

Mastergradsoppg. 2011

CELLULÆRE PARAMETERE FOR PÅVISNING AV METABOLSK STRESS.

CELLULAR PARAMETERS FOR DETECTION OF METABOLIC STRESS.



Ukt

VIBEKE OLSBU

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
INSTITUTT FOR KEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP
MASTEROPPGAVE 60 STP. 2011



Forord

Denne oppgaven ble utført på gruppa for Molekylær cellebiologi ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM).

Jeg vil takke Charlotte Kleiveland og Tor Lea for god veiledning i arbeidet med oppgaven, og takk til Ellen Karlstrøm for praktisk hjelp på laben.

Jeg vil også takke Lillian Gillesen for dagene på laben og på lesesalen. Ellers vil jeg takke resten av gruppa for Molekylær cellebiologi for et fint år på laben.

Ås, 12. mai 2011

Vibeke Olsbu

Innhold

Sammendrag	IV
Abstract	V
Forkortelser	VI
1 Teori.....	1
1.1 Innledning.....	1
1.2 Metabolisme og inflammasjon	2
1.3 Endoplasmatisk retikulum	3
1.4 ER og nutrient sensing.....	4
1.4.1 mTOR signalveien.....	4
1.5 Unfolded protein response (UPR)	5
1.5.1 IRE1 signalveien	7
1.5.2 ATF6 signalveien	8
1.5.3 PERK signalveien	10
1.6 Apoptose forårsaket av ER stress	10
1.7 Nutrient sensing og UPR	13
1.8 UPR og metabolske sykdommer	13
1.9 UPR-regulering av cytokinproduksjon	14
1.10 Preparater som induserer UPR	14
1.11 Cellelinjene TERT og 293T	15
2 Materialer	16
2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter	16
2.2 Kjemikalier	17
2.3 Analysesett.....	18
2.4 Medier og løsninger.....	18
2.5 Antistoff.....	18
2.6 Oppskrifter.....	19
2.6.1 Celloarbeid	19
2.6.2 SDS-PAGE.....	20
2.6.3 Western blotting	21
2.6.4 ELISA.....	22
3 Metoder	23
3.1 Celloarbeid.....	23
3.1.1 Celledyrking.....	23

3.1.2	Tining av celler	24
3.1.3	Frysing av celler.....	24
3.2	Separering og detektering av proteiner.....	25
3.2.1	Stimulering og lysering av celler	25
3.2.2	Stimulering av celler, kjerneisolering og lysering av kjerner	27
3.2.3	Natrium dodecylsulfat polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE).....	27
3.2.4	Western blotting.....	28
3.3	Måling av cytokinproduksjon.....	29
3.3.1	Stimulering av celler	29
3.3.2	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	30
4	Resultater	31
4.1	Detektering av UPR ved stimulering med tunicamycin	31
4.2	Detektering av UPR ved stimulering med thapsigargin	33
4.3	Måling av cytokinproduksjon.....	36
5	Diskusjon	38
	Referanser.....	43

Sammendrag

Unfolded protein respons (UPR) er en cellulær stressrespons som blir aktivert dersom endoplasmatisk retikulum (ER) blir utsatt for stress i form av ufoldede proteiner. Dersom mengden ufoldede proteiner er høyere enn foldingskapasiteten til ER, blir UPR aktivert. Det finnes også andre faktorer enn ufoldede proteiner som kan aktivere UPR. Disse faktorene kan være uregelmessigheter i glukosenivået, enkelte lipider, ubalanse i kalsiumnivået, hypoksi og patogener.

I eukaryote celler er overvåkingen av ER lumen og UPR-signaler mediert av tre ulike membranassosierte proteiner, PERK (PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase), IRE1 (inositol requiring enzyme 1) og ATF6 (activating transcription factor-6). De fungerer som stressensorer i ER lumen, og i et velfungerende og stressfritt ER er disse transmembranproteinene bundet av et anstandsprotein, BiP (binding immunoglobulin protein), i det intralumenale domenet. Når disse proteinene er bundet sammen, forblir de inaktive. Dersom det forekommer en akkumulering av ufoldede proteiner i ER, løsner BiP fra UPR-sensorene. Dette skjer fordi de ufoldede proteinene konkurrerer med sensorproteinene om binding til BiP.

I denne oppgaven ble TERT og 293T celler stimulert med tunicamycin og thapsigargin for å indusere UPR. Hensikten med denne oppgaven var å lage et system for detektering av UPR, og det ble sett på proteinene PERK, eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha) og ATF4 (Activating transcription factor 4) i PERK-signalveien. Det ble også sett på IL-8 produksjon i TERT celler etter stimulering med thapsigargin. Resultatene viste at eIF2 α blir fosforylert ved stimulering med thapsigargin, noe som tyder på at UPR har blitt aktivert med denne stimuleringen. Målingene av cytokinproduksjon viste økt produksjon av IL-8 etter stimulering med thapsigargin, og dette indikerer også at cellene responderer på stimulering med thapsigargin. Det ble ikke sett noen fosforylering av PERK, og heller ingen økt translasjon av ATF4 etter stimulering, disse resultatene indikerer at UPR ikke er aktivert. Det er likevel grunn til å tro at årsaken til at det ikke ble påvist fosforylering av PERK eller økt translasjon av ATF4, skyldes feil i deteksjonssystemene som ble brukt.

Abstract

The unfolded protein response is a cellular stress response activated in response to the accumulation of unfolded proteins in the ER lumen. Other conditions exist that can also activate the UPR. These conditions include an imbalance in ER calcium levels, glucose and energy deprivation, hypoxia, pathogens and certain lipids.

In eukaryotic cells, the ER lumen and UPR signals are mediated by three different membrane associated protein, Perk (PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase), IRE1 (Inositol requiring enzyme 1) and ATF6 (Activating transcription factor-6). They act as stress sensors in the ER lumen, and in an efficient and stress-free ER, these transmembrane proteins are bound by a chaperone, BIP (immunoglobulin binding protein), in the intraluminal domain. When these proteins are bound together, they remain inactive. In a well-functioning and “stress-free” ER, these three transmembrane proteins are bound by a chaperone, BiP, in their intraluminal domains and rendered inactive. Accumulation of improperly folded proteins and increased protein cargo in the ER results in the recruitment of BiP away from these UPR sensors.

TERT and 293T cells were stimulated with tunicamycin and thapsigargin to induce the UPR. The purpose of this thesis was to create a system for detecting the UPR. Three proteins in the PERK pathway were examined; PERK, eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 alpha) and ATF4 (Activating transcription factor 4). It was also examined whether stimulation with thapsigargin resulted in increased IL-8 production. The results showed that eIF2 α becomes phosphorylated by stimulation with thapsigargin, suggesting that the UPR has been activated with this stimulation. No phosphorylation of PERK was detected, nor was any increased translation of ATF4 after stimulation observed. These latter results indicate that UPR is not activated. However, there is reason to believe that these results were due to problems with the detection system which were used.

Forkortelser

Forkortelse	Forklaring
APS	Ammoniumpersulfat
ASK1	apoptosis signal regulating kinase-1
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	activating transcription factor-6
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-Cell lymphoma 2
BiP	binding immunoglobulin protein
BSA	Bovint serumalbumin
bZIP	basic-leucine zipper motif
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
CRE	cAMP-responselementer
DMSO	Dimetylsulfoksid
EDEM	ER degradation-enhancing α mannosidase-like protein
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha
ELISA	Enzymed-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisk retikulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation
ERSE-I, -II	ER stress-elementer
FCS	Føtalt kalveserum
hMSC	Human mesenchymal stamcelle
HRP	Horse radish preoxidase (pepperrotperoksidase)
IKK	inhibitor κ B kinase
IL	Interleukin
IRE1	inositol requiring enzyme 1
IRS1	insulin receptor substrate 1
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MEF	Mouse embryonic fibroblast
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ORF	open reading frame
PBS	Fosfatbufret saltvann
PERK	PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase
PI3K	Lipid kinase PI3-kinase
PVDF	Polyvinyliden difluorid-membran
Rcf	Relativ sentrifugalkraft
Rheb	Ras homologue enriched in brain
RIPA-buffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	reactive oxygen species

RT-PCR	Sanntids reverstranskriptase polymerase kjedereaksjon
S1P	site-1 protease
S2P	site-2 protease
SDS	Sodium dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfat polyakrylamidgelelektroforese
TBS	Trisbufret saltvann
TEMED	Tetrametyl-etylendiamin
Tnf- α	tumor necrosis factor-alpha
Tnf- α	Tumor nekrosefaktor-alfa
Traf2	tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
TSC	tuberous sclerosis complex
UPRE	UPR-elementer
Xbp1	X-box binding protein-1

1 Teori

1.1 Innledning

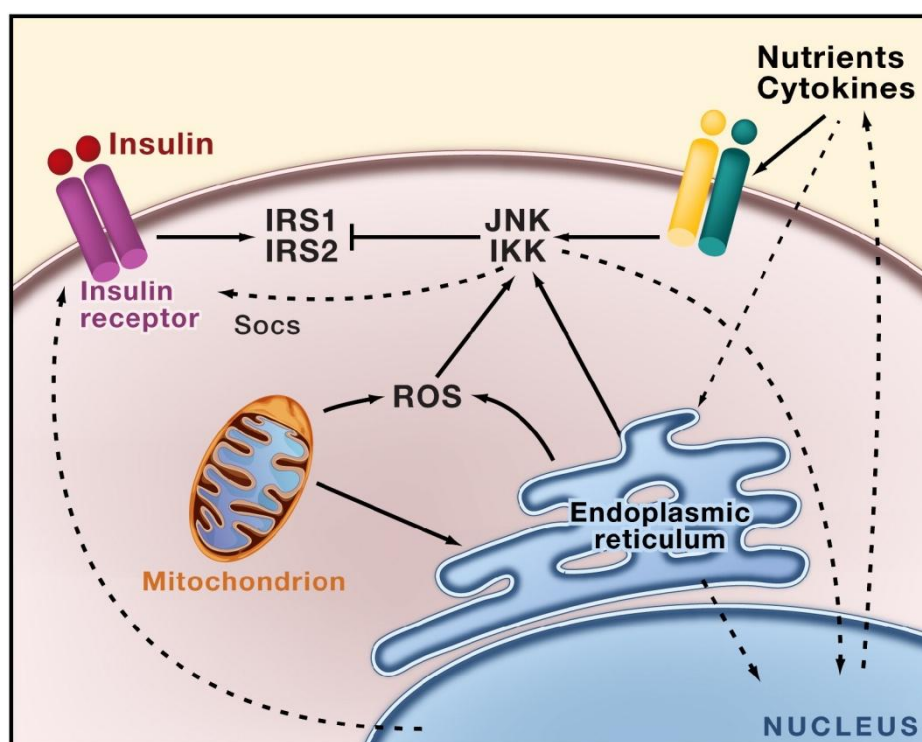
For at kroppen vår skal kunne fungere trenger den energi, og denne energien får vi fra maten vi spiser. Næringsstoffene vi får fra kosten vår er helt nødvendige for kroppens vekst og utvikling, og for å opprettholde alle kroppens funksjoner på en optimal måte. Den energien vi trenger, får vi i form av karbohydrater, fett og proteiner. Kroppen trenger også vitaminer og mineraler. Selv om næringsstoffer er helt nødvendige for å opprettholde god helse, kan de også medføre problemer dersom balansen mellom energiinntak og forbrenning forstyrres. Inntak av mer energi enn det kroppen forbrenner fører til overvekt og fedme. Ved energioverskudd kan det oppstå inflammasjon i en del vev, og da spesielt i fettvev (Wellen & Hotamisligil 2005). Kronisk inflammasjon har en viktig rolle i utviklingen av mange metabolske sykdommer. Fedme gir økt risiko for å utvikle kroniske metabolske sykdommer som type 2 diabetes, leversykdommer og aterosklerose, i tillegg til astma og noen typer kreftsykdommer (Hotamisligil 2006).

Det er viktig å forstå hvordan næringsstoffer påvirker cellene våre for å forstå de biologiske prosessene bak utviklingen av metabolske sykdommer. Kunnskap om disse molekylære mekanismene kan bidra til utviklingen av nye behandlingsmetoder mot metabolske sykdommer. Ved en økt forståelse for hvordan næringsstoffer påvirker cellene våre kan vi også få ny kunnskap om hvordan sammensetningen mellom næringsstoffene i kosten vår bør være for å bedre helsen vår.

For å registrere næringstilgang har cellene biokjemiske sensorer som registrerer nivået av de ulike næringsstoffene. Cellens mekanismer for registrering av tilgjengelige næringsstoffer kalles for ”nutrient sensing”. Begrepet ”nutrient sensing” er en samlebetegnelse på de sensorene og signalveiene som registrerer næringstilgangen til cellen. Denne registreringen fører til endringer i metabolske signalveier avhengig av hvilke næringsstoffer som er tilgjengelige (Lindsley & Rutter 2004). Nutrient sensing foregår blant annet i endoplasmatiske retikulum (ER), og den signalveien som registrerer næringsstoffer i ER kalles for mTOR (mammalian target of rapamycin) signalveien.

1.2 Metabolisme og inflammasjon

Insulin er det viktigste metabolske hormonet i pattedyr, og er helt avgjørende for metabolsk homeostase. De metabolske effektene av insulin kan bli inhibert av stress eller inflammasjon. Denne inhiberingen kan bli utløst av cytokiner, noe som indikerer at cytokiner har en regulatorisk effekt på systemisk glukose homeostase. Mange av de inflammatoriske signalveiene som inhiberer insulin-reseptor signalering blir direkte påvirket av næringsstoffer, i tillegg til cytokiner. En viktig signalvei som kobler metabolisme, inflammasjon og insulinaktivitet i metabolsk viktig vev slik som lever, muskel og fettvev er JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalveien. JNK kan bli aktivert som en respons på ulike stress-signaler, inkludert proinflammatoriske cytokiner, frie fettsyrer, ROS (reactive oxygen species) og patogener (se figur 1). Mange av disse stressignalene fører til inhibering av insulinsignalering. I musemodeller har aktivering av JNK en sentral rolle i utviklingen av metabolske sykdommer. Metabolsk stress kan registreres av cellens organeller, og dette gjelder spesielt ER og mitokondriene (Hotamisligil & Erbay 2008).

