

Mekanismer for glutamat- og deksametasonindusert celledød

Julie Wendelbo Aanensen



Farmasøytisk institutt avdeling for farmasøytisk biovitenskap

UNIVERSITETET I OSLO

Forord

Denne masteroppgaven har blitt gjennomført på avdeling for farmasøytisk biovitenskap fra januar til september 2010.

Jeg vil starte med å takke min engasjerte og kunnskapsrike veileder Ragnhild Paulsen for all hjelp og støtte gjennom arbeidet med denne oppgaven. Dette hadde aldri gått uten deg! Deretter går en stor takk til Bjørn Oddvar Strøm for hjelp og sosialt samvær på laben, for at du svarer på alle slags spørsmål, for at du alltid tar telefonen, og for at du har vært min IT-konsulent. Jeg vil også spesielt takke Gro Mathisen og Petra Aden for hjelp og nyttige tips i skriveinnspurten. Ellers må de andre på nevrogruppa takkes for å ha bidratt til at dette har vært en kjempespennende periode!

Når man kommer sliten hjem fra laben er det alltid godt å bli tatt imot av min mann Ketil og min sønn Sindre. Ketil, takk for at du alltid stiller opp og støtter meg. Sindre, takk for at du er så tålmodig med mammaen din, ikke bare gjennom arbeidet med denne oppgaven, men gjennom hele farmasistudiet. Dere er begge fantastiske! Mamma og Dag må også takkes, både for å ha vært noen glimrende barnevakter, og for å ha hjulpet meg med utformingen av masteroppgaven, den hadde aldri blitt så fin uten deres hjelp!

Oslo, september 2010

Julie Wendelbo Aanensen

Sammendrag

Oppfølgingsstudier av premature barn har vist at disse får koordinasjonsforstyrrelser, svimmelhet og nedsatt kognitiv funksjon som følge av deksametasonbehandling. De påviste symptomene er forenelig med celledød i lillehjernen. Det har blitt rapportert at deksametason øker Ca^{2+} -innstrømming gjennom NMDA-reseptoren og at deksametasonindusert toksisitet kan blokkeres av NMDA-reseptorantagonister. Derfor kan en interaksjon mellom NMDA-reseptoren og glukokortikoidreseptoren stå bak mekanismen for denne celledøden.

Kornceller fra lillehjernen gjennomgår en modningsprosess sent i fosterlivet og tidlig postnatalt. Forskjellige trinn i denne modningsprosessen er assosiert med ulike uttrykk av NMDA-reseptorsubenheter. NMDA-reseptorens subenhets sammensetning kan, sammen med et høyt uttrykk av glukokortikoidreseptoren, være årsaken til korncellers sårbarhet for deksametason.

I denne studien har PC12- og CV-1 celler blitt benyttet i et luciferaseassay for å undersøke om det kan foreligge en protein-protein-interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A. Kornceller fra kyllinglillehjerne ble høstet til Western blotting for å studere om ulike utviklingsfaser i kultur kan knyttes opp mot spesifikke uttrykk av NMDA-reseptorsubenheter. Videre ble det studert om deksametason- og glutamatindusert celledød henger sammen dette subenhetuttrykket. Det har også blitt undersøkt om ARA-C, som er en cellegift det er vanlig å bruke i nevronkulturmediet, kan påvirke korncellens utvikling i kultur.

I CV-1 celler ble det påvist en funksjonell interaksjon mellom GR og NR3A etter tilsats av deksametason, men denne interaksjonen lot seg ikke påvise i PC12-celler, og forsøksoppsettet med disse cellene krever mer optimalisering. Kyllingkorncellers morfologi forandret seg når de utviklet seg i kultur, og ARA-C-behandling var toksisk for umodne kyllingkornceller og påvirket cellens utvikling *in vitro* ved å redusere celledeling og øke differensiering. Det kan være en sammenheng mellom uttrykket av NMDA-reseptorsubenheter på ulike utviklingstrinn og glutamat- og deksametasonindusert død. Denne sammenhengen kan være en av årsakene til at umodne kornceller fra lillehjernen til premature barn er sårbare for deksametasonbehandling.

Forkortelser

AMPA	α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate
ANOVA	Analysis of Variance
ARA-C	Cytosine β -D-arabino-furanoside
APS	Ammonium persulfat
ATP	Adenosin 5-trifosfat
BBS	BES-bufret saltvann
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BES	N,N-Bis-(2-hydroksyetyl)-2-aminoetansulfonsyre
BID	Bcl-2 interagerende domene
BME	Basal medium eagle
BrdU	Bromdeoksyuridin
BSA	Bovint serumalbumin
CMV	Cytomegalovirus
CNS	Sentralnervesystemet
Cyt c	Cytokrom c
DBD	DNA-bindende domene
Dex	Deksametason
DIV	Dager <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DNase1	Deoksyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ER	Endoplasmatisk retikulum
EtOH	Etanol
FBS	Føtalt kalveserum
GABA	Gamma-aminosmørsyre
GC	Glukokortikoider
Gfp	Grønt fluorescerende protein
GR	Glukokortikoidreseptoren
GRE	Glukokortikoid responselement

GRtr	Trunkert glukokortikoidreseptor
HRP	Horseradish peroksidase
11 β HSD	11- β -hydoksystem steroid
Hsp90	90 kDa heat shock protein
LDB	Ligandbindene domene
LUC	Ildfluoluciferase
MAP	Mikrotubuliassosierte proteiner
MAPK	Mitogenaktiverede proteinkinaser
MES	(2-((N-morpholino)-etansulfonsyre))
mGR	Membranassosiert glukokortikoidreseptor
MQ	Milli Q
mRNA	Messenger-ribonukleinsyre
NMDA	N-methyl-D-aspartat
nNOS	Nevronal nitrogenoksid syntase
NO	Nitrogenoksid
NR	NMDA-reseptorsubenheter
PBS	Fosfatbufret saltvann
RL	Renillaluciferase
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
S & G	Stop and glow
SDS	Sodium didocyl sulphate
SE	Standardfeil
TBS	Trisbufret saltvann
TEMED	N,N,N,N-tetramethyletylenediamin
TG	Tris-glysinbuffer
TGS	Tris glysin-SDS-buffer
TK	Tymidinkinase
Tris	Trishydroksymetylaminometan
Yfp	Yellow fluorescens protein

Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING	11
1.1 LILLEHJERNEN	11
1.1.1 Lillehjernebarken	12
1.1.2 Kornceller	12
1.1.3 Kornceller fra kylling som modell for nevrobiologiske studier.....	12
1.2 APOPTOSE OG NEKROSE	14
1.3 GLUTAMATRESEPTORER.....	16
1.3.1 NMDA-reseptoren.....	17
1.3.2 NMDA-reseptoren påvirker lillehjernens utvikling.....	18
1.4 EKSOSITOTOKSISITET	21
1.5 STEROIDER	22
1.5.1 Glukokortikoidreseptoren og dens effekter	23
1.5.2 Deksametason	26
1.5.3 Glukokortikoidinduserte effekter i sentralnervesystemet under utvikling	27
1.6 INTERAKSJON MELLOM GR OG NMDA-RESEPTOREN?.....	28
1.7 MÅL MED STUDIEN	30
2. MATERIALER OG METODE.....	31
2.1 OVERSIKT OVER KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER	31
2.2 KORNCELLEKULTURER	33
2.2.1. Coating av korncellekulturskåler med poly-L-lysin	33
Prosedyre for coating med poly-L-lysin.....	33
2.2.2. Preparering av korncellekulturer.....	34
Prosedyre for preparering av korncellekulturer	35

2.2.3 Tilsats av ARA-C og ernæringsmedium	38
<i>Prosedyre for tilsats av ARA-C til korncellekultur.....</i>	<i>38</i>
2.3 SPLITTING OG TRANSFEKSJON AV CV-1- OG PC12-CELLER.....	39
2.3.1 CV-1 celler.....	39
2.3.2 Splitting av CV-1 celler til flasker.....	39
2.3.3 Splitting av CV-1 celler til skåler.....	40
2.3.4 Transfeksjon av CV-1-celler med kalsiumfosfat.....	41
<i>Prosedyre for transfeksjon av CV-1 celler med kalsiumfosfat</i>	<i>41</i>
2.3.5 PC12-celler.....	43
2.3.6 Splitting av PC12-celler til flasker.....	44
2.3.7 Splitting av PC12-celler til skåler.....	44
2.3.8 Transfeksjon av PC12-celler med Metafectene PRO®	45
<i>Prosedyre for transfeksjon av PC12 med Metafectene PRO®.....</i>	<i>45</i>
2.4 LUCIFERASE	46
2.4.1 Ildflueluciferase	46
<i>Prosedyre for høsting av celler til luciferasemåling</i>	<i>46</i>
2.4.2 Renillaluciferase	48
<i>Prosedyre for måling av renillaluciferase.....</i>	<i>49</i>
2.5 MIKROSKOPERING.....	49
2.5.1 Gfp og Yfp	49
2.5.2 Farging av kjernen og endoplasmatisk retikulum	50
<i>Prosedyre for kjernefarging med Hoechst og farging med ER-Tracker</i>	<i>50</i>
2.6 WESTERN BLOTTING	51
2.6.1 Høsting av celler til Westernblotting.....	51

2.6.2	<i>Proteinmåling</i>	52
2.6.3	<i>Gelstøping</i>	53
2.6.4	<i>Gelelektroforese</i>	55
2.6.5	<i>Blotting av gelen</i>	56
2.6.6	<i>Farging og blokkering av membranen</i>	58
2.6.7	<i>Tilsats av primær- og sekundærtstoff</i>	58
2.6.8	<i>Fremkalling</i>	60
2.6.9	<i>Stripping av membranen</i>	60
2.7	EKSPONERING AV KYLLINGKORNCCELLER	61
2.7.1	<i>Deksametason og etanol</i>	61
	<i>Prosedyre for eksponering med deksametason og etanol</i>	61
2.7.2	<i>Glutamat i Lockes løsning</i>	61
	<i>Prosedyre for eksponering med Lockes løsning</i>	61
2.7.3	<i>NMDA-reseptorantagonistene MK-801 og CGP 39551</i>	62
	<i>Prosedyre for preinkubering med antagonist</i>	63
2.8	FARGING AV DØDE CELLER MED TRYPANBLÅ	63
	<i>Prosedyre for farging med trypanblå og deteksjon av celledød</i>	64
2.9	GRAFER OG STATISTIKK	65
3	RESULTATER	66
3.1	INTRACELLULÆR FORDELING AV NMDA-RESEPTORSUBENHETER OG GR I PC12-CELLER	66
3.1.1	<i>Lokalisering av overuttrykte gfp/yfp-merkede NMDA-reseptorsubenheter</i>	66
3.1.2	<i>Lokalisering av GR-gfp og interaksjon med NR3A</i>	68
3.2	REPORTERGENET GRE-LUC I PC12- OG CV-1-CELLER	69
3.2.1	<i>Interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og endogen GR i PC12-celler</i>	70

3.2.2	<i>Interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og overuttrykt GR i PC12-celler.</i>	72
3.2.3	<i>Transfeksjon av PC12-celler med GRtr og NMDA-reseptorsubenheten NR3A og NR1-1a</i>	73
3.2.4	<i>Transfeksjon av CV-1-celler med GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A.....</i>	74
3.2.5	<i>Transfeksjon av CV-1-celler med GRtr og og NMDA-reseptorsubenheten NR3A og NR1-1a</i>	76
3.3	KYLLINGKORNCHELLERS MORFOLOGISKE UTVIKLING I KULTUR	77
3.4	UTVIKLING AV DEKSAMETASONINDUSERT CELLEDØD I KORNCELLEKULTURER FRA KYLLING ...	79
3.4.1	<i>NMDA-reseptorantagonisters påvirkning på celledød i deksametasoneksponerte kyllingkornceller</i>	<i>81</i>
3.5	UTVIKLING AV GLUTAMATINDUSERT CELLEDØD I KORNCELLEKULTURER FRA KYLLING	83
3.5.1	<i>NMDA-reseptorantagonisters påvirkning på celledød i glutamateksponerte kyllingkornceller</i>	<i>85</i>
3.6	ARA-C-TOKSISITET I KYLLINGKORNCELLEKULTURER.....	87
3.7	WESTERN BLOTTING	88
3.7.1	<i>Deling og differensiering av kyllingkornceller i kultur og påvirkning fra ARA-C.....</i>	<i>89</i>
3.7.2	<i>Uttrykk av GR og NMDA-reseptorsubenheter i kyllingkornceller</i>	<i>94</i>
	<i>Proteinbånd for NR2A i kyllingkornceller</i>	<i>94</i>
	<i>Proteinbånd for NR2B i kyllingkornceller</i>	<i>96</i>
	<i>Proteinbånd for NR1-1a i kyllingkornceller</i>	<i>97</i>
	<i>Proteinbånd for NR3A i kyllingkornceller</i>	<i>98</i>
4	DISKUSJON	99
4.1	DISKUSJON AV METODER	99
4.1.1	<i>Valg av cellemodeller.....</i>	<i>99</i>
4.1.2	<i>Bruk av reporter-genet GRE-luc som metode for å studere protein-protein-interaksjoner</i>	<i>100</i>
4.1.3	<i>Valg av metode for å måle celledød</i>	<i>102</i>
4.1.4	<i>Western blotting</i>	<i>104</i>
4.2	DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN	105

4.2.1 Lokalisering av gfp-merkede NMDA-reseptorsubenheter i PC12-celler	105
4.2.2 Lokalisering av GR-gfp med og uten NR3A i PC12-celler.....	106
4.2.3 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A	107
4.2.4 Morfologisk utvikling hos kyllingkorncellekulturer	110
4.2.5 Deksametasonindusert celledød hos kyllingkornceller i kultur	110
4.2.6 Glutamatindusert celledød hos kyllingkornceller i kultur	112
4.2.7 ARA-C påvirker kyllingkornceller i kultur	114
4.2.8 Uttrykk av NMDA-reseptorsubenheter hos kyllingkornceller	116
NR2A	117
NR2B	117
NR1-1a	118
NR3A	118
5 KONKLUSJON	121
KILDELISTE	122

1. Innledning

Deksametason administreres til prenatale barn for å behandle og forebygge bronkopulmonal dysplasi. I oppfølgingsstudier er det vist at disse barna får koordinasjonsforstyrrelser og nedsatt kognitiv funksjon, noe som er forenelig med tap av nevroner i lillehjernen (kap 1.1 og 1.4). Mekanismen for denne deksametasoninduserte celledøden er ikke fullstendig kartlagt, men flere studier rapporterer at det foreligger en interaksjon mellom glukokortikoidreseptoren og NMDA-reseptoren som gir toksiske intracellulære konsentrasjoner av Ca^{2+} (kap 1.2 og 1.4). Et prenatalt barn har en lillehjerne som inneholder umodne nevroner. NMDA-reseptoren er sammensatt av av fire subenheter, og sammensetningen av subenheter er av betydning for korncellens modningsprosess, hvor korncellens migrasjon fra lillehjernebarkens ytre til indre lag står sentralt (kap 1.3.). Det er vist at ulike subenhets sammensetninger gir reseptoren ulike funksjonelle egenskaper (kap 1.3.). NMDA-reseptorens subenhets sammensetning på tidspunktet for deksametasonadministrasjon, i tillegg til glukokortikoidreseptoruttrykket, kan derfor være av betydning for korncellenes sårbarhet for deksametason (kap 1.5).

1.1 Lillehjernen

Lillehjernens (cerebellums) viktigste funksjoner har blitt kartlagt først og fremst ved å studere hvilke symptomer en lillehjerneskade gir. Skader på lillehjernen fører til reduksjon av evnen til å koordinere bevegelser, og det er først og fremst viljestyrte bevegelser som påvirkes (Brodal 2001). Skade på lillehjernen vil også gi balanseforstyrrelser og svimmelhet (Kandel *et al.* 1991) . Etter tiår med forskning har det også blitt foreslått at lillehjernen spiller en funksjonell rolle når det gjelder affektive og kognitive funksjoner. Stadige forbedrede bildeteknikker har gjort det mulig å undersøke lillehjernen mens det blir utført kognitive oppgaver, mens nevroanatomiske studier har vist at det foreligger forbindelser mellom lillehjernen og assosiative områder av cerebral cortex som deltar i kognitiv regulering (Baillieux *et al.* 2008). Det har blitt vist at lillehjernen er deltar når en person må utføre flere kognitive oppgaver for å kunne klare å nå et bestemt mål, såkalt "multi-tasking", og at pasienter med degenerative cerebellære lesjoner har problemer med å utføre assosiative kognitive oppgaver. Dette kan bety at lillehjernen ikke bare er viktig ved

innlæring av motorikk, men også ved andre læringsprosesser. Det er også blitt vist at lillehjernen spiller en rolle ved verbal hukommelse (Baillieux *et al.* 2008).

1.1.1 Lillehjernebarken

I likhet med resten av hjernen, består lillehjernen av grå og hvit substans. Hvit substans består av aksoner, mens den sterkt foldede grå substansen inneholder cellekropper, og kalles *cortex cerebelli*, lillehjernebarken. Lillehjernebarken behandler all informasjon som kommer inn fra andre deler av sentralnervesystemet (afferente forbindelser), og sender "svar" ut igjen (efferente forbindelser) (Brodal 2001). Lillehjernebarken deles inn i tre distinkte lag (fig 1). Det ytterste laget kalles molekylærlaget, og består hovedsakelig av aksoner og dendritter fra nevroner i de to andre lagene. Det neste laget kalles purkinjecellelaget, og består av cellelegemene til purkinjecellene. Innerst ligger korncellelaget, og her er cellekroppene til korncellene å finne (Brodal 2001).

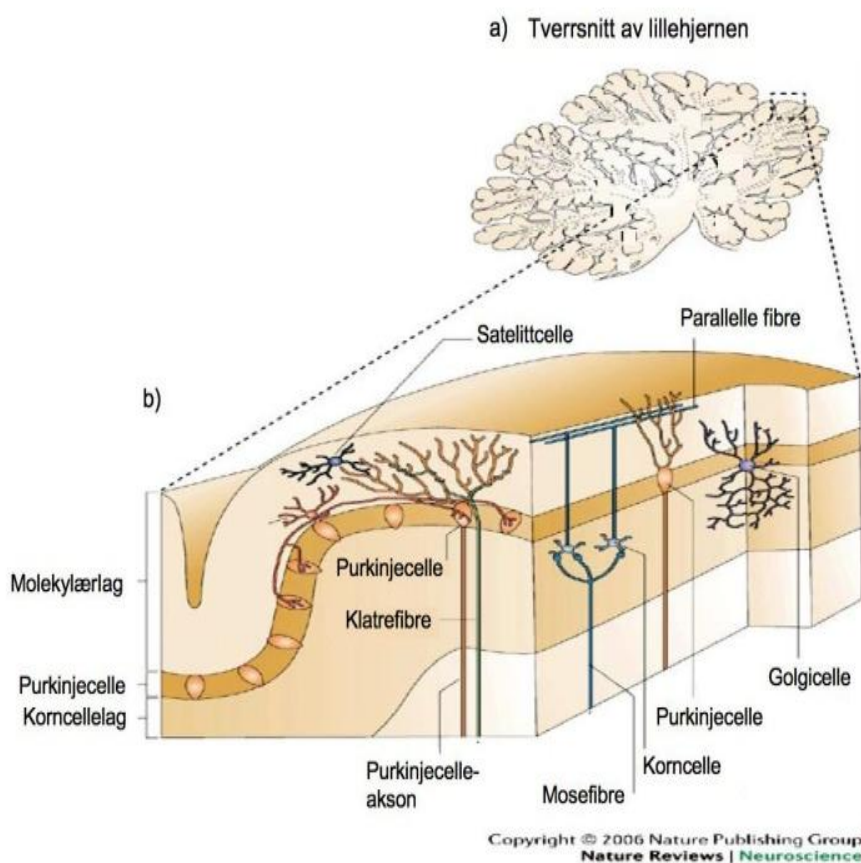
1.1.2 Kornceller

Korncellene sender aksoner opp i det molekylære laget, aksonene deler seg der i to grener, slik at de ligger på tvers av lillehjernebarkens lengderetning, og de danner eksitatoriske, glutaminerge synapser med purkinjecellenes dendritter (Gallo *et al.* 1982). En korncelle kan dermed påvirke svært mange purkinjeceller (Brodal 2001). Kornceller er en av de minste nevrontypene i hjernen, og er også den nevrontypen det er mest av. Tre fjerdedeler av hjernens nevroner er kornceller. Kornceller har bare fire-fem dendritter som er formet som en klo, og mottar eksitatorisk input fra mosfibre, og inhibitorisk input fra golgiceller (Brodal 2001).

1.1.3 Kornceller fra kylling som modell for nevrobiologiske studier

Kornceller er den største og mest homogene nevronpopulasjonen i lillehjernen, men også i hjernen som helhet (Contestabile 2002). Korncellers nevrogenese foregår i all hovedsak postnatalt, og i kultur deler korncellene seg etter utplating. Dette gjør at kornceller er en nevrontype som egner seg godt som *in vitro*-modell. Korncellekulturer har blitt brukt for å studere mekanismer for nevronal utvikling, toksisitet, celledød og funksjon i flere tiår (Contestabile 2002). Mange studier har blitt gjort på kornceller fra rotte, men å bruke kornceller fra kylling har vist seg å ha en

rekke fordeler. Korncellekulturer fra kylling modnes raskt sammenliknet med rotte, de trenger ikke depolariserende betingelser, og utvikler glutamatsensitivitet i kultur (Jacobs *et al.* 2006a). Den er også billig i bruk blant annet fordi det ikke er behov for dyrestallfasiliteter.



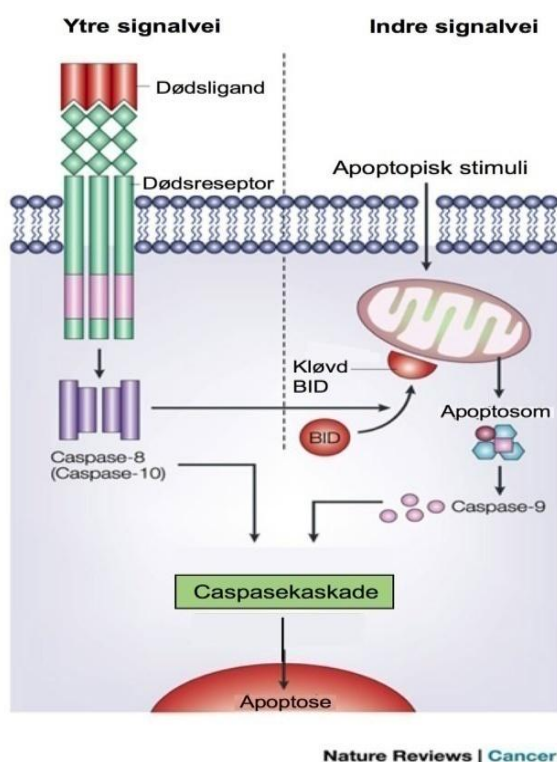
Figur 1: Fremstilling av lillehjernebarken og dens celletyper og plassering i lillehjernen. Figuren viser et tverrsnitt av lillehjernen (a), mens (b) viser lillehjernebarken og dens celletyper, og hvordan disse fordeler seg i lillehjernebarkens distinkte lag. Molekylærlaget inneholder purkinjecellens dendritter og aksoner fra korncellene, purkinjecellelaget inneholder purkinjecellenes cellekropper, mens korncellelaget består av cellekroppene til korncellene. Disse mottar eksitatorisk input fra mosefibre. Figuren er modifisert fra (Ramnani 2006).

1.2 Apoptose og nekrose

Under embryonal og postnatal utvikling blir nerveceller som ikke integreres i nevronale kretser, og som derfor ikke trengs for normal funksjon, eliminert via apoptose (Vaudry *et al.* 2003). Gjennom hele det voksne liv dør celler i sentralnervesystemet, uten at funksjonen til sentralnervesystemet svekkes. Selv om apoptose er en naturlig prosess, er den også involvert ved en rekke neurodegenerative sykdomsprosesser som ved Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, amyotrofisk lateralsklerose (ALS) og Huntingtons sykdom, der det foregår apoptose i helt spesifikke områder av hjernen (Honig og Rosenberg 2000). Apoptose forekommer også etter akutte neurodegenerative tilstander som traumer og iskemisk skade ved hjerneslag (Choi 1996). Flere kreftformer er assosiert med redusert apoptoserate (Gerl og Vaux 2005). Apoptose i sentralnervesystemet kan også utløses av legemidler, og en umoden hjerne under utvikling er spesielt sårbar (Chrysanthy 2009).

Apoptose er en "programmert" prosess, der kromatinet kondenserer, kjernen fragmenterer, og plasmamembranen gjennomgår dramatiske morfologiske forandringer som at den krymper og det dannes utposninger. Til tross for dette vil plasmamembranen beholde sin integritet (Kerr *et al.* 1972). Den apoptotiske cellen skiller ut signalsubstanser som tiltrekker seg nærliggende celler eller fagocytter (He *et al.* 2009). Disse cellene internaliserer raskt den apoptotiske cellen, og dette er et viktig funksjonelt aspekt for å beskytte det omliggende vev mot en autoimmun respons (Savill og Fadok 2000). To signalkaskader trigger apoptose (fig. 2). Den ene kan sies å være en indre signalvei, mens den andre er en ytre signalvei. Den ytre signalkaskaden aktivieres når ligander binder seg til "dødsreseptorer", TNF-reseptorfamilien (Schulze-Osthoff *et al.* 1998). Nedstrøms for disse reseptorene aktiveres pro-caspase-8 som kløyver caspase-8, og caspase-8 aktiverer caspase-3, og dette resulterer i apoptose (Schulze-Osthoff *et al.* 1998; Polster og Fiskum 2004). Den indre signalveien kan utløses av flere stimuli, deriblant DNA-skade, cytokindeprivasjon, vekstfaktordeprivasjon, toksiner, ubalanse i ionehomeøstasen og frie radikaler (Vaudry *et al.* 2003; Jana og Paliwal 2007). Økt permeabilitet i mitokondrienes ytre membran gjør at cytokrom-c frisettes til cytosol. Cytokrom-c vil kunne interagere med Apaf-1 og procaspase 9, proapoptotiske faktorer i

cytoplasma, og aktivere caspase-3 gjennom to trinn slik at apoptosen er et faktum. Andre proteiner. I tillegg til cytokrom c blir procaspase-3 tilgjengelig for aktivering (Polster og Fiskum 2004; Brenner og Mak 2009). Når celler i det utviklende sentralnervesystem elimineres via apoptose, er det hovedsakelig den "indre signalveien" som gjør seg gjeldende (Chang *et al.* 2002), mens begge signalveier tas i bruk for eksempel ved iskemisk hjerneskade (Polster og Fiskum 2004). Bid er et pro-apoptotisk protein som tilhører Bcl-2-familien, og dette proteinet fungerer som et bindeledd mellom den indre og den ytre signalveien -c, frisettes også andre proteiner fra mitokondriene og nøytraliserer apoptoseinhibitorer i cytoplasma, slik fordi det translokerer til mitokondriene og fører til at cytokrom-c frisettes etter ligandbinding til "dødsreseptor" og kløyving av caspase-8 (Luo *et al.* 1998).



Figur 2: Forenklet fremstilling av den ytre og indre signalveien i apoptosesignalering.

Figuren viser at den ytre veien aktiveres av ligandbinding til "dødsreseptor". Gjennom flere trinn vil caspase-8 føre til apoptose. Den indre veien går via mitokondriene. BID binder de to signalveiene sammen. Figuren er modifisert fra (Igney og Kramer 2002).

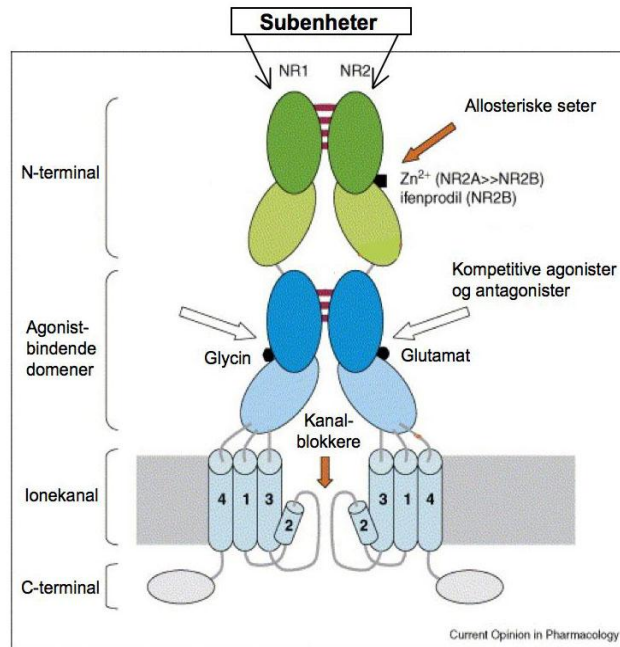
Nekrose kan karakteriseres som en dramatisk og ukontrollert form for celledød der alle cellens organeller går i oppløsning. I motsetning til apoptose er ikke caspasene viktige i den nekrotiske prosessen (Proskuryakov *et al.* 2003). Nekrotiske nerveceller kan observeres etter traume mot hjernen, etter hjerneslag eller etter eksponering for nevrotoksiske stoffer (Proskuryakov *et al.* 2003). Nekrotiske celler har irreversible membranskader og mitokondriell dysfunksjon som gjør at de sveller, og til slutt vil de lysere (Majno og Joris 1995). Lekkasje av cytoplasmisk materiale ut i vevet gjør at en immunrespons trigges, og omliggende celler vil også skades (Schulze-Osthoff *et al.* 1998). Nekrose kan altså resultere i større vevsskader sammenliknet med apoptose. Det finnes likevel flere eksempler på at det ikke er så klare skiller mellom apoptose og nekrose. Både eksitotoksisk glutamatindusert celledød (kap 1.4) og iskemisk celledød er eksempler på celledød som gir en blanding av nekrose og apoptose (Yuan *et al.* 2003). Tidligere ble det antatt at kun caspaseavhengig celledød var "programmert", og det er også denne som er best beskrevet. Det har derimot vist seg at også celledød som er caspaseuavhengig, kan være kontrollert eller programmert (Boujard, Gubkina *et al.* 2007). I dag anses programmert celledød som et kontinuum av prosesser som ender med apoptose eller nekrose avhengig av type dødssignal, styrken på dødssignalet, celletype eller det eksterne miljøet rundt cellene.

1.3 Glutamatreseptorer

Glutamatreseptorer kan deles inn i metabotrope og ionotrope glutamatreseptorer. Metabotrope glutamatreseptorer er reseptorer koblet til G-proteiner, mens ionotrope glutamatreseptorer er ligandopererte ionekanaler. De ionotrope glutamatreseptorene kan videre deles inn i tre grupper som heter N-metyl-D-aspartat (NMDA), alfa-amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolepropionat (AMPA) og kainatreseptorer. De tre reseptorgruppene er oppkalt etter sine selektive farmakologiske agonister (Hollmann og Heinemann 1994). Glutamatreseptorer spiller en sentral rolle i nevrologiske prosesser som læring og hukommelse (Hassel og Dingledine 2006), og under utvikling av sentralnervesystemet, men er også involvert i diverse patologiske prosesser, og etter traume eller iskemi i sentralnervesystemet (Cull-Candy *et al.* 2001).

1.3.1 NMDA-reseptoren

NMDA-reseptoren er en ionekanal og et heterogent kompleks, bestående av fire subenheter, og er å finne i cellemembranen (fig 3). Subenhetene som en NMDA-reseptor kan være satt sammen av kalles NR1, NR2 og NR3. Det eksisterer åtte NR1-subenheter, fire NR2-subenheter (A-D), og to NR3-subenheter (A-B). NR1-subenhetene kodes for av ett gen ved alternativ spleising, mens NR2- og NR3-subenhetene kodes for av seks separate gener (Myers *et al.* 2003). Ulik subenhets sammensetning har mye å si for reseptorens kinetikk, og for at det skal dannes membranbundne funksjonelle NMDA-reseptorer må NR1 danne en heteromer med en av NR2-subenhetene (Paoletti og Neyton 2007). NR3-subenheter kan danne en tetramer med NR1- og NR2-subenheter (Sasaki *et al.* 2002). NMDA-reseptorer vil, uansett subenhets sammensetning, være bygget opp av en stor ekstracellulær N-terminal, en transmembran region, bestående av tre segmenter (TM 1, 3 og 4), en ekstracellulær løkke som danner selve ionekanalens (M2), og en cytoplasmisk C-terminal (fig. 3) som kan ha ulik størrelse avhengig av subenhet og eventuelle interaksjoner med intracellulære proteiner som calmodulin, kinaser og fosfataser (Mayer 2006). NMDA-reseptoren har seks ulike bindingssteder for endogene ligander, som ved binding kan regulere ionekanalens åpningstid- og frekvens. Aktivering av kanalen krever binding av to agonister samtidig, glutamat og glysin. Glysin har sitt bindingssete på NR1-subenheten, mens bindingssetet for glutamat sitter på NR2-subenheten (fig. 3). Både glysin og glutamat må være bundet til sine respektive seter for at ionekanalens skal åpne seg, og de kalles derfor ko-agonister (Cull-Candy *et al.* 2001). Isoformer av NR1-subenheten er pH-sensitive og kan binde H^+ , som vil kunne inhibere reseptoren (Traynelis *et al.* 1995). Reseptorer som består av NR2A- og NR2B-subenheter har høy Ca^{2+} -permeabilitet, og kan blokkeres av Mg^{2+} , men under depolariserende betingelser, vil Mg^{2+} dissosiere fra sitt bindingssete. Zn^{2+} og polyaminer har også egne bindingssteder på NMDA-reseptoren, og kan modulere reseptorens aktivitet (Cull-Candy *et al.* 2001). NMDA-reseptorer som inneholder NR3-subenheter har nedsatt Ca^{2+} -permeabilitet, og blir i redusert grad blokkert av Mg^{2+} (Sasaki *et al.* 2002). NMDA-reseptoren finnes både synaptisk og ekstrasynaptisk, og er distribuert over hele sentralnervesystemet med ulik subenhets sammensetning på ulike steder, som gir funksjonelt forskjellige reseptorer (Cull-Candy *et al.* 2001).



Figur 3: NMDA-reseptorens sammensetning

I denne figuren er kun to NMDA-reseptorsubenheter vist for oversiktilighetens skyld (NR1 og NR2). Egentlig er det slik at NMDA-reseptoren er en tetramer, bestående av to NR1-subenheter og to NR2-subenheter. Figuren viser også reseptorens bindingssteder for glutamat og glysin, og dens modulerende bindingssete for Zn²⁺. Ionekanalen kan blokkeres av endogent Mg²⁺ og antagonisten MK-801. Figuren er modifisert fra (Paoletti og Neyton 2007).

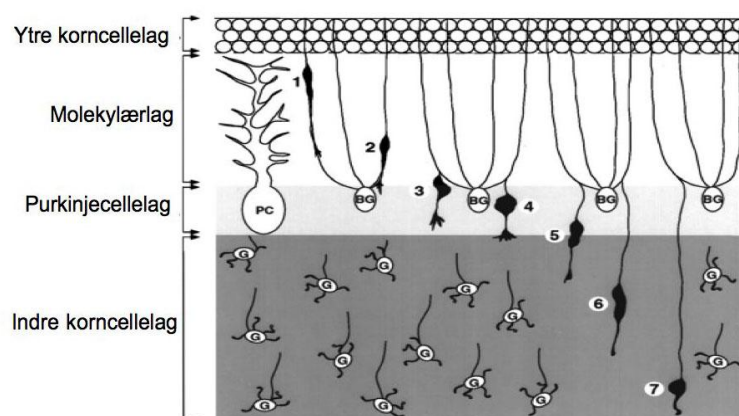
1.3.2 NMDA-reseptoren påvirker lillehjernens utvikling

I lillehjernen trengs NMDA-reseptoren for normal motorisk koordinasjon. Rotter som mangler cerebellære NMDA-reseptorer har dårlig motorisk koordinasjon (Kadotani *et al.* 1996). NR1-1a er uttrykt jevnt utover hele cerebellum underveis i utviklingen, mens mengden NR2-subenheter har variable uttrykk på ulike tidspunkter under utviklingen. I kornceller fra rotte er NR2B-uttrykket høyt sent i den embryonale fasen, og avtar gradvis i den andre postnatale uke. NR2A-uttrykket derimot, øker rett etter fødselen, samtidig som NR2B-uttrykket reduseres (Watanabe *et al.* 1994). NR2C er først og fremst å finne hos voksne, modne kornceller (Akazawa *et al.* 1994). Hvilken funksjonell rolle spiller så ulike NMDA-subenhets sammensetning for utviklingen av cerebellære kornceller?

