

Interaksjoner mellom MEK/ERK-signalveien og celledød indusert av caspaseaktivatorene PAC-1 og 1541

Annine Thomassen Gjesvik



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

FORORD

Arbeidet til denne oppgaven er blitt utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap tilhørende Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo i perioden august 2010 til mai 2011 som en del av graden Master i Farmasi.

Jeg ønsker å rette en stor takk til min hovedveileder professor Ragnhild E. Paulsen og medveileder stipendiat Karen Boldingh Debernard for faglig støtte og inspirerende veiledning under hele arbeidet. Takk for god hjelp, lærerike samtaler, motiverende innspill og konstruktive tilbakemeldinger.

Takk til Bjørn Oddvar Strøm, Gro Mathisen og Mona Gaarder for god opplæring og hjelp på laben samt nyttige innspill og støttende samtaler når arbeidet har vært vanskelig.

Takk til mine medstudenter for hyggelige samtaler og godt selskap på laben.

Til slutt vil jeg takke hele forskningsgruppen for et godt faglig og sosialt arbeidsmiljø som jeg har følt meg velkommen og ivaretatt i.

Oslo, mai 2011

Annine Thomassen Gjesvik

SAMMENDRAG

Apoptotisk celledød er en fundamental prosess i cellulær homeostase og utvikling av vitale organer i multicellulære organismer. Apoptose er nøye regulert av ulike signalveier som utgjør en kompleks balansegang mellom død og overlevelse, og har blitt studert av forskere i årevis. Ubalanse i denne reguleringen gir opphav til patologiske tilstander som kreft, autoimmune og nevrodegenerative sykdommer. For å kunne behandle slike abnormaliteter er det behov for mer kunnskap om de biokjemiske og cellulære mekanismene som er involvert i reguleringen av en celledøds liv og død.

Caspaser er en gruppe proteaser som gjennom kløyving av intracellulære substrater driver apoptoseprosessen fremover. Vekstfaktorer kan beskytte mot apoptose gjennom blant annet MEK/ERK-signalveien, en MAP-kinase kaskade som fremmer proliferasjon, differensiering og overlevelse. I dette arbeidet er interaksjonen mellom vekstfaktoren EGF og caspase-3 studert ved bruk av de rapporterte caspase-3-aktivatorene PAC-1 og 1541 som eksperimentelle verktøy i PC12-celler og kyllingkornceller.

PAC-1 og 1541 induerte celledød både i PC12-celler og kyllingkornceller, men ingen eller en liten økning av caspase-3-aktivitet ble påvist. Sen induksjon av celledød og tendens til reduksjon av celledød ved sen tilsetning av caspase-3-inhibitor tyder på at PAC-1 og 1541 bruker lang tid på å aktivere caspase-3. Ufullstendig beskyttelse mot celledød med caspase-3-inhibitor kan tyde på at celledøden også skyldes andre prosesser i cellene. Reduksjon av celledød med EGF og tegn til økt celledød med MEK-inhibitor tyder på en "crosstalk" mellom caspase-3 og MEK/ERK signalveien. Dette støttes av at PAC-1 og 1541 viste tegn til å gi en reduksjon av P-ERK som syntes å bli reversert av EGF og caspase-3-inhibitor.

Det kan konkluderes med at PAC-1 og 1541 kan indusere celledød i PC12-celler og kyllingkornceller, men at slike små molekylære aktivatorer av caspaser kan ha en mer kompleks virkningsmekanisme enn tidligere antatt. Dette er noe som bør kartlegges videre. Spesifikke aktivatorer av caspase-3 kan bli viktige verktøy for å forstå regulering av apoptose både i kreftceller og i nerveceller.

INNHold

FORORD.....	2
SAMMENDRAG.....	3
INNHold.....	4
1. INNLEDNING.....	7
1.1 CELLEDØD.....	7
1.1.1 Nekrose.....	7
1.1.2 Apoptose.....	8
1.1.3 Celledød i utvikling og sykdom.....	8
1.2 CASPASER.....	9
1.2.1 Caspasegrupper.....	9
1.2.2 Den ytre signalveien i apoptose.....	11
1.2.3 Den indre signalveien i apoptose	11
1.2.4 Caspase-3.....	12
1.3 CASPASEAKTIVATORER.....	13
1.3.1 1541	13
1.3.2 PAC-1	13
1.4 SINK.....	14
1.4.1 Cellesyklus	14
1.4.2 Sinkdeprivasjon gir apoptose og hemmer proliferasjon.....	16
1.5 MEK/ERK-SIGNALVEIEN.....	17
1.5.1 "Crosstalk" mellom MEK/ERK-signalveien og caspasekaskaden.....	18
1.6 CELLEKULTURER TIL STUDIER AV CELLEDØD.....	19
1.6.1 PC12-celler.....	19
1.6.2 Kyllingkornceller.....	20
1.7 MÅL MED OPPGAVEN.....	20
2. MATERIALER OG METODER.....	21
2.1 KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER.....	21
2.2 UTSTYR.....	23
2.3 SPLITTING AV PC12-CELLER.....	24
2.4 KORNCELLEKULTURER FRA KYLLING.....	25
2.4.1 Poly-L-lysin behandling av cellekulturskåler.....	25
2.4.2 Preparering av korncellekulturer fra kylling.....	26
2.4.3 Tilsetning av Ara-C og bytting av medium.....	28

2.5 DETEKSJON AV CELLEDØD.....	29
2.5.1 Eksponering av PC12-celler til deteksjon av celledød.....	29
2.5.2 Eksponering av kyllingkornceller til deteksjon av celledød.....	30
2.5.3 Kvantifisering av celledød	31
2.6 OBSERVASJON AV KJERNEMORFOLOGI I PC12-CELLER.....	32
2.7 MÅLING AV CASPASE-3-AKTIVITET	33
2.7.1 Måling av caspase-3-aktivitet i PC12-celler.....	33
2.7.2 Måling av caspase-3-aktivitet i kyllingkornceller.....	34
2.8 PROTEINMÅLING.....	36
2.9 WESTERNBLOTTING.....	38
2.9.1 Eksponering av PC12-celler til analyse med westernblotting.....	38
2.9.2 Eksponering av kyllingkornceller til analyse med westernblotting.....	39
2.9.3 Høsting av PC12-celler og kyllingkornceller til westernblotting.....	40
2.9.4 Proteinjustering av celleprøver til westernblotting.....	40
2.9.5 Prosedyre for westernblotting.....	41
2.9.6 Kvantifisering av westernbåndstyrke.....	47
2.10 GRAFER OG STATISTIKK.....	48
3. RESULTATER.....	49
3.1 CELLEDØD I PC12-CELLER OG KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1 ELLER 1541. .	49
3.1.1 Celledød i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541	49
3.1.2 Celledød i PC12-celler eksponert i 24 eller 48 timer for ulike konsentrasjoner av PAC-1 og 1541.....	50
3.1.3 Effekt av EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541.	52
3.1.4 Kjernemorfologi i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541	55
3.1.5 Celledød i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 eller 1541	57
3.1.6 Effekt av EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 eller 1541.....	59
3.2 CASPASEAKTIVITET I PC12-CELLER OG KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1 ELLER 1541	64
3.2.1 Caspase-3-aktivitet i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541.....	64
3.2.2 Caspase-3-aktivitet i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 eller 1541.....	66
3.2.3 Procaspase-3 i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541 tilsatt EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer.....	68
3.3 P-ERK i PC12-CELLER OG KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1 ELLER 1541	74

3.3.1 P-ERK i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541 tilsatt EGF.....	74
3.3.2 P-ERK i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 eller 1541 tilsatt EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer.....	77
3.4 IKKE-PROLIFERERENDE PC12-CELLER EKSPONERT FOR PAC-1 ELLER 1541.....	83
3.4.1 Celledød i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541.....	83
3.4.2 Celledød i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert i 24 eller 48 timer for ulike konsentrasjoner av PAC-1 og 1541	84
3.4.3 Effekt av EGF, MEK-inhibitor eller caspase-3-inhibitor i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541.....	86
3.4.4 P-ERK og ERK2 i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541	88
4. DISKUSJON.....	91
4.1 DISKUSJON AV METODER.....	91
4.1.1 Cellemodeller.....	91
4.1.2 Metoder for kvantifisering av celledød.....	92
4.1.3 Metoder til studering av proteiner involvert i celledød.....	93
4.2 DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN.....	94
4.2.1 PAC-1 og 1541 induserer celledød	94
4.2.2 Induserer PAC-1 og 1541 mer caspaseavhengig celledød i ikke-prolifererende celler?.....	97
4.2.3 EGF beskytter mot celledød induisert av PAC-1 og 1541.....	98
4.2.4 "Crosstalk" mellom MEK/ERK-signalveien og caspaseskaskaden.....	99
4.2.5 PAC-1 og 1541 som aktivatorer av caspase-3.....	100
5. KONKLUSJON.....	101
FORKORTELSER.....	102
REFERANSER.....	104

1. INNLEDNING

Kontrollert celledød (apoptose) er en fundamental prosess under embryonal utvikling og opprettholdelse av vevshomeostase, men feil i reguleringen kan gi opphav til patologiske tilstander (kap 1.1) (Fleicher et al. 2005). Forståelsen av de molekylære mekanismene i celledød og endringene som skjer ved sykdom er tilknyttet stor forskninginteresse. Caspaser er nøkkelmolekyler i apoptose (kap 1.2) og er potensielle angrepspunkt i farmakologisk modulering. Stoffer designet til å interferere med caspaseaktivering (kap 1.3) kan være nyttig i behandling av sykdommer som kreft, revmatoid artritt og Alzheimers (Lavrik et al. 2005). Balansen mellom en celledøds liv og død styres av et komplekst nettverk av regulatoriske faktorer (kap 1.4 og 1.5) (Adamo et al. 2010). I dette arbeidet er det studert mekanismer i celledød induisert av caspaseaktivatorene PAC-1 og 1541 ved bruk av PC12-celler og kyllingkornceller som *in vitro* cellemodeller (kap 1.6).

1.1 CELLEDØD

En celle kan dø på ulike måter og det er gjort mye arbeid i å prøve å kartlegge de ulike prosessene som fører til celledød. Celledød kan basert på de biokjemiske og morfologiske prosessene grovt deles inn i apoptose og nekrose (Hotchkiss et al. 2009). Apoptose omtales som en aktiv og programmert form for celledød der selve celledødsprosessen er nøye regulert. Nekrose er kjent som en passiv prosess der et raskt og ukontrollert tap av cellulær homeostase fører til celledød (Saraste and Pulkki 2000). Det er i flere tilfeller observert situasjoner der "crosstalk" mellom apoptose og nekrose har forekommet (Kerr et al. 1972; Leist et al. 1997). Mangel på ATP, ROS stimuli og destabilisering av membranpotensial er faktorer som kan drive en apoptotisk prosess til nekrose (Nicotera and Melino 2004). Undertrykking av en apoptotisk prosess kan gjøre at cellen går i nekrose istedenfor å overleve dersom dødsstimulusen ikke stoppes (Hotchkiss et al. 2009).

1.1.1 Nekrose

Nekrose er resultat av en biokjemisk kollaps i cellen der toksiske reagenter interagerer med ATP generering slik at ionepumpene i membranen slutter å virke og elektrolytter samles opp inni cellen. Dette fører til at væske går inn i cellen slik at den sveller og mister sin membranintegritet (Majno and Joris 1995). Når membranen sprekker vil cellulært materiale lekke ut og gi inflammasjon i cellens ekstracellulære miljø (Saraste and Pulkki 2000). Nekrose forekommer ofte som følge av fysisk traume, toksiner, varme, kulde og i noen tilfeller apoptose (Hotchkiss et al. 2009).

1.1.2 Apoptose

Apoptose er en kontrollert nedbrytningsprosess der kromatinet i kjernen kondenserer og fragmenterer. Cellen avrundes, krymper og løsner fra underlaget. Organellene pakkes inn i membranbundete vesikler som fagocytteres inn i makrofager. Dermed vil det ikke slippes ut noe cellulært materiale og inflammasjon i det ekstracellulære miljøet unngås (Kerr et al. 1972).

Apoptose er en aktiv prosess som krever energi og mangel på ATP kan gjøre at cellen går fra apoptose til nekrose (Leist et al. 1997).

1.1.3 Celledød i utvikling og sykdom

Apoptose spiller en essensiell rolle i normal utvikling og vedlikeholdelse av vevshomeostase i multicellulære organismer, en prosess som regnes som fysiologisk apoptose. En stor mengde nevroner som produseres under utvikling vil bli fjernet ved apoptose under foredlingen av nervesystemet i den embryonale og postnatale fasen (Blomgren et al. 2007). Apoptose har også en viktig funksjon i utvikling og vedlikeholdelse av immunsystemet ved at lymfocytter som mangler funksjonelle eller uttrykker vertsskadelige antigener elimineres (Marsden and Strasser 2003).

Feil i apoptosereguleringen er en viktig faktor til patologiske tilstander som kreft, autoimmune og neurodegenerative sykdommer. Modne nevroner er differensierte til å utøve bestemte funksjoner i nervesystemet og er ikke istand til å proliferere. Neurodegenerative sykdommer som Alzheimers, Parkinsons og Huntingtons er kroniske sykdommer som resulterer i tap av kognitiv eller motorisk funksjon grunnet progressiv apoptose av nevroner (Fleicher et al. 2006). Forståelse av de molekylære og cellulære mekanismene som skjer ved apoptose er nødvendig for behandling av slike sykdommer og flere mulige targets er allerede identifisert (Mattson 2000).

Nekrotisk celledød er observert som følge av akutte tilstander i kroppen forårsaket av skade som starter en biokjemisk kaskade der frie radikaler og eksotoksiner dannes. Apoptose kan forekomme i nærliggende vevsområder som har vært utsatt for en akutt skade. Etter en iskemi vil det være områder rundt som fortsatt har nok blodgjennomstrømning til at cellene fortsatt kan generere ATP. Dette gjør at celledødsstimuli som slippes ut fra det skadete området setter igang en patologisk apoptoseprosess istedenfor nekrose (Friedlander 2003; Blomgren et al 2007). Denne situasjonen gir mulighet til å kunne påvirke skadeomfanget av for eksempel et hjerneslag der igangsetting av apoptose kan forhindres ved å beskytte cellene mot frie radikaler og eksotoksiner, og hemme signalveier i apoptosekaskaden (Linnik et al. 1993; Friedlander 2003).

1.2 CASPASER

Caspaser er en gruppe cystein-aspartat-spesifikke proteaser som syntetiseres som proenzymmer og krever en biokjemisk endring for å bli aktivert. Caspasene gjenkjenner og kløyver proteiner med en bestemt aminosyrekjede der glutamat og aspartat er obligatoriske mens de to andre aminosyrene varierer. Ulike caspaser vil kløyve ulike proteiner avhengig av hvilke aminosyrer de gjenkjenner (Lavrik et al. 2005). Caspasene har en fundamental funksjon der de driver apoptoseprosessen frem ved å aktivere proapoptotiske proteiner og hemme antiapoptotiske signaler (Earnshaw et al. 1999).

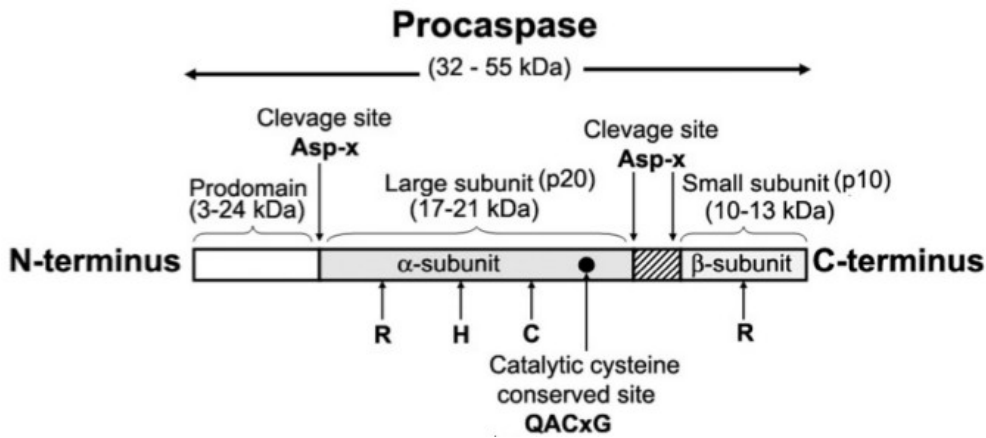
1.2.1 Caspasegrupper

Caspasene kan deles inn i to hovedgrupper. Den ene gruppen er cytokinaktivatorer som bidrar til inflammatorisk respons og består av caspase 1, 4, 5, 11, 12 og 13. Den andre gruppen består av de apoptotiske caspasene 2, 3, 6, 7, 8, 9 og 10 som formidler og overfører celledødsignaler. De apoptotiske caspasene er kategorisert som initiatorer og effektorer organisert i kaskader med sammenfallende endepunkt (Salvesen and Riedl 2007).

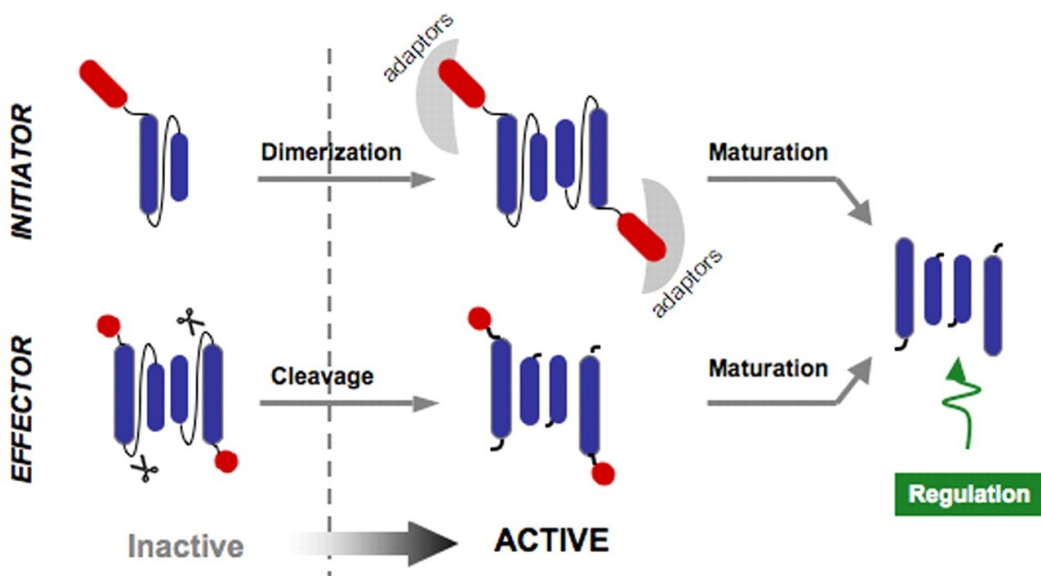
Procaspasene består av et prodomene og en stor og liten subenhet på henholdsvis omtrent 20 kDa og 10 kDa (figur 1.1a). Initiatorcaspasene har lange prodomener og eksisterer som inaktive monomerer som ved hjelp av adapterer på prodomenet binder til en oligomerisk plattform og danner et aktivt sete ved dimerisering (figur 1.1b). Caspase 2, 8, 9 og 10 benytter denne form for aktivering (Salvesen and Riedl 2007). Effektorcaspasene 3, 6 og 7 eksisterer som inaktive dimerer med et kort prodomene. Kløyving av bindingene som separerer den store og lille subenheten fra det katalytiske domenet bidrar til en reorganisering av dimerene og dannelse av et aktivt sete (Fuentes-Prior and Salvesen 2004).

Aktivering av caspaser fører ikke til fjerning av prodomenet, men etter aktivering kan aktive caspaser undergå en autoproteolytisk fjerning av prodomenet. Det blir dannet en mer stabil form av de aktive caspasene som gjør dem mottakelig for videre regulering. Det spekuleres i om den stabile formen av en moden caspase og den mer ustabile formen av aktivert caspase med prodomenet gjør det mulig at caspasene kan utføre ulike og til dels motstridende biologiske funksjoner (Pop and Salvesen 2009). Den modne caspaseformen uttrykker sterk katalytisk aktivitet som trolig forsterker apoptotiske funksjoner. Aktiverte caspaser med prodomene eksisterer i ulike isoformer som har vist å kunne fremme antiapoptotiske funksjoner som proliferering, differensiering og overlevelsessignaler (Fuentes-Prior and Salvesen 2004; Lamkanfi et al 2007).

A



B



Figur 1.1a-b: Caspasestruktur og aktivering av caspaser

A: En procaspase består av et prodome som er bundet til en stor og en liten subenhet som kan proteolyseres ved aspartat (Asp) kløyvningssteder. Den store subenheten har et katalytisk område mens den lille subenheten har substratbindende egenskaper. B: Initiatorcaspaser eksisterer som inaktive monomerer som aktiveres ved dimerisering mediert av prodomet. Effektorcaspaser eksisterer som inaktive dimerer som aktiveres ved kløyving av bindingen som separerer den store og lille subenheten fra det katalytiske domenet. Figur A er modifisert fra Chowdhury et al. 2008. Figur B er modifisert fra Pop and Salvesen 2009.

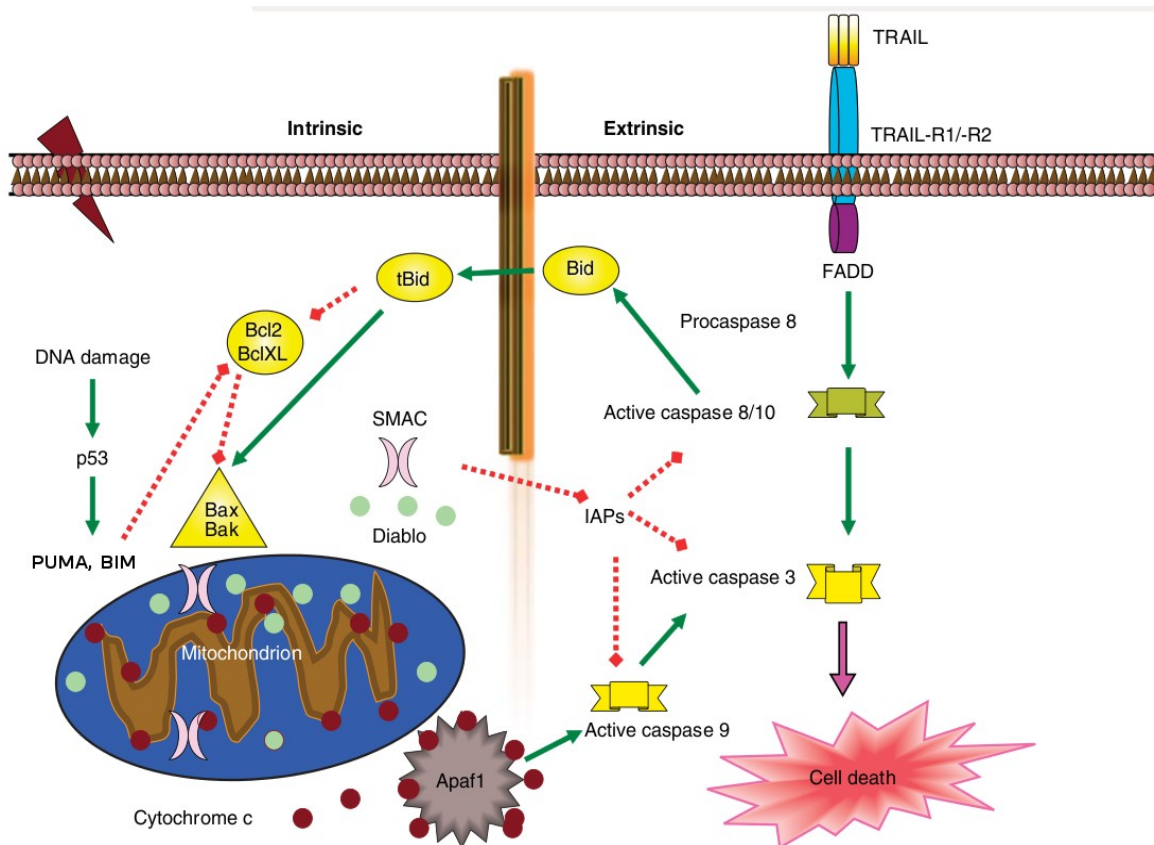
1.2.2 Den ytre signalveien i apoptose

Apoptosekaskaden er tradisjonelt delt inn i to signalveier, den ytre og indre signalvei (figur 1.2). Den ytre signalveien starter med aktivering av transmembrane dødsreseptorer ved binding av ekstracellulære ligander som FasL og TRAIL. Dette fører til en rekruttering og oligomerisering med Fas assosiert dødsdomene (FADD) og dannelse av et dødsinduserende kompleks (DISC) (Green and Kroemer 2005). DISC binder til dødseffektor prodomenet (DED) på procaspase-8 og 10 som dimeriseres og aktiveres (Lavrik et al. 2005). Aktivert caspase 8 og 10 kløyver procaspase-3 slik at aktiv caspase-3 kan kløyve substrater som fører til apoptotisk degradering av cellen. Caspase 8 og 10 kløyver også BH3-interagerende domene dødsagonist (Bid) til t-Bid som translokaliseres til mitokondriene og fremmer funksjon av proapoptotiske proteiner i Bcl-2 familien som initierer den indre apoptosesignalveien (Abdulghani and El-Deiry 2010).

1.2.3 Den indre signalveien i apoptose

Denne signalveien kalles også for den mitokondrielle signalveien og trigges av proapoptotiske stimuli. Eksempler på slike stimuli er skade på DNA eller mangel på vekstfaktorer som fører til oppregulering av den proapoptotiske transkripsjonsfaktoren p53 som øker transkripsjon av proapoptotiske proteiner som PUMA og BIM. Dette er proapoptotiske proteiner med BH3-domener som hemmer aktiviteten av antiapoptotiske Bcl-2 og Bcl-XL slik at proapoptotiske Bax og Bak kan binde til mitokondriene og øke membranpermeabiliteten (Hotchkiss et al. 2009). Tap av membranintegritet trigger utslipp av cytokrom c som bindes til og oligomeriserer Apaf-1 i cytosol. Dette resulterer i dannelse av et Apaf-1 apoptosom som rekrutterer procaspase-9 som dimeriseres og aktiveres. Aktivert caspase-9 vil så kunne kløyve procaspase-3 (Green 2000).

SMAC/DIABLO er et annet proapoptotisk protein som slippes ut av mitokondriene samtidig med cytokrom c og har som oppgave å hemme endogene inhibitorer av apoptose (IAP'er) (Green 2000). IAP'er har BIR-domener som er essensielle for den antiapoptotiske aktiviteten. For eksempel hemmer XIAP caspase 3 ved at BIR-domenet binder til dimerene og blokkerer det aktive setet ved interaksjon med caspase-9 hindrer XIAP dimerisering (Deveraux et al. 1999).



Figur 1.2 Den indre og ytre signalveien i apoptose

Binding av ekstracellulær ligand til dødsreseptor rekrutterer FADD som aktiverer caspase-8 og 10 som igjen aktiverer caspase-3. Aktiv caspase-8 og 10 bidrar til "crosstalk" mellom den ytre og indre apoptosekaskaden ved å fremme binding av Bax og Bak til mitokondriemembranen ved hjelp av t-Bid. Tap av mitokondriell membranintegritet gjør at cytokrom c slippes ut i cytosol og aktiverer caspase-3 gjennom dannelse av Apaf-1 apoptosom som dimeriserer caspase-9. Utslippelse av SMAC/DIABLO fra mitokondriene hemmer IAP'er i cytosol. Figuren er modifisert fra Abdulghani and El-Deiry 2010.

1.2.4 Caspase-3

Aktivert caspase-3 er et resultat av både den indre og den ytre apoptosesignalveien og er den effektorcaspasen som kløyver hovedandelen cellulære substrater i apoptotiske celler (Kumar 2007). Sammen med de andre effektorcaspasene bidrar caspase-3 til biokjemiske og morfologiske endringer i cellen som kjennetegner apoptotisk celledød (Earnshaw et al. 1999). Caspase-3 medvirker til degradering av cytoskjelettet ved kløyving av blant annet aktin og tubulin som bidrar til krymping og avrunding av cellen. Kløyving av lamin i tillegg til aktin bidrar også til fragmentering av kjernestrukturen. Caspase-3 fremmer aktivering av caspase-aktivert DNase som fører til kondensering av kromatin i kjernen (Taylor et al. 2008). Transkripsjonsfaktorer påvirkes også ved at caspase-3 blant annet aktiverer hemmere av antiapoptotiske faktorer som I κ B som fører til nedregulering av IAP'er. Ved caspase-3 mediert inaktivering av Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) opprettholdes mengden av ATP som er nødvendig for apoptose (Leist et al. 1997; Earnshaw et al. 1999).

1.3 CASPASEAKTIVATORER

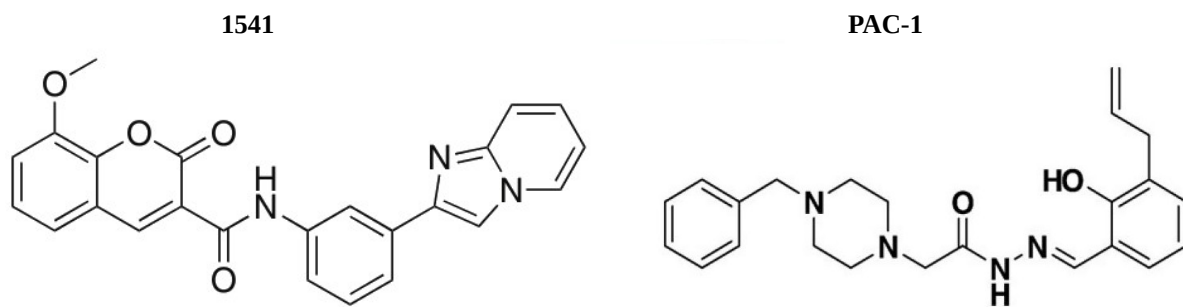
Utvikling av småmolekyler som kan modulere caspaseaktivitet kan gi nye muligheter i behandling av sykdommer med patologisk apoptose. Molekylene kan modifisere caspaseaktivitet ved å interagere med proteiner som er involvert i caspaseaktivering eller ved binding til et aktivt eller allosterisk sete på caspasen (Howley and Fearnhead 2008). Caspaseaktivatorer er også nyttige verktøy til studering av proenzymaktivering og videre funksjon i celler (Zorn and Wolan 2010).

1.3.1 1541

Studier av autoaktivering av caspaser har vist at caspasene er i en dynamisk likevekt mellom en intaktiv og en aktiv form der den inaktive formen ofte er favorisert. Små molekyllære aktivatorer som 1541 (figur 1.3) binder til procaspasen og stabiliserer den aktive konformasjonen. Dette fremmer autokløyving av caspasen ved å gjøre det aktive setet mer tilgjengelig for proteolyse. 1541 er designet til og vist å fremme aktivering av caspase-3 (Wolan et al. 2009; Zorn and Wells 2010). Ut i fra dette kan 1541 bli et nyttig verktøy for å studere signalveier og effekter knyttet til caspase-3 aktivering.

1.3.2 PAC-1

PAC-1 (figur 1.3) står for procaspase aktiverende substans og ble rapportert som en direkte aktivator av procaspase-3 der den foreslåtte mekanismen gikk ut på surgjøring av en sikring bestående av triaspartat som gjør procaspasen åpen for katalysering via caspase-8 og caspase-9 (Putt et al. 2006). I senere tid ble en alternativ virkningsmekanisme foreslått der PAC-1 ble vist å være en sink-chelator (Peterson et al. 2009a). Det er vist at sink-chelatering aktiverer caspase-3 og induserer apoptose (Chimienti et al. 2001). PAC-1 virker ved å chelatere sink bundet til procaspasen og redusere nivået av dynamisk sink i cellen slik at caspase-3 autoaktiveres uavhengig av caspase-8 eller caspase-9 (Peterson et al. 2009a). Det er vist at PAC-1 også induserer apoptose i celler som ikke uttrykker procaspase-3, noe som tyder på at den sink-chelaterende effekten til PAC-1 også påvirker andre prosesser i cellen som resulterer i celledød (se avsnitt 1.4.2) (Denault et al. 2007). Dette gjør PAC-1 til et interessant verktøy i studier av signalveier som medvirker til apoptose.



Figur 1.3: 1541 og PAC-1

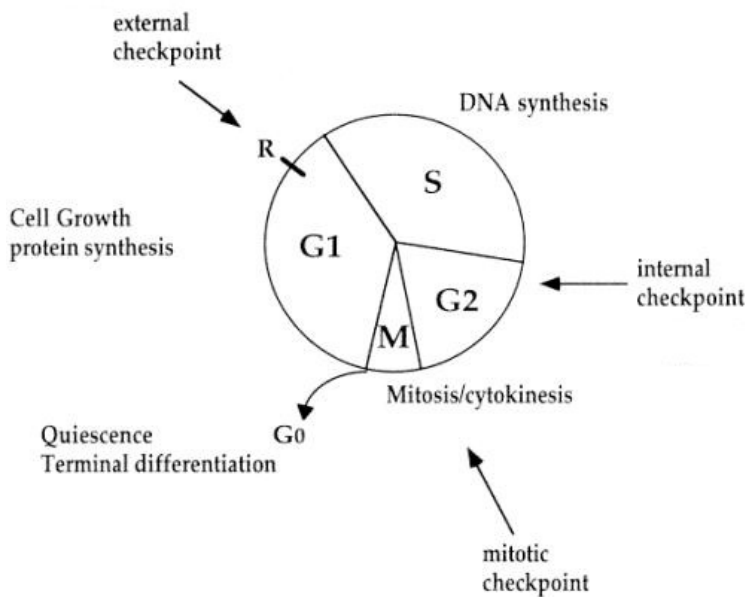
Strukturformler av 1541 og PAC-1 hentet fra Zorn and Wells 2010 og Peterson et al. 2009a.

1.4 SINK

Det har vært spekulert rundt at sink ble spesielt viktig under evolusjonen da jordens atmosfære ble oksygenrik og utvikling av cellulær respirasjon introduserte ROS. Cellene begynte å bruke sink istedenfor jern og mangan i flere proteiner siden sink ikke kan undergå redoksreaksjoner og dermed vil være beskyttet mot oksidering (Chai et al. 1999). Det er nå kjent at sink er involvert i essensielle cellulære prosesser som genekspressjon, proliferasjon og celledød (Vallee et al. 1993). Sink finnes i cellen som tett bundet til metalloenzymer, men også i en mer dynamisk form bundet til proteiner og lipider eller i vesikler. Det er trolig den dynamiske formen av sink som er viktig for proliferasjon og regulering av apoptose, og det er også den som blir påvirket ved sinkdeprivasjon (Chai et al. 1999; Troung-Tran et al. 2001).

1.4.1 Cellesyklus

En prolifererende celle gjennomgår en ordnet sekvens av faser som utgjør cellesyklus (figur 1.4). Mens cellen går gjennom syklusen utføres kontroller ved bestemte endestasjoner som sikrer at cellenes gjennomgang av fasen er komplett før introduksjon til neste fase. Slike interne faktorer kan sammen med eksterne faktorer påvirke cellesyklus og stimulere eller hemme celledeling (Dirks et al. 1996).