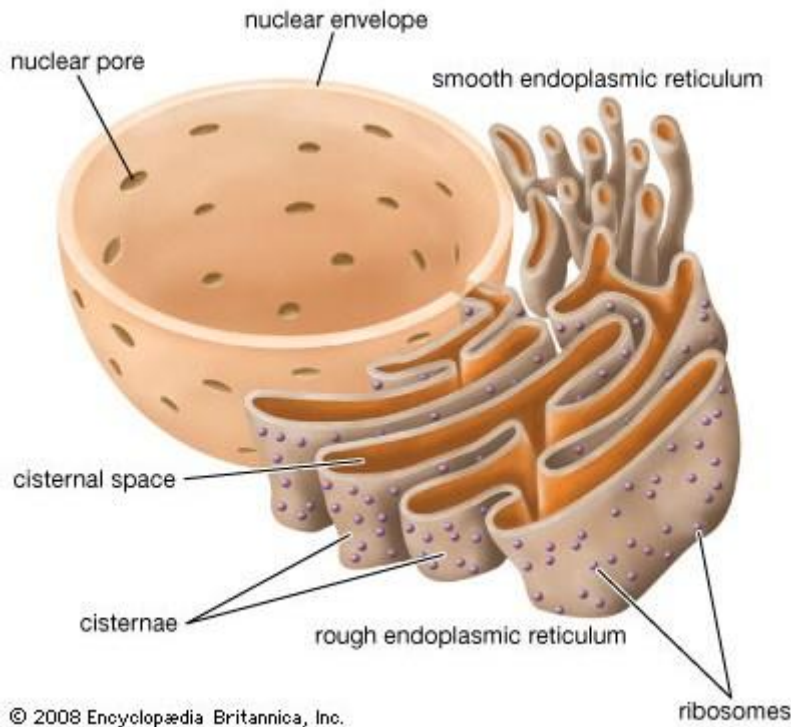


Figur 1: Figuren viser sammenhengen mellom insulinsignalering, stress-signaler og inflammasjon (Hotamisligil 2010).

1.3 Endoplasmatisk retikulum

Endoplasmatisk retikulum (ER) er den organelen i cellen som har hovedansvaret for proteinfolding og transport, og består av et membranavgrenset nettverk med hulrom i midten som kalles lumen. ER har en rekke funksjoner, men er spesielt viktig når det gjelder syntese av lipider, membranproteiner, og sekretoriske proteiner. Produksjon av transmembranproteiner og lipider som skal til ER, Golgiapparatet, lysosomene, endosomene, sekretoriske vesikler og plasmamembranen foregår i ER membranen. I tillegg til dette blir alle proteinene som skal til Golgiapparatet eller lysosomene sendt ut gjennom ER. Dette gjelder også proteiner som skal ut av cellen (sekretoriske proteiner).

Det finnes to ulike former for ER, glatt eller ru ER. Sistnevnte har ribosomer festet til cytosolsiden av membranen, noe som gjør at det blir en ru overflate. Glatt ER har ikke ribosomer festet til overflaten. I glatt ER foregår fettsyre- og fosfolipidsyntese. Begge typer ER består av et nettverk av rør og blærer, og membranen henger sammen med den ytre kjernemembranen. I ru ER blir membran- og organelleproteiner og sekretoriske proteiner syntetisert. Proteiner som blir syntetisert i cytosol, men som skal til sekretorisk transportvei, blir gjenkjent av en signalgjenkjenningsspartikkel fordi proteinet har en spesiell signalsekvens. Signalgjenkjenningsspartikkelen binder seg da til denne signalsekvensen og transporterer ribosomet til ER. Ribosomet blir da bundet til den ytre membranen av ER, og peptidet blir ført gjennom membranen mens det blir translatert ved hjelp av translokeringsproteiner i membranen. Når proteinet er ferdig syntetisert, blir det foldet i ER lumen ved hjelp av såkalte anstandsproteiner. Proteinene blir modifisert på flere måter av enzymer i ER lumen. Disse modifikasjonene er blant annet glykosylering og dannelse av disulfidbindinger. Nylig syntetiserte membranproteiner forblir i ER membranen mens proteiner som skal videre eller forbli i ER lumen akkumuleres der før de transporteres videre til golgiapparatet. ER fungerer også som et kalsium-reservoar som blir brukt til celledatering (Alberts et al. 2008).



Figur 2. Endoplasmatisk retikulum (Britannica 2008).

1.4 ER og nutrient sensing

I ER blir nivåene av kolesterol, aminosyrer og glukose registrert. Når det blir overskudd av et eller flere av disse næringsstoffene vil den signalveien som kalles for "the nutrient-responsive" mammalian target of rapamycin (mTOR) bli aktivert. Aktivert mTOR signalveien fører til oppregulering av proteinsyntese, noe som igjen øker protein translasjon og folding i ER. Dersom mengden protein blir høyere enn foldingskapasiteten til ER kan det resultere i akkumulering av ufoldede proteiner i ER. Akkumulering av ufoldede proteiner forstyrrer homeostasen til ER, og er ugunstig for cellen (Gregor & Hotamisligil 2007).

1.4.1 mTOR signalveien

TOR (target of rapamycin) er en konservert Ser/Thr kinase som regulerer cellevekst og metabolisme avhengig av miljøet rundt cellen. Rapamycin er en metabolitt som inhiberer proliferasjon og har immunsupprimerende egenskaper. mTOR ble først oppdaget som et mål (target) for rapamycin. Siden den gang har man funnet ut at mTOR er en regulator for

energihomeostase og cellefysiologi hos alle høyerestående eukaryoter (Wullschleger et al. 2006). Lipid-kinasen PI3-kinase (PI3K) og serin/threonin kinasen Akt kontrollerer mTOR gjennom G-proteinet Rheb (Ras homologue enriched in brain) og TSC (tuberous sclerosis complex) komponentene TSC1 og TSC2 (Hafen 2004). TOR finnes i to varianter; TORC1 og TORC2, og fungerer henholdsvis nedstrøms og oppstrøms fra Akt (Bhaskar & Hay 2007). TORC1 kontrolleres av Rheb som påvirker de anabolske aktivitetene som fører til vekst gjennom økt proteinsyntese. TORC1 stimulerer også translasjon ved direkte fosforylering av p70S6 kinase (S6K) og 4E-BP1. Vekstfaktorregulert TORC1 responderer i henhold til energinivå og oksygentilgang i cellen, og gjenspeiler det ekstracellulære nivået av næringsmidler. Det er foreløpig ukjent hvordan TORC2 blir regulert (Godberdhan et al. 2009).

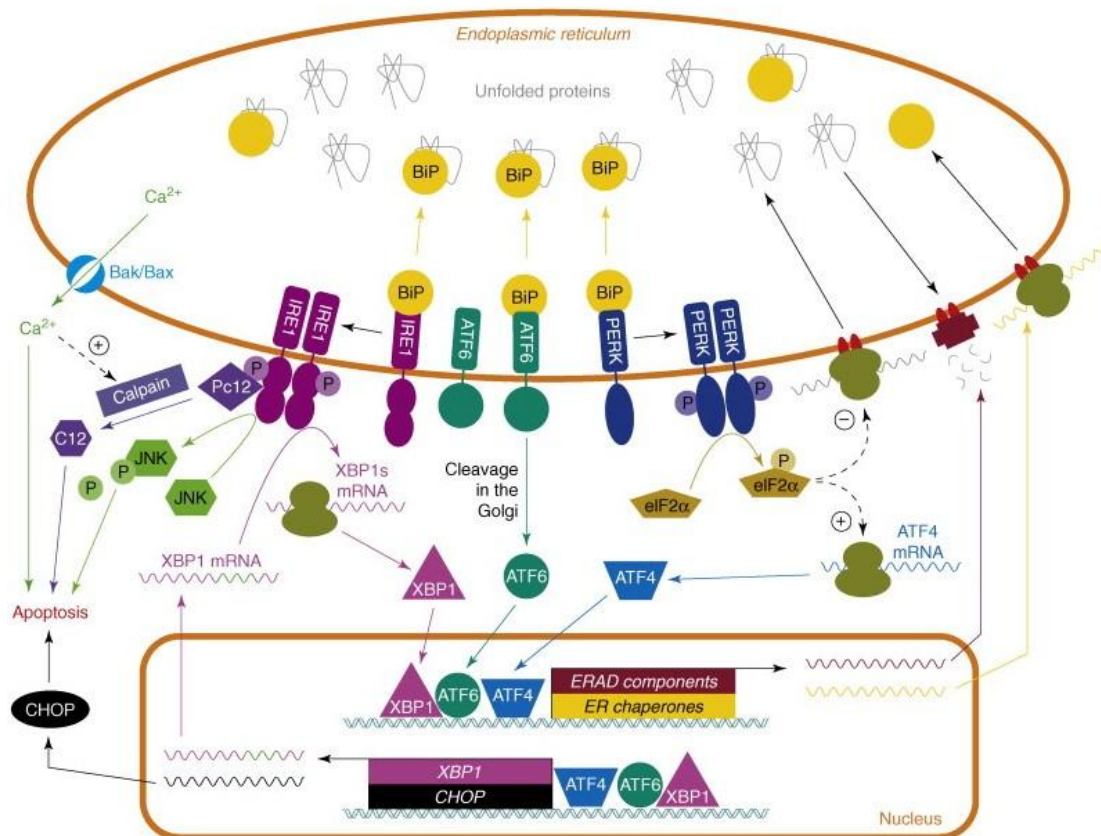
1.5 Unfolded protein response (UPR)

Dersom mengden protein blir høyere enn foldingskapasiteten til ER, kan det resultere i akkumulering av ufoldede proteiner i ER, noe som fører til såkalt ER stress. For at en celle skal kunne restituere seg fra ER-stress, må det gjenopprettes en balanse mellom proteinmengde og foldingskapasitet. Dette kan oppnås gjennom aktivering av flere signalveier som sammen sørger for gjenoppsettelse av homeostasen til ER. Disse signalveiene har en fellesbetegnelse og kalles for "Unfolded protein response", forkortet UPR.

Det finnes også andre forhold enn økt proteinsyntese og ufoldede proteiner som kan aktivere UPR. Det kan være ubalanse i kalsiumnivået i ER, glukose- og energiunderskudd, hypoksi (mangel på oksygen i blodet), patogener, noen lipider og toksiner (Hotamisligil 2010).

I eukaryote celler er overvåkingen av ER lumen og UPR-signaler mediert av tre ulike membranassosierte proteiner, PERK (PKR-like eukaryotic initiation factor 2 α kinase), IRE1 (inositol requiring enzyme 1) og ATF6 (activating transcription factor-6). De fungerer som stressensorer i ER lumen, og i et velfungerende og stressfritt ER er disse transmembranproteinene bundet av et anstandsprotein, BiP (binding immunoglobulin protein), i det intralumenale domenet. Når disse proteinene er bundet sammen, forblir de inaktive. Dersom det forekommer en akkumulering av ufoldede proteiner i ER, løsner BiP fra UPR-sensorene. Dette skjer fordi de ufoldede proteinene konkurrerer med sensorproteinene om binding til BiP.

Aktivering av UPR kan redusere ER stress ved å nedregulere proteinsyntese, øke protein degradering og øke produksjonen av anstandsproteiner som kan hjelpe ufoldede proteiner i ER til å folde seg. Ved redusert ER-stress kan homeostase gjenoppstå. Dersom dette ikke skjer, kan cellen igangsette apoptose (Hotamisligil 2010).

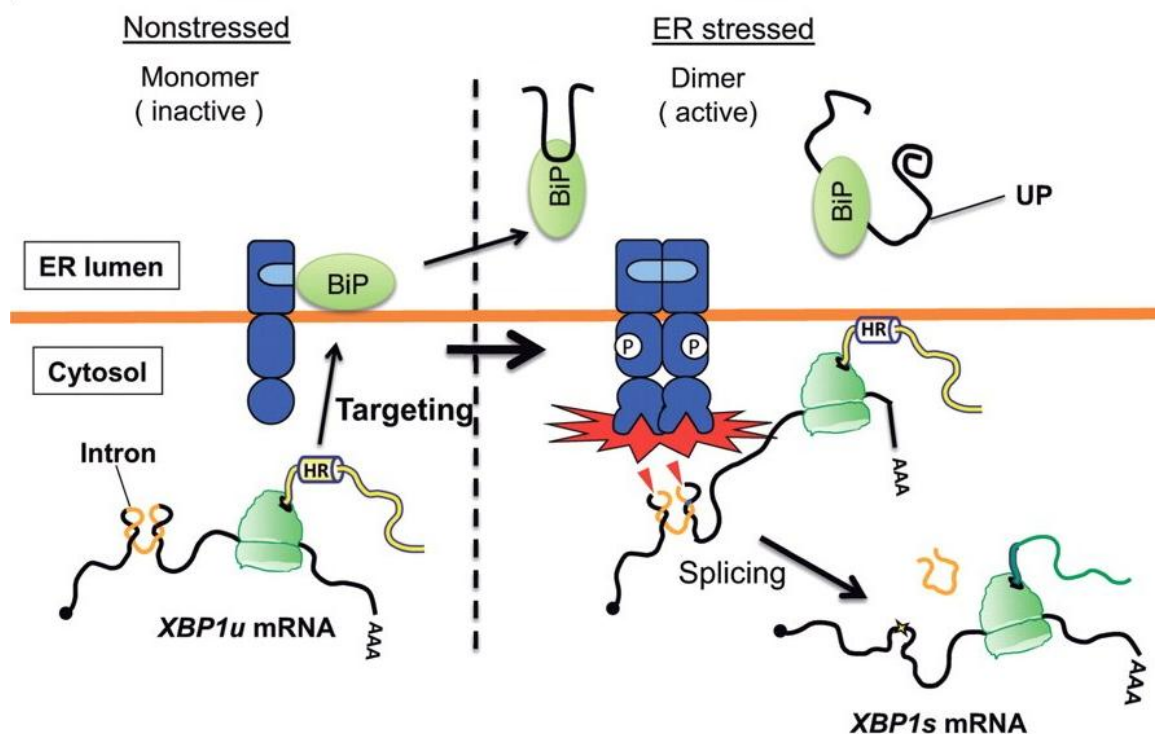


Figur 3. Figuren gir en oversikt over unfolded protein response. Det hele begynner med ufoldede proteiner i ER-lumen som fører til at BiP løsner fra stress-sensorene PERK, ATF6 og IRE1, noe som igjen medfører aktivering av en rekke signalveier. ATF6 translokteres til Golgi hvor transmembranproteinet blir kløvet, og det cytosoliske fragmentet av ATF6 fraktes til cellekjernen. Både IRE1 og PERK blir oligomerisert og autofosforlyert. PERK fosforlyerer eIF2 α , noe som gjør at proteinsyntese blir blokkert, men samtidig øker translasjonen av ATF4. ATF4 er en transkripsjonsfaktor som translokteres til kjernen, og induserer transkripsjon av gener som kan bidra til å gjenopprette ER homeostasen. ATF6 er også en transkripsjonsfaktor, og regulerer transkripsjon av ER-anstandsproteiner og Xbp1 (x-box binding protein 1). Dersom disse prosessene ikke fjerner ER-stresset, vil det føre til at cellen igangsetter apoptose. Disse prosessene kan sees til venstre i figuren og involverer blant annet proteinene Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) og Bax (Bcl-2-associated X protein) (Mandl et al. 2009).

