

**Candidata Scientarum-oppgave i molekylær cellebiologi**

**Mai Britt Dahl**

**Dynamic aspects of toxin-induced  
alterations in AMP-activated  
protein kinase and autophagy in  
isolated rat hepatocytes**



**Seksjon for Proteomikk og Animalsk Cellebiologi**

**Avdeling for Cellebiologi**

**Institutt for Kreftforskning**

**Det Norske Radiumhospital**

**Avdeling for Molekylær Cellebiologi**

**Institutt for Molekylær Biovitenskap**

**Universitetet i Oslo**

**Oslo, april 2005**

# INNHOLDSFORTEGNELSE

## Del I

Forord.....	3
Oppgavens målsetning .....	4
Forkortelser .....	5
Leveren.....	7
Hepatocytter .....	7
Proteinfosforylering .....	10
Proteinkinaser.....	11
AMP-aktivert proteinkinase (AMPK).....	12
Proteinfosfataser.....	19
PP1 .....	21
PP2A .....	22
PP2C .....	23
Fosfatasehemmere .....	24
Okadasyre .....	25
Cantharidin.....	28
Naringin.....	29
Autofagi.....	32
Den autofagisk-lysosomale veien.....	33
Autofagi – livsnødvendig eller dødelig? .....	37
Molekylære mekanismer bak dannelsen av autofagosomet.....	38
Regulering .....	41
Måling av autofagi.....	43
AMPK og mulig nedstrøms signalvei involvert i reguleringen av autofagi.....	44
Referanser .....	48

## Del II

Dynamic aspects of toxin-induced alterations in AMP-activated protein kinase and autophagy in isolated rat hepatocytes. (Artikkel manuskript).

## Forord

Mitt hovedfagsarbeid er utført ved Seksjon for Proteomikk og Animalsk Cellebiologi, Avdeling for Cellebiologi, Institutt for Kreftforskning, Det Norske Radiumhospital, under veiledning av professor, dr. philos Per Ottar Seglen. Forskningsgruppen ved denne seksjonen er engasjert i proteomikk, og har en fellesnevner i et intracellulært signalnettverk med mulig relasjon til autofagi.

Jeg vil takke min veileder, for all faglig rådgivning, konstruktiv kritikk og tilbakemeldelser under mitt hovedfagsarbeid, samt uvurderlig hjelp under manuskriptbearbeidelsen. Jeg setter stor pris på all den nye kunnskapen jeg har fått tilegnet meg i forbindelse med dette arbeidet.

Takk til stipendiatene, Siri Hildonen og Marianne L. Sneve, som på hver sin måte har delt av kunnskaper innen teori og laboratoriearbeid, samt satt meg inn i teknikkene isoelektrisk fokusering og 2-D gelelektroforese. Takk til cand. scient Tonje Asmyhr som engasjerte seg og ga meg konstruktiv kritikk under skriveprosessen, i tillegg til innføring i autofagi-målingsmetoden. Takk til cand. scient Frank Sætre som har delt av sine kunnskaper innen autofagi-målingsmetoden, perfusjon og westernblotting, samt gitt gode råd og hjelp underveis. Takk til tidligere vit. ass. Lise Holden for bra innføring i forsøksdesign, stipendiat Hamid R. Samari for god hjelp de gangene ulike software- og dataproblemer har inntruffet og postdoc. Monica Fengsrud for flere nyttige småtips underveis. I tillegg vil jeg takke resten av forskningsgruppen for råd og veiledning under laboratoriearbeidet.

Takk til med-hovedfagsstudent Shakila Iqbal Jabeen for koselig samvær og fine samtaler. En spesiell takk til min med-hovedfagsstudent, Marit Helgerud for tiden som hovedfagsstudenter sammen. Det har vært godt å ha noen å dele hverdagens små gleder og sorger med. Jeg setter stor pris på vårt vennskap!

Sist, men ikke minst, vil jeg rette en stor takk til min kjæreste og samboer, Kurt Bohmann, familie og venner. Jeg har fått mange positive tilbakemeldinger på oppgaven min, og interessen for hva jeg har holdt på med har vært stor. Men det har også vært viktig med all ikke-faglig støtte og for gode forsøk på å motivere meg i vanskelige perioder.

Oslo, april 2005

Mai Britt Dahl

## Oppgavens målsetning

AMP-aktivert proteinkinase (AMPK) er en sentral regulatorisk serin/threonin-proteinkinase hos mammalske celler. AMPK er et heterotrimerisk enzymkompleks, bestående av en katalytisk  $\alpha$ -subenhet, og to regulatoriske subenheter,  $\beta$  og  $\gamma$ . Proteinkinasen fungerer som en intracellulær ”drivstoffmåler” som til enhver tid registrerer ATP-nivået i cellen. Dersom AMP:ATP forholdet øker, hovedsakelig som følge av ulike typer stress, vil AMPK kunne fosforyleres (i Thr172) og fullaktiveres av den oppstrøms proteinkinasen, LKB1 (interagerende protein-1).

AMPK-aktivering hos rottehepatocytter kan induseres gjennom behandling med algegiftstoffet okadasyre (OA) eller cantharidin, et giftstoff produsert av visse typer biller. Aktivert AMPK vil forsøke å konservere energi ved å hemme ATP-forbrukende veier eller aktivere ATP-produserende veier. En slik ATP-forbrukende vei er autofagi, en degraderingsprosess for intracellulære proteiner med lang halveringstid, organeller og andre makromolekyler. Autofagi er hensiktsmessig på tre hovedområder: 1) remodellering under vekst og differensiering, 2) produksjon av aminosyrer, nukleotider og fettsyrer fra cellulære makromolekyler under sult og 3) eliminering av uønskede eller ødelagte organeller/makromolekyler. Tidligere utførte forsøk ved vårt laboratorium kan tyde på at LKB1/AMPK inngår i en signalvei involvert i autofagi-hemming.

Seglens forskningsgruppe ved Det Norske Radiumhospital jobber med problemstillinger knyttet til AMPK og autofagi ved å benytte isolerte rottehepatocytter som modellsystem, samt ulike proteomiske metoder. Målet med min oppgave var opprinnelig å se på underliggende mekanismer bak defosforylering av (pThr172) AMPK. Da det viste seg at fosforyleringen var irreversibel under de forsøksbetingelsene jeg benyttet, har jeg i stedet studert selve AMPK-fosforyleringen mer inngående. Jeg har også forsøkt å se videre på hypotesen om AMPK som hovedkomponent i et signalnettverk med mulig relasjon til autofagiregulering.

Metodene jeg har benyttet er først og fremst: eksperimentelle in vitro inkuberingsforsøk med isolerte rottehepatocytter, 1-D gelelektroforese, semidry-blotting, immunomerking med forskjellige antistoffer og autofagimålinger. I tillegg har jeg forsøkt å identifisere fosforyleringsvarianter innen AMPK $\alpha$ -subenheten, og gjort et forsøk på identifisere fosforylert Thr172 ved isoelektrisk fokusering og 2-D gelelektroforese ved bruk av disse metodene som hovedteknikker.

## Forkortelser

ACC	acetyl-CoA carboxylase
ADP	adenosindifosfat
AMP	adenosinmonofosfat
AMPK	adenosinmonofosfat-aktivert proteinkinase
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside
ASC	association with SNF1 complex
ASS	argininosuccinate synthase
ATG	autofagirelatert gen
ATP	adenosintrifosfat
BAPTA	bis(o-aminophenoxy)-ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
Beclin 1	Bcl-2-interacting protein
$\beta$ -GBD	$\beta$ -glykogen-bindende-domene
Bis	<i>N,N'</i> -metylenebisakrylamid
BHMT	betain:homocystein metyltransferase
cAMP	syklisk adenosinmonofosfat
C $\beta$ S	cystathionine- $\beta$ -synthase
CDK	syklinavhengig kinase
COMT	catechol o-metyltransferase
DARPP	dopamin-og syklisk AMP-regulert fosfoprotein
DSP	diarrhetic shellfish poisoning
EGTA	ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
ER	endoplasmatisk reticulum
GABARAP	$\gamma$ -aminobutyric acid receptor-associated protein
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATE-16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
iPP	uorganisk pyrofosfatase
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
kDa	kilodalton
KIS	kinase interaction sequence
LDH	laktat dehydrogenase
LKB1	interagerende protein-1

3MA	3-metyladenin
MAPK	mitogen-aktivert proteinkinase
MAP1-LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3
MAT	metionin adenosyltransferase
MO25 $\alpha/\beta$	mouse protein 25- $\alpha/\beta$
mTOR	mammalian target of rapamycin
naringin	naringenin-7-hesperidoside
OA	okadasyre
PE	fosfatidyletanolamin
PHP	histidin proteinkinase
PI	fosfatidylinositol
PK	proteinkinase
PKA	cAMP-avhengig proteinkinase
PKB	proteinkinase B
PKC	proteinkinase C
PP	proteinfosfatase
PPM	metall-ion-avhengige proteinfosfataser
PPP	fosfoprotein-fosfataser
PP1	proteinfosfatase type 1
PP2A	proteinfosfatase type 2A
PP2B	proteinfosfatase type 2B
PP2C	proteinfosfatase type 2C
PTP	tyrosin proteinkinaser
SCEH	short-chain 2-enoyl-CoA hydratase
S6	ribosomalt protein S6
S6K	p70 S6 kinase
SEK1	SAPK/Erk kinase
SNF1	sucrose nonfermenting like kinase
STRAD $\alpha/\beta$	Ste20-related adaptor protein- $\alpha/\beta$
TGN	trans-Golgi-nettverk
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate
UBL	ubiquityleringsliknende
ZMP	5-aminoimidazole-4-caboxamide riboside monophosphate

## Leveren

Leveren er funnet å være et svært godt egnet organ for eksperimentelle undersøkelser. Denne egnetheten skyldes blant annet organets størrelse, mykhet og homogenitet. Ved å benytte en to-trinns kollagenaseperfusjon er det mulig å isolere og rense et stort antall rottehepatocytter. Utbyttet av denne teknikken er høyt (30-40 %), og andelen av helt intakte hepatocytter er omtrent 90-95 %. Prinsippet ved metoden er først å bryte  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengige celleforbindelser ved å gjennomstrømme vevet med en  $\text{Ca}^{2+}$ -fri buffer. Deretter vil bindevevet degraderes med kollagenase, som er et  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengig proteolytisk enzym. For videre rensning av hepatocytterne utføres ultrasentrifugering og gjentatte vasketrinn (Seglen, 1976).

Leveren (hepar) er et forholdsvis stort organ plassert oppunder diafragma (mellomgulvet) på høyre side. Leveren har svært mange viktige endokrine og eksokrine funksjoner som inkluderer metabolisme av fett, karbohydrater og proteiner, detoksifisering av rusmidler og giftstoffer, lagring av glykogen, regulering av blodsukkerkonsentrasjonen, proteinsyntese, sekresjon av serumproteiner, produksjon og utskillelse av galle, fagocytose og dannelsen av urinstoff. Hos pattedyr-foster har leveren en essensiell funksjon som sete for blodcelledannelse (Sæter et al., 1988; Dahl & Rinvik, 1999, Lemaigre & Zaret, 2004).

Organet får tilført både arterielt og venøst blod. Det oksygenrike blodet tilføres leveren gjennom leverarterien fra aorta, mens mesteparten av blodet tilføres gjennom portvenen fra fordøyelseskanalen. Næringsstoffsammensetningen i det venøse blodet blir justert før det videreføres til hjertet og lunger (Dahl & Rinvik, 1999).

Leveren er inndelt i to eller flere lapper (avhengig av arten) som videre er inndelt i utallige irregulære heksagonale enheter som kalles lobuler. Hver lobule er sentrert rundt en sentralvene og omkranset av 6 triader i hvert sitt ytterpunkt (en triade består av en portvenegren, liten arterie og gallegang). Lobulen er leverens histologiske og funksjonelle enhet (Dahl & Rinvik, 1999).

### *Hepatocytter*

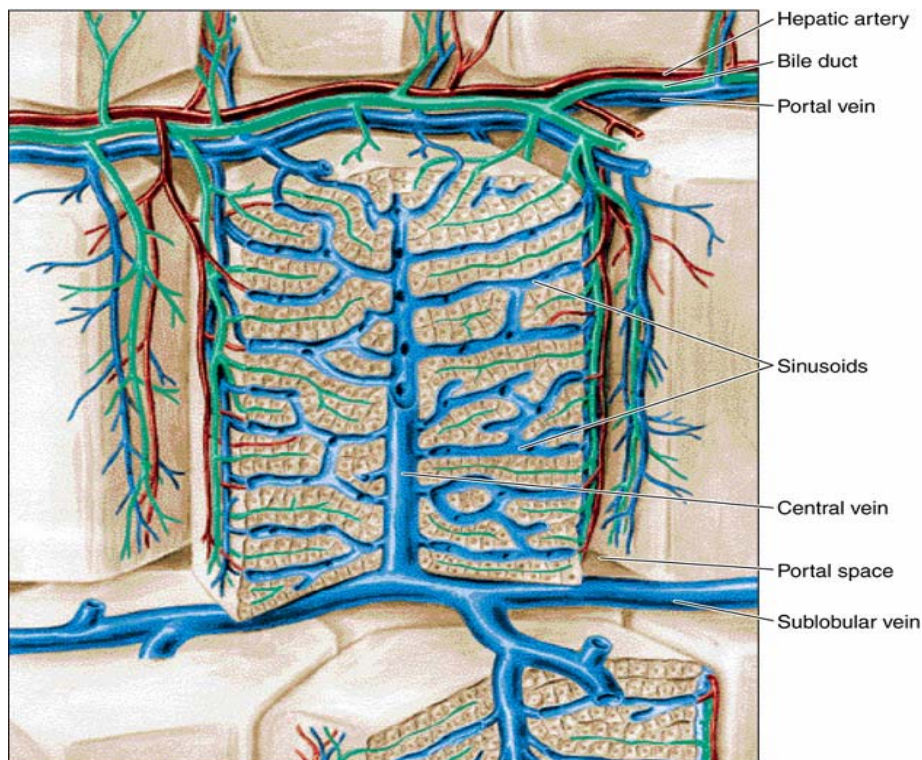
Hovedandelen av levercellene består av hepatocytter eller parenkymale leverceller (80-90 %). Det finnes imidlertid en rekke andre ikke-parenkymale celletyper (10-20 %) i leveren, og disse omfatter sinusoidalceller, stellatceller (fettlagrende celler), kuppferceller (sinusoidale makrofager), pitceller (naturlig dreperceller), fibroblaster, gallegangs-epitelceller, ovalceller og endotelceller. Hepatocytterne er relativt store celler (20-35  $\mu\text{m}$  i diameter) og dominerer størrelsesmessig. Hepatocytterne har normalt en levetid på ett år, og fornyes relativt langsomt.

Mellom sentralvenen og triadene er hepatocytene organisert inn i rader som går parallelt med langsgående hulrom, sinusoider, hvor det venøse og arterielle blodet forenes og føres til sentralvenen (Bevelander & Ramaley, 1974; Sæter et al., 1988). Sinusoidveggene er bekledd med et enkelt cellelag med endotelceller. Dette cellelaget er fenestrert (fullt av spalteåpninger) og sørger for kontakt mellom blodet og hepatocytene. Disse spalteåpningene medfører en gunstig utveksling av metabolitter i disse regionene. I forbindelsessonen mellom hepatocytene finnes gallekapillærene, som transporterer galle som ender opp i galleblæren (Dahl & Rinvik, 1999). I tillegg til å kunne utføre et stort spekter av metabolske eller sekretoriske oppgaver, kan hepatocytene dele seg ved behov (Alberts et al., 2002a).

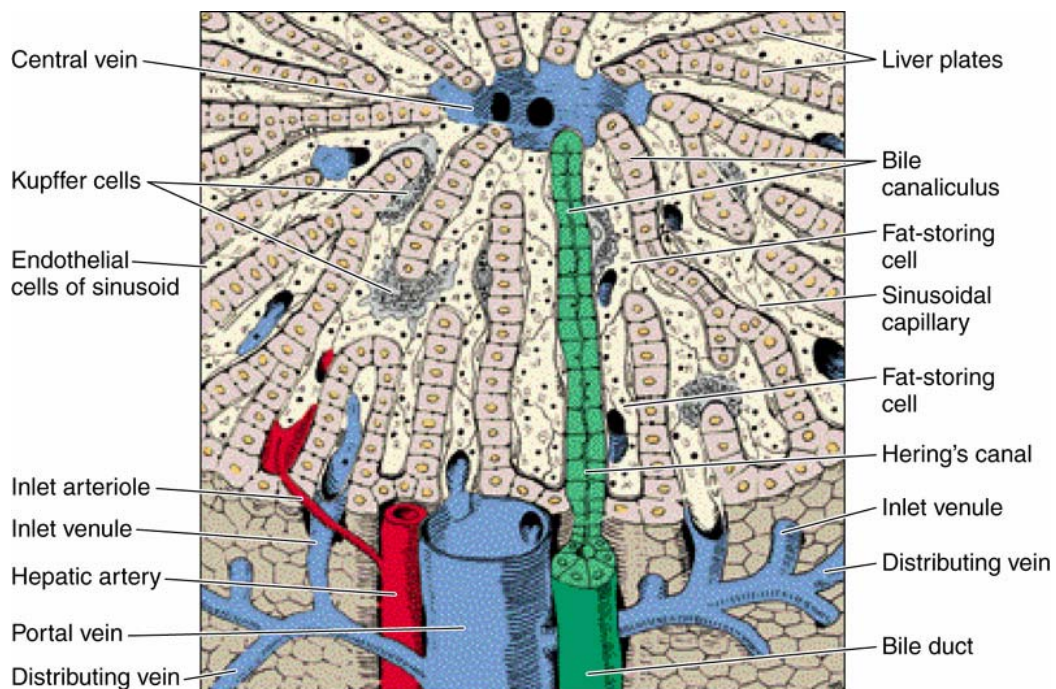
Hepatocytene har også en annen en annen egenskap, de er polariserte. Polariseringen går ut på at cellen har et forskjell i elektrisk potensial over membranen (Alberts et al., 2002a). Den apikale overflaten vender ut mot galle-canaliculi, den basale overflaten vender mot perisinuoidal rommet, mens den laterale overflaten grenser mot andre hepatocytter. Både den apikale- og basale-overflaten har karakteristisk trekk ved at membranen er omdannet til en kontinuerlig rekke av tynne utløpere (mikrovilli). Mikrovilliene og polariseringen forsvinner ved enkeltcelle-separering (Arias et al., 1988; Dahl & Rinvik, 1999).

Blant hepatocytene er det svært utbredt at cellene også inneholder to (diploide, ~10 %), fire (tetraploide, ~70 %), åtte (oktaploide, ~10 %) eller 16 (heksadepakloide) kromosomsett fordelt på en eller to relativt store kjerner. En slik polyploiditet skyldes at DNA-innholdet har blitt duplikert etterfulgt av kjernedeling uten at det har foregått celledeling. Den funksjonelle betydningen bak polyploidisering er det usikkerhet om, men det spekuleres i om prosessen kan beskytte mot dominant ekspresjon av muterte onkogener (kreftutvikling) (Sæter et al., 1988). Hepatocytene er funnet å inneholde mitokondier, endoplasmatiske retikulum (ER), Golgi-apparat og lysosomer (Arias et al., 1988).





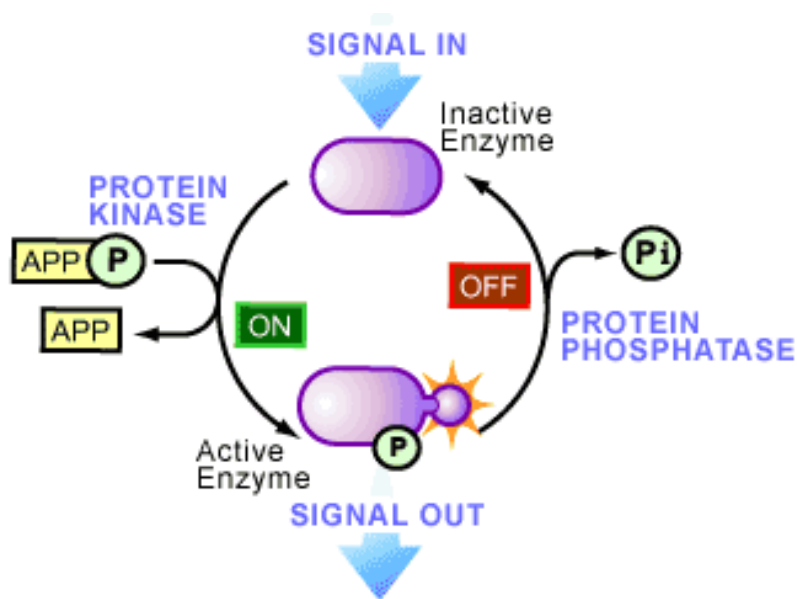
**Figur 1. Skjematisk lengdesnitt av leverlobulen** (fra Junqueira and Carneiro, 2003)



**Figur 2. Skjematisk tverrsnitt av leverlobulen** (fra Junqueira and Carneiro, 2003)

## Proteinfosorylering

Proteinfosorylering og defosorylering er en av hovedmekanismene bak regulering av mange cellulære prosesser hos eukaryote celler. Reguleringstypen er svært utbredt i alle signaliseringsveier, og utgjør et svært sensitivt og dynamisk system. Fosorylering og defosorylering er adskilte prosesser, men hører i stor grad sammen. Prosesser som er reversibelt kontrollert via protein fosorylering behøver både en proteinkinase (PK) og en proteinfosfatase (PP). Målproteiner fosoryleres i spesifikke seter via en eller flere proteinkinaser, og de resulterende fosfatgruppene vil deretter spesifikt kunne fjernes av proteinfosfataser. Ved fosorylering katalyserer en proteinkinase overførselen av en  $\gamma$ -fosorylgruppe fra et ATP-molekyl til hydroksylgruppen i et serin-, threonin- eller tyrosinsete innen målproteinet. Spaltingen av fosfat-fosfatbindingen innen ATP-molekylet frigir energi, og den eksoterme reaksjonen vil dermed kun gå i en retning. Proteinfosfatasene katalyserer den motsatte reaksjonen via en hydrolysereaksjon som fjerner fosfatgrupper fra målproteinene (Hunter, 1995).



Et stort omfang av proteinkinaser og proteinfosfataser gir opphav til et enormt spekter av ulike substratspesifisiteter, subcellulære lokaliseringer og reguleringer (Ceulemans & Bollen, 2004). Cellesyklusprogresjon, signaltransduksjon, celletransformasjon, metabolske prosesser, genregulering, transport og sekretoriske prosesser, organisering og homøostase av cytoskjelettet og celleadhesjon er blant essensielle cellulære prosesser som reguleres av proteinfosorylering (Toivola et al., 1997; Barford et al., 1998; Millward et al., 1999).

## Proteinkinaser

Proteinkinaser kan deles inn i to hovedgrupper, tyrosin-kinaser og serin/threonin-kinaser, som følge av hvilke seter de fosforylerer. Ved sammenligning av sekvenslikhet har det blitt laget en videre taksonomisk inndeling av proteinkinaser. Serin/threonin-proteinkinaser kan deles inn i følgende undergrupper: 1) Syklisk nukleotid-regulerte proteinkinaser, 2)  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmmodulin-regulerte proteinkinaser, 3) Diacylglycerol-regulerte proteinkinaser, 4) andre serin/threonin proteinkinaser (MAP-kinaser og reseptor-serin/threonin-proteinkinaser). Tyrosin-proteinkinaser kan deles inn i disse undergruppene: 1) Src-genfamilien, 2) abl-genfamilien, 3) fps-genfamilien, 4) vekstfaktor-reseptorer, 5) andre tyrosin-proteinkinaser (Hunter, 1987). Mens noen kinaser er fullstendig substratspesifikke (for eksempel fosforylase kinase og myosin light-chain kinase), kan andre fosforylere en hel rekke substrater da de kun er avhengig av en konsensus sekvens (for eksempel proteinkinase C (PKC) og cAMP-avhengig proteinkinase (PKA)). På tross av en stor diversitet i substratspesifisitet, innehar alle de eukaryotiske proteinkinaserne en slående sekvenslikhet i det katalytiske domenet, og det antas at alle proteinkinaser stammer fra det samme forhistoriske genet (Zolnierowicz, 2000; Schweighofer et al., 2004).

Sammenlikning av primærsekvenser, av over 400 kjente og potensielle proteinkinaser fra eukaryoter, indikerer at hovedkjernen av det katalytiske domenet består av omtrent 280 aminosyrer. Det katalytiske-domenet (eller kinase-domenet) inneholder 12 konserverte subdomener som folder seg inn i en felles katalytisk kjernestruktur (Hanks & Hunter, 1995). Det er hittil blitt identifisert 518 humane gener som antas å kode for proteinkinaser, og dette utgjør 1,7 % av det totale antallet gener i det humane genomet (Manning et al., 2002). Hos gjær (*S. cerevisiae*) er det identifisert 113 proteinkinase-gener og dette utgjør omtrent 2 % av det totale genantallet (Hunter & Plowman, 1997).

Det ser ut til at alle proteinkinaser i utgangspunktet cellulært foreligger i en inaktiv tilstand. Positiv eller negativ regulering innebærer binding av ligander, binding av sekundære budbringere eller økt intracellulær  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjon. En svært utbredt reguleringsmekanisme er direkte fosforylering av proteinkinaserne selv (Hunter, 1987).

Proteinkinaser er involvert i de fleste signaltransduksjonsveiene hos eukaryotiske celler. Ved å fosforylere og modulere ulike substrataktiviteter er de essensielle regulatorer av ulike cellulære prosesser (Manning et al., 2002). Mutasjoner og feilregulering av proteinkinaser er en vesentlig årsak til sykdommer. Å finne riktige agonister eller antagonister

for disse enzymene vil være viktig for bruk innen sykdomsterapi og pasientbehandling (Cohen, 2002b).

### **AMP-aktivert proteinkinase (AMPK)**

Først i 1988 fikk enzymet sitt nåværende navn, AMP-aktivert proteinkinase (AMPK). Det hadde blitt beskrevet før den tid, men da med andre navnsettinger. De to tidligere navnene, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase kinase og acetyl-CoA carboxylase (ACC) kinase, ble opprinnelig valgt på grunnlag av de to aller første, kjente substratene til enzymet. AMPK, som et endelig navn, ble derimot bestemt på bakgrunn av én av dets fysiologiske aktivatorer, AMP (Carling, 2004b).

AMP-aktivert proteinkinase er en serin/threonin proteinkinase som er svært konservert i høyere eukaryoter, gjærsopp og planter (Woods et al, 2003b). Kinasen er en komponent i en proteinkinase-kaskade som fungerer som en sensor for opprettholdelse av den cellulære energihomøostasen hos mammalske celler. (Pan & Hardie, 2002). Alle celler må opprettholde en høy ATP:ADP ratio for å overleve. Dersom det oppstår en nedgang i ATP:ADP forholdet, vil dette resultere i at AMP-konsentrasjonen øker. Denne reaksjonen katalyseres av adenylat kinase ( $2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ) (Hardie, 2003).

### ***Aktivering***

AMP vil allosterisk aktivere AMPK, men AMP-effektene kan antagoniseres av høye ATP-konsentrasjoner. Det antas at de allosteriske setene binder AMP og ATP kompetitivt (Hardie et al., 2003; Hardie, 2003). Det er altså AMP:ATP forholdet som bestemmer AMPK-aktiviteten. AMPK slås på ved ulike former for cellulært stress, enten det interfererer med ATP-produksjonen (f. eks. hypoksi, iskemia, varmesjokk eller glukoseunderskudd) eller ATP-konsumeringen (f. eks. muskelkontraksjon og trening) (Hardie, 2003).

AMPK vil ikke fullaktiveres av et økt AMP:ATP forhold alene. Det er i tillegg nødvendig med fosforylering via LKB1 (interagerende protein-1) på et threonin-sete (Thr172) innen aktiveringsløkken av kinase-domenet på  $\alpha$ -subenheten (Woods et al., 2003a). Thr172-fosforylering fremmes av AMP, både ved å stimulere LKB1 til fosforylering og ved å hemme defosforylering (via proteinfosfataser). Uten en Thr172-fosforylering vil det ikke detekteres noen AMPK-aktivitet, og den er dermed helt essensiell for å oppnå fullaktivering av enzymkomplekset (Davies et al., 1995)

Det har også vist seg at AMPK kan aktiveres gjennom hormoner som virker via Gq-koblede reseptorer, leptin eller adiponectin. Disse hormonene, som opprinnelig har opphav fra adipocytter, spiller en nøkkelrolle innen regulering av energihomøostasen. Mekanismene bak disse aktiveringsmåtene er imidlertid foreløpig noe uklare. (Hardie, 2003). Hyperosmotisk stress (Fryer et al., 2002) og den anti-diabetiske agenten, metformin (Hawley et al., 2002), kan aktivere AMPK uten å forandre det intracellulære AMP:ATP forholdet. Disse forholdene medfører også økt fosforylering via en oppstrøms kinase, men de direkte virkningsmekanismene bak AMPK aktiveringen er ikke kjent (Fryer et al., 2002).

AICAR (5-amino-4-imidazole carboxamide riboside) er en forbindelse som hyppig blir benyttet for aktivering av AMPK, og er svært ideell for å se på de fysiologiske konsekvensene av en slik aktivering. Adenosinanalogen tas opp av celler og omdannes av adenosin kinase til det monofosforylerte nukleotidet, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-5'-monophosphate (ZMP), som kan akkumulere til relativt høye nivåer innen de fleste celletyper. ZMP kan mimikere AMP, og aktiverer AMPK uten å forstyrre de cellulære nivåene av AMP, ADP eller ATP (Corton et al., 1995; Hardie, 2003).

Algegiftstoffet okadasyre (OA) og andre proteinfosfatase-hemmende giftstoffer (mikrocystin, calyculin A, cantharidin og tautomycin) kan indusere overfosforylering av AMPK hos isolerte rottehepatocytter. På bakgrunn av dose-respons analyser av giftstoffene, i tillegg til antagonistiske effekter av grapefrukt-flavonoidet, naringin, har det blitt identifisert to mulig separate aktiveringsmekanismer av AMPK-systemet. Den ene aktiveringsmekanismen som er naringin-sensitiv og antakelig innebærer inhibering av serin/threonin fosfatase proteinfosfatase 2A (PP2A), benyttes av okadasyre og mikrocystin. Den andre aktiveringsmekanismen, som er naringin-resistent og som trolig involverer inhibering av serin/threonin fosfatase proteinfosfatase 1 (PP1), benyttes av calyculin A, cantharidin og tautomycin (Larsen et al., 2002). AMPK blir defosforylert i Thr172 *in vivo* av proteinfosfatase 2C (PP2C). Det spekuleres i om de fosfatase-hemmerende giftstoffene kan virke inhiberende på PP2C ved å hemme andre proteinfosfataser. PP2C har ved forsøk vist seg å være OA-insensitiv (Moore et al., 1991).

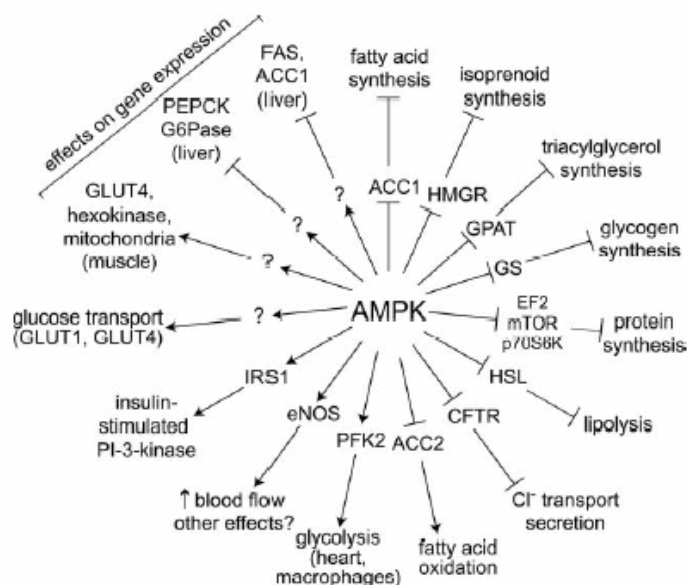
Aktivert AMPK responderer med å fosforylere ulike nedstrøms substrater, enten på en aktiverende eller inhiberende måte. Formålet bak disse substratfosforyleringene er å slå av ATP-konsumerende anabolske veier eller å slå på ATP-produserende katabolske veier. AMPK har vist seg å fosforylere og inaktivere nøkkelenzymer innen biosyntetiske veier som acetyl-CoA carboxylase i fettsyresyntesen og 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase

innen kolesterolsyntesen. AMPK kan på en annen side øke ATP-tilgangen ved å stimulere fettsyreoksidasjonen (Stein et al., 2000).