Under utviklingen av sentralnervesystemet, vil de fleste nevroner migrere fra sitt opprinnelsessted til sin endelige destinasjon. Denne migreringen er viktig for normal

organisering og modning av nevronene (Komuro og Yacubova 2003). Dette gjelder også for korncellene i lillehjernen, som er en mye brukt celletype for å studere nevronal migrasjon. Tidlig postnatalt gjennomgår kornceller sin siste mitose i det ytre laget av lillehjernebark (fig. 4). Etter dette vil de starte å migrere fra dette laget, gjennom det molekylære laget, purkinjecellelaget, og ende opp i det indre laget der de blir værende som modne kornceller (Komuro og Yacubova 2003). Denne migreringen tar i gjennomsnitt 26 timer hos mus (Komuro og Rakic 1998). I de ulike fasene av migrasjonsprosessen gjennomgår korncellene en morfologisk forandring, fra å være avlange til å ende som globulære celler (Komuro og Rakic 1998). Svært mange faktorer er viktige for migrasjonen, og en rekke signalstoffer og gener har blitt foreslått. Uttrykk av NMDA-reseptorer med spesifikk subenhets sammensetning er en av faktorene som har vist seg å ha betydning. Migrerende kornceller uttrykker NR1, NR2A og NR2B-subenheter sammen, mens kornceller i det indre laget uttrykker NR1 sammen med NR2C-subenheten. Når migrerende kornceller fra rotte har blitt behandlet med NR2B-antagonisten Ifenprodil, migrerer de mye saktere enn normalt, noe som tyder på at NR2B-subenheten er viktig for selve migrasjonsprosessen (Mancini og Atchison 2007). Ca^{2+} er viktig for migrasjonsprosessen. Det har blitt vist at en økning i intracellulær Ca^{2+} fremmer migrasjonsbevegelse, mens fravær av intracellulær Ca^{2+} stopper og kan også reversere migrasjonsbevegelsen (Komuro og Yacubova 2003). Det er imidlertid ikke slik at en kontinuerlig høy intracellulær Ca^{2+} -konsentrasjon gjør at korncellene er i stadig bevegelse, det er snarere ossillasjoner av Ca^{2+} som fører til bevegelse (Kumada og Komuro 2004). En sannsynlig kilde til slike Ca^{2+} -ossillasjoner, er NMDA-reseptorer som inneholder NR2B-subenheten i tillegg til spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler (Mancini og Atchison 2007). I en studie ble cerebellære kornceller fra NR2A-knockout-mus sammenliknet med villtype mus, og den viste at NR2A-subenheten sannsynligvis er viktig for utviklingen av funksjonelle eksitatoriske synapser, og at uttrykket av slike synapser øker med utviklingen (Fu *et al.* 2005). Knockout-musene hadde forsinket kinetikk med hensyn til eksitatoriske postsynaptiske ionestrømmer (EPSC) sammenliket med villtypemusene (Fu *et al.* 2005). EPSC blir raskere når nevronene utvikler seg, og spiller en viktig rolle for at korncellene skal kunne prosessere og integrere sensorisk informasjon som kommer fra mosfibre. Signaler sendes så parallelt fra kornceller til inhibitoriske internevroner og til purkinjeceller. Forstyrrelser i denne prosessen kan resultere i abnormal motorikk.

NMDA-reseptorsubenheten NR3A spiller en funksjonell rolle under nevronal utvikling. Reseptorer som inneholder NR3A har redusert Ca^{2+} -permeabilitet. En studie, gjort på tidlig postnatale mus som manglet NR3A, hadde økt tetthet av dendrittiske "spines" i cerebral korteks. Dette viser at NR3A spiller en sentral rolle i reguleringen av synaptiske elementer ved å påvirke ionestrømmer gjennom NMDA-reseptoren (Das *et al.* 1998). I embryonal rottehjerne er uttrykket av NR3A lavt, mens det øker fra postnatal dag 0 til dag 8, hvor uttrykket når en topp, mens det gradvis reduseres igjen til postnatal dag 20. Voksen rottehjerne uttrykker i liten grad NR3A (Wong *et al.* 2002). Celler i molekylærlaget og purkinjecellelaget uttrykker NR3A, men uttrykket er størst i korncellelaget i lillehjernebarken (Wong *et al.* 2002). Roberts *et al.*, har vist at nedregulering av NMDA-reseptorer som inneholder NR3A-subenheten er nødvendig for synaptisk modning og organisering



Figur 4: Fremstilling av korncellers migrasjon gjennom lillehjernebarkens tre lag. Figuren viser inndeling av lillehjernebarkens tre lag. Øverst sees det ytre laget, deretter følger molekylærlaget, purkinjecellelaget, og nederst det indre laget. Figuren viser også korncellens migrasjonsmønster gjennom lagene, og hvordan cellens morfologi forandrer seg i denne migrasjonsprosessen. Figuren er modifisert fra (Komuro og Rakic 1998).

1.4 Eksositoloksisitet

Eksositoloksisitet er knyttet til en rekke nevrologiske sykdommer (Waxman og Lynch 2005). Prosessen har blitt studert siden 1970-tallet, og er nå godt dokumentert, både *in vitro* og *in vivo*. Eksositoloksisitet er en prosess der eksitatoriske neurotransmittere, hvor glutamat er den kvantitativt viktigste, overstimulerer NMDA-reseptoren på en måte som fører til cellulær dysfunksjon, celledød og i siste instans nevronal celledød. Det er først og fremst overstimulering av ekstrasynaptiske NMDA-reseptorer som inneholder subenheten NR2B som har vist seg å kunne føre til eksositoloksisitet forårsaket av høye cytosoliske Ca^{2+} -nivåer i unge nevroner, mens i eldre nevroner bidrar også NR2A (Hardingham *et al.* 2002; Liu *et al.* 2007; Stanika *et al.* 2009).

Transportører i astrocytter og i eksitatoriske synapser sørger hele tiden for å frakte glutamat og aspartat fra det ekstracellulære rom, normalt er det derfor lav konsentrasjon av ekstracellulær glutamat i sentralnervesystemet (Tanaka 1993). Disse transportproteinene benytter seg av energi fra en natriumgradient over cellemembranen. En astrocytt kan få problemer med å opprettholde denne gradienten ved redusert ATP-produksjon som vil over tid påvirke Na^+/K^+ -ATPasens aktivitet, og gi økte intracellulære Na^+ -konsentrasjoner som depolariserer nevronet og som øker sekresjonen av glutamat, i tillegg til at transportkapasiteten for glutamat reduseres (Szatkowski *et al.* 1990; Epstein *et al.* 1994). Redusert ATP-produksjon kan være forårsaket av lav tilgang på glukose og oksygen.

Det er altså slik at økte ekstracellulære nivåer av glutamat vil kunne lede til en overaktivering av NMDA-reseptoren. Dette vil igjen øke intracellulære konsentrasjoner av Ca^{2+} . Ca^{2+} aktiverer en rekke enzymer i cellen, som fosfolipaser, proteaser, kinaser og fosfataser. Overeksponering av Ca^{2+} vil kunne føre til endret proteinsyntese, økt fosforylering, økt proteolyse og lipolyse, samt DNA-fragmentering som følge av påvirkningen fra disse enzymsystemene (Kristian og Siesjo 1998; Lipton 1999). Økte intracellulære Ca^{2+} -nivåer vil også kunne gi økt mitokondrielt Ca^{2+} -opptak som kan resultere i Ca^{2+} -akkumulering slik at mitokondriemembranen depolariseres, samt føre til strukturelle forandringer i mitokondriene (Abramov og Duchon 2008; Stanika *et al.* 2009). Som resultat kan ATP-produksjonen og elektrontransportkjedens aktivitet forstyrres. Depolarisering av

mitokondriemembranen kan reverseres ved å tilføre substrater for elektrontransportkjeden i tidlig fase etter glutamateksponering (Abramov og Duchon 2008). Redusert ATP-produksjonen kan, som nevnt, gi nedsatt transportkapasitet for glutamat, mens forstyrrelser i elektrontransportkjeden kan gi økt produksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS). NMDA-eksponering har gitt celledød i hippocampale nevroner fra rotte, og denne celledøden er assosiert med økt produksjon av superoksidradikal (O_2^-). Celledøden ble hemmet av caspase-1-inhibitor (Sengpiel *et al.* 1998), noe som tilsier at NMDA kan aktivere programmert celledød. Mitokondriene er kilden til NMDA-indusert superoksidproduksjon fordi en studie (Sengpiel *et al.* 1998) viste at hemmere av elektrontransportkjeden reduserer superoksidproduksjonen og NMDA-indusert nevrotoksisitet. Men mitokondrienes superoksidproduksjon alene var ikke nok til å indusere celledød, noe som tilsier at NMDA også aktiverer andre systemer som kan indusere celledød (Sengpiel *et al.* 1998). Kornceller fra lillehjernen dør også som følge av ROS-produksjon etter glutamateksponering (Ciani *et al.* 1996).

Nevronal nitrogenoksydasyntase (nNOS) aktiveres av Ca^{2+} , og resulterer i økt produksjon av nitrogenoksid (NO). NO kan reagere med O_2^- som kan genereres fra mitokondriene ved at respirasjonskjeden hemmes, og danne peroksinitritt ($ONOO^-$) som er meget toksisk, blant annet fordi det kan ødelegge proteinstrukturer, og skade DNA (Moncada og Bolaños 2006). Calpain er en cysteinprotease, og er involvert i celledød. (Wang 2000). Calpain kan aktiveres av Ca^{2+} . Substrater for calpain er blant andre cytoskjelettet, calmodulinavhengige proteiner, vekstfaktorer og vekstfaktorreseptorer. En overaktivering av dette enzymet kan derfor resultere i at proteiner som er helt nødvendig for en celledødsproliferasjon og overlevelse brytes ned, og cellen dør som følge av dette (Wang 2000).

1.5 Steroider

Steroider er hormoner som produseres fra kolesterol gjennom flere reaksjoner i en rekke forskjellige vev. De kan deles inn i flere klasser: Glukokortikoider, mineralkortikoider, androgener, østrogener og progesteroner. Glukokortikoider regulerer et bredt spekter av fysiologiske funksjoner, deriblant vekst, reproduksjon, metabolisme og immunreaksjoner (Kawata 1995). Steroider kan også syntetiseres

de novo i hjernen. Disse steroidene omtales som nevrosteroider og de utøver både genomiske og ikke-genomiske effekter på transmittersystemer i sentralnervesystemet (Monnet *et al.* 2006). Nevrosteroider spiller en viktig rolle under utviklingen av lillehjernen. Hos rotte skjer *de novo*-syntese av østrogen tidlig i utviklingen av lillehjernen, og nivået er høyt i den første leveuken. Østrogen øker tettheten av dendritter i lillehjernen. Progesteron produseres av Purkinjecellene og i det ytre laget i lillehjernebarken, og nivået av progesteron er høyt hos neonatale (Dean og McCarthy 2008). En progesteronmetabolitt har vist seg å være en allosterisk modulator for GABA_A-reseptoren, og GABA er en viktig nevrotrofik faktor i mange områder av den utviklende hjerne, blant annet for purkinje- og kornceller i lillehjernen (Eilers *et al.* 2001; Chavas og Marty 2003). Sirkulerende glukokortikoider kan også påvirke fosterutviklingen, både maternelle glukokortikoider og fosterets egenproduserte. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD) er et enzym som uttrykkes blant annet i placenta og som konverterer aktive glukokortikoider til inaktive metabolitter, og hindrer dermed sirkulerende glukokortikoider fra mor i å nå fosteret (Benediktsson *et al.* 1997). Dette enzymet vil få redusert eller økt sin aktivitet i kritiske perioder av fosterutviklingen, og dermed vil fosteret i større grad eller mindre grad bli eksponert for sirkulerende glukokortikoider. I bavianer har det blitt vist i midten av svangerskapet at enzymets aktivitet favoriserer dannelsen av kortisol, slik at fosteret blir eksponert for dette steroidhormonet. Denne eksponeringen fører så til at fosterets ACTH-sekresjon fra hypofysen undertrykkes slik at fosterets *de novo*-syntese av glukokortikoider reduseres. Ved fødsel vil økte østrogennivåer påvirke 11 β HSDs aktivitet slik at kortisol konverteres til sin inaktive form kortison. Dette gir et fall i føtale kortisolnivåer slik at ACTH-sekresjonen øker og dermed vil også fosterets *de novo*-syntese av glukokortikoider øke (Pepe og Albrecht 1984; Pepe *et al.* 1990; Pepe *et al.* 1999).

1.5.1 Glukokortikoidreseptoren og dens effekter

Glukokortikoidreseptoren (GR) er et 94 kDa stort intracellulært protein som fungerer som en ligandavhengig transkripsjonsfaktor som regulerer uttrykket av glukokortikoidresponsive gener (Nicolaidis *et al.* 2010). Det finnes to former for GR, en ligandbindende form, GR α og en β -isoform (Hollenberg *et al.* 1985). β -isoformen kan ikke binde glukokortikoider, men fungerer som en liganduavhengig negativ

regulator av glukokortikoider (Bamberger *et al.* 1995). GR er medlem av steroidtyroidea-retinoidreseptorfamilien, og består av flere distinkte regioner; et hydrofobt ligandbindende område nærmest C-terminalen, et DNA-bindende område som inneholder Zn²⁺-fingre som interagerer med DNA, og en modulerende del nærmest N-terminalen som kalles N-terminal domene (fig. 5) (Nicolaidis *et al.* 2010). I ubundet form i cytoplasma er GR å finne i et multiproteinkompleks bestående av heat-shock proteiner (Hsp), immunofiliner, og flere kinaser, som mitogenaktiverte proteinkinaser (MAPK) (Stahn *et al.* 2007). Når ligand binder seg til reseptoren vil imidlertid disse proteinene dissosiere fra komplekset, og GR kan translokere til kjernen, og binde seg som homodimer til spesifikke områder på DNA, kalt glukokortikoid-resonselementer (GRE) (Almawi og Melemedjian 2002). Dette resulterer i aktivering eller hemming av gentranskripsjon (Stahn *et al.* 2007). Ved aktivering av gentranskripsjon, transaktivering, vil GR binde seg til positive GRE. Eksempler på gener som aktiveres via denne mekanismen er gener som koder for anti-inflammatoriske proteiner og regulatoriske proteiner som er involvert i glukoneogenesen (Stahn *et al.* 2007). Ved transrepresjon vil GR interagere med negative GRE, og gentranskripsjon hemmes. Uttrykk av inflammatoriske cytokiner og kjemokiner hemmes på denne måten (Falkenstein *et al.* 2000). GR kan også interagere med transkripsjonsfaktorer som AP-1 og NF-κB direkte ved protein-protein interaksjoner, slik at disse transkripsjonsfaktorene ikke får bundet seg til sine responselementer. AP-1 og NF-κB er transkripsjonsfaktorer som blant annet aktiverer gentranskripsjon av pro-inflammatoriske gener

Det har blitt observert effekter av steroider som er så raske at de ikke kan forklares med gentranskripsjon. Konsensusen idag er at alle typer steroider har ikke-genomiske effekter, og at ett og samme steroid kan indusere både genomiske og ikke-genomiske effekter (Falkenstein *et al.* 2000). Det har blitt foreslått tre forskjellige mekanismer som kan forklare steroiders ikke-genomiske effekter:

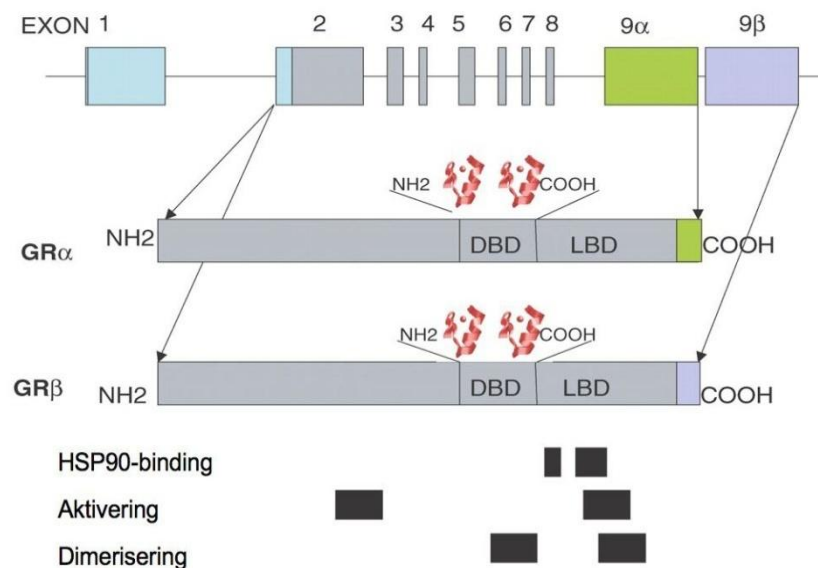
- Steroider interagerer med cellers membraner
- GR i cytosol medierer ikke-genomiske effekter
- Glukokortikoider binder seg til GR som sitter i plasmamembranen

Høye konsentrasjoner av steroider kan forandre membranenes fysiokjemiske egenskaper og endre aktiviteten til membranproteiner. Dette gjelder både

plasmamembranen og mitokondrienes membran. I immunceller har dette resultert i immunosuppresjon som følge av at steroider reduserer Ca^{2+} - og Na^{+} -transporten over membranen (Buttgereit og Scheffold 2002). Glukokortikoider har også vist seg å øke lekkasje av protoner fra mitokondriene, noe som resulterer i redusert ATP-produksjon i immunceller. Dette påvirker en rekke funksjoner hos immuncellene som syntese og sekresjon av cytokiner, migrasjon, fagocytose og antigenpresentasjon (Stahn *et al.* 2007).

Når ligander binder seg til GR i cytosol, vil proteiner som er koblet sammen med GR i et kompleks dissosiere. Eksempel på slike proteiner er kinaser som inngår i MAPK-signalveier og heat shock proteiner (Hsp). Disse proteinene kan forårsake raske steroideffekter når de ikke lenger er bundet til GR-komplekset. Sarkom (Scr), en protoonkogen tyrosinkinase, er et eksempel på en kinase som frigjøres raskt til cytosol etter at deksametason binder seg til GR (Croxtall *et al.* 2000).

I 1999 fant Gametchu *et al* en GR som sitter i plasmamembranen (mGR) i nevroner og lymfocytter hos amfibier. Senere har mGR blitt funnet i humane monocytter og B-lymfocytter (Bartholome *et al.* 2004; Buttgereit *et al.* 2004). Det antas at mGR er en modifisert form av cytosolisk GR (Falkenstein *et al.* 2000). Deksametason har vist seg å ha en 10 ganger høyere affinitet for mGR sammenliknet med GR i cytosol (Powell *et al.* 1999). Det har også blitt foreslått at deksametason kan indusere apoptose i kyllingkornceller uten å aktivere gentranskripsjon, og at denne apoptosen for eksempel medieres via en GR som er lokalisert til plasmamembranen (Aden *et al.* 2008).



Figur 5: Glukokortikoidreseptorens struktur.

Figuren viser isoformer av glukokortikoidreseptoren, deres sammensetning og ulike domener. DBD=DNA-bindende domene som også er ansvarlig for dimerisering. LBD=ligandbindende domene som er ansvarlig for steroidbinding, dimerisering og translokasjon til kjernen. Figuren er modifisert fra (McMaster og Ray 2007).

1.5.2 Deksametason

Deksametason er et høypotent syntetisk glukokortikoid med anti-inflammatorisk virkning. Deksametason har flere bruksområder, blant andre blir det brukt til å forebygge og behandle bronkopulmonal dysplasi hos premature barn. Bronkopulmonal dysplasi gir kroniske strukturendringer i lungevevet, som følge av biokjemisk lungeumodenhet, og kan være uforenelig med liv (Jobe og Bancalari 2001). Deksametason gis for å fremme alveolær surfaktantproduksjon (Liggins og Howie 1972). Surfaktant består av en kompleks blanding av fosfolipider og proteiner som produseres av alveolære celler type 2 i lungene. Transportproteinet ABCA3 frakter surfaktant over cellemembranen via en aktiv transportmekanisme. *ABCA3*-genet oppreguleres 1-2 dager før fødselen (Mulugeta *et al.* 2002). Det har blitt vist i en human alveolær type 2-cellelinje at deksametason øker *ABCA3*-mRNA-uttrykket ved å binde seg til promotoren til *ABCA3*-genet. Denne promotoren inneholder et GRE (Yoshida *et al.* 2004). Også andre proteiner som er viktige for surfaktantproduksjon oppreguleres av glukokortikoider ved å binde seg til glukokortikoidresonselementer (Ballard 1989; Phelps og Floros 1991). På 80- og

90-tallet var det en utstrakt bruk av steroider til premature, der deksametason var det hyppigst brukte. På slutten av 90-tallet kom de første rapportene som omhandlet bekymringsfulle langtidseffekter av denne steroidbehandlingen (Størdal og Lunde 2007). Premature barn ble fulgt til skolealder, og det viste seg at de barna som hadde blitt behandlet med deksametason hadde dårligere nevrologisk og kognitiv funksjon, sammenliknet med de barna som ikke hadde fått steroidbehandling (Yeh *et al.* 2004). Det har blitt vist at deksametason, gitt i klinisk relevante doser til neonatale rotter, fører til feilutvikling av rottehjernen. Rottene utviklet dårlig motorisk koordinasjon og adferdsforstyrrelser sammenliknet med kontrolldyr (Benesová og Pavlík 1989). Det er også vist at slik deksametasonadministrasjon fører til en doseavhengig nedregulering av cytosolisk GR i lillehjernen og at lillehjernens størrelse reduseres, noe som vedvarer til voksen alder (Benesová og Pavlík 1989). En studie på rotter viste at neonatal deksametasonadministrasjon forandret subenhets sammensetningen til NMDA-reseptoren i hippocampus. Det var færre reseptorkomplekser som inneholdt NR2B-subenheten (Kamphuis *et al.* 2003). Deksametason har også vist seg å redusere proliferasjon av celler i hippocampus og lillehjernen hos flere arter (Yu *et al.* 2004; Tauber *et al.* 2006; Gulino *et al.* 2009).

1.5.3 Glukokortikoidinduserte effekter i sentralnervesystemet under utvikling

Glukokortikoider har viktige oppgaver i hele den utviklende hjerne, fra å organisere dannelsen av nevron-til-nevronkontakter, til å fremme interaksjoner mellom nevroner og gliaceller (Gould *et al.* 1991; Gould 1994). For høye eller for lave konsentrasjoner av glukokortikoider i kritiske perioder av utviklingen av sentralnervesystemet kan dermed føre til strukturelle og funksjonelle forandringer i hjernen (Bohn *et al.* 1994; Oppenheimer og Schwartz 1997). I hvilken grad glukokortikoideksponeringen påvirker den utviklende hjerne, er selvsagt avhengig av uttrykket av glukokortikoidreseptorer på eksponeringstidspunktet. Både i hippocampus og i lillehjernen hos rotte er uttrykket lavt i den embryonale perioden, mens det når en topp rett rundt fødselen (Pavlík og Buresová 1984; Bohn *et al.* 1994). Det er svært sannsynlig at neonatal eller antenatal glukokortikoidbehandling kan påvirke barnets sentralnervesystem, og være potensielt skadelig. Flere studier har vist at unge dyr som enten blir utsatt for stress som gir høye endogene konsentrasjoner av glukokortikoider, eller som blir eksponert for eksogene glukokortikoider, får

signifikante reduksjoner i hippocampalt volum (Uno *et al.* 1994). Det samme er vist i lillehjernen (Benesová og Pavlík 1989). Det er velkjent at glukokortikoidene induserer apoptose i immunsystemet, og glukokortikoidene blir også brukt til å behandle visse former for leukemi (Laane *et al.* 2009). Men glukokortikoider har også vist seg å være involvert i nevronal celledød. Pasienter med revmatoid artritt og multippel sklerose som har fått glukokortikoidbehandling over lengere tid, fikk nevronal atrofi (Bentson *et al.* 1978; Hoogervorst *et al.* 2002) nevronal celledød kan være forårsaket av apoptose. Binding av agonist til glukokortikoidreseptorer i kornceller fra rottehippocampus, ga et skifte i ratioen mellom uttrykk av pro-apoptotiske proteiner, og anti-apoptotiske proteiner. Bax, som er et pro-apoptotisk protein ble oppregulert, mens det ble mindre av de anti-apoptotiske proteinene Bcl-2 og Bcl-x (Almeida *et al.* 2000). Denne studien viste også at aktivering av mineralkortikoid-reseptoren (MR) er neuroprotektiv, så forholdet mellom GR og MR påvirker nevronets skjebne. GR-aktivering gir nevronal død, mens MR-aktivering beskytter nevronene (Almeida *et al.* 2000). Aden *et al.* viste at hydrokortison ga caspaseavhengig celledød i cerebellære kornceller (Aden, Goverud *et al.* 2008). Biotilgjengeligheten av glukose i sentralnervesystemet er av helt avgjørende betydning for nevronal overlevelse. Glukokortikoider kan blokkere glukosetransporten inn i sentralnervesystemet fra perifer sirkulasjon, samt hindre opptak av glukose inn i nevroner (Homer *et al.* 1990; Sapolsky 1996). Det er imidlertid kontroversielt om dette fører til apoptose, da det har blitt vist at kalori restriksjon, med påfølgende høye konsentrasjoner av endogent glukokortikoid, har en neuroprotektiv effekt (Patel og Finch) . Nevroner som er under utvikling er i større grad sårbare for høye konsentrasjoner av glukokortikoider (de Kloet *et al.* 1998; Takahashi 1998).

1.6 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren?

Mekanismen for hvordan glukokortikoider fører til nevronal celledød er ikke fullstendig klarlagt, men en rekke studier antyder at det er en interaksjon mellom glukokortikoidindusert celledød og NMDA-reseptoren. I nevronkulturer fra rottehippocampus har det blitt vist at kortikosteron fører til forlenget åpningstid hos NMDA-reseptoren, og dermed økt intracellulær Ca^{2+} -konsentrasjon. Tilsats av NMDA-reseptorantagonisten, MK-801, reduserte Ca^{2+} -konsentrasjonen.

Preinkubering med deksametason ga en svært forlenget Ca^{2+} -influks. Det forhøyende Ca^{2+} -nivået resulterte i depolarisering av mitokondriemembranen, som igjen kan gi celledød. Studien foreslår at det eksisterer en interaksjon av ikke-genomisk art mellom NMDA-reseptoren og en membranal glukokortikoidreseptor. Årsaken til dette er at effekten kunne sees svært raskt, og er ikke forenelig med en genomisk mekanisme. Det høye Ca^{2+} -nivået ble heller ikke redusert av stoffet cyclohexamid, som hemmer proteinsyntesen (Takahashi *et al.* 2002). Dette taler også for at mekanismen er av en ikke-genomisk art.

Deksametason og glutamat induserer celledød i cerebellære kornceller fra rotte (Jacobs *et al.* 2006b). Både den glutamat- og deksametasoninduserte celledøden ble redusert ved tilstedeværelse av den ikke-kompetitive NMDA-reseptorantagonisten MK-801 og den kompetitive NMDA-reseptorantagonisten CGP 39551. Dette kan tolkes i retning av at membranbundne NMDA-reseptorer må være involvert i den deksametasoninduserte celledøden, fordi denne celledøden lot seg blokkere av NMDA-reseptorantagonister (Jacobs *et al.* 2006b). Det ble også vist at celler som ble eksponert for deksametason og glutamat samtidig, ikke ga en additiv celledød sammenliknet med celler som kun ble eksponert for glutamat. Dette tyder på at deksametason kan indusere celledød på egen hånd, og at denne celledøden kan involvere NMDA-reseptoren uavhengig av glutamat (Jacobs *et al.* 2006b). I kornceller fra lillehjerne hos kylling ble det vist at hydrokortison-indusert celledød kan reduseres av NMDA-reseptorantagonisten MK-801 og GR/MR-antagonisten RU 28318 (Aden *et al.* 2008). Tidligere arbeider med masteroppgaver der det har blitt gjort reporterstudier, har vist at ko-transfeksjon med GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A i deksametasoneksponerte CV-1-celler ga lavere genekspressjon sammenliknet med transfektert GR alene. Dette indikerer at det foreligger en interaksjon mellom GR og NR3A i cytoplasma etter deksametasoneksponering som hindrer GR å translokere inn i kjernen (Wehus 2007; Feng 2009).

I min masteroppgave var målet å studere denne potensielle interaksjonen i celletyper med nevronkarakteristika.

1.7 Mål med studien

Teste om det foreligger en interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og glukokortikoidreseptoren ved å:

- Benytte reporter gener som metode i den adrenale feokromcytom-cellelinjen PC12 som er et nevrobiologisk modellsystem, og fibroblastcellelinjen CV-1 for å teste om det foreligger en interaksjon.

Bruke kyllingkornceller som modell ved å:

- Påvise hvordan kyllingkorncellene differensierer og deler seg over tid i kultur, med og uten ARA-C-eksponering, og studere deres morfologi når de får utvikle seg i kultur.
- Teste om det er forskjeller i deksametason- og glutamatindusert celledød hos kyllingkornceller på ulike utviklingsstadier i kultur, og om en eventuell celledød lar seg blokkere av NMDA-reseptorantagonister.
- Teste om det finnes en korrelasjon mellom uttrykket av NMDA-reseptorsubenheter og GR, og deksametason- og glutamatindusert celledød i kyllingkornceller på ulike utviklingsstadier i kultur.

2. Materialer og metode

2.1 Oversikt over kjemikalier og biologiske produkter

Tabell 1: Kjemikalier og biologiske produkter

Produkt	Leverandør
Acrylamid 30 % BIS solution	Bio-Rad California, USA
APS (ammonium persulfat)	Sigma-Aldrich Co.
Ara-C (Cytosin β -D-arabino-furanosid)	Sigma-Aldrich Co.
ATP (adenosin 5`-trifosfat)	Sigma-Aldrich Co.
BES (N,N-bis-(2-hydroksyetyl)-2-aminoetansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co.
BME (Basal Medium Eagle med Earle`s salter med glutamin)	Invitrogen Co. California, USA
Blottebuffer (TG10X)	Bio-Rad
BSA (Bovint serumalbumin)	Sigma-Aldrich Co.
CaCl ₂ (kalsiumklorid)	Merck & Co., Inc. New Jersey, USA
CGP 39551	Norartis International AG Basel, Sveits
Deksametason (dex)	Sigma-Aldrich Co.
D-luciferin	Duchefa Haarlem, Nederland
DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium)	Invitrogen Co.
DNaseI (Deoksyribonuklease I) D5025	Sigma-Aldrich Co.
DTT (dithiotreitol)	Sigma-Aldrich Co.
Elfobuffer (TGS 10X)	Bio-Rad
Etanol 96 %	Arcus produkter Oslo, Norge
FBS (ftalt kalveserum)	Invitrogen Co.
Fenolrdt	Merck & Co., Inc.
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich Co.
Glukose	Merck & Co., Inc.
Glyserol	Prolab, Frankrike
Hesteserum	Gibco BRL Life Technologies Ltd Paislet, Skottland
KCl (kaliumklorid)	Genzyme Pharmapeuticals , USA
KH ₂ PO ₄ (kaliumdihydrogenfosfat)	Merck & Co., Inc.
Kyllingserum	Invitrogen Co.
Leupeptin (LP)	Sigma-Aldrich Co.
L-glutamin	Sigma-Aldrich Co.
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich Co.
MES (2-(N-morpholino-etansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co.
Metanol	Merck & Co., Inc.
Mg(CH ₃ COO) ₂ (magnesiumacetat)	Merck & Co., Inc.

MK 801 (dizocilpin((5R,10S)-(+)-5-metyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)syklohepten-5,10-imin hydrogenmaleat)	RBI Massachusetts, USA
NaCl (natriumklorid)	J.T. Baker, Nederland
Na ₂ HPO ₄ (di-natriumhydrogenfosfatdihydrat)	Merck & Co., Inc.
NaOH (natriumhydroksid)	J.T. Baker, Nederland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Co.
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich Co.
Penicillin-Streptomycin (10000U/ml / 10000 µl/ml)	Invitrogen Co.
Pepstatin-A (PS)	Sigma-Aldrich Co.
PMSF (pentametansulfonmylfluorid)	Sigma-Aldrich Co.
Poly-L-lysin	Sigma-Aldrich Co.
Ponceaus solution	Sigma-Aldrich Co.
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific Pierce Rockford, USA
SDS sodium dodecyl sulfat	Sigma-Aldrich Co.
Stop & Glo buffer og substrat	Promega Co. Wisconsin, USA
Supersignal West Femto	Thermo Scientific Pierce
TEMED (N,N,N,N,-tetrametyl-etylendiamin)	Sigma-Aldrich Co.
Tris-base (tris[hydroksymetyl]aminometan)	Sigma-Aldrich Co.
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co.
Trypanblå	Sigma-Aldrich Co.
Trypsin T9201	Sigma-Aldrich Co.
Trypsin-EDTA	Invitrogen Co.
Trysinhemmer T9003	Sigma-Aldrich Co.
Tween 20 (polyoksyetylen sorbitan monolaurat)	Calbiochem California, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge

Tabell 2: Utstyr

Utstyr	Produsent
Cellekulturflasker 175 cm ²	Nunclon
Cellekulturskåler	Nunclon
Celleskrape	Corning Incorporated
CO ₂ -inkubatorskap	Thermo Forma
Finnpipette	Thermo Electron
Fluorescens mikroskop	Nikon eclipse TE 300 med SPOT RT
Gassbrenner	Integra biosciences
LAF-benk	Holten safe 2000, modell 1.2
Luminometer	Lumat LB 9507 EG&G
Lysmikroskop	Nikon TMS-F 104
pH-meter	Metrohm 744
Pipetteboy	Integra Biosciences
Fremkallingsmaskin	GeneSnap
Plateleser	HTS 700 Plus Bio-Assay reader; Perkin Elmer

2.2 Korncellekulturer

Kornceller er den største og mest homogene nevronpopulasjonen i lillehjernen, men også i hjernen som helhet (Contestabile 2002), og er derfor en god cellemodell til bruk for å studere neurobiologiske mekanismer. Kornceller fra kylling modnes raskt, utvikler glutamattoksisitet tidlig i kultur (Jacobs *et al.* 2006a), og er billig i bruk blant annet fordi det ikke er behov for dyrestallfasiliteter.

2.2.1. Coating av korncellekulturskåler med poly-L-lysin

Dagen før preparering behandles skålene med polymeren poly-L-lysin slik at korncellene får bedre feste til skålene.

Prosedyre for coating med poly-L-lysin

1. En steril flaske med 5 mg poly-L-lysin tilsettes 10 ml autoklavert MQ-vann. Løsningen blandes godt.
2. Løsningen fortynnes ytterligere 1:50 med autoklavert MQ-vann slik at sluttkonsentrasjonen blir 0,01 mg/ml. Det er viktig å se til at all poly-L-lysin løser seg.

3. 1 ml av løsningen tilsettes til små skåler (8,8 cm²), 2 ml til mellomstore skåler (21,5 cm²) og 5 ml til store skåler (66,5 cm²). Skålene beveges rundt slik at hele bunnen dekkes.
4. Poly-L-lysin-løsningen suges av etter 30-60 minuttene og skålene og tørkes over natt i en steril LAF-benk med luftstrøm på maksimal styrke.

2.2.2. Preparering av korncellekulturer

Befruktede kyllingegg kjøpes fra Samvirkekylling i Våler. Eggene oppbevares kjølig helt til de legges i rugemaskinen. Eggene ruges i rugemaskinen ved 37 °C, og fra dag 4 til dag 17 snus eggene maskinelt morgen og kveld. På dag 7 gjennomlyses eggene, og ubefruktede egg fjernes. For å opprettholde en tilfredsstillende luftfuktighet i rugemaskinen, må vann tilsettes i et eget kammer. På dag 18 tas eggene ut av maskinen. Dette er tre dager før normal klekketid. Eggene gjennomlyses, og de eggene som inneholder levende kyllingfostre legges i isvann, som medfører at kyllingene bedøves. Kyllingene tas deretter ut og avlives ved dekapitering. Kyllingens lillehjerne dissikeres ut for videre preparering. Alt arbeid med preparering kyllingkorncellekulturer foregår i LAF-benk og med sterilt utstyr (tabell 3).

Tabell 3: Sterilt utstyr til preparering av korncellekulturer

Saks og pinsett til disseksjon
2 pinsetter for fjerning av hjernehirner
Trypsineringsflaske
Glassflaske for løsningene 1-5 og platemedium
Petriskåler
50 ml glassrør
Pasteurpipette
Alt utstyr er autoklavert ved 120 °C i 20 minutter

Prosedyre for preparering av korncellekulturer

1. Eggene legges i isvann i 7 minutter slik at kyllingene bedøves.
2. 6 egg tas ut av gangen.
3. Eggene vaskes med 70 % sprit før de knekkes.
4. En steril skalpell brukes til å skjære over kyllingenes hals. Hodene fraktes til LAF-benk der lillehjernen dissekeres ut med saks og pinsett, og overføres til en stor petriskål med løsning 1 (tabell 5).
5. Meningene fjernes forsiktig med 2 pinsetter og lillehjernen overføres til en ny stor petriskål med løsning 1.
6. Løsning 1 suges av og lillehjernen samles i en haug på midten av skålen, før de kuttet i mindre biter i to retninger vinkelrett på hverandre. 10 ml løsning 1 tilsettes skålen.
7. Bitene overføres til et sterilt 50 ml-rør med nye 10 ml av løsning 1. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt. Supernatanten fjernes, og pelleten resuspenderes i 8 ml av løsning 2 (tabell 5). Pipetterer forsiktig opp og ned til pelleten har løst seg.
8. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske og settes i vannbad ved 37 °C i 15 minutter. Korkene skrues halvveis på, 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 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 5) tilsettes røret og sentrifugeringen gjentas.
10. Supernatanten suges av og i røret tilsettes 3 ml løsning 3.
11. Pelleten løses forsiktig ved å pipettere opp og ned 15-20 ganger med en steril pasteurpipette som brennes av slik at den får en rundt og smal spiss.

Når celleklumpene har sunket i røret, overføres den øverste klumpefrie delen av løsningen til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 5 (tabell 5).

12. Ved behov kan trinn 10-11 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 sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.

14. Supernatanten suges av, og 10 ml platemedium (tabell 6) tilsettes.

15. Pelleten løsnes og alt overføres til en glassflaske med samme medium som inneholder halvparten av den mengden medium som er beregnet ut fra antall hjerner som er tilgjengelig. Det behøves 10-12 ml medium per hjerne. En liten prøve tas ut til celledeling i et Burchers tellekammer.

16. Cellesuspensjonen fortynnes med platemedium (tabell 6) til en tetthet på $1,7 \times 10^6$ celler per ml medium. Dette beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Antall (ml)} = \frac{\text{antall ml cellesusp.} * \text{celletetthet pr ml i cellesusp.}}{\text{ønsket celletetthet pr ml}}$$

17. Cellesuspensjonen overføres til skåler som er behandlet med poly-L-lysin dagen før. Antall ml cellesuspensjon per skål er angitt i tabell 7.

