alle prøvene.

## 2.7 Immunpresipitering og kinase-assay

### *Prinsipper*

Man kan utføre en antistoff-antigen-presipitasjon (immunpresipitering) for å isolere et spesifikt protein fra komplekse proteinblandinger som for eksempel et cellelysat. Hvis proteinet er en kinase, kan et kinase-assay av den isolerte kinasen utføres for å måle kinaseaktiviteten. Ved tilsetning av [<sup>32</sup>P]-ATP og substrat, kan kinasen fosforylere substratet med [<sup>32</sup>P] i varierende grad avhengig av kinasens aktivitetsnivå. Det fosforylerte substratet kan detekteres ved hjelp av autoradiografi, og mengden av [<sup>32</sup>P]-fosforylert substrat blir et mål på kinaseaktiviteten.

### *Preparering av protein A sepharose-anti-JNK1-kompleks*

40 mg protein A sepharose (frysetørret pulver) fikk svulle i 1 ml vann i 1-2 timer (på is), etterfulgt av vasking 2 ganger først med 1 ml vann og så med 1 ml ekstraksjonsbuffer. Det ble whirlmixet og sentrifugert ved 13.000 rpm i 1 minutt mellom hver vask. Det ble tilsatt ekstraksjonsbuffer til totalt 1 ml, og 8 µg antistoff (JNK1 (C-17) kanin-antistoff), og denne suspensjonen ble satt til inkubasjon over natt på kjølerom slik at det kunne dannes komplekser mellom anti-JNK1 og protein A sepharose-kuler.

### *Immunpresipitering*

Suspensjonen med protein A sepharose-anti-JNK1-kompleks ble vasket 2 ganger i 1 ml ekstraksjonsbuffer med påfølgende justering av volum med ekstraksjonsbuffer til totalt 400 µl. Det ble tatt ut 200 µl av hver prøve (totalt cellelysat løst i ekstraksjonsbuffer) i eppendorfrør, og 20 µl av suspensjonen med protein A sepharose-anti-JNK1-kompleks ble tilsatt per prøve (det ble whirlmixet mellom hvert uttak). Prøvene ble inkubert ved rotasjon i kjølerom i 1,5-2 timer for å presipitere JNK1 ut fra cellelysatet ved dannelse av bindinger

mellom anti-JNK1 og JNK1. Deretter ble prøvene vasket 2 ganger med henholdsvis 200  $\mu$ l ekstraksjonsbuffer og 200  $\mu$ l kinasebuffer, og supernatanten ble sugd av og kastet.

### *Kinase-assay*

ATP-mix ble tilsatt til hver prøve i en mengde som tilsvarte 1  $\mu$ g substrat (c-Jun (79) fusjonsprotein) og 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP per prøve. c-Jun og [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP skulle da være i overskudd i forhold til mengden JNK1 i prøvene. Prøvene ble satt på vannbad (30 °C) slik at JNK1 kunne fosforylere c-Jun med [ $^{32}$ P] (prøvene ble whirlmixet cirka hvert 10. minutt underveis). Reaksjonen ble stoppet etter 30 minutter ved å tilsette 10  $\mu$ l 2 x Laemmlibuffer, og prøvene ble whirlmixet og sentrifugert ved 13.000 rpm i 1 minutt. Prøvene ble deretter kokt på varmeblokk i 10 minutter for å bryte bindingene mellom JNK1 og protein A sepharose-anti-JNK1-komplekset.

### *Gelelektroforese*

Prøvene ble sentrifugert, og alt over pelleten bestående av protein A sepharose-anti-JNK1-komplekset ble applisert på en polyakrylamidgel bestående av en 12% separasjonsgel med en stacking-gel over (se Western blotting). En eller flere av brønnene i gelen ble tilsatt henholdsvis 5  $\mu$ l 2 x Laemmlibuffer og eventuelt blank prøve (hvor cellelysat ble byttet ut med ekstraksjonsbuffer) som en negativ kontroll. Proteinene i gelen ble separert ved gelelektroforese (kjørt i elektroforesebuffer) hvor spenningen først ble stilt inn på 100 V i cirka 10 minutter, og deretter på 125 V til blåfargen i prøvene hadde vandret ned til bunnen av gelen.

### *Klargjøring av gelen til deteksjon*

Gelen ble farget med Coomassie blue ved å først varme gelene i Coomassie blue med mikrobølgeovn stilt inn på 75% effekt i 1 minutt, og så legge den på vippebrett i 10 minutter ved romtemperatur. Gelen ble skylt i vann og deretter avfarget med avfargingsvæske på vippebrett i 10 minutter. Så ble gelen skylt i vann igjen, og lagt i ny avfargingsvæske på vippebrett over natt. Ved denne prosedyren ble proteinene på gelen synliggjort. Hele gelen ble først blå ved farging, og ved avfarging forble proteinbåndene blå mens resten av gelen ble blank igjen. Gelen ble tørket mellom cellofanflak i geltørkestativ i inkubatorrom i omtrent 2 timer. Cellofanflakene ble bløtgjort i 10% glycerol, og gelen ble krympet i en

blanding av 10% eddiksyre, 40% metanol og 2% glycerol i cirka 5 minutter før gelen kunne tørkes. Tørket gel ble lagt i en Packard Instantimager-maskin for elektronisk autoradiografi. [<sup>32</sup>P]-fosforylert c-Jun ble også detektert ved sverting av fotografisk film. Det ble tatt kopi av de synlige proteinene på gelen med kopimaskin.

## 2.8 Beregninger og statistisk analyse

Alle forsøk ble utført med to replikater applisert på hver sin gel, og de fleste forsøkene ble gjentatt minst 3 ganger. Det ble beregnet gjennomsnitt av verdiene av de parallelle prøvene som fremkom ved kvantifisering av båndene på gelene hvis ikke noe annet blir oppgitt. Disse gjennomsnittsverdiene ble omregnet til % av kontroll (jamfør figurtekster), og %-verdiene ble benyttet videre ved sammenslåing av forsøk for å framstille resultatene grafisk. De sammenslåtte resultatene ble analysert for statistisk signifikans ved bruk av enten paret tosidig Student's t-test eller enveis variansanalyse (se figurtekster). En p-verdi på  $< 0,05$  ble ansett som signifikant.

## 3. Resultater

Resultatene ble analysert for statistisk signifikans ved bruk av enten paret tosidig Student's t-test eller enveis variansanalyse. Disse testene resulterte stort sett i ikke-signifikante forskjeller (se Diskusjon), og de få signifikante forskjellene vil derfor bli nevnt kun i relevante figurtekster.

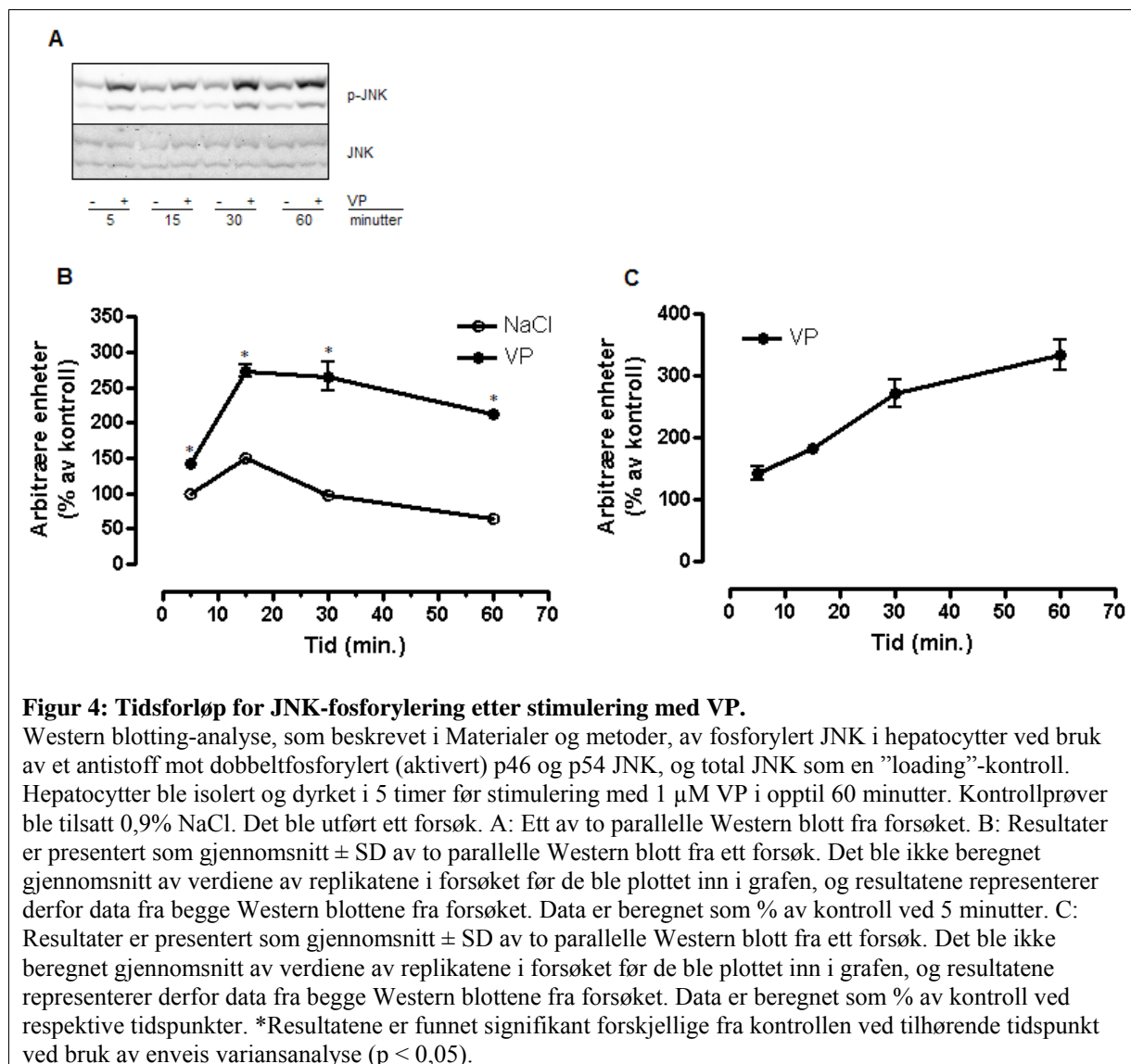
### 3.1 JNK-aktivering bestemt ved Western blotting

Antistoff detekterer dobbelfosforylert JNK, som er den aktiverte formen. Fosforylert JNK blir dermed et mål på aktivert JNK.

#### 3.1.1 Optimal inkuberingstid med VP

Aktivering av JNK i dyrkede hepatocytter med agonister som aktiverer  $G_q$ -proteinkoblede reseptorer, er tidligere ikke undersøkt i detalj. Tidligere forsøk ved dette laboratoriet viste at VP induerte JNK-fosforylering i dyrkede hepatocytter i opptil 5 timer, og effekten var sterkest ved 30 og 60 minutter (Sandnes et al., upublisert). Vi begynte derfor med et tidskurve-forsøk med VP for å bekrefte tidligere resultater, og for å bestemme optimal inkuberingstid med VP med tanke på å få høyest mulig VP-indusert JNK-fosforylering.

Som vist i figur 4A og B, var fosforylering av JNK synlig etter 5 minutter med stimulering, og økte fram til 15 minutter. Etter 30 minutter ble effekten gradvis svakere fram til 60 minutter. Den basale fosforyleringen av JNK hadde også en svak økning fram til 15 minutter, for deretter å gradvis synke fram til 60 minutter hvor den var lavere enn ved 5 minutter. Den prosentvise effekten av VP sammenlignet med kontrollen ved tilhørende tidspunkt, derimot, økte hele veien fram til 60 minutter, og var på cirka 325 % av kontrollen ved dette tidspunktet (figur 4C). Disse resultatene bekreftet tidligere funn, og 1 time ble derfor valgt som inkuberingstid med VP for videre forsøk.

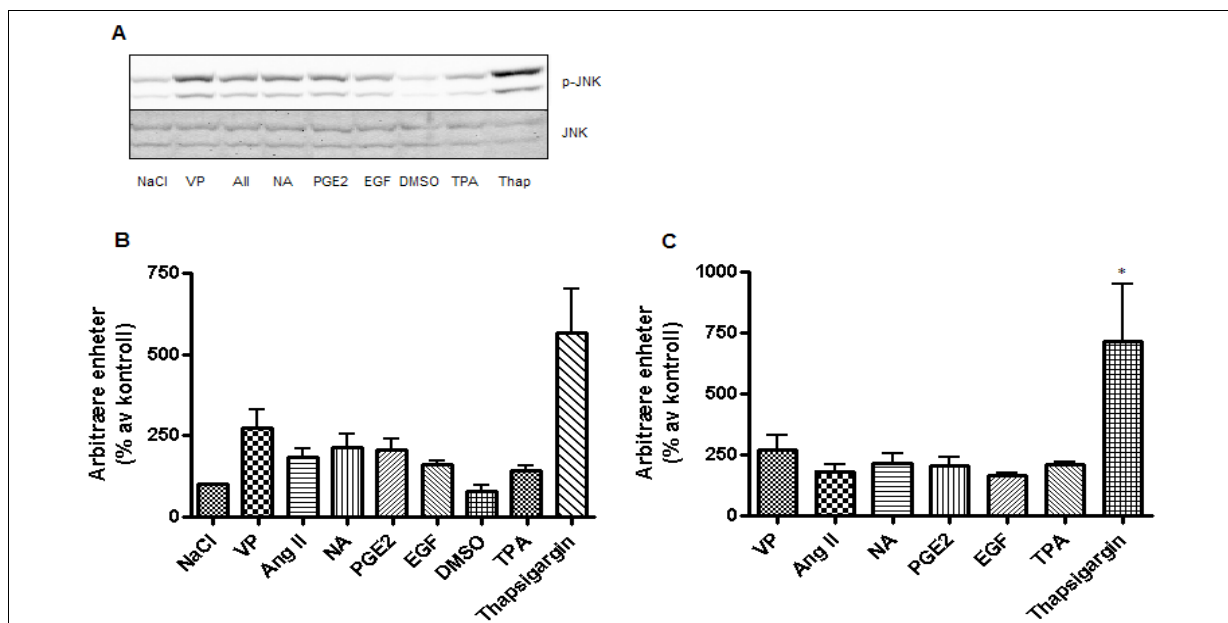


### 3.1.2 Effekt av agonister som aktiverer $G_q$ -proteinkoblede reseptorer på JNK-fosforylering

VP, Ang II, NA og  $PGE_2$  er eksempler på agonister som aktiverer  $G_q$ -proteinkoblede reseptorer i hepatocytter (Dajani et al., 1996). Hepatocytter er mest responsive for de vekstfremmende effektene av disse agonistene tidlig i  $G_1$ -fasen av celledyklusen, det vil si 0-10 timer etter utsæd (Christoffersen et al., 2000). Agonistene stimulerer DNA-syntese i hepatocytter i ulik grad. NA og  $PGE_2$  stimulerer DNA-syntese i mye større grad enn VP og Ang II, samtidig som NA og  $PGE_2$  er de svakeste aktivatorene av  $IP_3$ -akkumulering, med så og si ingen effekt på  $IP_3$ -akkumulering 5 timer etter utsæd (Dajani et al., 1996, Sandnes et al., 1999, Meisdalen et al., 2007). Vi undersøkte effekten av disse agonistene på JNK-

fosforylering for å se om noen av de andre agonistene ga en signifikant sterkere effekt enn VP og dermed kunne være bedre egnet som ”modells substans” for agonister som aktiverer  $G_q$ -proteinkoblede reseptorer i videre forsøk.