1.5.1 IRE1 signalveien

IRE1 er den delen av UPR som er best konservert, med homologer i gjær, planter, *Drosophila*, *C. elegans* og pattedyr. IRE 1 er et type I transmembranprotein med et dimeriseringsdomene i ER lumen som kan gjenkjenne ER stress, og et domene i cytosol som har proteinkinase- og endonukleaseaktivitet (Rasheva & Domingos 2009). En teori går ut på at anstandsproteinet BiP fungerer som en negativ regulator for IRE1 aktivering slik det står beskrevet i del 1.5. IRE1 befinner seg vanligvis i passiv form fordi det er bundet til BiP som inhiberer oligomerisering av membranproteinene. Ved løsrivelse fra BiP oligomeriseres IRE1, noe som fører til aktivering av proteinet (Bertolotti et al. 2000). En alternativ teori går ut på at IRE1 selv gjenkjenner ufoldede proteiner som blir bundet til hulrommet som blir formet av oligomeriseringen i lumendomenet av IRE1. En av svakhetene ved teorien om at IRE1 blir aktivert dersom BiP løsrives, er at konsentrasjonen av BiP i ER lumen er så stor at det da eventuelt kreves store mengder ufoldede proteiner for å påvirke mengden av frie BiP. Dette er ikke tilfelle siden UPR aktiveres allerede ved små variasjoner i foldingskapasiteten til ER (Credle et al. 2005).

I begge teoriene nevnt ovenfor fører ER stress til oligomerisering og autofosforylering av IRE1, noe som igjen fører til aktivering av RNase-aktiviteten til proteinet. Det aktive IRE1 proteinet initierer en kløyving av *Xbp1* (*X-box binding protein-1*), slik at et 26bp langt intron blir fjernet (se figur 4). Fjerningen av dette intronet fører til en endring av leserammen. Etter translasjon av det kløyvde mRNAet vil *Xbp1* fungere som en transkripsjonsfaktor, og proteinet kalles aktivt *Xbp1* (Schröder & Kaufman 2005). *Xbp1* fra *Xbp1* som ikke er splittet, vil ikke fungere som en transkripsjonsfaktor, men dersom dette mRNAet blir translatert kan det fungere som en negativ feedback regulator av IRE1 signalering ved at *Xbp1* blir bundet og degradert (Yoshida et al. 2006). Spleiset, altså aktivert, *Xbp1* binder seg til spesifikke promotorelementer og aktiverer transkripsjonen av en rekke gener, inkludert ER anstandsproteiner, ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation) faktorer og faktorer som er involvert i ER membran-biogenese. Det kan også nevnes at XBP1 aktivering er en av de viktigste signalveiene i UPR for å øke foldingskapasiteten til ER og hindre ER stress (Rasheva & Domingos 2009).



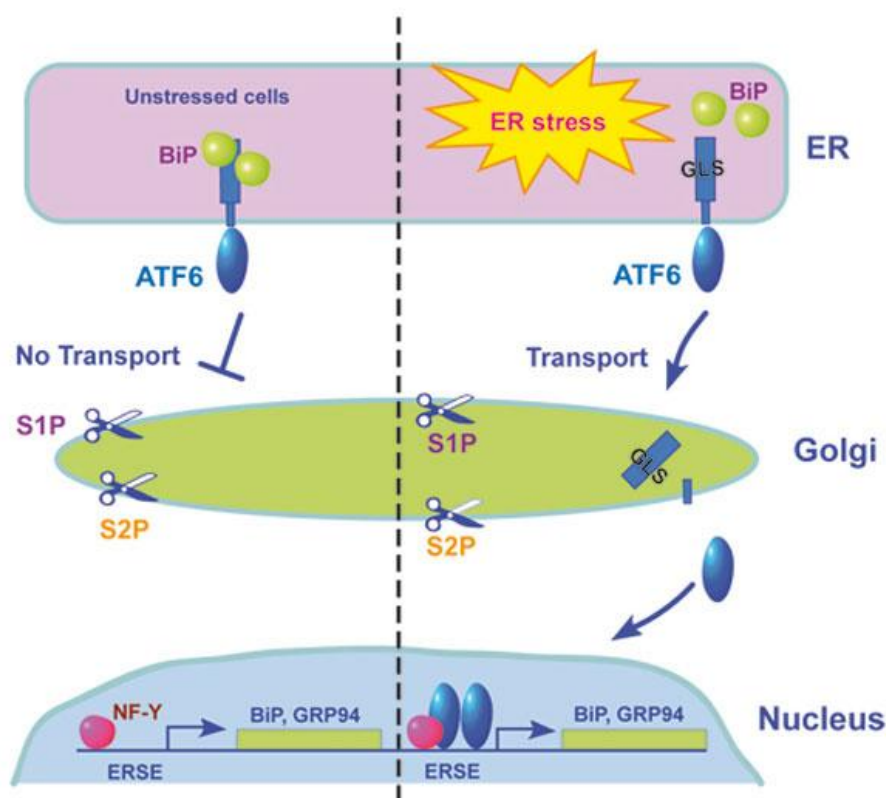
Figur 4: Figuren viser hvordan IRE1 aktiveres dersom BiP løsner ved høy konsentrasjon av ufoldede proteiner i ER. Videre kan man se at aktivert IRE1 kløyver Xbp1-mRNA (Kohno 2010).

Det finnes også en Xbp1-uavhengig signalvei nedstrøms fra IRE1 som degraderer mRNA-kodende ER proteiner for å redusere proteinmengden ved ER stress. I tillegg vil det cytosoliske domenet av IRE1 binde seg til Traf2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) som er en oppstrøms aktivator av JNK (c-Jun N-terminal Kinase) signalveien. Denne IRE1/Traf2 interaksjonen er også uavhengig av Xbp1, og den kan føre til apoptose ved vedvarende ER stress (Urano et al. 2000). Det kan også nevnes at IRE1 ikke bare aktiverer en del av UPR, men IRE1 er også en viktig regulator for å skru av UPR (Sicheri & Silverman 2011).

1.5.2 ATF6 signalveien

ATF6 er et type II transmembran-protein med en bZIP (basic-leucine zipper motif) transkripsjonsfaktor i det cytosoliske domenet (Haze et al. 1999). Ved ER-stress løsriver BiP fra ATF6 slik at golgi-lokaliseringsssekvensen kommer fram, og ATF6 blir translokert til golgi. I golgi vil en type serin-protease som kalles S1P (site-1 protease) kløyve lumen-domenet av ATF6. Den andre delen av ATF6 blir kløyvd av S2P (site-2 protease) i fosfolipid

dobbeltlaget (Schröder & Kaufman 2005). Disse proteolytiske reaksjonene frigjør det cytosoliske domenet av ATF6, som så blir translokert til kjernen hvor det fungerer som en transkripsjonsfaktor, og stimulerer ekspresjon av gener som har ER stresselementer (ERSE-I, -II), UPR-elementer (UPRE) og cAMP-responselementer (CRE) i promotoren. Disse proteinene øker degraderingen av ufoldede proteiner i ER lumen ved hjelp av ERAD og EDEM (ER degradation-enhancing α mannosidase-like protein). Førstnevnte er en signalvei som fører til ubiquitinerings av de misfoldede proteinene i ER slik at de blir ført tilbake til cytoplasma og degradert av proteasomer (Kokame et al. 2001). I tillegg regulerer ATF6 *Xbp1* ekspresjon (Wu et al. 2007).



Figur 5. ATF6 regulering ved ER stress. Både ER, golgi og kjernen er involvert i ATF6-aktivering. Ved ER-stress løsriver BiP fra ATF6 slik at golgi-lokaliseringsssekvensen kommer fram, og ATF6 blir transportert til golgi hvor proteinet kløyves av S1P og S2P. Cytosoldelen av ATF6 blir translokert til kjernen hvor den binder til ERSE. Høyresiden av figuren illustrerer stresset ER (Imgenex 2011).

1.5.3 PERK signalveien

PERK er et type I transmembranprotein hvor den cytosoliske delen av proteinet har kinase aktivitet. Det vil si at proteinet (enzymet) har mulighet til å fosforylere andre proteiner ved hjelp av ATP. Aktivering av PERK ved ER stress foregår ved en dimerisering av proteinet, og en transautofosforylering av det cytosoliske domenet. Denne dimeriseringen og transautofosforyleringen av PERK skjer dersom PERK ikke lenger er bundet til BiP (slik som ved aktivering av ATF6 og IRE1).

Dersom PERK blir aktivert fører det til en fosforylering av eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha), nærmere bestemt serin 51 på alfasubenheten av eIF2 α . Når serin 51 på eIF2 α blir fosforylert, forandrer eIF2 α seg og blir en konkurrent til eIF2B. Det gjør at dannelsen av ternary complex reduseres, noe som resulterer i redusert global proteinsyntese (Harding et al. 1999). Denne nedreguleringen av translasjon vil redusere ER stress.

Aktivering av PERK fører ikke bare til redusert global proteinsyntese, men også til økt translasjon av enkelte mRNA, som blant annet ATF4 (Activating transcription factor 4). ATF4 ligger nedstrøms for eIF2 α og er en transkripsjonsfaktor som blir aktivert dersom eIF2 α blir fosforylert (Okada et al. 2002). Økt ATF4 ekspresjon involverer to oppstrøms ORFer (open reading frames) i ATF4-mRNAet som sørger for translasjon av ATF4 (Abastado et al. 1991). Økt nivå av ATF4 fører også til aktivering av to andre transkripsjonsfaktorer, ATF3 og CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein), som sammen sørger for økt ekspresjon av gener som regulerer apoptose. CHOP ligger nedstrøms fra ATF3 (Jiang & Wek 2005). Alle disse transkripsjonsfaktorene er bZIP proteiner, og kan danne heterodimerer med andre bZIP proteiner. Det gjør at de direkte eller indirekte kan regulere ekspresjon av gener som er involvert i metabolisme og aminosyretransport, redoks-nivået i cellen, signalering og transkripsjon og apoptose (Harding et al. 2003). ATF3 og CHOP kan også indusere ekspresjon av GADD34, som fungerer som feedbackkontroll av eIF2 α kinase responsen (Wek et al. 2006).

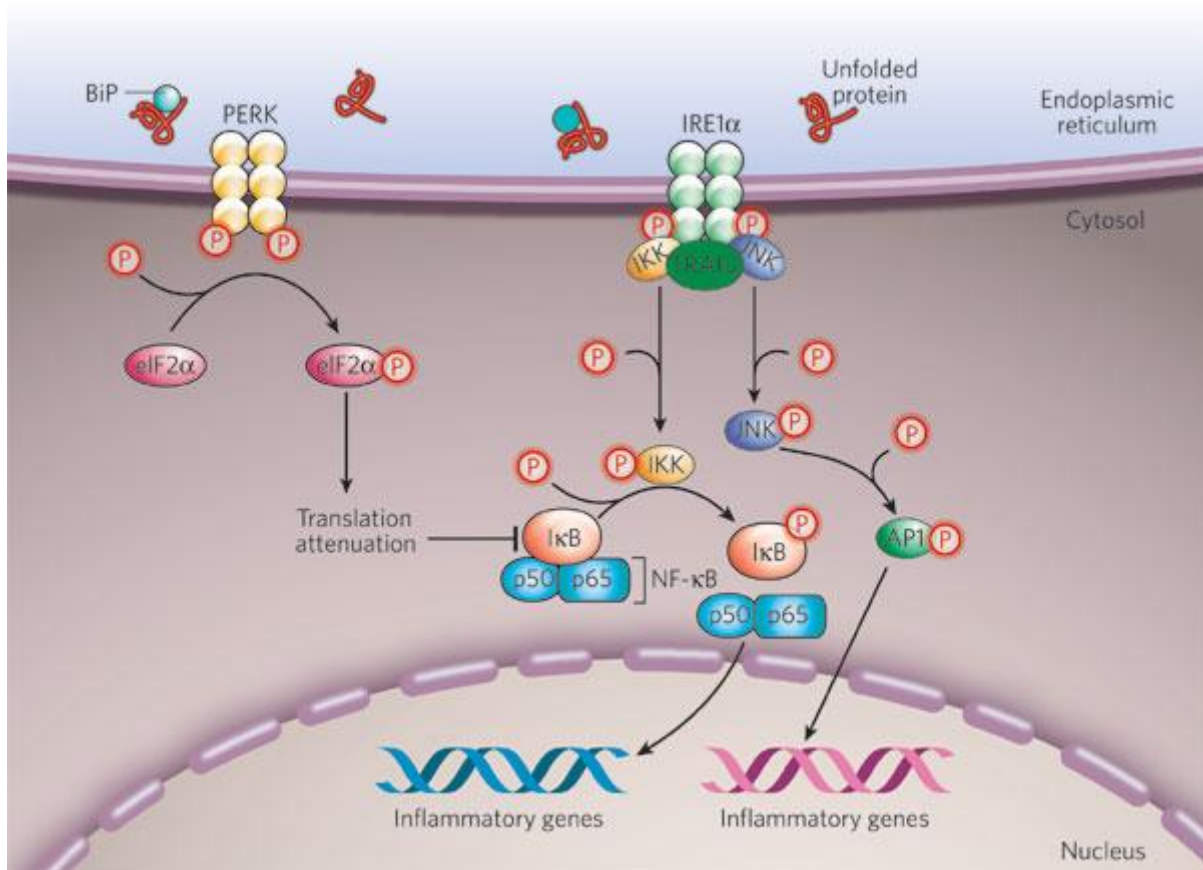
1.6 Apoptose forårsaket av ER stress

Noen ganger klarer ikke UPR å gjenopprette homeostasen i ER, og ved vedvarende stress i ER kan cellen gjennomgå apoptose. Apoptose, eller programmert celledød, er en prosess hvor cellen produserer proteiner som den trenger for å destruere seg selv. Caspaser og Bcl-2 (B-

Cell lymphoma 2) familien er viktige proteiner for denne prosessen. Caspaser er cystein proteaser, og de inngår i såkalte caspase-kaskader som bidrar til degradering av cellen. Bcl-2 proteiner fungerer som apoptoseregulatorer. For at apoptose skal kunne skje må caspasene aktiveres, og dette skjer ved at de kløyves for å danne aktive enzymer (Nakagawa et al. 2000). Aktiveringen av caspasene foregår nedstrøms for detekteringen av ER stresset. Både IRE1 og PERK er viktige i denne sammenhengen. Sistnevnte aktiverer både ATF4, ATF3 og CHOP ved vedvarende ER stress. CHOP kan indukere apoptose ved ER stress ved å nedregulere antiapoptosefaktoren Bcl-2, og oppregulere BIM/BCL2L11 (Bcl-2-like protein 11) som er proapoptotisk. CHOP kan også indukere apoptose ved å oppregulere *Ero-1*, som medierer dannelse av disulfidbindinger slik at foldingen i ER kan økes. Det dannes i tillegg et biprodukt ved denne prosessen, ROS (reactive oxygen species), som bidrar til aktivering av apoptosesignalveier (Rasheva & Domingos 2009). PERK kan også indukere en antiapoptoserespons ved å fosforylere Nrf2 som er en transkripsjonsfaktor som fremmer overlevelse ved ER stress (Cullinan et al. 2003).