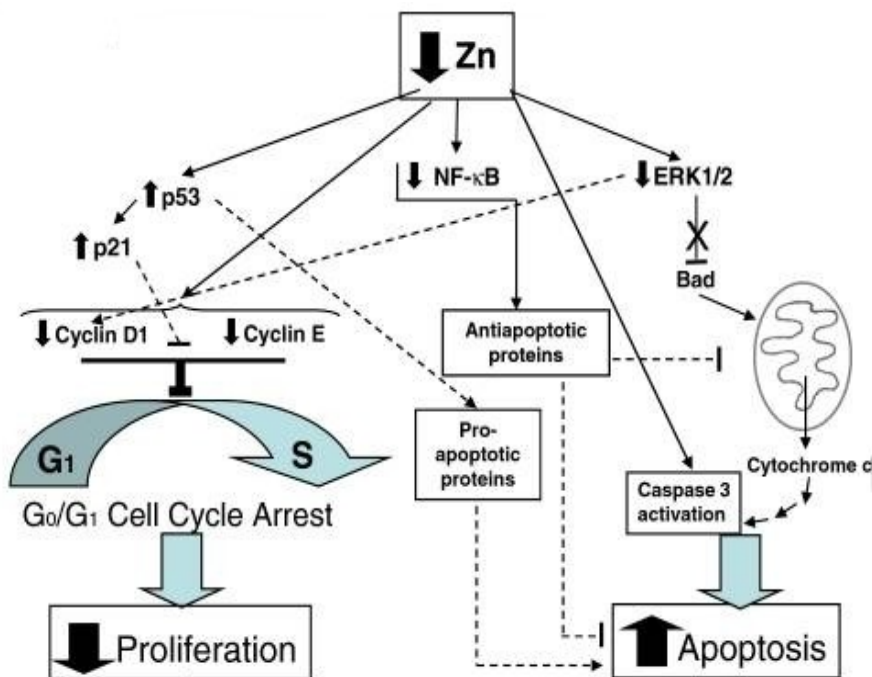
Figur 1.4: Cellesyklus

En prolifererende celle går inn i G1 (gap 1). Under gjennomgang av G1-fasen kontrolleres det for at cellen har god nok tilgang på aminosyrer og vekstfaktorer slik at cellen kan vokse og syntetisere komponenter som skal brukes til å lage DNA. Hvis det ikke er tilfredsstillende levetilstand vil cellen gå inn i G₀ som er et ikke-prolifererende stadium og bli der til forholdene bedres. I S-fasen blir kromosomalt DNA replikert og videre i G2-fasen kontrolleres det for at replikasjonen er fullstendig og uten feil. Under mitosen (M-fasen) separerer den mitotiske spindelen DNA-materialet til et par søsterkromatider. Ved å kontrollere at kromosomene er godt nok festet til spindelapparatet sikres ordentlig separasjon og migrasjon av søsterkromatidene til to motsatte sider av cellen. I den siste delen av M-fasen deles det cytoplasmiske materialet og danner to identiske celler. Figuren er hentet fra Dirks et al. 1996.

De interne kontrollene i syklusen er svært viktige. Hvis feil ikke oppdages kan patologiske tilstander som kreft utvikles. En korrekt gjennomgang av cellesyklus sikrer produksjon av to identiske datterceller i et miljø som støtter videre proliferering. Differensierte celler går inn i G₀-fasen, men kan i likhet med andre celler i G₀ gå inn i cellesyklus igjen under påvirkning av eksterne faktorer (Dirks et al. 1996). Utviklingen av nevroner er strengt regulert hvorav noen beholder sin proliferative egenskap, mens andre forlater cellesyklus permanent for terminal differensiering. Denne reguleringen er essensiell for genereringen av et passende antall nevronale celletyper og for etablering av et optimalt fungerende nettverk mellom nevronene (Politis et al. 2008).

1.4.2 Sinkdeprivasjon gir apoptose og hemmer proliferasjon

Sink modulerer et antall overlevelse og apoptosesignaler og mangel på sink vil kunne resultere i en blanding av aktivering og inhibering av dem (figur 1.5) (Adamo et al. 2010). Sink er et strukturelt element involvert i blant annet DNA-syntese og transkripsjon av vekstfaktorer, og er en nødvendig faktor for overgang fra G1 til S-fasen i cellesyklus. Sinkdeprivasjon er vist å hemme proliferasjon gjennom cellesyklusarrest i G1/G₀-fase (Beyersmann and Haase 2001). Mangel på sink kan også gi apoptose i celler som ikke er i deling ved aktivering av caspasekaskaden både ved stimulering av indre apoptosesignalvei og direkte aktivering av caspase-3 (Chai et al. 1999). Sink har også en viktig cytoprotektiv funksjon og beskytter cellene mot skadelig oksidativt stress (Truong-Tran et al. 2001).



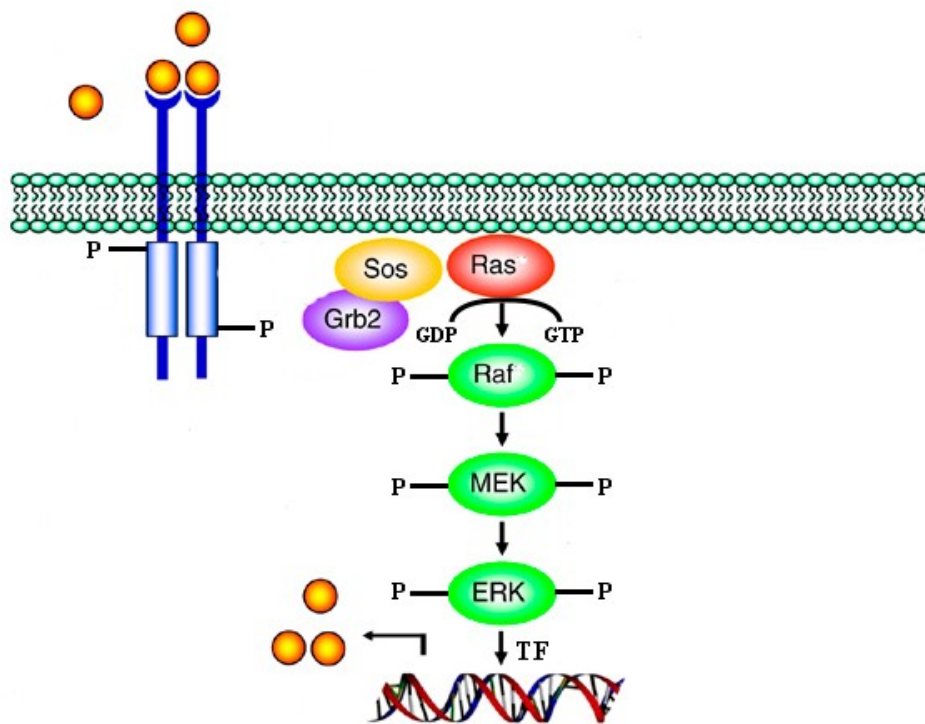
Figur 1.5: Følger av sinkdeprivasjon

Mangel på sink hindrer fosforylering av ERK (kap 1.5), og dermed hindres videre fosforylering av cyklin D1 og cyklin E som er viktig for cellens progresjon i G1-fasen og proliferasjon. Mangel på fosforylert ERK hemmer undertrykkelsen av proapoptotiske proteiner som Bad som dermed vil kunne translokalisere til mitokondriene og fremme utslipp av cytokrom-c som videre aktiverer caspase-3 som gir apoptose. NF-κB er en antiapoptotisk transkripsjonsfaktor som ved mangel på sink ikke vil kunne utføre sin funksjon. Den proapoptotiske transkripsjonsfaktoren p53 vil ved sinkmangel oppreguleres og fremme apoptose, men også trigge cellesyklusarrest ved aktivering av p21. Sink har også en direkte hemmende funksjon på caspase-3 som vil kunne oppheves ved sinkdeprivasjon. Figuren er modifisert fra Adamo et al. 2010.

1.5 MEK/ERK-SIGNALVEIEN

I celler eksisterer det en kontrollert balanse mellom celledød og overlevelse som kan påvirkes av cellens ekstracellulære miljø (Henson and Gibson 2006). MAP-kinaser har en sentral rolle i kaskader som overfører signaler fra ekstracellulære substanser som hormoner, neurotransmittere og vekstfaktorer som regulerer ulike cellulære prosesser (Seger and Krebs 1995). MAP-kinase kaskaden består av flere proteinkinaser som spesifikt fosforylerer og aktiverer hverandre (figur 1.6) (Chunderland and Seger 2005). MEK/ERK-signalveien er en MAP-kinase kaskade som spiller en viktig rolle i proliferasjon, differensiering og overlevelse og påvirkes av et stort antall faktorer som næringsinnhold i serum, vekstfaktorer og ulike typer stress (Seger and Krebs 1995; Lewis et al. 1998).

MEK/ERK-fosforyleringskaskaden starter med ligandbinding til en transmembran tyrosinkinasereseptor på celleoverflaten. Dette fører til aktivering av G-proteinet Ras som rekrutterer Raf-kinase som fosforyleres og videre aktiverer MEK som så aktiverer ERK (Shaul and Seger 2007). Aktivert ERK kan interagere med substrater i cytosol eller translokalisere til cellekjernen og regulere ulike transkripsjonsfaktorer, kinaser og cytoskjelettproteiner ved hjelp av ulike interagende proteiner (Lewis et al. 1998; Shaul and Seger 2007). Varighet av aktiveringen er også av stor betydning. Det er blitt vist i PC12-celler at nervevekstfaktor (NGF) fremmer differensiering via sterk og vedvarende ERK-aktivering, mens epidermal vekstfaktor (EGF) fremmer proliferasjon via en sterk og forbigående ERK-aktivering (Nguyen et al. 1993).



Figur 1.6: MEK/ERK-signalveien

Vekstfaktorer og andre ekstracellulære ligander binder til transmembrane reseptortyrosinkinaser som dimeriserer og fosforyleres på tyrosinresiduer. Adaptorproteiner med SH2-domene som Grb2, bindes til fosforylerte tyrosinresiduer og rekrutterer SOS som får Ras til å omdanne GDP til GTP og aktiveres. Ras fosforylerer og aktiverer Raf som igjen fosforylerer og aktiverer MEK som deretter fosforylerer og aktiverer ERK. ERK binder til og aktiverer substrater i cytosol og kan translokalisere til cellekjernen og aktivere ulike transkripsjonsfaktorer (Henson and Gibson 2006; Shaul and Seger 2007). Figuren er modifisert fra Roberts and Der 2007.

1.5.1 "Crosstalk" mellom MEK/ERK-signalveien og caspasekaskaden

"Crosstalk" mellom kinaser og caspaser bidrar til regulering av apoptoseinduksjon og mulighet for økning av apoptotiske signaler. I friske celler er caspaseaktiviteten skrudd av blant annet ved fosfatmediert undertrykking, men når cellen mottar vedvarende apoptotisk stimuli overgår denne undertrykkelsen ved at caspaser aktiveres og kløyver kinasene. Antiapoptotiske og proapoptotiske kinaser kontrollerer caspaseaktivering og aktivitet gjennom fosforylering som gir mulighet for regulering av apoptoseinduksjon i respons på endringer i det ekstracellulære miljøet (Kurokawa and Kornbluth 2009).

Det er blitt vist at ERK blokkerer caspase-9 aktivitet ved fosforylering av treonin-125 på prodomenet som hindrer aktivering av caspase-3 mediert via indre apoptosesignalvei (Allan et al. 2003). ERK fosforylerer også Bad og BIM slik at BH3-domenet degraderes og de proapoptotiske proteinene mister sin evne til binde til mitokondriene og fremme apoptose (Taylor et al. 2008; Mebratu and Tesfaiji 2009). ROS kan ved skade på DNA stimulere til aktivering av ERK som

videre fosforylerer p53 som stopper cellen fra å dele seg og sender den i apoptose (Cagnol and Chambard 2009; Mebratu and Tesfaigzi 2009). Studier viser at balansen mellom intensitet og varighet av slike anti- og proapoptotiske signaler medierte via ERK har betydning for om cellen prolifererer eller går inn i apoptose (Pearson et al 2001). Det er ikke kjent om caspaseaktivatorer som PAC-1 og 1541 kan interagere med MEK/ERK-signalveien.

1.6 CELLEKULTURER TIL STUDIER AV CELLEDØD

I dette arbeidet er det brukt PC12-celler og kyllingkornceller som cellemodeller til studering av celledød induisert av PAC-1 og 1541. Siden apoptose i PC12-cellene og kyllingkorncellene kan medieres via caspase-3 (Pittman et al. 1993; Jacobs et al. 2006), kan PAC-1 og 1541 brukes som verktøy til å studere apoptosesignalveier og eventuell "crosstalk" mellom caspasekaskaden og MEK/ERK-signalveien.

1.6.1 PC12-celler

PC12-celler er en nevroendokrin cellelinje avledet fra et feokromcytom i binyremargen til rotte (Greene and Tischler 1976). Dyrking av cellene i medium med serum gir cellene en rund eller kantete form. Ved høy celletetthet blir formen mer avrundet og cellene klumper seg sammen (Valavanis et al. 2001). PC12-celler er en god cellemodell til å studere signalveier siden bestemte responser på differensiering, proliferering og overlevelse kan studeres uavhengige av hverandre og det er få vekstfaktorer og hormoner cellene ikke responderer på. Cellelinjen er blitt brukt til å studere MEK/ERK-signalveien og det er blant annet vist at stimulering med EGF fører til proliferasjon (Vaudry et al. 2002). Cellene uttrykker egenskaper liknende sympatiske nevroner og danner lange utløpere ved stimulering med NGF og kan brukes til å studere nervesystemet på et cellulært og molekylært nivå (Greene and Tischler 1976). Det er flere farmakologiske og biokjemiske substanser som induserer celledød i PC12-celler (Valavanis et al. 2001). Blant annet er PAC-1 vist å indusere celledød i PC12-cellene relatert til nivå av procaspase-3 (Putt et al. 2006). Dette gjør at cellene også kan brukes som en modell til studier av celledøds mekanismer.

1.6.2 Kyllingkornceller

Lillehjernen er en fremstående struktur i hjernen til de fleste pattedyr og flertallet av nevronene er kornceller lokalisert i det dypeste laget i lillehjernebarken. Primærkulturer fra kornceller har vært brukt i mange år og er en anerkjent modell til studier av nevronal utvikling, funksjon og patologi (Contestabile 2002). Kornceller fra kylling er et billigere og enklere alternativ til kornceller fra mus eller rotte. Korncellelaget dannes siste uken før klekking ved intens mitotisk aktivitet i det ytre korncellelaget fulgt av migrering til det indre korncellelaget. Isolering av korncellene på embryonisk dag 18 har vist å gi et godt celleutbytte. Kyllingkorncellene utvikler eksitotoksisitet med ROS-produksjon og aktivering av caspase-3 etter 3 dager *in vitro* og kan brukes som en modell i studier av mekanismer involvert i apoptose (Jacobs et al. 2006).

1.7 MÅL MED OPPGAVEN

- Undersøke om PAC-1 og 1541 induserer caspaseavhengig celledød i PC12-celler og kyllingkornceller.
- Undersøke om 1541 er en bedre aktivator av caspase-3 enn PAC-1.
- Undersøke om vekstfaktoren EGF beskytter mot celledød induisert av PAC-1 og 1541, og om hemming av ERK med MEK-inhibitor vil øke celledøden.
- Undersøke om PAC-1 eller 1541 påvirker fosforylering av ERK

2. MATERIALER OG METODER

2.1 KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER

Produkt	Produsent
1541 (fenyl-imidazolpyridin-metoksy kumarin)	University of California, San Fransisco, USA
β -actin A5316	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Akrylamid 30%	Bio-Rad, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Basal Medium Eagle (BME)	Invitrogen, California, USA
BCA Protein Assay kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Bromfenolblått	Merck, Darmstadt, Tyskland
Caspase-3 Rabbit pAb-antistoff	Calbiochem, San Diego, USA
Caspase-3-inhibitor (Ac-DEVD-cmk)	Calbiochem, San Diego, USA
Caspase-3-substrat (Z-DEVD ₂ Rhodamine 110)	Bachem, Bubendorf, Sveits
Caspase-9-antistoff (rottespesifikk)	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Caspase-9-inhibitor (Ac-LEHD-cmk)	Bachem, Bubendorf, Sveits
Cytosine- β -arabino-furanoside (Ara-C)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Deoxyribonuklease 1 (DNase 1)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dimetylsulfoksid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Di-natriumhydrogenfosfat-dihydrat (Na ₂ PO ₄ x 2H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Donkey anti rabbit IgG-HRP sc-2312	Santa Cruz, California, USA
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, California, USA
ECL Plus Western Blotting Detection System	Ge Healthcare, Buckinghamshire, UK
Epidermal vekstfaktor (EGF)	Pepro Tech Inc, New Jersey, USA
ERK 2 (C-14) antistoff sc-154	Santa Cruz, California, USA
Etylenglycotetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Fenolrødt	Merck, Darmstadt, Tyskland
Fenylmetansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glukose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Glutamin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glyserol	BHD Prolabo, Poole, England
Hesteserum	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hoechst trihydroklorid 33342	Invitrogen, Oregon, USA
Hydrogenklorid (HCl)	Merck, Darmstadt, Tyskland

Igepal 100%	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kaliumdihydrogenfosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid (KCl)	Koch-Light laboratories, England
Kalsiumklorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kalveserum føtalt	Invitrogen, California, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
MEK-inhibitor U0126	Promega, Wisconsin, USA
2-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Metanol	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natrium deoxycholat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natrium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumklorid (NaCl)	J.T Baker Deventer, Nederland
Natrium orhtovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumselentrioksid (Na ₂ SeO ₃)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PAC-1	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Penicillin-Streptomycin 10000 IE-10000 µg/µl	Invitrogen, California, USA
Pepestatin A	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
P-ERK antistoff M8195	Santa Cruz, California, USA
Poly-L-lysin hydrobromid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ponceau-S-løsning	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Precision Plus Protein Standard All Blue	Bio Rad, USA
Putrescine	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Restore Western Blot Stipping Buffer	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Sau-anti-mus IgG-HRP NA 93IV	Ge Healthcare, Buckinghamshire, UK
Staurosporin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Supersignal West Femto Chemiluminiscent Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Supersignal West Piko Chemiluminiscent Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
TEMED (Tetrametyletylendiamin)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
h-Transferrin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trijodid-L-tyronin-natrium salt (T3)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris/Glycine Buffer (TG) 10x	Bio Rad, USA

Tris/Glycine/SDS Buffer (TGS) 10x	Bio Rad, USA
Tris base	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris hydroklorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin type III	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsininhibitor 1-S	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
α -tubulin (B-7) antistoff sc-5286	Santa Cruz, California, USA
Tween 20	Calbiochem, San Diego, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge

2.2 UTSTYR

Produkt	Modell og Fabrikant
Autoklav	Matachana 350 L-2, Thune
Brett 96 brønner	Nunclon
Cellekulturskåler	Nunclon
Celleskrape	Corning Inc
CO ₂ inkubator	Thermo Forma, Steri-Cycle
Finnpipette	Thermo Scientific
Fremkallingsmaskin westernblotting	Bio Imaging System, Syngene Synoptics Ltd
Kamera til fluorescensmikroskop	Nikon Digital Sight DSQ1Mc
LAF-benk	Holten Safe 2000 Model 2.1
Mikroskop fluorescens	Nikon eclipse TE 300
Mikroskop lys	Nikon TMS type 104
Nitrocellulosemembran westernblotting	Bio Rad, USA
pH-meter	Metrohm
Plateleser	HTS 7000 Plus-Assay Reader, Perkin Elmer
Rugemaskin	Covatutto 54, Novital
Rullebrett	Roller mixer SRT2, Stuart Scientific
Sentrifuge	Kubota 2010
Strømkilde westernblotting	Power-PAC 300, Bio Rad, USA
Tellekammer	Bürker
Vannbad	SUB Aqua 12, Grant
Vannrenseanlegg	Aquatron A4S
Vekt (mengder over 10 mg)	Mettler Toledo AB54-S
Vekt (mengder under 10 mg)	Sartorius

2.3 SPLITTING AV PC12-CELLER

PC12-cellene deler seg omtrent en gang per døgn og splittes når de er konfluente. Celler splittet til normal celletetthet, 7×10^4 celler/ml, blir konfluente etter 3-4 døgn. Celler splittet til kvadrupel celletetthet, 28×10^4 celler/ml, blir konfluente etter 2 døgn. Splittingen utføres ved aseptisk teknikk i LAF-benk. Cellene inkuberes ved 37°C og 5 % CO_2 .

Prosedyre for splitting av PC12-celler:

1. Gammelt medium helles av.
2. 10 ml nytt PC12-medium (tabell 2.1) tilsettes celleflasken. Slå cellene løs fra bunnen ved å banke på sidene av flasken. Sjekk i mikroskop at cellene er løse.
3. Pipetter opp og ned 15-20 ganger for å løse opp celleaggregater og fordele cellene jevnt i mediet. Gjentas med en pasteurpipette der åpningen er smalnet ved hjelp av gassbrenner.
4. Undersøk i mikroskop om cellene er jevnt fordelt i mediet.
5. 1,5 ml cellesuspensjon tilsettes hver nye cellekulturflaske som deretter tilsettes 20 ml nytt PC12-medium.
6. Ved splitting til cellekulturskåler må celletettheten i cellekulturflasken bestemmes. En liten prøve av cellesuspensjonen telles i mikroskop ved hjelp av Bürkers tellekammer. Mengde cellesuspensjon til skålene beregnes med hensyn på celletettheten som ønskes i cellekulturskålene;

$$\text{Antall ml cellesuspensjon} = \frac{\text{Antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{ønsket celletetthet}}{\text{Antall celler i tellekammer} \times 10^4}$$

7. Den beregnede mengden cellesuspensjon overføres til en kolbe og blandes med nytt PC12-medium. Mengden PC12-medium må først beregnes;

$$\text{Antall ml PC12-medium} = (\text{Antall ml per skål} \times \text{Antall skåler}) - \text{Antall ml cellesuspensjon}$$

8. Cellesuspensjonen og nytt PC12-medium blandes godt slik at cellene fordeles jevnt. Blandet løsning overføres til sterile cellekulturskåler.

Små skåler ($8,8 \text{ cm}^2$) tilsettes 1 ml

Medium skåler ($21,5 \text{ cm}^2$) tilsettes 3,3 ml

Store skåler ($66,5 \text{ cm}^2$) tilsettes 10 ml

9. Skålene og flaskene inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂. Korken på flaskene skal sitte løst på.

Tabell 2.1: PC12-medium med serum

Komponent	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Natriumpyruvat 100 mM	5 ml	1 mM
Penicillin-Streptomycin 10000 IE-10000 µg/µl	5 ml	100 IE-100 µg/µl
Hesteserum	25 ml	5 %
Kalveserum føtalt	50 ml	10 %
Dulbecco's modified eagle medium	500 ml	

2.4 KORNCELLEKULTURER FRA KYLLING

Befruktede egg leveres av Nortura Samvirkekylling på Våler i Norge. Eggene kan oppbevares i kjøleskap inntil 5 dager før de legges i rugemaskin ved 37°C. Fra dag 4 til dag 17 snus eggene maskinelt morgen og kveld. For å opprettholde tilfredstillende luftfuktighet tilsettes vann i et eget kammer i rugemaskinen. På dag 7 gjennomlyses eggene og ubefruktede egg fjernes. De resterende eggene tas ut på dag 18 som normalt er 3 dager før klekkesetid. Eggene gjennomlyses og de eggene som inneholder levende kyllingfostre klargjøres for prepping (avsnitt 2.4.2).

2.4.1 Poly-L-lysin behandling av cellekulturskåler

For å sikre at kyllingkorncellene fester seg til skålene behandles skålene med poly-L-lysin minst en dag før preparering av cellekulturen.

Prosedyre for poly-L-lysin behandling av cellekulturskåler:

1. 10 ml autoklavert MQ-vann overføres til en steril flaske med 5 mg poly-L-lysin og blandes godt.
2. 490 ml MQ-vann måles opp i en kolbe og poly-L-lysin løsningen overføres til denne.
3. Løsningen fordeles på skålene:
Små skåler (8,8 cm²) tilsettes 1 ml
Medium skåler (21,5 cm²) tilsettes 2 ml
Store skåler (66,5 cm²) tilsettes 5 ml
4. Poly-L-lysin løsningen pipetteres av etter 30-60 minutter og skålene settes til tørk over natt i LAF-benk.

2.4.2 Preparering av korncellekulturer fra kylling

Kyllingkorncellene prepareres fra 18 dager gamle kyllingfostre etter metode beskrevet i Jacobs et al 2006.

Prosedyre for preparering av korncellekulturer fra kylling:

1. Utstyr som benyttes skal være sterilt og noe må autoklaveres før bruk (tabell 2.2).
2. Kyllingfostrene bedøves ved å legge eggene i isvann i 7 minutter.
3. Eggene vaskes med 70 % etanol og knekkes i petriskåler.
4. Hodet til kyllingene kuttes av med skalpell og legges over i ny petriskål som flyttes raskt over i LAF-benk.
5. Lillehjernen tas ut ved bruk av saks og buet pinsett og legges i ny petriskål med løsning 1 (tabell 2.3 og 2.4).
6. Hjernehinnene fjernes ved hjelp av to pinsetter og lillehjernen legges i ny petriskål med løsning 1.
7. Løsning 1 pipetteres av og lillehjernen samles på midten av petriskålen og deles i mindre biter ved å kutte i to retninger vinkelrett på hverandre. Skålene tilsettes 10 ml av løsning 1.
8. Bitene av lillehjernen overføres til et 50 ml rør med 10 ml løsning 1 og petriskålen vaskes med litt av løsning 1. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt. (Sentrifugen er av typen Kubota 2010).
9. Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes i 8 ml løsning 2 (tabell 2.4) og overføres til en trypsinflaske fylt med løsning 2 som settes på vannbad 37°C i 15 minutter. Korkene må sitte løst på. Flasken rystes med jevne mellomrom.
10. Innholdet i trypsinflasken overføres til et nytt 50 ml rør med 15 ml løsning 4 (tabell 2.4). Røret fylles med løsning 4 og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter.
11. Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes i 3 ml løsning 3 (tabell 2.4) ved bruk av pasteurpipette der åpningen er smalnet ved hjelp av gassbrenner. Det pipetteres opp og ned 15-20 ganger.
12. Cellesuspensjonen holdes i ro så celleklumpene kan synke ned i røret, deretter overføres den klumpfrie delen av cellesuspensjonen til et nytt 50 ml rør med 15 ml løsning 5 (tabell 2.4).
13. 2 ml løsning 3 tilsettes røret med celleklumpene og trinn 11-12 gjentas til celleklumpene ikke er synlige lenger. Alle løsningene med cellesuspensjon samles i det samme 50 ml røret.
14. Røret med cellesuspensjon sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.
15. Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes i 10 ml platemedium (tabell 2.5) og

overføres til glassflaske. Glassflasken er på forhånd tilsatt platemedium tilsvarende halvparten av mengden medium beregnet ut fra antall skåler som ønskes preparert, det forventes et utbytte på 15-18 ml per lillehjerne. En liten prøve cellesuspensjon telles i mikroskop ved hjelp av Bürkes tellekammer.

16. Cellesuspensjonen fortynnes med beregnet mengde platemedium til en ønsket celletetthet på $1,7 \times 10^6$ celler/ml;

$$\text{Antall ml cellesuspensjon} = \frac{\text{Antall ml cellesuspensjon} \times \text{antall celler i tellekammer} \times 10^6}{\text{Ønsket celletetthet}}$$

17. Cellesuspensjonen blandes godt og overføres til cellekulturskåler forbehandlet med poly-L-lysin (avsnitt 2.4.1).

Små skåler (8,8 cm²) tilsettes 1 ml

Medium skåler (21,5 cm²) tilsettes 3,3 ml

Store skåler (66,5 cm²) tilsettes 10 ml

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

Tabell 2.2: Sterilt utstyr til preparering av kyllingkornceller

Skalpeller 1 saks 1 buet pinsett 2 rette pinsetter 1 trypsinflaske Pasteurpipetter med lang spiss 4 100 ml glassflasker med kork 1 500 ml glassflaske med kork 50 ml glassrør Erlenmeyerkolber
Utstyret er enten sterilt engangsutstyr eller autoklavert ved 121°C i 20 minutter

Tabell 2.3: 10 x Krebs-Ringer løsning

Komponent	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Fenolrødt	50 mg	0,3 mM
KH ₂ PO ₄	0,83 g	12 mM
KCl	1,80 g	48 mM
NaHCO ₃	10,7 g	0,25 M
Glukose	12,85 g	0,14 M
NaCl	35,35 g	1,21 M
Destillert vann	ad 500 ml	

Tabell 2.4: Løsning 1-5 til preparering av kyllingkornceller

Løsning	Komponent	Mengde
Løsning 1	Bovint serumalbumin MgSO ₄ (38,2 mg/ml) 10 x Krebs-Ringer løsning (tabell 2.3) Destillert vann	1,5 g 4,0 ml 50 ml ad 500 ml
Løsning 2	Trypsin type III Løsning 1	25 mg 100 ml
Løsning 3	Deoxyribonuklease 1 Trypsininhibitor 1-S MgSO ₄ (38,2 mg/ml) Løsning 1	6,25 mg 26,0 mg 500 µl ad 50 ml
Løsning 4	Løsning 3 Løsning 1	16 ml 100 ml
Løsning 5	MgSO ₄ (38,2 mg/ml) CaCl ₂ (12,0 mg/ml) Løsning 1	320 µl 320 µl 40 ml

Tabell 2.5 Platemedium til utplating kyllingkornceller

Komponent	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Glutamin	146 mg	2 mM
KCl	825 mg	22 mM
Penicillin-Streptomycin 10000 IE-10000 µg/µl	5 ml	100 IE-100 µg/µl
Hesteserum (varmeinaktivert)	50 ml	10 %
Insulin 1mM	50 µl	100 nM
Basal Medium Eagle	500 ml	

2.4.3 Tilsetning av Ara-C og bytting av medium

Cytosine-β-arabino-furanoside (Ara-C) tilsettes kyllingkorncellekulturene 16-18 timer etter preparering av cellene for å hindre vekst av ikke-nevronale celler (Jacobs et al. 2006).

Prosedyre for tilsetning av Ara-C og bytting av medium i korncellekulturer fra kylling:

1. Beregn volum ernæringsmedium som trengs til skålene som skal tilsettes Ara-C.
2. Den utveide mengden Ara-C løses i ernæringsmedium (tabell 2.6) slik at konsentrasjonen av Ara-C blir 0,1 mg/ml. Løsningen sterilfiltreres (0,22 µm). Det skal tilsettes 25 µl av den sterilfiltrerte Ara-C løsningen per ml ernæringsmedium. Arbeidet gjøres i LAF-benk.
3. Platemediumet som er i skålen fra før pipetteres av og skålen tilsettes ernæringsmedium med Ara-C.

Små skåler (8,8 cm²) tilsettes 1 ml

Medium skåler (21,5 cm²) tilsettes 3,3 ml

Store skåler (66,5 cm²) tilsettes 10 ml

Tabell 2.6: Erneringsmedium til dyrking av kyllingkornceller

Komponent	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Putrescine	4,8 mg	60 μ M
Insulin	12,5 mg	25 μ g/ml
h-Transferrin	50 mg	100 μ g/ml
Glutamin	146 mg	2 mM
KCl	825 mg	22 mM
T3 20 μ g/ml	17 μ l	1 nM
Na ₂ SeO ₃ 100 μ M	150 μ l	30 nM
Penicillin-Streptomycin 10000 IE-10000 μ g/ μ l	5 ml	100 IE-100 μ g/ μ l
Basal Medium Eagle	500ml	

2.5 DETEKSJON AV CELLEDØD

I friske celler er cellemembranen lite permeabel for hydrofile substanser, men når cellen dør mister cellemembranen sin integritet. Trypanblå er et hydrofilt stoff som vil lekke inn gjennom ødelagte membraner og farge de døde cellenes cytoplasma blå mens de levende cellene forblir ufarget. Celledøden kan dermed kvantifiseres ved telling av døde celler i lysmikroskop (Ying et al. 2000).

2.5.1 Eksponering av PC12-celler til deteksjon av celledød

PC12-cellene splittes til medium skåler (21,5 cm²) med celletetthet 7×10^4 celler/ml eller 28×10^4 celler/ml og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 24 eller 48 timer før eksponering. Cellene eksponeres etter tabell 2.7 ved at volum celleduspensjon i skålene justeres til 2 ml/skål derav et mindre volum pipetteres over i eppendorfrør. Eksponeringskomponenter tilsettes rørene og blandes før alt pipetteres tilbake i cellekulturskålene og blandes godt. Temperaturen i cellekulturskålene bør holdes så konstant som mulig på 37°C for å forhindre utfelling av PAC-1 og 1541, men også for å unngå påvirkning av cellene. Etter eksponering inkuberes cellene ved 37°C og 5 % CO₂ i 24 eller 48 timer.

Tabell 2.7: Eksponering av PC12-celler til deteksjon av celledød

Eksponeringsserie	Eksponering
Ubehandlet	Ingen tilsetninger
DMSO	DMSO 0,5 % (tilsvarende mengde DMSO som i 1541 25 µM løsning) DMSO 0,5 % + EGF 5 ng/ml DMSO 0,5 % + MEK-inhibitor 10 µM DMSO 0,5 % + Caspase-3-inhibitor 1 µM (tilsatt etter 0 eller 2 timer) DMSO 0,5 % + Caspase-9-inhibitor 10 µM
PAC-1	PAC-1 100 µM PAC-1 100 µM + EGF 5 ng/ml PAC-1 100 µM + MEK-inhibitor 10 µM PAC-1 100 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM (tilsatt etter 0 eller 2 timer) PAC-1 100 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM
1541	1541 25 µM 1541 25 µM + EGF 5 ng/ml 1541 25 µM + MEK-inhibitor 10 µM 1541 25 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM (tilsatt etter 0 eller 2 timer) 1541 25 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM
PAC-1 konsentrasjonrekke	PAC-1 150 µM PAC-1 100 µM PAC-1 75 µM PAC-1 50 µM
1541 konsentrasjonsrekke	1541 31 µM 1541 25 µM 1541 19 µM 1541 12,5 µM

2.5.2 Eksponering av kyllingkornceller til deteksjon av celledød

Kyllingkorncellene plates ut i medium skåler (21,5 cm²) med celledetthet 1,7 x 10⁶ celler/ml og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 72 timer før eksponering. Cellene eksponeres etter tabell 2.8 på samme måte som i avsnitt 2.5.1 og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 24 timer.

Tabell 2.8: Eksponering av kyllingkornceller til deteksjon av celledød

Eksponeringsserie	Eksponering
Ubehandlet	Ingen tilsetninger
DMSO	DMSO 0,5 % (tilsvarende mengde DMSO som i 1541 25 µM løsning) DMSO 0,5 % + EGF 5 ng/ml DMSO 0,5 % + MEK-inhibitor 10 µM DMSO 0,5 % + Caspase-3-inhibitor 1 µM DMSO 0,5 % + Caspase-9-inhibitor 10 µM
PAC-1	PAC-1 50 µM PAC-1 37,5 µM PAC-1 37,5 µM + EGF 5 ng/ml PAC-1 37,5 µM + MEK-inhibitor 10 µM PAC-1 37,5 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM PAC-1 37,5 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM PAC-1 25 µM

	PAC-1 25 µM + EGF 5 ng/ml PAC-1 25 µM + MEK-inhibitor 10 µM PAC-1 25 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM PAC-1 25 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM
1541	1541 25 µM 1541 25 µM + EGF 5 ng/ml 1541 25 µM + MEK-inhibitor 10 µM 1541 25 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM 1541 25 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM 1541 12,5 µM 1541 12,5 µM + EGF 5 ng/ml 1541 12,5 µM + MEK-inhibitor 10 µM 1541 12,5 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM 1541 12,5 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM

2.5.3 Kvantifisering av celledød

Kvantifisering av celledød ble gjort 24 eller 48 timer etter eksponering av PC12-cellene og 24 timer etter eksponering av kyllingkorncellene.

Prosedyre for farging av celler med trypanblå:

1. Cellemediet i cellekulturskålen pipetteres av til det er 1 ml igjen.
2. 250 µl trypanblå-løsning (tabell 2.9) tilsettes hver skål og blandes.
3. Cellene inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 30 minutter.
4. Trypanblå-løsningen helles av.
5. Levende og døde celler fra 3-4 ulike synsfelt av skålen telles i lysmikroskop og prosentandel døde celler beregnes ut i fra forholdet mellom antall døde celler og det totale antallet celler i skålen. For å få en robust kvantifisering ble det talt minst 100 celler per skål.

Tabell 2.9: Trypanblå-løsning

Trypanblå-stockløsning 2%	
Komponent	Mengde
Trypanblå	1 g
Destillert vann	50 ml
Komponentene blandes med magnetrører og varmes opp til kokepunktet under avtrekk. Løsningen avkjøles i romtemperatur før den filteres. Løsningen oppbevares i romtemperatur.	
NaCl-stockløsning 1,8%	
Komponent	Mengde
NaCl	1,8 g
Destillert vann	100 ml
Trypanblå-løsningen lages ved å blande trypanblå-stockløsning og NaCl-stockløsning i forholdet 1:1 rett før bruk.	

2.6 OBSERVASJON AV KJERNEMORFOLOGI I PC12-CELLER

Hoechst er et fluorescerende stoff som bindes til kromatin i kjernen. Farging av kromatin gir mulighet til å studere kjernemorfologi i celler ved bruk av UV-lys og fluorescensmikroskop (Darzynkiewicz 2004).

PC12-cellene splittes ut i medium skåler (21,5 cm²) med celletetthet 7×10^4 celler/ml og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 24 før eksponering. Cellene eksponeres etter tabell 2.10 på samme måte som i avsnitt 2.5.1 og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 24 timer.