Alle agonistene førte til økt fosforylering av JNK sammenlignet med respektive kontrollen (figur 5). Den VP-induserte JNK-fosforyleringen var sterkest med en gjennomsnittlig 2,5-3 ganger økning sammenlignet med kontrollen. Resten av agonistene førte til sammenlignbare økninger av JNK-fosforylering, rundt 2 ganger kontrollen. Siden VP ga sterkest effekt blant agonistene for  $G_q$ -proteinkoblede reseptorer som ble undersøkt, ble den valgt som ”modells substans” for påfølgende forsøk.



**Figur 5: Effekt av agonister som aktiverer  $G_q$ -proteinkoblede reseptorer, og av TPA, thapsigargin og EGF, på fosforylering av JNK.**

Western blotting-analyse av fosforylert JNK (se teksten til figur 4). Hepatocytter ble isolert og dyrket i 5 timer før stimulering med 1  $\mu$ M VP, 1  $\mu$ M Ang II, 50  $\mu$ M NA, 100  $\mu$ M PGE<sub>2</sub>, 10<sup>-8</sup> M EGF, 1  $\mu$ M TPA eller 1  $\mu$ M thapsigargin i 1 time. Kontrollprøver ble tilsatt 0,9% NaCl for VP, Ang II, PGE<sub>2</sub> og EGF, og 50% DMSO i 0,9% NaCl (endelig konsentrasjon 0,5%) for TPA og thapsigargin. Hepatocytene som ble stimulert med NA ble preinkubert med 10  $\mu$ M timolol i 15 minutter for å hemme aktivering av  $\beta$ -adrenoseptorer. Som kontroll ble enten en kontrollprøve (tilsatt 0,9% NaCl) eller alle prøvene, unntatt prøver som ble stimulert med TPA eller thapsigargin, preinkubert med 10  $\mu$ M timolol i 15 minutter. Det ble utført opptil fire forsøk med de enkelte agens. VP og TPA ble tilsatt i to forsøk, EGF og thapsigargin ble tilsatt i tre forsøk, og resten av agonistene ble tilsatt i alle fire forsøkene. A: Ett av to parallelle Western blott fra det eneste forsøket som inkluderte alle agens. B: Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SD av opptil fire uavhengige forsøk. Data er beregnet som % av kontrollen som ble tilsatt NaCl. C: Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SD av opptil fire uavhengige forsøk. Data er beregnet som % av respektive kontrollen. \*Resultatene er funnet signifikant forskjellige fra NaCl-kontrollen ved bruk av enveis variansanalyse ( $p < 0,001$ ).



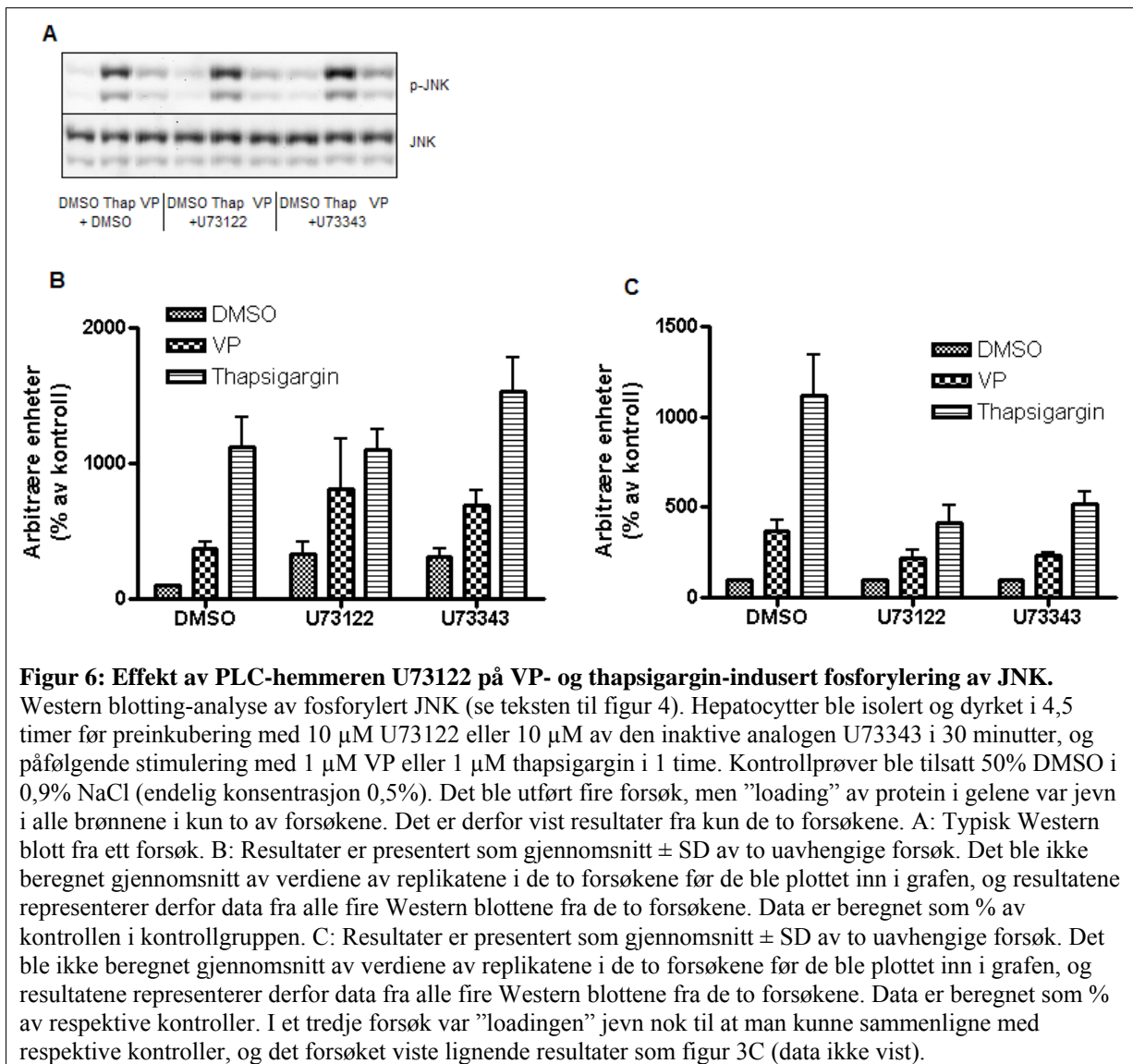
### 3.1.3 Betydning av PLC-signalveien for aktivering av JNK

Agonister som aktiverer G<sub>q</sub>-proteinkoblede reseptorer i hepatocytter fører til aktivering av PLC og nedstrøms økning av intracellulært Ca<sup>2+</sup> og aktivering av PKC, og det er tidligere vist at disse agonistene stimulerer ERK via mekanismer som involverer Ca<sup>2+</sup> og PKC (Dajani et al., 1999, Melien et al., 2002). Vi ville derfor undersøke om disse agonistene stimulerer JNK via de samme mekanismene. Vi undersøkte effekten av PLC ved bruk av PLC-hemmeren U73122 (Bleasdale et al., 1990). U73343, som er en inaktiv analog, ble tatt med som en negativ kontroll.

#### *Effekt av PLC-hemmer på VP- og thapsigargin-indusert fosforylering av JNK*

U73122 er et aminosteroid som er rapportert å være en spesifikk hemmer av PLC, og har blitt et viktig verktøy i å undersøke forbindelsen mellom PLC-aktivering og cellulær Ca<sup>2+</sup>-signalering (Bleasdale et al., 1990, Mogami et al., 1997).

Både den basale og VP-induserte JNK-fosforyleringen økte etter preinkubering med U73122, mens den thapsigargin-induserte JNK-fosforyleringen forble uendret (figur 6A og B). Den prosentvise effekten av både VP og thapsigargin, sammenlignet med respektive kontroller, ble derimot hemmet, hvorav sistnevnte ble hemmet i større grad (figur 6C). U73343 førte til en lignende effekt på VP- og thapsigargin-indusert JNK-fosforylering som U73122 (figur 6). Effekten på IP<sub>3</sub>-akkumulering var imidlertid som forventet (Sandnes, upublisert). Dette tydet på en uspesifikk effekt av de to analogene, og resultatene fra disse forsøkene var derfor vanskelige å tolke. Vi gikk derfor videre med å se nærmere på direkte påvirkning av PKC og Ca<sup>2+</sup>.



### 3.1.4 Betydning av $\text{Ca}^{2+}$ og PKC for aktivering av JNK

Som et ledd i undersøkelsen av om økning i intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  eller aktivering av PKC medierte effekten av GPCR-agonistene, ble effekten av TPA og thapsigargin undersøkt. TPA er en forbolester som aktiverer PKC, og thapsigargin øker intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ . I tillegg undersøkte vi effekten av PKC og  $\text{Ca}^{2+}$  ved bruk av EGTA, BAPTA-AM og GF109203X. EGTA og BAPTA-AM chelaterer henholdsvis ekstracellulært og intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ . Effekten av EGTA og BAPTA-AM på thapsigargin-stimulert JNK-aktivitet ble tatt med som en positiv kontroll. GF109203X er en PKC-hemmer. Effekten av GF109203X på TPA-stimulert JNK-aktivitet ble tatt med som en positiv kontroll.

### *Effekt av TPA og thapsigargin på JNK-fosforylering*

Effekten av DAG kan bli imitert ved bruk av TPA, som er et planteprodukt som fører til en direkte aktivering av PKC ved å binde seg til kinasen. Effekten av hormonstimulert IP<sub>3</sub>-indusert økning i intracellulært Ca<sup>2+</sup> kan etterlignes ved bruk av blant annet thapsigargin, som fører til en økning i intracellulært Ca<sup>2+</sup> ved å hemme SERCA-pumpen (Lytton et al., 1991, Alberts et al., 2002a).

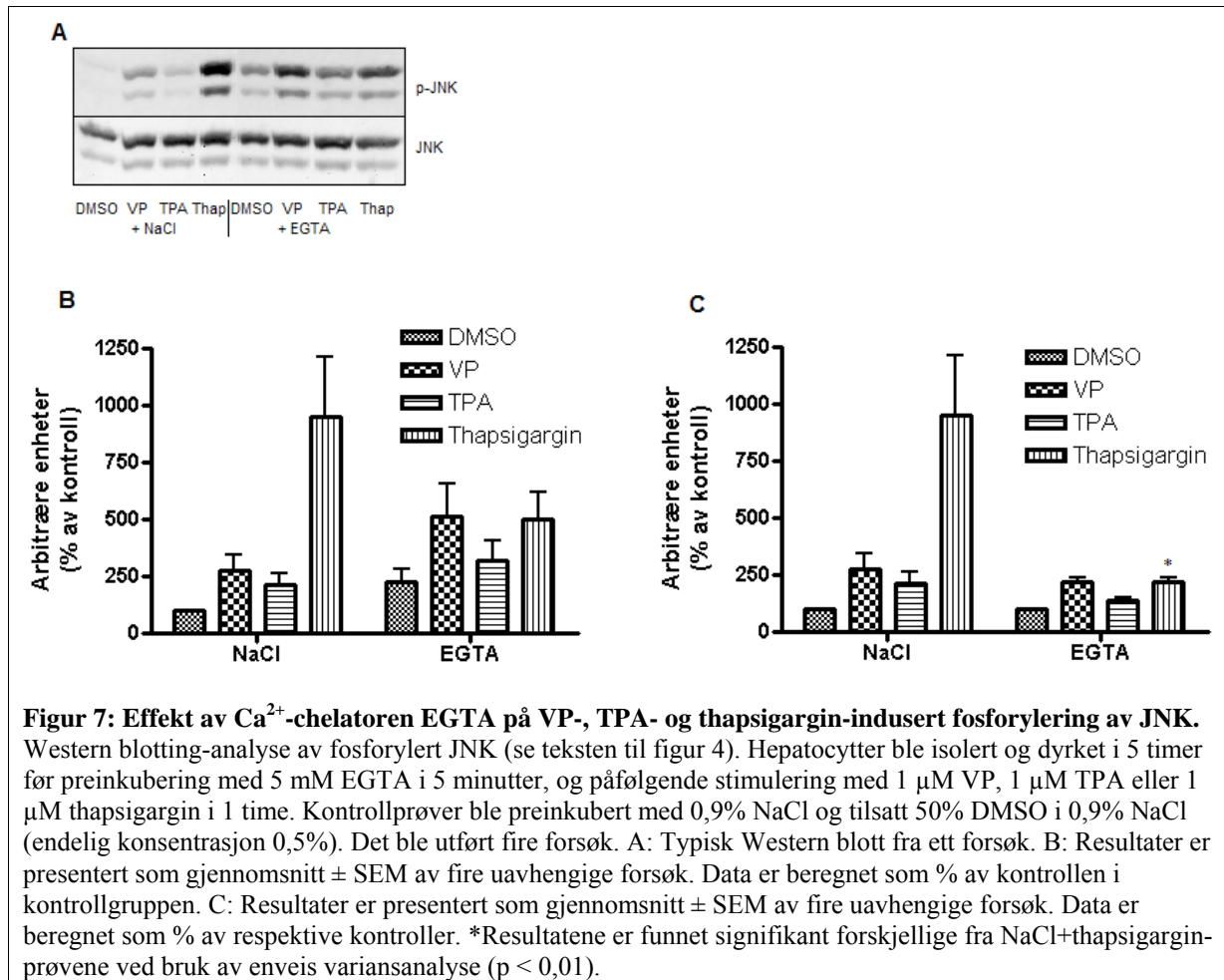
Thapsigargin førte til kraftigst fosforylering av JNK med en økning på cirka 5,5-8,5 i forhold til kontrollen. TPA førte til en lignende økning som Ang II, NA og PGE<sub>2</sub> som var på rundt 2 ganger kontrollen (figur 5).

