



Interaktion mellan värmechockfaktor 2 och talin 1: evaluering av cellinjer som modellsystem

Hendrik Hästbacka
Matrikelnummer 32540
hendrik.hastbacka@abo.fi

Handledare:
Prof. Lea Sistonen
Dr. Eva Henriksson
Dr. Marek Budzyński
Alejandro Da Silva (FM)

Avhandling pro gradu i cellbiologi
Fakulteten för naturvetenskaper och teknik
Åbo Akademi, 2018

Åbo Akademi

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Hendrik Hästbacka, 32540

Interaktion mellan värmechockfaktor 2 och talin 1: evaluering av cellinjer som modellsystem

Avhandling pro gradu i cellbiologi, 78 s., 2018

Proteiner är biomolekyler som interagerar för att bland annat ge cellen dess struktur och katalysera reaktioner. En potentiell proteininteraktion finns mellan fokaladhesionsproteinet talin 1 (TLN1) och transkriptionsfaktorn värmechockfaktor 2 (eng. heat shock factor 2, HSF2). HSF2 och TLN1 saknar kända överlappande funktioner, men de har motsatt effekt på migrations- och invasionspotentialerna i prostatacancer cellinjer. I denna avhandling pro gradu användes de humana cellinjerna RWPE-1, PC-3, MCF-10A, MCF-7, U2OS och U2OS HSF2 KO, en variant av U2OS som saknar HSF2, samt muscellinjen MEF. Cellinjerna evaluerades som modellsystem för att karaktärisera den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1. Cellinjerna RWPE-1 och MCF-10A representerade normala celler och PC-3 och MCF-7 representerade cancer cellinjer från prostata- respektive bröstepitel. Utav cellinjerna med tydlig komplexbildning av HSF2 och TLN1 kunde endast RWPE-1 och PC-3 transfekteras effektivt. En möjlig gränsyta i HSF2 för HSF2-TLN1-interaktionen utreddes genom att i PC-3-celler uttrycka en variant av HSF2, där den potentiella gränsytan muterats. Utredningen av gränsytan i HSF2 gav otydliga resultat, och direkt interaktion mellan HSF2 och TLN1 kunde varken bevisas eller motbevisas. Dock identifierades PC-3-cellinjen som ett möjligt modellsystem, plasmider framställdes och protokoll för transfektion och koimmunprecipitation optimerades för framtida undersökningar kring den potentiella interaktionen.

Nyckelord: HSF2, TLN1, RWPE-1, PC-3, MCF-10A, MCF-7, U2OS, MEF, Co-IP

Åbo Akademi University

Faculty of Science and Engineering

Hendrik Hästbacka, 32540

Interaction between heat shock factor 2 and talin 1: evaluation of cell lines as model system

Master's Thesis in Cell Biology, 78 pp., 2018

Proteins are biomolecules that interact to give the cell its structure and to catalyze reactions. There is potentially a protein interaction between the focal adhesion protein talin 1 (TLN1) and the transcription factor heat shock factor 2 (HSF2). HSF2 and TLN1 lack known overlapping functions, but they have opposing effects on the migratory and invasive potential in prostate cancer cell lines. In this master's thesis the human cell lines RWPE-1, PC-3, MCF-10A, MCF-7, U2OS and U2OS HSF2 KO, a variant of U2OS which lacks HSF2, and the murine cell line MEF were used. The cell lines were evaluated as model systems for characterization of the potential interaction between HSF2 and TLN1. The RWPE-1 and MCF-10A cell lines represented normal cells while PC-3 and MCF-7 represented cancer cell lines from prostate and breast epithelium, respectively. Out of the cell lines with clear complex formation of HSF2 and TLN1, only RWPE-1 and PC-3 could be effectively transfected. One possible interface in HSF2 for the HSF2-TLN1-interaction was investigated in PC-3 cells by expressing a variant of HSF2 in them where the interface had been mutated. The results from the investigation of the interface were inconclusive, and a direct interaction between HSF2 and TLN1 could neither be proven or disproven. Nevertheless, the PC-3 cell line was identified as a usable model system, plasmids were generated and protocols for transfection and co-immunoprecipitation were optimized for future studies regarding the potential interaction.

Keywords: HSF2, TLN1, RWPE-1, PC-3, MCF-10A, MCF-7, U2OS, MEF, Co-IP

Innehållsförteckning

Förkortningar	5
1 Introduktion	7
2 Litteraturoversikt	7
2.1 Cancer	7
2.2 Värmechockresponser	8
2.2.1 HSF1	9
2.2.2 HSF2	10
2.2.2.1 HSF2 i fysiologiska processer	12
2.2.2.2 HSF2 i sjukdomstillstånd	14
2.3 ECM-celladhesion	15
2.3.1 Integriner och fokadhesioner	15
2.3.2 Talin 1	16
2.3.3 Talin 1 och cancer	19
3 Målsättningar	20
4 Material och metoder	22
4.1 Cellkultur	22
4.1.1 Använda cellinjer	22
4.1.1.1 RWPE-1	22
4.1.1.2 PC-3	22
4.1.1.3 MCF-10A	23
4.1.1.4 MCF-7	23
4.1.1.5 U2OS	23
4.1.1.6 U2OS HSF2 Knockout	24
4.1.1.7 MEF	24
4.1.2 Odling och delning av celler	24
4.1.3 Skördning och lysering av celler	26
4.2 Koimmunprecipitation	26
4.3 Western blot	28

4.3.1	Natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgelelektrofores	28
4.3.2	Behandling av membran med antikroppar	29
4.3.2.1	Antikroppsbehandling med inkubation över natten	29
4.3.2.2	Antikroppsbehandling med ett SNAP i.d. 2.0-protein- detektionssystem	30
4.3.2.3	Immundetektering med förstärkt kemiluminiscens	30
4.3.2.4	Förberedelse av membran för följande antikropps- behandling	31
4.4	Mutagenes av plasmider	31
4.5	Transformation av bakterier för DNA-kloning	32
4.5.1	Isolering och sekvensering av plasmider	33
4.5.1.1	Isolering av plasmider	33
4.5.1.2	Sekvensering	34
4.6	Transient transfektion av RWPE-1-, PC-3- och U2OS 2KO-celler	34
4.6.1	Transfektion av cellinjen U2OS 2KO med polyetylenimin	35
4.6.2	Transfektion av RWPE-1-, PC-3- och U2OS 2KO-celler med elektroporering	35
4.6.3	Optimering av transfektionsparametrar och transfektionseffektivitet	36
4.6.3.1	Transfektion med gfp som rapporteringsgenen	37
4.6.3.2	Immunfluorescens	37
5	Resultat	39
5.1	HSF2-TLN1-komplexbildning i olika cellinjer	39
5.1.1	Komplexbildning av HSF2 och TLN1 i prostataepitelcellinjerna RWPE-1 och PC-3	39
5.1.2	Komplexbildning av HSF2 och TLN1 i osteosarkomcellinjerna U2OS och U2OS 2KO	41
5.1.3	Komplexbildning av HSF2 och TLN1 i bröstepitelcellinjerna MCF-10A och MCF-7	43
5.1.4	Komplexbildning av HSF2 och TLN1 i den embryonala	

musfibroblastcellinjen MEF	43
5.2 Transfektion av olika cellinjer	44
5.2.1 Val av cellinjer för transfektionsoptimering	44
5.2.2 Optimering av transfektionsparametrar	45
5.2.2.1 Transfektionsoptimering för RWPE-1-celler	45
5.2.2.2 Transfektionsoptimering för U2OS 2KO-celler	46
5.2.2.3 HSF2 WT- och HSF2-m2A-uttryck i U2OS 2KO-celler	47
5.3 Sammanfattning av resultat och val av modellsystem för komplex- bildning mellan HSF2-m2A och TLN1	49
5.4 Komplexbildning av HSF2-m2A och TLN1 i RWPE-1- och PC-3-celler ..	50
6 Diskussion	51
6.1 Cellinjer som modellsystem att studera den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1	51
6.1.1 Cancerspecifik skillnad i komplexbildning av HSF2 och TLN1	53
6.1.2 Cellinjen U2OS 2KO är opassande som modellsystem för att studera HSF2-TLN1-interaktionen	53
6.1.3 Cellinjen RWPE-1 hade utmärkt transfektionseffektivitet men långsam proliferation	56
6.1.4 Cellinjen PC-3 är ett utmärkt modellsystem för att studera interaktionen mellan HSF2 och TLN1	57
6.2 Funktion och relevans för den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1	58
6.3 Avslutning	60
7 Litteraturförteckning	60
8 Bilagor	72
8.1 Recept	72
8.2 DNA-primrar	74
8.2.1 Primrar som användes för sekvensering	74
8.2.2 Primrar som användes för mutagenes	74
8.3 Plasmidkartor	75

8.3.1 Tom pcDNA3.1(-), mock	75
8.3.2 pEGFP-N2	75
8.3.3 Humant HSF2 α i pcDNA4-TO utan eller med shRNA-resistens	76
8.3.4 Humant HSF2 α -m2A i pcDNA4-TO utan eller med shRNA-resistens	77
8.4 Supplementärt material	78

Förkortningar

ALS	amyotrofisk lateralskleros
BSA	bovint serumalbumin
CNS	centrala nervsystemet
co-IP	koimmunprecipitation (eng. co-immunoprecipitation)
DBD	DNA-bindande domän
DH	dimeriseringsspiral (eng. dimerisation helix)
DNA	deoxiribonukleinsyra (eng. deoxyribonucleic acid)
ECL	förstärkt kemiluminiscens (eng. enhanced chemiluminescence)
ECM	extracellulärmatris
EDTA	etylendiamintetraättiksyra (eng. ethylenediaminetetraacetic acid)
FA	fokaladhesion
FAK	fokaladhesionskinas
FAS	fetalt alkoholsyndrom
FASD	fetala alkoholspektrumstörningar (eng. fetal alcohol spectrum disorders)
FBS	fetalt bovint serum
GFP	grönt fluorescerande protein
HR	sju upprepningar av hydrofoba aminosyror (eng. heptad hydrophobic repeats)
HRP	pepparrotsperoxidas (eng. horseradish peroxidase)
HSEs	värmechockelement (eng. heat shock elements)
HSF	värmechockfaktor (eng. heat shock factor)
HSF1	värmechockfaktor 1 (eng. heat shock factor 1)
HSF2	värmechockfaktor 2 (eng. heat shock factor 2)
HSP	värmechockprotein (eng. heat shock protein)

HSR	värmechockresponsen (eng. heat shock response)
IAP	integrinadhesionsprotein
IF	immunfluorescens
IgG	immunglobulin G
IP	immunprecipitation
KO	knockout
LB	lysogenibuljong
mRNA	budbärrar-RNA (eng. messenger RNA)
PBS	fosfatbuffrad saltlösning (eng. phosphate-buffered saline)
PEI	polyetylenimin
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bifosfat (eng. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PTM	posttranslationell modifiering
PVDF	polyvinylidendifluorid
RIAM	Rap1-GTP-interagerande adaptormolekyl
RNA	ribonukleinsyra (eng. ribonucleic acid)
SDS	natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-polyakrylamidgel elektrofores
shRNA	kort hårnåls-RNA (eng. short hairpin RNA)
siRNA	kort interfererande RNA (eng. small interfering RNA)
SOC-media	superoptimal buljong med katabolitrepression (eng. super optimal broth with catabolite repression)
TAD	transaktiveringsdomän
TLN1	talin 1
TLN2	talin 2
WB	Western blot
WCL	helcellslysat (eng. whole cell lysate)
WT	vildtyp (eng. wild type)

1 Introduktion

Multicellulära organismer såsom människan är uppbyggda av ett stort antal celler med specialiserade uppgifter. Trots att de enskilda cellerna har identisk arvs massa kan celler av olika typ skilja sig mycket från varandra, vilket beror på variationer i cellernas genuttryck. Cellernas egenskaper beror således på vilka genprodukter, såsom proteiner, uttrycks. Proteiner är en av cellens viktigaste biomolekyler, och olika proteiner används bland annat för att ge cellen dess struktur, för att katalysera reaktioner och för att kommunicera med andra celler. Dessa processer kräver oftast interaktion mellan flera proteiner, och utredning av interaktionerna kan lära oss mera om både de enskilda proteinernas funktioner och hur de påverkar cellulära processer. En potentiell proteininteraktion finns mellan transkriptionsfaktorn värmechockfaktor 2 (eng. heat shock factor 2, HSF2) och fokaladhesionsproteinet talin 1 (TLN1). Interaktionens funktioner är dock okända, proteinernas överlappande funktioner likaså, men proteinerna har motsatt effekt på prostata-cancercellers invasivitet (Björk m.fl., 2016; Sakamoto m.fl., 2010). Syftet med denna avhandling pro gradu var att karaktärisera olika cellinjers lämplighet som modellsystem för att studera HSF2-TLN1-proteininteraktionen, att undersöka om interaktionen i cancerceller tydligt skiljer sig från den i friska celler samt att utreda en möjlig gränsvyta för direkt interaktion mellan HSF2 och TLN1.

2 Litteraturoversikt

2.1 Cancer

Cancer kännetecknas av okontrollerad cellproliferation och -migration och demonstrerar varför våra celler har så många redundanta regleringsmekanismer. Mutationerna i cancerceller kan leda till att dessa mekanismer

kringgås så att cellerna överlever och delar sig oberoende av sin omgivning (Alberts m.fl., 2014). Genom att utnyttja cellens försvarsmekanismer mot olika sorters stress kan cancercellerna även överleva i nya miljöer, under svåra förhållanden och bilda metastaser. Till dessa försvarsmekanismer hör värmechockresponsen (eng. heat shock response, HSR).

2.2 Värmechockresponsen

Under sin livstid utsätts celler för olika sorters stress och för att kunna överleva behöver de flera skyddsmekanismer, däribland HSR som upptäcktes av Ferruccio Ritossa år 1962 (Ritossa, 1962). Ritossa observerade att det var möjligt att orsaka ett specifikt svullnadsmönster på polytenkromosomer från *Drosophila bucksii* genom att utsätta fluglarver för värmechock och att kromosommönstret återgår till det normala om temperaturen återställs. Mönstret, som indikerade uttryck av specifika gener, bildades dessutom igen om larverna åter utsattes för värmechock. Detta var grunden för det som senare skulle bli känt som HSR. Det har senare visats att HSR inte bara skyddar celler från förhöjda temperaturer utan även skyddar celler från andra källor av stress såsom oxidativ stress och tungmetaller. HSR åstadkommer detta och upprätthåller proteostas främst genom uttryck av värmechockproteiner (Baldwin, 1986; Bieschke m.fl., 2006; Tamás m.fl., 2014; Åkerfelt m.fl., 2010).

Värmechockproteiner (eng. heat shock proteins, HSPs) är molekylära chaperoner som stöder korrekt veckning av proteiner samt omveckning av felveckade proteiner (Ellis m.fl., 1989; Morimoto, 2011). Detta förhindrar aggregation av felaktigt veckade proteiner, vilket annars orsakar proteotoxisk stress (Shinkawa m.fl., 2011). Allt flera HSPs upptäcks och de delas in i flera familjer såsom HSPH, HSPC, HSPA och DNAJ vilka inkluderar de välkända HSPs som tidigare kallades HSP110, HSP90, HSP70 och HSP40 (Kampinga m.fl.,

2009). Uttrycket av HSPs regleras huvudsakligen av värmechockfaktorer (HSF:er), en familj av transkriptionsfaktorer. HSF:er karakteriseras baserat på likheter mellan deras DNA-bindande domäner (DBD:er), vilka kan binda till specifika värmechockelement (eng. heat shock elements, HSEs) på DNA (Budzyński och Sistonen, 2017). Ett HSE består av fem upprepningar av nukleotiderna nGAAn i alternerande riktning, där "n" utmärker en valfri nukleotid. Bindningen av HSF:er till olika HSE påverkar transkriptionen av specifika gener (Amin m.fl., 1988). Däggdjur har sex olika HSF:er; HSF1, HSF2, HSF3 (som endast har hittats i möss), HSF4, HSFX och HSFY (Budzyński och Sistonen, 2017). Av dem är HSF1 den huvudsakliga HSF:n för regleringen av HSR.

2.2.1 HSF1

HSF1 är ett evolutionärt sett välkonserverat protein med stora likheter till HSF i evertebrater eller jäst, vilka bara har en värmechockfaktor. Under stressfria förhållanden hålls HSF1 i en inaktiv, monomerisk form i cytosolen. När en cell utsätts för proteotoxisk stress aktiveras HSF1, och det bildar trimerer via oligomeriseringsdomänerna HR-A/B (figur 1) som består av sju upprepningar av hydrofoba aminosyror (eng. heptad hydrophobic repeats, HR). HSF1 kan därefter transporteras in i cellkärnan. HSF1-trimerernas DNA-bindande domäner (DBD:er) kan binda till HSE på DNA och påverkar transkriptionen av bland annat HSPs (Gomez-Pastor m.fl., 2018). Eftersom HSF1 är en trimer måste minst tre HSE finnas i närheten av varandra på DNA för att HSF1 skall kunna binda till dem (Amin m.fl., 1988). HSF1 är värmekänsligt och kan trimerisera in vitro vid förhöjda temperaturer, men trimeriseringen räcker inte för att HSF1 skall kunna binda DNA in vivo (Ahn, 2003; Gomez-Pastor m.fl., 2018). HSF1:s funktion styrs också av flera posttranslationella modifieringar (PTM:er) såsom fosforylering, acetylering och sumoylering (Gomez-Pastor m.fl., 2018).

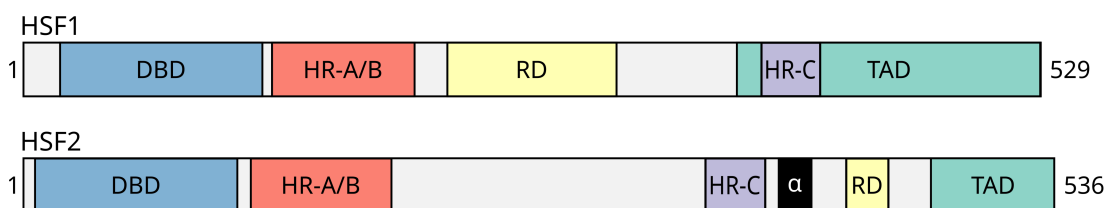
HSF1 har roller även utanför stressresponsen och krävs bland annat för bildningen av luktepitel åtminstone i möss (Takaki m.fl., 2006). HSF1 är även viktigt för utvecklingen av könsceller och HSF1 knockout (KO) honmöss är sterila (Vihervaara och Sistonen, 2014). Proteinnivåerna av HSF1 har även kopplats till flera sjukdomar. HSF1-nivåerna har visats vara nedsatta hos patienter med Huntingtons, Parkinsons och Alzheimers sjukdom samt hos patienter med amyotrofisk lateralskleros (ALS) (Gomez-Pastor m.fl., 2018). Utmärkande för dessa neurodegenerativa sjukdomar är ansamlingen av felaktigt veckade proteiner som orsakar proteotoxisk stress och celldöd. Proteinnivåerna av HSF1 är istället förhöjda i många sorters cancer och HSF1-nivåerna korrelerar med dålig prognos (Dai och Sampson, 2016, och referenser däri). Detta antas bero på att cancerceller utsätts för stressande förhållanden såsom syre- och näringsbrist, och att de därför utnyttjar HSF1 och HSR för att överleva (Dai m.fl., 2007; Gomez-Pastor m.fl., 2018). Denna indirekta koppling till cancer styrks av att HSF1 inte självständigt kan orsaka cancer (Luo m.fl., 2009).

HSF1 är den mest studerade värmechockfaktorn, och dess funktion är mest väldefinierad. För HSR är HSF1 den viktigaste HSF:n och dess funktion kan påverkas av många olika PTM:er. Funktionen för HSF1 kan även modifieras genom heterotrimerisering med värmechockfaktor 2, en HSF vars funktioner ännu inte är tydligt definierade (Budzyński och Sistonen, 2017; Sandqvist m.fl., 2009).

