
Procaspase-Activating Compound-1 (PAC-1)

*-Effekter på celledød og caspaseaktivitet i cellelinjen PC12 og
kyllingkornceller*

Line Kvaale Moe



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og
Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2010

Forord

Denne oppgaven har blitt utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Avdeling for farmasøytisk kjemi, ved Farmasøytisk institutt i perioden august 2009 til mai 2010, som del av graden Master i Farmasi, ved Universitetet i Oslo.

Jeg vil takke veilederne mine Ragnhild Paulsen og Trond Vidar Hansen for å være tilgjengelige når jeg lurte på noe, og for mange tilbakemeldinger.

Det har vært et lærerikt og givende år, og jeg har hatt mange gode opplevelser. Jeg har fått et godt innblikk i forskningsverdenen og det har vært veldig interessant.

Takk til Gro Mathiesen, Mona Gaarder, Bjørn Oddvar Strøm, Gulzeb Aziz, Petra Aden og Karen Boldingh Debernard ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap og Øyvind Akselsen på Avdeling for farmasøytisk kjemi, for hjelp på lab, faglige samtaler og hyggelig sosialt samvær!

Takk til alle på lesesalen på ZEB for mange interessante og kanskje ikke alltid faglig relevante samtaler. Dere vil bli savnet!

Takk til mine foreldre og svigerforeldre for å ha stilt opp på alle måter gjennom farmasistudiet. Deres hjelp har vært uvurderlig.

En spesiell takk til min mann, Andreas, og mine nydelige barn, Marie og Celine, for å gi meg andre impulser og være der for meg, gi meg klemmer og drivkraft når det trengtes.

Oslo, mai 2010

Line Kvaale Moe

Sammendrag

I 2006 publiserte Hergenrother og medarbeidere en artikkel om at de hadde utviklet et lite molekyl som direkte aktiverte procaspase-3 til aktiv caspase-3. Dette stoffet ble kalt procaspase-activating compound-1 (PAC-1). PAC-1 ga caspaseaktivering *in vitro* og induserte apoptose i kreftceller direkte proporsjonalt med konsentrasjonen av procaspase-3 i disse cellene. I vanlige, friske celler viste de at nivået av procaspase-3 var mye lavere, dermed ville man selektivt kunne ramme kreftceller.

PAC-1 ble brukt som et verktøy for å indusere apoptose i cellelinjen PC12 (Rimul 2007) og rottekornceller (Lindland-Tjønn 2009). Det ble vist at PAC-1 ga celledød, men at denne ikke ble beskyttet av caspasehemmeren (CI), Ac-DEVD-CMK, i PC12 celler. I rottekornceller og kyllingkornceller har caspasehemmeren vist å beskytte mot celledød (Lindland-Tjønn 2009; Aziz, Akselsen et al. 2010).

Effekten til PAC-1 skyldes sinkchelatering (Peterson, Goode et al. 2009), og siden sink påvirker mange prosesser i kroppen, kunne det være at den caspaseuavhengige døden i PC12 skyldtes påvirkning av cellyklus. Kornceller er ikke-delende celler, hvor effekter av PAC-1 kan studeres uten påvirkning av mediatorer fra cellyklusen.

I PC12 celler og kyllingkornceller induserer PAC-1 celledød. Det ble ikke funnet beskyttelse mot celledød ved tilsetning av Ac-DEVD-CMK i verken PC12 celler eller korncellene fra kylling. Caspaser ble aktivert av PAC-1 i PC12 celler og helt hemmet ved tilsetning av CI. Det ble observert en høyere celledød i PAC-1 eksponerte celler ved 48t og 72t enn 24t, som ikke taler for en direkte caspase-3 aktivering. ROS ble generert i PC12 celler eksponert for PAC-1. Det ble også observert beskyttelse mot celledød av vitamin C og E i PC12 celler. PAC-1 og STS virker synergistisk på caspaseaktivering og celledød.

Virkningsmekanismen til PAC-1 er fremdeles uklar og flere forsøk må utføres for å belyse alle sider ved effekten til PAC-1.

Innholdsfortegnelse

FORORD	2
SAMMENDRAG	3
INNHOLDSFORTEGNELSE	4
FORKORTELSER	8
1. INNLEDNING	10
1.1 KREFT	10
1.2 CELLEDØD.....	11
1.2.1 Nekrose.....	12
1.2.2 Apoptose	12
1.2.3 Mitokondrieindusert apoptose.....	12
1.2.4 Dødsreseptorveien.....	12
1.2.5 Caspaser	13
1.2.6 Initiatorcaspaser.....	13
1.2.7 Effektorcaspaser	13
1.3 CASPASEAKTIVERING.....	14
1.3.1 PAC-1	15
1.3.2 Sinkchelatering.....	17
1.3.3 Staurosporin	17
1.4 ROS-PRODUKSJON	18
1.5 MÅL MED OPPGAVEN	19
2. MATERIALER OG METODER	20
2.1 KJEMI; SYNTSE AV PAC-1-DERIVAT MED REDUSERT HYDRAZONE.....	20
2.2 KJEMIKALIER OG REAGENSER	20
2.3 PC12 CELLER.....	23

2.3.1	<i>Splitting av PC12 celler</i>	23
2.3.2	<i>Surgjøring av PC12 celler</i>	24
2.4	KORNCCELLER FRA KYLLING.....	24
2.4.1	<i>Poly L-lysin behandling av kulturskåler</i>	24
2.4.2	<i>Preparering av korncellekulturer</i>	25
2.4.3	<i>Tilsetning av Ara-C</i>	30
2.5	CASPASEASSAY.....	30
2.6	ROS-ASSAY I KYLLINGKORNCCELLER	32
2.7	ROS-ASSAY I PC12-CELLER	32
2.8	WESTERN BLOT.....	33
2.8.1	<i>Eksponering og høsting av celler</i>	33
2.8.2	<i>Proteinmåling og tilsetning av prøvebuffer (laemli)</i>	35
2.8.3	<i>Gelstøping</i>	38
2.8.4	<i>Elektroforese</i>	41
2.8.5	<i>Blotting og farging</i>	41
2.8.6	<i>Blokkning og påsetting av antistoff</i>	42
2.8.7	<i>Fremkalling</i>	44
2.8.8	<i>Stripping</i>	44
2.9	CELLEDØD	45
2.9.1	<i>Behandling av PC12 celler</i>	45
2.9.2	<i>Behandling av kornceller fra kylling</i>	45
2.9.3	<i>Telle celledød</i>	46
2.10	GRAFER OG STATISTIKK	47
3.	RESULTATER	48

3.1	DOSEAVHENGIG CELLEDØD INDUSERT AV PAC-1 I PC12 OG KYLLINGNEVRONER.....	48
3.1.1	<i>Caspasehemmer har ingen påvirkning på PAC-1-indusert celledød.....</i>	52
3.1.2	<i>PAC-1-indusert celledød er betydelig høyere ved 48t enn ved 24t.</i>	57
3.1.3	<i>PAC-1 aktiverer caspaser.....</i>	59
3.2	ANTALLET OBSERVERTE CELLER ER LAVERE ETTER PAC-1-EKSPONERING.....	64
3.3	UFULLSTENDIG ORTHO-HYDROKSY N-ACYL HYDRAZONESTRUKTUR GIR INGEN EFFEKT.....	66
3.4	STAUROSPORIN INDUSERER CELLEDØD I PC12 CELLER OG KYLLINGNEVRONER	72
3.5	STS GIR BETYDELIG BEDRE CASPASEAKTIVERING ENN PAC-1.....	75
3.6	PAC-1 OG STS GITT I KOMBINASJON GIR SYNERGI.....	77
3.7	PH PÅVIRKER PAC-1-INDUSERT CELLEDØD.....	80
3.8	ROS-FANGERE GIR DELVIS BESKYTTELSE MOT PAC-1-INDUSERT CELLEDØD.	84
3.8.1	<i>Celledød i PC12 celler og kyllingnevroner eksponert med ROS-fangere.....</i>	84
3.8.2	<i>ROS-assay utført med DHR i PC12.....</i>	89
3.8.3	<i>ROS-assay utført med DHR i kyllingnevroner</i>	93
3.9	PÅVISNING AV PROCASPASE-7 OG KLØYVET CASPASE-7.....	95
4.	DISKUSJON.....	97
4.1	DISKUSJON AV METODER	97
4.1.1	<i>PC12 celler og kornceller fra kylling.....</i>	97
4.1.2	<i>Metode for å måle celledød.....</i>	98
4.1.3	<i>Metode for å studere proteiner involvert i celledød.....</i>	99
4.1.4	<i>Måling av ROS-produksjon.....</i>	100
4.2	DISKUSJON AV RESULTATER	102
4.2.1	<i>PAC-1-indusert celledød kan skyldes flere mekanismer</i>	102
4.2.2	<i>Ortho-hydroksey N-acyl hydrazonestrukturen er viktig for effekt av PAC-1.....</i>	104

4.2.3	<i>STS induserer caspasene bedre enn PAC-1</i>	105
4.2.4	<i>STS og PAC-1 virker på ulike signalveier</i>	106
4.2.5	<i>pH kan påvirke prolifererende egenskaper og PAC-1-medierte effekter</i>	107
4.2.6	<i>ROS er involvert i celledøden</i>	108
4.3	KONKLUSJONER:.....	110
	KILDELISTE	111

Forkortelser

Ac-DEVD-CMK	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CMK
Ad	Opp til
AIF	Apoptose induserende faktor
APAF-1	Apoptoseaktiverende faktor-1
Caspase	”Cystein-aspartate spesifik-proteases”
CI	Caspase inhibitor
DA	Deallyl PAC-1
DH	Deallyl dehydroksid PAC-1
DHR	Dihydrorhodamin
DISC	Dødsinduserende signalkompleks
DMEM	”Dulbecco’s modified eagle medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGTA	Etylenglykoltetraeddiksyre
ERK	”Extracellular signal-regulated kinase”
FADD	Fas-assosiert dødsdomene
FBS	Føtalt kalveserum
mA	milliampere
MQ	Milli Q
PAC-1	”Procaspase-activating compound”

PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PBS	Fosfat bufret saltvann
R ²	Korrelasjonskoeffisient
RFU	Relative fluorescens enheter
RIPA	”Radioimmunprecipitation assay”
RPM	”Rounds per minute”
SDS	Natrium dodecyl sulfat
SEM	Standardfeil
TBE	Trisborat-EDTA-buffer
TBS	Tris bufret saltvann
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylenediamin
TG	Tris-glysin buffer
TGS	Tris-glysin-SDS-buffer
Ubh	Ubehandlet
zVAD-fmk	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone

1. Innledning

Da det i 2006 ble oppdaget en direkte caspase-3 aktivator tenkte man at det kunne føre til en helt ny strategi innen kreftbehandling. Procaspase-3 aktiveres som et av de siste trinnene i programmert celledød (apoptose, avsnitt 1.2.2). Hergenrother og medarbeidere viste til en systematisk evaluering av procaspase-3 nivået i flere kreftcellelinjer, og fant at nivået av procaspase-3 var mye høyere enn i vanlige, friske celler. Dersom PAC-1 virker i et av de siste trinnene i caspasekaskaden (avsnitt 1.2.5), og irreversibelt aktiverte den, kunne man drepe cancercellene relativt selektivt dersom nivået av procaspase-3 var veldig forhøyet i cancercellene sammenlignet med i friske celler (Putt, Chen et al. 2006).

1.1 Kreft

En celle har mange forskjellige signalmolekyler som stimulerer til proliferering og differensiering. Den har også signalmolekyler som hindrer cellen fra videre utvikling, og som får cellen til å begå selvmord (apoptose). Dette systemet er komplekst og avhenger av signaler både innad og utenfor cellen. I friske celler vil en uregelmessighet i celledelingssyklusen føre til at cellen går i apoptose. Uregelmessigheter blir fanget opp ved kontrollstasjoner av cyclinavhengige kinaser ved ulike faser cellen entrer i celledelingssyklusen (Johnson and Walker 1999).

Kreft kan skyldes defekter i gentranskripsjon som hindrer cellen i å oppdage feil i celledelingssyklusen eller hindrer celle å gå i apoptose etter at det er oppdaget en slik feil. Signalveien kan være brutt et sted på veien slik at cellen ikke går i apoptose, eller at cellen får motstridende signaler om å overleve fra vekstfaktorer (Putt, Chen et al. 2006).

Mange cytotoxiske stoffer som brukes i kreftbehandling induserer apoptose, men dersom signalveien er brutt vil det føre til resistens mot behandlingen og dermed apoptose. Resistens mot apoptotiske signaler (1.2.2 Apoptose) kan skyldes oppregulering eller nedregulering i nøkkelproteiner i denne komplekse kaskaden, eller mutasjon i genene som koder for proteinene. En direkte aktivering av caspase-3 vil da kunne være mer effektiv kreftbehandling

1.2 Celledød

Celledød kan skje på flere måter, men deles oftest opp i apoptose og nekrose. Det var i det 19 århundret, at naturlig forekommende celledød ble beskrevet. Ikke før Kerr og kollegene publiserte en artikkel i 1972 (Kerr, Wyllie et al. 1972), ble konseptet om fysiologisk (programmert) celledød mottatt med anerkjennelse. I dag gjøres det mye forskning på området, siden overaktivitet eller svak aktivitet i celledødsveiene er knyttet til mange sykdommer (Fadeel and Orrenius).

Tabell 1.1: Apoptose sammenlignet med nekrose. Tabellen er oversatt fra (Kroemer, Dallaporta et al. 1998).

Apoptose	Nekrose
Fysiologisk eller patologisk	”accidental”
Tilsynelatende godt regulert	Alltid patologisk
Plasmamembranen er inntakt til lenge etter at prosessen har startet	Uregulert eller lite regulert
Makrofagisk eliminering	Plasmamembranen blir ødelagt tidlig
Ikke lekkasje av celleinnhold	Lekkasje av celleinnhold
Liten eller ingen inflammasjon	Inflammasjon
Biokjemiske og morfologiske egenskaper: Kromatin kondensering, nukleær fragmentering, DNA fragmentering	Biokjemiske og morfologiske egenskaper: Svelling av hele cytoplasma samt mitokondriene.
Selektiv proteindegradering av spesifikke proteaser (caspaser)	Sekundær nekrose: Når cellene dør ved apoptose, men ikke blir fjernet av makrofager, vil cellen lyses.
Endringer i plasmamembranen: tap av membranasymmetri før tap av membranintegritet	
Cellekrymping	
Ingen mitokondrisk svelling	

1.2.1 Nekrose

Nekrose (tabell 1.1) er en patologisk form for celledød som er uheldig for vevet rundt. En irreversibel svelling av cellen fører til at cellen til slutt sprekker og frigjør celleinnholdet. Ofte påvirkes mange omliggende celler, slik at en inflammasjon oppstår. Dette skjer som følge av hypertermi, metabolsk forgiftning og direkte celletraume (Fadeel and Orrenius).

1.2.2 Apoptose

Apoptose er en velorganisert prosess i cellen som fører til celledød i de fleste, om ikke alle typer celler. Cellen får morfologiske forandringer som ”blebbing” av cellemembranen og den krymper. Inne i cellen vil kjernen og DNA fragmentere og kromatin dekonsolidere. Endepunktet er at cellen ender opp i små membranomsluttede apoptotiske fragmenter. Disse apoptotiske fragmentene blir gjenkjent og fagocyttert av naboceller eller fagocytter.

Apoptose skjer etter at et eller flere ytre eller indre signaler sendes, og aktiverer kaskadene. Fordelen med apoptose er at denne prosessen skader ikke vevet rundt seg og som regel, induserer ikke immunrespons. Den etterlater ikke arr. Apoptose skjer som regel via caspasekaskadene og er induert via dødsreseptorveien (”extrinsic”) eller mitokondriene (”intrinsic”) (Fadeel and Orrenius).

1.2.3 Mitokondrieindusert apoptose

Frigjøring av cytochrom c fra mitokondriene fører til aktivering av apoptose protease aktiverende faktor-1 (Apaf-1). Denne rekrutterer procaspase-9, og under tilstedeværelse av ATP og cytochrom c, danner et apoptosom. Dette apoptosomet kløyver procaspase-9 til caspase-9, som igjen aktiverer andre caspaser. Denne signalveien kalles også den indre signalveien.

1.2.4 Dødsreseptorveien

Dødsreseptorer på celleoverflaten kan ta imot ekstracellulære signaler om å gå i apoptose. Fas binder til Fasreseptor, eller APO-2 ligand og tumor nekrose faktor (TNF)-relatert apoptose induserende ligand (TRAIL) binder til TRAIL-reseptor. Denne bindingen blir etterfulgt av dannelse av et kompleks som rekrutter procaspase-8 eller 10 (Fadeel and Orrenius). Procaspasen blir kløvet til den aktive caspasen som aktiverer nedstrømscaspaser (caspase 3,6 og 7). Det er også kommunikasjon mellom dødsreseptorveien og

mitokondrieindusert apoptose. Bid, et protein i Bcl-2-familien, translokerer fra mitokondriene og frigjør cytokrom c, etter å ha blitt kløvet av caspase-8 (Polster and Fiskum 2004).

1.2.5 Caspaser

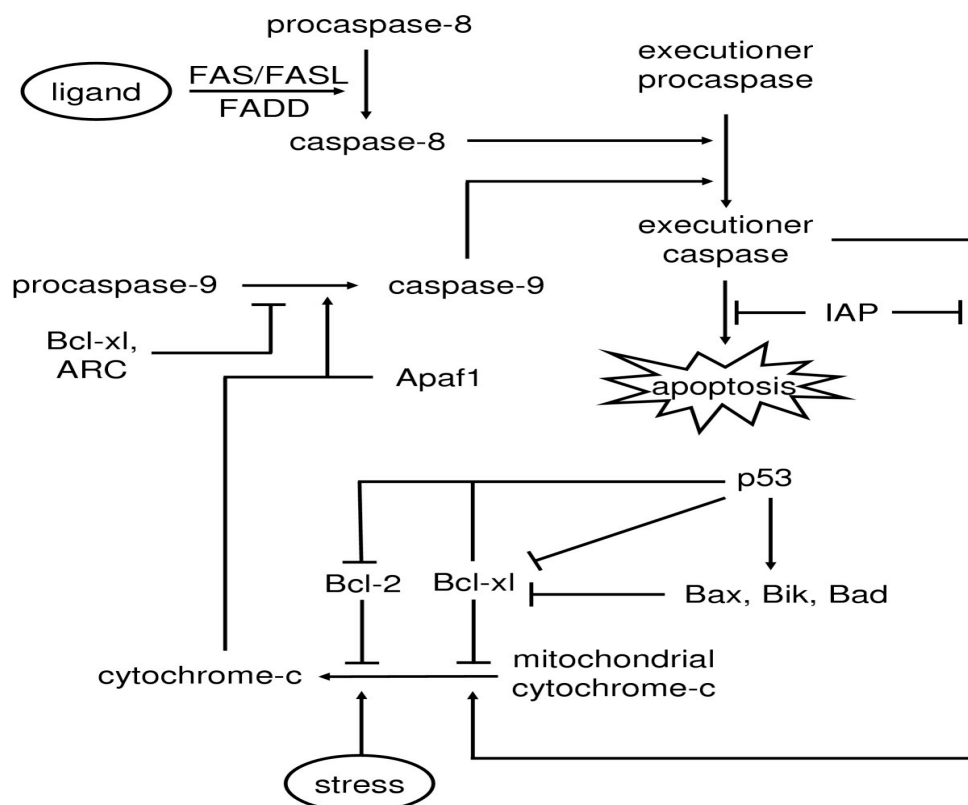
Caspaser (cystein-aspartat spesifikke proteaser) er proteolytiske enzymer som er nærmest uunnværlig i en cellereguleringsprosess for å utføre apoptose. Disse lages som inaktive procaspaser (zymogener) og kan raskt aktiveres av oppstrømssignaler. Det er kjent 14 forskjellige caspaser, og av disse er det syv som medierer apoptose. De andre er viktig for immunologiske responser. Av caspasene som medierer apoptose deler vi de inn i initiatorcaspaser og effektorcaspaser. Mekanisme for caspaseavhengig apoptose er vist i figur 1.1. Procaspasene består av en stor og liten subenhet. Det er et spesifikt aspartatsete på procaspasen, hvor den store subenheten og den lille subenheten skilles, slik at caspasen kan dimerisere og danne en aktiv heterotetramer. En cysteingruppe på caspasen er det ansvarlige setet for kløyving av substrater (Fadeel and Orrenius).

1.2.6 Initiatorcaspaser

Initiatorcaspasene er caspase 2, 8, 9 og 10. Disse caspasene har lange N-terminalkjeder (prodomene), med caspase rekrutteringsdomene (CARDs) og dødseffektor domene (DEDs) (Friedlander 2003). Caspase 8 og 10 er sentrale mediatorer i dødsreseptorveien. De aktiveres ved at Fas-ligand binder til Fas-reseptoren, som interagerer med Fas-assosiert dødsdomene protein (FADD) og rekrutterer procaspase-8 eller 10 og danner dødsreseptor indusert signaleringskompleks (DISC). Procaspase-8 eller 10 blir da proteolytisk aktivt etter at det er kløvet og signalerer videre til effektorcaspasene.

1.2.7 Effektorcaspaser

Effektorcaspasene ("executioner caspases") blir aktivert av initiatorcaspasene. Initiatorcaspasene kløyver av prodomene, og effektorcaspasene kan da også aktivere seg selv og danne dimerer. Effektorcaspasene er caspase 3, 6 og 7. Disse er ansvarlige for degraderingen av cellulære og nukleære proteiner (Fadeel and Orrenius).



Figur 1.1 Mekanisme for caspaseavhengig apoptose. Apoptosen skjer som følge av ligandbinding til Fas og aktivering av procaspase-8, eller stressrelatert frigjøring av cytokrom c fra mitokondriene som aktiverer procaspase-9. Begge signalveiene fører til aktivering av effektorcaspaser som procaspase-3. Figuren er hentet fra (Gadkar, Gunawan et al. 2005)

1.3 Caspaseaktivering

Initiatorcaspasene blir, som tidligere nevnt, aktivert av signaler fra dødsreseptorene eller mitokondriene. Effektorcaspasene blir aktivert av initiatorcaspasene, ved kløyving av procaspaseenheten. Deretter kan caspasen aktivere seg selv og forsterke signalet. Noen sykdommer skyldes en feil i denne kaskaden. Dersom kaskaden ikke lar seg aktivere på grunn av en feil oppstrøms, vil ikke cellen gå i apoptose. Ved kreftutvikling kan dette være en av årsakene. Derfor ville en direkte caspaseaktivator kunne føre til at cellene går i apoptose, uten å være avhengig av signaler oppstrøms.

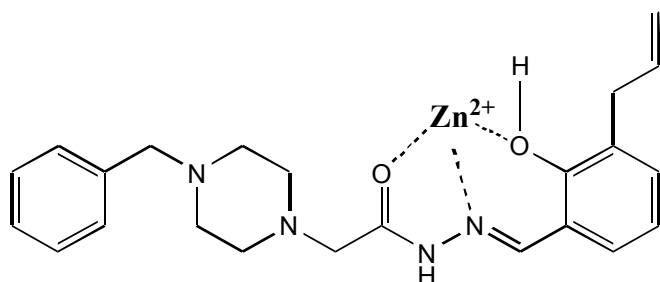
1.3.1 PAC-1

PAC-1 (figur 1.2-3) ble utviklet i 2006 av Hergenrother og medarbeidere (Putt, Chen et al. 2006). Stoffet ble utviklet som en direkte caspase-3 aktivator, etter å ha screenet flere tusen stoffer for aktivitet mot caspase-3. De rapporterte at i mange kreftceller var nivået av procaspase-3 meget forhøyet sammenlignet med ikke-kreftceller, og at celledøden var direkte relatert til konsentrasjonen av procaspase-3. Først kom hypotesen om at den flytted triaspartat "safety catch" på procaspase-3, ved hjelp av piperazin nitrogenet i strukturen til PAC-1. Det ble foreslått at posisjonen til "safety catch"en på procaspase-3 er følsom for pH. Under apoptose skjer det en surgjøring, og det ville føre til at setet under "safety catch"en ble tilgjengelig for proteolyse (Roy, Bayly et al. 2001). PAC-1 er positivt ladet ved fysiologisk pH. Dermed ville PAC-1 kunne fjerne denne bremseklossen, og procaspase-3 ville deretter autoaktiveres (Putt, Chen et al. 2006).

I 2009 kom Hergenrother med en ny artikkel som foreslo at mekanismen var at PAC-1 var en sinkchelator og at den fjernet hemmende sink fra procaspasen. De så på divalente metallioner og katalytisk aktivitet av caspase-3. Både kobber, sink, kobolt, jern og metallioner hemmet opp til 100% ved økende konsentrasjoner av metallet. De studerte PAC-1 og caspase-3 aktiviteten med økende konsentrasjoner av Zn^{2+} , og observerte en sterk hemming av caspase-3 aktiviteten ved høy konsentrasjon av Zn^{2+} . Tilsvarende forsøk med buffer uten PAC-1 viste at det trengtes lavere konsentrasjon med Zn^{2+} , for å få reduksjon i aktiviteten. Ved 500 nM caspase-3 og en konsentrasjon på ca 1000 nM $ZnSO_4$, begynner aktiviteten i bufferbehandlet prøve å minke, mens i buffer eksponert med 50 μ M PAC-1 opprettholdes aktiviteten ved enda høyere nivå av $ZnSO_4$. Ved et annet eksperiment har de en gitt mengde aktiv caspase-3 eller procaspase-3 i buffer med og uten $ZnSO_4$. I bufferen uten sink er aktiviteten høy og stabil, mens i buffer tilsatt sink, er aktiviteten minimal før den stiger ved økende mengder PAC-1. Overraskende, så viser også dette eksperimentet at PAC-1 hemmer caspaseaktiviteten ved høy konsentrasjon av PAC-1.

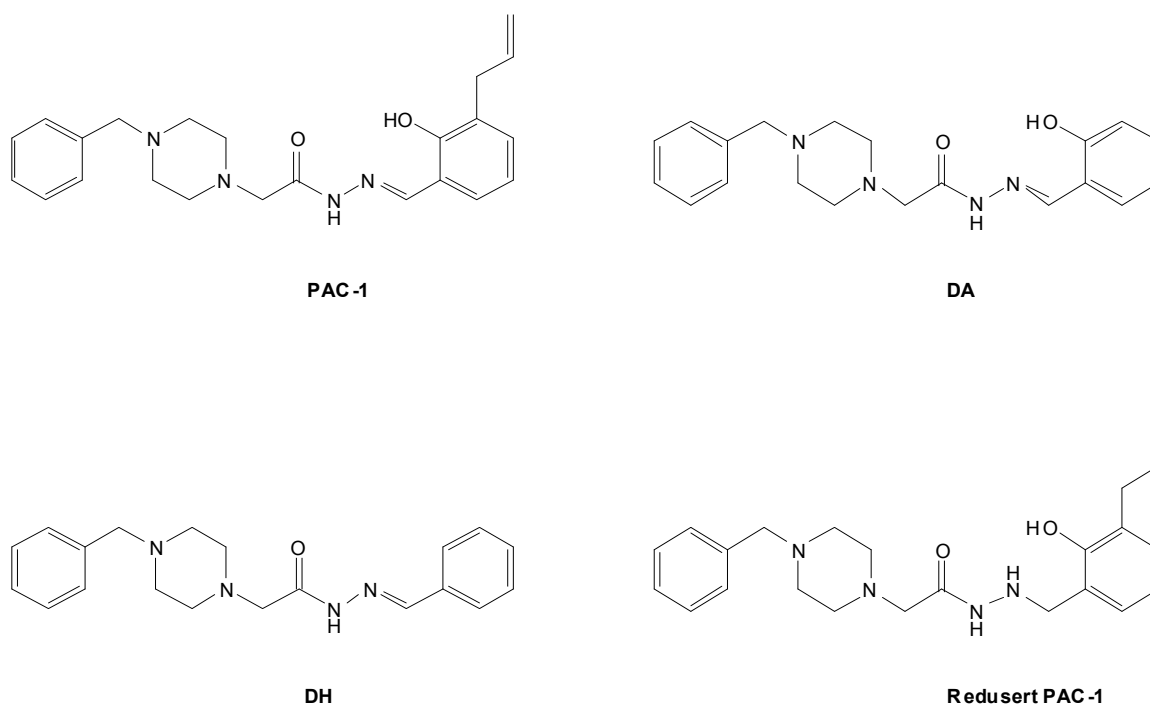
Mer eller mindre de samme resultatene kommer ved testing av caspase-7 istedenfor caspase-3. Både procaspase-3, caspase-3, procaspase-7 og caspase-7 får økt aktivitet med PAC-1 *in vitro*. Titrering med PAC-1 og økende mengder $ZnSO_4$, gir et skifte i UV-spekteret. I forholdet 1:1 hadde PAC-1 skiftet absorpsjonen av UV-lys fra ren PAC-1 til den sinkbundne statusen (96% av PAC-1 er bundet til sink ved et forhold på 1:1) Det er kjent at ortho-hydrokxy N-acyl hydrazonestrukturer har en chelaterende effekt på flere metaller (figur 1.2).

PAC-1-indusert celledød blir hemmet av sink²⁺-tilsetning i medium i cellekulturer (Peterson, Goode et al. 2009).



Figur 1.2 Sink har affinitet til ortho-hydroksy-N-acylhydrazonstrukturer.

