

# Mekanismer for deksametasonindusert celledød i PC12-celler og kyllingkornceller

Ngoc Dieu Thi Nguyen



**Masteroppgave i farmasi**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk- naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

---

## FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Farmasøytisk institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo. Arbeidet ble gjennomført i tidsrommet august 2010 til mai 2011, som et ledd i graden Master i farmasi.

Jeg vil starte med å takke veilederen min, Ragnhild E. Paulsen, for all hjelp og støtte gjennom arbeidet med oppgaven. Du har gitt meg mye veiledning og oppmuntring, og dine faglige kunnskaper og positive innstillinger er beundringsverdig. Deretter vil jeg rette en stor takk til Bjørn Oddvar Strøm for all hjelp på lab, for at du svarer på alle spørsmålene mine, råd og veiledning. Jeg vil også spesielt takke Kirsten E. Rakkestad for nyttige innspill under skriveprosessen.

En stor takk går til Mona Gaarder, Gro Mathisen og Karen Debernard for all hjelp og opplæring på lab. Jeg vil også takke mine medstudenter for mange koselige samtaler på lesesalen og på lab!

Min kjære Carl Henrik, tusen takk for omsorg, motivasjon og for at du støtter meg gjennom denne tiden. Oppgaven hadde ikke blitt så fin uten din hjelp!

Tusen takk til mamma og Folke- for deres støtte og oppmuntring gjennom dette året og under hele farmasistudiet.

Til slutt vil jeg takke alle som har gjort dette året til en spennende og lærerikt periode.

Oslo, mai 2011

Ngoc Dieu Thi Nguyen

---

## SAMMENDRAG

Studier av premature barn som har fått deksametason for behandling av bronkopulmonal dysplasi har vist at disse kan få koordinasjonsforstyrrelser og hemmet neurologisk utvikling. Disse symptomene er assosiert med skader og celledød i lillehjernen. Deksametason har i mange studier vist seg å øke  $\text{Ca}^{2+}$ -innstrømming gjennom NMDA-reseptoren og det er vist at deksametasonindusert toksisitet kan blokkeres av NMDA-reseptorantagonister. En interaksjon mellom glukokortikoidreseptoren (GR) og NMDA-reseptoren kan være en del av forklaringen for denne celledøden.

Kornceller fra lillehjernen gjennomgår en modningsprosess sent i fosterlivet og tidlig postnatalt, og uttrykket av ulike NMDA-reseptorsubenheter endres under denne prosessen. NMDA-reseptorens subenhets sammensetning, sammen med et høyt uttrykk av GR, kan stå bak deksametasonindusert celledød.

I dette prosjektet ble PC12- og CV1-celler, henholdsvis en kreftcellelinje som er avledet fra binyremargen hos rotte og fibroblastcellelinjen fra apenyre, benyttet i et luciferaseassay for å undersøke om det kan foreligge en interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheten 3A (NR3A). Videre ble det benyttet ko-immunpresipitering med GFP-trap for å påvise en protein-protein-interaksjon i CV1-celler. Kyllingkornceller ble høstet til Westernblotting for å studere uttrykket av GR og NMDA-reseptorsubenheter i ulike utviklingsstadier, og om dette kan knyttes opp deksametasonindusert celledød.

I CV1-celler ble det påvist en funksjonell interaksjon mellom GR og NR3A etter tilsetning av deksametason i et luciferaseassay. Denne interaksjonen kan ikke ses i PC12-celler, verken i differensierte eller udifferensierte. Dette forsøksoppsettet krever derfor videre optimalisering. Ved hjelp av GFP-trap var det mulig å påvise en interaksjon mellom GR-gfp og NR3A i CV1-celler. Kyllingkorncellers morfologi endrer seg under utviklingen i kultur, der den går fra en avlang til en globulær form. Kyllingkorncellene utvikler toksisitet for deksametason tidlig i kultur. Det kan være en sammenheng mellom uttrykket av NMDA-reseptorsubenheter på ulike utviklingsfaser og deksametasonindusert celledød, og denne sammenhengen kan være en av årsakene til premature barns sårbarhet overfor deksametasonbehandlingen.

---

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	<b>II</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>III</b>
<b>INNHALDSFORTEGNELSE</b> .....	<b>IV</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>1</b>
1.1 LILLEHJERNEN.....	1
1.1.1 Lillehjernens funksjon.....	1
1.1.2 Lillehjernens anatomi.....	1
1.1.3 Lillehjernebarken.....	2
1.1.4 Korncellelaget.....	3
1.1.5 Kornceller som modell for nevrobiologiske studier.....	3
1.2 APOPTOSE OG NEKROSE.....	3
1.3 GLUTAMATRESEPTORER.....	5
1.3.1 NMDA-reseptoren.....	6
1.3.2 NMDA-reseptorens påvirkning på lillehjernens utvikling.....	7
1.4 EKSITOTOKSISITET.....	9
1.5 STEROIDER.....	11
1.5.1 Glukokortikoider.....	11
1.5.2 Deksametason.....	12
1.5.3 Glukokortikoidreseptoren.....	13
1.6 GLUKOKORTIKOIDINDUSERT NEVROTOKSISTET.....	15
1.6.1 Interaksjon mellom GR og NMDAR?.....	16
1.7 HENSIKT MED STUDIEN.....	17
<b>2. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>19</b>
2.1 KJEMIKALER OG BIOLOGISKE PRODUKTER.....	19
2.2 UTSTYR- OG APPARATURLISTE.....	22
2.3 KORNCELLEKULTURER.....	23
2.3.1 Poly-L-lysin-behandling av kulturskåler.....	23
2.3.2 Preparering av korncellekulturer.....	24
2.3.3 Tilsetting av Ara-C.....	27
2.4 PC12-CELLER.....	28
2.4.1 Splitting av PC12-celler.....	28
2.4.2 Differensiering av PC12-celler.....	30
2.5 CV1-CELLER.....	31
2.5.1 Splitting av CV1-celler.....	31

2.6	TRANSFEKSJON AV CV1-, PC12- OG KYLLINGKORNCCELLER .....	33
2.6.1	<i>Transfeksjon av CV1-celler med kalsiumfosfat .....</i>	33
2.6.2	<i>Transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller med Metafectene® Pro.....</i>	35
2.7	EKSPONERING AV PC12-CELLER, CV1-CELLER OG KYLLINGKORNCCELLER.....	37
2.7.1	<i>Eksposering av udifferensierte PC12-, CV1-celler og kyllingkornceller.....</i>	37
2.7.2	<i>Eksposering av differensierte PC12-celler .....</i>	39
2.8	DETEKSJON AV CELLEDØD OG TELLING AV DØDE CELLER .....	40
2.9	LUCIFERASE.....	41
2.9.1	<i>Ildflueluciferase .....</i>	41
2.9.2	<i>Renillaluciferase .....</i>	42
2.9.3	<i>Høsting av celler til luciferasemåling.....</i>	42
2.9.4	<i>Måling av ildflueluciferase .....</i>	43
2.9.5	<i>Måling av renillaluciferaseaktivitet.....</i>	44
2.10	WESTERNBLOTTING.....	45
2.10.1	<i>Høsting av celler til Westernblotting.....</i>	45
2.10.2	<i>Proteinmåling .....</i>	46
2.10.3	<i>Proteinjustering av prøver.....</i>	48
2.10.4	<i>Gelstøping.....</i>	50
2.10.5	<i>Elektroforese.....</i>	51
2.10.6	<i>Blotting av gelen .....</i>	52
2.10.7	<i>Ponceaufarging av membranen.....</i>	53
2.10.8	<i>Blokkering .....</i>	54
2.10.9	<i>Tilsetting av primærantistoff.....</i>	55
2.10.10	<i>Tilsetting av sekundærantistoff.....</i>	56
2.10.11	<i>Fremkalling.....</i>	56
2.10.12	<i>Stripping .....</i>	57
2.11	KO-IMMUNPRESIPITERING MED GFP-TRAP.....	58
2.12	FIGURER OG STATISTIKK.....	61
<b>3.</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>63</b>
3.1	EFFEKT AV DEKSAMETASON PÅ CELLEDØD I PC12-CELLER .....	63
3.1.1	<i>Doserespons for deksametasonavhengig celledød .....</i>	63
3.1.2	<i>Celledød i differensierte vs. udifferensierte PC12-celler .....</i>	64
3.2	ANTAGONISTERS PÅVIRKNING PÅ DEKSAMETASONINDUSERT CELLEDØD I PC12-CELLER .....	66
3.3	TRANSFEKSJON AV KYLLINGKORNCCELLER, PC12- OG CV1-CELLER .....	68
3.3.1	<i>Transfeksjon av CV1-celler med luciferaseplasmider.....</i>	69
	<i>Transfeksjon av CV1-celler med GR og NMDA-subenheten NR3A .....</i>	69
3.3.2	<i>Transfeksjon av PC12-celler med luciferaseplasmider.....</i>	72
	<i>Interaksjon mellom NR3A og endogen GR i PC12-celler.....</i>	72
	<i>Interaksjon mellom andre NMDA-reseptorsubenheter og endogen GR i PC12-celler.....</i>	74
3.3.3	<i>Transfeksjon av differensierte PC12-celler med luciferaseplasmider.....</i>	76