2.2.2 HSF2

HSF2 är en transkriptionsfaktor som identifierades utgående från att dess DBD samt oligomeriseringsdomäner (HR-A/B) har hög homologi (79 % identitet) med motsvarande domäner i HSF1 (Sarge m.fl., 1991; Schuetz m.fl.,

1991). Proteinerna i helhet har dock lägre homologi (38 % identitet). HSF2 har flera domäner som identifierats eftersom de har likheter med domäner i HSF1 (figur 1). Förutom DBD och HR-A/B har HSF1 och HSF2 även HR-C som har inhibitorisk effekt på oligomeriseringsdomänen. De har även en transaktiveringsdomän (TAD) och en regulatorisk domän (RD) som har inhibitorisk effekt på TAD, men TAD och RD skiljer sig betydligt mellan HSF1 och HSF2 (Green m.fl., 1995; Yoshima m.fl., 1998). Även om domäner har stora likheter kan det finnas betydande skillnader mellan deras funktioner. Ett exempel på detta är att HSF2 i inaktiv form bildar dimerer (Sistonen m.fl., 1994). Det finns även två isoformer av HSF2, HSF2 α och HSF2 β . HSF2 α har 536 aminosyror medan HSF2 β saknar aminosyrorna 393-410 och bara har 518 aminosyror (Goodson m.fl., 1995, figur 1).



Figur 1: Schematisk illustration över identifierade domäner i HSF1 och HSF2. Proteinernas domäner samt den HSF2 α -specifika regionen är utmärkta med olika färger och förkortningar enligt följande: DNA-bindande domäner (DBD:er), oligomeriseringsdomäner (HR-A/B), oligomeriseringsinhibitoriska domäner (HR-C), regulatoriska domäner (RD:er), transaktiverande domäner (TAD:er) samt HSF2 α -specifik region (α). Figuren är baserad på information från The UniProt Consortium, 2018 och Yoshima m.fl., 1998.

Trots de strukturella likheterna har HSF2 mycket olika egenskaper än HSF1. HSF1 är ett stabilt protein medan HSF2 är mycket kortlivat och nedbryts av ubiquitin-proteasomsystemet (Mathew m.fl., 1998). HSF2 aktiveras dessutom inte av värme in vitro (Ahn m.fl., 2001), utan bryts istället ned vid akut värmestress (Ahlskog m.fl., 2010). Mild värmestress som motsvarar feber-

temperaturer (40-41 °C) kan dock leda till HSF2-aktivering in vivo (Shinkawa m.fl., 2011). HSF2 aktiveras även om ubiquitin-proteasomsystemet inhiberas med MG132, bortezomib eller laktocystin. Proteasominhibering med dessa ämnen leder också till att HSF2-proteinnivåerna stiger, både eftersom nedbrytningen av HSF2 blockerats och av att hsf2-transkriptionen ökar (Kawazoe m.fl., 1998; Mathew m.fl., 1998; Rossi m.fl., 2014). Proteasominhibering leder även till att HSF2 α -isoformens andel ökar (Lecomte m.fl., 2013).

Aktiverat HSF2 bildar trimerer som transporteras in i cellkärnan där de kan binda till HSE på DNA. HSF1 och HSF2 har både egna och gemensamma bindningsställen (Gomez-Pastor m.fl., 2018). Om HSF2-proteinnivåerna är höga kan HSF2 binda till hsf2-genens promotor (Park m.fl., 2015). Detta resulterar i nedreglering av HSF2 på mRNA-nivå, och HSF2 reglerar således delvis sitt uttryck. HSF1 och HSF2 kan även bilda heterotrimerer, där heterotrimeriseringen är beroende av HSF2-koncentrationerna (Sandqvist m.fl., 2009). Heterotrimererna har transkriptionell aktivitet som reglerar uttryck av hsp-gener (Östling m.fl., 2007). HSF2 kan därmed i samverkan med HSF1 modulera HSR.

2.2.2.1 HSF2 i fysiologiska processer

HSF2 medverkar i mitosen, där det kan binda till DNA. Under mitosen förhindras transkription av de flesta gener och DNA:et är tätt packat, vilket gör att få proteiner kan binda till DNA. HSF2 kan under dessa förhållanden vara bundet till specifika gener, vilket möjliggör snabb transkription av dem efter mitosen eftersom HSF2 fungerat som bokmärke (Vihervaara m.fl., 2013; Xing m.fl., 2005). HSF2 inhiberar dock också uttrycket av HSPA (HSP70) under mitosen, vilket leder till att cellerna blir känsligare för värmestress (Elsing

m.fl., 2014). Proteinnivåerna av HSF2 måste därför noggrant regleras under mitosen.

På vävnadsnivå påträffas HSF2 i så gott som alla vävnader, men HSF2 uttrycks speciellt i testikel (Fiorenza m.fl., 1995) samt i centrala nervsystemet (CNS) under embryonalutvecklingen (Rallu m.fl., 1997). I testiklar är HSF2-proteinnivåerna höga främst i spermatocyter och spermatider, som är tidigare utvecklingsstadier av spermier (Sarge m.fl., 1994). Balansen mellan HSF2:s isoformer varierar även i olika vävnader, där testiklar har större andel HSF2 α medan HSF2 β är den dominanta isoformen i hjärna och hjärta (Goodson m.fl., 1995). Rollen som HSF2 spelar i dessa vävnader blev tydligare efter att musmodeller som saknar HSF2, HSF2 knockout-modeller (KO-modeller), framställts (Kallio m.fl., 2002; Wang m.fl., 2003).

HSF2 KO-modellerna uppvisade minskad testikelstorlek, minskat spermieantal och förändrad spermimorfologi, vilket styrkte HSF2:s roll i spermatogenesen. Detta hade dock inte signifikant påverkan på fruktbarheten vid parning med vildtypshonor (Kallio m.fl., 2002; Wang m.fl., 2003; Åkerfelt m.fl., 2008). Däremot är hanmöss som saknar både HSF1 och HSF2 helt sterila trots att möss som bara saknar HSF1 har normal spermatogenes (Wang m.fl., 2004). Detta tyder på att samverkan mellan HSF1 och HSF2 är viktigare för spermatogenesen än deras enskilda funktioner, eller att de kan kompensera för varandra i spermatogenesen.

HSF2 KO-musmodellerna hade även störningar i CNS-utvecklingen, med förstörade laterala och tredje hjärnventriklar samt blödningar i ventrikelhålrummen (Kallio m.fl., 2002; Wang m.fl., 2003). Detta kan förklara den ökade embryodödligheten för HSF2 KO-embryon. Senare bevisades det att HSF2 krävs för normal hjärnbarksutveckling, eftersom avsaknaden av HSF2 resulterar i inkorrekt migration av neuroner (Chang m.fl., 2006). HSF2 har

således flera viktiga fysiologiska funktioner, och har även kopplats till flera sjukdomstillstånd.

2.2.2.2 HSF2 i sjukdomstillstånd

Fetala alkoholspektrumstörningar (eng. fetal alcohol spectrum disorders, FASD) är ett samlingsnamn för fosterstörningar som orsakas av alkohol under graviditet. Speciellt allvarliga fall kallas fetalt alkoholsyndrom (FAS) som bland annat leder till förändrade ansiktsdrag och lägre hjärnvikt. Störningarna i FAS beror delvis på att anormala HSF1-HSF2-trimerer bildas (El Fatimy m.fl., 2014). I dessa heterotrimerer har HSF1 ett specifikt mönster av PTM:er som endast bildas om HSR aktiverats av etanol, vilket påverkar bindningen till DNA och leder till anormalt genuttryck. Om FAS induceras hos HSF2 KO-möss orsakas dock mildare störningar, eftersom de anormala heterotrimererna inte kan bildas.

Likt HSF1 har även HSF2 kopplingar till cancer, men HSF2:s inverkan varierar mycket mellan olika cancertyper. Prover från patienter med lungcancer visade till exempel att HSF2-nivåerna var förhöjda i 78 % av fallen (Zhong m.fl., 2016). Uppreglering av HSF2 i lungcancercellinjen A549 ledde också till ökad migration och proliferation av cellerna. Baserat på patientmaterial är HSF2 istället nedreglerat i småcelligt lungkarcinom, invasivt bröstcancer och prostatacancer (Zhong m.fl., 2016). När HSF2 nedreglerades i 3D-odlingar av prostatacancer cellinjen PC-3 ökade cellernas invasiva egenskaper (Björk m.fl., 2016). Björk och medarbetare upptäckte också att nedregleringen av HSF2 under dessa förhållanden påverkar gener för kadheriner, integriner och cytoskelettet vilket påverkar adhesion mellan celler och mellan celler och extracellulärmatrisen (ECM:et).

2.3 ECM-celladhesion

Celler kan förankra sig genom adhesion till ECM och dessa adhesionsreceptorer utnyttjas även för att förmedla information om cellernas omgivning. Genom integrinsignalering och mekanotransduktion kan celler anpassa sig till omgivningens förhållanden (Das m.fl., 2014; Heath och Dunn, 1978). Signalerna från ECM kan bland annat leda till att celler prolifererar eller differentierar (Das m.fl., 2014; Giancotti, 1999). Adherenta celler kan också genomgå apoptos som en följd av förlorad ECM-kontakt, vilket även kallas anoikis (Frisch och Screaton, 2001). Det finns flera olika cell-ECM-kontakter varav fokaladhesionsreceptorer (FA:er) upptäcktes först och är de mest undersökta. För att FA:er skall bildas krävs integrinsignalering (BurrIDGE, 2017; Heath och Dunn, 1978).

2.3.1 Integriner och fokaladhesionsreceptorer

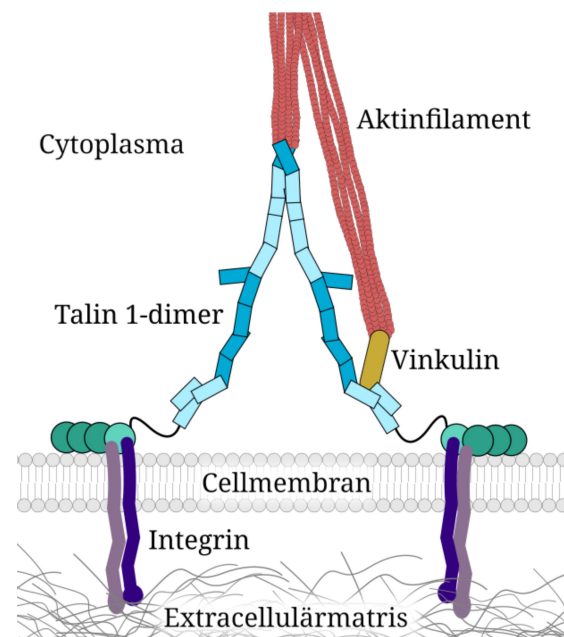
Integriner är en familj adhesionsreceptorer som består av två underenheter, α och β . De är transmembranproteiner med många olika varianter av både α - och β -underenheter, varav 24 kombinationer påträffats hos däggdjur. Ligandspecificiteten för integrinheterodimerens extracellulära och cytoplasmiska svansar varierar mellan dessa kombinationer (Calderwood, 2004; Giancotti, 1999). De extracellulära svansarna binder olika ECM-komponenter medan den cytoplasmiska svansen kan binda till olika proteiner såsom proteiner från talin- och kindlin-familjerna (Das m.fl., 2014). Integriner kan ansamlas och via t.ex. bundet talin 1 koppla cytoskelettet (främst aktinfilament) till ECM. När en integrinadhesion stabiliserats av en mängd olika proteiner och har kopplats till cytoskelettet har en FA bildats.

Vid FA sker dubbelriktad kommunikation via integrinerna (Klapholz och Brown, 2017). Beroende på bundna ECM-ligander förändras konformationen

för integrinernas cytoplasmiska svansar vilket påverkar rekryteringen av integrinadhesionsprotein (IAP). Som en följd av detta kan information om substratet förmedlas via integrinerna in i cellen. Detta aktiverar signalräckor så att cellen kan anpassa sig till substratet. På motsvarande sätt påverkar IAP:er som är bundna till de cytoplasmiska domänerna konformationen av de extracellulära svansarna, vilket förändrar ligandaffiniteten. På detta sätt kan integriner även förmedla information från cellens insida till dess utsida (Calderwood, 2004). En ökning av ligandaffiniteten hos integriner kallas integrinaktivering, vilket kan ske som en följd av ansamling av integriner eller genom påverkan av specifika IAP. Ett mycket viktigt IAP som bland annat aktiverar integriner, men som främst fungerar som adaptorprotein vid integrinadhesioner är talin 1 (TLN1).

2.3.2 Talin 1

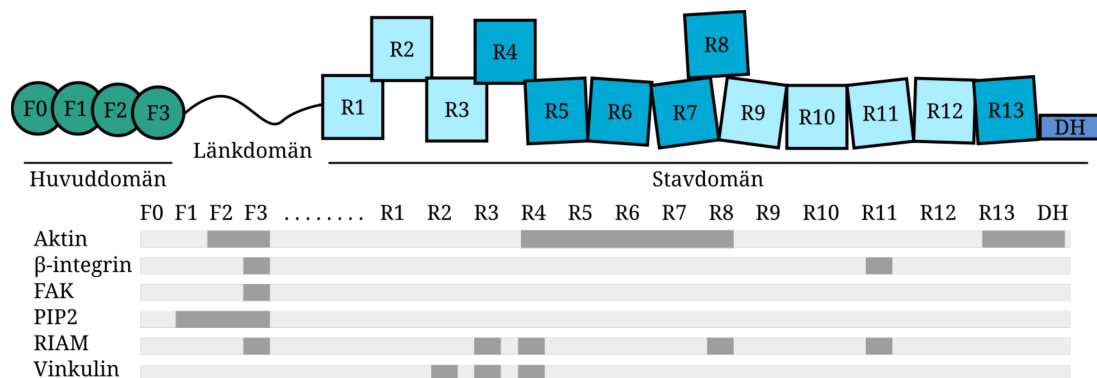
FA:er har länge associerats med aktinfilament, men länken mellan integriner och aktin var okänd. Upptäckten av TLN1, som kan binda både de cytoplasmiska svansarna av många β -integriner och aktin (figur 2), gav förklaringen på detta. TLN1 är ett ungefär 270 kDa stort cytoplasmiskt adaptorprotein, vars funktioner grundar sig på förmågan att binda och föra samman andra proteiner (Roberts och Critchley, 2009). TLN1 bildar tillsammans med talin 2 (TLN2)



Figur 2: TLN1 fungerar som en länk mellan integriner och aktinfilament. TLN1-dimerens huvuddomäner kan binda till integriner, varefter svansdomänerna kan binda aktinfilament. Figuren är baserad på modellen i Gough & Goult, 2018.

proteinfamiljen talin. TLN1 och TLN2 är mycket lika varandra och de har delvis överlappande funktioner. Båda proteinerna påträffas i så gott som alla vävnader men TLN1 är den dominerande talinen i alla förutom hjärtvävnad (Monkley m.fl., 2001). I denna avhandling pro gradu behandlas endast TLN1.

TLN1 kan delas in i tre delar; huvud-, länk- och stavdomän (figur 3). Huvudet är ungefär 50 kDa och består av en FERM-domän med tre lobar, F1-F3-domänerna, samt en F0-domän med liknande struktur som F1-domänen (Goult m.fl., 2010). Huvuddomänen kan binda de cytoplasmiska svansarna av β -integriner, aktin och fokaladhesionskinas (FAK), och den kan dessutom binda direkt till membran som innehåller fosfatidylinositol-4,5-bifosfat (eng. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2) (Goult m.fl., 2010; Lee m.fl., 2004). Via den korta (ungefär 80 aminosyror) länkdomänen kopplas huvuddomänen till stavdomänen. Länkdomänen är ostrukturerad och möjliggör rörelsefrihet mellan huvud- och stavdomänerna.



Figur 3: Struktur av TLN1. TLN1 består av en huvuddomän (F0-F3), en länkdomän och en stavdomän (R1-R13 + dimeriseringsspiralen DH). Stavdomänen består av 13 buntar av fyra (ljusblå) eller fem (mörkblå) alfaspiraler. TLN1 har bindningsställen för många proteiner, men endast bindningsställen för aktin, β -integrin, FAK, PIP2, RIAM och vinkulin är utmärkta. Figuren baserar sig på modellen i Klapholz & Brown, 2017.

Stavdomänen av TLN1 är ungefär 220 kDa och delas in i buntar med fyra eller fem alfaspiraler, R1-R13. Slutligen finns även en dimeriseringsspiral, DH (eng. dimerisation helix) (Klapholz och Brown, 2017). Stavdomänen innehåller bindningsställen för bland annat β -integrin, aktin, vinkulin och Rap1-GTP-interagerande adaptormolekyl (RIAM), men många bindningsställen är otillgängliga för deras ligander under normala förhållanden. Detta var förbryllande tills det visades att TLN1 kan sträckas ut av mekanisk stress (Goult m.fl., 2013b).

TLN1 förekommer som en fri, inaktiv dimer i cytosolen. Strukturen bildas genom en interaktion i båda monomererna mellan F3 i huvuddomänen och R9 i stavdomänen. I den inaktiva dimeren är de flesta bindningsställen otillgängliga, inklusive de för β -integrin i huvuddomänerna (Goult m.fl., 2013a). Mekanismen bakom aktiveringen av TLN1 är oklara, men flera alternativ har föreslagits. Ett av dem är att TLN1 kan binda RIAM som kan rekryteras till cellmembranen och integriner där autoinhibitionen bryts (Goksoy m.fl., 2008; Klapholz och Brown, 2017). FAK har också visats kunna rekrytera TLN1 till nybildade adhesionser (Lawson m.fl., 2012).

En TLN1-dimer innehåller minst fyra bindningsställen för β -integrin och sex för aktin vilket gör att TLN1 kan orsaka integrinaktivering genom att föra samman integrinerna (Han m.fl., 2006). Bindningen av TLN1 till β -integrin orsakar även konformationsförändringar i β -integrin, och TLN1 har därmed även direkt integrinaktiverande aktivitet (Tadokoro m.fl., 2003). Dessutom har proteiner som binder till TLN1, såsom RIAM, också visats kunna aktivera integriner (Han m.fl., 2006). Efter att ha bundit β -integrin binder TLN1 till aktinfilament, vilka sedan kan sträcka ut TLN1 till dess öppna konformation (figur 2). Bindningsställen för RIAM störs och för vinkulin tillgängliggörs, där vinkulin också kan binda aktin och antas stabilisera FA-komplexet (figur 2, Goult m.fl., 2013b).

Sträckningen av TLN1 sker stegvis utgående från hur stor sträckningskraft proteinet utsätts för och TLN1 återgår mot stängd konformation om kraften minskar (Yao m.fl., 2016). Detta leder till att bindningsställen på TLN1 varierar beroende på hur utsträckt det är, vilket gör TLN1 kritiskt för att omvandla mekaniska signaler till kemiska i cellen. Förutom signalering har TLN1 även föreslagits fungera som en molekylär stötdämpare för cellen eftersom energi kan absorberas av konformationsförändringarna när alfa-spiralbuntarna öppnas och stängs (Yao m.fl., 2017).

Funktionerna för TLN1 kompliceras ytterligare av att proteinet kan klyvas av calpain och calpain2 i länkdomänen så att huvudet och staven skiljs åt. Den klyvda huvuddomänen kan aktivera integriner mer effektivt (Goksoy m.fl., 2008). TLN1 förekommer därmed i många olika former; fritt i cytosolen som inaktiva dimerer, vid adhesioner som aktiva dimerer och i klyvd form.

Med tanke på hur viktigt adhesion är för celler i olika vävnader är det inte överraskande att störningar i TLN1 har allvarliga konsekvenser. Total avsaknad av TLN1 är dödlig redan under embryonalstadier i möss (Monkley m.fl., 2000). TLN1, TLN2 och vinkulin är också nedreglerade i fall av åderförkalkning (von Essen m.fl., 2016). Främst har dock förändringar i TLN1 kopplats till cancer eftersom TLN1 bland annat påverkar migration, proliferation och anoikisresistens vilka krävs för metastasbildning (Sakamoto m.fl., 2010).

