

DISS. ETH NO. 19502

## **Forkhead box transcription factors in nutrient signaling**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

MARGRET HELENE AGNES JOHANNA LUISE BÜLOW

Dipl. Biol., Universität Karlsruhe (TH)

born June 13<sup>th</sup> 1982

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Ruedi Aebersold, examiner

Prof. Michael J. Pankratz, co-examiner

Prof. Christian Frei, co-examiner

2011

## Summary

Organisms adapt their growth in dependence on nutrient availability. Carbohydrates are used for energy supply and fat storage, and amino acids are used for growth and protein biosynthesis. In moments of nutrient scarcity, fat storage is broken down, energy is provided by gluconeogenesis and cell proliferation and growth is stopped. The major underlying pathway is the insulin/TOR pathway. Insulin is secreted in response to carbohydrate and amino acid uptake. A key effector downstream of insulin signaling is the Forkhead box transcription factor FoxO. It is involved in the processing of nutrient information and is tightly regulated by insulin-dependent proteins. In addition to the kinase PKB/Akt, it binds to 14-3-3 scaffold proteins. In this work, I use the model system *Drosophila melanogaster* to show that knock-down of 14-3-3  $\epsilon$  and  $\zeta$  in *Drosophila* Schneider cells and in larval tissue leads to activation of dFoxo in the presence of insulin by regulating its subcellular localization. dFoxo nuclear shuttling in dependence from the nutrient status occurs in many larval tissues: the fatbody, the salivary glands and the insulin-producing cells in the brain. Furthermore I show that dFoxo is regulated by Src tyrosine kinases.

In a phosphoproteomic analysis of insulin-dependent phosphorylation events performed by the Aebersold lab, Src kinases were identified as possible antagonists of FoxO activity. Src42A overexpression inhibits nuclear shuttling of dFoxo in response to starvation, and Src42A knock-down promotes dFoxo activity under nutrient abundance. These observations are based on the subcellular localization of dFoxo, the activation of its target genes and the size of *Drosophila* larvae which carry a mutation for Src42A. Analysis of larvae homozygous for a Src42A mutation and heterozygous for a dFoxo mutation reveals that Src42A and dFoxo interact genetically.

The TOR (target of rapamycin) signaling module is connected with the insulin pathway at several points. It responds to amino acid uptake into the cell and promotes cell growth and protein biosynthesis. In my work I show that FoxA2/Forkhead (Fkh), a member of the same transcription factor family as FoxO, is negatively regulated by TOR. TORC1 activity is specifically blocked by the anti-cancer drug rapamycin. *Drosophila* larvae which are well fed but treated with rapamycin show reduced growth, a defect which is also observed in TOR mutant larvae and larvae in which Fkh is overexpressed. In contrast, larvae in which Fkh expression is knocked down by RNAi show reduced rapamycin sensitivity in the context of body growth. Similar observations can be made on the level of cellular growth in the *Drosophila* fatbody. Likewise, TOR activity impacts on the expression of Fkh target genes: they are upregulated in TOR mutants, upon amino acid starvation and rapamycin feeding. This upregulation is dependent on Fkh.

The implication of Fox transcription factors in nutrient signaling and the related health complications make them important subjects in the study of metabolism and nutrition. Although FoxO is well characterized, its key role in the regulation of growth, metabolism, cell cycle and lifespan raises the importance of identifying novel upstream regulatory mechanisms which are involved in FoxO function. In the case of FoxA/Forkhead, regulatory mechanisms and functions are not fully understood. The new findings in this work are discussed in relation to recent studies in mouse and *C. elegans*. Finally, the question is addressed of how the regulation and function of FoxO and FoxA overlap or differ under various nutrient and growth signaling conditions.