Hergenrother og medarbeidere utviklet også andre lignende molekyler, bla. et som kalles deallyl-PAC-1 (DA, vist i figur 1.3). DA har effekt på celledød slik som PAC-1, men i mindre grad. DA har også mindre affinitet til sink. Dehydroksid deallyl-PAC-1 har ikke effekt på celledød og ingen affinitet til sink. Redusert PAC-1 har endret tredimensjonal utfoldelse i forhold til PAC-1, slik at sink ikke lenger kan bindes.



Figur 1.3 Strukturen til PAC-1, DA, DH og redusert PAC-1. (Peterson, Goode et al. 2009).

1.3.2 Sinkchelatering

Sink finnes i mange viktige enzymer. Omtrent 90% av intracellulær sink finnes i proteinkomplekser som sinkfingre, metalloproteiner, DNA polymerase og mange flere. Ca 10% befinner seg i såkalte "zink-pools". Sink spiller en viktig rolle i mange forskjellige typer enzymer. Disse er involvert i metabolisme av RNA og DNA, genuttrykk og signalveier. En studie fra 2006, estimerte at omtrent 10% av de humane proteinene potensielt kan binde sink, i tillegg til hundrevis som er involvert i transport av sink. Forskjellige "pools" av sink kan ha forskjellig cellulære funksjoner, som nukleinsyre syntese, nevrotransmitter lagring og sekresjon i enkelte presynaptiske terminaler samt mikrotubuli (Daugas, Nochy et al. 2000).

TPEN (*N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmetyl)etylenediamine) er en sinkchelator, som nettopp ved å fjerne intracellulær sink trigger apoptose i thymocytter (McCabe Jr, Jiang et al. 1993). Sink beskytter mot apoptose. (Chimienti, Seve et al. 2001) Dersom sink blir fjernet, kan også celledelingssyklusen stoppe opp, og cellen bli sendt til apoptose. Ved å hemme Ca^{2+} og Mg^{2+} -avhengige endonukleaser kan sink hemme DNA fragmenteringen i et sent trinn i apoptosen. Caspaseaktivering blir også hemmet av sink, og dermed blir apoptosen hemmet i et tidligere trinn (Broadley, White et al. 2007).

1.3.3 Staurosporin

Staurosporin (STS) ble oppdaget i 1977 fra bakterien *Streptomyces Staurosporeus*. STS er en potent kinasehemmer. I nanomolarkonsentrasjoner hemmer den serine/reoninkinaser som protein kinase C og tyrosinkinase v-src. Det er vist at STS induserer en apoptotisk død og at en tidlig hendelse er cellekrymping, etterfulgt av frigjøring av cytokrom c fra mitokondriene og caspaseaktivering via den indre veien (Porcelli, Ghelli et al. 2004). PC12-celler som blir eksponert for STS har blitt vist å få en økt intracellulær konsentrasjon av kalsium. Det fører til akkumulering av reaktive oksygen molekyler (ROS), deretter lipidperoksidasjon, og tap av transmembranpotensialet i mitokondriene. Økt kalsium intracellulært og ROS-produksjon (kapittel 1.4) er viktig i staurosporinindusert celledød, da kalsiumchelatorer og peroksynitrittfangere beskytter mot celledød (Kruman, Guo et al. 1998). Caspase-3-hemmere har vist å redusere DNA-fragmentering indusert av STS med rundt 90% i SH-SY5Y celler (Scott, Sobotka-Briner et al. 2003). Caspasehemmer har også vist full beskyttelse mot STS-indusert celledød i PC12 celler (Kruman, Guo et al. 1998).

1.4 ROS-produksjon

Reaktive oksygen specier (ROS) er brukt om bla. hydroksyl-, alkoksyl- og peroksyldradikaler, som brytes ned raskt, og superoksid- og nitroksylradikaler, som brytes ned litt saktere. ROS omfatter også ikke-radikaler som hydrogenperoksid og organiske hydroperoksider (Simon, Haj-Yehia et al. 2000). De dannes i alle celler som følge av kjemiske reaksjoner. I den indre mitokondriemembranen skjer ATP-dannelse ved hjelp av elektrontransportkjeden. Dette er en viktig kilde til ROS-produksjon. Andre kilder til økt ROS-produksjon er ulike kjemiske substanser, UV-stråling og varmpåkjenning. ROS er viktige i cellesignalerer, ionetransport og for immunforsvaret, f.eks. rekruttere blodplater ved sår dannelse.

Det som kjennetegner disse forbindelsene er at de reagerer lett med andre stoffer og kan dermed føre til skader om de reagerer med f.eks DNA. Det kan føre til oksidativt stress når ROS-produksjonen stiger, og det gir uheldige følger for cellene. ROS kan bli fanget opp av naturlige antioksidanter som er i cellene og dermed uskadeliggjøres. I forbindelse med apoptose er ROS-generering fra mitokondriene en viktig hendelse, og følger med bla. frigjøring av cytochrom c (Valencia and Morán 2004).

1.5 Mål med oppgaven

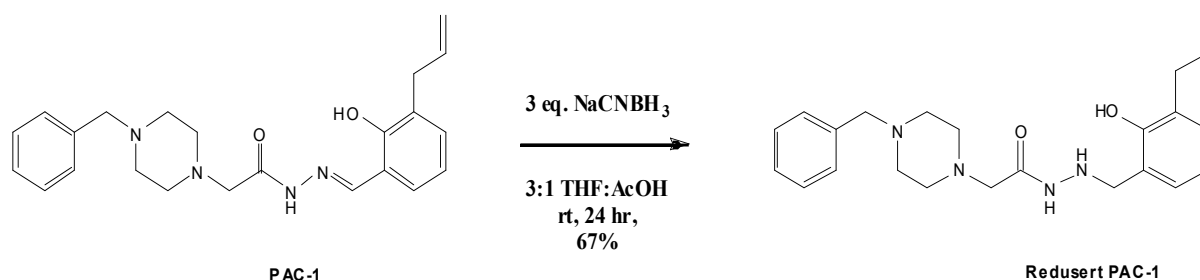
Målet for denne oppgaven har vært å teste følgende hypoteser:

1. PAC-1 og DA gir celledød i cellelinjen PC12 og i kyllingkornceller som ikke deler seg. PAC-1 og DA aktiverer procaspase-3 i PC12-celler og caspaseaktiveringen er ansvarlig for celledøden.
2. Celledøden og caspaseaktiveringen skyldes sinkchelatering via ortho-hydroksey N-acyl hydrazonestrukturen. DH har ikke denne strukturen komplett og har derfor ingen effekt.
3. Direkte caspase-3 aktivering gir like god caspaseaktivering som mitokondrieindusert caspase-3 aktivering.
4. PAC-1 virker på caspase-3 i apoptosen, hvor STS også virker. Dersom dette leddet blir stimulert optimalt, vil ikke kombinasjonen øke celledøden.
5. Dersom sinkchelateringen påvirkes av pH, og STS gir en eventuell økt effekt av PAC-1-indusert celledød, så er det pH som gir den økten effekten. Surgjøring av PC12-mediet påvirker celledødresponser i PC12 celler eksponert med PAC-1 tilsvarende STS i kombinasjon med PAC-1.
6. PAC-1 induserer celledød via direkte aktivering av caspase-3 og celledøden vil ikke påvirkes av ROS-fangere.

Det er også ønskelig å undersøke hvorvidt procaspase-7 er involvert i PAC-1-indusert celledød. Procaspase-7 er en induserbar caspase (Larner, McKinsey et al. 2005). Kanskje er caspase-7 vel så viktig som procaspase-3 som mediator i PAC-1-indusert celledød, men effekten kommer langsommere fordi den må induseres, oppreguleres og aktiveres.

2. Materialer og metoder

2.1 Kjemi; Syntese av PAC-1-derivat med redusert hydrazone



Figur 2.1 Foreslått syntese av redusert PAC-1 publisert av (Peterson, Goode et al. 2009).

Metode (Peterson, Hsu et al. 2009):

PAC-1 ble veid opp i en ønsket mengde (0,10 g, 0,25 mmol, 1 ekvivalent), og tilsatt i en 3:1 løsning av tetrahydrofuran (THF) og eddiksyre (AcOH). Deretter ble natrium cyanoborhydrid (0,048 g, 0,76 mmol, 3 ekvivalenter) tilsatt ved 0°C (I vannbad med is og vann). Blandingen sto i romtemperatur og rørt med magnetrører i 20 timer. Blandingen ble så ekstrahert, etter å ha blitt tilsatt litt is og 1 ml konsentrert saltsyre, med først diklormetan (2x10 ml) og så etylacetat (2x10 ml). For å fjerne rester av eddiksyre ble organisk fase vasket med natriumhydrogenkarbonat (NaHCO₃). Rester av vann ble tørket ut med magnesiumsulfat (danner krystallvann). Den organiske løsningen ble så filtrert og satt på rotavapor før produktet ble analysert ved NMR. Analysen viste at produktet var blitt dannet i så lavt utbytte at det ikke var egnet å gå videre med den reduserte formen av PAC-1.

2.2 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2.1 Stoffliste

Produkt:	Produsent:
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA

Bovint Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromfenolblått	Merck AG, Darmstadt, Tyskland
Caspase-7 antistoff p10	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-3-inhibitor III, Ac-DEVD-CMK	Calbiochem, San Diego, USA
Cytosin β -D-Arabino-Furanoside (Ara-C)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deallyl-PAC-1, DA	Gave fra stipendiat Øyvind Akselsen, Avd. for farmasøytisk kjemi, Universitetet i Oslo, Norge
Deallyl- dehydroksy-PAC-1, DH	Gave fra stipendiat Øyvind Akselsen, Avd. for farmasøytisk kjemi, Universitetet i Oslo, Norge
Dihydrorhodamine 123	Invitrogen Co, Carlsbad California, USA
Dimetylsulfoksid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen Co
Gentamicin sulfat salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glukose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Glyserol	VWR internasjonal
Hepes	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hesteserum	Invitrogen Co, Carlsbad California, USA
Igepal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kalveserum, føtalt (FBS)	Invitrogen Co, Carlsbad California, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol	Merck & Co, New Jersey, USA
MitoTracker® Red CM-H ₂ XRos	Invitrogen Co, Carlsbad California, USA
Natrium deoxycholot	Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook Bucks
Natriumklorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

PAC-1	Gave fra stipendiat Øyvind Akselsen, Avd. for farmasøytisk kjemi, Universitetet i Oslo, Norge
Poly L-glycine hydrobromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus All Blue Standards	Bio-Rad, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Sekundær antistoff, Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Staurosporin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Supersignal West Femto	Thermo Scientific
Supersignal West Piko	Thermo Scientific
Tris/Glycine Buffer (TG) 10 X	Bio-Rad, USA
Tris/Glycine/SDS Buffer (TGS) 10 X	Bio-Rad, USA
Trizma base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trizma HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Calbiochem, San Diego, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge
Vitamin C, L-ascorbic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Vitamin E, (+/-)- α -Tocopherol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
(Z-Asp-Glu-Val-Asp) ₂ -Rhodamine 110	Bachem Bioscience, King of Prussia, USA

2.3 PC12 celler

2.3.1 Splitting av PC12 celler

PC12-cellene ble splittet når de var konfluente, hver 3. eller 4. dag, og inkubert ved 5 % CO₂ og 37 °C.

Splitteprosedyre:

1. Gammelt medium i cellekulturflasken helles av.
2. 10 ml PC12-medium (tabell 2.2) tilsettes flasken. Flasken bankes hardt på flere sider for å få løsnet cellene fra bunnen. Se i mikroskopet for å sikre at cellene er løse.
3. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned, eventuelt med en pasteurpipette med trang åpning for å redusere aggregater med celler og få en jevn fordeling av cellene.
4. Når cellene ser fine ut splittes de over til ny flaske ved å overføre 1,5 ml av cellesuspensjonen til en ny cellekulturflaske, og tilsette 20 ml PC12-medium til den.
5. Ved splitting til skåler bestemmes først celletettheten i suspensjonen. En liten dråpe telles ved hjelp av Bürkers tellekammer og mikroskop.
6. Celletettheten i skålene skal optimalt være 7×10^4 celler/ml. Volumet som trengs fra celleflasken (X) blir beregnet ved hjelp av formelen:

$$X \text{ (ml)} = \frac{\text{Antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times 7 \times 10^4 \text{ celler/ml}}{\text{(antall celler i tellekammer} \times 10^4)}$$

7. Antallet ml cellesuspensjon overføres til en erlenmeyerkolbe. Deretter tilsettes så mye PC12-medium som trengs for å fylle det totale volumet til alle skålene (Y):

$$Y \text{ (ml)} = (\text{Antall ml per skål} \times \text{antall skåler}) - \text{antall ml cellesuspensjon}$$

8. Cellesuspensjonen tilsettes PC12-medium og blandes godt.
9. Pipetteres ut riktig volum til ulike sterile skåler. 10 ml til store skåler, 3,3 ml til medium og 1 ml til små skåler.
10. Inkuberes ved 37°C og 5% CO₂.

Tabell 2.2 PC12-medium med serum

Komponent	Mengde
Føtalt kalveserum	50 ml
Hesteserum	25 ml
Natriumpyruvat	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Dulbecco's MEM	500 ml

2.3.2 Surgjøring av PC12 celler

Til PC12-mediet ble det tilsatt konsentrert HCl og målt pH til angitte verdier. Det ble benyttet 4 forskjellige pH-verdier; 6,25 , 6,00 , 5,75 og 4,15. Etter pH-justering ble mediet sterilfiltrert (0,2 μ M), ført over i plastrør (50 ml) og satt i kjøleskapet (ca. 4°C). Etter at mediet hadde stått en stund ble mediet jevnlig testet med pH-papir for å holde kontroll med evt. endring av pH. I mediet er det HEPESbuffer. PC12 cellene ble splittet i vanlig medium. Dagen etter ble mediet byttet med pH-modifisert medium og telt etter 24 timer.

2.4 Kornceller fra kylling

Korncellekulturene er hentet fra cerebellum i kyllingfostere. Disse cellene er differensierte nevroner som ikke gjennomgår celledeling.

2.4.1 Poly L-lysin behandling av kulturskåler

For at kyllingnevronene skal feste seg til skålene behandles skålene med poly-L-lysin minst en dag før preparering av kulturene.

Prosedyre:

1. 10 ml fra en flaske med 500 ml autoklavert MQ eller destillert vann overføres til en steril flaske med 5 mg poly-L-lysin.
2. Det blandes og overføres tilbake til vannflasken.
3. 1 ml av løsningen tilsettes til de små skålene (8,8 cm²), 2 ml til medium (21,5 cm²) og 5 ml til store skåler (66,5 cm²).
4. Poly-L-lysin-løsningen suges av etter 30-60 minutter og skålene tørkes over natt i en steril LAF benk.

2.4.2 Preparering av korncellekulturer

Befruktede kyllingegg fra Samvirkekylling i Våler legges i rugemaskin ved 37°C i 18 dager. Eggene bedøves i iskaldt vann, kyllingen tas ut og dekapiteres. Fra lillehjernen blir tatt ut og frem til eksponering, foregår prosessen sterilt og ved bruk av aseptiske teknikker.

Prosedyre

1. Kyllingene bedøves ved at eggene legges i isvann i ca 10 minutter, 6 egg om gangen.
2. Eggene vaskes med 70% sprit før de åpnes.
3. En steril skalpell brukes til å dekapitere kyllingene, og hodene fraktes så over til LAF-benken hvor lillehjerne dissekeres ut med saks og pinsett, og overføres til en stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.4-5).
4. Hjernehinnene fjernes forsiktig ved hjelp av to pinsetter og lillehjernen overføres til en ny stor petriskål med løsning 1.
5. Løsning 1 suges av og lillehjernen kuttes i små biter med en skalpell. Det kuttes i to retninger vinkelrett på hverandre.
6. 10 ml av løsning 1 tilsettes igjen i skålen og bitene overføres til et sterilt 50 ml rør med nye 10 ml av løsning 1. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt.
7. Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes i 8 ml løsning 2 (tabell 2.5).

-
8. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske og settes i vannbad ved 37°C i 15 minutter. Korkene skrues halvveis og flasken ristes forsiktig med jevne mellomrom.
 9. Bitene fra trypsineringsflasken suges opp og overføres til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 4 (tabell 2.5). Røret fylles opp til 50 ml med løsning 4 og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter. Hvis supernatanten etter sentrifugering ikke er klar, kan en liten mengde løsning 3 (tabell 2.5) tilsettes røret og sentrifugeringen gjentas.
 10. Supernatanten suges forsiktig av og røret tilsettes 3 ml løsning 3.
 11. Pelleten løses forsiktig ved å pipettere opp og ned 15-20 ganger med en pasteurpipette med avrundet spiss (avrundes i flamme). Når celleklumpene har sunket ned i røret, overføres den øverste klumpfrie delen av løsningen til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 5 (tabell 2.5).
 12. Ved behov kan trinn 10 og 11 gjentas helt til det ikke lenger er synlige celleklumper tilstede og resten av løsningen overføres til røret som inneholder løsning 5.
 13. Cellesuspensjonen med løsning 5 (tabell 2.5) sentrifugeres ved 900 rpm i 7 min.
 14. Supernatanten suges av og 10 ml platemedium (tabell 2.6 for "serumfri" preparasjon og tabell 2.7 for "vanlig" preparasjon) tilsettes.
 15. Pelleten løses og alt overføres til en glassflaske med samme medium, som inneholder halvparten av den mengden medium som er beregnet ut fra antall preparerte skåler. En liten prøve tas ut til celledelling i Bürchers tellekammer.
 16. Cellesuspensjonen fortynnes med platemedium til en tetthet på $1,7 \cdot 10^6$ celler per ml medium. Det oppnås ved hjelp av denne formelen:

Antall ml platemedium totalt: (antall ml cellesuspensjon * celledetthet per ml i cellesuspensjonen) / ønsket celledetthet per ml.

17. Cellesuspensjonen overføres til petriskåler som er behandlet med poly-L-lysin dagen i forveien. Overfør 1 ml til små skåler (pluss 1 ml cellemedium), 3,3 ml til mediumskåler og 10 ml til store skåler.

18. Skålene inkuberes i inkubatorskap ved 37° C og 5% CO₂.

Tabell 2.3 Sterilt utstyr til preparering av korncellekulturer

Saks og pinsett til disseksjon
2 pinsetter for fjerning av hjernehirner
Skalpell
Trypsineringsflaske
Glassflaske for løsningene 1-5 og platemedium
Petrisåler
50 ml glassrør
Pasteurpipette
<i>Autoklaveres ved 120° C i 20 minutter.</i>

Tabell 2.4 Krebs-Ringerløsning 10X

Komponent	Mengde
Fenolrødt	50 mg
KH ₂ PO ₄	0,83 g
KCl	1,80 g
Glukose	12,85 g
NaCl	35,35 g
NaHCO ₃	10,70 g
Destillert vann	ad 500 ml
<i>Lagres i kjøleskap i 5-6 måneder.</i>	

Løsningene 1-5 (tabell 2.5) lages ny for hver korncellepreparering og sterilfiltreres (0,2 µm) før bruk.

Tabell 2.5 Løsning 1-5

Løsning	Komponent	Mengde
Løsning 1	Bovint serumalbumin (BSA)	1,50 g
	MgSO ₄ (3,82 g/100 ml destillert vann)	4 ml
	Krebs-Ringerløsning 10X (tabell 2.4)	50 ml
	Destillert vann	ad 500 ml
Løsning 2	Trypsin type III	25 mg
	Løsning 1	100 ml
Løsning 3	MgSO ₄ (3,82 g/100 ml destillert vann)	0,50 ml
	Deoksyribonuklease 1 (DNase 1)	6,25 mg
	Trypsinhemmer (Type 1-S)	26,0 mg
	Løsning 1	ad 50 ml
Løsning 4	Løsning 3	16 ml
	Løsning 1	100 ml
Løsning 5	MgSO ₄ (3,82 g/100 ml destillert vann)	0,320 ml
	CaCl ₂ (1,20 g/100 ml destillert vann)	0,320 ml
	Løsning 1	40 ml

Tabell 2.6 Platemedium til ”serumfrie” kyllingpreparasjoner

Komponent	Mengde
BME	500 ml
Varmeinaktivert hesteserum (varmeinaktivert 30 minutter i 56°C på vannbad)	50 ml

KCl	825 mg
Penicillin/streptomycin	5 ml
Glutamin 2 mM	146 mg
Insulin 100 nM	12,5 mg

Tabell 2.7 Ernæringsmedium til kylling korncellekulturer med serum

Komponent	Mengde
Basal medium Eagle (BME)	500 ml
Kyllingserum (varmeinaktivert)	25 ml
Gentamycinsulfat	50 mg
L-glutamin	146 mg
KCl	825 mg (5,4 mg er allerede i mediet)
<i>Oppbevares kjølig</i>	

Tabell 2.8 Ernæringsmedium til "serumfrie" kyllingpreparasjoner

Komponent	Mengde	Sluttkonsentrasjon
BME	500 ml	
KCl	825 mg	22 mM
penicillin/streptomycin	5 ml	
glutamin	146 mg	2 mM
humant transferrin	50 mg	100 µg/ml
putrecin	4,8 mg	60 µM
natriumselenitt	2,6 µl	30 nM
trijodtyronin	160 µl	1 nM
insulin 25 µg/ml	1,25 ml	25 µg/ml

2.4.3 Tilsetting av Ara-C

Cytosine β -D arabino-furanoside (Ara-C) tilsettes kulturene 24 timer etter preparering for å hindre vekst av ikke-nevronale celler.

For de ”serumfrie” skåler tilsettes Ara-C til ernæringsmediet. Så byttes platemediet som er i skålen til lik mengde ernæringsmedium (tabell 2.8) tilsatt Ara-C. For korncellekulturene med serum tilsettes Ara-C direkte til mediet i skålen. 1 mg Ara-C løses i 10 ml ernæringsmedium og sterilfiltreres (0,2 μ m). Det tilsettes 25 μ l per ml ernæringsmedium.

2.5 Caspaseassay

For å måle caspaseaktivitet ble PC-12 celler sådd ut i 96-brønnersplater og eksponert slik at det var ulike behandlinger i hver rad, og parallellert bortover hver kolonne. Etter å ha stått i 4, 10, 18 eller 24 timer ble cellene behandlet med RIPA-buffer, som lyserer cellene. Caspase-3 substrat med rhodamin ble tilsatt etter angitt tid og lest av ved hjelp av plateleser og programmet HTSoft. Rhodamin er et fluorescerende stoff. Differansen mellom snittet av tre brønnene med substrat og snittet av to brønner med substrat og hemmer fra samme rad, gjenspeiler aktiviteten av caspase med de ulike tilsetningene.

Prosedyre for måling av caspaseaktivitet:

1. PC12 celler sås ut i svarte 96-brønnersbrett.
2. Dagen etter eksponeres cellene for stoffene, og settes i inkubatorskap (37°C og 5% CO₂) i angitt tid.
3. 2X RIPA (tabell 2.9-11) tilsettes (Z-Asp-Glu-Val-Asp)₂-Rhodamine 110, slik at konsentrasjonen i brønnen blir 20 μ M. Av blandingen tas det ut 2/5 av volumet i et nytt plastrør og tilsettes caspase-3-hemmer slik at konsentrasjonen i brønnen 1 μ M.
4. Når cellene har blitt eksponert i angitt tid, fjernes først 50 μ l av mediet slik at resterende volum er ca 100 μ l, og tilsettes 100 μ l 2xRIPA med substrat til de første 3 kolonnene og 100 μ l 2xRIPA med substrat uten hemmer til kolonne 4 og

5. Hvorfor det ble fjernet og tilsatt ulike volumer, er pga væskefordamping fra det ble sådd ut celler dag 1.

5. Etter at RIPA-blandingen er tilsatt, er cellene klare for fluorescencemåling. Programmet som benyttes heter HTSoft, og eksitasjonsfilter måles ved 485 nm, mens emisjonsfilteret måles ved 535 nm, 3 flash med integrasjonstid på 40 μ s. Verdiene ble behandlet i Excel, hvor differansen mellom substrat og substrat + hemmer ga verdien på caspaseaktiviteten. Brettet ble avlest i plateleseren ved t=0 timer, 0,5 timer, 2 timer, 4 timer, 19 timer og 24 timer.

Tabell 2.9 2X RIPA-buffer

Komponent	Mengde i 100 ml buffer
Tris HCl 1M pH 7,4	10 ml
Igepal	2 ml
Natrium deoxycholat	0,5g
EGTA 0,1M	2 ml
NaCl-løsning 5M (tabell 2.10)	6 ml
MQ-vann	Ad 100 ml

Tabell 2.10 5M NaCl-løsning

NaCl	146,1 g
MQ-vann	400ml
<i>Løses opp i erlenmeyerkolbe med magnetrører, helles tilbake i målesylinderen og tilsettes ad 500 ml MQ-vann. Autoklaveres</i>	

Tabell 2.11 EGTA 0,5M

EGTA	7,608 g
MQ-vann	Ad 200 ml
<i>Blandes i erlenmeyerkolbe med magnetrører.</i>	

2.6 ROS-assay i Kyllingkornceller

Prosedyre:

1. Celler splittes ut i medium skåler.
2. Etter 3 dager eksponeres cellene med stoffene.
3. DHR tilsettes en time før høsting (se prosedyre for høsting av store skåler under avsnitt 2.8.1). På en stor skål går det tre medium skåler. Væsken med iskald PBS (tabell 2.12) flyttes fra den første, til den andre og så til den tredje, før det overføres til eppendorfrør.

2.7 ROS-assay i PC12-celler

Prosedyre:

1. Celler splittes ut i svart 96-brønnerplate.
2. Cellene eksponeres etter 24 timer. Mediet i brønnen overføres til eppendorfrør, hvor det aktuelle stoffet tilsettes og pipetteres noen ganger opp og ned. Deretter tas mediet tilbake i brønnen. Det lages tre paralleller per stoff. Settes deretter i inkubatorskap med 37°C og 5% CO₂.
3. En time før planlagt avlesning av ROS-aktivitet, tilsettes dihydrorhodamin. Det er en probe som penetrerer cellemembranen, og fluorescerer når den blir oksidert.

4. Etter at cellene har blitt eksponert for stoffene i 4t, byttes mediet på cellene. PC12-mediet (tabell 2.2) tas av og PBS (tabell 2.12) tilsettes i brønnene, slik at bakgrunnstøy fra det fargede PC12-mediet unngås ved avlesning.
5. Måles i plateleser ved 485nm 535nm 30min. Hver brønn leses 15 ganger i 30 min.

Tabell 2.12 PBS

Komponent:	Mengde:
NaCl	32 g
KCl	0,8 g
KH ₂ PO ₄	1,08 g
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	7,12 g
Destillert vann	Ad 4000 ml
<i>pH justeres til 7,4 med HCl og autoklaveres</i>	

2.8 Western blot

Westernblotting er en metode for å identifisere proteiner i en celleprøve. Antistoff fester seg på antigener i prøven. Slik kan man selektere ut hvilke proteiner man ønsker å påvise. Sekundærantistoff vil feste seg på primærantistoff og etter behandling med Supersignal West Femto eller Piko, vil man kunne kvalitativt og kvantitativt bestemme proteininnholdet i prøven. Prøveopparbeidelsen går gjennom flere prosedyrer før den er klar for fremkalling.

2.8.1 Eksponering og høsting av celler

Cellene sås ut i ønsket konsentrasjon (7×10^4 celler/ml for PC12 og $1,7 \times 10^6$ celler/ml for kyllingnevroner) i store skåler (66,5 cm²). Inkuberes i 24t for PC12 celler og i 3 dager for kyllingnevronene, ved 37°C og 5% CO₂, før de eksponeres.

Tabell 2.13 Eksponering av store skåler for Western

Komponent	Konsentrasjon i mediet
Pac1	100 μ M
Da	100 μ M
DH	100 μ M
STS	1 μ M
DMSO	0,1%
Ubh	

Etter eksponering settes cellene tilbake i inkubatorskapet. Cellene høstes etter 4 timer og 24 timer. Ved det ene forsøket med tidsstudier ble cellene høstet etter 1 time, 2 timer, 4 timer og 24 timer.

Prosedyre for høsting av store skåler:

1. Cellemediet helles av skålen og pipetteres bort.
2. Skålen skylles to ganger med PBS (tabell 2.12) (PBS'en skal stå på is).
3. 100 μ l høstebuffer (tabell 2.14) tilsettes rundt om i skålen.
4. Cellene skrapes av overflaten med en celledrape to veier vinkelrett på hverandre.
5. Suspensjonen overføres over i et eppendorfrør og settes på is.
6. Når alle skålene er høstet, kokes eppendorfrørene i 2 min ved 95°C før de fryses ned ved -80°C.

Tabell 2.14 Høstebuffer

Mengde høstebuffer tilpasses behovet. 100 μ l per stor skål. Blandes til før hver gang det brukes.	
Komponent	Mengde (til 1 ml)
Leupeptin 5 mg/ml	1 μ l
Pepstatin A 1 mg/ml	5 μ l
PMSF 100 mM	3 μ l
Na ₃ VO ₄	10 μ l
2% SDS	1 ml

2.8.2 Proteinmåling og tilsetning av prøvebuffer (laemmli)

Før celleprøver ble brukt til Westernblotting, ble proteininnholdet i hver prøve bestemt ved hjelp av "BCA protein assay kit" (Pierce) og lest av i en plateleser som måler absorbans. Ved hjelp av formelen som beregnes av plateleseren, setter man inn y-verdien og får ut x-verdien som gjenspeiler proteinkonsentrasjonen. Det er ønskelig å ha en proteinmengde på 50 μ g i hver brønn. Det viktigste er at mengden protein i hver brønn er lik. Man tar utgangspunkt i prøven med lavest konsentrasjon. Det tilsettes 2x eller 4x prøvebuffer (tabell 2.17 og 2.18) ettersom hvilken proteinkonsentrasjon man har og hvilken man ønsker å ende opp med etter tilsetningen av prøvebuffer.