2.3.3 Talin 1 och cancer

TLN1-nivåerna är förhöjda i många sorters cancer såsom prostata-, bröst- och äggstockscancer samt glioblastom (Beaty m.fl., 2014; Kang m.fl., 2015; Sakamoto m.fl., 2010; Tang m.fl., 2013; Xu m.fl., 2016; Zhang m.fl., 2016), där

TLN1 orsakar ökad adhesion, migration och invasion. Nivåerna av TLN1 i metastaser av prostatacancer är högre än i primärtumörerna och dessutom högre i mindre differentierade tumörer (Sakamoto m.fl., 2010; Xu m.fl., 2016). Sakamoto och medarbetare bevisade även att migrations- och invasionspotentialen för flera prostatacancercellinjer var beroende av TLN1-nivåerna; cellmigrationen och -invasionen ökade om TLN1 uppreglerades och minskade om TLN1 nedreglerades.

TLN1 främjar även metastasbildning genom anoikisresistens. Detta leder till att cancercellerna inte genomgår apoptos även om de förlorar kontakten med ECM (Sakamoto m.fl., 2010). TLN1 kan också motverka effektiviteten av anti-angiogeniska läkemedel som getts mot glioblastom. Nedreglering av TLN1 minskade läkemedelsresistensen och även glioblastomcellernas elakartade egenskaper (Kang m.fl., 2015). TLN1:s funktion i adhesion och migration främjar således egenskaper som är typiska för elakartade tumörer på flera sätt.

3 Målsättningar

Tidigare studier gjorda i Prof. Lea Sistonens laboratorium vid Åbo Akademi identifierade TLN1 som en möjlig interaktionspartner till HSF2 (Alejandro Da Silva, opublicerade resultat). Eftersom HSF2-nivåerna är höga i testiklar (Fiorenza m.fl., 1995), utförde Da Silva koimmunoprecipitation (eng. co-immunoprecipitation, co-IP) av HSF2 och immunglobulin G (IgG, användes som negativ kontroll) från mustestikelhomogenat. Proteinerna separerades enligt storlek och proteinband som var tydliga i HSF2-IP:en samt saknades i IgG-IP:en analyserades med masspektrometri (Da Silva, opublicerade resultat). Utifrån detta identifierades TLN1 som en möjlig interaktionspartner till HSF2. Da Silva bekräftade därefter med co-IP och Western blot (WB) att

HSF2 och TLN1 även bildar komplex i PC-3-celler. TLN1 bildar dessutom inte komplex med HSF1, vilket tyder på att fenomenet är specifikt för HSF2 (Da Silva, opublicerade resultat). HSF2 har en sekvens, ⁵²²APAPLDSDMPLLD⁵³⁵, som liknar en känd TLN1-bindande sekvens (personlig kommunikation, Benjamin Goult, University of Kent, UK). En HSF2-plasmid med mutationerna L526A, D527A (⁵²²APAP~~A~~SDMPLLD⁵³⁵), som borde förhindra TLN1-bindning, framställdes i Prof. Sistonens laboratorium av Marek Budzyński och Da Silva. HSF2 med dessa mutationer kallas HSF2-m2A.

Syftet med denna avhandling pro gradu var att **1)** evaluera cellinjer som modellsystem för karaktärisering av den potentiella HSF2-TLN1-interaktionen samt att **2)** utreda om interaktionen förhindras av HSF2-mutationerna L526A och D527A i HSF2-m2A. Den första målsättningen, evalueringen av cellinjer, var att identifiera celler där HSF2 och TLN1 tydligt bildar komplex och där transfektion kan utföras med minst 50 % transfektionseffektivitet. De humana cellinjerna RWPE-1, PC-3, U2OS, U2OS HSF2 knockout, MCF-10A och MCF-7 samt muscellinjen MEF evaluerades med koimmunprecipitation och Western blot, och transfektionseffektiviteten kontrollerades med immunfluorescens eller genom transfektion med en rapporteringsgen. Två par av cellinjer härstammande från samma vävnad som representerade normala celler eller cancerceller (RWPE-1 och PC-3 samt MCF-10A och MCF-7) valdes för att utreda om det fanns cancerspecifika skillnader i komplexbildningen av HSF2 och TLN1. Ytterligare valdes cellinjen U2OS eftersom en HSF2 knockout-variant fanns tillgänglig, vilket kunde vara fördelaktigt för den andra målsättningen.

Den andra målsättningen var att med transfektion och koimmunprecipitation utreda om mutationerna i HSF2-m2A förhindrar interaktion med TLN1. Eftersom HSF2-m2A borde kunna bilda trimerer med HSF2 skulle tolkningen av dessa resultat förenklas om U2OS-varianten utan HSF2 kunde användas. Om HSF2-m2A inte kan bilda komplex med TLN1 antyder det att den

muterade sekvensen ingår i gränssytan för en direkt interaktion mellan HSF2 och TLN1.

4 Material och metoder

4.1 Cellkultur

4.1.1 Använda cellinjer

I denna avhandling pro gradu användes flera olika cellinjer. Dessa valdes för att kunna jämföra celler som härstammar från olika vävnader, för att jämföra cancerceller med celler som har normal fenotyp eller för att cellinjen saknade HSF2. Cellinjerna erhöles från ATCC om annat inte nämns.

4.1.1.1 RWPE-1

RWPE-1 är prostataepitelceller som immortaliserats med mänskligt papillomvirus 18. RWPE-1-celler uttrycker prostataspecifikt antigen och androgenreceptorer, är inte invasiva och bildar inte heller tumörer. RWPE-1-celler liknar således normala epitelceller från prostata, och används som modell för dem (Bello m.fl., 1997).

4.1.1.2 PC-3

PC-3 är en mänsklig cellinje som härstammar från en benmetastas av prostatacancer (Kaighn m.fl., 1979). Cellinjen har egenskaper som liknar småcelligt neuroendokrint karcinom av prostata, vilket är en ovanlig typ av prostatacancer som är mycket aggressiv. Därför har PC-3-celler ofta använts som modell för aggressiv prostatacancer (Tai m.fl., 2011). Cellinjen har tidigare använts för att studera både HSF2 (Björk m.fl., 2016) och TLN1 (Sakamoto m.fl., 2010; Zhang m.fl., 2015). PC-3-cellinjen representerar

cancerceller från prostataepitel medan RWPE-1 representerar normala prostataepitelceller.

4.1.1.3 MCF-10A

Cellinjen MCF-10A härstammar från normala epitelceller från mänskligt bröst som immortaliserats genom odling i media med låg kalciumhalt. Cellerna har normal fenotyp, kan inte bilda tumörer och kan användas som modell för normala bröstepitelceller (Soule m.fl., 1990). MCF-10A-cellinjen har använts bland annat för att studera HSF1 (Guertin och Lis, 2010).

4.1.1.4 MCF-7

MCF-7-cellinjen härstammar från mänsklig metastatisk bröstcancer. Eftersom cellerna bibehåller särdrag för bröstepitel, såsom cytoplasmiska östrogenreceptorer, används cellinjen som modell för hormonkänslig bröstcancer (Soule m.fl., 1973). MCF-7 var den första etablerade cellinjen av hormonkänslig bröstcancer och har använts i forskning kring bröstcancer (Levenson och Jordan, 1997), TLN1 (Lin m.fl., 2010; Thapa m.fl., 2017) och HSF2 (Elsing m.fl., 2014). Cellinjerna MCF-7 och MCF-10A används ofta tillsammans som modeller för elakartade respektive normala bröstepitelceller.

4.1.1.5 U2OS

Cellinjen U2OS (ursprungligen kallad 2T) härstammar från mänskligt osteosarkom, en typ av bencancer. U2OS är mesenkymceller, men deras fenotyp påminner om epitelceller (Ponten och Saksela, 1967). Cellinjen har tidigare använts för forskning kring HSF2 (Elsing m.fl., 2014) och TLN1

(Rahikainen m.fl., 2017). Cellinjen var en gåva av Valerie Mezger, Université Paris Diderot, Frankrike.

4.1.1.6 U2OS HSF2 Knockout

U2OS HSF2 Knockout (KO), härfter kallad endast U2OS 2KO är en variant av U2OS-cellinjen som saknar HSF2. Cellinjen var en gåva av Valerie Mezger. U2OS 2KO framställdes med hjälp av genediteringssystemet CRISPR/Cas9 som utnyttjar det RNA-guidade endonukleaset Cas9 för att klyva DNA vid en specifik sekvens såsom exon 1 av hsf2-genen (Lino m.fl., 2018). Om DNA-skadan repareras genom icke-homolog sammanfogning kan det ske deletions- eller insertionsmutationer, vilka stör genens funktion. U2OS 2KO-cellerna härstammar från en klon där hsf2-genens funktion eliminerats.

4.1.1.7 MEF

MEF används ofta ett generiskt namn för embryonala musfibroblaster, men i detta arbete användes en specifik cellinje av MEF som härstammar från BALB/c-möss (McMillan m.fl., 1998). Denna cellinje har tidigare bland annat använts för forskning kring HSF1 och HSF2 (Budzyński m.fl., 2015; Östling m.fl., 2007). Cellerna var en gåva av Ivor Benjamin, Milwaukee, Medical College of Wisconsin, USA.

4.1.2 Odling och delning av celler

Alla celler odlades på odlingsplattor av polystyren. Cellerna inkuberades vid 37 °C i inkubator med fuktad 5 % CO₂ atmosfär. Odlingsmedia som användes för cellinjerna finns i tabell 1. Odlingsplattorna återanvändes upp till tre gånger.

Tabell 1: Odlingsmedia som använts för de använda cellinjerna. Penicillin-streptomycin (100 µg/ml och 100 U/ml) tillsattes till samtliga odlingsmedia

Cellinje	Media (Gibco)	Serum	Övriga tillsatser
RWPE-1	Keratinocyte-SFM		
PC-3	RPMI 1640	10 % FBS	100 µM L-glutamin
U2OS	DMEM	10 % FBS	100 µM L-glutamin
U2OS 2KO	DMEM	10 % FBS	100 µM L-glutamin
MCF-10A	DMEM/F-12 GlutaMAX	10 % Hästserum	100 µM L-glutamin 0,5 mg/ml Hydrokortison 10 µg/ml Insulin 100 ng/ml Koleratoxin 10 µg/ml EGF
MCF-7	RPMI 1640	10 % FBS	100 µM L-glutamin
MEF	DMEM	10 % FBS	100 µM L-glutamin 1X Icke-essentiella aminosyror (Från 100X Gibco 11140035) 0,05 % β-merkaptoetanol

Alla i detta arbete använda cellinjer är adherenta celler och de måste därför lösgöras från odlingsplattorna för att kunna sprida cellerna till större antal odlingsplattor. För detta användes trypsin 0,25 %-etylendiamintetraättiksyra (eng. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) från Biowest. Trypsinet inaktiverades genom tillsats av odlingsmedia med serum förutom för cellinjen RWPE-1 för vilken 3 % fetalt bovint serum (FBS) i fosfatbuffrad saltlösning (eng. phosphate-buffered saline, PBS) användes. Trypsinet bör inaktiveras eftersom långvarig trypsinaktivitet kan vara skadlig för cellerna (Phelan och May, 2017). Cellerna centrifugerades med 200 g i 4 min. För delning av celler blandades pelleten med odlingsmedia tills den var upplöst varefter cellsuspensionen delades på odlingsplattor.

4.1.3 Skördning och lysering av celler

För att kunna utföra analyser av cellernas proteiner måste cellerna skördas och lyseras. Lyseringen bryter sönder cell- och organellmembranerna så att proteinerna frigörs. Cellerna skördades genom skrapning efter tillsats av Lilas lysisbuffert (se receptbilagan). Efter 30 min inkubation med rotation centrifugerades lysaten i 10 min med 21 800 g för att avlägsna bland annat olyserade celler och olösliga cellrester. Supernatantens proteinkoncentration mättes med Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) och en Hidex Sense-mikroplattläsare.

4.2 Koimmunprecipitation

Immunprecipitation, IP, är en metod som används för att separera specifika proteiner från en blandning, till exempel celllys, med hjälp av antikroppar och icke-lösliga immunadsorbenter. Antikropparna binder specifikt till målproteinet och en immunadsorbent, såsom sefaroskolor med protein A eller G, binder till antikropparnas tunga kedja. Komplexet kan därefter separeras från blandningen (Anderson och Blobel, 1983).

Koimmunprecipitation är en vidareutveckling av IP där antikropparna är specifika för ett så kallat betesprotein. För co-IP används mildare lysis- och tvättbuffertar för att bevara proteininteraktioner, vilket leder till att betesproteinet samt proteiner som det bildat komplex med isoleras tillsammans (proteinerna koprecipiterar). Proteinerna som koprecipiterats kan identifieras med bland annat WB och masspektrometri (Free m.fl., 2009). Co-IP användes i denna avhandling pro gradu för att utreda om HSF2 och TLN1 koprecipiterar i olika cellinjer.

Co-IP påbörjades genom att odla celler till 80-95 % konfluens, varefter de skördades och lyserades enligt 4.1. För ett co-IP-prov användes celllysats med 750 µg protein, och totalvolymen var 500-600 µl. Som immunabsorbent användes sefaroskylor med protein G (GE Healthcare) som tvättats med TEG (se receptbilagan) och blandats med TEG så att halva volymen bestod av sefaroskylor. Proven inkuberades i 30 min vid 4 °C under rotation med 30 µl sefaros-TEG-blandning för att avlägsna proteiner som kan binda ospecifict till protein G eller sefaroskylor. Proven centrifugerades i 2 min vid 4 °C med 2000 g och supernatanterna sparades. Antikropparna tillsattes (se tabell 2 för använda antikroppar) och proven inkuberades över natten vid 4 °C med rotation. Eftersom de använda antikropparna var av klassen IgG användes normalt IgG, en blandning av ospecifica IgG-antikroppar, av samma art som kontroll för proteiner som ospecifict binder till alla IgG-antikroppar.

Tabell 2: Antikroppar som använts för co-IP

Antikropp	Produktkod	Värdart	Mängd per IP
HSF2 #58f	Icke-kommersiell	Kanin	5 µl, okänd koncentration
c-Myc	M4439 (Sigma)	Mus	5 µg
Normal IgG	12-370 (Millipore)	Kanin	2 µg
Normal IgG	12-371 (Millipore)	Mus	2 µg
TLN1 8D4	Ab157808 (Abcam)	Mus	5 µg
TLN1 8D4	T3287 (Sigma)	Mus	5 µg

Följande dag inkuberades proven i 3 h vid 4 °C med rotation tillsammans med 30 µl sefaros-TEG-blandning. Proven centrifugerades därefter i 2 min vid 4 °C med 2000 g och supernatanten avlägsnades. Obundna proteiner avlägsnades genom att skölja sefaroskylorna 4 gånger med co-IP-tvättbuffert (se receptbilagan) med 2 min, 2000 g centrifugering mellan sköljningarna.

Slutligen tillsattes 45 µl Laemmliprovbuffert (se receptbilaga) med β-merkaptoetanol och proven kokades i 5 min. Provvbufferten innehöll

natriumdodecylsulfat (SDS). Detta bryter proteinbindningarna och denaturerar proteinerna, vilket leder till att proteinerna frigörs från varandra och från sefarioskulorna. Proven centrifugerades slutligen i 10 min med maximal hastighet varefter supernatanten användes för WB.

4.3 Western blot

Western blot (WB) är en av de mest använda metoderna för att analysera proteininnehållet i prov. Proteiner i provet separeras enligt storlek på en gel och överförs därefter till ett membran av t.ex. nitrocellulosa. Metoden utnyttjar antikroppar för att identifiera relativa mängder av specifika proteiner mellan prov (Towbin m.fl., 1979).

4.3.1 Natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgelelektrofores

För att separera proteiner enligt storlek användes SDS-polyakrylamidgelelektrofores (SDS-PAGE). Proven kokades 5 min i Laemmli-provbuffert med β -merkaptoetanol för att bryta bindningar mellan proteiner och för de skall veckas ut till sin lineära primärstruktur. SDS ger även proteinerna en negativ nettoladdning, vilket gör att de påverkas av elektrofores (Alberts m.fl., 2014).

Proven samt en markör för molekylvikt (Precision Plus Protein Dual Color, Bio-Rad eller iBright Prestained Protein Ladder, Invitrogen) kördes med 200-300 V elektrofores på en 4-20 % gradientgel (Mini-PROTAN TGX stain-free, Bio-Rad) tills en bra separering av proteinband uppnåtts. Proteinerna separeras enligt storlek eftersom rörelsen av större proteiner bromsas mera av gelen. För körningen användes en SDS-PAGE-körningsbuffert (se receptbilagan).

Proteinerna överfördes med elektrofores från gelen till membran av nitrocellulosa (0,45 μ m, GE-healthcare eller Bio-Rad) eller polyvinyliden-

difluorid (PVDF, Bio-Rad). För detta användes två olika metoder. Blöt överföring (eng. wet transfer) utfördes i en kammare på is med wet transfer-buffert (se receptbilagan) i 45 min med 120 V. För Bio-Rads Trans-blot turbo transfer-system användes Trans-blot turbo transfer-överföringsbuffert (Bio-Rad) och för överföringen av proteiner användes 2,5 A, 25 V i 7 min för ett membran eller 10 min för två membran. Efter att proteinerna överförts kokades membranerna i MQ-vatten i 15 min, eftersom det förbättrade signalen om HSF2-antikroppar användes. Dessutom användes HSF2-antikropparna alltid först på membranerna eftersom de fungerade bäst om de användes på nya membran.

4.3.2 Behandling av membran med antikroppar

4.3.2.1 Antikroppsbehandling med inkubation över natten

Nitrocellulosa- och PVDF-membran är proteinbindande och kan därför också ospecifikt binda antikroppar. På grund av detta måste membranet mättas, eller blockeras, med proteiner så att antikropparna endast binder till sina målproteiner. För antikroppsbehandling med inkubation över natten blockerades membranerna med 0,05 % Tween20 och 5 % fettfri mjölk i PBS, 1 h vid rumstemperatur. Obunden blockeringslösning sköljdes bort med MQ-vatten och membranerna inkuberades i primärantikroppslösning (primärantikropp i 0,5 % bovint serumalbumin (BSA), 0,02 % NaN_3 i PBS) över natten vid 4 °C. Följande dag tvättades membranerna 3×5 min med WB-tvättlösning (PBS + 0,3 % Tween20) varefter de inkuberades i 1 h med sekundärantikroppslösning (sekundärantikropp i blockeringslösning). En lista med de använda antikropparna finns i tabell 3. Membranerna tvättades 3×5 min med WB-tvättlösning och antikropparna detekterades slutligen med förstärkt kemiluminiscens (eng. enhanced chemiluminescence, ECL).

Tabell 3: Primär- och sekundärantikroppar som använts för Western blot.

Primärantikropp	Produktkod	Värdart	Utspädning
HSF2 3E2	MAB88079 (Millipore)	Råtta	1:1000
HSF2 "S."	HPA031455 (Sigma-Aldrich)	Kanin	1:1000
HSF1 10H8	SMC-118C (StressMarq Biosciences)	Råtta	1:1000
TLN1 8D4	Ab157808 (Abcam)	Mus	1:1000
TLN1 8D4	T3287 (Sigma)	Mus	1:1000
Myc 9E12	M4439 (Sigma)	Mus	1:1000
Sekundärantikropp	Produktkod	Värdart	Utspädning
Anti-kanin IgG, HRP	W4011 (Promega)	Get	1:25000
Anti-mus IgG, HRP	NA931 (GE Healthcare)	Får	1:5000
Anti-råtta IgG, HRP	NA935 (GE Healthcare)	Get	1:3000

4.3.2.2 Antikroppsbehandling med ett SNAP i.d. 2.0-protein-detektionssystem

Antikroppsbehandling med ett SNAP i.d. 2.0-proteindetektionssystem (Millipore) är ett alternativ till antikroppsbehandling med inkubation över natten. Systemet utnyttjar en vakuumpump som suger lösningar genom membranen vilket möjliggör att motsvarande antikroppsbehandling som i 4.3.2.1 kan utföras på 30 min. Systemet användes enligt tillverkarens instruktioner med 0,1 % Tween20 + 0,5 % fettfri mjölk i PBS som blockeringslösning och 0,1 % Tween20 i PBS som tvättlösning samt primär- och sekundärantikroppslösning. Efter behandlingen detekterades antikropparna med ECL.