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

Tabell 4: Krebs-Ringerløsning 10X

Innholdsstoffer	Sluttkonsentrasjon	Mengde
Fenolrødt	0,03 mM	50 mg
KH ₂ PO ₄	10 mM	0,83 g
KCl	50 mM	1,80 g
Glukose	0,14 M	12,85 g
NaCl	1,21 M	35,35 g
NaHCO ₃	0,25 M	10,70 g
Destillert vann		ad 500 ml
- Sterilfiltereres 0,2 µm		
- Lagres i kjøleskap opptil 5-6 måneder		

Tabell 5: Løsninger 1-5

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Løsning 1	Bovint serum albumin (BSA) MgSO ₄ (3,82 g/100 ml destillert vann) Krebs-Ringerløsning 10X (tabell 4) Destillert vann	1,50 g 4 ml 50 ml ad 500 ml
Løsning 2	Trypsin type III Løsning 1	25 mg 100 ml
Løsning 3	MgSO ₄ (3,82 g/100 ml destillert vann) Deoksyribonuklease I (Dnase I) Trypsinhemmer (Type1-S) Løsning 1	0,50 ml 6,25 mg 26,0 mg ad 50 ml
Løsning 4	Løsning 3 Løsning 1	16 ml 100 ml
Løsning 5	MgSO ₄ (3,82 g/100 ml destillert vann) CaCl ₂ (1,20 g/100 ml destillert vann) Løsning 1	0,320 ml 0,320 ml 40 ml

Tabell 6: Platemedium til korncellekulturer

Innholdsstoffer	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
10 % varmeinaktivert hesteserum	50 ml
22 mM KCl	825 mg
Streptomycin penicillin	5 ml
2 mM glutamin	146 mg
100 nM insulin	0,28 mg
- Sterilfiltreres 0,2 µm	

Tabell 7: Antall ml cellesuspensjon per skål

Skåler	Størrelse	ml
Stor	66,5 cm ²	10 ml
Mellomstor	21,5 cm ²	3,3 ml
Små	8,8 cm ²	1 ml

2.2.3 Tilsats av ARA-C og ernæringsmedium

Cytosine β -D-arabino-furanoside (ARA-C) tilsettes kulturene 16-24 timer etter preparering for å hindre vekst av astrocytter. Det ble også gjort forsøk der ARA-C ble tilsatt på henholdsvis sammen dag som prepareringen fant sted, samt på dag 1, 2 og 3 etter preparering. Skåler som ble benyttet var mellomstore (21,5 cm²) og store (66,5 cm²). Platemedium (tabell 6) byttes ut med ernæringsmedium (tabell 8) samtidig som ARA-C-løsning tilsettes (tabell 9), 24 timer etter utplating til kultur. I de tilfeller ARA-C ble tilsatt senere enn 24 timer etter utplating, ble platemedium byttet ut med ernæringsmedium 24 timer etter utplatingen.

Prosedyre for tilsats av ARA-C til korncellekultur

1. ARA-C løsning lages (tabell 9).
2. Mediet i skålene justeres til 3,3 ml (21,5 cm²) og 10 ml (66,5 cm²).
3. 25 μ l ARA-C per ml medium tilsettes direkte i skålene.

Tabell 8: Ernæringsmedium til korncellekulturer

Innholdsstoffer	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
22 mM KCl	825 mg
2 mM glutamin	146 mg
100 µg/ml humant transferrin	50 mg
60 µM putrescin	4,8 mg
30 nM natriumselenitt	2,6 µl
1 nM T ₃	160 µl
25 µg/ml insulin	12,5 mg
- Sterilfiltreres 0,2 µm	
- Oppbevares kjølig	

Tabell 9: 10 µM Ara-C-løsning

Innholdsstoffer	Mengde
Ara-C	1 ml
Ernæringsmedium til korncellekulturer	10 ml
- Sterilfiltreres 0,2 µm	
- Ved utveiling av ARA-C-tørrestoff skal det benyttes støvmaske, hansker og labfrakk.	

2.3 Splitting og transfeksjon av CV-1- og PC12-celler

2.3.1 CV-1 celler

CV-1 celler er en fibroblastcellelinje tatt fra nyren til *Cercopithecus aethiops*, African green monkey (Hopps *et al.* 1963). Cellelinjen er stabil, og blir konfluent etter 3-4 dager etter splitting til celleflaske. CV-1 cellene lar seg lett transfektere, og de uttrykker ikke NMDA-reseptorer eller GR naturlig (Giguère *et al.* 1986; Feng 2009)

2.3.2 Splitting av CV-1 celler til flasker

CV-1 cellene blir dyrket i 175 cm² cellekulturflasker, og inkubert i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO₂. Cellene blir splittet til nye flasker hver 3. eller 4. dag.

1. Cellekulturflasken mikroskoperes for å undersøke om cellene er konfluente.

2. Gammelt medium helles av flasken.
3. 2 ml trypsin-EDTA tilsettes. Flasken beveges slik at hele bunnen blir eksponert for trypsinen.
4. Trypsin-EDTA helles av.
5. 2 ml trypsin-EDTA tilsettes på nytt og pipetteres av etter 30 sekunder.
6. Flasken inkuberers i 5-10 minutter i inkubatorskapet.
7. Flasken bankes på sidene slik cellene løsner fra bunnen. Dersom ikke cellene løsner gjentas punkt 4-6.
8. 10 ml CV-1 medium (tabell 10) tilsettes flasken, og cellesuspensjonen pipetteres opp og ned 10 ganger for å få jevn fordeling av cellene og for å løse opp celleaggregater. Hele bunnen av flasken må skylles når cellesuspensjonen pipetteres opp og ned.
9. 2 ml tilsettes til en ny cellekulturflaske som brukes ved neste splitting og 2 ml settes igjen i den gamle flasken som kan brukes som reserveflakse.
10. Til hver nye flaske tilsettes 20 ml CV-1 medium (tabell 10).

2.3.3 Splitting av CV-1 celler til skåler

1. Cellene splittes som beskrevet i punkt 1-8 ovenfor.
2. Celletettheten per ml skal være $3,5 \times 10^4$. Det volumet som skal brukes av cellesuspensjonen til skåler regnes så ut ved bruk av følgende formel:

$$X \text{ ml} = \frac{\text{antall ml pr skål} * \text{celletetthet pr skål}}{\text{celletetthet i flaske}}$$

3. En liten prøve av cellesuspensjonen tas ut til telling i et Burcher tellekammer. Det telles to rutenett (4x4 ruter). Gjennomsnittet av de to tellingene brukes i formelen.
4. Cellesuspensjonen tilsettes riktig mengde CV-1 medium (tabell 10) som beregnes etter følgende formel:

$Y \text{ ml} = \text{antall ml pr skål} * \text{antall skåler} - \text{volum av cellesuspensjon brukt}$

5. Cellesuspensjonen og CV-1 medium blandes og overføres til sterile skåler.

Tabell 10: CV-1-medium

Innholdsstoffer	Mengde
Dulbeccos MEM	500 ml
Føtalt kalveserum	50 ml
Pyruvat	5 ml
Streptemycin penicillin	5 ml
- Lages i LAF-benk	
- Oppbevares kjølig	

2.3.4 Transfeksjon av CV-1-celler med kalsiumfosfat

Cellene transfekteres med reportergenet glukokortikoidresponselement koblet til luciferase (GRE-luc), intern standard renilluciferase (RL-tk), samt GR og NMDA-reseptorsubenheterne NR3A og NR1-1a dagen etter at de har blitt splittet til skåler. Det lages en løsning med like mengder 0,25 M kalsiumklorid og BBS (tabell 11). Til denne løsningen tilsettes plasmidløsningen. Kalsiumionenes positive ladning bindes til de negative fosfatgruppene på DNA-molekylet, slik at det dannes et presipitat. Dette presipitatet kan tas opp av cellene ved endocytose (Chen og Okayama 1987).

Prosedyre for transfeksjon av CV-1 celler med kalsiumfosfat

1. Mengde transfeksjonsløsning som skal brukes beregnes etter følgende formel:

$$X \text{ ml} = \frac{\text{antall skåler} * \text{antall ml medium pr skål}}{10}$$

2. Transfeksjonsløsningen lages ved å blande like deler BBS og 0,25 M CaCl₂ (tabell 11).
3. Volumet av hver plasmidløsning beregnes etter følgende formel:

$$Y \mu\text{l} = \frac{\text{ønsket kons. i transf. løsning} (\mu\text{g/ml}) * \text{volum transf. løsning} (\text{ml})}{\text{plasmidløsningens konsentrasjon} (\mu\text{g}/\mu\text{l})}$$

Den totale DNA-mengden skal være 10 µg per 10 ml medium. Mengde DNA som benyttes er oppgitt i tabell 12.

4. Når plasmidene som skal studeres er tilsatt, fylles det opp med CMV som er et tomt plasmid slik at det blir 10 µg DNA totalt i 1ml transfeksjonsløsning.
5. Eppendorfrørerne wirlmixes i 10 sekunder og inkuberes i romtemperatur i 20 minutter.
6. Transfeksjonsløsningen tilsettes dråpevis mens skålene beveges forsiktig rundt.
7. Skålene inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂.
8. Mediet i skålene byttes ut etter 24 timer.

Tabell 11: Løsninger brukt til transfeksjon av CV1-celler

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
BBS	BES Na ₂ HPO 5 M NaCl MQ-vann - Denne løsningen fordeles i 5 flasker, og i hver av disse benyttes NaOH til å justere pH til henholdssvis 6,75, 6,85, 6,95, 7,00 og 7,05. Løsningene med ulik pH brukes så til transfeksjon av plasmider som gir luciferaseproduksjon. Den løsningen med best transfeksjonseffektivitet, målt med luminometer, brukes videre.	5,33 g 0,1335 g 28 ml ad 500 ml
0,25 M CaCl ₂	CaCl ₂ Destillert vann - Fortynnes 1:10 med MQ-vann og sterilfiltreres 0,2 µm. - Oppbevares i kjøleskap	36,75 g 100 ml

Tabell 12: Plasmider brukt til transfeksjon

Genprodukt	Kilde	Plasmidets forkortelse	Plasmidkonsentrasjon per ml transfeksjonsløsning
Ildfluoluciferase under kontroll av GRE-promotor	Gave fra J. Milbrandt, Washington University School of Medicine	GRE-luc	4 µg
Renillaluciferase under kontroll av tymidin kinase	Promega Co, Wisconsin, USA	RL-tk	1 µg
Ingen genprodukter	(Wilson <i>et al</i> , 1991)	CMV	Til totalt 10 µg plasmid
Glukokortikoidreseptor	Gave fra J. Milbrandt, Washington University School of Medicine	GR	2 µg
Trunkert glukokortikoidreseptor	Gave fra J. Milbrandt, Washington University School of Medicine	GRtr	2 µg
NMDA-reseptor subenhet NR1-1a	Gave fra S. Vincini Georgetown School of Medicine	NR1-1a	2 µg
NMDA-reseptor subenhet NR3A	Gave fra dr. D. Chang, Burnham insitute	NR3A	2 µg
NMDA-reseptor subenhet NR2A	Gave fra S. Vincini, Georgetown School of Medicine	NR2A	2 µg
Glukokortikoidreseptor merket med gfp	Gave fra M.D. Galigniana, University of Buenos Aires	GR-gfp	2 µg
NMDA-reseptor subenhet NR1-1a merket med gfp	Gave fra S. Vincini Georgetown School of Medicine	NR1-1a-yfp	2 µg
NMDA-reseptor subenhet NR1-1a merket med yfp	Gave fra S. Vincini Georgetown School of Medicine	NR2A-gfp	2 µg
NMDA-reseptor subenhet NR3A merket med gfp	Gave fra Perez-Otano, The Stalk Institute for Biological Studies	NR3A-gfp	2 µg

2.3.5 PC12-celler

PC12-celler er cancerceller hentet fra feokromocytom hos rotte, en svulst som utgår fra kromaffine celler i binyremargen. PC12-cellene innehar enzymapparatet som behøves for å syntetisere, lagre og sekretere katekolaminene dopamin og noradrenalin, og likner derfor på nevroner i det sympatiske nervesystemet. Av den grunn er PC12-cellelinjen en velegnet modell for studier innenfor neurobiologien

(Greene og Tischler 1976). Differensierte PC12-celler uttrykker endogen GR (Morsink *et al.* 2006).

2.3.6 Splitting av PC12-celler til flasker

PC12-cellene blir dyrket i 175 cm² cellekulturflasker, og inkubert i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO₂. Cellene blir splittet til nye flasker hver 3. eller 4. dag.

1. Tøm av gammelt medium.
2. Tilsett 10 ml nytt PC12-medium (tabell 13).
3. Bank på flaskens sider slik at cellene løsner.
4. Pipetterer opp og ned 10 ganger med en Pasteurpipette slik at cellesuspensjonen blir mest mulig homogen. Før pipetteringen brennes pasteurpipettens spiss av slik at den avrundes og innsnevres.
5. 2 ml cellesuspensjon tilsettes til en ny cellekulturflaske som brukes ved neste splitting, og 2 ml settes igjen i den gamle flasken som kan brukes som reserveflakse.
6. Til hver nye flaske tilsettes 20 ml PC12-medium (tabell 13).

2.3.7 Splitting av PC12-celler til skåler

1. Cellene splittes som beskrevet i punkt 1-4 ovenfor.
2. Ta ut en liten prøve til telling i et Burcher tellekammer. Det telles to rutenett (4x4 ruter). Gjennomsnittet av de to tellingene brukes i formelen.
3. Celletettheten per ml skal være 7×10^4 . Volumet av cellesuspensjonen som skal brukes beregnes etter følgende formel:

$$X \text{ (ml)} = \frac{\text{antall ml pr skål} * \text{celletetthet pr skål}}{\text{celletetthet i flaske}}$$

4. Volumet av mediet som skal brukes beregnes etter følgende formel:

$$Y \text{ ml} = \text{antall ml pr skål} * \text{antall skåler} - \text{volum av cellesuspensjon brukt}$$

5. Cellesuspensjonen og PC12-medium (tabell 13) blandes og overføres til sterile skåler.

2.3.8 Transfeksjon av PC12-celler med Metafectene PRO®

Transfeksjonsreagenset Metafectene PRO® er et polykationisk liposom, som interagerer med DNA slik at det dannes et DNA-lipidkompleks. I denne kompleksdannelsen kondenseres DNAet slik at det beskyttes mot degradering. Komplekset fuserer med cellemembranen og tas opp som et endosom. Endosomet frigjør DNAet intracellulært (Xu og Szoka 1996).

Prosedyre for transfeksjon av PC12 med Metafectene PRO®

1. 2 µl Metafectene PRO tilsettes 50 µl serumfritt medium DMEM uten gentamycinsulfat. Løsningen blandes ved pipettering. Skal ikke wirlmikses!
2. Riktig volum plasmid beregnes, og plasmidene løses i 50 µl DMEM. Løsningen wirlmikses. Hver skål (8,8 cm²) skal inneholde tilsammen 1 µg plasmid. Mengden DNA som benyttes per 10 skåler er oppgitt i tabell 12.
3. 50 µl Metafectenløsning tilsettes plasmidløsningen og blandes ved forsiktig pipettering. Skal ikke wirlmikses!
4. Løsningen inkuberes i romtemperatur i 20 minutter.
5. 100 µl transfeksjonsløsning tilsettes dråpevis til hver skål (8,8 cm²), mens skålen beveges forsiktig rundt.
6. Transfeksjonsløsningen fjernes etter 3 timer, og erstattes med vanlig PC12-medium (tabell 13).

Tabell 13: PC12-medium

Innholdsstoffer	Mengde
Dulbecoos MEM	500 ml
Føtalt kalveserum (10 %)	50 ml
Hesteserum (5 %)	25 ml
Pyruvat	5 ml
Streptomycin pencillin	5 ml
- Lages i LAF-benk	
- Oppbevares kjølig	

2.4 Luciferase

2.4.1 Ildflueluciferase

Luciferaser er enzymer som kan isoleres fra flere ulike organismer, deriblant fra ildfluen *Photinus pyralis*. Felles for disse enzymene er at de katalyserer reaksjoner der pigmentet luciferin inngår som substrat og det avgis energi i form av lys ved bølgelengde 563 nm (Marques og Esteves da Silva 2009). Lyset som avgis i en slik reaksjon er proporsjonal med mengde ildflueluciferase i reaksjonsblandingen. For at reaksjonene skal gå trengs det også O_2 , Mg^{2+} og ATP i overskudd (Gould og Subramani 1988).

I: luciferase+luciferin+ Mg^{2+} ATP \rightarrow luciferase-luciferyl-AMP + PP_i

II: Luciferase-luciferyl-AMP + $O_2 \rightarrow$ luciferase + oksyluciferin + AMP+ CO_2 + lys

Ildflueluciferase kan benyttes til å studere biologiske mekanismer både *in vivo* og *in vitro*, deriblant studier av genekspresjon (Gould og Subramani 1988). For å studere deksametasons evne til å initiere genekspresjon, har responselementet GRE, som er koblet til genet luciferase, blitt brukt. Når GR binder seg til GRE-luc etter ligandabinding, vil dette aktivere luciferaseekspresjonen nedstrøms for responselementet. Når luciferin og luciferasecocktail som inneholder ATP og Mg^{2+} , tilsettes celleekstraktet vil mengden lys som kan detekteres med et luminometer være et mål for hvor mye luciferase som har blitt uttrykt, og dermed et indirekte mål for genekspresjon (Marques og Esteves da Silva 2009).

Prosedyre for høsting av celler til luciferasemåling

1. Et passende volum av høstebuffer beregnes etter følgende formel:
 $X \text{ (ml)} = 235 \mu\text{l til mellomstore skåler (21,5 cm}^2) \times \text{ant skåler som skal høstes}$
 $X \text{ (ml)} = 100 \mu\text{l til små skåler (8,8 cm}^2) \times \text{ant skåler som skal høstes}$
2. Høstebuffer lages ved at DTT (tabell 14) tilsettes 0,1% LUC (tabell 14) i konsentrasjon 1 mM.
3. Mediet helles av skålene, og rester fjernes.

4. Medium skåler vaskes med 2 x 3 ml PBS (tabell 15), mens små skåler vaskes med 2 X 1 ml PBS. Skålene vaskes før rester fjernes.
5. Til mellomstore skåler (21,5 cm²) tilsettes 235 µl 0,1% LUC med DTT på midten av hver skål. Til små skåler (8,8 cm²) tilsettes 100 µl 0,1% LUC med DTT.
6. Skålene inkuberes i romtemperatur i 5 minutter.
7. Cellene skrapes løs med en celleskrape. Skålene skrapes to ganger vinkelrett på hverandre.
8. Cellesuspensjonen overføres til kalde eppendorfrør.
9. Eppendorfrørene sentrifugeres ved 4 °C i 5 minutter ved 13000 rpm.
10. Eppendorfrørene settes på is.
11. Prøvene måles i et luminometer. 50 µl prøve tilsette 150 µl LUC-coctail (tabell 16). Dispenseren tilsetter luciferin (tabell 16) og det måles i 2 sekunder.

Tabell 14: Løsninger brukt til å høste skåler for luciferasemåling

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
1 M DTT	Dithiothreitol MQ-vann - Oppbevares ved -20 °C	154,4 mg 1 ml
0,1% LUC høstebuffer)	1 M Tris/1 M MES pH 7,8 Triton X-100 MQ-vann, romtemperert - Oppbevares kjølig	5 ml 0,1 ml ad 100 ml

Tabell 15: Fosfatbufret saltvann (PBS)

Innholdsstoffer	Sluttkonsentrasjon	Mengde
NaCl	137 mM	32 g
KCl	2,7 mM	0,8 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	1,08 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	6,5 mM	7,12 g
MQ-vann		ad 4000 ml
HCl		Til pH 7, 4
- Autoklavers		
- Oppbevares kjølig		

Tabell 16: Løsninger til måling av ildfluoluciferase

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
1 mM luciferin	D-luciferin MQ-vann - Oppbevares kjølig og beskyttet fra lys.	11 mg 36,7 ml
LUC-coctail	Adenosin 5-trifosfat (ATP) 1 M magnesiumacetat 1M Tris/1 MES pH 7,8 MQ-vann	240 mg 2 ml 8,3 ml ad 100 ml

2.4.2 Renillaluciferase

Renillaluciferase er isolert fra korallen *Renilla reniformis* (Charbonneau og Cormier 1979). Renillaluciferase benyttes som intern standard for å korrigere for ulike variabler som transfeksjonseffektivitet og celletetthet i skålene. Renillaluciferase kan ko-transfektors sammen med ildfluoluciferase fordi de to reporter-genene reagerer med ulike substrater. En tidligere hovedfagsoppgave har vist at renillaluciferaseaktiviteten ikke påvirkes av NMDA-reseptorsubenheterne NR1-1a og NR3A eller deksametason i konsentrasjon 1 nM (Feng 2009). En annen studie har imidlertid vist at når CV-1-celler, transfektet med GR, ble eksponert for 10 nM deksametason, får de redusert renillaluciferaseaktivitet (Ibrahim *et al.* 2000). Det ble i denne studien imidlertid benyttet dobbelt så stor plasmidkonsentrasjon av renillaluciferase enn den som er benyttet i dette forsøksoppsettet.

Prosedyre for måling av renillaluciferase

1. Stop & Glo-reagens fra kitet Dual Luciferase (Promega) (tabell 17) fortynnes 100 ganger med MQ-vann.
2. Luminometeret innstilles på program 5, manuell prosedyre på forskningsgruppens luminometer som er av typen Lumat LB 9507 EG&G. Dette programmet måler lysintensiteten i 10 sekunder.
3. Ulike volumer av cellesuspensjon tilsettes glassrør sammen med 100 μ l fortynnet Stop&Glo-reagens. Prøvevolumet ligger vanligvis mellom 0,25-50 μ l. Dette gjøres for å finne det volumet der prøvene ligger i et lineært område. Verdiene bør være fem- eller sekssifret.
4. 100 μ l fortynnet Stop & Glo-reagens tilsettes et glassrør, og riktig volum fra prøven tilsettes.
5. Det tas 2 paralleller fra hver prøve. Hvis det er mer enn 10% avvik mellom disse parallellene, så utføres en tredje måling.

Tabell 17: Stop&Glo-reagens

Innholdsstoffer	Mengde
Stop&Glo-substrat	20 μ l
Stop&Glo-buffer	1 ml
- Oppbevares ved -20 °C	

2.5 Mikroskopering

2.5.1 Gfp og Yfp

Green Fluorescent Protein (gfp) ble isolert fra maneten *Aequorea victoria* og karakterisert av Shimomura og medarbeidere på begynnelsen av 60-tallet. På 1990-tallet ble proteinet klonet og tatt i bruk som et viktig verktøy i celle- og molekylærbiologien (Chudakov *et al.* 2005). GFP er unikt fordi det ikke trenger spesifikke kofaktorer eller substrater fra *Aequorea victoria*. GFP-cDNA kan kobles til gener i et plasmid som kan transfekteres inn i celler. Dersom transfeksjonen er vellykket, vil cellene uttrykke gfp-merkede proteiner. Disse kan belyses med blått lys

i et fluorescensmikroskop, og vil da skinne grønt. Emisjonsmaksimum til gfp har en bølgelengde på 507 nm. Etter kloningen av GFP, ble det laget flere muterte varianter av proteinet, og Yellow Fluorescent Protein (yfp) er et av disse. Emisjonsmaksimum til yfp har en bølgelengde på 527 nm.

PC12-celler ble transfektert med plasmidløsninger som inneholdt gener som koder for gfp- og yfp-merkede proteiner. To dager etter transfeksjonen ble cellene studert i Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop. Det ble tatt fasekontrastbilder og fluorescensbilder med Nikon DS-Qi1Mc, et kamera som er koblet til mikroskopet. Det ble undersøkt om det var mulig å se hvordan de merkede proteinene fordeler seg i cellene, og om en eventuell interaksjon mellom proteiner vil påvirke fordelingen intracellulært.

2.5.2 Farging av kjernen og endoplasmatisk retikulum

De mikroskoperte cellenes kjerne ble farget med kjernefargen Hoechst 33342. Hoechst binder seg til DNA i kjernen og mitokondriene, og eksiteres av UV-lys. I et fluorescensmikroskop vil det derfor være mulig å observere hvor i cellen kjernen er lokalisert. Hoechst har et emisjonsmaksimum på 461 nm. De transfekterte PC12-cellene ble kjernefarget for å studere kjernelokaliseringen til de gfp- og yfp-merkede proteinene. Det er også mulig å farge endoplasmatisk retikulum (ER) med en ER-tracker.

Prosedyre for kjernefarging med Hoechst og farging med ER-Tracker

1. 1 mg/ml Hoechst 33342 eller ER-Tracker (Blue-White DPX E-12353) ble tilsatt celledålene i forhold 1:1000 etter protokoll fra produsenten Molecular Probes.
2. Skålene inkuberes i 30 minutter ved 37 °C og 5 % CO₂.
3. Nytt medium tilsettes skålene rett før mikroskopering.

2.6 Western blotting

Western blotting er en teknikk som benyttes for å studere proteiner fra celleekstrakter eller fra homogeniserte vevsprøver, og teknikken består av flere definerte trinn. Ved elektroforese gjennom en SDS-polyakrylamidgel kan proteinene separeres med hensyn på størrelse. Ulik størrelse på proteinene, og gelens prosentvise innhold av akrylamid gjør at de vandrer gjennom gelen med ulik hastighet. Proteinene overføres til en nitrocellulosemembran, og kan dermed påvises av spesifikke antistoffer (Towbin *et al.* 1979). Denne overføringen gjøres ved hjelp av elektrisk strøm. For at det skal oppnås en mest mulig spesifikk binding mellom antistoffene og proteinet som skal studeres, blokkes membranen i 5 % tørrmelk med 1 % Tween. Etter blokking påsettes en løsning med primært antistoff, og membranen inkuberes over natt i et kjølerom eller i et par timer i romtemperatur. Protein-antistoffkomplekset kan identifiseres av et sekundært antistoff som spesifikt gjenkjenner det primære antistoffet. Det sekundære antistoffet er merket med enzymet horseradish peroxydase (HRP), og fremkallingsvæsken Super Signal West Femto inneholder enzymets substrat. Når dette substratet reagerer med HRP avgis det lys og dette lyset kan detekteres av et kamera. Lyssignalet er proporsjonalt med mengden protein på membranen.

2.6.1 Høsting av celler til Westernblotting

1. 2 % SDS (tabell 18) tilsettes protease- og fosfatasehemmere (tabell 18).
2. Mediet helles av store skåler (66,5 cm²) og restene pipetteres av.
3. Skålene vaskes to ganger med 3 ml iskald PBS (tabell 15).
4. Cellene høstes med 100 µl 2 % SDS tilsatt protease- og fosfatsehemmere fra en, eller eventuelt to skåler for å oppnå en tilfredsstillende mengde protein.
5. Cellene skrapes løs med en celledrape. Cellene skrapes løs over hele skålen i en retning, deretter skrapes det over hele skålen en gang til, men denne gangen vinkelrett på første skraping. Cellesuspensjonen overføres så til eppendorfrør som settes på is.
6. Cellesuspensjonen kokes på 95 °C i 2 minutter og fryses ved -70 °C.

Tabell 18: Løsninger brukt til å høste skåler til western blotting

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
2% SDS	20 % SDS MQ-vann	100 µl 900 µl
Proteasehemmere	Leupeptin (5 mg/ml) Pepstatin A (1 mg/ml) PMSF (100 mM)	1 µl 5 µl 3 µl
Fosfatasehemmer	Na ₃ VO ₄ (200 mM)	0,5 µl

2.6.2 Proteinmåling

1. Standardløsning (tabell 19) og working reagent (tabell 19) lages fra BCA Protein Assay Kit.
2. 12 brønner i en blank 96-brønners plate tilsettes standardløsning i riktige volumer (se eksempel side 53).
3. 10 µl celleprøve tilsettes i de neste brønnene. En prøve tilsettes 3 brønner (figur 1). Dersom cellelysaten er konsentrerte kan også mindre volumer benyttes, som 2,5 og 5 µl.
4. Alle brønnene tilsettes 200 µl working reagent.
5. 96-brønners platen inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂ i en time.
6. Absorbans måles ved 570 nm i en plateleser.

Eksempel på plateoppsett for proteinmåling

Blank	10 µl	Pr.1									
Blank	10 µl	Pr.2									
1 µl	20 µl	Pr.2									
1 µl	20 µl	Pr.2									
2,5 µl	40 µl	osv.									
2,5 µl	40 µl										
5 µl	Pr.1										
5 µl	Pr.1										

Pr. = Prøve

Tabell 19: Løsninger brukt til proteinmåling

Løsning	Innholdsstoffer	
Standardløsning	2 mg/ml bovint serum albumin (BSA) PBS (tabell 15)	50 µl 150 ml
Working reagent	BCA Protein Assay Reagent A BCA Protein Assay Reagent B	50 deler 1 del

2.6.3 Gelstøping

1. Glassplatene vaskes med etanol slik at fett fjernes, og støpeformen settes sammen.
2. Bufferløsninger for øvre og nedre gel lages (tabell 20).
3. Løsning for polyakrylamidgel lages (tabell 21).
4. Gelløsningen pipetteres over i rommet mellom glassplatene.
5. MQ-vann tilsettes på toppen av gelen for å få den helt rett.
6. Gelen stivner i løpet av 30-45 minutter.

7. MQ-vannet helles av. De siste restene suges vekk ved hjelp av papir.
8. Løsning for stacking gel lages (tabell 21) og helles over nedre gel. En kam med 10 tenner settes i gelen som stivner i løpet av 30-45 minutter.

Tabell 20: Løsninger brukt til gelstøping

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Nedre gelbuffer	Tris-base SDS (20%) MQ-vann - pH justeres til 8,8 med NaOH/HCl	18,17 g 2 ml ad 100 ml
Øvre gelbuffer	Tris-base SDS (20%) MQ-vann - pH justeres til 6,8 med NaOH/HCl	6,057 g 2 ml ad 100 ml

Tabell 21: Gelløsninger

Gelløsning	Innholdsstoffer	Mengde
Polyakrylamid gel 6 %, 1,5 mm	MQ-vann Nedre gelbuffer Akrylamid (30%) APS (10%) TEMED	5,5 ml 2,5 ml 2 ml 50 µl 8 µl
Polyakrylamid gel 8 %, 1,5 mm	MQ-vann Nedre gelbuffer Akrylamid (30%) APS (10%) TEMED	4,6 ml 2,7 ml 2,5 ml 100 µl 6 µl
Polyakrylamid gel 12 %, 1,5 mm	MQ-vann Nedre gelbuffer Akrylamid (30%) APS (10%) TEMED	3,3 ml 2,6 ml 4,0 ml 100 µl 4 µl
Stacking gel	MQ-vann Øvre gelbuffer Akrylamid (30%) APS (10%) TEMED	2,4 ml 1 ml 0,6 ml 20 µl 4 µl

2.6.4 Gelelektroforese

1. Glassplatene med gelen i mellom vaskes med kaldt vann for å fjerne søl.
2. Kammen tas forsiktig ut.
3. Glassplatene settes i et kar med den lille glassplaten inn mot midten i karet. Karet består av et indre og et ytre rom, og begge rommene fylles med elfobuffer (tabell 22).
4. En påføringsapplikator settes over gelen slik at det blir lettere å påføre prøvene.
5. Prøvene blandes med 4X Laemmli buffer i forholdet 1:3, eller med 2X Laemmli i forhold 1:1, avhengig av beregnet mengde protein i prøvene (tabell 23).
6. Blandingen kokes ved 95 °C i 5 minutter.
7. 5 µl standard (Prestion Plus Protein Dual Color Standard) påsettes den første brønnen.
8. Prøvevolumet som tilsettes brønnene beregnes slik at alle brønnene inneholder den samme mengden protein. Optimal proteinmengde per brønn er 50 µg. Maksimalt volum som kan tilsettes en brønn er 45 µl.
9. Prøvene ledes gjennom gjennom gelen på 150 V i ca 1 time.

Tabell 22: ELFO-buffer

Innholdsstoffer	Sluttkonsentrasjon
10X Tris/Glycine/SDS-buffer (TGS) fortynnes med 9 deler destillert vann til 1X TGS.	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
pH 8,3	

Tabell 23: Laemmlibuffere

Bufferløsninger	Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon i prøvene
10 ml 2X Laemmlibuffer	SDS (10%) Glyserol (50%) 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 2-merkaptoetanol Noen korn bromfenolblått - 2-merkaptoetanol og bromfenolblått tilsettes løsningen rett før bruk i avtrekk - Bufferen tilsettes prøvene i forhold 1:1	4,0 ml 2,0 ml 3,0 ml 1,0 ml	4% * 5 % 15 % 5 % * sluttkonsentrasjonen av SDS i prøvene blir 4% forutsatt at de er høstet i 2% SDS
10 ml 4X Laemmlibuffer	SDS (20 %) Glyserol (85%) 4 M Tris-HCl pH 6,8 2-merkaptoetanol MQ-vann Noen korn bromfenolblått - 2-merkaptoetanol og bromfenolblått tilsettes løsningen rett før bruk i avtrekk. - Bufferen tilsettes prøvene i forhold 1:3.	4,0 ml 2,35 ml 0,75 ml 2 ml 0,9 ml	4% * 5 % 15 % 5 % 9 % * sluttkonsentrasjonen av SDS i prøvene blir 4% forutsatt at de er høstet i 2% SDS

2.6.5 Blotting av gelen

1. Membran, skrubber og filterpapir legges i kar og fuktes i blottebuffer (tabell 24).
2. Gelen fjernes forsiktig fra glassplaten ved bruk av en plastspatel. Den øvre gelen skjæres vekk.
3. Et filterpapir legges over gelen og gelen løsner fra den tynne glassplaten med plastspatelen.
4. Gelen overføres til filterpapiret.

5. Gelen pakkes etter følgende oppsett:

- Gelholders svarte side legges ned
- Skrubbe
- Filterpapir som er festet til gelen
- Gel
- Membran
- Filterpapir
- Skrubbe
- Gelholderens hvite side

6. For å fjerne luft mellom gelen og membranen kan en stor plastpipette rulles over membranen.

7. Gelholderen settes i blottekaret hvor den svarte siden vendes mot karetts svarte del.

8. En magnetrører og en iskassett legges i blottekaret, og blottekaret fylles med blottebuffer (tabell 24) slik at gelpakken dekkes.

9. Blottekaret med gelpakken settes på kjølerommet, og kan enten kjøres over natten ved 50 mA eller i 2 timer ved 400 mA.

Tabell 24: Blottebuffer

Innholdsstoffer	Sluttkonsentrasjon
10 X Tris/Glycinbuffer (TG) fortynnes med 7 deler destillert vann og 2 deler metanol til 1 X TG.	
Tris	25 mM
Glysin	192 mM
Metanol	20% (v/v)
pH 8,3	

2.6.6 Farging og blokking av membranen

1. For å kontrollere at proteinene er jevnt overført fra gel til membran, legges membranen i et kar med Ponceaus fargeløsning (Sigma) i 1 minutt, slik at proteinbåndene farges. Fargeløsningen helles tilbake etter bruk. Dersom proteinene ikke er fordelt jevnt forkastes membranen.
2. Membranen vaskes 3 ganger i destillert vann for å fjerne rester av fargeløsningen.
3. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten. Røret tilsettes så 5 ml 5 % tørrmelk (tabell 25) i TBS med 0,1 % Tween (tabell 26). Røret legges til rulling på kjølerom til neste dag, eller i romtemperatur i 1-2 timer.

Tabell 25: 5% tørrmelk

Innholdsstoffer	Mengde
Tørrmelk	2,5 g
TBS med 0,1 % Tween - Oppbevares kjølig	50 ml

Tabell 26: Trisbufret saltvann med 0,1 % Tween (TBS-T)

Innholdsstoffer	Mengde
Tris base	12,1 g
NaCl	40 g
Tween 20	2,5 ml
MQ-vann	ad 500 ml
- Justeres til pH 7,6 med NaOH/HCl	
- 1 del 10X TBS fortynnes i 9 deler destillert vann til 1 X TBS med 0,1 % Tween før bruk.	
- Oppbevares kjølig	

2.6.7 Tilsats av primær- og sekundærantistoff

1. Primærantistoff tilsettes røret med 5 % tørrmelk (tabell 25) i TBS med 0,1 % Tween (tabell 26) i ulike blandingsforhold avhengig av hvilken type primærantistoff (tabell 27).
2. Røret legges til rulling på kjølerom til neste dag.

3. Membranen vaskes 3 ganger i 15 minutter med 5 ml TBS med 0,1 % Tween.
4. Sekundærantistoff (tabell 28) tilsettes røret i 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween i forhold 1:5000.
5. Røret legges til rulling i 1-2 timer i romtemperatur.
6. Membranen vaskes 3 ganger i 15 minutter med 5 ml TBS med 0,1 % Tween.

Tabell 27: Primære antistoffer brukt til Western blotting

Antistoff	Mengde	Primæranti-stoff	Lot.nr	Leverandør
GR	1:100	Sc 1004	J2908	Santa Cruz biotechnologies
NMDAR1	1:200	4042	1	Cell Signalling
NMDAR2A	1:100	Sc 1468	B1904	Santa Cruz biotechnologies
NMDAR2B	1:100	Sc 1469	C0606	Santa Cruz biotechnologies
NMDAR2C	1:100	Sc 31547	L3005	Santa Cruz biotechnologies
NMDAR3A	1:100	Cat.nr 07-356	22403	Upstate
NeuN	1:200	CA 92590	LV1634819	Millipore
PCNA clone PC10	1:200	M0879	593334	Dako
α -tubulin	1:200	Sc 5286	J1508	Santa Cruz biotechnologies

Tabell 28: Sekundære antistoffer brukt til Western blotting

Antistoff	Mengde	Sekundær-antistoff	Lot.nr	Leverandør
Donkey anti-goat	1:5000	Sc 2313	C2609	Santa Cruz biotechnologies
Sheep anti-mouse	1:5000	NA931V	382441	GE healthcare UK Limited
Donkey anti- goat	1:5000	Sc 2020	A1207	Santa Cruz biotechnologies
Anti-rabbit	1:5000	NA934VS	371622	GE healthcare UK Limited

2.6.8 Fremkalling

1. Super Signal West Femto detection reagent kit (Thermo Scientific) blandes i forhold 1:1.
2. Membranen tas ut av røret, og rester av TBS fjernes.
3. Membranen legges på en glassplate med proteinsiden opp.
4. 1 ml fremkallingsvæske dryppes jevnt over hele membranen og får virke i 5 minutter.
5. Overflødig fremkallingsvæske fjernes og membranen legges i en plastlomme.
6. Luft fjernes ved å trykke lett på plastomslaget.
7. Proteinbåndene fremkalles i Chemi Genius² fra Bio Imaging System (fremkallingsmaskin) med Genesnap som fremkallingsprogram.
8. Etter fremkalling kan membranen legges i et rør som fylles opp med TBS med 0,1 % Tween (tabell 26). Membranen legges kjølig, slik at den kan strippest på et senere tidspunkt.