Proteiner har ulike ladninger, romstruktur og masse. Hensikten med prøvebufferen er å få en uniform negativ ladning, økt løselighet og reduksjon av S-S bindinger slik at størrelsen er det som bestemmer vandringshastigheten.

Prosedyre for proteinmåling og tilsetning av prøvebuffer:

1. Standardløsning og "working reagent" lages klart (tabell 2.15).
2. 12 av brønnene i en blank 96-brønnersplate tilsettes standardløsning i de mengdene som figuren over plateoppsettet viser (tabell 2.16).

3. 10 µl celleprøve tilsettes i de neste brønnene. Dersom proteinkonsentrasjonen er høy, kan lavere volumer brukes. Hver prøve tilsettes i to ulike brønner (tabell 2.16).
4. Alle brønnene tilsettes 200 µl ”working reagent” (tabell 2.15).
5. De to blanke brønnene og brønnene med standardløsning, tilsettes samme volumet som i punkt 4. av høstebufferen (tabell 2.14). Dette gjøres for å måle bakgrunnsstøy.
6. Brettet inkuberes ved 37 ° C i 1 time.
7. Absorbans måles ved 570 nm i plateleseren. (Metoden kalles nevro protein.)
8. Etter avlesning beregnes konsentrasjonen av protein i prøvene.
9. Dersom konsentrasjon av protein er lav, brukes 4X laemmli (tabell 2.18) i forholdet 3:1 med henholdsvis protein og 4X laemmli. Forøvrig bruker man 2X laemmli (tabell 2.17) i forholdet 1:1.

Tabell 2.15 Løsninger til Proteinmåling

Standardløsning:	
Bovint serumalbumin 2 mg/ml:	50 µM
PBS (tabell 2.12)	150 µM
Working reagent:	
Mengde som lages avpasses i forhold til antall brønner som skal brukes.	
(Volum ”working reagent” = Antall brønner med standard og prøver × 200 µl/brønn)	
BCA protein assay reagent A	50 deler
BCA protein assay reagent B	1 del

Tabell 2.16 Plateoppsett til proteinmåling

Blank	10 µL Standard	Prøve 2	Osv..									
Blank	10 µL Standard	Prøve 2										
1 µL Standard	20 µL Standard	Prøve 3										
1 µL Standard	20 µL Standard	Prøve 3										
2,5 µL Standard	40 µL Standard	Prøve 4										
2,5 µL Standard	40 µL Standard	Prøve 4										
5 µL Standard	Prøve 1	Prøve 5										
50 µL Standard	Prøve 1	Prøve 5										

Tabell 2.17 2X Laemmli

Komponent	Mengde
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	3 ml
10% SDS	4 ml
50% glyserol	2ml
merkptoetanol	1 ml
Bromfenolblått	noen korn

Tabell 2.18 4X Laemmli

Komponent	Mengde
Tris-HCl (2M) pH 6,8	1,5 ml
SDS 20%	1,5 ml
Glyserol 40%	4 ml
MQ-vann	1 ml
Merkaptoetanol (obs, tilsette i avtrekksskap rett før laemmlibufferen skal brukes)	2 ml
Bromfenolblått (tilsettes i avtrekksskap til løsningen blir farget blå)	noen korn

2.8.3 Gelstøping

Avhengig av størrelsen på proteinene man ønsker å detektere kan man støpe 10 eller 12 % gel. For caspase-7 og caspase-3 er det aktuelt med 12 %, fordi disse proteinene er små. Jo høyere tetthet på gelen, dess mer motstand møter proteinene når de vandrer, og derfor vil små proteiner vil separert bra. Tykkelsen på gelen velges ut fra volumet man ønsker å påføre i brønnen. Dersom man har lav proteinkonsentrasjon, vil et større volum være gunstig. Antallet brønner velges ut fra antallet prøver og ønsket volum. I gel med 1,5 mm tykkelse og 10 brønner er det plass til et volum på 50 μ l.

Prosedyre for gelstøping:

1. Gjøres i avtrekk pga akrylamid som er giftig ved innånding før den er polymerisert. Bruk hansker.
2. Bakplate og forplate av glass som er vasket helt rene, settes sammen kant i kant.
3. Glassplatene festes i resten av støpeformen og kontrolleres for lekkasje, ved å helle vann imellom glassplatene. Dersom det ikke lekker, helles vannet ut og det er klart for støping.
4. Komponentene til nedre gel (tabell 2.19-20) blandes sammen i et plastrør. Temed tilsettes sist (induserer geldannelsen). Overføres deretter mellom glassplatene.

Ønskes det tynn gel (0,75mm) brukes oppskriften nedenfor. Ønskes det tykk gel (1,5mm) lager man dobbelt så mye.

5. Litt MQ-vann helles i glassplatene for å sikre en rett kant på gelen.
6. Polymeriseres i 30 min.
7. Komponentene til stacking gelen (tabell 2.21-22) blandes sammen i et plastrør. Temed tilsettes sist.
8. Vannet over den stivnede gelen helles ut, og stacking gelen helles over den stivnede gelen.
9. En plastkam, med riktig antall brønner og tykkelse, festes i åpningen av glassplatene. Obs, det spruter noen dråper fremover.
10. Polymeriseres i ytterligere 30 min.

Tabell 2.19 Nedre gel (tynn gel) 12 %

Komponent	Mengde
MQ-vann	3,3 ml
Nedre gelbuffer (tabell 2.9)	2,6 ml
Akrylamid	4,0 ml
APS 10%	100 µl
Temed	4 µl

Tabell 2.20 Nedre gelbuffer

Komponent	Mengde
Trizma base	18,170 g
SDS 20%	2,0 ml
MQ-vann	ad 100 ml
<i>HCl brukes for å justere pH til 8,8</i>	

Tabell 2.21 Stacking gel

Komponent	Mengde
MQ-vann	1,2 ml
Akrylamid	0,3 ml
Øvre gelbuffer (tabell 2.11)	0,5 ml
APS 10%	10 µl
Temed	2 µl

Tabell 2.22 Øvre gelbuffer

Komponent	Mengde
Trizma base	6,06 g
SDS (20%)	2,0 ml
MQ-vann	ad 100 ml
<i>HCl brukes for å justere pH til 6,8</i>	

Tabell 2.23 Elfobuffer

TGS	100 ml
Destillert vann	900 ml

Tabell 2.24 Blottebuffer

TG	100 ml
Metanol	200 ml
Destillert vann	700 ml

2.8.4 Elektroforese

Under elektroforesen vandrer proteinene nedover gelen og separeres ut i fra størrelse. Ladningen skal i teorien være lik, slik at størrelse og 3D-struktur er den eneste parameteren som påvirker hvor langt proteinene vandrer. Prøvebufferen (tabell 2.17 og 2.18) skal holde samme pH som øvre gel. Det er viktig for at proteinene skal havne mest mulig samtidig på nedre gel, slik at båndene blir så smale som mulig og separasjonen god.

Tips: Det er lurt å ha laget elfobuffer og blottebuffer før man begynner på elektroforesen.

Prosedyre for elektroforese:

1. Når den øvre gelen har stivnet, fjernes plastkammen forsiktig. Glassplatene skylles forsiktig i springvann.
2. Karet for gelkjøring monteres. (Sett glasset med gelen inn i den grønne plastformen og sett den inn i formen med elektrodene på og ta dette sammen i karet.)
3. Elfobuffer (tabell 2.23) helles i karet.
4. Luftbobler under glassplatene fjernes ved hjelp av en bøyd kanyle.
5. En plastkam settes over gelen for å angi brønnenes plassering.
6. I den første brønnen tilsettes 5 µl Precision Plus All Blue Standard. Prøve tilsettes i de resterende brønnene. 15 µl til små brønner og 50 µl til store brønner.
7. Gelen kobles til strøm. Først 90 volt i 15 min, deretter 150 volt til prøvene har vandret gjennom hele gelen (ca 1 time). Dersom man ser etter små proteiner, er det viktig å ikke la den gå for langt.

2.8.5 Blotting og farging

Ved blotting overføres proteinene og standarden fra gelen til membranpapiret. Fargingen er for å se hvor mye protein man har fått på membranen og om det er jevn mengde fra hver av brønnene.

Prosedyre for blotting og farging:

1. Bruk blå hansker (pga metanolen).

-
2. To skrubber og to filterpapir per gel legges i et kar med blottebuffer (tabell 2.24).
 3. Gelen fjernes forsiktig fra glassplatene ved hjelp av en plastspatel. En nitrocellulosemembran dyppes i blottebuffer og legges oppå den ene siden av gelen. Et filterpapir legges på den andre siden. Legg det sammen i denne rekkefølgen:
 - Svart plastramme
 - Skrubb
 - Filterpapir
 - Gel
 - Membran
 - Filterpapir skrubb
 - Hvit plastramme
 4. Rammen med gelen puttes i et blottekar. Ha i en iskassett og magnetrører. La den stå på kjølerommet og fyll opp med blottebuffer.
 5. Strømstyrken settes til 400 mA i 1,5 time eller 50 mA over natt.
 7. Membranen legges i et kar med Ponceau S løsning i 1 minutt med proteinsiden opp, da blir proteinene farget røde.
 8. Membranen vaskes i et kar med destillert vann.
 9. La overflødig væske renne av før man legger membranen inn i en plastlomme og tar bilde av proteinbåndene med en kopimaskin.

2.8.6 Blokking og påsetting av antistoff

Prosedyre

1. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden mot midten (bruk pinsett og hansker).
2. Røret tilsettes 5 ml 5 % tørrmelk i TBS med Tween (tabell 2.25-26), og legges til rulling i 1 time.

3. Primærantistoff og minst 3 ml 5 % tørrmelk i TBS m/Tween (tabell 2.25-26) tilsettes membranen. Blandingsforholdet avhenger av type antistoff og hvor sensitivt det er. I dette arbeidet ble det benyttet caspase-7 antistoff i blandingsforholdet 1:200, dvs 15 µl caspase-7 antistoff til 3 ml TBS m/Tween. La plastrøret ligge til rulling på kjølerom over natten.
4. Neste dag helles melken med antistoffet av og vaskes deretter tre ganger 10 minutter med 5 ml 1x TBS m/Tween i romtemperatur.
5. Sekundærantistoff i minst 3 ml 5 % tørrmelk i TBS m/Tween tilsettes og legges til rulling i en time. Blandingsforholdet avhenger av type antistoff. Det ble benyttet ”donkey anti-goat”, fordi primærantistoffet var fremstilt fra geit.
6. Melken med sekundærantistoff helles av og vaskes tre ganger 10 minutter med TBS m/Tween ved romtemperatur.

Tabell 2.25 Tørrmelk (5 %) i TBS m/ Tween

Tørrmelk	2,5 g
TBS m/Tween (tabell 2.26)	50 ml
<i>Oppbevares kjølig, sjekk at den ikke har blitt dårlig før bruk.</i>	

Tabell 2.26 Tris bufret saltvann (TBS) med Tween

Komponent	Mengde
Trizma base	1,21 g
NaCl	4,00 g
Tween 20	0,25 ml
Destillert vann	Ad 500 ml
<i>pH justeres til 7,6 med HCl</i>	

2.8.7 Fremkalling

Prosedyre

1. Fremkallingsvæske blandes 1:1. Supersignal West Piko brukes når man får mye signal, mens Supersignal West Femto brukes når man trenger en mer følsom fremkallingsvæske.
2. Membranen tas ut av plastrøret, overflødig væske rennes av og membranen legges med proteinsiden opp på en glassplate. Ca 1 ml fremkallingsvæske pipetteres ut over membranen, slik at det fordeler seg godt. Bruk hansker og pinsett. La ligge i 5 minutter.
3. Overflødig væske fra membranen helles av og membranen legges i en plastlomme. Fremkalles ved hjelp av GeneSnap fra SynGene.
4. Etter fremkallingen legges membranen i plastrøret med 1x TBS eller eventuelt stripes for påføring av nytt antistoff.

2.8.8 Stripping

Prosedyre

1. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden mot midten.
2. Plastrøret tilsettes 5 ml stripebuffer (Western Blot Stripping Buffer), og legges til rulling i 15 min ved romtemperatur.
3. Stripebufferen helles av og membranen vaskes med 5 ml TBS m/Tween ved romtemperatur i 3 timer.
4. Membranen er klar til å blokkes. Se prosedyren som er tidligere beskrevet i 2.8.6.

2.9 Celledød

For å kvantifisere celledøden etter tilsetning av de forskjellige stoffene i ulike konsentrasjoner ble det benyttet et stoff som farger kun celler som er døde. Trypanblå farger celler som har mistet membranintegriteten og dermed kan man i mikroskop, skille på levende og døde celler.

2.9.1 Behandling av PC12 celler

Cellene ble sådd ut på medium skåler. Dagen etter ble de eksponert for stoffene. 24t eller 48t etter eksponering ble skålene farget med trypanblå. Da ble væske fjernet fra cellene slik at det resterende volumet var 1 ml medium og deretter ble 250 µl trypanblåløsning (tabell 2.27) tilsatt.

Skålene ble satt tilbake i inkubatorskapet i en halvtime, før telling ble utført. Inkubatorskapet holdt 37°C og 5% CO₂.

2.9.2 Behandling av kornceller fra kylling

Cellene ble sådd ut på mediumskåler. 3 dager etter ble cellene eksponert for stoffene. Dagen etter eksponering ble skålene farget med trypanblåløsning (tabell 2.27). Først fjernes væske slik at resterende volum av kyllingmediet er 1 ml, deretter tilsettes 250µl trypanblåløsning.

Skålene ble satt tilbake i inkubatorskapet i en halvtime, før telling ble utført. Inkubatorskapet holdt 37°C og 5% CO₂.

Tabell 2.27 Trypanblåløsning

2 % Trypanblå stockløsning

Trypanblå	1 g
Destillert vann	50 ml

Komponentene blandes sammen og varmes opp til kokepunktet. Dette gjøres i avtrekk. Deretter settes løsningen til avkjøling ved romtemperatur før den filtreres.

NaCl stockløsning

NaCl	1,8 g
Destillert vann	100 ml

Trypanblåløsning

Trypanblå stockløsning blandes med NaCl stockløsning i forholdet 1:1 rett før bruk

2.9.3 Telle celledød

Hver skål ble telt for levende og døde celler, tre områder i hver skål. Avhengig av hvor mange celler det var ble en kvart, halve eller hele synsfeltet telt.

Tabell 2.28 Eksempel på eksponering av PC12-cellene

Eksponering av PC12-cellene, tilsatt i PC-12 medium (tabell 2.1)	PAC-1 10 μM	+/- Caspase-3-hemmer	+/- endring av pH
	PAC-1 30 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	PAC-1 100 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	DA 10 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	DA 30 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	DA 100 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	DH 10 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	DH 30 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	DH 100 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	STS 1 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	STS 2 μM	+/- Caspase-3-hemmer	
	DMSO 1 μl	+/- Caspase-3-hemmer	
	Ubehandlet	+/- Caspase-3-hemmer	+/- endring av pH

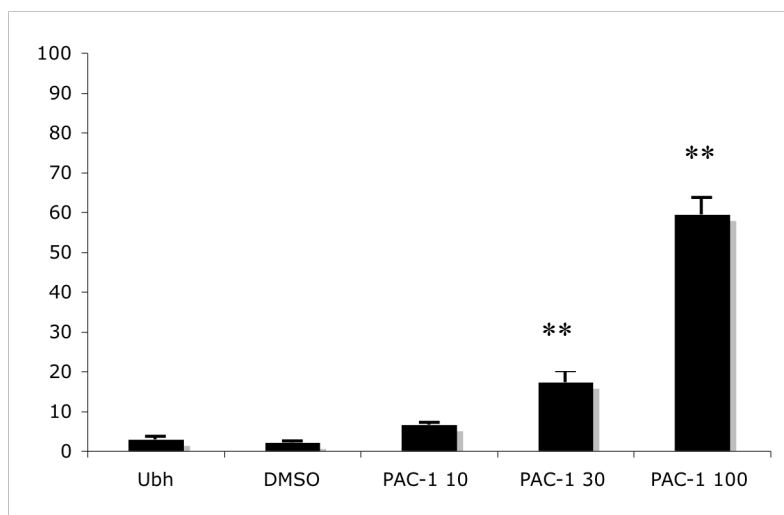
2.10 Grafer og statistikk

Resultatene er fremstilt grafisk ved bruk av Microsoft Excel 2004 for Mac. Statistikken er utført ved hjelp av programmet SigmaStat™. Tallmateriale er angitt som gjennomsnitt og standardfeil (SEM, standard error of mean), samt antall observasjoner/forsøk. Det er angitt i figurtekst hvilke statistiske tester og hvilket signifikansnivået som er brukt. Det er angitt i tabell tilhørende hver figur, hvilke stoffer og konsentrasjoner som er brukt i forsøket.

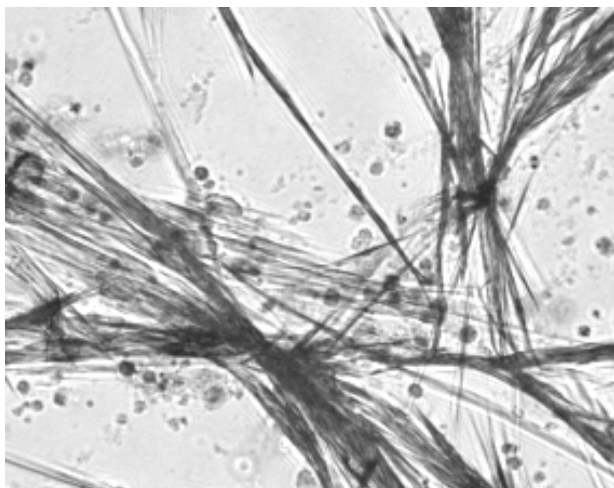
3. Resultater

3.1 Doseavhengig celledød induisert av PAC-1 i PC12 og kyllingnevroner

Det er vist at PAC-1 gir celledød i μM -området. Derfor ble det utført celledødtesting med PAC-1 (løst i DMSO) ved 10, 30 og 100 μM . PAC-1 inducerer en doseavhengig celledød i PC12 celler og det var signifikant økt celledød i forhold til kontrollen ved PAC-1 30 og 100 μM i PC12 celler (figur 3.1 og tabell 3.1). Skåler med høy konsentrasjon av PAC-1 kunne gi krystallisering (vist i figur 3.1b). Kyllingkornceller er vist i figur 3.2a. Det observeres nevroner og ikke-nevronale celler i kyllingkulturene, men kun nevroner telles med i grunnlaget for disse dataene. PAC-1 gir også doseavhengig død i kyllingkornceller. Det var signifikant økt celledød ved PAC-1 30 og 100 μM (figur 3.2 og tabell 3.2) og i kornceller i serumfritt medium ved PAC-1 100 μM (figur 3.3 og tabell 3.3). I figur 3.28 sees ubehandlede PC12 celler, slik de observeres i mikroskop. Høy konsentrasjon med PAC-1 førte til at mange celler løsnet fra bunnen (se avsnitt 3.2). De gjenværende cellene var små og runde, med korte utløpere.



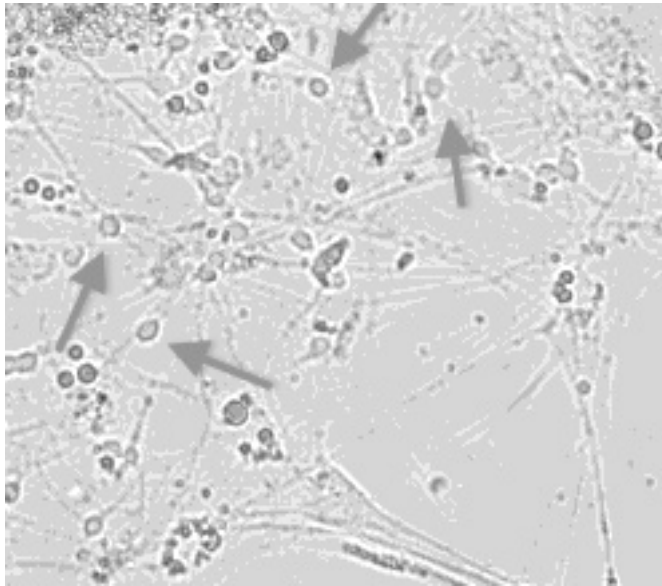
Figur 3.1a PAC-1-indusert celledød i PC12 celler eksponert i 24 timer. Cellesuspensjon ble platet ut i skål og eksponert dagen etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24 timer etter eksponering. ** angir signifikans $p < 0,001$ mot DMSO og ubh som kontroll ved bruk av one-way ANOVA, Dunnett's post hoc test. Ubh=ubehandlet. Tallene angir PAC-1 konsentrasjon i μM .



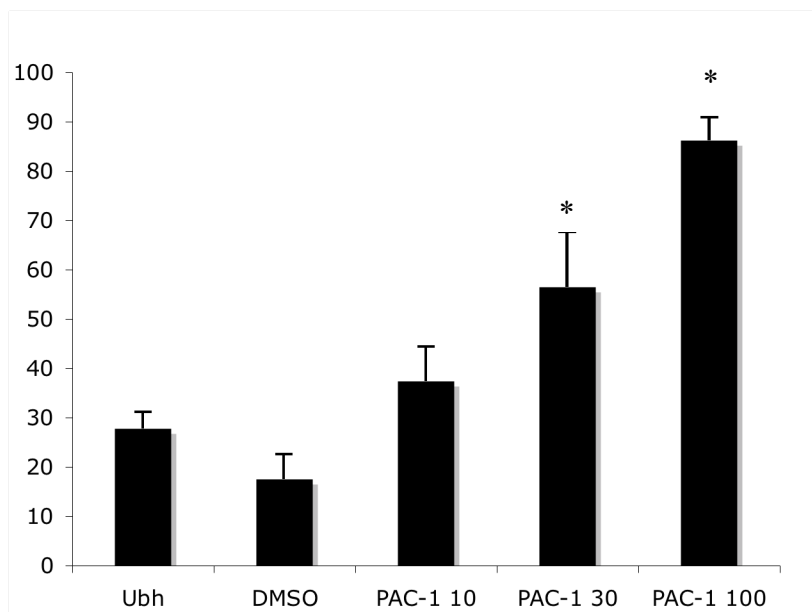
Figur 3.1b Krystalldannelse i 100 μM PAC-1 eksponerte PC12 celler.

Tabell 3.1 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.1a

Eksposering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
Ubh	2,96	0,66	9	8
DMSO 0,1%	2,09	0,45	9	8
PAC-1 10 μM	6,55	0,64	10	9
PAC-1 30 μM	17,23	3,01	5	4
PAC-1 100 μM	59,36	4,26	10	9



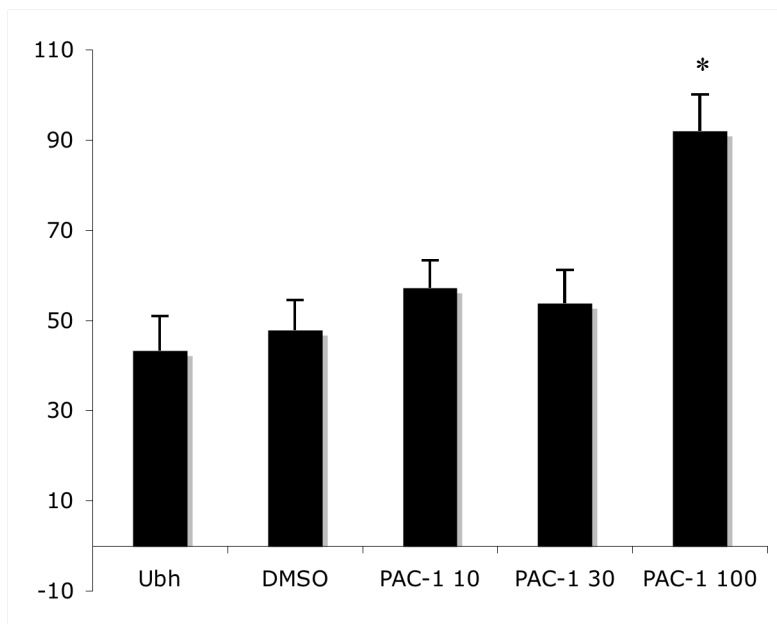
Figur 3.2a Utsnitt av celler slik det observeres i mikroskop. Pilene markerer kyllingnevroner. Det er en heterogen blanding av celler, både nevroner og ikke-neuronale celler. Cellene har medium med serum og er platet ut i skål og inkubert ved 37°C og 5% CO₂ i 3 dager.



Figur 3.2b PAC-1-indusert celledød i kyllingkornceller med serum eksponert i 24 timer. Cellesuspensjon ble platet ut i skåler og eksponert 3 dager etter. Celledød er angitt i prosent og ble målt vha ved trypanblåfarging 24 timer etter eksponering. * angir signifikans $p < 0,05$ i mot DMSO som kontroll ved bruk av one-way ANOVA, Dunnett's post hoc test. Ubh=ubehandlet. Tallene angir PAC-1 konsentrasjon i μM .

Tabell 3.2 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2b

Eksposering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
Ubh	27,74	3,37	5	5
DMSO	17,51	5,11	3	3
PAC-1 10 μ M	37,37	7,02	5	5
PAC-1 30 μ M	56,55	11,09	5	5
PAC-1 100 μ M	86,24	4,71	5	5



Figur 3.3 PAC-1-indusert celledød i kyllingkornceller i serumfritt medium eksponert i 24 timer. Cellesuspensjon ble platet ut i skåler og eksponert 3 dager etter. Celledød er angitt i prosent og ble målt vha trypanblåfarging 24 timer etter eksponering. * angir signifikans $p < 0,05$ i mot DMSO og ubh som kontroll ved bruk av one-way ANOVA, Dunnett's post hoc test. Ubh=ubehandlet. Tallene angir PAC-1 konsentrasjon i μ M.

Tabell 3.3 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3

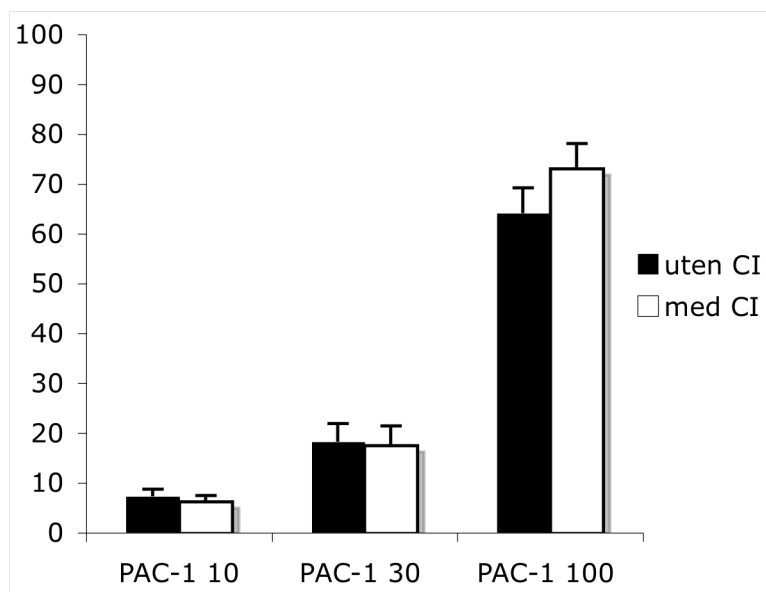
Eksposering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
Ubh	43,27	7,71	5	4
DMSO	47,76	6,71	5	4
PAC-1 10 μ M	57,20	6,14	5	4
PAC-1 30 μ M	53,80	7,32	5	4
PAC-1 100 μ M	91,94	8,06	5	4

3.1.1 Caspasehemmer har ingen påvirkning på PAC-1-indusert celledød

Det ble sett på om PAC-1-indusert celledød var caspaseavhengig. Siden den foreslåtte mekanismen er direkte caspase-3-aktivering, bør en caspase-3-hemmer beskytte mot celledøden. Det ble derfor tilsatt caspase-3-hemmer (CI, Ac-DEVD-CMK, 1 μ M) til PC12-mediet samtidig med PAC-1. Denne caspase-3-hemmeren er, på tross av navnet, ikke spesifikk hemmer av kun caspase-3, men hemmer også caspase-6, 7, 8 og 10, ifølge produsenten Calbiochem.

Det var ingen forskjell på celledød om CI var tilstede sammen med PAC-1 eller ikke, verken i PC12 celler (figur 3.4 og tabell 3.4), kyllingnevroner med serum (figur 3.5 og tabell 3.5) eller kyllingnevroner i serumfritt medium (figur 3.6 og tabell 3.6).