<i>Interaksjon mellom NR3A og endogen GR i differensierte PC12-celler</i> .....	76
<i>Interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheter og endogen GR i differensierte PC12-celler</i> .....	77
3.3.4 <i>Transfeksjon av kyllingkornceller med luciferaseplasmider</i> .....	80
<i>Transfeksjon av kyllingkornceller med GRE-luc og RL-tk</i> .....	80
<i>Transfeksjon av kyllingkornceller med overuttrykt NR3A og NRI-1a</i> .....	82
3.3.5 <i>Faktorer som kan påvirke luciferaseaktiviteten mellom CV1- og PC12-celler</i> .....	84
3.4 IMMUNPRESIPITERING .....	88
3.5 KYLLINGKORNCCELLERS MORFOLOGISKE UTVIKLING I KULTUR .....	90
3.6 DEKSAMETASONINDUSERT CELLEDØD I KORNCELLEKULTURER .....	92
3.6.1 <i>Utvikling av deksametasonindusert celledød i korncellekulturer fra kylling</i> .....	92
3.6.2 <i>GR-, MR- og NMDA-reseptorantagonisters påvirkning på celledød i deksametasoneksponerte kyllingkornceller</i> .....	94
3.7 WESTERNBLOTTING .....	99
3.7.1 <i>Uttrykk av GR i kyllingkornceller</i> .....	100
3.7.2 <i>Uttrykk av NMDA-reseptorsubenheter i kyllingkornceller</i> .....	102
<b>4. DISKUSJON</b> .....	<b>107</b>
4.1 DISKUSJON AV METODER .....	107
4.1.1 <i>Valg av cellemodeller</i> .....	107
4.1.2 <i>Valg av metoder for å måle celledød</i> .....	108
4.1.3 <i>Westernblotting</i> .....	109
4.1.4 <i>Bruk av GRE-luc som metode for å studere protein-protein-interaksjoner</i> .....	110
4.1.5 <i>Bruk av ko-immunpresipitering som metode for å studere protein-protein-interaksjoner</i> .....	111
4.2 DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN .....	113
4.2.1 <i>Deksametasonindusert celledød i PC12-celler</i> .....	113
4.2.2 <i>Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A</i> .....	114
4.2.3 <i>Ko-immunpresipitering</i> .....	116
4.2.4 <i>Morfologisk utvikling hos kyllingkornceller i kultur</i> .....	117
4.2.5 <i>Deksametasonindusert celledød i kyllingkorncellekulturer</i> .....	117
4.2.6 <i>Uttrykket av GR og NMDA-reseptorsubenheter i kyllingkornceller</i> .....	119
<b>5. KONKLUSJON</b> .....	<b>121</b>
<b>REFERANSELISTE:</b> .....	<b>123</b>

---

## FORKORTELSER

ad	Opp til
AMP	Adenosinmonofosfat
AMPA	Alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate
ANOVA	Analysis of Variance
Ara-C	Cytosin- $\beta$ -D-arabino-furanoside
ATP	Adenosintrifosfat
BBS	BES-bufret saltvann
BCA	Bicinchoninic acid
BDP	Bronkopulmonal dysplasi
BID	BH3-interagerende domene dødsagonist
BME	Basal Medium Eagle
Caspase	Cystein-aspartat-spesifikk-protease
CBG	Kortisolbindende globulin
CMV	Cytomegalovirus
SNS	Sentralnervesystem
Cyt c	Cytokrom c
DBD	DNA-bindende domene
Dex	Deksametason
DIV	Dag <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DNase	Deoksyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ER	Endoplasmatisk retikulum
EtOH	Etanol
FBS	Føtalt kalveserum
GABA	Gamma-aminosmørsyre
GC	Glukokortikoid
GFP	Grønt fluorescerende protein
GR	Glukokortikoidreseptor

---

GRE	Glukokortikoid responselement
HRP	Pepperrot peroksidase (Horseradish peroxidase)
Hsp90	90 kDa heat shock protein
LUC	Ildflueluciferase
MAPK	Mitogenaktivererte proteinkinaser
mGR	Membranassosiert glukokortikoidreseptor
MQ	Milli-Q
MR	Mineralkortikoidreseptor
mRNA	messenger-ribonukleinsyre
NeuN	Nevronal kjerne (Neuronal Nuclei)
NGF	Nervevekstfaktor (Nerve Growth Factor)
NMDA	N-metyl-D-aspartat
NMDAR	N-metyl-D-aspartat reseptor
NO	Nitrogenoksid
NR	NMDA-reseptorsubenhett
PBS	Fosfat-bufret saltvann
RL	Renillaluciferase
RNA	Ribonukleinsyre
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
rpm	Runder per minutt
SDS	Natrium dodecyl sulfat
SE	Standardfeil
TBS	Tris-bufret saltvann
TK	Thymidinkinase
TNF	Tumor nekrose faktor
Ubh	Ubehandlet



---

# 1. INNLEDNING

Deksametason ble gitt til premature barn, definert som barn født før uke 37, for å behandle og forebygge den kroniske lungesykdommen bronkopulmonal dysplasi, en alvorlig komplikasjon ved prematur fødsel. Studier som har blitt gjort på barn som har fått denne behandlingen viser at disse kan få nedsatt kognitiv funksjon og koordinasjonsforstyrrelser. Disse karakteristika henger sammen med tap av nevroner i lillehjernen (se avsnitt 1.1 og 1.2). Mekanismer for deksametasonindusert celledød hos denne gruppen brukere er ikke fullstendig kartlagt, men det foreligger flere studier som indikerer at det kan foreligge en interaksjon mellom glukokortikoidreseptoren (GR) og NMDA-reseptorsubenheten 3A (NR3A), som fører til en toksisk intracellulær konsentrasjon av  $\text{Ca}^{2+}$  (se avsnitt 1.3 og 1.4). Premature barn har umodne nevroner slik at NMDA-reseptorens sammensetning og uttrykket av glukokortikoidreseptoren på administrasjonstidspunktet, kan være av betydning for korncellenes sårbarhet for deksametason (se avsnitt 1.3 og 1.5).