4.3.2.3 Immundetektering med förstärkt kemiluminiscens

Sekundärantikropparna som användes var konjugerade till enzymet pepparrotsperoxidase (eng. horseradish peroxidase, HRP), ett enzym som katalyserar en reaktion i ECL-substratet där ljus är en av produkterna. Eftersom HRP endast är närvarande där antikropparna är fästa är ljuset

lokaliserat där antikropparna och därmed målproteinet finns. För detekteringen användes antingen röntgenfilm (Fujifilm) som framkallades med Curix 60 (Agfa) eller ett iBright FL1000 Imaging System (ThermoFisher Scientific) som direkt detekterar ljuset med en kamera.

4.3.2.4 Förberedelse av membran för följande antikropps-behandling

För att avlägsna bundna antikroppar och förbereda membranerna för inkubation med en annan antikropp inkuberades membranerna i 15 min i en lösning innehållande 0,2 M glycin och 0,5 M NaCl med pH 2,9 som värmts till kokpunkten. Membranerna tvättades 3×5 min med tvättilösningen i 4.3.2.1 eller 4.3.2.2, varefter de behandlades med följande antikropp.

4.4 Mutagenes av plasmider

Nedreglering av ett protein med kort hårnåls-RNA (eng. short hairpin RNA, shRNA) baserar sig på att shRNA:et binder en specifik sekvens i mRNA. I detta arbete användes en plasmid för shRNA mot HSF2 samt en plasmid med ospecifik sekvens för användning som negativ kontroll (Östling m.fl., 2007). För att kunna nedreglera ett endogent protein utan att påverka uttrycket av exogent protein kan tysta mutationer, som ändrar nukleotidsekvensen utan att påverka aminosyrasekvensen, användas. I detta arbete introducerades istället HSF2-m2A-mutationen till en plasmid som redan innehöll shRNA-resistent vildtyp HSF2 (Björk m.fl., 2016). DNA-primrarna för m2A-mutationen designades av Da Silva och Budzyński med hjälp av QuikChange Primer Design (Agilent, tillgängligt från adressen www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp).

Mutagenesen utfördes med ett QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Aglient), som är ett kit för riktad mutagenes av dubbelsträngat DNA in vitro. För detta användes mutagena DNA-primrar (en primer per DNA-sträng, sekvenserna finns i bilaga 8.2.2) samt plasmider som innehöll genen som skulle muteras. Eftersom primrarna sträcker sig över ett större område än mutationspunkten kan de fästa sig vid templat-DNA:et trots att mutationspunktens nukleotider är inkorrekta.

Mutagenesreaktionen utfördes enligt protokollet för QuikChange II och med en T100 termocykler (Bio-Rad). Skedena för en cykel är följande: Denaturering av templat-DNA (95 °C, 30 s), fästning av DNA-primrarna till templat-DNA (55 °C, 1 min) samt förlängning av primrarna med DNA-polymeras tills nya strängar som innehåller mutationen bildats (68 °C, 7 min). För denna mutagenes användes 16 cykler.

Eftersom DNA som producerats av bakterier ofta är metylerat medan DNA som framställts av mutagenesreaktionen är ometylerat är det möjligt att avlägsna templat-DNA:et (Weiner m.fl., 1994). Detta görs genom att inkubera reaktionslösningen i 1 h vid 37 °C med restriktionsenzymet Dpn I, vilket endast klyver metylerat DNA. Efter detta användes den muterade plasmiden för att transformera bakterier.

4.5 Transformation av bakterier för DNA-kloning

För transformation användes kompetenta JM109-celler (Promega) eller superkompetenta XL1-Blue-celler (Aglient) som är bakterier med förmågan att ta upp DNA från omgivningen. Respektive tillverkarens protokoll följdes, förutom att 50 µl celler och 450 µl superoptimal buljong med katabolitrepression (eng. super optimal broth with catabolite repression, SOC-media) användes. Efter transformationen spriddes 100 µl av transformationsblandningen ut på

odlingsplattor med 10 % agar i lysogenibuljong (LB, se receptbilagan) och ampicillin (50 µg/ml), eftersom de använda plasmiderna innehöll en gen för ampicillinresistens. Plattor med 1:10 och 1:100 utspädningar av transformationsblandningen förbereddes enligt behov. Plattorna inkuberades över natten vid 37 °C eller över veckoslutet vid rumstemperatur.

4.5.1 Isolering och sekvensering av plasmider

4.5.1.1 Isolering av plasmider

Mutagenesen kontrollerades med sekvensering av plasmid-DNA från transformationerna. Från varje odlingsplatta med transformerade celler valdes upp till 5 enskilda kolonier som inkuberades över natten i 4 ml LB-media med 25 µg/ml ampicillin för att framställa tillräcklig plasmidmängd för sekvensering. Plasmiderna isolerades från 3,5 ml av bakterieblandningen med Monarch Plasmid Miniprep kit (New England BioLabs) enligt tillverkarens instruktioner, förutom att TE-buffert (se receptbilagan) användes för elueringen av plasmider. Plasmidkoncentrationen mättes med en NanoDrop 2000 spektrofotometer (ThermoFisher Scientific). Plasmiderna skickades därefter till sekvensering, som beskrivs i 4.5.1.2. Glycerolstammar (eng. glycerol stocks) med 40 % glycerol framställdes från kvarvarande bakterieblandningar om sekvenseringsresultaten var positiva. Glycerolstammarna förvarades vid -80°C.

För att framställa tillräckligt stor mängd plasmid för transfektion odlades bakterier direkt från en glycerolstam i 400 ml LB-media med 25 µg/ml ampicillin över natten vid 37 °C. MaxiPrep kit (QIAGEN) användes därefter enligt tillverkarens instruktioner, förutom att elueringen utfördes med TE-buffert för att isolera plasmider från bakterierna. Plasmidernas koncentration

mättes med en NanoDrop 2000 spektrofotometer, och skickades till sekvensering om plasmider från glycerolstocken inte tidigare sekvenserats.

4.5.1.2 Sekvensering

Plasmiderna sekvenserades med Mix2Seq kit (Eurofins) enligt tillverkarens instruktioner. Sekvenseringsprimrarna valdes utifrån plasmidvektorn så att inserten sekvenserades (se bilaga 8.2.1 för använda primrar). Plasmiderna validerades genom multipel sekvensinriktning i programmet SnapGene (version 3.3.4, från GSL Biotech; tillgängligt från snapgene.com). För mutagenesvalidering inriktades sekvenseringsresultaten med den ursprungliga plasmiden och för validering av inserten inriktades sekvenseringsresultaten med nukleotidsekvensen för genen i fråga.

4.6 Transient transfektion av RWPE-1-, PC-3- och U2OS 2KO-celler

Med transient transfektion avses att främmande DNA förs in i celler men förblir separat från cellens arvsmassa, och eftersom eukaryota celler inte kan replikera bakterieplasmider förloras de efter en tid genom nedbrytning och celledelning (Kim och Eberwine, 2010). Det finns många olika transfektionsmetoder, men de kan grovt delas in i kategorierna biologiska, kemiska eller fysiska transfektionsmetoder. I detta arbete användes transfektion med polyetylenimin (PEI, kemisk metod) och elektroporering (mekanisk metod) för transient transfektion av humana celler.

4.6.1 Transfektion av cellinjen U2OS 2KO med polyetylenimin

Transfektion med PEI är en kemisk, lipidbaserad transfektionsmetod. När PEI blandas med DNA bildas katjoniska lipiddroppar med DNA:et på insidan som fäster sig vid cellmembranet, som är anjoniskt. De fasta dropparna endocyteras, vilket frigör deras DNA-innehåll inuti cellen (Longo m.fl., 2013).

I detta arbete transfekterades endast U2OS 2KO-celler med PEI. Cellerna odlades enligt 4.1, förbereddes på samma sätt som för celldelning (4.1.2) och räknades med en Bürkerkammare. Cellerna inkuberades över natten vid 37 °C på en 6-brunnsplatta, 150 000 celler per brunn. Följande dag blandades 3 µg DNA och 6, 9 eller 12 µg PEI med 400 µl Opti-MEM (ThermoFisher Scientific) som inkuberades i 15 min vid rumstemperatur. Odlingsmediet ersattes därefter med DNA-PEI-blandningen och cellerna inkuberades över natten vid 37 °C, varefter cellerna odlades i vanligt odlingsmedia i en dag.

4.6.2 Transfektion av RWPE-1-, PC-3- och U2OS 2KO-celler med elektroporering

Elektroporering är en mekanisk transfektionsmetod där celler utsätts för ett elektriskt fält som öppnar små, kortlivade porer i cellmembranet. Främmande DNA kan via dessa porer ta sig in i cellen (Wong och Neumann, 1982). För elektroporering odlades cellerna enligt 4.1, förbereddes som för celldelning (4.1.2) och cellerna räknades med en Bürker-kammare eller en Countess II automatisk cellräknare (Thermo Fisher Scientific). Två olika elektroporeringssystem användes. U2OS 2KO- och RWPE-1-celler transfekterades med ett GenePulser Xcell-elektroporeringsystem (Bio-Rad) med cellerna i Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). För 2 mm kyvetter användes en transfektionsvolym på 200 µl medan 400 µl användes för 4 mm kyvetter.

För alla transfektioner användes 975 mF och $\infty \Omega$, medan spänningen varierade mellan 220 och 240 V, beroende på resultatet av optimeringen som utfördes enligt 4.6.3.

PC-3-celler transfekterades genom elektroporering med ett Neon-transfektionssystem (Thermo Fisher Scientific). Cellerna förbereddes på samma sätt som ovan, men blandades med Neon-resuspensionsbuffert R (Thermo Fisher Scientific). För en transfektion användes $3-8 \times 10^6$ celler med parametrarna 1250 V, 30 ms pulsbredd och 1 puls med 100 μ l transfektionsspetsar.

Alla använda cellinjer transfekterades med mock (tom pcDNA3.1(-)-plasmid), vildtyp HSF2 och HSF2-m2A. För U2OS 2KO-cellinjen, som saknar endogent HSF2, användes sådan mängd av plasmiderna att ett motsvarande HSF2-uttryck som i vildtyp (eng. wild type, WT) U2OS uppnåddes. RWPE-1-cellinjen kotransfekterades dessutom med antingen shRNA mot HSF2 för att nedreglera endogent, omuterat HSF2 eller Scramble, en negativ kontroll för shRNA med slumpmässig nukleotidsekvens. PC-3-cellinjen kotransfekterades med 5 μ g plasmid för grönt fluorescerande protein (GFP) och 15 μ g mock, vildtyp HSF2 eller HSF2-m2A så att en kraftig uppreglering orsakades. Efter transfektion inkuberades cellerna i odlingsmedia 1-2 dagar vid 37 °C, oberoende av vilket elektroporeringsystem som använts.

4.6.3 Optimering av transfektionsparametrar och transfektionseffektivitet

Transfektionseffektivitet är andelen celler som framgångsrikt transfekterats. Eftersom analyserna utfördes på hela cellpopulationen eftersträvades minst 50 % transfektionseffektivitet för att få pålitliga resultat. För att maximera transfektionseffektiviteten och för att erhålla tillräckligt stor mängd celler för

co-IP utreddes flera transfektionsparametrar såsom elektroporerings-spänning, cellantal, antal transfektioner per plasmid och inkubationstider. Både transfektion med gfp som rapporteringsgen och immunfluorescens utnyttjades för att mäta transfektionseffektiviteten.

4.6.3.1 Transfektion med gfp som rapporteringsgenen

$1,25 \times 10^6$ celler transfekterades med 220-240 V spänning och 3-15 μg GFP-plasmid (pEGFP-N2, Clontech), varefter de inkuberades på 6-brunnsplattor i 1-2 dagar. Ett EVOS FL cell imaging system (Thermo Fisher Scientific) eller ett Axio Vert.A1 mikroskop (Zeiss) med kamera användes därefter för att ta bilder av cellerna från minst två delar av varje brunn. Cellantalet från bilderna räknades manuellt med ImageJ. Antalet synliga celler på GFP-bilderna (celler som framgångsrikt transfekterats och uttrycker GFP) dividerades med det totala antalet celler på ljustmikroskopibilderna för att beräkna transfektionseffektiviteten. Eftersom TLN1-GFP användes för uppreglering av TLN1 i PC-3-cellinjen kunde transfektionseffektiviteten mätas på motsvarande sätt som ovan utan att skilt transfektera cellerna med GFP.

4.6.3.2 Immunfluorescens

Immunfluorescens är en metod som utnyttjar antikroppar konjugerade till fluoroforer för att visualisera proteiner i celler. I detta arbete användes indirekt immunfluorescens, där fluoroforerna är konjugerade till sekundärantikroppar som binder till de okonjugerade primärantikropparna. Fluoroforerna absorberar ljus av specifika våglängder och avger därefter ljus med lägre energi (längre våglängder). Ljuset kan detekteras med fluorescensmikroskop (Taylor m.fl., 2013).

En 6-brunnsplatta förbereddes genom att täckglas av glas lades i botten på varje brunn, efter att de doppats i 70 % etanol och torkats över öppen låga. Celler transfekterades enligt 4.6.2 med HSF2 WT, HSF2-m2A eller mock. Elektroporeringen utfördes med parametrarna 240 V, 975 mF, $\infty \Omega$ i 4 mm kyvetter. Efter transfektion överfördes $1,25 \times 10^6$ celler till en brunn med täckglas i 6-brunnsplattan. Cellerna inkuberades i odlingsmedium i 24 h.

Cellerna på täckglaset fixerades och permeabiliserades med en lösning med 3 % formaldehyd och 0,5 % TritonX-100 i PBS. Fixeringen stoppar biologiska processer så att cellens tillstånd bevaras och permeabiliseringen gör hål i cellens lipidmembraner som antikropparna kan ta sig genom. Cellerna inkuberades vid rumstemperatur över ett veckoslut i IF-blockeringslösning (0,1 % Tween20 och 3 % BSA i PBS), varefter cellerna tvättades 3×10 min med IF tvättlösning (0,1 % Tween20 i PBS). Primärantikroppar mot Myc (Sigma-Aldrich M4439, 1:800) eller HSF2 (Sigma-Aldrich HPA031455, 1:60) i IF-blockeringslösning tillsattes och cellerna inkuberas över natten vid 4 °C.

Obundna primärantikroppar avlägsnades med 3×10 min tvättar med IF-tvättlösning. Cellerna inkuberades i 1 h med 1:500 α -mus Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific) för α -Myc eller 1:400 α -kanin Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) för α -HSF2 i IF-blockeringslösning. Efter ytterligare 3×10 min tvättar med IF-tvättlösning användes monteringsmedia med DAPI (VECTASHIELD) för att montera täckglaset på objektglas med cellsidan neråt, och täckglaset förseglades med genomskinligt nagellack. Cellerna visualiserades i ett Eclipse Ti2-mikroskop (Nikon) och räknades manuellt i ImageJ. Transfektionseffektiviteten beräknades som i 4.6.3.1, men DAPI användes för att räkna det totala antalet celler eftersom det färgar cellkärnor.

5 Resultat

5.1 HSF2-TLN1-komplexbildning i olika cellinjer

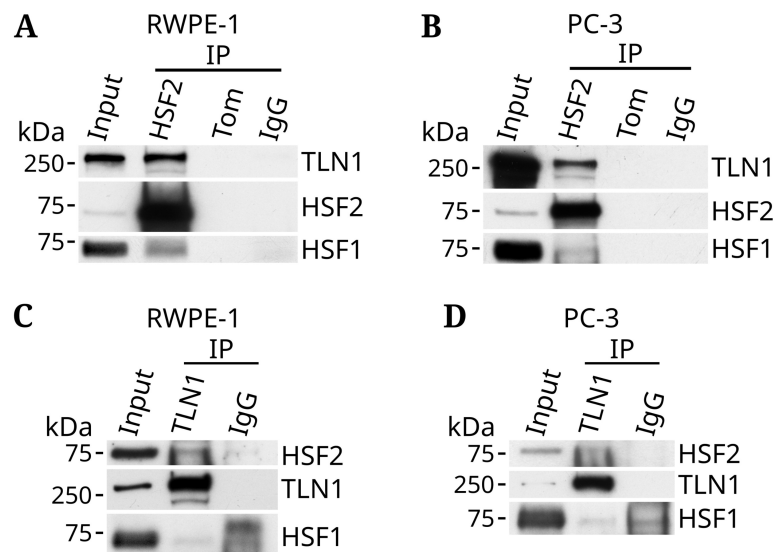
Det första steget för att välja ett modellsystem för den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1 var att studera i vilka cellinjer HSF2 och TLN1 förekommer som komplex. Detta utreddes med co-IP av både HSF2 och TLN1 och alla co-IP-resultat analyserades med WB. Helcellslysats (eng. whole cell lysate, WCL) användes som input och det fungerade som positivt kontrollprov för WB. Komplexbildningens styrka i de olika cellinjerna jämfördes med respektive cellinjes input, så att bildningen av HSF2-TLN1-komplex ansågs vara kraftig om proteinnivån i input och co-IP-provet var av motsvarande styrka. IP med ospecifika IgG-antikroppar användes som ett negativt kontrollprov för IP:erna. Proteinerna ansågs ha precipiterat specifikt om signalen i IgG var svagare än i HSF2- eller TLN1-IP-proven enligt WB. HSF1 användes som positiv kontroll för co-IP med HSF2 eftersom HSF1 och HSF2 kan bilda heterotrimerer (Sandqvist m.fl., 2009). Motsvarande positiv kontroll för co-IP med TLN1 saknades, eftersom ingen specifik signal kunde detekteras för β 1-integrin, FAK eller aktin (data visas inte), trots att dessa proteiner kan interagera med TLN1 (Lawson m.fl., 2012).

5.1.1 Komplexbildning av HSF2 och TLN1 i prostataepitelcellinjerna RWPE-1 och PC-3

Cellinjerna RWPE-1 och PC-3 användes för att utreda om det fanns tydliga skillnader i HSF2-TLN1-komplexbildning mellan prostataepitelceller med normal fenotyp och cancerfenotyp. HSF2-TLN1-komplexbildningen i RWPE-1-cellinjen var kraftig (figur 4A). IP av HSF2 i RWPE-1 ledde till en anrikning av HSF2, vilket visar att IP:en fungerat. HSF1, den positiva kontrollen för co-IP, bildade komplex med HSF2. I PC-3-celler kunde komplexbildning mellan HSF2

och TLN1 samt HSF2 och HSF1 detekteras, och HSF2 anrikades av HSF2-IP:en (figur 4B). HSF2-TLN1-komplexbildningens styrka i PC-3-cellerna var medelmåttig. HSF2-IP utfördes även en gång från RWPE-1-celler som odlats till 80 eller 95 % konfluens (se supplementär figur 1 i bilaga 8.4). Dessa resultat är preliminära, men de antyder att cellernas odlingskonfluens påverkar HSF2-TLN1-komplexbildningen.

Komplexbildning mellan HSF2 och TLN1 utreddes även med TLN1 som betesprotein. I TLN1-IP från cellinjerna RWPE-1 och PC-3 detekterades svag komplexbildning mellan TLN1 och HSF2 (figur 4C och D). TLN1 anrikades av TLN1-IP:erna i både RWPE-1 och PC-3. HSF1 detekterades i TLN1-IP-proven, men detta berodde inte på specifik komplexbildning med TLN1 eftersom IgG-provet hade starkare HSF1-signal.