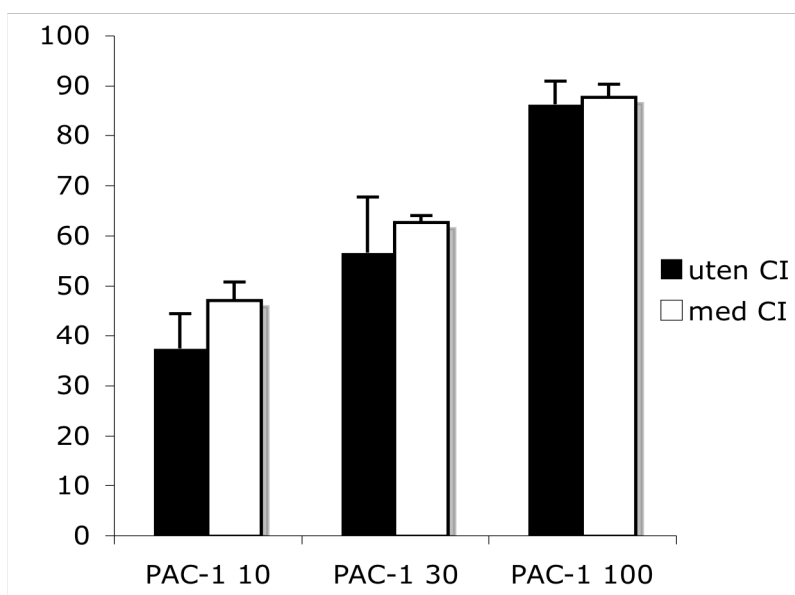
Det ble målt om CI beskyttet PC12 celer mot celledød induisert av PAC-1 ved 48t (figur 3.7 og tabell 3.7). Det ble heller ikke funnet noen beskyttelse mot PAC-1 med CI ved 48t.



Figur 3.4 Celledød induisert av PAC-1 med og uten CI målt etter 24t i PC12 celler. Cellesuspensjon med PC12 celler ble platet ut i skåler og eksponert dagen etter. PAC-1 og CI ble tilsatt samtidig. Celledød er angitt i prosent og ble målt vha trypanblåfarging 24 timer etter eksponering. Tallene angir konsentrasjon av PAC-1 i µM. CI- og DMSO-behandlede celler hadde en celledød på henholdsvis 2,02% og 2,09%.

Tabell 3.4 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.4

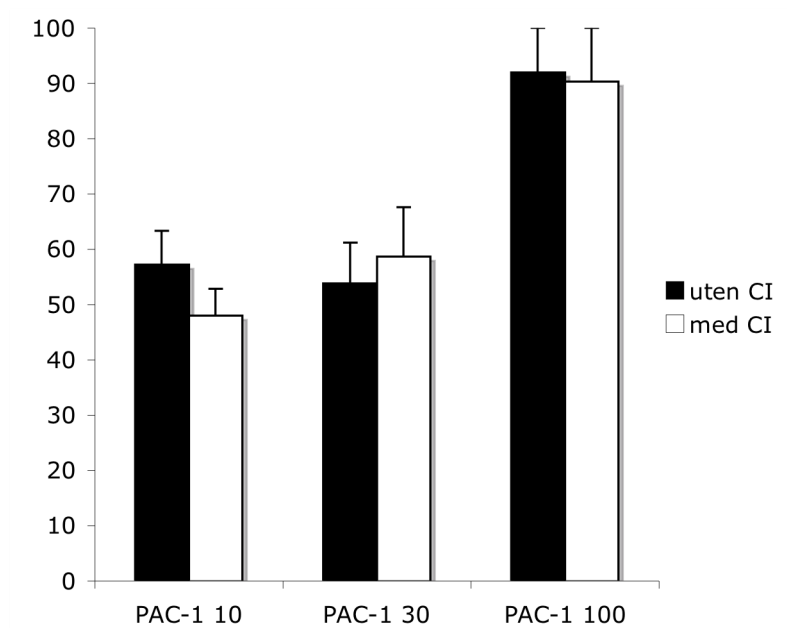
Eksposering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1 10 µM	7,34	1,41	4	4
PAC-1 10 µM + CI 1 µM	6,16	1,37	4	4
PAC-1 30 µM	18,22	3,66	4	4
PAC-1 30 µM + CI 1 µM	17,49	3,99	4	4
PAC-1 100 µM	69,09	5,18	4	4
PAC-1 100 µM + CI 1 µM	73,04	5,02	4	4



Figur 3.5 Celledød induisert av PAC-1 med og uten CI målt etter 24 timer i kyllingnevroner med serum i mediet. Cellesuspensjon med kyllingnevroner ble platet ut i skåler og eksponert 3 dager etter. PAC-1 og CI ble tilsatt samtidig. Konsentrasjonene er angitt i tabell 3.5. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24 timer etter eksponering. CI- og DMSO-behandlede celler hadde en celledød på henholdsvis 28,33% og 17,51%.

Tabell 3.5 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5

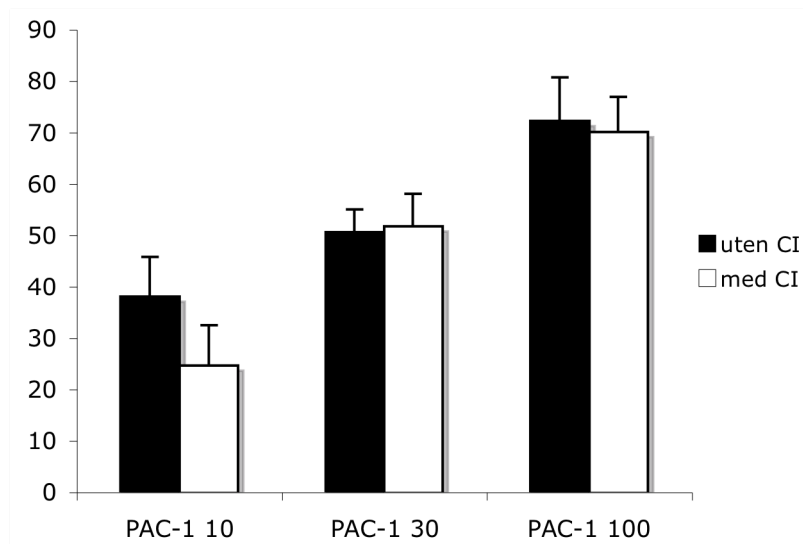
Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1 10 μM	37,37	7,02	3	3
PAC-1 10 μM + CI 1 μM	46,98	3,66	3	3
PAC-1 30 μM	56,55	11,09	2	2
PAC-1 30 μM + CI 1 μM	62,66	1,32	2	2
PAC-1 100 μM	86,24	4,71	4	4
PAC-1 100 μM + CI 1 μM	87,61	2,63	4	4



Figur 3.6 Effekt av CI på PAC-1-indusert celledød i kyllingnevroner med serumfritt medium eksponert i 24 timer. Cellesuspensjon med kyllingnevroner ble platet ut i skåler og eksponert 3 dager etter. PAC-1 og CI ble tilsatt samtidig. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24 timer etter eksponering CI- og DMSO-behandlede celler hadde en celledød på henholdsvis 45,00 % og 47,76%.

Tabell 3.6 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.6

Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1 10 μ M	57,20	6,14	5	4
PAC-1 10 μ M + CI 1 μ M	47,98	4,82	5	4
PAC-1 30 μ M	53,80	7,32	5	4
PAC-1 30 μ M + CI 1 μ M	58,64	8,89	5	4
PAC-1 100 μ M	91,94	8,06	5	4
PAC-1 100 μ M + CI 1 μ M	90,30	9,70	5	4



Figur 3.7 Effekt av CI på PAC-1-indusert celledød i PC12 celler eksponert i 48 t. Cellene ble platet ut i skåler og eksponert dagen etter. PAC-1 og CI ble tilsatt samtidig. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 48 timer etter eksponering. Tallene angir konsentrasjonen av PAC-1. CI- og DMSO-behandlede celler hadde en celledød på 2,19% og 2,49%.

Tabell 3.7 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.7

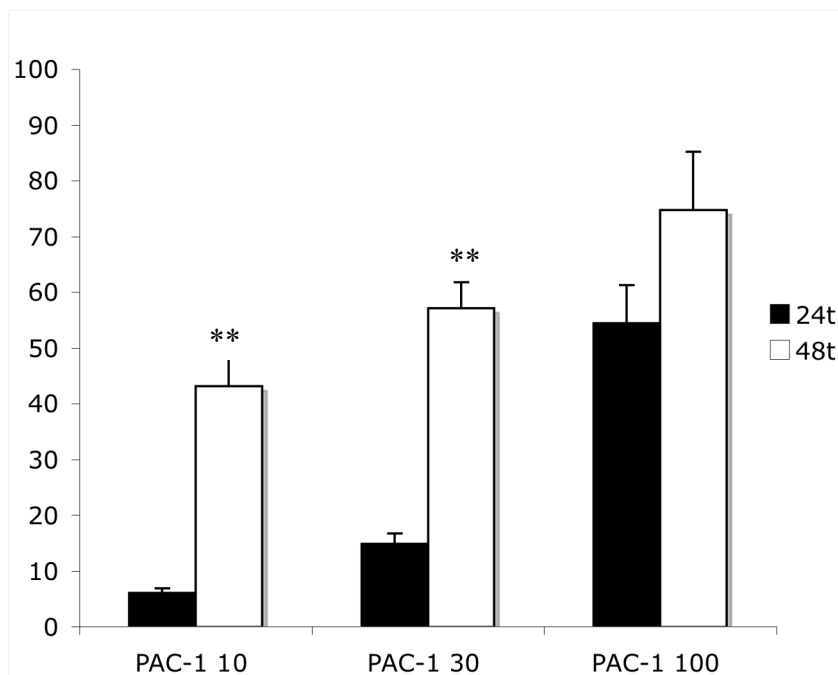
Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1 10 µM	38,04	7,79	4	4
PAC-1 10 µM + CI 1 µM	24,74	7,76	4	4
PAC-1 30 µM	50,58	4,46	4	4
PAC-1 30 µM + CI 1 µM	51,78	6,35	4	4
PAC-1 100 µM	72,31	8,47	4	4
PAC-1 100 µM + CI 1 µM	70,18	6,74	4	4

3.1.2 PAC-1-indusert celledød er betydelig høyere ved 48t enn ved 24t

Ved måling av celledød fremmet av PAC-1 ved 24t og 48t er celledøden signifikant høyere ved eksponering i 48t enn i 24t. Forskjellen i celledød mellom de ulike konsentrasjonene minker når konsentrasjonen øker (figur 3.8 og tabell 3.8).

I den første artikkelen til Hergenrother (Putt, Chen et al. 2006) undersøkte de PAC-1-indusert celledød i ulike cellekulturer/linjer ved 24 t og 72 t. Derfor ble det testet på PC12 celler ved 24t, 48t og 72t med en lav konsentrasjon av PAC-1, som ikke ga nevneverdig celledød etter 24t (figur 3.9 og tabell 3.9).

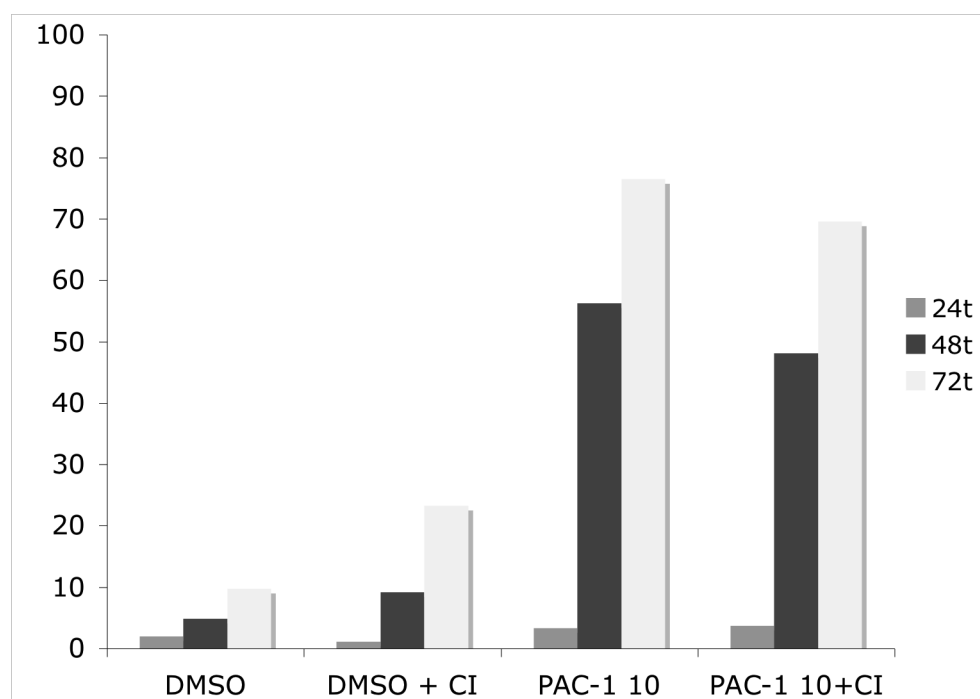
Eksperimentet vist i figur 3.9 er en pilot og bare testet en gang. Celledøden har økt betraktelig fra 24 timer til 48 timer og har økt videre ved 72 timer, ved eksponering for PAC-1. Celledøden virker å være lik i PAC-1 og CI-eksponerte celler versus kun PAC-1 ved 48 og 72 t. Celledøden er høyere i cellene eksponert for CI og DMSO, versus kun DMSO.



Figur 3.8 Celledød i PC12 celler er signifikant høyere ved eksponering i 48 timer versus 24 timer. Cellene er platet ut samtidig, og eksponert dagen etter. Celledøden i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24 eller 48 timer etter eksponering. ** angir signifikans $p < 0,001$ når 48 timer er sammenlignet med 24 timer for de ulike konsentrasjonene, ved bruk av t-test.

Tabell 3.8 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8

Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1 10 μ M 24t	6,00	0,82	7	7
PAC-1 10 μ M 48t	43,06	5,59	7	7
PAC-1 30 μ M 24t	14,81	1,91	3	3
PAC-1 30 μ M 48t	57,13	4,67	7	7
PAC-1 100 μ M 24t	54,38	6,83	7	7
PAC-1 100 μ M 48t	74,74	10,47	7	7



Figur 3.9 Celledød i PC12 celler ved 24, 48 og 72 timer. PAC-1 gir mye høyere død ved 48 og 72 timer. Cellene er platet ut samtidig, og eksponert dagen etter. Celledøden ble målt vha trypanblåfarging 24, 48 eller 72 timer etter eksponering.

Tabell 3.9 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9

Eksposering	% Celledød 24 t	% Celledød 48 t	% Celledød 72 t
DMSO 0,1%	2,00	4,85	9,82
DMSO 0,1% + CI 1 μ M	1,17	9,16	23,27
PAC-1 10 μ M	3,37	56,27	76,52
PAC-1 10 μ M + CI 1 μ M	3,78	48,10	69,57

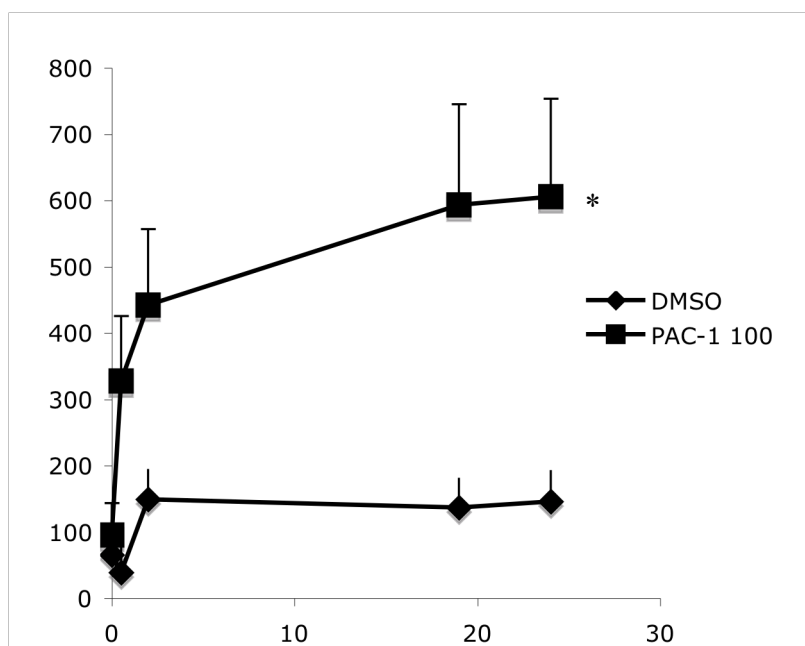
3.1.3 PAC-1 aktiverer caspaser

For å se på caspaseaktiverende effekt, ble det kjørt caspaseassay med PAC-1 og negativ kontroll, DMSO.

PAC-1 aktiverer caspaser signifikant bedre enn DMSO (figur 3.10 og tabell 3.10). Dette er også blitt vist tidligere. Det var tvil om hvorvidt caspase-3 lot seg aktivere i noen særlig grad i PC12 celler, fordi PAC-1 ga ikke særlig høy caspaseaktivitet. Derfor ble det også testet med staurosporin (STS) som positiv kontroll (avsnitt 3.4).

Kurven i figur 3.10 viser at økningen er størst i starten. Aktiviteten viser lineær korrelasjon i området fra 0 til 2 timer, men får da en endring i kurven. Fra 2 timer og til 24 timer er det fremdeles lineært, men stigningstallet er da mye lavere. Ved å ta utgangspunkt i tallene i det første lineære området, gir PAC-1 en økning i caspaseaktivitet på 151,29 RFU/time med korrelasjon på $R^2=0,7925$. Videre er stigning fra tid 2 til 24 på 7,78 RFU/time med korrelasjon på $R^2=0,9772$. Tilsvarende gir DMSO en stigning på 49,05 RFU/time ved tid 0 til 2, og fra tid 2 til 24 er det ingen stigning.

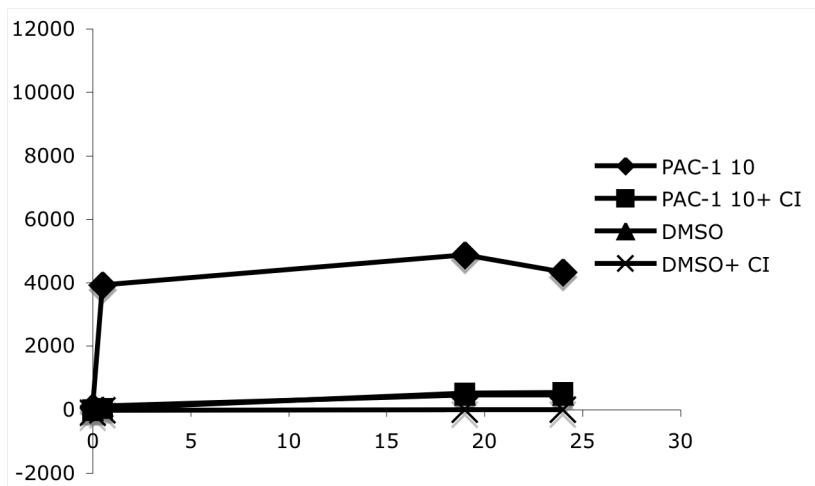
Figur 3.11, 3.12 og 3.13 er fra samme celledødsstudie som celledødsstudiene i figur 3.9 og er bare utført en gang. PAC-1 viser caspaseaktivering etter eksponering i 24, 48 og 72 timer. Ved tilsetning av CI samtidig med annen eksponering, vises ingen caspaseaktivering,



Figur 3.10 Caspaseaktivitet målt som RFU i PC12 celler eksponert med PAC-1 og DMSO i 4t før tilsetning av RIPA-buffer. Cellene ble platet ut i 96-brønnersplater og eksponert dagen etter. * angir signifikans $p < 0,05$ fra tid 0,5 ved bruk av t-test. Forsøket er utført 6 ganger.

Tabell 3.10 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10

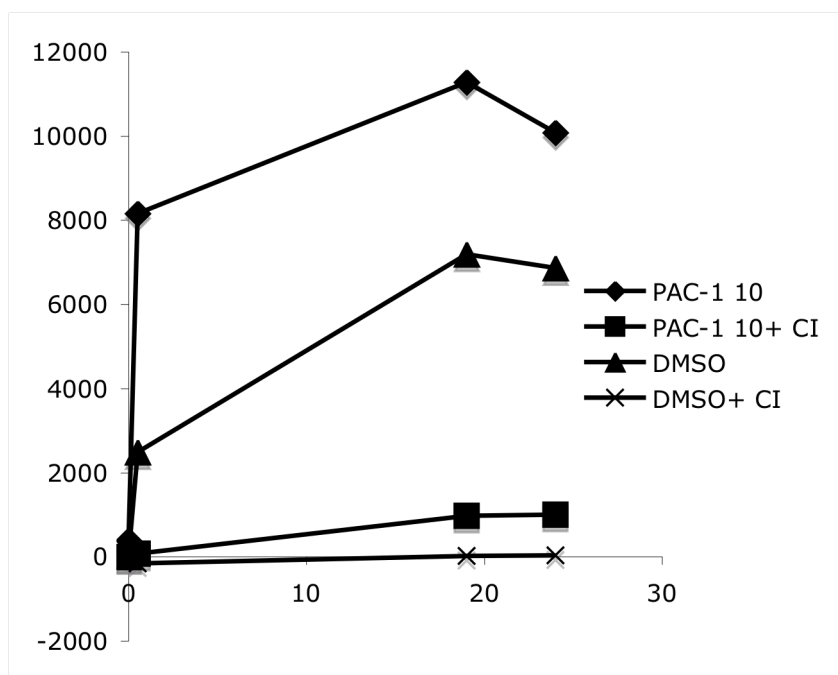
Eksponering	Tid 0	Tid 0,5	Tid 2	Tid 19	Tid 24
DMSO 0,1 %, Casp.akt.	65,83	39,26	149,33	136,92	145,78
DMSO 0,1%, SEM	39,4	61,21	45,45	44,54	47,31
PAC-1 100 μ M, Casp.akt	95,39	327,47	442,67	593,54	605,68
PAC-1 100 μ M, SEM	47,93	98,14	114,33	151,84	147,90



Figur 3.11 Caspaseaktivering målt som RFU etter 24t eksponering i PC12 celler. Cellene ble platet ut i 96-brønnersplater, eksponert dagen etter og tilsatt RIPA 24t etter eksponering.

Tabell 3.11 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11

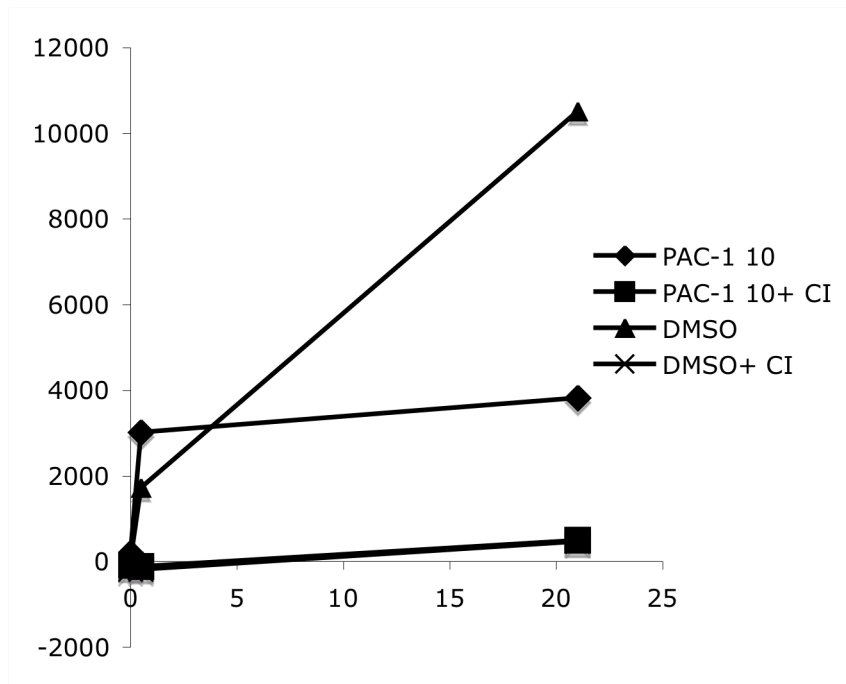
Eksposering	Tid 0	Tid 0,5	Tid 19	Tid 24
PAC-10 μM	74	3928	4884	4332
PAC-10 μM + CI 1 μM	-12	28	512	544
DMSO 0,1%	-17	119	463	459
DMSO 0,1 % + CI 1 μM	-110	-31	-5	5



Figur 3.12 Caspaseaktivering i RFU etter 48t eksponering i PC12 celler. Cellene ble platet ut i 96-brønnersplater, eksponert dagen etter og tilsatt RIPA 48t etter eksponering.

Tabell 3.12 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.12

	Tid 0	Tid 0,5	Tid 19	Tid 24
PAC-10 μM	387	8151	11286	10077
PAC-10 μM + CI 1 μM	-5	68	972	1001
DMSO 0,1%	-3	2484	7191	6858
DMSO 0,1 % + CI 1 μM	43	-154	16	27



Figur 3.13 Caspaseaktivering i RFU etter 72t eksponering i PC12 celler. Cellene ble platet ut i 96-brønnersplater, eksponert dagen etter og tilsatt RIPA 72t etter eksponering.

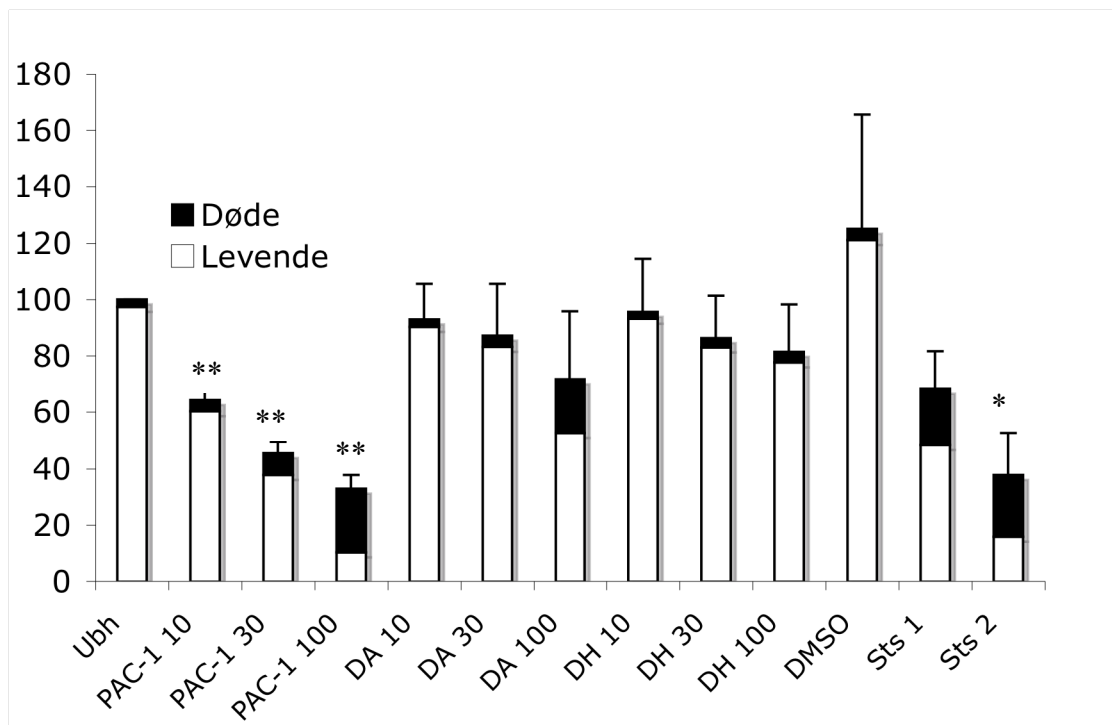
Tabell 3.13 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13

	Tid 0	Tid 0,5	Tid 21
PAC-10 μM	192	3015	3823
PAC-10 μM + CI 1 μM	-87	-113	498
DMSO 0,1%	22	1721	10513
DMSO 0,1 % + CI 1 μM	-192	-190	470

3.2 Antallet observerte celler er lavere etter PAC-1-eksponering

Ved telling av PC12 celler ble det observert et lavere antall celler på bunnen av skålen, når de var behandlet med PAC-1 versus ubehandlet. Ved kvantitativ måling på dette, ses en nedgang i antall celler som omvendt proporsjonal med dosen (figur 3.14 og tabell 3.14). DA 100 (kapittel 3.3) viser knapt noen nedgang, og staurosporin viser en signifikant, men svak nedgang. PAC-1 derimot viser en signifikant sterk reduksjon i antall celler sammenlignet med kontrollen. STS 2 μM viser en høyere andel celledød enn PAC-1 100 μM .

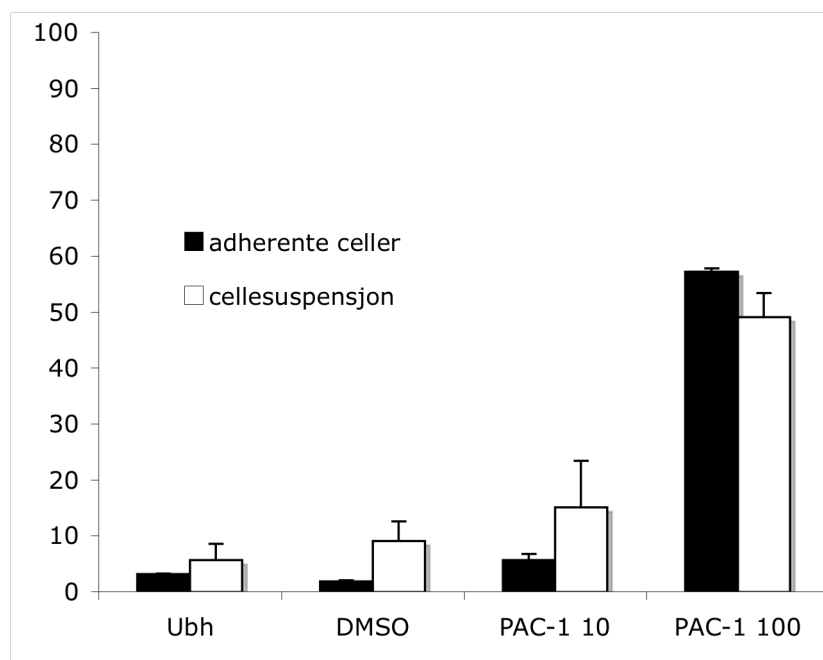
Celledøden blant cellene som fløt i mediet sammenlignet med den respektive skålens bunn viste at celledøden var relativt lik (figur 3.15 og tabell 3.15). Det ble videre antatt at celledøden som ble observert i skålen var tilnærmet den reelle, og at den ikke ble overestimert eller underestimert på tross av at mange celler falt av.