Prosedyre for kjernefarging av PC12-celler med hoechst:

1. UV-lampen til fluorescensmikroskopet slås på 30 minutter før bruk.
2. Cellekulturskålene tilsettes hoechst 1 µg per ml cellemedium.
3. Cellene inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 20-30 minutter.
4. Ulike synsfelt i cellekulturskålene undersøkes i fluorescensmikroskop og kjernediameteren måles. For å få en robust måling ble det målt omtrent 100 kjerner per skål.

Tabell 2.10: Eksponering av PC12-celler til observasjon av kjernemorfologi

Eksponeringsserie	Eksponering
DMSO	DMSO 0,5 % (tilsvarende mengde DMSO som i 1541 25 µM løsning)
PAC-1	PAC-1 100 µM
1541	1541 25 µM

2.7 MÅLING AV CASPASE-3-AKTIVITET

Caspaser aktiveres ved kløyving av procaspase som er et inaktivt proenzym. Caspase-3-substratet, (Z-DEVD₂) Rhodamine 110, består av tetrapeptidsekvensen DEVD som gjenkjennes av aktive kløyvingsprodukter fra procaspase-3. Substratet er merket med et fluorescerende molekyl, Rhodamine 110, som frigjøres når aktiv caspase-3 kløyver caspase-3-substratet. Fluorescensen blir målt i plateleser som et indirekte mål på caspase-3-aktiviteten (Wang et al. 2005).

2.7.1 Måling av caspase-3-aktivitet i PC12-celler

PC12-cellene splittes med celletetthet 28×10^4 celler/ml til svarte 96-brønnersbrett. Brettene inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 24 timer før cellene eksponeres. En rad i brettet tilsettes staurosporin som positiv kontroll på aktiv caspase-3. Bakgrunnsaktiviteten av caspase-3 blir målt ved at to brønner for hver eksponering tilsettes caspase-3-inhibitor (Ac-DEVD-cmk) i tillegg til caspase-3-substrat. Caspase-3-inhibitoren er vist å hemme minst 85 % av bakgrunnsaktiviteten til caspase-3-substratet (Aziz et al. 2010).

Prosedyre for måling av caspase-3-aktivitet i PC12-celler:

1. Cellene i brønnene eksponeres etter tabell 2.11.
2. Brettene inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 4 timer.
3. 50 µl av cellekulturmediet fjernes fra hver brønn slik at resterende volum blir 100 µl da omtrent 50 µl er dampet av.
4. 4 brønner per eksponering tilsettes 100 µl 2 x RIPA-buffer (tabell 2.12) tilsatt caspase-3-substrat (sluttkonsentrasjon 20 µM).
5. 2 brønner per eksponering tilsettes 100 µl 2 x RIPA-buffer tilsatt caspase-3-substrat (sluttkonsentrasjon 20 µM) og caspase-3-inhibitor (sluttkonsentrasjon 1 µM).
6. Brettene inkuberes ved 37°C og fluorescens måles i plateleser av programmet HT-soft ved 485/535 nm etter 30 minutter, 4 timer og 24 timer.
7. Gjennomsnittet av fluorescensmålingene i brønnene tilsatt både caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor brukes som mål på bakgrunnsaktiviten og trekkes fra gjennomsnittlig fluorescens i brønnene til sine respektive eksponeringer tilsatt kun caspase-3-substrat.

Tabell 2.11: Eksponering av PC12-celler til måling av caspase-3-aktivitet

Eksponeringsserie	Eksponering
Ubehandlet	Ingen tilsetninger
DMSO	DMSO 0,5 % (tilsvarende mengde DMSO som i 1541 25 µM løsning)
Staurosporin	Staurosporin 1 µM
PAC-1	PAC-1 100 µM
1541	1541 25 µM

Tabell 2.12: 2 x RIPA-buffer

Komponent	Mengde til 100 ml buffer
Natrium deoxycholat	0,5 g
EGTA 1 mM	2 ml
Igepal 100 %	2 ml
NaCl-løsning 5 M	6 ml
Tris Hcl 1 M pH 7,4	10 ml
MQ-vann	Ad 100 ml
1 x RIPA-buffer:	
2 x RIPA-buffer	1 del
MQ-vann	1 del

2.7.2 Måling av caspase-3-aktivitet i kyllingkornceller

Kyllingkorncellene plates ut i medium skåler (21,5 cm²) med celletetthet $1,7 \times 10^6$ celler/ml og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 72 timer før eksponering. Cellene eksponeres etter tabell 2.13 på samme måte som i avsnitt 2.5.1 og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 4 timer.

Prosedyre for måling av caspase-3-aktivitet i kyllingkornceller:

1. 3 brønner per eksponering tilsettes 100 µl 1 x RIPA-buffer (tabell 2.12) tilsatt caspase-3-substrat (sluttkonsentrasjon 20 µM).
2. 1 brønn per eksponering tilsettes 100 µl 1 x RIPA-buffer tilsatt caspase-3-substrat (sluttkonsentrasjon 20 µM) og caspase-3-inhibitor (sluttkonsentrasjon 1 µM).

3. Kyllingkorncellene høstes 4 timer etter eksponering;
 - Cellemediet helles av og cellekulturskålen vaskes en gang med 1 ml kald PBS (tabell 2.14). Resterende PBS fjernes med pipette.
 - Tilsatt cellekulturskålen 500 µl 1 x RIPA og inkuber i 5 minutter ved romtemperatur.
 - Cellene høstes ved å skrape med en celskraper langs bunnen av cellekulturskålen i to retninger vinkelrett på hverandre.
 - Cellelysate pipetteres over til eppendorfrør og settes på is.
4. 100 µl cellelysate tilsettes i 4 brønner per eksponering.
5. Brettet med celler inkuberes ved 37°C og fluorescens måles i plateleser av programmet HT-soft ved 485/535 nm etter 30 minutter, 4 timer og 24 timer.
6. Fluorescensmålingene i brønnene tilsatt både caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor brukes som bakgrunn og trekkes fra median fluorescens i brønnene til sine respektive eksponeringer tilsatt kun caspase-3-substrat.

Tabell 2.13: Eksponering av kyllingkornceller til måling av caspase-3-aktivitet

Eksponeringsserie	Eksponering
Ubehandlet	Ingen tilsetninger
DMSO	DMSO 0,5 % (tilsvarende mengde DMSO som i 1541 25 µM løsning) DMSO 0,5 % + EGF 5 ng/ml DMSO 0,5 % + MEK-inhibitor 10 µM DMSO 0,5 % + Caspase-3-inhibitor 1 µM DMSO 0,5 % + Caspase-9-inhibitor 10 µM
PAC-1	PAC-1 50 µM PAC-1 50 µM + EGF 5 ng/ml PAC-1 50 µM + MEK-inhibitor 10 µM PAC-1 50 µM + Caspase-3-inhibitor 1µM PAC-1 50 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM PAC-1 37,5 µM PAC-1 25 µM PAC-1 25 µM + EGF 5 ng/ml PAC-1 25 µM + MEK-inhibitor 10 µM PAC-1 25 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM PAC-1 25 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM
1541	1541 25 µM 1541 25 µM + EGF 5 ng/ml 1541 25 µM + MEK-inhibitor 10 µM 1541 25 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM 1541 25 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM 1541 12,5 µM 1541 12,5 µM + EGF 5 ng/ml 1541 12,5 µM + MEK-inhibitor 10 µM 1541 12,5 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM 1541 12,5 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM

Tabell 2.14: PBS

Komponent	Mengde
KCl	0,80 g
KH ₂ PO ₄	1,08 g
Na ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	7,12 g
NaCl	32,0 g
Destillert vann	ad 4000 ml

pH justeres til 7,4 med HCl.
Autoklaveres.

2.8 PROTEINMÅLING

Det er viktig å bestemme proteinmengden i prøver høstet fra cellekulturskåler som er brukt til måling av caspase-3-aktivitet og westernblott. Proteinmengden er en konfunderende faktor for caspase-3-aktiviteten som måles og store forskjeller i proteinmengde kan gi et misvisende resultat. Ved å korrigere målt caspase-3-aktiviteten mot bestemt proteinmengde i hver prøve elimineres usikkerheten som ligger i ulik proteinmengde. Prøver som skal brukes til westernblott bør ha kjent proteinmengde slik at volum av prøvene tilsatt i gelbrønnen blir omtrent lik og har samme proteinkonsentrasjon. Proteinmengden i prøvene blir bestemt ved hjelp av BCA protein assay kit (Pierce). BCA-assayet måler dannelse av Cu⁺ fra Cu²⁺ ved at BCA interagerer med aminosyrene cystein, cystin, tryptofan og tyrosin i proteinet fra celleprøvene og danner et kompleks med Cu⁺ som har en absorbans ved 562 nm (Olson and Markwell 2007).

Prosedyre for måling av protein i prøver fra PC12 og kyllingkornceller:

1. Standardløsning og working reagent klargjøres (tabell 2.15).
2. I en 96-brønnersplate med blank bunn tilsettes 12 av brønnene standardløsning i mengder vist i tabell 2.16.
3. Alle brønnene tilsettes 200 µl working reagent.
4. De neste brønnene tilsettes;
 - 2 µl celleprøve høstet til westernblott.
 - 10 µl celleprøve høstet til måling av caspase-3-aktivitet.Hver prøve tilsettes i 3 brønner. Er prøvene viskøse kan de homogeniseres med sprøyte og kanyle.
5. De to blanke brønnene og brønnene med standardløsning tilsettes høstebuffer i samme volum som celleprøvene tilsatt i brønnene.
6. Brettet inkuberes ved 37°C i 1 time.

7. Absorbans måles i plateleser ved 570 nm av programmet HT-soft.
8. Basert på median absorbans for hver prøve leses proteinmengden i brønnene ut i fra standardkurven som plottes og ut fra volum celleprøve tilsatt per brønn, beregnes proteinkonsentrasjonen i prøvene.

Tabell 2.15: Løsninger til proteinmåling

Standardløsning	
Komponent	Mengde
Bovint serumalbumin 2 mg/ml	50 µl
PBS	150 µl
Working reagent	
Komponent	Mengde
BCA Protein assay reagent A	50 deler
BCA Protein assay reagent B	1 del
Total mengde working reagent bestemmes av antall brønner som skal brukes.	
200 µl/brønn x Antall brønner = <u>Volum working reagent</u>	

Tabell 2.16: Brønnoppsett til proteinmåling

	1	2	3	4
A	Blank	Standard 10µl (6,7 µg protein)	Prøve 2	Osv.
B	Blank	Standard 10µl (6,7 µg protein)	Prøve 2	
C	Standard 1µl (0,67 µg protein)	Standard 20µl (13,4 µg protein)	Prøve 3	
D	Standard 1µl (0,67 µg protein)	Standard 20µl (13,4 µg protein)	Prøve 3	
E	Standard 2,5µl (1,67 µg protein)	Standard 40µl (26,8 µg protein)	Prøve 4	
F	Standard 2,5µl (1,67 µg protein)	Standard 40µl (26,8 µg protein)	Prøve 4	
G	Standard 5µl (3,35 µg protein)	Prøve 1	Prøve 5	
H	Standard 5µl (3,35 µg protein)	Prøve 1	Prøve 5	

2.9 WESTERNBLOTTING

Westernblotting (immunoblotting) er en metode til å detektere spesifikke proteiner gjenkjent av mono- eller polyklonale antistoffer. Ved koking av celleprøvene sammen med SDS og 2-merkaptoetanol denaturerer proteinene og primærstrukturen påføres en jevn negativ ladning slik at proteinene kan separeres etter størrelse ved hjelp gelelektroforese. Sekundærantistoffet som bindes til primærantistoffet er merket med horseradish peroxidase (HRP) som gjør det mulig å detektere det spesifikke antigenet på proteinet som primærantistoffet er bundet til. Proteinene identifiseres ved å sammenlikne med en proteinstandard som inneholder en blanding av proteiner med kjent molekylvekt (Gallagher 2006; Gallagher et al. 2008).

2.9.1 Eksponering av PC12-celler til analyse med westernblotting

PC12-celleene splittes til store skåler (66,5 cm²) med celletetthet 7×10^4 celler/ml eller 28×10^4 celler/ml og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 24 eller 48 timer før eksponering. Cellene eksponeres etter tabell 2.17 på samme måte som i avsnitt 2.5.1 og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 4 timer.

Tabell 2.17: Eksponering av PC12-celler til analyse med westernblott

Eksponeringsserie	Eksponering
Ubehandlet	Ingen tilsetninger
DMSO	DMSO 0,5 % (tilsvarende mengde DMSO som i 1541 25 µM løsning) DMSO 0,5 % + EGF 5 ng/ml DMSO 0,5 % + MEK-inhibitor 10 µM DMSO 0,5 % + Caspase-3-inhibitor 1 µM DMSO 0,5 % + Caspase-9-inhibitor 10 µM
PAC-1	PAC-1 100 µM PAC-1 100 µM + EGF 5 ng/ml PAC-1 100 µM + MEK-inhibitor 10 µM PAC-1 100 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM PAC-1 100 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM
1541	1541 25 µM 1541 25 µM + EGF 5 ng/ml 1541 25 µM + MEK-inhibitor 10 µM 1541 25 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM 1541 25 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM

2.9.2 Eksponering av kyllingkornceller til analyse med westernblotting

Kyllingkorncellene plates ut i store skåler (66,5 cm²) med celletetthet 1,7 x 10⁶ celler/ml og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 72 timer før eksponering. Cellene eksponeres etter tabell 2.18 på samme måte som i avsnitt 2.5.1 og inkuberes ved 37°C og 5 % CO₂ i 4 timer.

Tabell 2.18: Eksponering av kyllingkornceller til analyse med westernblott

Eksponeringsserie	Eksponering
Ubehandlet	Ingen tilsetninger
DMSO	DMSO 0,5 % (tilsvarende mengde DMSO som i 1541 25 µM løsning) DMSO 0,5 % + EGF 5 ng/ml DMSO 0,5 % + MEK-inhibitor 10 µM DMSO 0,5 % + Caspase-3-inhibitor 1 µM DMSO 0,5 % + Caspase-9-inhibitor 10 µM
PAC-1	PAC-1 50 µM PAC-1 50 µM + EGF 5 ng/ml PAC-1 50 µM + MEK-inhibitor 10 µM PAC-1 50 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM PAC-1 50 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM PAC-1 37,5 µM PAC-1 25 µM PAC-1 25 µM + EGF 5 ng/ml PAC-1 25 µM + MEK-inhibitor 10 µM PAC-1 25 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM PAC-1 25 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM
1541	1541 25 µM 1541 25 µM + EGF 5 ng/ml 1541 25 µM + MEK-inhibitor 10 µM 1541 25 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM 1541 25 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM 1541 12,5 µM 1541 12,5 µM + EGF 5 ng/ml 1541 12,5 µM + MEK-inhibitor 10 µM 1541 12,5 µM + Caspase-3-inhibitor 1 µM 1541 12,5 µM + Caspase-9-inhibitor 10 µM

2.9.3 Høsting av PC12-celler og kyllingkornceller til westernblotting

Hver cellekulturskål høstes etter 4 timers eksponering med 100 µl høstebuffer (tabell 2.19). Koking av prøvene med SDS denaturerer proteinene og påfører primærstrukturen en negativ ladning. Høstebufferen inneholder fosfatase- og proteasehemmere som beskytter proteinene mot nedbrytning (Gallagher 2006).

Prosedyre for høsting av celler til westernblotting:

1. Cellemediet i cellekulturskålen helles av.
2. Skålen vaskes to ganger med 2 ml kald PBS. Rester av PBS fjernes med pipette.
3. 100 µl høstebuffer tilsettes cellekulturskålen.
4. Cellene høstes ved å skrape langs bunnen av cellekulturskålen med en celledrape i to retninger vinkelrett på hverandre. La skålene stå litt skrått slik at mer protein samles opp.
5. Cellesuspensjonen pipetteres over i eppendorfrør, kokes på 95°C i 2 minutter og settes på deretter på is. Prøvene kan fryses ved -80°C til senere bruk.

Tabell 2.19: Høstebuffer til westernblott

Komponent	Mengde
Na ₃ VO ₄ 200 mM	0,5 µl
Leupeptin 5 mg/ml	1 µl
PMSF 100 mM	3 µl
Pepstatin A 1 mg/ml	5 µl
SDS 20 %	100 µl
PBS	ad 1000 µl

2.9.4 Proteinjustering av celleprøver til westernblotting

Basert på proteinmålingen (avsnitt 2.8) justeres prøvene slik at proteinmengden i hver prøve blir omtrent lik og et likt volum av hver prøve kan appliseres i gelbrønnen for elektroforese. Hver gelbrønn rommer 50 µl prøve og i den er det ønskelig med en proteinmengde på 50 µg.

Prosedyre for proteinjustering av celleprøver til westernblotting:

1. Klargjør prøvene ved å blande 3 deler celleprøve med 1 del 4 x laemmlibuffer (tabell 2.20).
2. Finn prøven med den laveste absorbansmålingen og regn ut om proteinkonsentrasjonen i denne prøven vil gi en proteinmengde i brønnene lavere enn 50 µg. Er dette tilfelle må det tas utgangspunkt i denne mengden ved proteinjustering av de andre prøvene.

- Basert på forholdstallet mellom ønsket proteinmengde i brønnene og proteinkonsentrasjon i hver enkelt prøve anslås volum 1 x laemmlibuffer (tabell 2.20) som må tilsettes for å oppnå tilsvarende proteinkonsentrasjon i hver prøve.

Tabell 2.20: 4 x laemmlibuffer

Komponent	Mengde
Tris-HCl 2 M pH 6,8	1,1 ml
Glycerol 85 %	1,8 ml
MQ-vann	2,6 ml
SDS 20 %	3 ml
Bromfenolblått	Noen korn
2-Merkaptoetanol 2 M	1,5 ml
Bromfenolblått gjør løsningen blå. Merkaptoetanol tilsettes i avtrekk rett før bufferen skal brukes.	
1 x laemmlibuffer:	
4 x Laemmlibuffer	1 del
MQ-vann	3 deler

2.9.5 Prosedyre for westernblotting

Støping av westerngel:

Det er molekylvekten på proteinene som ønskes detektert som bestemmer tettheten på gelen. Jo høyere tetthet gelen har jo mer motstand vil proteinene møte når de vandrer nedover gelen ved elektroforese. I denne oppgaven har proteinene som skal undersøkes proteinvekt fra 44 kDa til 10 kDa og en polyakrylamidgel på 12 % er derfor passende. Tykkelsen på gelen bestemmes ut i fra volumet man ønsker å applisere i brønnen. Er det lav proteinkonsentrasjon i prøvene trenger man et større volum. I denne oppgaven er det brukt geler med tykkelse på 1,5 mm med 10 brønner (Gallagher 2006).

- Vask glassplatene som utgjør støpeformen rene. Gelen lages i avtrekkskap siden akrylamid er giftig ved innånding.
- Bakplate og forplate settes sammen kant i kant og monteres til resten av støpeformen.
- Støpeformen fylles med vann og sjekkes for eventuell lekkasje. Ved lekkasje monteres støpeformen på nytt og kontrolleres igjen. Hvis støpeformen ikke lekker helles vannet ut og det er klart til støping.
- Komponentene til nedre gel (tabell 2.21 og 2.22) blandes sammen i et plastrør og helles i støpeformen. Litt MQ-vann pipetteres over for å gi en gelen en rett kant.

5. La nedre gel stivne 30 minutter.
6. Komponentene til øvre gel (tabell 2.23 og 2.24) blandes sammen i et plastrør.
7. MQ-vannet helles av støpeformen og øvre gel-løsningen helles over den nedre gelen.
8. En plastkam med rett tykkelse festes til åpningen av glassplatene for å støpe brønner.
9. La øvre gel stivne i 30 minutter.
10. Fjern plastkammen forsiktig og kontroller at veggen i brønnene er intakte. Glassplatene skylles forsiktig i vann.

Tabell 2.21: Nedre gelbuffer

Komponent	Mengde
Tris-base	18,17 g
SDS 20 %	2 ml
MQ-vann	ad 100 ml
HCl og NaOH brukes til å justere pH i bufferen til 8,8.	

Tabell 2.22: Nedre gel-løsning 12 % gel

Komponent	Mengde per gel (1,5 mm)
Nedre gelbuffer (tabell 2.21)	2,6 ml
MQ-vann	3,3 ml
Akrylamid 30 %	4 ml
APS 10 %	100 µl
TEMED	4 µl
TEMED får gelen til å stivne og tilsettes rett før bruk.	

Tabell 2.23: Øvre gelbuffer

Komponent	Mengde
Tris-base	6,06 g
SDS 20 %	2 ml
MQ-vann	ad 100ml
HCl og NaOH brukes til å justere pH i bufferen til 6,8.	

Tabell 2.24: Øvre gel-løsning

Komponent	Mengde per gel (1,5 mm)
MQ-vann	2,4 ml
Øvre gelbuffer (tabell 2.23)	1 ml
Akrylamid 30 %	0,6 ml
APS 10 %	20 µl
TEMED	4 µl
TEMED får gelen til å stivne og tilsettes rett før bruk.	

Elektroforese:

Elektroforese gjør at proteinene vandrer nedover gelen og blir separert avhengig av molekylvekt. Laemmlibufferen har samme pH som øvre gel og sammen med den øvre gelens lave tetthet vil proteinene drives gjennom gelen med liten motstand havne på nedre gel nærmest samtidig slik at båndene blir smale og separasjonen godt synlig. Den nedre gelen har en høyere en høyere pH og tetthet som gjør at proteinene vil gå saktere gjennom gelen og separeres etter molekylvekt (Gallagher 2006).

1. Støpeformen med gel monteres i kar for gelkjøring.
2. Elfobuffer helles i karet (tabell 2.25).
3. Luftbobler under glassplatene fjernes med en bøyd kanyle.
4. En plastkam settes over gelen for å angi brønnenes plassering.
5. Den første brønnen tilsettes 5 µl proteinstandard (BioRad Precision Plus Protein All Blue). Det appliseres 50 µl prøveløsning i hver brønn. Prøveløsningene er på forhånd justert for proteinmengde og volum (avsnitt 2.9.4).
6. Gelen koples til strøm, først 90 volt i 15 minutter til prøvene kommer på rett linje i gelen, deretter 150 volt til prøvene har vandret gjennom gelen. Elektroforesen tar omtrent 1 time.

Tabell 2.25: Elfobuffer

Komponent	Mengde
TGS-buffer pH 8,3	100 ml
Destillert vann	900 ml

Blotting og farging:

Blotting overfører proteinene og standarden fra gelen til en nitrocellulosemembran. Membranen kan farges for å se hvor mye protein som er blitt overført og om proteinmengden er jevn (Ursitti et al. 1995).

1. En nitrocellulosemembran, to filterpapir og to skrubber fuktes i blottebuffer (tabell 2.26).
2. Gelen fjernes forsiktig fra glassplatene med en plastspatel.
3. Blottekomponentene legges sammen i denne rekkefølgen:
 - Svart plastramme
 - Skrubbb
 - Filterpapir
 - Gel
 - Membran
 - Filterpapir
 - Skrubbb
 - Hvit plastramme
4. Den ferdige blotterammen legges i et blottekar sammen med en iskassett og magnetrører. Karet fylles med blottebuffer.
5. Gelen blottes på kjølerom. Strømstyrken settes til 400 mA i 1,5 timer eller 50 mA over natt.
6. Etter blotting legges membranen i et kar med Ponceau-S-løsning i 1 minutt. Proteinene blir farget røde.
7. Membranen skylles i et kar med destillert vann.
8. La overfløding væske renne av membranen før den legges i en plastlomme.
9. Ta bilde av proteinbåndene på membranen.
10. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten og vaskes 3 ganger med destillert vann.

Tabell 2.26: Blottebuffer

Komponent	Mengde
TG-buffer pH 8,3	100 ml
Metanol	200 ml
Destillert vann	700 ml

Blokking og påsetting av antistoff:

Blokking med løsning av 5 % tørrmelk i 1 x TBS med tween (tabell 2.27 og 2.28) blokker uspesifikke bindinger slik at primærantistoffet binder seg spesifikt til de proteinene som ønskes detektert (Gallagher et al. 2008).

1. Røret tilsettes 3 ml 5 % tørrmelk løsning i 1 x TBS med tween.
2. Røret legges til blokking på rullebrett i 1 time ved romtemperatur.
3. Etter blokking suges tørrmelkløsningen ut av røret.
4. Røret tilsettes deretter 3-5 ml 5 % tørrmelk i 1 x TBS med tween og primærantistoff. Blandingsforholdet avhenger av type primærantistoff som brukes (tabell 2.29).
5. Etter tilsetning av primærantistoff legges røret til rulling på kjølerom over natt.
6. Tørrmelkløsningen med primærantistoff helles av og vaskes tre ganger 15 minutter med 5 ml 1 x TBS med tween (tabell 2.27) i romtemperatur.
7. Røret tilsettes deretter 3-5 ml 5 % tørrmelk i 1 x TBS med tween og sekundærantistoff. Blandingsforholdet avhenger av type sekundærantistoff som brukes (tabell 2.29).
8. Etter tilsetning av sekundærantistoff legges røret til rulling ved romtemperatur i minst 1 time.
9. Tørrmelkløsningen med sekundærantistoff helles av og membranen vaskes tre ganger 15 minutter med 5 ml 1 x TBS med tween ved romtemperatur.

Tabell 2.27: 10 x Tris bufret saltvann (TBS) med tween

Komponent	Mengde
Tris base	12,1 g
NaCl	40 g
Tween 20	2,5 ml
Destillert vann	Ad 500 ml
HCl og NaOH brukes til å justere pH i løsningen til 7,6.	
1 x TBS med tween:	
10 x TBS med tween	100 ml
Destillert vann	900 ml

Tabell 2.28: 5 % tørrmelk i TBS med tween

Komponent	Mengde
Tørrmelk	2,5 g
1 x TBS med tween (tabell 2.28)	ad 50 ml
Løsningen oppbevares i kjøleskap og er holdbar i 3 dager.	

Tabell 2.29: Oversikt over antistoffer og konsentrasjoner brukt til westernblotting

Primærantistoff	Lot.nr	Blandingsforhold	Sekundærantistoff	Lot.nr	Blandingsforhold
Erk-2 (C-14) sc-154	B0106	1:1000	Donkey-anti-rabbit HRP sc-2313	C2609	1:10000
P-Erk M8159	108K4837	1:5000	Anti-mus IgG-HRP NA 93IV	311296	1:15000
Anti-caspase-3 Rabbit pAb 235412	D00103773	1:2000	Donkey-anti-rabbit HRP sc-2313	C2609	1:10000
Caspase-9 9506	D00060132	1:5000	Donkey-anti-rabbit HRP sc-2313	C2609	1:10000
β -actin A5316	128K4805	1:5000	Anti-mus IgG-HRP NA 93IV	311296	1:15000
α -tubulin B-7 sc-5286	D2310	1:1000	Anti-mus IgG-HRP NA 93IV	311296	1:15000

Fremkalling:

For å kunne detektere av ønsket protein fremkalles membranen ved hjelp av fremkallingsreagenser (tabell 2.30). Valg av type fremkallingsreagens avhenger av hvor mye av proteinet som ønskes detektert er tilstede. Fremkallingsreagenset inneholder luminol som reagerer med HRP bundet til sekundærantistoffet og reaksjonen gir luminicens som fanges opp av et digitalt kamera (Gallagher et al. 2008).

1. Komponentene til fremkallingsvæsken settes ut i romtemperatur 60 minutter før bruk.
2. De to komponentene i fremkallingsvæsken blandes.
3. Membranen tas ut av røret. La overflødig væske renne av og legg membranen på en glassplate med proteinsiden opp.
4. 1 ml fremkallingsvæske pipetteres over membranen slik at det fordeles godt. Luftbobler fjernes med pinsett. La membranen ligge i 5 minutter.
5. Overflødig fremkallingsvæske helles av, membranen legges i en plastlomme og fremkalles i programmet GeneSnap fra SynGene.
6. Etter fremkalling legges membranen tilbake i røret og lagres i 1 x TBS med tween i kjøleskap til eventuell stripping og påføring av nytt antistoff.

Tabell 2.30: Oversikt over fremkallingsreagenser brukt til westernblotting

Fremkallingsreagens	Blandingsforhold	Deteksjonsgrenser	Protein detektert
ECL-Plus	1:40	10 ⁻¹² g	β-actin
Supersignal West Piko	1:1	10 ⁻¹² g	ERK2, P-ERK
Supersignal West Femto	1:1	10 ⁻¹⁵ g	P-ERK, Caspase-3, Caspase-9

Stripping:

Strippebufferen bryter bindingene mellom primær og sekundærtstoff slik at membranen kan reprobos med nye antistoffer og fremkalles på nytt. Reprobings med antistoffer av samme molekylvekt kan gi usikkerhet i deteksjon dersom antistoffene ikke blir strippet fullstendig av. Dette kan undersøkes ved fremkalle membranen etter stripping (Gallagher et al. 2008).

1. Tilsett røret 5 ml stripebuffer (Western Blot Stripping Buffer). Røret legges til rulling i 15 minutter ved romtemperatur.
2. Strippebufferen helles av og membranen vaskes tre ganger 15 minutter med 5 ml 1 x TBS med tween.
3. Tilsett røret 3 ml 5 % tørrmelk i 1 x TBS med tween. Røret legges til rulling i 3 timer ved romtemperatur.
4. Membranen er klar til å påsettes nytt antistoff.

2.9.6 Kvantifisering av westernbåndstyrke

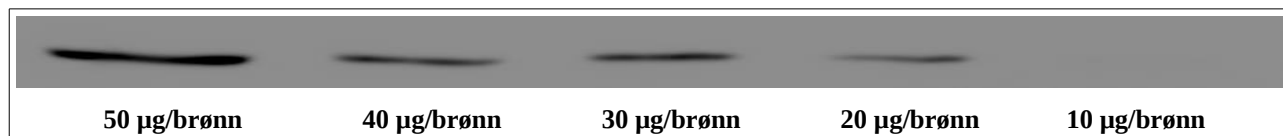
Bildene av membranene som fremkalles blir videre behandlet i bildeprogrammet ImageJ. Her blir styrken på proteinbåndene målt i antall pixels og på bakgrunn av dette blir det gjort en semikvantitativ sammelikning av proteinmengden i de ulike prøvene på membranen. Båndstyrken kan måles ved hjelp av ulike metoder i programmet. Det er tidligere blitt utført en test av de ulike målemetodene ved bruk av en fortynningsrekke med et DNA-plasmid. Det ble vist at sammelikning av maksimalt antall piksler gir mest lineær sammenheng mellom båndstyrke og proteinkonsentrasjon (Lindland-Tjønn 2009).

Det var interessant å se om dette stemte for ubehandlede prøver fra PC12-celler. Det ble laget et westernblott av prøver med kjente proteinkonsentrasjoner etter prosedyre vist i avsnitt 2.9.5. Membranen ble påsatt α-tubulin antistoff og fremkalt (figur 2.1).

Bildet av membranen ble analysert ved bruk av to målemetoder;

- Integraltetthet
- Maksimalt antall piksler - antall piksler i bakgrunnen

Bildet ble analysert 3 ganger per målemetode der regresjonslinjen ble sammenliknet med hensyn på gjennomsnittlig multipl regresjonskoeffesient (R^2) \pm SEM (tabell 2.31).



Figur 2.1 Fortynningsrekke av ubehandlede PC12-prøver.

PC12-celleprøven ble dyrket i 24 timer før høsting. Det ble laget en fortynningsrekke for 5 ulike konsentrasjoner av celleprøven. Prøvene lå innenfor det lineære pixelområdet. Figuren viser α -tubulin proteinbåndene for 4 av de 5 prøvene.

Tabell 2.31: Resultater fra ulike metoder for måling av båndstyrke

	Integraltetthet	Maksimalt antall piksler - bakgrunn
Gjennomsnittlig R^2	0,98045	0,97576
\pm SEM	0,0005	0,00001

Resultatene viser at de ulike målemetodene i ImageJ gir tilnærmet lik R^2 verdi og verdien viser god lineær sammenheng mellom båndstyrke og proteinkonsentrasjon. Det er lavest variasjon i båndstyrker målt ved maksimalt antall piksler og på bakgrunn av dette er denne målemetoden benyttet for alle målinger av båndstyrker i denne oppgaven.

2.10 GRAFER OG STATISTIKK

Resultatene er fremstilt grafisk i OpenOffice.org Calc og statistisk analyse er utført ved hjelp av Sigma Stat versjon 3.0 fra SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA. Signifikansnivået er satt til $p < 0,05$. Parvis sammenlikning av normalfordelte data er utført ved bruk av t-test. Parvis sammenlikning av ikke-normalfordelte data er utført ved bruk av Mann-Whitney Rank sum test. Sammenlikning av flere grupper med normalfordelte data er utført ved bruk av One Way Analysis of Variance (ANOVA) med Dunnet's post hoc test. Sammenlikning av flere grupper med ikke-normalfordelte data er utført ved bruk av Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance (ANOVA) on Ranks med Dunn's post hoc test.

3. RESULTATER

3.1 CELLEDØD I PC12-CELLER OG KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1 ELLER 1541

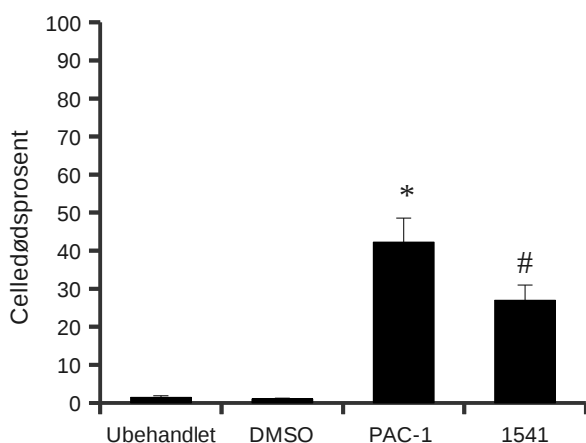
PAC-1 induserer celledød gjennom sinkavhengig aktivering av caspase-3 (Peterson et al.2009a). 1541 er foreslått som en aktivator av caspase-3 ved en direkte interaksjon med procaspasen (Wolan et al. 2009). Eksponering med PAC-1 eller 1541 gir dermed mulighet til studering av apoptoregulering der caspase-3 er involvert.

3.1.1 Celledød i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541

PC12-celler splittet med celletetthet 7×10^4 celler/ml, deler seg og utviser responser på differensiering, proliferasjon og celledød (Green and Tischler 1976), og har blitt brukt i tidligere arbeid der induksjon av celledød med PAC-1 er studert (Putt et al. 2006).

PC12-cellene ble eksponert med 100 μ M PAC-1 og 25 μ M 1541 basert på tidligere arbeid for å kunne oppnå en tilfredsstillende celledød (Aziz et al. 2010; Wolan et al 2009). PAC-1 er løst i DMSO tilsvarende en konsentrasjon på 0,1 %, og 1541 er løst i DMSO tilsvarende en konsentrasjon på 0,5 %. Derfor ble ubehandlede celler brukt som kontroll for PAC-1 og celler tilsatt DMSO ble brukt som kontroll for 1541. Cellene ble eksponert i 24 timer og deretter farget med trypanblå og telt i mikroskop. Celledød ble beregnet som forholdet mellom antall døde celler og antall celler totalt i prosent.

Resultatene viste at PAC-1 og 1541 ga signifikant økt celledød sammenliknet med kontrollbehandlingene (figur 3.1 og tabell 3.1).



Figur 3.1: PAC-1 og 1541 induserer celledød i PC12-celler.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 24 timer med PAC-1 (100 μM) og 1541 (25 μM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler eksponert med DMSO. Celledød ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop. Figuren viser celledød oppgitt som prosent i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=16-19). * angir signifikant forskjell i celledød mellom PAC-1 og ubehandlet, # angir signifikant forskjell i celledød mellom 1541 og DMSO ($P < 0,05$, Mann-Whitney Rank sum test).