Korttidseffekter ved AMPK-aktivering innebærer direkte fosforylering og regulering av slike metabolske enzymer i cytoplasma. Langtidseffekter ved aktivering av kinasen gir effekter på genekspresjonsmønsteret. Det tyder på at AMPK kan ha direkte effekter på aktiviteten til proteiner i kjernen, involvert i transkripsjonregulering. En av primærfunksjonene til AMPK i kjernen er antakelig å redusere transkripsjonsraten, som er en svært energikrevende prosess (Leff, 2003).

Eksperimenter utført med isolerte rottehepatocytter indikerer at AMPK kan mediere en rekke intracellulære effekter etter toksin-indusert fosforylering og aktivering. En av disse er overfosforylering av proteiner som inngår i cytoskjelettet. Keratin-intermediærfilament-nettverket fragmenteres som resultat av en slik overfosforylering (Blankson et al., 2000). Plektin, et cytoskjelett-kryssbindingsprotein, overfosforyleres også, og det hepatocellulære plektin-nettverket fragmenteres på liknende måte (Larsen et al., 2002).

På bakgrunn av at AMPK intracellulært har en funksjon som metabolsk ”drivstoffmåler”, er det rimelig at enzymet er involvert i signalveier som hemmer energikrevende prosesser når næringstilgangen er lav. Toksin-indusert fosforylering av AMPK kan derfor godt tenkes å formidle de hemmende virkningene av toksinene på prosesser som autofagi, endocytose og protein syntese (Gordon et al., 1995; Samari & Seglen, 1998; Blankson et al., 2000).



**Figur 3** Kjente fysiologiske målprosesser regulert av AMPK-systemet (fra Hardie, 2003).

### ***Et heterotrimerisk kompleks***

AMPK er en heterotrimer som består av en katalytisk  $\alpha$ -subenhet (63 kDa) og to regulatoriske subenheter,  $\beta$  (40 kDa) og  $\gamma$  (38 kDa). Koekspresjon av de ikke-katalytiske  $\beta$ - og  $\gamma$ -subenhetene er nødvendig for optimal aktivitet for den katalytiske  $\alpha$ -subenheten og for dannelse av et aktivt stabilt enzymkompleks (Stapleton et al., 1997). Hos mammalsk AMPK blir hver subenhet kodet for av enten to eller tre gener ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ). Dette vil kunne gi opphav til totalt 12 mulige holoenzymkombinasjoner. De dominante isoformene hos de fleste celletyper er  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  og  $\gamma 1$ , men leverceller har vist seg å uttrykke et signifikant nivå av  $\alpha 2$ , mens hjertemuskulatur også uttrykker  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  og  $\gamma 3$  (Hardie, 2003).

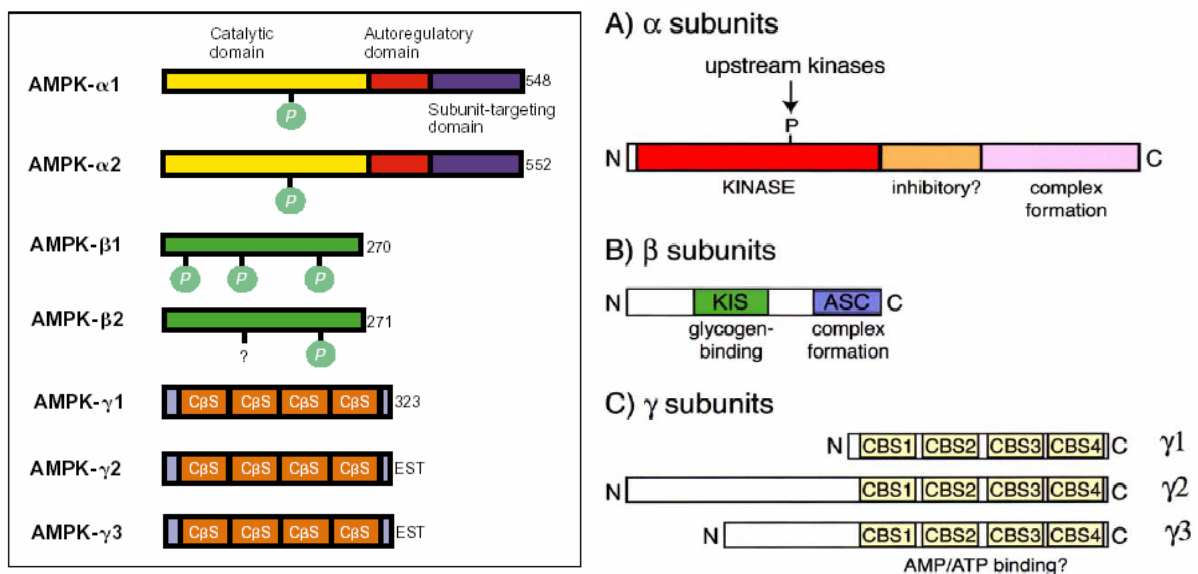
Den katalytiske subenheten består hovedsakelig av to funksjonelle regioner: en N-terminal katalytisk kjerne og en C-terminal hale som er ansvarlig for autoregulering samt binding til de to andre ikke-katalytiske subenhetene. Det typiske serin/threonin katalytiske proteinkinase-domene på N-terminal halvdel av  $\alpha$ -subenheten inneholder særtrekk som er konserverte gjennom hele proteinkinase-superfamilien (Hanks et al., 1988). Regionen på den C-terminale halvdel av  $\alpha$ -subenheten, som er ansvarlig for subenhetens assosiering med de to andre subenhetene, er på  $\sim 150$  aminosyrer (392-548). I tillegg er det identifisert en region nedstrøms for det katalytiske domene som tilsynelatende kan se ut til å ha en inhibitorisk funksjon (setene 312-392 innen  $\alpha 1$ -subenheten) (Crute et al., 1998).  $\alpha$ -subenheten er ustabil i fravær av  $\beta$  og  $\gamma$ , og  $\alpha$ -subenhet-ekspresjonen begrenses dermed av tilgjengeligheten av de øvrige to subenhetene (Hardie et al., 2003).

$\beta$ -subenheten er myristoylert og fosforylert i flere seter (Ser24/25, Ser96, Ser101, Ser108 og Ser182). Fosforylering i Ser108 på  $\beta 1$  ser ut til å være nødvendig for aktivering av AMPK enzymet, mens fosforylering i de øvrige setene antas å være involvert i AMPK kompleksets subcellulære lokalisering eller substratbinding (Warden et al., 2001; Woods et al., 2003b). Bakgrunnen for myristoyleringen er antakeligvis at den har en innvirkende effekt på membran-binding.  $\beta$ -subenheten inneholder også et sentralt konserverte domene, som nylig har blitt identifisert som  $\beta$ -glykogen-bindende-domene ( $\beta$ -GBD). Dette domenet (residu 68-163) er nært beslektet med isoamylase-domener som finnes i forgrenede glykogen- og stivelsesenzymmer (Kemp et al., 1999; Polekhina et al., 2003). Det spekuleres i om dette domenet kan være involvert i en målstyring av AMPK til glykogen, og videre om det kan fungere som en reguleringsmekanisme for glykogen av AMPK-komplekset (Carling, 2004a). En av funksjonene til den regulatoriske  $\beta$ -subenheten er at den virker som et "stativ" som binder  $\alpha$ - og  $\gamma$ -subenheten til seg via to konserverte domener, henholdsvis ASC (assosiation

with SNF1 complex) og KIS (kinase interaction sequence) (Hardie & Hawley, 2001). Nylige studier har imidlertid vist at kun ASC-domenet er nødvendig for dannelse av et stabilt og aktivt  $\alpha\beta\gamma$ -kompleks, samt at det tidligere KIS-domenet er sammenfallende med  $\beta$ -GBD (Hudson et al., 2003).

$\gamma$ -subenheten innehar ingen post-translasjonelle modifikasjoner med unntak av N-acetylering. De N-terminale regionene av AMPK- $\gamma$  (hos pattedyr) har vist seg å være svært variable, både i størrelse og sekvenssammensetning. Subenheten består ellers av fire identiske cystathionine- $\beta$ -synthase (C $\beta$ S) domener på ~ 50-60 aminosyrer. Disse domene har blitt funnet å eksistere i et stort omfang av ulike proteiner (Kemp et al., 1999; Hardie et al., 2003). Det har nylig kommet sterke indisier på at disse fire nærliggende domenene på  $\gamma$ -subenheten danner bindingssteder for de regulatoriske nukleotidene, AMP og ATP (Adams et al., 2003; Hardie et al., 2003).

Det trimeriske kompleksets AMP-avhengighet varierer med hvilken  $\alpha$ - og  $\gamma$ -subenhet det er bygget opp av. Det er også slik at  $\alpha$ 2-komplekser er svært utbredt og dominerer i omfang i kjernen, mens derimot  $\alpha$ 1-komplekser i stor grad ekskluderes fra kjernen og først og fremst befinner seg i cytoplasma (Hardie, 2003). Det er også gjort forsøk, med rottehepatocytter, som har vist at  $\alpha$ 1 og  $\alpha$ 2 har litt forskjellige substratpreferanser, noe som kan antyde at de to isoformene kan spille ulike fysiologiske roller intracellulært (Woods et al., 1996)



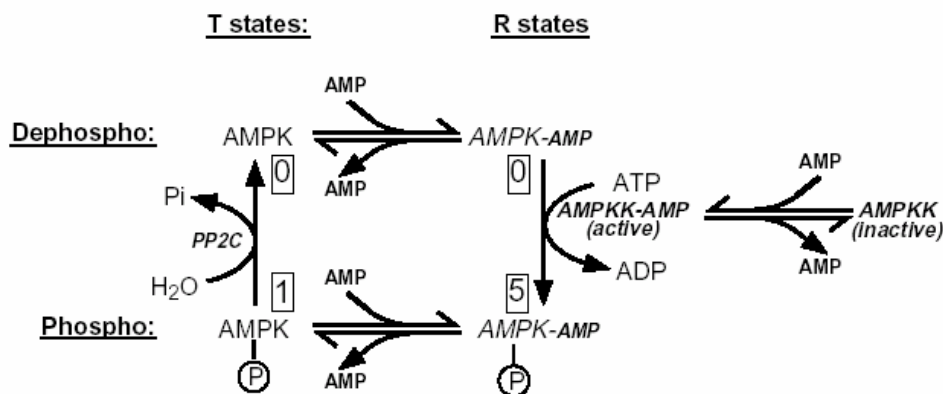
**Figur 4. De ulike isoformene som kan inngå i et trimerisk AMPK-kompleks.** De ulike isoformene varierer i domenesammensetning, og innehar forskjellige fosforyleringssteder (fra Kemp et al., 1999; Hardie et al., 2003)



## AMPK og LKB1

Reguleringen av AMPK er allosterisk og skjer via AMP, og ved at kinasen utsettes for en reversibel fosforylering. Thr172 innen aktiveringsdomenet på den katalytiske subenheten er identifisert som hovedsetet som fosforyleres av en oppstrøms AMP-aktivert kinase-kinase (Stein et al., 2000). En slik oppstrøms kinase ble nylig identifisert som tumor-suppressoren og proteinkinase LKB1 (Woods et al., 2003a). Fosforylering i Thr172 er som tidligere nevnt nødvendig for å kunne detektere noen signifikant kinase-aktivitet (Hardie et al., 2003).

Det er antatt at det autoregulatoriske domenet på C-terminal halvdel av  $\alpha$ -subenheten, i fravær av AMP interagerer med det katalytiske domenet, og holder kinasen i en inaktiv konformasjon (T-konformasjon). Det kan tyde på at dette skyldes en interaksjon nettopp mellom kinase- og det autoregulatoriske-domenet innen den samme subenheten. Det antas videre at når komplekset er i den aktive konformasjonen (R-konformasjonen), brytes denne interaksjonen pga at det autoregulatoriske domenet på  $\alpha$ -subenheten nå i stedet interagerer med C $\beta$ S-domenene på  $\gamma$ -subenheten. AMP virker i denne sammenhengen ved å stabilisere interaksjonen mellom subenhetene, og fremmer kinasens aktive konformasjon. Det er først i den aktive konformasjonen at hovedfosforyleringssetet Thr172, som ligger innen aktiveringsløkken av kinase-domenet, er tilgjengelig for fosforylering (Hardie & Hawley, 2001).



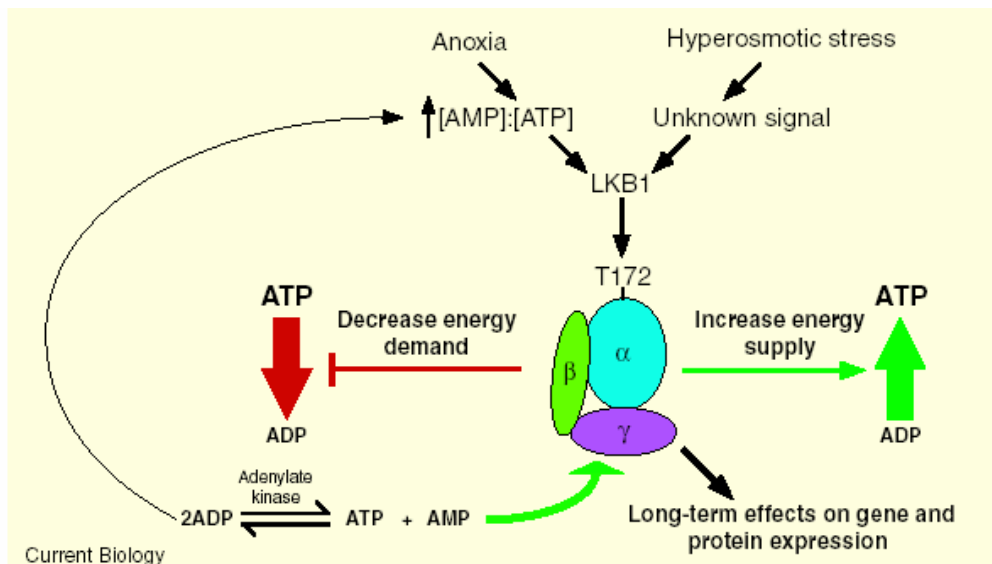
**Figur 5. AMPK regulering.** AMPK reguleres av 5'AMP, samt fosforylering (Thr-172). AMPK antas å kunne eksistere i 4 tilstander: R- og T-tilstand, som begge kan være fosforylert/defosforylert. R-tilstanden er et substrat for AMPKK, mens T-tilstanden er et substrat for PP2C (fra Hardie et al., 1998).

Det eksisterer også ytterligere fosforyleringssteder innen  $\alpha$ -subenheten, Thr258 og Ser485 (Ser491 hos  $\alpha$ 2). Disse øvrige fosforyleringssetene har imidlertid ikke vist seg å være essensielle for enzymaktiviteten. Sekvensene som omgir Thr258 og Ser485/Ser491 har en konsensus som ikke finnes ved Thr172. Denne observasjonen indikerer at Thr258 og

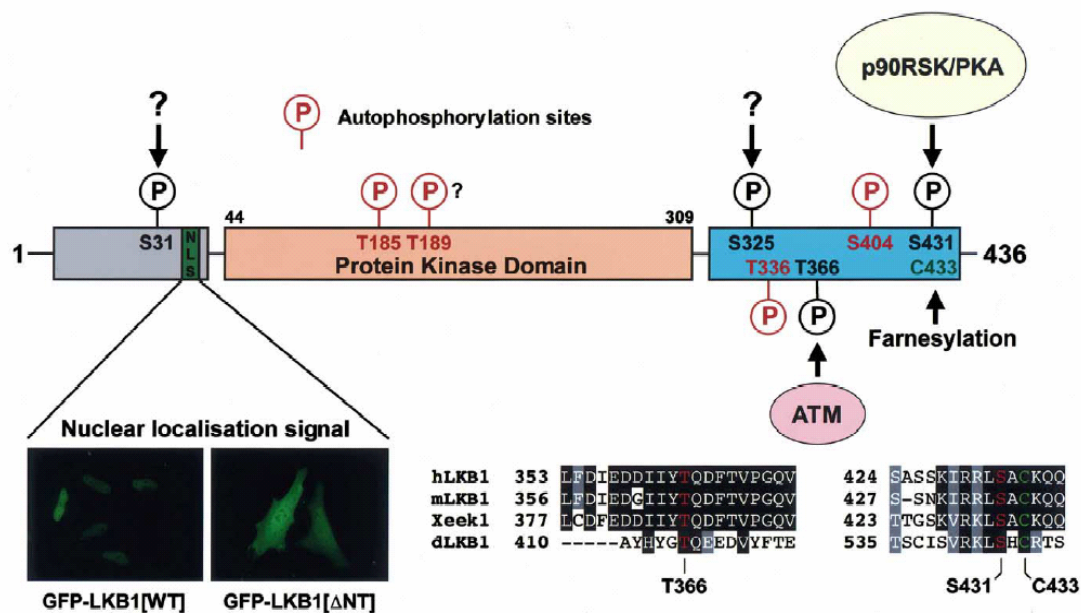
Ser485/Ser491 blir fosforylert av en felles AMPKK, men at denne er forskjellig fra den som fosforylerer i Thr172 for aktivering (Woods et al., 2003b).

LKB1 er på sin side en proteinkinase involvert i regulering av celleproliferasjon og polaritet (Boudeau, 2003b). Inaktiverende mutasjoner i LKB1 medfører en sjelden og arvelig (autosomal dominant) kreftform, Peutz-Jeghers syndrom (Carling, 2004a). LKB1 har vist seg å dele en signifikant aminosyresekvens-likhet med Elm1, Pak1 og Tos3, tre kinaser hos gjær som fosforylerer og aktiverer SNF1 (AMPK-homologen hos gjær) (Hong et al., 2003; Carling, 2004a). Identifisering av tumor-suppressoren LKB1 som oppstrøms kinase for AMPK medfører at AMPK kan være involvert i regulering av vekst, transformasjon og metabolisme (Hong et al., 2003).

LKB1 fosforylerer og aktiverer AMPK *in vitro* (Hong et al., 2003), og har vist seg å stå for det meste av AMPKK-aktiviteten detektert i celleekstrakter (Woods et al., 2003a). Predikert masse for LKB1 hos mus/mennesker er 49 kDa (Woods et al., 2003a). LKB1 fosforylerer og aktiverer AMPK i kompleks med pseudokinasen, Ste20-related adaptor protein- $\alpha/\beta$  (STRAD $\alpha/\beta$ ), og stativproteinet, mouse protein 25- $\alpha/\beta$  (MO25 $\alpha/\beta$ ) (Hawley et al., 2003). MO25 $\alpha/\beta$  binder seg til C-terminus av STRAD $\alpha/\beta$  og stabiliserer assosiasjonen mellom STRAD $\alpha/\beta$  og LKB1, i tillegg til å lokalisere LKB1 til cytoplasma (Boudeau et al., 2003a).



**Figur 6. Tumor suppressoren LKB1 er identifisert som en oppstrøms kinase (AMPKK) for AMPK. LKB1 fosforylerer i Thr172, hovedfosforyleringssetet for aktivering av AMPK (fra Carling, 2004b).**



**Figur 7. LKB1 (mus).** LKB1 har trolig 4 fosforyleringssteder og 4 autofosforyleringssteder. Hovedautofosforyleringsstedet, Thr-336, står trolig for tumorsuppressorfunksjonaliteten (Boudeau et al., 2003a).

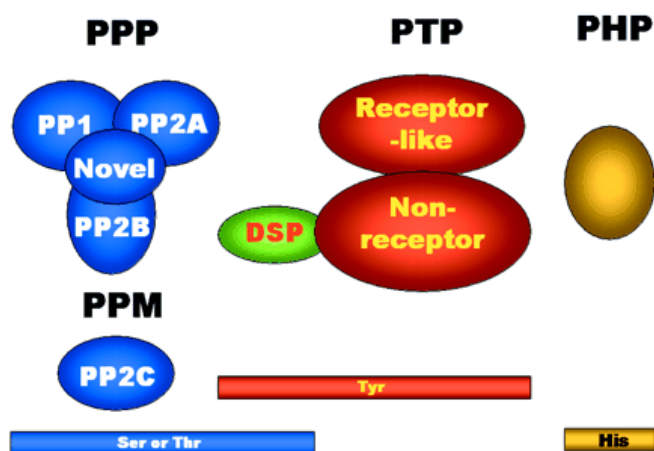
AMPK antas å være involvert i metabolske lidelser som diabetes, kreft, overvekt eller hjerte- og karsykdommer, og på grunn av dets sentrale rolle innen metabolismen er kinasekomplekset et viktig terapeutisk mål for forskning og medisinsk behandling både i nåtiden og for fremtiden (Hong et al., 2003).

## Proteinfosfataser

Proteinfosfatasene kan bli klassifisert inn i tre uavhengige proteinfamilier på bakgrunn av substratspesifisiteter, katalytiske mekanismer og aminosyresekvenser. De tre proteinfamilieene er navngitt som følge av hvilke aminosyreseter de spesifikt defosforylerer, og benevnes serin/threonin-proteinfosfataser, tyrosin-proteinfosfataser (PTPs) og histidin-proteinfosfataser (PHPs). I tillegg finnes det en god del dobbeltspesifikke proteinfosfataser, som både kan defosforylere i tyrosin- og serin/threonin-seter. PTP-familien består av både en transmembran (reseptorliknende) og en cytosolisk (ikke-reseptor) underfamilie. Den mer nylig identifiserte PHP-familien er derimot ikke videre inndelt i underfamilier (Dombradi et al., 2002).

Alle kjente proteinfosfataser spesifikke for fosforylerte serin- og threoninresiduer blir kodet for av to ubeslektede gen familier, PPM (metall-ion-avhengige proteinfosfataser) og PPP (fosfoprotein fosfataser). PPM-familien består av Mg<sup>2+</sup>-avhengige proteinfosfataser. Den

mest kjente representanten for denne familien er proteinfosfatase 2C (PP2C), i tillegg til pyruvat dehydrogenase fosfatase. PPP-familien har tradisjonelt blitt delt inn i tre subfamilier, hvor proteinfosfatase 1 (PP1), proteinfosfatase 2A (PP2A) og proteinfosfatase 2B (PP2B/calcineurin) er representanter for hver av dem. (Andreeva & Kutuzov, 2001). I den senere tid har disse tre subfamiliene ytterligere blitt supplementert med nye medlemmer fra flere arter: PP4, PP5, PP6 (en funksjonell homolog til Sit4 hos *S. cerevisiae*) og PP7 (Cohen, 1997; Garcia et al., 2003). Det er også blitt karakterisert ytterligere en genfamilie av serin/threonin-proteinfosfataser, denne benevnes FCP familien, og omfatter kun én fosfatase som også er Mg<sup>2+</sup>-avhengig (Ceulemans & Bollen, 2004).



**Figur 8. Karakteriserte proteinfosfatase-familier.** Fosfoprotein fosfataser (PPP), metall-ion-avhengige proteinfosfataser (PPM), tyrosin proteinfosfataser (PTP), dobbelt-spesifikke phosphataser (DSP), histidin proteinfosfataser (PHP) (fra Dombradi et al., 2002).

På primærsekvensnivå utgjør katalytiske subenheter eller domener hos PPP-familien generelt en region på ca 220 aminosyrer, som er karakterisert av tilstedeværelse av tre konserverte aminosyre-motiver (Barton et al., 1994). Det er funnet at antallet gener som koder for proteinfosfataser er under halvparten av genantallet som koder for proteinkinaser, og av 119 identifiserte gener som koder proteinfosfataser, viste det seg at hovedandelen av disse tilhørte PTP-familien (Zolnierowicz, 2000).

Ulikt de fleste andre enzymer viser serin/threonin proteinfosfatasene svært bred og overlappende spesifisitet *in vitro*, og en klassifisering av dem krever bruk av spesifikke inhibitorer og aktivatorer. Ved bruk av disse kriteriene har de forskjellige katalytiske subenhetene av proteinfosfataser innen PP-familien blitt identifisert hos eukaryoter. PP1 defosforylerer  $\beta$ -subenheten av fosforylase kinase spesifikt og blir hemmet av nanokonsentrasjoner av de thermostabile proteinene, inhibitor-1 og inhibitor-2. Type 2

proteinfosfatasene (PP2A, PP2B og PP2C) har derimot en preferanse mot å defosforylere  $\alpha$ -subenheten av fosforylase kinase og lar seg i mindre grad affisere av inhibitorene. Type 2 proteinfosfatasene kan skilles fra hverandre på bakgrunn av kation-preferanser nødvendig for aktivitet. PP2C er avhengig av  $Mg^{2+}$ , PP2B avhengig av  $Ca^{2+}$ , mens PP2A ikke er avhengig av noe spesifikt kation (Ingebritsen et al., 1983; Cohen & Cohen, 1989).

Serin/threonin-proteinfosfatasene PP1, PP2A, og PP2B fra PPP familien utgjør sammen med PP2C, fra PPM familien, hovedandelen av protein-serin/threonin proteinfosfatase aktiviteten *in vivo*, og befinner seg i cytoplasma hos alle mammalske celler. PP1, PP2A og PP2B deler et felles katalytisk domene på 280 residuer, mens de er mest divergent innen de ikke-katalytiske N- og C-terminale endene og blir skilt fra hverandre via de respektive assosierte regulatoriske subenhetene for dannelse av en stor variasjon av ulike holoenzymmer (Barford et al., 1998). I kontrast til PP2B og PP2C, blir PP1, PP2A, PP4, PP5, PP6 og PP7 hemmet av naturlig forekommende toksiner som OA eller mikrocystiner (Cohen et al., 1990; Garcia et al., 2003). PP1, PP2A og PP2B eksisterer i kompleks med andre subenheter *in vivo*, mens PP2C kun har blitt isolert som et monomerisk protein.

## ***PP1***

Proteinfostatase 1, PP1 (35–38 kDa), er et av de mest konserverte eukaryotiske proteinene. Eukaryotiske genomer inneholder fra ett (*Saccharomyces cerevisiae*) til åtte gener (*Arabidopsis thaliana*) som koder for PP1 isoformer. Mer enn 70 % av aminosyrene i de sentrale delene av disse isoformene er uforandret, sekvensene på N- og C-terminal ende viser en større grad av divergens. Pattedyr har tre PP1 gener som koder for isoformene PP1 $\alpha$ , PP1 $\gamma$  og PP1 $\beta/\delta$ . To spleisevarianter kan bli generert fra PP1 $\gamma$ -genet, PP1 $\gamma_1$  og PP1 $\gamma_2$ . Det kan dermed dannes fire forskjellige isoformer av PP1 fra de tre genene. Med unntak av at PP1 $\gamma_2$  er anrikt i testiklene er de mammalske isoformene jevnt fordelt (Ceulemans & Bollen, 2004).

PP1 er en serin/threonin proteinfosfatase hos eukaryoter som regulerer et stort mangfold cellulære funksjoner gjennom interaksjoner med den katalytiske subenheten og ulike regulatoriske subenheter (Cohen, 2002b). Slike ulike interaksjoner kan gi opphav til en stor variasjon av holoenzymmer (1:1 forhold mellom katalytisk subenhet og regulatorisk subenhet). En del av subenhetene er vist å være direkte PP1-regulatorer, mens andre antas å være substrater (Ceulemans & Bollen, 2004). De forskjellige regulatoriske subenhetene fungerer som aktivitetsmodulatorer ved å fremme interaksjon med andre subenheter (Bollen,

2001). Hormoner, vekstfaktorer og metabolitter kan påvirke PP1 funksjonelt ved å modulere interaksjonen(-e) mellom subenhetene (Bollen, 2001).

Den funksjonelle betydningen til proteinfosfatasen er stor. Gjennom interaksjoner med ulike regulatorer medvirker enzymkomplekset til reduksjon av det intracellulære energiforbruket ved å fremme resirkulering av spesifikke proteiner og ved å returnere cellen til basaltilstand. PP1 har vist å være medvirkende til energilagring, i form av glykogen. I tillegg er det funnet at PP1 kan reversere translasjonelle kontrollmekanismer induert av ulike former for stress, inaktivere spesifikke transkripsjonsfaktorer og fremme resirkulering av transkripsjons- og spleisefaktorer. PP1 er også involvert i nedregulering av muskelkontraksjon, nedregulering av aktiviteten til ATP-konsumerende ionepumper og transportører og indusering av apoptose ved omfattende celledskader, samt involvert i reguleringen av celle-syklus progresjon (Terrak et al., 2004; Ceulemans & Bollen, 2004).

### **PP2A**

PP2A er en svært konservert heterotrimerisk serin/threonin-proteinfosfatase. Det antas at fosfatasen er involvert i en rekke ulike regulatoriske prosesser som cellulær metabolisme, DNA-replikasjon, gentranskripsjon, RNA-spleising, proteinsyntese, celle-syklus kontroll, morfogenese, muskelkontraksjon, utvikling og transformasjon, cytoskjelettorganisering og signaloverføring (Mumby & Walter, 1993; Oliver & Shenolikar, 1998; Zolnierowicz, 2000). PP2A består av en katalytisk (C-) subenhet (36 kDa), en svært homolog strukturell (PR65) subenhet (65 kDa) og en av flere forskjellige regulatoriske subenheter som sørger for substratspesifisiteten, den subcellulære lokalisasjonen og modulering av kompleksets aktivitet. C-subenheten eksisterer sammen med den regulatoriske PR65-subenheten (også kalt A-subenheten) som et konstitutivt kompleks. PR65-subenheten fungerer som et stativ, og dets hovedfunksjon er å rekruttere ytterligere regulatoriske subenheter (B-subenheter). Det er funnet 3 ulike genfamilier som koder for disse regulatoriske subenhetene: PR55 (B-subenhet), PR61 (B'-subenhet) og PR72 (B''-subenhet). Det eksisterer flere isoformer av hver av de tre forskjellige B-subenhetene, og det antas at det eksisterer en ytterligere B-subenhet som hittil ikke er fullstendig identifisert. (Millward et al., 1999; Gimeno-Alcaniz & Sanz, 2003). Den katalytiske subenheten av PP2A er et metalloenzym som kan binde  $Fe^{2+}$  og  $Zn^{2+}$ . (Nishito et al., 1999).

Sammenliknet med andre enzymer utgjør PP2A så mye som 1 % av alle cellulære proteiner, samt hovedandelen av serin/threonin-proteinfosfatase-aktiviteten innen de fleste

celler og vev (Cohen, 1997). Biokjemiske og genetiske studier har avslørt at PP2A er et svært vanlig og jevnt fordelt intracellulært holoenzym-kompleks.

Delesjon av genet som koder for PP2A katalytisk subenhet har vist seg å være dødelig for både gjær (Kinoshita et al., 1996), og mus (Gotz et al., 1998). Det antas at PP2A er delaktig innen regulering av interaksjonen mellom den katalytiske og den regulatoriske subenheten av AMPK-komplekset. Denne mulige reguleringsmåten av AMPK er i tillegg antakelig glukoseavhengig (Gimeno-Alcaniz & Sanz, 2003).

PP2A har vist seg å være et svært ideelt mål for virus pga dets sentrale rolle innen regulering av ulike proteinkinase kaskader. Flere typer virus protein danner komplekser med PP2A og forandrer kompleksets aktivitet eller substratspesifisitet (f. eks SV40 small t antigen) (Millward et al., 1999).

Det er i dag kjent mer enn 30 proteinkinase-aktiviteter som blir regulert av PP2A *in vitro*, og flere av disse proteinkinase danner stabile komplekser med PP2A. Det antas at en del av disse kinasene også må være fysiologiske substrater for PP2A (Millward et al., 1999).

## **PP2C**

Molekylær kloning har vist at PP2C er en separat genfamilie. PP2C har ingen aminosyresekvens homologi med proteinfosfatasene fra PPP-genfamilien, men likheter i den tredimensjonale strukturen kan muligens tyde på en felles katalytisk mekanisme (Das et al., 1996). Det er imidlertid stor spredning i sekvenssammensetning av ulike PP2C-enzymmer fra forskjellige organismer, og dette kan indikere en funksjonell diversitet av denne subklassen. PP2C er den minst karakteriserte av de fire typene serin/threonin-spesifikke proteinfosfataser, og de enzymatiske egenskapene til PP2C skiller det klart fra de øvrige proteinfosfatasene som tilhører PPP-familien. Hittil har alle medlemmene av PP2C-subklassen vist seg å være cytosoliske og løselige proteiner (Klumpp et al., 1998).

PP2C er monomeriske enzymer som er tilstede hos både prokaryoter og eukaryoter, som ikke er utsatt for regulering via inhiberende proteiner eller regulerende subenheter. Det kan imidlertid tyde på at PP2C muligens kan oppnå spesifikke funksjoner gjennom interaksjoner med substrater eller andre signalkomponenter. Et særegent trekk ved PP2C er at det trenger  $Mg^{2+}$  (eller  $Mn^{2+}$ ) for aktivitet (Schweighofer et al., 2004). I motsetning til PP1 og PP2A har fosfatasen vist seg å være resistent ovenfor naturlig proteinfosfatasehemmere, som okadasyre (Cohen, 1989). Mammalsk PP2C eksisterer på hovedisoformene, PP2C $\alpha$  and PP2C $\beta$  (Jackson et al., 2003).