## 1.1 Lillehjernen

### 1.1.1 Lillehjernens funksjon

Lillehjernen (*cerebellum*) er et område i hjernen som spiller en viktig rolle i motorisk kontroll (Allen and Tsukahara, 1974). Den er også involvert i kognitive funksjoner, som oppmerksomhet og språk (Leiner et al., 1993, Allen et al., 1997). Rapporter fra så tidlig som 1976 antyder at lillehjernen i tillegg har en rolle i ikke-motoriske funksjoner som personlighet, humør og psykose (Cutting, 1976, Wolf et al., 2009). Lillehjernen setter ikke i gang bevegelser, men den bidrar til koordinering, presisjon og nøyaktig timing. Den mottar sensoriske input fra andre deler av hjernen og ryggmargen, deretter bearbeider den disse signalene til jevne og koordinerte bevegelser (Fine et al., 2002). Skader på lillehjernen fører til balanseforstyrrelser, svimmelhet og svekket koordineringsevne (Walker, 1990), og det er først og fremst viljestyrte bevegelser som påvirkes (Brodal, 2001).

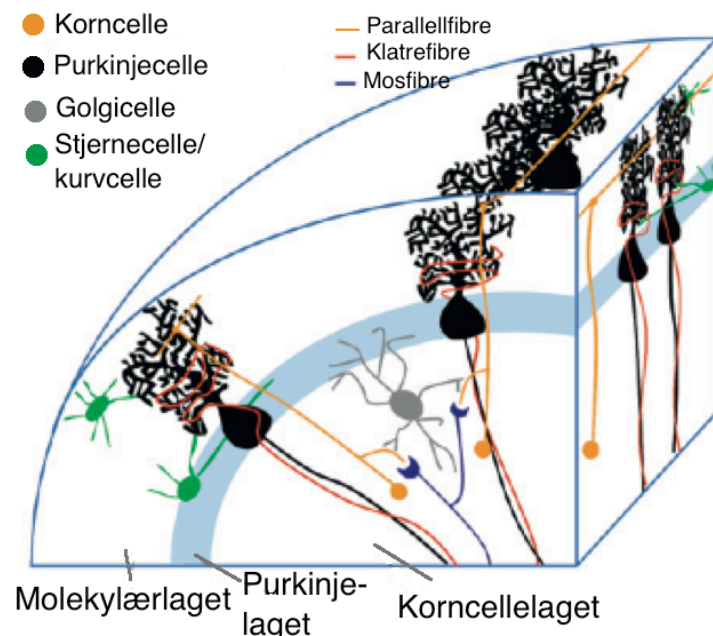
### 1.1.2 Lillehjernens anatomi

Lillehjernen ligger på undersiden av hjernen, under den cerebrale hemisfæren. Det meste av lillehjernens volum er bygget opp av sterkt foldede lag (folier) av grå substans, kalt

lillehjernebarken (Voogd and Glickstein, 1998). Den sterke foldingen i lillehjernen gjør at den inneholder flere nevroner enn resten av hjernen, men den opptar kun 10 % av det totale hjernevolumet. Under den grå substansen finner vi hvit substans, som er bygd opp av myeliniserte nervefibrer som går til og fra hjernebarken.

### 1.1.3 Lillehjernebarken

Lillehjernebarken (*cortex cerebelli*) er bygd opp av fem typer nevroner (kornceller, purkinjeceller, golgiceller, kurvceller og stjerneceller), og består av tre lag: molekylær-, purkinje- og korncellelaget (Voogd and Glickstein, 1998) (Figur 1-1). Molekylærlaget ligger ytterst, og inneholder synapser mellom korncellenes parallellfibrer og purkinjefibrenes dendritter. Her finner man cellelegemene til GABAerge nevroner, som stjerneceller og kurvceller (Barmack and Yakhnitsa, 2008). Det midterste er purkinjelaget, et smalt område med inhibitoriske purkinjeceller som er viktige for overføring av signaler ut fra lillehjernebarken. Korncellelaget ligger innerst, og har cellelegemer til kornceller og noen golgiceller (Voogd and Glickstein, 1998). Lillehjernebarken behandler informasjon som kommer inn (afferente signaler) fra alle deler av sentralnervesystemet, og har efferente nerveutløpere som sender prosessert informasjon ut av lillehjernen (Gray, 1961). Det afferente transmisjonssystemet består av parallellfibre, mosfibre og klatrefibre (Figur 1-1).



**Figur 1-1: Fremstilling av cellyper og plassering i lillehjernebarken**

Figuren viser cellene i lillehjernebarken. Molekylærlaget inneholder purkinjecellenes dendritter, aksoner fra korncellene og stjerneceller/kurvceller. Purkinjecellelaget inneholder purkinjecellenes cellekropp. Innerst ligger kornceller og golgiceller. Korncellene mottar eksitoriske input fra mosfibre. Figuren er modifisert fra Valenzuela 2010.

---

### **1.1.4 Korncellelaget**

Mer enn 90 % av nevronene i lillehjernen er kornceller, som er lokalisert i det dypeste laget i lillehjernebark (Contestabile, 2002). Disse er blant de minste nevronene i hjernen (Voogd and Glickstein, 1998). En korncelle sender ut 4-5 nervefibrer til molekylærlaget, og disse fibrene danner eksitatoriske (stimulerende), glutaminerge synapser med purkinjecellenes dendritter (Gallo et al., 1982). På denne måten kan korncellene påvirke mange purkinjeceller (Brodal, 2001). Kornceller bruker glutamat som neurotransmitter, og har dermed en eksitatorisk effekt på sine målceller.

### **1.1.5 Kornceller som modell for neurobiologiske studier**

Kornceller er den største og mest homogene nevronpopulasjonen i lillehjernen, men også i hjernen som helhet (Contestabile, 2002). Dannelse av korncellenevrone skjer stort sett postnatalt, og gjennom mange trinn. Prosesser i korncellens utvikling inkluderer proliferasjon i det ytre korncellelaget, migrering nedover til det indre korncellelaget og til slutt differensiering (den normale utviklingen i kultur er nærmere beskrevet i avsnitt 1.3.2). Korncellene uttrykker GR og NMDA-reseptorer (Pearce et al., 1987, Persengiev, 2001).

I kultur utvikler korncellene seg etter utplating, og er relativt resistente mot celledøende faktorer. Disse egenskapene gjør at korncellene er en egnet nevrontype for å studere mekanismer for nevronal utvikling, funksjon, toksisitet og celledød (Contestabile, 2002). Det meste av studier på kornceller er gjort på rotter, men i de senere årene har også kyllingkornceller blitt brukt i en del studier. Disse har en rekke fordeler, som raskere modning, at de utvikler glutamatsensitivitet i kultur og at de er billigere i bruk (Jacobs et al., 2006a).

## **1.2 Apoptose og nekrose**

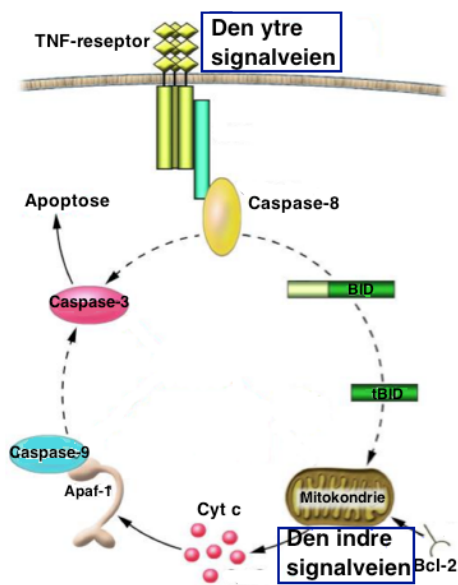
For at sentralnervesystemet (SNS) skal utvikle seg, kreves det en balanse mellom celleproliferasjon og celledød. Et avvik i denne balansen kan resultere i unormal utvikling av nervesystemet og ha patologiske konsekvenser. Celledød kan beskrives ut fra morfologiske og biokjemiske kriterier, enten som følge av apoptose eller nekrose. Selv om disse kriteriene er forskjellige, har forskningen i senere tid vist at disse to formene for celledød involverer mange av de samme cellulære mekanismene (Proskuryakov et al., 2003, Zeiss, 2003). Om en celle dør av nekrose eller apoptose er delvis avhengig av celledødsignalet, vevstype, utviklingsstadiet av

---

vevet og det fysiologiske miljøet. Nekrose er en ukontrollert og passiv prosess som kan påvirke mange andre celler og dermed føre til større cellulære skader (Fink and Cookson, 2005, Jana and Paliwal, 2007). Mekanismen bak denne typen celledød er at cellen sveller og sprekker. Dette fører til frigjøring av cytoplasmatisk materiale og inflammatoriske faktorer som ofte trigger inflammasjonsresponser i organismen (Proskuryakov et al., 2003).