IRE1 kan fremme apoptose ved å aktivere JNK-signalveien (Urano et al. 2000). De proapoptotiske Bcl-2 proteinene BAX (Bcl-2-associated X protein) og BAK (Bcl-2 homologous antagonist killer) blir skrudd på av IRE1 signalveien. IRE1, Traf2 og ASK1 (apoptosis signal regulating kinase-1) danner et kompleks som fosforylerer JNK og aktiverer apoptose, en respons som er uavhengig av *Xbp1*-spleising. Aktivering av JNK og spleising av *Xbp1* er altså to uavhengige responser (Nishitoh et al. 2002). Disse to uavhengige responsene har motsatt virkning, JNK fremmer apoptose ved ER-stress mens aktivert *Xbp1* hindrer apoptose (Lin et al. 2007).

Aktivering av PERK signalveien kan føre til aktivering av NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) signalveien ved ER stress gjennom fosforylering av eIF2 α . NF- κ B er en viktig apoptoseregulator (Deng et al. 2004). Når det gjelder IRE1-aktivering av NF- κ B kan dette skje ved at IKK (inhibitor κ B kinase) danner et kompleks gjennom adapterproteinet TRAF2 (Hu et al. 2006). ATF6 kan også regulere NF- κ B aktiviteten (Yamazaki et al. 2009). Alle disse signalene trigger apoptoseresponsene når ER stress foregår over lengre tid uten å bli nøytralisert.

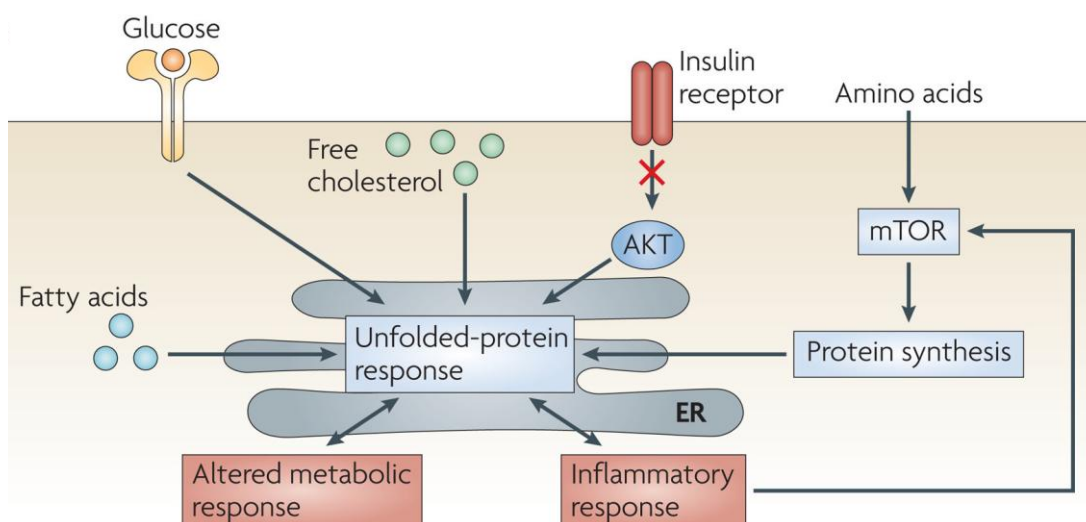


Figur 6. Figuren viser hvordan signalveiene JNK og NF- κ B aktiveres ved UPR. Siden I κ B har kortere halveringstid enn NF- κ B, vil PERK-mediert inhibering av translasjon føre til at det blir høyere konsentrasjon av NF- κ B i forhold til I κ B, NF- κ B blir derfor frigjort og kan translokere til kjernen. Ved fosforylering av IRE1 blir tumor necrosis factor- α (TNF- α)-receptor-associated factor 2 (TRAF2) rekruttert til IRE1. IRE1-TRAF2 komplekset interagerer med JNK og/eller I κ B kinase (IKK), og aktiverer disse kinasene. Aktivert JNK fosforylerer transkripsjonsfaktoren AP1 (activator protein 1). Aktivert NF- κ B og AP1 transporteres til kjernen hvor de induserer transkripsjon av gener som er involvert i inflammatoriske responser (Zhang & Kaufman 2008).

Overføring av kalsium fra ER lumen til mitokondriene er en viktig mekanisme for å regulere apoptose (Pizzo & Pozzan 2007). Proteinene Bak og Bax regulerer denne frigjøringen av kalsium fra ER, og kan i tillegg frigjøre proapoptotiske faktorer fra mitokondriene (Rasheva & Domingos 2009). En annen viktig faktor for overføring av kalsium fra ER til mitokondriene ved ER stress er sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1 (S1T) som blir induisert gjennom PERK signalveien (Chami et al. 2008). Kalsiumoverskudd i mitokondriene induserer altså aktivering av apoptosesignalveien i mitokondriene.

1.7 Nutrient sensing og UPR

UPR-signalering, og da spesielt PERK signalveien, har en viktig rolle når det gjelder opprettholdelsen av glukosehomeostasen i cellene. Aktivering av UPR er nødvendig dersom det oppstår uregelmessigheter i glukosenivået (Scheuner et al. 2001). Autofosforylering av IRE1 kan skje direkte dersom proteinet utsettes for kraftig glukosestimulering. I tillegg kan en rekke UPR-induserte transkripsjonsendringer oppstå ved nedbryting eller syntese av glukose (Lipson et al. 2006). Dersom IRE1 forblir aktivert på grunn av at proteinet konstant blir eksponert for høye glukosekonsentrasjoner, vil dette aktivere både JNK og IKK-NF κ B signalveiene, som er viktige signalveier for koblingen mellom inflammasjon og metabolske signaler (Ron & Walter 2007). ER er også viktig når det gjelder lipidmetabolisme, og frie fettsyrer kan trigge ER-stress i leverceller, cardiomyocytes og makrofager (Ota et al. 2007).



Figur 7. Figuren illustrerer sammenhengen mellom næringsmidler, UPR, metabolisme og inflammasjon (Hotamisligil & Erbay 2008).

1.8 UPR og metabolske sykdommer

ER stress har vist seg å ha en viktig rolle når det gjelder metabolske sykdommer. Økt ER-stress i lever og fettvev hos overvektige mus kan føre til utvikling av systemisk insulin resistens og type 2 diabetes. Denne insulinresistansen skjer ved at IRS1 (insulin receptor substrate 1) fosforyleres gjennom IRE1-aktivert JNK1 (Özcan et al. 2004). Dette viser hvor viktig integreringen av næringsmidler og inflammatoriske responser er for metabolsk

homeostase, og hvordan ER stress kan føre til kroniske metabolske sykdommer. Disse funnene kan brukes til å utvikle nye medisiner som kan regulere ER stressresponsene, og dermed hindre utviklingen av diabetes type 2 hos overvektige mennesker. En slik medisin kan tenkes å fungere forebyggende for mennesker med høy risiko for å utvikle diabetes type 2, eller behandlende hos mennesker som allerede har utviklet sykdommen (Özcan et al. 2004).

1.9 UPR-regulering av cytokinproduksjon

Cytokiner er små signalproteiner som binder til spesifikke reseptorer på celleoverflatene, og virker som kommunikasjonsmidler mellom celler. Virkningen er parakrin eller autokrin, noe som vil si at de virker på nærliggende celler, eller på produsentcellen selv. En av egenskapene til cytokinene er at de ofte har overlappende effekter, men ett enkelt cytokin kan utløse mange forskjellige reaksjoner i en celle. Når det gjelder UPR har det blitt påvist at aktivering av denne stressreaksjonen øker ekspresjon av enkelte cytokiner, deriblant TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) og interleukin-6 (IL-6) (Carroll et al. 2010). UPR er også en viktig regulator for interleukin-8 (IL-8) produksjon (Gargalovic et al. 2006). IL-8 produseres av en rekke ulike celletyper og har en rekke ulike funksjoner, deriblant cellerekuttering (t-celler og nøytrofiler), sårheling og angiogenesis (utvikling av nye blodårer) (Bosch et al. 2002).

1.10 Preparater som induserer UPR

Det finnes ulike preparater som kan brukes for å indusere UPR. Thapsigargin og tunicamycin blir ofte brukt i studier av UPR. Sistnevnte er et antibiotikum som inhiberer det første steget i biosyntesen av N-koblede oligosakkarider i celler. Denne hemmingen av glykosylering i ER fører til akkumulering av misfoldede proteiner i ER lumen (Huong et al. 2011). Thapsigargin er en tumor promoter i pattedyr, og utvinnes fra planten *Thapsia garganica*. Thapsigargin forstyrrer kalsiumhomeostasen i ER fordi stimulering med thapsigargin fører til frigjøring av kalsium fra ER lumen. Dette skjer fordi thapsigargin hemmer den ATP-avhengige Ca^{2+} pumpe i ER slik at den mister muligheten til å pumpe kalsium inn i ER lumen og ER tappes derfor for kalsium (Li et al. 2000).

1.11 Cellelinjene TERT og 293T

Mesenkymale stamceller (MSC) er en type multipotente stamceller som befinner seg i benmargen og som kan differensieres til osteoblaster, adipocytter og chondrocytter (Abdallah et al. 2005). Under celledeling forkortes telomerene for hver gang på grunn av at DNA replikasjonskomplekset ikke klarer å kopiere hele det telomeriske DNAet. Dette fører til at cellen får nedsatt proliferasjonspotensial og en nedsatt differensieringsevne. For at telomerlengden skal kunne opprettholdes etter celledeling trenger cellen et enzym som heter telomerase. Telomerase er et ribonukleært proteinkompleks som består av RNA (hTR) som fungerer som et templat, og en katalytisk subenhet (hTERT) som har en revers transkriptaseaktivitet. De fleste celler, inkludert humane mesenkymale stamceller (hMSC), mangler TERT. Uten TERT vil genene i enden på kromosomene bli ødelagte og føre til cellesyklusarrest. Gjennom overekspressjon av hTERT i hMSC kan telomeraseaktiviteten bli gjenopprettet slik at livslengden til cellekulturen øker. Derfor har det blitt utviklet en cellelinje som er transdusert med et gen for TERT for å kunne opprettholde differensierings- og proliferasjonspotensiale i kultur, hMSC-TERT (Simonsen et al. 2002).

Cellelinjen 293T stammer fra humane embryonale nyreceller som er transfektert med DNA fragmenter fra adenovirus 5 (Ad5) (Graham et al. 1977). Bokstaven t i 293T står for SV40 Large T-antigen som er et proto-onkogen som er hentet fra polyomavirus SV40 (He et al. 1998).

2 Materialer

2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter

Teknikk	Utstyr/instrument	Produsent
Sentrifuger	Digicenzo-R	Orto Alresa
	BIOfuge pico	Heraeus
	Megafuge 1.0	Heraeus
Mikroskop	Leica DFC 420	Leica
Celledyrking	250 mL cellekulturflasker	Becton Dickinson Labware
	6 brønns plater	Falcon
	24 brønns plater	Falcon
	Coulter Z1 (partikkelteller)	Coulter Electronics Ltd
	Steril-cycle CO2 incubator	Thermo Scientific
	Sterilbenk	Biowizard
SDS-PAGE	Mini-PROTEAN 3	BioRad Laboratories
	Power Pac 300	BioRad Laboratories
Westernblotting	Semi-Dry Transfer unit	Hoefer
	Amersham Hybond	GE-Healthcare
	Whatmann kromatografipapir	Whaman international ltd.
	Clear Blue X-Ray-film	Thermo Scientific
ELISA	Sunrise Absorbance Reader	TECAN
	96 Well EIA/RIA Plate	Costar

2.2 Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
2-merkaptoetanol	Sigma
ABTS Di-Ammonium	Roche
Akrylamid	BioRad Laboratories
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Bicarbonate	Merck
Bromfenolblått	Merck
Carbonate	Merck
Developer G150	AGFA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma
Ethidiumbromid	SIGMA
Glycerol 98 %	VWR International
Glycin	SIGMA
Hydrogenperoksyd	Apotek
Metanol	VWR International
Monotioglycerol	SIGMA
Natriumfluorid (NaF)	KEBO Lab
Natriumklorid	Merck
NP-40	Calbiochem
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (tween 20)	Sigma
Protein standard: Precision plus protein, Dual Color	BioRad Laboratories
Rapid Fixer G354	AGFA
Saltsyre (HCL)	MERCK
Skummet tørrmelk	Normilk AS
Sodium dodecylsulfat (SDS)	SIGMA
Sodium orthovanadate	SIGMA
Streptavidin-HRP conjugate	SouthernBiotech
TEMED	BioRad Laboratories
Thapsigargin	Sigma-Aldrich
TNFα	Immunotools
Trizma base	SIGMA
Tunicamycin	Sigma-Aldrich

2.3 Analysesett

Navn	Produsent
Interleukin 8, matced pair for ELISA	ImmunoTools
Nuclear Extract Kit	Active Motif

2.4 Medier og løsninger

Navn	Produsent
BSA (Rinderalbumin 30%)	Biotest
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories
Føtalt kalveserum	PAA Laboratories
Gentamicin Sulfat 50 mg/ml	Bio Whittaker
Ikke-essensielle aminosyrer (100x)	PAA Laboratories
Natriumpyruvat	PAA Laboratories
RPMI 1640 + L-Glutamin	PAA Laboratories
Trypsin EDTA (1X)	PAA Laboratories
Monothioglycerol	Sigma

2.5 Antistoff

Navn	Produsent
Anti ATF4	AbD Serotec
Anti eIF2 α	Cell Signaling
Anti-fosfo eIF2 α	Cell Signaling
Anti-fosfo PERK	Cell Signaling
Biotinylated detector	ImmunoTools
Coating antibody	ImmunoTools
Geit anti-kanin	Southern Biotechnology
Kanin anti-geit	Southern Biotechnology

2.6 Oppskrifter

2.6.1 Cellaarbeid

RPMI 1640 med 10% kalveserum:

500 ml RPMI 1640

50 ml inaktivert kalveserum (FCS)

240 µl 50 mg/ml gentamycin

5,0 ml natriumpyruvat

5,0 ml ikke-essensielle aminosyrer (100x)

25 µl 1M monotioglyserol

RPMI 1640 med 1 % kalveserum (sultemedium):

Likt som ovenfor bortsett fra at det tilsettes 5 ml FCS istedenfor 50 ml.