2.6.9 Stripping av membranen

Dersom det er ønskelig å benytte seg av en membran flere ganger kan den strippest. Når membranen eksponeres for stripebuffer vil alle antistoffer som er festet til membranen fjernes, og dermed kan nye settes til.

1. Membranen inkuberes med 5 ml Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) i 15 minutter.
2. Membranen vaskes i rikelig TBS med 0,1 % Tween (tabell 26) i 15 minutter.
3. Membranen blokkjes med 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween. Røret legges til rulling på kjølerom til neste dag, eller i romtemperatur i 1-2 timer.
4. Nytt primærantistoff tilsettes, og samme prosedyre som under primærantistoff følges.

2.7 Eksponering av kyllingkornceller

2.7.1 Deksametason og etanol

Prosedyre for eksponering med deksametason og etanol

1. Mediet suges opp i en pipette for å se hvor mange ml medium som er i skålen.
2. Deksametason (tabell 29) og etanol tilsettes direkte i mediet i riktig volum i forholdet 1:1000. Etanolkonsentrasjonen i mediet blir 1 promille.

Tabell 29: 10 mM deksametasonløsning

Innholdsstoffer	Mengde
Deksametason	39,2 mg
Etanol	10 ml

Deksametasonløsningen ble så fortynnet videre i 96% etanol.

2.7.2 Glutamat i Lockes løsning

Prosedyre for eksponering med Lockes løsning

1. 3 ml eksponeringsløsning trengs for hver skål som skal eksponeres. Det beregnes ut fra dette hvor mye løsning som må lages. Det lages to rør. Ett rør tilsettes Lockes løsning med $MgCl_2$ (tabell 30) og det andre røret tilsettes Lockes løsning uten $MgCl_2$ (tabell 30). Lockes løsning uten $MgCl_2$ tilsettes et riktig volum med 10 mM glutamatløsning og 1 mM glysinløsning som beregnes etter volum eksponeringsløsning som behøves.
2. Mediet pipetteres av skålene og fjernes.
3. Cellene vaskes med 1 ml eksponeringsløsning.
4. Vaskeløsningen pipetteres av og fjernes.
5. 2 ml av den aktuelle eksponeringsløsningen tilsettes.
6. Skålene inkuberes i romtemperatur i 15 minutter.
7. Eksponeringsløsningen pipetteres av og fjernes.
8. Skålene vaskes med 1 ml ernæringsmedium (tabell 8).

9. Ernæringsmediet pipetteres av og fjernes.

10. Skålene tilsettes 2 ml ernæringsmedium.

11. Skålene inkuberes ved 37 °C i 5 % CO₂.

Tabell 30: Lockes løsning

Løsning	Innholdsstoffer	Slutt-konsentrasjon	Mengde
Lockes løsning uten MgCl ₂	NaCl	154 mM	9,00 g
	KCl	5,6 mM	0,42 g
	NaHCO ₃	3,6 mM	0,30 g
	CaCl ₂	2,3 mM	0,34 g
	Glukose	5,6 mM	1,00 g
	Hepes	5,0 mM	1,19 g
	Destillert vann		ad 1000 ml
	- Oppbevares kjølig		
	- Justeres til pH 7,4		
Lockes løsning med MgCl ₂	Inneholder de samme komponentene i samme mengde som Lockes løsning uten MgCl ₂ , men er i tillegg tilsatt:		
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,2 mM	244
	- Oppbevares kjølig		

2.7.3 NMDA-reseptorantagonistene MK-801 og CGP 39551

Kyllingkornceller ble preinkubert med NMDA-reseptorantagonistene MK-801 og CGP 39551 før de ble eksponert for henholdsvis deksametason eller glutamat. Antagonistene tilsettes Lockes løsning med eller uten MgCl₂ før de tilsettes kyllingkorncellene. De korncellene som skal eksponeres for glutamat etter preinkubering med antagonist vaskes og preinkuberes med Lockes løsning uten MgCl₂, mens de som skal eksponeres for deksametason, etanol eller buffer vaskes og preinkuberes med Lockes løsning med MgCl₂.

Prosedyre for preinkubering med antagonist

1. Mediet i skålene helles av, og rester fjernes med en pipette.
2. Cellene vaskes med 1 ml Lockes løsningsom inneholder MK-801 (tabell 31) eller CGP 39551 (tabell 32). Vaskeløsningen helles av, og rester fjernes med en pipette.
3. 2 ml Lockes løsning med antagaoonist tilsettes.
4. Skålene inkuberes i romtemperatur i 15 minutter.
5. Lockes løsning med antagonist helles av, og rester fjernes med en pipette.
6. Cellene er nå klare for å bli eksponert for deksametason eller glutamat, se punkt 2.7.1 og 2.7.2.

Tabell 31: 1 mM MK-801

Innholdsstoffer	Mengde
MK-801	10 mg
MQ-vann - Tilsatt i Lockes løsning i forhold 1:1000	29,64 ml

Tabell 32: 100 mM CGP 39551

Innholdsstoffer	Mengde
CGP 39551	10 mg
MQ-vann - Tilsatt i Lockes løsning i forhold 1:1000	0,420 ml

2.8 Farging av døde celler med trypanblå

Når celler dør vil deres cellemembran ikke lenger holde seg intakt, i motsetning til levende celler som beholder sin membranintegritet. Trypanblå fargeløsning vil kunne trenge gjennom membranen til de døde celle og farge disse (Tennant 1964). Dette er derfor en egnet metode for å detektere og telle døde celler i et lysmikroskop. Cellene farges og telles dagen etter at de har blitt eksponert.

Prosedyre for farging med trypanblå og deteksjon av celledød

1. To like mengder 2% trypanblå (tabell 33) og 1,8 % NaCl-løsning blandes (tabell 33). Det beregnes et passende volum etter ønsket antall skåler som skal farges og telles.
2. Cellemediets volum justeres til 1 ml, og 250 µl trypanblå fargeløsning tilsettes skålene. Skålene beveges forsiktig rundt slik at fargeløsningen blander seg jevnt i mediet.
3. Skålene inkuberes i 30 minutter ved 37 °C og 5 % CO₂.
4. Fargeløsningen til skålen som skal telles helles av. En og en skål telles ved å benytte et lysmikroskop. Celler som har blitt farget blå er døde, mens celler som ikke har blitt farget er levende. Døde og levende celler telles hver for seg.
5. Prosentvis celledød beregnes som antall blå celler delt på det totale antalle celler.

Tabell 33: Trypanblåløsning

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Trypanblå 2 %	Trypanblå MQ- vann - Blandingen varmes til det koker, mens flasken beveges. Kjøles ned og løsningen filtreres. Oppbevares i romtemperatur.	1 g 50 ml
NaCl 1,8 %	NaCl MQ-vann - Oppbevares i romtemperatur	1,8 g 100 ml

2.9 Grafer og statistikk

Grafer og tabeller ble laget i Microsoft Office Excel 2007. Alle figurer baserer seg på gjennomsnitt av flere uavhengige forsøk med standardfeil (SE). I de tilfellene hvor det kun ble gjort to forsøk presenteres figurene som gjennomsnitt med intervall. Til statistisk analyse av resultatene ble SigmaStat versjon 3.2 fra SPSS inc., Chicago, USA benyttet. For å sammenlikne gjennomsnittet av to grupper ble t-test brukt. Dersom dataene ikke besto testen for normalfordeling ble Mann-Whitney rank sum-test benyttet. Når flere grupper ble sammenliknet ble "One Way Analysis of Variance" brukt. Dersom dataene i gruppene ikke besto testen for normalfordeling ble en posthoc-test benyttet, enten i form av Kruskal-Wallis One Way ANOVA on ranks med Dunns metode, eller en Holm-Sidaks test.

Resultatene ble ansett som statistisk signifikante ved en p-verdi $<0,05$.

3 Resultater

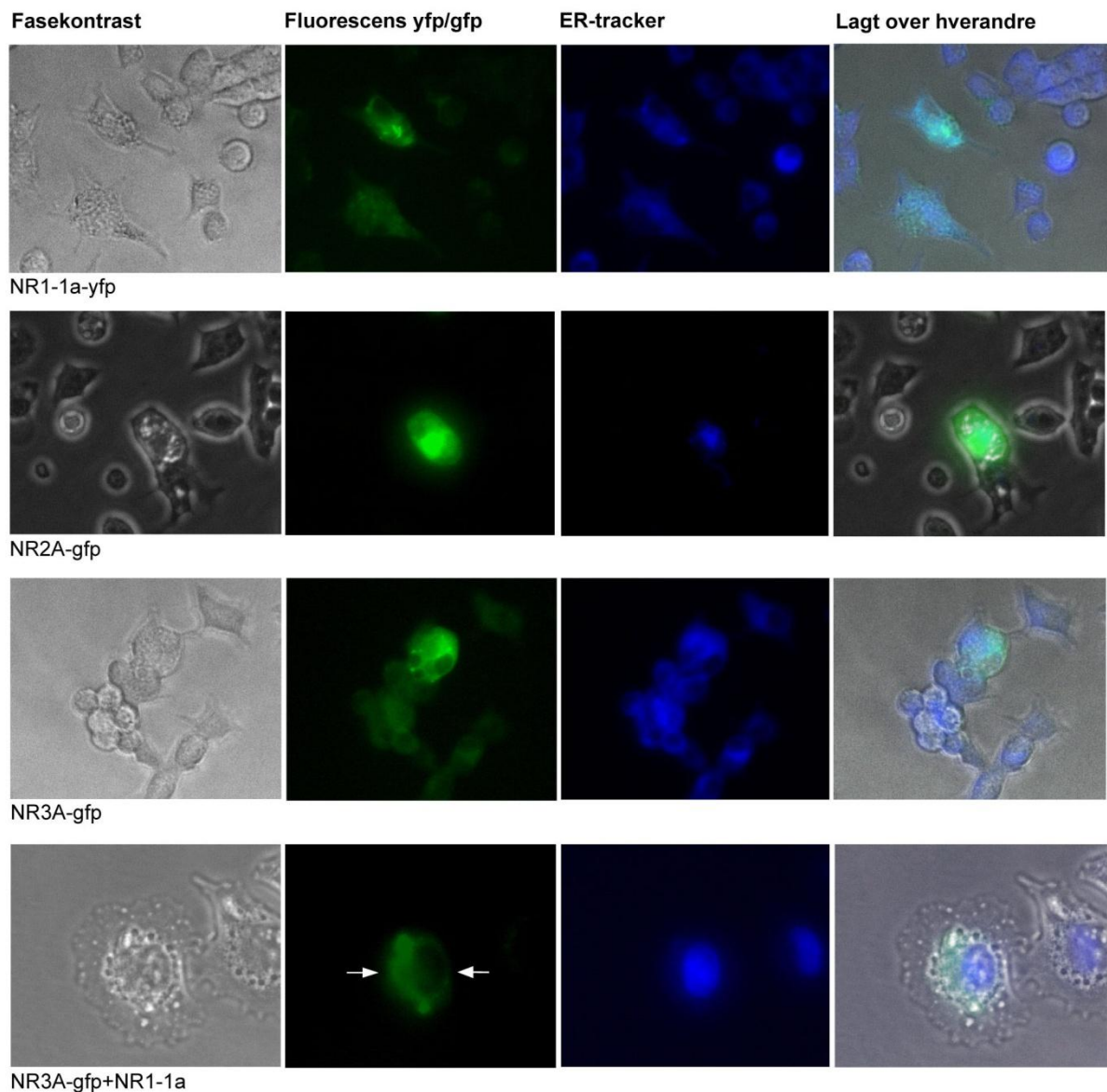
3.1 Intracellulær fordeling av NMDA-reseptorsubenheter og GR i PC12-celler

Ved bruk av transfeksjonsreagenset Metafectene PRO® ble PC12-celler transfektert med plasmider som koder for GR og NMDA-reseptorsubenheter som er merket med yfp eller gfp. To døgn etter transfeksjonen ble cellene studert i Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop med 40x-objektiv for å se hvor i cellene de gfp/yfp-merkede proteinene befinner seg. På denne måten var det mulig å finne ut hvordan disse fordelte seg intracellulært, og om PC12-cellelinjen er egnet for å studere en eventuell interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A.

3.1.1 Lokalisering av overuttrykte gfp/yfp-merkede NMDA-reseptorsubenheter

PC12-cellene ble transfektert med subenhetene NR1-1a-yfp, NR2A-gfp eller NR3A-gfp (fig. 1). Det har tidligere blitt vist i andre cellelinjer at subenheten NR3A må uttrykkes sammen med NR1-1a for å bli transportert til membranen (Perez-Otano *et al.* 2001; Schüler *et al.* 2008). Derfor ble NR3A-gfp ko-transfektet med NR1-1a for å kunne studere om dette var tilfelle også i PC12-celler (fig. 1, nederste rad). Det har også blitt vist at når NR3A uttrykkes sammen med NR1-1a, så vil det foreligge en reduksjon av mengde subenhet som akkumuleres i ER (McIlhinney *et al.* 1998; Perez-Otano *et al.* 2001). En ER-tracker ble derfor tilsatt celler som ble transfektert med NR3A-gfp og NR1-1a-yfp alene, og celler som ble ko-transfektet med NR3A-gfp og NR1-1a. Det ble så forsøkt å se om en ko-transfeksjon med NR3A-gfp og NR1-1a ga redusert ER-lokalisering. Ko-transfeksjon av NR3A-gfp sammen med NR1-1a viste lokalisering ut mot plasmamembranen i PC12-celler (fig. 1, nederste rad, se pil). Sammenliknet med bildene av celler transfektert med NR1-1a-yfp og NR3A-gfp alene (fig 1, første og tredje rad), hadde NR3A-gfp og NR1-1a-yfp sin lokalisering endret seg fra avgrensede områder rundt kjernen til områder ut mot plasmamembranen (fig. 1, nederste rad). Dette tydet på at NR3A-gfp og NR1-1a-yfp ikke lenger akkumuleres i ER. NR2A-gfp var fordelt jevnt utover hele cytoplasma i tillegg til at det var mye av dette proteinet i kjernen (fig 1, andre rad). NR3A-gfp fordelte seg i cytosol, og det var lite av proteinet i kjernen. Det var mer av proteinet

lokalisert i det som ser ut som vesikler i ER, men lokaliseringen var ikke begrenset til ER alene siden ER-trackeren bare delvis overlappet med lokaliseringen til NR3A-gfp (fig. 1, tredje rad).

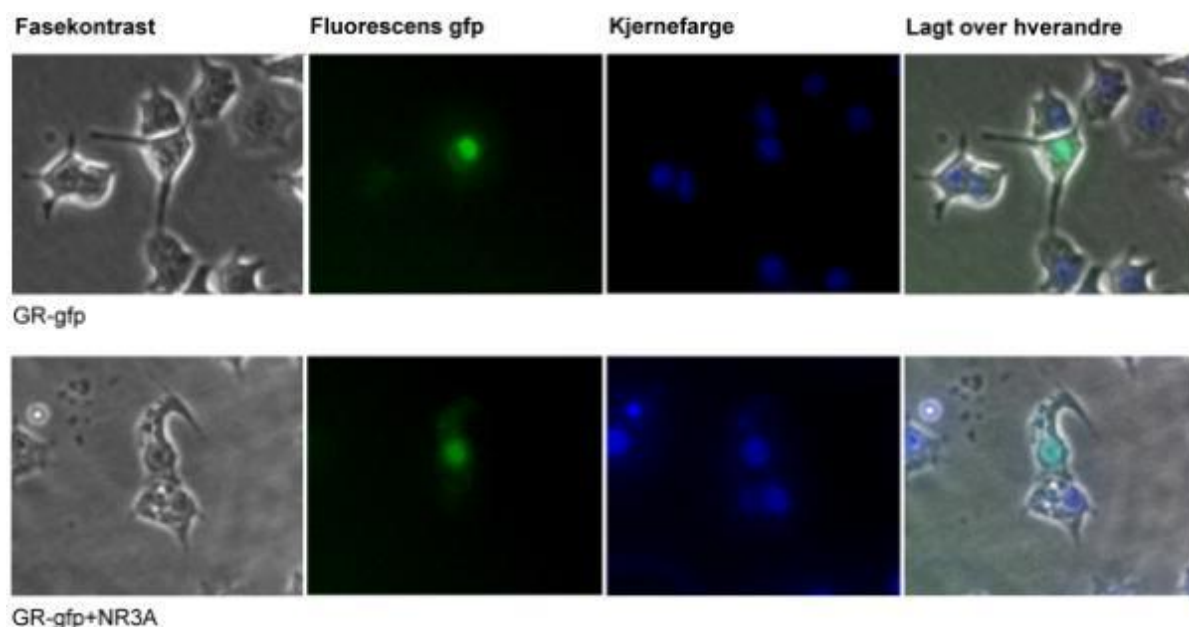


Figur 1: Lokalisering av NMDA-reseptorsubenheter i PC12-celler.

PC12-celler ble transfektert med enten NR1-1a-yfp (første rad), NR2A-gfp (andre rad), eller NR3A-gfp (tredje rad) og ko-transfektet med NR3A-gfp og NR1-1a (fjerde rad). To dager etter transfeksjonen ble cellene studert i et fluorescensmikroskop. Fra venstre mot høyre: Fasekontrastbilde, fluorescensbilde med yfp eller gfp (grønn farge), fluorescensbilde med ER-tracker (blå farge) og fasekontrastbilde der fluorescensbildene er lagt over hverandre. Bildene på nederste rad ble forstørret for å tydeligere vise cellen.

3.1.2 Lokalisering av GR-gfp og interaksjon med NR3A

For å kunne studere en eventuell interaksjon mellom GR-gfp og NR3A, ble PC12-cellene transfektert med GR-gfp alene eller ko-transfektet med NR3A (fig. 2). GR-gfp var kjernelokalisert i PC12-celler, men en mindre mengde protein var i cytoplasma (fig. 2, øverste rad). Når GR-gfp ble ko-transfektet med NR3A, forelå det også en kjernelokalisering, men som for GR-gfp alene, var det en mindre mengde protein i cytoplasma (fig. 2, nederste rad). Det ble tilsatt en kjernefarge for å se om ko-transfeksjonen endret kjernelokaliseringen til GR-gfp (fig. 2, nederste rad). Dersom ko-transfeksjonen viste at proteinene befant seg på samme sted i cellen, kunne en interaksjon være mulig. Det ble gjort forsøk der GR-agonisten deksametason ble tilsatt skåler transfektet med GR-gfp alene, og GR-gfp sammen med NR3A. Tilsats av GR-agonist vil føre til at GR translokerer fra cytoplasma til kjernen (Stahn *et al.* 2007). En interaksjon mellom GR og NR3A kan resultere i at GR blir holdt igjen i cytoplasma, slik at translokasjon til kjernen i mindre grad finner sted. Det var imidlertid vanskelig å se en forandring i GR-gfps lokalisering etter tilsats av deksametason i dette pilotforsøket (resultater ikke vist).



Figur 2: Lokalisering av GR-gfp alene og GR-gfp sammen med subenheten NR3A i PC12-celler. PC12-celler ble transfektet med GR-gfp alene eller ko-transfektet med GR-gfp+NR3A. To dager etter transfeksjonen ble cellene studert i et fluorescensmikroskop. Fra venstre mot høyre: Fasekontrastbilde, fluorescensbilde med gfp (grønn farge), fluorescensbilde med kjernefarge (blå farge) og fasekontrastbilde der fluorescensbildene er lagt over hverandre.

3.2 Reporterogenet GRE-luc i PC12- og CV-1-celler

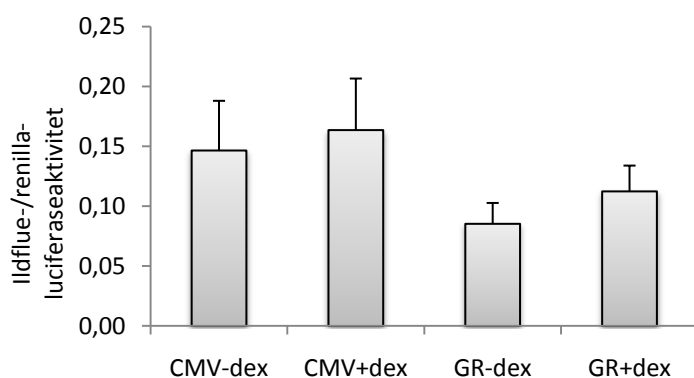
Det er tidligere foreslått i CV-1-celler at NR3A kan interagere med GR, men at NR1-1a ikke gjør det ved bruk av reporterogenet GRE-luc (Feng, 2009). Derfor ble PC12- og CV-1-celler transfektert med plasmidene GR, NR3A, NR1-1a og CMV sammen med GRE-luc. Transfeksjonsreagenset Metafectene PRO® ble benyttet til PC12-celler, og kalsiumklorid ble benyttet som transfeksjonsreagens til CV-1-celler. Plasmidet GRE-luc ble benyttet som reporterogen for GR i alle transfeksjonsforsøk. GRE-luc består av prolaktin pro36 basalpromotor med tre GRE som ligger oppstrøms for luciferasegenet. Når GR binder seg til GRE-luc fører dette til at luciferasetranskripsjonen starter. GRE-luc er derfor egnet som reporterogen for GR. GR-agonisten deksametason ble tilsatt alle skålene i konsentrasjon 1 nM fordi det tidligere har blitt vist i en masteroppgave at deksametason ga maksimal luciferaseproduksjon ved denne konsentrasjonen uten å være toksisk for cellene (Feng 2009). Et plasmid som koder for renillaluciferase (RL-tk), og som drives av en herpes simplex-virustymidinkinase-promotor som er konstitutiv aktiv, ble brukt som intern standard for å korrigere for forskjeller i transfeksjonseffektivitet og celletall mellom skålene. Det har tidligere blitt vist at renillaluciferase var egnet som internstandard i dette forsøksoppsettet, fordi renillaluciferaseverdier ikke lot seg påvirke av NMDA-reseptorsubenheter (Feng 2009). Deksametason ble løst i etanol og etanolen har en sluttkonsentrasjon på 1 promille. Kontrollskåler ble derfor tilsatt samme volum etanol. Dette ble gjort 24 timer etter transfeksjonen. 48 timer etter transfeksjonen ble luciferasemålinger utført med luminometet Lumat LB 9507 EG&G.

Hypotesen var at en interaksjon mellom GR og NR3A vil kunne ses som en reduksjon i ildfluoluciferaseaktivitet i cellene som ble ko-transfektet med disse plasmidene sammenliknet med celler som ble transfektet med GR alene når deksametason tilsettes. For å undersøke om en eventuell reduksjon i luciferaseaktivitet var et generelt fenomen forårsaket av ko-transfeksjonen, ble celler ko-transfektet med GR og NR1-1a. Alle resultater fra transfeksjon er vist som ildfluoluciferaseverdier korrigert med de korresponderende renillaluciferaseverdiene. Resultatene ble normalisert, og oppgitt som fraksjoner av enten CMV eller GR tilsatt 1 nM deksametason.

3.2.1 Interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og endogen GR i PC12-celler

Siden differensierte PC12-celler uttrykker GR endogent (Morsink *et al.* 2006) var det interessant å undersøke om endogent GR kunne aktiveres av 1 nM deksametason i vår PC12-cellelinje. CMV, et plasmid som ikke koder for noen proteiner, ble transfektert inn i PC12-celler sammen med GRE-luc (fig. 3). Dersom GRE-luc ga lucifereaseproduksjon etter tilsats av 1 nM deksametason, ville dette være et uttrykk for at lucifereaseproduksjonen var forårsaket av aktivert endogen GR. Det ble produsert luciferease i cellene eksponert for deksametason eller etanol, men det var ingen signifikant forskjell fra etanolkontrollen (fig. 3). Rådataene viste at ildfluolucifereaseaktiviteten var høyere enn for endogen GR, men renillalucifereaseaktiviteten var også større med transfektert GR, slik at ildflue/renilla-ratioen ble lavere (tallmateriale som figur 3 og 4 er basert på).

CMV og GR

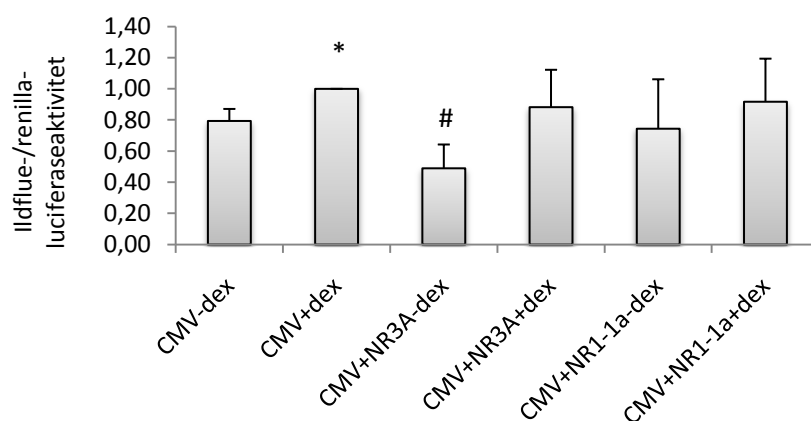


Figur 3: Det ble produsert luciferease i PC12-cellelinjen eksponert for deksametason eller etanol
PC12-celler ble transfektert med GRE-luc og GR eller CMV og eksponert for etanol alene eller etanol tilsatt 1 nM deksametason etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluolucifereaseaktivitet delt på renillalucifereaseaktivitet etter 48 timer med SE, n=8-10. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom lucifereaseaktiviteten til CMV og GR verken når de er eksponert for etanol alene eller etanol tilsatt 1 nM deksametason.

Videre ble PC12-celler ble transfektert med CMV alene og CMV sammen med NR3A eller NR1-1a for å undersøke om det var en interaksjon mellom endogen GR og NR3A forårsaket av deksametason (fig. 4). Resultatene ble normalisert mot CMV tilsatt 1 nM deksametason (fig. 4). Resultatet viste at målingen med CMV tilsatt 1 nM deksametason var signifikant høyere enn den korresponderende etanolkontrollen, og at NR3A ko-transfektet med CMV tilsatt etanol var signifikant lavere enn CMV

alene (fig. 4). Det var en signifikant høyere luciferaseaktivitet i gruppene som ble tilsatt deksametason sammenliknet med de som ikke ble tilsatt deksametason.

CMV og NR3A



Figur 4: Endogen GR i PC12-celler aktiveres av deksametason.

PC12-celler ble transfektert med RL-tk, GRE-luc, cmv og subenhetene NR3A eller NR1-1a og eksponert for etanol alene eller etanol tilsatt 1 nM deksametason etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=9-10. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. * betyr at målingen med CMV tilsatt 1 nM deksametason er statistisk signifikant forskjellig fra den korresponderende etanolkontrollen. # betyr at det er en statistisk signifikant forskjell mellom CMV tilsatt etanol og CMV+NR3A tilsatt etanol. Det var en statistisk signifikant forskjell mellom alle gruppene som ble tilsatt etanol alene og gruppene som ble tilsatt etanol med 1 nM deksametason.

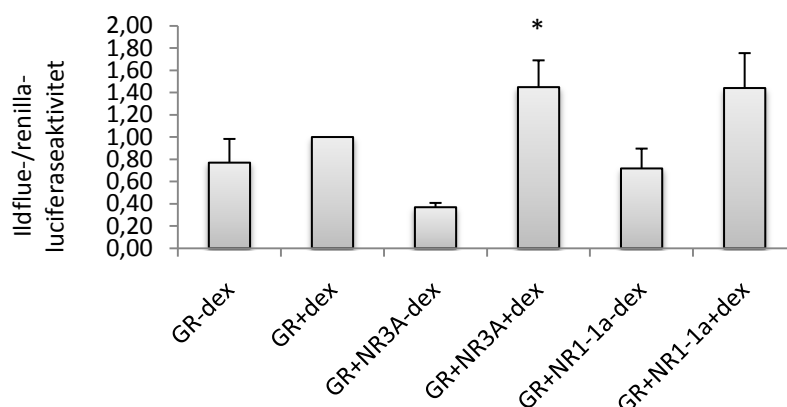
Tallmateriale som figur 3 og 4 er basert på

	Gjennomsnitt ildluciferaseaktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferaseaktivitet	SE	Antall forsøk
CMV-dex	253	82	4596	2164	9
CMV+dex	282	71	4396	1775	10
GR-dex	343	102	8092	4055	8
GR+dex	947	397	13178	4899	10
CMV+NR3A-dex	285	80	6785	1865	9
CMV+NR3A+dex	322	62	5975	1509	10
CMV+NR1-1a-dex	275	54	8207	2594	10
CMV+NR1-1a+dex	463	114	7887	2315	10

3.2.2 Interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og overuttrykt GR i PC12-celler

Fordi en interaksjon mellom endogen GR og NR3A med deksametason ikke lot seg påvise, ble det undersøkt om det kunne foreligge en interaksjon mellom overuttrykt GR og NR3A (fig. 5). Resultatene ble normalisert mot GR tilsatt 1 nM deksametason. Resultatet viste at GR ko-transfektet med NR3A tilsatt 1 nM deksametason var signifikant høyere sammenliknet med den korresponderende etanolkontrollen. Det var ingen signifikant forskjell mellom de andre målingene. Det var en signifikant høyere luciferaseaktivitet i gruppene som ble tilsatt deksametason sammenliknet med de som ikke ble tilsatt deksametason.

GR og NR3A



Figur 5: Overuttrykt GR i PC12-celler aktiveres av deksametason.

PC12-celler ble transfektet med RL-tk, GRE-luc, GR og subenheten NR3A og NR1-1a og eksponert for enten etanol alene eller etanol tilsatt 1 nM deksametason etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer med SE i prosent, n=8-11. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. * betyr at målingen med GR+NR3A tilsatt 1 nM deksametason er statistisk signifikant høyere enn den korresponderende etanolkontrollen. Det var en statistisk signifikant forskjell mellom gruppene som ble tilsatt deksametason og de som ikke ble tilsatt deksametason.

Tallmateriale som figur 5 er basert på

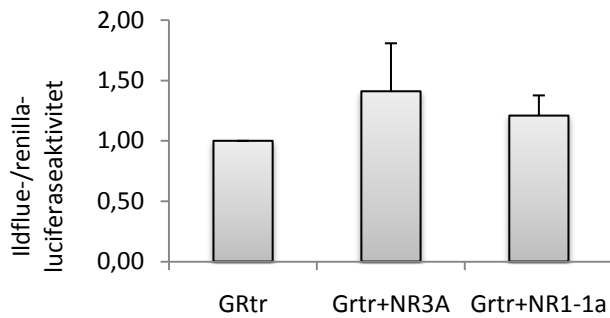
	Gjennomsnitt ildfluoluciferase- aktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferase- aktivitet	SE	Antall forsøk
GR-dex	343	102	8092	4055	8
GR+dex	947	397	13178	4899	10
GR+NR3A-dex	244	53	28467	18012	10
GR+NR3A+dex	865	269	22755	12577	11
GR+NR1-1a-dex	495	149	40683	25069	10
GR+NR1- 1a+dex	1420	398	46978	29988	11

3.2.3 Transfeksjon av PC12-celler med GRtr og NMDA-reseptorsubenheten NR3A og NR1-1a

GRtr-plasmidet koder for en glukokortikoidreseptor som mangler det ligandbindende domenet som er lokalisert til karboksylterminalen. Reseptoren er ikke bundet til heat shock-proteiner i cytoplasma, og kan binde seg til GRE og aktivere gentranskripsjon uten å bli aktivert av en ligand (Danielsen *et al.* 1987). Dersom karboksylterminalen i GR er involvert i en interaksjon med NR3A, er det forventet at ildfluoluciferaseverdiene ikke reduseres i celler ko-transfektet med GRtr og NR3A.

I dette forsøket har PC12-celler blitt transfektet med GRtr alene, og GRtr sammen med subenheten NR3A (fig. 6). Subenheten NR1-1a har blitt brukt som kontroll for en eventuell effekt av ko-transfeksjonen. Fordi GRtr er konstitutiv aktiv har det ikke blitt tilsatt ligand. Resultatene ble normalisert mot GRtr. Resultatet viste at GRtrs konstitutive luciferaseaktivitet i liten grad ble påvirket av ko-transfeksjon med NMDA-reseptorsubenhetene NR3A og NR1-1a (fig. 6).

GRtr og NR3A eller NR1-1a



Figur 6: NMDA- reseptorsubenheterne NR3A og NR1-1a påvirker i liten grad GRtrs konstitutive luciferaseaktivitet.

PC12-celler ble transfektert med RL-tk, GRE-luc, GRtr og subenheterne NR3A og NR1-1a. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n= 11-12. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene der GRtr ble ko-transfektet med subenheterne NR3A og NR1-1a sammenliknet med når GRtr ble transfektet alene.

Tallmateriale som figur 6 er basert på

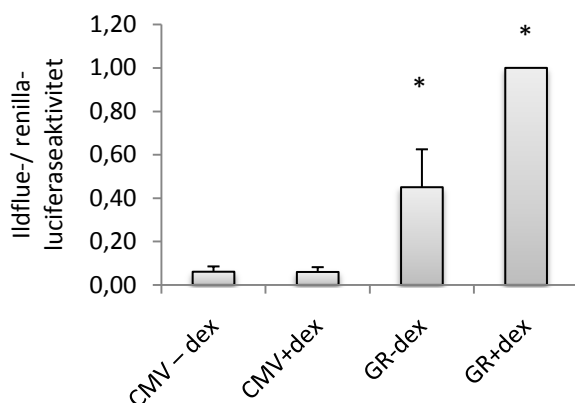
	Gjennomsnitt ildfluelluciferaseaktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferaseaktivitet	SE	Antall forsøk
GRtr	145	29	47999	19107	11
GRtr+NR3A	248	44	43393	19544	11
GRtr+NR1-1a	403	120	59625	21975	12

3.2.4 Transfeksjon av CV-1-celler med GR og NMDA- reseptorsubenheteren NR3A

Siden studien av PC12-celler ga et annet resultat enn det en tilsvarende studie i CV-1-celler har vist, ble forsøket gjentatt i CV-1-celler. For å undersøke om det var en interaksjon mellom GR og NR3A i cytoplasma i CV-1-celler ble GR ko-transfektet med NMDA-reseptorsubenheteren NR3A. CMV ble benyttet som en negativ kontroll fordi CV-1-celler ikke uttrykker endogen GR. CMV ga minimal luciferaseaktivitet i CV-1-celler sammenliknet med overuttrykt GR (fig. 7). Subenheteren NR1-1a ble benyttet som en kontroll fordi det ikke ble forventet at denne subenheteren skulle gi en nedgang i luciferaseaktivitet når denne ko-transfekteres med GR og tilsettes ligand. Resultatene ble normalisert mot GR tilsatt 1 nM deksametason. Tall som befant seg mer enn tre standardavvik fra gjennomsnittet ble definert som uteliggere, og ikke tatt med i figuren.

Resultatet viste at det var en nedgang i luciferaseaktivitet når ble GR ko-transfektet med NR3A og tilsatt 1 nM deksametason sammenliknet med GR alene (fig. 8).

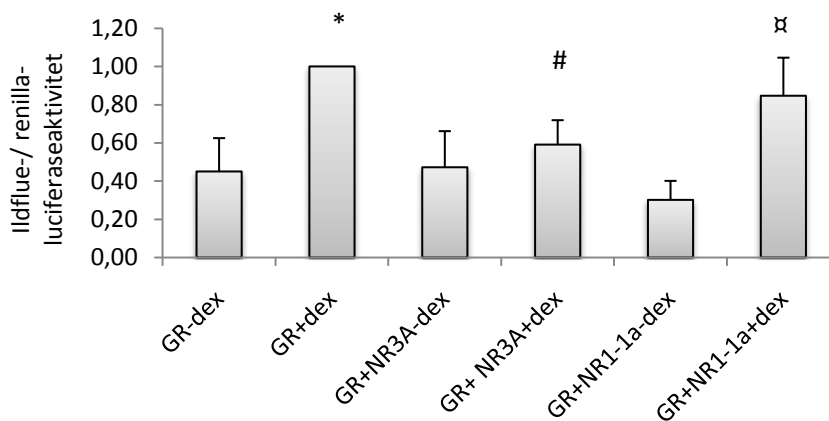
CMV og GR



Figur 7: CMV er egnet som en negativ kontroll ved transfeksjon av CV-1-cellelinjen.

CV-1-celler ble transfektet med RL-tk, GRE-luc, GR og CMV, og eksponert for etanol alene eller etanol med 1nM deksametason etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluLuciferaseaktivitet delt på renillaLuciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=10-12. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. * betyr at målingene med GR med eller uten etanol tilsatt 1 nM deksametason er statistisk signifikant forskjellige fra målingene med CMV med eller uten etanol tilsatt 1 nM deksametason.

GR og NR3A



Figur 8: Ved ko-transfeksjon av GR og NR3A i CV-1-celler ble luciferaseaktiviteten redusert sammenliknet med GR alene.

CV-1-celler ble transfektert med RL-tk, GRE-luc, GR og subenhetene NR3A og NR1-1a, og eksponert for henholdsvis 1nM deksametason og etanol etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=10-12. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk.* betyr at målingene der GR tilsatt etanol og 1 nM deksametason er statistisk signifikant forskjellige fra den korresponderende etanolkontrollen. # betyr at målingene med GR+NR3A tilsatt etanol og 1 nM deksametason er statistisk signifikant forskjellige sammenliknet med målinger med GR tilsatt etanol og 1 nM deksametason. α betyr at GR+NR1-1a tilsatt etanol og 1 nM deksametason er statistisk signifikant forskjellig fra den korresponderende etanolkontrollen.