Apoptose, eller programmert celledød, ble først beskrevet av Kerr (Kerr et al., 1972). Det er en kontrollert og energiavhengig prosess som normalt skjer under utvikling og aldring, og virker som en homeostatisk mekanisme som opprettholder cellepopulasjonen i ulike vev. I tillegg er denne prosessen viktig for utviklingen av fosteret og sentralnervesystemet. Apoptose skjer også som en forsvarsmekanisme i for eksempel immunreaksjoner, når celler er skadet av sykdommer eller giftige stoffer (Norbury and Hickson, 2001). Celler som enten er blitt alvorlig skadet, har nådd sin levealder, eller som det ikke lenger er behov for, har en innebygd evne til aktivering av apoptose. Under apoptose skjer disse prosessene: kjernen og cytoplasma kondenseres, DNA fragmenteres og cellen brytes ned til ulike membranbundne fragmenter (Kerr et al., 1972). Den apoptotiske cellen skiller ut signalsubstanser som tiltrekker seg makrofager. Disse cellene fjerner fragmentene raskt, og er viktige for å beskytte nærliggende vev mot en omfattende skade (He et al., 2009).

To signalkaskader, den indre og den ytre, kan trigge apoptose (Figur 1-2). Studier viser at de to signalveiene er koblet sammen, og molekyler i én signalvei kan påvirke den andre (Igney and Krammer, 2002). Den ytre signalkaskaden aktiveres når ligander binder seg til ”dødsreseptorer” (eksempel Tumor Nekrose Faktor-reseptorer) (Ashkenazi and Dixit, 1998). Ligandbindingen fører til aktivering av pro-caspase-8 som kløyver caspase-8, og denne aktiverer caspase-3. Caspase-3 er en effektor som kløyver DNase, og dette fører til kromatin-kondensering og DNA-fragmentering som er karakteristisk for apoptose (Porter and Janicke, 1999). Den indre signalveien kan utløses av flere stimuli, som for eksempel DNA-skade, NGF-deprivasjon, toksiner, ubalanse i ionehomeostasen og frie radikaler (Vaudry et al., 2003). Eksponering av en umoden hjerne for noen sedativa, antiepileptika, høyt oksygen eller deksametason kan trigge apoptose av nevroner. Økt permeabilitet i mitokondrienes ytre membran gjør at cytokrom c fra mitokondriene skilles ut til cytosol. Cytokrom c kan interagere med proapoptotiske faktorer, og dette medfører aktivering av caspase-3.



**Figur 1-2: Apoptotiske signalkaskader**

Figuren viser at den ytre signalveien (dødsreseptormediert apoptose) aktiveres av ligandbinding til “dødsreseptorer”. Nedstrøms for denne bindingen blir caspase-3 aktivert og det resulterer i apoptose. Den indre signalveien (mitokondriemediert apoptose) kan aktiveres av blant annet DNA-skade. De to signalveiene bindes sammen av BID, et proapoptotisk protein som tilhører Bcl-2-familien. Bcl-2 medierer frisetting av cytokrom c. Figuren er modifisert fra Wright and Duckett, 2005.

Mange typer stimuli og forutsetninger, både fysiologisk og patologisk, kan trigge apoptose, men ikke alle celler vil dø som respons til samme stimuli (Elmore, 2007). Upassende mengder av apoptose, enten for mye eller for lite, er en faktor i mange sykdommer, inkludert autoimmune og neurodegenerative sykdommer, iskemisk slag og mange kreftformer. I tillegg kan apoptose føre til kognitive eller motoriske defekter hos foster og spedbarn (Grier and Halliday, 2005).

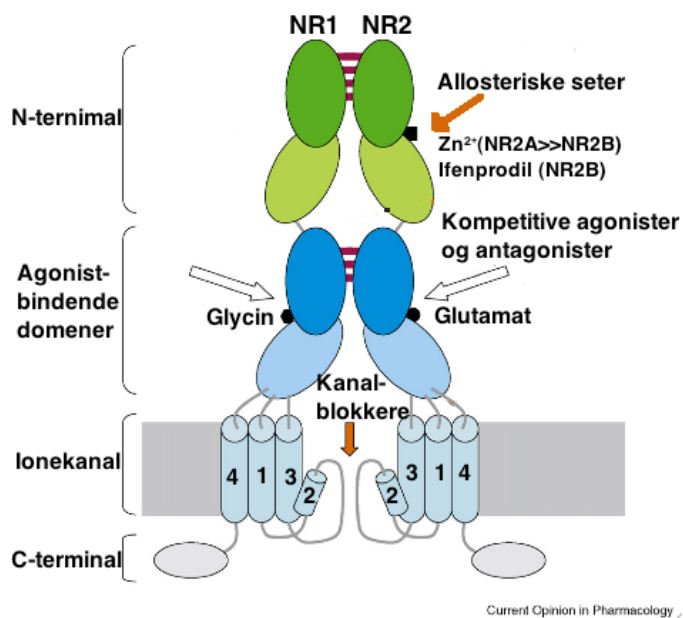
### 1.3 Glutamatreseptorer

Basert på studier som er gjort med selektive agonister og antagonist, kan det skilles mellom fire glutamatreseptorsubtyper, nemlig N-metyl-D-aspartat (NMDA), alfa-amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), kainat og metabotrope reseptorer (Mayer, 2005). De tre første er ionotrope reseptorer (ligandopererte ionekanaler), oppkalt etter deres spesifikke agonister (Mayer and Armstrong, 2004). Metabotrope reseptorer er G-proteinkoblede reseptorer som er bundet til intracellulære ”second messenger-systemer” (Mayer, 2005). Glutamatreseptorer er viktige i nevronal kommunikasjon, hukommelse, læring og utvikling av sentralnervesystemet (Waxman and Lynch, 2005). De er også involvert i patologien til mange neurodegenerative sykdommer på grunn av eksitotoksisiteten (Cull-Candy et al., 2001).

### 1.3.1 NMDA-reseptoren

I løpet av de siste tiårene har mange NMDA-reseptorsubenheter blitt identifisert. NMDA-reseptorer (NMDAR) finnes over hele sentralnervesystemet, med ulik subenhets sammensetning som gir funksjonelt forskjellige reseptorer (Cull-Candy et al., 2001).

NMDA-reseptorsubenheter uttrykkes forskjellig i ulike deler av hjernen, og under utvikling. NMDA-reseptoren er lokalisert i cellemembranen. Den er bygd opp av en stor ekstracellulær N-terminal del, en transmembran region (består av tre segmenter; TM 1, 3 og 4), en ekstracellulær løkke som danner selve ione kanalen og en cytoplasmatiske C-terminal del (Figur 1-3). NMDA-reseptoren har seks ulike bindingssteder for endogene ligander. Ligandbinding kan for eksempel regulere ione kanalens åpnings tid og -frekvens. Aktivering av NMDA-reseptorer krever binding av de to agonistene glutamat og glysin, samtidig med depolarisering som dermed fjerner magnesium fra å blokkere ione kanalen (Waxman and Lynch, 2005). Andre modulatorer er polyaminer,  $Mg^{2+}$  og  $Zn^{2+}$  som har egne bindingssteder og kan modulere reseptorens aktivitet (Cull-Candy et al., 2001). Åpningen av kanalen fører til at  $Ca^{2+}$  og  $Na^{+}$  strømmer inn i cellen.