Hos eukaryoter er en av oppgavene til PP2C å reversere virkningen av stressinduserte proteinkinase-kaskader. Nylig ble fosfatasen identifisert til å være en negativ regulator til en mitogen-aktivert proteinkinase (MAPK). Proteinfosfasen kan samarbeide med andre fosfatasyper for defosforylering av kjernekomponenter ved signaltransduksjons-kaskader (Meskiene et al., 2003; Schweighofer et al., 2004). PP2C er også involvert i cellyklusregulering ved å reversere aktiverende fosforyleringer av cyclin-avhengige proteinkinaser (CDKer) hos både gjær og humane celler (Cheng et al., 1999). Det humane PP2C $\gamma$  har i tillegg vist seg å være nødvendig for dannelsen av spleisosomet og det er med på å underbygge at PP2C kan være involvert selve spleisingsprosessen (Murray et al., 1999).

En aktiv, fosforylert form av AMPK kan inaktiveres i celle-frie assays av både PP2A og PP2C, men det ser ut til at PP2C står for det meste av fosfataseaktiviteten detektert hos rottelever-ekstrakter (Moore et al., 1991). Eksperimenter utført i isolerte rottehepatocytter har også vist at det antakeligvis kun er den OA-resistente proteinfosfasen, PP2C, som er ansvarlig for defosforylering av AMPK i intakte celler (Moore et al., 1991).

## Fosfatasehemmere

Mange naturlig forekommende giftstoffer er proteinfosfatase-hemmere som utøver en toksisk effekt gjennom overfosforylering av cellulære proteiner. Disse giftstoffene har vist seg å kunne hemme PP1 eller PP2A med forskjellig potens. Sammenlikning av effektene til de ulike giftstoffene på en bestemt prosess, kan gi svar på hvilken av de to ovennevnte proteinfosfasene som mest sannsynlig må være involvert (Larsen et al., 2002).

Ved å skaffe bedre kunnskap om struktur og bindingsfunksjoner til både PP1 og PP2A kan det oppnås bedre forståelse av mange PP1- og PP2A-involverende signaloverføringsmekanismer. Okadasyre-klassen av naturlig forekommende giftstoffer er en svært variert gruppe med fosfatasehemmere. Fellesnevneren for alle er at de er potente hemmere av PP1 og PP2A, og noen av dem har også vist seg å kunne påvirke PP4, PP5 og PP2B (calcineurin). Som tidligere nevnt blir imidlertid ikke PP2C påvirket i det hele tatt. Okadasyre-klassen er videre delt inn i forskjellige grupper, først og fremst på bakgrunn av struktur. To beslektede sykliske peptidtoksiner, mikrocystiner og nodulariner, utgjør gruppen av *sykliske peptider*. Cantharidin er en representant for gruppen *terpenoider*, mens okadasyre, calyculiner og tautomycin tilhører *polyketid*-gruppen. Polyketidene og terpenoidene er celle-permeable, mens de sykliske peptidene ikke har denne egenskapen. Calyculin, OA og

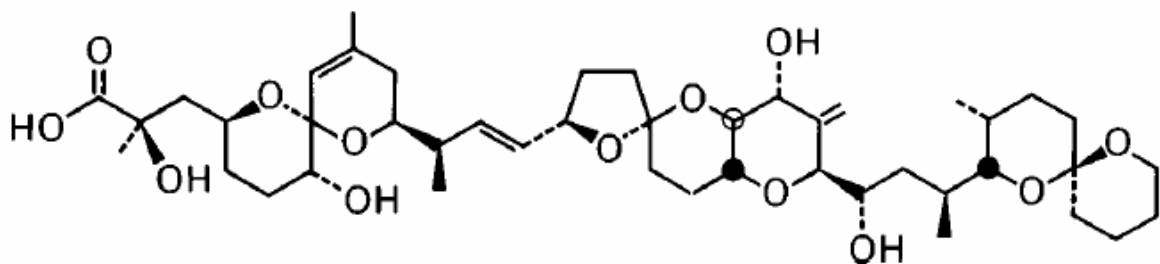


mikrocystin har vist seg å være tumor-promotorer, og er viktige innenfor kreftforskningen (Fujiki et al., 1989; Sheppeck et al., 1997).

Alle medlemmene av okadasyre-klassen kan binde seg direkte til den katalytiske subenheten av PP1 og PP2A. På tross av de strukturelle forskjellene er disse forbindelsene konkurrerende hemmere på grunn av at deres PP1/PP2A-bindende seter overlapper med hverandre (Fujiki & Suganuma, 1993; Gauss et al., 1997). PP1 og PP2A vil hemmes med ulik intensitet av de forskjellige okadasyre-klasse medlemmene. Okadasyre har vist seg å være en mye mer potent hemmer av PP2A enn av PP1. Mikrocystin-LR er også en sterkere hemmer av PP2A, og kan binde seg spesifikt til denne proteinfosfatasen intracellulært. Calyculin A, cantharidin og tautomycin har derimot vist seg å være en mer potente PP1-hemmere i intakte celler (Pugazhenthil et al., 1993; Toivola et al., 1994; Erdodi et al., 1995; Sheppeck et al., 1997).

Det er funnet at okadasyre-klassen av forbindelser fremmer utvikling av svulster i flere organer induisert av tre forskjellige tumor-initiatorer. En slik måte å utvikle kreft på involverer hemming av PP1 og PP2A, og avviker mye fra den klassiske TPA-veien (Fujiki & Suganuma, 1999). Den strukturelt varierte okadasyre-klassen av giftstoffer er også vist å kunne hemme defosforylering av dopamin- og cAMP-regulert fosfoprotein (DARPP), som fungerer som en molekylær bryter. Hemming av DARPP innebærer at utallige normale signalveier ikke fungerer som de skal.

### Okadasyre



**Figur 9. Strukturformelen til okadasyre** (fra Fujiki & Suganuma, 1999).

Okadasyre (OA) er en kompleks fettsyre-polyketal (polyetherderivat av en 38-karbon fettsyre), som produseres av marine dinoflagellater og akkumuleres i fordøyelseskanalen til filteretende organismer som skalldyr og marine svamper (Cohen & Cohen, 1989; Schonthal,

1998). Opprinnelig ble toksinet isolert fra en sort svamp, *Halichondria okadai*, og fikk derav navnet okadasyre (Suganuma et al., 1988).

Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) er en OA-indusert forgiftning, som i årrekker har påført mennesker smerte og ubehag hovedsakelig etter inntak av blåskjell og skalldyr. Symptomene ved DSP er knyttet til fordøyelseskanalen, og kan være diarè, kvalme, oppkast og magesmerter. (Suganuma et al., 1988). Nyere undersøkelser og forsøk har vist at lipid-nedbrytning kan være svært viktig for å eliminere OA fra blåskjell (*Mytilus edulis*). Det er antakelig slik at OA har en affinitet for lipid-rike cellulære og intracellulære komponenter som membraner og fettdråper. I fordøyelseskjertlene er det et relativt høyt lipidinnhold, og det ble observert at OA-nivået og lipidinnholdet i fordøyelseskjertlene korrelerte med hverandre. En slik korrelasjon indikerer at nedbrytning av lipidlagre kan påvirke frigjøring og eliminering av det lipofile toksinet. En slik nedbrytning forventes å skje under stressede situasjoner hvor energiforbruket overgår energitilførselen. (Svensson & Forlin, 2004).

OAs eneste hittil identifiserte cellulære substrater er enkelte medlemmer av serin/threonin proteinfosfatase-familien. Ved å binde seg til den katalytiske subenheten hemmer OA den enzymatiske aktiviteten (Bialojan & Takai, 1988).

Cellulære effekter som blir observert i sammenheng med lave OA-konsentrasjoner bidrar ofte til hemming av PP2A, siden denne fosfatasen blir hemmet av svært lave (~0,1 nM) konsentrasjoner av giftstoffet. PP1 hemmes ved høyere OA-konsentrasjon (~10 nM), og inhiberingen av denne fosfatasen er mindre potent. Det er imidlertid viktig å være klar over at mindre vanlige proteinfosfataser, som PP4, PP5 og PP6, også vil hemmes av lave OA-konsentrasjoner (< 2 nM) (Bialojan & Takai., 1988; MacKintosh et al., 1990; Schonthal, 1998). Det har blitt vist at proteinfosfatasenes OA-bindingssete er forskjellig fra de respektive proteinfosfatasenes substratbindingssete, og at OA funksjonelt kan hemme PP1 og PP2A på en ikke-konkurrerende måte (Bialojan & Takai., 1988). Hittil har det blitt karakterisert minst 16 OA-derivater, og to av dem er identifisert som potente proteinfosfatase-hemmere (dinophysistoxin-1 og acanthifolicin) (Fujiki & Suganuma, 1993).

Det er ikke funnet noen direkte effekt av OA på noen proteinkinase, men det utelukker ikke at giftstoffet kan ha indirekte regulatoriske effekter på proteinkinaser. Når OA har blitt addert til intakte celler har det forårsaket en forandring i fosforyleringstilstanden til en rekke cellulære proteiner (Schonthal, 1995). Det er hittil blitt rapportert om 74 proteiner som har utvist en forandring i fosforyleringsgrad etter OA-eksponering av humane fibroblaster (Guy et al., 1992).

OA er en hydrofob forbindelse og kan entre celler på bakgrunn av denne egenskapen. Gjennomtrengeligheten til OA over cellemembran er imidlertid relativt dårlig. Det har blitt estimert at OA penetrerer cellemembranen omtrent 100 ganger mindre potent sammenliknet med calyculin A (Favre et al., 1997). OA har derimot vist seg å fritt penetrere lipidmembranen til multilagsvesikler i væske-krystallinsk tilstand. Denne observasjonen kan indikere at OA har tilgang på reseptorer i cytosol eller cellemembranen. Det spekuleres i om disse reseptorene muligens er proteinfosfataser, siden de cellulært kan befinne seg på begge disse stedene (Nam et al., 1990).

Når OA entrer rotte-hepatocytter i kultur har dette medført en morfologi-ændring. Cellene har blitt mer opprandede og mistet celle-celle-kontakter, i tillegg til kontakt med matriks. Ved rottehepatocyt-forsøk er det vist at OA kan indusere overfosforylering av cytoskjelett-proteiner som plektin og keratin. Overfosforylering av disse viktige proteinene medførte fragmentering, aggregering og påfølgende ødeleggelse av den intracellulære cytoskjelett-strukturen (Blankson et al., 1995; Blankson et al., 2000; Larsen et al., 2002). Det var kun de intermediære filamentene som ble utsatt for en OA-sensitiv overfosforylering. Mikrotubuli og aktinfilamentene ble kun påvirket i ubetydelig grad (Blankson et al., 1995). OA-konsentrasjonen (30 nM) som medførte overfosforylering av intermediærkomponentene, ble derimot ikke funnet å ha noen effekt på det intracellulære ATP-nivået eller celleoverlevelsen. Den observerte effekten på proteinsyntese var også veldig liten (Holen et al., 1993). Ved høyere OA-konsentrasjoner ble de morfologiske effektene større og resulterte i utposninger av celleoverflaten (blebbing) og en omarrangering av organellene intracellulært (Falconer & Yeung, 1992).

Algegiften OA er også involvert i hemming av hepatocytisk autofagi, og har vist å kunne hemme autofagisk sekvestrering fullstendig. Trolig er denne hemmingen indirekte relatert til ødeleggelsen av det intermediære cytoskjelettet, siden intakte intermediær-filamenter antakeligvis er nødvendige for sekvestreringsprosessen (Holen et al., 1992; Blankson et al., 1995). OA kan også hemme endocytose-veien. Forsøk har vist at reseptor-mediert opptak til en viss grad ble hemmet av giftstoffet og det antas at hemmingen skyldes at endocytosen er avhengig av et intakt cytoskjelett eller at den totale endosomale apparatet ble redusert i størrelse (Gordon et al., 1995).

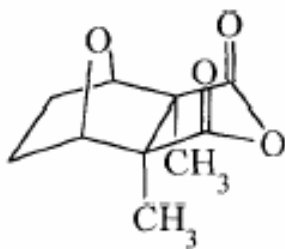
Ved forsøk med rottehepatocytter har OA induisert programmert celledød eller apoptose. De morfologiske effektene av giftstoffet er svært karakteristiske for apoptose. Slike trekk involverer kromatin-kondensering, overflateutposninger og tap av cytosolisk innhold til omgivelsene, omfordeling av organeller og sammentrykking av dem, dannelse av

cytoplasmiske vakuoler og hypersammenrulling av kjernemembranen. Hos noen celler ble det også funnet kjernefragmentering. (Boe et al., 1991; Blankson et al., 2000).

En av proteinkinase som er utsatt for OA-indusert aktivering er AMP-aktivert proteinkinase (AMPK). Aktiveringen er indirekte og involverer sannsynligvis hemming av PP2A. Aktivering av AMPK-komplekset er svært viktig for energi-konservering og celleoverlevelse (Larsen et al., 2002). Det cytosoliske enzymet, glycine N-metyltransferase, blir også utsatt for overfosforylering etter en OA-indusert aktivering. Enzymet er involvert i metylering av glycine til sarcosine, og bruker S-adenosylmethionine som donor av metylgruppen (Møller et al., 2003).

OA har i tillegg vist seg å ha effekter under celledelingsprosessen ved å medføre for tidlig separasjon av søsterkromatidene under meiosen, i tillegg til aneuploiditet hos muse-oocytter (Mailhes et al., 2003). Giftstoffet har også blitt rapportert å føre til fragmentering i trans-Golgi nettverket (TGN) (Horn & Banting, 1994).

### **Cantharidin (2,3-dimethylendothall anhydride)**



**Cantharidin**

**Figur 10. Strukturformelen til cantharidin** (fra Honkanen, 1993).

Cantharidin er et giftstoff som produseres av biller som tilhører familien *Meloidae*. Det eksisterer totalt over 1500 arter av forskjellige cantharidin-produserende biller, og de fleste av disse artene lever sørøst i USA (Till & Majmudar, 1981). Toksinet er i utgangspunktet en del av det naturlige forsvarssystemet til disse billene, men har en lang historie både innen alternativ og tradisjonell medisin. I de senere årene har cantharidin først og fremst blitt benyttet til behandling av vorter og lignende hudplage forårsaket av virus. (Moed et al., 2001). Cantharidin og hydrolyseproduktet, cantharidinsyre, er strukturelt svært like de kommersielle plantegiftene, endothall og endothall thioanhydride (Knapp et al., 1998). Cantharidin kan være tilgjengelig i vesentlige mengder på bakgrunn av at giftstoffet kan

produseres gjennom bakteriell gjæring, og ikke er avhengig av begrenset tilgang fra naturlige kilder (Shepcke et al., 1997).

Ved hudkontakt absorberes giftstoffet og medfører en aktivering av serin proteaser som ender med intraepidermal blemmedannelse (Moed et al., 2001). Ved svelging er det en stor fare for å miste det funksjonelt viktige slimlaget som dekker deler av fordøyelseskanalen (Oaks et al., 1960).

Cantharidin har ved forsøk vist å kunne inducere økt kontraksjonskraft av glatt hjerte- og blodkarmuskulatur og øke fosforyleringen av regulatoriske proteiner tilknyttet disse muskelfibertypene (Knapp et al., 1998). Det antas også at cantharidin kan ha en viktig funksjon innen cellesyklus-progresjon siden både PP1 og PP2A er involvert i cellesyklus-hemming. Tilsvarende som for okadasyre er cantharidin funnet å inducere overfosforylering av AMPK og cytoskjelettproteinet plektin samt virke hemmende på autofagi (Holen et al., 1993; Larsen et al., 2001; Samari et al., 2005).

På tross av at cantharidin svært skadelig, er den mindre toksisk enn OA, mikrocystin-LR og calyculin A. De sistnevnte toksinene er hittil blitt funnet å være for giftige for klinisk bruk (Sakoff et al., 2002). For fremtiden vil det være interessant å se om det er mulig å utvikle mindre skadelige derivater av cantharidin. Slike mindre potensielt skadelige cantharidin-derivater kan være viktige innenfor behandling av pasienter med for eksempel hjertefeil (Moed, 2001).

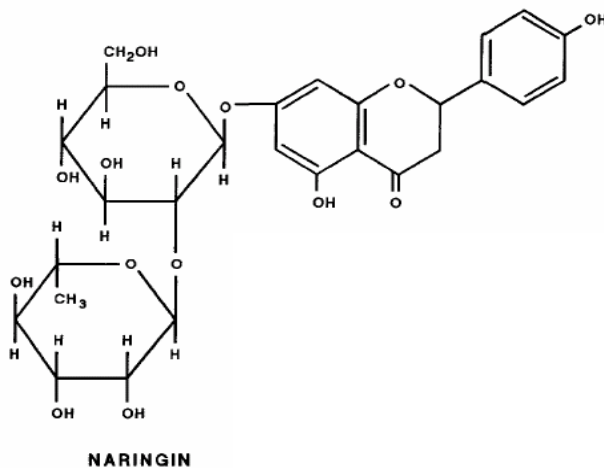
## **Naringin**

Flavonoider er polyfenoliske antioksidanter som finnes overalt i planteriket og er vanlige komponenter i vår egen diett. De finnes naturlig forekommende i grønnsaker, frukt, nøtter og i drikker som te og vin (Hertog et al., 1993; Galati & O'Brien, 2004). Innen plantene blir de lokalisert i thylakoidmembraner i fotosyntetiserende celler, og antas å være involvert i fotosyntesen. Etter hvert som plantene dør vil flavonoidene frigjøres til andre deler av planten, som plantesaft og røtter. Planteflavonoider er difenylpropan-derivater som har en stor spennvidde av biokjemiske og farmakologiske effekter (Skibola & Smith, 2000).

Flavonoler, proanthocyanidiner, isoflavonoider, flavoner og flavanoner er blant hovedgruppene av flavonoider som inngår i kostholdet vårt (Skibola & Smith, 2000). Naringin er et glykosidisk flavanon (Gordon et al., 1995).

Flavonoidene utviser en svært stor strukturell diversitet, og hittil har mer enn 4000 forskjellige flavonoider blitt identifisert fra ulike planter. De har vist seg å ha strukturavhengige og svært spesifikke effekter på en mengde enzymer, og er derfor i stand til å interferere med et stort antall cellulære prosesser, inkludert vekst og differensiering (Brandi, 1992). De mange effektene flavonoidene står for kan skyldes at de har en stor strukturell likhet med ATP, og derfor kan tenkes å konkurrere med ATP om et bindingsseter på enzymer (Graziani et al, 1983). Selve spesifisiteten til flavonoidene blir først og fremst bestemt av den tre-dimensjonale strukturen til de intakte holoenzymene (Gordon et al., 1995).

Naringin (naringenin-7-hesperidoside) er et citrus-flavonoid som finnes i grapefrukt, der det er ansvarlig for grapefruktens karakteristiske bitre smak. På samme måte som de fleste andre flavonoider, har naringin metall-chelaterende (Jung et al., 1983) og betennelsesdempende (Robak & Gryglewski, 1996) egenskaper. Naringin kan i tillegg virke senkende på kolesterolnivået i blod og lever (Shin et al., 1999). Det er også blitt vist at naringin kan redusere og virke beskyttende mot stråle-indusert ødeleggelse av DNA. Dette skyldes trolig at naringin kan ta opp frie radikaler (Russo et al., 2000; Jagetia et al., 2003). Det er tidligere også blitt rapportert at naringin kan virke beskyttende mot lipid-peroksidasjon (Maridonneau-Parini et al., 1986).



**Figur 11. Strukturformelen til naringin** (fra Gordon et al., 1995).

Flere flavonoider har vist seg å fungere som antagonister mot fosfatasehemmeren okadasyre i isolerte rottehepatocytter. Naringin har vist seg å fungere som den mest potente av dem, og har forhindre okadasyre-indusert inhibering av endogent, lysosomal proteindegradering ved autofagi. Hittil er den eneste kjente mekanismen til okadasyre, at den medfører overfosforylering av flere cellulære proteiner. Det tyder på at flavonoidenes

antagonistiske virkning ovenfor en fosfatasehemmer som okadasyre er et resultat av at de kan fungere som proteinkinase-inhibitorer. Hittil har det ikke blitt demonstrert at naringin har noen slik direkte proteinkinase-inhibitorisk effekt, men det er derimot blitt vist at andre flavonoider kan inhibere en rekke forskjellige proteinkinaser (Gordon et al., 1995). Naringin har på tilsvarende måte også vist seg å kunne antagonisere virkningen til proteinfosfatasehemmeren mikrocystin-LR (Larsen et al., 2002). Flavonoidet er ikke vist å ha noen direkte effekt på proteinfosfatase 2A, verken basalt eller under okadasyre-hemmende celle-frie omstendigheter. Dette underbygger at naringin mest sannsynligvis må virke fosforylerings-hemmende i stedet for å fremme en eventuell defosforylering (Blankson et al., 2000).

Blant strukturtrekk av flavonoidmolekyler som er nødvendig for okadasyre-antagonisme, kan det se ut som om glykosylering er spesielt viktig, spesielt ved å forhindre inhibering av autofagi. Det har vist seg at andre ikke-glykosylerte flavonoider ikke var i stand til å reversere autofagi-inhiberingen induisert av okadasyre på en like potent måte. Glykosylering i 7-posisjonen av flavonoid-molekyler var tilsynelatende mest effektivt, men glykosylering i 3-posisjonen viste seg også å virke antagonistisk (Gordon et al., 1995).

Naringin har vist seg å kunne forhindre toksin-indusert ødeleggelse av cytoskjelettet og apoptotisk celledød hos rottehepatocytter. I tillegg er det påvist at den beskyttende effekten til naringin tilsynelatende kun ser ut til å gjelde normale hepatocytter, og ikke hepatoceller. Humane kreftceller ble heller ikke beskyttet mot en slik toksin-indusert apoptose, (Blankson et al., 2000) på denne måten er naringin interessant både som et potensielt kjemoterapeutisk stoff, og som et verktøy for å studere mekanismene som trer i kraft ved toksin-indusert celledød (Larsen et al., 2002). Generelt kan naringin og andre okadasyre-antagonistiske flavonoider være svært nyttige i studier av intracellulær proteinfosforylering (Gordon et al., 1995).

En viktig generell egenskap ved flavonoider er at de på redusert form kan fungere som antioksidanter, mens de på oksidert form kan inneha pro-oksidante egenskaper. Det er vist at flavonoider kan beskytte DNA mot oksidative skader. I tillegg er det vist at de kan virke antikarsinogent. Flavonoider kan antakeligvis interferere med flere av trinnene som fører frem til utviklingen av malignante tumorer. Forsøk har vist at flavonoider kan inhibere viktige enzymer som er nødvendige for å fremme/initiere en karsinogenese (fase I karsinogen-metaboliserende enzymer, oksygen radikal-dannende enzymer). Flavonoidene kunne også inhibere enzymer involvert i DNA-syntese eller proliferativ signaltransduksjon, og muligens forhindre tumor-dannelse ved å indusere apoptose av tumorcellene. På denne måten kan

flavonoider muligens benyttes kjemoterapeutisk for behandling av kreft, men forut for dette må toksisiteten av disse forbindelsene være grundig uttestet (Galati & O'Brien, 2004).

Den antikarsinogene virkningen til flavonoider er dermed først og fremst et resultat av at de kan inhibere et vidt spekter av enzymer. Blant disse enzymene er det identifisert funksjonelt forskjellige enzymer som proteinkinase C (Komori et al., 1993), tyrosin proteinkinase (Akiyama et al., 1987), topoisomerase II (Austin et al., 1992), cAMP-aktivert proteinkinase (Jinsart et al., 1992) og myosin-lettkjede kinase (Jinsart et al., 1991).

Det er imidlertid sterke indikasjoner på at flavonoid-inntak i høye doser kan virke mutagent. Pro-oksidant-egenskapene kan generere frie radikaler og det kan medføre inhibering av nøkkelenzymer som er involvert i hormonmetabolismen. Et ufødt foster vil være spesielt utsatt for en slik risiko, da flavonoider uten hindringer kan krysse placenta. Hittil er det muligens slik at de negative konsekvensene ved inntak av flavonoider, i høye doser, er større enn fordelene (Skibola & Smith, 2000).

## **Autofagi**

Hos mammalske celler kan autofagi deles inn i tre hovedformer: makroautofagi, mikroautofagi og chaperon-mediert autofagi. I mikroautofagi er det den lysosomale membranen som innbuktes for opptak av cytosoliske substrater. Chaperon-mediert autofagi translokerer løselige cytosoliske proteiner inn i lysosomlumen via reseptorer på den lysosomale membranen (Cuervo, 2004). Alt tyder på at det er makroautofagien som spiller den største rollen innefor intracellulær degradering, og den vil dermed bli omtalt og beskrevet nedenfor synonymt med autofagi. Autofagi er utledet fra de to greske ordene, "auto" og "phagos", og direkte oversatt blir betydningen "selvspising" (Levine & Klionsky, 2004).

Autofagi er en av hovedmekanismene for degradering av intracellulære makromolekyler og organeller. Generelt står cellens proteasomer (ubiquitin-proteasom systemer) for den selektive nedbrytningen av proteiner med kort levetid. Proteiner med lang levetid blir derimot nedbrutt i lysosomer ved hjelp av autofagi (Yoshimori, 2004). Mer enn 90 % av proteinene i en celle har lang halveringstid, og en forandring i degraderingsraten av disse proteinene kan dramatisk forandre cellens proteinmasse. Autofagi er svært viktig for opprettholdelsen av en normal cellulær homøostase, proliferasjon og proteinmetabolisme, i tillegg til å stå bak resirkulering av komponenter som inngår i cytoplasma (Strømhaug et al., 1998; Meijer & Codogno, 2004; Gozuacik & Kimchi, 2004). I tillegg antas det at autofagi er



en viktig prosess for funksjoner som cellulær differensiering, vevs-remodellering og forsvar av cellen under nye miljøbetingelser, anti-aldningsmekanismer og det medfødte immunsystemet (Cuervo, 2004; Gozuacik & Kimchi, 2004; Levine & Klionsky, 2004). Oppsummert er autofagisk nedbrytning hensiktsmessig på minst tre hovedområder; 1) remodellering under utvikling og differensiering, 2) produksjon av aminosyrer (fettsyrer og nukleotider) ved dårlige næringsforhold, 3) eliminering av uønskede eller ødelagte organeller og/eller molekyler. Den sistnevnte er svært viktig under det voksne livsløp (Meijer & Codogno, 2004).

Autofagi finner sted som en cellulær respons både til ulike intracellulære (feilfunksjonelle proteiner, organelleoverskudd, deformerte organeller) og ekstracellulære (næringsunderskudd, hypoksi, varmesjokk) stressituasjoner (Levine & Klionsky, 2004). I tillegg kan autofagisk nedbrytning forsterkes etter hormonell stimulering eller etter behandling med ulike medikamenter (Kabeya et al., 2000). Det direkte utbyttet fra autofagisk nedbrytning kan være en fullstendig og irreversibel dissosiering av substratet til dets essensielle bestanddeler. Nedbrytning av intracellulære makromolekyler er som nevnt en viktig energikilde når næringstilgangen er lav, og kan hjelpe cellen med å overleve. Autofagi har vist seg å være konstitutiv hos alle celler som innehar intracellulære lysosomer (Meijer & Codogno, 2004), og er funnet å være tilstede i omtrent alle eukaryote celler, fra gjær til pattedyrceller (Levine & Klionsky, 2004). På tross av at mekanismene bak den autofagiske nedbrytningen varierer mellom de ulike celletypene, er autofagien i seg selv en svært konservert prosess (Cuervo, 2004).

Degraderingen som foregår ved autofagi er i hovedsak uspesifikk, som vist blant annet ved at sekvestringsraten for syv ulike cytosoliske proteiner med varierende halveringstider var svært like (Kopitz et al., 1990). Det har imidlertid blitt observert selektiv sekvestring av organeller under ulike patologiske- og/eller stressforhold (Meijer & Codogno, 2004).

### ***Den autofagisk-lysosomale veien***

Ultrastrukturelle studier har vist at autofagi består av en serie med påfølgende trinn, som ofte betegnes den autofagisk-lysosomale veien (Seglen et al., 1990).

I første trinn av denne prosessen blir en del av cellens cytoplasma og organeller omsluttet av en sekvestrerende membran, cisterne. Opphavet til denne membranen er det foreløpig ikke entydig sikkerhet omkring. Den er muligens et resultat av de novo syntese eller gjenbruk av allerede eksisterende membraner (Klionsky, 2004). Dersom den sekvestrerende membranen har sitt opphav fra eksisterende membraner, er både endoplasmatiske reticulum

(ER) og Golgi-apparatet mulige kandidater. Det er funnet enzymmarkører for både ER (Dunn, 1990) og Golgi-apparatet. (Locke & Sykes, 1975). Andre motstridende forsøk har ikke funnet slike organelle-spesifikke enzymmarkører, og underbygger heller at membranen kan representere en unik organelle. Den sekvestrerende membranen har fått betegnelsen fagofor. Det er det blitt vist at fagofor membranene er svært lipid-rike, proteinfattige og innehar et høyt innhold av umettede fettsyrer (Reunanen et al., 1985; Strømhaug et al., 1998).

Sekvestreringsprosessen ender med dannelsen av en membranomsluttet organelle, autofagosomet. Autofagosomet kan være omgitt av doble eller multiple membranlag. Analyser har vist at omtrent 85 % var omgitt av en dobbelmembran (en enkelt cisterne), mens 10-15 % var omgitt av multiple membranlag (flere cisterner). De kuleformede autofagosomene er omtrent 1  $\mu\text{m}$  (vanligvis mellom 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ ) i diameter, og har relativt kort levetid ( $t_{1/2}$  er ca åtte minutter) sammenlignet med andre organeller. Membranegenskapene til denne vakuolen ligner fagoforens: de er proteinfattige, lipidrike og med et høyt innhold av umettede fettsyrer. Det ble heller ikke identifisert noen forskjeller mellom den indre eller ytre membransiden av den avgrensede cisternen (Fengsrud et al., 2004; Yoshimori, 2004). Innholdet i autofagosomene er vanligvis normalt cytoplasma. Analyser av rottehepatocyt-autofagosomer har vist at kjerner normalt ikke var tilstede, mens ~30 % inneholdt mitokondrier, ~70 % inneholdt ER og ~4 % inneholdt peroksisomer, i tillegg ble det funnet den vanlige andelen med endogene enzymer (Strømhaug et al., 1998). Cytoskjelett-proteiner (keratin, aktin, tubulin og plektin) var imidlertid tilstede i svært lave mengder hos rensede autofagosomer. Det spekuleres i om dette kan skyldes at disse proteinene befinner seg på yttersiden av fagoforen og er aktive under sekvestreringsprosessen og i dannelsen av autofagosomet (Strømhaug et al., 1998).

Mammalsk microtubulus-assosiert protein 1 (MAP1) lettkjede 3 (LC3), er en homolog til Atg8 (essensiell for autofagi hos gjær). LC3 kan eksistere i to former; LC3-I og LC3-II. LC3-II er bundet som et perifert membranprotein på autofagosomets ytre og indre membranside, i motsetning til LC3-I som er cytosolisk. LC3-II blir benyttet som en autofagosomal markør hos mammalske celler, og har blitt brukt for studier av autofagi i neurodegenerative og neuromuskulære sykdommer, kreftsvulster og bakterielle og viruelle infeksjoner (Kabeya et al., 2000, Tanida et al., 2004). I tillegg er det identifisert en rekke andre proteiner assosiert med autofagosommembraner. Dette er hovedsakelig membranbindende isoformer av vanlige cytoplasmiske enzymer. Tre proteiner ble funnet å være spesielt høyt anriket i autofagosomfraksjoner fra isolerte rottehepatocytter. Disse proteinene er en isoform av argininosuccinate synthase (ASS), en N-trunkert variant av

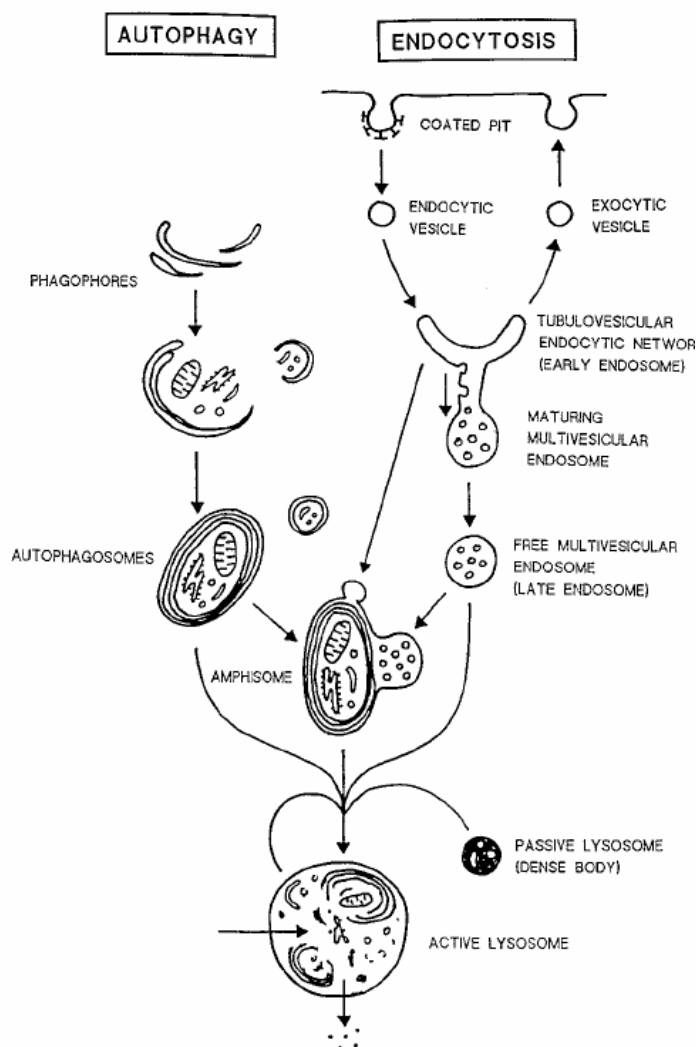
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) og en sekvensvariant av kort-kjede 2-enoyl-CoA hydratase (SCEH) (Fengsrud et al., 2000b). Senere studier har identifisert ~ 40 proteiner som har hatt en 25x så stor anrikning i autofagosomale membraner relativt til resten av cellen. Fire av disse proteinene (betain:homocystein metyltransferase (BHMT), metionin adenosyltransferase (MAT), catechol o-metyltransferase (COMT), uorganisk pyrofosfatase (iPP)) er varianter av enzymer som inngår i metyl-metabolismen, og indikerer at membran-metylering kan ha en rolle innen autofagi-regulering. Et annet høyt anrikt protein var fosfatidyletanolamin bindingsprotein, vanligvis involvert i lipidforankring (Øverby, upubliserte resultater).