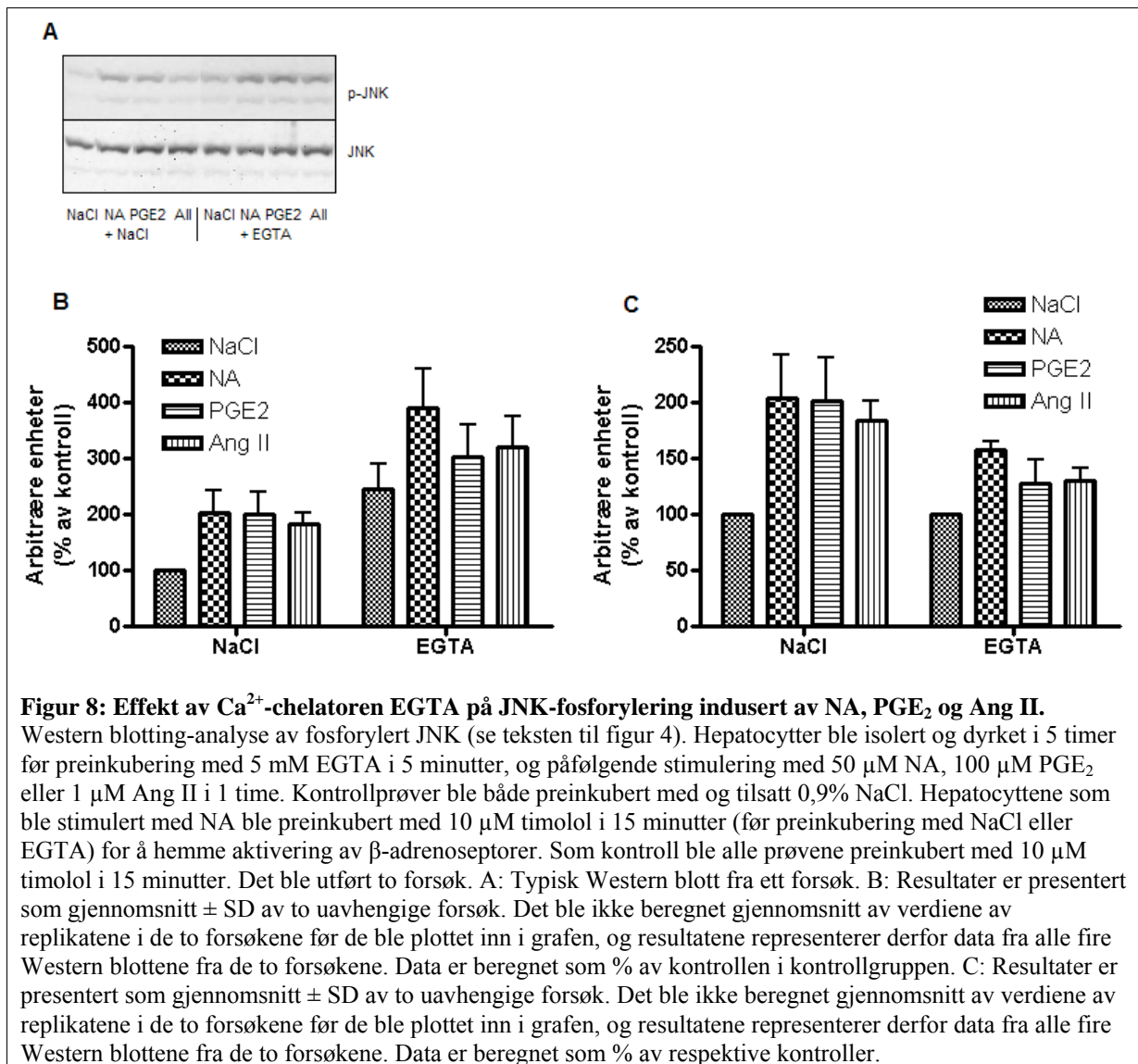
Den sterke effekten av thapsigargin, som øker det intracellulære Ca<sup>2+</sup>-nivået, tyder på at Ca<sup>2+</sup>-signalet er av betydning for fosforylering av JNK. Aktivering av PKC med TPA hadde også en viss effekt, men den var mye svakere enn thapsigargin-effekten, og PKC ser derfor ut til å være av mindre betydning i denne sammenheng.

### *Effekt av EGTA på agonist-, TPA- og thapsigargin-indusert fosforylering av JNK*

EGTA chelaterer ekstracellulært Ca<sup>2+</sup>. Ved frigjøring av Ca<sup>2+</sup> fra intracellulære lagre vil det i de fleste celler sekundært skje en influks av Ca<sup>2+</sup>, som vil bli hemmet av EGTA. Ved langvarig eksponering for EGTA vil dessuten intracellulære Ca<sup>2+</sup>-lagre gradvis tømmes (Bánhegyi et al., 1993).

EGTA økte både basal, agonist-stimulert og TPA-indusert JNK-fosforylering, mens den thapsigargin-induserte JNK-fosforyleringen ble omtrent halvert (figur 7A og B og figur 8A og B). Den prosentvise effekten av TPA, NA, PGE<sub>2</sub> og Ang II, sammenlignet med respektive kontroller, ble derimot svakt hemmet, mens effekten av VP forble uendret (figur 7C og 8C). Den prosentvise effekten av thapsigargin ble kraftig hemmet (figur 7C). Disse resultatene tydet på at Ca<sup>2+</sup> medierer effekten av thapsigargin på JNK-aktivitet, men ikke synes å spille noen rolle for aktivering av JNK med agonister som aktiverer G<sub>q</sub>-proteinkoblede reseptorer.

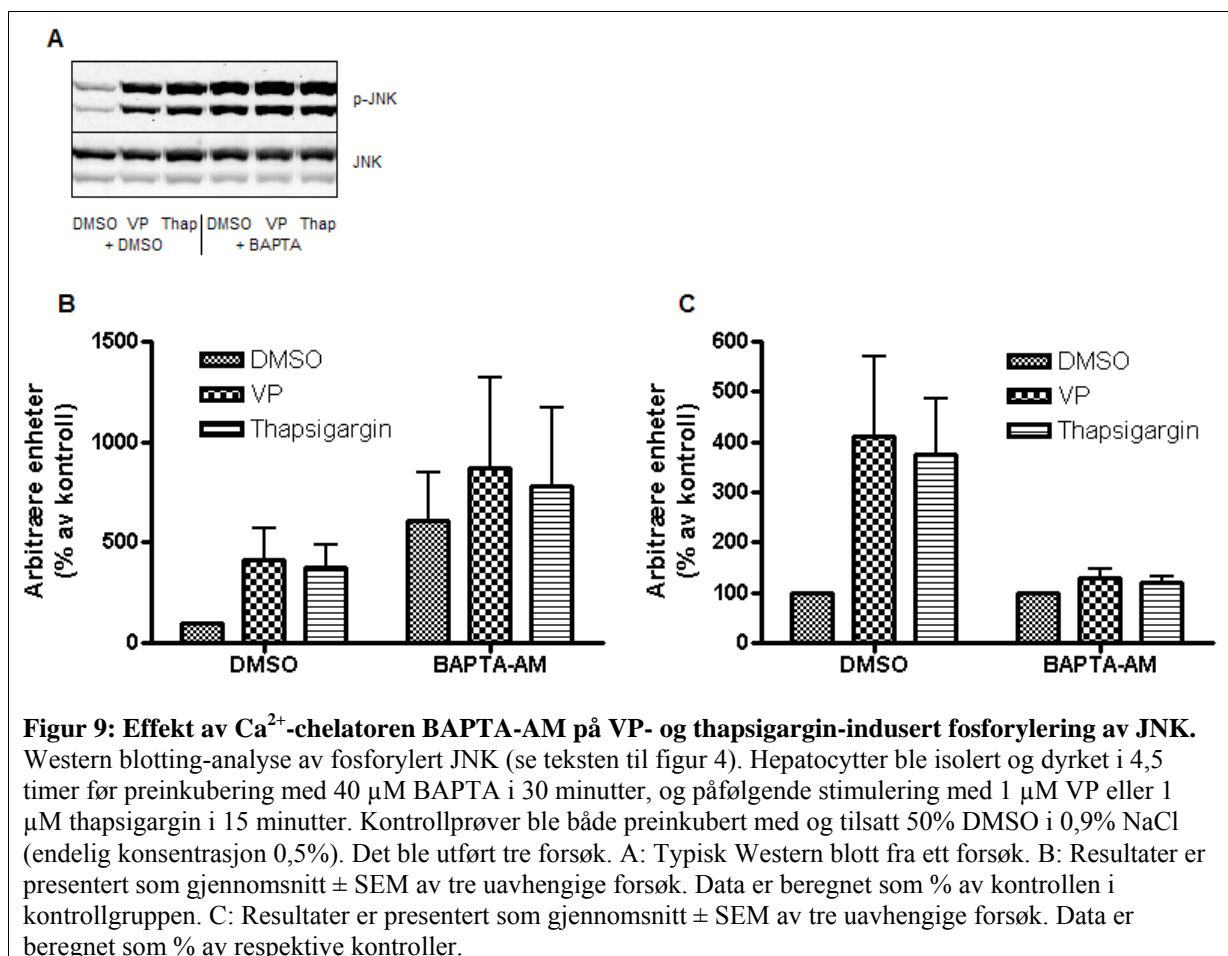




## Effekt av BAPTA-AM på VP- og thapsigargin-indusert fosforylering av JNK

BAPTA-AM chelaterer intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  og benyttes ofte for å undersøke i hvilken grad frigjøring av  $\text{Ca}^{2+}$  fra intracellulære lagre er involvert i ulike cellulære prosesser (Maloney et al., 1999).

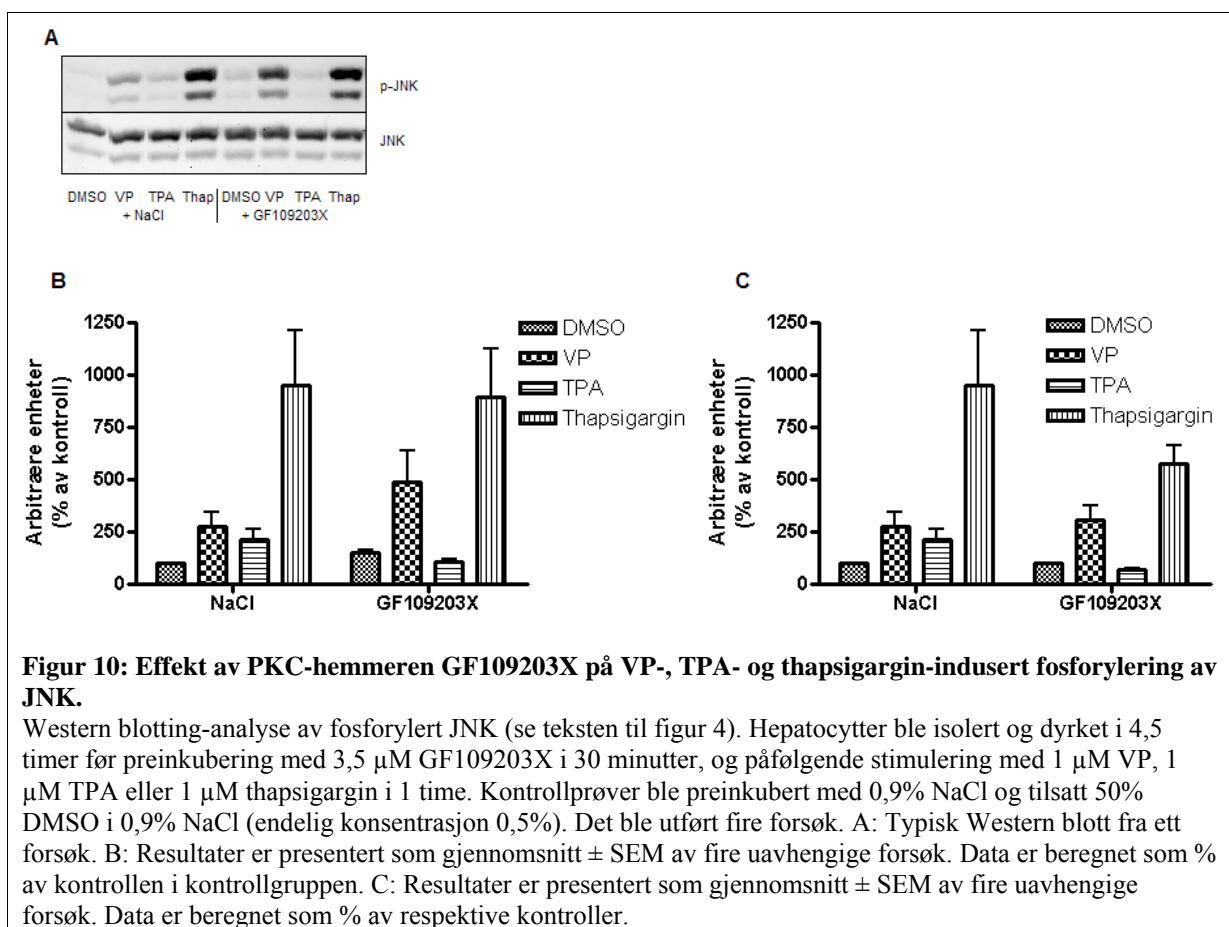
BAPTA-AM førte til en kraftig økning i basal JNK-fosforylering i det første forsøket, og inkuberingstiden ble derfor redusert til 15 minutter i påfølgende parallelle forsøk. BAPTA-AM økte både basal, VP- og thapsigargin-indusert JNK-fosforylering (figur 9A og B). Den prosentvise effekten av VP og thapsigargin, sammenlignet med respektive kontroller, ble derimot nesten fullstendig hemmet (figur 9C). Den kraftige økningen i basal JNK-fosforylering tydet imidlertid på en uspesifikk effekt av BAPTA-AM, og det var derfor vanskelig å tolke disse resultatene.



## Effekt av PKC-hemmer på VP-, TPA- og thapsigargin-indusert fosforylering av JNK

GF109203X, et lite, cellepermeabelt molekyl, er en potent hemmer av  $\alpha$ -,  $\beta$ - og  $\gamma$ -isoformer av PKC som konkurrerer om det ATP-bindende setet på PKC. GF109203X er blitt brukt i mange studier for å studere betydningen av PKC i regulering av forskjellige cellulære prosesser (Alessi, 1997).