**Figur 1-3: NMDA-reseptoren og potensielle seter for ligandbinding**

De fleste NMDA-reseptorer er antatt å være tetramere sammensatt av to NR1- og to NR2-subenheter. Her er det vist én av de to NR1/NR2 heterodimerene. Figuren viser bindingssteder for ligandene glutamat, glysin og  $Zn^{2+}$ . Ionekanalen har også bindingssteder for kanalblokkere (for eksempel endogent  $Mg^{2+}$ ) og antagonister (for eksempel MK 801). Figuren er modifisert fra Paoletti and Neyton, 2007.

---

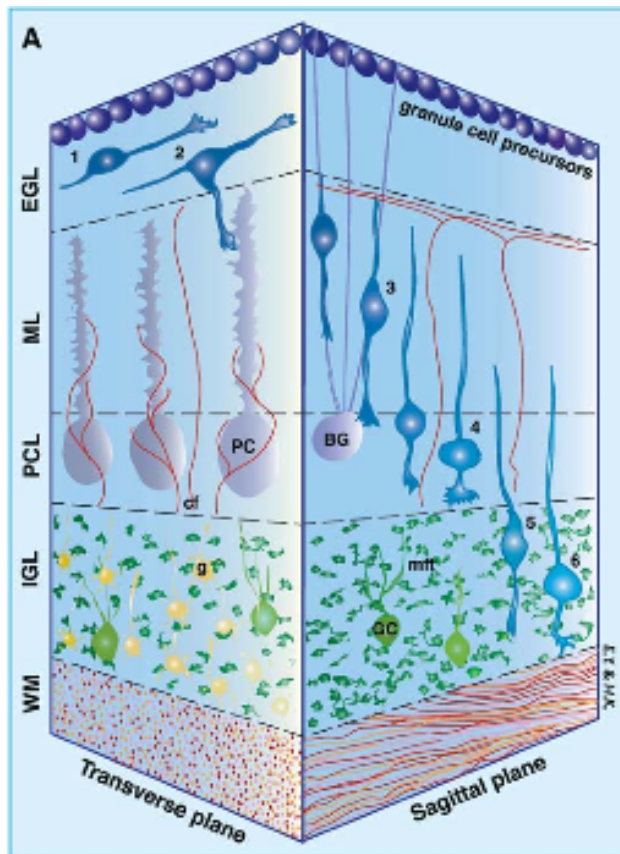
Alle NMDA-reseptorer ser ut til å fungere som heterodimerer, bygd opp av NR1-subenheter (som binder glysin) i kombinasjon med minst én av NR2-subtypene (som binder glutamat) (Cull-Candy et al., 2001, Perez-Otano et al., 2001, Waxman and Lynch, 2005). NR3 danner ikke funksjonelle reseptorer alene, men kan sette seg sammen med NR1/NR2-komplekset (Cull-Candy et al., 2001), eller kun NR1-subenheter (Waxman and Lynch, 2005). Sistnevnte kombinasjon vil ikke være påvirket av glutamat (Waxman and Lynch, 2005). NR1 finnes som åtte subenheter, mens det er fire NR2-subenheter (A-D) og to NR3-subenheter (A-B).

### **1.3.2 NMDA-reseptorens påvirkning på lillehjernens utvikling**

NMDA-reseptoren er viktig for lillehjernens motoriske kontroll (Nandhu et al., 2011). Stimulering av NMDA-reseptorsubenheter har vist seg å være viktig i flere aspekter av nevronal utvikling (Contestabile, 2002). Glutamataktivering av NMDA-reseptoren kan også påvirke korncellers migrering (Tarnok et al., 2008). NMDA-reseptorer spiller en viktig rolle i langsiktige, adaptive og patologiske endringer i hjernen, og er derfor et potensielt mål for legemidler (Cull-Candy et al., 2001).

Tidlig postnatalt begynner postmitotiske kornceller å vandre fra det ytre korncellelaget (External Germinal cell Layer - EGL), gjennom molekylærlaget og purkinjecellelaget, til det indre laget (Internal Granule cell Layer - IGL) (Figur 1-4). Modningen av korncellene skjer underveis i vandringen, og når korncellene når det indre laget har de blitt til modne kornceller (Yacubova and Komuro, 2003). Migrasjonen er en viktig prosess i utviklingen av korncellene (Mancini and Atchison, 2007).

Uttrykket av NR1-1a er jevnt under hele utviklingen av lillehjernen, mens mengden av NR2-subenheter varierer på ulike tidspunkter under utviklingen. NR2B- og NR2D-subenheter finnes hovedsaklig i neonatale hjerner, men under utviklingen blir de erstattet av NR2A, og i visse områder av NR2C (Cull-Candy et al., 2001, Fu et al., 2005, Waxman and Lynch, 2005). NR2C er lokalisert i lillehjernen, mens NR2D er funnet i andre utvalgte hjerneområder (Waxman and Lynch, 2005).



#### Figur 1-4: Translokasjon og transformasjon av postmitotiske kornceller

Figuren viser hva som skjer tidlig postnatalt i lillehjernen til mus og den tre-dimensjonale representasjon av korncellers migrasjon fra EGL til IGL *in vivo*. Korncellenes migrering i det ytre korncellelaget (1-2), bergmann glia-assosiert migrering gjennom molekylærlaget (3). Stasjonær fase i purkinjecellelaget (4), og den endelige migreringen til det indre korncellelaget (5-6). Forkortelser: PC: purkinjeceller, BG: bergmann glia, GC: Golgiceller, g: postmigrert korncelle, cf: klatrefiber, mft: mosfiberterminal, WM: hvit substans. Figuren er hentet fra Yacubova and Kumuro 2003.

NR1, NR2A og NR2B er uttrykt hos migrerende kornceller, mens kornceller i det indre laget uttrykker NR1 sammen med NR2C. Studier tyder på at NR2B-subenheten og  $Ca^{2+}$  er viktige for migrering (Tarnok et al., 2008). Overuttrykt NR2B i kornceller øker migrasjonshastigheten. Behandling av rottekornceller med NR2B-reseptorantagonisten Ifenprodil fører til en langsommere migrasjon enn normalt (Mancini and Atchison, 2007, Tarnok et al., 2008). Det har blitt vist at en økning av intracellulær  $Ca^{2+}$  fremmer migrasjonsprosessen, mens fravær fører til en reversibel retardasjon av bevegelsen (Komuro and Rakic, 1998). NR2A er viktig for motorisk koordinasjon og utvikling av funksjonelle eksitatoriske synapser (Schlett et al., 2004, Fu et al., 2005). Nevroner som uttrykker NR2A har en raskere eksitatorisk postsynaptisk ionestrøm (EPSC) enn celler som ikke uttrykker denne subenheten. EPSC blir raskere når nevronene utvikler seg, og dette spiller en viktig rolle for at korncellene skal kunne prosessere og integrere sensorisk informasjon som kommer fra mosfibre (Cathala et al., 2003). Signalene



---

fra mosfibrene sendes videre fra kornceller til purkinjeceller (Cathala et al., 2003). Forstyrrelser i denne prosessen kan resultere i unormal motorikk. Andre studier indikerer imidlertid at NR2A-mediert forsterkning fra mosfibre til kornceller ikke er nødvendig for motorikken, men at de kan være viktige for hukommelsesdannelse i lillehjernen (Andreescu et al., 2011).