Tabell 3.1: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.1

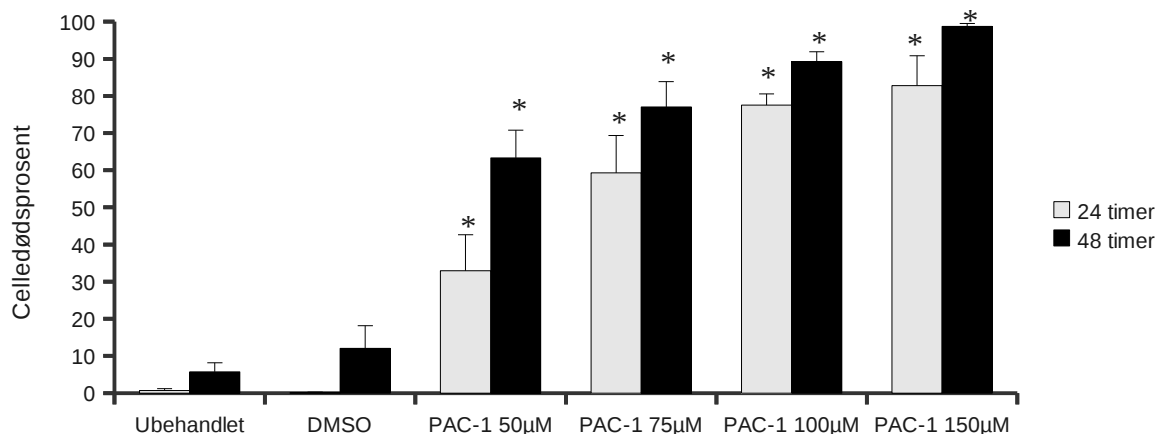
Eksponering	Celledødsprosent	\pm SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	1,41	0,42	16
DMSO (0,5 %)	1,05	0,21	19
PAC-1 (100 μM)	42,24	6,30	16
1541 (25 μM)	26,97	3,99	19

3.1.2 Celledød i PC12-celler eksponert i 24 eller 48 timer for ulike konsentrasjoner av PAC-1 og 1541

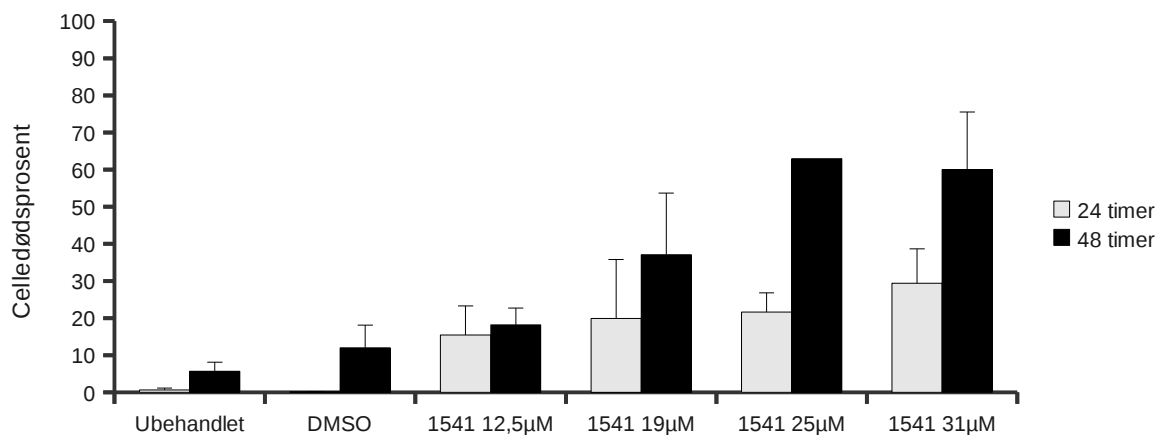
Det er tidligere vist at eksponering med PAC-1 over lengre tid gir økt celledød i PC12-celler ved lave konsentrasjoner (Aziz et al. 2010). Det ble derfor undersøkt effekter på celledød ved ulike konsentrasjoner av PAC-1 og 1541 eksponert i 24 eller 48 timer.

PC12-cellene ble eksponert i 24 eller 48 timer for en konsentrasjonsrekke med PAC-1 (50 μM , 75 μM , 100 μM og 150 μM) og en konsentrasjonsrekke med 1541 (12,5 μM , 19 μM , 25 μM , 31 μM). Ubehandlete celler og celler tilsatt DMSO ble brukt som kontroll. Cellene ble farget med trypanblå og telt i mikroskop. Celledød ble beregnet i prosent.

Resultatene viste signifikant økt celledød ved økende konsentrasjon av PAC-1 sammenliknet med ubehandlet (figur 3.2 og tabell 3.2). For celler eksponert med 1541 ga økt konsentrasjon tendens til økt celledød sammenliknet med DMSO (figur 3.3 og tabell 3.2). Celledøden så ut til å øke med eksponeringstid både for PAC-1 og 1541.



Figur 3.2: Konsentrasjonsrekke for PAC-1 viser økt celledød ved økt konsentrasjon og eksponeringstid. PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering med PAC-1 i ulike konsentrasjoner. Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler eksponert med DMSO. Celledød ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop 24 eller 48 timer etter eksponering. Figuren viser celledød oppgitt som prosent i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=3). * angir signifikant forskjell i celledød i forhold til ubehandlet ($P < 0,05$, one-way ANOVA).



Figur 3.3: Konsentrasjonsrekke for 1541 viser tendens til økt celledød for økte konsentrasjoner ved lengre eksponeringstid.

PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering med 1541 i ulike konsentrasjoner. Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler eksponert med DMSO. Celledød ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop 24 eller 48 timer etter eksponering. Figuren viser celledød oppgitt som prosent i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=3). (Gjennomsnitt der antall forsøk er 2 er ikke SEM oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i celledød i forhold til DMSO ($P < 0,05$, one-way ANOVA).

Tabell 3.2: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 og 3.3

Eksposering	Celledødsprosent 24 timer	±SEM	Celledødsprosent 48 timer	±SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	0,66	0,50	5,71	2,42	3
DMSO (0,5 %)	0,12	0,12	12,10	6,15	3
PAC-1 (50 µM)	32,96	9,70	63,29	7,50	3
PAC-1 (75 µM)	59,32	10,01	77,07	6,78	3
PAC-1 (100 µM)	77,51	3,07	89,26	2,64	3
PAC-1 (150 µM)	82,78	8,05	98,72	0,82	3
1541 (12,5 µM)	15,48	7,83	18,17	4,58	3
1541 (19 µM)	19,93	15,84	37,08	16,63	3
1541 (25 µM)	21,64	5,22	62,93	-	2-3
1541 (31 µM)	29,37	9,32	59,97	15,55	3

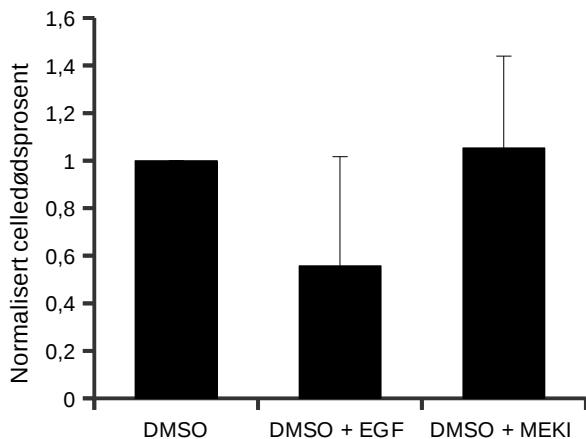
3.1.3 Effekt av EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541

I tillegg til å studere effekten av PAC-1 og 1541 på celledød var det videre interessant å studere mekanismene som er involvert i apoptose. Det er vist at tilsetning av vekstfaktorer som EGF gir beskyttende effekt mot ulike former for celledød via MEK/ERK-signalveien og ved tilsetning av MEK-inhibitor vil denne signalveien kunne hindres (Henson and Gibson 2006; Duffy and Kumar 2009). Det ble derfor undersøkt om EGF kan beskytte mot celledød induert av PAC-1 eller 1541 og om MEK-inhibitor vil kunne øke celledødseffekten av PAC-1 og 1541. Siden PAC-1 og 1541 induserer celledød via mekanismer som involverer caspase-3 var det også ønskelig å undersøke om celledøden vil reduseres ved tilsetning av inhibitorer av caspase-3 og caspase-9.

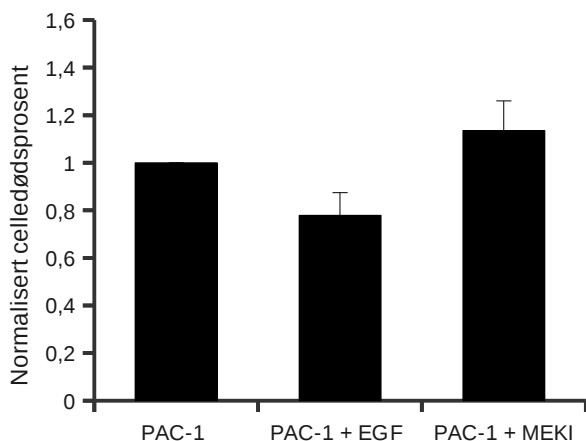
PC12-cellene ble eksponert med PAC-1 (100 µM) og 1541 (25 µM) alene eller i kombinasjon med EGF, MEK-inhibitor, caspase-3-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Til kontroll ble det brukt celler tilsatt DMSO med eller uten EGF, MEK-inhibitor, caspase-3-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Cellene ble eksponert i 24 timer og deretter farget med trypanblå og telt i mikroskop. Celledød ble beregnet i prosent, men på grunn av stor spredning mellom forsøkene ble resultatene normalisert med hensyn på prosent celledød induert av DMSO, PAC-1 og 1541 alene.

Tilsetning av EGF ga signifikant reduksjon i celledød sammenliknet med 1541 alene og viste tegn til reduksjon i celledød sammenliknet med PAC-1 alene. Tilsetning av MEK-inhibitor syntes å gi noe økt celledød i celler eksponert med 1541 og i mindre grad i forhold til PAC-1 (figur 3.4b-c og tabell 3.3). Caspaseinhibitorer ga ingen signifikant reduksjon i celledød sammenliknet med PAC-1 eller 1541, men caspase-3-inhibitor viste tendens til reduksjon av celledød (figur 3.5b-c og tabell 3.4).

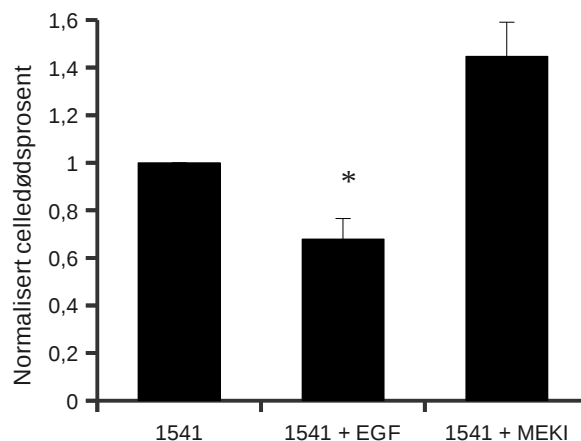
A



B



C

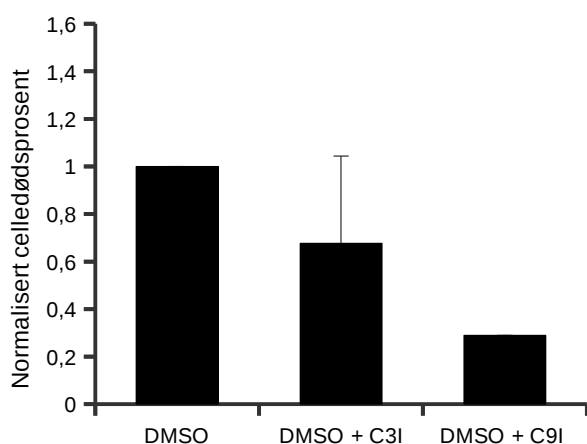


Figur 3.4a-c: EGF reduserer celledød induisert av 1541 og viser tendens til redusert celledød induisert av PAC-1. PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 24 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) eller MEK-inhibitor (10 μ M). Til kontroll ble det brukt celler eksponert med DMSO alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) eller MEK-inhibitor (10 μ M). Celledød ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop. Figuren viser celledød i forhold til antall celler totalt (Celledødsprosenten for DMSO, PAC-1 og 1541 er gitt i figur 3.1). Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt med SEM (n=5-18). * angir signifikant forskjell i celledød i forhold til 1541 alene (C) ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

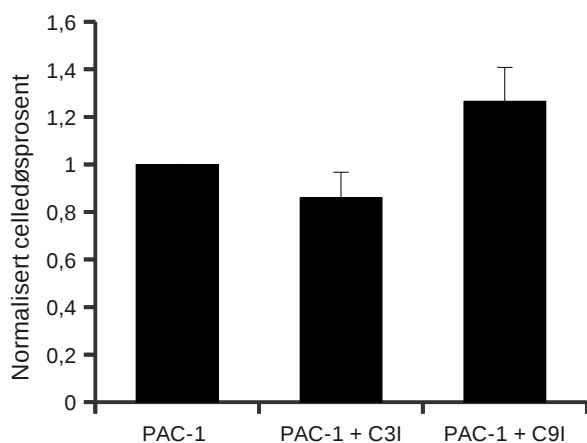
Tabell 3.3: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.4a-c

Eksposering	Normalisert celledødsprosent	±SEM	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,5 %)	1	-	6
DMSO (0,5 %) + EGF (5 ng/ml)	0,56	0,46	6
DMSO (0,5 %) + MEKI (10 µM)	1,05	0,39	5
PAC-1 (100 µM)	1	-	17
PAC-1 (100 µM) + EGF (5 ng/ml)	0,78	0,10	17
PAC-1 (100 µM) + MEKI (10 µM)	1,14	0,12	16
1541 (25 µM)	1	-	18
1541 (25 µM) + EGF (5 ng/ml)	0,68	0,09	18
1541 (25 µM) + MEKI (10 µM)	1,45	0,14	18

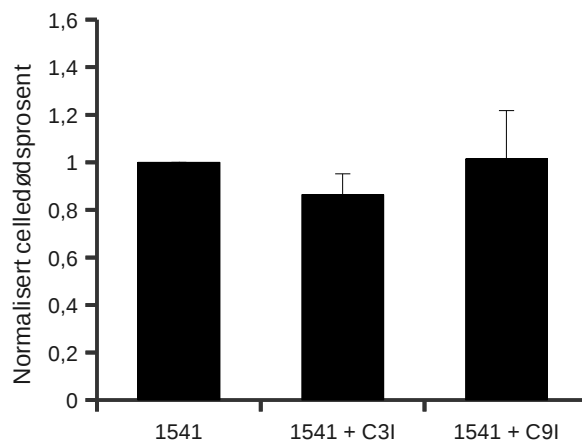
A



B



C



Figur 3.5a-c: Caspase-3-inhibitor viser tendens til reduksjon av celledød induisert av PAC-1 eller 1541.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 24 timer med PAC-1 (100 µM) og 1541 (25 µM) alene eller tilsatt caspase-3-inhibitor (1 µM) eller caspase-9-inhibitor (10 µM). Til kontroll ble det brukt celler eksponert med DMSO alene eller tilsatt caspase-3-inhibitor (1 µM) eller caspase-9-inhibitor (10 µM). Celledød ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop. Figuren viser celledød i forhold til antall celler totalt. (Celledødsprosenten for DMSO, PAC-1 og 1541 er gitt i figur 3.1). Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt med SEM (n=3-14). (Der antall forsøk er 1 er ikke SEM oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i celledød i forhold til alenebehandlinger med (A) DMSO, (B) PAC-1 og (C) 1541 ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.4: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5a-c

Eksposering	Normalisert celledødsprosent	±SEM	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,5 %)	1	-	3
DMSO (0,5 %) + C3I (1 µM)	0,68	0,37	3
DMSO (0,5 %) + (C9I 10 µM)	0,29	-	1
PAC-1 (100 µM)	1	-	16
PAC-1 (100 µM) + C3I (1 µM)	0,86	0,11	16
PAC-1 (100 µM) + C9I (10 µM)	1,27	0,14	11
1541 (25 µM)	1	-	14
1541 (25 µM) + C3I (1 µM)	0,86	0,09	19
1541 (25 µM) + C9I (10 µM)	1,01	0,20	8

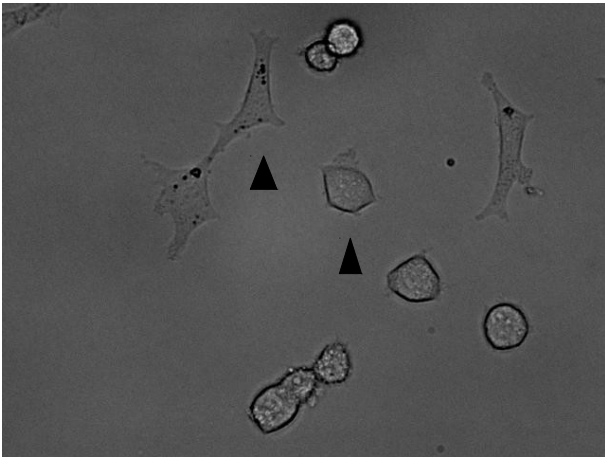
3.1.4 Kjernemorfologi i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541

I avsnitt 3.1.2 ble det observert tendens til at PAC-1 og 1541 ga høyere celledød etter lengre eksponeringstid. Det ble under mikroskopering observert morfologiske forskjeller i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541. Det var derfor interessant å se på om kjernemorfologien kunne si noe mer om de morfologiske forskjellene som ble observert og hvor lang tid cellene må eksponeres før de morfologiske endringene kan bli observert.

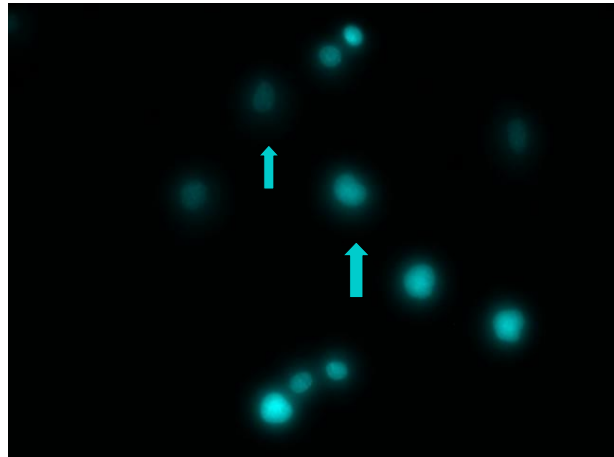
PC12 cellene ble eksponert for PAC-1 (100 µM) og 1541 (25 µM). DMSO ble brukt som kontroll. Etter 4, 8 og 24 timer ble cellene farget med hoechst og observert i fluorescensmikroskop der kjernediameter for omtrent 100 celler per eksponering ble målt.

Det ble ikke observert noen morfologiske forskjeller mellom PAC-1, 1541 eller DMSO ved eksponering i 4 eller 8 timer (data ikke vist). Bilder tatt etter 24 timer viste at celler eksponert med DMSO var kantete eller avlange med utløpere og kjernene så store ut (celler med pilhoder og kjerner med piler fig 3.6a-b). Det ble observert runde og små celler ved eksponering med PAC-1 og kjernene til disse cellene så mindre ut enn for de kantete cellene (celler med pilhoder og kjerner med piler fig 3.6c-d). Noen celler eksponert med 1541 var ujevne og krympet med små kjerner, mens andre celler var avlange med antydning til større kjerner (celler med pilhoder og kjerner med piler fig 3.6e-f). Det det var ingen signifikant forskjell i kjernediameter mellom celler eksponert for PAC-1 eller 1541 i forhold til DMSO (figur 3.7 og tabell 3.5).

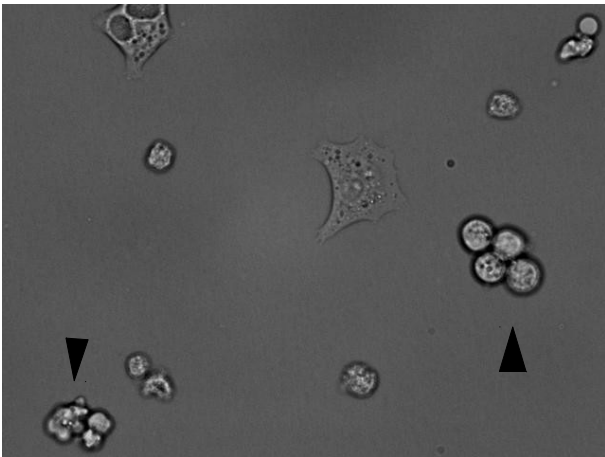
A: DMSO celler



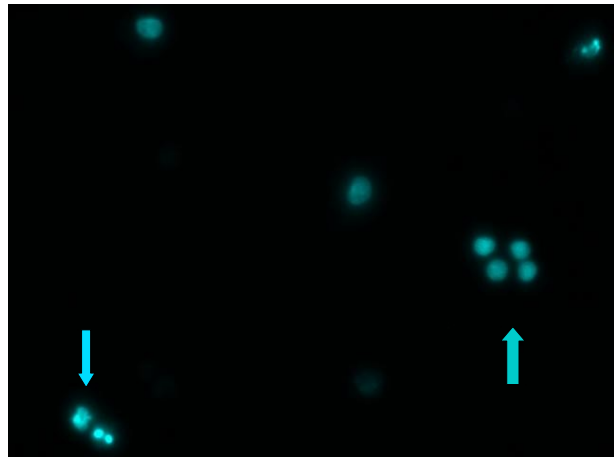
B: DMSO kjernefarget



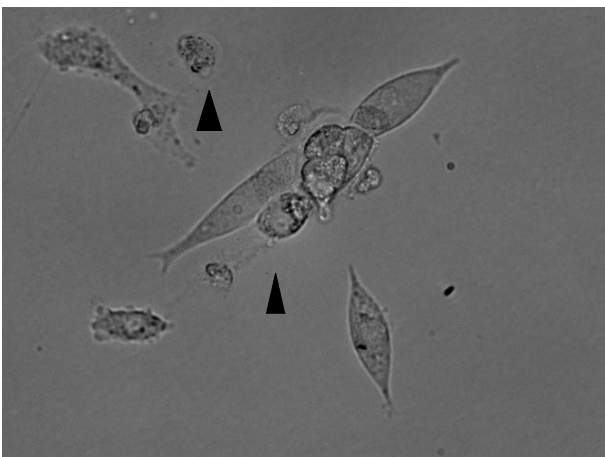
C: PAC-1 celler



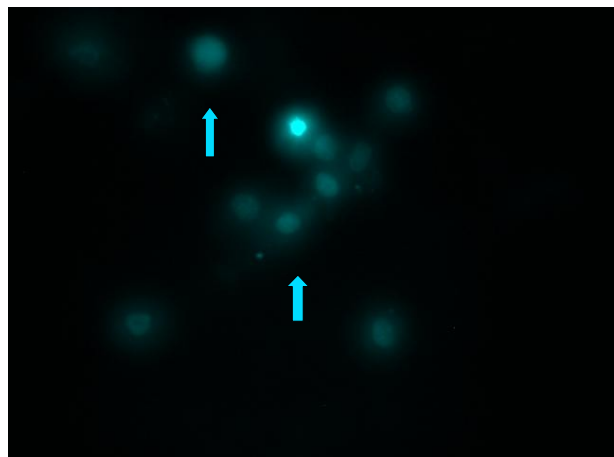
D: PAC-1 kjernefarget



E: 1541 celler

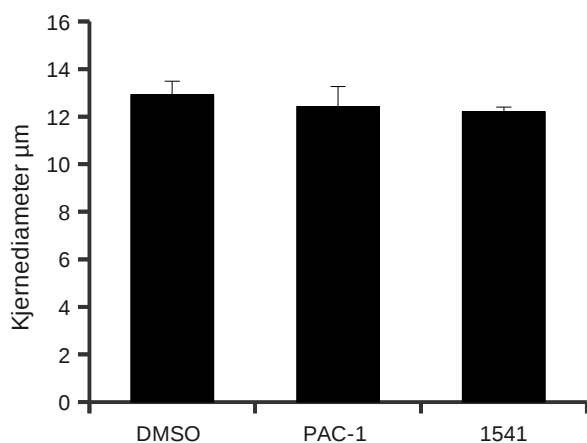


F: 1541 kjernefarget



Figur 3.6a-f: Morfologiske forskjeller i celler eksponert for DMSO, PAC-1 og 1541.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 24 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M) med DMSO som kontroll. Kjernene ble farget med hoechst og observert i fluorescensmikroskop. Celler eksponert med DMSO var kantete eller avlange med store kjerner. Celler eksponert med PAC-1 var små og runde med små kjerner, mens celler eksponert med 1541 var ujevne eller avlange med både små og store kjerner. (Celler markert med pilhoder og kjerner med piler).



Figur 3.7: Det er ingen forskjell i kjernediameter i celler eksponert for PAC-1 og 1541 i forhold til DMSO.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 24 timer med PAC-1 og 1541 med DMSO som kontroll. Kjernene ble farget med hoechst etter 24 timer og kjernediameteren for omtrent 100 celler per eksponering ble målt i fluorescensmikroskop. Figuren viser kjernediameter i µm oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=3). Det var ingen signifikant forskjell i kjernediameter mellom celler eksponert for PAC-1 eller 1541 i forhold til DMSO ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.5: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.7

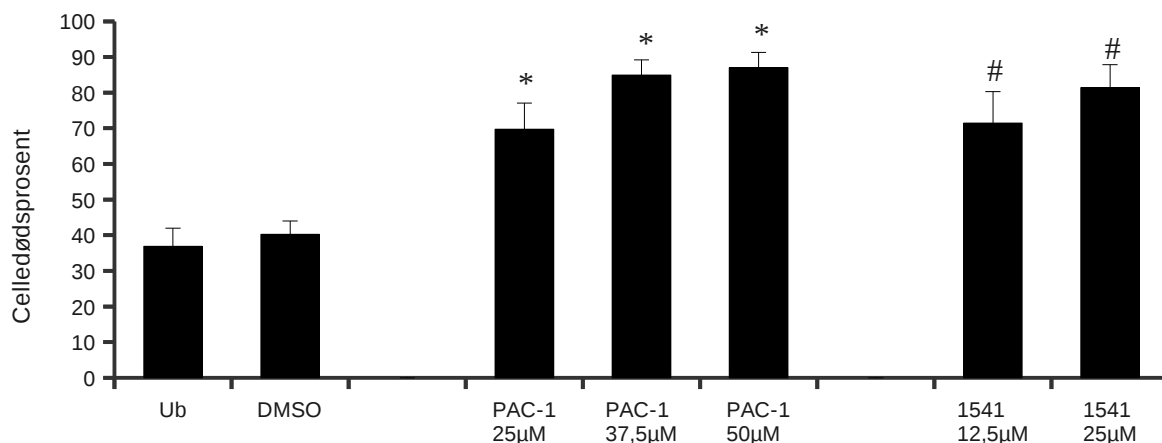
Eksponering	Kjernediameter µm	±SEM	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,5 %)	12,93	0,57	3
PAC-1 (100 µM)	12,42	0,84	3
1541 (25 µM)	12,20	0,19	3

3.1.5 Celledød i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 eller 1541

Det er vist at kyllingkornceller dyrket 3 dager *in vitro* uttrykker procaspase-3 (Jacobs et al. 2006). Det var derfor ønskelig å utføre tilsvarende forsøk i kyllingkorncellene som i PC12-cellene for å undersøke effekter av PAC-1 og 1541 på celledød.

Kyllingkorncellene ble eksponert med PAC-1 (25 µM, 37,5 µM og 50 µM) og 1541 (12,5 µM og 25 µM), basert på tidligere arbeid (Aziz et al. 2010; Wolan et al 2009). Til kontroll ble det brukt ubehandlede og celler tilsatt DMSO. Cellene ble eksponert i 24 timer og deretter farget med trypanblå og telt i mikroskop. Celledød ble i prosent.

Resultatene viste at PAC-1 og 1541 ga signifikant økt celledød sammenliknet med kontrollbehandlingene (figur 3.8 og tabell 3.6).



Figur 3.8: PAC-1 og 1541 induserer celledød i kyllingkornceller.

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 24 timer med PAC-1 (25 µM, 37,5 µM og 50 µM) og 1541 (12,5 µM og 25 µM) alene. Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Celledøden ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop. Figuren viser celledød oppgitt som prosent i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=4-5). * angir signifikant forskjell i celledød i forhold til ubehandlet og # angir signifikant forskjell i forhold til DMSO (P<0,05, one-way ANOVA).

Tabell 3.6: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8

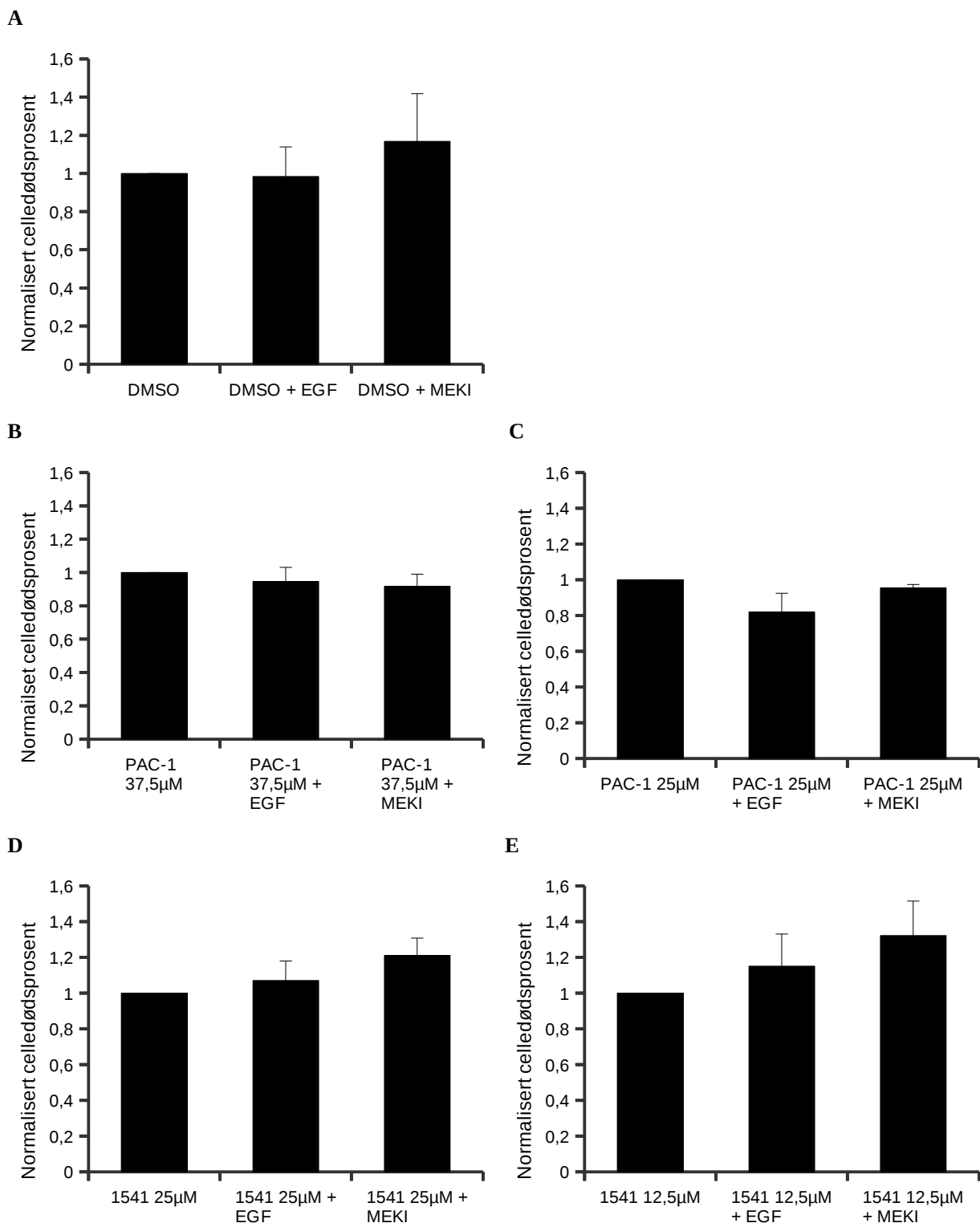
Eksponering	Prosent celledød	±SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet (Ub)	36,90	5,08	5
DMSO (0,5 %)	40,23	3,79	5
PAC-1 (25 µM)	69,78	7,30	5
PAC-1 (37,5 µM)	84,95	4,22	4
PAC-1 (50 µM)	87,07	4,25	4
1541 (12,5 µM)	71,43	8,85	4
1541 (25 µM)	81,45	6,43	5

3.1.6 Effekt av EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 eller 1541

Kyllingkornceller er nevroner som ikke deler seg og det gir mulighet til å studere overlevelsesmekanismer ved celledød i en primærecellekultur uavhengig av celledeling. Dette ble gjort ved tilsetning av EGF og MEK-inhibitor. Siden cellene uttrykker relativt mye procaspase-3 var det også interessant å se om inhibitorer av caspase-3 og caspase-9 vil kunne beskytte mot celledød induisert av PAC-1 og 1541.

Eksponering med 50 μM PAC-1 ga høy celledød (figur 3.8 og tabell 3.6), derfor ble konsentrasjonen av PAC-1 senket til 37,5 μM med hensikt for å tydeligere kunne observere eventuelle forskjeller mellom de ulike behandlingene. Kyllingkorncellene ble eksponert med PAC-1 (25 μM og 37,5 μM) og 1541 (12,5 μM og 25 μM) alene eller i kombinasjon med EGF, MEK-inhibitor, caspase-3-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Til kontroll ble det brukt celler tilsatt DMSO med eller uten EGF, MEK-inhibitor, caspase-3-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Cellene ble eksponert i 24 timer og deretter farget med trypanblå og telt i mikroskop. Celledød ble beregnet i prosent, men på grunn av stor spredning mellom forsøkene ble resultatene normalisert med hensyn på prosent celledød induisert av DMSO, PAC-1 og 1541 alene.

Tilsetning av EGF ga ingen signifikant reduksjon i celledød i forhold til PAC-1 eller 1541 alene, tilsetning av MEK-inhibitor ga ingen økning i celledød (figur 3.9 og tabell 3.7). Caspaseinhibitorer ga ingen signifikant reduksjon i celledød sammenliknet med PAC-1 eller 1541 alene (figur 3.10 og tabell 3.8).

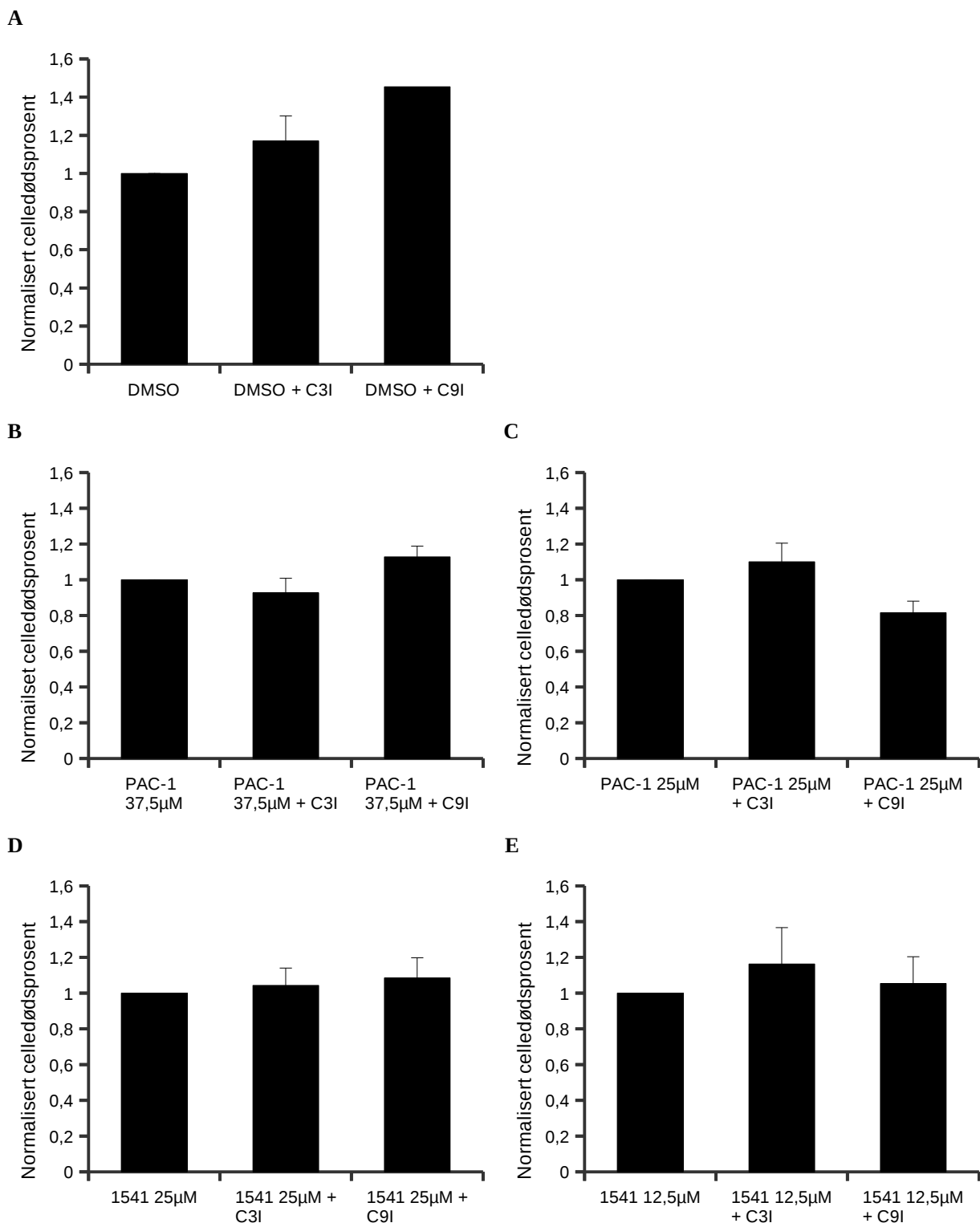


Figur 3.9a-e: EGF reduserer ikke og MEK-inhibitor øker ikke celledød induisert av PAC-1 eller 1541.