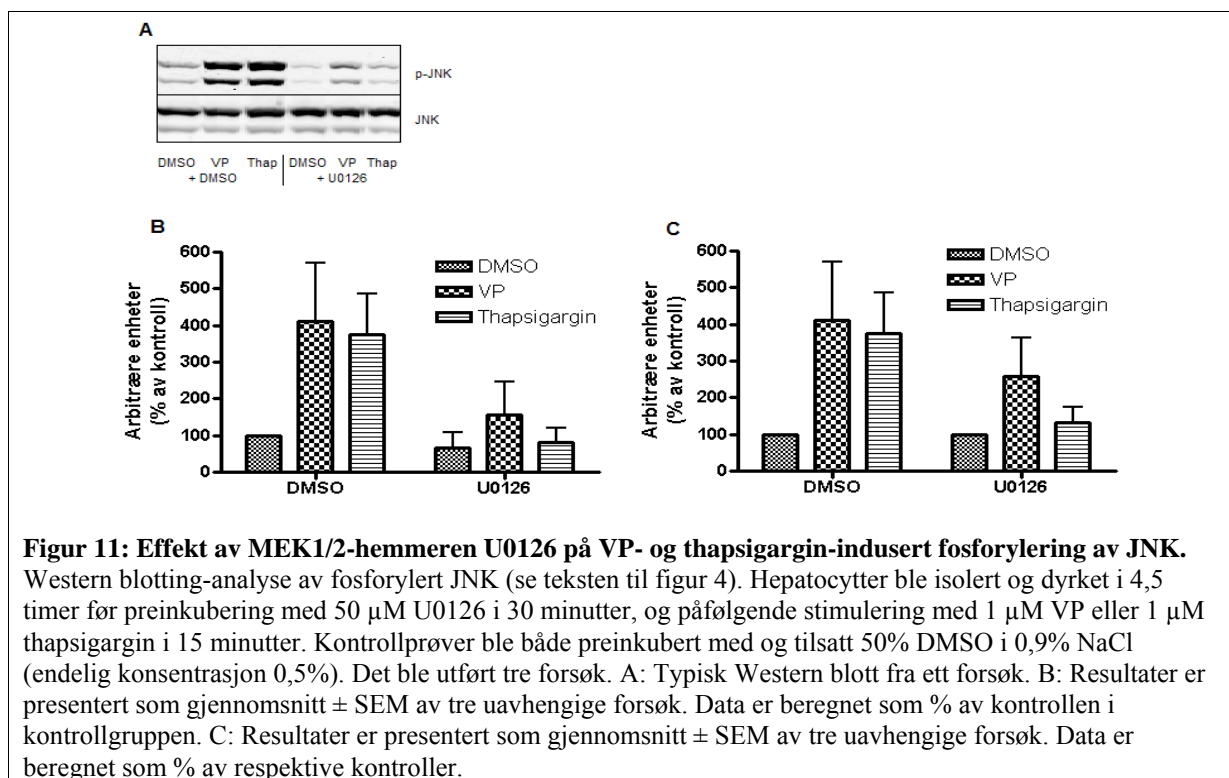
GF109203X førte til noe økt basal JNK-fosforylering. VP-indusert JNK-fosforylering ble noe økt, mens TPA-indusert JNK-fosforylering ble redusert til basalnivået. Thapsigargin-indusert JNK-fosforylering forble uendret (figur 10A og B). Den prosentvise effekten av VP, sammenlignet med respektiv kontroll, forble uendret. Den prosentvise effekten av thapsigargin ble betydelig hemmet, mens effekten av TPA ble fullstendig hemmet (figur 10C). Disse resultatene tydet på at JNK-aktivering med agonister som aktiverer  $G_q$ -proteinkoblede reseptorer er PKC-uavhengig.



## Effekt av MEK-hemmer på VP- og thapsigargin-indusert fosforylering av JNK

PKC aktiverer Raf-MEK1/2/ERK-signalveien i hepatocytter (Dajani et al., 1999). Ved bruk av U0126, en hemmer av MEK1/2 (Favata et al., 1998), kan PKC-indusert aktivering av ERK hemmes. Det er tidligere foreslått at agonist-indusert PKC-aktivering via aktivering av ERK i hepatocytterne utøver en hemmende effekt på JNK-aktiveringen, som oppheves av PKC- eller ERK-hemming (Jarvis et al., 1997). Vi fant det derfor av interesse å undersøke hvordan MEK-hemmeren U0126 påvirket JNK-fosforylering.

Hepatocytterne ble stimulert i 15 minutter istedenfor 1 time fordi effekten av U0126 ble undersøkt i samme forsøk som effekten av BAPTA-AM. U0126 førte til en klar hemming av VP-indusert JNK-fosforylering, mens thapsigargin-indusert JNK-fosforylering ble fullstendig hemmet (figur 11A og B). Den basale JNK-fosforyleringen ble imidlertid også svakt hemmet (figur 11A og B), og den prosentvise effekten av VP- og thapsigargin-indusert JNK-fosforylering, sammenlignet med respektive kontroller, ble derfor hemmet i noe mindre grad (figur 11C). Disse resultatene var uventet (se Diskusjon).





### 3.1.5 EGF-indusert fosforylering av JNK

EGF aktiverer EGFR og induserer JNK-aktivitet i hepatocytter (Christoffersen et al., 2000, Thoresen et al., 2003). Mekanismene bak EGFR-mediert JNK-aktivering er ikke så godt karakterisert (se Epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR)).

#### *Effekt av EGF på JNK-fosforylering sammenlignet med effekt av GPCR-agonistene*

Vi ville undersøke effekten av EGF fordi det i andre celletyper er rapportert at GPCR-agonister gir sterkere og mer vedvarende aktivering av JNK enn det vekstfaktorer gjør (Coso et al., 1995, Zohn et al., 1995).

EGF førte til en økning av JNK-fosforylering som var på rundt 160% av kontrollen. Til sammenligning førte Ang II, NA og PGE<sub>2</sub> til en økning på rundt 200% av kontrollen (figur 5). Effekten av EGF var ikke betydelig svakere enn effekten av GPCR-agonistene, og det som ble rapportert i andre celletyper så dermed ikke ut til å være tilfelle i hepatocytter. Disse resultatene ga derfor grunn til nærmere undersøkelser av effekten av EGF.

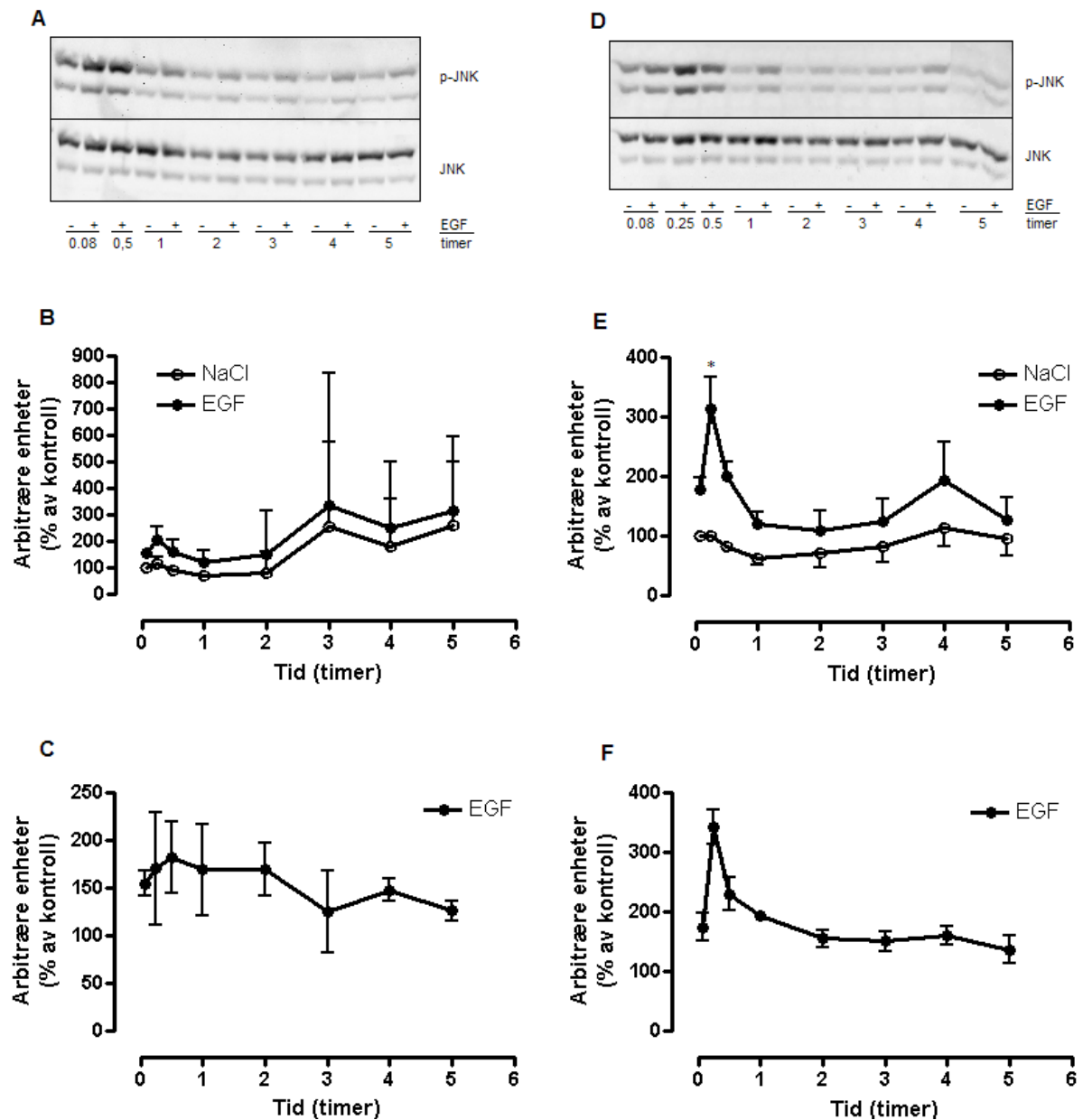
#### *Kortvarig og langvarig effekt av EGF på fosforylering av JNK*

Tidligere forsøk ved dette laboratoriet har sett på langtidseffekten av EGF på aktivering av ERK og p38 i dyrkede hepatocytter, og viste at EGF fører til en langvarig aktivering av ERK, mens aktivering av p38 er mer kortvarig (Thoresen et al., 2003). Langtidseffekten av EGF på aktivering av JNK ble ikke undersøkt, og vi så derfor nærmere på dette. Det ble utført 5 timers EGF-tidskurver både 5 og 24 timer etter utsæd av hepatocytene.

Figur 12A-C viser tidsforløpet for JNK-fosforyleringen i forsøkene som ble utført 5 timer etter utsæd. EGF førte til økt fosforylering av JNK gjennom hele forsøket. EGF-stimulert fosforylering av JNK var synlig etter 5 minutter med stimulering, og nådde en topp ved 15 minutter hvor effekten av EGF på JNK-fosforyleringen var på cirka 200% av kontrollen ved 5 minutter. Ved 3 timer nådde EGF-stimulert fosforylering av JNK en ny og høyere topp på omtrent 350% av kontrollen ved 5 minutter. Den basale aktiviteten fulgte en lignende kurve (figur 12B). Den prosentvise effekten av EGF på JNK-fosforylering sammenlignet med

kontrollen ved tilhørende tidspunkt, økte fram mot 15 minutter. Effekten var da på cirka 175%, og holdt seg rundt dette nivået fram til 2 timer før den avtok (figur 12C).

I forsøkene som ble utført 24 timer etter utsæd, førte EGF til økt fosforylering av JNK gjennom hele forsøket (figur 12D-F). EGF-stimulert fosforylering av JNK var synlig etter 5 minutter med stimulering, og toppet seg ved 15 minutter hvor effekten av EGF på fosforylering av JNK var på rundt 300% av kontrollen ved 5 minutter. En ny, lavere topp ble nådd ved 4 timer, og her var effekten av EGF på JNK-fosforylering på cirka 200% av kontrollen ved 5 minutter. Den basale JNK-fosforyleringen sank litt fram mot 1 time, og økte igjen mot startnivået utover forsøket (figur 12E). Den prosentvise effekten av EGF på JNK-fosforylering sammenlignet med kontrollen ved tilhørende tidspunkt, økte fram mot 15 minutter og nådde en topp på cirka 350%. Etter 15 minutter avtok effekten gradvis ut forsøket (figur 12F).



**Figur 12: Tidsforløp for JNK-fosforylering etter stimulering med EGF.**

Western blotting-analyse av fosforylert JNK (se teksten til figur 4). Hepatocytter ble isolert og dyrket i enten 5 eller 24 timer før stimulering med  $10^{-8}$  M EGF i henholdsvis 5, 15, og 30 minutter, og 1, 2, 3, 4 og 5 timer i alle forsøkene med unntak av ett av forsøkene som startet 5 timer etter utsæd. I dette forsøket ble hepatocytene stimulert med EGF i henholdsvis 5, 15, 30 og 60 minutter. Kontrollprøver ble tilsatt 0,9% NaCl. Det ble utført tre forsøk 5 timer etter utsæd og tre forsøk 24 timer etter utsæd. A: Typisk Western blott fra ett forsøk utført 5 timer etter utsæd. B: Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SD av tre uavhengige forsøk utført 5 timer etter utsæd. Det ble ikke beregnet gjennomsnitt av verdiene av replikatene i de tre forsøkene før de ble plottet inn i grafen, og resultatene representerer derfor data fra alle seks Western blottene fra de tre forsøkene. Data er beregnet som % av kontroll ved 5 minutter. C: Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SD av tre uavhengige forsøk utført 5 timer etter utsæd. Det ble ikke beregnet gjennomsnitt av verdiene av replikatene i de tre forsøkene før de ble plottet inn i grafen, og resultatene representerer derfor data fra alle seks Western blottene fra de tre forsøkene. Data er beregnet som % av kontroll ved respektive tidspunkter. D: Typisk Western blott fra ett forsøk utført 24 timer etter utsæd. E: Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk utført 24 timer etter utsæd. Data er beregnet som % av kontroll ved 5 minutter. F: Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk utført 24 timer etter utsæd. Data er beregnet som % av kontroll ved respektive tidspunkter. \*Resultatene er funnet signifikant forskjellige fra kontrollen ved tilhørende tidspunkt ved bruk av enveis variansanalyse ( $p < 0,001$ ).

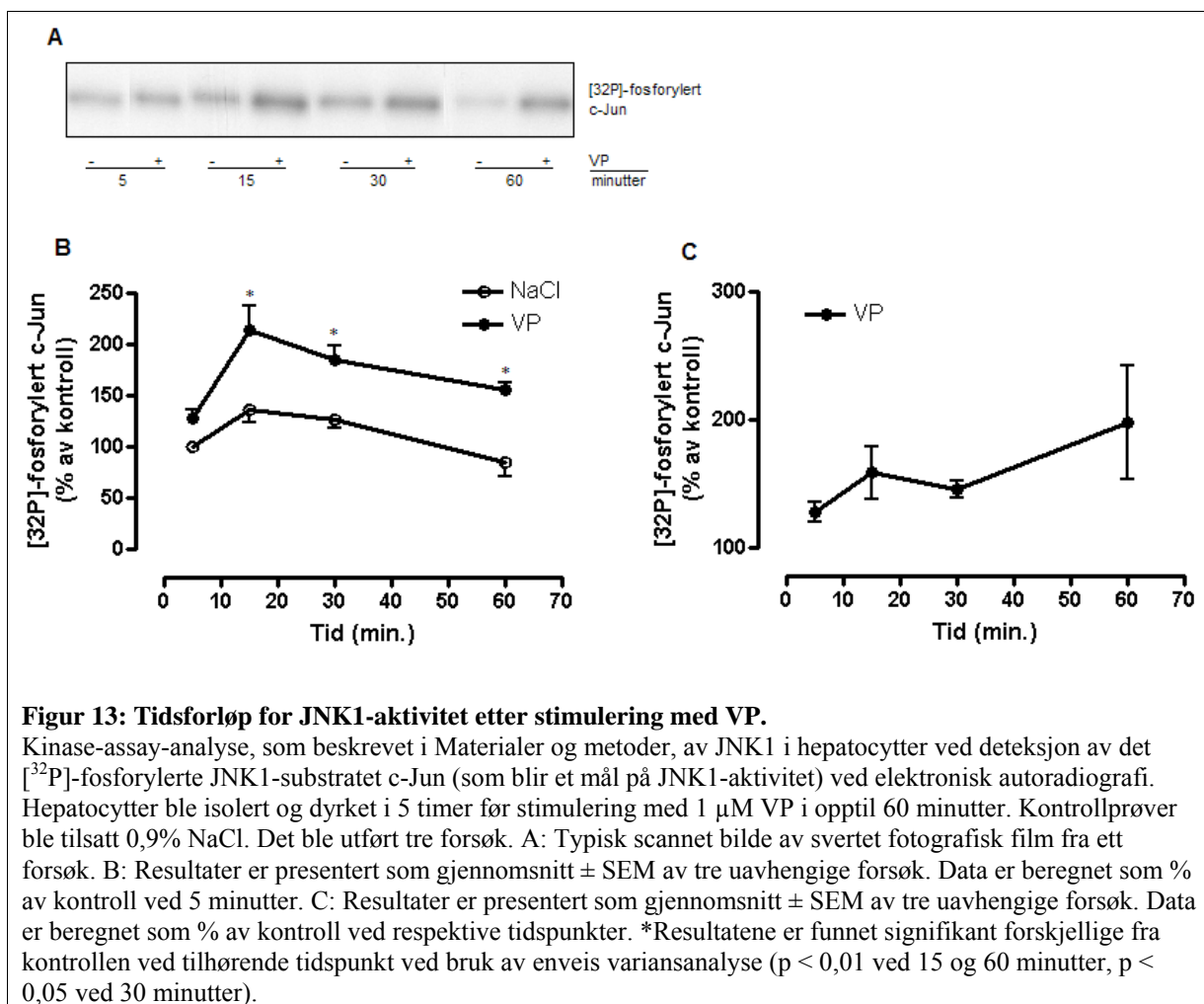
Resultatene viste at EGF har en langvarig effekt på JNK-fosforylering. Forsøkene som ble utført 5 timer etter utsæd, viste at den prosentvise effekten av EGF sammenlignet med kontrollen ved tilhørende tidspunkt var på opptil 1,5-2 ganger kontrollen. I forsøkene som ble utført 24 timer etter utsæd, var denne effekten høyere på sitt sterkeste og var på opptil 3-3,5 ganger kontrollen. 24-48 timer etter utsæd, når hepatocytter er i mellom/sen G<sub>1</sub>-fase av cellesyklusen, er de meget sensitive og høyst mottakelige for EGFR-mediert mitogen stimulering (Dajani et al., 1999, Thoresen et al., 2003). Resultatene mine er i samsvar med dette.