Autofagosomene vil kunne fusjonere med tidlige eller sene endosomer (fra endocytose-veien). Disse hybrid organellene betegnes amfisomer, og kan også beskrives som prelysosomale vakuoler. At autofagosomer kan fusjonere med både tidlige og sene endosomer, ble bekreftet da det ble funnet at amfisomer ved rensing og isoleringsforsøk inneholdt karakteriske proteinmarkører for både tidlige og sene endosomer (asialoglykoproteinreseptor, tidlig endosom-assosiert protein 1, og kation-uavhengig mannose 6-fosfatase reseptor). Amfisomene er vanligvis omgitt av en enkelt membran, men det forekommer også at membranen er delvis eller helt dobbel (Berg et al., 1998). Fusjonering kan finne sted mellom multiple autofagosomer og endosomer, og dette kan gi opphav til svært komplekse amfisomer. Etter endt fusjon diffunderer transmembranproteinene fra endosompartneren ut på overflaten av amfisom-membranen, hvor de fordeler seg jevnt utover (Fengsrud et al., 2000a). Amfisomer mangler lysosomale markørenzymer (sur fosfatase og kathepsin B) og lysosomale membranproteiner, men det er vist at det cytoplasmatiske innholdet til en viss grad er denaturert (Berg et al., 1998). Amfisomene har et surt indre miljø (Strømhaug & Seglen, 1993). Dette er et resultat av at protonpumper eller ATPaser kontinuerlig pumper  $H^+$ -ioner inn i lumen. Protonpumpene har sitt opphav i den endosomale fusjonspartneren (Dunn, 1990). Hos isolerte rottehepatocytter har ultrastrukturelle studier vist at ca 80 % av de autofagosomale fusjonene inkluderte endosomer, mens 20 % representerte en direkte autofagosom-lysosom fusjon (Liou et al., 1997). Ut fra dette kan det antas at en amfisomal vei er predominant, men ikke nødvendigvis obligatorisk.

Amfisomet vil deretter levere innholdet sitt til et lysosom med en mer sur indre pH-verdi. Et surt indre miljø sammen med tilstedeværelse av lysosomale hydrolaser er essensielt for at en effektiv degradering skal kunne finne sted. Det antas at disse lysosomale enzymene tilegnes de autofagiske organellene via fusjon med allerede eksisterende lysosomer (Ericsson et al., 1969). Lysosomene kan fusjonere med både endosomer, autofagosomer og amfisomer

(Berg et al., 1998). Undersøkelser har vist at de samme lysosomene som er ansvarlig for nedbrytning og degradering ved autofagi, på samme tid også er virksomme i endocytosen (Fengsrud et al., 1995).

Lysosomene inneholder rundt 40 ulike hydrolytiske enzymer for mest mulig kontrollert intracellulær nedbrytning. Disse enzymene inkluderer blant annet proteaser, nukleaser, glykosidaser, lipaser, fosfolipaser, fosfataser og sulfataser. Alle hydrolasene trenger et surt miljø for optimal aktivitet. De fleste lysosomale membranproteinene er svært glykosylerte, noe som virker beskyttende mot de lysosomale proteasene i lumen (Alberts et al., 2002b).



**Figur 12.** Autofagiveien og endocytosen har tydelig interaksjon med hverandre (Berg et al., 1998).

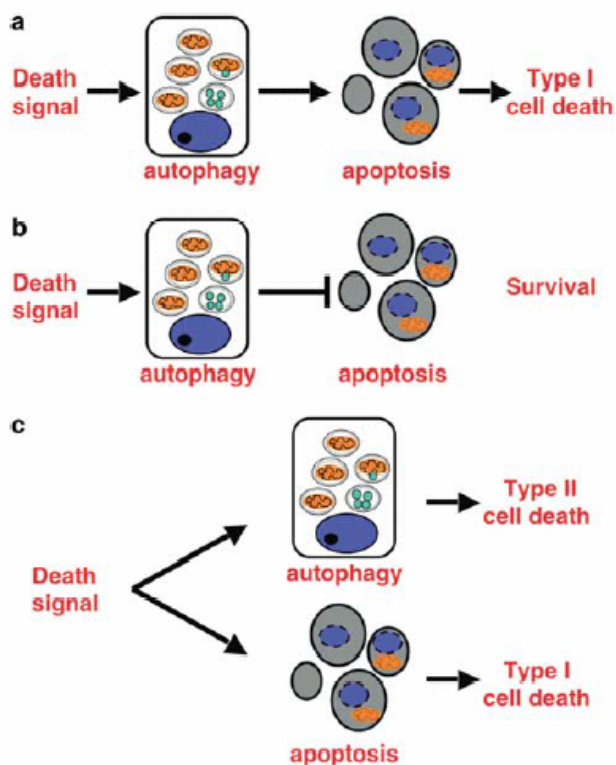
Forstyrrelser av normal autofagisk degradering eller mangel på viktige gener involvert i autofagien kan føre til alvorlige sykdommer som myopati, neurodegenerative sykdommer

eller kreft (Meijer & Codogno, 2004). Kreftutvikling finner sted ved genetiske dereguleringer av molekulære veier som kontrollerer proliferasjon og/eller programmert celledød. Autofagi er også viktig som en sikkerhetsmekanisme som begrenser ukontrollert cellevekst. Nedregulering av autofagisk aktivitet i ondartede kreftceller kan indikere at feil ved den normale autofagi-prosessen er medvirkende for videre kreftutvikling. En annen observasjon som støtter en relasjon mellom kreft og autofagi, er at noen ondartede kreftcelletyper responderer på antikreft-medikamenter ved å utløse autofagi (Gozuacik & Kimchi, 2004).

### ***Autofagi – livsnødvendig eller dødelig?***

Autofagi er en prosess hvor autofagiske vesikler med innhold brytes ned av cellens eget lysosomale nedbrytningssystem (som beskrevet ovenfor). I noen systemer er det imidlertid vist at det totale volumet av autofagiske vakuoler og kompakte legemer (dense bodies) kan dominere intracellulært (Clarke, 1990). Ved en så stor autofagisk aktivitet, vil cellen være i stand til degradere et stort omfang av cytosol og organeller, noe som fører til total kollaps av de cellulære funksjonene og til en irreversibel type av cellulær atrofi. En slik omfattende autofagisk aktivitet fører til celledød, en alternativ form for kaspase-uavhengig programmert celledød (type II celledød eller autofagisk celledød). Siden kaspaser ikke blir aktivert ved denne type celledød er det ingen nevneverdig DNA-degradering, mens cellulær fragmentering er fraværende. Ved denne ekstreme formen for autofagi vil kjernene tas opp i autofage vakuoler og forholde seg intakte til siste fase av celledøden (Gozuacik & Kimchi, 2004). Autofagisk celledød er viktig under utviklingsprosessen hos høyere eukaryoter og har blitt observert i forbindelse med at store vevsregioner degenereres (Mizushima et al., 2002).

Type I celledød tilsvarer apoptotisk celledød, som kan gjenkjennes morfologisk ved celleinnskrumping, kromatinkondensering, nukleosomal DNA-degradering og fragmentering av cellen inn i apoptotiske legemer. Bakgrunnen til disse morfologiske trekkene er aktivering av kaspase-familien av cystein proteaser. Utposninger av celleoverflaten er et fellestrekk ved autofagisk og apoptotisk celledød. Restene fra cellen blir fjernet av profesjonelle fagocytter eller naboceller. I noen tilfeller kan det se ut som om autofagi og apoptose er forbundet med hverandre enten positivt eller negativt, som molekulære brytere. Avhengig av den opprinnelige stimuleringen eller den cellulære sammenhengen, kan autofagi være uunnværlig for at apoptosen blir slått på og kan tre i kraft. I andre tilfeller kan autofagien antagonisere, forsinke eller virke gjensidig ekskluderende på apoptoseprosessen (Gozuacik & Kimchi, 2004).



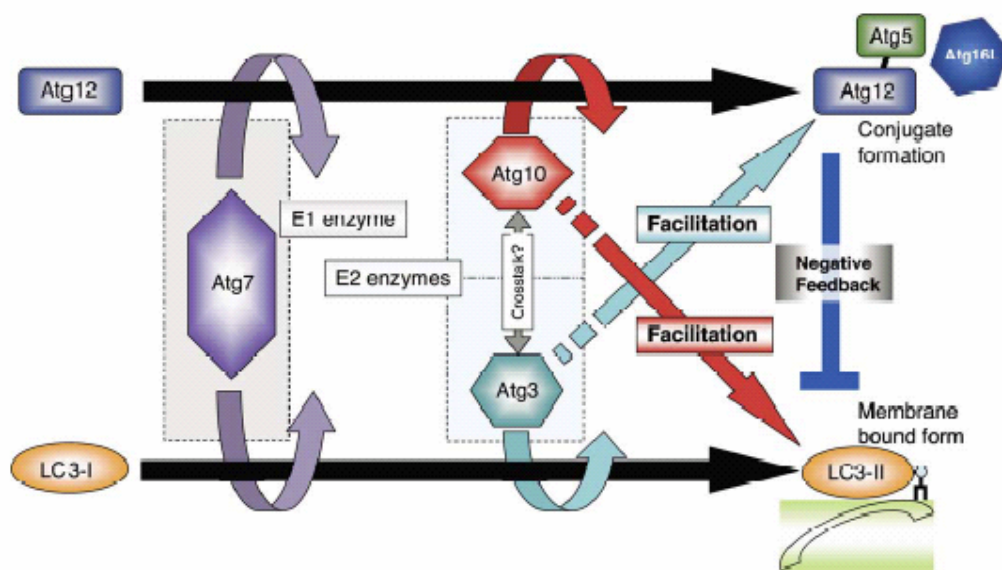
**Figur 13. Autofagi og apoptose** (fra Gozuacik & Kimchi, 2004).

Autofagi kan medføre kontrastfylte ytterpunkter som celleoverlevelse eller celledød. At autofagien har en overlevelsesfunksjon underbygges ved at autofagi sørger for næring og molekylære ”byggeklosser” når tilgangen ellers er svært begrenset. Autofagien antas å være en adaptiv respons forbundet med celleoverlevelse ved svært ugunstige forhold (Gozuacik & Kimchi, 2004).

### ***Molekylære mekanismer bak dannelsen av autofagosomet***

Gener og proteiner som utgjør basismaskineriet i den autofagiske prosessen ble først identifisert i gjær (*Saccharomyces cerevisiae* er benyttet som et modellsystem) og noen av deres mammalske orthologer har i den senere tid også blitt beskrevet. Flere av de autofagirelaterte genene hos gjær (ATG) har mulige orthologer hos høyere eukaryoter. Noen av disse kandidat-orthologene har allerede bevist at de har en sentral rolle innenfor autofagi hos planter, nematoder, slimsopp, fluer og pattedyr. På tross av at disse genene er svært konserverte er det viktig å være klar over mulige ulikheter. Komponenter som inngår i det autofagiske maskineriet, kan også ha andre tilleggsfunksjoner (Levine & Klionsky, 2004).

Det er nødvendig med to ulike ubiquityleringsliknende (UBL) systemer for å danne autofagosomer. Helt essensielt innenfor disse to systemene er to funksjonelt ulike enzymtyper: et aktiverende E1-liknende enzym og et konjugerende E2-liknende enzym (Reggiori & Klionsky, 2002). I den senere tid er det blitt karakterisert at et LC3-konjugeringssystem og et Atg12-Atg5 protein konjugeringssystem, er involvert under den mammalske sekvestringsprosessen (Reggiori & Klionsky, 2002; Tanida et al., 2004). Det antas at Atg12-konjugering er viktig for sekvestringen, mens LC3-modifisering muligens er viktig for dannelsen av selve autofagosomene (Kabeya et al., 2000).

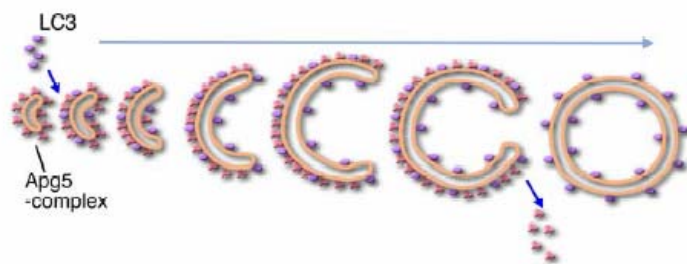


**Figur 14. To ubiquitylerings-liknende modifiseringer helt nødvendige for mammalsk autofagi.** Mulig "crosstalk" mellom de to modifiseringsmekanismene (fra Tanida et al., 2004).

Den C-termimale glysin-aminosyren på Atg12 aktiveres av Atg7 (E1-liknende enzym) og dette resulterer i dannelsen av et Atg12-Atg7 thioester intermediat (Tanida et al., 2001). Atg12 overføres deretter til mammalsk Atg10 (E2-liknende enzym) og danner et Atg12-Atg10 thioester intermediat (Mizushima et al., 2002). Deretter blir den C-terminale glysin aminosyren på Atg12 kovalent bundet til lysin-130 på Atg5 via en isopeptidbinding (Mizushima et al., 1998). Atg12-Atg5 konjugatet danner kompleks med Atg16L (Atg16-like). Mammalsk Atg16L er et 63-74 kDa protein med flere spleiseisoformer og er en del større enn Atg10 hos gjær (17 kDa). De fleste Atg12-Atg5-Atg16L-kompleksene befinner seg i cytosol, kun en liten andel av dem lokaliserer seg til fagoforen under elongeringsprosessen. Til å begynne med er kompleksfordelingen jevn over hele membrancisternen, men under selve elongeringen blir assosiasjonen størst på yttersiden. Atg12-Atg5 konjugatet i kompleks med Atg16L er membranbindende og dissosierer fra membranen rett før eller rett etter at

autofagosomdannelsen er fullstendig. De fleste Atg12-Atg5 konjugatene og Atg16L-proteinene er stabilt inkorporert i proteinkomplekset (~800 kDa), og dette indikerer at selve kompleksdannelsen ikke er involvert i dannelsen av autofagosomer (Tainida et al., 2001; Mizushima et al., 2003; Yoshimori, 2004; Kabeya et al., 2004).

Funksjonen til Atg12-systemet er nært knyttet opp til LC3-konjugeringssystemet. Rett etter syntesen blir den C-terminale regionen av LC3 (22 og 5 aminosyrer hos henholdsvis rotte- og humant-LC3) spaltet av den mammalske Atg4-homologen (cystein protease), hAtg4B. Den prosesserte formen, LC3-I (cytosolisk form), har en glysin aminosyre på C-terminal ende til, før det aktiveres av Atg7, overføres til Atg3 (et annet E2-liknende enzym) og modifiseres til den membranbundne formen, LC3-II. LC3-II forblir bundet til membranen, selv etter fusjonen. LC3 finnes vanligvis spredt over hele cytoplasma, og det er kun en fraksjon av proteinet som spesifikt blir rekruttert til membranene. Det er muligens slik at LC3-II blir konjugert til fosfatidyletanolamin (PE) i den C-terminale enden, på samme måte som Atg8 hos gjær. Det antas at Atg12-konjugeringen og LC3-modifiseringen er forbundet med hverandre via de to E2-liknende enzymene, Atg10 og Atg3 (Tanida et al., 2004). Normalt vil mengden av LC3-II proteiner korrelere med autofagosom-antallet. Når autofagi induseres oppreguleres ekspresjonen av LC3 og omdannelsen av LC3-I til LC3-II øker (Yoshimori, 2004). Ved fusjon mellom autofagosom(-er) og lysosom(-er), blir intra-autofagosomalt LC3-II degradert vha. hydrolytiske enzymer (Kabeya et al., 2000).



**Figur 15. Et kompleks bestående av Atg5, Atg12 og Atg16L assosiert med små membrancisterner, rekrutterer LC3-II til membranene og starter membranelongeringsprosessen.** Cisternene vokser seg til å bli de karakteristiske sekvestrerende membranene og tilslutt autofagosomer innen 10 minutter (fra Yoshimori, 2004).

Andre Atg8-homologer,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)<sub>A</sub>-receptor-associated protein (GABARAP) og Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa (GATE-16), blir også modifisert via samme mekanisme som LC3. Når humant Atg7 og Atg3 uttrykkes sammen med GABARAP og Gate-16, blir de spaltede formene av dem, GABARAP-I og Gate-16-I, modifisert til de lipiderte modifiserte formene, GABARAP-II og Gate-16-II. Rollen til de



Øvrige Atg8-homologene (GABARAP, GATE-16 og Apg8L/Atg8L) i autofagiprosessen er svært lite kjent (Tanida et al., 2003; Tanida et al., 2004). I celler som overuttrykker disse proteinene, ble det funnet at GATE-16 og GABARAP var assosiert med LC3-positive autofagosomer. Det er dermed grunn til å anta at de iallfall er delaktige under autofagien (Kabeya et al., 2004).

Bcl-2 interacting protein, Beclin 1 (60 kDa), er en mammalsk ortolog av Vps30/Atg6 hos gjær, og antas å være viktig for dannelse av autofagosomer. Beclin-1 interagerer med klasse III fosfatidylinositol (PI) 3-kinase i mammalske celler og er nesten utelukkende lokalisert til trans-Golgi nettverket. I tillegg er det identifisert at proteinet også har tumor-suppressor egenskaper (Kihara et al., 2001; Edinger & Thompson, 2003). Beclin 1 er ikke nødvendig for autofagisk degradering, men innehar muligens en mer spesialisert rolle ved å regulere styrken av den autofagiske responsen eller muligens ved å begrense degraderingsomfanget. Hos gjær er Vps30/Atg6 assosiert med PI 3-kinasen, Vps34, en proteinkinase nødvendig for autofagi. PI 3-fosfat har også vist seg å være essensielt for autofagi hos mammalske celler (Petiot et al., 2000).

### ***Regulering***

Hos gjærsoppen, *S. cerevisiae*, blir autofagi aktivert under sult-forhold. Autofagosomene leverer innholdet til en vakuole, som er nedbrytningsorganellen hos gjær, for degradering og resirkulering (Huang & Klionsky, 2002). I kontrast til den induserbare autofagien hos gjær, kan det virke som om mammalsk autofagi er konstitutiv aktiv. Den mammalske autofagien må dermed hovedsakelig reguleres via hemmende mekanismer. Protein fosforylering kan en slik predominant negativ kontrollfunksjon. (Møller et al., 2004a).

På grunn av at autofagi har kapasitet til å degradere hele organeller ville det være svært skadelig hvis denne nedbrytningsprosessen inntreffer tilfeldig eller på ugunstige tidspunkt. Det er dermed viktig at autofagi-prosessen er under sterk regulering (Klionsky, 2004).

Det er først og fremst sekvestreringstrinnet, dannelsen av autofagosomer fra fagoforer, som i stor grad er utsatt for regulering. Cellulært er det mest hensiktsmessig og energibesparende å sørge for regulering av det initielle trinnet av autofagien. Aminosyrer, hormoner, sykliske nukleotider, ATP-forbrukende metabolitter og hormoner som insulin og glukagon,  $\alpha$ -adrenerge agonister og proteinkinaser har alle vist seg å kunne regulere det initielle sekvestreringstrinnet. Autofagisk sekvestrering har i tillegg vist seg å være svært

temperaturavhengig, og vil mer eller mindre opphøre ved temperaturer under 20 °C. (Seglen et al., 1990; Strømhaug et al., 1997).

Autofagi-prosessen er avhengig av det intracellulære ATP nivået (Kim & Klionsky, 2000). ATP-underskudd har vist å redusere autofagisk degradering, og spesielt sekvestreringstrinnet er sensitivt overfor fall i ATP-nivået (Plomp et al., 1987). Hos rottehepatocytter har autofagien blitt vist å kunne hemmes av adenosin, adenosinanaloger og AMP (Kovacs et al., 1998). AICAR (5-amino-4-imidazole carboxamide riboside) og N<sup>6</sup>-mercaptopurine riboside har også vist seg å inneha denne hemmende effekten, men det er imidlertid kun i de respektive monofosforylerte formene (Samari & Seglen, 1998).

Aminosyrer er sluttproduktet ved autofagisk degradering, og vil virke som negative feedback-regulatorer av prosessen. (Blommaart et al., 1997). Høye aminosyre-konsentrasjoner kan hemme autofagi *in vitro*, og en gruppe på ni aminosyrer er funnet å være de mest effektive (asparagin, glutamin, leucin, tryptofan, histidin, metionin, prolin, tryptofan og tyrosin) siden de kan hemme autofagi på egenhånd. Hos isolerte rottehepatocytter er det vist at en balansert aminosyreblending effektivt kan hemme sekvestreringstrinnet. To av aminosyrene er spesielt viktige for den hemmende effekten av en slik blanding. Tryptofan er funnet å ha den sterkeste effekten, mens leucin er helt nødvendig for den maksimale effekten (Seglen et al., 1980; Seglen & Gordon, 1984). Glutamin har ingen hemmende effekt under selve sekvestreringen, men antas å være aktive på et senere tidspunkt av autofagi-prosessen ved å danne ammoniakk som øker lysosomal pH og slik virker hemmende på proteolytiske enzymer (Grinde & Seglen, 1981). Asparagin hemmer fusjon mellom amfimer og lysosomer (Kopitz et al., 1990).

Insulin vil virke hemmende på autofagi-prosessen, mens glykogen stimulerer den (Blommaart et al., 1997). Glykogen og insulin vil virke henholdsvis synergistisk eller antagonistisk sammen med aminosyrer og begge hormonene er vist å kunne virke inn på sekvestreringshastigheten (Poli et al., 1981; Seglen et al., 1990). Epinephrin, norepinephrin og phenylepinephrin hemmer autofagisk sekvestrering i isolerte rottehepatocytter gjennom  $\alpha$ 1-adrenerge mekanismer som involverer at Ca<sup>2+</sup> frigjøring fra intracellulære lagre (Gordon et al., 1991). Chelatorene EGTA (ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) og BAPTA (bis(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), samt ATPase-hemmeren thapsigargin vil også medføre autofagi-hemming gjennom Ca<sup>2+</sup>-frigjøring (Gordon et al., 1993).

Det ser ut til at cAMP og cAMP-analoger er involvert i reguleringen av sekvestreringstrinnet ved hepatotisk autofagi. Siden nesten alle biologiske effekter av cAMP

medieres gjennom cAMP-avhengig proteinkinase (PKA), er det svært sannsynlig at PKA også er involvert i en cAMP-indusert autofagi-reguleringsmekanisme. Ulike GTPaser har også vist å ha en autofagi-hemmende rolle, spesielt på sekvestreringstrinnet (Petiot et al., 1999).

Proteinfosforylering som reguleringsmekanisme er svært utbredt, og er trolig svært viktig for regulering av autofagien. At proteinfosforylering har en rolle innenfor autofagireguleringen ble stadfestet ved bruk av proteinfosfatasehemmeren, okadasyre, som hemmer autofagisk sekvestrering (Holen et al., 1993). Proteinkinasen, mammalian target of rapamycin (mTOR), har vist seg å kunne integrere hormonelle stimuli, som glukagon, via klasse I fosfatidylinositol (PI)- 3-kinase/proteinkinase B (PKB)-veien som også trolig er en autofagireguleringsvei (Rohde et al., 2001). mTOR antas å være indirekte involvert i dannelsen av autofagosomet, ved å være en oppstrøms signal-mediator. Hos gjær er en nedstrøms komponent for TOR, Atg1, ansvarlig for dannelsen av autofagosomet (Yoshimori, 2004).

3-metyladenin (3MA) er en relativt spesifikk hemmer av autofagi, og er vist å ikke ha noen effekt på proteinsyntesen, endocytisk proteindegradering eller ATP-nivået (Seglen & Gordon, 1982). 3MA utøver sin effekt på sekvestreringstrinnet, og en konsentrasjon på 10 mM kan hemme autofagien fullstendig (Seglen et al., 1986). Mens langtidskontroll av autofagi-prosessen kan medieres via transkripsjonell regulering av eIF2 $\alpha$  kinaser, kan korttidskontrollen muligens medieres via en LKB1/AMPK-mediert signalvei (Møller et al., 2004a) (se nærmere beskrivelse under **AMPK og mulig nedstrøms signalvei involvert i reguleringen av autofagi**).

### ***Måling av autofagi***

Hos isolerte rottehepatocytter kan autofagimålinger utføres biokjemisk ved å måle sekvestreringsraten av en løselig, membran-impermeabel markør fra cytosol inn i autofage vakuoler (Seglen & Bohley, 1992). Denne markøren kan være en forbindelse som blir innført i cellen (radioaktivt merket sukker) eller et endogent cytosolisk enzym (laktat dehydrogenase (LDH)). LDH er en hyppig benyttet markør ved autofagi-målinger på bakgrunn av flere egenskaper som gjør det svært godt egnet. Det endogene enzymet er tilstede hos hepatocytter i høy konsentrasjon, lar seg relativt enkelt kvantifisere og tas opp i autofagiske vakuoler uselektivt. For å forhindre at markøren blir degradert i lysosomene, er det helt nødvendig at hepatocytterne tilføres en lysosomal hemmer (for eksempel leupeptin) (Seglen, 1983). For å måle autofagiraten av den cytosoliske markøren, må de autofagiske vakuolene skilles fra cytosol. En slik atskillelse kan oppnås ved å elektro-”sprengne” cellene mens de er i ionefri-

løsning (for eksempel 10 % sukrose). Etter sprengingen vil cellene kun inneholde organeller som autofagiske vakuoler, siden disse er for store til å slippe ut gjennom perforeringene i cellemembranen. For videre separasjon, sentrifugeres celleduspensjonen gjennom en tetthetsgradient (for eksempel 8 % nycodenz), som vil resultere i at de autofagiske vakuolene oppkonsentreres i pelleten. Autofagimålingene blir utført ved å måle markørmengde sekvestrert inn i autofagiske vakuoler i forhold til det totale cellulære nivået av markøren, og autofagiraten angis som dette forholdet uttrykt i prosent. Selve målingene av LDH-markøren kan utføres ved å bruke en autoanalyser som måler et fall i NADH ved 340 nm, og mengden LDH beregnes på bakgrunn av reaksjonsligningen:  $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Laktat} + \text{NAD}$ .

### **AMPK og mulig nedstrøms signalvei involvert i reguleringen av autofagi**

Som tidligere nevnt spiller AMP-aktivert proteinkinase (AMPK) en vesentlig rolle for den intracellulære energimetabolisme-homøostasen, ved å forsøke å opprettholde et konstant høyt ATP:ADP forhold til enhver tid. Serin/threonin proteinkinasen aktiveres ved ulike former for stress (metabolsk eller toksisk) som kan medføre en nedgang i ATP:ADP forholdet og økning av AMP-konsentrasjonen. Det er AMP:ATP forholdet, og ikke AMP-konsentrasjonen, som bestemmer hvorvidt proteinkinasen kan aktiveres og respondere cellulært og fysiologisk. For å oppnå en fullaktivering av AMPK er det nødvendig med fosforylering i hovedfosforyleringssetet Thr172, av den oppstrøms kinasen LKB1. Aktivert AMPK responderer ved å hemme ATP-forbrukende signalveier, mens ATP-produserende signalveier blir aktivert (Hardie, 2003).

Forsøk utført i isolerte rottehepatocytter har vist at AMPK trolig er komponent i en signalvei som er involvert i regulering av autofagi (Samari & Seglen, 1998). Denne signalveien kan induseres av naturlig forekommende toksiner, ulike proteinfosfatasehemmere (OA, mikrocystin, calyculin A og cantharidin). Disse toksinene kan stimulere til overfosforylering og aktivering av AMPK-komplekset. Et aktivt AMPK vil kunne aktivere nedstrøms komponenter i en slik antatt signalvei som vil virke hemmende på autofagi-prosessen. Autofagi er svært sentral innenfor cellulær metabolisme, som en hovedsakelig uspesifikk mekanisme for degradering av organeller så vel som av proteiner og andre cellulære makromolekyler (Larsen et al., 2002).

Algegiftene, OA og mikrocystin, kan trolig indirekte aktivere AMPK via en proteinfosfatase 2A (PP2A)-inhiberende mekanisme. Denne aktiveringen vil antagoniseres av

grapefrukt-flavonoidet naringin. Giftstoffene cantharidin og calyculin A har vist seg å kunne aktivere AMPK ved å inhibere proteinfosfatase 1 (PP1). Denne fosforyleringen kan imidlertid ikke antagoniseres av naringin, og kan betegnes naringin-resistent (Larsen et al., 2002).

Det er vist at serin/threonin proteinfosfatase-hemmere kan inhibere autofagi hos isolerte rottehepatocytter (Holen et al., 1993). Blant toksinene har OA vist seg å være den mest potente hemmeren av autofagi, og er effektiv selv ved ganske lave toksinkonsentrasjoner (Larsen et al., 2002). Puriner har også vist seg å ha en hemmende effekt på autofagi-prosessen. I tidligere utførte forsøk ble isolerte rottehepatocytter behandlet med AMPK-proaktivatorene adenosin,  $N^6$ -mercaptopurine riboside og AICAR. Den autofagiske aktiviteten ble inhibert av alle tre nukleosidene, men de ble først potente autofagi-hemmere på monofosforylert form (Samari & Seglen, 1998). At AMPK trolig er involvert i autofagi-regulering kan støttes av observasjonen av at det ved ATP-underskudd oppstår redusert autofagisk aktivitet (Plomp et al., 1987). Alt tyder på at autofagi er en svært energi-krevende prosess, og ut fra dette er det logisk at autofagi er blant de anabolske prosessene som slås av under forhold med energiunderskudd (Hardie & Carling, 1997; Samari & Seglen, 1998).

Ved å sammenlikne slike toksin-induserte fosforyleringsmønstre, og eventuell naringin-sensitivitet av fosforyleringene, har det vært forsøkt å identifisere mulige nedstrøms komponenter for AMPK i en autofagi-hemmende signalvei. I tillegg til toksin-indusert fosforylering og aktivering, har også AICAR blitt benyttet for å oppnå aktivering av AMPK. AICAR, som er en adenosin-analog, har vist seg å kunne indusere naringin-sensitiv fosforylering av AMPK. AICAR monofosforyleres intracellulært til AMP-analogen ZMP, som er en svært potent AMPK-aktivator. Det er dermed trolig at en naringin-sensitiv fosforylering og aktivering induert av AICAR blir mediert via AMPK (Møller et al., 2004a).

Ulike fosfoproteiner har blitt identifisert ut fra de ovennevnte kriteriene. De stress-aktiverede proteinkinase, SAPK/Erk kinase (SEK1) og den nedstrøms komponenten c-Jun  $NH_2$ -terminal kinase (JNK) har vist seg å kunne fosforyleres naringin-sensitivt i henholdsvis Thr183/Tyr185 og Thr261. Det kan derfor tenkes at stress-aktiverede proteinkinaser spiller en rolle i mediering av autofagi-hemmende toksineffekter ved å virke nedstrøms i en LKB1/AMPK-initiert signalvei. Det er utført forsøk i hepatocytter hvor AICAR-indusert aktivering av JNK har ført til apoptose, noe som underbygger en hypotese om at det eksisterer en signalvei hvor både AMPK og JNK er involvert (Meisse et al., 2002). Det har tidligere blitt rapportert at stress-aktiverede proteinkinaser opptrer i triader, gjerne forbundet via et stativprotein for optimal signalisering. Stemmer dette, gjenstår det å identifisere en ytterligere proteinkinase oppstrøms for SEK1 (Davis, 2000).