## Zusammenfassung

Organismen passen ihr Wachstum dem Nahrungsangebot an. Kohlenhydrate liefern Energie und werden zum Aufbau von Fettreserven verwendet, und Aminosäuren werden für Wachstum und Proteinbiosynthese gebraucht. In Momenten der Nahrungsknappheit werden die Fettreserven abgebaut, Energie wird durch Gluconeogenese bereitgestellt und Zellproliferation und Wachstum werden gestoppt. Dem liegt hauptsächlich der Insulin/TOR-Signalweg zugrunde. Insulin wird infolge der Aufnahme von Kohlenhydraten und Aminosäuren sekretiert. Am Ende dieses Signalwegs steht der Transkriptionsfaktor FoxO. FoxO ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren bei der Verarbeitung von Nahrungssignalen, und wird von verschiedenen Proteinen insulinabhängig reguliert. Abgesehen von der Kinase PKB/Akt bindet es an 14-3-3 Scaffold-Proteine und wird von der Kinase Src inhibiert. In der vorliegenden Arbeit verwende ich den Modellorganismus *Drosophila melanogaster* um zu zeigen, dass ein Knock-down von 14-3-3  $\epsilon$  und  $\zeta$  die Aktivierung von dFoxo in Schneiderzellen und Larvengewebe bewirkt, trotz hoher Insulinkonzentration. Der Transfer von dFoxo zwischen Cytoplasma und Zellkern findet in verschiedenen larvalen Geweben statt, u.a. dem Fettkörper, den Speicheldrüsen und den insulin-produzierenden Zellen im Gehirn. Überdies wird gezeigt, dass dFoxo durch Src Tyrosinkinasen reguliert wird.

In einer Phosphoproteomanalyse des Aebersold-Labors, in welcher nach insulin-abhängigen Proteinphosphorylierungen gesucht wurde, wurden Src Kinasen als neue mögliche Antagonisten von FoxO identifiziert. In dieser Arbeit zeige ich, dass Src42A Überexpression den Transfer von dFoxo in den Zellkern infolge von Nahrungsmangel verhindert, und dass ein Knock-down von Src42A die Aktivität von dFoxo unter Nahrungsüberfluss befördert. Diese Beobachtungen basieren auf der subzellulären Lokalisierung von dFoxo, sowie der Aktivierung seiner Zielgene und der Größe von *Drosophila* Larven mit einer Src42A Mutation. Die Analyse von homozygoten Src42A Mutanten, die gleichzeitig heterozygot mutant für dFoxo sind, zeigt, dass Src42A genetisch verknüpft sind und dass

die beobachteten Phänotypen, die durch die homozygote Src42A-Mutation entstehen, durch eine Kopie des mutierten dFoxo-Allels gerettet werden.

Der TOR (target of rapamycin)- Signalweg ist mit dem Insulinsignalweg verknüpft. Er reagiert auf die Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle und fördert Zellwachstum und Proteinbiosynthese. In meiner Arbeit zeige ich, dass Foxa2/Forkhead (Fkh), ein Mitglied der Familie von Transkriptionsfaktoren, der auch FoxO angehört, negativ durch TOR reguliert wird. TOR wird spezifisch durch das Krebsmedikament Rapamycin geblockt. *Drosophila* Larven, die mit Hefe gefüttert wurden, aber mit Rapamycin behandelt sind, zeigen verringertes Wachstum, genauso wie TOR Mutanten und Larven mit erhöhter Fkh Expression. Dagegen reagieren Larven mit verringerter Fkh Expression weniger sensibel auf Rapamycin. Ähnliches kann auch auf zellulärer Ebene in *Drosophila*-Fettkörpern beobachtet werden. Gleiches gilt für die Expression von Fkh Zielgenen: sie werden in TOR Mutanten, bei Aminosäureentzug und bei Rapamycinbehandlung heraufreguliert. Dieser Vorgang ist Fkh-abhängig.

Die Rolle der Fox Transkriptionsfaktoren in der Verarbeitung von Stoffwechselfsignalen und den damit verbundenen Krankheitsrisiken machen sie zu einem wichtigen Objekt in der Stoffwechsel- und Ernährungsforschung. Wenngleich FoxO bereits umfassend charakterisiert ist, ist es doch durch seine Schlüsselrolle in der Genregulation zur Kontrolle von Wachstum, Stoffwechsel, Zellzyklus und Lebensdauer von Interesse, neue Regulatoren, denen die Aktivität von FoxO zugrunde liegt, zu identifizieren. Hingegen sind Regulation und Funktion von FoxA/Forkhead noch nicht ausreichend erforscht. Die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit werden im Zusammenhang mit aktueller Forschung in Mäusen und *C. elegans* betrachtet. Zuletzt wird noch die Fragestellung der Redundanz bzw. Divergenz der Regulation und Funktion von FoxO und FoxA unter verschiedenen Nahrungsbedingungen bearbeitet.