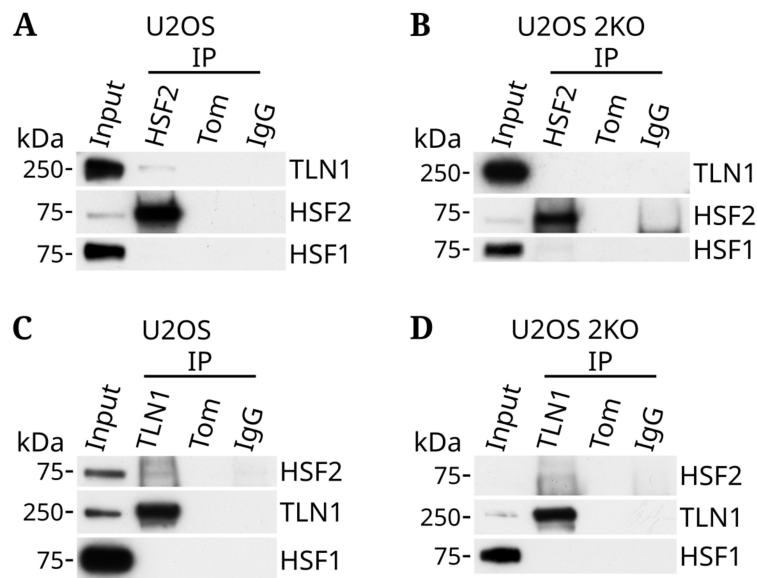
Figur 4: HSF2 och TLN1 bildar komplex i RWPE-1- och PC-3-celler. Western blot-resultat av HSF2-IP i cellinjerna RWPE-1 (A) och PC-3 (B) samt resultat av TLN1-IP i RWPE-1 (C) och PC-3 (D). Cellysat (15 µg, input) användes som positivt kontrollprov i Western blot, följt av co-IP av HSF2 eller TLN1. IgG användes som kontroll för ospecifik bindning (negativ kontroll i immunprecipitationsexperimenten). IP:erna av HSF2, TLN1 och IgG utfördes från cellysat med 750 µg protein. Membranen blottades med antikroppar mot TLN1, HSF2 och HSF1, där HSF1 användes som positiv kontroll för HSF2-IP. TLN1-IP:erna blottades mot HSF1 för att säkerställa att HSF1 inte bildar komplex med TLN1. Resultaten är representativa utgående från tre experiment.

5.1.2 Komplexbildning av HSF2 och TLN1 i osteosarkomcellinjerna U2OS och U2OS 2KO

Komplexbildningen av HSF2 och TLN1 i cellinjen U2OS studerades för att utreda om U2OS 2KO-cellinjen kunde användas som modellsystem. Komplexbildningen av HSF2 och TLN1 i U2OS-2KO-cellinjen utfördes som en negativ kontroll för komplexbildningen utöver IgG-proven, eftersom cellinjen saknar HSF2. Svag komplexbildning av HSF2 och TLN1 kunde detekteras i HSF2-IP från U2OS-celler (figur 5A). HSF2 anrikades, men HSF1 saknades i HSF2-IP-provet. HSF2-IP-provet från U2OS-2KO-celler validerade att cellinjen

saknar HSF2, men ett protein av något lägre molekylärvikt än HSF2 i U2OS-celler var både synligt i input och anrikades av HSF2-IP (figur 5B). Detta protein bildade dock inte komplex med HSF1 eller TLN1.

I TLN1-IP från U2OS-celler kunde svag komplexbildning mellan TLN1 och HSF2 detekteras (figur 5C). I U2OS 2KO-cellerna kunde inget tydligt HSF2-proteinband detekteras i input eller TLN1-IP-provet (figur 5D). TLN1 anrikades och HSF1 saknades i TLN1-IP-proven från både U2OS- och U2OS 2KO-celler.



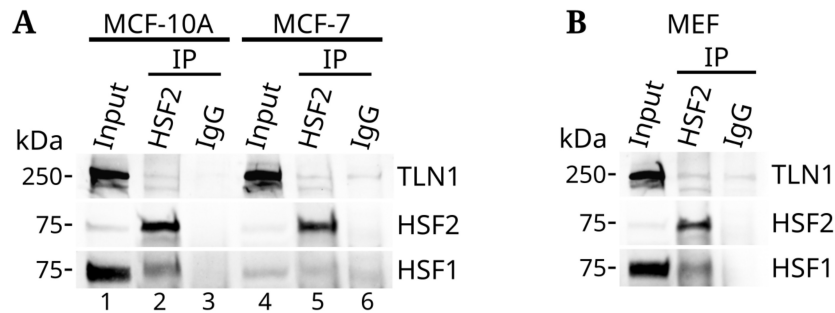
Figur 5: HSF2 och TLN1 bildar komplex i U2OS-celler. Western blot-resultat av HSF2- eller TLN1-IP från U2OS- eller U2OS 2KO-celler. **A)** HSF2-IP från U2OS-celler. **B)** HSF2-IP från U2OS 2KO-celler. **C)** TLN1-IP från U2OS WT-celler. **D)** TLN1-IP från U2OS 2KO-celler. Membranen blottades med antikroppar mot TLN1, HSF2 och HSF1. Cellysat (15 µg, input) användes som positiv kontroll för Western blot, och IgG som negativ kontroll för ospecifik bindning i immunprecipitationsexperimenten. För varje IP-prov användes cellysat med 750 µg protein. Resultaten är representativa utgående från tre experiment.

5.1.3 Komplexbildning av HSF2 och TLN1 i bröstepitelcellinjerna MCF-10A och MCF-7

Bröstepitelcellinjerna MCF-10A, som har normal fenotyp, och MCF-7, som har cancerfenotyp, jämfördes för att utreda om det fanns tydliga skillnader i komplexbildning av HSF2 och TLN1 mellan dessa celltyper. När HSF2-IP utfördes observerades specifik komplexbildning av HSF2 och TLN1 endast i MCF-10A-cellinjen (figur 6A). HSF2 anrikades av HSF2-IP från både MCF-10A- och MCF-7-celler men specifik HSF1-signal i HSF2-IP-prov detekterades endast i MCF-10A-cellerna.

5.1.4 Komplexbildning av HSF2 och TLN1 i den embryonala musfibroblastcellinjen MEF

Komplexbildning av HSF2 och TLN1 utreddes även med IP av HSF2 i en cellinje från möss, den embryonala musfibroblastcellinjen MEF (figur 6B). I MEF-celler saknades specifik komplexbildning av HSF2 och TLN1. HSF2 anrikades framgångsrikt av HSF2-IP:en och komplexbildning med HSF1 kunde detekteras.



Figur 6: TLN1 bildar komplex med HSF2 i cellinjen MCF-10A men inte i MCF-7 eller MEF. Western blot-resultat från HSF2-IP i de humana cellinjerna MCF-10A, MCF-7 och muscellinjen MEF. Cellysat (15 µg) användes som positiv för Western blot och IgG som negativ kontroll för immunprecipitationsexperimenten. För ett IP-prov användes cellysat med 750 µg protein. Membranet blottades med antikroppar mot TLN1, HSF2 och HSF1. **A)** Western blot-resultat från HSF2-IP i cellinjerna MCF-10A och MCF-7. Resultaten är representativa utgående från två experiment. **B)** Western blot-resultat från HSF2-IP i MEF-celler. Resultaten är representativa utgående från tre experiment.

5.2 Transfektion av olika cellinjer

5.2.1 Val av cellinjer för transfektionsoptimering

Slutmålet i detta arbete var att utreda om mutationerna i HSF2-m2A påverkar komplexbildningen mellan HSF2 och TLN1. För detta användes transient transfektion. För att erhålla representativa resultat från transfekterade celler eftersträvades minst 50 % transfektionseffektivitet, och för att uppnå detta utfördes transfektionsoptimering. Endast cellinjer med tydlig komplexbildning av HSF2 och TLN1 enligt resultaten i 5.1 beaktades, och av dessa cellinjer valdes U2OS 2KO och RWPE-1 för transfektionsoptimering.

Cellinjen U2OS 2KO valdes eftersom komplexbildning av HSF2 och TLN1 detekterades i U2OS (figur 5) och komplexbildningen således borde återställas till U2OS 2KO om HSF2 återintroduceras via transfektion. Eftersom U2OS 2KO

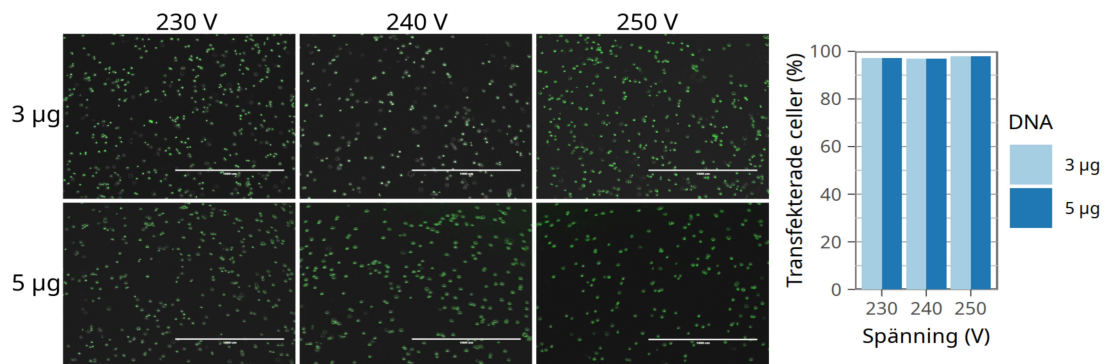
saknar endogent HSF2 säkerställer det att all HSF2-aktivitet orsakats av exogent HSF2 från transfektion. Cellinjen RWPE-1 valdes för transfektionsoptimering eftersom komplexbildningen av HSF2 och TLN1 var kraftigare än i övriga undersökta cellinjer. PC-3-cellinjen var ytterligare ett alternativ för transfektion, men eftersom cellinjen tidigare använts för transfektion i Sistonens laboratorium krävdes ingen transfektionsoptimering för den (Björk m.fl., 2016).

5.2.2 Optimering av transfektionsparametrar

Transfektionsparametrarna optimerades för cellinjerna U2OS 2KO och RWPE-1. För detta utreddes flera DNA- och PEI-koncentrationer för transfektion med PEI, medan spänning och DNA-koncentrationer varierades för elektroporering. Transfektionseffektiviteten mättes genom transfektion med gfp som rapporteringsgen eller med IF-färgning med antikroppar mot HSF2 och proteinmärkningen Myc. Celler som transfekterats hade GFP- eller IF-signal, och dessa celler räknades och jämfördes med det totala antalet celler för att beräkna transfektionseffektiviteten.

5.2.2.1 Transfektionsoptimering för RWPE-1-celler

Transfektionseffektiviteten för cellinjen RWPE-1 utreddes med 3 eller 5 µg GFP-plasmid och 230, 240 eller 250 V transfektionsspänning (figur 7). Mängden GFP-positiva celler indikerade att transfektionseffektiviteten var över 95 % för samtliga parametrar, med något högre effektivitet då 5 µg DNA användes. Parametrarna 5 µg DNA med 230 V transfektionsspänning valdes eftersom en visuell inspektion av brunnarna indikerade att ett större antal celler överlevde transfektion under dessa förhållanden än efter transfektion med 250 V (data visas inte).



Figur 7: Transfektionseffektivitet för RWPE-1-celler vid transfektion med GFP. RWPE-1-celler transfekterades med indikerad mängd GFP-plasmid och elektroporeringsspänning. Bilder togs med fluorescensmikroskop efter 24 h. Den vita linjen representerar 1,0 mm. Det totala antalet celler samt antalet transfikerade celler räknades manuellt med ImageJ. Transfektionseffektiviteten beräknades med R från ett experiment.

5.2.2.2 Transfektionsoptimering för U2OS 2KO-celler

Transfektionseffektiviteten med elektroporering mättes först genom att transfektera U2OS 2KO-celler med en plasmid innehållande en gfp-gen. Antalet transfikerade celler, som uttrycker GFP från plasmiden, kunde beräknas under ett fluorescensmikroskop. Vid elektroporering med 5, 10 eller 15 µg GFP-plasmid med 240 V spänning var transfektionseffektiviteten under 15 % för samtliga DNA-koncentrationer (figur 8A). Skillnaden i transfektionseffektivitet mellan DNA-koncentrationerna var liten. Transfektionseffektiviteten ökade med stigande spänning vid elektroporering med 4 µg GFP-plasmid och 220, 230 eller 240 V (figur 8B). Transfektionseffektiviteten var trots detta under 30 % vid 240 V.

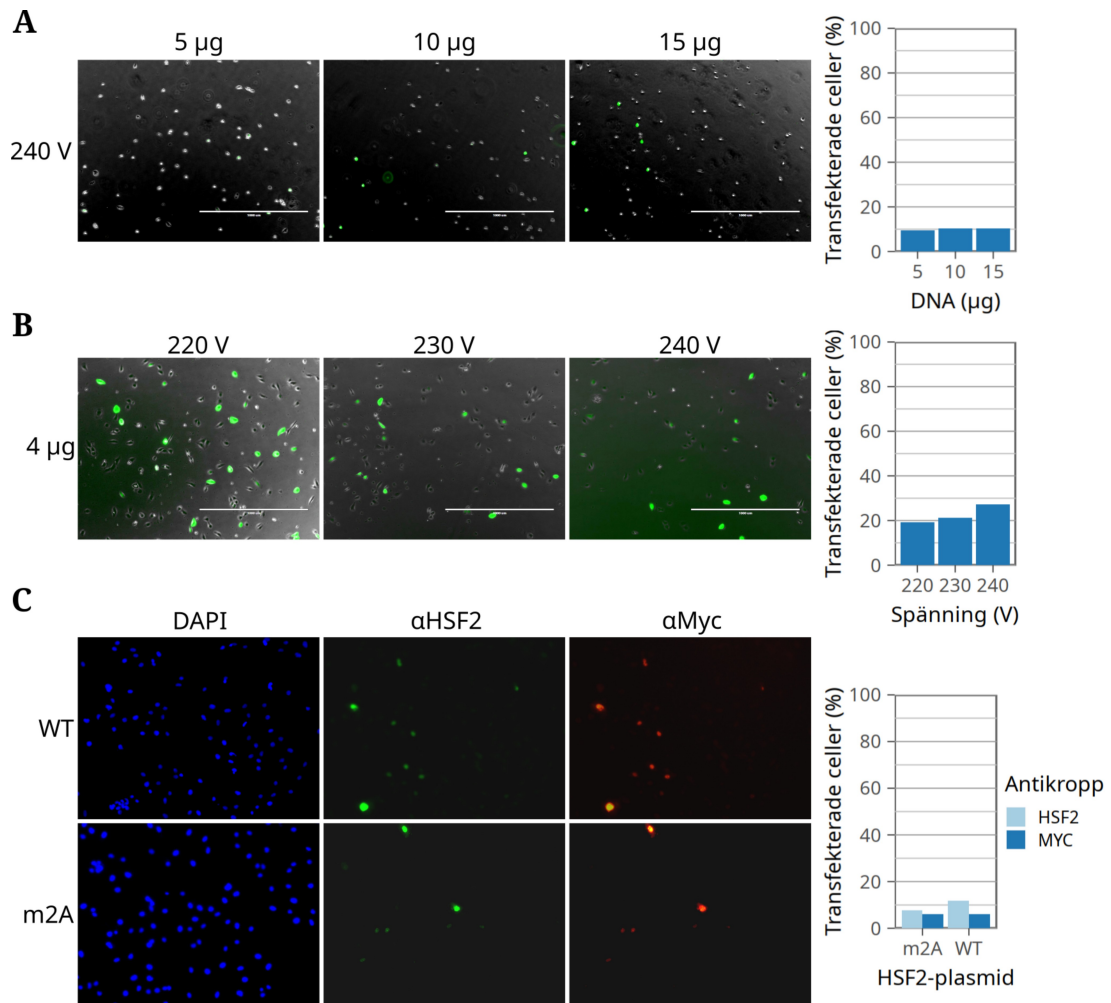
Transfektionseffektiviteten utreddes även specifikt för de plasmider som senare skulle användas, HSF2 WT och HSF2-m2A. Detta utfördes genom IF-färgning med antikroppar mot HSF2 och proteinmärkningen Myc.

Transfektionseffektiviteten var under 15 % för både HSF2 WT och HSF2-m2A enligt antalet HSF2- eller Myc-positiva celler (figur 8C).

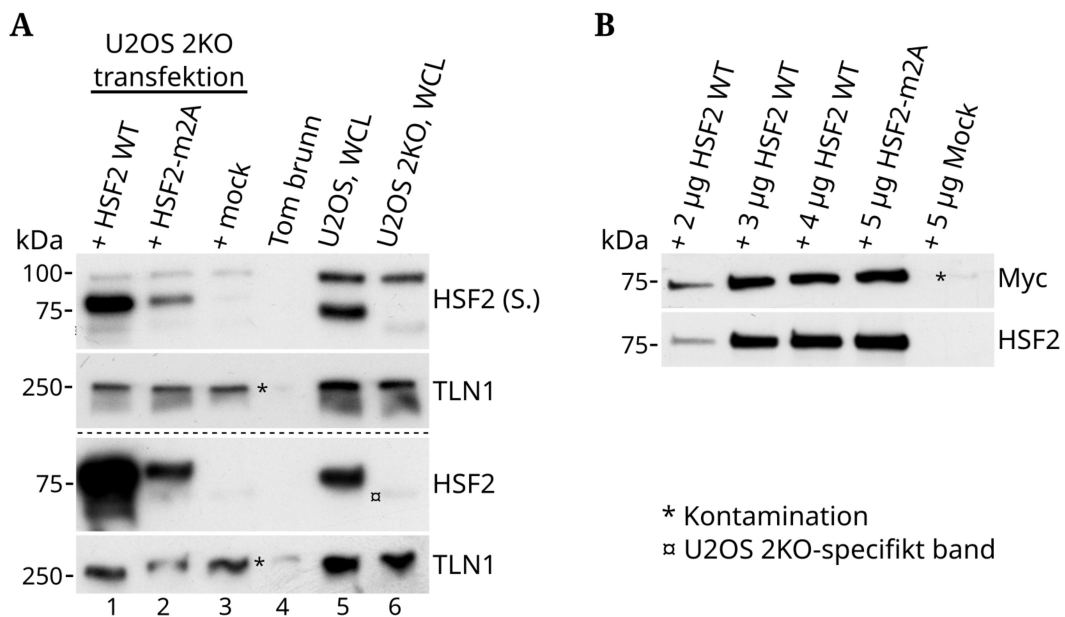
Transfektion med PEI utreddes som en alternativ transfektionsmetod för U2OS 2KO-celler. Flera koncentrationer av både GFP-plasmid och PEI användes, men kraftig celldöd förekom vid samtliga PEI-koncentrationer (data visas inte). På grund av detta användes endast transfektion med elektroporering.

5.2.2.3 HSF2 WT- och HSF2-m2A-uttryck i U2OS 2KO-celler

För att uppnå fysiologiskt relevant proteinmängd av HSF2 i U2OS 2KO-celler jämfördes mängden HSF2 i transfekterade celler med vildtyp U2OS-celler. Cellerna transfekterades med HSF2 WT eller HSF2-m2A och HSF2-nivåerna jämfördes med WB (figur 9A). U2OS 2KO-celler transfekterade med 5 µg HSF2 WT-plasmid (brunn 1) uttryckte mer HSF2 än vildtyp U2OS (brunn 5). Transfektion av U2OS 2KO med 5 µg HSF2-m2A-plasmid (brunn 2) resulterade i något lägre HSF2-proteinnivå än i vildtyp U2OS (brunn 5). Närvaron av proteinmärkning Myc på HSF2 i de transfekterade U2OS 2KO-cellerna validerade att HSF2 i dessa celler härstammar från de använda plasmiderna, eftersom endogent HSF2 saknar denna proteinmärkning (figur 9B).



Figur 8: Optimering av transfektionseffektivitet i cellinjen U2OS 2KO. Transfektionerna utfördes med elektroporering, och GFP- eller IF-signalerna detekterades med fluorescensmikroskop. Den vita linjen i A och B representerar 1,0 mm. Transfektionseffektiviteterna beräknades manuellt med ImageJ och R från ett experiment **A)** Transfektionseffektivitet för transfektion av indikerad mängd GFP-plasmid med 240 V spänning. **B)** Transfektionseffektivitet vid transfektion av 4 µg GFP-plasmid med indikerade spänningar. **C)** Transfektionseffektiviteten för HSF2-WT och HSF2-m2A mätt med IF-färgning av HSF2 eller Myc. Cellkärnor visualiserades med DAPI.