Hepatocytisk p70 S6 kinase (S6K) fosforyleres naringin-sensitivt i haleregionen (Thr421/Ser424) etter behandling med OA eller AICAR. p70 S6K er svært viktig for både cellevekst og celleoverlevelse (Le et al., 2003). Den nedstrøms komponenten, S6 ribosomalt protein (S6), fosforyleres i Ser235/236. Fosforylering av S6 er essensielt innenfor cellulær massevekst, da dette er en kontrollmekanisme for syntese av komponenter som inngår i translasjonsmaskineriet og er nødvendig for proteinsyntesen (Dufner & Thomas, 1999). S6K har også vist seg å kunne fosforyleres etter behandling med aminosyrer, via en mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediert signalvei. Aminosyrer kan indusere fosforylering både i haleregionen (Thr421/Ser424) og i hovedfosforyleringssetet (Thr389). Fosforylering i Thr-389 er nødvendig for et S6K skal kunne være aktivt. AICAR har vist seg å hemme en slik aminosyre-indusert aktivering av S6K, men fosforylerer naringin-sensitivt i haleregionen.

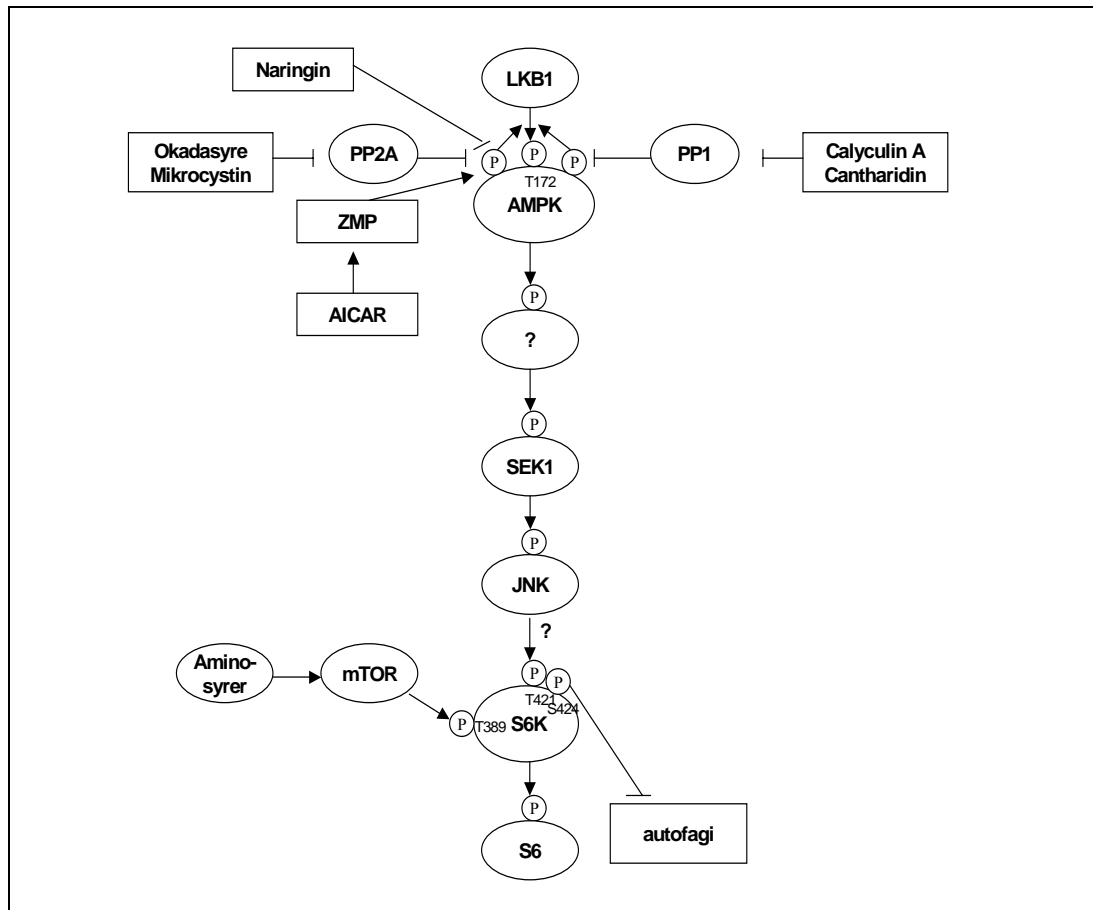
AMPK kan derfor muligens ha to effekter på S6K. Den ene effekten er at kinasen fremmer halefosforylering (toksin- eller AICAR-indusert), mens den andre effekten er inhibering av Thr-389 fosforylering og dermed av S6K-aktivitet. Toksinene kan ikke aktivere S6K, da de kun fosforylerer haleregionen. S6K-halefosforyleringen kan tenkes å fungere som en mediator av den autofagihemmende signaliseringen (Møller et al., 2004b). Det kan videre tenkes at JNK er en oppstrøms kinase for S6K. I flere epiteliale kreftcellelinjer kan det se ut til at JNK fosforylerer S6K i Thr421/Ser424 (Le et al., 2003).

Hos rottehepatocytter er det vist at aminosyrer kan hemme autofagi. Insulin og cellesvelling ble funnet å fremme en slik inhibering via aminosyrer. Disse forholdene viste seg å være assosiert med fosforylering av S6, og det er indikasjoner på at inhibering av autofagi og fosforylering av S6 er under kontroll av samme signaltransduksjonsvei. S6-fosforylering var et resultat av S6K-aktivering, og ikke av inhibering av S6 fosfatase. På bakgrunn av denne mulige sammenhengen mellom S6-fosforylering og autofagi-inhibering, har fosforylert S6 vært postulert å fungere som inhibitor av autofagisk degradering (Blommaart et al., 1995).

Det er mulig at AMPK også på en annen indirekte måte kan innvirke på autofagien. Det er trolig slik at AMPK medierer toksin-indusert fosforylering av cytoskjelettkomponenter som plektin og keratin, som medfører fragmentering av disse cytoskjelett-nettverkene, og som indirekte kan tenkes å forårsake autofagi-inhibering. Det er f.eks vist at et intakt intermediærfilament-cytoskjelett er korrelert med en optimal autofagisk sekvestrering (Blankson et al., 1995; Larsen et al., 2002).

AMPK har også vist seg å ha en effekt på celleoverlevelse hos hepatocytter. Ved å lage et kunstig konstitutivt AMPK-kompleks, ble det observert at forlenget AMPK-aktivering

utløste apoptose i sammenheng med JNK-aktivering. Det antas dermed at AMPK-aktivering kan indusere apoptose mediert via JNK, og i forbindelse med denne observasjonen kan AMPK også tilegnes en pro-apoptotisk effekt (Meisse et al., 2002).



**Figur 16. Toksin-indusert signalvei mediert gjennom LKB1/AMPK (hypotetisk fremstilling)**

AMPK kan indirekte aktiveres av en rekke forskjellige naturlige forekommende toksiner (OA, mikrocytin, cantharidin, calyculin A), som utøver sin funksjonalitet ved å være effektive proteinfosfatasehemmere. Det er identifisert to forskjellige slike aktiveringsmekanismer; en PP2A-inhiberende og naringin-sensitiv (okadasyre og mikrocytin) eller en PP1-inhiberende og naringin-resistent (cantharidin, calyculin A). LKB1 fosforylerer AMPK i Thr172 og er helt nødvendig for å oppnå AMPK-aktivitet. Aktivert AMPK antas å mediere en toksin-indusert signalisering via ulike nedstrøms komponenter i en signalvei involvert i autofagi-regulering. De stress-aktiverede kinasene, SAPK/Erk kinase (SEK1) og c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK), er implikert å være nedstrøms komponenter i denne signalveien. Det samme gjelder S6K og muligens dets substrat S6. S6K fosforyleres i Thr421 og Ser424 (haleregionen). En slik fosforylering kan være toksin- eller AICAR-indusert. S6K kan for øvrig også fosforyleres i Thr389, og denne fosforyleringen er essensiell for proteinkinasens aktivitet. Dette hovedfosforyleringssetet blir fosforylert av mTOR og kan induseres av aminosyrer. Det er imidlertid halefosforyleringen av S6K som tenkes å videreformidle den autofagi-hemmende effekten.

## Referanser

1. Adams, J., Chen, Z. P., van Denderen, B. J. W., Morton, C. J., Parker, M. W., Witters, L. A., Stapleton, D., and Kemp, B. E. (2003). Intracellular control of AMPK via the  $\gamma_1$  subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Science* **13**, 155-165.
2. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592-5595.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002a). Intracellular vesicular traffic. In "Molecular Biology of the Cell" pp. 739-740, 762-764. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002b). Histology: the lives and deaths of cells in tissues. In "Molecular biology of the cell" pp. 1276-1278. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
5. Andreeva, A. V., and Kutuzov, M. A. (2001). PPP Family of Protein Ser/Thr Phosphatases: Two Distinct Branches? *Mol. Biol. Evol.* **18**, 448-452.
6. Arias, I. M., Jakoby, W. B., Popper, H., Schachter, D., and Shafritz, D. A. (1988). The Cells. In "The Liver. Biology and pathobiology" pp. 7-10. Raven Press, New York.
7. Austin, C. A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H., and Fisher, L. M. (1992). Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem J.* **282**, 883-889.
8. Barford, D., Das, A. K., and Egloff, M.-P. (1998). The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133-164.
9. Barton, G. J., Cohen, P. T., and Barford, D. (1994). Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* **220**, 225-237.
10. Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., and Seglen, P. O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *Biochem. J.* **273**, 21883-21892.
11. Bevelander, G., and Ramaley, J. A. (1974). Glands associated with the digestive tract. In "Essentials of histology" (1974) pp. 212-219. The C. V. Mosby company, Saint Louis.
12. Bialojan, C., and Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* **256**, 283-290.
13. Blankson, H., Grotterod, E.M., and Seglen P.O. (2000). Prevention of toxin-induced cytoskeletal disruption and apoptotic liver cell death by the grapefruit flavonoid, naringin. *Cell Death Differ.* **7**, 739-746.
14. Blankson, H., Holen, I., and Seglen, P. O. (1995). Disruption of the cytokeratin cytoskeleton and inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid. *Exp. Cell. Res.* **218**, 522-530.
15. Blommaart, E. F., Luiken, J. J., Blommaart, P. J., van Woerkom, G. M., and Meijer, A. J. (1995). Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 2320-2306.
16. Blommaart, E. F., Luiken, J. J., and Meijer, A. J. (1997). Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem. J.* **29**, 365-385.



17. Boe, R., Gjertsen, B. T., Vintermyr, O. K., Houge, G., Lanotte, M., and Døskeland, S. O. (1991). The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp Cell Res.* **195**, 237-246.
18. Bollen, M. (2001). Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 426-431.
19. Boudeau, J., Baas, A. F., Deak, M., Morrice, N. A., Kieloch, A., Schutowski, M., Prescott A. R., Clevers, H. C., and Alessi, D. R. (2003a). MO25 isoforms interact with the STE20-related pseudokinase STRAD $\alpha/\beta$  and enhance their ability to bind, activate and localise the LKB1 tumour suppressor in the cytoplasm. *EMBO J.* **22**, 5102-5114.
20. Boudeau, J., Sapkota, G., and Alessi, D. R. (2003b). LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. *FEBS Lett.* **546**, 159-165.
21. Brandi, M. L. (1992). Flavonoids: biochemical effects and therapeutic applications. *Bone Miner.* **1**, 3-14.
22. Carling D. (2004a). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 18-24.
23. Carling, D. (2004b). AMPK. *Curr. Biol.* **14**, R220.
24. Ceulemans, H., and Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.* **84**, 1-39.
25. Cheng, A., Ross, K. E., Kaldis, P., and Solomon, M. J. (1999). Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev.* **13**, 2946-2957.
26. Clarke, PG. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl)*. **181**, 195-213.
27. Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453-508.
28. Cohen, P. (2002a). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 309-315.
29. Cohen, P. T. (2002b). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci.* **115**, 241-256.
30. Cohen, P. T. W. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 245-251.
31. Cohen, P., and Cohen, P. T. (1989). Protein phosphatases come of age. *J. Biol. Chem.* **264**, 21435-21438.
32. Cohen, P., Holmes, C. F., and Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 98-102.
33. Corton, J. M., Gillespie, J. G., Hawley, S. A., and Hardie D. G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* **229**, 558-565.
34. Crute, B. E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B. E., and Witters, L. A. (1998). Functional domains of the alpha catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 35347-35354.
35. Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* **14**, 70-77.
36. Dahl, H. A. and Rinvik, E. (1999). Fordøyelsesorganene. In "Menneskets funksjonelle anatomi" pp. 688-695. Cappelen Akademisk Forlag as, Oslo.

37. Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T., and Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution *EMBO J.* **15**, 6798-6809.
38. Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T., and Hardie, D. G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* **377**, 421-425.
39. Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* **103**, 239-252.
40. Dombradi, V., Krieglstein, J., and Klumpp, S. (2002). Regulating the regulators. Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO Rep.* **3**, 120-124.
41. Dufner, A., and Thomas, G. (1999). Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell Res.* **253**, 100-109.
42. Dunn, W. A. Jr. (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* **110**, 1923-1933.
43. Edinger, A. L., and Thompson, C. B. (2003). Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell.* **4**, 422-424.
44. Erdodi, F., Toth, B., Hirano, K., Hirano, M., Hartshorne, D. J., and Gergely, P. (1995). Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo. *Am J Physiol.* **269**, 1176-1184.
45. Ericsson, J. L. (1969). Studies on induced cellular autophagy. I. Electron microscopy of cells with in vivo labelled lysosomes. *Exp. Cell. Res.* **55**, 95-106.
46. Falconer, I. R., and Yeung, D. S. (1992). Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by Microcystis toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem. Biol. Interact.* **81**, 181-196.
47. Favre, B., Turowski, P., and Hemmings, B. A. (1997). Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J. Biol. Chem.* **272**, 13856-13863.
48. Fengsrud, M., Erichsen, E. S., Berg, T. O., Raiborg, C., Seglen, P. O. (2000a). Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur. J. Cell. Biol.* **79**, 871-882.
49. Fengsrud, M., Raiborg, C., Berg, T. O., Stromhaug, P. E., Ueno, T., Erichsen, E. S., and Seglen, P. O. (2000b). Autophagosome-associated variant isoforms of cytosolic enzymes. *Biochem J.* **352**, 773-781.
50. Fengsrud, M., Roos, N., Berg, T., Liou, W., Slot, J. W., and Seglen, P. O. (1995). Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Exp. Cell. Res.* **221**, 504-519.
51. Fengsrud, M., Sneve, M. L., Øverbye, A., and Seglen, P. O. (2004). Structural aspects of mammalian autophagy. . In "Autophagy" (Klionsky, D. J., ed.), chapter 2, pp. 11-25. Landes Bioscience, Georgetown, TX, USA.
52. Fryer, L. G., Parbu-Patel, A., and Carling, D. (2002a) The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **277**, 25226-25232.
53. Fujiki, H., and Suganuma, M. (1993). Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res.* **61**, 143-194.
54. Fujiki, H., and Suganuma, M. (1999). Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* **125**, 150-155.

55. Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., and Kobayashi, M. (1989). Sarcophytols A and B inhibit tumor promotion by teleocidin in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **115**, 25-28.
56. Galati, G., and O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 287-303.
57. Garcia, A., Cayla, X., Guergnon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M. P., Fleischer, A., and Rebollo, A. (2003). Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie.* **85**, 721-726.
58. Gauss, C. M., Shepbeck, J. E. 2nd, Nairn, A. C., and Chamberlin, R. (1997). A molecular modeling analysis of the binding interactions between the okadaic acid class of natural product inhibitors and the Ser-Thr phosphatases, PP1 and PP2A. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 1751-1773.
- Gimeno-Alcaniz, J. V., and Sanz, P. (2003). Glucose and type 2A protein phosphatase regulate the interaction between catalytic and regulatory subunits of AMP-activated protein kinase. *J. Mol. Biol.* **333**, 201-209.
59. Gordon, P. B., Holen, I., and Seglen, P. O. (1991). Effects of adrenergic agonists and antagonists on autophagic activity in isolated rat liver cells. *Biomed. Biochim. Acta.* **50**, 383-387.
60. Gordon, P. B., Holen, I., and Seglen, P. O. (1995). Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. *J. Biol. Chem.* **270**, 5830-5838.
61. Gordon, P. B., Holen, I., Fosse, M., Rotnes, J. S., and Seglen, P. O. (1993). Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J. Biol. Chem.* **268**, 26107-26112.
62. Gotz, J., Probst, A., Ehler, E., Hemmings, B., and Kues, W. (1998). Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit Calpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 12370-12375.
63. Gozuacik, D., Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* **23**, 2891-2906.
64. Graziani, Y., Erikson, E., and Erikson, R. L. (1983). The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.* **135**, 583-589.
65. Grinde, B., and Seglen, P. O. (1981). Effects of amino acid analogues on protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **676**, 43-50.
66. Guy, G. R., Cao, X., Chua, S. P., and Tan, Y. H. (1992). Okadaic acid mimics multiple changes in early protein phosphorylation and gene expression induced by tumor necrosis factor or interleukin-1. *J. Biol. Chem.* **267**, 1846-1852.
67. Hanks, S. K., and Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596.
68. Hanks, S. K., Quinn, A. M., and Hunter T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* **241**, 42-52.
69. Hardie, D. G. (2003). Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* **144**, 5179-5183.
70. Hardie, D. G. and Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays.* **23**, 1112-1119.

71. Hardie, D. G., and Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* **246**, 259-73.
72. Hardie, D. G., Carling, D., and Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 821-855.
73. Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., and Hudson, E. R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* **546**, 113-120.
74. Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R., and Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADalpha/beta and MO25alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* **2**, 28.1-28.16.
75. Hawley, S. A., Gadalla, A. E., Olsen, G. S., and Hardie DG. (2002). The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes.* **51**, 2420-2425.
76. Hertog, M.G., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer.* **20**, 21-29.
77. Holen, I., Gordon, P. B., and Seglen, P. O. (1992). Protein kinase-dependent effects of okadaic acid on hepatocytic autophagy and cytoskeletal integrity. *Biochem. J.* **284**, 633-636.
78. Holen, I., Gordon, P. B., and Seglen, P. O. (1993). Inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid and other protein phosphatase inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **215**, 113-122.
79. Hong, S. P., Leiper, F. C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 8839-8843.
80. Honkanen, R. E. (1993). Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett.* **30**, 283-286.
81. Horn, M., and Banting, G. (1994). Okadaic acid treatment leads to a fragmentation of the trans-Golgi network and an increase in expression of TGN38 at the cell surface. *Biochem. J.* **301**, 69-73.
82. Huang, W. P., and Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell. Struct. Funct.* **27**, 409-420.
83. Hudson, E. R., Pan, D. A., James, J., Lucocq, J. M., Hawley, S. A., Green, K. A., Baba, O., Terashima, T., and Hardie, D. G. (2003). A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr. Biol.* **13**, 861-866.
84. Hunter, T. (1987). A thousand and one protein kinases. *Cell* **50**, 823-829.
85. Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell.* **80**, 225-236.
86. Hunter, T., and Plowman, G. D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 18-22.
87. Ingebritsen, T. S., Stewart, A. A., and Cohen, P. (1983). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 6. Measurement of type-1 and type-2 protein phosphatases in extracts of mammalian tissues; an assessment of their physiological roles. *Eur J Biochem.* **132**, 297-307.
88. Jackson, M. D., Fjeld, C. C., and Denu, J. M. (2003). Probing the function of conserved residues in the serine/threonine phosphatase PP2Calpha. *Biochemistry.* **42**, 8513-8521.

89. Jagetia, G. C., Venkatesha, V. A., and Reddy, T. K. (2003). Naringin, a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis*. **18**, 337-343.
90. Jinsart, W., Ternai, B., and Polya, G. M. (1991). Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and avian myosin light chain kinase by flavonoids and related compounds. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*. **372**, 819-827.
91. Jinsart, W., Ternai, B., and Polya, G. M. (1992). Inhibition of rat liver cyclic AMP-dependent protein kinase by flavonoids. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*. **373**, 205-211.
92. Junqueira and Carneiro, Basic Histology, a text and atlas, p. 333, Figure 16-11. 10th edition. The McGraw Hill. Companies 2003. ISBN: 0071378294. NY, USA Basic Histology, a text and atlas, p. 333, Figure 16-11 and 16-12.
93. Jung, G., Hennings, G., Pfeifer, M., and Bessler, W. G. (1983). Interaction of metal-complexing compounds with lymphocytes and lymphoid cell lines. *Mol. Pharmacol.* **23**, 698-702.
94. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720-5728.
95. Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell. Sci.* **117**, 2805-2812.
96. Kemp, B. E., Mitchelhill, K. I., Stapleton, D., Michell, B. J., Chen, Z. P., and Witters, L. A. (1999). Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342-346.
97. Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **152**, 519-30.
98. Kim, J., and Klionsky, D. J. (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 303-342.
99. Kinoshita, K., Nemoto, T., Nabeshima, K., Kondoh, H., Niwa, H., and Yanagida, M. (1996). The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatase 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes Cells.* **1**, 29-45.
100. Klionsky, D. J. (2004). Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature*. **431**, 31-32.
101. Klumpp, S., Hanke, C., Donella-Deana, M., Beyer, A., Kellner, R., Pinna, L. A., and Schultz, J. E. (1998). A Membrane-bound Protein Phosphatase Type 2C from *Paramecium tetraurelia*. Purification, characterization, and cloning *J. Biol. Chem.*, **273**, 19167-19172.
102. Knapp, J., Boknik, P., Huke, S., Gombosova, I., Linck, B., Luss, H., Muller, F. U., Muller, T., Nacke, P., Schmitz, W., Vahlensieck, U., and Neumann, J. (1998). Contractility and inhibition of protein phosphatases by cantharidin. *Gen. Pharmacol.* **31**, 729-33.
103. Komori, A., Yatsunami, J., Okabe, S., Abe, S., Hara, K., Suganuma, M., Kim, S. J., and Fujiki, H. (1993). Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn J. Clin. Oncol.* **23**, 186-190.
104. Kopitz, J., Kisen, G. Ø., Gordon, P. B., Bohley, P., and Seglen, P. O. (1990). Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* **111**, 941-953.
105. Kovacs, A. L., Gordon, P. B., Grotterod, E. M., and Seglen, P. O. (1998). Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, adenosine analogs and AMP. *Biol. Chem.* **379**, 1341-1347.

106. Larsen, A. K., Moller, M. T., Blankson, H., Samari, H. R., Holden, L., and Seglen, P. O. (2002). Naringin-sensitive phosphorylation of plectin, a cytoskeletal cross-linking protein, in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 34826-34835.
107. Le, X. F., Hittelman, W. N., Liu, J., McWatters, A., Li, C., Mills, G. B., and Bast, R. C. Jr. (2003). Paclitaxel induces inactivation of p70 S6 kinase and phosphorylation of Thr421 and Ser424 via multiple signaling pathways in mitosis. *Oncogene*. **22**, 484-497.
108. Leff, T. (2003). AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 224-227.
109. Lemaigre, F., and Zaret, K. S. (2004). Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 582-590.
110. Levine, B., and Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* **6**, 463-477.
111. Liou, W., Geuze, H. J., Geelen, M. J., Slot, J. W. (1997). The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J. Cell. Biol.* **136**, 61-70.
112. Locke, M., and Sykes, A. K. (1975). The role of the Golgi complex in the isolation and digestion of organelles. *Tissue Cell.* **7**, 143-58.
113. MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P., and Codd, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* **264**, 187-192.
114. Mailhes, J. B., Hilliard, C., Fuseler, J. W., and London, S. N. (2003). Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, induces premature separation of sister chromatids during meiosis I and aneuploidy in mouse oocytes in vitro. *Chromosome Res.* **11**, 619-631.
115. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*. **298**, 1912-1934.
116. Maridonneau-Parini, I., Braquet, P., and Garay, R. P. (1986). Heterogeneous effect of flavonoids on K<sup>+</sup> loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radicals in human red cells. *Pharmacol. Res. Commun.* **18**, 61-72.
117. Meijer, A. J., and Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**, 2445-2462.
118. Meisse, D., Van de Casteele, M., Beauloye, C., Hainault, I., Kefas, B. A., Rider, M. H., Foufelle, F., and Hue, L. (2002). Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett.* **526**, 38-42.
119. Meskiene, I., Baudouin, E., Schweighofer, A., Liwosz, A., Jonak, C., Rodriguez, P. L., Jelinek, H., and Hirt, H. (2003). Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 18945-18952.
120. Millward, T. A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B. A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 186-191.
121. Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell. Sci.* **116**, 1679-1688.
122. Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell. Struct. Funct.* **27**, 421-429.

123. Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (1998). A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **273**, 33889-33892.
124. Moed, L., Shwayder, T. A., and Chang, M. W. (2001). Cantharidin revisited: a blistering defense of an ancient medicine. *Arch. Dermatol.* **137**, 1357-1360.
125. Møller, M. T. N., Samari, H., Holden, L., and Seglen, P. O. (2004a). Regulation of mammalian autophagy by protein phosphorylation. In "Autophagy" (Klionsky, D. J., ed.), chapter 4, pp. 48-59. Landes Bioscience, Georgetown, TX, USA.
126. Møller, M. T. N., Samari, H. R., and Seglen, P. O. (2004b). Toxin-Induced Tail Phosphorylation of Hepatocellular S6 Kinase: Evidence for a Dual Involvement of the AMP-Activated Protein Kinase in S6 Kinase Regulation. *Toxicol. Sci.* **82**, 628-637.
127. Møller, M. T., Samari, H. R., Fengsrud, M., Stromhaug, P. E., Ostvold, A. C., and Seglen, P. O. (2003). Okadaic acid-induced, naringin-sensitive phosphorylation of glycine N-methyltransferase in isolated rat hepatocytes. *Biochem J.* **373**, 505-513
128. Moore, F., Weekes, J., and Hardie, D. G. (1991). Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur. J. Biochem.* **199**, 691-697.
129. Mumby, M. C., and Walter, G. (1993). Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev.* **73**, 673-99.
130. Murray, M. V., Kobayashi, R., and Krainer, A. R. (1999). The type 2C Ser/Thr phosphatase PP2C $\gamma$  is a pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.* **13**, 87-97.
131. Nam, K. Y., Hiro, M., Kimura, S., Fujiki, H., and Imanishi, Y. (1990). Permeability of a non-TPA-type tumor promoter, okadaic acid, through lipid bilayer membrane. *Carcinogenesis.* **11**, 1171-1174.
132. Nishito, Y., Usui, H., Shinzawa-Itoh, K., Inoue, R., Tanabe, O., Nagase, T., Murakami, T., and Takeda, M. (1999). Direct metal analyses of Mn<sup>2+</sup>-dependent and -independent protein phosphatase 2A from human erythrocytes detect zinc and iron only in the Mn<sup>2+</sup>-independent one. *FEBS Lett.* **447**, 29-33.
133. Oaks, W., DiTunno, J., Magnani, T., Levy, H., and Mills, L. (1960). Cantharidin poisoning. *Arch. Intern. Med.* **105**, 574-582.
134. Oliver, C. J., and Shenolikar, S. (1998). Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front. Biosci.* **3**, 961-972.
135. Pan, A. P., and Hardie, D. G. (2002). A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. *Biochem. J.* **367**, 179-186.
136. Petiot, A., Ogier-Denis, E., Bauvy, C., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., and Codogno, P. (1999). Subcellular localization of the Galphai3 protein and G alpha interacting protein, two proteins involved in the control of macroautophagy in human colon cancer HT-29 cells. *Biochem. J.* **337**, 289-295.
137. Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 992-998.
138. Plomp, P. J., Wolvetang, E. J., Groen, A. K., Meijer, A. J., Gordon, P. B., and Seglen, P. O. (1987). Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **164**, 197-203.
139. Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B. J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S. C., Jennings, I. G., Campbell, D. J., Witters, L. A., Parker, M. W., Kemp, B. E., and Stapleton, D. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr. Biol.* **13**, 867-871.

140. Poli, A., Gordon, P. B., Schwarze, P. E., Grinde, B., Seglen, P. O. (1981). Effects of insulin and anchorage on hepatocytic protein metabolism and amino acid transport. *J. Cell. Sci.* **48**, 1-18.
141. Pugazhenthii, S., Yu, B., Gali, R. R., and Khandelwal, R. L. (1993). Differential effects of calyculin A and okadaic acid on the glucose-induced regulation of glycogen synthase and phosphorylase activities in cultured hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1179**, 271-276.
142. Reggiori, F., and Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell.* **1**, 11-21.
143. Reunanen, H., Punnonen, E. L., and Hirsimäki, P. (1985). Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in mouse liver. V. A cytochemical study on the origin of membranes. *Histochemistry.* **83**, 513-517.
144. Robak, J., and Gryglewski, R. J. (1996). Bioactivity of flavonoids. *Pol. J. Pharmacol.* **48**, 555-64.
145. Rohde, J., Heitman, J., and Cardenas, M. E. (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J. Biol. Chem.* **276**, 9583-9586.
146. Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M. L., and Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol. Toxicol.* **16**, 91-98.
147. Sakoff, J. A., Ackland, S. P., Baldwin, M. L., Keane, M. A., and McCluskey, A. (2002). Anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition of a new generation of cantharidin analogues. *Invest New Drugs.* **20**, 1-11.
148. Samari, H. R., and Seglen, P. O. (1998). Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N<sup>6</sup>-mercaptapurine riboside. Evidence for involvement for AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 23758-23763.
149. Schonthal, A. H. (1998). Role of PP2A in intracellular signal transduction pathways. *Front Biosci.* **3**, 1262-1273.
150. Schonthal, A. H. (1995). Regulation of gene expression by serine/threonine protein phosphatases. *Semin. Cancer Biol.* **6**, 239-48.
151. Schweighofer, A., Hirt, H., and Meskiene, I. (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant. Sci.* **9**, 236-243.
152. Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**, 29-83.
153. Seglen, P. O. (1983). Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol.* **96**, 737-764.
154. Seglen, P. O., and Bohley, P. (1992). Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia.* **48**, 158-172.
155. Seglen, P. O., and Gordon, P. B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **79**, 1889-1892.
156. Seglen, P. O., and Gordon, P. B. (1984). Amino acid control of autophagic sequestration and protein degradation in isolated rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.* **99**, 435-444.
157. Seglen, P. O., Gordon, P. B., and Holen, I. (1990). Non-selective autophagy. *Seminars in Cell Biology.* **1**, 441-448.
158. Seglen, P. O., Gordon, P. B., and Poli, A. (1980). Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **630**, 103-118.



159. Seglen, P. O., Gordon, P. B., Tolleshaug, H., and Hoyvik, H. (1986). Use of [3H]raffinose as a specific probe of autophagic sequestration. *Exp. Cell. Res.* **162**, 273-277.
160. Sheppeck, J. E. 2nd, Gauss, C. M., and Chamberlin, A. R. (1997). Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 1739-1750.
161. Shin, Y. W., Bok, S. H., Jeong, T. S., Bae, K. H., Jeoung, N. H., Choi, M. S, Lee, S. H., and Park, Y. B. (1999). Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **69**, 341-347.
162. Skibola, C. F., and Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 375-383.
163. Stapleton, D., Woollatt, E., Mitchelhill, K. I., Nicholl, J. K., Fernandez, C. S., Michell, B. J., Witters, L. A., Power, D. A., Sutherland, G. R., and Kemp, B. E. (1997). AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett.* **409**, 452-456.
164. Stein, S. C., Woods, A., Jones, N. A., Davison, M. D., and Carling, D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* **345**, 437-443.
165. Strømhaug, P. E., and Seglen, P. O. (1993). Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes). *Biochem. J.* **291**, 115-21.
166. Strømhaug, P. E., Berg, T. O., Berg, K., and Seglen, P. O. (1997). A novel method for the study of autophagy: destructions of hepatocytic lysosomes, but not autophagosomes, by the photosensitizing porphyrin tetra(4-sulphonatophenyl)porphine. *Biochem. J.* **321**, 217-225.
167. Strømhaug, P. E., Berg, T. O., Fengsrud, M., and Seglen, P. O. (1998). Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochem. J.* **335**, 217-224.
168. Saganuma, M., Fujiki, H., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K., and Sugimura, T. (1988). Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**, 1768-1771.
169. Svensson, S., and Forlin, L. (2004). Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquat. Toxicol.* **66**, 405-418.
170. Sæter, G., Schwarze, P. E., Nesland, J. M., Juul, N., Pettersen, E. O., and Seglen, P. O. (1988). The polyploidizing growth pattern of normal rat liver is replaced by divisional, diploid growth in hepatocellular nodules and carcinomas. *Carcinogenesis.* **9**, 939-945.
171. Tanida, I., Komatsu, M., Ueno, T., and Kominami, E. (2003). GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 637-644.
172. Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., and Kominami, E. (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J. Biol. Chem.* **276**, 1701-1706.
173. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **36**, 2503-2518.
174. Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T., Dominguez R. (2004). Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* **429**, 780-784.
175. Till, J. S., and Majmudar, B. N. (1981). Cantharidin poisoning. *South Med. J.* **74**, 444-447.
176. Toivola, D. M., Eriksson, J. E., and Brautigan, D. L. (1994). Identification of protein phosphatase 2A as the primary target for microcystin-LR in rat liver homogenates. *FEBS Lett.* **344**, 175-180.