Figur 3.14 Prosentvis celletall ved eksponering for ulike stoffer i forhold til ubehandlet (ubehandlet er 100%). Cellene er platet ut i skåler og eksponert dagen etter. Cellene ble telt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering. ** angir signifikans $p < 0,001$ og * angir signifikans $p < 0,05$ mot ubehandlet, ved bruk av t-test. Stoffer og konsentrasjoner som er benyttet er angitt i tabell 3.14.

Tabell 3.14 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.14 Tallene er normalisert slik at antall celler i ubehandlet prøve er 100 %, mens de andre tallene er relative til ubehandlet.

Eksposering	% Celletall levende	% Celletall døde	Antall celler relativt til Ubh	+/- SEM	Antall observasjoner totalt
Ubh	97,28	2,63	100	0	4
PAC-1 10 μ M	60,36	3,93	64,33	7,18	4
PAC-1 30 μ M	37,73	7,61	45,37	4,10	4
PAC-1 100 μ M	10,11	22,65	32,79	4,90	4
DA 10 μ M	90,27	2,67	92,98	12,68	4
DA 30 μ M	83,09	4,09	87,24	18,31	4
DA 100 μ M	52,52	19,07	71,63	24,27	4
DH 10 μ M	93,05	2,47	95,59	18,87	4
DH 30 μ M	82,99	3,33	86,37	15,00	4
DH 100 μ M	77,58	3,73	81,35	16,81	4
DMSO 0,1 %	121,10	3,88	125,04	40,72	4
STS 1 μ M	48,26	20,06	68,38	13,23	4
STS 2 μ M	15,70	22,08	37,78	14,81	4



Figur 3.15 Prosent celledød i skål (adherente) og i mediet (cellesuspensjon) ved ulike eksponeringer angitt i tabell 3.15. Cellene er plattet ut i skåler og eksponert dagen etter. Cellene ble telt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering, enten i skålene eller at det respektive mediet ble helt over i en annen skål og telt. Tallene angir konsentrasjonen av PAC-1.

Tabell 3.15 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.15

Eksposering	Celledød adherente celler	+/- SEM adherente celler	Celledød celleduspensjon	+/- SEM celleduspensjon	Antall observasjoner
Ubh	3,10	0,13	5,57	2,96	2
DMSO 0,1%	1,82	0,22	9,03	3,47	2
PAC-1 10 μ M	5,61	1,12	15,08	8,25	2
PAC-1 100 μ M	57,15	0,67	48,00	4,33	2

3.3 Ufullstendig ortho-hydroksy N-acyl hydrazonestruktur gir ingen effekt

Gjennom å gjøre studier på strukturaktivitetsforhold ble det undersøkt hvilken betydning OH-gruppen i ortho-hydroksy N-acyl hydrazonestrukturen hadde for caspaseaktivering og

celledød. Det var dermed ønskelig å bruke PAC-1 uten OH-gruppen. Det var ikke mulig å anskaffe et PAC-1-derivat uten OH-gruppen, men det var tilgjengelig PAC-1 uten allyl og OH-gruppen (DH). For å kunne sammenligne DH med PAC-1 ble deallyl-PAC-1 (DA) brukt i tillegg.

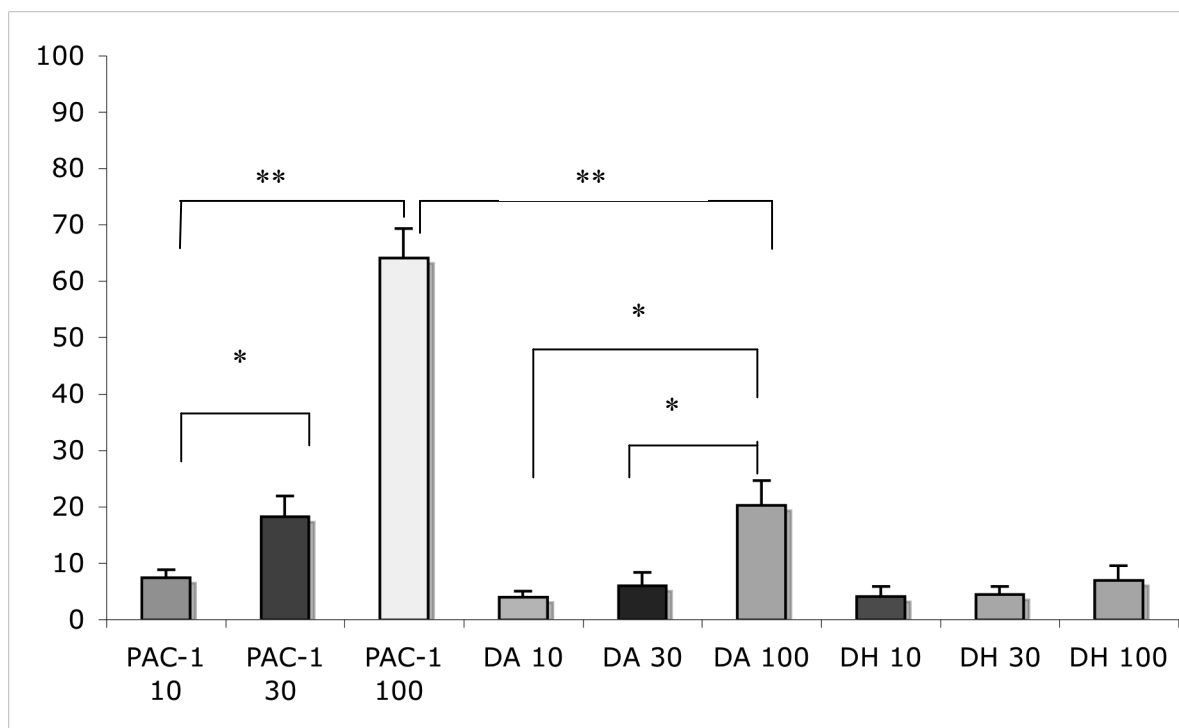
DA er strukturelt likt som PAC-1, bortsett fra at DA mangler en allylgruppe på fenolringen. Denne allylgruppen påvirker celledøden. Effekten av DA er tilstede, da eksponering med 100 μM DA gir en signifikant celledød ift placebo. DH var ment å være negativ kontroll, siden OH-bindingen på ortho-hydroksy N-acyl hydrazonestruktur er essensiell for den chelaterende effekten. Peterson et al (2009) viste at DH har tilnærmet ingen sinkchelaterende effekt, så derfor var det ønskelig å se om den hadde effekt på celledød og caspaseaktivering.

Det er vist i figur 3.16 at DA 100 μM gir signifikant økt celledød sammenlignet med DA 10 og 30 μM . DH 100 gir ikke signifikant celledød sammenlignet med 10 og 30 μM . I kyllingnevronene var det ingen signifikant celledød ved eksponering med DA 100 μM sammenlignet med 10 og 30 μM . PAC-1 100 μM gir signifikant høyere celledød enn PAC-1 10 og 30 μM . Spredningen i celledødstallene i kylling var stor (figur 3.17 og tabell 3.17).

Forskjell i celledød er signifikant forskjellige ved PAC-1 100 μM og DA 100 μM . Forskjellen mellom celledød fremmet av DA 100 μM og DH 100 μM viste en p-verdi akkurat over signifikansnivået som er satt til 0,05. DH 100 μM viste ingen signifikant forskjell fra DMSO 0,1 %.

Caspasehemmer påvirker ikke celledød induisert av DA eller DH (figur 3.18 og tabell 3.18).

PAC-1 gir signifikant økt caspaseaktivering sammenlignet med DH ved alle tidspunkter fra tid 0,5 (figur 3.19 og tabell 3.19). PAC-1 gir kun signifikant caspaseaktivering ift. DA ved tid 24. DA og DH viser relativt like caspaseaktiverende egenskaper, og de er svakt økt, men ikke signifikant forskjellige fra DMSO (graf ikke vist, se data i figur 3.10 og tabell 3.10 for DMSO samt figur 3.19 og tabell 3.19).

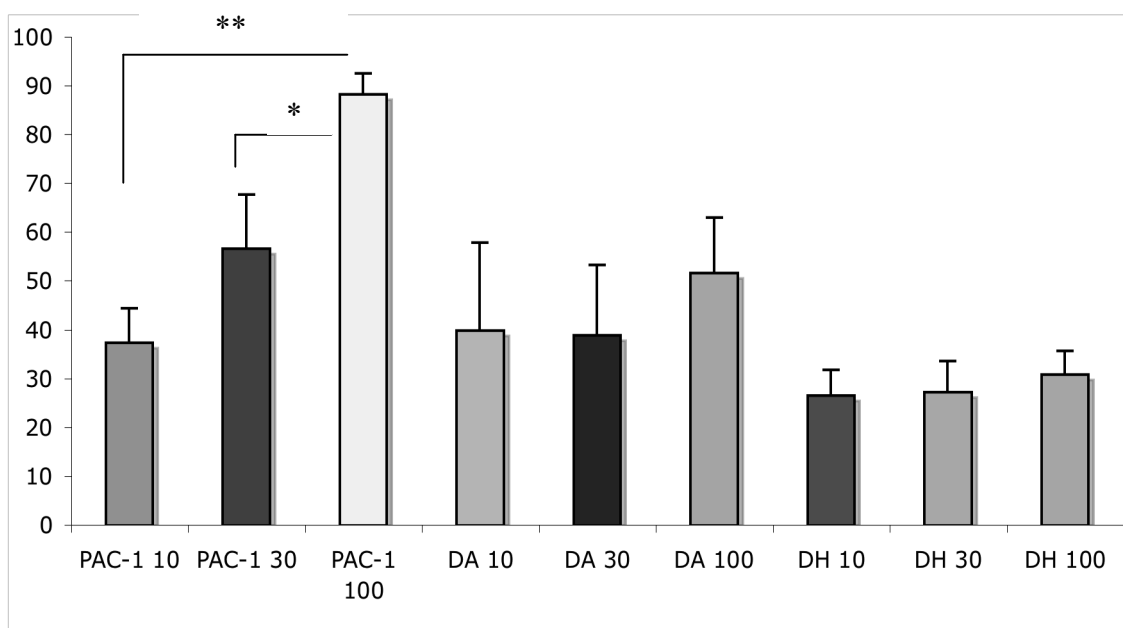


Figur 3.16 Celledød i PC12 celler etter eksponering i 24 timer med PAC-1, DA og DH i konsentrasjonene 10, 30 og 100 μ M. Cellene er platet ut i skåler og eksponert dagen etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering. ** angir signifikans $p < 0,001$, og * angir signifikans $p < 0,05$ ved bruk av t-test.

Tabell 3.16 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.16

Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1 10 μ M	7,34	1,41	4	4
PAC-1 30 μ M	18,22	3,66	4	4
PAC-1 100 μ M	64,08	5,18	6	5
DA 10 μ M	3,98	1,06	4	4
DA 30 μ M	5,96	2,33	4	4
DA 100 μ M	20,24	4,41	6	5
DH 10 μ M	4,02	1,8	4	4
DH 30 μ M	4,37	1,42	4	4

DH 100 μM	6,90	2,65	4	4
----------------------	------	------	---	---

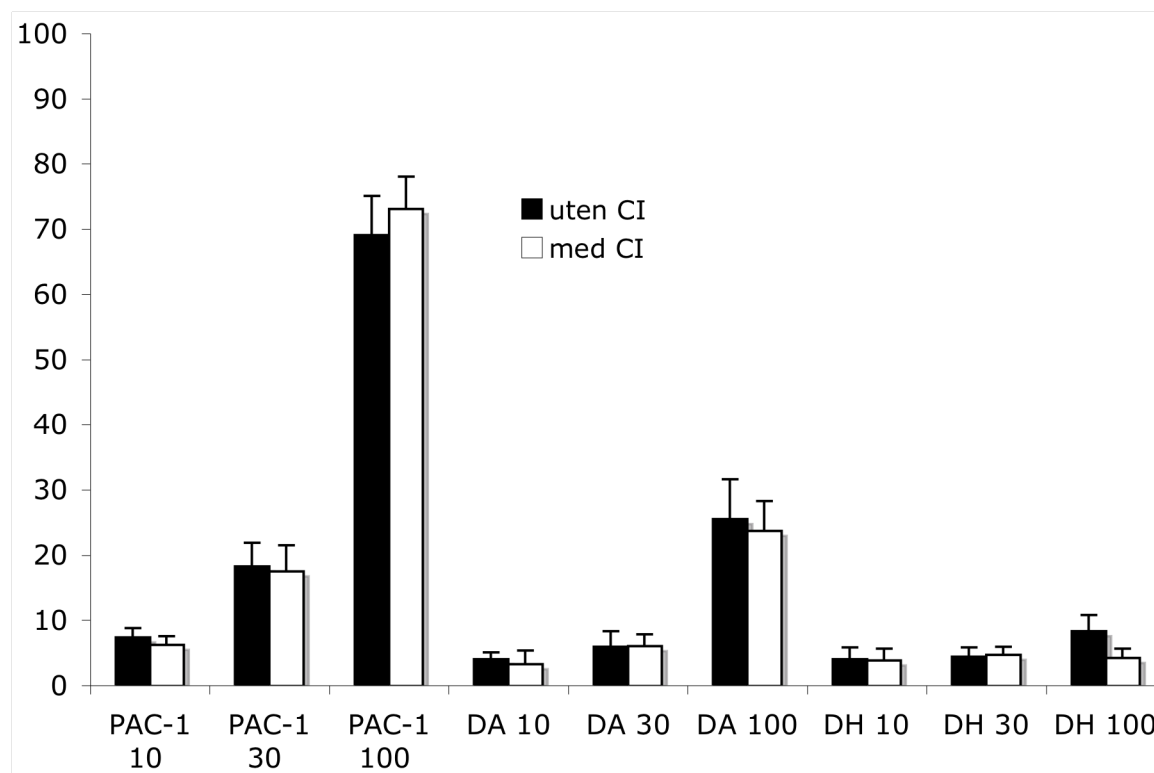


Figur 3.17 Celledød i kyllingnevroner med serum i mediet etter eksponering i 24 timer med PAC-1, DA og DH i konsentrasjonene 10, 30 og 100 μM . Cellene er plattet ut i skåler og eksponert 3 dager etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering. ** angir signifikans $p < 0,001$, og * angir signifikans $p < 0,05$ ved bruk av t-test.

Tabell 3.17 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.17

Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1 10 μM	37,37	7,02	5	5
PAC-1 30 μM	56,55	11,11	5	5
PAC-1 100 μM	88,16	4,30	6	6
DA 10 μM	39,80	18,00	3	3
DA 30 μM	38,83	14,43	3	3
DA 100 μM	51,60	11,42	4	4
DH 10 μM	26,56	5,23	3	3

DH 30 μ M	27,17	6,44	2	2
DH 100 μ M	30,77	4,94	4	4

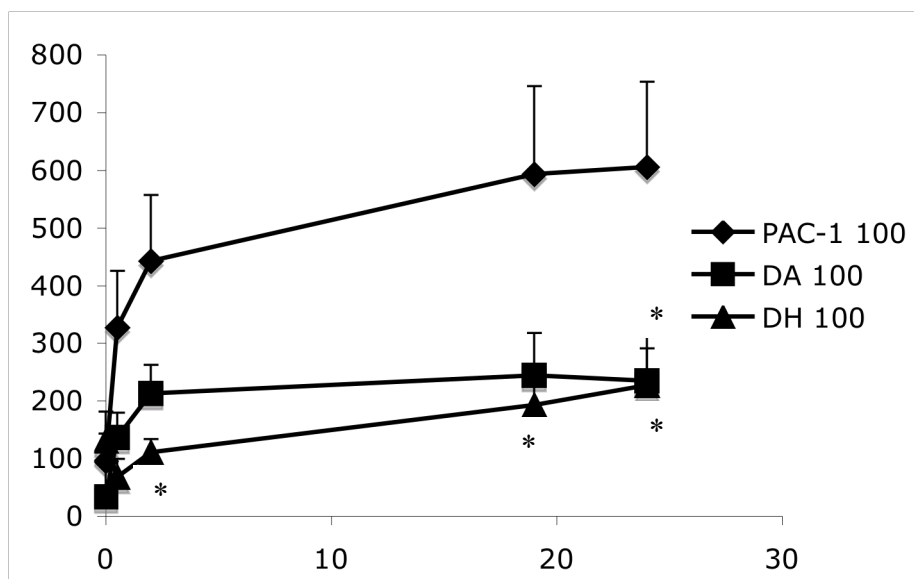


Figur 3.18 Tilsetning av CI virker ikke inn på celledød induisert av PAC-1, DA eller DH. Cellene er platet ut i skåler og eksponert dagen etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering.

Tabell 3.18 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.18

Eksponering	% Celledød uten CI	+/- SEM	% Celledød med CI	+/- SEM	Antall observasjoner totalt
PAC-1 10 μ M	7,34	1,41	6,16	1,37	4
PAC-1 30 μ M	18,22	3,67	17,49	3,99	4
PAC-1 100 μ M	69,09	5,97	73,04	5,02	4
DA 10 μ M	3,98	1,06	3,23	2,14	4
DA 30 μ M	5,96	2,32	6,01	1,84	4

DA 100 μM	25,53	6,04	23,70	4,57	4
DH 10 μM	4,02	1,80	3,85	1,78	4
DH 30 μM	4,37	1,42	4,68	1,21	4
DH 100 μM	8,29	2,48	4,16	1,45	4



Figur 3.19 Caspaseaktivitet målt ved RFU i PC12 celler eksponert for PAC-1, DA og DH i 4t. Cellene er platet ut i 96-brønnersplater og eksponert dagen etter. RIPA ble tilsatt 4 timer etter eksponering, og angir tid 0. * angir signifikans $p < 0,05$ mot PAC-1 ved one-way ANOVA, dunnett post hoc test. Ved $t=24$ er både DA 100 og DH 100 signifikante. Antallet forsøk er 6.

Tabell 3.19 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.19.

	Tid 0	Tid 0,5	Tid 2	Tid 19	Tid 24
PAC-1 100 μM Casp.akt.	95,39	327,47	442,67	593,54	605,68
PAC-1 100 μM , SEM	47,93	98,14	114,33	151,84	147,90
DA 100 μM , Casp.akt	33,74	136,07	212,94	244,42	234,18
DA 100 μM ,	78,22	43,29	49,15	72,86	76,81

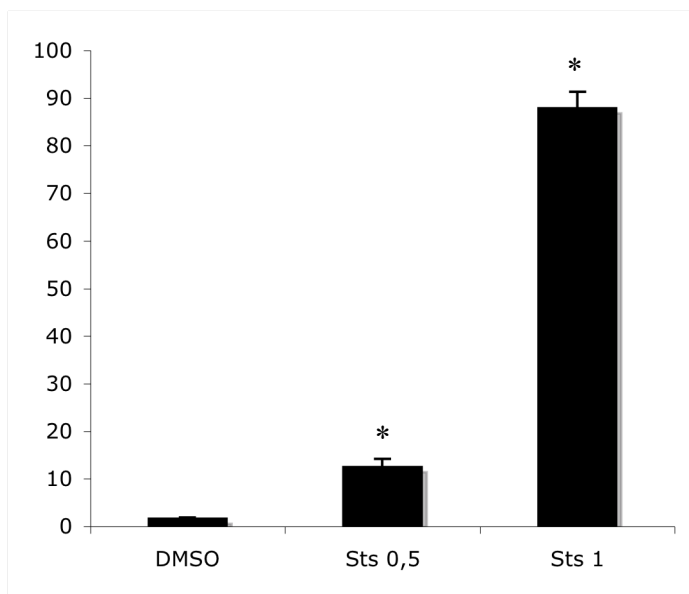
SEM					
DH 100 μ M, Casp.akt	130,46	68,10	110,78	192,53	227,32
DH 100 μ M, SEM	51,04	31,16	22,40	63,29	63,31

3.4 Staurosporin induserer celledød i PC12 celler og kyllingnevroner

Staurosporin (STS) aktiverer caspaser og gir celledød i flere celletyper (Porcelli, Ghelli et al. 2004). Det var ønskelig med en positiv kontroll for PAC-1 som aktiverer caspaser som et ledd i mitokondrieindusert apoptose. Det har blitt publisert tidligere at PC12 celler får aktivert caspaser og dør som følge av STS (Kruman, Guo et al. 1998).

En signifikant celledød observeres etter 24 timers eksponering i PC12 celler med STS 0,5 og 1 μ M (figur 3.20 og tabell 3.20), og i kyllingnevroner (med serum) med STS 1 μ M (figur 3.21 og tabell 3.21). Cellene som ble observert i mikroskop var små og runde, og hadde til dels fragmenterte utløpere.

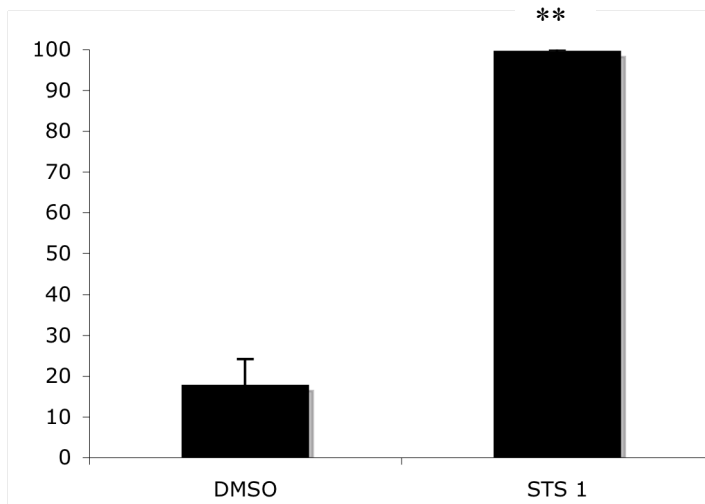
Staurosporin gir signifikant og sterk økning i caspaseaktivitet i PC12 celler. Caspaseaktiviteten øker proporsjonalt med tiden i de to første timene med en R^2 -verdi på 0,9398 (korrelasjonsverdi), men så flater kurven ut. Det er derfor riktig å se på stigningen de første 2 timene som uttrykk for caspaseaktiverende effekt (figur 3.22). Stigningen er på 4300 RFU/min før den flater ut.



Figur 3.20 Staurosporinindusert celledød i PC12 celler. Cellene er plattet ut i skåler og eksponert dagen etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24 timer etter eksponering. * angir signifikans $p < 0,05$ ved one-way ANOVA, Dunnetts post hoc test.

Tabell 3.20 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.20

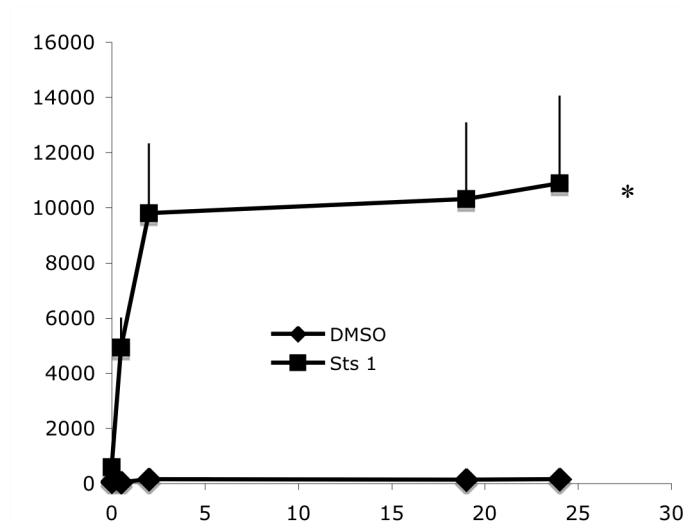
Eksposering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
DMSO	1,62	0,19	4	4
STS 0,5 μM	12,41	1,73	5	4
STS 1 μM	87,82	3,53	4	4



Figur 3.21 Staurosporinindusert celledød i kyllingnevroner med serum i mediet. Cellene er platet ut i skåler og eksponert 3 dager etter. Celledød i prosent er målt vha trypanblåfarging 24 timer etter eksponering. ** angir signifikans $p < 0,001$ ved bruk av t-test.

Tabell 3.21 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.21

Eksposering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner
DMSO	17,51	6,59	3
STS 1 μM	99,35	0,65	3



Figur 3.22 STS gir signifikant økning i caspaseaktivitet i PC12 celler. Cellene er platet ut i 96-brønnersplater og eksponert dagen etter. RIPA ble tilsatt 4t eksponering og er satt til tid 0. * angir signifikans $p < 0,001$ ved bruk av t-test, fra tid 0,5. Antallet forsøk er 6.

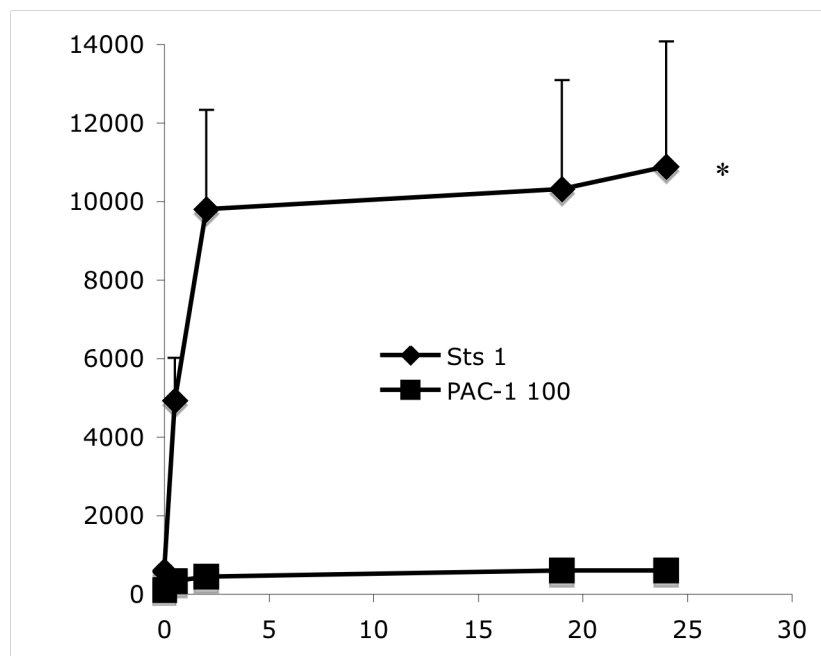
Tabell 3.22 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.22

	Tid 0	Tid 0,5	Tid 2	Tid 19	Tid 24
DMSO 0,1 %, Casp.akt.	65,83	39,26	149,33	136,92	145,78
DMSO 0,1%, SEM	39,4	61,21	45,45	44,54	47,31
STS 1 μ M, Casp.akt	591,60	4934,30	9805,33	10317,93	10891,75
STS 1 μ M, SEM	123,55	1083,70	2522,37	2765,11	3174,02

3.5 STS gir betydelig bedre caspaseaktivering enn Pac-1

Figur 3.23 viser at staurosporin er en god caspaseaktivator. Det er caspaser i PC12 celler og de lar seg aktivere, men PAC-1 aktiverer ikke caspasene i like stor grad som STS. Variansen er stor fra en måling til neste. Caspaseaktiviteten, ved STS-eksponering, øker lineært de første 2 timene. Deretter får stigningstallet en nedgang i RFU/time etter ca 2 timer, men

fortsetter da også lineært. For de to første timene er stigningstallet til caspaseaktiviteten på 4293,1 RFU/time med R^2 -verdi på 0,9398, samtidig som DMSO ikke viser like sterk lineær korrelasjon ($R^2=0,79$). Fra 2 timer til 24 timer er stigningstallet til caspaseaktiviteten på 44,47 RFU/time med R^2 -verdi på 0,8903.



Figur 3.23 Caspaseaktivitet i PC12 celler eksponert med STS og PAC-1 i 4t. Cellene er plattet ut i 96-brønnersplate og eksponert dagen etter. RIPA ble tilsatt 4t etter eksponering og angir tid 0. * angir signifikans $p < 0,05$ ved bruk av t-test, fra tid 0,5. STS-dataene er de samme som i figur 3.22. Antall forsøk er 6.