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 24 timer med PAC-1 (37,5 µM og 25 µM) og 1541 (25 µM og 1541 12,5 µM) alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) eller MEK-inhibitor (10 µM). Til kontroll ble det brukt celler eksponert med DMSO alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) eller MEK-inhibitor (10 µM). Celledød ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop. Figuren viser celledød i forhold til antall celler totalt. (Celledødsprosenten for DMSO, PAC-1 og 1541 er gitt i figur 3.8). Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt med SEM (n=4-5). (Gjennomsnitt der antall forsøk er 2 er feilfelt oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i celledød i forhold til alenebehandlinger med (B) PAC-1 (37,5 µM), (C) PAC-1 (25 µM), (D) 1541 (25 µM) og (E) 1541 (12,5 µM) ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.7: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9a-e

Eksposering	Normalisert celledødsprosent	±SEM (feilfelt der n=2)	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,5 %)	1	-	2
DMSO (0,5 %) + EGF (5 ng/ml)	0,98	0,15	2
DMSO (0,5 %) + MEKI (10 µM)	1,17	0,25	2
PAC-1 (37,5 µM)	1	-	4
PAC-1 (37,5 µM) + EGF (5 ng/ml)	0,95	0,08	4
PAC-1 (37,5 µM) + MEKI (10 µM)	0,92	0,07	4
PAC-1 (25 µM)	1	-	5
PAC-1 (25 µM) + EGF (5 ng/ml)	0,82	0,11	5
PAC-1 (25 µM) + MEKI (10 µM)	0,95	0,02	5
1541 (25 µM)	1	-	5
1541 (25 µM) + EGF (5 ng/ml)	1,07	0,11	5
1541 (25 µM) + MEKI (10 µM)	1,21	0,10	5
1541 (12,5 µM)	1	-	4
1541 (12,5 µM) + EGF (5 ng/ml)	1,15	0,18	4
1541 (12,5 µM) + MEKI (10 µM)	1,32	0,19	4



Figur 3.10a-e: Caspaseinhibitorer reduserer ikke celledød induisert av PAC-1 eller 1541.

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 24 timer med PAC-1 (37,5 µM og 25 µM) og 1541 (25 µM og 1541 12,5 µM) alene eller i kombinasjon med caspase-3-inhibitor (1 µM) eller caspase-9-inhibitor (10 µM). Til kontroll ble det brukt celler tilsatt DMSO alene eller tilsatt caspase-3-inhibitor (1 µM) eller caspase-9-inhibitor (10 µM). Celledød ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop. Figuren viser celledød i forhold til antall celler totalt. (Celledødsprosenten for DMSO, PAC-1 og 1541 er gitt i figur 3.8). Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt med SEM (n=3-5). (Gjennomsnitt der antall forsøk er 2 er feilfelt oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i celledød i forhold til alenebehandlinger med (B) PAC-1 (37,5 µM), (C) PAC-1 (25 µM), (D) 1541 (25 µM) og (E) 1541 (12,5 µM) ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.8: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10a-e

Eksposering	Normalisert celledødsprosent	±SEM (feilfelt der n=2)	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,5 %)	1	-	2
DMSO (0,5 %) + C3I (1 µM)	1,17	0,13	2
DMSO (0,5 %) + C9I (10 µM)	1,45	-	1
PAC-1 (37,5 µM)	1	-	4
PAC-1 (37,5 µM) + C3I (1 µM)	0,93	0,08	4
PAC-1 (37,5 µM) + C9I (10 µM)	1,13	0,06	3
PAC-1 (25 µM)	1	-	5
PAC-1 (25 µM) + C3I (1 µM)	1,10	0,10	5
PAC-1 25 µM + C9I 10 µM	0,82	0,07	5
1541 (25 µM)	1	-	5
1541 (25 µM) + C3I (1 µM)	1,04	0,10	5
1541 (25 µM) + C9I (10 µM)	1,08	0,11	4
1541 (12,5 µM)	1	-	4
1541 (12,5 µM) + C3I (1 µM)	1,16	0,20	4
1541 (12,5 µM) + C9I (10 µM)	1,05	0,15	4

3.2 CASPASEAKTIVITET I PC12-CELLER OG

KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1 ELLER 1541

Forsøk på celledød vist i avsnitt (3.1.1 og 3.1.5) demonstrerte at PAC-1 og 1541 induerte celledød i PC12-celler og kyllingkornceller. Det var derfor ønskelig å måle grad av caspase-3-aktivitet i PC12-cellene og kyllingkorncellene eksponert for PAC-1 og 1541. Det ble også forsøkt å måle caspase-9-aktivitet i PC12-celler (data ikke vist), men da det ikke ble observert aktivitet over bakgrunn ble det ikke forsøkt videre i kyllingkorncellene. Det ble gjort forsøk med tilsetning av EGF, MEK-inhibitor og inhibitorer av caspase-3 og caspase-9 for å gjøre det mulig å studere en eventuell "crosstalk" mellom MEK/ERK-signalveien og caspasekaskaden, og om celledøden skyldes direkte aktivering av caspase-3 eller aktivering via caspase-9. Basert på resultater tidligere arbeid ble cellene eksponert i 4 timer (Aziz et al. 2010).

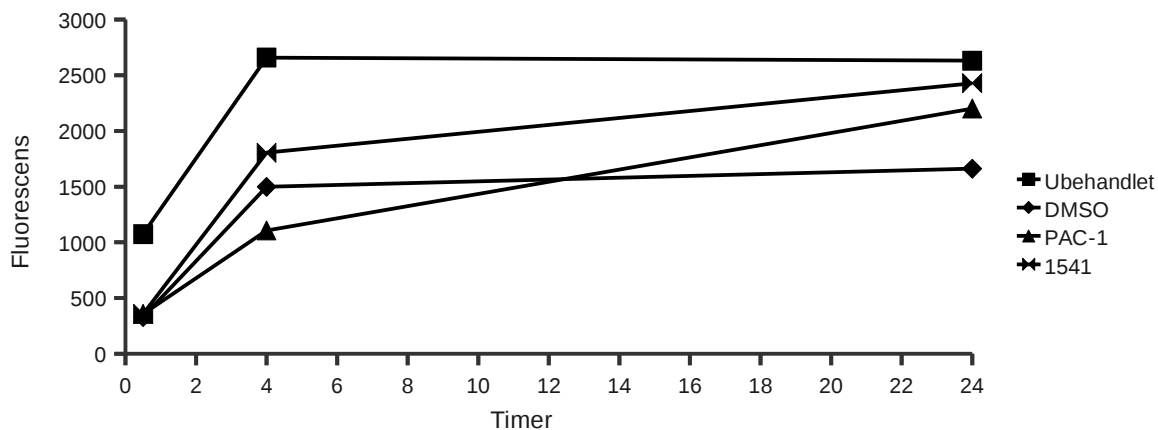
3.2.1 Caspase-3-aktivitet i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541

Cellene ble eksponert med PAC-1 (100 μM) eller 1541 (25 μM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Staurosporin ble brukt som en positiv kontroll til aktivert caspase-3. Cellene ble eksponert i 4 timer og caspase-3-aktiviteten ble målt 30 minutter, 4 timer og 24 timer etter tilsetning av caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor. Det ble utført 3 uavhengige forsøk hvorav ett der staurosporin ga caspase-3-aktivitet.

Figur 3.11 og tabell 3.9 viser at stigningen i caspase-3-aktivitet var størst i området 30 minutter til 4 timer og etter 4 timer flatet aktiviteten ut. For PAC-1 og 1541 syntes caspase-3-aktiviteten å være høyest ved 24 timer og det er tatt utgangspunkt i dette tidspunktet i videre sammenlikninger av caspase-3-aktiviteten.

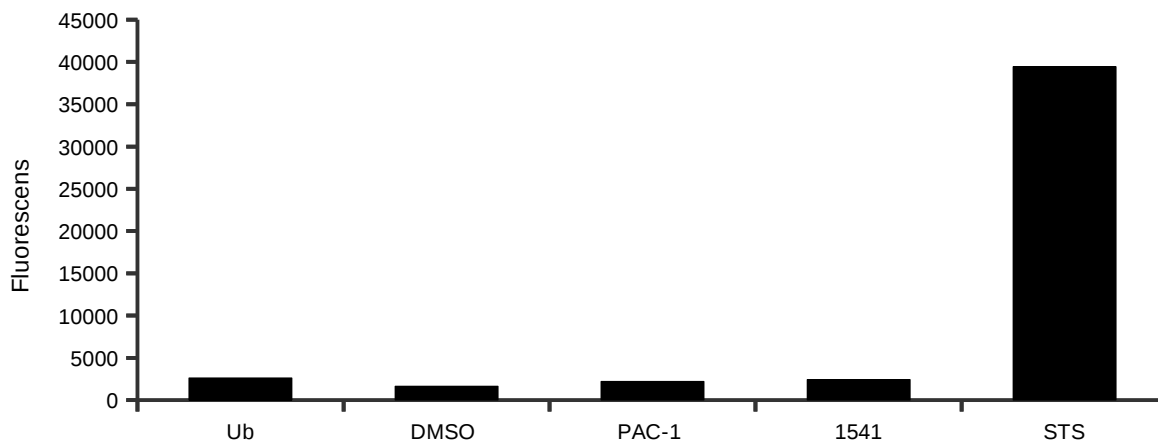
Resultatene viste ingen økt caspase-3-aktivitet i celler eksponert for PAC-1 eller 1541 i forhold til kontrollbehandlingene. Staurosporin ga vesentlig høyere caspase-3-aktivitet sammenliknet med PAC-1 og 1541 (figur 3.12 og tabell 3.9).

Data for caspase-3-aktivitet ved tilsetning av EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer er ikke vist siden PAC-1 og 1541 ikke aktiverte caspase-3 over kontrollnivå.



Figur 3.11: Caspase-3-aktiviteten i PC12-celler stiger mest i området 0,5-4 timer.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer i 96-brønnsbrett med 28×10^4 celledetthet til caspase-3-assay før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μM) og 1541 (25 μM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Staurosporin (1 μM) ble brukt som en positiv kontroll til aktivert caspase-3 (vist i tabell 3.9). Fluorescens ble målt ved 485/535 nm i plateleser 30 minutter, 4 timer og 24 timer etter tilsetning av caspase-3-substrat/inhibitor i brettet. Figuren viser caspase-3-aktivitet i form av gjennomsnittlig fluorescens fra 4 brønner korrigert for bakgrunn med caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor. Figuren er basert på tallmateriale fra 1 forsøk.



Figur 3.12: PAC-1 og 1541 aktiverer ikke caspase-3 over kontrollnivå og staurosporin gir vesentlig høyere caspase-3-aktivitet.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer i 96-brønnsbrett med 28×10^4 celledetthet til caspase-3-assay i før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μM) og 1541 (25 μM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Staurosporin (1 μM) ble brukt som en positiv kontroll til aktivert caspase-3. Fluorescens ble målt ved 485/535 nm i plateleser 24 timer etter tilsetning av caspase-3-substrat/inhibitor i brettet. Figuren viser caspase-3-aktivitet i form av gjennomsnittlig fluorescens fra 4 brønner korrigert for bakgrunn med caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor. Figuren er basert på tallmateriale fra 1 forsøk.

Tabell 3.9: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11 og 3.12

Eksposering	Fluorescens 0,5 timer	Fluorescens 4 timer	Fluorescens 24 timer	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet (Ub)	1074,0	2658,5	2630,5	1
DMSO (0,5 %)	330,5	1498,0	1661,5	1
PAC-1 (100 μ M)	357,5	1107,0	2201,5	1
1541 (25 μ M)	357,5	1804,5	2429,0	1
Staurosporin (1 μ M) (STS)	14242,5	35223,5	39456,0	1

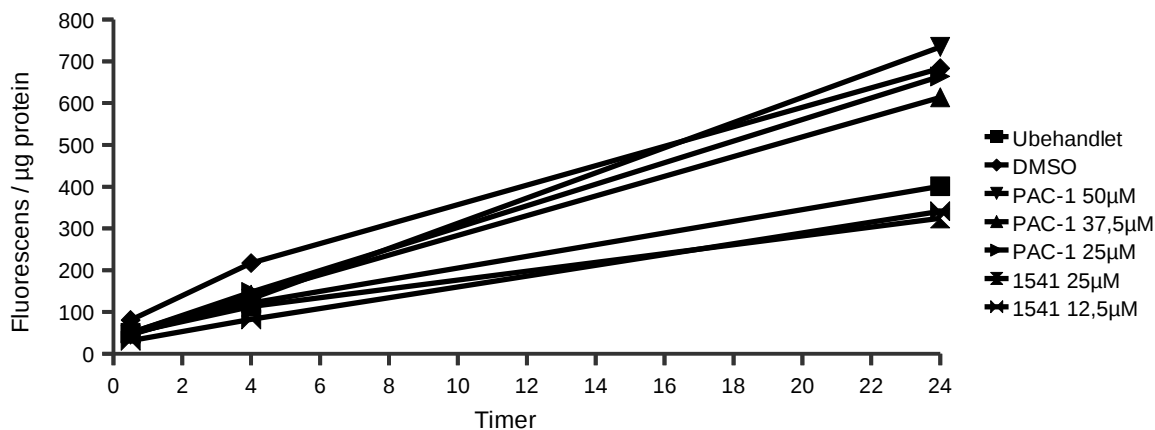
3.2.2 Caspase-3-aktivitet i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 eller 1541

Kyllingkorncellene ble eksponert i med PAC-1 (25 μ M, 37,5 μ M og 50 μ M) og 1541 (12,5 μ M og 25 μ M). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Staurosporin ble brukt som en positiv kontroll til aktivert caspase-3. Cellene ble eksponert i 4 timer og caspase-3-aktiviteten ble målt 30 minutter, 4 timer og 24 timer etter tilsetning av caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor.

Figur 3.13 og tabell 3.10 viser at caspase-3-aktiviteten steg sakte med tiden og var høyest etter 24 timer og det er tatt utgangspunkt i dette tidspunktet i videre sammenlikninger av caspase-3-aktiviteten.

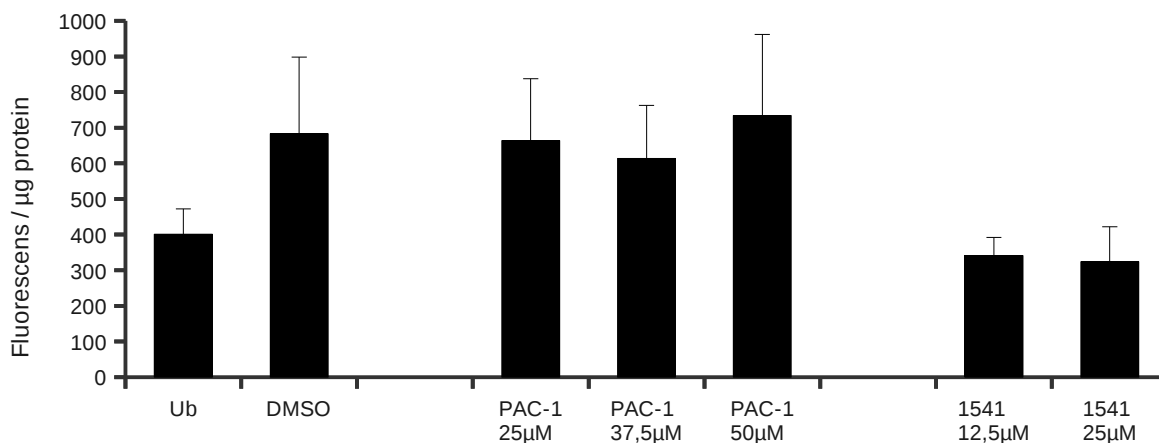
Resultatene viste ingen signifikant økning av caspase-3-aktivitet i celler eksponert med PAC-1 eller 1541 i forhold til kontrollbehandlingene (figur 3.14 og tabell 3.10). Staurosporin ga en vesentlig høyere aktivering av caspase-3 sammenliknet med PAC-1 og 1541 (data ikke vist).

Data for caspase-3-aktivitet ved tilsetning av EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer er ikke vist siden PAC-1 og 1541 ikke aktiverte caspase-3 over kontrollnivå.



Figur 3.13: Caspase-3-aktiviteten i kyllingkornceller stiger sakte og er høyest ved 24 timer.

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 4 timer med PAC-1 (25 µM, 37,5 µM og 50 µM) og 1541 (12,5 µM og 25 µM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Fluorescens ble målt ved 485/535 nm i plateleser 30 minutter, 4 timer og 24 timer etter tilsetning av celleprøve og caspase-3-substrat/inhibitor i brettet. Figuren viser gjennomsnittlig caspase-3-aktivitet fremstilt som ratioen mellom fluorescens og proteinmengde. Median fluorescens fra 3 brønner ble korrigert for bakgrunn med caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor. Figuren er basert på 3-4 uavhengige forsøk. (SEM er oppgitt i tabell 3.10).



Figur 3.14: PAC-1 og 1541 gir ikke caspase-3-aktivitet over kontrollnivå.

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 4 timer med PAC-1 (25 µM, 37,5 µM og 50 µM) og 1541 (12,5 µM og 25 µM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Staurosporin (1 µM) ble brukt som en positiv kontroll til aktivert caspase-3. Fluorescens ble målt ved 485/535 nm i plateleser 24 timer etter tilsetning av celleprøve og caspase-3-substrat/inhibitor i brettet. Figurene viser caspase-3-aktivitet fremstilt som ratioen mellom fluorescens og proteinmengde. Median fluorescens fra 3 brønner ble korrigert for bakgrunn med caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=3-4). Det var ingen signifikant forskjell i caspase-3-aktivitet i forhold til ubehandlet eller DMSO ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.10: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13 og 3.14

Eksposering	Fluorescens/ µg protein 0,5 timer	±SEM	Fluorescens/ µg protein 4 timer	±SEM	Fluorescens/ µg protein 24 timer	±SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet (Ub)	47,85	7,47	121,23	17,38	401,50	70,90	4
DMSO (0,5 %)	80,58	21,30	217,13	61,12	683,35	214,96	4
PAC-1 (25 µM)	49,80	9,93	147,53	31,57	663,85	173,31	4
PAC-1 (37,5 µM)	50,35	8,43	141,70	28,54	613,88	148,78	4
PAC-1 (50 µM)	45,37	13,82	131,70	37,42	734,30	227,14	3
1541 (12,5 µM)	31,0	9,08	82,28	19,40	341,33	50,75	4
1541 (25 µM)	49,75	12,43	112,85	35,56	324,30	97,64	4

3.2.3 Procaspase-3 i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541 tilsatt EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer

Procaspase-3 kløyves til aktiv caspase-3 ved proteolyse og det var ønskelig å studere mengden av aktivt caspase-3-enzym i cellene ved eksponering med PAC-1 og 1541, og om mengden procaspase-3 endres ved tilsetning av EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer. Det var også interessant å studere mengden av aktiv caspase-9 siden den er en aktivator av caspase-3.

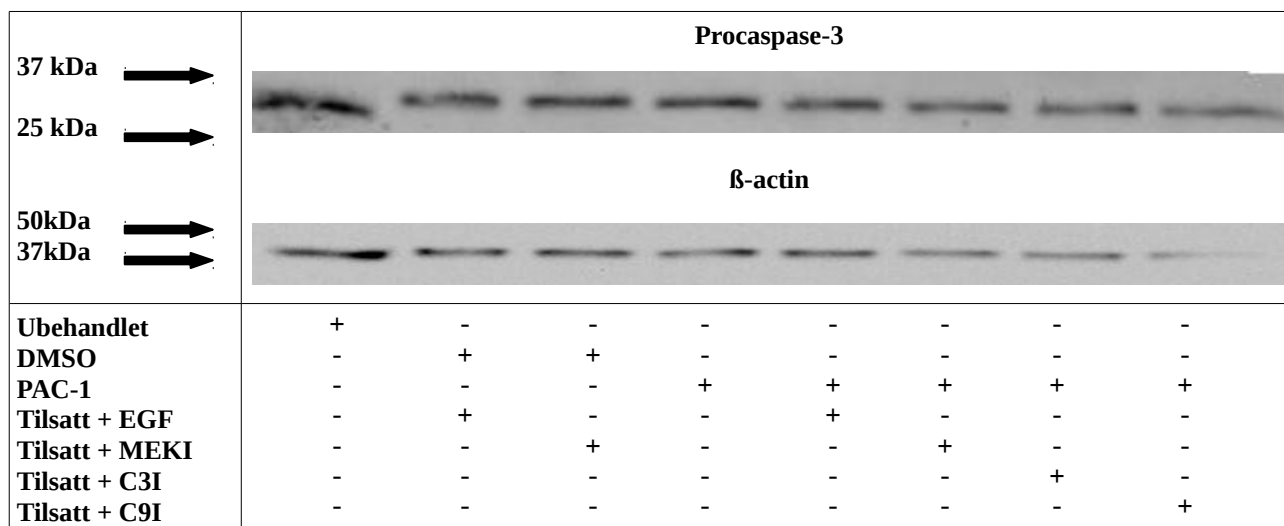
Westernblotting ble utført på PC12-celler og kyllingkornceller der et antistoff for caspase-3 og caspase-9 ble brukt. Cellene ble eksponert i 4 timer for PAC-1 og 1541 alene eller tilsatt EGF, MEK-inhibitor caspase-3-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO alene eller tilsatt EGF, MEK-inhibitor, caspase-3-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Staurosporin ble brukt som en positiv kontroll til aktivert caspase-3. I alle forsøkene ble β -actin brukt som en intern kontroll på proteinmengden i prøvene.

Det ble forsøkt å fremkalle westernbånd for både procaspase-3 (35 kDa) og aktive caspase-3 domener (17 og 10 kDa). Det lyktes kun å få frem procaspase-3 bånd i PC12-prøvene (figur 3.15a-b). Styrke på procaspase-3 båndene kan brukes som et indirekte mål på aktiv caspase-3 da det er vist korrelasjon mellom nedgang i procaspase-3 og økning av caspase-3 (Aziz et al. 2010). Det lyktes heller ikke å detektere westernbånd for procaspase-9 (51 kDa) eller kløyvde caspase-9 domener (40, 38 og 17 kDa).

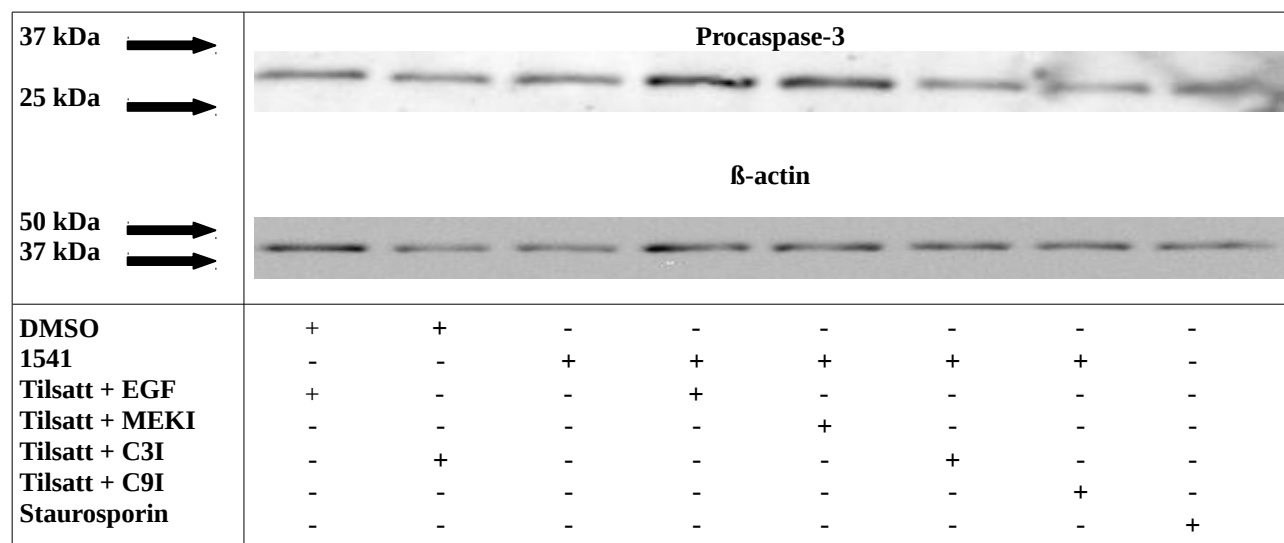
Resultatene viste ingen signifikant reduksjon i procaspase-3 i celler eksponert med PAC-1 eller 1541 sammenliknet med ubehandlet kontroll (figur 3.16 og tabell 3.11). Tilsetning av EGF økte ikke procaspase-3 og MEK-inhibitor reduserte ikke procaspase-3 i forhold til PAC-1 eller 1541

alene (figur 3.17a-c og tabell 3.12). Caspaseinhibitorene økte ikke procaspase-3 i celler i forhold til PAC-1 eller 1541 alene (figur 3.18a-c og tabell 3.13). Staurosporin viste heller ikke nedgang i procaspase-3, men staurosporin ga heller ikke caspase-3-aktivitet i PC12-celler fra samme forsøksperiode.

A

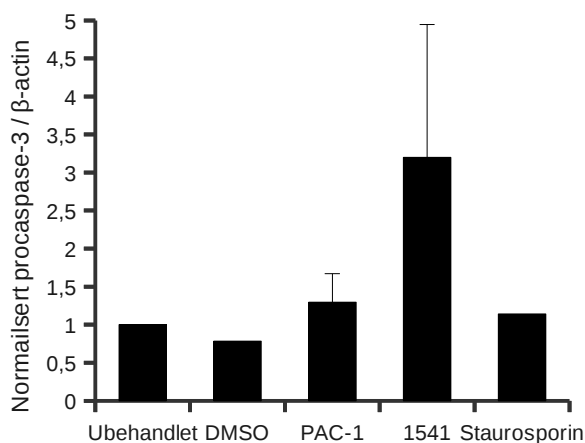


B



Figur 3.15a-b: Westernblott av PC12-celler.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 µM) og 1541 (25 µM) alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml), MEK-inhibitor (10 µM), caspase-3-inhibitor (1 µM) eller caspase-9-inhibitor (10 µM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml), MEK-inhibitor (10 µM) eller caspase-3-inhibitor (1 µM). (Blottet med DMSO tilsatt caspase-9-inhibitor (10 µM) ble ikke kvantifiserbart og er ikke vist). Staurosporin (1 µM) ble brukt som positiv kontroll på aktivert caspase-3. Membranen ble påsatt caspase-3 antistoff, så strippet og påsatt P-ERK1/2 antistoff, deretter ERK2 antistoff og til sist β-actin antistoff. Westernbåndene viser procaspase-3 med molekylvekt 35 kDa og β-actin med molekylvekt 42 kDa. (Blottet er fra samme membran som vist i avsnitt 3.3.1)

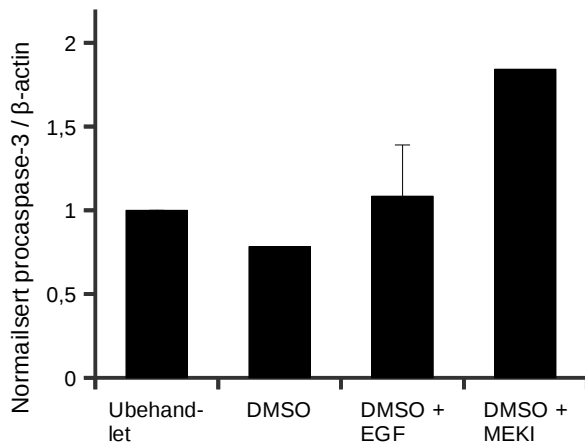
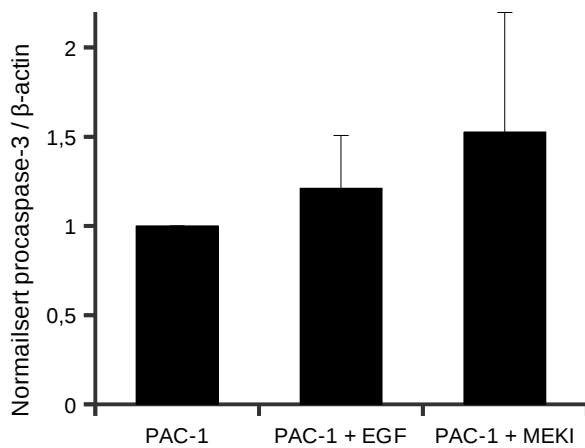
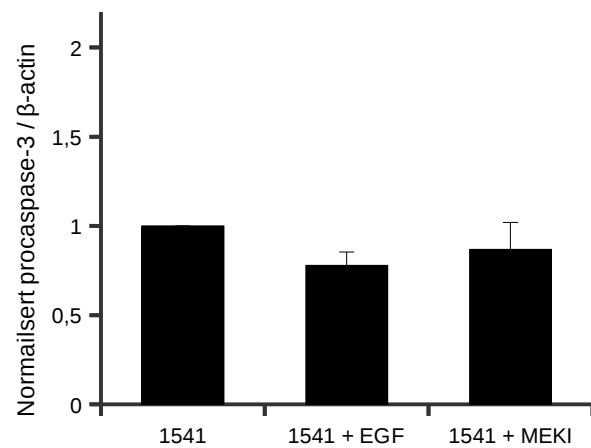


Figur 3.16a-b: PAC-1 og 1541 reduserer ikke procaspase-3.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μM) og 1541 (25 μM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Staurosporin (1 μM) ble brukt som kontroll på aktivert caspase-3. Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til procaspase-3 og β -actin målt i antall pixler. Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt av procaspase-3/ β -actin ratio med SEM (n=3-4). (Der antall forsøk er 1-2 er ikke SEM oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i procaspase-3 i forhold til ubehandlet ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.11: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.16a-b

Eksponering	Normalisert procaspase-3/ β -actin	\pm SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	1	-	4
DMSO (0,5 %)	0,78	-	1
PAC-1 (100 μM)	1,13	0,37	4
1541 (25 μM)	3,2	1,74	3
Staurosporin (1 μM)	1,14	-	2

A**B****C**

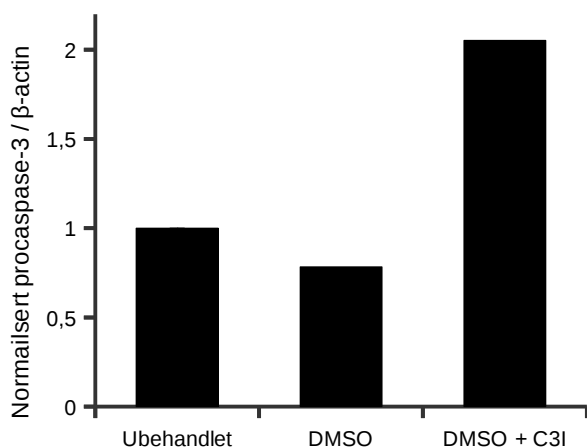
Figur 3.17a-c: EGF øker ikke procaspase-3 og MEK-inhibitor reduserer ikke procaspase-3 i celler eksponert med PAC-1 eller 1541.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller i kombinasjon med EGF (5 ng/ml) eller MEK-inhibitor (10 μ M). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) eller MEK-inhibitor (10 μ M). Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til procaspase-3 og β -actin målt i antall pixler. Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt av procaspase-3/ β -actin ratio med SEM (n=3-4). (Der antall forsøk er 1 er ikke SEM oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i procaspase-3 i forhold til (A) ubehandlet, (B) PAC-1 alene og (C) 1541 alene ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

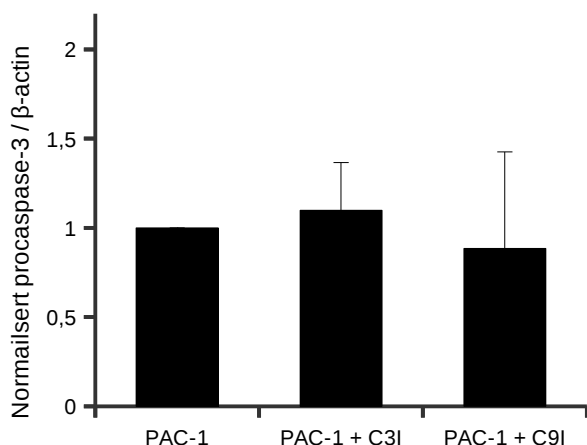
Tabell 3.12: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.17a-c

Eksposering	Normalisert procaspase-3/ β -actin	\pm SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	1	-	3
DMSO (0,5 %)	0,78	-	1
DMSO (0,5 %) + EGF (5 ng/ml)	1,08	0,3	3
DMSO (0,5 %) + MEKI (10 μ M)	1,84	-	1
PAC-1 (100 μ M)	1	-	4
PAC-1 (100 μ M) + EGF (5 ng/ml)	1,21	0,3	4
PAC-1 (100 μ M) + MEKI (10 μ M)	1,53	0,67	4
1541 (25 μ M)	1	-	4
1541 (25 μ M) + EGF (5 ng/ml)	0,78	0,08	4
1541 (25 μ M) + MEKI (10 μ M)	0,87	0,15	4

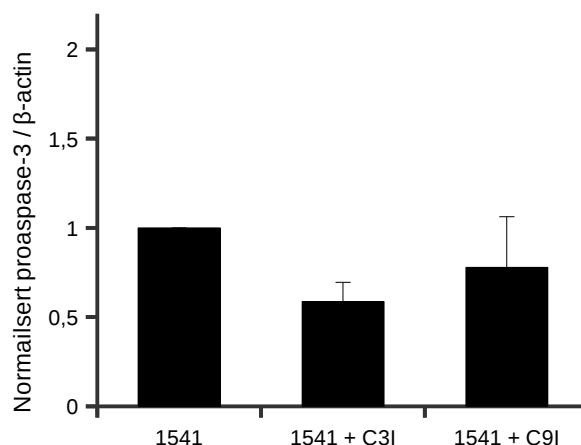
A



B



C



Figur 3.18a-c: Caspaseinhibitorer øker ikke procaspase-3 i celler eksponert med PAC-1 eller 1541.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller i kombinasjon med caspase-3-inhibitor (1 μ M) eller caspase-9-inhibitor (10 μ M). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO alene eller tilsatt caspase-3-inhibitor 1 μ M. Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til procaspase-3 og β -actin målt i antall pixler. Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt av procaspase-3/ β -actin ratio med SEM (n=3-4). (Der antall forsøk er 1 er ikke SEM oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i procaspase-3 i forhold til (B) PAC-1 alene og (C) 1541 alene ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.13: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.18a-c

Eksposering	Normalisert procaspase-3/β-actin	\pmSEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	1	-	1
DMSO (0,5 %)	0,78	-	1
DMSO (0,5 %) + C3I (1 μ M)	2,05	-	1
PAC-1 (100 μ M)	1	-	4
PAC-1 (100 μ M) + C3I (1 μ M)	1,1	0,27	4
PAC-1 (100 μ M) + C9I (10 μ M)	0,88	0,54	3
1541 (25 μ M)	1	-	4
1541 (25 μ M) + C3I (1 μ M)	0,59	0,11	4
1541 (25 μ M) + C9I (10 μ M)	0,78	0,29	4

3.3 P-ERK i PC12-CELLER OG KYLLINGKORNCCELLER

EKSPONERT FOR PAC-1 ELLER 1541

Det ble i avsnitt 3.1.3 vist at EGF beskytter mot celledød i PC12-celler induisert av 1541 og det ble vist tendens til beskyttelse mot celledød induisert av PAC-1. EGF kan aktivere MEK/ERK-signalveien, en MAP-kinasekaskade som resulterer i fosforylering av ERK (P-ERK) som igjen blant kan regulere antiapoptotiske proteiner ved transkripsjon (Henson and Gibson 2006). Caspase-3 er vist å kunne hindre P-ERK signalisering ved kløyving av viktige proteiner, men caspase-3 kan trolig også senke ERK-aktivering ved å kløyve selve ERK-proteinet (Marchetti et al. 2004; McKay and Morrison 2007). For å få en bedre forståelse av interaksjon med caspase-3 og EGF gjennom MEK/ERK-signalveien ble det utført westernblotting med P-ERK og ERK2 i PC12-celler og kyllingkornceller eksponert med PAC-1 og 1541 alene og tilsatt EGF, MEK-inhibitor og inhibitorer av caspase-3 og caspase-9. Siden caspase-3 også kan kløyve β -actin (Earnshaw et al. 1999) var det ønskelig å bruke både β -actin og ERK2 som internstandarder for å kunne gi et sikere estimat av effekter på P-ERK forutsatt at PAC-1 eller 1541 ikke reduserer ERK2.