177. Toivola, D. M., Goldman, R. D., Garrod, D. R., and Eriksson, J. E. (1997). Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J. Cell Sci.* **110**, 23-33.
178. Warden, S. M., Richardson, C., O'Donnell, J. Jr., Stapleton, D., Kemp, B. E., and Witters, L. A. (2001). Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J.* **354**, 275-283.
179. Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003a). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* **13**, 2004-2008.
180. Woods, A., Salt, I., Scott, J., Hardie, D. G., and Carling, D. (1996). The  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Lett.* **397**, 347-351.
181. Woods, A., Vertommen, D., Neumann, D., Turk, R., Bayliss, J., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., and Rider, M. H. (2003b). Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 28434-28442.
182. Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **313**, 453-458.
183. Zolnierowicz, S. (2000). Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1225-1235.



Dynamic aspects of toxin-induced alterations in AMP-activated protein kinase and autophagy in isolated rat hepatocytes

Mai Britt Dahl, Tonje Asmyhr and Per O. Seglen \*

Proteomics & Mammalian Cell Biology Section, Department of Cell Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Montebello, N-0310 Oslo, Norway

Running title: Toxin-induced AMPK alterations

41 pages

11 figures

\*Corresponding author: Per O. Seglen, professor dr. philos, Department of Cell Biology, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, N-0310 Oslo, Norway. Telephone: +47 22935947; Fax: +47 22934580; E-mail: per.seglen@labmed.uio.no

## KEYWORDS

Acetyl-CoA carboxylase, AMPK, autophagy, cantharidin, hepatocytes, naringin, okadaic acid, phosphorylation

## ABBREVIATIONS

ACC, acetyl-CoA carboxylase; AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside; AMPK, AMP-activated protein kinase; JNK, C-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase, LDH, lactate dehydrogenase; LKB1, interacting protein-1, MAPK, mitogen-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; OA, okadaic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PP, protein phosphatase; SEK1, SAPK/Erk kinase; SDS, sodium dodecyl sulphate; S6K, S6 kinase.

## SUMMARY

In isolated rat hepatocytes, okadaic acid and cantharidin activate AMP-activated protein kinase (AMPK) by a naringin-sensitive and a naringin-resistant mechanism respectively, probably through inhibition of protein phosphatases PP2A and PP1, respectively.

The activating phosphorylation of AMPK $\alpha$  at Thr172 (detected by immunoblotting with a pThr172-specific antibody) induced by a 1-h treatment with okadaic acid was subsequently very stable at all toxin concentrations tested (30-100 nM), persisting even 2 h after drug removal. AMPK phosphorylation induced by cantharidin (30  $\mu$ M) was also completely stable for 2 h after removal of the toxin. Similarly, in correlation with the stable (Thr172) AMPK $\alpha$  phosphorylation, autophagy was inhibited in an irreversible manner upon incubation with 30 or 50 nM okadaic acid.

The stress-activated protein kinases, SAPK/Erk kinase (SEK1) and C-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase (JNK), as well as S6 kinase and its substrate, S6, have been suggested as downstream components in a LKB1/AMPK-initiated signalling pathway and are phosphorylated following toxin treatment. However, unlike AMPK, all these phosphoproteins showed a reversal of phosphorylation upon toxin removal, questioning their roles as downstream mediators in an autophagy-regulating pathway.

At 30 nM and higher okadaic concentrations, AMPK phosphorylation was evident in immunoblots as at least three distinct and adjacent bands, the uppermost low-mobility form being predominant. This multi-phosphorylated AMPK was clearly enzymatically active *in situ*, as shown by the effective phosphorylation of its direct substrate, acetyl-CoA carboxylase (ACC) at Ser79. With a shorter incubation time (20 min) as well as at lower okadaic acid concentrations (10-15 nM), the monophosphorylated high-mobility form was the only band present. This monophosphorylated AMPK appeared to be enzymatically inactive in relation to ACC phosphorylation, but still seemed to be able to suppress autophagic sequestration significantly. In addition, monophosphorylated AMPK allowed the phosphorylation of SEK1 (pThr261), JNK (pThr183/Tyr185) and S6K (pThr421/Ser424), but not of S6 (pSer235/236). Thus, mono- and multi- (full) phosphophorylated AMPK seem to have slightly different substrate preferences.

For further examination of the Thr172 AMPK immuno-stained bands, isoelectric focusing (IEF) and 2-D gel electrophoresis were utilized as protein separation methods. Identification by these techniques has been a difficult task, since phosphorylated AMPK has

not been detectable. By using a general antibody against the AMPK $\alpha$  subunit, three distinct spots were detected after IEF. Two of these were identified as the  $\alpha 2$  isoform.

## INTRODUCTION

Protein phosphorylation and dephosphorylation are among the main mechanisms involved in regulating eukaryotic cellular processes. Target proteins are phosphorylated at distinct sites by protein kinases, and specifically dephosphorylated at the same sites by protein phosphatases (Hunter, 1995). AMP-activated protein kinase (AMPK) is a serine/threonine protein kinase and a heterotrimeric enzyme complex involved in regulating cellular energy homeostasis. The AMPK complex is a very conserved protein kinase found in most higher eukaryotes, with well-known homologues among plants, banana flies, and yeast (Woods et al., 2003b). The protein kinase is assumed to function as a metabolic sensor, and is activated by different types of stress-situations that interfere with the intracellular AMP:ATP ratio (energy balance) (Hardie et al., 2003). To accomplish full activation, Thr172 in the catalytic subunit must be phosphorylated by the upstream protein kinase, LKB1 (interacting protein-1) (Hawley et al., 1996; Woods et al., 2003a). Activated AMPK responds by inactivating ATP-utilizing anabolic pathways and activating ATP-producing catabolic pathways, either through activating or inactivating phosphorylations of different key proteins involved in these processes (Stein et al., 2000).

The AMPK-complex consists of three different subunits: a catalytic  $\alpha$  subunit, and regulatory  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. There are different isoforms for each of the three subunits, encoded by either two or three genes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ), that can give rise to twelve different holoenzyme variants (Hardie, 2003). In addition to the main phosphorylation site, Thr172, additional phosphorylation sites have been identified within the  $\alpha$  subunit, i. e. Thr258 and Ser485 (Ser491 in  $\alpha 2$ ) (Woods et al., 2003b).

Autophagy is among the main processes in eukaryotes responsible for degradation of long-lived proteins and other macromolecules (Yoshimori, 2004). The process involves an initiating sequestration of cytoplasm into membrane-delimited vacuoles. The sequestering membrane cisternae are termed phagophores, while the membrane-delimited vacuoles are called autophagosomes. These autophagosomes are able to fuse with endosomes from the endocytotic pathway, making an intermediate compartment, the amphisome. Both autophagosomes and amphisomes deliver their contents to the lysosomes for final degradation (Fengsrud et al., 2000; Fengsrud et al., 2004).

Protein phosphorylation has been suggested to be an autophagy-regulatory mechanism, since the algal toxin and protein phosphatase inhibitor, okadaic acid, has been



shown to inhibit autophagy (Seglen et al., 1990). Together with other naturally occurring toxins (cantharidin, calyculin A, microcystin-LR and tautomycin), okadaic acid has been found to induce overphosphorylation of AMPK as well (Samari et al., 2005). All these toxins inhibit protein phosphatase (PP) 1 or PP2A, but with different potencies (Fujiki & Suganuma, 1993). The okadaic acid-induced (Thr172) AMPK $\alpha$  phosphorylation is naringin-sensitive, and probably involves a PP2A-inhibitory mechanism, while cantharidin uses a naringin-resistant mechanism that possibly includes inhibition of PP1 (Larsen et al., 2002; Samari et al., 2005).

In the present study, experiments were designed to obtain a reversal of toxin-induced AMPK phosphorylation, in order to examine AMPK dephosphorylation mechanisms. Unexpectedly, both okadaic acid and cantharidin induced irreversible AMPK phosphorylations that were stable for at least 2 h after toxin removal. This offered a unique opportunity to investigate the stability and degree of AMPK phosphorylation (mono- vs. multiphosphorylation) in relation to the stability and specificity of its downstream effects (autophagy and protein phosphorylation).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Reagents*

Okadaic acid was obtained from Alexis Biochemicals (Läufelfingen, Switzerland), cantharidin from Calbiochem (San Diego, CA, USA), and naringin from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Phosphospecific antibodies against Thr172-phosphorylated AMPK $\alpha$ , Thr421/Ser424-phosphorylated S6K, Ser235/Ser236-phosphorylated S6, Thr261-phosphorylated SEK1/MKK4, Thr183/Tyr185-phosphorylated JNK, Ser79-phosphorylated ACC, as well as antibodies against total AMPK $\alpha$ , total LKB1, and horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG antibody, were all purchased from Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA). Antibodies against AMPK $\alpha$ 1, AMPK $\alpha$ 2, and horseradish peroxidase-linked donkey anti-goat IgG antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

Sodium dodecyl sulphate (SDS), acrylamide and bisacrylamide were obtained from BioRad (Hercules, CA, USA). Methanol, acetic acid, NaCl and D-saccharose were from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA). Ammonium persulphate and Coomassie Brilliant Blue G-250 were from Serva (Heidelberg, Germany), dry milk powder was from Nestlé (Vevey, Switzerland), and nitrocellulose membranes were from Osmotics (Westborough, MA, USA).

Rainbow molecular weight markers (RPN 755, RPN 756 and RPN 800), and the ECL/ECL Plus western blot detection kit/system were from Amersham Biosciences (Little Chalfont, Bucks, UK). Both sodium orthovanadate and sodium fluoride were from Sigma Chem. Co. (Saint Louis, MO, USA). The Protease Inhibitor Cocktail Set III was from Calbiochem (San Diego, CA, USA).

Immobiline DryStrip pH 3-10 (18 cm) and IPG buffer pH 3-10 were from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). 17 cm ReadyStrip IPG strips (pH 5-8) were from BioRad (Bedford, MA, USA). Nanosep Centrifugal Devices with Omega membrane (10 K) were purchased from Pall Life Sciences (Hercules, CA, USA), while Ultrafree-0.5 PBQK Centrifugal Filter Units (50K and 100K) were obtained from Millipore (Ann Arbor, MI, USA).

Analytical reagents for measuring lactate dehydrogenase (LDH) were from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Nycodenz was obtained from Nycomed Pharma AS (Oslo, Norway) and leupeptin was purchased from Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan). Other biochemicals were purchased from Sigma Chem. Co. (Saint Louis, MO, USA).

### ***Animals and cells***

Hepatocytes were isolated from 18-h starved male Wistar rats (250-300 g; Harlan UK Ltd., Shaws Farm, Oxon, UK) by two-step collagenase perfusion (Seglen, 1976), purified by differential centrifugation, and resuspended in a suspension buffer to which was added 2 mM  $Mg^{2+}$  and 15 mM pyruvate (Seglen, 1976). A successful perfusion gave approximately 3 g wet mass of cells containing > 90 % intact hepatocytes. Cell quality and viability were determined based on Trypan-blue exclusion and light microscopy.

For immunoblotting studies, the cells were incubated as 2-ml aliquots of diluted cell suspension in Sarstedt (Newton, NC, USA) Petri-dishes (60x15 mm) at 37° C. Each dish contained 200  $\mu$ l cell suspension corresponding to about 20 mg cells (wet mass) and 1700  $\mu$ l suspension buffer fortified with 2 mM  $Mg^{2+}$  and 15 mM pyruvate. In addition, each Petri dish was supplemented with 20  $\mu$ l of okadaic acid, cantharidin, naringin or DMSO (dimethyl sulfoxide), as well as 80  $\mu$ l 0,9 % NaCl (total volume: 2 ml/Petri-dish). However, when both okadaic acid and naringin were added to the same dish, the volume of each drug was reduced to 10  $\mu$ l without any alteration of final concentration.

Total incubation time was variable according to each experimental procedure. All incubations were divided into three incubation steps at 37 °C: preincubation (20 min), incubation (20, 60 or 120 min), and reincubation (0, 3, 10, 30, 60, 90 or 120 min). Between incubation and reincubation, the cells were washed twice with ice-cold saline-buffered washing buffer (148 mM  $Na^+$ , 6.7 mM  $K^+$ , 1.2  $Ca^{2+}$ , 151 mM  $Cl^-$ , pH 7.4) followed by centrifugation at 600 rev/min for 4 min (4 °C); the washing was repeated once. The cells were kept cold (4 °C) throughout the whole washing procedure. The sedimented pellets were dissolved in heated (37 °C) suspension buffer before a transfer to new Petri-dishes. 0.9 % NaCl and okadaic acid/cantharidin were included again in the dishes prior to the reincubation-step.

### ***1-D gel electrophoresis and immunoblotting***

The reincubation step was terminated by adding 4 ml of ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and the cells were centrifuged at 1600 rpm for 5 minutes (in the cold; 4 °C). The sedimented cells were lysed for 30 minutes on ice by adding 700  $\mu$ l lysis buffer containing 0.4 % SDS, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM sodium pyrophosphate, and 20 mM Tris-base, pH 7.2. The lysed cells were frozen at -75 °C before sonication for 10 sec/sample. The resulting cell extracts were diluted with an equal volume of SDS gel-loading buffer (1 % w/v

SDS, 10 % w/v mercaptoethanol, 0.1 % v/v bromophenol blue, 13.4 % v/v glycerol, 4.8 mM deoxycholic acid, 1 % v/v IGEPAL CA-630, 120 mM Tris-HCl, pH 6.8) and boiled for 5 min at 95 °C.

For measuring the protein contents of the cell extracts, the BCA protein assay kit from Pierce (Rockford, USA) was used according to the Bradford method (Bradford, 1976).

Samples of cell extracts containing 20 µg protein were separated by SDS gel electrophoresis for approximately 45-75 min at 200 V in 10 % polyacrylamide gels containing 0.1 % SDS. The different electrophoresis time lengths were determined based on the molecular masses of the proteins of interest. Molecular weight markers were included in all gels. The separated proteins were then transferred to a nitrocellulose blotting membrane (45 µm pore size) using a semi-dry transfer unit (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) with Towbin's blotting buffer (192 mM glycine, 20 % methanol, 25 mM Tris-base, pH 8.3).

The nitrocellulose membranes were blocked by 2 h incubation with 5 % dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1 % Tween-20 (TBS-t) or 5 % bovine serum albumin (BSA), and washed three times for 15 min in TBS-t. For detection of total or phosphorylated (pThr172) AMPK $\alpha$ , (pThr421/Ser424) S6K, (pSer235/Ser236) S6, (pThr261) SEK1/MKK4, (pThr183/Tyr185) JNK or total LKB1, the membranes were incubated overnight at 4 °C with the respective antibodies (diluted 1:1000 in TBS-t/5 % BSA). After washing three times with TBS-t (15 min/wash) the membranes were incubated at room temperature with anti-rabbit-horseradish peroxidase (diluted 1:1000) in TBS-t/5 % BSA, washed three times with TBS-t (15 min/wash) and visualized by chemiluminescence using the ECL Plus Western Detection System and Chemi Genius Bio Imaging System (Syngene Ltd., Cambridge, UK) as a digital detector. In the end, proteins in the SDS gels were visualized by Coomassie Brilliant Blue G-250 staining.

For optimal detection of acetyl-CoA carboxylase, 20 µg protein was separated in a 6 % polyacrylamid gel containing urea (6 M). Towbin's blotting buffer was used without added methanol. Antibodies against AMPK $\alpha$ 1 and AMPK $\alpha$ 2 were diluted 1:100 in TBS-t, while donkey anti-goat IgG antibody was diluted 1:5000 in TBS-t. The rest of the western blot procedure was followed as usual.

### ***Measurement of autophagy***

Autophagy was measured as the net sequestration of an endogenous cytosolic enzyme, lactate dehydrogenase (LDH), into sedimentable autophagic vacuoles (mostly autolysosomes) during

incubation at 37° C. The proteinase inhibitor leupeptin (0.3 nM) was added to all the cells, preventing intralysosomal LDH degradation. The incubation was similarly divided into three different steps: preincubation (20 min), incubation (20, 60 or 120 min), and reincubation (0, 30, 60, 90 or 120 min). Between the incubation and reincubation-step, the cells were centrifuged and washed twice with ice-cold saline-buffered washing buffer (600 rev/min for 4 min). After reincubation, the cells were sedimented at 1600 rev/min for 4 min in ice-cold unbuffered (electrolyte-free) 10 % sucrose; the centrifugation step was repeated once.

The cell pellet was resuspended in 500 µl 10 % sucrose before electrodisruption by a single voltage (2kV/cm, 1.2 µFarad) pulse through the cell suspension. The cell suspensions were then transferred to new tubes containing 0,5 ml ice-cold post-disruption buffer (100 mM potassium phosphate, 2 mM EDTA, 2 mM DTT and 0.05 mM sucrose, pH 7.5). 600 µl of the disrupted cells were centrifuged through a 4 ml 8 % Nycodenz gradient (100 mM potassium phosphate, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,05 mM sucrose, pH 7.5). After 15 min centrifugation (20 000 rev/min) and removing of the supernatant (cytosol), the pellets containing autophagic vacuoles were washed with 10 % sucrose before freezing at -75 °C. The disrupted cells in the post-disruption buffer were also frozen down at -75 °C before measuring the LDH-content. The autophagic vacuoles were resuspended in 600 µl resuspension buffer (50 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT, pH 7.5), while the 50 µl of the disrupted cells (containing total cellular content) were resuspended in 600 µl 10 mM KPP.

The amount of LDH in the resulting cytosol-free sediment was measured and expressed as per cent (autophagically sequestered per hour) of the total cellular LDH in the sample (Kopitz et al., 1990). All LDH measurements were done by UV-spectrometry, measuring a fall in the NADH concentration at 340 nm through the use of an autoanalyzer (Technicon SRA 2000).

## ***2-D PAGE***

Cell extracts containing 400 µg or 500 µg protein (frozen down at -75 °C in 10 % sucrose or 3 % CHAPS), were dissolved in a rehydration buffer (6 M urea, 2 M thiourea, 2 % CHAPS, 0.3 % DTT and 2.5 % IPG buffer), before sonication (10 sec/sample). Rehydration and isoelectric focusing were performed using 18 cm linear Immobiline DryStrips (IPG, pH 3-10) or 17 cm ReadyStrips (IPG, pH 5-8) and Amersham Bioscience IPGphor Isoelectric Focusing System apparatus. The strips were rehydrated for 12 h, followed by three focusing steps for totally 6 h with an increasing voltage strength (1 h: 500 volt, 1 h: 1000 volt, 4 h: 8000 volt).

The focused strips were then equilibrated in a two-step process using an equilibration buffer (2 % SDS, 6 M urea, 30 % glycerol and 50 mM 1.5 M Tris-Cl, pH 8.8). The purpose was to disrupt the disulphide bonds in the proteins and to prevent their reformation. In the first step, the equilibration buffer was supplemented with 0.1 % DTT. In the second step, the equilibration buffer was supplemented with 0.45 % iodacetamide. Both steps were performed for 15 min in room temperature using a bench shaker.

Equilibrated strips were placed on top of a vertical SDS PAGE gel (10 % gel, 18x18 cm). The subsequent electrophoresis was performed using the BioRad Protean II apparatus. The proteins were separated for approximately 19 h and 15 min with a constant volt-value (1000 volt), but different maximum mA-values (15 min: 40 mA, 18 h: 14 mA, 1 h: 20 mA).

The gels were electroblotted using the semi-dry blotting apparatus from BioRad and Towbin`s blotting buffer. During the blotting process, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m pore size). The membranes were blocked for 2 h before incubation with an antibody against the protein of interest. The immunoblotting procedure was further identical to the one described for 1-D gel electrophoresis.

Finally, the proteins in the gels were visualized by an aldehyde-free silver staining (as described by Heukeshoven & Dernick, 1985) or a Coomassie Brilliant Blue G-250 staining.

### ***Blotting of IPG strips***

Focused IPG-strips were also electroblotted directly to nitrocellulose membranes (0.45  $\mu$ m pore size) using the semi-dry blotting apparatus from BioRad. The following procedure was then as already described for immunoblotting.

## RESULTS

### *Okadaic acid induced naringin-sensitive phosphorylation of AMPK*

Okadaic acid has been shown to induce a dose-dependent Thr172 AMPK $\alpha$  phosphorylation, used as an indicator of AMPK activation. To identify the minimum okadaic acid concentration necessary for Thr172 phosphorylation, isolated rat hepatocytes were incubated with different okadaic acid concentrations (10-60 nM) at 37 °C for 1 h. The resulting Thr172 AMPK $\alpha$  phosphorylation was detected by immunoblotting, using a specific antibody against this phosphorylation site. In unstimulated cells a faint single band around 60 kDa could usually be detected, but the band intensity was very variable, possibly reflecting varying degrees of preparation-associated hypoxia and consequent AMP generation. Some unspecific antibody detection of unphosphorylated AMPK $\alpha$  could also contribute. The okadaic acid-induced Thr172 phosphorylation of AMPK $\alpha$  was detected as an increased staining of the preexisting band seen in unstimulated cells, and the additional appearance of at least two adjacent low-mobility bands. At 10 nM okadaic acid, Thr172 phosphorylation was evident only in the high-mobility band, but at increasing okadaic acid concentrations (30-60 nM) at least two low-mobility bands were present as well and gave rise to a thick composite band probably corresponding to phosphorylation at more additional sites (Fig. 1). At 30 nM okadaic acid and higher toxin concentrations, the highest mobility band was the most predominant. Previous experiments performed in our laboratory have shown that the low-mobility forms of AMPK were non-detectable prior to such toxin-treatment. By pretreating the cell extracts with alkaline phosphatase before 1-D gel electrophoresis, the low-mobility bands were eliminated suggesting that they most probably appeared due to toxin-induced phosphorylation of AMPK $\alpha$  (Samari et al., 2005).

Okadaic acid has been shown to be a very potent stimulant of AMPK (Larsen et al., 2002; Samari et al., 2005), and immunostaining with the pThr172 AMPK $\alpha$  antibody indicated that more than 10 nM okadaic acid was necessary to obtain multiple (full) phosphorylation of AMPK $\alpha$  (Fig. 1). Naringin (100  $\mu$ M) antagonized the pThr172 phosphorylation of AMPK induced by 50 nM okadaic acid. This antagonism could be detected as naringin preventing the formation of the phosphorylated low mobility forms, as well as strongly reducing the intensity of the high mobility band (Fig. 1). As seen in Fig. 1, naringin alone did not cause any change in pThr172 AMPK immunostaining.

To verify that the pThr172 phosphorylation was due to toxin-induced stimulation, and not to differences in protein amounts, a general antibody against the AMPK $\alpha$  subunit was used. This antibody detects both phosphorylated and unphosphorylated AMPK, and immunoblotting analysis showed that the total AMPK amount was similar in all protein samples. The phosphorylation pattern obtained with the general AMPK $\alpha$  antibody correlated with the one obtained with the phosphospecific Thr172 antibody, indicating that the AMPK $\alpha$  low-mobility forms were not pre-existent, but due to the toxin-treatment (Fig. 2A).

LKB1 has been identified as the upstream protein kinase responsible for Thr172 AMPK $\alpha$  phosphorylation (Woods et al., 2003a). It was therefore interesting to observe that immunostaining with a general antibody against LKB1 showed bands of similar intensity in protein samples from unstimulated and okadaic acid treated hepatocytes (Fig. 2B). There were no detectable mobility shifts or stronger immunostaining intensity due to okadaic acid treatment, possibly excluding LKB1 as a target for the algal toxin.

#### *Irreversibility of okadaic acid-induced AMPK phosphorylation*

To test whether the okadaic acid-induced AMPK phosphorylation was reversible, experiments were designed to observe dephosphorylation. However, isolated rat hepatocytes treated with okadaic acid (30-100 nM) for 1 h maintained a stable multi-phosphorylation even 2 h after drug removal (Fig. 3).

This apparently irreversible phosphorylation could conceivably be a consequence of the relative high okadaic acid concentrations used. However, as shown in Fig. 3, even the monophosphorylation induced by 10 nM okadaic acid was stable for 2 h. The dose-response characteristics obtained with okadaic acid suggested that the minimum concentration necessary for full (multi) AMPK phosphorylation after 1 h incubation lay somewhere between 10 and 30 nM. It was reasonable to believe that a concentration closer to this minimum concentration would be easier to reverse than higher toxin concentrations like 50 and 100 nM. Therefore, 15 nM okadaic acid as well as a shorter incubation period (20 min) was chosen for further dephosphorylation studies.

After 20 min incubation with 15 nM okadaic acid, the high-mobility phosphorylation band was usually the only band evident upon immunostaining. In the experiment shown in Fig. 4A, the two low-mobility bands were not detectable before ~80 min incubation. This observation indicates that the phosphorylation rate is slow due to the low drug concentration. The slow Thr172 phosphorylation obtained when using 15 nM okadaic acid was non-



reversible for up to 2 h after toxin removal, excluding that lower okadaic acid concentrations are more easily reversed than higher concentrations. Immunostaining with a general antibody against the AMPK $\alpha$  subunit showed that the total AMPK amount was similar in all protein samples, and that multiple bands only appeared slowly in the continuous presence of okadaic acid (Fig. 4B).

In occasional experiments with 15 nM okadaic acid and 20 min incubation, the two additional low-mobility AMPK phosphorylation forms could be detected as faintly staining bands (Fig. 4C). However, the high mobility form was predominant, and no reversal upon okadaic acid withdrawal was observed with any band. These observations suggest that the appearance of the low-mobility phosphorylation forms is highly dependent on the incubation time as well as on the drug concentration.

#### *AMPK full (multi) phosphorylation correlates with AMPK activity*

Activated AMPK phosphorylates (at Ser79) and inhibits the activity of acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Hardie & Pan, 2002), a rate-limiting enzyme involved in fatty acid synthesis. To check how phosphorylation of AMPK correlated with AMPK activity, the phosphorylation of ACC in okadaic acid-treated hepatocytes was examined using a specific antibody against pSer79 ACC. At 30 nM okadaic acid, AMPK phosphorylation correlated with phosphorylation at Ser79 in ACC, indicating that the phosphorylated AMPK in fact was enzymatically active (Fig. 5A). Surprisingly, at 15 nM okadaic acid, when just the high-mobility phosphorylated AMPK band was evident, ACC was not phosphorylated at Ser79. This observation suggests that AMPK has to be phosphorylated at two or more positions to be enzymatically active. However, irreversible ACC (Ser79) phosphorylation was observed upon 2 h incubation with okadaic acid (15 nM), and subsequent 2 h reincubation without the drug (Fig. 5B). Interestingly, even the weakly staining low-mobility bands seen in Fig. 4C were apparently sufficient for full protein kinase activity (Fig. 5C). Both these AMPK forms and the ACC (Ser79) phosphorylation were sustained and irreversible, even at 2 h after toxin withdrawal (Fig. 5C).

#### *Okadaic acid stimulation of other phosphoproteins*

Previous experiments performed in our laboratory have shown additional protein kinases being both okadaic acid and naringin sensitive at distinct phosphorylation sites. These protein kinases were identified through western blotting using antibodies against these specific phosphorylation sites. The stress activated protein kinases, SAPK/Erk kinase (SEK1)

and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK), as well as S6 kinase (S6K) and ribosomal protein S6 were all proteins phosphorylated upon okadaic acid stimulation (Larsen et al., 2002). These observations suggest that these phosphoproteins could be possible downstream signal mediators in an LKB1/AMPK-initiated signalling pathway.

By using antibodies against (pThr261)SEK1, (pThr183/Tyr185)JNK, (pThr421/Ser424)S6K and (pSer235/Ser236)S6, the respective phosphorylations were investigated further. Hepatocytes were treated with 40 nM okadaic acid for 1 h, and then reincubated without toxin addition. Surprisingly, 2 h after drug removal SEK1, JNK, S6K and S6 all seemed to show some degree of reversibility in the phosphorylations induced by okadaic acid, despite the irreversibility of the AMPK phosphorylation (Fig. 6). The reversibility was more obvious for SEK1 and JNK compared to the others.

It would clearly be of interest to investigate the phosphorylation patterns of these possible downstream mediators for AMPK when the okadaic acid concentration was lowered (to 15 nM) and the incubation time was shortened (to 20 min) to maintain the enzyme in a monophosphorylated state. SEK1, JNK and S6K were all phosphorylated after 20 min incubation with okadaic acid, in correlation with monophosphorylated AMPK. However, a distinct S6 phosphorylation was not obtained within the 20 min of incubation, possibly due to a slower phosphorylation or more effective dephosphorylation of its phosphorylation sites. Multi-phosphorylated AMPK (80/140 min incubation) correlated with a stronger phosphorylation pattern of all the putative downstream components. In contrast to AMPK, S6K and JNK showed a significant phosphorylation reversal at 2 h after okadaic acid withdrawal (Fig 7). Phosphorylation of these putative AMPK-regulated proteins thus correlates with AMPK monophosphorylation and multi-phosphorylation, but the reversibility of some of the phosphorylations indicates that other regulatory mechanisms are (also) involved.

#### *Cantharidin-induced AMPK phosphorylation*

Two different toxin-induced AMPK activation mechanisms have been identified. Different naturally occurring protein phosphatase inhibitors belonging to the okadaic acid class of toxins inhibit PP1 or PP2A with different potencies (Fujiki & Suganuma, 1993). Cantharidin, tautomycin and calyculin A activate AMPK through a naringin-resistant, possibly PP1-involving mechanism, whereas okadaic acid and microcystin-LR activate AMPK through a naringin-sensitive mechanism that probably involves PP2A inhibition (Larsen et al., 2002; Samari et al., 2005). Since cantharidin uses an AMPK activation

mechanism different from okadaic acid, it was interesting to observe that cantharidin (30  $\mu\text{M}$ ) treated hepatocytes gave the same stable AMPK multi-phosphorylation pattern as observed with okadaic acid (Fig. 8). It is therefore reasonable to believe that other toxins belonging to the okadaic acid class of compounds will induce similar irreversible AMPK phosphorylations as well.

#### *Stable okadaic acid induced-inhibition of autophagy*

Okadaic acid has been shown to be a very potent inhibitor of autophagic lactate dehydrogenase (LDH) sequestration in hepatocytes (Samari et al., 2005). Autophagic activity was determined by measuring the content of endogenous LDH sequestered into autophagic vacuoles relative to the total cellular LDH content. The autophagy inhibition was complete at all the okadaic acid concentrations investigated, i. e., 50 nM (Fig. 9A), 30 nM (Fig. 9B) or 15 nM (Fig. 9C-D). The fact that okadaic acid was able to suppress hepatic autophagy strongly at nanomolar concentrations indicates a PP2A-associated mechanism that is, furthermore, naringin-sensitive (Gordon et al., 1995). Earlier observed parallel effects induced by okadaic acid on AMPK and autophagy may indicate that the autophagy inhibition is mediated through AMPK (Samari et al., 2005).

Previous experiments also performed in our laboratory (Holen et al., 1993) have shown that the autophagy-inhibitory effect of okadaic acid (15 nM) was reversible if the drug was removed after 20 or 60 min of incubation. Based on my own results concerning stable AMPK phosphorylation, it would seem more likely that the okadaic acid-induced autophagy inhibition would persist after such drug removal. Isolated rat hepatocytes were incubated with okadaic acid (30 or 50 nM) for 1 h to obtain complete autophagy inhibition before drug removal and subsequent reincubation.

As shown in Fig. 9A-B, the inhibition of autophagy induced by 30-50 nM okadaic acid indeed was irreversible even 2 h after cessation of okadaic acid treatment, supporting my observations regarding stable AMPK phosphorylation. With 15 nM okadaic acid, 20 min of treatment was apparently insufficient for detectable autophagy suppression (Fig. 9C), an observation similar to its effect on AMPK phosphorylation and AMPK activity. The subsequent removal of okadaic acid resulted in an incomplete inhibition that could easily be mistaken for a reversal. With a 2 h treatment, however, the effect of 15 nM okadaic acid was irreversible (Fig. 9D). This stability correlation strengthens a connection between AMPK and autophagy as previously suggested.

### *Variants of the AMPK $\alpha$ subunit*

AMPK has been shown to be a heterotrimeric complex consisting of a catalytic  $\alpha$ -subunit and two regulatoric subunits,  $\beta$  and  $\gamma$ . Co-expression of the regulatory subunits is required for functionality and optimal catalytic activity (Stapleton et al., 1997). The catalytic  $\alpha$ -subunit contains the main phosphorylation site, Thr172, necessary for AMPK activity (Stein et al., 2000). There have been identified two genes encoding the two isoform-variants of the  $\alpha$ -subunit,  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  (Hardie, 2003).