Tabell 3.23 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.23

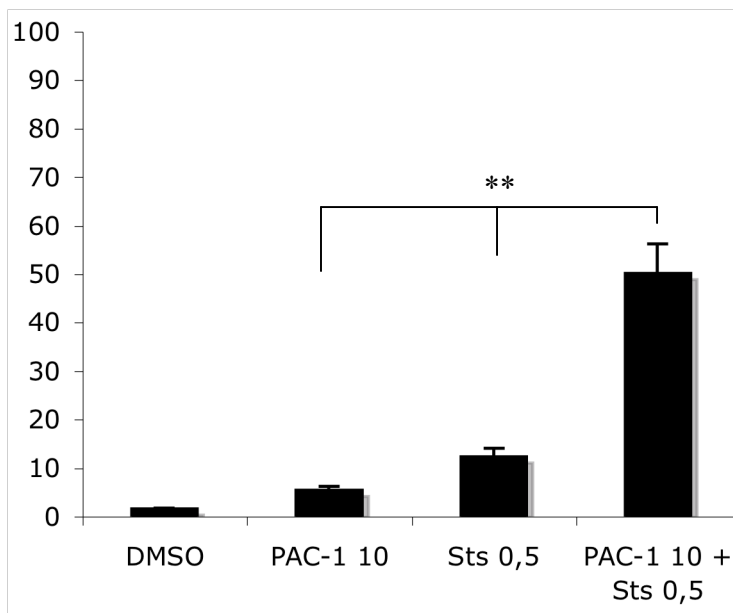
	Tid 0	Tid 0,5	Tid 2	Tid 19	Tid 24
PAC-1 100 μ M, Casp.akt.	95,39	327,47	442,67	593,54	605,68
PAC-1 100 μ M, SEM	47,93	98,14	114,33	151,84	147,90
STS 1 μ M, Casp.akt	591,60	4934,30	9805,33	10317,93	10891,75
STS 1 μ M, SEM	123,55	1083,70	2522,37	2765,11	3174,02

3.6 PAC-1 og STS gitt i kombinasjon gir synergi

Det ble observert en mye høyere aktivering av caspasene i STS-eksponerte PC12 celler. Derfor ble det undersøkt om STS gjorde noe med cellene, som PAC-1 ikke klarte, og hvorvidt de sammen ville kunne aktivere caspasene bedre. Cellene ble eksponert for en lav dose med PAC-1 og STS, som i seg selv ikke ga noen særlig høy død, og kombinasjon av disse dosene (figur 3.24 og tabell 3.24).

Det er veldig interessant at det er en synergistisk effekt av kombinasjonen. Det ble testet caspaseaktivering ved eksponering for de samme konsentrasjonene av stoffene, for å se om dette også gjaldt caspaseaktiveringen (figur 3.25 og tabell 3.25). Det er økt caspaseaktivitet ved eksponering for både PAC-1 og STS, men denne var ikke signifikant forskjellig fra STS eller PAC-1, da standardfeilen (SEM) var stor. STS 0,5 var signifikant forskjellig fra PAC-1.

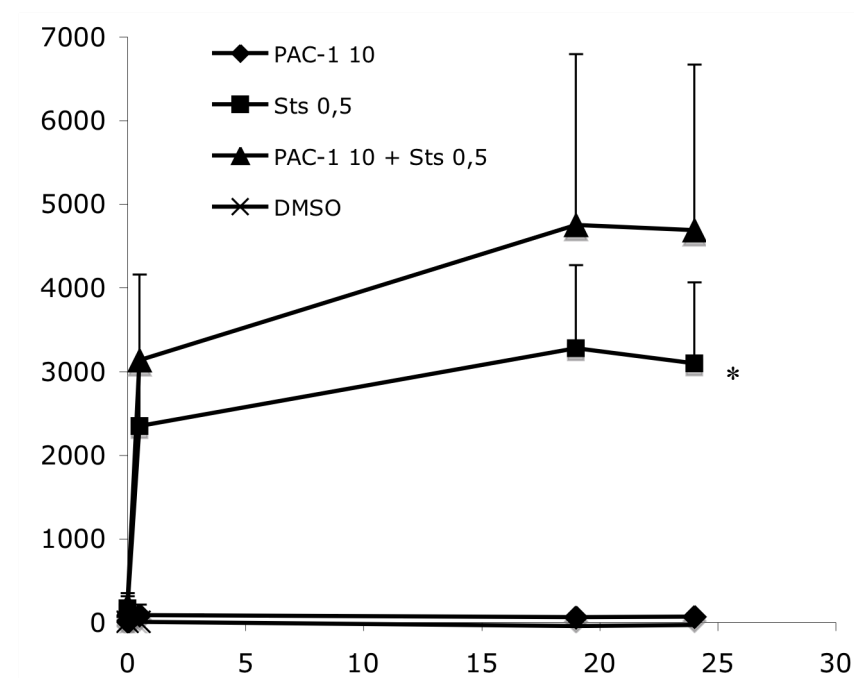
Caspaseaktiveringen blir helt hemmet ved tilsetning av CI samtidig med STS og PAC-1 (figur 3.26 og tabell 3.26). Denne var kun signifikant i tid 0,5 på grunn av stor standardfeil i de senere tidspunktene.



Figur 3.24 Celledød i PC12 celler eksponert for PAC-1 10 μ M, STS 0,5 μ M eller kombinasjon av PAC-1 og STS. Cellene er platet ut i skåler og eksponert dagen etter. Celledød ble telt etter 24 timer. ** angir signifikans $p < 0,001$ ved bruk av t-test, både kombinasjonen mot STS og PAC-1, men også kombinasjonen mot summen av PAC-1- og STS-indusert celledød.

Tabell 3.24 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.23

Eksposering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner	Antall uavhengige forsøk
DMSO 0,1%	1,62	0,19	4	4
PAC-1 10 μ M	5,40	0,83	5	4
STS 0,5 μ M	12,41	1,73	5	4
PAC-1 10 μ M + STS 0,5 μ M	50,09	6,23	5	4

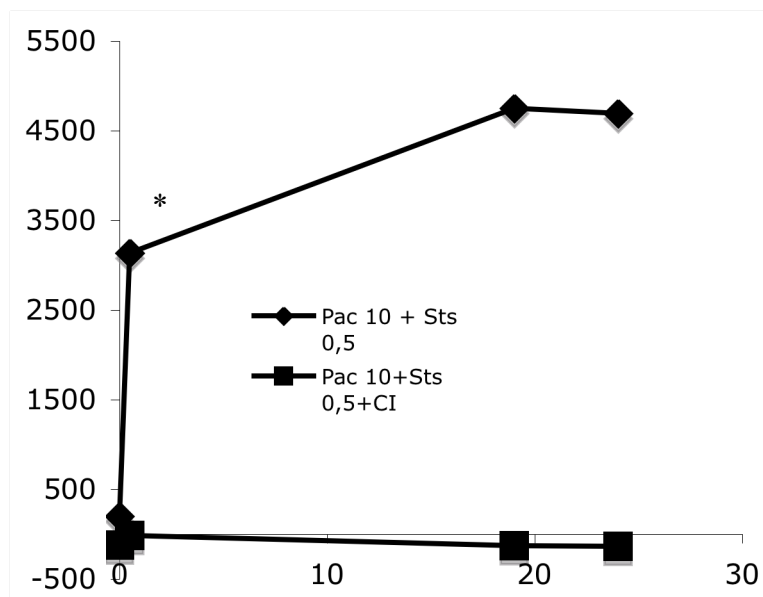


Figur 3.25 Caspaseaktivering i PC12 celler eksponert for PAC-1, STS eller kombinasjonen. Aktiveringen er målt i RFU. Cellene er plattet ut i 96-brønnersplate og eksponert dagen etter. RIPA ble tilsatt 4t etter eksponering og angir tid 0. * angir signifikans $p < 0,05$ mot PAC-1 ved bruk av t-test fra tid 0,5. Antallet forsøk er 4.

Tabell 3.25 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.24

	Tid 0	Tid 0,5	Tid 19	Tid 24
PAC-1 10 μ M casp.akt	11,54	87,88	65,38	65,88

PAC-1 10 μ M, SEM	79,84	123,37	33,21	29,38
STS 0,5 μ M casp.akt	171,25	2348,42	3276,67	3098,71
STS 0,5 μ M, SEM	142,96	704,91	992,31	967,98
PAC-1 10 μ M + STS 0,5 μ M casp.akt.	196,88	3134,50	4750,46	4689,50
PAC-1 10 μ M + STS 0,5 μ M, SEM	153,76	1025,64	2043,17	1982,64
DMSO 0,1% casp.akt	4,13	5,79	-42,71	-34,21
DMSO 0,1%, SEM	78,24	65,47	48,01	52,31



Figur 3.26 Tilsetning av CI samtidig med eksponering av de andre stoffene hemmer caspaseaktivering helt. Caspaseaktiveringen er angitt i RFU. Cellene er plattet ut i 96-brønnersplate og eksponert dagen etter. RIPA ble tilsatt 4t etter eksponering og angir tid 0. * angir signifikans $p < 0,05$ og gjelder bare $t = 0,5$. Antallet forsøk er 4.

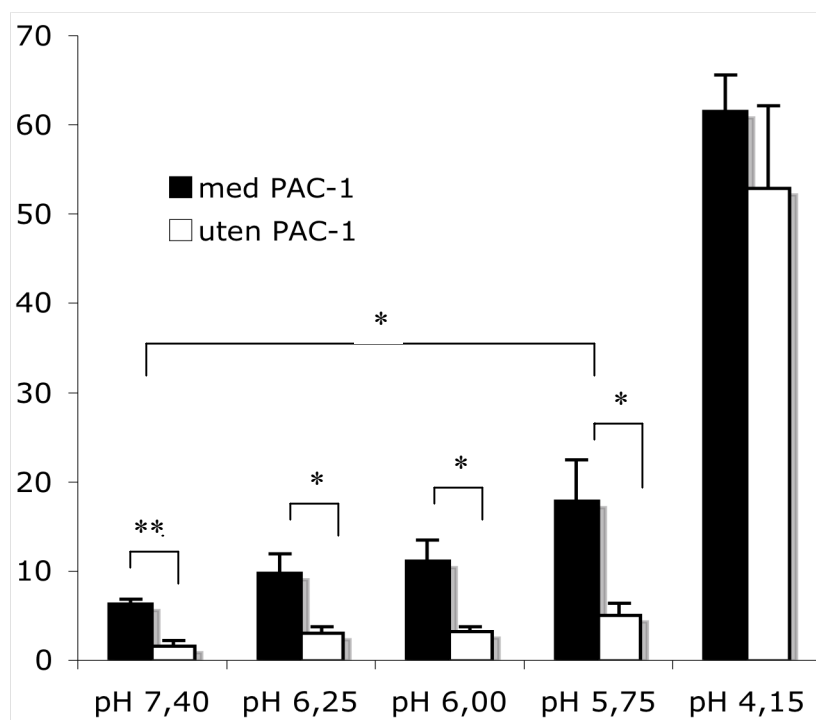
Tabell 3.26 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.25

	Tid 0	Tid 0,5	Tid 19	Tid 24
PAC-1 10 μ M + STS 0,5 μ M casp.akt.	196,88	3134,50	4750,46	4689,50
PAC-1 10 μ M + STS 0,5 μ M, SEM	153,76	1025,64	2043,17	1982,64
PAC-1 10 μ M + STS 0,5 μ M + CI 1 μ M, casp.akt.	-123,21	-16,21	-128,92	-132,63
PAC-1 10 μ M + STS 0,5 μ M + CI 1 μ M , SEM	108,00	80,11	54,07	52,32

3.7 pH påvirker PAC-1-indusert celledød

PAC-1 gir signifikant celledød, sammenlignet med ubehandlet, ved alle pH-verdier bortsett fra ved pH 4,15 (figur 3.27 og tabell 3.27). Ved pH 4,15 er celledøden mye høyere enn ved 5,75 og det er sannsynligvis mange prosesser som påvirkes av pH når den er så sur, at PAC-1 spiller en liten betydning. Ved surgjøring av PC12-mediet var det en potensering i effekten til PAC-1. Ratioen mellom celledøden i PAC-1-behandlede celler og ubehandlede blir mindre med surere pH, mens differansen i celledød øker.

Cellene var morfologisk annerledes ved sur pH. Det ble observert mindre og rundere celler med lavere pH (figur 3.28). Cellene hadde også færre utløpere ved pH 4,15 enn pH 7,4. Celletallet viste en tendens til reduksjon ved minkende pH (figur 3.29 og tabell 3.28).

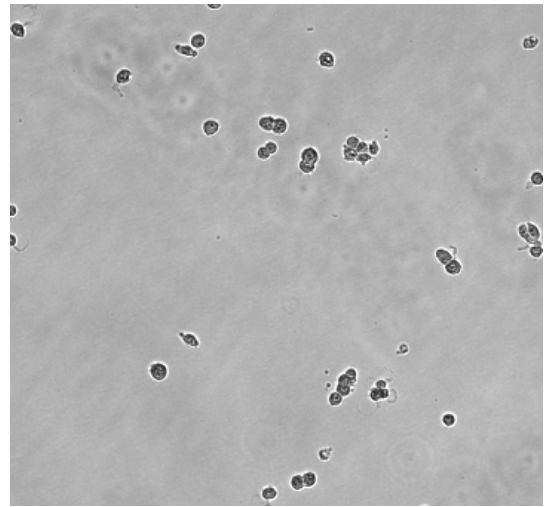
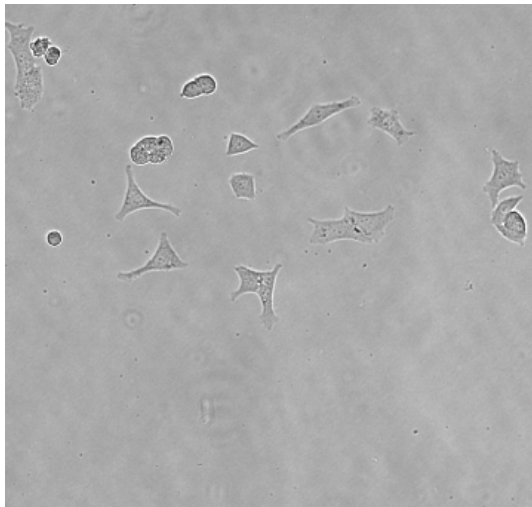


Figur 3.27 Celledød ved ulike pH-verdier med og uten tilsetning av PAC-1 10 μ M. PC12 cellene er platet ut i skåler og eksponert dagen etter. Celledød i prosent er målt vha trypanblåfarging 24 timer etter eksponering. * angir signifikans $p < 0,05$ og ** angir signifikans $p < 0,001$, ved bruk av t-test.

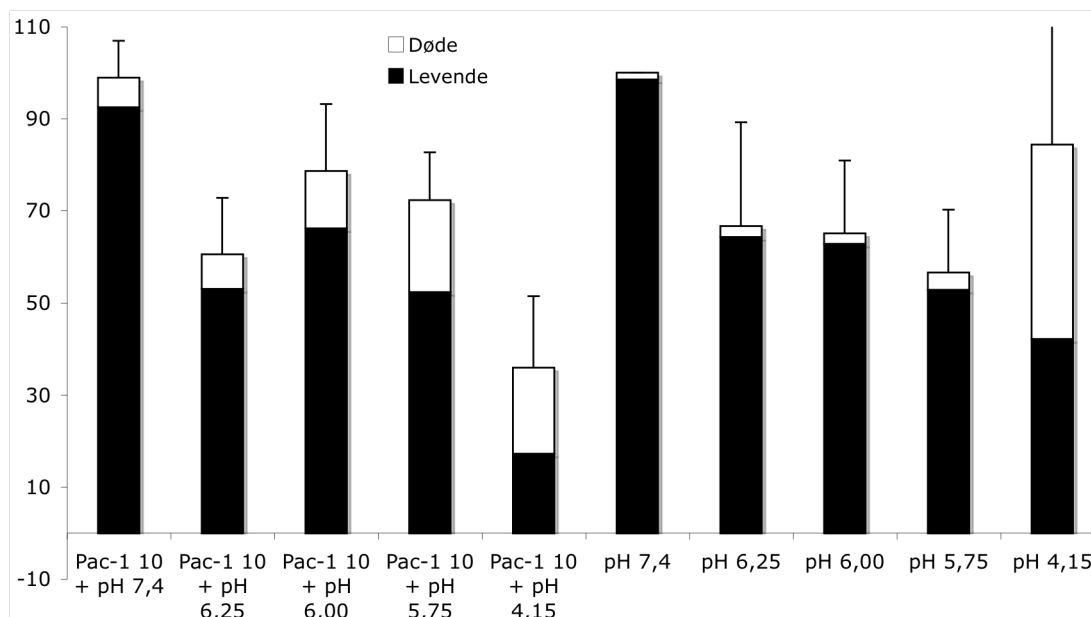
Tabell 3.27 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.27

Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner	Antall uavhengige forsøk
pH 7,4	1,58	0,56	4	4
pH 6,25	3,03	0,71	5	4
pH 6,00	3,21	0,54	5	4
pH 5,75	5,01	1,31	5	4
pH 4,15	52,84	9,22	4	4
PAC-1 10 μ M + pH 7,4	6,29	0,52	5	4
PAC-1 10 μ M + pH 6,25	9,70	2,18	5	4
PAC-1 10 μ M +	11,04	2,42	5	4

pH 6,00				
PAC-1 10 μ M + pH 5,75	17,77	4,67	5	4
PAC-1 10 μ M + pH 4,15	61,48	4,05	4	4



Figur 3.28 PC12 celler med pH 4,15 i mediet (t.h) eksponert i 24 t og ubehandlet (pH 7,4, t.v) Bildene er tatt fra to av skålene som er telt i figur 3.27.



Figur 3.29 PC12-celler behandlet med ulike pH-verdier, med og uten PAC-1. Det er samme skåler som er brukt her som i figur 3.27.

Tabell 3.28 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.29 Antallet celler i ubehandlet skål med pH 7,4 er 100%, mens de andre tallene er relative til den ubehandlede.

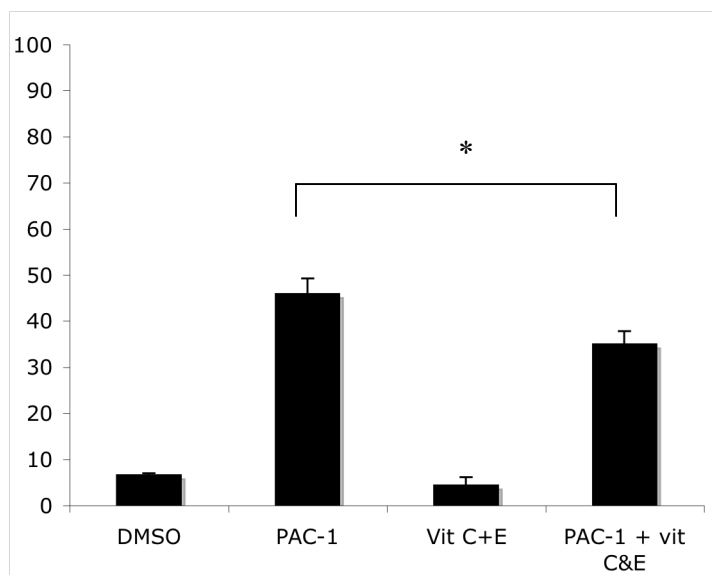
Eksposering	Levende celler	Døde celler	+/- SEM	Antall observasjoner
PAC-1 10 μM + pH 7,4	92,44	6,49	7,96	4
PAC-1 10 μM + pH 6,25	53,02	7,54	12,25	4
PAC-1 10 μM + pH 6,00	66,18	12,46	14,57	4
PAC-1 10 μM + pH 5,75	52,35	19,97	10,37	4
PAC-1 10 μM + pH 4,15	17,23	18,71	15,50	4
pH 7,4	98,49	1,51	0	4
pH 6,25	64,26	2,38	22,55	4
pH 6,00	62,84	2,26	15,78	4
pH 5,75	52,77	3,81	13,65	4

pH 4,15	42,12	42,22	41,46	4
---------	-------	-------	-------	---

3.8 ROS-fangere gir delvis beskyttelse mot PAC-1-indusert celledød.

3.8.1 Celledød i PC12 celler og kyllingnevroner eksponert med ROS-fangere

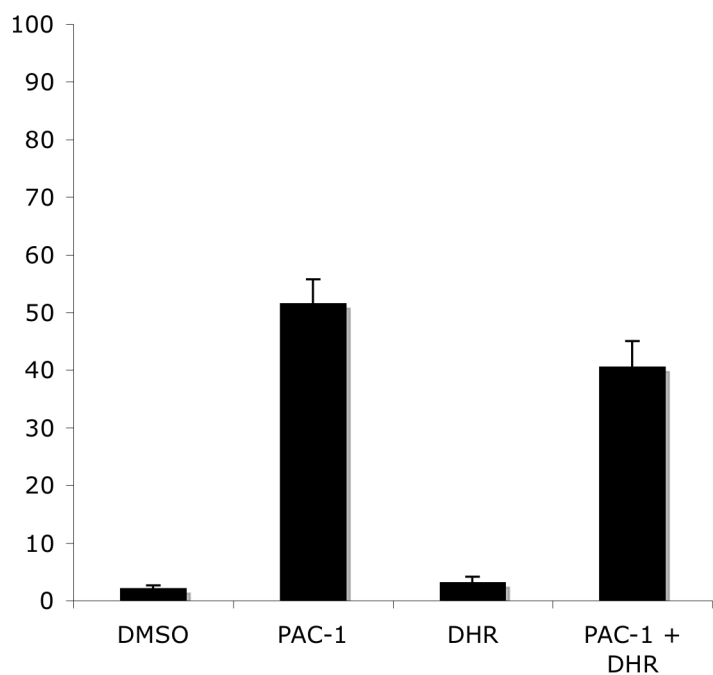
Den konservative hypotesen tilsier at PAC-1 skal gi en direkte caspase-3 aktivering, og at denne aktiveringen kommer etter eventuell involvering av initiatorcaspaser, mitokondrier og vekstfaktorer. Det var derfor veldig interessant å se om ROS-fangere hadde noen påvirkning på celledød. Dihydrorhodamine er en peroksynitrittnøytraliserer, vitamin C og E (viktig for å motvirke lipidoksidering) og MitoTracker® Red er generelle radikalfangere. Vitamin C & E ga en signifikant reduksjon i celledød i forhold til PAC-1 i PC12 celler. Det var også signifikant reduksjon med vitamin C & E i celler eksponert med STS. Dersom det hadde blitt gjort flere forsøk i kylling, kunne det kanskje også blitt vist signifikant reduksjon der. Variasjonen i tallene i kyllingnevronforsøkene var store, men det var en tendens til beskyttelse av vitaminene. MitoTracker® Red passerer mitokondriemembranen og blir oksidert av oksygenradikaler. Den fluorescerer også når den blir oksidert, noe som ble testet i ROS-assay. Det ble ikke vist noen generering av ROS ved bruk av MitoTracker® Red.



Figur 3.30 Celledød i PC12 celler eksponert for PAC-1 og vitamin C og E. Cellene ble platet ut i skåler og eksponert dagen etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering. * angir signifikans $p < 0,05$ ved bruk av t-test. Stoffer og konsentrasjoner som ble brukt er angitt i tabell 3.29.

Tabell 3.29 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.30

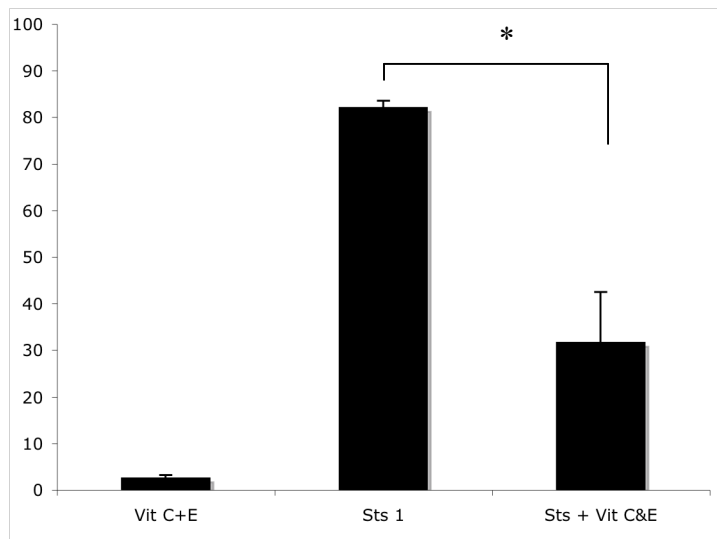
Exponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner	Antall uavhengige forsøk
DMSO 0,1 %	6,58	0,44	4	4
PAC-1 100 μ M	45,82	3,46	6	5
Vit C 2 μ M + vit E 10 μ M	4,36	1,76	5	4
PAC-1 100 μ M + vit C 2 μ M + vit E 10 μ M	34,96	2,81	6	5



Figur 3.31 Celledød i PC12 celler eksponert for PAC-1 og DHR. Cellene ble platet ut i skåler og eksponert dagen etter. Celledød ble målt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering. Stoffer og konsentrasjoner er angitt i tabell 3.30.

Tabell 3.30 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.31

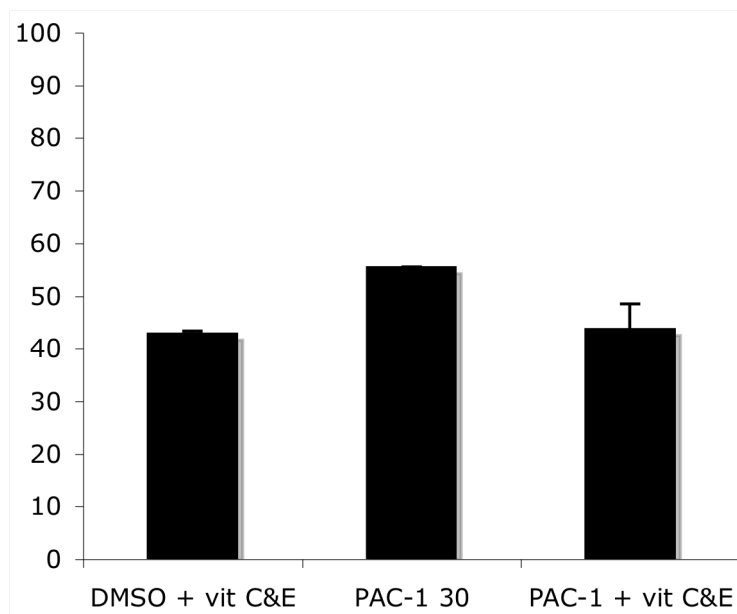
Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner	Antall uavhengige forsøk
DMSO 0,1 %	2,00	0,62	3	2
PAC-1 100 μ M	51,44	4,28	3	2
DHR 1 μ M	3,02	1,13	3	2
PAC-1 100 μ M + DHR 1 μ M	40,46	4,54	3	2



Figur 3.32 ROS-fangere hemmer celledøden induisert av STS. Cellene ble platet ut i skåler og eksponert dagen etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering. * angir signifikans $p < 0,05$ ved bruk av t-test. Konsentrasjoner er angitt i tabell 3.31.

Tabell 3.31 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.32

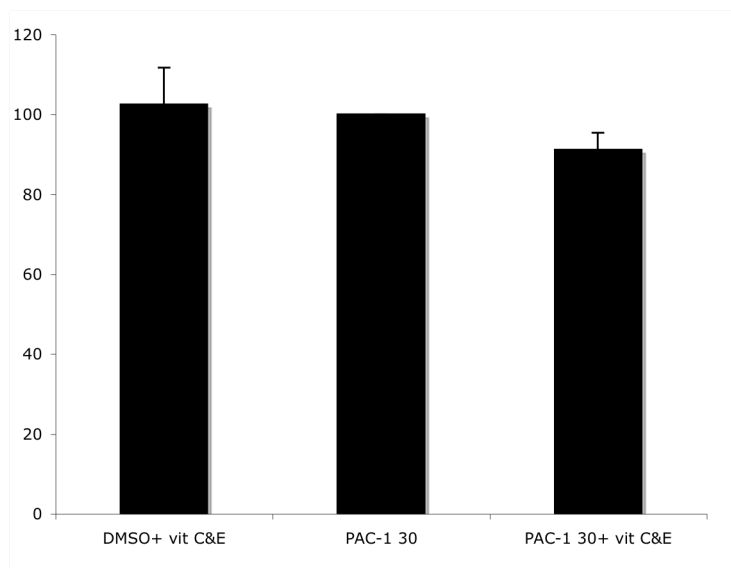
Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner
Vit C 2 μM + vit E 10 μM	2,48	0,70	2
STS 1 μM	82,00	1,53	2
STS 1 + vit C 2 μM + vit E 10 μM	31,61	10,86	2



Figur 3.33 Celledød i kyllingnevroner med serum i mediet, eksponert med PAC-1, PAC-1 og vitamin C og E, og kontroll. Cellene ble platet ut i skåler og eksponert 3 dager etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering. Stoffe og konsentrasjoner er angitt i tabell 3.32.

Tabell 3.32 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.33

Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner	Antall uavhengige forsøk
DMSO 0,1% + vit C 2 μ M + vit E 10 μ M	42,78	0,53	2	2
PAC-1 30 μ M	55,34	0,12	2	2
PAC-1 30 μ M + vit C 2 μ M + vit E 10 μ M	43,65	4,82	2	2



Figur 3.34 Celledød i kyllingnevroner med serumfritt medium, eksponert med PAC-1, PAC-1 og vitamin C og E, og kontroll. Cellene ble platet ut i skåler og eksponert 3 dager etter. Celledød i prosent ble målt vha trypanblåfarging 24t etter eksponering. Stoffe og konsentrasjoner er angitt i tabell 3.33.

Tabell 3.33 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.34. Tallene er normalisert fordi variasjonen i basaldød ved forsøkene var stor, mens den relative forskjellen i celledød mellom PAC-1 og PAC-1 med vitaminer var jevnere.