3.3.1 P-ERK i PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541 tilsatt EGF

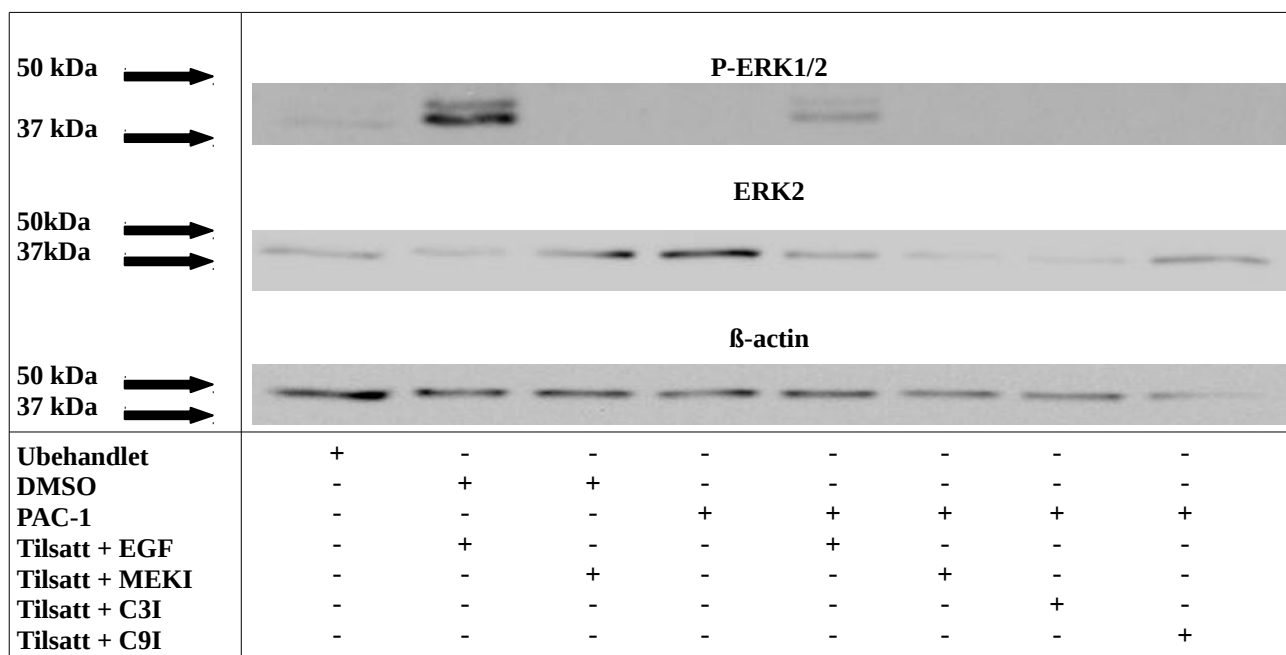
Resultatene er hentet fra de samme westernblottene av PC12-cellene som i avsnitt 3.2.3. Blottene ble reprobet med antistoff for ERK2 (total ERK2) og P-ERK (fosforylert ERK).

Bruk av P-ERK-antistoff resulterte i kvantifiserbare proteinbånd kun i prøver tilsatt EGF (figur 3.19a-b).

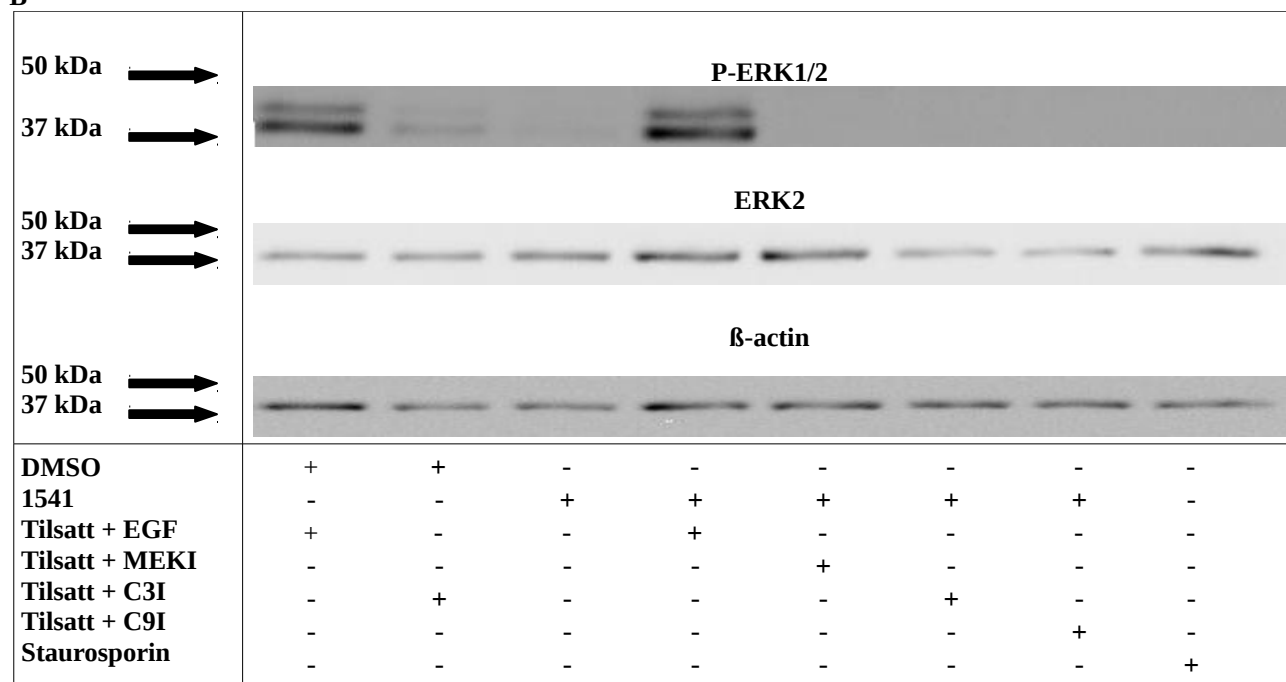
PAC-1 og 1541 viste ingen tegn til å redusere ERK2 i forhold til ubehandlet (figur 3.20 og tabell 3.14). Dermed ble ERK2 brukt som internstandard i tillegg til β -actin ved estimering av P-ERK.

Resultatene viste tendens til reduksjon av P-ERK i celler eksponert med 1541 tilsatt EGF i forhold til DMSO tilsatt EGF, men denne tendensen var mindre tydelig for PAC-1 (figur 3.21a-b og tabell 3.15)

A

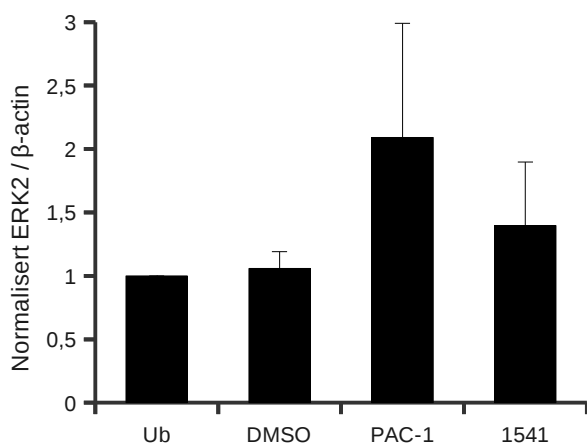


B



Figur 3.19a-b: Westernblott av PC12-celler.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 µM) og 1541 (25 µM) alene eller i kombinasjon med EGF (5 ng/ml), MEK-inhibitor (10 µM), caspase-3-inhibitor (1 µM) eller caspase-9-inhibitor (10 µM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO alene eller i kombinasjon med EGF (5 ng/ml), MEK-inhibitor (10 µM) eller caspase-3-inhibitor (1 µM). (Blottet med DMSO tilsatt caspase-9-inhibitor (10 µM) ble ikke kvantifiserbart og er ikke vist). Staurosporin (1 µM) ble brukt som positiv kontroll på aktivert caspase-3. Membranen ble påsatt caspase-3 antistoff, så strippet og påsatt P-ERK1/2 antistoff, deretter ERK2 antistoff og til sist β-actin antistoff. Westernbåndene viser P-ERK1/2 med molekylvekt 44/42 kDa, ERK2 med molekylvekt 42 kDa og β-actin med molekylvekt 42 kDa. (Blottet er fra samme membran som vist i avsnitt 3.2.3).



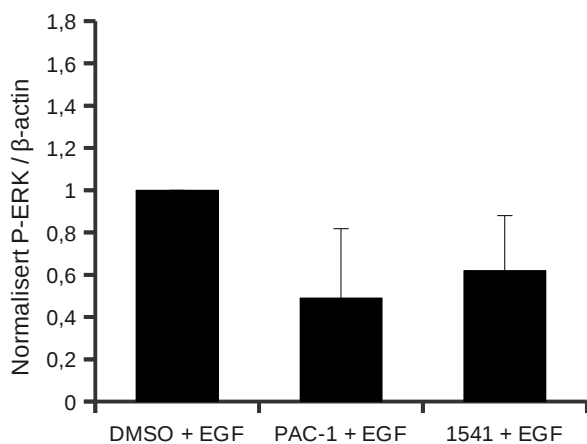
Figur 3.20: PAC-1 eller 1541 reduserer ikke ERK2 i PC12-celler.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til ERK2 og β -actin målt i antall pixler. Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt av ERK2/ β -actin ratio med SEM (n=4-7). Det var ingen signifikant forskjell i ERK2 i forhold til ubehandlet ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

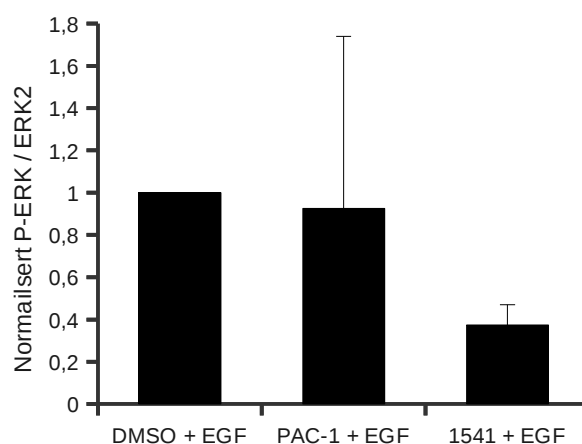
Tabell 3.14: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.20

Eksponering	Normalisert ERK2/ β -actin	\pm SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	1	-	7
DMSO (0,5 %)	1,06	0,13	4
PAC-1 (100 μ M)	2,09	0,9	7
1541 (25 μ M)	1,4	0,5	7

A



B



Figur 3.21a-b: 1541 synes å redusere P-ERK.

PC12-cellene ble dyrket i 24 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller i kombinasjon med EGF (5 ng/ml). Til kontroll ble det brukt celler tilsatt DMSO alene eller i kombinasjon med EGF (5 ng/ml). Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til, (A) P-ERK og β -actin og (B) P-ERK og ERK2, målt i antall pixler. Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt av P-ERK/ β -actin eller P-ERK/ERK2 ratio med SEM (n=3). Det var ingen signifikant forskjell i P-ERK i forhold til DMSO tilsatt EGF ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.15: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.21a-b

Eksposering	Normalisert P-ERK/ β -actin	\pm SEM	Normalisert P-ERK/ERK2	\pm SEM	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,5 %) + EGF (5 ng/ml)	1	-	1	-	3
PAC-1 (100 μ M) + EGF (5ng/ml)	0,49	0,33	0,93	0,81	3
1541 (25 μ M) + EGF (5 ng/ml)	0,62	0,26	0,37	0,1	3

3.3.2 P-ERK i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 eller 1541 tilsatt EGF, MEK-inhibitor eller caspaseinhibitorer

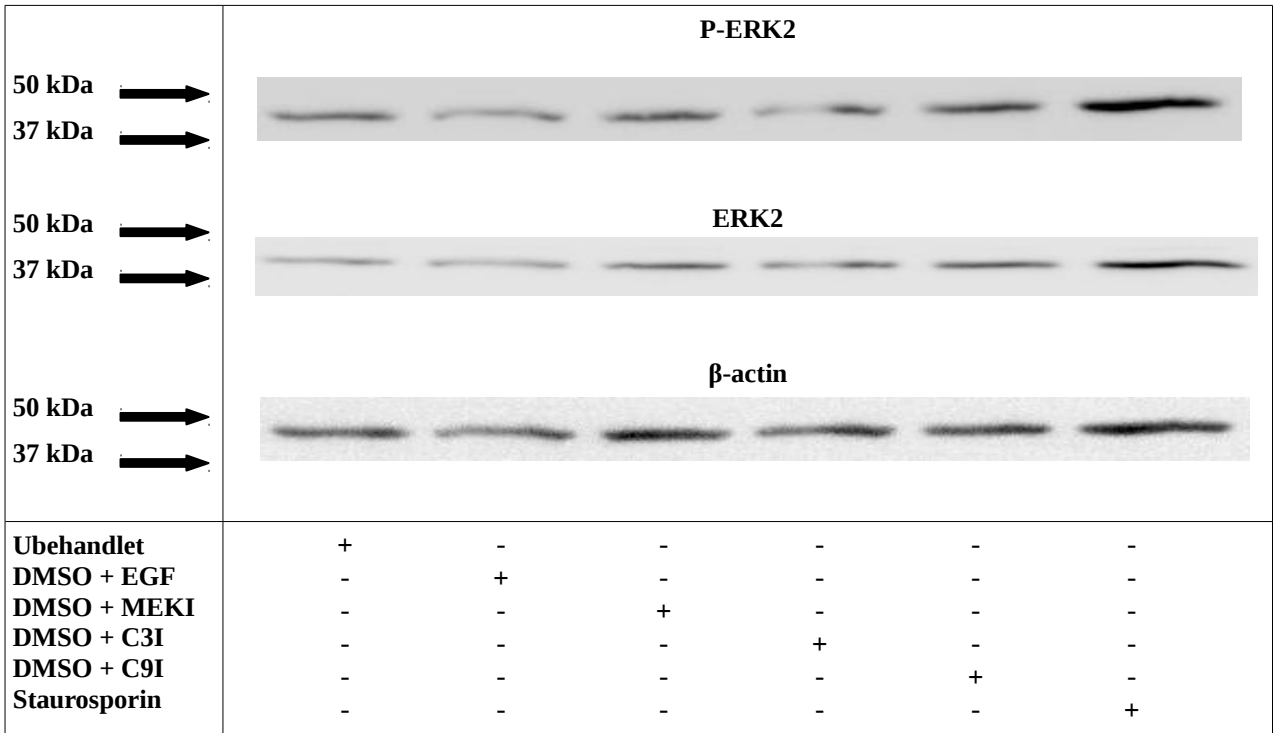
Kyllingkorncellene ble eksponert i 4 timer med PAC-1 (25 μ M og 50 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller tilsatt enten EGF, MEK-inhibitor, caspase-3-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO alene eller tilsatt enten EGF, MEK-inhibitor, caspase-3-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Det var ønskelig å bruke ERK2 og β -actin brukt som internstandarder for å kunne gi et sikere estimat av effekter på P-ERK forutsatt at PAC-1 eller 1541 ikke reduserer ERK2.

Det ble observert westernbånd for P-ERK og ERK2 i alle prøvene. Kun ett westernbånd for P-ERK1/2 (44/42kDa) ble detektert (figur 3.22a-c), men arbeid i forskningsgruppen har i likhet med tidligere arbeid vist at dette er et vanlig fenomen i kyllingkornceller og det er trolig at dette båndet tilsvarer P-ERK2 (42kDa) (Yadav et al. 2003). Blottene for P-ERK2 og ERK2 så like ut og det mistenkes at P-ERK2 kanskje ikke har blitt strippet godt nok av. Dermed blir estimeringen av ERK2 som ble probet etter P-ERK er mer usikker enn estimeringen av β -actin som ble probet før P-ERK.

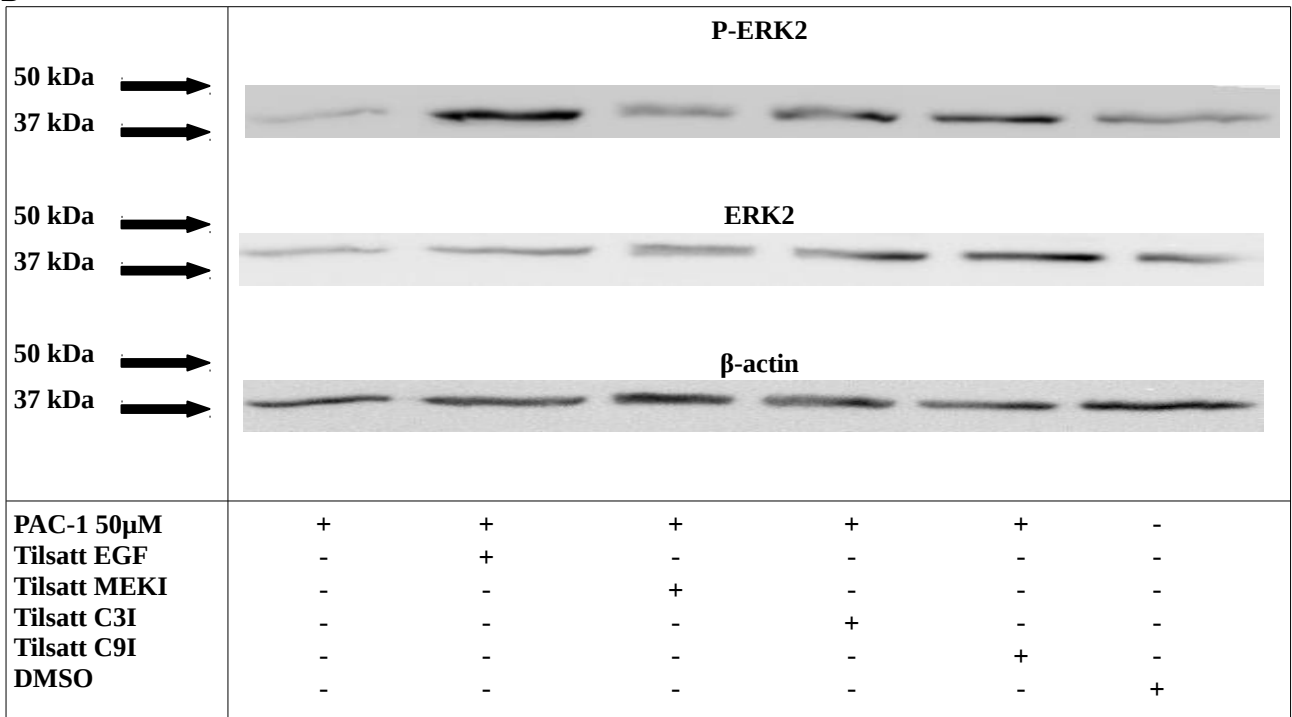
PAC-1 og 1541 syntes ikke å redusere ERK2 i forhold til ubehandlet kontroll (figur 3.23 og tabell 3.16) og dermed ble ERK2 brukt som internstandard i tillegg til β -actin ved estimering av P-ERK.

Resultatene viste tendens til reduksjon av P-ERK i celler eksponert med PAC-1 i forhold til ubehandlet kontroll, men denne tendensen var mindre tydelig 1541 (figur 3.24a-b og tabell 3.17). Tilsetning av EGF syntes å øke P-ERK i forhold til PAC-1 alene, men ikke i forhold til 1541. MEK-inhibitor reduserte ikke P-ERK sammenliknet med PAC-1 og 1541 alene (figur 3.25b-c og tabell 3.18). Caspaseinhibitorer viste tegn til å øke P-ERK i forhold til PAC-1 alene, men ikke i forhold til 1541 (figur 3.26b-c og tabell 3.19). Siden det ikke ble observert noen forskjell i estimering av P-ERK ved bruk β -actin eller ERK2 som internstandard, er data for P-ERK i forhold til ERK2 ikke vist.

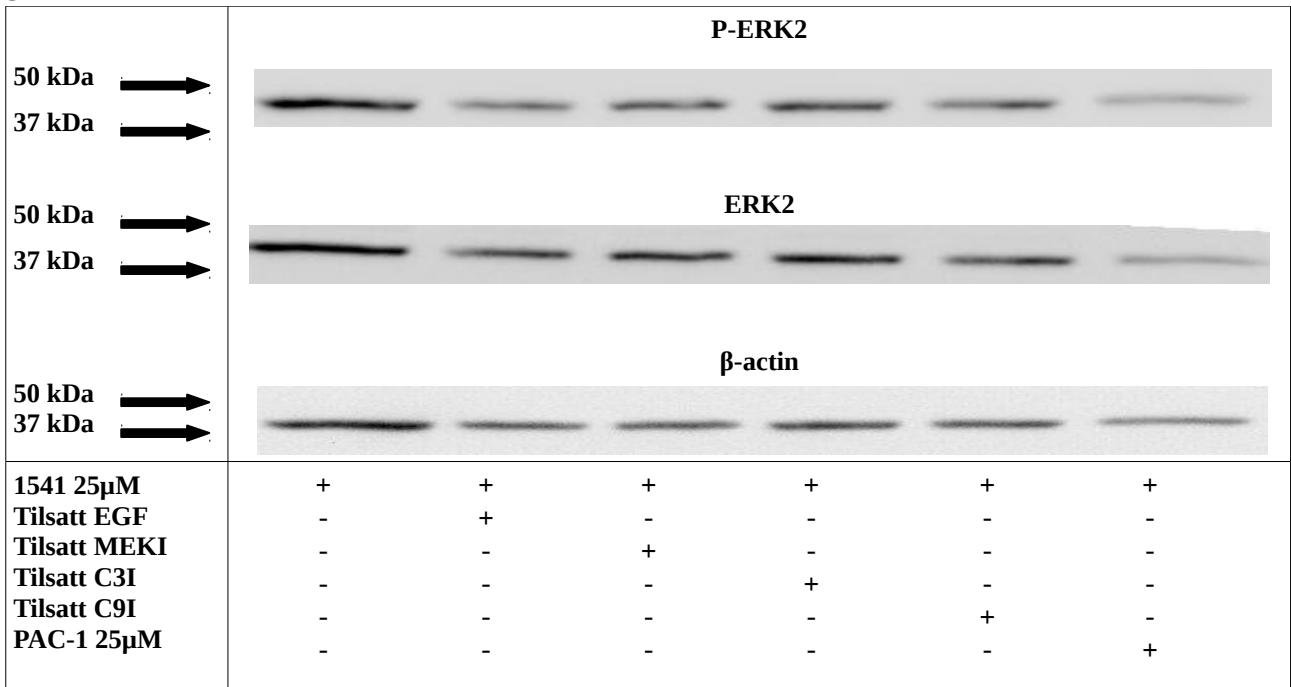
A



B

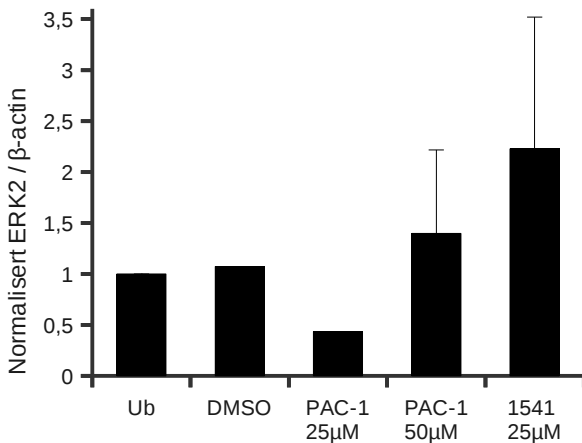


C



Figur 3.22a-c: Westernblott av kyllingkornceller.

Kyllingceller eksponert på DIV 3 i 4 timer med PAC-1 (50 μ M og 25 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller i kombinasjon med EGF (5 ng/ml), MEK-inhibitor (10 μ M), caspase-3-inhibitor (1 μ M) eller caspase-9-inhibitor (10 μ M). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO alene eller i kombinasjon med EGF (5ng/ml), MEK-inhibitor (10 μ M), caspase-3-inhibitor (1 μ M) eller caspase-9-inhibitor (10 μ M). Staurosporin (1 μ M) ble brukt som positiv kontroll til aktiv caspase-3. Membranen ble påsatt β -actin antistoff, så strippet og påsatt P-ERK1/2 antistoff og til sist ERK2 antistoff. Westernbåndene viser β -actin med molekylvekt 42 kDa, P-ERK2 med molekylvekt 42 kDa og ERK2 med molekylvekt 42 kDa.

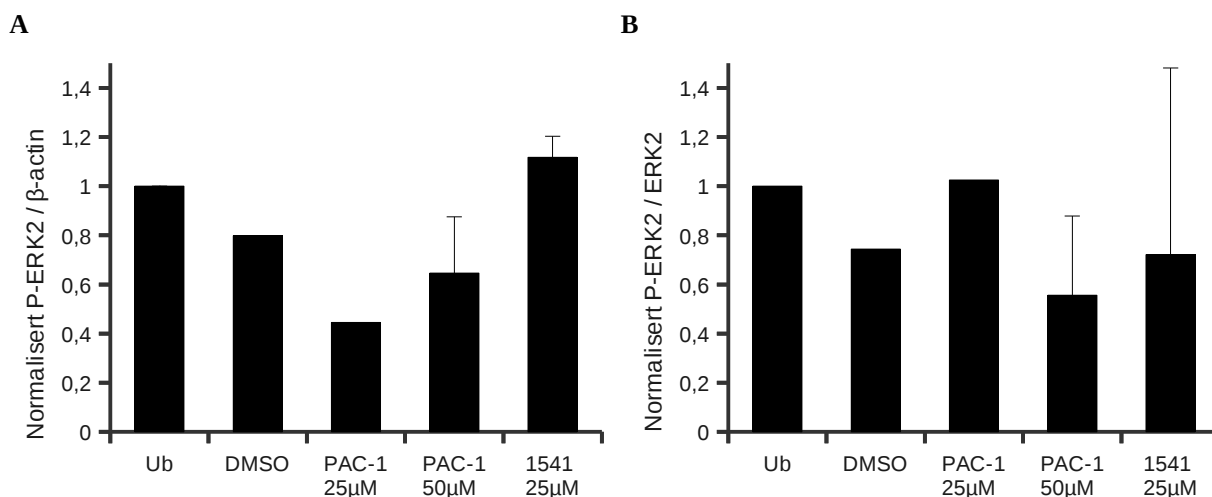


Figur 3.23: PAC-1 og 1541 synes ikke å redusere ERK2.

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 4 timer med PAC-1 (50 μ M og 25 μ M) og 1541 (25 μ M). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til ERK2 og β -actin målt i antall pixler. Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt av ERK2/ β -actin ratio med feilfelt (n=2). (Der antall forsøk er 1 er ikke feilfelt oppgitt).

Tabell 3.16: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.23

Eksposering	Normalisert ERK2/ β -actin	Feilfelt	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet (Ub)	1	-	2
DMSO (0,5 %)	1,07	-	1
PAC-1 (25 μ M)	0,43	-	1
PAC-1 (50 μ M)	1,40	0,82	2
1541 (25 μ M)	2,23	1,29	2

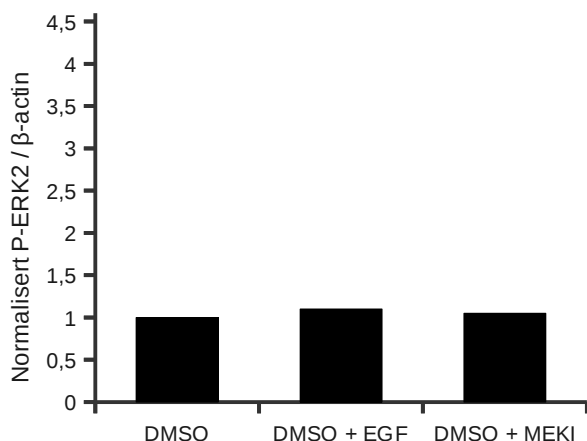
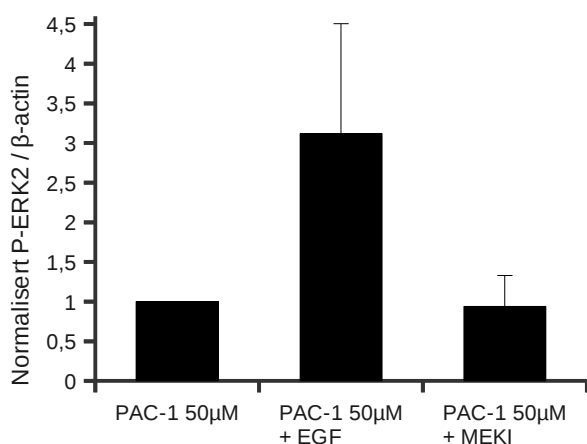
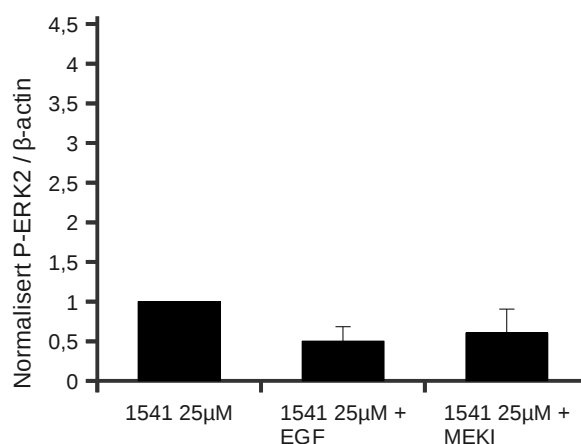


Figur 3.24a-b: PAC-1 synes å redusere P-ERK.

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 4 timer med PAC-1 (50 μ M og 25 μ M) og 1541 (25 μ M). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler tilsatt DMSO. Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til P-ERK2 og β -actin eller P-ERK2 og ERK2 ratio målt i antall pixler. Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt av, (A) P-ERK2/ β -actin eller (B) P-ERK2/ERK2, ratio med feilfelt (n=2). (Der antall forsøk er 1 er ikke feilfelt oppgitt).

Tabell 3.17: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.24a-b

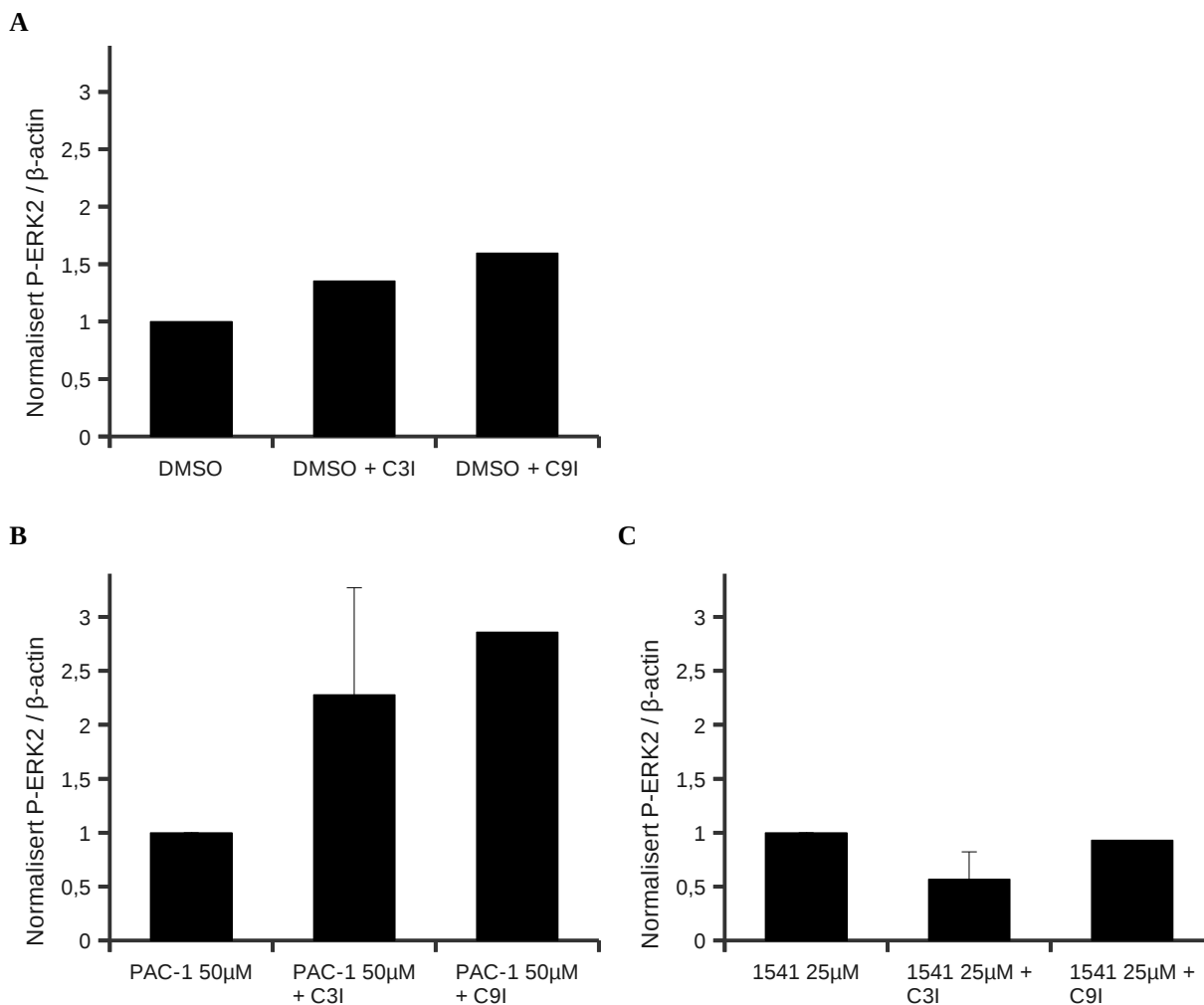
Eksposering	Normalisert P-ERK2/ β -actin	Feilfelt	Normalisert P-ERK2/ERK2	Feilfelt	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet (Ub)	1	-	1	-	2
DMSO (0,5 %)	0,80	-	0,74	-	1
PAC-1 (25 μ M)	0,44	-	1,03	-	1
PAC-1 (50 μ M)	0,65	0,23	0,56	0,32	2
1541 (25 μ M)	1,12	0,09	0,72	0,76	2

A**B****C****Figur 3.25a-c: EGF viser tendens til økning av P-ERK i celler eksponert med PAC-1.**

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 4 timer med PAC-1 (50 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) eller MEK-inhibitor (10 μ M). Til kontroll ble det brukt celler tilsatt DMSO alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) eller MEK-inhibitor (10 μ M). Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til P-ERK2 og β -actin målt i antall pixler. Resultatene er vist som normalisert gjennomsnitt av P-ERK2/ β -actin ratio med SEM (n=3) (Der antall forsøk er 1 er ikke SEM oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i P-ERK2 i forhold til (B) PAC-1 alene eller (C) 1541 alene ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.18: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.25a-c

Eksposering	Normalisert P-ERK2/ β -actin	\pm SEM	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,5 %)	1	-	1
DMSO (0,5 %) + EGF (5 ng/ml)	1,10	-	1
DMSO (0,5 %) + MEKI (10 μ M)	1,05	-	1
PAC-1 (50 μ M)	1	-	3
PAC-1 (50 μ M) + EGF (5 ng/ml)	3,12	1,39	3
PAC-1 (50 μ M) + MEKI (10 μ M)	0,94	0,39	3
1541 (25 μ M)	1	-	3
1541 (25 μ M) + EGF (5 ng/ml)	0,50	0,18	3
1541 (25 μ M) + MEKI (10 μ M)	0,61	0,30	3



Figur 3.26a-c: Caspaseinhibitorer viser tendes til økning av P-ERK i celler eksponert med PAC-1.