Innfrysningsmedium:

100 ml RPMI 1640 med 10 % FCS

20 ml DMSO

2.6.2 SDS-PAGE

Lyseringsbuffer:

10 mM Tris-HCL pH 7,4

0,15 M NaCl

1 mM EDTA

1 % NP-40

1 mM Natriumorthovanadat

50 mM NaF

Proteasehemmere (1mg/ml leupeptin, 1mg/ml Antipain, 1 mg/ml Pepstatin A, 1 mg/ml Chymostatin)

Lysisbuffer tilsatt proteasehemmere kan oppbevares i kjøleskap i 14 dager.

2x samplebuffer

0.5 M TrisHCl, pH 6.8 25 ml

10% SDS 40 ml

Glycerol 20 ml

Bromphenolblue 0.2 mg

Deionized H₂O 15 ml

Bruksløsning ved reduserende gel: 9 ml 2x samplebuffer tilsettes 1 ml 2-mercaptoetanol

Materialer

10x Elektroforesebuffer

25 mM Tris (FW 121.1)	30.0 g
192 mM Glycin	144.0 g
10% SDS	10.0 g
Deionized H ₂ O	til 1000 ml

Bruksfortynning: fortynnes til 1X med deionisert H₂O

Konsentrerende gel, 4 % (2 geler):

0,670 ml Akrylamid
1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8
50,0 µl 10 % SDS
3,00 ml dH ₂ O
25,0 µl 10 % APS
2,50 µl TEMED

Separerende gel, 10 % (2 geler):

3,3 ml Akrylamid
2,5 ml 1,5 Tris pH 8,8
0,10 10% SDS
4,0 ml dH ₂ O
50 µl 10% SDS
3,3 µl TEMED

2.6.3 Western blotting

10x Transferbuffer (1 L):

25 mM Tris (FW 121.1)	30.0 g
192 mM Glycin	144.0 g
Deionized H ₂ O	til 1000 ml

Bruksløsning (1L):

100 ml 10x Transferbuffer
100 ml Metanol
800 ml Deionized H ₂ O

Materialer

10x TBS, pH 7.4(1L):

Tris (FW 121.1)	31.5 g
NaCl	90.0 g
HCl	til pH 7.4
Deionized H ₂ O	til 1000 ml

Bruksløsning TBS m/ 0.1 % Tween 20:

100 ml 10x TBS
900 ml Deionized H ₂ O
1 ml Tween 20

Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk/BSA:

100 ml bruksløsning TBS m/0,1 % Tween 20

5,0 g tørrmelk/BSA

2.6.4 ELISA

Coating-buffer:	100 mM Carbonate/bicarbonate buffer, pH 9,6
PBS:	10 mM Phosphate buffered saline, pH 7,3
Blokkeringsbuffer:	PBS med 5 % BSA
Vaskebuffer:	PBS med 0,01 % TWEEN-20
Fortynningsbuffer til prøver og standard:	Medium med 5 % kalveserum
Fotynningsbuffer:	PBS med 1 % BSA og 0,05 TWEEN 20
Streptavidin-HRP konjugat:	Streptavidin-poly-HRP 1:5000
Substratløsning:	ABTS med H ₂ SO ₄

3 Metoder

3.1 Celloarbeid

Cellelinjer: hMSC-TERT, 293T

Cellene ble oppbevart i celleinkubator med konstant temperatur på 37 °C, 5 % CO₂ og 100 % luftfuktighet. Alt celloarbeid ble utført i sterilbenk.

3.1.1 Celledyrking

Materialer:

Cellekulturflasker, medium med 10 % kalveserum, celleinkubator, telleinstrument, trypsin-EDTA

Prosedyre:

1 million celler ble sådd ut i T75 sterilflasker i 15 ml medium med 10 % føtalt kalveserum (FCS). Cellene fikk vokse i 3-4 dager til de var 80 % konfluente, deretter ble de splittet. Ved splitting ble mediet fjernet, og cellene vasket med steril PBS. For at de adherente cellene skulle løsne fra flasken ble det tilsatt 2,5 ml trypsin-EDTA. Flasken ble deretter satt i inkubatorskap i 10-12 minutter til cellene løsnet fra flasken. Trypsineringen ble stoppet ved å tilsette 5 ml medium med kalveserum. Deretter ble cellene sentrifugert ved 13000 rpm i 10 minutter. Cellene ble så resuspendert i medium, som regel 1ml, men mer dersom celleantallet var høyt. Antall celler ble bestemt ved å fortynne 20 µl cellesuspensjon i 10 ml tellevæske. Partikkeltelleren var innstilt slik at partikler mellom 4 og 12 µm ble telt.

3.1.2 Tining av celler

Materialer:

Medium med 10 % kalveserum

Prosedyre:

Ampullen med celler ble raskt tint ved 37°C til det var en liten isklump igjen i ampullen. Cellene ble så overført til et rør med 10 mL medium og sentrifugert i 10 min. ved 13000 rpm. Deretter ble supernatanten sugd av og cellepelletten resuspendert i medium og sådd ut i en flaske.

3.1.3 Frysing av celler

Materialer:

Innfrysningsmedium, cryorør, medium med 10 % kalveserum

Prosedyre:

Cellene ble sentrifugert ved 13000 rpm i 10 min. og resuspendert i medium. Det ble deretter tilsatt et likt volum innfrysningsmedium under røring før cellene ble overført til cryorør. Cellene ble fryst inn ved -80°C over natt. Neste dag ble cellene overført til nitrogentanken. Antall celler som ble fryst ned var mellom 4 og 6 millioner.

3.2 Separering og detektering av proteiner

3.2.1 Stimulering og lysering av celler

Materialer:

Medium med 10 % eller 1 % kalveserum, lyseringsbuffer, Tunicamycin, Thapsigargin, 2x SDS prøvebuffer, 24 brønns plate.

Prosedyre:

Celler ble platet ut i en 24 brønners plate med $4 \cdot 10^5$ celler per brønn. Cellene ble stimulert med thapsigargin eller tunicamycin (se tabell 1). Etter endt stimulering ble mediet fjernet og 50-100µl lyseringsbuffer tilsatt i hver brønn. Platen ble inkubert på is i 30 minutter før lysatene ble overført til eppendorfrør, og sentrifugert i 10 minutter ved 15000 g og 4°C. Supernatantene ble overført til nye eppendorfrør og tilsatt likt volum samplebuffer. Rørene ble så kokt på varmeblokk ved 100°C i 5 minutter. Prøver som ikke ble benyttet direkte til SDS-page, ble frosset ned ved -20°C.

Tabell 1: Tabellen viser hvilke preparater som har blitt brukt til cellestimulering, samt hvilke konsentrasjoner og stimuleringstider som har blitt brukt.

Stimulering	Konsentrasjon	Stimuleringstid	Cellelinje
TNFα	20 ng/ml	24 timer	TERT
Tunicamycin	1 μ g/ml	2, 4, 6, 8, 24, 48 t.	TERT og 293T
	2 μ g/ml	2, 4, 6, 8, 24, 48 t.	TERT og 293T
	4 μ g/ml	2, 4, 6, 8, 24, 48 t.	TERT og 293T
Thapsigargin	0,25 μ M	2, 4, 6, 8 t.	TERT og 293T
	1 μ M	2, 4, 6, 8 t.	TERT og 293T
	1 μ M	15, 30, 45, 60 min.	293T
	1 μ M	30 min. int. til 3,5 t.	TERT
	1 μ M	60 min.	TERT og 293T
	2 μ M	60 min.	TERT og 293T
	3 μ M	60 min.	TERT og 293T
	4 μ M	60 min.	TERT og 293T
	5 μ M	60 min.	TERT og 293T
	0,5 μ M	60 min.	TERT og 293T
	1 μ M	60 min.	TERT og 293T
	2 μ M	60 min.	TERT og 293T
	3 μ M	60 min.	TERT og 293T
	4 μ M	60 min.	TERT og 293T
	5 μ M	60 min.	TERT og 293T
	6 μ M	60 min.	TERT og 293T
	7 μ M	60 min.	TERT og 293T
0,5 μ M	90 min.	TERT og 293T	
1 μ M	90 min.	TERT og 293T	
2 μ M	90 min.	TERT og 293T	
3 μ M	90 min.	TERT og 293T	
4 μ M	90 min.	TERT og 293T	
5 μ M	90 min.	TERT og 293T	
6 μ M	90 min.	TERT og 293T	
7 μ M	90 min.	TERT og 293T	
Forskolin	10 μ M	15, 30, 45, 60 min.	293T
Orthovanadate	0,1 M	10 min.	TERT og 293T

3.2.2 Stimulering av celler, kjerneisolering og lysering av kjerner

Materialer:

Kjerneisolerings kit fra Active Motif, Trypsin EDTA, RPMI med 10 % og 1 % kalveserum, thapsigargin, tunicamycin, 24 brønns plate.

Prosedyre:

Det ble platet ut $2 \cdot 10^6$ celler per brønn i en 6 brønners plate. Cellene ble stimulert med thapsigargin eller tunicamycin (se tabell 1). Protokollen fra Active Motif ble fulgt for isolering og lysering av cellekjerner.

3.2.3 Natrium dodecylsulfat polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE)

Materialer:

Separerende og konsentrerende gel, elektroforesebuffer, proteinstandard, oppsett for gelkjøring

Prosedyre:

SDS-PAGE er en metode for å separere proteiner i en gel. Proteinene blir separert på bakgrunn av størrelse. Det ble applisert 5 μ l proteinstandard i den første brønnen, og i de andre brønnene ble det applisert 20 μ l av de ulike prøvene. Hver gel ble kjørt med 20 mA i ca. 1 time til proteinfronten nådde enden av gelen.

3.2.4 Western blotting

Materialer:

PVDF-membran (Polyvinyliden difluorid-membran), Whatmanpapir, metanol, proteinoverføringsbuffer, Semi-dry transfer unit, blokkeringsbuffer, primærantistoff, sekundærantistoff, ECL (Enhanced Chemo Luminescence) og Clear Blue X-Ray-film.

Tabell 2: Tabellen viser hvilke primær- og sekundærantistoffer som ble brukt, og i hvilke konsentrasjoner de ble brukt. Tabellen viser også hvilke blokkeringsbuffer som ble brukt og fosforyleringssetene til de ulike antistoffene.

Primærantistoff	Fosforylerings-seter	Blokkeringsbuffer til primærantistoff	Sekundær-antistoff	Blokkeringsbuffer til sekundærantistoff
Anti-eIF2 α (1:1000)		Blokkeringsbuffer med 5 % BSA	Geit anti-kanin IgG-HRP (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk
Anti-p-eIF2 α (1:1000)	Ser51	Blokkeringsbuffer med 5 % BSA	Geit anti-kanin IgG-HRP (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk
Anti-p-PERK (1:1000)	Thr980	Blokkeringsbuffer med 5 % BSA	Geit anti-kanin IgG-HRP (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk
Anti-ATF4 (1:1000)		Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk	Kanin anti-geit IgG-HRP (1:4000)	Blokkeringsbuffer med 5 % tørrmelk

Prosedyre:

Proteinene som ble separert ved gelelektroforese ble overført til en PVDF-membran ved halvtørr overføring. Dette ble gjort ved hjelp en Semi-Dry Transfer unit som overfører proteinene fra gelen til en membran ved hjelp av strøm. Først ble den konsentrerende gelen fjernet, og deretter ble den separerende gelen lagt i proteinoverføringsbuffer. PVDF-membranen ble fuktet i metanol i 20 sekunder og deretter lagt i proteinoverføringsbuffer. Åtte filterpapir per membran ble fuktet i proteinoverføringsbuffer. Først ble det lagt fire filterpapir

på blotteren, deretter membranen, så gelen, og til slutt fire nye filterpapir på toppen. Overføringen av proteinene fra gelen til membranen foregikk i 1 time ved 65mA per gel/membran.

Etter overføringen ble membranen overført til blokkeringsbufferen. Blokkeringen foregikk i 1 time ved romtemperatur på risting for å hindre uspesifikk binding mellom membran og antistoff. Etter blokkeringen ble primærantistoff tilsatt og inkubert på kjølerom over natt på vipper. Dagen etter ble membranen vasket med TBS m/Tween i minst 3 x 10 mintutter før membranen ble inkubert med sekundærantistoff i 1 time på risting. Deretter ble membranen på nytt vasket i TBS m/Tween. Ved fremkalling ble det benyttet et ECL-substrat (luminol) for pepperrot peroksidase (HRP) som var konjugert til sekundærantistoffene. Se tabell 2 ovenfor som angir hvilke blokkeringsbufferer og konsentrasjoner som ble benyttet til de ulike primær- og sekundærantistoffene.

3.3 Måling av cytokinproduksjon

3.3.1 Stimulering av celler

Materialer:

TNF- α , thapsigargin, medium med 10 % eller 1 % kalveserum, 24 brønns plate.

Prosedyre:

Cellene ble platet ut i en 24 brønns plate med 4×10^5 celler per brønn. Etter at cellene hadde festet seg (etter 4-5 timer), ble mediet med 10 % kalveserum byttet ut med et sultemedium tilsatt 1 % kalveserum. Cellene ble serumsultet natten over før stimuleringen ble startet.

Cellene ble stimulert med 20 ng/ml TNF- α i 24 timer, eller med thapsigargin i konsentrasjonene 1 μ M og 4 μ M i 4 timer. Etter endt stimulering ble mediet høstet fra de ulike brønnene.

3.3.2 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Materialer:

96 brønners plate, coating buffer, PBS, RPMI med 10 % og 1 % kalveserum, blokkeringsbuffer, fortynningsbuffer, Streptavidin-HRP konjugat, Substratløsning, coating antistoff, biotinykert antistoff.