### 3.2 Måling av kinase-aktivitet ved immunpresipitering og kinase-assay

Utvalgte forsøk (eller deler av forsøk) utført ved Western blotting ble gjentatt med en annen metode, immunpresipitering og kinase-assay.

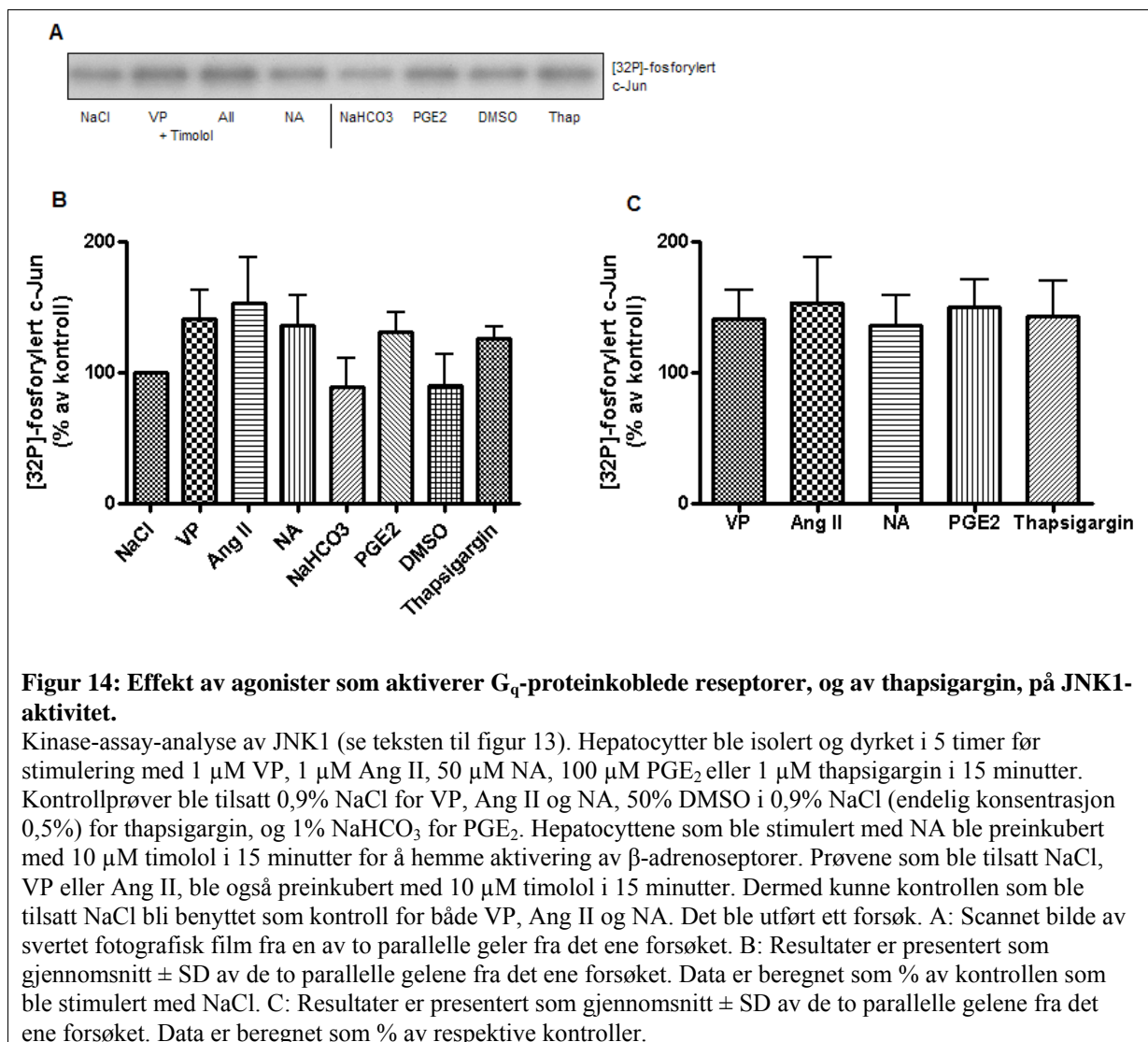
### 3.2.1 Optimal inkuberingstid med VP

VP førte til økt JNK-aktivitet gjennom hele forsøket (figur 13). Aktiviteten var synlig etter 5 minutter, og økte fram til 15 minutter, for så å avta gradvis utover. Den basale aktiviteten økte også noe fram til 15 minutter, for deretter å avta fram til 60 minutter til et nivå som var lavere enn startnivået (figur 13B). Den prosentvise effekten av VP derimot, sammenlignet med kontrollen ved tilhørende tidspunkt, økte fram til 15 minutter, avtok fram til 30 minutter, og økte så igjen til en høyere topp ved 60 minutter (figur 13C). Det var ikke stor forskjell mellom effekten av VP ved 15 og 60 minutter siden effekten ved sistnevnte tidspunkt var beheftet med stor spredning, og 15 minutter ble derfor valgt som inkuberingstid med VP for videre forsøk.



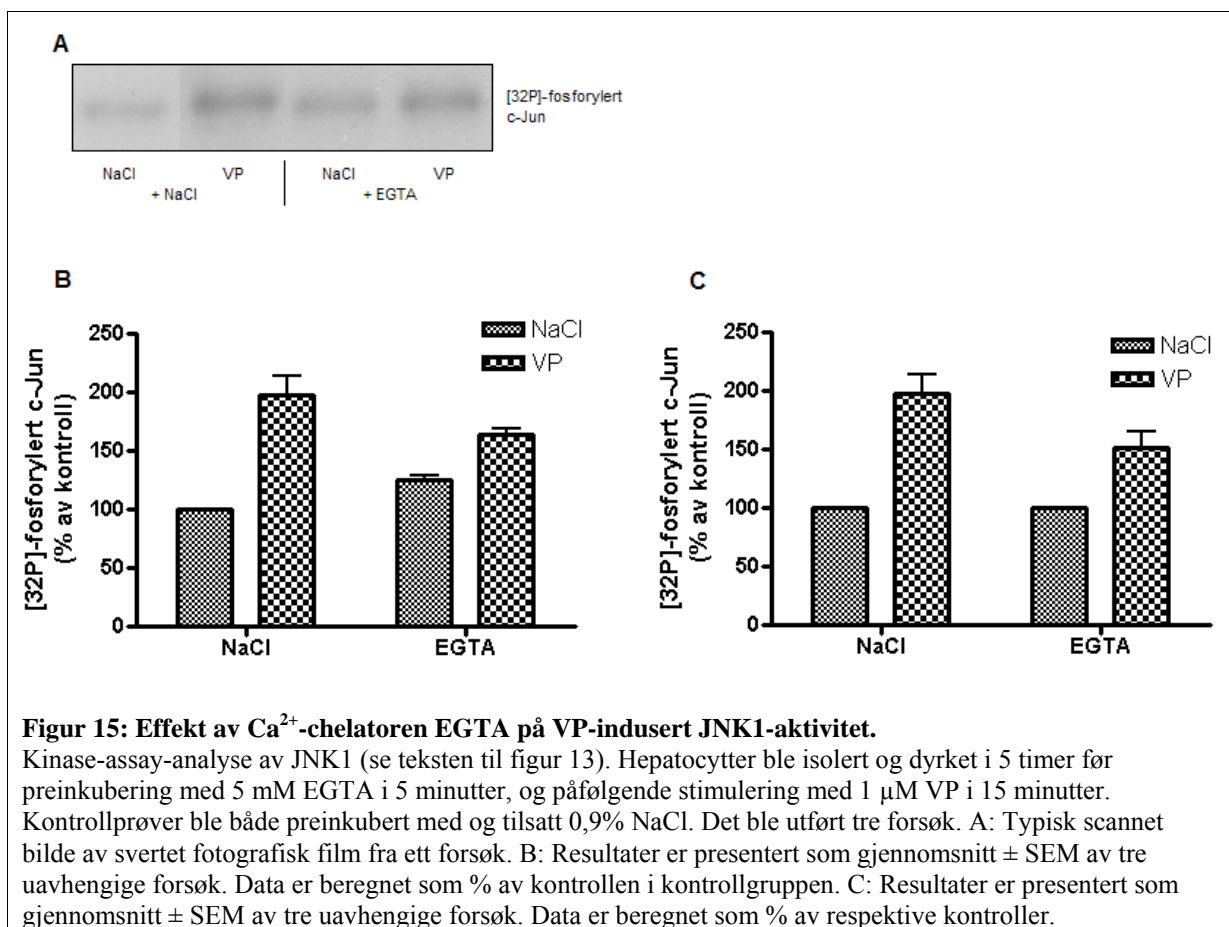
### 3.2.2 Effekt av agonister som aktiverer G<sub>q</sub>-proteinkoblede reseptorer, og av thapsigargin, på JNK-aktivitet

Det ble utført kun ett forsøk fordi det ikke var tid til flere forsøk på slutten av arbeidet med masteroppgaven. Både thapsigargin og alle agonistene førte til lignende økning i JNK-aktivitet (figur 14). Effekten av thapsigargin og VP var dermed lavere enn i Western blotting-forsøkene (se Diskusjon).



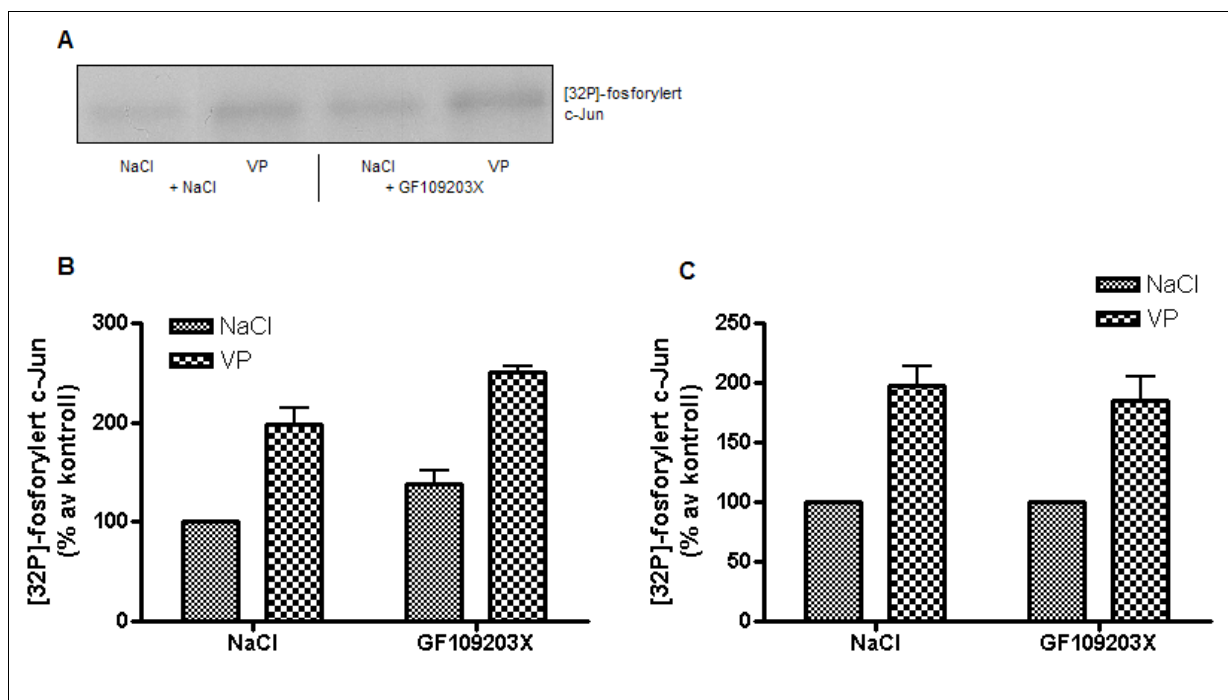
### 3.2.3 Effekt av EGTA på VP-indusert JNK-aktivitet

EGTA førte til en svak hemming av VP-indusert aktivering av JNK (figur 15), mens den basale JNK-aktiviteten økte i svak grad (figur 15A og B). Sett i sammenheng med resultatene fra Western blotting, hvor VP-indusert aktivering av JNK ikke ble hemmet med EGTA, tyder disse resultatene på at  $\text{Ca}^{2+}$  ikke ser ut til å være involvert i VP-indusert aktivering av JNK.