Tallmateriale som figurene 7 og 8 er basert på

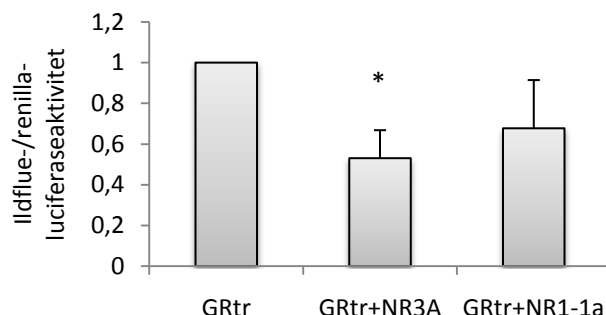
	Gjennomsnitt ildflueluciferaseaktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferaseaktivitet	SE	Antall forsøk
CMV-dex	1298	808	131504	97538	12
CMV+dex	1396	718	67849	41310	12
GR-dex	103649	89959	63933	50030	11
GR+dex	248851	133331	104040	91306	11
GR+NR3A-dex	85528	77587	77165	60997	11
GR+NR3A+dex	165229	97780	73040	61090	11
GR+NR1-1-dex	77070	73747	78647	66599	11
GR+NR1-1a+dex	115608	74660	75469	62492	10

3.2.5 Transfeksjon av CV-1-celler med GRtr og og NMDA-reseptorsubenhetene NR3A og NR1-1a

CV-1-celler ble transfektert med GRE-luc, GRtr alene, og GRtr sammen med NR3A. NR1-1a ble brukt som kontroll. Fordi GRtr er konstitutiv aktiv har det ikke blitt tilsatt ligand. Resultatene ble normalisert mot GRtr. Resultatene viste at den konstitutive

aktiviteten til GRtr økte signifikant ved ko-transfeksjon med NMDA-reseptorsubenheterne NR3A og NR1-1a, sammenliknet med GRtr alene (fig. 9).

GRtr og NR3A eller NR1-1a



Figur 9: GRtr konstitutive luciferaseaktivitet minker når GRtr ko-transfekteres med NMDA-reseptorsubenheterne NR3A og NR1-1a.

CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk og GRtr og subenhetene NR3A og NR1-1a. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 2 døgn i prosent med SE, n=7-11. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. * betyr at resultatene fra ko-transfeksjonen med GRtr og NR3A og var statistisk signifikant forskjellig fra transfeksjon med GRtr alene.

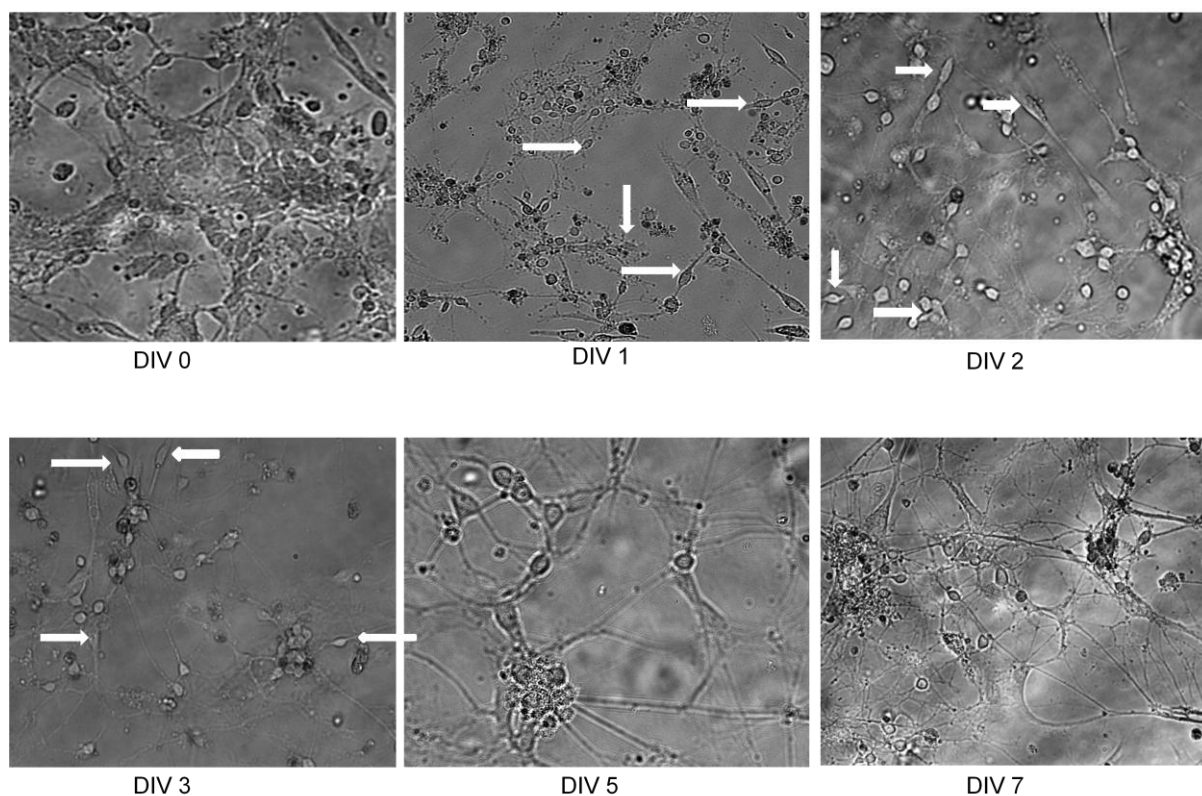
Tallmaterialet som figur 9 er basert på

	Gjennomsnitt ildfluelluciferaseaktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferaseaktivitet	SE	Antall forsøk
GRtr	35047	14746	36422	8038	11
GRtr+NR3A	59597	27472	127711	86153	7
GRtr+NR1-1a	73074	32146	146071	94978	8

3.3 Kyllingkorncellers morfologiske utvikling i kultur

Det var ønskelig å studere GR og NMDA-reseptorsubenheter i kornceller fra lillehjerne under utvikling, siden de kan ha en spesiell sårbarhet for deksametason. Siden det har blitt rapportert at kornceller fra mus og rotte gjennomgår en utvikling *in vivo*, der deres morfologi forandrer seg gjennom utviklingen, var det interessant å studere om dette også gjelder for kyllingkornceller når disse får utvikle seg i kultur. Det ble derfor tatt bilder av kyllingkornceller fra lillehjernen på ulike tidspunkter, fra utplatingsdagen, dag 0 *in vitro* (DIV 0) til dag DIV 7 (fig.10). Alle kulturskåler ble tilsatt Cytosine β -D-arabino-furanoside (ARA-C) dagen etter utplating. Bildene viser at kyllingkorncellene lå i store klynger dagen de ble platet ut. Fra DIV 0 til DIV 1 og 2 var det en uttalt celledød, der mange celler falt av skålen. Korncellene dannet

utløpere, noe som var synlig fra DIV 2 og 3. På DIV 5 og 7 hadde cellene en tendens til å danne klynger, og mange av korncellene har dødd og falt av skålen. Det så ut til at kornceller som etablerte synaptiske kontakter med andre kornceller var de som overlevde i kultur. Det så også ut til at korncellenes cellekropp forandret sin morfologi når de fikk utvikle seg i kultur. Noen kornceller hadde en avlang fasong (se piler), mens andre var mer globulære. De avlange korncellene var først og fremst å se på tidlige tidspunkter etter utplating til kultur. På DIV 5 og 7 hadde korncellene en mer globulær karakter.

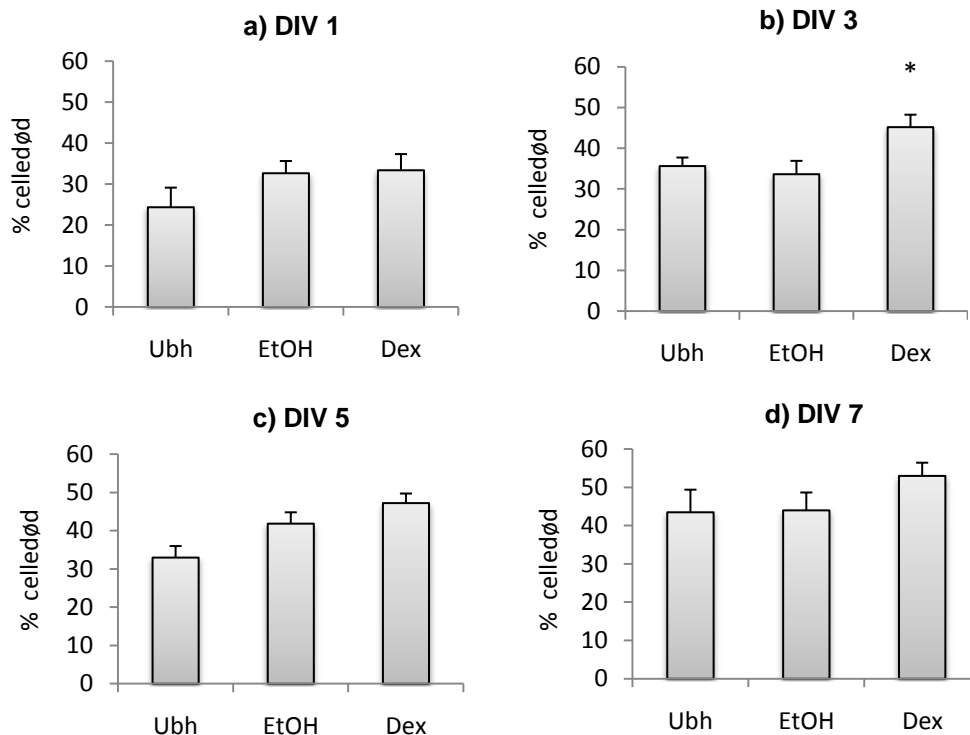


Figur 10: Morfologisk utvikling av kyllingkorncellekulturer fra lillehjerne.

Bilder er tatt av ubehandlede kyllingkornceller på utplatingdage (DIV 0), og på DIV 1, 2, 3, 5 og 7. Pilene peker på kornceller som er eksempler på celler med avlang morfologisk karakter.

3.4 Utvikling av deksametasonindusert celledød i korncellekulturer fra kylling

Det har tidligere blitt vist at deksametason induserer celledød i umodne kyllingkornceller fra lillehjernen (Aden *et al.* 2008), men det har ikke blitt undersøkt om denne deksametasoninduserte celledøden kan knyttes opp mot kyllingkorncellenes utviklingsstadier i kultur. Det har tidligere blitt rapportert at neonatale rottekornceller fra lillehjernen inneholder det høyeste nivået av glukokortikoidreseptorer i hjernen (Pavlík og Buresová 1984). Det var interessant å undersøke om GR-uttrykket forandrer seg når kyllingkorncellene får utvikle seg i kultur, og om en deksametasonindusert celledød påvirkes av dette reseptoruttrykket, og det ble satt opp en tidsserie der kyllingkorncellene ble eksponert for 10 μ M deksametason på henholdssvis DIV 1, 3, 5 og 7 (fig. 11a-d). Fordi deksametason ble løst i etanol ble tilsvarende mengde etanol tilsatt kontrollskåler. En skål ved hvert eksponeringstidspunkt ble ikke behandlet for å kunne studere basaldøden til korncellene (fig 11a-d). Cellene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer etter eksponering, og celledøden ble kvantifisert ved å telle døde trypanblåfargede celler og levende celler i et lysmikroskop. Resultatet viste at den deksametasoninduserte celledøden på DIV 3 var signifikant høyere enn etanolkontrollen (fig. 11b). På DIV 1 det var det en tendens til at etanol er toksisk for korncellene, men forskjellen var ikke signifikant fra ubehandlede celler (fig. 11a).



Figur 11 a-d: Deksametasonindusert celledød hos kyllingkornceller fra lillehjerne.

Korncellene ble eksponert for 10 μ M deksametason på dag 1, 3, 5 og 7 i kultur. 24 timer etter eksponering ble celledøden kvantifisert ved trypanblåfarging og telling i lysmikroskop. Figurene viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med SE, n= 6-8. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. * betyr at at den deksametasoninduserte celledøden er statistisk signifikant forskjellig fra etanolskålene.

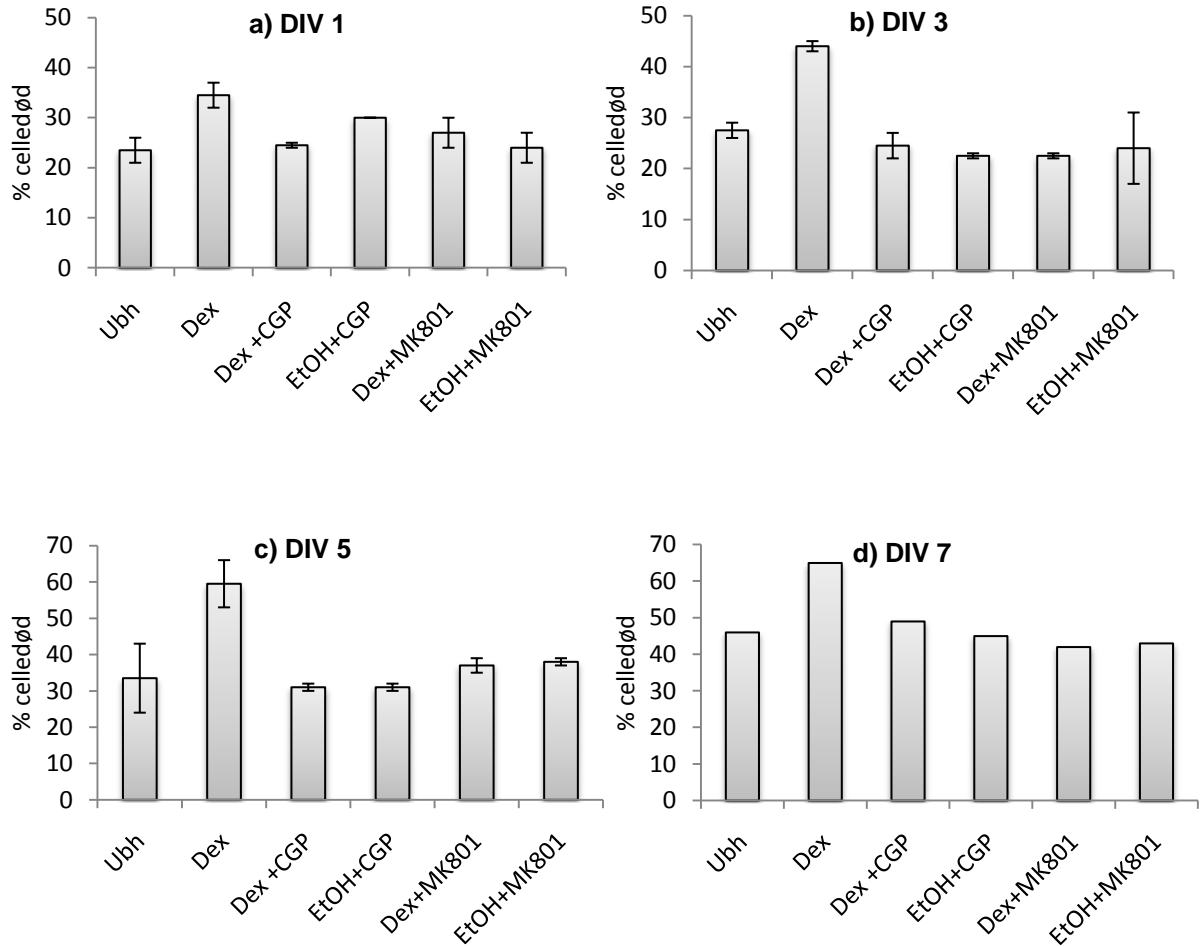
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 11 a-d

DIV 1	Snitt	SE	Antall forsøk	DIV 3	Snitt	SE	Antall forsøk
Ubh	24,3	10,1	8	Ubh	35,6	4,6	8
EtOH	32,6	6,2	8	EtOH	33,6	7,2	8
Dex	33,4	9	8	Dex	45,2	6,5	8
DIV 5	Snitt	SE	Antall forsøk	DIV 7	Snitt	SE	Antall forsøk
Ubh	33	6,8	8	Ubh	43,5	10,2	6
EtOH	41,9	7,1	8	EtOH	44	11,4	6
Dex	47,3	4,7	8	Dex	53	8,5	6

3.4.1 NMDA-reseptorantagonisters påvirkning på celledød i deksametasoneksponerte kyllingkornceller

Siden det er foreslått at deksametasom øker Ca^{2+} -innstrømming gjennom NMDA-reseptoren (Takahashi *et al.* 2002), var det interessant å studere om deksametasonindusert celledød lar seg blokkere av en NMDA-reseptorantagonist, og om en eventuell blokkering var forbundet med cellenes utvikling i kultur. I en tidsserie ble kyllingkornceller behandlet med den ikke-kompetitive NMDA-reseptorantagonisten MK-801 (1 μM) og den kompetitive CGP 33951 (100 μM) på DIV 1, 3, 5 og 7 før de ble eksponert for deksametason (10 μM) etter 15 minutter (fig. 12a-d). Etanol tilsatt 1 μM MK-801 eller 1 mM CGP 33951 ble benyttet som kontroller, mens en skål fra hvert tidspunkt forble ubehandlet for å kunne studere korncellenes basaldød på hvert enkelt tidspunkt. Etter eksponering ble korncellene inkubert i 24 timer, og celledød ble kvantifisert ved å telle døde trypanblåfargede celler og levende celler i lysmikroskop.

Ved å benytte tallmaterialet fra etanoleksponerte kornceller som kontroll for deksametasonindusert celledød, (fig. 11a-d) så viste resultatene at på DIV 1 og 3 var det minimal forskjell i celledød mellom celler som ble eksponert for deksametasom, og etanoleksponerte celler på samme tidspunkt. Både på DIV1 og 3 var etanoldøden større enn basaldøden (fig. 11a/b og 12a/b). På DIV 3 så det ut til at antagonistene reduserte den etanolinduserte celledøden (fig. 11b og 12b). På DIV 5 blokkerte antagonistene for den deksametasoninduserte celledøden (fig. 11c og 12c), og på DIV 7 var det en tendens til det samme (fig. 11d og 12d). Dette forsøket var en pilotstudie der det har blitt gjennomført 1-2 paralleller, resultatene bør derfor tolkes med forsiktighet.



Figur 12 a-d: NMDA-reseptorantagonistene MK-801 og CGP 33591 reduserer celledød hos deksametasoneksponerte kyllingkornceller.

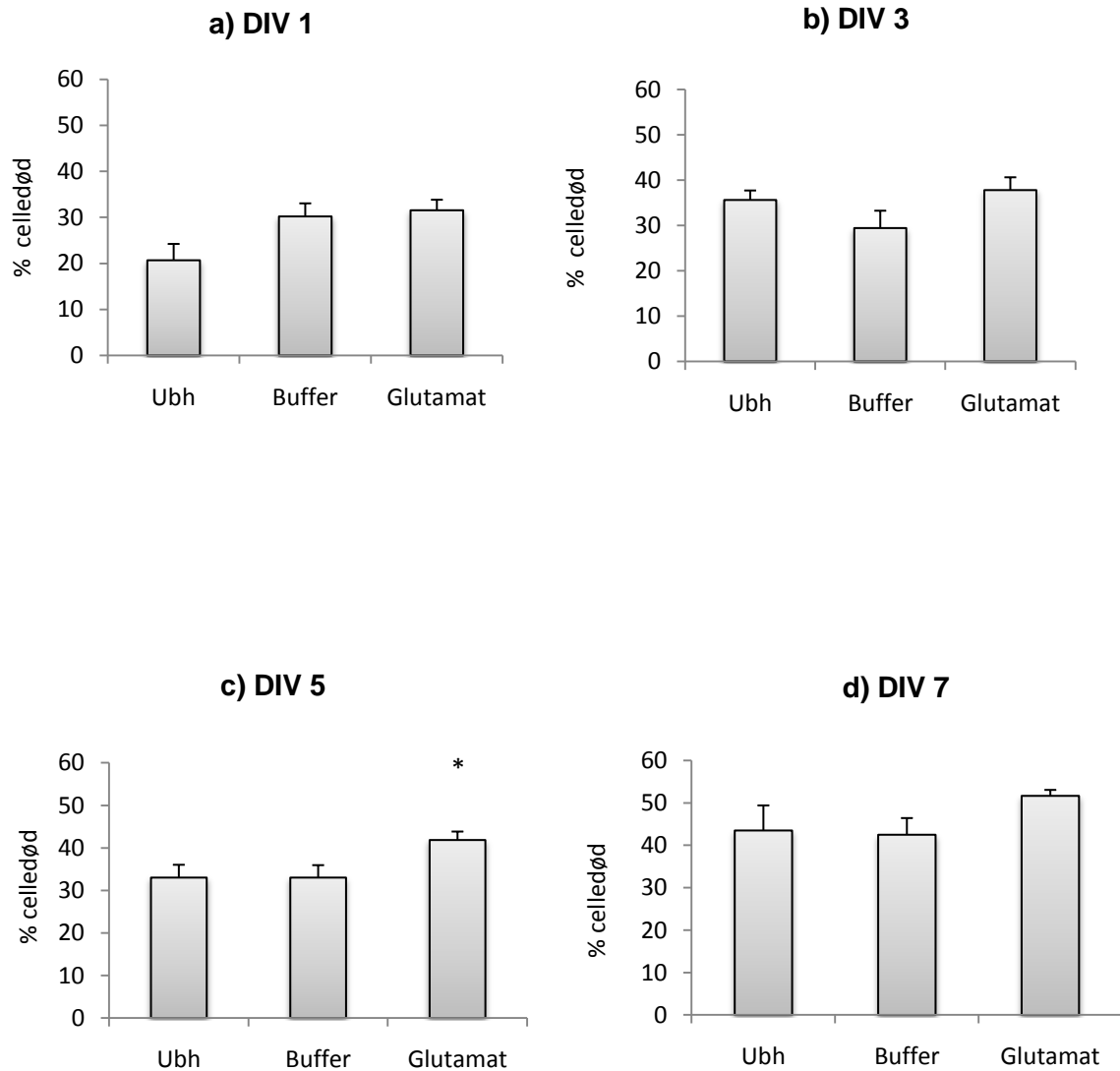
Korncellene ble eksponert for NMDA-reseptorantagonistene MK-801 (1 μ M) og CGP 33591 (100 μ M) på DIV 1, 3, 5 og 7 for deretter å bli eksponert for deksametason (10 μ M). Celledøden ble kvantifisert ved å telle trypanblåfargede celler i lysmikroskop 24 timer etter eksponering. Figurene viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med intervall, n=1- 2. På DIV 7 ble det kun gjort ett forsøk.

Tallmateriale som figurene 12 a-d er basert på

	Gjennomsnitt DIV 1	Intervall DIV 1	Gjennomsnitt DIV 3	Intervall DIV 3	Gjennomsnitt DIV 5	Intervall DIV 5	Antall forsøk DIV 7	Antall forsøk
Ubh	24	21-26	28	26-29	34	24-43	46	1-2
Dex	35	32-37	44	43-45	60	53-66	65	1-2
Dex+ CGP 33591	25	24-25	25	22-27	31	30-32	49	1-2
Dex+MK-801	27	24-30	23	22-23	37	35-39	42	1-2
EtOH + CGP 33591	30	30-30	23	22-23	31	30-32	45	1-2
EtOH + MK-801	24	21-27	24	17-31	38	37-39	43	1-2

3.5 Utvikling av glutamatindusert celledød i korncellekulturer fra kylling

NMDA-reseptorens subenhets sammensetning forander seg under korncellenes utvikling (Komuro og Yacubova 2003). For å finne ut om glutamattoksisitet kunne knyttes opp mot korncellenes utviklingsstadiet, ble kornceller fra kylling eksponert for glutamat (100 μ M) på DIV 1, 3, 5 og 7. Glutamat ble tilført en bufferløsning, og kontrollskåler ble derfor eksponert for denne bufferløsningen. En skål på hvert tidspunkt forble ubehandlet, slik at korncellenes basaldød kunne studeres. Cellene ble inkubert i 24 timer etter eksponering, og celledøden ble kvantifisert ved å telle trypanblåfargede celler i lysmikroskop. Resultatene viste at det på DIV 5 var det en signifikant forskjell mellom celledøden i glutamateksponert skål sammenliknet med bufferkontrollen. På DIV 7 var det en tendens til en glutamatindusert celledød (fig. 13 a-d).



Figur 13 a-d: Glutamatindusert celledød i kyllingkornceller fra lillehjerne.

Korncellene ble eksponert for glutamat (100 μ M) på DIV 1, 3, 5 og 7. 24 timer etter eksponering ble celledøden kvantifisert ved trypanblåfarging og telling i lysmikroskop. Figurene viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med SE. n=6-8. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. * betyr at den glutamatinduserte celledøden er statistisk signifikant forskjellig fra celledøden i skåler som er behandlet med bufferløsning.

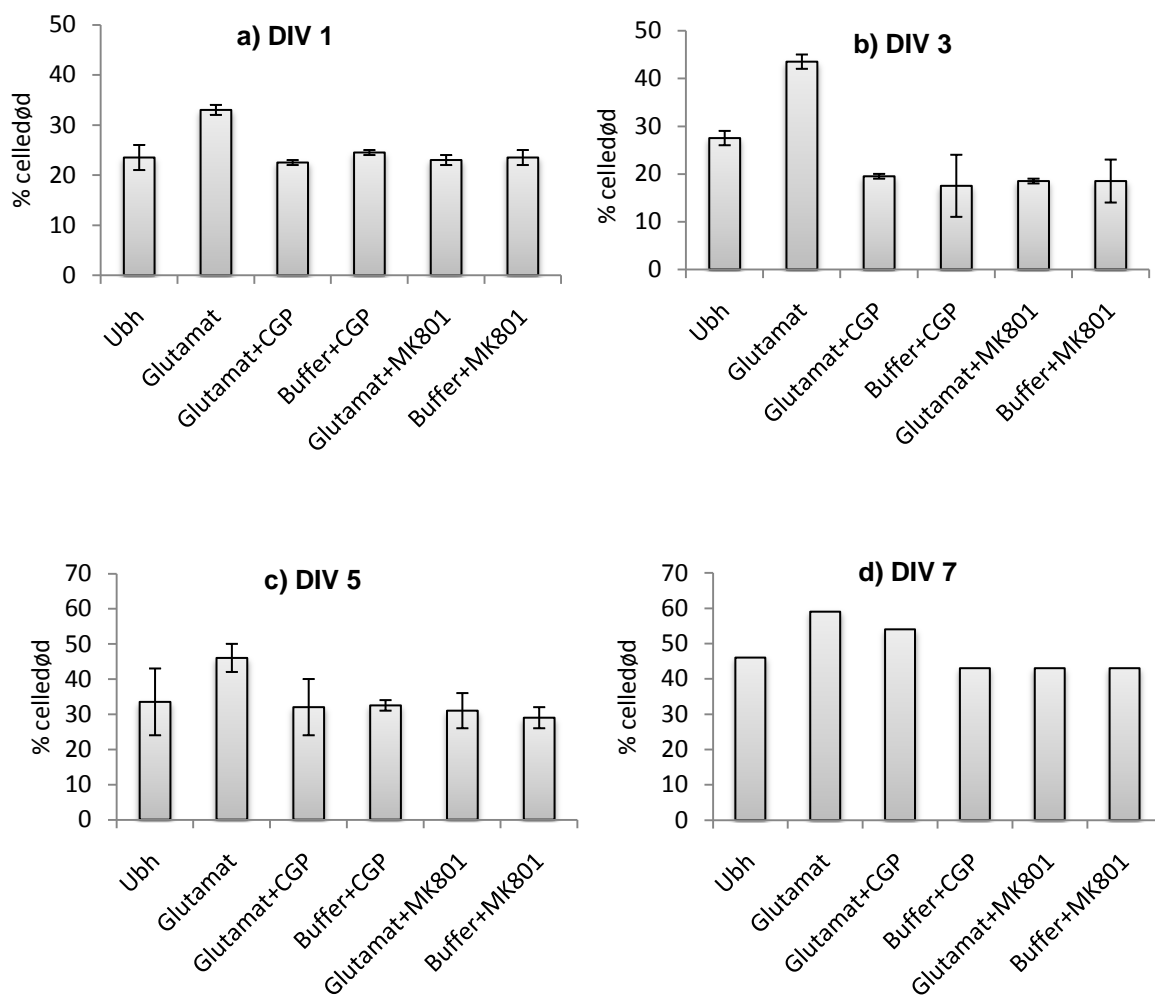
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 13 a-d

DIV 1	Snitt	SE	Antall forsøk	DIV 3	Snitt	SE	Antall forsøk
Ubh	20,7	6,3	7	Ubh	35,6	4,6	8
Buffer	30,2	6,9	8	Buffer	29,4	7,3	7
Glut	31,5	4,7	8	Glut	37,8	6,9	8
DIV 5	Snitt	SE	Antall forsøk	DIV 7	Snitt	SE	Antall forsøk
Ubh	33	6,8	8	Ubh	43,5	10,2	6
Buffer	33	5,3	6	Buffer	42,5	6,7	6
Glut	41,8	3,8	6	Glut	51,7	2,2	6

3.5.1 NMDA-reseptorantagonisters påvirkning på celledød i glutamateksponerte kyllingkornceller

Dersom NMDA-reseptorantagonister hemmer glutamatindusert celledød på ulike tidspunkter i kultur, kunne dette vise uttrykk av funksjonelle NMDA-reseptorer på det aktuelle utviklingstidspunktet. I en tidsserie ble kyllingkornceller behandlet med antagonistene MK-801 (1 μ M) og CGP 33951 (100 μ M) på DIV 1, 3, 5 og 7 før de ble eksponert for glutamat (100 μ M) 15 minutter senere. Bufferløsninger ble tilsatt 1 μ M MK-801 eller 100 μ M CGP 33951 og benyttet som kontroller, mens en skål fra hvert tidspunkt forble ubehandlet for å kunne studere korncellenes basaldød på hvert enkelt tidspunkt. Etter eksponering ble korncellene inkubert i 24 timer, og celledød ble kvantifisert ved å telle døde trypanblåfagede celler og levende celler i lysmikroskop.

Ved å benytte tallmaterialet fra buffereksponeerte kornceller som kontroll for glutamatindusert celledød, (fig. 13a-d) viste resultatet at på DIV 1 foreligger det i liten grad glutamatindusert død (fig. 13a og 14a). På DIV 3 var det en glutamatindusert død som ble hemmet av begge antagonistene. Det så også ut til at antagonistene hemmet basaldøden på dette tidspunktet (fig. 13b og 14b). På DIV 5 var den glutamatinduserte døden liten (fig. 13c og 14c), mens på DIV 7 forelå det en glutamatindusertdød som ble hemmet av begge antagonistene (fig. 13d og 14d). Dette forsøket var en pilotstudie der det har blitt gjennomført 1-2 paralleller, resultatene bør derfor tolkes med forsiktighet.



Figur 14 a-d: NMDA-reseptorantagonistene MK-801 og CGP 33591 reduserer celledød i glutamateksponte kyllinghornceller.

Korncellene ble eksponert for NMDA-reseptorantagonistene MK-801 (1 μ M) og CGP 33591 (100 μ M) på DIV 1, 3, 5 og 7 for deretter å bli eksponert for glutamat (100 μ M). 24 timer etter eksponering ble celledøden kvantifisert ved trypanblåfarging og telling i lysmikroskop. Figurene viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med intervall, n=1- 2. På DIV 7 ble det kun gjort ett forsøk.

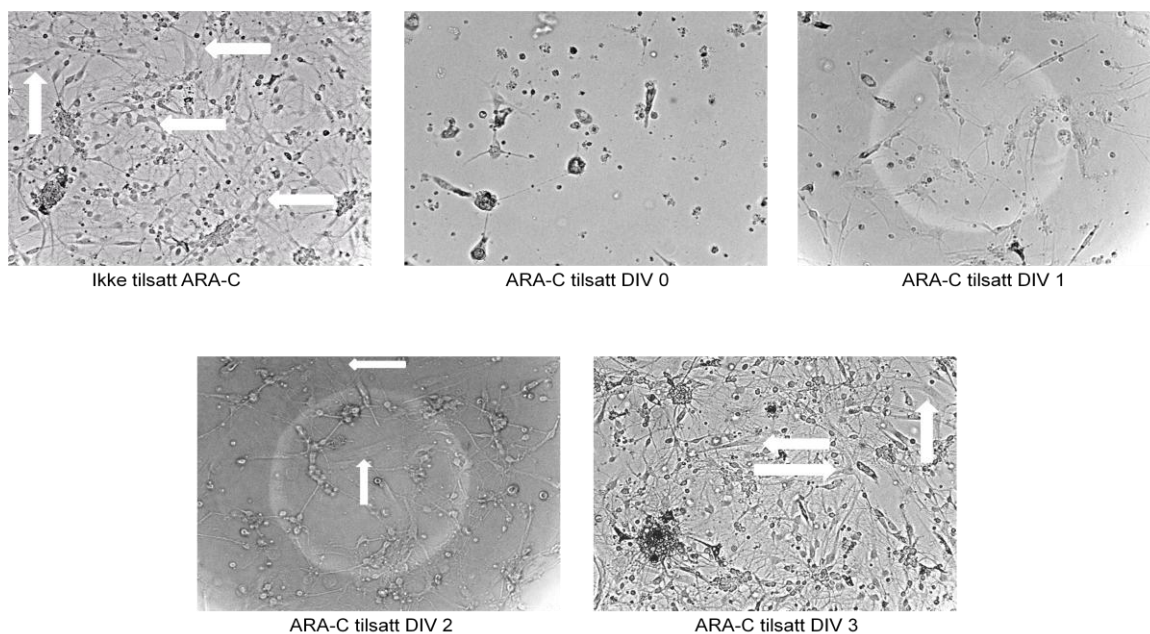
Tallmateriale som figur 14 a-d baserer seg på

	Gjennomsnitt DIV 1	Intervall DIV 1	Gjennomsnitt DIV 3	Intervall DIV 3	Gjennomsnitt DIV 5	Intervall DIV 5	DIV 7	Antall forsøk
Ubh	24	21-26	28	26-29	36	24-43	46	1-2
Glutamat	33	32-34	44	42-45	46	42-50	59	1-2
Glutamat+ CGP 33591	23	22-23	20	19-20	32	24-40	54	1-2
Glutamat+MK-801	23	22-24	19	18-19	31	26-36	43	1-2
Buffer + CGP 33591	25	24-25	18	11-24	33	31-34	43	1-2
Buffer + MK-801	24	22-25	19	14-23	29	26-32	43	1-2

3.6 ARA-C-toksisitet i kyllingkorncellekulturer

Cytosine β -D-arabinofuranoside (ARA-C) er et cytostatikum som er mye benyttet i nevronkulturer fordi det hindrer deling av astrocytter. ARA-C-behandlingen vil, på den måten, føre til at kulturen i all hovedsak består av nevroner. En tidligere studie har vist at ARA-C er toksisk på kornceller fra rotte rett etter utplating til kultur, sammenliknet med senere tidspunkter (Leeds *et al.* 2005). For å studere om dette også er tilfellet for kyllingkornceller ble 10 μ M ARA-C tilsatt korncellekulturer på DIV 0, 1, 2 og 3 (fig. 15). En ubehandlet skål ble brukt som kontroll på basaldød. På DIV 4 ble celledøden kvantifisert ved å telle trypanblåfargede døde celler og levende celler i lysmikroskop (fig. 16). Resultatet viste at det var signifikant større forskjell i celledød mellom ubehandlede kornceller og kornceller tilsatt ARA-C på DIV 0 og 1 (fig. 16). Det var også signifikant større forskjell i celledød mellom kornceller som ble tilsatt ARA-C på DIV 0 og DIV 3 (fig. 16). Skålen som ikke ble tilsatt ARA-C og skåler som ble tilsatt ARA-C på DIV 2 og DIV 3 inneholdt astrocytter (fig. 15, bilder med piler).

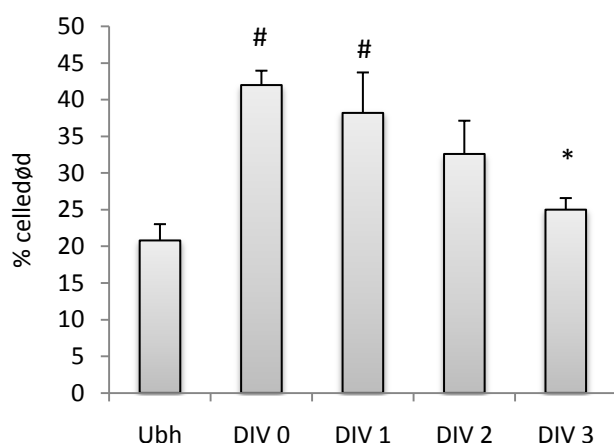
Bilder av skåler med kyllingkornceller tilsatt ARA-C på ulike tidspunkter



Figur 15: Bilder av kyllingkornceller etter eksponering av ARA-C på ulike dager etter utplating til kultur.

Bildene viser representative synsfelt av kyllingkornceller som har blitt eksponert for ARA-C på DIV 0, 1, 2 og 3. Skåler som er eksponert for ARA-C på DIV 2 og 3 har en større andel av astrocytter. Alle bildene er tatt på DIV 4.

ARA-C-toksisitet hos kyllingkornceller



Figur 16: ARA-C er mer mest toksisk for kyllingkornceller rett etter utplating til kultur.

Kyllingkorncellene ble eksponert for 10 μ M AraC på samme dag som de ble platet ut, eller på DIV 1, 2 eller 3. På DIV 4 ble celledøden kvantifisert ved å telle trypanblåfargede celler i lysmikroskop. Figurene viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med SE, $n=4-5$. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. # betyr at det er signifikant forskjell i celledød mellom ubehandlede celler og celler som er tilsatt ARA-C på DIV 0 og DIV 1. * betyr at det er signifikant større forskjell i celledød mellom DIV 0 og DIV 3. Det var ingen signifikant forskjell mellom de andre gruppene.

Tallmateriale som figur 16 baserer seg på

	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubehandlet	20,8	3,8	5
DIV 0	42,0	3,0	4*
DIV 1	38,2	7,9	5
DIV 2	32,6	7,1	5
DIV 3	25,0	2,8	5

*En skål på DIV 0 ble forkastet fordi alle celler i skålen var farget blå.

3.7 Western blotting

For å kunne studere hvordan kyllingkornceller deler seg og differensierer i kultur, og om subenhets sammensetningen av NMDA-reseptorer kan knyttes opp mot korncellenes utviklingstrinn, ble det utført Western Blot. Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9. I noen tilfeller ble det kun høstet skåler på DIV 1, 3, 5 og 7 fordi skålene på DIV 9 ikke lenger inneholdt levende kornceller. Før høsting ble skålenes kvalitet bedømt ved lysmikroskopi. Etter elektroforese og blotting ble alle proteinene på membranene farget med Ponceus fargeløsning, og de membranene som ikke hadde en jevn proteinfordeling ble forkastet.