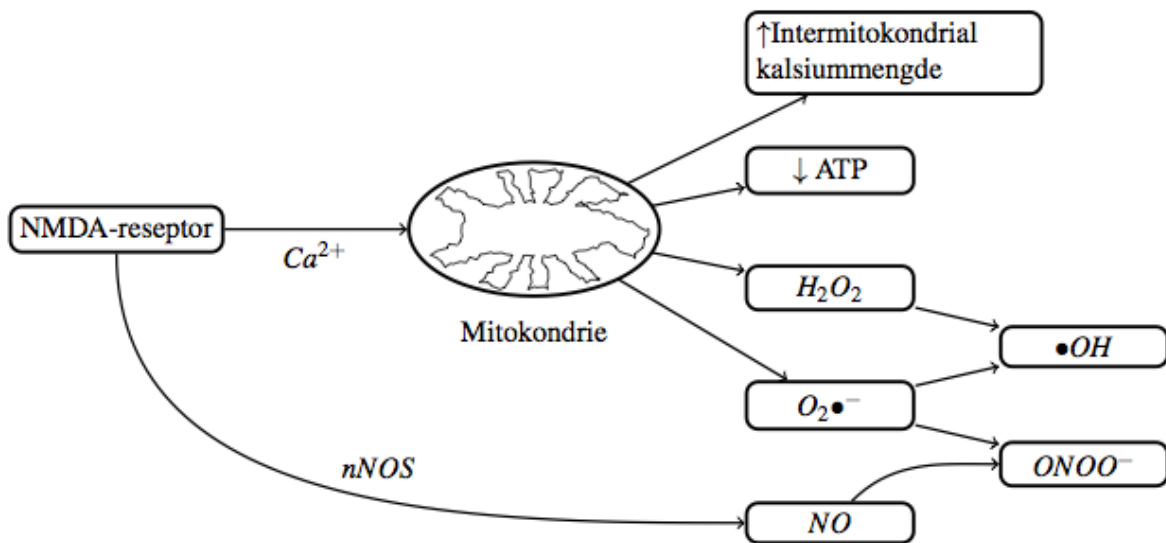
NR3-subenheter (NR3A og NR3B) kan virke som funksjonelle ionekanalmodulatorer og har viktige roller under nevronal utvikling (Kew and Kemp, 2005). Uttrykket av NR3A mRNA i rottehjerne når en topp mot slutten av den første postnatale uken, og reduseres deretter til et lavt nivå frem mot voksen alder (Wong et al., 2002, Nilsson et al., 2007). NR3A-uttrykket er størst i korncellelaget i lillehjernebarken, men kan også finnes hos celler i molekylær- og purkinjecellelaget. Mus som mangler NR3A har økt NMDA-respons, noe som tyder på at NR3A-subenheten spiller en rolle i utviklingen av sentralnervesystemet og plastisitet via modulering av NMDA-reseptoraktivitet (Das et al., 1998). Reseptorer som inneholder NR3A har redusert  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilitet, og dette tyder på at NR3A har en sentral rolle i utvikling av synaptiske elementer ved å påvirke ionestrømmen gjennom NMDA-reseptoren (Das et al., 1998, Wong et al., 2002). I fravær av NR1-1a vil NR3A forbli i endoplasmatisk retikulum (ER) og vil ikke nå celleoverflaten. Det betyr at subenhets sammensetning og ER-eksport spiller nøkkelroller for effekten til NR3A (Perez-Otano et al., 2001).

## 1.4 Eksitotoksisitet

Eksitotoksisitet er en patologisk prosess der nerveceller blir skadet og drept av glutamat og andre eksitatoriske neurotransmittere (Olney, 1969). Glutamat er svært giftig for nevroner, og en lav konsentrasjon av glutamat (1  $\mu\text{M}$ ) gitt til en cellekultur, dreper cellene (Jacobs et al., 2006b). Eksitotoksisitet er trolig involvert i ryggmargsskade og slag, og er knyttet til en rekke nevrologiske sykdommer (Waxman and Lynch, 2005). Ved slag blir energien som er viktig for å pumpe glutamat inn igjen, borte og glutamat kan lekke ut av cellen.

Glutamat og andre eksitotoksiner gir en overaktivering av NMDA-reseptoren, og dette fører til cellulær dysfunksjon, celledød og nevronal celledød (Choi, 1992) (Figur 1-5). Aktivering av AMPA-reseptorer depolariserer cellen, som igjen fjerner blokkering av NMDA-kanaler, og  $\text{Ca}^{2+}$  kan strømme inn. Depolariseringen åpner også spenningsaktiverte kalsiumkanaler og dette fører til økt glutamat. Overstimuleringen medfører høye nivåer av intracellulære  $\text{Ca}^{2+}$  (Manev et al., 1989).  $\text{Ca}^{2+}$ -innstrømmingen aktiverer mange enzymer, inkludert fosfolipaser,

endonukleaser og proteaser som calpain. Disse enzymene fører til endringer i cellestrukturen på grunn av skader på cytoskjelettet, membraner og DNA (Waxman and Lynch, 2005).



**Figur 1-5: Aktiveringen av NMDA-reseptoren fører til økt intracellulær kalsium som kan resultere i mitokondriell dysfunksjon**

Økning i intracellulære  $Ca^{2+}$  øker kalsiumopptak i mitokondriene, som fører til at det overstiger normalen. Som en konsekvens av elektrontransportdysfunksjon skjer det da en reduksjon i ATP-produksjon og generering av reaktive oksygenforbindelser (ROS). NMDA-reseptoren kan produsere nitrogenoksid (NO) uavhengig av mitokondrie, og NO i kombinasjon med radikalene resulterer i toksiske mengder av reaktive oksygenforbindelser. Figuren er modifisert fra Waxman et al. 2005.

NMDA-reseptorantagonister kan forhindre eksitotoksisitet i cellulære- og dyremodeller ved å blokkere NMDA-reseptoren. Dizocilpine (MK 801) er en selektiv ikke-kompetitiv NMDA-reseptorantagonist. Den er fettløselig, og kan dermed krysse blod-hjerne-barrieren. For at MK 801 skal blokkere kanalen, må kanalen først aktiveres av agonister. Det er antatt at MK 801 og  $Mg^{2+}$  binder seg til et felles bindingssete i ionekanalene. CGP 39551 er en selektiv og kompetitiv reseptorantagonist, og har samme bindingssete som glutamat (Cotterell et al., 1992). Blokkering av NMDA-reseptoren ved systemisk administrasjon av CGP 39551 resulterer i økt apoptotisk eliminering av kornceller, særlig de som er i det indre korncellelaget på slutten av deres migrering (Contestabile, 2002). En studie har vist at deksametason induserer celledød i rottekornceller. Denne døden kan blokkeres av NMDA-reseptorantagonister, men den er ikke sensitiv overfor  $Mg^{2+}$  (Jacobs et al., 2006b).

---

## 1.5 Steroider

Steroider er en samlebetegnelse for en gruppe hormoner. Felles for disse er at alle stammer fra kolesterol. Steroider kan deles i glukokortikoider, mineralkortikoider, androgener, østrogener og progestogener (Kawata, 1995).

### 1.5.1 Glukokortikoider

Glukokortikoider (GC) påvirker nærmest alle organsystemene og utøver en rekke fysiologiske effekter i kroppen, blant annet regulering av metabolisme, vekst, nevronal funksjon og kroppens stressrespons. De innehar antiinflammatoriske og immunsuppressive egenskaper (Barnes, 2006), og er en av de mest markedsførte legemiddelgruppene (Borski, 2000).

Endogent glukokortikoid, kortisol, produseres i binyrebarkens *zona fasciculata* og *zona reticularis* (Kemppainen and Behrend, 1997). I blodet er 60 % av kortisol bundet til kortisolbindende globulin (CBG), ca. 30 % bundet til albumin og resten sirkulerer ubundet (Czock et al., 2005). Bundne steroider er biologisk inaktive (Peterson et al., 1960). Glukokortikoid er alltid til stede i blodet, men i friske personer følger blodkonsentrasjonen en veldefinert døgnrytme, med høyest konsentrasjon tidlig om morgenen og gradvis nedgang gjennom dagen mot et lavt punkt på kveld/natt. Når HPA-aksen ("hypothalamic-pituitary-adrenal") er aktivert i en stressende situasjon, kan kortisolnivået øke minst 10 ganger. Ved så høye nivåer vil kortisol interagere med lavere affinitet til glukokortikoidreseptoren (King and Hegadoren, 2002).