Figur 9: Validering och jämförelse av HSF2-expression från plasmider i U2OS 2KO-celler med Western blot. A) U2OS 2KO-celler transfekterades med 5 µg HSF2 WT, HSF2-m2A eller mock, och signalstyrkan jämfördes med helcellslysat (WCL) från vildtyp U2OS-celler (brunn 5). Den brutna linjen indikerar skilda membran med identiska prover, där membranerna blottats med samma TLN1-antikropp men med olika antikroppar mot HSF2; HPA031455 (HSF2 S.) eller MAB88079 (HSF2). TLN1 fungerade som laddningskontroll. **B)** U2OS 2KO-celler transfekterades med indikerade mängder HSF2 WT eller HSF2-m2A-plasmid. Membranet blottades med antikroppar mot HSF2 och proteinmärkningen Myc.

5.3 Sammanfattning av resultat och val av modellsystem för komplexbildning mellan HSF2-m2A och TLN1

Resultaten i 5.1 och 5.2 visade att endast cellinjerna RWPE-1 och PC-3 uppfyllde kraven på modellsystem för att studera interaktionen mellan HSF2 och TLN1, det vill säga förekomst av HSF2-TLN1-komplexbildning och tillräcklig transfektionseffektivitet. Cellinjen RWPE-1 hade kraftigast bildning

av komplex mellan HSF2 och TLN1 och utmärkt transfektionseffektivitet. RWPE-1-cellerna prolifererade dock långsamt (uppskattad dubblingstid 48-60 h). Detta var problematiskt eftersom analyserna krävde ett stort antal celler, men uteslöt inte RWPE-1-celler som modellsystem. Förutom cellinjen RWPE-1 valdes även cellinjen PC-3, eftersom PC-3-cellerna hade medelmåttig HSF2-TLN1-komplexbildning och tidigare har använts för transfektioner (Björk m.fl., 2016). Alla använda cellinjernas lämplighet som modellsystem för HSF2-TLN1-komplexbildningen sammanfattas i tabell 4.

Tabell 4: Sammanfattning över resultaten från HSF2-TLN1-komplexbildning och transfektionsoptimering i de använda cellinjerna. Egenskaper som markerats med rött uteslöt cellinjerna som modellsystem. ¹⁾ U2OS 2KO saknar HSF2

Cellinje	HSF2-TLN1-komplexbildning	Transfektionseffektivitet > 50 %	Uppskattad fördubblingstid
RWPE-1	Kraftig	Ja	48-60 h
PC-3	Medelmåttig	Ja	24 h
U2OS	Svag	-	24 h
U2OS 2KO	Nej ¹	Nej	24-36 h
MCF-10A	Medelmåttig	-	< 24 h
MCF-7	Nej	-	24-36 h
MEF	Nej	-	24 h

5.4 Komplexbildning av HSF2-m2A och TLN1 i RWPE-1- och PC-3-celler

För att utreda om TLN1 kan bilda komplex med HSF2-m2A jämfördes HSF2-TLN1-komplexbildningen i RWPE-1- eller PC-3-celler som transfekterats med antingen HSF2 WT eller HSF2-m2A. För RWPE-1-cellerna användes kotransfektion av shRNA mot HSF2 och shRNA-resistent HSF2 WT eller HSF2-m2A, varefter exogent HSF2 skulle immunprecipiteras med en antikropp specifik för Myc-proteinmärkningen. WB av helcelllysats från dessa celler visade dock att nedregleringen av HSF2 med shRNA inte fungerade, och

proteinmängderna som erhöles från de transfekterade cellerna var otillräckliga för att utföra co-IP (n=4, data visas inte). På grund av detta användes istället PC-3-celler för att utreda om HSF2-m2A och TLN1 kan bilda komplex.

PC-3-cellerna transfekterades med HSF2 WT eller HSF2-m2A, och exogent HSF2 immunprecipiterades med en antikropp specifik för proteinmärkningen Myc. WB-resultaten hade stor variation och var inte reproducerbara (n=3, data visas inte). Bland annat detekterades TLN1 både i Myc-IP-provet och IgG i ett försök, medan TLN1 i nästa försök inte kunde detekteras i någotdera provet. HSF2 kunde inte heller detekteras i Myc-IP-provet i alla försök, och då membranen blottades med en Myc-antikropp fanns rikligt med ospecifika band i samtliga prover. Baserat på dessa resultat går det därför inte att avgöra om HSF2-m2A kan bilda komplex med TLN1.

6 Diskussion

6.1 Cellinjer som modellsystem att studera den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1

Målsättningarna i detta arbete var att evaluera de humana cellinjerna RWPE-1, PC-3, U2OS, U2OS 2KO, MCF-10A, MCF-7 och muscellinjen MEF som modellsystem för att studera den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1, samt att därefter undersöka om HSF2-m2A, en muterad variant av HSF2, kan bilda komplex med TLN1. De egenskaper som krävdes av cellinjerna var att 1) HSF2 och TLN1 bildar komplex, vilket undersöktes med co-IP och WB, och 2) minst 50 % transfektionseffektivitet, vilket utfördes genom transfektion med GFP-plasmid eller transfektion med HSF2-plasmid följt av IF-färgning. Cellinjen PC-3 uppfyllde dessa krav och användes för att

utreda om HSF2-m2A kan bilda komplex med TLN1, genom att jämföra co-IP-resultat från PC-3-celler som transfekterats med HSF2 WT eller HSF2-m2A.

Resultaten av komplexbildning mellan HSF2 och TLN1 i icke-transfekterade celler enligt co-IP (5.1) antydde att det fanns cellinjespecifika skillnader med avseende på komplexbildningen. Specifik komplexbildning av HSF2 och TLN1 iaktogs i cellinjerna RWPE-1, PC-3, U2OS och MCF-10A men saknas i cellinjerna MCF-7 och MEF. Den starkaste signalen i förhållande till input erhöles från cellinjen RWPE-1. HSF1 användes som positiv kontroll för co-IP av HSF2, eftersom HSF1 och HSF2 kan bilda heterotrimerer (Sandqvist m.fl., 2009). Dock kunde HSF1 inte detekteras i HSF2-IP-proven från cellinjerna U2OS eller MCF-7. Detta berodde antagligen på cellspecifika skillnader med avseende på heterotrimeriseringen av HSF1 och HSF2 samt proteinernas lokalisering. I U2OS-celler är till exempel HSF2 kraftigt lokaliserat till cellkärnan (Joutsen, 2018) medan inaktivt HSF1 befinner sig i cytoplasman. Avsaknaden av HSF1 i HSF2-IP:en kan således förklaras av att proteinerna inte kommer i kontakt med varandra under normala förhållanden i U2OS-celler.

Co-IP-resultaten visade också att HSF2-IP var ett bättre alternativ än TLN1-IP för att detektera HSF2-TLN1-komplexbildning, eftersom den svaga HSF2-signalen i TLN1-IP nästan doldes av bakgrundssignal. Dessutom saknades positiv kontroll av co-IP för TLN1-IP, eftersom varken β 1-integrin, FAK eller aktin kunde detekteras specifikt trots att dessa proteiner kan interagera med TLN1 (Lawson m.fl., 2012). En potentiell förklaring av detta är att den använda lysisbufferten är mild, och troligen inte effektivt frigör dessa proteiner från cellmembranet eller FA:erna.

6.1.1 Cancerspecifik skillnad i komplexbildning av HSF2 och TLN1

Eftersom både HSF2 (Björk m.fl., 2016) och TLN1 (Sakamoto m.fl., 2010) har kopplats till migrations- och invasionspotentialen i prostatacancer, utreddes det om det fanns cancerspecifika skillnader i komplexbildning mellan HSF2 och TLN1. Detta undersöktes med två par av cellinjer som representerade normala celler eller cancerceller från samma vävnad; RWPE-1 och PC-3 från prostataepitel samt MCF-10A och MCF-7 från bröstepitel.

Resultaten i 5.1, där TLN1 koprecipiterar med HSF2 starkare i cellinjerna med normal fenotyp (RWPE-1 och MCF-10A) än i motsvarande cancercellinjer (PC-3 och MCF-7), antyder att HSF2-TLN1-interaktionen kan vara dämpad åtminstone i karcinom. Preliminära data (supplementär figur 1 i bilaga 8.4) erbjuder dock en alternativ förklaring, nämligen att komplexbildningen av HSF2 och TLN1 minskar när odlingsplattorna närmar sig konfluens. Eftersom cellernas proliferation och migration avtar när plattorna blir konfluenta är det möjligt att den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1 påverkar dessa processer. Resultaten i 5.1 kan således även förklaras av att cancercellinjerna möjligen uppnått högre konfluens, eller av att de har anormal proliferation och migration.

6.1.2 Cellinjen U2OS 2KO är opassande som modellsystem för att studera HSF2-TLN1-interaktionen

U2OS 2KO-cellinjen var ursprungligen det mest attraktiva alternativet som modellsystem för att studera HSF2-TLN1-interaktionen eftersom cellinjen saknar HSF2. Detta underlättar utredningen av hur HSF2-mutationer påverkar komplexbildning av HSF2 och TLN1, eftersom nedreglering av endogen, omuterat HSF2 inte behövs. HSF2 och TLN1 bildade dessutom

komplex i vildtyp U2OS-celler, vilket indikerade att introduktion av HSF2 till U2OS 2KO skulle kunna återställa HSF2-TLN1-komplexbildning.

Vid utredningen av U2OS 2KO som modellsystem upptäcktes dock två problem; ett proteinband på Western blot som specifikt binds av antikroppar mot HSF2 samt U2OS 2KO-cellinjens låga transfektionseffektivitet. Det U2OS 2KO-specifika proteinbandet som detekterades av antikroppar mot HSF2 (figur 9A) är av något lägre molekylvikt än endogent HSF2 i vildtyp U2OS eller exogent HSF2 som uttrycktes i U2OS 2KO efter transfektion. Bandet kan också iakttas i HSF2-IP:en från U2OS 2KO (figur 5B), där det anrikas. Proteinet binds specifikt av minst tre olika antikroppar mot HSF2. En möjlig förklaring för detta protein är att det bildats från en alternativ startplats efter avlägsnandet av exon 1 med CRISPR-Cas9, och att detta protein därför kan vara en förkortad variant av HSF2. Nivån av detta protein är dock mycket lägre än HSF2 WT i vildtyp U2OS, och U2OS 2KO-cellerna har därför åtminstone kraftig nedreglering av HSF2. U2OS 2KO-cellinjen uppvisar dock heterogenitet, och vissa U2OS 2KO-populationer som använts av medarbetare i laboratoriet saknar detta HSF2-lik band. Eftersom TLN1 dessutom inte bildade komplex med detta U2OS 2KO-specifika protein (figur 5B) var U2OS 2KO-cellinjen ändå ett möjligt modellsystem och dess transfektionseffektivitet undersöktes.

Den avgörande faktorn som uteslöt cellinjen U2OS 2KO som modellsystem var den låga transfektionseffektiviteten. Trots lovande proteinnivåer av HSF2 efter transfektion med HSF2 WT eller HSF2-m2A (figur 9A) var transfektionseffektiviteten med elektroporering under 30 % (figur 8). Transfektion med PEI, en kemisk transfektionsmetod, utreddes men transfektionen ledde till kraftig celldöd. Majoriteten av transfektionsoptimeringarna utfördes därför för elektroporering. Transfektionseffektiviteten med elektroporering för U2OS 2KO-celler varierade mycket mellan transfektionsförsök, vilket framstår i figur 8, där transfektionseffektiviteten var under 10 % i panel A (5 µg DNA,

240 V) och nästan 30 % i panel B (4 µg DNA, 240 V). Eftersom majoriteten av cellpopulationen inte blev transfekterad måste de transfekterade cellerna ha producerat höga nivåer av HSF2 för att uppnå motsvarande mängd som hela populationen i vildtyp U2OS-celler. Pålitliga resultat kan således inte erhållas från cellpopulationer med låg transfektionseffektivitet.

För att utesluta att den låga transfektionseffektiviteten inte berodde på mätningssmetoden (transfektionseffektivitet enligt transfektion med gfp som rapporteringsgen), utfördes IF-färgning med antikroppar mot HSF2 och Myc efter transfektion med de HSF2 WT- och HSF2-m2A-plasmider som senare skulle användas. IF-färgningen bekräftade den låga transfektionseffektiviteten (under 15 %). Myc-antikroppen användes eftersom det endogena U2OS 2KO-specifika proteinet som identifierats på Western blot känns igen av HSF2-antikroppar medan endast exogent HSF2 hade proteinmärkningen Myc. Transfektionseffektiviteten enligt Myc-proteinmärkningen var lägre än för HSF2, men detta kan bero på att en lägre mängd av Myc-antikropp användes. Signalerna från HSF2- och Myc-IF-färgning är överlappande, vilket indikerar att HSF2-signalen härstammar från exogent HSF2 och inte från det U2OS 2KO-specifika HSF2-likade proteinet. Eftersom nivåerna av det U2OS 2KO-specifika HSF2-likade proteinet är låga är det möjligt att mycket längre exponeringstid skulle krävas innan detta protein syns på IF-färgningar. Eftersom proteinerna inte denatureras i IF-färgningar är det också möjligt att tertiärstrukturen för det U2OS 2KO-specifika proteinet inte kan bindas av HSF2-antikropparna. Förändrad tertiärstruktur kan även förklara varför TLN1 inte bildade komplex med detta protein.

6.1.3 Cellinjen RWPE-1 hade utmärkt transfektions-effektivitet men långsam proliferation

RWPE-1-cellinjen var ett lovande alternativ som modellsystem för att studera den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1 eftersom HSF2-IP resulterade i tydlig koprecipitation av TLN1. Transfektionseffektiviteten för RWPE-1-celler var också utmärkt (över 90 %) med elektroporering. För att kunna utreda om mutationerna i HSF2-m2A påverkar dess komplexbildning med TLN1 i RWPE-1 krävdes dock nedreglering av endogent HSF2, vilket utfördes genom transfektion av shRNA specifikt för endogent HSF2. Cellinjen RWPE-1 visade sig dock vara opraktisk som modellsystem dels för att nedregleringen av HSF2 med shRNA var ineffektiv och dels för att RWPE-1-cellerna prolifererade långsamt.

Vid transfektion av RWPE-1 med shRNA mot HSF2, vilket leder till att mRNA för HSF2 nedbryts, var proteinnivåerna av HSF2 efter 48 h nästan oberörda (data visas inte). Eftersom HSF2-proteinet har en halveringstid på en till två timmar (Ahlskog m.fl., 2010; Mathew m.fl., 1998), berodde detta troligen på att shRNA:et var ineffektivt. Mängden shRNA kunde inte heller ökas i provet, eftersom färre celler överlevde transfektion med höga plasmidvolymmer. Potentiellt kunde nedreglering av HSF2 med kort interfererande RNA (siRNA, eng. small interfering RNA) utredas.

Det var möjligt att använda RWPE-1 som modellsystem för att studera den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1, men cellinjen hade egenskaper som gjorde den opraktisk att använda. De främsta problemen var låg proteinmängd från odlingsplattor jämfört med övriga cellinjer samt långsam proliferationshastighet. RWPE-1-cellernas fördubblingstid var 48-60 h, jämfört med 24-36 h för PC-3-celler. RWPE-1-cellerna överlevde dessutom inte transfektion efter 35 odlingspassager.

6.1.4 Cellinjen PC-3 är ett utmärkt modellsystem för att studera interaktionen mellan HSF2 och TLN1

Till sist valdes PC-3-cellinjen för att studera den potentiella HSF2-TLN1-interaktionen eftersom de är lätta att transfektera och HSF2 bildar komplex med TLN1 i dem. Eftersom nedregleringen av HSF2 med shRNA tidigare misslyckats i RWPE-1-cellinjen användes inte shRNA tillsammans med PC-3-cellinjen. Cellerna kotransfekterades istället med GFP för att mäta transfektionseffektiviteten och HSF2 eller HSF2-m2A, varefter Myc-IP utfördes för att huvudsakligen immunprecipitera exogent HSF2. Resultaten från Myc-IP:erna var dock otydliga. Det är möjligt att detta berodde på att co-IP-protokollet inte optimerats för Myc-IP, men det kan även finnas biologiska förklaringar. Interaktionen kan vara känslig för de relativa proteinnivåerna av HSF2 och TLN1, vilka rubbas av HSF2-uppregleringen. Stressen som orsakas av transfektion kanske också påverkar interaktionen. Det är dessutom möjligt att Myc-proteinmärkningen på HSF2 påverkar komplexbildningen. Eftersom resultaten var oklara är det ännu okänt om mutationerna i HSF2-m2A påverkar interaktionen med TLN1, och det förblir således obevisat om det är frågan om en direkt proteininteraktion eller inte.

Ett alternativ som kunde förbättra PC-3-celler som modellsystem för att utreda om mutationer påverkar HSF2-TLN1-komplexbildning är att använda en HSF2-KO PC-3-cellinje. IP av HSF2, som fungerade väl i detta arbete, kunde utföras på celler som saknar endogent HSF2 istället för IP av Myc. Användningen av en HSF2-KO-cellinje skulle dessutom eliminera risken att heterotrimerisering mellan endogent och exogent HSF2 påverkar resultaten.

6.2 Funktion och relevans för den potentiella interaktionen mellan HSF2 och TLN1

Inom modern cellbiologi är interaktion mellan en transkriptionsfaktor och ett protein vid cellmembranet ovanlig, men inte omöjlig. Exempel på detta är transkriptionsfaktorn p91 som interagerar med transmembranreceptorn för epidermal tillväxtfaktor (Fu och Zhang, 1993), och transkriptionsfaktorn aktivatorprotein 1 som interagerar med det cytosoliska eller membranbundna ställproteinet (eng. scaffold protein) striatrin-4 (Castets m.fl., 2000; Miyamoto-Sato m.fl., 2010). Om flera dylika interaktioner beskrivs kan det leda till upptäckten av många interaktioner som tidigare avfärdats som kontaminationer.

Det är även möjligt att interaktionen mellan HSF2 och TLN1 sker i andra delar av cellen än vid cellmembranet. Nyligen har TLN1 observerats i cellkärnan (Da Silva & Budzyński, opublicerade resultat), vilket medför att TLN1 och aktiverat HSF2 kan befinna sig i samma del av cellen. Med tanke på att TLN1 binder aktin och att aktin i cellkärnan medverkar i transkription (Hofmann m.fl., 2004; Sokolova m.fl., 2018), är en interaktion mellan TLN1 i cellkärnan och transkriptionsfaktorn HSF2 inte otänkbar. Det bör dock påpekas att det ännu är okänt om TLN1 kan binda aktin i cellkärnan. Genom att utföra subcellulär fraktionering följt av HSF2-IP från fraktionerna skulle man kunna bekräfta om HSF2 och TLN1 bildar komplex i cytoplasman och/eller cellkärnan.

Både HSF2 och TLN1 har dessutom kopplats till mitosen (Bellissent m.fl., 1999; Elsing m.fl., 2014; Skop m.fl., 2004), och det är möjligt att HSF2-TLN1-interaktionens funktion är mitosrelaterad. TLN1 deltar i cytokinesen och är lokaliserat till cellens mittparti (eng. midbody) när den kontraktila ringen av aktin- och myosin-filament separerar dottercellerna. Både HSF2 och aktin har

iakttagits under spermatogenesisen vid de intercellulära broarna som bildas från könszellens mittparti vid både mitotiska och meiotiska celldelningar (Alastalo m.fl., 1998; Greenbaum m.fl., 2006). Potentiellt kan HSF2-TLN1-interaktionen påverka hur lång tid mitosen tar, eftersom TLN1 medverkar i bildningen av klyvningsfåran och eftersom mitosen slutförs snabbare utan HSF2 (Bellissent m.fl., 1999; Elsing m.fl., 2014).

Det är möjligt att HSF2 och TLN1 samverkar under cytokinesen, men hittills har HSF2 och TLN1 inte identifierats tillsammans i detta sammanhang. HSF2 kunde inte identifieras i mittpartier från en cellinje av äggstocksceller från kinesisk hamster (Skop m.fl., 2004). UniProt inkluderade dock HSF2 från kinesisk hamster första gången år 2011, och enligt BLAST-analys har proteinet endast 80 % identitet med HSF2 i människa eller mus (Altschul m.fl., 1997; The UniProt Consortium, 2018a). Det är därför möjligt att HSF2 saknades eller inte kunde identifieras från den databas Skop och medarbetare använde år 2004. Eftersom genuttrycket av hsf2 varierar kraftigt mellan vävnader (Fiorenza m.fl., 1995), borde dessutom mittpartier av mitotiska celler från olika vävnader analyseras.