Etter at ønsket protein ble påvist, ble alle membraner strippet for primære antistoffer og nytt primærantistoff mot α -tubulin ble påsatt. α -tubulin ble benyttet som intern standard for å kunne korrigere for forskjeller i proteinmengde mellom prøvene. Alle proteinbånd ble semikvantifisert i bildebehandlingsprogrammet ImageJ ved at det ble tegnet en ramme rundt hvert enkelt bånd, og maksimalt antall pixler i hver ramme ble målt. Bakgrunnen ble funnet ved å måle antall pixler i et område uten bånd. Det er flere måter kvantifisering kan gjøres på, men metoden som er valgt i denne oppgaven baserer seg på en tidligere studie der det ble laget en fortynningsrekke med ulike konsentrasjoner av plasmidet N1-gfp. Fortynningsrekken ble analysert i ImageJ, og parametrene maksimal båndstyrke, integraltetthet og at bakgrunn trekkes fra gjennomsnittet og deles på arealet, ble sammenliknet. Det var størst lineær sammenheng mellom maksimal båndstyrke og konsentrasjon av plasmid i fortynningsrekken (Lindland-Tjønn 2009).

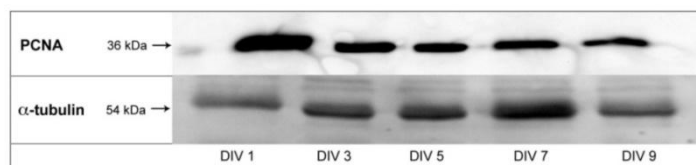
3.7.1 Deling og differensiering av kyllingkornceller i kultur og påvirkning fra ARA-C

Det var interessant å finne ut hvordan korncellene deler seg og differensierer i kultur, og om ARA-C har noen påvirkning på dette. Å tilegne seg kunnskap om hvordan korncellene oppfører seg i kultur er meget viktig, for eksempel kan en differensiert korncelle uttrykke andre proteiner enn en umoden korncelle. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ble benyttet som markør for celledeling, mens NEUronal Nuclei (NeuN) ble benyttet som markør for differensiering. NeuN er nevronspesifikk, og uttrykkes på utviklingstidspunkter etter at cellen har vært i celledyklus og er ferdig med å dele seg (Mullen *et al.* 1992). Resultatene viste at PCNA kunne påvises DIV 1 både med og uten ARA-C-behandling (fig. 17 og 19), men korrigert for proteinmengde resulterte ARA-C-behandlingen i redusert PCNA-ekspresjon på DIV 3 og 5 (fig. 18b og 20b). Ukorrigert for proteinmengde var NeuN-uttrykket ganske likt på DIV 1, 5 og 7 med en nedgang på DIV 3 og 9 (fig. 22a). Etter å ha korrigert for proteinmengde ved hjelp av α -tubulin viste kvantifisering av NeuN-uttrykket var størst på DIV 1, 7 og 9, mens det var lavest på DIV 3 og 5 (fig. 22b). Celler som ikke fikk ARA-C-behandling hadde et uttrykk av NeuN som var mer konstant på de ulike tidspunktene (fig. 23). Kvantifisering viste at NeuN-uttrykket var jevnt, med en liten topp på DIV 1 (fig. 24a). Korrigert for proteinmengde viste kvantifisering at NeuN er uttrykt i størst grad på DIV 1 og i mindre grad på de andre tidspunktene (fig. 24b).

Det skal imidlertid understrekes at figurene ble basert på normaliserte data med stor spredning.

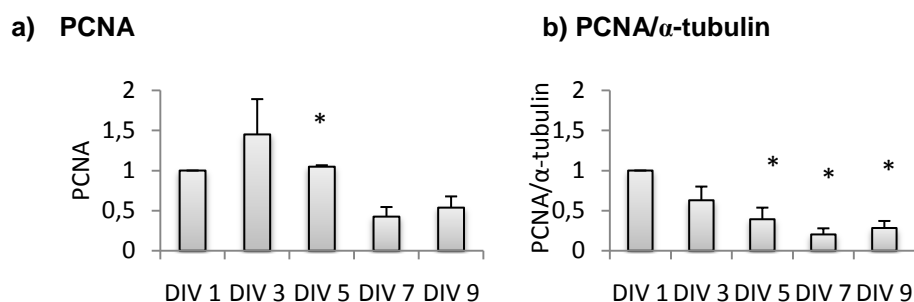
Proteinbånd for PCNA i kyllingkornceller behandlet med ARA-C

PCNA



Figur 17: ARA-C-behandlede kyllingkorncellerkulturer deler seg i kultur etter utplating.

Kyllingkorncellekulturer ble tilsatt 10 μ M ARA-C 24 timer etter utplating. Korncellekulturene ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9.



Figur 18 a-b: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til PCNA.

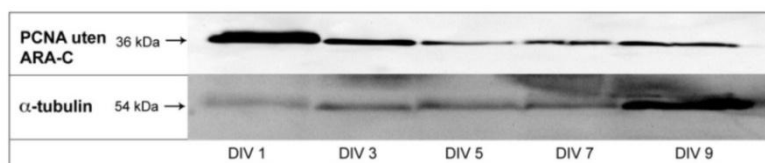
Figur a viser båndstyrken til PCNA sitt proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall pixler med SE, n=3. * betyr at PCNA-uttrykket var signifikant høyere på DIV 5 sammenliknet med DIV 9. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de andre gruppene. Figur b viser proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til PCNA og α -tubulin etter at bakgrunnen er trukket fra med SE, n=3. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk.. * betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom DIV 1 og DIV 5, 7 og 9. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom DIV 1 og DIV 3.

Målinger av båndstyrke i pixler som ligger til grunn for figur 18 a-b

	Gjennomsnitt PCNA	SE	Gjennomsnitt α -tubulin	SE
DIV 1	851,3	487	140,3	92
DIV 3	1265,7	614	230	93
DIV 5	891,3	502	294,7	73
DIV 7	441	344	273,7	128
DIV 9	367	201	214,3	58
Gjennomsnitt bakgrunn	124	4	141,7	18

Proteinbånd for PCNA i kyllinkorncellekulturer uten ARA-C

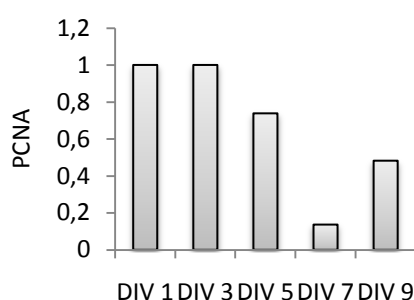
PCNA uten ARA-C



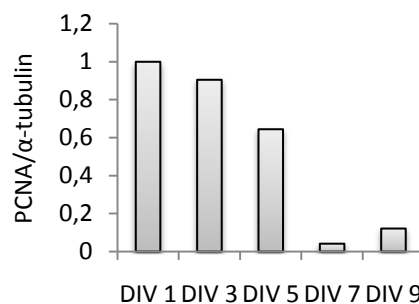
Figur 19: PCNA uttrykkes på alle tidspunkter i kultur, men uttrykket er størst rett etter utplating.

Kyllingskåler ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9. Ingen skåler ble tilsatt ARA-C.

a) PCNA uten ARA-C



b) PCNA uten ARA-c/ α -tubulin



Figur 20 a-b: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til PCNA uten ARA-C.

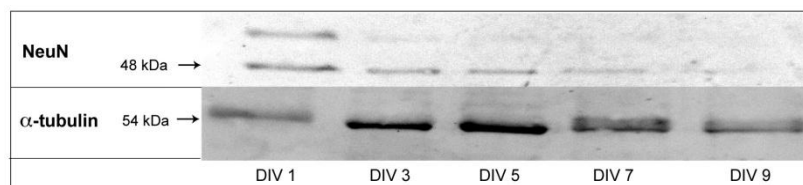
Figur a viser båndstyrken til PCNA uten ARA-C sitt proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall pixler. Figur b viser proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til PCNA uten ARA-C og α -tubulin etter at bakgrunnen er trukket fra. Figurene baserer seg på ett forsøk.

Målinger av båndstyrke i pixler som ligger til grunn for figur 20

	PCNA uten ARA-C	α -tubulin
DIV 1	3338	124
DIV 3	3338	137
DIV 5	2464	142
DIV 7	455	406
DIV 9	1609	496
Bakgrunn	169	78

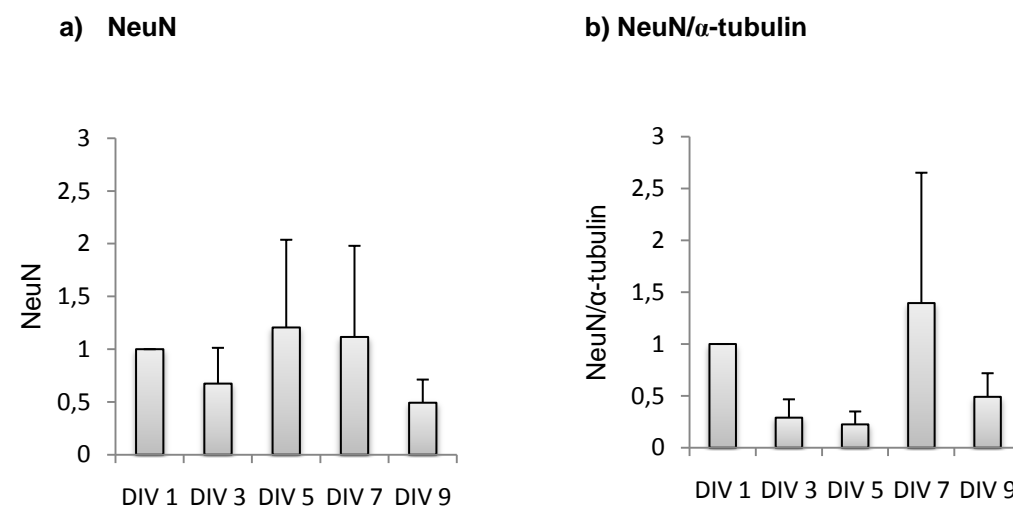
Proteinbånd for NeuN i kyllingkornceller behandlet med ARA-C

NeuN



Figur 21: NeuN uttrykkes på alle tidspunkter i kultur.

Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9.



Figur 22 a-b: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke for NeuN og NeuN/ α -tubulin

Figur a viser båndstyrken til NeuNs proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall pixler med SE, n=3. Figur b viser proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til NeuN og α -tubulin, etter at bakgrunnen er trukket fra med SE, n=3. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom gruppene i figur a eller i figur b.

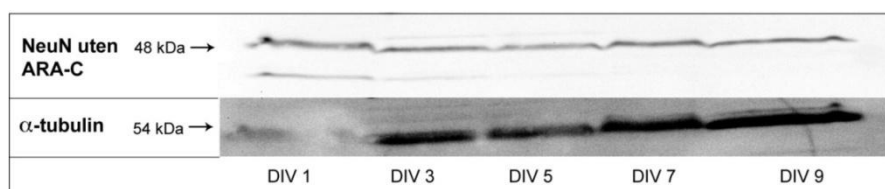
Målinger av båndstyrke i pixler som ligger til for figur 22 a-b

	Gjennomsnitt NeuN	SE	Gjennomsnitt α -tubulin	SE
DIV 1	261	221	68	13
DIV 3	40	4	142	34
DIV 5	58	13	285	132
DIV 7	49	17	147	78
DIV 9	83	63	71	10
Gjennomsnitt bakgrunn	122		139	

Proteinbånd for NeuN i kyllingkorncellekulturer uten ARA-C

I den grafiske fremstillingen av westernbåndstyrken til NeuN uten ARA-C valgte jeg å kvantifisere båndstyrken til NeuN uten å korrigere for α -tubulin i tillegg til å korrigere for α -tubulin. Årsaken til dette er at kvantifiseringen til α -tubulin-båndene ga et uforholdsmessig høyt tall på DIV 3, noe som ikke er representativt for hvordan båndene fremstår visuelt.

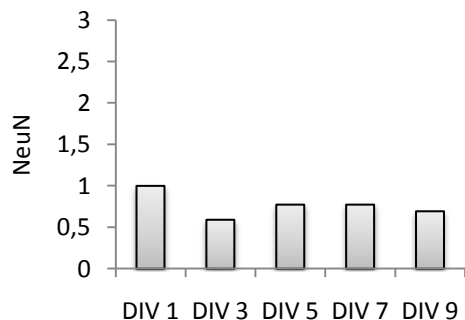
NeuN uten ARA-C



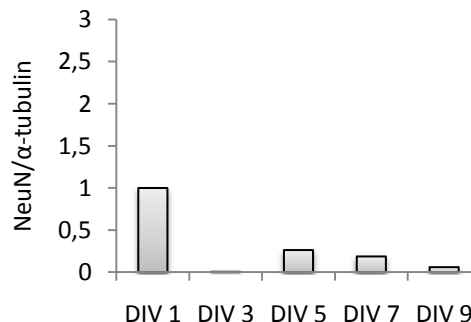
Figur 23: NeuN er uttrykt på alle tidsspunkter i kultur uten ARA-C.

Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9. Figurene viser westernbånd for NeuN høstet fra skåler uten ARA-C med tilhørende westernbånd for α -tubulin.

a) NeuN uten ARA-C



b) NeuN uten ARA-C/ α -tubulin



Figur 24 a-b: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrkene til NeuN i kulturer uten ARA-C.

Figur a viser båndstyrken til NeuNs proteinbånd etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i maksimalt antall pixler. Figur b viser proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til NeuN og α -tubulin etter at bakgrunnen er trukket fra. Figurene baserer seg på ett forsøk.

Målinger av båndstyrke i pixler som ligger til grunn for figur 24 a-b:

	NeuN uten ARA-C	α -tubulin
DIV 1	411	32
DIV 3	243	3313
DIV 5	318	94
DIV 7	318	132
DIV 9	285	367
Bakgrunn	126	120

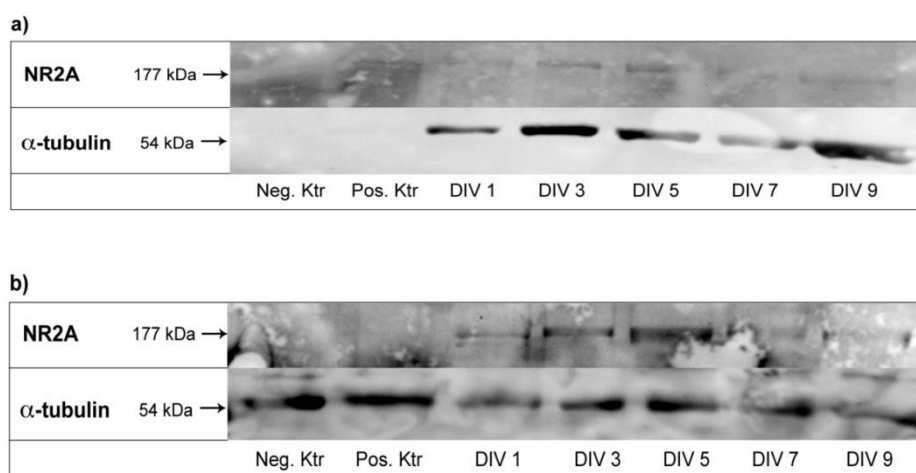
3.7.2. Uttrykk av GR og NMDA-reseptorsubenheter i kyllingkornceller

På samme tidspunkt som kyllingkorncellene ble eksponert for deksametason og glutamat med tanke på kvantifisering av celledød, ble skåler med kornceller høstet til Westernblotting-analyser. Hensikten var å studere om det er en sammenheng mellom deksametason- eller glutamatindusert toksisitet og uttrykket av GR eller NMDA-reseptors subenhets sammensetning. Uttrykket av NMDA-reseptorsubenheter på ulike tidspunkter vil også kunne si noe om kyllingkorncellers modenhet under utvikling i kultur (Cull-Candy *et al.* 1998). CV-1-celler ble transfektert med de NMDA-subenheterne som skulle studeres og høstet med samme metode som kyllingkorncellene som en positiv kontroll. Ikke-transfekte CV-1-celler ble benyttet som negativ kontroll fordi CV-1-celler ikke uttrykker NMDA-reseptorsubenheter endogent. Kvaliteten på disse kontrollene var dårlig. Det lyktes ikke å produsere westernblott for GR, selv om det ble gjort gjentatte forsøk med flere antistoff og med ulike konsentrasjoner av disse.

Proteinbånd for NR2A i kyllingkornceller

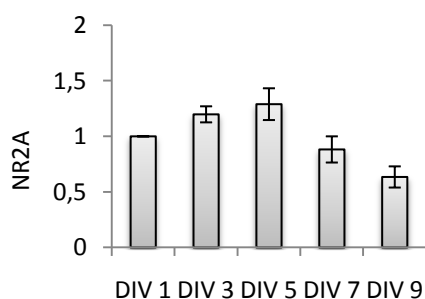
Det ble produsert to westernblott med NR2A. Begge blottene viste at uttrykket økte fra DIV 1 til DIV 5, der det nådde en topp, mens det ble redusert igjen mot DIV 9 (fig. 25a/b og 26a). Fordi proteinbåndene med α -tubulin var av dårlig kvalitet, har jeg valgt å kvantifisere båndstyrken til NR2A både med og uten korreksjon for proteinengde. Når det ble korrigert viste kvantifiseringen at uttrykket av NR2A var størst på DIV 1 og ganske jevnt på de andre tidspunktene med en ørliten topp på DIV 7 (fig 26b).

NR2A

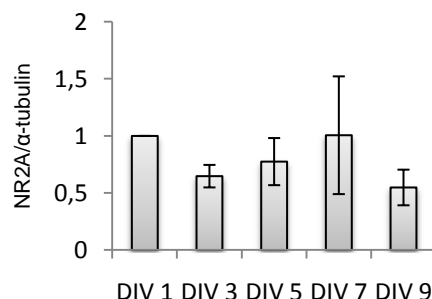


Figur 25 a-b: Uttrykket av NR2A øker fra DIV 1 til DIV 5, mens det reduseres på DIV 7 og DIV 9. Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9. Figurene viser westernbånd for NR2A med tilhørende westernbånd for α -tubulin fra to ulike kyllingpreparasjoner. CV-1-celleprøver ble benyttet som positiv og negativ kontroll.

a) NR2A



b) NR2A/ α -tubulin



Figur 26 a og b: Grafisk fremstilling av westernbåndene.

Figur a viser båndstyrken til NR2As proteinbånd målt i maksimalt antall pixler etter at bakgrunnen er trukket fra med intervall, og figur b viser proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til NR2A og α -tubulin etter at bakgrunnen er trukket fra med intervall, n=2.

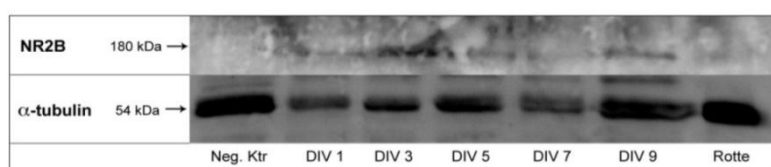
Målinger av båndstyrke i pixler som ligger til for figur 26 a-b

	Gjennomsnitt NR2A	Intervall	Gjennomsnitt α -tubulin	Intervall
DIV 1	114	37-191	343	309-377
DIV 3	131	47-215	526,5	526-766
DIV 5	136	53-219	602,5	451-754
DIV 7	91,5	37-146	388	203-573
DIV 9	65	27-103	424	320-528
Gjennomsnitt bakgrunn	293,5	119-468	197,5	81-314

Proteinbånd for NR2B i kyllingkornceller

Det ble produsert ett westernblott for NR2B, men resultatet lot seg ikke reproducere. Westernblottet var av dårlig kvalitet, så resultatet bør tolkes med forsiktighet. Resultatet viste at NR2B er uttrykt på alle tidspunkter i kultur med en topp på DIV 3. Uttrykket reduseres på DIV 5 og 7, men øker igjen på DIV 9 (fig. 27). Korrigert for proteinengde viste kvantifiseringen at NR2B var uttrykt på alle tidspunkter, men at uttrykket er størst på DIV 1 og 3 (fig. 28).

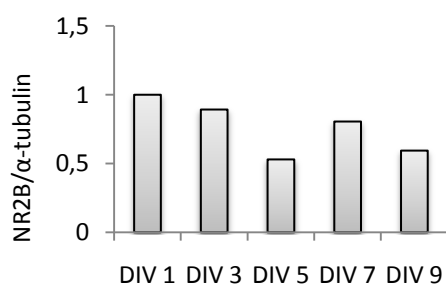
NR2B



Figur 27: Uttrykket av NR2B er størst i kyllingkornceller rett etter utplating til kultur, og avtar gradvis på DIV 5 og 7. På DIV 9 øker uttrykket igjen.

Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9. CV-1-celler ble benyttet som negativ kontroll. En rotteprøve ble benyttet som positiv kontroll.

NR2B/α-tubulin



Figur 28: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke for NR2B.

Figuren viser proteinbåndenes styrke som er målt i maksimalt antall pixler, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til NR2B og α-tubulin etter at bakgrunnen er trukket fra. Figuren baserer seg på ett forsøk.

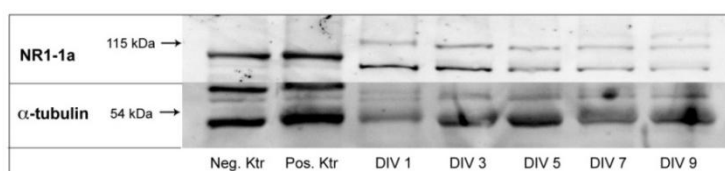
Målinger av båndstyrke i pixler som ligger til grunn for figur 28

	NR2B	α-tubulin
DIV 1	658	279
DIV 3	838	356
DIV 5	641	381
DIV 7	599	287
DIV 9	648	360
Bakgrunn	247	153

Proteinbånd for NR1-1a i kyllingkornceller

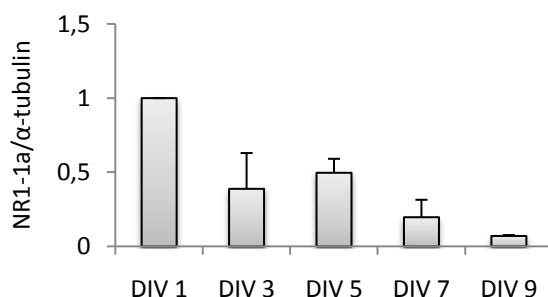
Det ble produsert tre westernblott med NR1-1a. Både westernblottet og kvantifisering med korreksjon proteinengde viste at NR1-1a ble uttrykt på alle tidspunkter i kultur, men at uttrykket avtok over tid (fig. 29 og 30).

NR1-1a



Figur 29: NR1-1a-uttrykket er størst på DIV 1, 3 og 5, mens det avtar på DIV 7 og 9. Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9. CV-1-celleprøver ble benyttet som positiv og negativ kontroll, men båndene som vises er uspesifikke.

NR1-1a/α-tubulin



Figur 30: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til NR1-1a.

Figuren viser proteinbåndenes styrke som er målt i maksimalt antall pixler, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til NR1-1a og α-tubulin etter at bakgrunnen er trukket fra med SE, n=3. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom gruppene.

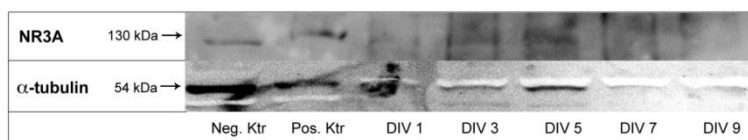
Målinger av båndstyrke i pixler som ligger til for figur 32

	Gjennomsnitt NR1-1a	SE	Gjennomsnitt α-tubulin	SE
DIV 1	540,3	198	114,3	45
DIV 3	414,3	131	1509,7	1200
DIV 5	359,7	142	177	87
DIV 7	80,3	21	135,3	49
DIV 9	65,7	12	325,7	216
Gjennomsnitt bakgrunn	151	11	143	29

Proteinbånd for NR3A i kyllingkornceller

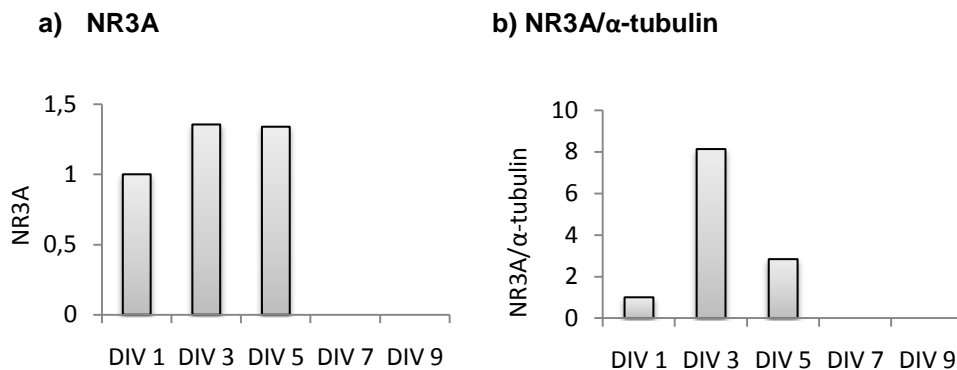
Det ble produsert ett westernblott for NR3A, men dette var av meget dårlig kvalitet. Forsøket var en pilotstudie. Blottet med α -tubulin var også av dårlig kvalitet og jeg valgte derfor å kvantifisere båndstyrken til NR3A både med og uten å korreksjon for proteinengde. Resultatet bør tolkes med forsiktighet. Resultatet viste at NR3A ble uttrykt på DIV 1, 3 og 5 (fig. 31 og 32a). Korrigert for proteinengde viste kvantifiseringen at uttrykket var størst på DIV 3 (fig. 30b).

NR3A



Figur 31: NR3A uttrykkes på DIV 1, 3 og 5.

Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 eller 9. CV-1-celleprøver ble benyttet som positiv og negativ kontroll.



Figur 32 a-b: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til NR3A.

Figuren viser proteinbåndenes styrke som er målt i maksimalt antall pixler, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til NR3A og α -tubulin etter at bakgrunnen er trukket fra. Figuren baserer seg på ett forsøk.

Målinger av båndstyrke i pixler som ligger til for figur 30 a-b

	NR3A	α -tubulin
DIV 1	62	36
DIV 3	84	6
DIV 5	83	17
DIV 7	Ingen bånd	Ingen bånd
DIV 9	Ingen bånd	Ingen bånd
Bakgrunn	109	127

4 Diskusjon

4.1. Diskusjon av metoder

4.1.1 Valg av cellemodeller

I dette masteroppgavearbeidet har både CV-1- og PC12-celler blitt benyttet, samt primærkulturer fra kyllinglillehjerne. Forsøk i cellelinjer ble utført for å forsøke å studere en potensiell interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og glukokortikoidreseptoren. Fordelen med cellelinjer er at disse gir mer reproducerbare resultater sammenliknet med primærkulturer, fordi alle kommer fra samme opphav, og er dermed like. De er imidlertid kreftceller som kan ha mistet egenskaper som en "vanlig" differensiert celle har, og dette er noe som må tas hensyn til når data fra cellelinjer skal tolkes (Adler 2006). PC12-cellelinjen har nevronkarakteristika og har derfor blitt benyttet i denne masteroppgaven. PC12-celler har et enzymapparat som gjør at de kan syntetisere, lagre og frisette katekolaminene dopamin og noradrenalin (Greene og Tischler 1976; Kumar *et al.* 1998). Flere studier har vist at PC12-celler produserer mRNA for NMDA-reseptorsubenheterne NR1, NR2C og NR2D (Leclerc *et al.* 1995; Vazhappilly og Sucher 2002; Edwards *et al.* 2007). Selv om PC12-celler har mRNA for flere NMDA-reseptorsubenheter, uttrykker de ikke funksjonelle NMDA-reseptorer (Edwards *et al.* 2007). Differensierte PC12-celler produserer også glukokortikoidreseptoren endogent (Morsink *et al.* 2006). PC12-cellelinjer som benyttes av ulike forskningsgrupper har ulike egenskaper, og kan derfor ikke sammenlignes direkte. Funnene tyder likevel på at PC12-celler er egnede for å studere en interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og glukokortikoidreseptoren, fordi cellene kan uttrykke og distribuere de aktuelle proteinene endogent.

CV-1-cellelinjen er en fibroblastcellelinje fra apenyre (Hopps *et al.* 1963), og har ikke nevronkarakteristika. Tidligere studier gjort i forbindelse med masteroppgaver har vist at CV-1 cellelinjen er en god modell for vårt forsøksoppsett, der den potensielle interaksjonen mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og GR skal studeres ved bruk av et luciferaseassay. Cellene er lette å transfektere og overuttrykte NMDA-reseptorsubenheter fordeler seg i CV-1-cellene slik som i andre cellelinjer (Wehus

2007; Feng 2009). CV-1 celler uttrykker ikke selv noen av de aktuelle reseptorene, slik at eksperimentator har kontroll over reseptortyper ved hjelp av transfeksjon. Fordi man beveger seg langt vekk fra *in vivo*-forhold ved å benytte CV-1-celler, må det sies at data som genereres fra disse cellene er av en svært indirekte art.

Primærkulturer består av celler som er tatt ut fra dyr og sådd ut til skåler. Resultatene som oppnås ved å benytte seg av primærkulturer, blir ikke like reproducerbare som når cellelinjer benyttes, fordi cellene hentes fra ulike dyr ved hvert forsøk. Samtidig er det ønskelig å benytte seg av nevroner for å kunne teste hypoteser som egentlig omhandler cellulære mekanismer i det humane sentralnervesystem. Det er en styrke dersom det er mulig å påvise en nevronal mekanisme både i en cellelinje og i en primær nevronkultur. Fordi kornceller er en homogen nevronal populasjon *in vivo*, vil også kulturer av disse bli homogene, sammenliknet med andre nevronpopulasjoner som ofte består av høyere andel andre celletyper (Contestabile 2002). Rottekorncellers nevrogenese foregår sent embryonalt og postnatalt, derfor vil kornceller utvikle seg etter utplating til kultur (Contestabile 2002). For å studere glutamatindusert celledød i nevronkultur er korncellekulturer fra kylling godt egnet, fordi det er tidligere vist at disse utvikler glutamatindusert eksositoloksisitet tidlig i kultur (Jacobs *et al.* 2006a). Deksametason har også vist seg å indusere apoptose i umodne kornceller fra kylling og rotte (Jacobs *et al.* 2006b; Aden *et al.* 2008). Kornceller fra kylling er altså en meget egnet modell for å utføre utviklingsstudier slik som i denne masteroppgaven.

4.1.2 Bruk av reporter-genet GRE-luc som metode for å studere protein-protein-interaksjoner

Dersom det foreligger en interaksjon mellom NR3A og GR, vil det kunne tenkes at GR holdes tilbake i cytoplasma der reseptoren vanligvis befinner seg. Ved tilsats av agonist, vil GR ikke i like stor grad translokere inn i kjernen for å aktivere glukokortikoidresponsive gener. Interaksjonen mellom GR og NR3A vil derfor gi redusert genekspressjon og proteinuttrykk. Et reporter-gen for GR, GRE-luc, er derfor egnet til å teste om denne interaksjonen foreligger. GRE-luc ble transfektert inn i PC12 og CV-1-celler sammen med GR og NR3A, og cellene ble eksponert for GR-agonisten deksametason. Når GR binder seg til GRE-luc etter agonistbinding, vil dette aktivere luciferaseekspressjonen nedstrøms for responselementet, fordi GRE er

koblet til et gen som koder for luciferaseprotein. Dette proteinet katalyserer en reaksjon der det blir avgitt lys, og dette lyset kan detekteres av et luminometer. Luciferasen blir derfor et indirekte mål for genekspresjon, og det forventes at dersom en interaksjon finner sted, vil luciferaseproduksjonen være redusert når man sammenlikner med GR transfektert inn i cellene alene. Et liknede forsøksoppsett kan benyttes for kyllingkornceller som også lar seg transfektere (Strøm *et al.*), men i et slikt forsøksoppsett kan det bli vanskelig å finne en negativ kontroll fordi det endogene GR-uttrykket kan variere over tid. Dersom man hadde kornceller der GR-uttrykket var "slått ut" kunne disse blitt benyttet som en negativ kontroll. Å påvise at denne interaksjonen mellom GR og NR3A forekommer i nevroner vil styrke hypotesen om at dette er en interaksjon som forekommer *in vivo* i hjernen. Motsatt vil en avkrefte kunne indikere at denne interaksjonen er et resultat av overuttrykte proteiner i cellelinjer, altså et *in vitro*-artefakt.

Det finnes flere metoder for å studere protein-protein-interaksjoner, og disse kan benyttes i tillegg til reporter gener for å bekrefte eller avkrefte om en interaksjon finner sted. Ko-immunpresipitering er en mye brukt og direkte metode for å påvise interaksjoner mellom proteiner. Dersom interaksjonen mellom proteiner arter seg som et kompleks kan dette detekteres av antistoffer spesifikke for proteiner i komplekset. Antistoff-proteinkomplekset kan så felles ut ved å tilføre sefarosekuler, for deretter å bli detektert ved en Western blotting-analyse (Phizicky og Fields 1995). Det ble utført en pilotstudie med ko-immunpresipitering i dette masteroppgavearbeidet ved bruk av en GFP-trap (resultat ikke vist). CV-1 celler ble transfektert med GR og NR3A-gfp hver for seg, og begge plasmidene sammen. En GFP-trap består av et antistoff rettet mot GFP som er kovalent bundet til sefarosekuler. Den vil følgelig binde gfp-merkede proteiner om de befinner seg i et kompleks eller alene. Deretter ble det foretatt en Western blotting-analyse, som ikke ga noe resultat, til tross for at det på forhånd ble testet at antistoffer mot de aktuelle proteinene fungerte (resultater ikke vist). Fordi det ble vist at antistoffene hadde immunreaktivitet mot de aktuelle proteinene, er dette en høyst aktuell metode for å bekrefte eller avkrefte om det foreligger en interaksjon mellom NR3A og GR i CV-1-celler.

I vårt forsøksoppsett ble renilluciferase benyttet som intern standard. Det viste seg imidlertid at renillaverdiene til celler transfektert med CMV alene eller ko-transfektet

med CMV hadde lave renilla-verdier, det samme gjaldt etanoleksponerte celler transfektert med GR. Dette kan være et uttrykk for at CMV-plasmidet var av dårlig kvalitet eller at konsentrasjonen på plasmidløsningen ikke stemmer overens med det som ble oppgitt, slik at feil mengde plasmid tilsettes transfeksjonsløsningen. Dette kan gi lav transfeksjonseffektivitet. Det bør etterstrebes å oppnå mest mulig jevne renillaverdier dersom denne skal benyttes som en intern standard. Flere batcher med CMV-plasmid bør derfor testes. Det kan også testes om RL-cmv, som er en sterkere promotor enn RL-tk gir jevnere renillaverdier i PC12-celler.

Tall som ikke var forskjellige fra luminometerets instrumentelle bakgrunn ble ikke tatt med i figurene. De hadde korresponderende lave renillaverdier, noe som tyder på lav transfeksjonseffektivitet eller få celler. Årsaken kan ha vært store variasjoner i celletettheten mellom skåler forårsaket av en ujevn fordeling av PC12-cellene. Dette kan skje dersom celledensiteten sedimenterer når splitting foretas eller hvis cellene klumper seg sammen til store aggregater. Det vil derfor være viktig å undersøke celletettheten i skåler før transfeksjonen gjennomføres, og skåler med lavt antall celler bør ikke benyttes.

4.1.3 Valg av metode for å måle celledød

Det eksisterer flere etablerte metoder for å detektere og kvantifisere celledød. Ofte brukes 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, laktat dehydrogenase (LDH) assay, trypanblåfarging eller merking med propidium jodid (Ying *et al.* 2001). Alle metodene har fordeler og ulemper, og det må derfor vurderes nøye hvilken metode man skal benytte. Et MTT-assay måler funksjonen til mitokondrielle enzymer som taper sin aktivitet når cellen dør, eller er på vei til å dø. LDH-assay registrerer mengden av laktat dehydrogenase som har lekket fra cytoplasma ut i cellekulturmediet. Dette enzymet lekker ut ved tap av cellenes membranintegritet, og mengden LDH i mediet vil være proporsjonal med antall døde celler. (Ying *et al.* 2001). Propidium jodid kan benyttes til å identifisere døde celler som ikke lenger har intakt cellemembran fordi reagensen fluorescerer når det binder seg til DNA. Fluorescerende celler kan enten telles ved hjelp av et fluorescensmikroskop, eller kvantifiseres i et spektrofotometer (plateleser). Trypanblå farger celler som ikke lenger har en intakt membran blå, og dermed kan disse cellene telles i et lysmikroskop. Trypanblå er en meget hydrofil forbindelse, og

kan derfor ikke trenge inn i levende celler med en intakt hydrofob cellemembran (Ying *et al.* 2001). Til tross for at korncellekulturer er ganske homogene sammenliknet med andre nevronkulturer (Contestabile 2002), inneholder de innslag av andre celletyper, ca 20% av kulturen består av astrocytter (Jacobs *et al.* 2006a). Det kan tenkes at astrocytter og kornceller har ulik mitokondrietthet fordi astrocyttene har en høy metabolsk rate blant annet på grunn av det energikrevende glutamatopptaket (Benarroch 2005). Astrocytter bidrar til at nevroner får næringsstoffer, deriblant laktat, og det må derfor antas at disse cellene har mye LDH, fordi LDH katalyserer dannelsen av laktat fra pyruvat (Magistretti og Pellerin 1999). I så måte vil det kunne forventes at både et LDH- eller et MTT-assay vil kunne gi falske høye celledødsestimater som kan tilskrives astrocytter og ikke bare kornceller. Tap av mitokondriell aktivitet er ikke nødvendigvis ensbetydende med irreversibel celledød som ender med død, dermed kan et MTT-assay overestimere celledøden (Ying *et al.* 2001). MTT har dessuten vist seg å være toksisk i seg selv (Hertel *et al.* 1996). Et LDH-assay vil, i så måte være mer pålitelig, fordi tap av membranintegritet er mer forenelig med at cellen faktisk er død. Det som imidlertid kan by på problemer, er at LDH-lekkasjen kan være på analysetidspunktet. Ved apoptose vil cellen lukke cellulære fragmenter inne i apoptotiske "compartments", og dette vil også gjelde LDH. Dette vil kunne gi en underestimert celledød (Ying *et al.* 2001). Å måle celledød ved å benytte trypanblå gjør at man ser hva man teller, og dette gir morfologisk informasjon om cellene, hvilket gjør at man kan skille mellom kornceller og andre celletyper i kulturskålen. Denne fordelingen har man ikke med de andre metodene. Det er imidlertid en mer subjektiv metode enn de andre teknikkene. Fargevurderingen til personen som teller ligger til grunn for celledødstallene. Metoden kan gjøres mindre subjektiv ved at den som teller er blindet for hvilken celledød som har fått en bestemt behandling. Etterhvert som tiden går, har korncellene en tendens til å klumpe seg sammen, og det kan være vanskelig å skille enkeltceller fra hverandre. Det kan derfor være knyttet ulik grad av sikkerhet til celledødsestimater fra ulike tidspunkter i kultur. Apoptotiske celler beholder sin membranintegritet i store deler av apoptoseforløpet. Dette vil kunne gi en underestimert av celledød ved at apoptotiske celler ikke blir talt fordi de ikke tar opp trypanblåfarge. I en studie utført på kreftceller ble det vist at trypanblå farger disse cellene i et visst stadium i apoptoseforløpet, når apoptose ble induisert av radioaktiv stråling (Filippovich *et al.* 1997). Valg av metode for å måle celledød bør

gjenspeile målet med forsøket man skal utføre. I denne masteroppgaven hvor glutamat- og deksametasonindusert celledød skulle studeres mens kornceller utviklet seg i kultur, var farging med trypanblå et godt valg. Ved denne metoden har eksperimentør morfologisk kontroll med hvordan korncellene utvikler seg i kultur. Videre gir metoden kontroll over apoptotisk og nekrotisk morfologi. I tillegg har man mulighet til å skille mellom nevronale og ikke-nevronale celler. Til slutt representerer tap av membranintegritet et godt endepunkt for om en celle faktisk er død, fordi prosessen er irreversibel.