Eksponering	% Celledød	+/- SEM	Antall observasjoner	Antall uavhengige forsøk
DMSO 0,1% + vit C 2 μ M + vit E 10 μ M	102,54	9,23	5	4
PAC-1 30 μ M	100	0	5	4
PAC-1 30 μ M + vit C 2 μ M + vit E 10 μ M	91,20	4,18	5	4

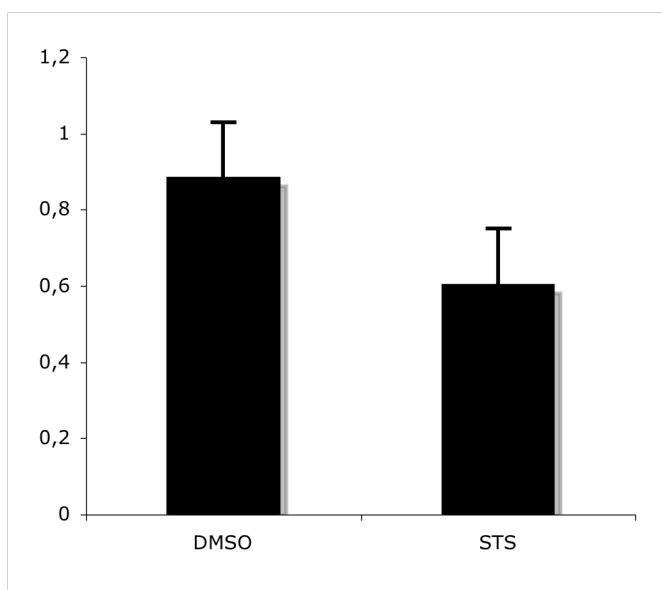
3.8.2 ROS-assay utført med DHR i PC12

Det så ut som at ROS-fangere hadde effekt på celledød, og derfor ble det også utført ROS-assay. Denne metoden skal se hvorvidt det blir generert ROS ved at proben, DHR, blir oksidert i nærvær av peroksynitritt og DHR vil da fluorescere. I PC12 celler vil STS

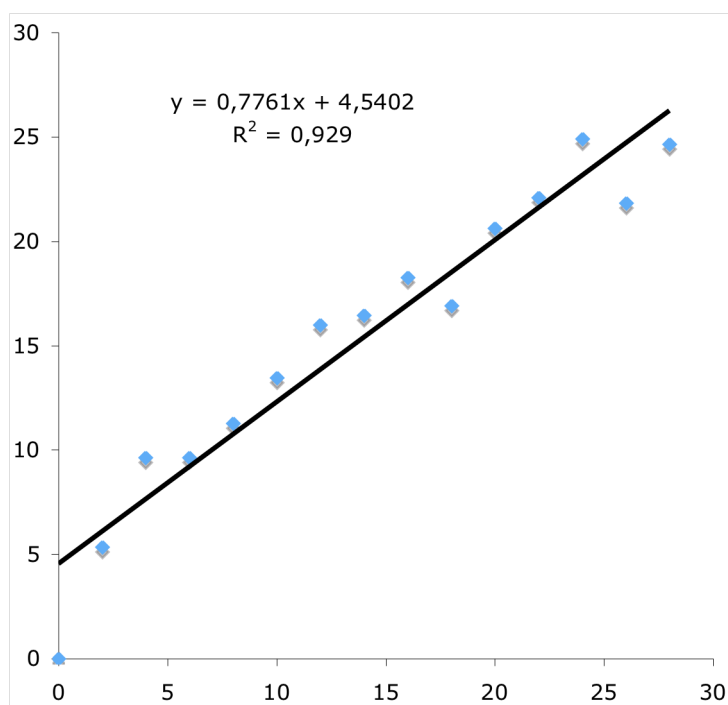
generere peroksynitritt, og peroksynitritt er veldig viktig i staurosporinindusert død. Cellene ble eksponert i 4t med STS som positiv kontroll, da dette tidspunktet tidligere har blitt vist å gi mest fluorescens når DHR har blitt brukt som probe (Kruman, Guo et al. 1998).

Staurosporin skulle være en god positiv kontroll til denne metoden, da virkningsmekanismen til staurosporin involverer ROS-dannelse. Det var derfor overraskende at brønnene eksponert med staurosporin ikke ga noen særlig fluoriscens av DHR. STS var ingen god positiv kontroll i disse forsøkene (figur 3.35 og tabell 3.34). Det gjennomsnittlige stigningstallet er lavere enn hos kontrollen. Det kan tolkes ut fra figur 3.35 at staurosporin er en dårlig positiv kontroll eller at metoden er dårlig (diskusjonsdelen).

Målingene som ble gjort ga stor spredning ved alle stoffer. Det ble derfor ikke gjort noen signifikante funn. Resultatene viser at PAC-1 gjør at DHR fluoriscerer mer enn i kontrollen og derivatene (figur 3.37-38 og tabell 3.34).



Figur 3.35 ROS-dannelse målt i RFU i PC12 celler eksponert for DMSO 0,1% og STS 1 μ M. Cellene ble platet ut i 96-brønnerplater og eksponert dagen etter. 3t etter eksponering ble det tilsatt DHR til mediet og 4t etter eksponering ble fluorescens målt. For tallmateriale se tabell 3.34.

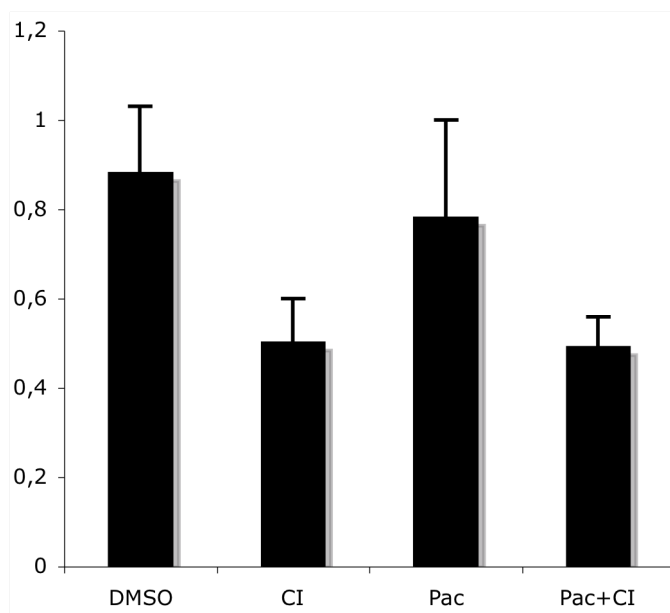


Figur 3.36 Korrelasjon av fluorescens (RFU) som funksjon av tid ved måling av DHR og ROS-aktivitet i PAC-1 100 µM eksponerte PC12 celler. Cellene ble platet ut i 96-brønnersplater og eksponert dagen etter. 3t etter eksponering ble det tilsatt DHR til mediet og 4t etter eksponering ble fluorescens målt.

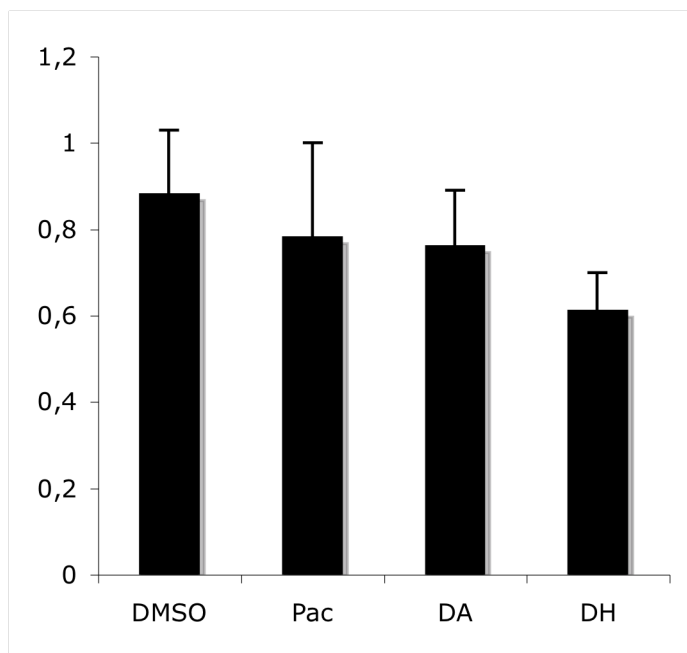
Tabell 3.34 ROS-aktivitet i 96-brønnersplater med PC12 celler eksponert med ulike stoffer. Stigningstall som var mer enn 2 standard avvik fra gjennomsnittmålingen er utelatt.

Stoff	Stigningstall RFU/min	R ² -verdi	SEM	Antall
PAC-1 100 µM	0,78	0,93	0,22	11
DA 100 µM	0,76	0,96	0,13	11
DH 100 µM	0,61	0,92	0,09	12
DMSO 0,1%	0,88	0,95	0,15	12
STS 1 µM	0,60	0,95	0,15	11
Ubh	0,64	0,93	0,10	11

PAC-1 100 μ M + CI 1 μ M	0,49	0,94	0,07	8
CI 1 μ M	0,50	0,92	0,10	7



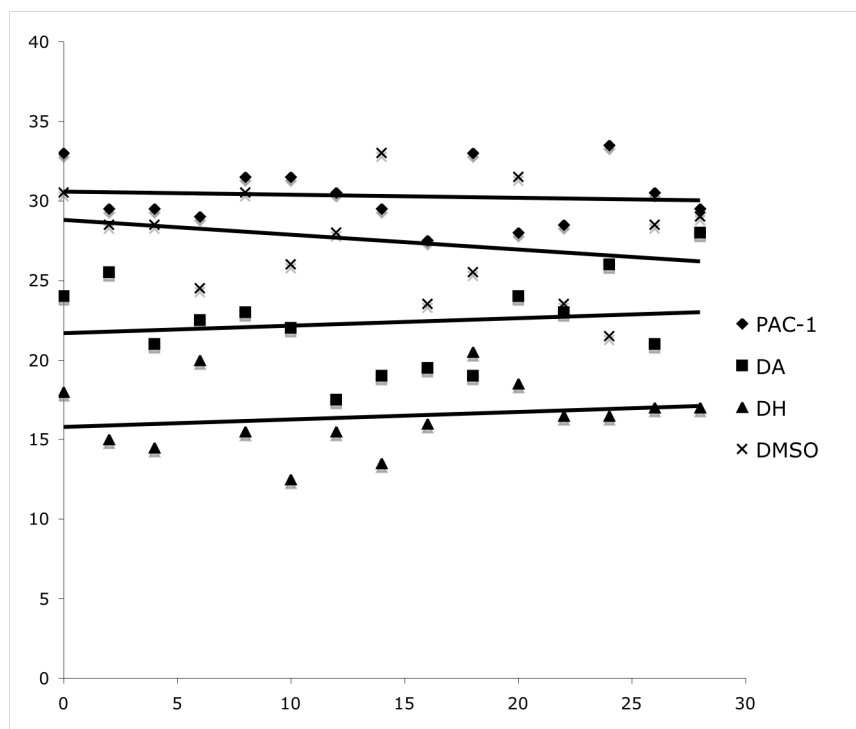
Figur 3.37 ROS-dannelse målt i RFU i PC12 celler eksponert for PAC-1 100 μ M, CI 1 μ M og kombinasjonen. Cellene ble platet ut i 96-brønnersplater og eksponert dagen etter. 3t etter eksponering ble det tilsatt DHR til mediet og 4t etter eksponering ble fluorescens målt. For tallmateriale se tabell 3.34.



Figur 3.38 ROS-dannelse målt i RFU i PC12 celler eksponert for PAC-1 100 μ M, DA 100 μ M og DH 100 μ M. Cellene ble platet ut i 96-brønnersplater og eksponert dagen etter. 3t etter eksponering ble det tilsatt DHR til mediet og 4t etter eksponering ble fluorescens målt. Se tallmateriale i tabell 3.34.

3.8.3 ROS-assay utført med DHR i kyllingnevroner

ROS-assay utført i kyllingnevronene (med serum i mediet) viste ingen økning i RFU/min (figur 3.40 og tabell 3.35). Korrelasjonen viste at det var ingen lineær sammenheng. Dette forsøket ble utført en gang med 2 paralleller. Kyllingnevroner ble behandlet med PAC-1, DA, DH og DMSO, og skålene ble høstet etter 4t og deretter lest av. Det ble ikke utført flere forsøk i kylling.



Figur 3.40 PAC-1 viste ingen økning i RFU/min når ROS-aktivitet ble målt i kyllingnevroner. Cellene ble platet ut i 96-brønnersplater og eksponert 3 dager etter. 3t etter eksponering ble det tilsatt DHR til mediet og 4t etter eksponering ble cellene høstet, pipettert ut i 96-brønnersplate og fluorescens målt i plateleser.

Tabell 3.35 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.37

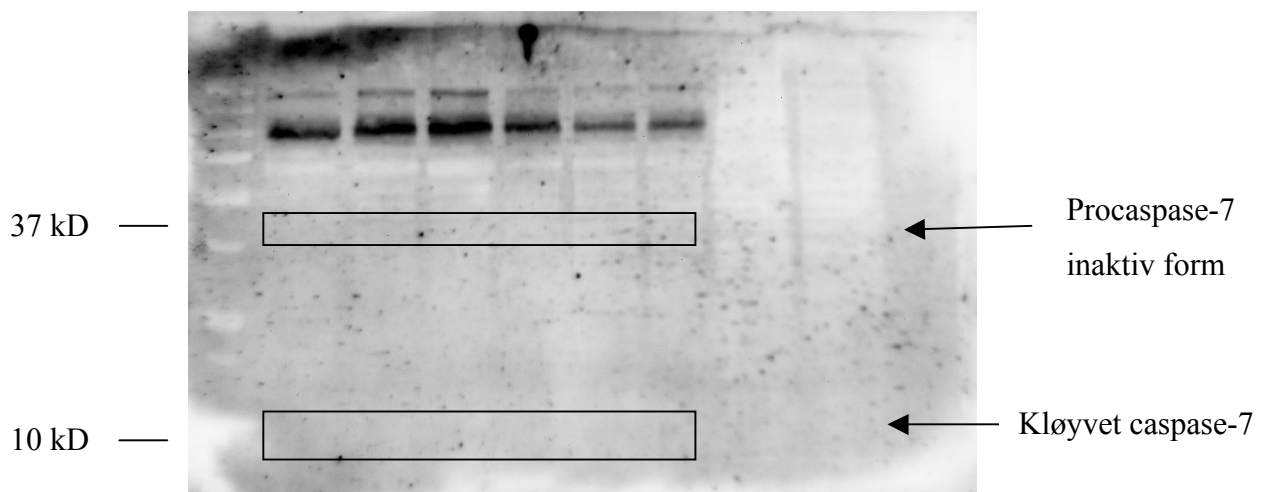
Eksposering	Stigningstall RFU/min	Korrelasjon	Antall
PAC-1 100 μ M	-0,0196	0,0089	2
DA 100 μ M	0,0482	0,0218	2
DH 100 μ M	0,0473	0,0366	2
DMSO μ M	-0,0929	0,0631	2

3.9 Påvisning av procaspase-7 og kløyvet caspase-7

Det er vist at PAC-1 aktiverer caspaser. Det har også blitt vist til at procaspase-3 blir kløyvet til caspase-3. Det er allikevel lite procaspase-3 som blir kløyvet. Siden det ble funnet, i denne oppgaven, at celledøden var mye høyere ved 48t enn 24t, kunne det skyldes at caspasen som aktiveres er induserbar (Larner, McKinsey et al. 2005; Zhang, Alber et al. 2006). Procaspase-7 er strukturelt likt som procaspase-3. PAC-1 har vist å aktivere procaspase-7 ved sinkchelatering (Peterson, Goode et al. 2009). Caspasehemmer tilsatt 2 og 4 timer etter PAC-1 til rotte kornceller har vist å hemme celledøden med over 50 %, men funnet var ikke signifikant (Lindland-Tjønn 2009).

Det ble ikke funnet noen spesifikke Westernbånd ved fremkalling av nitrocellulosemembranen etter å ha påført caspase-7 antistoff og tilhørende sekundær antistoff. Forsøket ble gjentatt mange ganger uten bedre resultater (diskusjon, avsnitt 4.1.3). Figur 3.41-42 viser uspesifikke bånd og mangel på bånd ved molekylvekt 38 kD. Det kløyvede båndene er på 10 kD.

Procaspase-7 har blitt påvist i PC12 celler (Larner, McKinsey et al. 2005). Antistoffet som ble brukt har vist bånd tidligere (Fiala and Kinkor 2004; Song, Yao et al. 2003).



Figur 3.41 Westernblot med standard (Precision Plus All Blue Standards) i kolonnen helt til venstre. Videre mot høyre er det prøver med henholdsvis PC12 celler eksponert med PAC-1 100 μM, DA 100 μM, DH 100 μM, DMSO 0,1%, STS 1 μM og ubehandlet. Cellene var eksponert i 4t før høsting.



Figur 3.42 Westernblot med standard (Precision Plus All Blue Standards) i kolonnen helt til venstre. Videre mot høyre er det prøver med kyllingnevroner eksponert for PAC-1 100 μM , DA 100 μM , DH 100 μM , DMSO 0,1%, STS 1 μM og ubehandlet. De tre brønnene til høyre er PC12 med DMSO 0,1%, STS 1 μM og ubehandlet. Alle cellene var eksponert i 4t før høsting.

4. Diskusjon

4.1 Diskusjon av metoder

4.1.1 PC12 celler og kornceller fra kylling

Cellekulturer deles generelt inn i cellelinjer og primærkulturer. Cellelinjer vokser i flasker og kan vokse *in vitro* i mange år, mens primærkulturer prepareres og brukes innen kort tid. Fordelen med linjene er at de har samme opprinnelse, og i forsøk vil cellene opptre relativt likt fra forsøk til forsøk, og reproduserbarhet vil dermed være større enn i primærkulturer.

PC12 celler er en prolifererende cellelinje som stammer fra en rotte- binyrefeokromocytom (Greene and Tischler 1976). PC12 er en kreftcellelinje, og det betyr at den har fått endrede egenskaper i form av økt overlevelse og den har mistet noen av de differensierte egenskapene som tilsvarende ikke-kreftceller har.

Primærkulturer er isolert fra vev og stammer fra flere forskjellige dyr. Cellene lever ikke lenge *in vitro*, og krever mer kompliserte dyrkningsbetingelser. Primærkultur vil i større grad enn cellelinjer gjenspeile det man finner *in vivo*. Kornceller fra kylling er en modell for å studere nevronal utvikling, og er en metode som er utviklet ved farmasøytisk institutt (Jacobs, Aden et al. 2006). Fordelen med å bruke kylling som modell er at den har mange like egenskaper som rotte, som er en velstudert modell med høy kredibilitet for å studere nevronal utvikling, funksjon og patologi (Contestabile 2002). I motsetning til rotte krever ikke kylling dyrestall, men rugemaskin, og er derfor en enklere modell. I studier hvor kylling er sammenlignet med rotte, viser de to kulturene samme glutamatindusert eksitotoksisitet, ROS-aktivitet og caspaseaktivering. Celledød ved eksponering for glutamat kan blokkeres med caspasehemmer (Jacobs, Aden et al. 2006). Siden cellene dyrkes med tilstedeværelse av Ara-C, vil det ikke være prolifererende celler tilstede.

Primærkulturer er ofte mer sårbare for påkjenninger enn cellelinjer. Basaldøden i kyllingnevronene varierte mye, og var i snitt på 27,74% for korncellene med serum (figur 3.2 og tabell 3.2), og 43,27% i korncellene i serumfritt medium (figur 3.3 og tabell 3.3), mens den var 2,96% i PC12 celler (figur 3.1 og tabell 3.1).

PC12 celler og kornceller fra kylling er tidligere brukt til studier av PAC-1. PAC-1 har da vist å gi caspaseaktivitet og induisert celledød. I korncellene har caspasehemmer gitt fullstendig beskyttelse mot celledøden, mens det i PC12 celler ikke har gitt beskyttelse ved tilsetning av caspasehemmer (Aziz, Akselsen et al. 2010). Kyllingkorncellene er derfor en egnet modell for å se nærmere på mekanismene som ligger til grunn for PAC-1-indusert celledød.

Ved høy konsentrasjon av PAC-1, kan stoffet felle ut og danne krystaller, enten alene eller sammen med noen av komponentene i mediet. I figur 3.1a er en slik utfelling vist. Utfelling kunne sees både med og uten mikroskop. Det skjedde noen ganger både i skåler med PC12 celler og kyllingnevroner ved konsentrasjon på 100 μM . Dette er noe man bør være oppmerksom på, da resultatene kan bli misvisende som en følge av det. Det kan være at man kan unngå krystalldannelse dersom PAC-1 blir tilsatt til medium før mediet blir tilsatt cellene, men dette ble ikke undersøkt.

4.1.2 Metode for å måle celledød

I denne oppgaven har det blitt benyttet trypanblå til å farge døde celler, som deretter ble telt i mikroskop. Trypanblå passerer cellemembranen i celler som har mistet membranintegriteten. Tap av membranintegritet er felles for døde celler (Aras, Hartnett et al. 2008). Denne metoden har den fordelen at man ser cellene man teller, og man kan se morfologiske forandringer på celler som følge av behandlingen de har fått. I korncellekulturene er det kun nevronene man skal telle, og derfor er det viktig å kunne skille dem slik man gjør i mikroskopet. Ulempen ved metoden er at den tar lang tid, og det er en subjektiv vurdering. Nekrotiske celler svulmer opp og synes derfor godt, mens apoptotiske celler blir små, og går også over i fragmenter. Noen celler er farget klart blått, mens andre celler kan være små og antyder blåfarge. Derfor er det ikke alltid lett å skille på om en celle er død eller ikke.

Det ble observert at celletallet var lavere i PAC-1 eksponerte celler enn i kontrollceller (figur 3.14). Celler eksponert for PAC-1 viser færre utløpere enn ubehandlede, og mange er runde. Aktin og spektrin er substrater for caspaser (Chan and Mattson 1999), og utøver en viktig effekt i cytoskjelettet. Derfor kan en av grunnene til at celletallet er lavere ved PAC-1 eksponering, være at cellene har mindre utløpere, som følge av at monomerene som er med på å danne utløpere, blir kløvet av caspaser. Celler med utløpere sitter bedre festet til skålen

enn celler uten utløpere. Det var derfor knyttet usikkerhet til om det observerte forholdet mellom døde og levende celler ville vært annerledes om ikke cellene hadde løsnet fra bunnen på skålen. Derfor ble mediet med trypanblå telt for å finne celledødsandelen der, og sammenligne med den respektive skålen. Det ble telt to paralleller med PAC-1 10 og 100 μ M, DMSO og ubehandlet. I figur 3.15 er det vist celledød blant cellene som sitter fast på bunnen av skålen og celledød blant cellene som er løse i mediet. Celledøden viser seg å være så lik, at det kan antas at celledødstallene i PC12 cellene er riktige på tross av at mange faller av. Det styrker derfor sikkerheten på de kvantitative celledødsdataene funnet i PC12.

Kyllingnevronene var vanskelige å telle. Skålene med korncellene ble tilsatt Ara-c for å hindre vekst av ikke-nevronale celler, men noen vil være tilstede. Disse celletyper skulle ikke telles. Nevronene har en karakteristisk form som skiller dem visuelt fra de andre cellene man observerer i skålen, men de er ofte i klumper. Det er vanskelig å være nøyaktig på celleantallet i klumper. Det var stor variasjon i basaldød og stor variasjon i hvor lett det var å skille cellene fra hverandre. Ved noen av prepareringene var kvaliteten dårlig og det ble observert fragmenter og cellerester som virket forstyrrende for tellingen. Ved telling av nevroner i serumfritt medium ble celletallene generelt høyere enn i skåler hvor det var serum i mediet, og det var enklere å skille tellbare celler fra hverandre.

4.1.3 Metode for å studere proteiner involvert i celledød

Westernblotting kan brukes til kvalitativ og kvantitativ analyse av spesifikke proteiner i en prøve. Metoden krever noen dagers forberedning før man kan lese av resultat ved fremkalling. Det ble benyttet et nytt antistoff, og det kreves prøving og feiling, før man får etablert en standard for hvilke konsentrasjoner og eksponeringstider man bør benytte for optimalt resultat. Det er derfor en tidkrevende metode. Western blotting ble benyttet til å påvise caspase-7 i PC12 celler og kornceller eksponert for ulike behandlinger. Antistoffet som ble benyttet har tidligere vist å gi bånd på procaspase-7 og kløyvet caspase-7 i PC12 celler (Fiala and Kinkor 2004; Song, Chen et al. 2009). Det ble ingen spesifikke bånd med riktig molekylvekt i forsøkene som ble utført her. Det ble testet med flere ulike prøver, både PC12 celler, kyllingnevroner og melanocytter. Problemet ved Western blottene som ble utført i den oppgaven var både for mye bakgrunn, uspesifikke bånd og mangel på spesifikke. Det ble gjort mange tiltak for å kompensere for problemer som oppsto. Sterk bakgrunn kan

skyldes dårlig blokking, for mye sekundær antistoff, dårlig vasking med TBS m/Tween og en bør heller bruke Supersignal West piko, som er mindre sensitiv, enn Supersignal West femto. Det ble forsøkt å blokke lengre, endre konsentrasjonen på primærantistoffet, endre sekundærantistoff og øke proteinmengden i hver brønn. Det ble ikke testet med annen membran, bytte av blokkemiddel eller endring av geltykkelse. Det minste båndet har størrelse på 10 kD og kommer derfor nesten samtidig med væskefronten. Dersom væskefronten og det kløyvede caspase-7-båndet hadde vært bedre separert er det lettere å identifisere.

Caspaseassay er en metode for å måle caspaseaktiviteten i en prøve etter ulike behandlinger. PC12 cellene måles i samme brett som de er platet ut i. En tidligere benyttet metode gikk ut på å så ut celler i medium skåler, for så å høste og tilsette i 96-brønnersplaten (Slagsvold, Rosseland et al. 2003). Metoder som innebærer høsting, krever at man gjør proteinmåling for å kunne korrigere for proteinkonsentrasjonen i prøvene som blir avlest. Det er derfor en stor fordel at cellene kan sås rett i 96-brønnersplaten, da man antar at celletetthet og dermed proteinkonsentrasjon er lik i alle brønnene.

Det tilsettes RIPA-buffer som lyserer cellene og caspasesubstrat som fluorescerer når substratet kløyves. Det måles hvor mye substrat som kløyves. Mengde fluoriscernede substrat gjenspeiler hvor mye caspase-3 som er aktivert i prøven. Denne metoden er objektiv og lite tidkrevende, men målingene i plateleseren må utføres i gitte tidsrom der hvor kløyvingen er lineær, for å se utviklingen i substratkløyving over tid.

4.1.4 Måling av ROS-produksjon

ROS-produksjon i cellene kan kvantifiseres ved å bruke en probe som penetrerer cellemembranen og sender ut et signal når den blir oksidert. Dihydrorhodamin er et slikt stoff, og det fluoriserer når det blir oksidert fra dihydrorhodamin til rhodamin. Denne proben oksideres av peroksynitritt, som er en type ROS (Cuzzocrea, Misko et al. 2000). Det betyr at den ikke reagerer med alle former for ROS, og gir dermed ikke et fullstendig bilde av ROS-produksjonen.

Avlesningene ga store målevariasjoner. Dette kan skyldes ujevn fordeling av tilførte stoffer i brønnene. For å gi mest mulig homogen fordeling ble derfor mediet i brønnene tatt ut før

eksponering, blandet godt med stoffene og ført tilbake. På tross av dette var det stor variasjon på målingene. En annen forklaring er at nettopp prosedyren med å ta ut mediet og sette tilbake, for så til slutt å bytte ut PC12-mediet med PBS, kan føre til underestimering. PC12 cellene løsner lett fra brønnene, og i større grad PAC-1-eksponerte celler (som tidligere nevnt). Derfor kan det være færre celler i brønnene eksponert med PAC-1 enn i kontrollbrønnene. Det betyr færre celler til å oksidere proben, og en underestimering av den reelle ROS-genereringen. Tall som lå mer enn 2 standard avvik unna gjennomsnittet ble derfor utelatt. Av totalt 8 eller 12 målinger ble det fjernet 0-2 tall for hvert stoff.

4.2 Diskusjon av resultater

4.2.1 PAC-1-indusert celledød kan skyldes flere mekanismer

PAC-1 og DA gir celledød i både PC12 celler og kyllingnevroner. Celledøden øker proporsjonalt med dosen. I lungecancer cellelinjen, NCL-H226 ble det vist en IC₅₀-verdi på 0,35 µM, mens i andre linjer som ble testet var IC₅₀-verdien mellom 0,5 og 3,5 µM (Putt, Chen et al. 2006). I andre studier er det funnet langt høyere IC₅₀-verdier. For PC12 celler er det nødvendig at PAC-1 gis i doser ved 10-30 µM-området for å se en respons på celledød etter 24t.

Den konservative hypotesen tilsier at det skal være en direkte caspase-3 aktivering, og at denne aktiveringen skal komme uten eventuell involvering av initiatorcaspaser, mitokondrier og vekstfaktorer. Caspaseassay viser caspaseaktivering målt ved 4 timer. Denne blir helt hemmet ved tilsetning av caspasehemmer i cellene samtidig med PAC-1 eksponering. Dersom det er direkte caspase-3 aktivering som fører til celledød er det å forvente at celledøden kommer raskt etter eksponering med PAC-1. I PC12 cellene ble celledød målt ved 48 timer og 72 timer, i tillegg til 24 timer. Det er tydelig økning i celledødstallene etter 48 timer. Det kan bety at evnen PAC-1 har til å aktivere procaspase-3 ikke er god nok til å indusere en god celledødsrespons, men at det tar tid før caspase-3 får kløyvet nok til at cellen dør.