In addition to increasing the pThr172 immunoreactivity of the single AMPK band seen in unstimulated cells, okadaic acid treatment also induced immunoreactivity at at least two adjacent bands of lower mobility as previously described. Since Thr172 phosphorylation was detectable in all the bands, the reduced mobility would most likely reflect heterogenous phosphorylation at other sites, e. g. at the two known  $\alpha$  subunit phosphorylation sites, Thr258 and Ser485 (Ser491 in the  $\alpha 2$  subunit).

In an attempt to better resolve the three bands seen after okadaic treatment, we tried isoelectric focusing (IEF) on immobilized 18 cm IPG-strips (pH-values ranging from 3-10). After direct electroblotting, a general antibody against AMPK $\alpha$  was used to identify both phosphorylated and unphosphorylated spots corresponding to AMPK. The pI values of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  that have been reported as 7.3 and 7.6 (<http://us.expasy.org/sprot/>) would be expected to be shifted towards more acidic pI-values due to phosphorylation. In extracts from both control cells and okadaic acid treated cells, three distinct spots were identified in the pH range around 7 after IEF (Fig. 10A-B). Interestingly, immunoblotting with the general AMPK $\alpha$  antibody revealed no major differences in the spot positions between okadaic acid-treated and untreated cells (Fig. 10A-B). This would seem to indicate a lack of phosphorylated AMPK forms in the gels after IEF.

The three distinct spots (around pH 7-8) identified by the general antibody against AMPK $\alpha$  were investigated further by using more specific antibodies against the two  $\alpha$ -subunit isoforms,  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ . Immunoblotting with an  $\alpha 2$  antibody indicated that two of the three spots probably corresponded to  $\alpha 2$  (Fig. 10C). By comparing the immunoblots after using general AMPK $\alpha$  antibody and an antibody against the AMPK  $\alpha 2$  isoform, the two most basic spots were found to represent  $\alpha 2$ . In contrast, the AMPK $\alpha 1$  antibody failed to detect any spots at all after IEF.

It was of interest to try to investigate the same focused protein samples using the phosphospecific pThr172 antibody against AMPK. Unfortunately, the identification of

phosphorylated AMPK by IEF has not been very successful. It seemed as if the signal disappeared somewhere between cell lysis and immunostaining of the IPG strip. To try to find possible reasons for this disappearance, a further examination was necessary.

*A methodological comparison between isoelectric focusing and 1-D gel electrophoresis.*

A stepwise comparison between 1-D gel electrophoresis- and isoelectric focusing procedures could perhaps solve some of the difficulties associated with identification of (pThr172) AMPK after IEF, since the same phosphospecific (pThr172) identification has been quite good after running 1-D gels.

To see if the lack of pThr172 immunostaining could be due to protein phosphatase activity, three different protein phosphatase inhibitors: okadaic acid (100 nM), sodium fluoride (2 mM) and sodium orthovanadate (50  $\mu$ M), were added prior to cell lysis. In addition it was attempted to prevent protein protease activity by adding a cocktail consisting of different protein protease inhibitors (1 mM AEBSF, 0.8  $\mu$ M aprotinin, 50  $\mu$ M bestatin, 15  $\mu$ M E-64, 20  $\mu$ M leupeptin, and 10  $\mu$ M pepstatin). However, neither phosphatase inhibitors nor protease inhibitors facilitated pThr172 AMPK $\alpha$  detection.

Subsequent experiments were performed on 1-D gels with protein samples treated as usual prior to IEF. These comparison steps included using a rehydration buffer instead of lysis buffer, incubating the protein samples overnight (room temperature) corresponding to the rehydration and IEF steps, and the addition of DTT- and iodacetamide solutions to the protein samples to break disulphide bonds and prevent their reformation. The rehydration buffer does not contain the EDTA/EGTA, trizma base, SDS or sodium pyrophosphate found in the lysis buffer. Since SDS is necessary for protein migration in the 1-D gel during electrophoresis, it was added to the protein samples at that step by dilution with SDS gel-loading buffer. In all these subsequent adjustments, pThr172 phosphorylation was still evident after 1-D gel electrophoresis. These observations would suggest that the (pThr172) AMPK detection failure after IEF was not due to the different buffers used by the two separation methods, or the sample treatment before electroblotting of the IPG-strips.

Later tests were performed as adjustments of the IEF procedure. At the electroblotting step, improved transfer of proteins to the nitrocellulose membranes was attempted by running the blotting at higher voltage-values as well as longer time intervals. In other test experiments, the protein samples were just rehydrated, and not focused prior to immunoblotting. Neither of these adjustments led to any pThr172 detection

In order to improve the method for lysing the cells prior to IEF, the detergent CHAPS (3-[(cholamidpropyl)dimethylamino]-1-propanesulfonate) was introduced. CHAPS is a non-denaturing and electrically neutral detergent able to disrupt nonspecific protein interactions (Perdew et al., 1983). A concentration of 3 % CHAPS was chosen, because this concentration was compatible with the IEF procedure. The protein samples treated with 3 % CHAPS as well as a modified rehydration buffer (higher urea- and DTT concentrations and on one occasion without thiourea) were prepared for IEF by using 17 cm IPG strips (pH 5-8). Separation due to both pI and mass was desirable so IEF followed by 2-D gel electrophoresis was performed. However, no distinct spots were obtained after immunoblotting with the phosphospecific Thr172 AMPK $\alpha$  antibody.

To try to verify that the three spots immuno-stained by the general AMPK $\alpha$  antibody actually represented AMPK, and not unspecific antibody binding or background noise, ultrafiltration was utilized. By using specialized filtration tubes, the idea was to purify a protein concentrate containing a more narrow range of proteins (50-100 kDa). For reasons not known, AMPK was held back in the tubes even in cases where the protein should have been in the filtrate.

It was of interest to resolve the three identified spots by IEF further by 2-D gel electrophoresis. Unfortunately, in the subsequent 2-D gel electrophoresis the three distinct spots seen by the direct IPG-strip blotting were not evident. Both the general AMPK $\alpha$  antibody (Fig. 11A-B), as well as the pThr172 AMPK $\alpha$  antibody (Fig. 11C-D) showed, however, a lot of spots that corresponded to unspecific antibody binding. In conclusion, it seems likely that phosphorylated AMPK $\alpha$  may be undetectable due to preparative procedures ahead of 2-D gel electrophoresis. According to the results obtained in this report it seems reasonable to suggest that the phosphoprotein (pThr172 AMPK) fails to be detected as a consequence of the isoelectric focusing procedure, indicating that IEF and subsequent 2-D PAGE are not optimal identification methods for phosphorylated AMPK.

## DISCUSSION

In isolated rat hepatocytes AMPK has been shown to be activated by natural toxins like okadaic acid and cantharidin. Okadaic acid activates AMPK indirectly through a naringin-sensitive and possibly PP2A-inhibitory mechanism, while the activating mechanism followed by cantharidin is naringin-resistant and possibly PP1-inhibitory (Larsen et al., 2002; Samari et al., 2005). Both activation mechanisms result in phosphorylation of the site responsible for protein kinase activity, Thr172 in AMPK $\alpha$ , performed by the upstream protein kinase LKB1 (Stein et al., 2000; Woods et al., 2003a). AMPK activation induced by AICAR (5-amino-4-imidazole carboxamide riboside) treatment does not involve any protein phosphatase inhibitory mechanism, but promotes a naringin-sensitive pThr172 phosphorylation indirectly by mimicking the allosteric AMPK activation by AMP (Samari & Seglen, 1998). Previous studies regarding a connection between AMPK and autophagy have indicated that okadaic acid-induced AMPK activity probably mediates the autophagy-suppressive effects of the toxin (Holen et al., 1993; Kovacs et al., 1998; Samari & Seglen, 1998; Samari et al., 2005). This hypothesis is supported by my present results. In addition, cantharidin as well as AICAR have been shown to suppress autophagic sequestration strongly in isolated hepatocytes (Samari et al., 2005), a suppression probably also mediated through AMPK signalling.

In an attempt to obtain more information regarding possible dephosphorylation mechanisms of AMPK, isolated hepatocytes were incubated with various okadaic acid concentrations to induce (AMPK) phosphorylation, before subsequent toxin removal and reincubation. Surprisingly, the AMPK phosphorylation was persistent, even 2 h after drug removal, at all okadaic acid concentrations tested. Similarly, cantharidin induced a stable phosphorylation, that was irreversible after drug-withdrawal. In correlation with the stable AMPK phosphorylation observed, okadaic acid-induced autophagy inhibition was irreversible, and persisted for at least 2 h after drug withdrawal.

Previous experiments performed in our laboratory have shown that AICAR also induces stable, and irreversible (AMPK $\alpha$ ) phosphorylation. Furthermore, autophagic sequestration was irreversibly as a result of AICAR treatment (Lise Holden, unpublished results). Altogether, these observations indicate a striking long-term stability in the mechanisms underlying AMPK activation and autophagy inhibition.

One explanation for such long-lasting AMPK phosphorylation would be a lack of dephosphorylation, either through protein phosphatase inhibitory mechanisms or, in general,

little protein phosphatase activity towards AMPK. Another possibility is that the stable Thr172 phosphorylation might reflect that the drug molecules are locked inside the hepatocytes once they have entered the cells. In the latter case, it would be difficult to remove the drug simply by reincubation in drug-free medium. It is possible that the toxin influx through the cell membranes is good because of active transport mechanisms, but that the toxin efflux is poor. In general, very little is known about transport mechanisms through cell membranes for toxins like okadaic acid and cantharidin.

Together, previous results and my present results show irreversible AMPK activation by a direct effect of AICAR as well as by indirect toxin effects through naringin-sensitive and naringin-resistant mechanisms. If a lack of dephosphorylation is the cause of this irreversibility, it is possible that activated AMPK may phosphorylate and inactivate components involved in its own dephosphorylation. PP2C has been suggested as the protein phosphatase mainly responsible for dephosphorylation of AMPK at pThr172 in intact hepatocytes (Moore et al., 1991; Davies et al., 1995). In a study performed by Kobayashi et al. (1998), the PP2C $\alpha$  isoform was specifically phosphorylated on the serine residue(-s) when expressed in COS7 cells. This observation shows that PP2C is a phosphoprotein. In the same study, the phosphorylation of PP2C $\alpha$  was increased two-fold by the addition of okadaic acid to the culture medium, and it was speculated that PP2C $\alpha$  was dephosphorylated by endogenous PP1 and/or PP2A (Kobayashi et al., 1998). However, it is still unknown if the stable Thr172 AMPK $\alpha$  phosphorylation reflects the absence of effective protein phosphatase activity or excessive protein kinase activity (LKB1).

Okadaic acid can bind to the catalytic subunits of protein phosphatase PP1 and PP2A. By binding to the subunits, okadaic acid inhibits the activity of these protein phosphatases, being most potent against PP2A relatively to PP1 (Bialojan & Takai, 1988). Experiments performed by Nam et al. (1990) showed that okadaic acid permeated freely through a DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) lipid membrane in a liquid-crystalline state. They therefore suggested that okadaic acid permeates through cell membrane and binds to a receptor, for example, a protein phosphatase, which exists either in the cytosol or in the cell membrane. In comparison, the permeation was inhibited in a gel-state lipid membrane, and it was therefore assumed that mobile lipid molecules are required for OA to permeate through a lipid membrane.

Okadaic acid is a quite hydrophobic compound (Nam et al., 1990), but it has been reported that the permeability of the toxin over erythrocyte membranes is relatively poor,



being much slower compared with calyculin A (Namboodiripad & Jennings, 1996; Favre et al., 1997). In the report presented by Namboodiripad and Jennings (1996), okadaic acid permeation through erythrocyte membranes seemed to be both dependent on temperature and pH. The permeation rate was slower at lower temperatures, and the results indicated that the main permeant species of okadaic acid was the undissociated acid. Lowering the pH strongly accelerated okadaic acid entry into the cells. Another crucial finding was that minimum 1 h incubation time was required as adequate time to obtain an equilibrium across the plasma membrane.

Namboodiripad and Jennings (1996) also reported that okadaic acid-induced PP2A inhibition was not followed by any significant reversal 3 h after okadaic acid removal. It was suggested that this slow reversal was a result of the long half time necessary for okadaic acid permeation (~ 1 h at 37 °C) compared to the relatively short half time required for okadaic acid to suppress PP2A activity.

Such irreversibility correlates with my findings regarding okadaic acid-induced AMPK phosphorylation. Hepatocytes treated with various concentrations of okadaic acid or cantharidin during both incubation (1 h) and reincubation (2 h) were not different from the hepatocytes treated with toxins only during incubation, when analyzed by an antibody against pThr172 AMPK $\alpha$ . It is therefore unlikely that there would be any significant phosphorylation reversal due to longer incubation times after toxin withdrawal.

In relation to my results it seems likely that okadaic acid is taken up in the cells at a rate depending on the absolute drug concentration added. Based on my own findings it seems reasonable to believe that isolated hepatocytes have a relatively poorly developed intracellular defence system against harmful toxins like okadaic acid. 15 nM okadaic acid did result in a phosphorylation at Thr172, but a strong multi-phosphorylation was not seen before 2 h incubation. After 20 min incubation (37°C) with 15 nM okadaic acid, AMPK was only monophosphorylated, detected as a high-mobility band upon immunostaining, sometimes visible in unstimulated cells as well. The phosphorylated high-mobility band was not reversed after 2 h reincubation following drug removal. At AMPK full phosphorylation, there are at least three adjacent bands visible upon pThr172 (AMPK $\alpha$ ) immunostaining, the uppermost band being predominant. At 30 nM and higher okadaic acid concentrations, full (multi) phosphorylation is obtained after 1 h incubation at 37 °C.

To verify that AMPK actually was enzymatically active, both 15 nM- and 30 nM okadaic acid treated cells were immunostained with an antibody against (pSer79) acetyl-CoA

carboxylase (ACC). ACC is a keyenzyme in fatty acid synthesis, and among the substrates phosphorylated and inhibited by AMPK *in vivo* (Ruderman et al., 2003). At 30 nM okadaic acid, AMPK full (multi) phosphorylation correlated with ACC phosphorylation. Surprisingly, at 15 nM okadaic acid when only the monophosphorylated AMPK high mobility-form was present, ACC phosphorylation was absent. This observation indicates that AMPK multiphosphorylation is necessary for an enzymatic activity like ACC (Ser79) phosphorylation. Since the uppermost low-mobility band is the most prominent at AMPK full phosphorylation, the results might suggest that full (multi) phosphorylation is indispensable for AMPK activity. It would be of interest to investigate AMPK phosphorylation versus other physiological substrates as well, for instance 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase, the enzyme catalyzing the rate-limiting step in cholesterol synthesis (Hardie, 2003). The effective phosphorylation of SEK1, JNK and S6K under conditions where AMPK is monophosphorylated may indeed indicate that the latter is not inactive, but merely exhibits a reduced affinity towards ACC relative to other substrates.

It has been suggested that phosphorylation of the regulatory  $\beta$ 1 subunit at Ser108 (possible an autophosphorylation site) is important for AMPK activity (Warden et al., 2001), and previously experiments in our laboratory have shown that the Ser108 AMPK $\beta$ 1 phosphorylation is naringin-sensitive upon okadaic acid induction and that the toxin effect paralleled the effects on AMPK $\alpha$  phosphorylation (Samari et al., 2005). It is possible that  $\beta$ -subunit phosphorylation at Ser108 is a secondary consequence of an okadaic acid-induced AMPK $\alpha$  phosphorylation. In relation to my results, it would be interesting to know if this AMPK $\beta$  phosphorylation corresponds to appearance of the AMPK $\alpha$  low-mobility phosphorylation forms in addition to the high mobility form. Such  $\beta$ -subunit phosphorylation could possible be a response to a stable, sustained AMPK $\alpha$  multiphosphorylation.

Both okadaic acid and cantharidin belong to the okadaic acid class of toxins, a term used for compounds that all inhibit PP1 or PP2A with various potencies (Fujiki & Suganuma, 1993). Previous experiments performed in our laboratory have identified additional protein phosphatase inhibiting toxins, tautomycin, microcystin-LR and calyculin A, as being able to inhibit autophagic activity completely (Holen et al., 1993; Samari et al., 2005). These toxins have also been shown to induce AMPK activation, possibly through protein phosphatase-inhibitory mechanisms, in a naringin-resistant or naringin-sensitive manner (Larsen et al., 2000; Samari et al., 2005). It would therefore be interesting to find out if these toxins

similarly induce irreversible Thr172 AMPK $\alpha$  phosphorylations as well as stable autophagy inhibition. Such uniform irreversibility would detect an important property of activated AMPK, being able to sustain activating for long time-intervals as well as being hard to dephosphorylate. However, since the permeability over erythrocyte membranes for calyculin A is faster than for okadaic acid (Namboodiripad & Jennings, 1996), it is more unlikely that calyculin A would be locked intracellularly as suggested for okadaic acid.

The irreversibility of AMPK phosphorylation, induced by okadaic acid or cantharidin, may have bearings on the role of AMPK as a regulator of energy homeostasis. Cell viability is dependent on having such a sensor that is responsible for activating ATP producing pathways, as well as depressing ATP consuming processes when the ATP:ADP ratio is low. It would seem reasonable to believe that AMPK activity is so important when first stimulated, that it is necessary that the enzyme maintains its activity until the energy balance is conserved again. By shutting down energy-requiring processes like cholesterol and fatty acid synthesis, AMPK preserves ATP (Stein et al., 2000) for more important and immediate cellular needs like for instance ion gradient maintenance.

The liver is in general the organ responsible for degradation of potentially harmful drugs, but it may not be so effective against natural occurring toxins belonging to the okadaic acid class of compounds. Since okadaic acid treatment normally results in long lasting effects, it seems likely that okadaic acid in general is difficult to degrade intracellularly.

Ito et al. (2002) reported that okadaic acid administered orally to mice was distributed to lung, liver, heart, kidney, and small and large intestine. The toxin affected both lung and small intestine in a negative manner, causing different injuries like bleeding and edema (lung) as well as epithelial cell separation from villi, erosion and swollenness (small intestine). Surprisingly, although considerable amounts of okadaic acid accumulated in the liver, no distinct symptoms were observed. The detection of okadaic acid in the liver continued for 2 weeks, supporting that the toxin is hard to degrade. The same experiments established that okadaic acid has the small intestine as its target, not the liver (Ito et al., 2002). Altogether, these observations support okadaic acid as being hard-degradable, but not so harmful to the liver as expected.

Previous results obtained in our laboratory (Berven et al., 2001) have shown a similar lack of detectable effects on the liver when okadaic acid was administered by intragastric intubation. However, when administered intravenously, okadaic acid led to dissolution of hepatic bile canaliculi, blood congestion as well as hypotension and death. These observations

may indicate that okadaic acid-induced effects in the liver depend much on the route of administration.

Autophagy is an energy-dependent process, utilizing ATP both at the sequestration step leading to the formation of an autophagosome, and probably in the operation of the proton pump later in the degradation process (Plomp et al., 1987). Most likely, autophagy is among the energy-requiring cellular processes shut down by AMPK when ATP levels are low. In the present study, autophagy inhibition correlated with AMPK full (multi) phosphorylation induced by 30 nM or higher okadaic acid concentrations. Interestingly, hepatocytes treated with 15 nM okadaic acid for 20 min and reincubated for 120 min without the toxin, exhibited only monophosphorylated AMPK, but the autophagic activity was still significantly suppressed. This observation indicates that AMPK monophosphorylation is sufficient for autophagy inhibition. Since AMPK shows no enzymatic activity towards ACC in this state, the monophosphorylated enzyme would seem to differ from the fully phosphorylated form with respect to substrate preference.

In accordance with the stable AMPK phosphorylation, okadaic acid-induced autophagy inhibition was still evident even 2 h after drug removal. It seems likely that AMPK might be a mediator of the okadaic acid induced autophagy inhibition, possibly by downstream signalling through other protein kinases. There are strong implications based on okadaic acid-induced phosphorylation as well as naringin sensitivity, that the phosphoproteins SEK1, JNK, S6K and S6 may be involved in signalling downstream of LKB1/AMPK (Larsen et al., 2002). Toxin-induced SEK1 and JNK phosphorylations were not so unexpected, since such stress-activated protein kinases are known to be stimulated under different stress conditions. A working hypothesis would be that AMPK can function as a general mediator of cellular stress responses. Normally, SEK1 and JNK have been identified as components of a triade, typical for mitogen-activated protein (MAP) kinases. In relation to the possible LKB1/AMPK-initiated pathway, a third protein kinase (between AMPK and SEK1) remains to be identified in such a signalling pathway.

JNK has been found to induce apoptosis in several cell types, and is activated by SEK1, as well as by SEK2 (Weston & Davis, 2002; Nishina et al., 2003). Sustained AMPK activity in hepatocytes has been shown to result in apoptosis by JNK activation, indicating that the AMPK pathway also has a proapoptotic function (Meisse et al., 2002). In a previous report by Blankson et al. (2000), okadaic acid and microcystin-LR, were found to induce hepatocellular apoptosis in a naringin-sensitive manner. It is therefore tempting to suggest that AMPK may be a general mediator of apoptosis induction. In some epithelial cancer cell

lines JNK seems to phosphorylate S6K in Thr421/Ser424, allowing a possible linkage between the two kinases to be drawn (Le et al., 2003). Activated S6 kinase phosphorylates and activates S6, a protein important for protein synthesis and cellular growth (Volarevic & Thomas, 2001). Experiments by Blommaert et al. (1995) in isolated rat hepatocytes showed a possible link between amino acid-induced S6 phosphorylation and autophagy inhibition, suggesting that S6 could be involved in autophagy regulation. A recent report by Møller et al. (2004) implicates that S6K tail phosphorylation may possibly act as a mediating signal for toxin-induced inhibition of autophagy. In relation to the LKB1/AMPK pathway theory, it was surprising to find that SEK1, JNK, S6K and S6 all differed from AMPK in having reversible phosphorylations. This difference may reflect a more complex signalling network than previously assumed. A possibility is that these observed reversals are due to a secondary effect of toxin-induced AMPK phosphorylation, through a mechanism that promotes dephosphorylation of the other phosphoproteins. However, the discrepancy between the irreversible AMPK phosphorylation and the reversible phosphorylations of the SEK1, JNK, S6K and S6 may question the involvement of these phosphoproteins in a LKB1/AMPK-initiated autophagy suppression pathway.

Experiments performed by Woods et al. (1996) showed that the two AMPK $\alpha$  isoforms,  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2, probably have slightly different substrate preferences, suggesting that their specificity for downstream targets within the cells differ. It is possible that the two isoforms contribute differently to the at least three phosphorylation variants demonstrated in the present study, and that they differ in their downstream signalling as well.

My present results regarding lower okadaic acid concentration (15 nM) as well as shorter incubation time (20 min), also show differences between the putative downstream AMPK mediators in phosphorylation pattern. As expected, a correlation between SEK1 and JNK was evident, both phosphorylated after 20 min. Likewise, S6K was phosphorylated upon 20 min incubation. However, S6 was phosphorylated in a slower manner, phosphorylation being evident only after 80 min of incubation with okadaic acid. For both the stress-activated protein kinases and for S6K, the phosphorylation obtained after 20 min incubation was weaker than the respective phosphorylations obtained after 80 min incubation. This observation is in accordance with the immunostaining pattern detected for monophosphorylated and multi-phosphorylated AMPK. It is possible that monophosphorylated AMPK is able to mediate a downstream phosphorylation signal to SEK1, JNK and S6K, while S6 possibly needs multi-phosphorylated AMPK as a signal mediator. These results indicate that monophosphorylated AMPK correlates with weak

phosphorylations of SEK1, JNK and S6K, while multi-phosphorylated AMPK correlates with strong phosphorylations of the respective protein kinases. A possibility is that monophosphorylated and multi-phosphorylated AMPK exhibits quantitative differences in enzymatic activity regarding phosphorylation of these possible downstream mediators.

The stable AMPK $\alpha$  phosphorylation may in fact reflect that okadaic acid or cantharidin affect a protein kinase just as much as a protein phosphatase. However, in accordance with previous results from our laboratory (Samari et al., 2005), immunostaining with a general antibody against the protein kinase LKB1, upstream for AMPK, did not show any altered mobility phosphorylation due to okadaic acid treatment, possibly excluding LKB1 as a toxin target. Experiments performed in isolated rat hepatocytes have indicated that PP2C is responsible for AMPK dephosphorylation in intact cells (Moore et al., 1991), but okadaic acid did not alter the mobility of this enzyme either (Samari et al., 2005). The results obtained regarding stable AMPK $\alpha$  phosphorylation might reflect that the toxins activate AMPK by stimulating phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit rather than by inhibiting its dephosphorylation. The appearance of several phosphosubstrates of AMPK after toxin treatment indicates a more complex AMPK activation than previously suggested. Even though LKB1 has been identified as the upstream protein kinase that activates AMPK by phosphorylation at Thr172, it is likely that AMPK is phosphorylated by some other kinase(-s) as well. Møller et al. (2004) reported that two additional regulatory AMPK phosphorylations may be permissive for the activating phosphorylation at Thr172. The protein kinase that phosphorylates both Thr258 and Ser485 (Ser491 in  $\alpha$ 2) in the AMPK $\alpha$  subunit has not yet been identified (Woods et al., 2003b). However, it can not be excluded that the toxins may promote Thr172 phosphorylation by LKB1 as well. A hypothesis proposed by Møller et al. (2004), suggests that these additional phosphorylation sites may be subject to different regulations involving either PP1 or PP2A. Whether phosphorylations at these sites actually promote a phosphorylation at Thr172 remains to be shown. With regard to the two phosphorylation sites that correspond to Thr258 and Ser485 (Ser491 in the  $\alpha$ 2 subunit), it has already been indicated that they are not necessary for phosphorylation at Thr172 AMPK $\alpha$  (Woods et al., 2003b).

Multi-phosphorylated AMPK has so far been identified only through 1-D gel electrophoresis. In an attempt to get a better resolution of the three phosphorylation forms, we tried IEF and 2-D gel electrophoresis, which normally give better separation, higher resolution (larger area) and allow larger protein amounts to be tested. Unfortunately, detection

of the AMPK $\alpha$  phosphorylation forms was not an easy task. Various attempts to optimize detection and separation did not lead forward as expected.

The difficulty regarding phosphoprotein identification on 2-D gels may be due to different reasons. One possibility is that the actual AMPK content in the sample is below the detection limit. Another possibility is that proteins having the same mass and pI may be in excess, and completely cover the AMPK molecule in the gel. However, the latter suggestion is probably not so likely, since (Thr172) AMPK $\alpha$  is always detected upon to 1-D gel electrophoresis and subsequent immunostaining.

It has also been speculated that phosphorylated (pThr172) AMPK may interact with constituents of the gels used in IEF and 2-D electrophoresis that destroy the native protein conformation and lead to aggregate formations. It is also possible that phosphoproteins precipitate during isoelectric focusing, since proteins are concentrated in small areas around their isoelectric point. To optimize detection due to low protein amounts, different protein up-concentration procedures could have been followed. Such methods include immunoprecipitation (with an antibody against AMPK $\alpha$ ), affinity column chromatography, and high performance liquid chromatography (HPLC).

However, use of a general antibody against the AMPK $\alpha$  subunit after IEF showed three distinct spots around pH 7, in the range of the two AMPK $\alpha$  isoforms,  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 (respectively pI: 7.3 and pI: 7.6, <http://us.expasy.org/sprot>). By immunostaining with a general antibody against the AMPK $\alpha$ 2 isoform, it was found that the two most basic spots probably are AMPK $\alpha$ 2. Unfortunately, and for reasons not known, the general AMPK $\alpha$ 1 antibody failed to detect any spots at all. Previous experiments have shown that heterotrimeric AMPK complexes containing the  $\alpha$ 2 isoform exhibit greater AMP dependence and a preferential nuclear localisation (Salt et al., 1998). It was therefore important to utilize total protein extracts as samples for optimal detection of both isoforms. However, Woods et al. (1996) reported that the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 isoforms of AMPK have similar activities in rat liver, so theoretically, both isoforms should be detectable.

Further experimental studies are required to obtain more information about the different pThr172 AMPK $\alpha$  variants, in addition to extended examination of the AMPK phosphorylation forms and possible differences in their substrate affinities. It would also be interesting to do more studies regarding the apparently stable AMPK phosphorylation. Since AICAR, as well as the protein phosphatase inhibitors induce irreversible AMPK

phosphorylation, it seems likely that activated AMPK in general is stable and difficult to inhibit.

The experimental results from this report suggest high AMPK stability after both okadaic acid- and cantharidin-induced AMPK $\alpha$  phosphorylation, as well as a stable autophagy suppression. The specific mechanisms underlying such stability have to be examined closer in future experiments.



## REFERENCES

- Berven, G., Saetre, F., Halvorsen, K., and Seglen, P. O. (2001). Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionality of rat liver and intestinal cells. *Toxicol.* **39**, 349-362.
- Bialojan, C., and Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.* **256**, 283-290.
- Blankson, H., Grotterod, E.M., and Seglen P.O. (2000). Prevention of toxin-induced cytoskeletal disruption and apoptotic liver cell death by the grapefruit flavonoid, naringin. *Cell Death Differ.* **7**, 739-746.
- Blommaart, E. F., Luiken, J. J., Blommaart, P. J., van Woerkom, G. M., and Meijer, A. J. (1995). Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 2320-2326.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Davies, S. P., Helps, N. R., Cohen, P. T., and Hardie, D. G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* **377**, 421-425.
- Favre, B., Turowski, P., and Hemmings, B. A. (1997). Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J. Biol. Chem.* **272**, 13856-13863.
- Fengsrud, M., Erichsen, E. S., Berg, T. O., Raiborg, C., Seglen, P. O. (2000). Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur. J. Cell. Biol.* **79**, 871-882.
- Fengsrud, M., Sneve, M. L., Øverbye, A., and Seglen, P. O. (2004). Structural aspects of mammalian autophagy. In "Autophagy" (Klionsky, D. J., ed.), chapter 2, pp. 11-25. Landes Bioscience, Georgetown, TX, USA.
- Fujiki, H., and Suganuma, M. (1993). Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res.* **61**, 143-194.
- Gordon, P. B., Holen, I., and Seglen, P. O. (1995). Protection by naringin and some other flavonoids of hepatocytic autophagy and endocytosis against inhibition by okadaic acid. *J. Biol. Chem.* **270**, 5830-5838.
- Hardie, D. G. (2003). Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* **144**, 5179-5183.
- Hardie, D. G., and Pan, D. A. (2002). Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1064-1070.
- Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., and Hudson, E. R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* **546**, 113-120.
- Hawley, S. A., Davison, M., Woods, A., Davies, S. P., Beri, R. K., Carling, D., and Hardie, D. G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27879-27887.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, **6**, 103-112.
- Holen, I., Gordon, P. B., and Seglen, P. O. (1993). Inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid and other protein phosphatase inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **215**, 113-122.

- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell*. **80**, 225-236.
- Ito, E., Yasumoto, T., Takai, A., Imanishi, S., and Harada, K. (2002). Investigation of the distribution and excretion of okadaic acid in mice using immunostaining method. *Toxicol.* **40**, 159-165.
- Kobayashi, T., Kusuda, K., Ohnishi, M., Wang, H., Ikeda, S., Hanada, M., Yanagawa, Y., and Tamura, S. (1998). Isoform specific phosphorylation of protein phosphatase 2C expressed in COS7 cells. *FEBS Lett.* **430**, 222-226.
- Kopitz, J., Kisen, G. Ø., Gordon, P. B., Bohley, P., and Seglen, P. O. (1990). Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* **111**, 941-953.
- Kovacs, A. L., Gordon, P. B., Grotterod, E. M., and Seglen, P. O. (1998). Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, adenosine analogs and AMP. *Biol. Chem.* **379**, 1341-1347.
- Larsen, A. K., Moller, M. T., Blankson, H., Samari, H. R., Holden, L., and Seglen, P. O. (2002). Naringin-sensitive phosphorylation of plectin, a cytoskeletal cross-linking protein, in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 34826-34835.
- Le, X. F., Hittelman, W. N., Liu, J., McWatters, A., Li, C., Mills, G. B., and Bast, R. C. Jr. (2003). Paclitaxel induces inactivation of p70 S6 kinase and phosphorylation of Thr421 and Ser424 via multiple signaling pathways in mitosis. *Oncogene*. **22**, 484-497.
- Meisse, D., Van de Casteele, M., Beauloye, C., Hainault, I., Kefas, B. A., Rider, M. H., Fougelle, F., and Hue, L. (2002). Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett.* **526**, 38-42.
- Moore, F., Weekes, J., and Hardie, D. G. (1991) Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur. J. Biochem.* **199**, 691-697
- Møller, M. T. N., Samari, H. R., and Seglen, P. O (2004). Toxin-Induced Tail Phosphorylation of Hepatocellular S6 Kinase: Evidence for a Dual Involvement of the AMP-Activated Protein Kinase in S6 Kinase Regulation. *Toxicol. Sci.* **82**, 628-637.
- Nam, K. Y., Hiro, M., Kimura, S., Fujiki, H., and Imanishi, Y. (1990). Permeability of a non-TPA-type tumor promoter, okadaic acid, through lipid bilayer membrane. *Carcinogenesis*. **11**, 1171-1174.
- Namboodiripad, A. N., and Jennings, M. L. (1996). Permeability characteristics of erythrocyte membrane to okadaic acid and calyculin A. *Am. J. Physiol.* **270**, 449-456.
- Nishina, H., Nakagawa, K., Azuma, N., and Katada, T. (2003). Activation mechanism and physiological roles of stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase in mammalian cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **17**, 295-302.
- Perdew, G. H., Schaup, H. W., and Selivonchick, D. P. (1983). The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. *Anal. Biochem.* **135**, 453-455.
- Plomp, P. J., Wolvetang, E. J., Groen, A. K., Meijer, A. J., Gordon, P. B., and Seglen, P. O. (1987). Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **164**, 197-203.
- Ruderman, N. B., Saha, A. K., Kraegen, E. W. (2003). Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology*. **144**, 5166-5171.
- Salt, I., Celler, J. W., Hawley, S. A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D., Hardie, D. G. (1998). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem. J.* **334**, 177-187.