De preliminära resultaten i supplementär figur 1, där komplexbildningen mellan HSF2 och TLN1 minskar vid högre odlingskonfluens, överensstämmer med hypotesen att interaktionen är mitosrelaterad eftersom RWPE-1-cellerna slutar proliferera vid hög konfluens. Varken HSF2 eller TLN1 krävs dock för mitos, eftersom cellinjer utan dessa proteiner kan proliferera. HSF2-TLN1-interaktionens roll i mittpartiet kunde möjligen utredas med IP av HSF2 från isolerade mittpartier. Detta kunde både bevisa om HSF2 är närvarande i mittpartier och om komplexbildning av HSF2 och TLN1 sker i dessa strukturer. Om HSF2-TLN1-interaktionen är mitosrelaterad kan det ge oss ytterligare insikt i hur mitosen regleras. Dessutom kan det leda till att en specifik funktion för HSF2 kan identifieras, något som hittills saknats.

6.3 Avslutning

I denna avhandling pro gradu utreddes åtta olika cellinjer som modellsystem för att studera en potentiell interaktion mellan HSF2 och TLN1. Komplexbildning av HSF2 och TLN1 utreddes i cellinjerna under normala förhållanden, varefter transfektionseffektiviteten undersöktes för cellinjer med tydlig komplexbildning eftersom pålitliga resultat inte kan erhållas från transfekterade celler med låg transfektionseffektivitet. De bästa cellinjerna som modellsystem var RWPE-1 och PC-3, men RWPE-1-cellinjens låga proliferationshastighet gjorde att PC-3-cellinjen valdes för fortsatta experiment. PC-3-cellinjen användes för att utreda om mutationerna i HSF2-m2A förhindrar komplexbildning med TLN1, vilket kunde bevisa om HSF2 direkt interagerar med TLN1. Detta skulle även innebära att interaktionens gränsvyta identifierats. Resultaten av dessa experiment blev oklara, och den direkta interaktionen är således tills vidare obevisad. Tack vare denna avhandling finns det nu ett modellsystem samt optimerade protokoll tillgängliga för fortsatt forskning kring den potentiella interaktionen mellan transkriptionsfaktorn HSF2 och fokaladhesionsproteinet TLN1.

7 Litteraturförteckning

- Ahlskog, J.K., Björk, J.K., Elsing, A.N., Aspelin, C., Kallio, M., Roos-Mattjus, P., Sistonen, L., 2010. Anaphase-promoting complex/cyclosome participates in the acute response to protein-damaging stress. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5608–5620.
- Ahn, S.G., 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 17, 516–528.

- Ahn, S.G., Liu, P.C., Klyachko, K., Morimoto, R.I., Thiele, D.J., 2001. The loop domain of heat shock transcription factor 1 dictates DNA-binding specificity and responses to heat stress. *Genes Dev.* 15, 2134–2145.
- Alastalo, T.P., Lönnström, M., Leppä, S., Kaarniranta, K., Pelto-Huikko, M., Sistonen, L., Parvinen, M., 1998. Stage-specific expression and cellular localization of the heat shock factor 2 isoforms in the rat seminiferous epithelium. *Exp. Cell Res.* 240, 16–27.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2014. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed, Garland Science. Garland Science, New York.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Amin, J., Ananthan, J., Voellmy, R., 1988. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3761–3769.
- Anderson, D.J., Blobel, G., 1983. [8] Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations. I: *Methods in Enzymology*. s. 111–120.
- Baldwin, R.L., 1986. Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8069–8072.
- Beaty, B.T., Wang, Y., Bravo-Cordero, J.J., Sharma, V.P., Miskolci, V., Hodgson, L., Condeelis, J., 2014. Talin regulates moesin–NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis. *J. Cell Biol.* 205, 737–751.
- Bellissent, A., Waydelich, Vanier, M.-T., Albigès, C., Rizo, Simon, P., Assmann, 1999. Talin Concentrates to the Midbody Region During Mammalian Cell Cytokinesis. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1357–1367.
- Bello, D., Webber, M.M., Kleinman, H.K., Wartinger, D.D., Rhim, J.S., 1997. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* 18, 1215–1223.
- Bieschke, J., Zhang, Q., Bosco, D.A., Lerner, R.A., Powers, E.T., Wentworth, P., Kelly, J.W., 2006. Small Molecule Oxidation Products Trigger Disease-Associated Protein Misfolding. *Acc. Chem. Res.* 39, 611–619.

- Björk, J.K., Åkerfelt, M., Joutsen, J., Puustinen, M.C., Cheng, F., Sistonen, L., Nees, M., 2016. Heat-shock factor 2 is a suppressor of prostate cancer invasion. *Oncogene* 35, 1770–1784.
- Budzyński, M.A., Puustinen, M.C., Joutsen, J., Sistonen, L., 2015. Uncoupling Stress-Inducible Phosphorylation of Heat Shock Factor 1 from Its Activation. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2530–2540.
- Budzyński, M.A., Sistonen, L., 2017. Versatile Functions of Heat Shock Factors: It is Not All About Stress. *Curr. Immunol. Rev.* 13.
- Burridge, K., 2017. Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J.* 284, 3355–3361.
- Calderwood, D.A., 2004. Integrin activation. *J. Cell Sci.* 117, 657–666.
- Castets, F., Rakitina, T., Gaillard, S., Moqrich, A., Mattei, M.G., Monneron, A., 2000. Zinedin, SG2NA, and striatin are calmodulin-binding, WD repeat proteins principally expressed in the brain. *J. Biol. Chem.* 275, 19970–19977.
- Chang, Y., Östling, P., Åkerfelt, M., Trouillet, D., Rallu, M., Gitton, Y., El Fatimy, R., Fardeau, V., Le Crom, S., Morange, M., Sistonen, L., Mezger, V., 2006. Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. *Genes Dev.* 20, 836–847.
- Dai, C., Sampson, S.B., 2016. HSF1: Guardian of Proteostasis in Cancer. *Trends Cell Biol.* 26, 17–28.
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A.B., Lindquist, S., 2007. Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell* 130, 1005–1018.
- Das, M., Subbayya Ithychanda, S., Qin, J., Plow, E.F., 2014. Mechanisms of talin-dependent integrin signaling and crosstalk. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838, 579–588.
- El Fatimy, R., Miozzo, F., Le Mouël, A., Abane, R., Schwendimann, L., Sabéran-Djoneidi, D., de Thonel, A., Massaoudi, I., Paslaru, L., Hashimoto-Torii, K., Christians, E., Rakic, P., Gressens, P., Mezger, V., 2014. Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in models of fetal alcohol syndrome. *EMBO Mol. Med.* 6, 1043–1061.
- Ellis, R.J., van der Vies, S.M., Hemmingsen, S.M., 1989. The molecular chaperone concept. *Biochem. Soc. Symp.* 55, 145–153.

- Elsing, A.N., Aspelin, C., Björk, J.K., Bergman, H.A., Himanen, S. V., Kallio, M.J., Roos-Mattjus, P., Sistonen, L., 2014. Expression of HSF2 decreases in mitosis to enable stress-inducible transcription and cell survival. *J. Cell Biol.* 206, 735–749.
- Fiorenza, M.T., Farkas, T., Dissing, M., Kolding, D., Zimarino, V., 1995. Complex expression of murine heat shock transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 23, 467–474.
- Free, R.B., Hazelwood, L.A., Sibley, D.R., 2009. Identifying Novel Protein-Protein Interactions Using Co-Immunoprecipitation and Mass Spectroscopy. I: Current Protocols in Neuroscience. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, s. 1–14.
- Frisch, S.M., Screaton, R.A., 2001. Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 555–562.
- Fu, X.-Y., Zhang, J.-J., 1993. Transcription factor p91 interacts with the epidermal growth factor receptor and mediates activation of the c-fos gene promoter. *Cell* 74, 1135–1145.
- Giancotti, F.G., 1999. Integrin Signaling. *Science* 285, 1028–1033.
- Goksoy, E., Ma, Y.-Q., Wang, X., Kong, X., Perera, D., Plow, E.F., Qin, J., 2008. Structural Basis for the Autoinhibition of Talin in Regulating Integrin Activation. *Mol. Cell* 31, 124–133.
- Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E.T., Thiele, D.J., 2018. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 4–19.
- Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D., 1995. Tissue-dependent expression of heat shock factor 2 isoforms with distinct transcriptional activities. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5288–5293.
- Gough, R.E., Goult, B.T., 2018. The tale of two talins - two isoforms to fine-tune integrin signalling. *FEBS Lett.* 592, 2108–2125.
- Goult, B.T., Bouaouina, M., Elliott, P.R., Bate, N., Patel, B., Gingras, A.R., Grossmann, J.G., Roberts, G.C.K., Calderwood, D.A., Critchley, D.R., Barsukov, I.L., 2010. Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation. *EMBO J.* 29, 1069–1080.

- Goult, B.T., Xu, X.-P., Gingras, A.R., Swift, M., Patel, B., Bate, N., Kopp, P.M., Barsukov, I.L., Critchley, D.R., Volkmann, N., Hanein, D., 2013a. Structural studies on full-length talin1 reveal a compact auto-inhibited dimer: Implications for talin activation. *J. Struct. Biol.* 184, 21–32.
- Goult, B.T., Zacharchenko, T., Bate, N., Tsang, R., Hey, F., Gingras, A.R., Elliott, P.R., Roberts, G.C.K., Ballestrem, C., Critchley, D.R., Barsukov, I.L., 2013b. RIAM and Vinculin Binding to Talin Are Mutually Exclusive and Regulate Adhesion Assembly and Turnover. *J. Biol. Chem.* 288, 8238–8249.
- Green, M., Schuetz, T.J., Sullivan, E.K., Kingston, R.E., 1995. A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3354–3362.
- Greenbaum, M.P., Yan, W., Wu, M.-H., Lin, Y.-N., Agno, J.E., Sharma, M., Braun, R.E., Rajkovic, A., Matzuk, M.M., 2006. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4982–4987.
- Guertin, M.J., Lis, J.T., 2010. Chromatin landscape dictates HSF binding to target DNA elements. *PLoS Genet.* 6, e1001114.
- Han, J., Lim, C.J., Watanabe, N., Soriani, A., Ratnikov, B., Calderwood, D.A., Puzon-McLaughlin, W., Lafuente, E.M., Boussiotis, V.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., 2006. Reconstructing and Deconstructing Agonist-Induced Activation of Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *Curr. Biol.* 16, 1796–1806.
- Heath, J.P., Dunn, G.A., 1978. Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. *J. Cell Sci.* 29, 197–212.
- Hofmann, W.A., Stojiljkovic, L., Fuchsova, B., Vargas, G.M., Mavrommatis, E., Philimonenko, V., Kysela, K., Goodrich, J.A., Lessard, J.L., Hope, T.J., Hozak, P., de Lanerolle, P., 2004. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* 6, 1094–1101.
- Joutsen, J., 2018. Regulation of cellular stress proteins in physiology and disease. Åbo Akademi University, Turku.

- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., Jones, L.W., 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* 17, 16–23.
- Kallio, M., Chang, Y., Manuel, M., Alastalo, T.-P., Rallu, M., Gitton, Y., Pirkkala, L., Loones, M.-T., Paslaru, L., Larney, S., Hiard, S., Morange, M., Sistonen, L., Mezger, V., 2002. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.* 21, 2591–2601.
- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., Hightower, L.E., 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14, 105–111.
- Kang, W., Kim, S.H., Cho, H.J., Jin, J., Lee, J., Joo, K.M., Nam, D.H., 2015. Talin1 targeting potentiates anti-angiogenic therapy by attenuating invasion and stem-like features of glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 6, 27239–27251.
- Kawazoe, Y., Nakai, A., Tanabe, M., Nagata, K., 1998. Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. *Eur. J. Biochem.* 255, 356–362.
- Kim, T.K., Eberwine, J.H., 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3173–3178.
- Klapholz, B., Brown, N.H., 2017. Talin – the master of integrin adhesions. *J. Cell Sci.* 130, 2435–2446.
- Lawson, C., Lim, S.T., Uryu, S., Chen, X.L., Calderwood, D.A., Schlaepfer, D.D., 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J. Cell Biol.* 196, 223–232.
- Lecomte, S., Reverdy, L., Le Quément, C., Le Masson, F., Amon, A., Le Goff, P., Michel, D., Christians, E., Le Dréan, Y., 2013. Unraveling complex interplay between heat shock factor 1 and 2 splicing isoforms. *PLoS One* 8, e56085.
- Lee, H.S., Bellin, R.M., Walker, D.L., Patel, B., Powers, P., Liu, H., Garcia-Alvarez, B., De Pereda, J.M., Liddington, R.C., Volkmann, N., Hanein, D., Critchley, D.R., Robson, R.M., 2004. Characterization of an actin-binding site within the talin FERM domain. *J. Mol. Biol.* 343, 771–784.

- Levenson, A.S., Jordan, V.C., 1997. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 57, 3071–3078.
- Lin, Y.-P., Cheng, Y.-J., Huang, J.-Y., Lin, H.-C., Yang, B.-C., 2010. Zap70 controls the interaction of talin with integrin to regulate the chemotactic directionality of T-cell migration. *Mol. Immunol.* 47, 2022–2029.
- Lino, C.A., Harper, J.C., Carney, J.P., Timlin, J.A., 2018. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 25, 1234–1257.
- Longo, P.A., Kavran, J.M., Kim, M.-S., Leahy, D.J., 2013. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 529, 227–240.
- Luo, J., Solimini, N.L., Elledge, S.J., 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136, 823–837.
- Mathew, A., Mathur, S.K., Morimoto, R.I., 1998. Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5091–5098.
- McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K., Benjamin, I.J., 1998. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 7523–7528.
- Miyamoto-Sato, E., Fujimori, S., Ishizaka, M., Hirai, N., Masuoka, K., Saito, R., Ozawa, Y., Hino, K., Washio, T., Tomita, M., Yamashita, T., Oshikubo, T., Akasaka, H., Sugiyama, J., Matsumoto, Y., Yanagawa, H., 2010. A comprehensive resource of interacting protein regions for refining human transcription factor networks. *PLoS One* 5, e9289.
- Monkley, S.J., Pritchard, C.A., Critchley, D.R., 2001. Analysis of the mammalian talin2 gene TLN2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 880–885.
- Monkley, S.J., Zhou, X.H., Kinston, S.J., Giblett, S.M., Hemmings, L., Priddle, H., Brown, J.E., Pritchard, C.A., Critchley, D.R., Fässler, R., 2000. Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev. Dyn.* 219, 560–574.
- Morimoto, R.I., 2011. The Heat Shock Response: Systems Biology of Proteotoxic Stress in Aging and Disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 91–99.

- Park, S.-M., Kim, S.-A., Ahn, S.-G., 2015. HSF2 autoregulates its own transcription. *Int. J. Mol. Med.* 36, 1173–1179.
- Phelan, K., May, K.M., 2017. Mammalian Cell Tissue Culture Techniques. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 117, A.3F.1-A.3F.23.
- Ponten, J., Saksela, E., 1967. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int. J. Cancer* 2, 434–447.
- Rahikainen, R., von Essen, M., Schaefer, M., Qi, L., Azizi, L., Kelly, C., Ihalainen, T.O., Wehrle-Haller, B., Bastmeyer, M., Huang, C., Hytönen, V.P., 2017. Mechanical stability of talin rod controls cell migration and substrate sensing. *Sci. Rep.* 7, 3571.
- Rallu, M., Loones, M., Lallemand, Y., Morimoto, R., Morange, M., Mezger, V., 1997. Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2392–2397.
- Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18, 571–573.
- Roberts, G.C.K., Critchley, D.R., 2009. Structural and biophysical properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Biophys. Rev.* 1, 61–69.
- Rossi, A., Riccio, A., Coccia, M., Trotta, E., La Frazia, S., Santoro, M.G., 2014. The proteasome inhibitor bortezomib is a potent inducer of zinc finger AN1-type domain 2a gene expression: role of heat shock factor 1 (HSF1)-heat shock factor 2 (HSF2) heterocomplexes. *J. Biol. Chem.* 289, 12705–12715.
- Sakamoto, S., McCann, R.O., Dhir, R., Kyprianou, N., 2010. Talin1 Promotes Tumor Invasion and Metastasis via Focal Adhesion Signaling and Anoikis Resistance. *Cancer Res.* 70, 1885–1895.
- Sandqvist, A., Björk, J.K., Åkerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc'h, C., Jolly, C., Salminen, T.A., Nymalm, Y., Sistonen, L., 2009. Heterotrimerization of Heat-Shock Factors 1 and 2 Provides a Transcriptional Switch in Response to Distinct Stimuli. *Mol. Biol. Cell* 20, 1340–1347.
- Sarge, K.D., Park-Sarge, O.K., Kirby, J.D., Mayo, K.E., Morimoto, R.I., 1994. Expression of heat shock factor 2 in mouse testis: potential role as a regulator of heat-shock protein gene expression during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 50, 1334–1343.

- Sarge, K.D., Zimarino, V., Holm, K., Wu, C., Morimoto, R.I., 1991. Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability. *Genes Dev.* 5, 1902–1911.
- Schuetz, T.J., Gallo, G.J., Sheldon, L., Tempst, P., Kingston, R.E., 1991. Isolation of a cDNA for HSF2: evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 6911–6915.
- Shinkawa, T., Tan, K., Fujimoto, M., Hayashida, N., Yamamoto, K., Takaki, E., Takii, R., Prakasam, R., Inouye, S., Mezger, V., Nakai, A., 2011. Heat shock factor 2 is required for maintaining proteostasis against febrile-range thermal stress and polyglutamine aggregation. *Mol. Biol. Cell* 22, 3571–3583.
- Sistonen, L., Sarge, K.D., Morimoto, R.I., 1994. Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2087–2099.
- Skop, A.R., Liu, H., Yates, J., Meyer, B.J., Heald, R., 2004. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* 305, 61–66.
- Sokolova, M., Moore, H.M., Prajapati, B., Dopie, J., Meriläinen, L., Honkanen, M., Matos, R.C., Poukkula, M., Hietakangas, V., Vartiainen, M.K., 2018. Nuclear actin is required for transcription during *Drosophila* oogenesis. *ISCIENCE*.
- Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., Brenz, R., McGrath, C.M., Russo, J., Pauley, R.J., Jones, R.F., Brooks, S.C., 1990. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, 6075–6086.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1409–1416.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., Calderwood, D.A., 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302, 103–106.