Glukokortikoider har en essensiell rolle i sentralnervesystemet. Glukokortikoider kan påvirke emosjon (Roozendaal et al., 1999), læring og hukommelse (Bohus and de Kloet, 1981) og er involvert i koordinering av døgnrytme og matinntak. I tillegg til virkningene på hjernens adferdsfunksjoner, har glukokortikoider påvirkning på nevronal celleoverlevelse i situasjoner som er kritiske for vevet, som under aldring og nevrodegenerative sykdommer (Sapolsky et al., 1984, Abraham et al., 2001). Studier av rottekornceller viser at prenatal overeksponering for glukokortikoider kan ha skadelige effekter på utvikling av organer, inkludert nervesystemet (Ahlbom et al., 2000). Det er et smalt terapeutisk vindu mellom konsentrasjoner som gir beskyttelse og eksitotoksisitet.

Siden det er et lite lipofilt molekyl kan glukokortikoider passere blod-hjerne-barrieren, og gå inn i målcellen ved diffusjon. Glukokortikoider kan påvirke cellemembraner direkte, ettersom

---

de har sterolringstruktur ved at de kan inkorporeres inn i, og endre, de fysiske egenskaper til cellemembranen (Grier and Halliday, 2005). Dette påvirker aktiviteten til membranassosierte proteiner som for eksempel kalsium- og natriumkanaler, og dermed kan GC endre cellulære metabolske signalveier som er avhengig av disse ionene (Lipworth, 2000). Inne i cellen kan de bindes til intracellulære mineralokortikoidreseptorer (MR) og glukokortikoidreseptorer i nevroner og gliaceller (Abraham et al., 2001). Glukokortikoideffekten er mediert av reseptorer.

### **1.5.2 Deksametason**

Deksametason ( $9\alpha$ -fluoro- $16\alpha$ -metylprednisolon) er et høypotent, syntetisk glukokortikoid. Det er 25–30 ganger så potent som det naturlige hormonet, hydrokortison, og 4–5 ganger så potent som prednisolon. Deksametason har ikke klassisk mineralokortikoidvirkning. I tillegg har deksametason meget lang biologisk virkningstid. Deksametason har ingen affinitet til kortisolbindende globulin (CBG), men binder til albumin i plasma (ca. 75 %) (Cummings et al., 1990).

Deksametason, har blitt brukt til både å behandle og forebygge bronkopulmonal dysplasi (BDP) hos premature barn (Mammel et al., 1983, Grier and Halliday, 2005). Bronkopulmonal dysplasi er en kronisk lungesykdom og er en av de alvorligste komplikasjonene ved prematur fødsel (Farstad and Bratlid, 2007). Prevalensen av BDP hos premature er høy (opptil 43 %) og er assosiert med høy mortalitet, morbiditet og sykehusinnleggelse (Grier and Halliday, 2005). Premature barn har strukturelt underutviklede lunger, mangel på surfaktanter som reduserer lungefunksjonen og nedsatt respiratorisk kraft. Deksametason har blitt gitt for å fremme produksjonen av alveolar surfaktant (Liggins and Howie, 1972). Surfaktanter er en kompleks blanding av fosfolipider, proteiner og ioner, og er viktig for å redusere overflatespenningen. Produksjonen av surfaktanter skjer hos type 2-celler i alveolarveggen. ABCA-3, et transportprotein, frakter så surfaktanter over cellemembranen. Studier viser at deksametason øker ABCA3-mRNA-uttrykket ved å binde seg til GRE som finnes på promotoren til ABCA3-genet (Yoshida et al., 2004).

Den første publiserte bruken av kortikosteroider i behandling av premature lunger var i 1956 (Haddad et al., 1956). I 1990-årene ble deksametason gitt til premature med alvorlig lungesykdom, blant annet for å dempe inflammasjonsprosessen (Farstad and Bratlid, 2007). På slutten av 1990-tallet kom data som viste at steroider gitt postnatalt for forebygging eller behandling av bronkopulmonal dysplasi er assosiert med en dramatisk hemming i nevronal

---

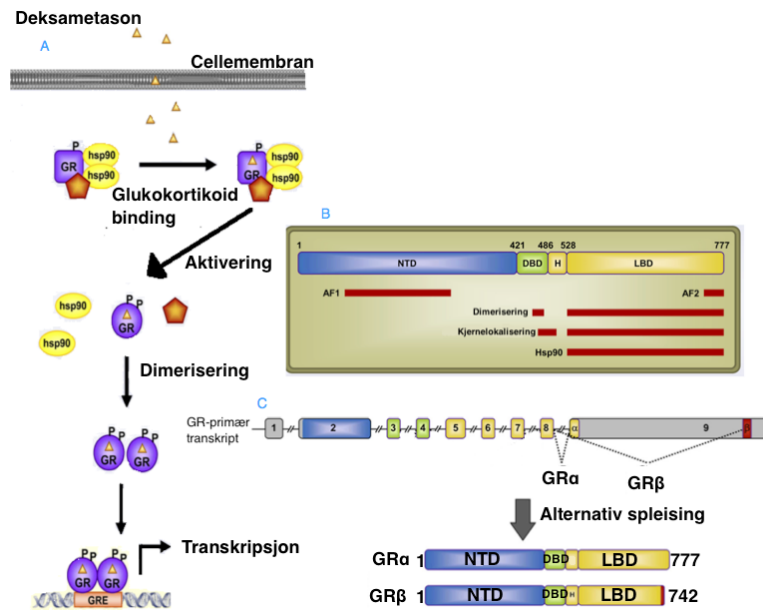
utvikling (Barrington, 2001). Deksametasonbehandlingen har blant annet ført til signifikant mindre hodeomkrets, dårligere motorisk kontroll og motorisk koordinasjon, i tillegg til lavere IQ-score og dårligere kognitiv funksjon (Yeh et al., 2004). Andre studier har vist at barn som fikk deksametason hadde en høyere frekvens av cerebral parese (lammelse) enn kontrollgruppen, og hadde forsinket utvikling (Shinwell et al., 2000). Studiene konkluderte med at bruk av deksametason til premature barn bør fravikes (Shinwell et al., 2000, Barrington, 2001, Yeh et al., 2004). Dette har ført til en reduksjon i postnatal bruk av høypotente glukokortikoider (Grier and Halliday, 2005).

### 1.5.3 Glukokortikoidreseptoren

Glukokortikoidreseptorer (GR) er uttrykt i store mengder i lillehjernen. Ligandaktivering av GR spiller en sentral rolle i reguleringen av nevronal proliferasjon, og trolig i celledifferensiering og -modning (Diaz et al., 1998). GR tilhører en av syv kjente familier av kjernereseptorer (NR3C1, Nuclear Receptors Nomenclature 56 Committee; 1999) og er medlem i steroid-tyroidea-retinoid-reseptor-familien. Reseptorene virker som ligandavhengige transkripsjonsfaktorer som induserer signaler ved å modifisere gentranskripsjonen. GR har en molekylvekt på 94 kDa og foreligger som to isoformer, GR $\alpha$  og GR $\beta$  (Figur 1-6). GR $\alpha$  er uttrykt i nærmest alle celletyper, og blir funksjonelle når de binder til, og blir aktivert av, glukokortikoider. GR $\beta$  er en alternativ form som binder til DNA, men som ikke aktiveres av kortikosteroider på grunn av et deformert ligandbindende domene (mangler deler av den C-terminale delen) (Stahn and Buttgerit, 2008). GR $\beta$  er uttrykt i mindre grad enn GR $\alpha$ , med en andel på kun 0,2-1,0 % av all GR-ekspresjon.