### 3.2.4 Effekt av PKC-hemmer på VP- og TPA-indusert JNK-aktivitet

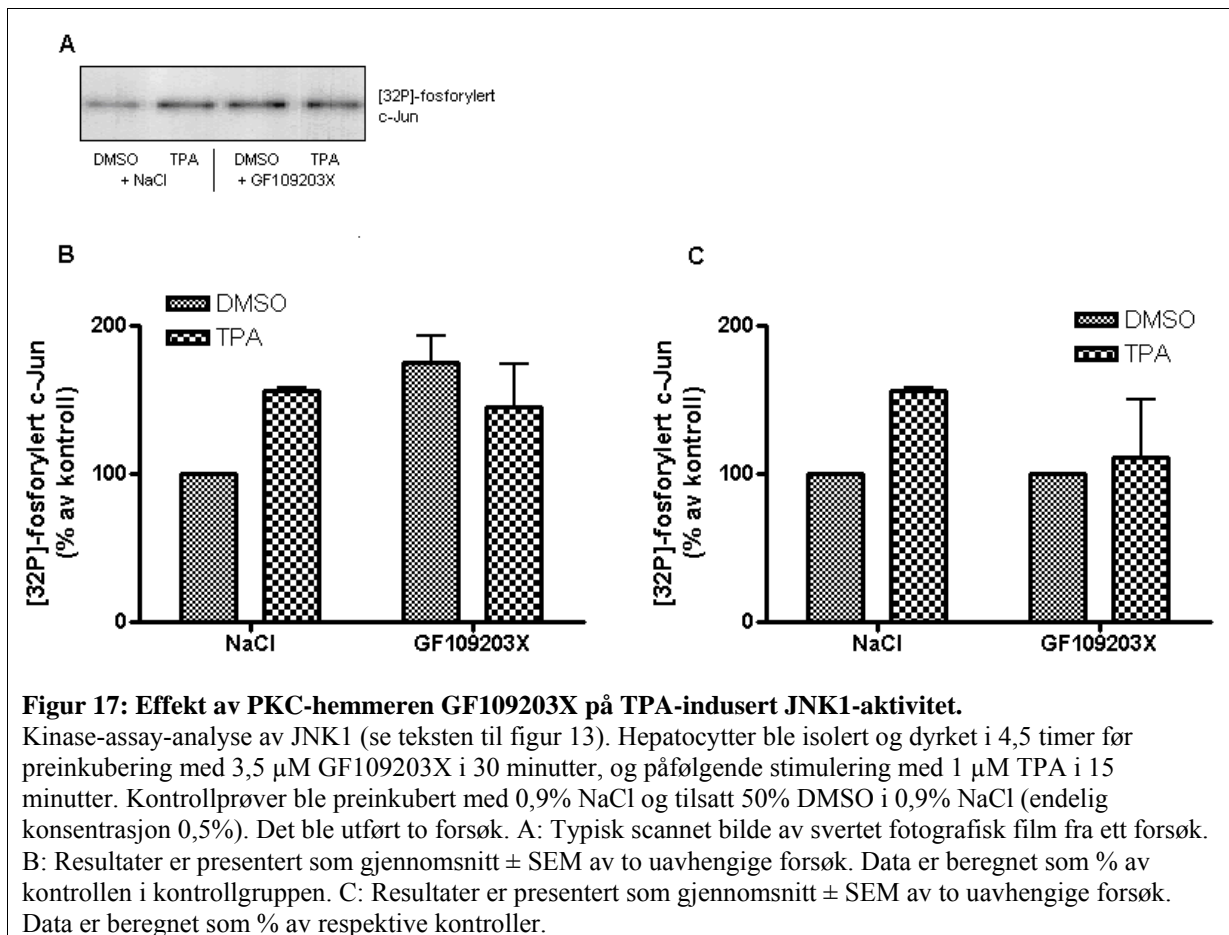
GF109203X førte til noe økt basal og VP-indusert JNK-aktivitet i forsøkene med VP (figur 16A og B). I forsøkene med TPA økte den basale JNK-aktiviteten i større grad, mens TPA-indusert JNK-aktivitet forble uendret (figur 17A og B). Den prosentvise effekten av VP-indusert JNK-aktivitet, sammenlignet med respektiv kontroll, forble derimot uendret (figur 16C), mens den prosentvise effekten av TPA-indusert JNK-aktivitet ble fullstendig hemmet (figur 17C). Dette er hovedsaklig i samsvar med resultatene fra Western blotting-forsøkene, og tyder på at PKC ikke er involvert i VP-indusert aktivering av JNK.



**Figur 16: Effekt av PKC-hemmeren GF109203X på VP-indusert JNK1-aktivitet.**

Kinase-assay-analyse av JNK1 (se teksten til figur 13). Hepatocytter ble isolert og dyrket i 4,5 timer før preinkubering med 3,5  $\mu$ M GF109203X i 30 minutter, og påfølgende stimulering med 1  $\mu$ M VP i 15 minutter. Kontrollprøver ble både preinkubert med og tilsatt 0,9% NaCl. Det ble utført tre forsøk. A: Typisk scannet bilde av svartet fotografisk film fra ett forsøk. B: Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. Data er beregnet som % av kontrollen i kontrollgruppen. C: Resultater er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM av tre uavhengige forsøk. Data er beregnet som % av respektive kontroll.





## 4. Diskusjon

### 4.1 Metodologiske aspekter

Både Western blotting og immunpresipitering og måling av kinaseaktivitet er veletablerte metoder ved dette laboratoriet. Av disse er immunpresipitering og kinase-assay den mest kvantitative.

Deteksjon ved Western blotting ved bruk av LumiGLO er avhengig av en lysproduserende enzymreaksjon. Dette er en dynamisk reaksjon som endres konstant med tiden.

Tidsavhengigheten av signalet påvirker dermed kvantifiseringen. Det fins imidlertid kvantitative deteksjonsmetoder som kan være bedre egnet til kvantifisering av Western blott. I tillegg kan ”stripping” av membranen føre til inkonsistent tap av protein, og dette påvirker også kvantifiseringen. ”Stripping” ble hovedsaklig utført for å kunne bruke samme membran til deteksjon av både p-JNK og total JNK. Alternativet hadde vært å ha egne geler for total JNK, men det ville heller ikke vært ideelt da forskjeller i ”loading” og proteinoverføring kan gi betydelig variasjon mellom forskjellige blott. ”Stripping” ble også utført i noen tilfeller hvor jeg hadde problemer med visualisering av proteinbåndene på membranen ved deteksjon av p-JNK. Ved å ”strippe” membranen og gjenta deteksjonsprosessen, fikk jeg visualisert båndene ved andre forsøk. Her ville alternativet vært å lage nye blott, noe som er en tidkrevende prosess. ”Stripping” av membraner så imidlertid ut til å være uproblematisk, da ”loading” av total JNK ble jevn i de aller fleste forsøk.

Selve deteksjonsprosessen ved immunpresipitering og kinase-assay, elektronisk autoradiografi, er kvantitativ på grunn av det store lineære dynamiske området. Varierende resultater under prøveopparbeidelsen, og da spesielt grad av utbytte ved immunpresipiteringen, fører imidlertid til at data fremkommet ved immunpresipitering og kinase-assay blir mindre kvantitative.

---

Siden datamaterialet i denne oppgaven er fremkommet ved semikvantitative metoder, er statistisk analyse av resultatene beheftet med usikkerhet. Til dels store kvantitative forskjeller i resultater mellom de enkelte forsøkene (selv om de kvalitative resultatene var forholdsvis like) førte dessuten til stor spredning ved sammenslåing av forsøkene. Enkelte avvikende resultater ga også et stort utslag på spredningen. Denne spredningen, sammen med et lite antall forsøk per forsøksoppsett, kan ha bidratt til at de statistiske testene stort sett ikke viste noen signifikante forskjeller.

Bruk av hemmere og  $\text{Ca}^{2+}$ -chelatorer kan medføre en økning i basal JNK-aktivitet, slik både EGTA, BAPTA-AM, U73122 og GF109203X gjorde i denne oppgaven. Data kunne da vise en tilsynelatende hemming av stimulert JNK-aktivitet når stimulering ble uttrykt som % av respektive kontroller, mens det egentlig var slik at stimulert JNK-aktivitet enten økte i mindre grad enn økningen i den basale JNK-aktiviteten eller forble uendret. I slike tilfeller måtte resultatene fortolkes med tanke på om den tilsynelatende hemmingen av stimulert JNK-aktivitet var en reell hemming. Derfor presenteres resultatene på flere måter. Bruk av positive kontroller bidro også til tolkningen.

Alle agens som ble benyttet i denne oppgaven, har tidligere blitt brukt ved dette laboratoriet, og konsentrasjonene av de forskjellige agens er dermed valgt ut ifra erfaring. TPA og thapsigargin har dårlig løselighet i vann, og DMSO ble benyttet som løsemiddel for disse stoffene fordi det skal være et inert løsemiddel. DMSO har imidlertid av erfaring vist seg å ha en svak egeneffekt blant annet i hepatocytter, og vi tilstrebet derfor å holde konsentrasjonen av DMSO lavest mulig (endelig konsentrasjon 0,5%). I forsøk med TPA eller thapsigargin der det også ble benyttet hemmere som måtte løses i DMSO, ble konsentrasjonen imidlertid høyere (endelig konsentrasjon 1%). I forsøkene med TPA og thapsigargin ble det tatt med kontroller tilsatt DMSO for å fange opp en eventuell egeneffekt av DMSO, og det viste seg at DMSO hadde en svak hemmende effekt på JNK-aktivitet (se figur 2B). Denne hemmingen var imidlertid meget svak, og har derfor antakelig ingen betydning for resultatene. VP og TPA ble tilsatt i kun to av opptil fire forsøk ved sammenligning av effekter av GPCR-agonister, EGF, TPA og thapsigargin på JNK-fosforylering (se figur 2). Effekten av VP og TPA på JNK-fosforylering ble imidlertid også undersøkt i flere andre forsøk, og det foreligger derfor tilstrekkelige data om deres effekt.

## 4.2 Stimulering med GPCR-agonister øker JNK-fosforylering og JNK-aktivitet

I samsvar med tidligere funn, ble JNK-fosforylering opprettholdt i minst 1 time etter stimulering med VP. JNK-aktivitet ble også opprettholdt i minst 1 time etter stimulering med VP, og fulgte helhetlig sett et lignende tidsforløp som JNK-fosforylering. Små forskjeller i tidsforløpet for henholdsvis fosforylering og aktivitet av JNK førte imidlertid til at det ble valgt ulike inkuberingstider ved de to forskjellige metodene. De andre agonistene stimulerte også JNK-fosforylering og JNK-aktivitet, men i lavere grad enn VP. Forsøk utført ved henholdsvis Western blotting og immunpresipitering og kinase-assay viste stort sett sammenfallende resultater, men sistnevnte metode viste generelt mindre responser. Responsen på thapsigargin var spesielt lav. Mindre responser antas å skyldes den kortere inkuberingstiden ved immunpresipitering og kinase-assay, men det at Western blotting er en mer følsom metode kan også ha spilt inn.

Med unntak av PGE<sub>2</sub> utøver alle agonistene sine effekter via hver sin bestemte reseptortype i hepatocytter (se GPCR-agonister benyttet i denne oppgaven). PGE<sub>2</sub> kan imidlertid utøve effekter via både FP-reseptorer og alle de fire subgruppene av EP-reseptorer i hepatocytter. Vekststimulerende effekter av PGE<sub>2</sub> i hepatocytter utøves hovedsaklig via EP<sub>3</sub>-reseptorer, men G<sub>q</sub>-koblede FP-reseptorer er også involvert (Meisdalen et al., 2007). Det kan derfor tenkes at EP<sub>3</sub>-reseptorer og/eller FP-reseptorer er involvert i aktivering av JNK. Det bør på et senere tidspunkt undersøkes hvilke(n) av disse reseptortypene som er involvert i PGE<sub>2</sub>-indusert aktivering av JNK.

Siden VP førte til sterkest stimulering av JNK blant alle GPCR-agonistene, ble VP valgt som representant for disse agonistene for videre forsøk hvor mekanismer for aktivering av JNK skulle undersøkes. De forskjellige agonistene har imidlertid vist seg å stimulere DNA-syntese og IP<sub>3</sub>-akkumulering i ulik grad. NA og PGE<sub>2</sub> fører i motsetning til VP og Ang II ikke til merkbar IP<sub>3</sub>-akkumulering i hepatocytter 5 timer etter utsæd, samtidig som de fører til en mye sterkere stimulering av DNA-syntese enn VP og Ang II (Sandnes et al., 1999, Meisdalen et al., 2007). I tillegg har de vekststimulerende effektene av disse agonistene vist seg hovedsaklig å være additive (Dajani et al., 1996). Det er derfor mulig at agonistene

---

utøver sine effekter via til dels forskjellige mekanismer. Effektene av hemmerne og  $\text{Ca}^{2+}$ -chelatorene på VP-indusert JNK-fosforylering trenger dermed ikke nødvendigvis å være fullstendig overførbare til de andre agonistene.

### 4.3 Betydning av PLC-signalveien for JNK-fosforylering

PLC-hemmeren U73122 økte den VP-induserte JNK-fosforyleringen, mens thapsigargin-effekten forble uendret. U73122 førte til en økning i basal JNK-fosforylering som i ett av de to forsøkene i figur 6 var på 480%. På grunn av økningen i basal JNK-fosforylering ble den prosentvise effekten av VP og thapsigargin på JNK-fosforylering hemmet med U73122. Den inaktive analogen U73343, som skulle fungere som en negativ kontroll, ga et positivt utslag med lignende effekter som U73122. Effekten på  $\text{IP}_3$ -akkumulering var som forventet, og det tydet på at U73122 hemmet PLC-aktiviteten. Effektene av U73343, og den uspesifikke effekten av U73122 på stimulering av JNK med thapsigargin (som øker intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  uavhengig av PLC), tyder imidlertid på at U73122 utøver andre effekter i hepatocytter i tillegg til å hemme PLC. U73122 har i flere celletyper vist seg å ha uspesifikke effekter, inkludert reduksjon av mengde  $\text{PIP}_2$  (substrat for PLC) (Vickers, 1993) og  $\text{Ca}^{2+}$ -frigjøring fra intracellulære lagre (Mogami et al., 1997), hvorav den sistnevnte effekten også er vist i hepatocytter (Berven og Barritt, 1995). Disse faktorene gjorde at det var vanskelig å tolke resultatene. Vi valgte derfor å gå videre med å undersøke effekter av direkte påvirkning av  $\text{Ca}^{2+}$  og PKC.

### 4.4 Betydning av økt intracellulært $\text{Ca}^{2+}$ for JNK-fosforylering og JNK-aktivitet

Thapsigargin-indusert økning i intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  førte til en kraftig økning i JNK-fosforylering. Dette tyder på at  $\text{Ca}^{2+}$ -signalveien er av betydning for JNK-fosforylering, og det var derfor av interesse å undersøke om GPCR-agonister utøver sin effekt på JNK via denne signalveien.

Hemming av  $\text{Ca}^{2+}$ -signalveien ved bruk av EGTA, som chelaterer ekstracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ , så ikke ut til å ha noen effekt på VP-indusert fosforylering av JNK. Thapsigargin-indusert JNK-fosforylering ble som forventet hemmet av EGTA. EGTA førte til økt basal JNK-fosforylering. En mulig forklaring på dette kan være at EGTA påfører cellene stress, som igjen kan aktivere JNK. Det at chelatering av  $\text{Ca}^{2+}$  hemmet effekten av thapsigargin, men ikke av VP, på JNK-fosforylering, kan tyde på at VP aktiverer JNK via en  $\text{Ca}^{2+}$ -uavhengig mekanisme. En annen mulig forklaring er imidlertid at en langvarig thapsigargin-indusert økning i intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ , i motsetning til det fysiologiske  $\text{Ca}^{2+}$ -signalet fra VP, kan resultere i aktivering av JNK via stressinduserte signalveier. Ved lang nok stimulering med thapsigargin, ville alle slags celletyper etter hvert ha dødd på grunn av det ufysiologiske, vedvarende  $\text{Ca}^{2+}$ -signalet.