4.1.4 Western blotting

Western blotting er en etablert metode for å detektere og karakterisere proteiner i celle- eller vevsekstrakter (Towbin *et al.* 1979; Kurien og Scofield 2003). I alle Westernanalysene som har blitt presentert i oppgaven, har α -tubulin blitt benyttet som en intern standard. Mikrotubuli består av α -tubulin og β -tubulin (Pigino *et al.* 2006). Mikrotubuli er en del av cytoskjelettet i alle celler, men mikrotubulis organisering i nevroner er forskjellig fra organiseringen i andre celler (Heidemann 1996). Når det skal utføres utviklingsstudier, som i dette arbeidet, der kyllingkornceller ble høstet på ulike tidspunkter etter utplating til kultur, viste det seg at flere proteinbånd at mengden α -tubulin øker over tid. Figur 19 og 23 i resultatdelen er eksempler på dette. α -tubulin uttrykkes av alle celler, også astrocytter. Etter hvert som skålene står lenge dør mange kornceller, mens astrocyttene ikke dør like raskt. Derfor er et proteinbånd som representerer α -tubulin også et uttrykk for α -tubulin i astrocytter. Dette representerer en betydelig feilkilde når proteinmengden i prøvene høstet på ulike dager i kultur skal kvantifiseres. Ved å dele alle proteinbåndene på α -tubulin vil det se ut som om proteinmengden går ned fordi mengden α -tubulin øker. Kornceller utvikler seg etter utplating til kultur, de deler seg og danner dendrittiske kontakter med hverandre. I nevronale utløpere er det mye tubulin fordi her foregår det en utstrakt transport av proteiner og organeller over relativt lange avstander (Hu *et al.* 2008). Men et annet poeng, er at mikrotubuli spiller en helt sentral rolle for utvikling og vekst av dendritter og aksoner (Hu *et al.* 2008; Kamath *et al.* 2010), og ved cellulær migrasjon og morfogenese (Dehmelt og Halpain 2004). Derfor kan det tenkes at α -tubulin-uttrykket øker når kyllingkorncellene får utvikle seg i kultur fordi de danner utløpere og synaptiske

kontakter med hverandre (fig. 10). Dersom liknende utviklingsstudier skal gjøres i fremtiden bør det testes om α -tubulin faktisk egner seg som en intern standard. Det kan hende at nevronmarkøren NeuN egner seg bedre. Ved å benytte seg av NeuN vil man ikke få noe bidrag fra astrocytter. En ulempe er at NeuN er en markør for differensierte nevroner (Mullen *et al.* 1992), og dermed får man ikke tatt udiffensierte nevroner med i beregningen, noe som på et tidlig tidspunkt i kultur vil representere en betydelig feilkilde. Lamin er en kjernemarkør som kan benyttes som intern standard dersom man skal analysere helcelleekstrakter. MAP (mikrotubuliassosierte proteiner) er nevronspesifikke, men vil også kunne øke sitt uttrykk når korncellene får utvikle seg i kultur. MAP bidrar til interaksjon mellom mikrotubuli og actin når nevronale utløpere dannes (Dehmelt og Halpain 2004).

Selv om flere arter uttrykker det samme proteinet kan det være strukturforskjeller i proteinene fra art til art. Dersom et antistoff har vist immunreaktivitet mot for eksempel et rotteprotein, trenger man ikke å oppnå det samme resultatet i kylling. Manglende resultater betyr derfor ikke at proteinet ikke uttrykkes i kylling, men at antistoffet ikke "gjenkjenner" kyllingproteinet. Å finne antistoffer som gir gode proteinbånd fra kyllingprøver har vært en utfordring i arbeidet med oppgaven, og det anbefales at nye antistoffer i ulike konsentrasjoner prøves ut på kyllingkornceller.

4.2 Diskusjon av biologiske funn

4.2.1 Lokalisering av gfp-merkede NMDA-reseptorsubenheter i PC12-celler

Transfeksjon og mikroskopi med gfp eller yfp-merkede proteiner ble benyttet som metode for å studere hvordan NMDA-reseptorsubenheter og GR fordelte seg intracellulært, og om PC12-cellelinjen er egnet for å studere en eventuell interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A. Mikroskopibildene (fig. 1, øverste rad) viste at NR1-1a-yfp hopet seg opp i avgrensede områder utenfor kjernen, noe som var forenelig med ER-lokalisering. Det samme har blitt vist i en studie foretatt i COS-cellelinjen (McIlhinney *et al.* 1998). Denne studien viste også at NR2A er ER-lokalisert når den er uttrykt alene (McIlhinney *et al.* 1998). I PC12-cellelinjen var NR2A jevnt fordelt i hele cellen, med ekstra mye protein lokalisert i kjernen (fig. 1, andre rad). Det samme er tidligere vist i CV-1-cellelinjen (Feng, 2009). Dette kan

være en artefakt, eller et uttrykk for at cellen uttrykker unaturlige store mengder av denne subenheten når plasmidet transfekteres inn, eller at proteinet fordeler seg slik fordi det er merket med gfp. Villtype-protein ville kanskje ha fordelt seg annerledes. Dersom fordeling av villtype-protein skal studeres kan man immunfarge subenhetene, eller gjøre en westernblotting-analyse på cellulære fraksjoner. NR3A-gfp var lokalisert i ER, men også i andre områder i cytosol (fig.1, tredje rad). Når NR3A-gfp ble ko-transfektet med NR1-1a var det en lokalisering ut mot membranen (fig. 1, nederste rad). I andre cellelinjer har det blitt vist at subenheten NR3A må uttrykkes sammen med NR1-1a for å bli transportert til membranen (Perez-Otano *et al.* 2001; Schüler *et al.* 2008). I HEK 293-har det blitt vist at når NR3A uttrykkes sammen med NR1-1a, vil det foreligge en reduksjon av mengde overuttrykt subenhet som akkumuleres i ER (Perez-Otano *et al.* 2001). Dersom bildene av NR1-1a-yfp og NR3A-gfp hver for seg sammenlignes med bildene av NR3A-gfp+NR1-1a, viste ko-transfeksjonen en endret lokalisering med redusert mengde protein i avgrensede områder rundt kjernen (fig. 1, første og tredje rad og siste rad).

4.2.2 Lokalisering av GR-gfp med og uten NR3A i PC12-celler

I PC12-celler var GR-gfp kjernelokalisert med en mindre mengde protein i cytosol (fig.2, øverste rad). Ko-transfeksjon med GR og NR3A viste det samme (fig. 2, nederste rad). For å studere om det var mulig å se en forflytning av GR-gfp etter agonistbehandling i mikroskopet, ble et pilotforsøk gjort, der celler ble transfektet med GR-gfp og behandlet med deksametason. Celler ble også ko-transfektet med GR-gfp og NR3A og behandlet med deksametason for å se om forflytningen av GR-gfp ble redusert av NR3A (resultater ikke vist). Dette kunne ha blitt tolket som en interaksjon mellom GR-gfp og NR3A. Det var imidlertid vanskelig å se en forflytning av GR-gfp i mikroskopet. I tillegg til å se forflytningen, er det også mulig å kvantifisere om GR-gfp lokalisering forandrer seg ved ko-transfeksjon med NR3A og ved tilsats av deksametason. Dette kan gjøres ved å benytte et bildeanalyseringsprogram, for eksempel ImageJ. Ved å beregne ratioen mellom antall pixler i kjernen og i cytosol kan man få et tall på en eventuell forflytning av GR-gfp etter tilsats av deksametason, og man kan få et tall på om denne forflytningen er mindre når GR-gfp ko-transfekteres med NR3A, hvilket kan bety at GR, som normalt ville ha translokert til kjernen etter agonistbinding, holdes igjen i cytosol på grunn av

en interaksjon med NR3A. Det kunne også ha blitt foretatt en Westernblott-analyse der man så på mengde GR i kjernefraksjoner og cytosolfraksjoner før og etter eksponering med deksametason og ved ko-transfeksjon med NR3A.

4.2.3 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A

Tidligere er det vist i CV-1-celler ved bruk av reporter-genet GRE-luc og transfeksjon av GR og NR3A, at det kan foreligge en interaksjon mellom disse proteinene (Feng, 2009). Det samme forsøksoppsettet med GRE-luc ble derfor benyttet i PC12-celler. Resultatene viste ingen nedgang i luciferaseproduksjon når GR, endogen eller overuttrykt ko-transfekteres med NR3A og eksponeres for 1 nM deksametason (fig. 4 og 5). Fordi det ikke ble funnet en nedgang i luciferaseproduksjon i PC12-cellelinjen ved ko-transfeksjon med GR og NR3A, ble forsøket gjentatt i CV-1-cellelinjen. Disse resultatene viste at ko-transfeksjon med GR og NR3A tilsatt 1 nM deksametason ga en statistisk signifikant lavere luciferaseproduksjon sammenliknet med GR tilsatt deksametason alene (fig. 8). Fluorescensmikroskop har blitt benyttet både i PC12-celler (fig. 1 og 2) og i CV-1-celler (Feng, 2009) for å studere intracellulær lokalisering av GR-gfp og yfp/gfp-erkede NMDA-reseptorsubenheter. Mikroskopieresultatene fra disse to studiene viste at PC12-celler ikke skulle være noen dårligere cellemodell enn CV-1-celler for å påvise en eventuell interaksjon mellom GR og NR3A når det gjelder fordeling av overuttrykt GR-gfp og yfp/gfp-merkede NMDA-reseptorsubenheter. CV-1-celler uttrykker ikke GR (Giguère *et al.* 1986), og NMDA-reseptoren er hovedsakelig å finne i sentralnervesystemet. At CV-1-celler uttrykker denne er derfor usannsynlig fordi CV-1 er en cellelinje fra apenyre (Hopps *et al.* 1963). Når plasmider som koder for GR og NMDA-reseptorsubenheter transfekteres inn i CV-1-celler, holdes det kontroll over hvilke proteiner som overuttrykkes, og det finnes ingen endogene systemer i CV-1 celler som interferer med hvordan disse overuttrykte proteinene fordeles intracellulært. Siden PC12-celler uttrykker GR endogent (Morsink *et al.* 2006) og også har mRNA for NMDA-reseptorsubenheter (Edwards *et al.* 2007), kan dette påvirke de overuttrykte proteinens fordeling.

GR, endogent eller overuttrykt, aktiverte transkripsjon av ildflueluciferase via GRE-luc til tross for at det kun ble eksponert for etanol i PC12-celler (fig. 4 og 5). Dette kan være et uttrykk for at det var et glukokortikoid i PC12-mediet som kommer fra

hesteserumet. PC12-cellemediet inneholder hesteserum, mens dette ikke er tilfelle for CV-1-mediet. For å undersøke om dette var tilfelle kan CV-1-mediet tilsettes samme mengde hesteserum som PC12-mediet for så å studere hvordan dette påvirker transfeksjonsdataene. En slik etanoleffekt kan være en artefakt, men det ble også i CV-1-celler registrert etanoleffekter på luciferaseproduksjon når GR ble ko-transfektet med NMDA-reseptorsubenheter og eksponert for etanol (Feng, 2009). Det er ingen kjent sammenheng mellom etanol, GR og NMDA-reseptoren, foruten at det er kjent at etanol kan påvirke NMDA-reseptoren (Bhave og Hoffman 1997). Etanoleffekter i dette forsøksoppsettet bør studeres mer inngående, og det kan være en idé at deksametason løses i et mer inert løsemiddel som ikke har noen påvirkning på ildfluoluciferaseproduksjonen. Det var en klar reduksjon i ildfluoluciferaseaktivitet når GR ble ko-transfektet med NR3A og tilsatt etanol sammenlignet med GR alene tilsatt etanol (fig. 5). Det samme kunne ses for endogent GR ved transfeksjon av NR3A tilsatt etanol sammenlignet med endogent GR alene tilsatt etanol. For endogent GR var denne forskjellen signifikant (fig. 4). Dette kan tyde på at ko-transfeksjon med subenheten NR3A har en innvirkning på ildfluoluciferaseaktiviteten i etanoleksponerte PC12-celler som den ikke har i CV-1-celler. Dette kan også være et uttrykk for at det er et glukokortikoid i hesteserumet. Fordi PC12-celler uttrykker endogent GR inneholder de en rekke proteiner, blant annet heat shock protein 90 (Hsp90) som er koblet til GR i et kompleks i cytosol, og som hindrer GR i å translokere til kjernen når reseptoren ikke har bundet ligand (Stahn *et al.* 2007). Overuttrykt NR3A-gfp var lokalisert til flere intracellulære områder, blant annet cytosol (fig.1, tredje rad). Det kan tenkes at overuttrykt NR3A interagerer med GR-komplekset i cytosol, som følge av etanolen eller et eventuelt glukokortikoid, og hindrer GR i å translokere til kjernen slik at luciferaseproduksjonen blir mindre sammenlignet med endogent GR alene (fig. 4 og 5). Det kan også være at overuttrykt NR3A hindrer ildfluoluciferasen nedstrøms for genekspressjonen.

I CV-1-celler har det tidligere blitt undersøkt hvilken deksametasonkonsentrasjon som gir høyest ildfluoluciferaseaktivitet ved bruk av reporter-genet GRE-luc. Dose-responskurven viste at 1 nM ga høyest aktivitet, mens 10 nM ga litt lavere (Feng, 2009). 1 nM ble derfor benyttet i denne studien på PC12-celler, både fordi denne konsentrasjonen ga maksimal ildfluoluciferaseaktivitet i CV-1-celler, og fordi høyere konsentrasjoner tidligere har vist seg å være toksisk for nevroner (Aden *et al.* 2008).

På grunn av lav luciferaseproduksjon i PC12-celler sammenliknet med CV-1-celler, bør det utføres en tilsvarende dose-respons-studie i PC12-celler for å se om andre deksametasonkonsentrasjoner gir høyere ildfluelluciferaseproduksjon via GRE-luc.

Det er rapportert at differensierte PC12-celler uttrykker GR endogent (Morsink *et al.* 2006). Til tross for at PC12-cellene som ble benyttet i forsøksoppsettet ikke var differensierte, viste resultatene at disse uttrykte GR endogent (fig. 3). Dersom PC12-cellene differensieres ved å tilsette NGF (nerve growth factor) (Greene og Tischler 1976), kan det tenkes at luciferasetallene vil gå opp fordi GR-uttrykket øker, og at det blir en større forskjell mellom gruppene som tilsettes deksametason sammenliknet med etanolkontrollene.

Plasmidet GRtr er lik GR, men mangler det ligandbindende domenet (LDB) som er lokalisert i karboksylterminalen til GR, og kan derfor binde seg til DNA og aktivere gentranskripsjon uten at ligand har aktivert reseptoren først (Danielsen *et al.* 1987). Dersom en interaksjon mellom GR og NR3A foregår i karboksylterminalen til GR, forventes det ikke at ko-transfeksjonen med NR3A reduserer GRtr sin konstitutive aktivitet, fordi NR3A vil ikke kunne holde GRtr tilbake i cytosol. I CV-1-celler viste resultatene at ko-transfeksjon med NR3A og NR1-1a reduserte GRtr sin konstitutive aktivitet, forskjellen mellom GRtr alene og GRtr sammen med NR3A var signifikant (fig. 9). Dette var i strid med tidligere funn, der ko-transfeksjon GRtr og NMDA-reseptorbubenheterne NR3A og NR1-1a førte til en økning av luciferaseaktivitet. I denne studien ble imidlertid cellene eksponert for deksametason (Feng, 2009). Dette kan tyde på at GRtr kan binde deksametason og aktivere gentranskripsjon, til tross for at det ligandbindende domenet mangler. En studie har også vist at dette er tilfellet (Keightley og Fuller 1995). Forsøkene som har blitt gjort med GRtr og CV-1-celler i denne oppgaven tyder på at dersom en interaksjon foreligger mellom GR og NR3A, kan denne forekomme på andre deler av GR enn karboksylterminalen. Alternativt kan årsaken være at renillaverdien var så høy. Det bør gjøres nye målinger med andre plasmider hvor renillaverdiene blir mer like før en kan konkludere. PC12-celler økte ildfluelluciferaseaktiviteten når GRtr ble ko-transfektet med NR3A og NR1-1a, men økningen var ikke signifikant (fig. 6). I PC12-celler kan det dermed hende at interaksjonen skjer i karboksylterminalen til GR. Det kan være interessant å eksponere PC12-celler transfektet med GRtr og subenheter for

deksametason for å se om GRtr sin konstitutive aktivitet øker som følge av eksponeringen.

4.2.4 Morfologisk utvikling hos kyllingkorncellekulturer

Kyllingkorncellenes morfologi forandrer seg når de var under utvikling i kultur (fig. 10, DIV 0-7). På samme dag som utplating var det mange celler som lå som klumper i skålen. Fra DIV 0 til DIV 1-2 forandret korncellene seg mye. Mange celler var døde, og hadde falt av skålen. Det kan være tilsats av ARA-C som forårsaket noe av celledøden, og det kan være et ledd i en naturlig forekommende prosess der nevroner som ikke etablerer synaptiske kontakter med andre nevroner, og som ikke blir en del av en nevronal krets, går i apoptose. Det var tydelig at fra DIV 1 og utover dannet cellene utløpere, og etablerte kontakt med hverandre. En korncelle under utvikling vil forandre sin morfologi når den som umoden korncelle migrerer fra det ytre til det indre laget i lillehjernebarken. En umoden korncelle har en avlang riskornaktig form når den befinner seg i det ytre laget, mens den får en mer globulær karakter når den har migrert til det indre laget (Komuro og Rakic 1998). På DIV 1, 2 og 3 var det mulig å observere kyllingkornceller med en slik riskornaktig form, mens på DIV 5 og 7 var alle korncellene globulære. Dette kan bety at i korncellekulturer fra kylling befinner det seg subpopulasjoner av celler som er på ulike nivåer i sin utvikling. Når det gjelder fremtidige utviklingsstudier av kyllingmodellen er det viktig å få kartlagt dette, fordi kornceller som har ulik grad av modenhet også kan ha ulike reseptoruttrykk som gjør dem sårbare for deksametasonindusert celledød.

4.2.5 Deksametasonindusert celledød hos kyllingkornceller i kultur

Deksametason induserer apoptose i kyllingkornceller, både *in vivo* og *in vitro* (Aden *et al.* 2008). Uttrykket av GR er høyt i den neonatale lillehjerne fra rotte (Pavlík og Buresová 1984), og hos kylling øker GR-mRNA-uttrykket i hypofysen mellom embryodag 12-17 (E12-17), og endogene konsentrasjoner av glukokortikoider øker i samme periode (Porter *et al.* 2007). Dette indikerer at endogene glukokortikoider spiller en viktig rolle for reguleringen av hypothalamus-hypofyse-binyre-aksen (HPA-aksen) på dette tidspunktet i utviklingen. Det kunne derfor forventes at en deksametasonindusert celledød vil vises allerede på DIV 1, på grunn av uttrykket av endogen GR, fordi utplatingen skjer på embryodag 18 (E18). Resultatet viste

imidlertid at det ikke var en signifikant forskjell i celledød mellom deksametason- og etanoleksponerte kyllingkornceller (fig. 11a). Det var imidlertid en høy basaldød og noe etanoldød. Det er vist at etanol induserer apoptose i kornceller fra rotte ved å inhibere NMDA-reseptorens trofiske effekt (Bhave og Hoffman 1997). En høy etanoldød kan derfor kamuflere en deksametasonindusert celledød. På dette tidspunktet i kultur bør det vurderes om deksametason skal løses i et mer inert løsemiddel. Høy basaldød på DIV 1 kan være et uttrykk for at mange umodne kornceller vil gå i apoptose som en del av en naturlig prosess i lillehjernens utvikling. For å finne ut om NMDA-reseptoren er involvert i basaldøden kunne en ha tilsatt antagonist på et tidligere tidspunkt, for eksempel DIV 0. En studie har vist at umodne kornceller fra rotte, som befinner seg i det indre laget av lillehjernebarken, har et høyt uttrykk av 11β -hydroksysteroid dehydrogenase som inaktiverer endogene glukokortikoider lokalt (Robson *et al.* 1998). Det kan tenkes at også umodne kyllingkornceller uttrykker dette enzymet, og at dette bidrar til at mindre deksametason er tilgjengelig for å indusere celledød. På DIV 3 var det statistisk signifikant forskjell mellom deksametason- og etanoleksponerte kyllingkornceller (figur 11b), mens på DIV 5 var det en trend mot en deksametasonindusert død (figur 11c). Det er tidligere vist at NMDA-reseptorantagonisten MK-801 reduserer deksametasonindusert celledød i kyllingkorncellekulturer på DIV 3 (Aden *et al.* 2008). I denne oppgaven hemmet denne antagonisten deksametasonindusert celledød på DIV 5 (figur 12c), men forsøket var kun en pilot, og det behøves flere paralleller for å bekrefte eller avkrefte resultatet. På DIV 3 viste det seg at begge antagonister hemmer etanolindusert celledød (fig. 11b og 12b). Det har tidligere blitt rapportert at etanol kan påvirke NMDA-reseptoren (Bhave og Hoffmann 1997), og det kan derfor tenkes at en NMDA-reseptorantagonist vil kunne hemme en etanolindusert celledød, dersom etanolen induserer celledød via NMDA-reseptoren. Etanol er selv en NMDA-reseptorantagonist og en GABA_A-reseptoraktivator, og det har blitt vist at etanol induserer apoptose i rottenevrone som er i synaptogenese ved å virke på disse to reseptorene, blant annet ved å øke intracellulære Ca²⁺-konsentrasjoner (Han *et al.*, 2005). Det har tidligere blitt vist at MK-801 og CGP 39551 ikke gir noen endring i deksametasons GR-induserte luciferaseproduksjon (Feng, 2009). En forklaring på dette kan være at det er en indirekte interaksjon mellom antagonistene og GR, der NMDA-reseptoren er involvert. Det er vist at

deksametason aktiverer caspase-3 i kyllingkornceller kun to timer etter eksponering (Aden *et al.* 2008). Denne korte tiden er ikke forenelig med en gentranskripsjonseffekt, men at apoptosen medieres via en ikke-genomisk mekanisme for eksempel via membranassosiert GR. Det kan dermed tenkes at det er uttrykket av membranassosiert GR som forårsaker den deksametasoninduserte celledøden på DIV 3. For å finne ut av dette kan man immunfarge mot membranassosiert GR og se om uttrykket forandrer seg over tid. Det at deksametasonindusert celledød lar seg blokkere av NMDA-reseptorantagonisten MK-801, styrker antagelsen om at NMDA-reseptoren er involvert i den deksametasoninduserte celledøden. Det har også blitt vist at deksametason øker Ca^{2+} -innstrømming gjennom NMDA-reseptoren (Takahashi *et al.* 2002). Deksametasonindusert celledød i kornceller fra rotte lar seg ikke blokkere av Mg^{2+} (Jacobs *et al.* 2006b). Dette styrker antakelsen om at NR3A-subenheten er involvert i denne formen for celledød, fordi NR3A har lav affinitet for Mg^{2+} (Paoletti og Neyton 2007). Westernblottet for NR3A (fig. 29) viser at kyllingkorncellene uttrykte NR3A på DIV 1, 3 og 5. Dersom NR3A er involvert, passer dette funnet med at den deksametasoninduserte celledøden er størst på DIV 3 og 5. For å underbygge dette kan det derfor være interessant å se om deksametasonindusert celledød hos kornceller fra kylling heller ikke lar seg blokkere av Mg^{2+} . For å studere om deksametasonindusert celledød kunne knyttes opp mot GR-uttrykket på ulike utviklingsstadier i kultur, ble det forsøkt å produsere westernblott med GR. Flere konsentrasjoner og ulike antistoffer mot GR ble testet, men ingen ga resultater. Det hadde for eksempel vært interessant å se om GR- og NR3A-uttrykket er høyt på de samme tidspunktene, og om deksametasoninduserte celledøden var tilsvarende høy.

4.2.6 Glutamatindusert celledød hos kyllingkornceller i kultur

Det var signifikant glutamatindusert celledød på DIV 5 (fig. 13c) og en trend på DIV 7 (fig. 13d). Tidligere observasjoner har vist at kyllingkornceller utvikler glutamatindusert eksositoloksisitet med produksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS) og aktivert caspase-3 på DIV 3 (Jacobs *et al.* 2006a). På DIV 3 var det riktignok en forskjell mellom glutamat og bufferkontrollen (fig. 13b), men forskjellen var ikke signifikant. Det er sannsynlig at en glutamatindusert celledød påvirkes av subenhets sammensetningen til NMDA-reseptoren. På DIV 3 (fig. 27) var uttrykket av

NR2B høyt, og NMDA-reseptorer som inneholder NR2B har høy Ca^{2+} -permeabilitet (Cull-Candy *et al.* 1998; Mancini og Atchison 2007). NR2A var uttrykt på alle tidspunkter i kultur, med et stigende uttrykk fra DIV 1 til 5 (fig. 25 a og b), og NR3A var uttrykt på DIV 1, 3 og 5 (fig. 29). NMDA-reseptorer som består av subenhetene NR1/NR2A/NR3 har fem-folds lavere Ca^{2+} -konduktans sammenliknet med reseptorer som kun består av NR1 og NR2A (Das *et al.* 1998; Perez-Otano *et al.* 2001). Hvis dette også gjør seg gjeldende for kornceller fra kylling, kan det bety at det finnes subpopulasjoner av kornceller på DIV 3, 5 og 7 som har NMDA-reseptorer med høy Ca^{2+} -permeabilitet, med andre ord reseptorer som inneholder NR2A- og NR2B-subenheten.

Ved tilsats av NMDA-reseptorantagonistene MK-801 og CGP 33591 ble den glutamatinduserte celledøden redusert, dette kom til uttrykk på DIV 3 (fig. 13b og 14b), noe som underbygger hypotesen om at glutamat induserer celledød allerede på DIV 3. På DIV 5 forelå det ingen glutamatindusert celledød, mens på DIV 7 var det en tendens til at MK-801 hemmet celledøden induert av glutamat (fig. 13c-d og 14c-d). Det skal imidlertid understrekes at dette kun var en pilotstudie med bare 1-2 paralleller (ett forsøk på DIV 7), så forsøket bør gjentas for å bekrefte resultatet. Det så også ut til at antagonistene hemmet basaldøden noe på DIV 3. En forklaring på dette kan være at NMDA-reseptoren er involvert i prosesser på dette utviklingstidspunktet der kornceller enten innlemmes i nevronale kretser eller går i apoptose. Det har blitt vist at både for høy eller for lav NMDA-reseptoraktivitet kan indusere apoptose i nevroner under utvikling (Lipton og Nakanishi 1999). I denne studien ble ikke korncellene behandlet med antagonistene samtidig med glutamat, men rett før glutamateksposeringen. Dette kan føre til at antagonistene vaskes vekk når glutamatløsningen tilsettes, slik at det er lite antagonist tilstede. Resultatene tyder likevel på at antagonistene har hatt en blokkerende effekt på NMDA-reseptoren på eksponeringstidspunktet for glutamat. MK-801 er en ikke-kompetitiv NMDA-reseptorantagonist, og binder seg på innsiden av ionekanalene og blokkerer dermed Ca^{2+} -innstrømming inn i cellen. For at MK-801 skal binde seg må reseptoren aktiveres, slik at ionekanalene åpner seg. Derfor er det sannsynlig at den blokkerende effekten til MK-801, vil bli større dersom korncellene eksponeres for glutamat og MK-801 samtidig. CGP 33591 er en kompetitiv antagonist og vil binde seg til NMDA-

reseptoren uten at den aktiveres på forhånd. Det er en styrke at celledøden ble redusert av to antagonister som virker på to forskjellige måter.

4.2.7 ARA-C påvirker kyllingkornceller i kultur

ARA-C (cytosine β -D-arabinofuranoside) er et cytostatikum som tilsettes nevronkulturer for å hindre at ikke-nevronale celler deler seg, slik at kulturen blir mest mulig homogen. På den måten blir resultatene som oppnås i størst mulig grad korncellespesifikke. Samtidig er det slik at resultater som genereres fra korncellemodellen skal kunne brukes til å trekke konklusjoner om *in vivo*-forhold. *In vivo* finnes det ikke helt homogene nevronpopulasjoner, og det er dessuten slik at nevronene er helt avhengig av astrocyttene både for å utvikle seg og fungere normalt (Benarroch 2005). Det var signifikant forskjell i celledød mellom celler som ikke har blitt eksponert for ARA-C og celler som har blitt eksponert for ARA-C på DIV 0 og DIV 1 (fig. 16). Det var også forskjell mellom eksponering på DIV 0 og DIV 3. En studie har vist at jo tidligere ARA-C blir tilsatt etter utplating til kultur, jo høyere er den estimerte celledøden. Når ARA-C ble tilsatt etter 3-7 dager opphørte celledøden (Dessi *et al.* 1995). Leeds *et al.* har vist at kornceller fra rotte dør på grunn av apoptose når ARA-C tilsettes på samme dag som utplating til kultur, mens den estimerte celledøden ble betydelig mindre når ARA-C ble tilsatt 24-48 timer etter utplating har funnet sted. På dag 3-4 i kultur ble det ikke lenger observert ARA-C-indusert celledød som var større enn en ubehandlet kontroll (Leeds *et al.* 2005). Det skal legges til at ARA-C-konsentrasjonene i begge disse studiene var høyere enn den som benyttes til våre kyllingkorncellekulturer, og at celledøden ble estimert ved å benytte MTT-assay.

Når kyllingkornceller plates ut til kultur, kan det ikke med sikkerhet fastslås på hvilket stadie i utviklingen de befinner seg i. Men siden det i vår forskningsgruppe prepareres korncellekulturer tre dager før eggene skulle ha klekket naturlig, må det kunne antas at nevronene er mer umodne sammenliknet med nevroner fra kyllinger som klekkes ved normal tid. Umodne kornceller som ikke har startet på sin migrasjon fra det ytre til det indre laget i lillehjernebarken, har enda ikke fullført sin siste mitose. Derfor vil denne subpopulasjonen med kornceller være i en utviklingsfase som gjør at de er mer sårbare for ARA-C sammenliknet med andre kornceller som er i andre utviklingsfaser på tidspunktet for ARA-C-tilsatt. Dersom det er slik at store deler av

denne subpopulasjonen dør ved ARA-C-tilsats vil dette kunne representere en feilkilde når utviklingstudier av kyllingkornceller skal utføres, fordi denne korncellepopulasjonen kan være en type nevroner som er ekstra sårbare for deksametason. Det er tidligere vist at korncellekulturer fra kylling som ikke tilsettes ARA-C, har 45% NeuN-positive celler på DIV 3. Når de er tilsatt ARA-C er 70-80% av cellene NeuN-positive. Cellene som ikke ble behandlet med ARA-C hadde også en lavere basaldød sammenliknet med ARA-C-behandlede celler (Jacobs *et al.* 2006a). Dette kan komme av at ARA-C er toksisk for kyllingkornceller eller at astrocytter har en beskyttende effekt på korncellene.

Proteinet PCNA spiller en viktig rolle for cellyklusens progresjon, og er nødvendig for kromosomal DNA-syntese og reparasjon av skader på DNA. PCNA er derfor en egnet markør for celler i deling. Celledelingen i korncellekulturer fra kylling var størst på DIV 1 og 3 (fig. 17 og 18). Sammenliknet PCNA med og uten tilsatt ARA-C, var det på DIV 1 en uttalt celledeling (fig. 18 og 20). Det må understrekes at eksponeringstiden for ARA-C på DIV 1 er meget kort fordi tilsatsen skjer bare noen timer før cellene høstes. Det videre forløpet på DIV 3, 5 og 7 viste at cellene delte seg i større grad på DIV 5 hvis ikke ARA-C ble tilsatt, sammenliknet med de skålene hvor ARA-C har blitt tilsatt (fig. 18b og 20b). At PCNA-uttrykket reduseres dersom ARA-C ikke tilsettes kan også være et uttrykk for at α -tubulinuttrykket øker over tid (fig. 19 og 20b). Resultatet må imidlertid tolkes med forsiktighet, da det kun ble gjort en pilotstudie med ett westernblott for PCNA uten ARA-C-tilsetning. Det bør derfor utføres flere paralleller for å studere delingsforløpet over tid i kultur. Det kan også være interessant å sammenlikne prøver med og uten ARA-C. For å kunne gjøre dette bør korncelleprøver med og uten ARA-C-tilsats høstes på samme tidspunkt settes på gel i brønner ved siden av hverandre. PCNA er ikke en nevrone spesifikk markør. PCNA-uttrykket kan komme fra astrocyttene i kulturen. Det vil derfor være interessant å farge cellene for å differensiere mellom PCNA-uttrykket i nevroner og astrocytter. Bromdeoksyridin (BrdU) er en markør for celledeling som kan brukes til å farge cellene i kultur. Bruk av BrdU i snitt fra kyllinglillehjerne dag 18, har vist at BrdU-positive kornceller øker, hvilket betyr at det ikke bare er astrocyttene som deler seg i kulturene (Aden, manuskript).

ARA-C kan hindre celler i å dele seg, indusere apoptose eller starte prosesser i korncellene som gjør at de differensierer. Astrocytter kan ha en beskyttende effekt på korncellene i kultur, slik at flere kornceller prolifererer i fravær av ARA-C. Det har blitt vist i menneske at kornceller i det indre laget i lillehjernebarken er NeuN-positive, mens bare et fåtall av korncellene i det ytre laget er immunoreaktive for NeuN (Sarnat *et al.* 1998). Både med og uten tilsats av ARA-C var uttrykket av NeuN jevnt på alle tidspunktene (fig. 22a og 24a), men med ARA-C-tilsatsen bidro til at uttrykket kom litt høyere opp både på DIV 3, 5 og 7 (fig. 22a). Ved å korrigere for proteinmengde var NeuN-uttrykket størst på DIV 7 dersom kulturene ble tilsatt ARA-C, men spredningen var stor så det må gjennomføres flere paralleller for å bekrefte eller avkrefte resultatet (fig. 22b). Uten tilsats av ARA-C, og korrigert for proteinmengde var uttrykket av NeuN størst på DIV 1 og lav på DIV 5, 7 og 9 (fig. 24b). På DIV 3 var NeuN-uttrykket veldig lavt, noe som kan forklares av en høy α -tubulinverdi som må sies å være en artefakt (målinger av båndstyrke i pixler som ligger til grunn for fig 24 a-b). Det at NeuN-uttrykket kom opp i større grad i ARA-C-eksponerte kornceller kan tyde på at ARA-C påvirker cellene slik at de differensierer i stedet for å fortsette å dele seg. Dersom det er slik at kornceller fra kyllinglillehjerne også i størst grad er immunoreaktive for NeuN når de har migrert til det indre laget av lillehjernebarken, tyder det på at en større andel kornceller er i en post-migrasjonsfase av utviklingen i nærvær av ARA-C.

4.2.8 Uttrykk av NMDA-reseptorsubenheter hos kyllingkornceller

I kornceller fra lillehjernen hos rotte og mus er det beskrevet et skifte i utviklingen ("development switch"), der uttrykket av NMDA-reseptorsubenheten NR2B reduseres, mens uttrykket av NR2A-subenheten øker (Rumbaugh og Vicini 1999; Komuro og Yacubova 2003; Fu *et al.* 2005; Mancini og Atchison 2007). På hvilket tidspunkt dette skjer i kyllingkorncellekulturer, eller om det skjer, er ikke dokumentert. Det som imidlertid er studert er at kyllingkornceller modnes raskt i kultur sammenliknet med rottekornceller, og de har utviklet glutamatindusert eksotoksisitet allerede på DIV 3 (Jacobs *et al.* 2006a). Dette tilsier at kyllingkorncellene har funksjonelle NMDA-reseptorer med en subenhets sammensetning som gir høy Ca^{2+} -permeabilitet på DIV 3.