Prosedyre:

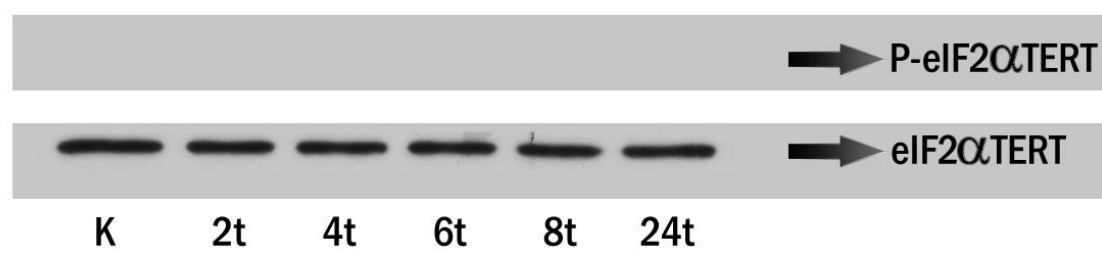
Coating antistoff ble fortynnet (1:1000) i coating buffer, og det ble tilsatt 100 µl i alle brønnene. Platen ble inkubert over natt ved 4°C. Dagen etter ble platen vasket fem ganger med PBS. Deretter ble platen blokkert med 200 µl blokkeringsbuffer per brønn i 1 time ved romtemperatur før en ny vaskeprosess ble foretatt. Prøvene ble fortynnet i medium og tilsatt brønnene, 100 µl per brønn, og innkubert i 1 time ved romtemperatur. Platen ble på nytt vasket, og deretter ble den inkubert med 100 µl biotinykert antistoff per brønn. Det biotinykerte antistoffet ble fortynnet 1:1000 i fortynningsbuffer. Så ble det foretatt enda et vasketrinn før det streptavidin-HRP konjugerte substratet ble tilsatt til brønnene, 100 µl per brønn. Til slutt ble absorbansen lest av ved hjelp av Sunrise Absorbance Reader.

4 Resultater

4.1 Detektering av UPR ved stimulering med tunicamycin

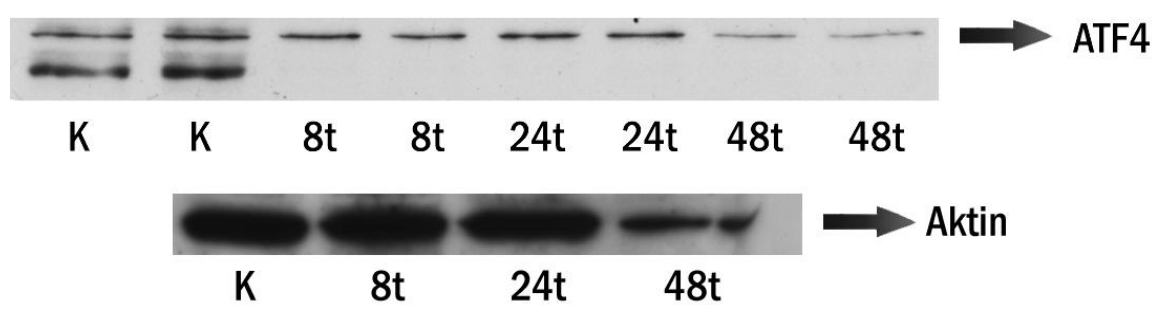
Målet for oppgaven var etablering av avlesningsystemer for deteksjon av unfolded protein response (UPR). Den initielle prosessen av UPR har to hovedmål; stoppe translasjonen og inducere cellesyklus arrest i G1. Disse tidlige hendelsene er kontrollert av PERK. Det ble først sett på eIF2 α som er et sentralt protein i PERK signalveien. eIF2 α blir fosforylert av PERK dersom PERK er aktivert. Fosforylert eIF2 α resulterer i redusert global proteinsyntese, samtidig som det fører til økt translasjon av transkripsjonsfaktoren ATF4. Fosforylert eIF2 α er et av de viktigste proteinene for å redusere ER-stress, og er en mye brukt markør for å detektere UPR (Cawley et al. 2011). Fosforyleringsnivået av eIF2 α etter stimulering med tunicamycin ble undersøkt. Tunicamycin hemmer N-linked glykosylering, som er viktig for folding av proteiner i ER, og vil derfor føre til opphopning av ufoldede proteiner i ER.

TERT celler ble stimulert med konsentrasjonene 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ og 4 $\mu\text{g/ml}$ tunicamycin i henholdsvis 2, 4, 6, 8, 24 og 48 timer. Stimuleringene ble utført i RPMI med både 10 % kalveserum og RPMI med 1 % kalveserum. 1 % kalveserum (sultemedium) brukes for å få ned bakgrunnsfosforyleringen i cellene. Ingen av behandlingene førte til endringer av fosforyleringsnivået til eIF2 α (figur 8). Siden tunicamycin ikke ga noen fosforylering av eIF2 α i TERT celler, ble det samme oppsettet forsøkt i cellelinjen 293T for å kontrollere om systemet fungerer, da andre har vist at stimulering med tunicamycin aktiverer UPR i 293T celler (Cawley et al. 2011). I vårt forsøk ble det ikke påvist økt fosforylering av eIF2 α i 293T celler ved stimulering med tunicamycin.



Figur 8. Figuren viser immunoblot med anti-fosfo-eIF2 α og anti-eIF2 α fra TERT-lysate der cellene har blitt stimulert med 2 μ g/ml tunicamycin i henholdsvis 2, 4, 6, 6 og 24 timer. Det er også tatt med en kontroll fra ustimulerte celler. Stimulering med tunicamycin gir ingen fosforylering av eIF2 α . Mengde eIF2 α holder seg konstant ved alle stimuleringstidene.

For å se på om det kunne være problemer med anti-fosfo-eIF2 α antistoffet ble det sett på ATF4 som er en transkripsjonsfaktor, og ligger nedstrøms for eIF2 α . Fosforylering av eIF2 α fører til økt translasjon av ATF4 (Wek et al. 2006). Ved å se på ATF4 kan man derfor indirekte se om eIF2 α er fosforylert eller ikke. For å se på ATF4, som befinner seg i cellekjernen, ble det isolert cellekjerner fra TERT og 293T. Vi klarte ikke å påvise økt ekspresjon av ATF4 etter stimulering med tunicamycin (figur 9).



Figur 9. Figuren viser immunoblot med anti-ATF4 fra TERT-lysate der cellene har blitt stimulert med 2 μ g/ml tunicamycin i 8, 24 og 48 timer. Stimulering med tunicamycin ser ikke ut til å øke mengden ATF4 i cellene. Det ser derimot ut til at mengde ATF4 minsker ved vedvarende stimulering med tunicamycin.

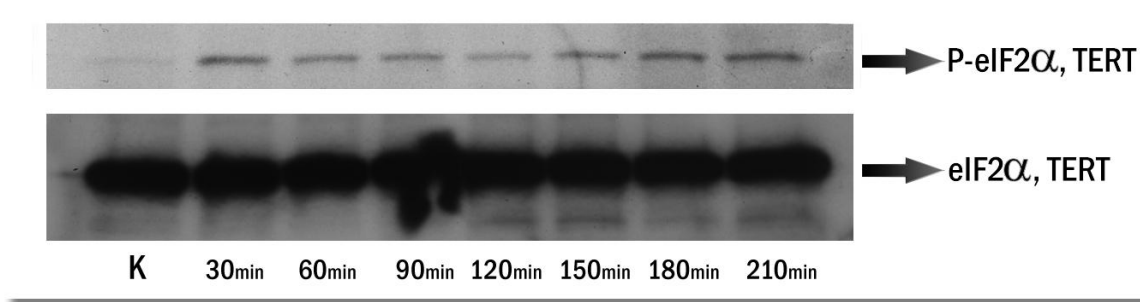
Fra figur 9 kan man se at mengden ATF4 minker ved lang stimuleringstid med tunicamycin. For å se på om årsaken til dette er reduksjon av celle viabilitet, ble viabiliteten undersøkt ved fluorescensmikroskopering (farging med EtBr/acridinorange). Det ble konkludert med at cellenes viabilitet var redusert med ca. 20 % etter stimulering i 48 timer med tunicamycin (data ikke vist).

Det ble også sett på transmembranproteinet PERK etter stimulering med tunicamycin. PERK aktiviseres ved oligomerisering av reseptoren, som igjen fører til autofosforylering av det intracellulære domenet (Schröder & Kaufman 2005). Det ble derfor undersøkt om fosforylering av PERK kunne detekteres ved induksjon av UPR. Det ble ikke funnet noen endringer i fosforyleringsnivåene til PERK verken i TERT eller 293T celler etter stimulering med tunicamycin (data ikke vist).

4.2 Detektering av UPR ved stimulering med thapsigargin

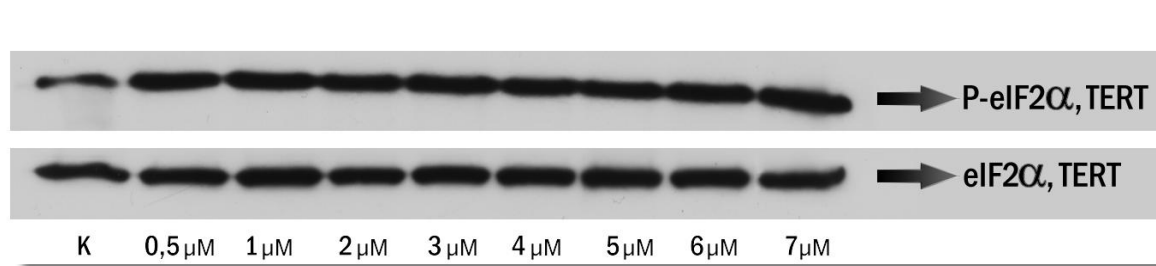
Siden det ikke ble sett noen aktivering av PERK signalveien etter stimulering med tunicamycin stimulerte vi med thapsigargin, som er et annet preparat som induserer UPR. Thapsigargin ødelegger ER homeostase ved å forstyrre Ca^{2+} balansen. TERT og 293 celler ble stimulert med 0,25 μM thapsigargin i 2, 4, 6, 8 og 24 timer. Dette ga ingen fosforylering av eIF2 α i hverken TERT eller 293T. Det ble også sett på PERK og ATF4 etter stimulering med 0,25 μM thapsigargin, men de ga heller ingen respons på stimuleringen (data ikke vist). Konsentrasjonen av thapsigargin ble økt til 1 μM , og det ble stimulert i henholdsvis 30, 60, 90, 120, 150, 180 og 210 minutter. I TERT cellene fant vi en økning i fosforylering av eIF2 α allerede etter 30 minutters stimulering. Fosforyleringsnivået holdt samme nivå for alle tidspunktene (figur 10).

Resultater



Figur 10. Figuren viser immunoblot med anti-fosfo-eIF2 α og anti-eIF2 α fra TERT-lysat der cellene har blitt stimulert med 1 μ M thapsigargin i henholdsvis 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 minutter. Det også tatt med en kontroll fra ustimulerte celler. Her ser det ikke ut til å forekomme noen fosforylering.

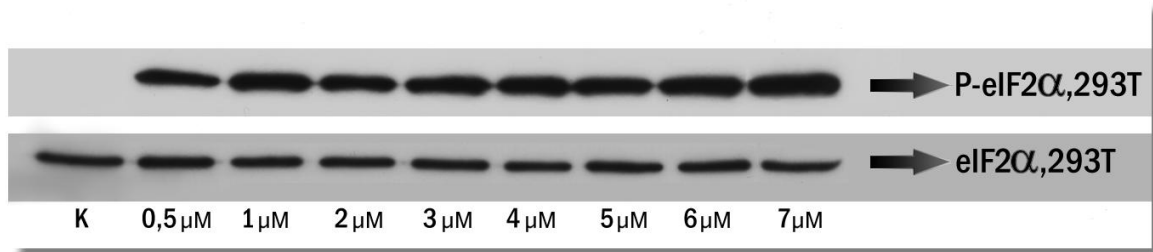
For å undersøke om stimulering med thapsigargin gir en dose-respons effekt på fosforylering av eIF2 α ble TERT og 293T celler stimulert med ulike konsentrasjoner av thapsigargin. Cellene ble stimulert med 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7 μ M thapsigargin i 60 minutter. Figur 11 viser at fosforyleringen av eIF2 α i TERT ikke endrer seg ved de ulike konsentrasjonene av thapsigargin.



Figur 11. Figuren viser immunoblot med anti-fosfo-eIF2 α og anti-eIF2 α fra TERT-lysat der cellene har blitt stimulert med henholdsvis 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7 μ M thapsigargin i 60 minutter. Kontrollen viser noe fosforylering, men den er svakere enn hos de stimulerte cellene.

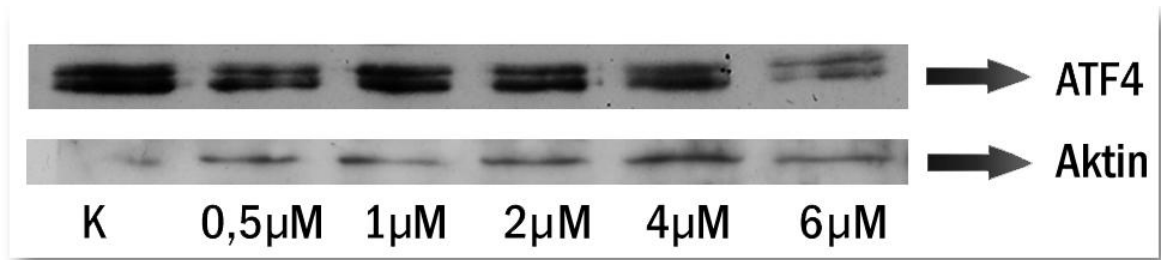
Resultater

Også i 293T celler finner vi økt fosforylering av eIF2 α etter stimulering med økende konsentrasjon av thapsigargin (figur12). Vi finner også her at fosforyleringsnivået er uavhengig av thapsigarginkonsentrasjonen.



Figur 12. Figuren viser immunoblot med anti-fosfo-eIF2 α og anti-eIF2 α fra 293T-lysat der cellene har blitt stimulert med henholdsvis 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7 μ M thapsigargin i 60 minutter. Kontrollen viser ingen tegn til fosforylering. Mengden eIF2 α holder seg konstant ved alle konsentrasjonene.

Siden stimulering med thapsigargin førte til fosforylering av eIF2 α , var vi derfor interessert i å se på om de samme konsentrasjonene ville gi økt ATF4 translasjon. Det ble stimulert i 90 minutter istedenfor 60 minutter som ble brukt ved detektering av fosforylert eIF2 α . Forlenget stimuleringstid ble brukt fordi ATF4 ligger nedstrøms for eIF2 α , og translasjon av nye proteiner vil ta lengre tid. Vi klarte ikke å påvise økt translasjon av ATF4 i cellekjerner etter stimulering med thapsigargin (figur 13).