Kyllingkorncellene ble eksponert på DIV 3 i 4 timer med PAC-1 (50 µM) og 1541 (25 µM) alene eller i kombinasjon med caspase-3-inhibitor (1 µM) eller caspase-9-inhibitor (10 µM). Til kontroll ble det brukt celler tilsatt DMSO alene eller tilsatt caspase-3-inhibitor (1 µM) eller caspase-9-inhibitor (10 µM). Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til P-ERK2 og β-actin målt i antall pixler. Resultatene er vist som normalisert gjennomsnitt av P-ERK2/β-actin ratio med SEM (n=3) (Der antall forsøk er 1-2 er ikke SEM oppgitt). Det var ingen signifikant forskjell i P-ERK2 i forhold til (B) PAC-1 alene eller (C) 1541 alene ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.19: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.26a-c

Eksposering	Normalisert ratio P-ERK2/β-actin	±SEM	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,5 %)	1	-	1
DMSO (0,5 %) + C3I (1 µM)	1,36	-	1
DMSO (0,5 %) + C9I (10 µM)	1,60	-	1
PAC-1 (50 µM)	1	-	3
PAC-1 (50 µM) + C3I (1 µM)	2,28	0,99	3
PAC-1 (50 µM) + C9I (10 µM)	2,86	-	2
1541 (25 µM)	1	-	3
1541 (25 µM) + C3I (1 µM)	0,57	0,25	3
1541 (25 µM) + C9I (10 µM)	0,93	-	2

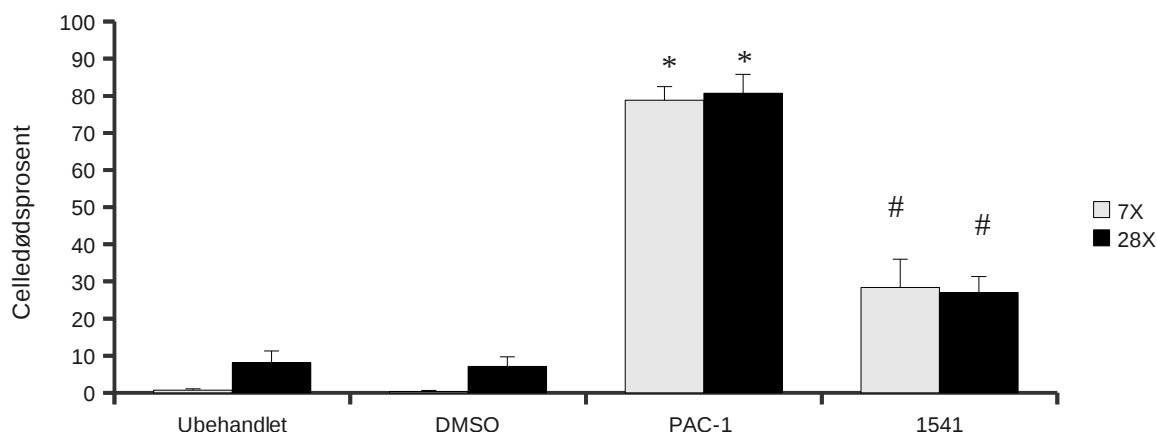
3.4 IKKE-PROLIFERERENDE PC12-CELLER EKSPONERT FOR PAC-1 ELLER 1541

PC12-celler splittet med celletetthet 28×10^4 celler/ml, blir raskt konfluente og proliferasjon blir undertrykket. Sinkdeprivasjon har vist å hemme celleproliferasjon i gjennom cellesyklusarrest i tillegg til å indusere caspaseavhengig apoptose (Adamo et al. 2010). Siden PAC-1 chelaterer sink er det mulig at celledød induisert av PAC-1 ikke bare påvirker caspaseaktivering, men at døden også kan skyldes forstyrrelser av cellesyklus. Ved bruk av ikke-prolifererende celler kan effekter av celledød induisert av PAC-1 og 1541 undersøkes uavhengig av effekter på cellesyklus.

3.4.1 Celledød i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541

PC12-celler med celletetthet 28×10^4 celler/ml ble eksponert med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M). Ubehandlete celler og celler tilsatt DMSO ble brukt som kontroll. Tilsvarende ble også gjort i prolifererende PC12-celler med celletetthet 7×10^4 celler/ml for å få en avhengig sammenlikning. Cellene ble eksponert i 24 timer og deretter farget med trypanblå og telt i mikroskop. Celledød ble beregnet i prosent.

Resultatene viste signifikant økt i celledød induisert av PAC-1 og 1541 for både prolifererende og ikke-prolifererende celler sammenliknet med kontrollbehandlingene (figur 3.27 og tabell 3.20).



Figur 3.27: PAC-1 og 1541 induserer celledød i ikke-prolifererende PC12-celler tilsvarende som i prolifererende PC12-celler.

PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering i 24 timer med PAC-1 (100 μM) og 1541 (25 μM). Til kontroll ble det brukt ubehandlede celler og celler eksponert med DMSO. Celledøden ble kvantifisert ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop. Figuren viser celledød oppgitt som prosent i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=3-4). * angir signifikant forskjell i celledød mellom PAC-1 og ubehandlet, # angir signifikant forskjell i celledød mellom 1541 og DMSO ($P < 0,05$, t-test).

Tabell 3.20: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.27

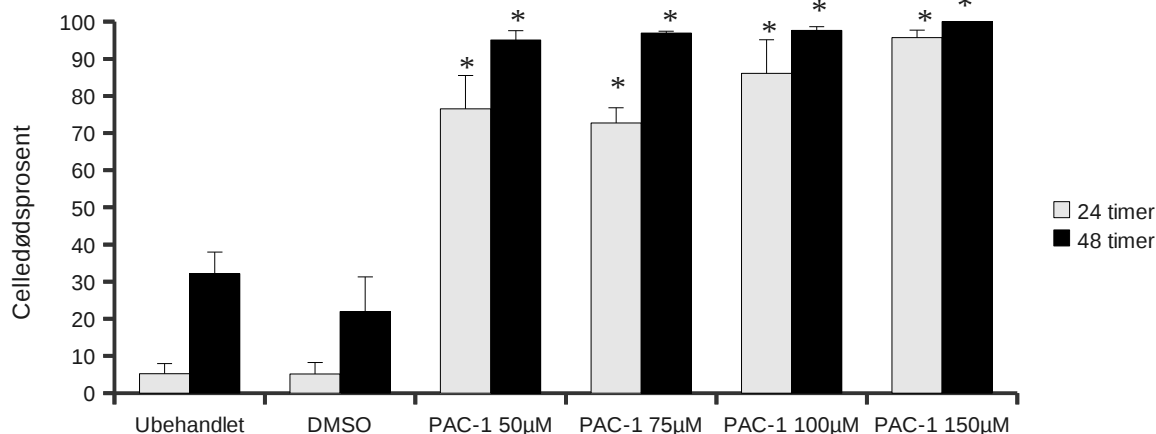
Eksposering	Celledødsprosent 7 x celletetthet (7X)	\pm SEM	Celledødsprosent 28 x celletetthet (28X)	\pm SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	0,72	0,36	8,16	3,12	3
DMSO (0,5 %)	0,40	0,29	7,09	2,58	4
PAC-1 (100 μM)	78,81	3,69	80,72	5,08	3
1541 (25 μM)	28,40	7,58	27,05	4,26	4

3.4.2 Celledød i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert i 24 eller 48 timer for ulike konsentrasjoner av PAC-1 og 1541

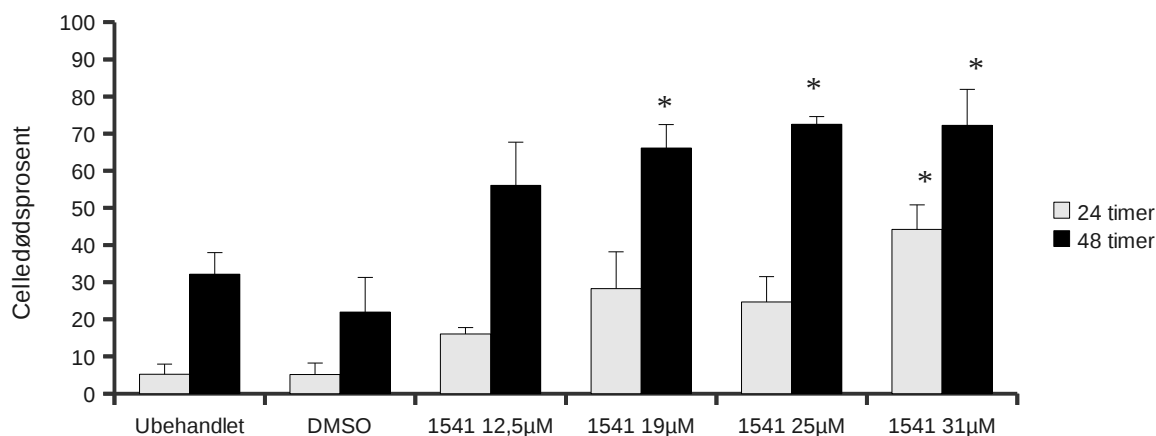
Tilsvarende som for prolifererende PC12-celler var det for ikke-prolifererende PC12-celler også interessant å undersøke effekter på celledød ved ulike konsentrasjoner av PAC-1 og 1541 eksponert i 24 eller 48 timer.

PC12-celler med celletetthet 28×10^4 celler/ml ble eksponert i 24 eller 48 timer for en konsentrasjonsrekke med PAC-1 (50 μM , 75 μM , 100 μM og 150 μM) og en konsentrasjonsrekke med 1541 (12,5 μM , 19 μM , 25 μM , 31 μM). Ubehandlete celler og celler tilsatt DMSO ble brukt som kontroll. Tilsvarende ble også gjort i prolifererende PC12-celler med celletetthet 7×10^4 celler/ml for å få en avhengig sammenlikning (avsnitt 3.1.2). Cellene ble farget med trypanblå og telt i mikroskop. Celledød ble beregnet i prosent.

Resultatene viste signifikant økt celledød ved økende konsentrasjon av PAC-1 sammenliknet med ubehandlet kontroll (figur 3.28 og tabell 3.21). For celler eksponert med 1541 ga økt konsentrasjon ved lengre eksponeringstid signifikant økt celledød sammenliknet med DMSO (figur 3.29 og tabell 3.21). Celledøden så ut til å øke med eksponeringstid for både PAC-1 og 1541. Disse observasjonene er tilsvarende som vist for prolifererende PC12-celler i avsnitt 3.1.2.



Figur 3.28: Konsentrasjonsrekke for PAC-1 viser økt celledød ved økende konsentrasjon og eksponeringstid. PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering med PAC-1 i ulike konsentrasjoner. Celledøden ble målt ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop 24 eller 48 timer etter eksponering. Figuren viser celledød oppgitt som prosent i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=3). * angir signifikant forskjell i celledød i forhold til ubehandlet ($P < 0,05$, one-way ANOVA).



Figur 3.29: Konsentrasjonsrekke for 1541 viser økt celledød for økte konsentrasjoner ved lengre eksponeringstid. PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering med 1541 i ulike konsentrasjoner. Celledøden ble målt ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop 24 eller 48 timer etter eksponering. Figuren viser celledød oppgitt som prosent i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt med SEM (n=3). * angir signifikant forskjell i celledød i forhold til DMSO ($P < 0,05$, one-way ANOVA).

Tabell 3.21: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.28 og 3.29

Eksposering	Celledødsprosent 24 timer	±SEM	Celledødsprosent 48 timer	±SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	5,23	2,68	31,13	5,85	3
DMSO (0,5 %)	5,16	3,04	21,92	9,39	3
PAC-1 (50 µM)	76,54	8,99	95,09	2,50	3
PAC-1 (75 µM)	72,70	4,11	96,91	0,52	3
PAC-1 (100 µM)	86,11	9,01	97,68	1	3
PAC-1 (150 µM)	95,71	2,01	100	0	3
1541 (12,5 µM)	16,08	1,69	56,08	11,60	3
1541 (19 µM)	28,30	9,84	66,15	6,29	3
1541 (25 µM)	24,67	6,84	72,50	2,10	3
1541 (31 µM)	44,20	6,66	72,25	9,68	3

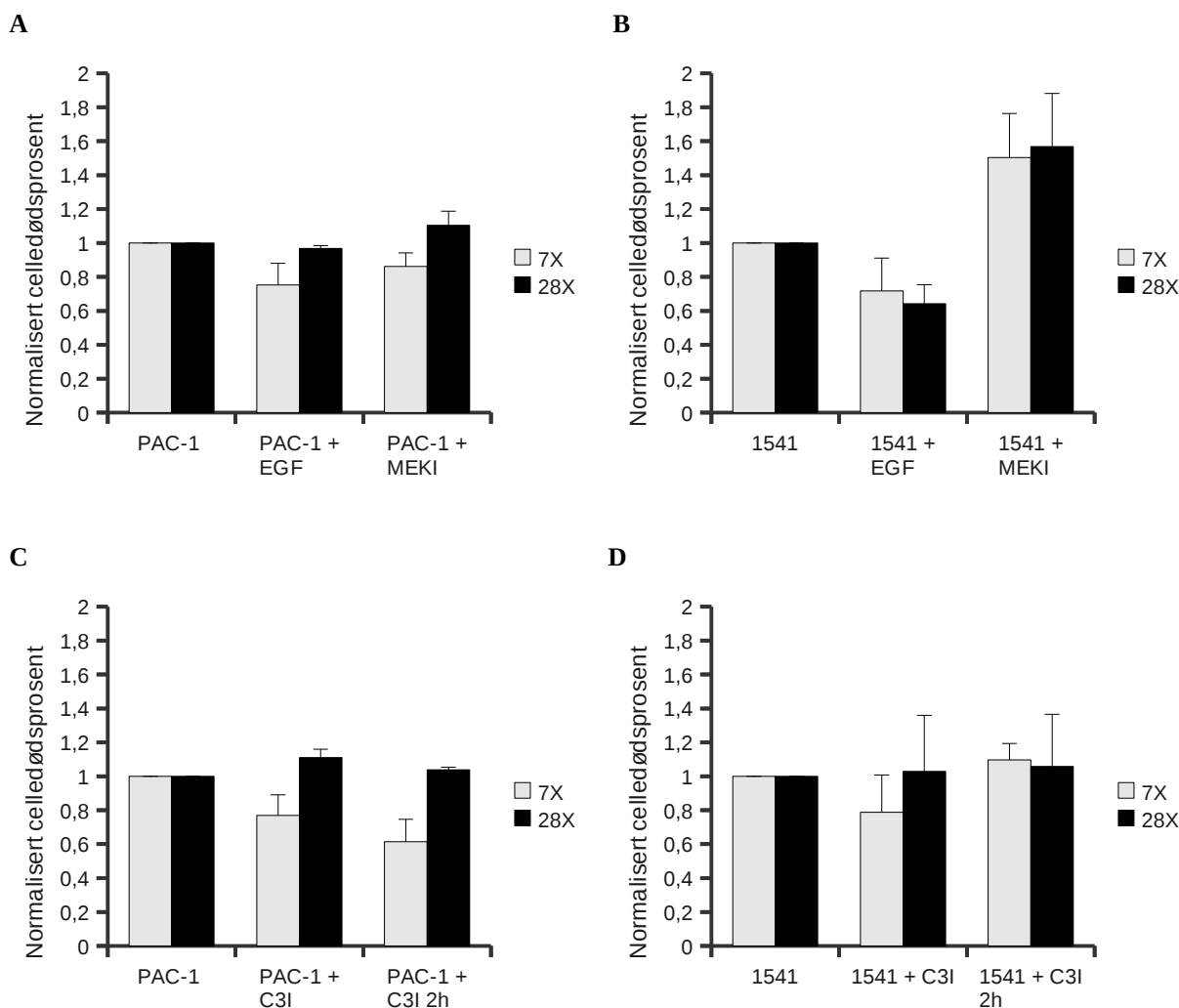
3.4.3 Effekt av EGF, MEK-inhibitor eller caspase-3-inhibitor i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541

Det var ønskelig å undersøke om EGF og caspase-3-inhibitor kunne beskytte mot celledød og om MEK-inhibitor vil kunne øke celledød induisert av PAC-1 og 1541 i ikke-prolifererende PC12-celler. Tilsetning av caspase-3-inhibitor i prolifererende PC12-celler på et senere tidspunkt etter PAC-1 eksponering har vist å gi beskyttelse mot celledød så det var interessant å undersøke om dette gjelder også for ikke-prolifererende PC12-celler (Bjørndal 2010).

PC12-celler med celletetthet 28×10^4 celler/ml ble eksponert med PAC-1 (100 µM) og 1541 (25 µM) alene eller i kombinasjon med EGF, MEK-inhibitor eller caspase-3-inhibitor tilsatt 0 eller 2 timer etter eksponering. Ubehandlete celler og celler tilsatt DMSO ble brukt som kontroll.

Tilsvarende ble også gjort i prolifererende PC12-celler med celletetthet 7×10^4 celler/ml for å få en avhengig sammenlikning. Cellene ble eksponert i 24 timer og deretter farget med trypanblå og telt i mikroskop. Celledød ble beregnet i prosent, men på grunn av stor spredning mellom forsøkene ble resultatene normalisert med hensyn på prosent celledød induisert av DMSO, PAC-1 og 1541 alene.

Resultatene viste tendens til reduksjon av celledød ved tilsetning av EGF og økt celledød ved tilsetning av MEK-inhibitor både for ikke-prolifererende og prolifererende PC12-celler sammenliknet med 1541 alene, men i forhold til PAC-1 var ikke disse effektene like tydelige (figur 3.30a-b og tabell 3.22). Caspase-3-inhibitor tilsatt etter 0 og 2 timer viste tegn til reduksjon i celledød sammenliknet med PAC-1 i prolifererende PC12-celler, men ikke i forhold til 1541. Tilsetning av caspase-3-inhibitor i ikke-prolifererende PC12-celler reduserte ikke celledød sammenliknet med PAC-1 eller 1541 alene (figur 3.30c-d og tabell 3.22).



Figur 3.30a-d: EGF synes å redusere og MEK-inhibitor synes å øke celledød induisert av 1541 i PC12-celler uavhengig av prolifererende evne. Caspase-3-inhibitor synes å redusere celledød induisert av PAC-1 bare i prolifererende PC12-celler.

PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering i 24 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml), MEK-inhibitor (10 μ M) eller caspase-3-inhibitor (1 μ M) tilsatt 0 eller 2 timer etter eksponering. Celledøden ble målt ved farging av cellene med trypanblå og telling i mikroskop. Figuren viser celledød oppgitt som prosent i forhold til det totale antallet celler. (Celledødsprosenten for PAC-1 og 1541 er gitt i figur 3.27). Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt med SEM (n=3). Det var ingen signifikant forskjell i celledød i forhold til PAC-1 alene (A og C) og 1541 alene (B og D) ($P < 0,05$, Kruskal-Wallis one-way ANOVA on Ranks).

Tabell 3.22: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.30a-d

Eksposering	Normalisert celledødsprosent 7 x celledetthet (7X)	±SEM	Normalisert celledødsprosent 28 x celledetthet (28X)	±SEM	Antall uavhengige forsøk
PAC-1 (100 µM)	1	-	1	-	3
PAC-1 (100 µM) + EGF (5 ng/ml)	0,75	0,13	0,97	0,02	3
PAC-1 (100 µM) + MEKI (10 µM)	0,86	0,08	1,10	0,08	3
PAC-1 (100 µM) + C3I (1 µM)	0,77	0,12	1,11	0,05	3
PAC-1 (100 µM) + C3I (1 µM) 2timer	0,61	0,13	1,04	0,02	3
1541 (25 µM)	1	-	1	-	3
1541 (25 µM) + EGF (5 ng/ml)	0,72	0,19	0,64	0,11	3
1541 (25 µM) + MEKI (10 µM)	1,50	0,26	1,57	0,31	3
1541 (25 µM) + C3I (1 µM)	0,79	0,22	1,03	0,33	3
1541 (25 µM) + C3I (1 µM) 2 timer	1,10	0,10	1,06	0,31	3

3.4.4 P-ERK og ERK2 i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert for PAC-1 eller 1541

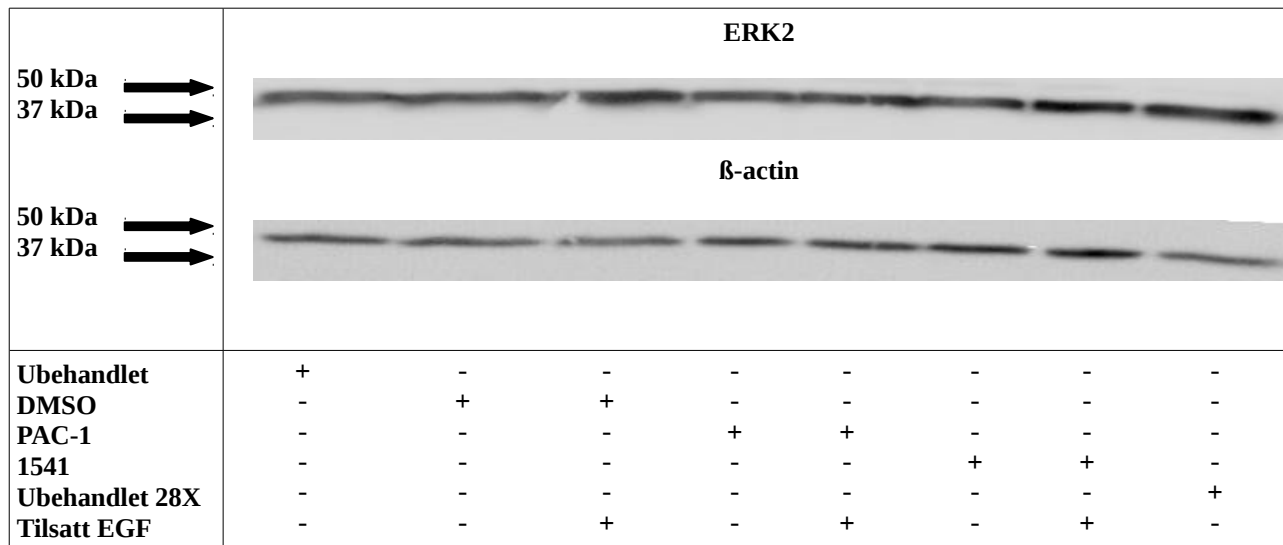
I avsnitt 3.4.3 ble vist tendens til at EGF reduserer og MEK-inhibitor øker celledød, samt at caspase-3-inhibitor ikke reduserer celledød i ikke-prolifererende PC12-celler. Det var derfor interessant å undersøke om mengden P-ERK og ERK2 ville kunne påvirkes av PAC-1 og 1541 i ikke-prolifererende PC12-celler siden mekanismene i prolifererende PC12-celler (avsnitt 3.3.1) og ikke-prolifererende PC12-celler kan være forskjellige.

PC12-celler med celledetthet 28×10^4 celler/ml ble eksponert i 4 timer med PAC-1 (100 µM) og 1541 (25 µM) alene eller i kombinasjon med EGF. Ubehandlete celler og celler tilsatt DMSO med eller uten EGF ble brukt som kontroll. Tilsvarende ble også gjort i prolifererende PC12-celler med celledetthet 7×10^4 celler/ml for å få en avhengig sammenlikning. I alle forsøkene ble β -actin brukt som en intern kontroll på proteinmengden i prøvene.

PERK ga ingen synlige proteinbånd i prøvene fra ikke-prolifererende celler og i prolifererende celler ble bånd bare observert i prøver tilsatt EGF. Derfor er kun blott for ERK2 vist (figur 3.31 og 3.32).

Resultatene viste ingen signifikant reduksjon av ERK2 i ikke-prolifererende celler eksponert for PAC-1 eller 1541 sammenliknet med ubehandlet. Tilsvarende ble observert for prolifererende PC12-celler (figur 3.33 og tabell 3.23) og avsnitt 3.3.1.

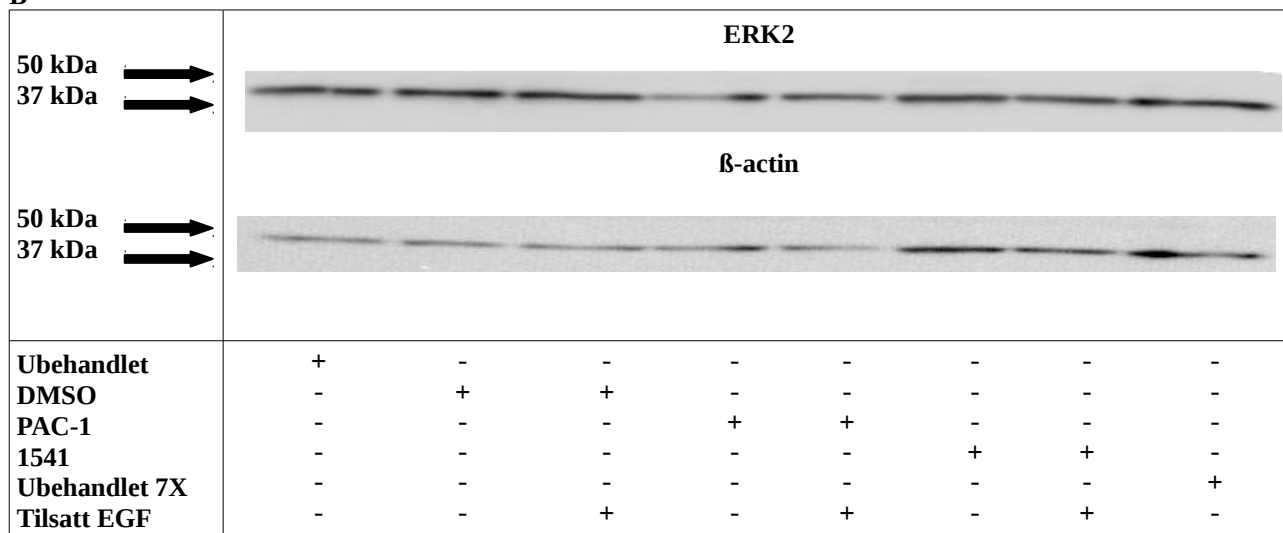
A



Figur 3.31: Westernblott PC12-celler med celletetthet 7×10^4 celler/ml

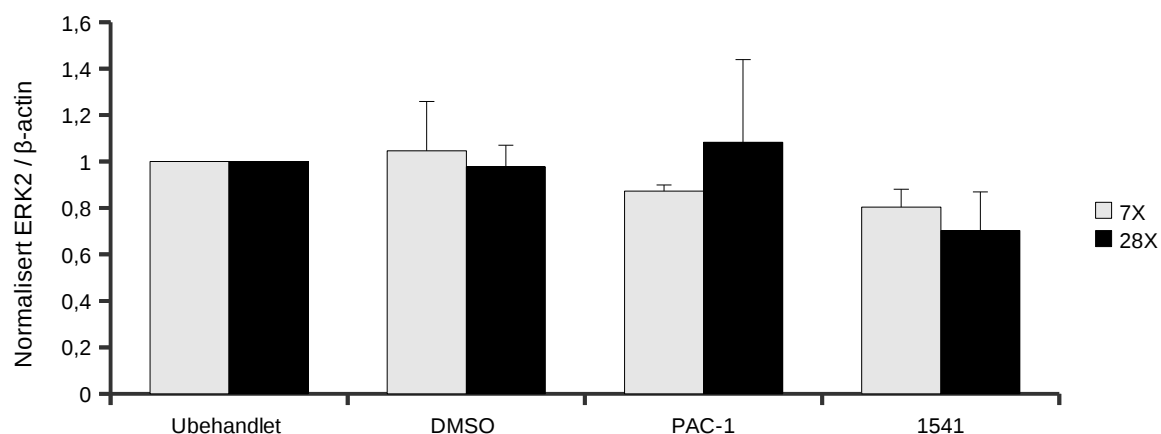
PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml). DMSO alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) og ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Membranen ble påsatt P-ERK1/2 antistoff, deretter ERK2 antistoff og til sist β -actin antistoff. Westernbåndene viser ERK2 med molekylvekt 42 kDa og β -actin med molekylvekt 42 kDa.

B



Figur 3.32: Westernblott PC12-celler med celletetthet 28×10^4 celler/ml

PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100 μ M) og 1541 (25 μ M) alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml). DMSO alene eller tilsatt EGF (5 ng/ml) og ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Membranen ble påsatt P-ERK1/2 antistoff, deretter ERK2 antistoff og til sist β -actin antistoff. Westernbåndene viser ERK2 med molekylvekt 42 kDa og β -actin med molekylvekt 42 kDa.



Figur 3.33: PAC-1 eller 1541 reduserer ikke ERK2 verken i prolifererende eller ikke-prolifererende PC12-celler. PC12-cellene ble dyrket i 48 timer før eksponering i 4 timer med PAC-1 (100µM) eller 1541 (25µM). Ubehandlede celler eller celler tilsatt DMSO ble brukt som kontroll. Figuren viser styrken på proteinbåndene fremstilt som ratioen mellom båndstyrkene til ERK2 og β-actin målt i antall pixler. Resultatene er oppgitt som normalisert gjennomsnitt av ERK2/β-actin ratio med SEM (n=3) Det var ingen signifikant forskjell i ERK2 i forhold til ubehandlet (P< 0,05, Kruskal-Wallis one way ANOVA).

Tabell 3.23: Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.33

Eksposering	Normalisert ERK2/β-actin 7 x celletetthet (7X)	±SEM	Normalisert ERK2/β-actin 28 x celletetthet (28X)	±SEM	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	1	-	1	-	3
DMSO (0,5 %)	1,05	0,21	0,98	0,09	3
PAC-1 (100 µM)	0,87	0,03	1,08	0,36	3
1541 (25 µM)	0,80	0,08	0,70	0,17	3

4. DISKUSJON

4.1 DISKUSJON AV METODER

4.1.1 Cellemodeller

I dette arbeidet ble det gjort studier på apoptosesignalveier ved bruk av prolifererende og ikke-prolifererende PC12-celler og kornceller fra kylling. PC12-celler er en kontinuerlig kreftcellelinje avledet fra feokromocytom i rottebinyremarg og ved ordinære vekstforhold uttrykker disse cellene egenskaper tilsvarende umodne adrenale kromaffinceller (Adler et al. 2006). PC12-cellene kan differensieres til å etterlikne sympatiske nevroner ved stimulering med NGF (Adler et al. 2006), men i dette arbeidet er det kun benyttet udifferensierte PC12-celler. Kornceller fra kylling er et alternativ til kornceller fra rotte som er en godt etablert modell til studier av nevronal differensiering og celledød (Jacobs et al. 2006). Kyllingkornceller har den fordel at de kan dyrkes i fysiologiske konsentrasjoner av kalium og dermed etterlikne fysiologiske forhold og opprettholde normal nevronaktivitet som i lillehjernen. Rottekornceller er derimot avhengig av en høy kaliumkonsentrasjon for å oppnå normal eksiterbarhet av NMDA-reseptor, noe som er vist å være essensielt for differensiering og overlevelse i korncellenevroner (Contestabile 2002). Bruk av kornceller fra kylling krever heller ikke tillatelse til dyrehold da eggene kan ruges i rugemaskin.

Klonede cellelinjer som PC12-celler har den fordel at cellepopulasjonen er mer homogen enn primærkulturer fra kylling som er høstet fra kyllingfostre med ulikt genetisk materiale. PC12-celler er også enkle å dyrke og er tilpasset livet i cellekultur der de kan vokse og splittes videre mange år imotsetning til primærkulturer som for hver gang må høstes fra dyr, prepareres og dyrkes i en kultur der levetiden er kort (Adler et al. 2006). Dette gjør PC12-celler til en mer reproducerbar cellemodell sammenliknet med primærkulturer fra kyllingkornceller. En ulempe med PC12-celler er at de over lang tid i kultur vil kunne miste sine originale nevronliknende egenskaper og bli mer lik kreftceller (Adler et al. 2006). Cellene brukt i dette arbeidet ble derfor erstattet med PC12-celler fra en ny stock etter omtrent 50 passasjer. Nyopptatte PC12-celler kan dermed tenkes å ha noe høyere sensitivitet mot ulike typer dødsstimuli enn gamle PC12-celler der apoptosesignalveiene kan på grunn av mer kreftcelleliknende egenskaper og mutasjoner være mer motstandsdyktige. Primærcelekkulturer fra korncellenevroner har fordelen at de bedre enn PC12-celler kan gjenspeile forhold *in vivo*. Fordelen med å drive forskningsarbeid med både primær- og sekundærcelekkulturer er at ulemper med den ene cellemodellen kan oppveies av fordeler med den andre cellemodellen.

PC12-celler og kyllingkornceller er tidligere benyttet som cellemodeller i studier av PAC-1 (Putt et al. 2006; Aziz et al. 2010). Det er kjent at PC12-celler kan brukes som modell i studier av nevronal apoptose (Pittman et al. 1993). Apoptose i PC12-celler kan medieres via caspase-3, noe som også gjør PC12-celler egnet som cellemodell til studier på kreftceller (Zou et al. 2002; Kim et al. 2008). Kyllingkorncellene er umodne nevroner og uttrykker procaspase-3 i høyere grad enn modne nevroner (Madden and Cotter 2008). Caspase-3 spiller en sentral rolle i utviklingen av nervesystemet og det er vist at caspase-3 aktiveres av apoptotisk stimuli i disse cellene (Jacobs et al. 2006). Kyllingkornceller er også en interessant modell til å studere effekt av toksisk stimuli på nerveceller.

4.1.2 Metoder for kvantifisering av celledød

Det finnes flere måter å måle celledød på avhengig hvilke steder i celledødsprosessen man ønsker å kvantifisere død. Det er vanlig å måle celledød ut i fra morfologiske endringer, økt membranpermeabilitet eller økt mitokondrieaktivitet (Aras et al. 2008). Farging med trypanblå ble benyttet i dette arbeidet og baseres på prinsippet om økt membranpermeabilitet. Trypanblå er et hydrofilt stoff som ikke vil kunne gå gjennom en normal cellemembran, men er membranen skadet vil stoffet trenge inn og farge cellen blå. Ved bruk av lysmikroskop ville fargede og ufargede celler kunne skilles fra hverandre og de fargede cellene antas som døde siden levende celler har intakte cellemembraner (Aras et al. 2008). Kvantifisering av døde celler må gjøres manuelt og er en tidkrevende prosess, men samtidig nyttig da det også vil gi morfologisk informasjon om cellene. Morfologisk informasjon er viktig for å kunne kvantifisere riktig celletype i cellekulturer som ikke er homogene slik som tilfellet er for kyllingkorncellene. Kvantifisering av celledød med trypanblå er derfor en god metode både i PC12-celler og kyllingkornceller. En ulempe med denne metoden er at det gjøres en subjektiv vurdering. Ublindet kvantifisering og ulike operatører kan medføre konfunderende faktorer som øker usikkerheten i resultatet. Over- eller underestimering av celledød kan forekomme blant annet ved fargede fremmedlegemer i skålen som ser ut som døde celler, celler som faller av skålen og dårlig farging (Ying et al. 2000). Farging av døde celler med propidium iodid er en alternativ metode til trypanblåfarging. Metoden krever ikke manuell telling av celler siden celledøden i tillegg til observasjon i fluorescensmikroskop også kan avleses ved fluorescens og dermed gi mulighet for raske og repeterte målinger av celledød over tid. Denne metoden er likevel ikke foretrukket da den er kostbar og propidium iodid er potensielt mutagent (Aras et al. 2008).

Måling av mitokondrieaktivitet er en indirekte måte å kvantifisere celledød på og blir sett på som en mer sensitiv metode da den viser abnormaliteter tidligere i celledødsprosessen. Metoden kan detektere døende celler som ikke ville blitt farget med trypanblå da cellemembran fortsatt kan være intakt. Mitokondrieaktivitet måles ved MTT-assay der redokspotensialet i cellen måles ved at dehydrogenase omdanner MTT-reagenset til et produkt som kan avleses med fluorescens ved 570 nm. En ulempe med MTT-assay er at cellene kan gjenvinne mitokondrieintegritet og celledøden vil kunne overestimere (Aras et al. 2008). Alternativt kunne MTT-assay og trypanblåfarging blitt brukt sammen da man ivaretar biokjemiske og morfologiske kjennetegn for celledød, men siden MTT-reagenset er vist å være toksisk i PC12-celler var det ikke aktuelt i dette arbeidet (Hertel et al. 1996).