NR2A

Westernblottene med antistoff mot NR2A viste at mengden NR2A økte fra DIV1 med topp på DIV 5, og at det ble redusert betraktelig på DIV 7 og 9. Korrigert for α -tubulin viste den grafiske fremstillingen at uttrykket var størst på DIV 1 (fig. 26b). Dette stemmer imidlertid ikke overens med det visuelle man ser på westernblottene for NR2A (fig. 25a/b). Det er en styrke at westernblott fra to uavhengige kyllingprepareringer viste det samme, men det må likevel gjøres flere paralleller for å bekrefte funnet. NR2A-subenheten er viktig for utviklingen av funksjonelle eksitatoriske synapser, og antallet slike synapser øker med utviklingen (Fu *et al.* 2005). I rottekornceller er det vist at NR2A sammen med NR1-1a, men ikke NR2B, er å finne i eksitatoriske synapser, og at NR2A erstatter NR2B allerede på et tidlig tidspunkt i utviklingen (Fu *et al.* 2005). Dette passer overens med at NR2A-uttrykkes på alle tidspunktene i kultur, og at det når en topp på DIV 5 (fig. 26a)

NR2B

Westernblottet av NR2B er av dårlig kvalitet og det gjør at kvantifiseringen av blottet blir usikker. Det lyktes heller ikke å reprodusere resultatet. Det bør gjøres for å bekrefte funnet. Den grafiske fremstillingen av NR2B korrigert for α -tubulin (fig. 28) viser at uttrykket av NR2B er størst på DIV 1 og synker på DIV 3 og DIV 5. Uttrykket øker igjen på DIV 7, og synker igjen på DIV 9. NR2B er en subenhet som er viktig for korncellers evne til å migrere gjennom lagene i lillehjernebarken. NMDA-reseptorer har høy Ca^{2+} -permeabilitet, og kan dermed være en viktig kilde til Ca^{2+} , som er en viktig signalsubstans for migrerende kornceller (Mancini og Atchison 2007). Dette er vist hos rotter. Det at NR2B er til stede på alle tidspunkter i kulturen kan være et uttrykk for at det er mange kornceller som befinner seg i en migrasjonsfase etter at de plates ut til kultur. Resultatet fra den morfologiske studien av kyllingkorncellenes utvikling i kultur viste at det var flere kornceller som har en avlang fasong (fig. 10), som kan representere kornceller som fortsatt er i en migrasjonsfase (Komuro og Rakic 1998). NR2B-uttrykket hos kyllingkorncellene representerer i så måte en subpopulasjon med umodne kornceller i migrasjon som enda ikke er differensierte.

NR1-1a

NR1-1a er til stede på alle tidspunkter i kyllingkulturen (fig. 29 og 30). I cellelinjer har NR1-1a vist seg nødvendig for dannelsen av funksjonelle NMDA-reseptorer, og for at komplekser av NMDA-reseptorsubenheter skal fraktes fra ER til membranen (McIlhinney *et al.* 1998; Perez-Otano *et al.* 2001). Migrerende kornceller fra rotte uttrykker NR1, NR2A og NR2B-subenheter sammen, mens modne kornceller i det indre laget uttrykker NR1 sammen med NR2C-subenheten (Fu *et al.* 2005). En studie har vist at NR1 uttrykkes i hjernestammen og purkinjeceller hos kylling i fosterlivet og i voksen alder. Uttrykket av NR1 i denne studien, funnet ved kvantitativ Westernblotting-analyse og immunohistokjemi, viste at det endret seg lite fra embryonal dag 18 (E18)- til postnatal dag 28 (P28) (Tang og Carr 2004).

NR3A

NR3A er kun til stede på DIV 1, 3 og 5 (fig. 31 og 32 a/b). Uttrykket er størst på DIV 3 og 5. Dette forsøket ble kun foretatt en gang, og flere paralleller fra uavhengige kyllingprepareringer må til for å bekrefte resultatet. Westernblottet med α -tubulin er av så dårlig kvalitet at resultatet må tolkes med forsiktighet. Figur 21 b viser en grafisk fremstilling der NR3A er korrigert for α -tubulin. I rottehjerne er det vist at uttrykket av NR3A øker fra postnatal dag 0 til 8, mens det reduseres igjen fra dag 8 til 20 (Wong *et al.* 2002). I så måte, dersom hypotesen om at kornceller modnes raskere i kultur sammenliknet med kornceller fra rotte, kan resultatet fra dette forsøket representere det reelle uttrykket av NR3A hos kyllingkorncellene på høstetidspunktene. Det er også vist hos rotte at uttrykket av NR3A er høyt i kornceller fra lillehjernen (Wong *et al.* 2002). Nedregulering av NR3A er nødvendig for modning og organisering av glutaminerge eksitatoriske synapser før såkalte kritiske perioder av utviklingen. En studie viste at ved å forlenge perioden der NR3A-uttrykket er høyt, ble det etablert færre synaptiske kontakter mellom nevroner, og at synapsene fikk redusert sin størrelse (Roberts *et al.* 2009). Årsaken til dette kan være at NMDA-reseptorer som inneholder NR3A har nedsatt Ca^{2+} -permeabilitet, og fungerer som en "brems" som forhindrer prematur dannelse av eksitatoriske synapser ved å redusere Ca^{2+} -signaler og transkripsjon, og ved å redusere remodellering av cytoskjelettet som er nødvendig for dannelse av utløpere (West *et al.* 2002). Figur 10 viser kyllingkorncellers morfologiske utvikling i kultur. Denne studien indikerer at

kornceller danner synapser med hverandre, noe som er veldig tydelig fra DIV 3 og utover. Dette funnet passer med at uttrykket av NR3A ikke er til stede etter DIV 5. Uttrykket passer også overens med NR2A-uttrykket øker fra DIV 1-5, og at NR2B reduseres. Denne subenhets sammensetningen forteller at kyllingkorncellene har fått en mer moden karakter hva gjelder NMDA-reseptoren. Hva glutamatindusert celledød angår, så vil man forvente at NR3A beskytter korncellene mot økt Ca^{2+} -innstrømming. Figur 13 a-d viser at det er statistisk signifikant forskjell i celledøden mellom glutamatbehandlede skåler og kontrollskåler med buffer på DIV 5. På DIV 7 var det en tendens til forskjell mellom glutamat og bufferkontrollen.

Det er vanskelig å komme frem til en endelig konklusjon når det gjelder hvordan NMDA-reseptorsubenhets sammensetningen forandrer seg når kyllingkornceller får utvikle seg i kultur. Dersom det skal kunne trekkes sikre konklusjoner om utviklingen av NMDA-reseptorer hos kyllingkorncellekulturer må metoden optimaliseres videre, både med tanke på å utvikle gode negative og positive kontroller og med tanke på å finne antistoffer med immunreaktivitet i kylling. Flere antistoffer rettet mot de ulike NMDA-reseptorsubenheter bør testes, samt ulike konsentrasjoner av disse, fordi det er mulig at andre konsentrasjoner enn det som anbefales av produsentene bør benyttes i kylling. Det ser ut til at kulturskålene inneholder subpopulasjoner med kornceller som er på litt forskjellige stadier i utviklingen relatert til uttrykket av NMDA-reseptorsubenheter, og det er også vist i rotte at under utvikling av kornceller er det en blandet populasjon med NMDA-reseptorer med lav og høy Ca^{2+} -konduktans (Farrant *et al.* 1994). For å studere hvilke celler som uttrykker de ulike subenheter under utviklingen kan immunfarging benyttes som metode. Fordi det kan virke som om ARA-C tilsatt påvirker korncellenes utvikling når det gjelder deling (fig. 17 og 19) og differensiering (fig. 21 og 23) og siden det er vist at NMDA-reseptoren og dens subenhets sammensetning er viktig for korncellers differensiering (Komuro og Rakic 1993), kan det være interessant å studere om ARA-C-eksponering kan påvirke NMDA-reseptorens subenhets sammensetning på de gitte tidspunkter i kultur. Det er heller ikke sikkert at de subenheter som er detektert i kyllingkorncellene representerer subenheter som er inkorporert i en NMDA-reseptor. De kan befinne seg i ER eller andre intracellulære områder (Perez-Otano *et al.* 2001). I så måte blir det vanskelig å si noe sikkert om tilstedeværelsen av en subenhet har noe å si for NMDA-reseptorens egenskaper på et gitt utviklingstrinn. For å detektere komplekser

med subenheter som mest sannsynlig er en del av en funksjonell NMDA-reseptor, kan det utføres ko-immunpresipitering.

5 Konklusjon

- Det foreligger en funksjonell interaksjon mellom NR3A og GR i CV-1-celler.
- Det var ikke mulig å påvise denne interaksjonen i PC12-celler og forsøksoppsettet krever videre optimalisering.
- NR1-1a-yfp, NR2A-gfp og NR3A-gfp fordeles i PC12-celler slik som i CV-1-celler.
- Kyllingkornceller forandrer sin morfologi og fysiologi når de får utvikle seg i kultur.
- ARA-C er toksisk for umodne kornceller fra kylling og påvirker korncellens utvikling i kultur ved å redusere celledeling og øke differensiering.
- Kyllingkornceller utvikler deksametason- og glutamattoksisitet tidlig i kultur.
- Kyllingkorncellers uttrykk av NMDA-reseptorsubenheter kan være knyttet opp mot den deksametason- og glutamatinduserte toksisiteten.

Kildeliste

Abramov, A. Y. og M. R. Duchon (2008). "Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 953-964.

Aden, P., I. Goverud, K. Liestøl, E. M. Løberg, R. E. Paulsen, J. Mæhlen og J. Lømo (2008). "Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum." Brain Research **1236**: 39-48.

Adler, E. M. (2006). Cell Culture as a Model System for Teaching: Using PC12 Cells. Science`s STKE: Signal transduction knowledge environment. **2006**: tr5-.

Akazawa, C., R. Shigemoto, Y. Bessho, S. Nakanishi og N. Mizuno (1994). "Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats." The Journal of Comparative Neurology **347**(1): 150-160.

Almawi, W. Y. og O. K. Melemedjian (2002). "Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor." Journal of leukocyte biology **71**(1): 9-15.

Almeida, O. F. X., G. L. Conde, C. Crochemore, B. A. Demeneix, D. Fisher, A. H. S. Hassan, M. Meyer, F. Holsboer og T. M. Michaelidis (2000). "Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate." The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **14**(5): 779-790.

Almeida, O. F. X., G. L. Conde, C. Crochemore, B. A. Demeneix, D. Fisher, A. H. S. Hassan, M. Meyer, F. Holsboer og T. M. Michaelidis (2000). "Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate." FASEB J. **14**(5): 779-790.

Baillieux, H., H. J. D. Smet, P. F. Paquier, P. P. De Deyn og P. Mariën (2008). "Cerebellar neurocognition: Insights into the bottom of the brain." Clinical Neurology and Neurosurgery **110**(8): 763-773.

Ballard, P. L. (1989). "Hormonal Regulation of Pulmonary Surfactant." Endocrine reviews **10**(2): 165-181.

Bamberger, C. M., A. M. Bamberger, M. de Castro og G. P. Chrousos (1995). "Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans." The Journal of Clinical Investigation **95**(6): 2435-2441.

Bartholome, B., C. M. Spies, T. Gaber, S. Schuchmann, T. Berki, D. Kunkel, M. Bienert, A. Radbruch, G. R. Burmester, R. Lauster, A. Scheffold og F. Buttgereit (2004). "Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis." The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **18**(1): 70-80.

Benarroch, E. E. (2005). "Neuron-Astrocyte Interactions: Partnership for Normal Function and Disease in the Central Nervous System." Mayo Clinic Proceedings **80**(10): 1326-1338.

Benediktsson, R., A. A. Calder, C. R. W. Edwards og J. R. Seckl (1997). "Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure." Clinical Endocrinology **46**(2): 161-166.

Benesová, O. og A. Pavlík (1989). "Perinatal treatment with glucocorticoids and the risk of maldevelopment of the brain." Neuropharmacology **28**(1): 89-97.

Bentson, J., M. Reza, J. Winter og G. Wilson (1978). "Steroids and Apparent Cerebral Atrophy on Computed Tomography Scans." Journal of Computer Assisted Tomography **2**(1): 16-23.

Bhave, S. V. og P. L. Hoffman (1997). "Ethanol Promotes Apoptosis in Cerebellar Granule Cells by Inhibiting the Trophic Effect of NMDA." Journal of Neurochemistry **68**(2): 578-586.

Bohn, M. C., D. Dean, S. Hussain og R. Giuliano (1994). "Development of mRNAs for glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in rat hippocampus." Developmental Brain Research **77**(2): 157-162.

Brenner, D. og T. W. Mak (2009). "Mitochondrial cell death effectors." Current Opinion in Cell Biology **21**(6): 871-877.

Brodal, P. (2001). Sentralnervesystemet. Oslo, Universitetsforlaget.

Buttgereit, F. og A. Scheffold (2002). "Rapid glucocorticoid effects on immune cells." Steroids **67**(6): 529-534.

Buttgereit, F., R. H. Straub, M. Wehling og G. R. Burmester (2004). "Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: An update on the mechanisms of action." Arthritis & Rheumatism **50**(11): 3408-3417.

Chang, L. K., G. V. Putcha, M. Deshmukh og E. M. Johnson (2002). "Mitochondrial involvement in the point of no return in neuronal apoptosis." Biochimie **84**(2-3): 223-231.

Charbonneau, H. og M. J. Cormier (1979). "Ca²⁺-induced bioluminescence in *Renilla reniformis*. Purification and characterization of a calcium-triggered luciferin-binding protein." Journal of Biological Chemistry **254**(3): 769-780.

Chavas, J. og A. Marty (2003). "Coexistence of Excitatory and Inhibitory GABA Synapses in the Cerebellar Interneuron Network." The Journal of Neuroscience **23**(6): 2019-2031.

Chen, C. og H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." Molecular and cellular biology **7**(8): 2745-2752.

Choi, D. W. (1996). "Ischemia-induced neuronal apoptosis." Current Opinion in Neurobiology **6**(5): 667-672.

Chrysanthy, I. (2009). "Triggers of apoptosis in the immature brain." Brain & development **31**(7): 488-492.

Chudakov, D. M., S. Lukyanov og K. A. Lukyanov (2005). "Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging." Trends in Biotechnology **23**(12): 605-613.

Ciani, E., L. Grøneng, M. Voltattorni, V. Rolseth, A. Contestabile og R. E. Paulsen (1996). "Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons." Brain Research **728**(1): 1-6.

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.

Croxtall, J. D., Q. Choudhury og R. J. Flower (2000). "Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism." British Journal of Pharmacology **130**(2): 289-298.

Cull-Candy, S., S. Brickley og M. Farrant (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." Current Opinion in Neurobiology **11**(3): 327-335.

Cull-Candy, S. G., S. G. Brickley, C. Misra, D. Feldmeyer, A. Momiyama og M. Farrant (1998). "NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors." Neuropharmacology **37**(10-11): 1369-1380.

Danielsen, M., J. P. Northrop, J. Jonklaas og G. M. Ringold (1987). "Domains of the Glucocorticoid Receptor Involved in Specific and Nonspecific Deoxyribonucleic Acid Binding, Hormone Activation, and Transcriptional Enhancement." Molecular endocrinology **1**(11): 816-822.

Das, S., Y. F. Sasaki, T. Rothe, L. S. Premkumar, M. Takasu, J. E. Crandall, P. Dikkes, D. A. Conner, P. V. Rayudu, W. Cheung, H. S. V. Chen, S. A. Lipton og N. Nakanishi (1998). "Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A." Nature **393**(6683): 377-381.

de Kloet, E. R., E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl og M. Joels (1998). "Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease." The Endocrine Reviews **19**(3): 269-301.

Dean, S. og M. McCarthy (2008). "Steroids, sex and the cerebellar cortex: implications for human disease." The Cerebellum **7**(1): 38-47.

Dehmelt, L. og S. Halpain (2004). "Actin and microtubules in neurite initiation: Are MAPs the missing link?" Journal of Neurobiology **58**(1): 18-33.

Dessi, F., H. Pollard, J. Moreau, Y. Ben-Ari og C. Charriaud-Marlangue (1995). "Cytosine Arabinoside Induces Apoptosis in Cerebellar Neurons in Culture." Journal of Neurochemistry **64**(5): 1980-1987.

Edwards, M. A., R. A. Loxley, A. J. Williams, M. Connor og J. K. Phillips (2007). "Lack of functional expression of NMDA receptors in PC12 cells." NeuroToxicology **28**(4): 876-885.

Eilers, J., T. D. Plant, N. Marandi og A. Konnerth (2001). "GABA-mediated Ca²⁺ signalling in developing rat cerebellar Purkinje neurones." The Journal of Physiology **536**(2): 429-437.

Epstein, F. H., S. A. Lipton og P. A. Rosenberg (1994). "Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders." New England Journal of Medicine **330**(9): 613-622.

Falkenstein, E., A. W. Norman og M. Wehling (2000). "Mannheim Classification of Nongenomically Initiated (Rapid) Steroid Action(s)." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(5): 2072-2075.

Farrant, M., D. Feldmeyer, T. Takahashi og S. G. Cull-Candy (1994). "NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum." Nature **368**(6469): 335-339.

Feng, Y. Z. (2009). Mulig interaksjon mellom NMDA reseptorsubenheten 3A og glukokortikoidreseptoren. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap. **Master**.

Filippovich, I. V., N. I. Sorokina, N. Robillard og J. F. Chatal (1997). "Radiation-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids." International Journal of Cancer **72**(5): 851-859.

Fu, Z., S. M. Logan og S. Vicini (2005). "Deletion of the NR2A subunit prevents developmental changes of NMDA-mEPSCs in cultured mouse cerebellar granule neurones." The Journal of Physiology **563**(3): 867-881.

Gallo, V., M. T. Ciotti, A. Coletti, F. Aloisi og G. Levi (1982). "Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**(24): 7919-7923.

Gerl, R. og D. L. Vaux (2005). "Apoptosis in the development and treatment of cancer." Carcinogenesis **26**(2): 263-270.

Giguère, V., S. M. Hollenberg, M. G. Rosenfeld og R. M. Evans (1986). "Functional domains of the human glucocorticoid receptor." Cell **46**(5): 645-652.

Gould, E. (1994). "The Effects of Adrenal Steroids and Excitatory Input on Neuronal Birth and Survival." Annals of the New York Academy of Sciences **743**(1): 73-92.

Gould, E., C. S. Woolley og B. S. McEwen (1991). "Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death." The Journal of Comparative Neurology **313**(3): 479-485.

Gould, S. J. og S. Subramani (1988). "Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology." Analytical Biochemistry **175**(1): 5-13.

Greene, L. A. og A. S. 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): 2424-2428.

Gulino, A., E. De Smaele og E. Ferretti (2009). "Glucocorticoids and neonatal brain injury: the hedgehog connection." The Journal of Clinical Investigation **119**(2): 243-246.

Hardingham, G. E., Y. Fukunaga og H. Bading (2002). "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." Nature Neuroscience **5**(5): 405-414.

Hassel, B. og R. Dingledine (2006). Basic Neurochemistry, "Glutamate". San Diego, Elsevier Academic Press.

He, B., N. Lu og Z. Zhou (2009). "Cellular and nuclear degradation during apoptosis." Current Opinion in Cell Biology **21**(6): 900-912.

Heidemann, S. R. (1996). Cytoplasmic Mechanisms of Axonal and Dendritic Growth in Neurons. International Review of Cytology. W. J. Kwang, Academic Press. **165**: 235-262, 262a, 264-296.

Hertel, C., N. Hauser, R. Schubel, B. Seilheimer og J. A. Kemp (1996). " β -Amyloid-Induced Cell Toxicity: Enhancement of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide-Dependent Cell Death." Journal of Neurochemistry **67**(1): 272-276.

Hollenberg, S. M., C. Weinberger, E. S. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E. Brad Thompson, M. G. Rosenfeld og R. M. Evans (1985). "Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA." Nature **318**(6047): 635-641.

Hollmann, M. og S. Heinemann (1994). "Cloned Glutamate Receptors." Annual Review of Neuroscience **17**(1): 31-108.

Homer, H. C., D. R. Packan og R. M. Sapolsky (1990). "Glucocorticoids Inhibit Glucose Transport in Cultured Hippocampal Neurons and Glia." Neuroendocrinology **52**(1): 57-64.

Honig, L. S. og R. N. Rosenberg (2000). "Apoptosis and neurologic disease." The American Journal of Medicine **108**(4): 317-330.

Hoogervorst, E. L., C. H. Polman og F. Barkhof (2002). "Cerebral volume changes in multiple sclerosis patients treated with high-dose intravenous methylprednisolone." Multiple Sclerosis **8**(5): 415-419.

Hopps, H. E., B. C. Bernheim, A. Nisalak, J. H. Tjio og J. E. Smadel (1963). "Biologic Characteristics of a Continuous Kidney Cell Line Derived from the African Green Monkey." The Journal of Immunology **91**(3): 416-424.

Hu, X., C. Viesselmann, S. Nam, E. Merriam og E. W. Dent (2008). "Activity-Dependent Dynamic Microtubule Invasion of Dendritic Spines." The journal of neuroscience **28**(49): 13094-13105.

Ibrahim, N. M., A. C. Marinovic, S. R. Price, L. G. Young og O. Fröhlich (2000). "Pitfall of an internal control plasmid: response of Renilla luciferase (pRL-TK) plasmid to dihydrotestosterone and dexamethasone." Biotechniques **29**((4)): 782-784.

Igney, F. H. og P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nature reviews. Cancer **2**(4): 277-288.

Jacobs, C. M., P. Aden, G. H. Mathisen, E. Khuong, M. Gaarder, E. M. Løberg, J. Lømo, J. Mæhlen og R. E. Paulsen (2006a). "Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture." Journal of Neuroscience Methods **156**(1-2): 129-135.

Jacobs, C. M., M. D. Trinh, T. Rootwelt, J. Lømo og R. E. Paulsen (2006b). "Dexamethasone induces cell death which may be blocked by NMDA receptor antagonists but is insensitive to Mg²⁺ in cerebellar granule neurons." Brain Research **1070**(1): 116-123.

Jana, S. og J. Paliwal (2007). "Apoptosis: Potential Therapeutic Targets for New Drug Discovery." Current Medicinal Chemistry **14**: 2369-2379.

Jobe, A. H. og E. Bancalari (2001). "Bronchopulmonary Dysplasia." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **163**(7): 1723-1729.

Kadotani, H., T. Hirano, M. Masugi, K. Nakamura, K. Nakao, M. Katsuki og S. Nakanishi (1996). "Motor Discoordination Results from Combined Gene Disruption of the NMDA Receptor NR2A and NR2C Subunits, But Not from Single Disruption of the NR2A or NR2C Subunit." Journal of Neuroscience **16**(24): 7859-7867.

Kamath, K., E. Oroudjev og M. A. Jordan (2010). Determination of Microtubule Dynamic Instability in Living Cells. Methods in Cell Biology. C. Lynne and T. Phong, Academic Press. **97**: 1-14.

Kamphuis, P. J. G. H., F. Gardoni, A. Kamal, G. Croiset, J. M. Bakker, F. Cattabeni, W. H. Gispen, F. van Bel, M. Di Luca og V. M. Wiegant (2003). "Long-lasting effects of neonatal dexamethasone treatment on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity. Involvement of the NMDA receptor complex." FASEB J.: 02-0333fje.

Kandel, E. R., J. H. Schwartz og T. M. Jessel (1991). Principles of neuronal science. New York Elsevier Science Publishing Co. Inc.

Kawata, M. (1995). "Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system." Neuroscience Research **24**(1): 1-46.

Keightley, M.-C. og P. J. Fuller (1995). "Cortisol resistance and the guinea pig glucocorticoid receptor." Steroids **60**(1): 87-92.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie og A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." British journal of cancer **26**(4): 239-257.

Komuro, H. og P. Rakic (1993). "Modulation of neuronal migration by NMDA receptors." Science **260**(5104): 95-97.

Komuro, H. og P. Rakic (1998). "Distinct Modes of Neuronal Migration in Different Domains of Developing Cerebellar Cortex." Journal of Neuroscience **18**(4): 1478-1490.

Komuro, H. og E. Yacubova (2003). "Recent advances in cerebellar granule cell migration." Cellular and Molecular Life Sciences **60**(6): 1084-1098.

Kristian, T. og B. K. Siesjo (1998). "Calcium in Ischemic Cell Death." Stroke **29**(3): 705-718.

Kumada, T. og H. Komuro (2004). "Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca²⁺ transients." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(22): 8479-8484.

Kumar, G. K., J. L. Overholt, G. R. Bright, K. Y. Hui, H. Lu, M. Gratzl og N. R. Prabhakar (1998). "Release of dopamine and norepinephrine by hypoxia from PC-12 cells." American Journal of Physiology- Cell Physiology **274**(6): C1592-1600.

Kurien, B. T. og R. H. Scofield (2003). "Protein blotting: a review." Journal of Immunological Methods **274**(1-2): 1-15.

Leclerc, C. L., C. L. Chi, M. Awobuluyi og N. J. Sucher (1995). "Expression of N-methyl--aspartate receptor subunit mRNAs in the rat pheochromocytoma cell line PC12." Neuroscience Letters **201**(2): 103-106.

Leeds, P., Y. Leng, E. Chalecka-Franaszek og D. M. Chuang (2005). "Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons." Neurochemistry International **46**(1): 61-72.

Liggins, C. og R. N. Howie (1972). "A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants." Pediatrics **50**: 515.

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

Lipton, P. (1999). "Ischemic Cell Death in Brain Neurons." Physiological Reviews **79**(4): 1431-1568.

Lipton, S. A. og N. Nakanishi (1999). "Shakespeare in love—with NMDA receptors?" Nature **5**: 270 - 271.

Liu, Y., T. P. Wong, M. Aarts, A. Rooyackers, L. Liu, T. W. Lai, D. C. Wu, J. Lu, M. Tymianski, A. M. Craig og Y. T. Wang (2007). "NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo." Journal of Neuroscience **27**(11): 2846-2857.

Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter og X. Wang (1998). "Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors." Cell **94**(4): 481-490.

Laane, E., K. P. Tamm, E. Buentke, K. Ito, P. Khahariza, J. Oscarsson, M. Corcoran, A. C. Bjorklund, K. Hultenby, J. Lundin, M. Heyman, S. Soderhall, J. Mazur, A. Porwit, P. P. Pandolfi, B. Zhivotovsky, T. Panaretakis og D. Grander (2009). "Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy." Cell Death and Differentiation **16**(7): 1018-1029.

Magistretti, P. J. og L. Pellerin (1999). "Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain." News in Physiological Sciences **14**(5): 177-182.

Majno, G. og I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." American Journal of Pathology **146**(1): 3-15.

Mancini, J. D. og W. D. Atchison (2007). "The NR2B subunit in NMDA receptors is functionally important during cerebellar granule cell migration." Neuroscience Letters **429**(2-3): 87-90.

Marques, S. M. og J. C. G. Esteves da Silva (2009). "Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions." IUBMB Life **61**(1): 6-17.

Mayer, M. L. (2006). "Glutamate receptors at atomic resolution." Nature **440**(7083): 456-462.

McIlhinney, R. A. J., B. Le Bourdellès, E. Molnár, N. Tricaud, P. Streit og P. J. Whiting (1998). "Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl--aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells." Neuropharmacology **37**(10-11): 1355-1367.

McMaster, A. og D. W. Ray (2007). "Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects." Experimental Physiology **92**(2): 299-309.

Moncada, S. og J. P. Bolaños (2006). "Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration." Journal of Neurochemistry **97**(6): 1676-1689.

Monnet, F., ccedil, P. ois og T. Maurice (2006). "The Sigma1 Protein as a Target for the Non-genomic Effects of Neuro(active)steroids: Molecular, Physiological, and Behavioral Aspects." Journal of Pharmacological Sciences **100**(2): 93-118.

Morsink, M. C., M. Joëls, R. A. Sarabdjitsingh, O. C. Meijer, E. R. D. Kloet og N. A. Datson (2006). "The dynamic pattern of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional responses in neuronal PC12 cells." Journal of Neurochemistry **99**(4): 1282-1298.

Mullen, R. J., C. R. Buck og A. M. Smith (1992). "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." Development **116**(1): 201-211.

Mulugeta, S., J. M. Gray, K. L. Notarfrancesco, L. W. Gonzales, M. Koval, S. I. Feinstein, P. L. Ballard, A. B. Fisher og H. Shuman (2002). "Identification of LBM180, a Lamellar Body Limiting Membrane Protein of Alveolar Type II Cells, as the ABC Transporter Protein ABCA3." Journal of Biological Chemistry **277**(25): 22147-22155.

Myers, S. J., R. Dingledine og K. Borges (2003). "Genetic regulation of glutamate receptor ion channels " Annual Review of Pharmacology and Toxicology **39**(1): 221-241.

Nicolaidis, N. C., Z. Galata, T. Kino, G. P. Chrousos og E. Charmandari (2010). "The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function." Steroids **75**(1): 1-12.

Oppenheimer, J. H. og H. L. Schwartz (1997). "Molecular Basis of Thyroid Hormone-Dependent Brain Development." Endocrine Reviews **18**(4): 462-475.

Paoletti, P. og J. Neyton (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." Current Opinion in Pharmacology **7**(1): 39-47.

Patel, N. V. og C. E. Finch "The glucocorticoid paradox of caloric restriction in slowing brain aging." Neurobiology of Aging **23**(5): 707-717.

Pavlík, A. og M. Buresová (1984). "The neonatal cerebellum: The highest level of glucocorticoid receptors in the brain." Developmental Brain Research **12**(1): 13-20.

Pepe, G. J. og E. D. Albrecht (1984). "Transuteroplacental Metabolism of Cortisol and Cortisone during Mid- and Late Gestation in the Baboon." Endocrinology **115**(5): 1946-1951.

Pepe, G. J., M. G. Burch og E. D. Albrecht (1999). "Expression of the 11[beta]-Hydroxysteroid Dehydrogenase Types 1 and 2 Proteins in Human and Baboon Placental Syncytiotrophoblast." Placenta **20**(7): 575-582.

Pepe, G. J., B. J. Waddell og E. D. Albrecht (1990). "Activation of the Baboon Fetal Hypothalamic-Pituitary Adrenocortical Axis at Midgestation by Estrogen-Induced Changes in Placental Corticosteroid Metabolism." Endocrinology **127**(6): 3117-3123.

Perez-Otano, I., C. T. Schulteis, A. Contractor, S. A. Lipton, J. S. Trimmer, N. J. Sucher og S. F. Heinemann (2001). "Assembly with the NR1 Subunit Is Required for Surface Expression of NR3A-Containing NMDA Receptors." Journal of Neuroscience **21**(4): 1228-1237.

Phelps, D. S. og J. Floros (1991). "Dexamethasone in vivo raises surfactant protein B mRNA in alveolar and bronchiolar epithelium." American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology **260**(2): L146-152.

Phizicky, E. og S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." Microbiology Reviews **59**(1): 94-123.

Pigino, G., L. L. Kirkpatrick og T. B. Scott (2006). Basic Neurochemistry, "The Cytoskeleton of Neurons and Glia". San Diego, Elsevier Academic Press.

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

Porter, T. E., S. Ghavam, M. Muchow, I. Bossis og L. Ellestad (2007). "Cloning of partial cDNAs for the chicken glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and characterization of mRNA levels in the anterior pituitary gland during chick embryonic development." Domestic Animal Endocrinology **33**(2): 226-239.

Powell, C., C. Watson og B. Gametchu (1999). "Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49<sup>+</sup> lymphoma cells." Endocrine **10**(3): 271-280.

Proskuryakov, S. Y. a., A. G. Konoplyannikov og V. L. Gabai (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?" Experimental Cell Research **283**(1): 1-16.

Ramnani, N. (2006). "The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function." Nature Reviews Neuroscience **7**(7): 511-522.

Roberts, A. C., J. Díez-García, R. M. Rodriguiz, I. P. López, R. Luján, R. Martínez-Turrillas, E. Picó, M. A. Henson, D. R. Bernardo, T. M. Jarrett, D. J. Clendeninn, L. López-Mascaraque, G. Feng, D. C. Lo, J. F. Wesseling, W. C. Wetsel, B. D. Philpot og I. Pérez-Otaño (2009). "Downregulation of NR3A-Containing NMDARs Is Required for Synapse Maturation and Memory Consolidation." Neuron **63**(3): 342-356.

Robson, A. C., C. M. Leckie, J. R. Seckl og M. C. Holmes (1998). "11[beta]-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain." Molecular Brain Research **61**(1-2): 1-10.

Rumbaugh, G. og S. Vicini (1999). "Distinct Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Developing Cerebellar Granule Neurons." Journal of Neuroscience **19**(24): 10603-10610.

Sapolsky, R. M. (1996). "Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion." Stress: The International Journal on the Biology of Stress **1**(1): 1 - 19.

Sarnat, H. B., D. Nochlin og D. E. Born (1998). "Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system." Brain and Development **20**(2): 88-94.

Sasaki, Y. F., T. Rothe, L. S. Premkumar, S. Das, J. Cui, M. V. Talantova, H.-K. Wong, X. Gong, S. F. Chan, D. Zhang, N. Nakanishi, N. J. Sucher og S. A. Lipton (2002). "Characterization and Comparison of the NR3A Subunit of the NMDA Receptor in Recombinant Systems and Primary Cortical Neurons." Journal of Neurophysiology **87**(4): 2052-2063.

Savill, J. og V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-788.

Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg og M. E. Peter (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." European Journal of Biochemistry **254**(3): 439-459.

Schüler, T., I. Mesic, C. Madry, I. Bartholomäus og B. Laube (2008). "Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 Heterodimers Constitutes the Initial Step in N-Methyl-D-aspartate Receptor Assembly." Journal of Biological Chemistry **283**(1): 37-46.

Sengpiel, B., E. Preis, J. Krieglstein og J. H. M. Prehn (1998). "NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria." European Journal of Neuroscience **10**(5): 1903-1910.

Stahn, C., M. Löwenberg, D. W. Hommes og F. Buttgerit (2007). "Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists." Molecular and Cellular Endocrinology **275**(1-2): 71-78.

Stanika, R. I., N. B. Pivovarova, C. A. Brantner, C. A. Watts, C. A. Winters og S. B. Andrews (2009). "Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(24): 9854-9859.

Strøm, B. O., P. Aden, G. H. Mathisen, J. Lømo, S. Davanger og R. E. Paulsen "Transfection of chicken cerebellar granule neurons used to study glucocorticoid receptor regulation by nuclear receptor 4A (NR4A)." Journal of Neuroscience Methods **In Press, Uncorrected Proof**.

Størdal, K. og J. Lunde (2007). "Bruk og misbruk av steroider til nyfødte." Tidsskriftet for den norske legeförening **127**(21): 2806-2809.

Szatkowski, M., B. Barbour og D. Attwell (1990). "Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake." Nature **348**(6300): 443-446.

Takahashi, L. K. (1998). "Prenatal stress: consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function." International Journal of Developmental Neuroscience **16**(3-4): 199-207.

Takahashi, T., T. Kimoto, N. Tanabe, T. a. Hattori, N. Yasumatsu og S. Kawato (2002). "Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons." Journal of Neurochemistry **83**(6): 1441-1451.

Tanaka, K. (1993). "Cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain." Neuroscience Letters **159**(1-2): 183-186.

Tang, Y.-Z. og C. E. Carr (2004). "Development of NMDA R1 expression in chicken auditory brainstem." Hearing Research **191**(1-2): 79-89.

- Tauber, S. C., C. Schlumbohm, L. Schilg, E. Fuchs, R. Nau og J. Gerber (2006). "Intrauterine Exposure to Dexamethasone Impairs Proliferation But Not Neuronal Differentiation in the Dentate Gyrus of Newborn Common Marmoset Monkeys." Brain Pathology **16**(3): 209-217.
- Tennant, J. R. (1964). "Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability." Transplantation **2**(6): 685-694.
- Towbin, H., T. Staehelin og J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(9): 4350-4354.
- Traynelis, S., M. Hartley og S. Heinemann (1995). "Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines." Science **268**(5212): 873-876.
- Uno, H., S. Eisele, A. Sakai, S. Shelton, E. Baker, O. DeJesus og J. Holden (1994). "Neurotoxicity of Glucocorticoids in the Primate Brain." Hormones and Behavior **28**(4): 336-348.
- Vaudry, D., A. Falluel-Morel, S. Leuillet, H. Vaudry og B. J. Gonzalez (2003). "Regulators of Cerebellar Granule Cell Development Act Through Specific Signaling Pathways." Science **300**(5625): 1532-1534.
- Vazhappilly, R. og N. J. Sucher (2002). "Turnover analysis of N-methyl--aspartate receptor subunit NR1 protein in PC12 cells." Neuroscience Letters **318**(3): 153-157.
- Wang, K. K. W. (2000). "Calpain and caspase: can you tell the difference?" Trends in Neurosciences **23**(1): 20-26.
- Watanabe, M., M. Mishina og Y. Inoue (1994). "Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum." The Journal of Comparative Neurology **343**(4): 513-519.
- Waxman, E. A. og D. R. Lynch (2005). "N-methyl-D-aspartate Receptor Subtypes: Multiple Roles in Excitotoxicity and Neurological Disease." The Neuroscientist **11**(1): 37-49.
- Wehus, L. E. (2007). Mulige interaksjoner mellom NMDA-reseptorsubenheter og glukokortikoidreseptoren.

West, A. E., E. C. Griffith og M. E. Greenberg (2002). "Regulation of transcription factors by neuronal activity." Nature Reviews. Neuroscience **3**(12): 921-931.

Wong, H. K., X. B. Liu, M. F. Matos, S. F. Chan, I. Pérez-Otaño, M. Boysen, J. Cui, N. Nakanishi, J. S. Trimmer, E. G. Jones, S. A. Lipton og N. J. Sucher (2002). "Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain." The Journal of Comparative Neurology **450**(4): 303-317.

Xu, Y. og F. C. Szoka (1996). "Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection†,‡." Biochemistry **35**(18): 5616-5623.

Yeh, T. F., Y. J. Lin, H. C. Lin, C. C. Huang, W. S. Hsieh, C. H. Lin og C. H. Tsai (2004). "Outcomes at School Age after Postnatal Dexamethasone Therapy for Lung Disease of Prematurity." New England Journal of Medicine **350**(13): 1304-1313.

Ying, H. S., F. J. Gottron og D. W. Choi (2001). Assessment of Cell Viability in Primary Neuronal Cultures, John Wiley & Sons, Inc.

Yoshida, I., N. Ban og N. Inagaki (2004). "Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **323**(2): 547-555.

Yu, I. T., S.-H. Lee, Y.-S. Lee og H. Son (2004). "Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro." Biochemical and Biophysical Research Communications **317**(2): 484-490.

Yuan, J., M. Lipinski og A. Degtarev (2003). "Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death." Neuron **40**(2): 401-413.