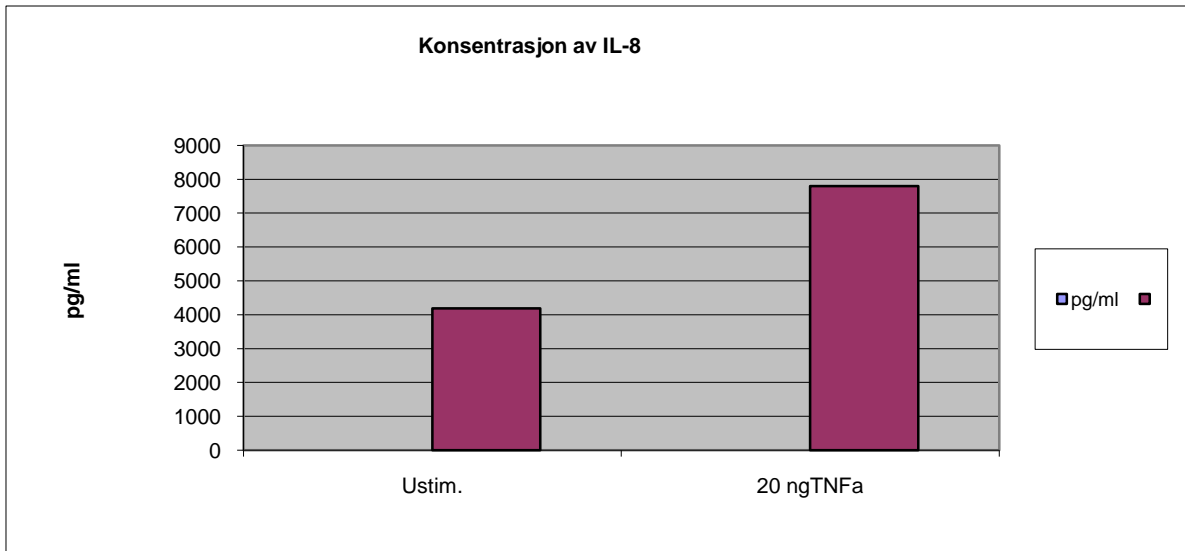


Figur 13. Figuren viser immunoblot med anti-ATF4 fra TERT-lysate der cellene har blitt stimulert med henholdsvis 0,5, 1, 2, 4, og 6 μM thapsigargin i 90 minutter. Mengde ATF4 holder seg konstant fra ustimulerte celler til cellene som ble stimulert med 4 μM thapsigargin. Stimulering med 6 μM thapsigargin ser ut til å resultere i redusert ekspresjon av ATF4.

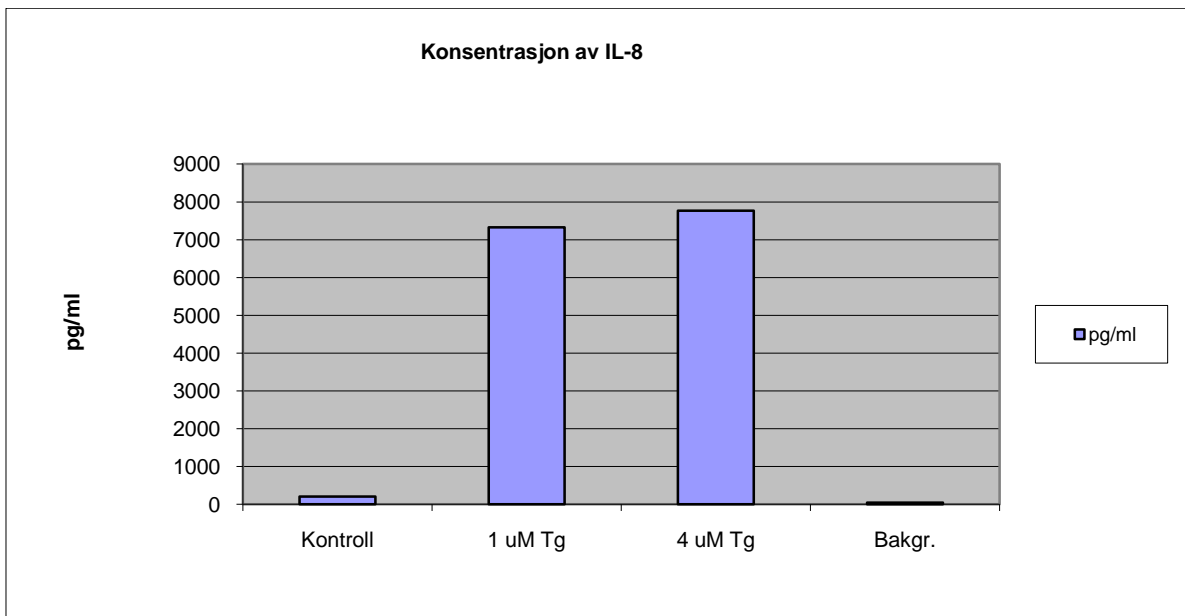
4.3 Måling av cytokinproduksjon

For å undersøke om TERT cellene ga en respons på stimulering med thapsigargin ble det sett på om denne stimulering førte til økt IL-8 produksjon. I vår gruppe har vi i tidligere forsøk vist at stimulering med TNF- α gir økt IL-8 produksjon i TERT celler (data ikke vist). Det ble etablert en ELISA for å detektere IL-8 i TERT celler (figur 14). Dette oppsettet ble brukt til å se på IL-8 produksjon etter stimulering med thapsigargin. Det ble stimulert med 1 μM og 4 μM thapsigargin i 4 timer. Dette ga økt IL-8 produksjon ved begge konsentrasjonene, men det ga ingen stor forskjell mellom stimulering med 1 μM og 4 μM thapsigargin (figur 15).

Resultater



Figur 14. Figuren viser at nivået av IL-8 i de ustimulerte cellene var 4182 pg/ml, mens nivået av IL-8 etter stimulering med TNF- α i 24 timer var 7801 pg/ml.



Figur 15. Figuren viser at nivået av IL-8 i kontrollen (ustimulert) var 209 pg/ml, mens nivået av IL-8 etter stimulering med 1 μ M thapsigargin i 4 timer var 7331 pg/ml, stimulering med 4 μ M thapsigargin i 4 timer ga 7765 pg/ml.

5 Diskusjon

Siden målet for oppgaven var etablering av avlesningsystemer for deteksjon av UPR, ble det først sett på proteinet eIF2 α , siden dette er et sentralt protein i UPR. eIF2 α blir fosforylert dersom UPR blir aktivert. Det ble stimulert med tunicamycin som hemmer glykosylering, som er viktig for folding av proteiner i ER og vil derfor føre til opphopning av ufoldede proteiner i ER. Ifølge teorien skal stimulering med tunicamycin indusere UPR, og det var derfor forventet at denne stimuleringen skulle gi fosforylering av eIF2 α (Harding et al. 2003). Stimulering med tunicamycin ga ingen økt fosforylering av eIF2 α i TERT celler ved de konsentrasjonene og tidspunktene som ble brukt. Dette kan muligens skyldes feil ved tunicamycinen. For å finne ut om dette er tilfellet kunne man sett på glykosyleringene til proteinene siden tunicamycin hemmer glykosylering av proteiner. Dette kunne man undersøkt ved bruk av massespektroskopi. Grunnen til at vi ikke fikk noen fosforylering kan også skyldes at konsentrasjonene og/eller stimuleringsbetingelsene ikke var optimale i forhold til TERT cellene. I så fall, kunne det vært prøvd ut flere ulike konsentrasjoner og stimuleringsstider enn det som ble forsøkt, men dette er tidkrevende. Andre studier viser også at tunicamycin ikke nødvendigvis inducerer fosforylering av eIF2 α . Ifølge Cybulsky et al. (Cybulsky et al. 2005) ble ikke eIF2 α i epitelceller fosforylert etter stimulering med tunicamycin, men i samme forsøk ble det påvist økt ekspresjon av BiP. Dette kan tyde på at ikke alle signalveiene i UPR nødvendigvis blir aktivert av én type stimuli/stressfaktor. For å sjekke om det var TERT cellene som ikke responderte på tunicamycinen, eller om det var tunicamycinen som ikke fungerte, introduserte vi cellelinjen 293T. Det er tidligere rapportert om aktivering av UPR som respons på tunicamycinstimulering i denne cellelinjen (Cawley et al. 2011). Her ga stimulering med tunicamycin spleising av *Xbp1*, noe som indikerer at IRE1 signalveien er aktivert. Det var derfor grunn til å tro at også PERK signalveien ville bli aktivert ved stimulering med tunicamycin i 293T celler. Stimulering av våre 293T celler ga ingen fosforylering av eIF2 α .

Fosforylering av eIF2 α forventes å gi økt translasjon av ATF4 (Vattem & Wek 2004). Siden stimulering med tunicamycin ikke viste noen fosforylering av eIF2 α , var det heller ikke ventet at stimulering med tunicamycin ville gi økt translasjon av ATF4. Resultatene fra Western blottingen viste at mengden ATF4 ble mindre jo lengre stimuleringsstid som ble brukt. Viabilitetstestene som ble utført viste tegn til at viabiliteten til cellene gikk noe ned ved

langvarig stimulering med tunicamycin. Dette tyder på at lang stimuleringstid med tunicamycin får cellen til å igangsette apoptose, eller at toksisiteten til tunicamycinen fører til nekrose. Celledød kan muligens ikke forklare hele grunnen til den lave mengden ATF4 siden majoriteten av cellene fremdeles var levende selv etter lang stimuleringstid.

Resultatene fra Western blotting med anti-fosfo-PERK viste ingen tegn til fosforylering av PERK i TERT eller 293T cellene etter stimulering med tunicamycin (resultater ikke vist). Da stimulering med tunicamycin ikke resulterte i aktivering av UPR i våre celler ble en annen aktivator av UPR testet, thapsigargin. Ifølge teorien skal stimulering med thapsigargin inducere UPR, og det var derfor forventet at denne stimuleringen skulle gi fosforylering av PERK (Harding et al. 2003). Grunnen til at fosfo-PERK ikke ble detektert kan være fordi PERK er tilstede i lave konsentrasjoner, og i tillegg mangler man gode antistoffer til å detektere PERK (Samali et al. 2010). En annen grunn til at det ikke ble påvist noen fosforylering av PERK kan være at lyseringen av cellene ikke har vært optimal. Siden PERK er et transmembranprotein som befinner seg i ER-membranen, kan det tenkes at lyseringen ikke har vært fullstendig nok til at ER-membranen har blitt lysert. Det hadde vært interessant og sett på PERK (kun proteinet), for å se om PERK er frigjort i lysatet eller ikke. Dersom PERK ikke er frigjort i lysatet, kunne det vært brukt en annen type lysisbuffer, for eksempel en RIPA buffer, som inneholder 3 forskjellige detergenter, en anionisk, en kationisk og ikke-ionisk. Ifølge abcam sin protokoll (<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>) vil en RIPA buffer lettere lysere membranene enn en NP-40 buffer, slik at man får membranproteinene i løsning. I denne oppgaven ble det kun forsøkt med NP-40. Det kan også tenkes at kokingen av prøvene fremmer aggregering av membranproteinene. Ifølge Kaur et al. (Kaur & Bachhawat 2009) vil høy temperatur føre til aggregering av membranproteiner, og det anbefales å varme prøvene i 37°C i 10 minutter istedenfor koking. I tillegg anbefaler Kaur et. al å varme membranen i en SDS/merkaptøetanol løsning etter proteinoverføring. Et annet forslag fra Abcam sin protokoll for Western blotting er at membranproteiner bør varmes ved 70°C i 5-10 minutter istedenfor koking. De anbefaler også å bruke 0,1 % SDS i proteinoverføringsbufferen for proteiner som er større enn 80 kD (PERK er 170kD), fordi det vil hjelpe store proteiner til å bli overført fra gel til membran. Overføring av store proteiner går saktere enn for mindre proteiner.

Etter stimulering av TERT med thapsigargin ble det påvist økt fosforylering av eIF2 α . Stimulering med 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7 μ M thapsigargin i 60 minutter viste at fosforyleringen av eIF2 α var konstant ved alle konsentrasjonene. Dette ble påvist i både

TERT og 293T cellene. Det er naturlig å tro at denne fosforyleringen ville holdt seg konstant også ved høyere konsentrasjoner enn $7 \mu\text{M}$, fram til ER-stresset blir så kraftig at cellen igangsetter apoptose. Det er også rimelig å anta at fosforyleringen ville vært konstant ved lengre stimuleringsstid, men cellene ville nok igangsatt apoptose etter en stund på grunn av vedvarende ER-stress. ER-homeostasen vil ikke kunne gjenopprettes så lenge cellene utsettes for stimulering med thapsigargin. Siden eIF2 α kan fosforyleres av andre kinaser enn PERK, kan det ikke sikkerhet konkluderes med at hele PERK signalveien er aktivert selv om eIF2 α er fosforylert (Wek et al. 2006). I tillegg til PERK kan eIF2 α fosforyleres av tre andre kinaser; PKR (protein kinase R), HRI (heme-regulated eIF2 α kinase), GCN2 (general control nonrepressed 2). Det kan også nevnes at signalene fra fosfoproteinene var svake, og det måtte brukes kraftig ECL-substrat og lang eksponeringstid for å detektere fosfoproteinene. Årsaken kan være lav mengde fosforylert eIF2 α (eIF2 α ga et mye sterkere signal ved samme eksponeringstid), men det kan også skyldes at affiniteten til antistoffene er lav. Det ble forsøkt med noe høyere konsentrasjon av primærantistoff, som ga noe sterkere signal. Lavere prosentandel med tørrmelk og/eller BSA kunne vært forsøkt ved inkubasjon med både primærantistoff og sekundærantistoff siden det kan tenkes at denne blokkeringen ikke bare blokkerer bakgrunnsstøy, men også svekker selve signalet.