4.1.3 Metoder til studering av proteiner involvert i celledød

Westernblotting er en allsidig og anerkjent metode til detektering, karakterisering og kvantifisering av proteiner i komplekse blandinger (Tovey et al. 1987). Bruk av denne metoden bidrar til informasjon om signalveier i celler og var derfor viktig i dette arbeidet. Siden samme membran kan reprobere flere ganger gir det muligheten til å studere ulike proteiner i samme celleprøve, noe som er viktig for sammenlikning av resultatene. En stor ulempe i dette arbeidet har vært at proteinene som skal studeres (P-ERK, ERK2 og β -actin) har samme molekylvekt. Det er da mulighet for at antistoffene ikke blir fjernet ved strippeprosedyren og vil dermed kunne forstyrre deteksjonen. Det ble forsøkt å ta hensyn til dette ved å probe antistoff med høy deteksjonsgrense først da dette krever et mer følsomt fremkallingsreagens. Dette viste seg å kunne hindre forstyrrelser i deteksjonen av antistoff med lavere deteksjonsgrense siden disse krever et mindre følsomt fremkallingsreagens. Det ble utført forsøk som viste at P-ERK i PC12-celler ikke forstyrrer deteksjonen av ERK2. Dette ble ikke forsøkt i kyllingkorncellene noe som gjør kvantifiseringen av ERK2 usikker. Siden fremkalling av alle antistoffene brukt i kyllingkorncellene ble gjort med mindre følsomme fremkallingsreagenser ble det testet at resterende β -actin ikke ga deteksjon etter stripping. Caspase-3 kløyver mange proteiner i cellen og dette gjør det vanskelig å finne en internstandard som ikke påvirkes av caspaseaktivatorene PAC-1 og 1541. I dette arbeidet ble det derfor brukt to internstandarder, ERK2 og β -actin, for å få et bedre estimat av P-ERK.

Det ble i dette arbeidet forsøkt å detektere caspaseaktivering enten ved westernblotting med spesifikke antistoffer mot caspase-3 og caspase-9 eller ved måling av caspaseaktivitet med fluorescerende caspasesubstrat. Bruk av antistoffer viste seg å være problematisk og kun bånd for procaspase-3 i PC12-celler ble detektert. Det kan være problematisk å få detektert proteiner med westernblott i kyllingkornceller siden antistoffene som brukes ikke er kyllingspesifikke. Måling av caspaseaktivitet med caspaseassay er heller ikke uproblematisk da det er vist overlappende spesifisitet av substrater og inhibitorer for ulike caspaser. Dette kommer av at initiatorcaspasene og effektorcaspasene har liknende peptidsekvenser i subenhetene og det er derfor vanskelig for peptidbaserte substrater og inhibitorer å få en selektiv interaksjon med en type caspase i et miljø der flere andre caspaser er aktive (McStay et al. 2008; Pereira and Song 2008). Det er også vist at metoder som utelukkende avhenger av kløyving av caspasesubstrat kan underestimere caspaseaktivitet grunnet fraksjonert isolering av caspasene i caspaseassaykitet. Det er også blitt observert samlokalisering av endogene hemmere av caspaser som XIAP sammen med kløyvde caspaser (Kottke et al. 2002).

4.2 DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN

4.2.1 PAC-1 og 1541 induserer celledød

PAC-1 og 1541 ga økt celledød i PC12-celler og kyllingkornceller. At PAC-1 og 1541 induserte celledød stemmer overens med det som i den originale utprøvingen ble demonstrert for PC12-celler eksponert for PAC-1 og andre kreftcellelinjer eksponert for 1541 (Putt et al 2006; Wolan et al. 2009). Tidligere masteroppgaver har også vist samme resultater for PAC-1 (Rimul, 2007; Lindland-Tjønn 2009; Bjørdal 2010). PAC-1 ble lansert som en direkte aktivator av caspase-3, men senere studier viste at PAC-1 også induserte død i MCF-7 celler som ikke uttrykker procaspase-3 (Putt et al. 2006; Denault et al. 2007). Som respons på dette ble en alternativ virkningsmekanisme foreslått der PAC-1 aktiverer procaspase-3 gjennom å chelatere hemmende sinkioner (Peterson et al. 2009a). Sink spiller en essensiell rolle i den cellulære homeostasen og det er ikke klarlagt hvilke andre effekter PAC-1 kan ha med hensyn på dette. 1541 er rapportert å være en mer spesifikk aktivator av caspase-3 enn PAC-1 ved at stoffet interagerer direkte med det katalytiske domenet på procaspasen og stabiliserer en aktiv konformasjon av enzymet (Wolan et al. 2009; Zorn and Wells et al. 2010).

Det ble observert en økt i toksisitet i PC12-celler ved eksponering med lavere konsentrasjoner av PAC-1 over lengre tid, noe som også er vist før (Aziz et al. 2010). 1541 viste tendens til høyere celledød ved lengre eksponeringstid noe som var overraskende siden det tidligere har blitt vist at 1541 gir rask nedgang i cellulær viabilitet (Wolan et al. 2009). Kyllingkorncellene ble observert mer sensitive for PAC-1 og 1541 enn PC12-cellene, noe som står i tråd med tidligere funn for PAC-1 (Aziz et al. 2010; Bjørdal 2010). Høyere sensitivitet kan mulig forklares ved at kyllingkorncellene kan tenkes å ha høyere uttrykk av procaspase-3 enn PC12-cellene, ettersom de er umodne nevroner. PAC-1 har vist korrelasjon mellom sensitivitet og nivå av procaspase-3 og 1541 har vist lavere toksisitet i MCF-7 celler (Putt et al. 2006; Wolan et al. 2009). Måling av caspase-3-aktivitet tyder derimot på at staurosporin er en bedre aktivator av caspase-3 enn både PAC-1 og 1541 som ikke ga noe aktivitet over kontrollnivå verken i PC12-celler eller i kyllingkornceller. Dette er også observert i andre studier av PAC-1 (Moe 2010; Bjørdal 2010). Det ble heller ikke observert økt caspase-3-aktivitet i form av nedgang i intensitet i westernbånd for procaspase-3 i PC12-celler eksponert med PAC-1 eller 1541. Caspase-3-inhibitor økte heller ikke mengden procaspase-3. En mulig forklaring på dette kan være at siden PAC-1 ikke kan gå inn i cellekjernen (Peterson et al. 2009b), vil det fortsatt være en andel procaspase-3 som ikke er tilgjengelig for aktivering av PAC-1. Dermed vil mengden av procaspase-3 kunne gi et misvisende bilde av evnen PAC-1 har til å aktivere caspase-3. Forsøk utført i kyllingkornceller har vist at PAC-1 gir en økning av kløvet caspase-3 påvist med westernblott (Aziz et al. 2010).

Det er i rottekornceller vist at caspase-3-aktivitet og celledød ikke nødvendigvis gjenspeiler hverandre siden kun en liten aktivering av caspase-3 kreves for å gi celledød (Slagsvold et al. 2003). Det er observert at 1541 og staurosporin induserer celledød i samme grad selv om staurosporin gir en høyere caspaseaktivering (Wolan et al. 2009). En annen studie har imidlertid vist korrelasjon mellom caspase-3-aktivitet og celledød induert av PAC-1 i kyllingkornceller (Aziz et al. 2010). Indusert aktivering av caspase-3 ved PAC-1 og 1541 er avhengig av dose og for høye konsentrasjoner av PAC-1 og 1541 virker hemmende på aktiveringen (Peterson et al. 2009a; Wolan et al. 2009). Tidligere observasjoner har vist at eksponering med 25 μ M PAC-1 ga sterkere nedgang i westernbånd for procaspase-3 i rottekornceller enn ved eksponering med 100 μ M PAC-1 (Lindland-Tjønn 2009). I forsøk utført med ulike konsentrasjoner av PAC-1 og 1541 i PC12-celler ble det vist at celledød induert av PAC-1 økte med dosen til celledøden var fullstendig. Dette kan gi en mulig indikasjon på at PC12-celler eksponert med høye konsentrasjoner av PAC-1 dør av andre årsaker i tillegg til aktivering av caspase-3. For 1541 ga økt konsentrasjon tegn til økt

celledød, men observasjonene er tilknyttet en stor usikkerhet grunnet utfelling av 1541 i konsentrasjonsområdet 25 μ M. Flere forsøk vil måtte gjøres for å kunne avdekke om økt konsentrasjon av 1541 fører til økt celledød.

Teoretisk skal caspase-3-inhibitor redusere celledød induert av de rapporterte caspase-3-aktivatorene PAC-1 og 1541 i PC12-celler og kyllingkornceller. Caspase-3-inhibitor viste tendens til reduksjon av celledød induert av PAC-1 eller 1541 i PC12-cellene. Dette ble ikke observert i kyllingkorncellene, men siden både basaldøden og den induerte celledøden i kyllingkorncellene var høy kan det hende at cellene dør av flere årsaker. Hemming av caspase-3 er derfor kanskje ikke nok til å redusere døden. I tidligere funn med lavere basaldød og andre dyrkningsbetingelser er det vist at caspase-3-inhibitor reduserer celledød i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 (Aziz et al. 2010). Andre studier har vist reduksjon av celledød i PC12-celler og kyllingkornceller ved tilsetning av caspase-3-inhibitor på et senere tidspunkt etter eksponering med PAC-1 (Lindland-Tjønn 2009; Bjørdal 2010). I dette arbeidet ble denne trenden observert i PC12-celler for PAC-1 ved tilsetning av caspase-3-inhibitor 2 timer etter eksponering. PAC-1 har vist å også kunne aktivere caspase-7 (Peterson et al. 2009a). Tidligere studier av rottenevroner har vist at caspase-3 og caspase-7 oppreguleres av apoptotisk stimulus ved traume (Yakovlev et al. 2001; Larner et al. 2005). Hvis PAC-1 induerer en type apoptotisk stimulus som fører til oppregulering av caspase-3 og caspase-7 kan dette medføre sen caspaseaktivering og være en mulig forklaring på den sene effekten av caspase-3-inhibitor. 1541 viste ikke den samme trenden som PAC-1 ved senere tilsetning av caspase-3-inhibitor. Tilsetning av caspase-3-inhibitor kan forstyrre genereringen av ATP i apoptoseprosessen slik at den istedenfor går over i nekrose noe som kan ha påvirket resultatene (Earnshaw et al. 1999; Nicotera et al. 2004). 1541 har vist å også kunne aktivere caspase-6 (Wolan et al. 2009). Caspase-6 kan i likhet med caspase-3 kløyve essensielle proteiner i cellen som medfører apoptose (Chowdhury et al. 2008). Likheter mellom peptidsekvensene i effektorcaspasene kan gjøre det vanskelig å oppnå en spesifikk hemming i et miljø med mye aktiv caspase (Pereira and Song 2008).

4.2.2 Induserer PAC-1 og 1541 mer caspaseavhengig celledød i ikke-prolifererende celler?

PAC-1 virker ved å chelatere sink som er en endogen inhibitor av caspase-3 (Chimienti et al. 2001; Peterson et al. 2009a). Sink er et strukturelt element som spiller en viktig rolle i cellefysiologien og er vist å være essensiell for proliferasjon og differensiering i PC12-celler (Sánchez-Martín et al. 2010). Sink er viktig for DNA-syntese og mangel på sink har vist å gi hemming av nevronal prolifisering på grunn av cellesyklusarrest der overgang fra G1 til S-fase hindres (Wong et al. 2007; Adamo et al. 2010). Sinkmangel har også vist å kunne oppregulere p53 og dermed indirekte aktivere caspase-3 (Adamo et al. 2010). Dette gjør det interessant å studere virkningen av PAC-1 både i prolifererende celler og i ikke-prolifererende celler. Det er usikkert om 1541 har det samme potensialet til å chelatere sink som PAC-1. For å kunne få en bedre forståelse av de studerte effektene PAC-1 og 1541 har på celledød er dette absolutt interessant å undersøke.

Resultatene viste tegn til at PAC-1 ved lavere konsentrasjoner og 1541 har en høyere toksisitet ved eksponering over lengre tid i ikke-prolifererende PC12-celler. Celledøden i ikke-prolifererende PC12-celler og kyllingkornceller økte proporsjonalt med dosen av PAC-1, men dette var mindre tydelig for 1541. Det ble ikke observert reduksjon av celledød med caspase-3-inhibitor tilsatt samtidig eller 2 timer etter eksponering i ikke-prolifererende PC12-celler verken for PAC-1 eller 1541. Det var overraskende at hemming av caspase-3 ikke påvirket celledød induert av PAC-1 i ikke-prolifererende PC12-celler. Man skulle tro at i celler som ikke deler seg ville celledøden være resultat av en caspaseavhengig effekt upåvirket av den sinkdepriverende effekten på celledeling. Sink som finnes i cellen i dynamisk form har vist å kunne beskytte cellen mot oksidativt stress direkte ved å inngå som element i lipider og proteiner, eller indirekte gjennom effekter på den intracellulære antioksidanten glutation (Truong-Tran et al. 2001). Det kan dermed tenkes at celledød induert av PAC-1 i ikke-prolifererende celler også kan skyldes nedsatt cytoprotektivet i tillegg til økt caspaseaktivering. Nærmere undersøkelser kan bli gjort ved måling av ROS-aktivitet. Det hadde vært interessant å gjøre forsøk med tilsetning av sink for å se hvilken effekt det vil ha på celledød induert av PAC-1 og 1541. Det vil kunne gi informasjon om celledøden induert av 1541 er sinkavhengig og om nedsatt cytoprotektivet er årsak til celledød.

Sinkdeprivasjon kan også inducere apoptose via den mitokondrielle apoptosesignalveien og aktivering av caspase-9 (Adamo et al. 2010). Caspase-9-inhibitor viste ingen tegn til reduksjon av celledød induisert av PAC-1 og 1541 i kyllingkornceller eller prolifererende PC12-celler. Mangel på beskyttende effekt av caspase-9-inhibitor i kyllingkorncellene kan mulig forklares av høy celledød som nevnt i avsnitt 4.2.1. 1541 er tidligere vist å aktivere caspase-3 uavhengig av den mitokondrielle signalveien via caspase-9 og den ytre signalveien via caspase-8. En eventuell aktivering av caspase-9 vil dermed være på grunn av positiv feedback-loop fra caspase-3 på mitokondriene (Wolan et al. 2009). Siden caspase-9-inhibitor ikke reduserte celledød i prolifererende PC12-celler induisert av PAC-1 og 1541 kan det tyde på at det er lite caspase-3 som er aktivert som nevnt i avsnitt 4.2.1. Det hadde vært interessant å undersøke om tilsetning av caspase-9-inhibitor på et senere tidspunkt ville gi en reduksjon i celledød tilsvarende som det ble observert ved senere tilsetning av caspase-3-inhibitor (avsnitt 4.2.1).

4.2.3 EGF beskytter mot celledød induisert av PAC-1 og 1541

Resultatene viste tendens til reduksjon av celledød induisert av PAC-1 ved tilsetning av EGF i prolifererende PC12-celler, noe som også er vist tidligere (Bjørndal 2010). Dette ble ikke observert for PAC-1 i ikke-prolifererende PC12-celler. EGF viste reduksjon av celledød i PC12-celler eksponert med 1541 uavhengig av prolifererende evne. Det er kjent at EGF kan beskytte mot celledød gjennom aktivering av MEK/ERK-signalveien som blant annet regulerer transkripsjon av antiapoptotiske proteiner (Henson and Gibson 2006). MEK-inhibitor syntes å gi noe økt celledød der EGF viste reduksjon i PC12-celler eksponert med 1541, men denne effekten var mindre tydelig for PAC-1. EGF stimulerer også proliferasjon i PC12-celler gjennom en sterk og forbigående aktivering av ERK (Sasagawa et al. 2005). I de prolifererende PC12-cellene motvirker EGF den hemmende effekten sinkdeprivasjon har på celledeling. Dette kan mulig forklare hvorfor effekten av EGF og MEK-inhibitor ikke var så synlige i ikke-prolifererende PC12-celler eksponert med PAC-1. En annen forklaring kan være at celledøden i PC12-cellene ble observert høyere for PAC-1 enn for 1541 og at effektene av EGF og MEK-inhibitor er tydeligere ved lavere celledød.

Resultatene fra westernblott viste mulig korrelasjon mellom EGF og økt P-ERK i prolifererende PC12-celler da det kun ble observert bånd for P-ERK i celleprøver tilsatt EGF. 1541 viste tendens til å redusere P-ERK i prolifererende PC12-celler. Denne tendensen var ikke like tydelig for PAC-1, men det er tidligere vist at PAC-1 reduserer P-ERK i PC12-celler og at EGF motvirker denne effekten (Lindland-Tjønn 2009). Båndet for P-ERK var ikke detekterbart i ikke-prolifererende PC12-celler også for kontrollen tilsatt EGF. Dette kan kanskje tyde på at ikke-prolifererende PC12-celler har mindre P-ERK enn prolifererende PC12-celler, men det kan også forklares ved at deteksjonen av P-ERK i PC12-cellene generelt var liten på grunn av at bruken av antistoffet ikke var optimalisert.

I kyllingkornceller ble det ikke observert reduksjon i celledød induert av PAC-1 og 1541 ved tilsetning av EGF eller økning av celledød med MEK-inhibitor. Tidligere studier har vist at EGF kan redusere celledød i kyllingkornceller induert av PAC-1 under andre dyrkningsbetingelser (Bjørndal 2010). Det kan tenkes at effekten av EGF og MEK-inhibitor i kyllingkorncellene ikke kom frem i dette arbeidet på grunn av andre dyrkningsbetingelser og for høy celledød som nevnt i avsnitt 4.2.1. I kyllingkorncellene ble bånd for P-ERK påvist i alle prøvene og det ble observert en mulig reduksjon av P-ERK i celler eksponert med PAC-1 som ble reversert ved tilsetning av EGF. Samme tendenser har også blitt vist tidligere (Bjørndal 2010). 1541 syntes ikke å redusere P-ERK i kyllingkorncellene. Siden estimeringen av P-ERK var noe usikker er det behov for flere forsøk for å undersøke om EGF kan beskytte mot apoptotisk stimulus induert av PAC-1 og 1541.

4.2.4 "Crosstalk" mellom MEK/ERK-signalveien og caspaseskaskaden

Det er tidligere vist at EGF reduserer caspase-3-aktivitet induert av PAC-1 i prolifererende PC12-celler. (Rimul 2007). Dette underbygger hypotesen om at PAC-1 er en direkte aktivator av caspase-3, men det kjent at EGF kan oppregulere IAP'er som direkte hemmer flere caspaser enn bare caspase-3 (Deveraux et al. 1999; Henson and Gibson 2006). Det kan derfor tenkes at man med EGF ville ha sett en reduksjon i blant annet caspase-6, caspase-7 og caspase-9 aktivitet siden det er som nevnt i avsnitt 4.2.1 mulighet for at også disse caspasene direkte eller indirekte kan aktiveres av PAC-1 og 1541. EGF økte ikke procaspase-3 og MEK-inhibitor reduserte ikke procaspase-3 i prolifererende PC12-celler eksponert for PAC-1 og 1541, men siden verken PAC-1 eller 1541 påvirket procaspase-3 i disse forsøkene kunne det heller ikke forventes. For å prøve å få et bedre innblikk i hvilke caspaser som trolig er involvert i celledød induert av PAC-1 og 1541, hadde vært interessant å måle aktivitet eller mengde av de andre caspasene.

Inhibitorer av caspase-3 og caspase-9 syntes å øke mengden av P-ERK i kyllingkornceller. Dette kan tyde på at aktivering av caspase-3 og caspase-9 med PAC-1 påvirker P-ERK. Dette er også vist i rottekornceller tidligere (Lindland-Tjønn 2009). Caspase-3 kan redusere P-ERK ved å kløyve Raf-1 og KSR1 som er viktige proteiner i ERK-mediert overlevelsessignalering (Johnson et al. 2005; McKay and Morrison 2007). Det er også gjort funn som viser at caspase-3 kan kløyve selve ERK-proteinet (Marchetti et al. 2004). Verken PAC-1 eller 1541 reduserte ERK2 i PC12-celler og det ble ikke vist tegn til reduksjon i kyllingkornceller.

4.2.5 PAC-1 og 1541 som aktivatorer av caspase-3

Siden PAC-1 ble lansert i 2006 som en direkte aktivator av caspase-3, har denne virkningsmekanismen økt til å omfatte andre virkningsmekanismer grunnet sink-chelatering (Putt et al. 2006; Denault et al. 2007; Peterson et al. 2009a). Resultater presentert i denne oppgaven og i tidligere oppgaver har vist at den sink-chelaterende evnen PAC-1 har også går utover andre cellulære prosesser enn aktivering av caspase-3. 1541 syntes å ha liknende effekter i cellene som PAC-1 og har ikke vist seg som en mer spesifikk aktivator av caspase-3. "Crosstalk" mellom caspasekaskaden og MEK/ERK-signalveien gjør det vanskelig å spesifikt interagere med et potensielt target som caspase-3. Da PAC-1 ble testet som legemiddel mot kreft i mus og hos hunder ble det oppdaget at PAC-1 ga nevrotoksisitet (Peterson et al. 2010), noe som også ble vist i dette arbeidet da både PAC-1 og 1541 induserte celledød i nevroner. Det har blitt utviklet en ny kjemisk form av PAC-1, S-PAC-1, som ikke kan krysse blod-hjerne-barrieren (Peterson et al. 2010). Dette viser hvor viktig det er å forstå hvordan stoffer som PAC-1 og 1541 kan brukes både som verktøy i cellemodeller til studering av apoptoseregulering, og som mulige farmakologiske targets.

5. KONKLUSJON

- PC12-celler og kyllingkornceller er gode modeller til å studere celledød induisert av PAC-1 og 1541.
- PAC-1 og 1541 inducerer celledød i PC12-celler og kyllingkornceller, men døden synes også å være knyttet til andre prosesser i cellen enn caspaseaktivering.
- PAC-1 og 1541 er ikke effektive aktivatorer av caspase-3 siden de gir liten eller ingen økning i caspase-3-aktivitet og ikke reduserer procaspase-3.
- MEK/ERK-signalveien tyder på være involvert siden EGF reduserer og MEK-inhibitor synes å øke celledød induisert av PAC-1 og 1541.
- PAC-1 og 1541 synes å redusere fosforylering av ERK og tilsetning av EGF eller caspase-3-inhibitor ser ut til å kunne beskytte mot dette.

FORKORTELSER

Ad	Opp til
AIF	Apoptoseinduserende faktor
Apaf-1	Apoptoseaktiverende faktor-1
ADP/ATP	Adenosin difosfat/Adenosin trifosfat
Asp	Aspartat
Bak	Bcl-2-antagonist/killer
Bax	Bcl-2-assosiert X-protein
Bcl-2	B-celle leukemi/lymfom-2
Bcl-XL	B-celle lymfomliknende X
BH3	Bcl-2 homologi 3
Bid/t-Bid	BH3 interagerende dødsagonist/trunktert Bid
BIM	Bcl-2 liknende protein 11
BIR	Baculoviral IAP repeat
Caspase	Cystein-asparat-spesifikk-protease
DED	Dødseffektor prodomene
DIABLO	Direkte inhibitor av apoptose bindende protein med lav pI
DISC	Dødsinduserende kompleks
DIV	Dag <i>in vitro</i>
DNA	Deoxyribonuklease
EGF	Epidermal vekstfaktor
ERK/P-ERK	Ekstracellulær singalregulert kinase/ Fosforylert ERK
FADD	Fas-assosiert dødsdomene
Grb-2	Vekstfaktor-reseptorbindende protein-2
GDP/GTP	Guanosin difosfat/Guanosin trifosfat

IAP	Inhibitor av apoptose
kDa	Kilo dalton
mA	Milli ampere
MAPK	Mitogen-aktivert protein kinase
MEK	Mitogen-aktivert ERK kinase/protein kinase
MQ	Milli Q
NF-κB	Nukleær faktor-κB
NGF	Nerve vekstfaktor
PAC-1	Procaspase activating compound-1
PARP	Poly-ADP-ribose polymerase
PBS	Fosfatbufret saltvann
PUMA	p53 oppregulert modulator av apoptose
R ²	Multippel korrelasjonskoeffisient
RIPA	Radioimmunopresipitasjons assay
ROS	Reaktive oksygen substanser
SDS	Natrium dodecyl sulfat
SMAC	Second mitochondria-derived Activator of Caspases
SOS	"Son of Sevenless"
TF	Transkripsjonsfaktor
TRAIL	Tumor-nekrose-faktor relatert apoptoseinduserende ligand
XIAP	X-linket inhibitor av apoptose
(Z-DEVD) ₂ Rhodamine 110	(Z-Asp-Glu-Val-Asp) ₂ Rhodamine 110

REFERANSER

- Abdulghani, J. and El-Deiry, WS. (2010). Trail receptor signaling and therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**: 1091-1108.
- Adamo, A., Zago, M., Mackenzie, G. et al. (2010). The role of zinc in the modulation of neuronal proliferation and apoptosis. *Neurotoxicity Research* **17**: 1-14.
- Adler, EM., Gough, NR. and Blundon, JA. (2006). Differentiation of PC12 cells. *Sci. STKE* **2006**: tr9.
- Allan, LA., Morrice, N., Brady, S. et al. (2003). Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at thr 125 by ERK MAPK. *Nat. Cell Biol.* **5**: 647-654.
- Aras, MA., Hartnett, KA. and Aizenmann, E. (2008). Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* **44**: 7.18.1-7.18.15.
- Aziz, G., Akselsen, ØW., Hansen, TV. et al. (2010). Procaspase-activating compound 1 induces a caspase-3-dependent cell death in cerebellar granule neurons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **247**: 238-242.
- Beyersmann, D. and Haase, H. (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* **14**: 331-341.
- Bjørndal, MH. (2010). Caspase-3-avhengig celledød i PC12-celler og kyllingkornceller. Hovedfagsoppgave for graden Candidatus pharmaciae. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Blomgren, K., Leist, M. and Groc, L. (2007). Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis* **12**: 993-1010.
- Cagnol, S. and Chambard, J. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal* **277**: 2-21.

Chai, F., Truong-Tran, AQ., Ho, LH. et al. (1999). Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: a review. *Immunol. Cell Biol.* **77**: 272-278.

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

Chowdhury, I., Tharakan, B. and Bhat, GK. (2008). Caspases -- an update. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology* **151**: 10 - 27.

Chuderland, D. and Seger, R. (2005). Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol. Biotechnol.* **29**: 57-74.

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**: 41-55.

Darzynkiewicz, Z. and Huang, X. (2004). Analysis of cellular dna content by flow cytometry. *Current Protocols in Immunology* **60**: 5.7.1-5.7.18.

Denault J-B, Drag M, Salvesen GS et al. (2007). Small molecules not direct activators of caspases [1]. *Nat. Chem. Biol.* **3**: 519.

Deveraux, QL., Stennicke, HR., Salvesen, GS. et al. (1999). Endogenous inhibitors of caspases. *J. Clin. Immunol.* **19**: 388-398.

Dirks, PB. and Rutka, JT. (1997). Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle-a review. *Neurosurgery* **40**: 1000-1015

Duffy, A. and Kummar, S. (2009). Targeting mitogen-activated protein kinase kinase (mek) in solid tumors. *Targeted Oncology* **4**: 267-273.

Earnshaw, WC., Martins, LM. and Kaufmann, SH. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 383-424.

Fleischer A, Ghadiri A, Dessauge F et al. (2006). Modulating apoptosis as a target for effective therapy. *Mol. Immunol.* **43**: 1065-1079.

Friedlander, RM. (2003). Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *New England Journal of Medicine* **348**: 1365-1375.

Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* **384**: 201-232.

Gallagher, S., et al. (2008) Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Immunology* **83**: 8.10.1-8.10.28.

Gallagher, SR. (2006) One-dimensional sds gel electrophoresis of proteins. *Current protocols in immunology* **75**: 8.4.1-8.4.37

Green, D. and Kroemer, G. (2005). Pharmacological manipulations of cell death: clinical applications in sight?. *J. Clin. Invest.* **115**: 2610-2617.

Green, DR. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**: 1-4.

Greene, LA. and Tischler, AS. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 2424-2428.

Henson, ES. and Gibson, SB. (2006). Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell. Signal.* **18**: 2089-2097.

Hertel, C., Hauser, N., Schubanel, R. et al. (1996). β -amyloid-induced cell toxicity: enhancement of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-dependent cell death. *J. Neurochem.* **67**: 272-276.

Hotchkiss, RS., Strasser, A., McDunn, JE. et al. (2009). Cell death. *New England Journal of Medicine* **361**: 1570-1583.

Howley, B. and Fearnhead, HO. (2008). Caspases as therapeutic targets. *J. Cell: Mol. Med.* **12**: 1502-1516.

Jacobs, CM., Aden, P., Mathisen, GH. et al. (2006). Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture. *J. Neurosci. Methods* **156**: 129-135.

Johnson, GL., Dohlman, HG. and Graves, LM. (2005). Mapk kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. *Current Opinion in Chemical Biology* **9**: 325 - 331.

Kerr, JFR., Wyllie, AH. and Currie, AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.

Kim, SW., Choi, OK., Chang, MS. et al. (2008). Thiazolidinediones inhibit the growth of PC12 cells both in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**: 197 - 202.

Kottke, TJ., Blajeski, AL., Meng, XW. et al. (2002). Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 804-815.

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* **14**: 32-43.

Kurokawa, M. and Kornbluth, S. (2009). Caspases and kinases in a death grip. *Cell* **138**: 838 - 854.

Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W. et al. (2006). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* **14**: 44-55.

Larner, SF., McKinsey, DM., Hayes, RL. et al. (2005). Caspase 7: increased expression and activation after traumatic brain injury in rats. *J. Neurochem.* **94**: 97-108.

Lavrik IN, Golks A and Krammer PH (2005). Caspase: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* **115**: 2665-2672.

Leist, M. and Nicotera, P. (1997). The shape of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 1-9

Lewis, TS., Shapiro, PS. and Ahn, NG. (1998) Signal transduction through map kinase cascades. *Advances in Cancer Research* **74**: 49-139

Lindland-Tjønn, H. (2009). Vekstfaktorers interaksjoner med caspaser i PC12-celler og kornceller fra rotte. Hovedfagsoppgave for graden Candidatus pharmaciae. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Linnik, M., Zobrist, R. and Hatfield, M. (1993). Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **24**: 2002-2008.

Madden, S. and Cotter, T. (2008). Cell death in brain development and degeneration: control of caspase expression may be key! *Mol. Neurobiol.* **37**: 1-6.

Majno, G. and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. an overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**: 3-15.

Marchetti, A., Cecchinelli, B., D'Angelo, M. et al. (2004). P53 can inhibit cell proliferation through caspase-mediated cleavage of ERK2/MAPK. *Cell Death Differ.* **11**: 596-607.

Marsden, VS. and Strasser, A. (2003). Control of apoptosis in the immune system: bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 71-105.

Mattson, MP. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 120-130.

McKay, MM. and Morrison, DK. (2007). Caspase-dependent cleavage disrupts the erk cascade scaffolding function of ksr1. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 26225-26234.

McStay, GP., Salvesen, GS. and Green, DR. (2007). Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* **15**: 322-331.

Mebratu, Y. and Tesfaigzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* **8**: 1168-1175.

Moe, LK. (2010). Procaspase-activating-compound-1 (PAC-1) - Effekter på celledød og caspaseaktivering i cellelinjen PC12 og kyllingkornceller. Hovedfagsoppgave for graden Candidatus pharmaciae. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Nguyen, TT., Scimeca, JC., Filloux, C. et al. (1993). Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kda ribosomal S6 kinase in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 9803-9810.

Nicotera, P. and Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* **23**: 2757-2765.

Olson, B. and Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science* **48**: 3.4.1-3.4.29.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T. et al. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**: 153-183.

Pereira, NA. and Song, Z. (2008). Some commonly used caspase substrates and inhibitors lack the specificity required to monitor individual caspase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **377**: 873 - 877.

Peterson, QP., Goode, DR., West, DC. et al. (2009a). PAC-1 activates procaspase-3 in vitro through relief of zinc-mediated inhibition. *J. Mol. Biol.* **388**: 144 - 158.

Peterson QP, Hsu DC, Goode DR et al. (2009b). Procaspase-3 activation as an anti-cancer strategy: structure-activity relationship of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and its cellular co-localization with caspase-3. *J. Med. Chem.* **52**: 5721-5731.

- Peterson, QP., Hsu, DC., Novotny, CJ. et al. (2010). Discovery and canine preclinical assessment of a nontoxic procaspase-3-activating compound. *Cancer Res.* **70**: 7232-7241.
- Pittman, R., Wang, S., DiBenedetto, A. et al. (1993). A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *The Journal of Neuroscience* **13**: 3669-3680.
- Politis, KP., Thomaidou, D. and Matsas, R. (2008). Coordination of cell cycle exit and differentiation of neuronal progenitors. *Cell Cycle* **7**: 691-697.
- Pop, C. and Salvesen, GS. (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 21777-21781.
- Putt, KS., Chen, GW., Pearson, JM. et al. (2006). Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy. *Nat. Chem. Biol.* **2**: 543-550.
- Rimul, GF. (2007). Celledød, aktivering av caspase-3, og NGFI-B-forflytning i cellelinjene PC12 og CV1. Hovedfagsoppgave for graden Candidatus pharmaciae. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Roberts, PJ. and Der, CJ. (2007). Targeting the raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**: 3291-3310.
- Salvesen, GS, and Riedl S.J. (2007). Caspase mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **615**: 13-23.
- Sánchez-Martín, FJ., Valera, E., Casimiro, I. et al. (2010). Nerve growth factor increases the sensitivity to zinc toxicity and induces cell cycle arrest in pc12 cells. *Brain Res. Bull.* **81**: 458 - 466.
- Saraste, A. and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **45**: 528-537.
- Sasagawa, S., Ozaki, Y., Fujita, K. et al. (2005). Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained erk activation. *Nat. Cell Biol.* **7**: 365-373.

Seger, R. and Krebs, E. (1995). The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal* **9**: 726-735.

Shaul, YD. and Seger, R. (2007). The mek/erk cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1773**: 1213-1226.

Slagsvold, HH., Rosseland, CM., Jacobs, C. et al. (2003). High molecular weight dna fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res.* **984**: 111 - 121.

Taylor, RC., Cullen, SP. and Martin, SJ. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 231-241.

Tovey, ER., Ford, SA. and Baldo, BA. (1987). Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of the resolution and detection of antigens in complex extracts. *J. Biochem. Biophys. Methods* **14**: 1-17.

Truong-Tran, AQ., Carter, J., Ruffin, RE. et al. (2001). The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals* **14**: 315-330.

Ursitti, JA., Mozdzanowski, J. and Speicher, DW. (1995) Electroblothing from polyacrylamide gels. *Current protocols in protein science* 10.7.1-10.7.14.

Valavanis, C., Hu, Y., Yang, Y. et al. (2001) Model cell lines for the study of apoptosis in vitro. *Methods in Cell Biology* **66**: 417-436

Vallee, BL. and Falchuk, KH. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **73**: 79-118.

Vaudry, D., Stork, PJS., Lazarovici, P. et al. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* **296**: 1648-1649.

Wang, Z., Liao, J. and Diwu, Z. (2005). N-devd-n'-morpholinecarbonyl-rhodamine 100: novel caspase-3 fluorescent substrates for cell-based apoptosis assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**: 2335-2338.

Wolan, DW., Zorn, JA., Gray, DC. et al. (2009). Small-molecule activators of a proenzyme. *Science* **326**: 853-858.

Wong, SHK., Zhao, Y., Schoene, NW. et al. (2007). Zinc deficiency depresses p21 gene expression: inhibition of cell cycle progression is independent of the decrease in p21 protein level in hepg2 cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **292**: C2175-C2184.

Yadav, G., Straume, M., Heath, J. et al. (2003). Are changes in MAPK/ERK necessary or sufficient for entrainment in chick pineal cells?. *The Journal of Neuroscience* **23**: 10021-10031.

Yakovlev, AG., Ota, K., Wang, G. et al. (2001). Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *The Journal of Neuroscience* **21**: 7439-7446.

Ying, H., Gottron, F. and Choi, D. (2000). Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Current Protocols in Neuroscience* **13**: 7.18.1-7.18.17.

Zorn, JA. and Wells, JA. (2010). Turning enzymes on with small molecules. *Nature Chemical Biology* **6**: 179-188.

Zou, W., Zeng, J., Zhuo, M. et al. (2002). Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **67**: 837-843.