- Tai, S., Sun, Y., Squires, J.M., Zhang, H., Oh, W.K., Liang, C.Z., Huang, J., 2011. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* 71, 1668–1679.
- Takaki, E., Fujimoto, M., Sugahara, K., Nakahari, T., Yonemura, S., Tanaka, Y., Hayashida, N., Inouye, S., Takemoto, T., Yamashita, H., Nakai, A., 2006. Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *J. Biol. Chem.* 281, 4931–4937.
- Tamás, M.J., Sharma, S.K., Ibstedt, S., Jacobson, T., Christen, P., 2014. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules* 4, 252–267.
- Tang, H., Yao, L., Tao, X., Yu, Y., Chen, M., ZHANG, R., XU, C., 2013. miR-9 functions as a tumor suppressor in ovarian serous carcinoma by targeting TLN1. *Int. J. Mol. Med.* 32, 381–388.
- Taylor, C.R., Colley, E.C., Stead, R.H., Shi, S.-R., Nielsen, S., Jacobsen, L., Nielsen, M., Månsson, S., Rudbeck, L., Petersen, K., Pedersen, H.C., Schmid, J., Pace, G.E., Rasmussen, O.F., McDonald, D., Jørgensen, J.T., Saxena, R., Badve, S., Mollerup, J., Jørgensen, R., Wendelboe, H.G., Lykke, A., Pace, G., Jensen, S.S., Boenisch, T., An, 2013. *IHC Guidebook, 6:e ed, Immunohistochemical Staining Methods.* Dako Denmark A/S, Glostrup.
- Thapa, N., Tan, X., Choi, S., Wise, T., Anderson, R.A., 2017. PIPKIγ and talin couple phosphoinositide and adhesion signaling to control the epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 36, 899–911.
- The UniProt Consortium, 2018a. UniProtKB - G3HKK7 (G3HKK7_CRIGR) [WWW Document]. UniProtKB Protein Knowledgebase. URL www.uniprot.org/uniprot/G3HKK7 (åtkomstdatum 10.25.18).
- The UniProt Consortium, 2018b. UniProtKB - Q00613 (HSF1_HUMAN) [WWW Document]. UniProt Univers. protein knowledgebase. URL <https://www.uniprot.org/uniprot/Q00613> (åtkomstdatum 12.8.18).
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4354.
- Vihervaara, A., Sergelius, C., Vasara, J., Blom, M. a. H., Elsing, A.N., Roos-Mattjus, P., Sistonen, L., 2013. Transcriptional response to stress in the

- dynamic chromatin environment of cycling and mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3388–E3397.
- Vihervaara, A., Sistonen, L., 2014. HSF1 at a glance. *J. Cell Sci.* 127, 261–266.
- von Essen, M., Rahikainen, R., Oksala, N., Raitoharju, E., Seppälä, I., Mennander, A., Sioris, T., Kholová, I., Klopp, N., Illig, T., Karhunen, P.J., Kähönen, M., Lehtimäki, T., Hytönen, V.P., 2016. Talin and vinculin are downregulated in atherosclerotic plaque; Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 255, 43–53.
- Wang, G., Ying, Z., Jin, X., Tu, N., Zhang, Y., Phillips, M., Moskophidis, D., Mivechi, N.F., 2004. Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis* 38, 66–80.
- Wang, G., Zhang, J., Moskophidis, D., Mivechi, N.F., 2003. Targeted disruption of the heat shock transcription factor (hsf)-2 gene results in increased embryonic lethality, neuronal defects, and reduced spermatogenesis. *genesis* 36, 48–61.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E., Bauer, J.C., 1994. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151, 119–123.
- Wong, T.-K., Neumann, E., 1982. Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 584–587.
- Xing, H., Wilkerson, D.C., Mayhew, C.N., Lubert, E.J., Skaggs, H.S., Goodson, M.L., Hong, Y., Park-Sarge, O.-K., Sarge, K.D., 2005. Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science* 307, 421–423.
- Xu, N., Chen, H.-J., Chen, S.-H., Xue, X., Chen, H., Zheng, Q., Wei, Y., Li, X., Huang, J., Cai, H., Sun, X., 2016. Upregulation of Talin-1 expression associates with advanced pathological features and predicts lymph node metastases and biochemical recurrence of prostate cancer. *Medicine (Baltimore)*. 95, 1–8.
- Yao, M., Goult, B.T., Klapholz, B., Hu, X., Toseland, C.P., Guo, Y., Cong, P., Sheetz, M.P., Yan, J., 2016. The mechanical response of talin. *Nat. Commun.* 7, 11966.

- Yao, M., Goult, B.T., Sheetz, M.P., Yan, J., 2017. Talin as a Molecular Shock Absorber. *Biophys. J.* 112, 267a–268a.
- Yoshima, T., Yura, T., Yanagi, H., 1998. Function of the C-terminal transactivation domain of human heat shock factor 2 is modulated by the adjacent negative regulatory segment. *Nucleic Acids Res.* 26, 2580–2585.
- Zhang, H., Chang, Y.-C., Huang, Q., Brennan, M.L., Wu, J., 2016. Structural and Functional Analysis of a Talin Triple-Domain Module Suggests an Alternative Talin Autoinhibitory Configuration. *Structure* 24, 721–729.
- Zhang, W., Mao, Y.-Q., Wang, H., Yin, W.-J., Zhu, S.-X., Wang, W.-C., 2015. MiR-124 suppresses cell motility and adhesion by targeting talin 1 in prostate cancer cells. *Cancer Cell Int.* 15, 49.
- Zhong, Y., Cheng, H., Peng, H., Tang, S., Wang, P., 2016. Heat shock factor 2 is associated with the occurrence of lung cancer by enhancing the expression of heat shock proteins. *Oncol. Lett.* 5106–5112.
- Åkerfelt, M., Henriksson, E., Laiho, A., Vihervaara, A., Rautoma, K., Kotaja, N., Sistonen, L., 2008. Promoter CHIP-chip analysis in mouse testis reveals Y chromosome occupancy by HSF2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 11224–11229.
- Åkerfelt, M., Morimoto, R.I., Sistonen, L., 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 545–555.
- Östling, P., Björk, J.K., Roos-Mattjus, P., Mezger, V., Sistonen, L., 2007. Heat Shock Factor 2 (HSF2) Contributes to Inducible Expression of hsp Genes through Interplay with HSF1. *J. Biol. Chem.* 282, 7077–7086.

8 Bilagor

8.1 Recept

Lilas lyseringsbuffert

25 mM	Hepes, pH 8,0
100 mM	NaCl
5 mM	EDTA, pH 8,0
0,5 %	TritonX-100
20 mM	β -glycerofosfat
20 mM	p-nitrofenylfosfat
100 μ M	Ortovanadat

Före användning tillsattes

0,5 mM	PMSF
1X	Proteasinhibitor (Roche)
1X	Fosfatasinhibitor (Roche)

3X Laemmli-provbuffert

30 %	Glycerol
3 %	SDS
187,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
0,015 %	Bromfenolblå
3 %	β -merkaptoetanol

Körningsbuffer för SDS-PAGE

30 g/l	Tris-Base
144 g/l	Glycin
0,1 %	SDS

Wet transfer-buffert

30 g Tris-Base

144 g Glycin

20 % Metanol

LB-media

10 g/l Bakto-tryptonei

5 g/l Bakto-jästextrakt

10 g/l NaCl

Justera pH 7,5

TE-buffert

10 mM Tris-base

1 mM EDTA

Justera pH 8,0

TEG

20 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

10 % Glycerol

Justera pH 7,4-7,5

Co-IP-tvättbuffert

20 mM Tris-Hcl

1 mM EDTA

10 % Glycerol

150 mM NaCl

0,1 % Triton-X-100

Justera pH till 7,4-7,5

8.2 DNA-primrar

8.2.1 Primrar som användes för sekvensering

BGH Reverse:

5' - TAGAAGGCACAGTCGAGG - 3'

CMV Forward:

5' - CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG - 3'

hHSF2 S131A Forward:

5' - TTGGACTCGTGATCGATATTTAAAAACAATTTAGAAGGACTGCTTAAAATAA - 3'

M13 Reverse:

5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'

T7 Forward:

5' - TAATACGACTCACTA - 3'

8.2.2 Primrar som användes för mutagenes

hHSF2 LD 527-528 AA Forward

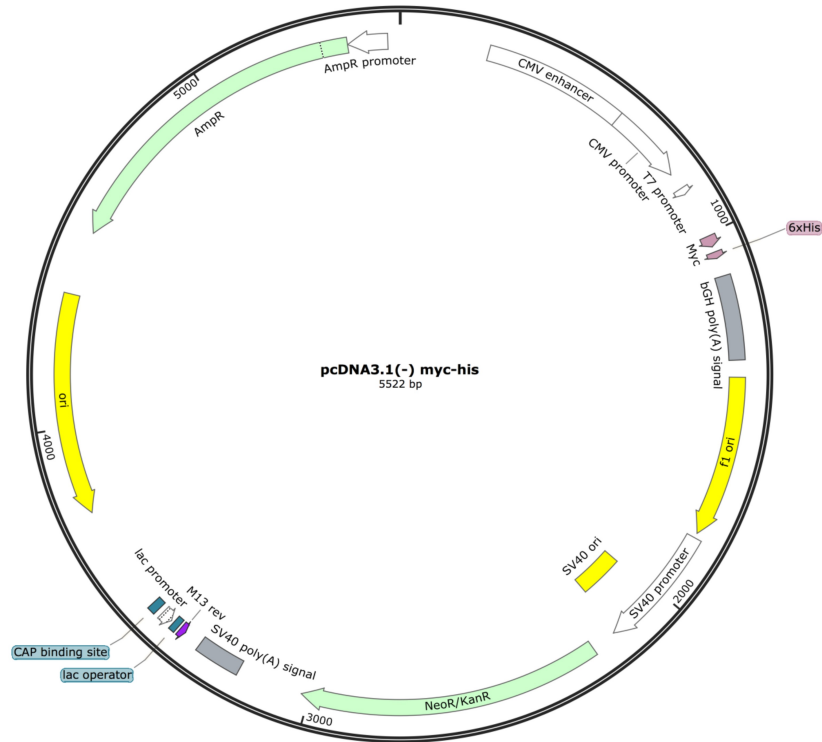
5' - CTAAAAGTGGCATATCACTAGCCGCAGGTGCAGGAGCAAGTTCAC

hHSF2 LD 527-528 AA Reverse

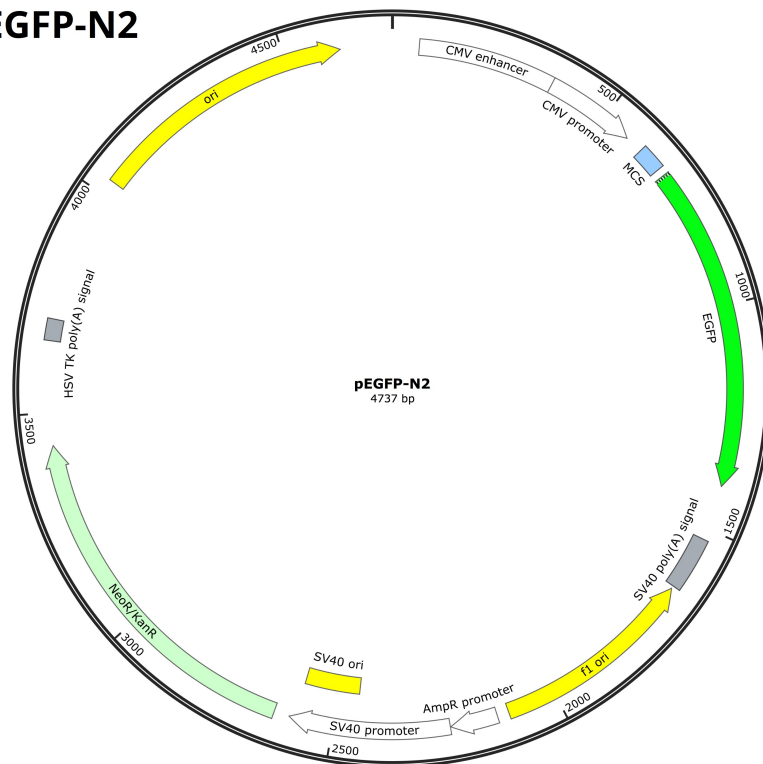
5' - GTGAACTTGCTCCTGCACCTGCGGCTAGTGATATGCCACTTTTAG

8.3 Plasmidkartor

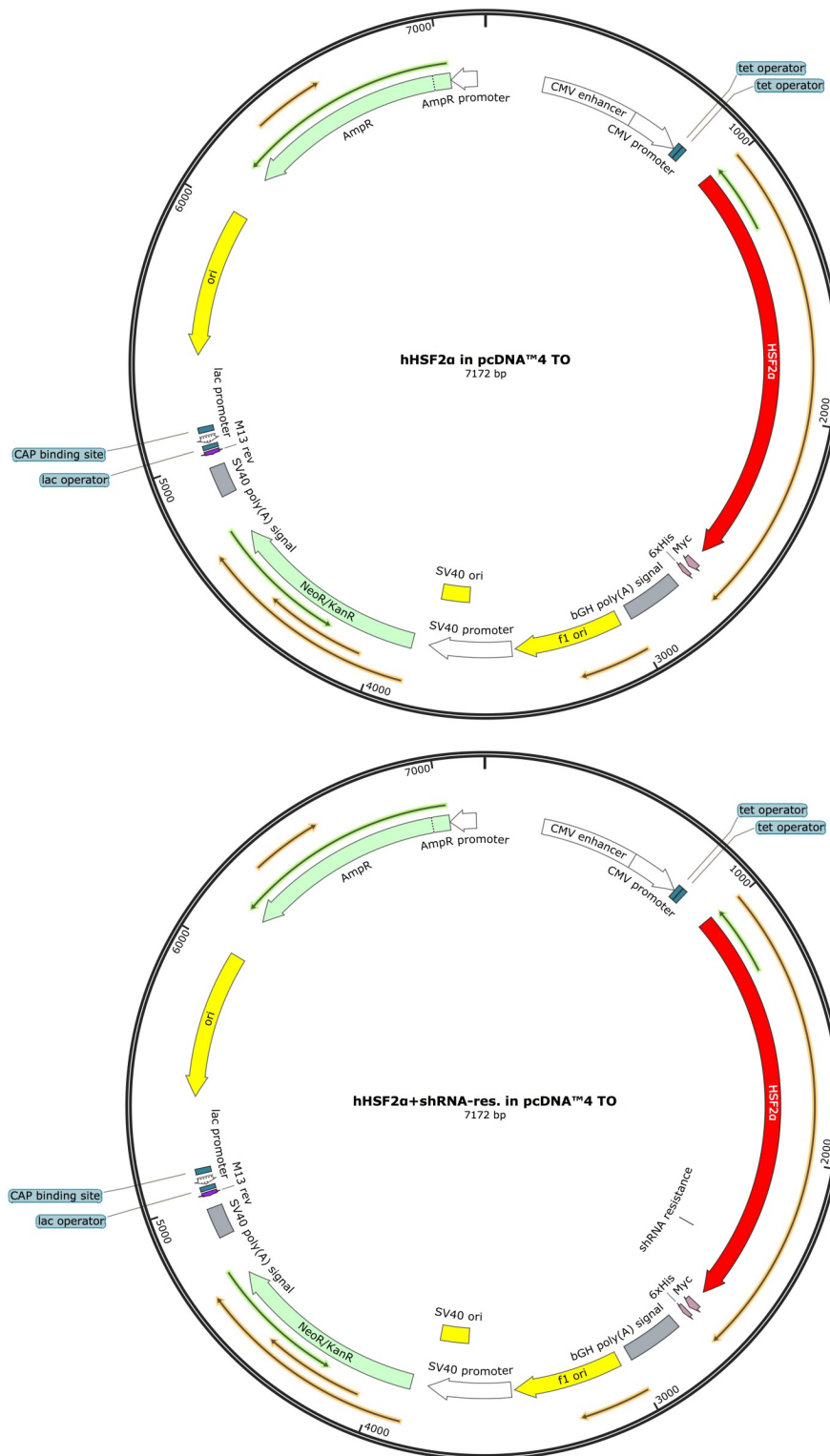
8.3.1 Tom pcDNA3.1(-), mock



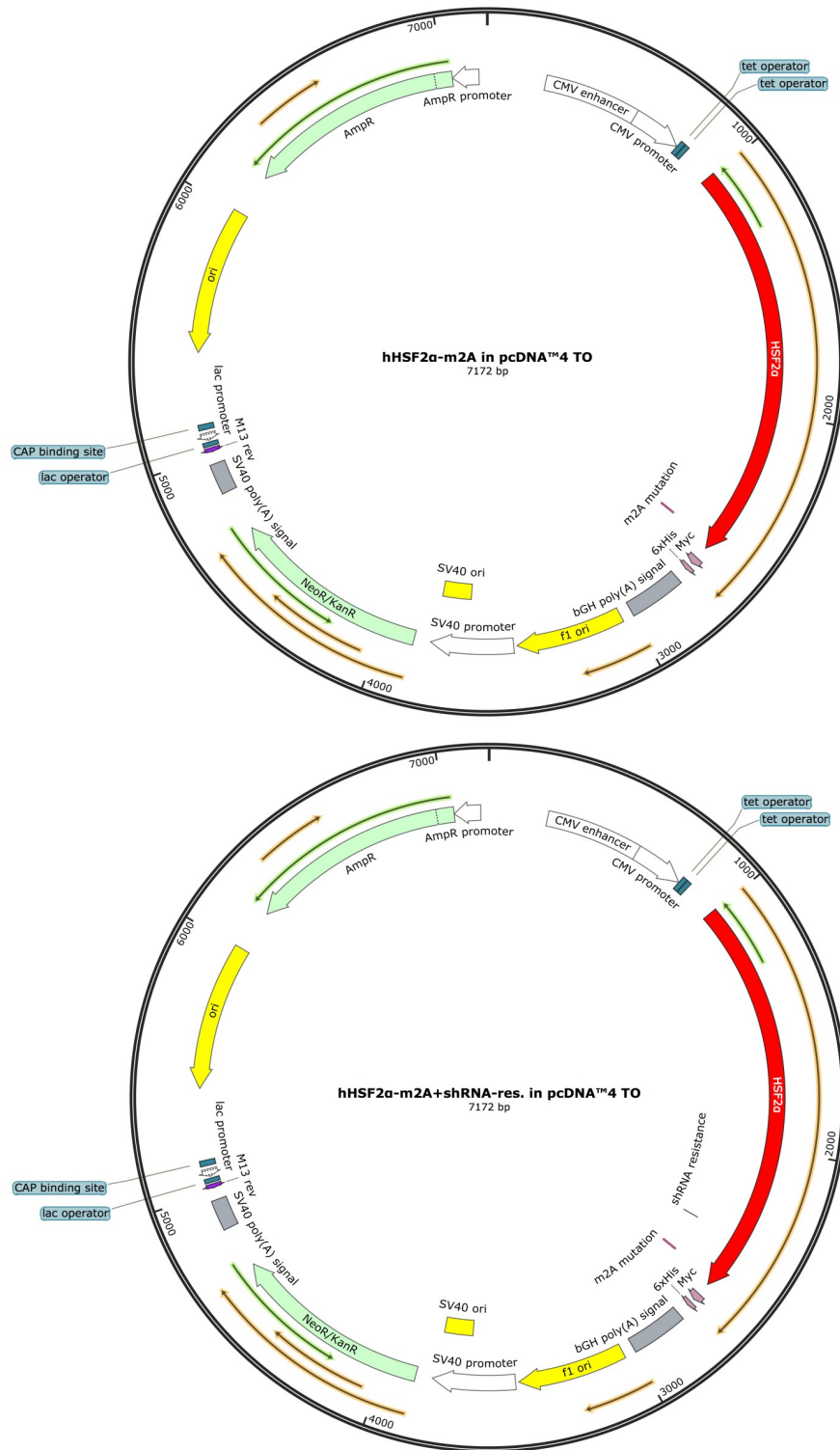
8.3.2 pEGFP-N2



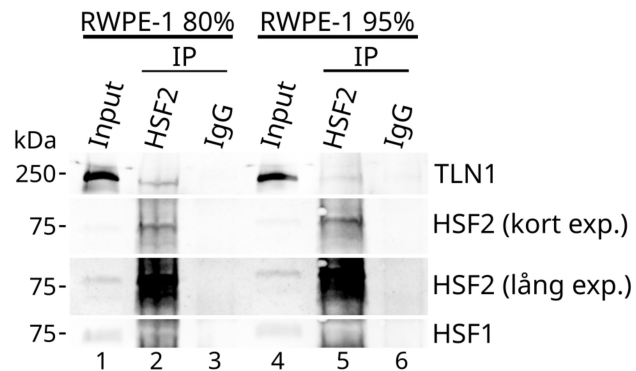
8.3.3 Humant HSF2 α i pcDNA4-TO utan eller med shRNA-resistens



8.3.4 Humant HSF2 α -m2A i pcDNA4-TO utan eller med shRNA-resistens



8.4 Supplementärt material



Supplementär figur 1: Odlingskonfluens kan påverka komplexbildning av HSF2 och TLN1. Western blot-resultat från co-IP av HSF2 i RWPE-1-celler som odlats till 80 och 95 % konfluens. TLN1-mängden är lägre i HSF2-IP:en från de mer konfluenta RWPE-1-cellerna. För varje IP-prov användes celllysats med 750 µg protein, och 15 µg celllysats användes som input. Membranet har blottats med antikroppar mot TLN1, HSF2 och HSF1. Resultaten är preliminära och härstammar från ett experiment.