EGTA hemmer ikke den initielle økningen i intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ , men det mer langvarige sekundære  $\text{Ca}^{2+}$ -signalet som følge av  $\text{Ca}^{2+}$ -influks. Siden det initielle  $\text{Ca}^{2+}$ -signalet i  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -signalveien er nødvendig for å utløse det sekundære  $\text{Ca}^{2+}$ -signalet, var det viktig å unngå langvarig eksponering for EGTA, noe som hadde ført til gradvis tømming av intracellulære  $\text{Ca}^{2+}$ -lagre (Bánhegyi et al., 1993, Melien et al., 2002). Preinkuberingstiden med EGTA ble derfor holdt lavest mulig (5 minutter), men den totale inkuberingstiden ble likevel på 65 minutter (på grunn av stimulering med agens i 60 minutter). Det er derfor mulig at EGTA i løpet av denne tiden førte til at noe  $\text{Ca}^{2+}$  ble trukket ut av cellene. Effekten av EGTA på thapsigargin-indusert JNK-fosforylering var imidlertid som forventet ved at thapsigargin-effekten ikke ble fullstendig hemmet. Vi kan derfor trekke den konklusjonen at  $\text{Ca}^{2+}$  ikke er av betydning for VP-indusert JNK-fosforylering. Alternativet ville vært å stimulere i kortere tid i nærvær av EGTA, eller eventuelt hatt med tidskurver for VP- og thapsigargin-indusert JNK-fosforylering med og uten EGTA. Resultatene fra EGTA-forsøkene som ble utført ved immunpresipitering og kinase-assay tyder også på at  $\text{Ca}^{2+}$ -signalet ikke er av betydning for VP-indusert JNK-aktivitet, og i disse forsøkene var den totale inkuberingstiden mye lavere (20 minutter).

For å hemme frigjøring av  $\text{Ca}^{2+}$  fra intracellulære lagre benyttet jeg BAPTA-AM, som chelaterer intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ . Mens EGTA og GF109203X økte basal JNK-fosforylering med opptil cirka 250%, økte BAPTA-AM den basale JNK-fosforyleringen med omtrent

---

600%. Denne uspesifikke effekten av BAPTA-AM vanskeliggjorde tolkning av resultatene. Preinkubering av hepatocytter med 40  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM i 30 minutter har tidligere blitt utført ved dette laboratoriet i forbindelse med undersøkelser av ERK, og BAPTA-AM førte kun til en svak økning i basal ERK-aktivitet (på cirka 120%) i de forsøkene (Melien et al., 2002). Zohn et al. (1995) fant at BAPTA-AM i høye konsentrasjoner økte basal JNK-aktivitet i en leverderivert cellelinje, men her ble agonist-stimulert aktivitet tydelig hemmet. Økningen i basal JNK-aktivitet ble antatt å skyldes en uspesifikk, toksisk effekt av BAPTA-AM.

Resultatene fra de forskjellige forsøkene tyder på at det er mulig å aktivere JNK via  $\text{Ca}^{2+}$ -signalveien, men at denne signalveien ikke er involvert i aktivering av JNK med VP. VP ser derfor ut til å stimulere JNK-fosforylering via en annen mekanisme enn aktivering av  $\text{Ca}^{2+}$ -signalveien. Forsøk utført ved immunpresipitering og kinase-assay bekrefter disse resultatene (som er utført ved Western blotting). For helt å kunne utelukke at  $\text{Ca}^{2+}$ -signalveien er av betydning for aktivering av JNK med VP, bør det imidlertid utføres flere forsøk med andre hemmere av  $\text{Ca}^{2+}$ -signalet i tillegg til EGTA.

## 4.5 Betydning av PKC for JNK-fosforylering og JNK-aktivitet

TPA-indusert PKC-aktivering førte til en økning i JNK-fosforylering som var mye lavere enn den thapsigargin-induserte økningen. PKC ser derfor ut til å være av mindre betydning for JNK-fosforylering. Siden PKC-signalveien stimulerte JNK-fosforylering i noe grad, var det likevel av interesse å undersøke om GPCR-agonister utøver sin effekt på JNK-fosforylering via denne signalveien.

Hemming av PKC-signalveien ved bruk av PKC-hemmeren GF109203X så ikke ut til å ha noen signifikant effekt på VP-indusert fosforylering av JNK. Resultatene med TPA, som fungerte som kontroll i forsøkene, var som forventet. TPA fører imidlertid til en kraftig, ufysiologisk aktivering av PKC. VP har antakeligvis ikke en like sterk effekt på PKC som TPA. Det er derfor mulig at stressinduserte signalveier kan være involvert i TPA-indusert JNK-fosforylering. Den prosentvise effekten av thapsigargin, sammenlignet med respektiv

kontroll, ble hemmet. Den absolutte effekten av thapsigargin forble imidlertid uendret, og siden PKC ikke skulle være av særlig betydning for thapsigargin-indusert JNK-fosforylering, tolker vi dette til at thapsigargin-effekten ikke ble påvirket ved bruk av GF109203X. Disse resultatene står i motstrid til studier utført av Jarvis et al. (1997), som viste at  $\alpha_1$ -adrenoseptor-indusert JNK-aktivitet i hepatocytter ser ut til å være avhengig av PKC. En mulig forklaring på dette kan være at VP og  $\alpha_1$ -adrenoseptor-agonister aktiverer JNK via til dels forskjellige mekanismer.

GF109203X førte i likhet med EGTA til økt basal JNK-fosforylering. Dette er i samsvar med andre studier som har vist at GF109203X øker basal aktivitet i hepatocytter (Sandnes et al., upublisert, Jarvis et al., 1997). I tillegg viste disse studiene at GF109203X øker VP-indusert JNK-aktivitet, noe som også ser ut til å være tilfelle ved mine forsøk hvis man ser på den absolutte effekten. En mulig forklaring på dette kan være at PKC-aktivitet har en hemmende effekt på JNK-aktivering. Jarvis et al. (1997) fant at hemming av PKC i hepatocytter førte til økt basal JNK-aktivitet, og Wang et al. (2004) viste at hemming av PKC forsterket stressindusert JNK-aktivering i en leverderivert cellelinje. En alternativ forklaring kan være at GF109203X påfører cellene stress og aktiverer JNK via stressinduserte signalveier.

Det er i nyere tid blitt kjent at DAG kan aktivere minst fem andre effektormolekyler i tillegg til PKC, og disse signalerer uavhengig av PKC. Nyere funn tyder på at flere cellulære prosesser som ble antatt å være regulert av PKC, egentlig reguleres av disse effektormolekylene (Brose og Rosenmund, 2002). GF109203X, som er en forholdsvis spesifikk hemmer av PKC (Toullec et al., 1991), hemmer ikke de andre effektormolekylene, og selv om PKC ikke ser ut til å være involvert i VP-indusert aktivering av JNK, er det ikke dermed sagt at DAG ikke kan være det.

Resultatene tyder på at det er mulig å aktivere JNK i noe grad via PKC-signalveien, men at denne signalveien i likhet med  $\text{Ca}^{2+}$ -signalveien ikke er involvert i VP-indusert aktivering av JNK. VP ser derfor ut til å stimulere JNK-fosforylering via en annen mekanisme enn PKC-



---

signalveien. Forsøk utført ved immunpresipitering og kinase-assay bekrefter disse resultatene (som er utført ved Western blotting).

## 4.6 Betydning av $\text{Ca}^{2+}$ og PKC for JNK- og ERK-aktivitet undersøkt i andre studier

Det er tidligere vist at VP, Ang II, NA og  $\text{PGE}_2$  stimulerer ERK via mekanismer som involverer  $\text{Ca}^{2+}$  og PKC (Dajani et al., 1999, Melien et al., 2002). Disse signalveiene ser imidlertid ikke ut til å være involvert i aktivering av JNK i hepatocytter. Studier i ulike celler har i likhet med dette vist at ERK og JNK kan aktiveres via forskjellige mekanismer. Selv om for eksempel både JNK og ERK kan aktiveres via den G-proteinkoblede endotelinreseptoren  $\text{Et}_A$  i Rat-1-celler, ble JNK-aktivisering hemmet av både  $\text{Ca}^{2+}$ - og PKC-signalveien, mens ERK-aktiveringen var uavhengig av  $\text{Ca}^{2+}$  og PKC (Cadwallader et al., 1997). Wylie et al. (1999) fant at aktivering av ERK og JNK via humane G-proteinkoblede  $\text{m}_3$  muskarinreseptorer uttrykt i CHO-celler involverer henholdsvis PKC og  $\text{Ca}^{2+}$ . Videre fant de at JNK-aktiveringen ble hemmet av PKC.

Betydning av  $\text{Ca}^{2+}$ - og PKC-signalveien for JNK-aktivisering ser ut til å variere avhengig av celletype. Det er for eksempel vist i en leverderivert cellelinje fra rotte at Ang II stimulerer JNK via en  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengig signalvei som kan hemmes av PKC, og at  $\text{Ca}^{2+}$  medierer sin effekt via tyrosinkinase Pyk2 (Zohn et al., 1995, Li et al., 1997).

Cook og McCormick (1996) viste at mitogene konsentrasjoner av GPCR-agonisten LPA stimulerte bifasisk, langvarig aktivering av ERK i Rat-1-celler. Aktivering av PKC og  $\text{Ca}^{2+}$ -flukser spilte kun en mindre, forbigående rolle i den initiale fasen av ERK-aktivering, og var ikke involvert i den sekundære fasen.  $\text{Ca}^{2+}$ - og PKC-signalveien kan dermed se ut til å bidra i ulik grad ved forskjellige tider. Det ville derfor være av interesse å undersøke hvordan hemming av henholdsvis  $\text{Ca}^{2+}$ - og PKC-signalveien påvirker tidsforløpet for VP-stimulert JNK-aktivisering.

## 4.7 Kan hemming av MEK/ERK-signalveien påvirke fosforylering av JNK?

MEK1/2-hemmeren U0126 hemmet delvis den VP-induserte JNK-fosforyleringen, mens effekten av thapsigargin ble nesten fullstendig hemmet. MEK1/2 er spesifikke MKK for ERK, og det kan derfor se ut til at VP- og thapsigargin-indusert aktivering av ERK er involvert i aktivering av JNK. Dette var et uventet funn som burde undersøkes nærmere, også ved bruk av andre MEK-hemmere.

I motsetning til mine funn, viste Jarvis et al. (1997) at PKC-mediert aktivering av ERK hemmer basal JNK-aktivitet i hepatocytter. I en leverderivert cellelinje førte hemming av ERK til økt stressindusert JNK-fosforylering (Wang et al., 2004). Det er tidligere vist ved dette laboratoriet at både VP, Ang II, NA og PGE<sub>2</sub> kan aktivere ERK i hepatocytter (Melien et al., 1998). Flere studier tyder på at MAP-kinaser kan innvirke på hverandre, og det ser ut til at en balanse mellom signaler fra de forskjellige MAP-kinasene kan være av avgjørende betydning for flere viktige cellulære prosesser, som genaktivering og celleproliferasjon (Spector et al., 1997, Hui et al., 2007, Wada et al., 2008).

U0126 er en forholdsvis spesifikk hemmer av MEK1/2, men kan i tillegg også hemme aktivering av ERK5 i flere ulike celletyper ved å hemme MEK5 (en spesifikk MKK for ERK5) (Kamakura et al., 1999, Bain et al., 2007). Det kan derfor ikke utelukkes at det er ERK5, og ikke ERK1/2, som er involvert i aktivering av JNK. U0126 kan også ha andre effekter i tillegg til å hemme ovennevnte MKK. Ramos et al. (2006) fant at U0126 førte til depleksjon av intracellulært glutation i U-937-celler.

## 4.8 Hvilken effekt har stimulering med EGF på fosforylering av JNK?

EGF stimulerte JNK-fosforylering i nesten like stor grad som flere av GPCR-agonistene. I tillegg førte EGF til en langvarig aktivering av JNK. I motsetning til i andre celletyper, hvor GPCR-agonister gir en både sterkere og mer vedvarende aktivering av JNK enn vekstfaktorer (Coso et al., 1995, Zohn et al., 1995), ser det ut til at EGF også fører til en

forholdsvis sterk og vedvarende aktivering av JNK i hepatocytter. Både styrken og varigheten av aktivitet i forskjellige signalveier (som for eksempel de ulike MAP-kinase-signalveiene) er viktig for det kvalitative utfallet av responsen (Hazzalin og Mahadevan, 2002). Det er tidligere vist en sammenheng mellom varigheten av EGF-stimulert ERK-aktivitet, og grad av EGF-stimulert DNA-syntese (Thoresen et al., 2003).

EGFR kan formidle sterk vekststimulering i hepatocytter, og EGF kan stimulere DNA-syntese via alle de forskjellige MAP-kinasene i denne celletypen (Christoffersen et al., 2000). Det er av interesse at EGF, som øker DNA-syntese, også fører til en langvarig aktivering av JNK. HGF er en agonist som aktiverer reseptortyrosinkinasen Met, og JNK-aktivitet har vist seg å være nøkkelveien for HGF-stimulert DNA-syntese (Auer et al., 1998). Det ville derfor være interessant å se nærmere på effekter av EGF på JNK-aktivitet av mer langvarig karakter enn varigheten som er undersøkt i denne oppgaven, og hvilken rolle JNK eventuelt spiller i EGF-mediert DNA-syntese.

## 4.9 Alternative mekanismer for aktivering av JNK via GPCR-agonister

GPCR-agonistene antas å aktivere PLC-signalveien via  $G\alpha_q$ -subenheten (Melien et al., 1998). Siden funnene i denne oppgaven tyder på at disse agonistene aktiverer JNK ved en  $Ca^{2+}$ - og PKC-uavhengig mekanisme, er det mulig at aktivering av JNK skjer via  $\beta\gamma$ -subenheten.  $\beta\gamma$ -subenheten kan aktivere medlemmer av Rho-familien med påfølgende aktivering av JNK via PLC-uavhengige mekanismer. Et annet mulig alternativ er at agonist-indusert aktivitet av JNK involverer  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ . Disse G-proteinene kan, i likhet med  $\beta\gamma$ -subenheten nevnt ovenfor, føre til en PLC-uavhengig aktivering av medlemmer av Rho-familien, som igjen kan aktivere JNK (Marinissen og Gutkind, 2001). Flere agonister som kobler til  $G_q$ , har også vist seg å kunne koble til  $G_{12}/G_{13}$  (Elefsinioti et al., 2004), og det er vist at  $G_{13}$  uttrykkes i hepatocytter (Melien et al., 2000). Det ville også være av interesse å undersøke effekter av pertussistoksin på GPCR-agonist-indusert aktivering av JNK for eventuelt å kunne utelukke  $G_i$ -avhengige aktiveringsmekanismer (Melien et al., 1998).

## 4.10 Konklusjon

Basert på funnene i denne oppgaven, er hovedkonklusjonen at VP ser ut til å aktivere JNK via en  $\text{Ca}^{2+}$ - og PKC-uavhengig mekanisme i hepatocytter.