Siden fosforylering av eIF2 α ble påvist etter stimulering med thapsigargin, ble de samme konsentrasjonene av thapsigargin brukt til å stimulere celler som skulle brukes til kjerneisolering for å se på ATF4, som befinner seg i cellekjernen. Det var forventet at vi skulle se økt proteinmengde av ATF4 siden fosforylering av eIF2 α fører til økt translasjon av ATF4. Cellene som ble brukt til kjerneisolering ble stimulert i 90 minutter siden fosforylering av eIF2 α ble påvist etter 60 minutter (i både TERT og 293T), og ATF4 ligger nedstrøms for eIF2 α . Resultatene fra Western blotting med anti-ATF4 viste ingen tegn til økt proteinmengde av ATF4. Dette kan skyldes at 90 minutter ikke er lenge nok til å se effekt på proteinmengde som resultat av økt translasjonen av ATF4. Andre forsøk viser at økt translasjon av ATF4 skjer etter 4 timer med $0,1 \mu\text{M}$ thapsigargin i MEF (mouse embryonic fibroblast) celler (Whitney et al. 2009), mens det rapporteres om økt translasjon av ATF4 i MIN6 celler (β -celler) ved stimulering med $0,5 \mu\text{M}$ thapsigargin i 8 timer (Tominaga et al. 2010). Samme studie viser at ATF4 reduseres etter 24 timer. I våre forsøk ble det utført stimuleringer i 2, 4, 8 og 24 timer med $0,25 \mu\text{M}$. Dette ga ikke økt translasjon av ATF4. Men etter at vi fant ut at konsentrasjonen av thapsigargin måtte økes for å få fosforylering av eIF2 α , ble det ikke utført lengre stimuleringsstider enn 90 minutter for å se på om de samme konsentrasjonene ville øke

translasjonen av ATF4. Det er derfor grunn til å tro at de konsentrasjonene som førte til fosforylering av eIF2 α vil gi økt translasjon av ATF4 etter lengre stimuleringsstid, siden andre studier viser at det tar lengre tid enn 90 minutter å øke translasjon av ATF4 etter aktivering av UPR. En annen årsak til at det ikke har blitt sett noen oppregulering av ATF4 i 293T eller TERT, kan være på grunn av problemer med protokollen til analysesettet for kjerneisolering som ble brukt. Det kan også skyldes problemer med antistoffet. Siden signalet ved detektering av fosforylert eIF2 α var såpass svakt, kan det kanskje tenkes at det ikke er nok fosforylert eIF2 α til at man vil kunne se noen forskjell i ATF4-translasjon hos thapsigarginstimulerte celler i forhold til ustimulerte celler. Fosforylering av eIF2 α i den cytoplasmiske fraksjonen ble ikke påvist. Dette skyldes mest sannsynlig at metoden som ble brukt gir et lysat med lav proteinkonsentrasjon, siden samme stimulerings og fosforylering ved samme konsentrasjoner i tidligere forsøk der helcellelysat ble benyttet. Som et alternativ til kjerneisolering, kunne et helcellelysat vært benyttet. Ved å bruke en RIPA buffer som også lyserer kjernen slik at ATF4 frigjøres i løsning er dette et godt alternativ.

PERK signalveien er en mye brukt signalvei til detektering av UPR, og er fordelaktig siden det er mulig å detektere alle proteinene i signalveien (Cawley et al. 2011). I de to andre signalveiene i UPR, ATF6 og IRE1 signalveiene er det svært vanskelig å detektere membranproteinene ATF6 og IRE1 siden de er tilstede i veldig lave konsentrasjoner. Dette gjelder til dels også for PERK. Western blotting er mye brukt til detektering av UPR, men RT-PCR kan også brukes til detektering av UPR ved å se på ekspresjon av UPR-regulerte gener (Samali et al. 2010). Som beskrevet i teoridelen fører UPR til transkripsjonsaktivert av gener som koder for anstandsproteiner, foldingsenzymer, og ERAD faktorer.

Samali et al. anbefaler å se på proteiner nedstrøms for ER-stress for å detektere UPR, og da spesielt proteinene CHOP, HERP, XBP1 og BiP som er robuste markører for UPR (Samali et al. 2010). *Xbp1* spleising er en viktig markør for IRE1 aktivert siden IRE1 aktivert fører til at et 26 bp langt intron blir kuttet ut av *xbp1*. Denne kløyvinga kan detekteres ved RT-PCR ved å bruke primere som er spesifikke for *xbp1* (Cawley et al. 2011). Ved RT-PCR vil man kunne detektere både kløyvet og ikke-kløyvet *Xbp1*, og på den måten se om UPR (IRE1 signalveien) er aktivert eller ikke. Proteinene CHOP (i PERK signalveien) blir oppregulert ved UPR-aktivert. CHOP kan detekteres ved hjelp av Western blotting, men anti-CHOP antistoffene som er på markedet kan gi falske positive (Samali et al. 2010). Det kan også brukes fluorescensmikroskopi til detektering av *Xbp1* og ATF6 (Cawley et al. 2011). UPR kan også detekteres ved å se på ekspresjon av BiP siden UPR fører til økt BiP ekspresjon.

Dette kan detekteres på mRNA-nivå ved hjelp av Northern Blotting (Shang 2005). Økt ekspresjon av BiP kan også detekteres på proteinnivå ved Western blotting.

Resultatene fra ELISA viste at stimulering med thapsigargin ga økt produksjon av IL-8 i TERT celler, noe som indikerer at cellene responderte på stimuleringen. Det var ingen stor forskjell mellom stimulering med 1 μ M og 4 μ M thapsigargin. Siden stimulering med thapsigargin ikke ga noen dose-respons effekt på fosforylering av eIF2 α , var det heller ikke ventet at denne stimuleringen skulle gi noen dose-respons effekt på IL-8 produksjon. Ifølge Gargalovic et al. er ATF4 en viktig mediator for IL-8 ekspresjon (Gargalovic et al. 2006). Økt ATF4 translasjon ser altså ut til å medføre økt IL-8 produksjon. Dette underbygget at PERK signalveien i TERT celler blir aktivert etter stimulering med thapsigargin, selv om vi ikke klarte å påvise økt ATF4 ekspresjon eller fosforylering av PERK på grunn av feil ved deteksjonssystemene som ble brukt.

Hensikten med oppgaven var å lage et system for detektering av UPR. I denne oppgaven ble det påvist fosforylering av eIF2 α etter stimulering med thapsigargin som induserer UPR. Fosforylering av eIF2 α kan dermed brukes som en markør for påvisning av UPR i TERT og 293T celler. For sikkert å kunne konstatere at UPR er aktivert, er det fordelaktig å ha flere markører for påvisning av UPR. Det ble ikke sett noen fosforylering av PERK, og heller ingen økt translasjon av ATF4 etter stimulering, disse resultatene indikerer at UPR ikke er aktivert. Årsaken til at det ikke ble påvist fosforylering av PERK eller økt translasjon av ATF4 etter stimulering, skyldes trolig feil ved deteksjonssystemene som ble brukt. Det bør derfor arbeides videre med å etablere deteksjonssystemer for disse markørene eller andre UPR-markører for å ha et robust system for deteksjon av UPR.

Referanser

- Abastado, J. P., Miller, P. F., Jackson, B. M. & Hinnebusch, A. G. (1991). Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control. *Mol. Cell. Biol.*, 11 (1): 486-496.
- Abdallah, B. M., Haack-Sørensen, M., Burns, J. S., Elsnab, B., Jakob, F., Hokland, P. & Kassem, M. (2005). Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite of extensive proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326 (3): 527-538.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of The Cell*: Garland Science.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2 (6): 326-332.
- Bhaskar, P. T. & Hay, N. (2007). The Two TORCs and Akt. *Developmental Cell*, 12 (4): 487-502.
- Bosch, I., Xhaja, K., Estevez, L., Raines, G., Melichar, H., Warke, R. V., Fournier, M. V., Ennis, F. A. & Rothman, A. L. (2002). Increased Production of Interleukin-8 in Primary Human Monocytes and in Human Epithelial and Endothelial Cell Lines after Dengue Virus Challenge. *J. Virol.*, 76 (11): 5588-5597.
- Britannica, E. (2008). *Endoplasmic reticulum*. Tilgjengelig fra: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/187020/endoplasmic-reticulum-ER?anchor=ref90894>.
- Carroll, T. P., Greene, C. M., O'Connor, C. A., Nolan, Á. M., O'Neill, S. J. & McElvaney, N. G. (2010). Evidence for Unfolded Protein Response Activation in Monocytes from Individuals with α -1 Antitrypsin Deficiency. *The Journal of Immunology*, 184 (8): 4538-4546.
- Cawley, K., Deegan, S., Samali, A. & Gupta, S. (2011). Assays for Detecting the Unfolded Protein Response.
- Chami, M., Oulès, B., Szabadkai, G., Tacine, R., Rizzuto, R. & Paterlini-Bréchet, P. (2008). Role of SERCA1 Truncated Isoform in the Proapoptotic Calcium Transfer from ER to Mitochondria during ER Stress. *Molecular cell*, 32 (5): 641-651.

- Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M. & Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (52): 18773-18784.
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J. & Diehl, J. A. (2003). Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol. Cell. Biol.*, 23 (20): 7198-7209.
- Cybulsky, A. V., Takano, T., Papillon, J. & Bijian, K. (2005). Role of the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response in Glomerular Epithelial Cell Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (26): 24396-24403.
- Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., Harding, H. P. & Ron, D. (2004). Translational Repression Mediates Activation of Nuclear Factor Kappa B by Phosphorylated Translation Initiation Factor 2. *Mol. Cell. Biol.*, 24 (23): 10161-10168.
- Gargalovic, P. S., Imura, M., Zhang, B., Gharavi, N. M., Clark, M. J., Pagnon, J., Yang, W.-P., He, A., Truong, A., Patel, S., et al. (2006). Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (34): 12741-12746.
- Godberdhan, D. C. I., Ogmundsdottir, M. H., Kazi, S., Reynolds, B., Visvalingam, S. & Wilson, C. (2009). Amino acid sensing and mTOR regulation; inside or out? *Biochem Soc Trans.*, 37: 248-252.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol*, 36 (1): 59-72.
- Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research*, 48 (9): 1905-1914.
- Hafen, E. (2004). Cancer, type 2 diabetes, and ageing: news from flies and worms. *Swiss Medical Weekly*, 134.
- Harding, H. P., Zhang, Y. & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397 (6716): 271-274.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., et al. (2003). An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular cell*, 11 (3): 619-633.

- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. (1999). Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochemical Journal*, 355.
- He, T.-C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (5): 2509-2514.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444 (7121): 860-867.
- Hotamisligil, G. S. & Erbay, E. (2008). Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*, 8 (12): 923-934.
- Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, 140 (6): 900-917.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J. & Exton, J. H. (2006). Autocrine Tumor Necrosis Factor Alpha Links Endoplasmic Reticulum Stress to the Membrane Death Receptor Pathway through IRE1 {alpha}-Mediated NF- κ B Activation and Down-Regulation of TRAF2 Expression. *Mol. Cell. Biol.*, 26 (8): 3071-3084.
- Huong, P. T. T., Moon, D.-O., Kim, S. O., Kim, K. E., Jeong, S. J., Lee, K. W., Lee, K. S., Jang, J. H., Erikson, R. L., Ahn, J. S., et al. (2011). Proteasome inhibitor-I enhances tunicamycin-induced chemosensitization of prostate cancer cells through regulation of NF- κ B and CHOP expression. *Cellular Signalling*, 23 (5): 857-865.
- Imgenex. (2011). *ATF6 Regulation in the ER Stress Response*. Tilgjengelig fra: http://imgenex.com/view_data_page.php?id=18.
- Jiang, H.-Y. & Wek, R. C. (2005). GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem. J.*, 385 (2): 371-380.
- Kaur, J. & Bachhawat, A. K. (2009). A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. *Analytical Biochemistry*, 384 (2): 348-349.
- Kohno, K. (2010). Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *Journal of Biochemistry*, 147 (1): 27-33.
- Kokame, K., Kato, H. & Miyata, T. (2001). Identification of ERSE-II, a New cis-Acting Element Responsible for the ATF6-dependent Mammalian Unfolded Protein Response. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (12): 9199-9205.

- Li, M., Baumeister, P., Roy, B., Phan, T., Foti, D., Luo, S. & Lee, A. S. (2000). ATF6 as a Transcription Activator of the Endoplasmic Reticulum Stress Element: Thapsigargin Stress-Induced Changes and Synergistic Interactions with NF-Y and YY1. *Mol. Cell. Biol.*, 20 (14): 5096-5106.
- Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K. M., LaVail, M. M. & Walter, P. (2007). IRE1 Signaling Affects Cell Fate During the Unfolded Protein Response. *Science*, 318 (5852): 944-949.
- Lindsley, J. E. & Rutter, J. (2004). Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139 (4): 543-559.
- Lipson, K. L., Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Nguyen, L. X., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A. A. & Urano, F. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metabolism*, 4 (3): 245-254.
- Mandl, J., Mészáros, T., Bánhegyi, G., Hunyady, L. & Csala, M. (2009). Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20 (4): 194-201.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, 403 (6765): 98-103.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. & Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & Development*, 16 (11): 1345-1355.
- Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M. & Mori, K. (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.*, 366 (2): 585-594.
- Ota, T., Gayet, C. & Ginsberg, H. N. (2007). Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 118: 316-332.
- Pizzo, P. & Pozzan, T. (2007). Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends in Cell Biology*, 17 (10): 511-517.
- Rasheva, V. & Domingos, P. (2009). Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*, 14 (8): 996-1007.

- Ron, D. & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (7): 519-529.
- Samali, A., FitzGerald, U., Deegan, S. & Gupta, S. (2010). Methods for Monitoring Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response. *International Journal of Cell Biology*.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S. & Kaufman, R. J. (2001). Translational Control Is Required for the Unfolded Protein Response and In Vivo Glucose Homeostasis. *Molecular cell*, 7 (6): 1165-1176.
- Schröder, M. & Kaufman, R. J. (2005). THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *Annual Review of Biochemistry*, 74 (1): 739-789.
- Shang, J. (2005). Quantitative measurement of events in the mammalian unfolded protein response. *Methods*, 35 (4): 390-394.
- Sicheri, F. & Silverman, R. H. (2011). Putting the brakes on the unfolded protein response. *The Journal of Cell Biology*.
- Simonsen, J. L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S. I. S., Jensen, T. G. & Kassem, M. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotech*, 20 (6): 592-596.
- Tominaga, R., Yamaguchi, S., Satake, C., Usui, M., Tanji, Y., Kondo, K., Katagiri, H., Oka, Y. & Ishihara, H. (2010). The JNK pathway modulates expression and phosphorylation of 4E-BP1 in MIN6 pancreatic β -cells under oxidative stress conditions. *Cell Biochemistry and Function*, 28 (5): 387-393.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P. & Ron, D. (2000). Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*, 287 (5453): 664-666.
- Vattem, K. M. & Wek, R. C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (31): 11269-11274.
- Wek, R. C., Jiang, H.-Y. & Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans.*, 34: 7-11.
- Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (5): 1111-1119.

- Whitney, M. L., Jefferson, L. S. & Kimball, S. R. (2009). ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379 (2): 451-455.
- Wu, J., Rutkowski, D. T., Dubois, M., Swathirajan, J., Saunders, T., Wang, J., Song, B., Yau, G. D. Y. & Kaufman, R. J. (2007). ATF6[alpha] Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. *Developmental Cell*, 13 (3): 351-364.
- Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, 124 (3): 471-484.
- Yamazaki, H., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Tagawa, Y., Okamura, M., Ogata, R., Huang, T., Nakajima, S., Yao, J., Paton, A. W., et al. (2009). Activation of the Akt-NF- κ B Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response. *The Journal of Immunology*, 183 (2): 1480-1487.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M. & Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of Cell Biology*, 172 (4): 565-575.
- Zhang, K. & Kaufman, R. J. (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454 (7203): 455-462.
- Özcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Özdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H. & Hotamisligil, G. S. (2004). Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science*, 306 (5695): 457-461.