Eventuelt kan PAC-1 aktivere procaspase-3 og det gir en positiv feedback på caspasekaskaden, f. eks ved kløyving av initiatorcaspaser og/eller vekstfaktorer som virker modifierende på apoptoseprosessen, slik at responsen forsterkes. Caspase-9 blir kløyvet av caspase-3 slik at den katalytiske aktivitetet til caspase-9 i apoptosomet øker drastisk (Zou, Yang et al. 2003). ERK2 kan fosforylere caspase-9, slik at caspase-9 inaktiveres (Allan, Morrice et al. 2003). PAC-1 gir reduksjon i fosforylert ERK (Lindland-Tjønn 2009). Dersom PAC-1 gir aktiv caspase-3, ERK inaktiveres og caspase-9 ikke blir hemmet av ERK, kan signalet fra kløyvet caspase-3 forsterkes slik at den mitokondrieinduserte apoptosen bli aktivert. Dette vil gi ROS-aktivering. Dersom dette er den gitte mekanismen, forklarer det hvorfor vekstfaktorer beskytter mot PAC-1-indusert død (Lindland-Tjønn 2009), og gir ROS-aktivering, og at det tar tid før cellene dør.

ERK er kinaser som er viktige i intracellulær signalering. Aktivisering av ERK (fosforylering) er assosiert med undertrykking av apoptose (Martin, Allan et al. 2008). Studier peker i begge retninger vedrørende kløyving av fosforylert ERK som respons på caspaseaktivitet. Lindland-Tjønn (2007) fant at serumdeprivasjon og PAC-1 reduserer nivået av fosforylert ERK. P53 hemmer ERK2 ved caspasemediert kløyving, men det ble også funnet kløyving av ERK2 i MCF-7 celler, som mangler gen for funksjonelt caspase-3 (Marchetti, Cecchinelli et al. 2004). Fas-mediert apoptose har vist å ikke endre på nivået av ERK og ERK2 (Widmann, Gibson et al. 1998).

Enda en forklaring kan være at det egentlig er påvirkning av andre sinkholdige molekyler som forårsaker celledødsstimuli, f eks ved påvirkning av DNA polymerase (Slater, Mildvan et al. 1971). Sinkdeprivasjon fører til hemming av celleproliferasjon ved å stoppe cellesyklusen i fase G₀/G₁ (Adamo, Zago et al. 2010), men også i G₁/S fasen (Wong, Zhao et al. 2007). Sinkmangel kan indusere apoptose i både proliferative og ikke-delingsdyktige nevronale celler via den indre veien, som følge av hemming av ERK, caspase-3-aktivisering og nedregulering av nukleær faktor-kappa B (NF-κB)-avhengige antiapoptotiske gener (Adamo, Zago et al. 2010).

En caspasehemmer burde hindre caspaseaktivisering og en potensiell positiv feedback, men caspasehemmeren, ac-DEVD-CMK, som hemmer flere caspaser, virker ikke beskyttende på PAC-1-indusert celledød. Caspasehemmeren, zVAD-fmk, kan føre til alternative celledødsveier som nekrose og autofagisk celledød (Vandenabeele and Berghe 2006). Det kan være at celler som er eksponert for PAC-1 dør som følge av en caspaseaktivisering, som forsterkes av en feedback loop, men det kan også tenkes at når man tilsetter caspasehemmer, så dør cellen av en annen mekanisme. Denne eventuelle andre mekanismen er også PAC-1-avhengig, men at CI fører til at det er andre signalkaskader som da blir aktivert. Et ledd i både nekrose og autofagisk celledød, slik det er beskrevet av Vandenabeele og Berghe, er at det dannes ROS, men ved måling av ROS-aktivitet i PC12 celler tilsatt PAC-1 og CI samtidig, var det mye lavere ROS-generering enn i alle de andre brønnene. Flere målinger må gjøres for å se om det funnet er signifikant, eller bør måles på et annet tidspunkt (se 4.2.7).

Frigjøring av AIF (apoptose induserende faktor) fra mitokondriene kan mediere en caspaseuavhengig celledøds-kaskade som også er viktig i nevroner. AIF blir frigjort til cytosol for å indusere celledød som respons på PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1)

aktivering (Yu, Andrabi et al. 2006). Frigjøring av cytokrom c og AIF fra mitokondriene virker å være separate hendelser, og AIF kan bli regulert forskjellig i caspaseavhengig og uavhengig celledød (Polster and Fiskum 2004). AIF fungerer som både en antioksidant og apoptoseinduser. AIF er, ved oksidoreduktaseegenskapene sine, en viktig medspiller i antioksidantforsvaret (Cande, Cecconi et al. 2002; Higgins, Beart et al. 2009).

Dersom mitokondriene blir skadet, beveger AIF seg fra cytosol til kjernen. Translokasjon av AIF til kjernen er observert som følge av bl.a. NMDA-behandling, peroksynitrittbehandling og oksygen-/glukosedeprivasjon (Polster and Fiskum 2004). AIF fører til DNA fragmentering og kromatinkondensering (Daugas, Nochy et al. 2000). I PC12 celler er PAC-1-mediert celledød caspaseuavhengig. Det hadde vært interessant å undersøke nærmere om AIF og PARP-1 blir påvirket av eksponering med PAC-1.

Det er vist at oppregulering av procaspase-7 mRNA, økte nivåer av procaspase-7 og aktivering av caspase-7, som respons på traumatisk hjerneskade (Larner, McKinsey et al. 2005; Zhang, Alber et al. 2006; Song, Chen et al. 2009). Caspase-7 påvirkes av PAC-1, og caspase-7 blir også hemmet av sink (Peterson, Goode et al. 2009). Som nevnt tidligere i dette avsnittet, er celledøden mye høyere ved 48 og 72 timer, enn ved 24 timer. Caspasehemmer tilsatt senere enn eksponering med PAC-1 ga større beskyttelse enn når CI er tilsatt samtidig med PAC-1 i rottekyllingnevroner (Lindland-Tjønn 2009). Det ville derfor være interessant å få belyst mengdene av procaspase-7 og aktiv caspase-7 i PC12 celler.

4.2.2 Ortho-hydroksy N-acyl hydrazonestrukturen er viktig for effekt av PAC-1

Det ble vist i artikkelen til Peterson et al. at PAC-1 binder sink *in vitro*. PAC-1 ble vist å lokaliseres intracellulært ved caspase-3 (Peterson, Hsu et al. 2009). Sink hindrer caspase-3-aktivering.

Det er kjent at ortho-hydroksy N-acyl hydrazonestrukturen binder metaller (Charkoudian, Pham et al. 2006; Kovacic 2008). Peterson og medarbeidere har sett på sinkbindende egenskaper, IC₅₀-verdien i cellelinjen U937 og caspase-3 aktivering. PAC-1 binder sink med en K_d på 52 nM, IC₅₀-verdien er 4,8 µM og caspaseaktiveringen ved 10 µM er på 45,8 %. Tilsvarende har DA en K_d på 77 nM, IC₅₀-verdi på 15,3 µM og caspaseaktiverende effekt på

30 %. DH har en K_d på mer enn 1000 nM, IC_{50} -verdi på over 100 μ M og viser ingen caspaseaktivering (Peterson, Hsu et al. 2009).

Resultatene i denne oppgaven viser at PAC-1 100 μ M gir en trefold økning i celledød sammenlignet med DA 100 μ M, tilsvarende er konsentrasjonen for IC_{50} -verdien trefold lavere for PAC-1 (se over). Caspaseaktiveringen fremmet av DA er ca 2/3 av aktiveringen til PAC-1 ifølge Peterson og medarbeidere. Funnene her viste at caspaseaktiveringen til DA og DH var omtrent 1/3 av aktiveringen til PAC-1. Ubehandlede brønner viste en caspaseaktivering på omtrent 1/6 (data ikke vist), mens i DMSO-behandlede brønner var aktiveringen litt høyere enn i ubehandlede.

Det at DA gir celledød mer effektivt enn DH, men caspaseaktiveringen er tilsvarende kan bety at caspaser ikke er involvert i celledøden. Eventuelt kan det tolkes som at det er ikke mengden av caspaser som er avgjørende, men hvilken caspase som aktiveres og hvor den er lokalisert.

4.2.3 STS induserer caspasene bedre enn PAC-1

STS ble benyttet for å få en kontroll som gir apoptotisk stimuli og iverksetter den indre mitokondrieinduserte signalveien. Innkubering med staurosporin i mer enn 2 timer gir en intracellulær surgjøring i ECV304 celler. Surgjøringen var ikke viktig for STS-mediert celledød (Porcelli, Ghelli et al. 2004). Som nevnt i innledningen, er det publisert tidligere at STS-indusert celledød blir helt hemmet av caspasehemmer (Kruman, Guo et al. 1998). Forsøk utført i denne oppgaven viste ingen beskyttelse ved bruk av caspasehemmer mot STS-indusert celledød (data ikke vist).

I 2009 publiserte Wells og medarbeider en artikkel om at de har utviklet en annen direkte caspase-3-aktivator, kalt 1541. 1541 gir aktivering av både caspase-3 og caspase-6. De hevder at dette stoffet induserer en autoproteolytisk aktivering ved å stabilisere en mer aktiv konformasjon og denne konformasjon er også mer mottakelig for intermolekylær proteolyse. 1541 ble sammenlignet med STS, og ved lik celledød gir STS enn høyere caspaseaktivering. Begge stoffene ga rask celledød. De mener at det betyr at bare en brøkdel av effektorcaspasene trenger å bli aktivert for å indusere celledød. Cytokrom c ble frigjort før aktivering av caspase-3 med STS, men etter aktiveringen med 1541. Det skyldes feedback på

den indre signalveien diskutert i avsnitt 4.2.1. I cellelinjen DKO MEF, som hadde dobbel ”knock out” på genet som koder for Bak og Bax, to viktige mediatorer i mitokondrieindusert apoptose, ble celledød indusert av STS hindret, mens 1541 induserte celledød. I cellelinjen MCF-7, som mangler et funksjonelt caspase-3 gen, viste 1541 liten respons. Det ble også testet med PAC-1 og de fant ved 100 μ M PAC-1 ingen målbar økning i aktivitet eller autoproteolyse av effektorcaspasene, mens 25 μ M ga god respons (Wolan, Zorn et al. 2009). Det kan skyldes at PAC-1 i høye konsentrasjoner virker hemmende på caspaseaktiviteten (Peterson, Goode et al. 2009). Det kan være at PAC-1 er en dårlig aktivator, eller at en direkte caspase-3-aktivator ikke kan indusere caspase-3 like effektivt som mitokondrieindusert caspase-3-aktivering. Artikkelen til Wells gir et inntrykk av at direkte caspase-3-aktivering er en effektiv metode for å indusere celledød. Det hadde vært interessant å gjøre flere studier og sammenligne disse to stoffenes egenskaper.

4.2.4 STS og PAC-1 virker på ulike signalveier

Det er nærliggende å tenke at STS og PAC-1 virker på ulike signalveier, siden de i kombinasjon gir høyere celledød enn om man summerer sammen celledød indusert av hvert av stoffene. Mulige mekanismer for PAC-1 indusert celledød er diskutert i avsnitt 4.2.1. Det er kjent at STS er en kinasehemmer (Kruman, Guo et al. 1998). STS ble først beskrevet som en hemmer av protein kinase C (PKC), men har siden vist å hemme mange forskjellige protein kinaser. Den eksakte mekanismen for STS-indusert celledød er ennå ikke kjent. Kritiske ledd i mekanismen er blant annet tidlig caspaseaktivering, økning av det intracellulære kalsiumnivået og ROS-produksjon (Kruman, Guo et al. 1998). Staurosporin fører også til intracellulær surgjøring (Waibel, Kramer et al. 2007), men staurosporin-indusert celledød er ikke avhengig av denne surgjøringen (Porcelli, Ghelli et al. 2004).

Det er kjent at celler har flere signalveier for å gi celledød, slik at det finnes reserveplaner om enkelte signalstoffer skulle være manglende (f.eks caspaseavhengig og caspaseuavhengig apoptose). Studiene utført her tyder på at PAC-1 og STS virker på ulike mediatorer, på tross av at begge virker via den mitokondrieinduserte signalveien, enten direkte eller indirekte. Kanskje STS hemmer mediatorer som ellers ville ha hemmet PAC-1 medierte effekter og *vice versa*. Foreløpig blir det spekulasjoner og flere studier trengs for å se tidsforløpet for ulike trinn i apoptoseinduksjonen, samt hvilke mediatorer som er involvert.

4.2.5 pH kan påvirke prolifererende egenskaper og PAC-1-medierte effekter

pH har vist å være sur i området rundt kreftceller, men med store variasjoner. Det var derfor antatt at cellene var sure på innsiden også. Det gikk mange år før det var mulig å teste den intracellulære pH-en, men den har derimot vist å være mer alkalisk enn pH målt i normale celler (Griffiths 1991). Dysregulering av protonpumpen på plasmamembranen er assosiert med en cancer fenotype.

Økt intracellulær pH har blitt demonstrert parallelt med transformasjon og proliferasjon (Shrode, Tapper et al. 1997). Dersom høy pH gir proliferasjon, kan det være at lav cytosolisk pH gir mindre celledeling. I PC12 celler er det tidligere blitt undersøkt hvordan pH intracellulært påvirker mitogenese (Thomas, Ritz et al. 1998). Det har blitt vist at intracellulær surgjøring. Forsuring, induisert enten ved jerncyanid eller propionsyre, produserte mitogene effekter. Det ble foreslått at intracellulær surgjøring i seg selv gir vekstfaktorlignende mitogene effekter i PC12 celler. Dette er også vist i studier på andre celletyper (Thomas, Ritz et al. 1998). Det har også blitt vist en direkte aktivering av DNA endonuklease ved redusert pH intracellulært, og at det var en direkte årsak til apoptose (Gottlieb, Nordberg et al. 1996). Apoptose, som er syreindusert, har i tillegg vist å skje gjennom en organisert signalvei som er uavhengig av caspasene (Zanke, Lee et al. 1998).

Det ble ikke testet hva den intracellulære pH-en var ved pH-forsøkene som ble gjort i denne oppgaven, men det ville gitt nyttig informasjon. Celletallene i skåler utsatt for pH-endringer ble undersøkt og er vist i figur 3.29 og tabell 3.28. Det var store forskjeller, men trenden viste at jo surere pH, dess færre celler. Bortsett fra celletallene ved pH 4,15, viste tallene en proporsjonal reduksjon i celletall med reduksjon i pH-en.

En mulig forklaring på en viss økning i effekten på celledød når PAC-1 gis i surt miljø kan være at sink blir mer effektivt chelatert av PAC-1, og deretter vil det skje en autoaktivering av procaspase-3. Ved surt miljø kan en sur amidhydrolyse skje av procaspase-3. "Safety catch"-en på procaspase-3 ble sagt å være pH-avhengig (Putt, Chen et al. 2006). Evnen sink har til å hemme procaspase-3 kan også være pH-avhengig. Sink er et divalent metall, og kanskje protoner kan redusere den kjemiske bindingsstyrken mellom sinkionet og PAC-1 og/eller sinkionet og procaspasen og dermed løsne på sinkionet, slik at kapasiteten til å aktivere caspasen øker. Det er en likevekt mellom fri sink i vann og sink

bundet til vann; $Zn^{2+} + 2H_2O \rightleftharpoons ZnOH^+ + H^+$ (Han and Singer 2007). Når pH'en senkes går denne likevekten mot mer fri sink. Disse frie sinkionene kan både virke hemmende på caspasen og bli chelatert av PAC-1. Kanskje beskytter surere pH mot caspaseaktivering, men med PAC-1 tilstede går likevekten mot chelatering av PAC-1. Dermed vil sur pH med PAC-1 tilstede redusere hemmingen av procaspase-3 og øke autokatalyseringen. Forøvrig påvirker pH-modifikasjoner mange prosesser inne i cellen, som f.eks. passasje over plasmamembranen (Stella, Pellerin et al. 1995). Signaler fra plasmamembranen kan påvirke mange signalveier i cellen. Det ble ikke testet om caspaseaktivering var økt ved surere pH, men det hadde det vært interessant å studere nærmere.

4.2.6 ROS er involvert i celledøden

Mange apoptose-stimulerende signaler gir ROS-produksjon i mitokondriene. Dette etterfølges av membranlipidperoksidering og tap av mitokondrisk transmembran-potensial (Kruman, Guo et al. 1998). PAC-1 skulle egentlig indukert apoptose i et trinn som kommer etter involvering av mitokondriene. Derfor ble det undersøkt nærmere om ROS var tilstede ved PAC-1 eksponering.

STS induserer apoptose, og denne involverer ROS-dannelse. Det er tidligere vist at STS gir ROS-produksjon i PC12 celler, og at den når en topp ved måling etter 4 timer. Derfor ble STS valgt som positiv kontroll og cellene ble eksponert i 4 timer før avlesning. Det var overraskende at resultatet viste ingen generering av ROS i det som var ment å være positiv kontroll. Ubehandlet var klart lavere enn PAC-1 eksponerte celler. Det som var overraskende var at DMSO-behandlede skåler også ga ROS, og tilsynelatende høyere enn de andre stoffene (se også diskusjon 4.1.4). Assayen sier ingenting om lokaliseringen til ROS. Det er ikke bare den kvantitative økningen i signalstoffer/enzymer som har betydning for effekt på apoptose, men også lokaliseringen av de ulike stoffene.

Funnene vedrørende ROS-aktivitet var ikke signifikante, men celledøden ble signifikant redusert med ROS fangerne, vitamin C og E. Caspasehemmeren, Ac-DEVD-CMK, ble tilsatt samtidig som PAC-1 og det viste mindre generering av ROS enn i kontroll. Dette funnet er i tråd med tidligere funn som viser at ROS ikke ble dannet i PC12 celler behandlet med STS og zVAD-fmk, versus celler med kun STS (Kruman, Guo et al. 1998). Som nevnt ovenfor kan zVAD-fmk, fører til alternative celledødsveier som nekrose og autofagisk celledød.

Noen studier har vist at disse veiene også involverer ROS-produksjon, men på et veldig tidlig tidspunkt (Vandenabeele and Berghe 2006). Det kan være at ROS-assayen ville vist at det ble dannet ROS om det ble testet på et tidligere tidspunkt enn 4 timer. Det trengs flere studier som viser når ROS-produksjonen er høyest og om den reduseres av CI. I tillegg kan det også være interessant med celledødsstudier med kombinasjon av PAC-1 og ROS-fanger +/- CI.

4.3 Konklusjoner:

1. PAC-1 gir caspaseuavhengig celledød i PC12 celler og kyllingkornceller. DA gir også død, men i mindre grad. Caspaser blir aktivert som følge av PAC-1 eksponering, men denne aktiveringen er ikke ansvarlig for celledøden. Hypotesen om caspase-3-avhengig celledød gjelder ikke for disse celletypene.
2. Ortho-hydroksy N-acyl hydrazonstrukturen er nødvendig for effekt på celledød i PC12 celler og kyllingkornceller. Denne strukturen gir også caspaseaktivering. Dette samsvarer med den publiserte litteraturen og samsvarer med sinkchelateringsegenskapene. Dette forsterker hypotesen om at OH-gruppen er viktig.
3. Caspaseaktivering er mye bedre ved eksponering med STS sammenlignet med eksponering med PAC-1 i PC12 celler. Dette betyr at PAC-1 enten er en dårlig caspase-3-aktivator eller at mitokondrieindusert signalvei gir mer effektiv aktivering av caspase-3. Hypotesen om at PAC-1- og mitokondrieindusert caspase-3-aktivering er like effektiv forkastes.
4. STS i kombinasjon med PAC-1 virker synergistisk celledød i PC12. Dette er ikke forenelig med at både STS og PAC-1 skulle virket optimalt på caspase-3 og dermed ikke gi synergi, men det tyder på at de virker på ulike mediatorer.
5. Det er en svak økning i differansen mellom celledød i PC12 celler med og uten PAC-1 ved sur pH sammenlignet med nøytral pH. Økningen er ikke like stor som når STS og PAC-1 gis i kombinasjon. Dette er ikke forenelig med at det er STS-indusert surgjøring som er ansvarlig for synergien.
6. ROS-fangere beskytter PC12 celler mot PAC-1-indusert celledød. Det er ikke forenelig med en direkte caspase-3-indusert apoptose.

Metoden for å påvise hvorvidt caspase-7 er involvert i PAC-1-indusert celledød krever mer utprøving (se avsnitt 4.1.3).

Kildeliste

Adamo, A., M. Zago, et al. (2010). "The Role of Zinc in the Modulation of Neuronal Proliferation and Apoptosis." Neurotoxicity Research **17**(1): 1-14.

Allan, L., N. Morrice, et al. (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." Nature cell biology **5**(7): 647-654.

Aras, M. A., K. A. Hartnett, et al. (2008). "Assessment of cell viability in primary neuronal cultures." Curr Protoc Neurosci **Chapter 7**: Unit 7 18.

Aziz, G., Ø. W. Akselsen, et al. (2010). Procaspase-activating compound 1 induces a caspase-3-dependent cell death in cerebellar granule neurons. Ikke publisert ennå.

Broadley, M., P. White, et al. (2007). "Zinc in plants." New Phytologist **173**(4): 677-702.

Cande, C., F. Cecconi, et al. (2002). "Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?" Journal of cell science **115**(24): 4727.

Chan, S. and M. Mattson (1999). "Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death." Journal of neuroscience research **58**(1): 167-190.

Charkoudian, L., D. Pham, et al. (2006). "A pro-chelator triggered by hydrogen peroxide inhibits iron-promoted hydroxyl radical formation." Journal of the American Chemical Society **128**(38): 12424.

Chimienti, F., M. Seve, et al. (2001). "Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors 1." Biochemical pharmacology **62**(1): 51-62.

Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." The cerebellum **1**(1): 41-55.

Cuzzocrea, S., T. Misko, et al. (2000). "Beneficial effects of peroxynitrite decomposition catalyst in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion." The FASEB Journal **14**(9): 1061.

Daugas, E., D. Nochy, et al. (2000). "Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis." FEBS letters **476**(3): 118-123.

Fadeel, B. and S. Orrenius "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease." Apoptosis **479**: 517.

Fiala, P. and Z. Kinkor (2004). "Increased expression of Apaf-1 and procaspase-3 and the functionality of intrinsic apoptosis apparatus in non-small cell lung carcinoma." Biol. Chem **385**: 153-168.

Friedlander, R. (2003). "Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases." The New England journal of medicine **348**(14): 1365.

Gadkar, K., R. Gunawan, et al. (2005). "Iterative approach to model identification of biological networks." BMC bioinformatics **6**(1): 155.

Gottlieb, R., J. Nordberg, et al. (1996). "Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(2): 654.

Greene, L. and A. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**(7): 2424.

Griffiths, J. (1991). "Are cancer cells acidic?" British journal of cancer **64**(3): 425.

Han, F. X. and Singer, A (2007). "Environmental pollution 13" Biogeochemistry of trace elements in arid environments 366 pages; 80.

Higgins, G., P. Beart, et al. (2009). "Oxidative stress triggers neuronal caspase-independent death: endonuclease G involvement in programmed cell death-type III." Cellular and Molecular Life Sciences **66**(16): 2773-2787.

Jacobs, C. M., P. Aden, et al. (2006). "Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture." J Neurosci Methods **156**(1-2): 129-135.

Johnson, D. and C. Walker (1999). "Cyclins and cell cycle checkpoints." Annual review of pharmacology and toxicology **39**(1): 295-312.

Kerr, J., A. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." British journal of cancer **26**(4): 239.

Kovacic, P. (2008). "Does Structural Commonality of Metal Complex Formation by PAC-1 (anticancer), DHBNH (anti-HIV), AHL (autoinducer), and UCS1025A (anticancer) Denote Mechanistic Similarity? Signal Transduction and Medical Aspects." Journal of Receptors and Signal Transduction **28**(3): 141-152.

Kroemer, G., B. Dallaporta, et al. (1998). "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis." Annual review of physiology **60**(1): 619-642.

Kruman, I., Q. Guo, et al. (1998). "Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells." Journal of neuroscience research **51**(3): 293-308.

Larner, S., D. McKinsey, et al. (2005). "Caspase 7: increased expression and activation after traumatic brain injury in rats." Journal of neurochemistry **94**(1): 97-108.

Lindland-Tjønn, H. (2009). "Vekstfaktorers interaksjoner med caspaser i PC12-cellelinjen og kornceller fra rotte."

Marchetti, A., B. Cecchinelli, et al. (2004). "p53 can inhibit cell proliferation through caspase-mediated cleavage of ERK2/MAPK." Cell Death & Differentiation **11**(6): 596-607.

Martin, M., L. Allan, et al. (2008). "The docking interaction of caspase-9 with ERK2 provides a mechanism for the selective inhibitory phosphorylation of caspase-9 at threonine 125." Journal of Biological Chemistry **283**(7): 3854.

McCabe Jr, M., S. Jiang, et al. (1993). "Chelation of intracellular zinc triggers apoptosis in mature thymocytes." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology **69**(1): 101.

Peterson, Q., D. Goode, et al. (2009). "PAC-1 activates procaspase-3 in vitro through relief of zinc-mediated inhibition." Journal of Molecular Biology.

Peterson, Q., D. Hsu, et al. (2009). "Procaspase-3 Activation as an Anti-Cancer Strategy: Structure- Activity Relationship of Procaspase-Activating Compound 1 (PAC-1) and Its Cellular Co-Localization with Caspase-3." Journal of Medicinal Chemistry **52**(18): 5721-5731.

Peterson, Q., D. Hsu, et al. (2009). "PAC-1: A novel therapeutic approach to procaspase activation." The FASEB Journal **23**(1_MeetingAbstracts): 533.531.

Polster, B. and G. Fiskum (2004). "Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis." Journal of neurochemistry **90**(6): 1281-1289.

Porcelli, A., A. Ghelli, et al. (2004). "Apoptosis induced by staurosporine in ECV304 cells requires cell shrinkage and upregulation of Cl⁻ conductance." Cell Death & Differentiation **11**(6): 655-662.

Putt, K., G. Chen, et al. (2006). "Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy." Nat Chem Biol **2**(10): 543-550.

Rimul, G. (2007). "Celledød, aktivering av caspase 3, og NGFIB-forflytning i cellelinjene PC12 og CV1 Publisert År: 2007 Dokumenttype: Hovedoppgave Språk: Norsk BokMål."

Roy, S., C. Bayly, et al. (2001). "Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic safety catch regulatory tripeptide." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(11): 6132.

Scott, C., C. Sobotka-Briner, et al. (2003). "Novel small molecule inhibitors of caspase-3 block cellular and biochemical features of apoptosis." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **304**(1): 433.

Shrode, L., H. Tapper, et al. (1997). "Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis." Journal of bioenergetics and biomembranes **29**(4): 393-399.

Simon, H., A. Haj-Yehia, et al. (2000). "Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction." Apoptosis **5**(5): 415-418.

Slagsvold, H., C. Rosseland, et al. (2003). "High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons." Brain research **984**(1-2): 111-121.

Slater, J., A. Mildvan, et al. (1971). "Zinc in DNA polymerases." Biochemical and Biophysical Research Communications **44**(1): 37-43.

Song, Z., X. Chen, et al. (2009). "Isolation and structure elucidation of degradation products in the potential anticancer drug PAC-1." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

Song, Z., X. Yao, et al. (2003). "Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis." Journal of Biological Chemistry **278**(25): 23130.

Stella, N., L. Pellerin, et al. (1995). "Modulation of the glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse cortical neurons: involvement of a pH-sensitive membrane phospholipase A2." Journal of Neuroscience **15**(5): 3307.

Thomas, D., M. Ritz, et al. (1998). "Intracellular acidification mediates the proliferative response of PC12 cells induced by potassium ferricyanide and involves MAP kinase activation." International Journal of Cancer **68**(4): 547-552.

Valencia, A. and J. Morán (2004). "Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons." Free Radical Biology and Medicine **36**(9): 1112-1125.

Vandenabeele, P. and V. Berghe (2006). "Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways." Science's STKE **2006**(358).

Waibel, M., S. Kramer, et al. (2007). "Mitochondria are not required for death receptor-mediated cytosolic acidification during apoptosis." Apoptosis **12**(3): 623-630.

Widmann, C., S. Gibson, et al. (1998). "Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis." Journal of Biological Chemistry **273**(12): 7141.

Wolan, D., J. Zorn, et al. (2009). "Small-Molecule Activators of a Proenzyme." Science **326**(5954): 853.

Wong, S., Y. Zhao, et al. (2007). "Zinc deficiency depresses p21 gene expression: inhibition of cell cycle progression is independent of the decrease in p21 protein level in HepG2 cells." American Journal of Physiology- Cell Physiology **292**(6): C2175.

Yu, S., S. Andrabi, et al. (2006). "Apoptosis-inducing factor mediates poly (ADP-ribose)(PAR) polymer-induced cell death." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(48): 18314.

Zanke, B., C. Lee, et al. (1998). "Death of Tumor Cells after Intracellular Acidification Is Dependent on Stress-activated Protein Kinases (SAPK/JNK) Pathway Activation and Cannot Be Inhibited by Bcl-2 Expression or Interleukin 1 {beta}-converting Enzyme Inhibition." Cancer Research **58**(13): 2801.

Zhang, X., S. Alber, et al. (2006). "Proteolysis consistent with activation of caspase-7 after severe traumatic brain injury in humans." Journal of neurotrauma **23**(11): 1583-1590.

Zou, H., R. Yang, et al. (2003). "Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP." Journal of Biological Chemistry **278**(10): 8091.