Resultatene viser at både VP, Ang II, NA,  $\text{PGE}_2$  og EGF kan stimulere JNK-aktivitet, og at VP fører til kraftigst aktivering blant disse agonistene. EGF fører til en forholdsvis langvarig aktivering av JNK. Thapsigargin- og TPA-indusert aktivering av JNK tyder på at henholdsvis  $\text{Ca}^{2+}$ - og PKC-signalveien er av en viss betydning for aktivering av JNK, hvorav  $\text{Ca}^{2+}$ -signalveien er den viktigste. Resultatene antyder også at ERK kan være involvert i VP-indusert aktivering av JNK.

---

## Referanser

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002a). *Molecular biology of the cell*. 4. opplag. Garland Science, USA, s. 831-905.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002b). *Molecular biology of the cell*. 4. opplag. Garland Science, USA, s. 983-1060.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004). *Essential cell biology*. 2. opplag. Garland Science, USA, s. 533-569.

Alessi, D.R. (1997). The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* **402**: 121-123.

Auer, K.L., Contessa, J., Brenz-Verca, S., Pirola, L., Rusconi, S., Cooper, G., Abo, A., Wymann, M.P., Davis, R.J., Birrer, M., Dent, P. (1998). The Ras/Rac1/Cdc42/SEK/JNK/c-Jun cascade is a key pathway by which agonists stimulate DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Biol Cell.* **9**: 561-573.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* **408**: 297-315.

Bánhegyi, G., Bellomo, G., Fulceri, R., Mandl, J., Benedetti, A. (1993). Intraluminal calcium of the liver endoplasmic reticulum stimulates the glucuronidation of p-nitrophenol. *Biochem J.* **292**: 99-104.

Bauer, P.H., Chiu, A.T., Garrison, J.C. (1991). DuP 753 can antagonize the effects of angiotensin II in rat liver. *Mol Pharmacol.* **39**: 579-585.

Berven, L.A., Barritt, G.J. (1995). Evidence obtained using single hepatocytes for inhibition by the phospholipase C inhibitor U73122 of store-operated Ca<sup>2+</sup> inflow. *Biochem Pharmacol.* **49**: 1373-1379.

Bleasdale, J.E., Thakur, N.R., Gremban, R.S., Bundy, G.L., Fitzpatrick, F.A., Smith, R.J., Bunting, S. (1990). Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther.* **255**: 756-768.

Brose, N., Rosenmund, C. (2002). Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci.* **115**: 4399-4411.

Cadwallader, K., Beltman, J., McCormick, F., Cook, S. (1997). Differential regulation of extracellular signal-regulated protein kinase 1 and Jun N-terminal kinase 1 by Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C in endothelin-stimulated Rat-1 cells. *Biochem J.* **321**: 795-804.

Christoffersen, T., Refsnes, M., Brønstad, G.O., Østby, E., Huse, J., Haffner, F., Sand, T.E., Hunt, N.H., Sonne, O. (1984). Changes in hormone responsiveness and cyclic AMP metabolism in rat hepatocytes during primary culture and effects of supplementing the medium with insulin and dexamethasone. *Eur J Biochem.* **138**: 217-226.

Christoffersen, T., Thoresen, G.H., Dajani, O.F., Melien, Ø., Guren, T., Refsnes, M., Sandnes, D. (2000). Mechanisms of hepatocyte growth regulation by hormones and growth factors. I: Berry, M.N., Edwards, A.M. (red.): The hepatocyte review. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 209-232.

Cook, S.J., McCormick, F. (1996). Kinetic and biochemical correlation between sustained p44ERK1 (44 kDa extracellular signal-regulated kinase 1) activation and lysophosphatidic acid-stimulated DNA synthesis in Rat-1 cells. *Biochem J.* **320**: 237-245.

Coso, O.A., Chiariello, M., Kalinec, G., Kyriakis, J.M., Woodgett, J., Gutkind, J.S. (1995). Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. *J Biol Chem.* **270**: 5620-5624.

Dajani, O.F., Røttingen, J.A., Sandnes, D., Horn, R.S., Refsnes, M., Thoresen, G.H., Iversen, J.G., Christoffersen, T. (1996). Growth-promoting effects of Ca<sup>2+</sup>-mobilizing agents in hepatocytes: lack of correlation between the acute activation of phosphoinositide-specific phospholipase C and the stimulation of DNA synthesis by angiotensin II, vasopressin, norepinephrine, and prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. *J Cell Physiol.* **168**: 608-617.

- 
- Dajani, O.F., Sandnes, D., Melien, Ø., Rezvani, F., Nilssen, L.S., Thoresen, G.H., Christoffersen, T. (1999). Role of diacylglycerol (DAG) in hormonal induction of S phase in hepatocytes: the DAG-dependent protein kinase C pathway is not activated by epidermal growth factor (EGF), but is involved in mediating the enhancement of responsiveness to EGF by vasopressin, angiotensin II, and norepinephrine. *J Cell Physiol.* **180**: 203-214.
- Dajani, O.F., Meisdalen, K., Guren, T.K., Aasrum, M., Tveteraas, I.H., Lilleby, P., Thoresen, G.H., Sandnes, D., Christoffersen, T. (2008). Prostaglandin E2 upregulates EGF-stimulated signaling in mitogenic pathways involving Akt and ERK in hepatocytes. *J Cell Physiol.* **214**: 371-380.
- Ding, G., Zhang, A., Huang, S., Pan, X., Zhen, G., Chen, R., Yang, T. (2007). ANG II induces c-Jun NH2-terminal kinase activation and proliferation of human mesangial cells via redox-sensitive transactivation of the EGFR. *Am J Physiol Renal Physiol.* **293**: F1889-1897.
- Elefsinioti, A.L., Bagos, P.G., Spyropoulos, I.C., Hamodrakas, S.J. (2004). A database for G proteins and their interaction with GPCRs. *BMC Bioinformatics.* **5**: 208.
- Etienne, P.L., Baffet, G., Desvergne, B., Boissard-Rissel, M., Glaise, D., Guguen-Guillouzo, C. (1988). Transient expression of c-fos and constant expression of c-myc in freshly isolated and cultured normal adult rat hepatocytes. *Oncogene Res.* **3**: 255-262.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., Trzaskos, J.M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* **273**: 18623-18632.
- Goldsmith, Z.G., Dhanasekaran, D.N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene.* **26**: 3122-3142.
- Gudermann, T., Grosse, R., Schultz, G. (2000). Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **361**: 345-362.
- Guren, T.K., Christoffersen, T., Thoresen, G.H., Wisløff, F., Dajani, O., Tveit, K.M. (2005). Antitumormidler rettet mot tyrosinkinaser. *Tidsskr Nor Lægeforen.* **125**: 3115-3119.

Hashimoto, A., Kurosaki, M., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurosaki, T. (1999). Shc regulates epidermal growth factor-induced activation of the JNK signaling pathway. *J Biol Chem.* **274**: 20139-20143.

Hazzalin, C.A., Mahadevan, L.C. (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**: 30-40.

Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic, V., Scheuch, H., Beug, H., Wagner, E.F. (2007). p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet.* **39**: 741-749.

Jarvis, W.D., Auer, K.L., Spector, M., Kunos, G., Grant, S., Hylemon, P., Mikkelsen, R., Dent, P. (1997). Positive and negative regulation of JNK1 by protein kinase C and p42(MAP kinase) in adult rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **412**: 9-14.

Ji, T.H., Grossmann, M., Ji, I. (1998). G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem.* **273**: 17299-17302.

Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* **298**: 1911-1912.

Kamakura, S., Moriguchi, T., Nishida, E. (1999). Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem.* **274**: 26563-26571.

Kobilka, B.K., Deupi, X. (2007). Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **28**: 397-406.

Li, X., Yu, H., Graves, L.M., Earp, H.S. (1997). Protein kinase C and protein kinase A inhibit calcium-dependent but not stress-dependent c-Jun N-terminal kinase activation in rat liver epithelial cells. *J Biol Chem.* **272**: 14996-15002.

Luttrell, L.M., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 177-183.

Lynch, C.J., Blackmore, P.F., Charest, R., Exton, J.H. (1985). The relationships between receptor binding capacity for norepinephrine, angiotensin II, and vasopressin and release of



---

inositol trisphosphate, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and phosphorylase activation in rat liver. *Mol Pharmacol.* **28**: 93-99.

Lytton, J., Westlin, M., Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem.* **266**: 17067-17071.

Maloney, J.A., Tsygankova, O.M., Yang, L., Li, Q., Szot, A., Baysal, K., Williamson, J.R. (1999). Activation of ERK by Ca<sup>2+</sup> store depletion in rat liver epithelial cells. *Am J Physiol.* **276**: C221-230.

Marinissen, M.J., Gutkind, J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* **22**: 368-376.

Meisdalen, K., Dajani, O.F., Christoffersen, T., Sandnes, D. (2007). Prostaglandins enhance epidermal growth factor-induced DNA synthesis in hepatocytes by stimulation of E prostanoid 3 and F prostanoid receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **322**: 1044-1050.

Melien, Ø., Thoresen, G.H., Sandnes, D., Østby, E., Christoffersen, T. (1998). Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase by angiotensin II, vasopressin, norepinephrine, and prostaglandin F<sub>2</sub>α in hepatocytes is sustained, and like the effect of epidermal growth factor, mediated through pertussis toxin-sensitive mechanisms. *J Cell Physiol.* **175**: 348-358.

Melien, Ø., Sandnes, D., Johansen, E.J., Christoffersen, T. (2000). Effects of pertussis toxin on extracellular signal-regulated kinase activation in hepatocytes by hormones and receptor-independent agents: evidence suggesting a stimulatory role of G(i) proteins at a level distal to receptor coupling. *J Cell Physiol.* **184**: 27-36.

Melien, Ø., Nilssen, L.S., Dajani, O.F., Sand, K.L., Iversen, J.G., Sandnes, D.L., Christoffersen, T. (2002). Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of ERK in hepatocytes by norepinephrine and prostaglandin F<sub>2</sub> α: role of calmodulin and Src kinases. *BMC Cell Biol.* 2002;**3**:5.

Mogami, H., Lloyd Mills, C., Gallacher, D.V. (1997). Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca<sup>2+</sup>, potentiates Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J.* **324**: 645-651.

- Morel, A., O'Carroll, A.M., Brownstein, M.J., Lolait, S.J. (1992). Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor. *Nature*. **356**: 523-526.
- Nilssen, L.S., Ødegård, J., Thoresen, G.H., Molven, A., Sandnes, D., Christoffersen, T. (2004). G protein-coupled receptor agonist-stimulated expression of ATF3/LRF-1 and c-myc and comitogenic effects in hepatocytes do not require EGF receptor transactivation. *J Cell Physiol*. **201**: 349-358.
- Nilssen, L.S., Dajani, O., Christoffersen, T., Sandnes, D. (2005). Sustained diacylglycerol accumulation resulting from prolonged G protein-coupled receptor agonist-induced phosphoinositide breakdown in hepatocytes. *J Cell Biochem*. **94**: 389-402.
- Nishina, H., Wada, T., Katada, T. (2004). Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem*. **136**: 123-126.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. **366**: 2-16.
- Post, G.R., Brown, J.H. (1996). G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB J*. **10**: 741-749.
- Radhika, V., Dhanasekaran, N. (2001). Transforming G proteins. *Oncogene*. **20**: 1607-1614.
- Ramos, A.M., Fernandez, C., Amrán, D., Esteban, D., de Blas, E., Palacios, M.A., Aller, P. (2006). Pharmacologic inhibitors of extracellular signal-regulated kinase (ERKs) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) decrease glutathione content and sensitize human promonocytic leukemia cells to arsenic trioxide-induced apoptosis. *J Cell Physiol*. **209**: 1006-1015.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. (2003). Pharmacology. 5. opplag. Elsevier Science, UK, s. 22-48.
- Refsnes, M., Thoresen, G.H., Sandnes, D., Dajani, O.F., Dajani, L., Christoffersen, T. (1992). Stimulatory and inhibitory effects of catecholamines on DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: role of alpha 1- and beta-adrenergic mechanisms. *J Cell Physiol*. **151**: 164-171.

- 
- Sakurai, T., Maeda, S., Chang, L., Karin, M. (2006). Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 10544-10551.
- Sandnes, D., Dajani, O., Bjørneby, A., Christoffersen, T. (1999). The relationship between activation of phosphoinositide-specific phospholipase C and growth stimulation by Ca<sup>2+</sup>-mobilizing hormones in hepatocytes. *Pharmacol Toxicol*. **84**: 234-240.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. **103**: 211-225.
- Schwabe, R.F., Bradham, C.A., Uehara, T., Hatano, E., Bennett, B.L., Schoonhoven, R., Brenner, D.A. (2003). c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology*. **37**: 824-832.
- Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. **13**: 29-83.
- Spector, M.S., Auer, K.L., Jarvis, W.D., Ishac, E.J., Gao, B., Kunos, G., Dent, P. (1997). Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress-activated protein kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult rat hepatocytes. *Mol Cell Biol*. **17**: 3556-3565.
- Thevananther, S., Sun, H., Li, D., Arjunan, V., Awad, S.S., Wyllie, S., Zimmerman, T.L., Goss, J.A., Karpen, S.J. (2004). Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology*. **39**: 393-402.
- Thoresen, G.H., Guren, T.K., Christoffersen, T. (2003). Role of ERK, p38 and PI3-kinase in EGF receptor-mediated mitogenic signalling in cultured rat hepatocytes: requirement for sustained ERK activation. *Cell Physiol Biochem*. **13**: 229-238.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D., Kirilovsky, J. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*. **266**: 15771-15781.
- Vickers, J.D. (1993). U73122 affects the equilibria between the phosphoinositides as well as phospholipase C activity in unstimulated and thrombin-stimulated human and rabbit platelets. *J Pharmacol Exp Ther*. **266**: 1156-1163.

Visnjic, D., Banfic, H. (2007). Nuclear phospholipid signaling: phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phosphoinositide 3-kinase. *Pflugers Arch.* **455**: 19-30.

Wada, T., Stepniak, E., Hui, L., Leibbrandt, A., Katada, T., Nishina, H., Wagner, E.F., Penninger, J.M. (2008). Antagonistic control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling. *Cell Death Differ.* **15**: 89-93.

Wang, Y., Schattenberg, J.M., Rigoli, R.M., Storz, P., Czaja, M.J. (2004). Hepatocyte resistance to oxidative stress is dependent on protein kinase C-mediated down-regulation of c-Jun/AP-1. *J Biol Chem.* **279**: 31089-31097.

Wess, J. (1998). Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther.* **80**: 231-264.

Wylie, P.G., Challiss, R.A., Blank, J.L. (1999). Regulation of extracellular-signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase by G-protein-linked muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem J.* **338**: 619-628.

Zohn, I.E., Yu, H., Li, X., Cox, A.D., Earp, H.S. (1995). Angiotensin II stimulates calcium-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol.* **15**: 6160-6168.

Zwick, E., Hackel, P.O., Prenzel, N., Ullrich, A. (1999). The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci.* **20**: 408-412.