- Samari, H. R., and Seglen, P. O. (1998). Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, and N<sup>6</sup>-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 23758-23763.
- Samari, H. R., Møller, M. T., Holden, L., Asmyhr, T., and Seglen, P. O. (2005). Stimulation of hepatocytic AMP-activated protein kinase by okadaic acid and other autophagy-suppressive toxins. *Biochem. J.* **386**, 237-244.
- Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**, 29-83.
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., and Holen, I. (1990). Non-selective autophagy. *Seminars in Cell Biology.* **1**, 441-448.
- Stapleton, D., Woollatt, E., Mitchelhill, K. I., Nicholl, J. K., Fernandez, C. S., Michell, B. J., Witters, L. A., Power, D. A., Sutherland, G. R., and Kemp, B. E. (1997). AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Lett.* **409**, 452-456.
- Stein, S. C., Woods, A., Jones, N. A., Davison, M. D., and Carling, D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* **345**, 437-443.
- Volarevic, S., and Thomas, G. (2001). Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **65**, 101-127.
- Warden, S. M., Richardson, C., O'Donnell, J. Jr., Stapleton, D., Kemp, B. E., and Witters, L. A. (2001). Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem. J.* **354**, 275-283.
- Weston, C. R., and Davis, R. J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 14-21.
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003b). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* **13**, 2004-2008.
- Woods, A., Salt, I., Scott, J., Hardie, D. G., and Carling, D. (1996). The  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Lett.* **397**, 347-351.
- Woods, A., Vertommen, D., Neumann, D., Turk, R., Bayliss, J., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., and Rider, M. H. (2003b). Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 28434-28442.
- Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 453-458.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. Dose-dependent and naringin-sensitive stimulation of AMPK phosphorylation by okadaic acid.** Freshly isolated rat hepatocytes were incubated for 1 h at 37 °C with various concentrations of okadaic acid alone (10-60 nM) or with 100 µM naringin in the presence or absence of 50 nM okadaic acid. Cell extracts were immunoblotted with an antibody against the phosphorylated AMPK $\alpha$  subunit (pThr172). The position of a 66 kDa marker protein is indicated.

**Fig. 2. Effect of okadaic acid on the amount and motility of AMPK and LKB1.** Isolated hepatocytes were incubated at 37 °C for 1 h with 30 nM okadaic acid, washed twice and reincubated for 0, 60 or 120 min with (+ +) or without (+ -) 30 nM okadaic acid. Cell extracts were immunoblotted with general antibodies against the AMPK $\alpha$  subunit (A) or LKB1 (B). The position of a 66 (A) or 50 (B) kDa marker protein is indicated.

**Fig. 3. Irreversibility of AMPK phosphorylation.** Freshly isolated rat hepatocytes were incubated for 1 h at 37 °C with various okadaic acid concentrations (10-100 nM), then reincubated for up to 2 h with (A) or without (B) the same concentrations of okadaic acid. Cell extracts were immunoblotted with an antibody against pThr172 in the AMPK $\alpha$  subunit.

**Fig. 4. Induction and maintenance of stably monophosphorylated or multi-phosphorylated AMPK $\alpha$ .** Isolated hepatocytes were incubated at 37 °C for 20 min or 2 h with 15 nM okadaic acid, washed twice and reincubated for 0, 60 or 120 min with (+ +) or without (+ -) 15 nM okadaic acid. Cell extracts were immunoblotted with an antibody against pThr172 AMPK $\alpha$  (A and C) or a general antibody against the AMPK $\alpha$  subunit (B). The immunoblots in (A) and (B) represent the same experiment, while (C) represents a separate experiment where more multi-phosphorylation was induced.

**Fig. 5. Activity of mono- and multi-phosphorylated AMPK in acetyl-CoA carboxylase phosphorylation.** Isolated hepatocytes were incubated for 20 min, 60 min or 2 h at 37 °C with 15 or 30 nM okadaic acid, washed twice and reincubated for 0, 60 or 120 min with (+ +) or without (+ -) the same concentration of okadaic acid. Cell extracts were immunoblotted with an antibody against the phosphorylated acetyl-CoA carboxylase (pSer79). The

immunoblots (A), (B) and (C) represent different experiments, (B) and (C) corresponding to (A) and (C), respectively, in **Fig. 4**. The position of a 250 kDa marker protein is indicated.

**Fig. 6. Reversible phosphorylations of proteins putatively downstream of AMPK.**

Freshly isolated rat hepatocytes were incubated for 1 h at 37 °C with 40 nM okadaic acid, washed twice and reincubated for 120 min with (+ +) or without (+ -) 40 nM okadaic acid. In parallel, some hepatocytes were incubated for 1 h at 37 °C with 40 nM okadaic acid without subsequent reincubation. Cell extracts were immunoblotted with antibodies against phosphorylated AMPK $\alpha$  (pThr172), SEK1 (pThr261), JNK (pThr183/Tyr185), S6K (pThr421/Ser424) or S6 (pSer235/236). The positions of 30, 45 and 66 kDa marker proteins are indicated. NR, not reincubated

**Fig. 7. Phosphorylation of putative downstream target proteins in the presence of monophosphorylated or multi-phosphorylated AMPK.**

Isolated hepatocytes were incubated at 37 °C for 20 min with 15 nM okadaic acid, washed twice and reincubated for 0, 60 or 120 min with (+ +) or without (+ -) 15 nM okadaic acid. Cell extracts were immunoblotted with antibodies against phosphorylated AMPK $\alpha$  (pThr172), SEK1(pThr261), JNK (pThr183/Tyr185), S6K (pThr421/Ser424) or S6 (pSer235/236).

**Fig. 8. Stable AMPK phosphorylation after cantharidin removal.**

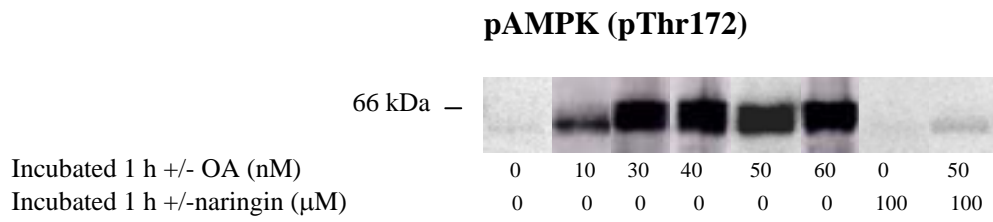
Isolated hepatocytes were incubated for 1 h at 37°C with 30  $\mu$ M cantharidin, washed twice and reincubated for up to 120 min without (+ -) cantharidin. Cell extracts were immunoblotted with an antibody against AMPK $\alpha$  (pThr172).

**Fig. 9. Non-reversibility of okadaic acid-induced autophagy suppression.**

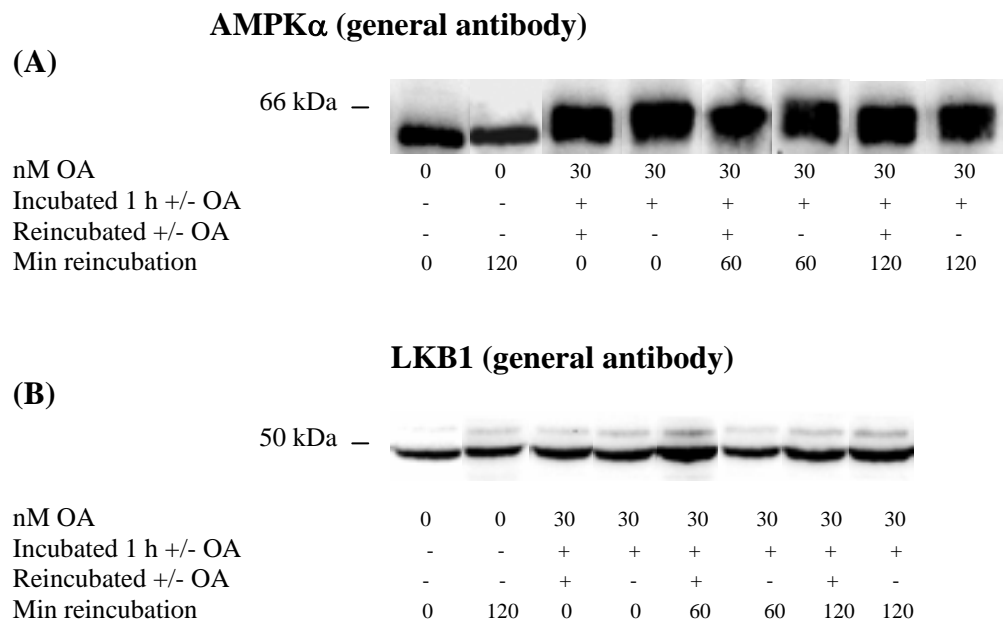
Hepatocytes were incubated with 50 (A), 30 (B) or 15 nM (C) okadaic acid for 1 h, or with 15 nM for 2 h (D) at 37 °C, washed twice and reincubated with (+ +) or without (+ -) the same concentrations of okadaic acid for up to 2 h. Negative controls, Ctr (- -), were incubated for up to 3 h without okadaic acid. The amount of LDH autophagocytosed at various time points was measured and expressed as per cent of the total amount in the cells. In (D), the amount of LDH autophagocytosed was measured as the net sequestration after 2 h incubation. In (C), each value is the mean  $\pm$  S.E. (or range) of two experiments.

**Fig. 10. AMPK separation by isoelectric focusing.** Isolated rat hepatocytes were incubated for 1 h without (A) or with (B) 300 nM okadaic acid. Cell extracts containing 400  $\mu$ g protein were isoelectrofocussed on 18 cm IPG strips (pH 3-10) for 6 h (with an increasing voltage strength) and subsequently immunoblotted with a general antibody against the AMPK $\alpha$  subunit, (A, B) or the  $\alpha$ 2 subunit (C).

**Fig. 11. AMPK immunoblotting on 2-D PAGE gels.** Isolated rat hepatocytes were incubated for 1 h with (B, D) or without (A, C) 300 nM okadaic acid. Cell extracts containing 400  $\mu$ g protein were isoelectrofocussed on 18 cm IPG strips (pH 3-10) for 6 h (with an increasing voltage strength), before 2-D gel electrophoresis for 19 h 15 min (1000 volt) and subsequently immunoblotted with a general antibody against the AMPK $\alpha$  subunit (A, B) or a pThr172 AMPK $\alpha$  antibody (C, D).

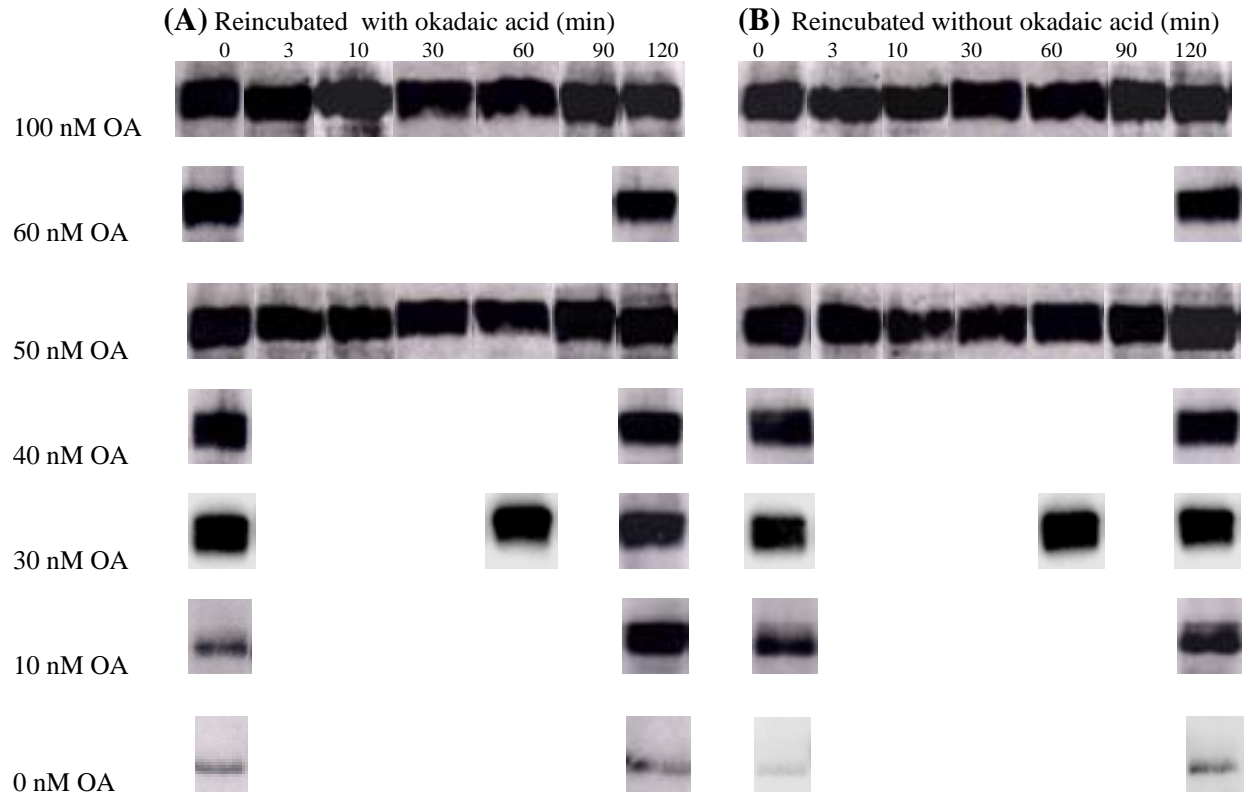


**Fig. 1**



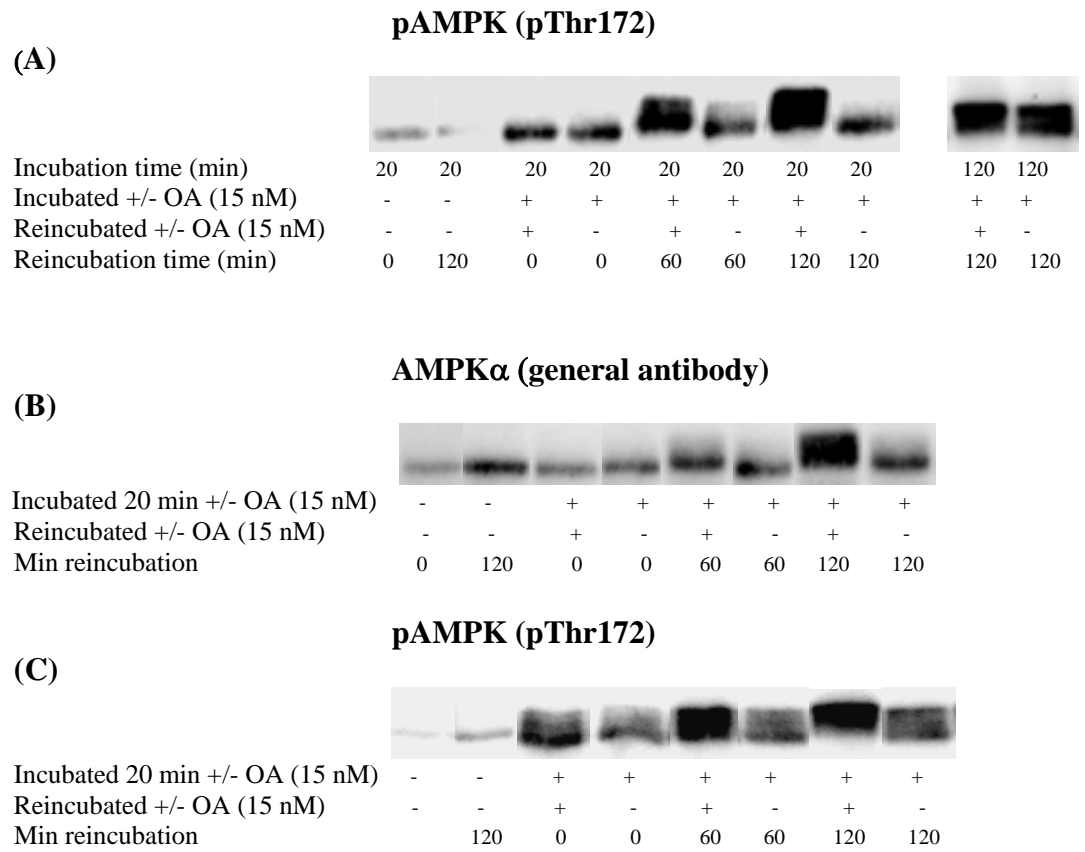
**Fig. 2**

**pAMPK (pThr172)**



**Fig. 3**

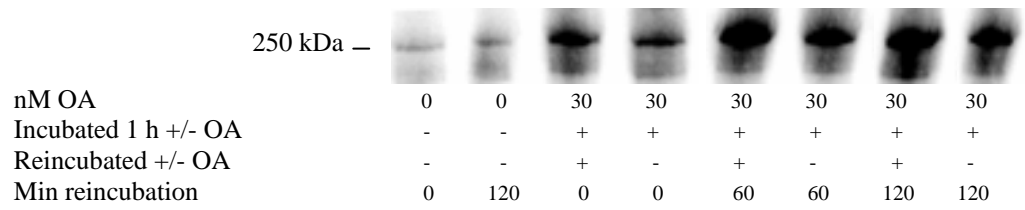




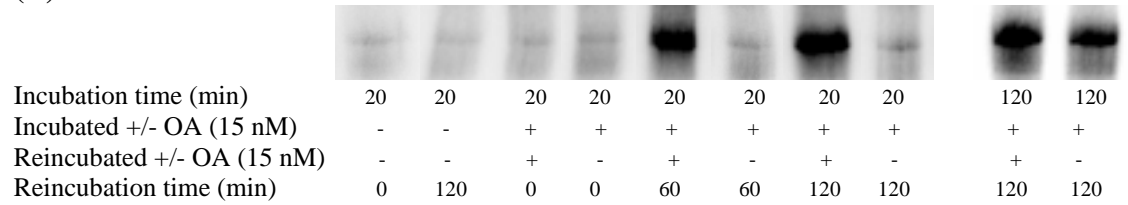
**Fig. 4**

**phospho-Acetyl-CoA carboxylase (pSer79)**

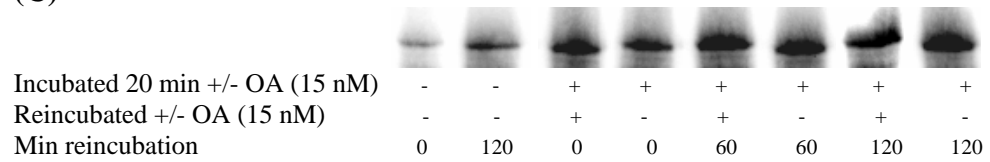
**(A)**



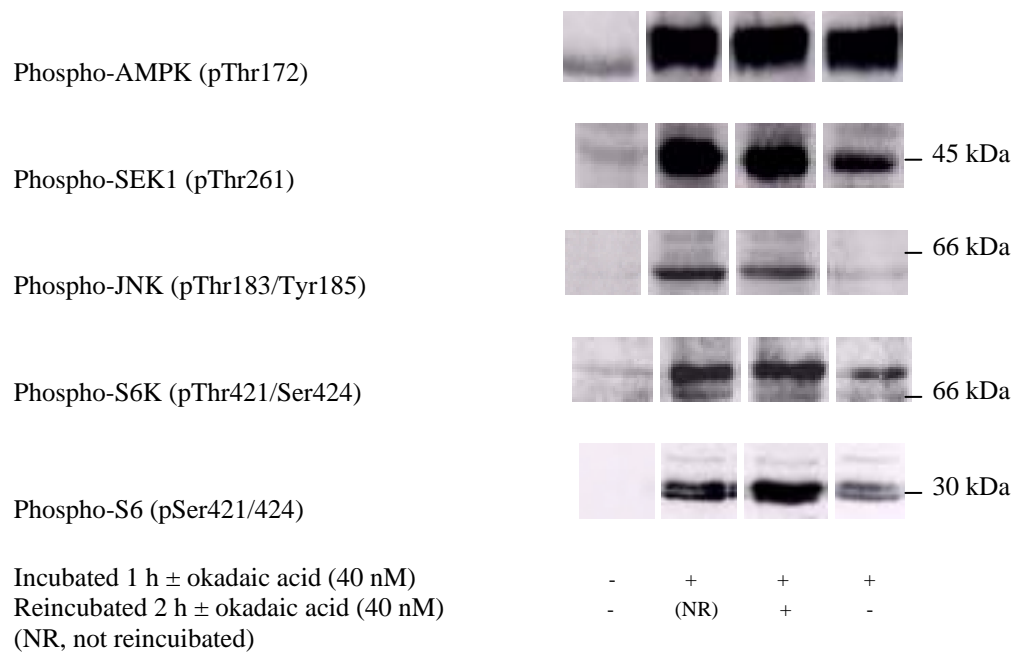
**(B)**



**(C)**

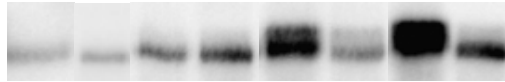


**Fig. 5**

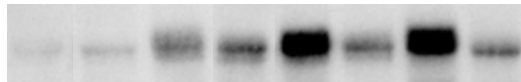


**Fig. 6**

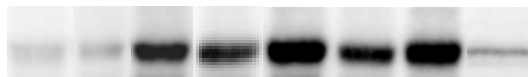
**pAMPK (Thr172)**



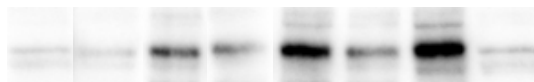
**pSEK1 (Thr261)**



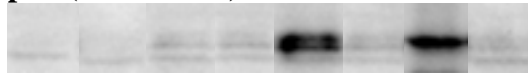
**pJNK (Thr173/Tyr185)**



**pS6K (Thr421/Ser424)**



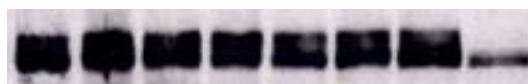
**pS6 (Ser235/236)**



Incubated 20 min +/- OA (15 nM)	-	-	+	+	+	+	+	+
Reincubated +/- OA (15 nM)	-	-	+	-	+	-	+	-
Min reincubation	0	120	0	0	60	60	120	120

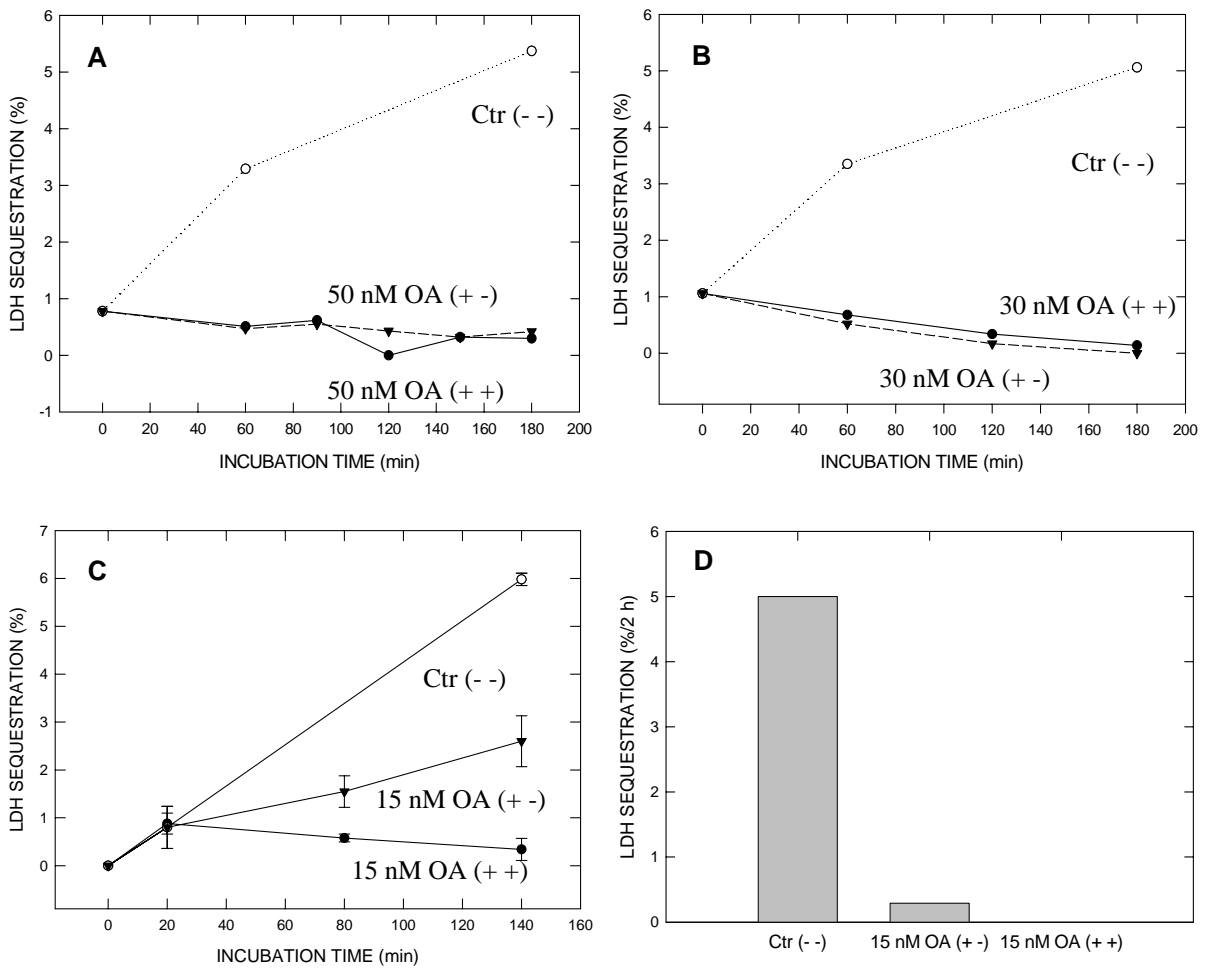
**Fig. 7**

**pAMPK (pThr172)**

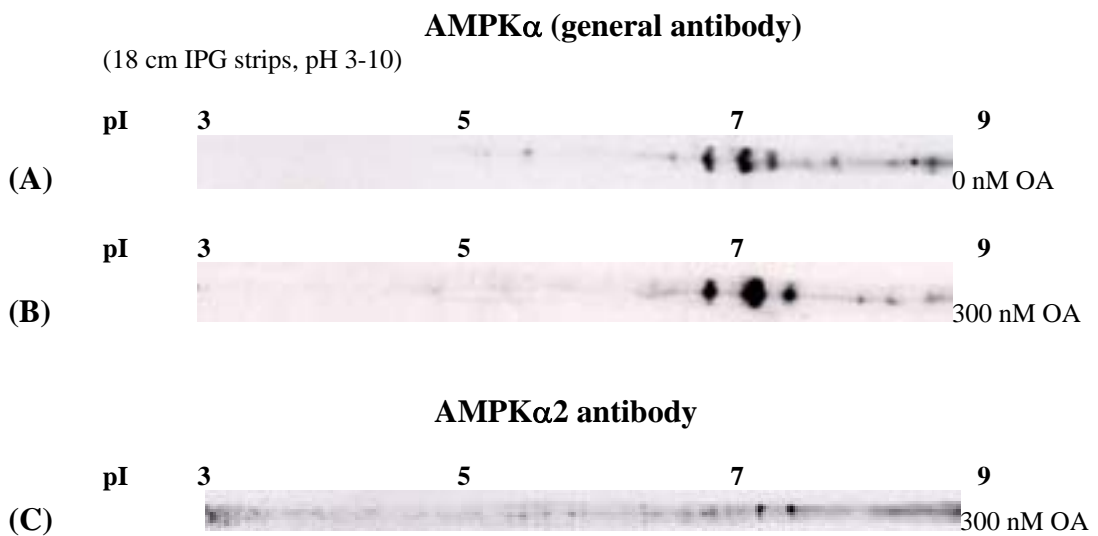


Incubated +/- 30 μM cantharidin, 1 h	+	+	+	+	+	+	+	+
Reincubated without cantharidin (min)	0	3	10	30	60	90	120	120

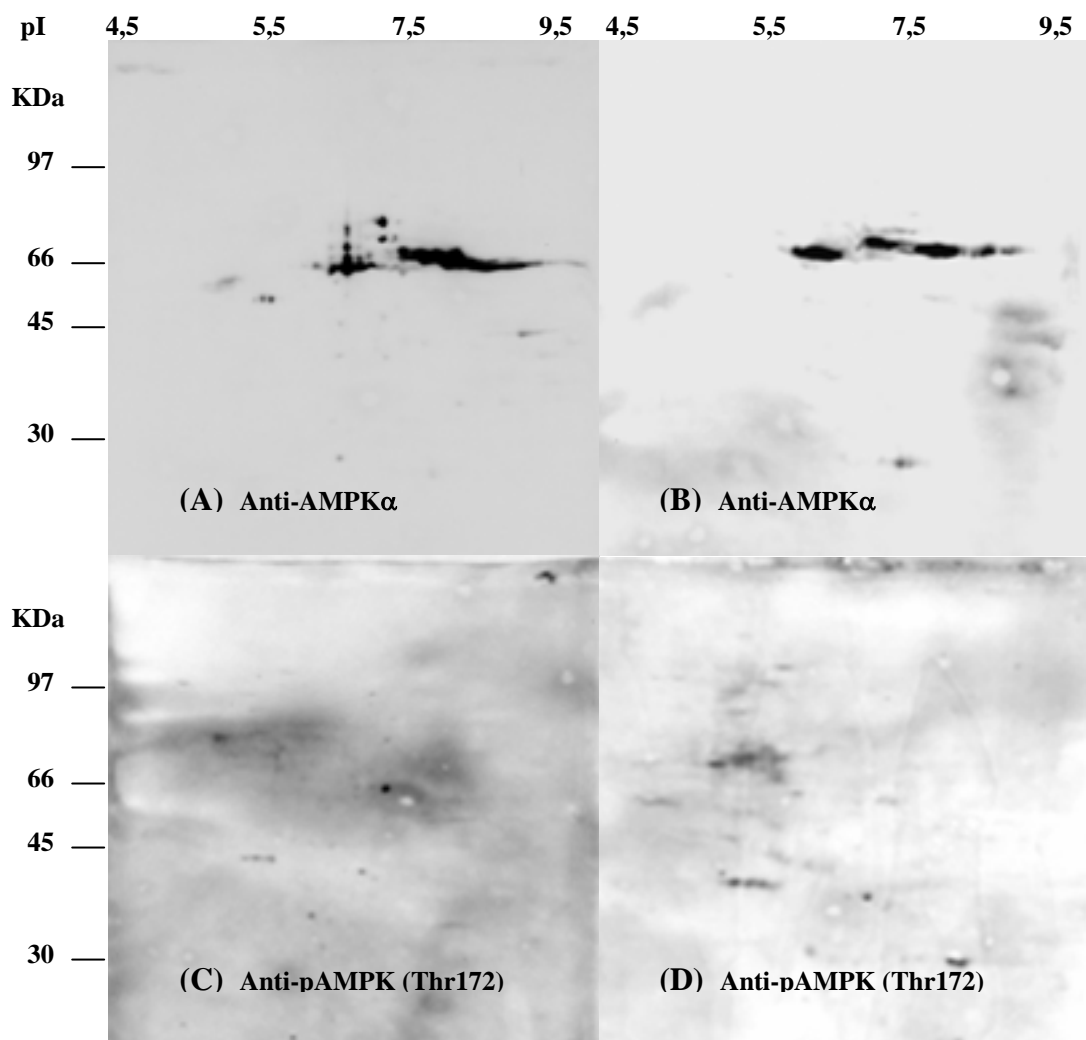
**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**



**Fig. 11**