Den klassiske GR er en intracellulær reseptor som befinner seg i cytoplasma når den ikke er bundet til ligand (Tronche et al., 1998) (Figur 1-6). Cytoplasmatiske GR er normalt bundet til proteiner, kjent som molekylære "chaperones" (for eksempel heat shock protein; Hsp) og kinaser (som mitogenaktiverede proteinkinaser; MAPK). "Chaperones" beskytter reseptoren og forhindrer kjernelokalisering ved å dekke til reseptorseter som er nødvendig for transport gjennom kjernemembranen og inn til kjernen (Wu et al., 2004). Når ligand bindes til reseptoren (GR), endres reseptorstrukturen slik at molekylære "chaperones"-proteiner dissosierer. Dette fører til aktivert GC/GR-kompleks. To glukokortikoidreseptorer bindes sammen og danner en homodimer. Denne blir transportert inn i kjernen, der den binder til DNA ved en spesifikk

sekvens i promotorregionen, GRE ("Glucocorticoid Response Elements") (Beato, 1989, Barnes, 2006) og fører til endringer i gentranskripsjonen (Stahn and Buttgerit, 2008).



**Figur 1-6: Mekanismen for genomiske effekter av glukokortikoider**

Figuren A viser deksametason som krysser over cellemembranen og binder seg til GR. GR er inaktivert når den er ubundet, men løsner fra "chaperons" når den er bundet til ligand. Aktiverte GR-monomerer dimeriserer og går inn i kjernen der den binder til GRE. Dette fører til aktivering av transkripsjonen. Figuren B viser at DBD (DNA-bindende domene) og LBD (ligandbindene domene) er ansvarlige for dimerisering og kjernelokalisering, mens NTD (N-terminal domene) er involvert i transkripsjonsaktivering (AF1). Figuren C viser de to isoformene, GR $\alpha$  og GR $\beta$ , som er et resultat av alternativ spleising av ekson 9. Figurene er modifiserte fra Oakley and Cidlowski, 2010.

Det er foreslått at steroider i tillegg kan indusere ikke-genomiske effekter (Falkenstein et al., 2000). Raske effekter av steroider har blitt observert, og disse effektene kan ikke forklares ut fra gentranskripsjon (genomiske effekter). Mekanismene som kan forklare steroiders ikke-genomiske effekter kan klassifiseres som: 1. Ikke-spesifikke interaksjoner mellom GC og cellulære membraner, 2. Ikke-genomisk effekt som er mediert av cytosolisk GR, eller 3. Spesifikke interaksjoner med membranbundne GR (Stahn and Buttgerit, 2008).

Studier med rotte- og kyllingkornceller har foreslått at celledød induisert av glukokortikoidet deksametason (se avsnitt 1.5.2) kan medieres via ikke-klassiske effekter (Jacobs et al., 2006b), og via en GR som er lokalisert i plasmamembranen (Aden et al., 2008). Andre har også foreslått at plasmamembranassosierte reseptorer for steroidhormoner er viktige (Szego and Stein, 1978). mGR er en GR som sitter i plasmamembranen i blant annet nevroner og lymfocytter (Gametchu, 1987). mGR har en helt annen farmakologi, for eksempel lavere

---

affinitet for deksametason, enn den klassiske intracellulær GR (iGR) (Chen et al., 1999, Powell et al., 1999, Aden et al., 2008). Både mGR og klassisk GR har epitoper som gjenkjenner tre anti-GR antistoffer. De binder til de samme steroidklassene, til GRE og de samme hsp-proteinene (Gametchu et al., 1999). Det er derfor antatt at mGR er en modifisert form av GR (Falkenstein et al., 2000).

Eksistensen av alternative bindings seter for glukokortikoider kan gi en økning i glukokortikoidmedierte effekter ved en annen konsentrasjon enn effekter som er mediert gjennom tradisjonelle mekanismer ved gentranskripsjon. Det kan virke som om visse nerveceller kan ha en spesiell mekanisme for deksametasonindusert celledød, som går via en NMDA-reseptor som ikke er uttrykt i andre celletyper (Jacobs et al., 2006b). Den hurtige rekrutteringen av apoptosemediatorer (30 min. -2 timer) indikerer også at det er en ikke-klassisk mekanisme (Aden et al., 2008).

## **1.6 Glukokortikoidindusert nevrotoksistet**

Glukokortikoider er essensielle for mange aspekter i normal utvikling av hjernen og nervesystemet. De organiserer dannelse av kontakter mellom nevroner og nevronal ontogeni (Gould et al., 1991, Bohn et al., 1994b). Overeksponering av fosterets hjerne med glukokortikoider ved viktige stadier i utviklingen av sentralnervesystemet kan føre til langvarige effekter på adferd og nevroendokrine funksjoner (Matthews, 2000). Det limbiske systemet (særlig hippocampus) i den umodne hjernen er sensitivt overfor endogene og eksogene glukokortikoider. I hvilken grad glukokortikoideksponeringen påvirker fosteret og den utviklende hjernen, er avhengig av uttrykket av glukokortikoidreseptorer på eksponeringstidspunktet (Matthews, 2000). Nivået av GR uttrykket i rotters hjerne er lav under hele svangerskapet, men har en rask økning etter fødselen (Bohn et al., 1994a).

Glukokortikoider kan også modifisere hjernestrukturen. En rekke dyrestudier har vist at stress og økning i glukokortikoider fører til store endringer i hippocampus, som atrofi av dendrittiske utløpere. Dette kan gi forstyrrelser i synaptisk plastisitet, nevronal død (Uno et al., 1990, Sapolsky, 1999), og en signifikant reduksjon i volumet av hippocampus (Uno et al., 1990). Glukokortikoider aktiverer differensiering og proliferasjon (De Kloet et al., 1988, De Kloet et al., 1998), og glukokortikoideksponering kan skade modne nevroner indirekte (De Kloet et al., 1998). Det har også blitt vist at glukokortikoider kan blokkere opptaket av glukose hos

---

nevroner (Abraham et al., 2001), og medføre en reduksjon i energimetabolismen slik at nevronene blir mer sårbare (Horner et al., 1990, Lawrence and Sapolsky, 1994). Korncellekulturer fra rotter som har blitt eksponert for deksametason prenatalt, har vist økt sensitivitet til oksidativ stressindusert celledød (Ahlbom et al., 2000).

### **1.6.1 Interaksjon mellom GR og NMDAR?**

Glukokortikoiders kliniske effekt kan medieres på ulike måter, og mekanismen bak glukokortikoidindusert celledød er ikke fullstendig klarlagt. Det finnes indikasjoner på at deksametason har direkte toksiske effekter på nevroner, og at stoffet kan svekke mekanismer som beskytter cellen mot hypoksi og hypoglykemi (Grier and Halliday, 2005). En rekke studier indikerer at det kan være en sammenheng mellom glukokortikoidindusert celledød og NMDA-reseptoren. I nevronkulturer fra rotter har kortikosteron ført til forlenget åpningstid hos NMDA-reseptoren, og dermed økt intracellulær  $Ca^{2+}$ -konsentrasjon (Abraham et al., 2001, Takahashi, 2002). Glukokortikoideksponering kan også endre antall NMDA-reseptorer (Lu et al., 2003). Tilsetning av den ikke-kompetitive NMDA-reseptorantagonisten MK 801 og den kompetitive NMDA-reseptorantagonisten CGP 39551 fører til en reduksjon i den deksametasoninduserte celledøden i rottekornceller (Jacobs et al., 2006b). Det faktum at NMDA-reseptorantagonister kan blokkere deksametasonindusert toksisitet kan indikere at membranbundne NMDA-reseptorer er involvert i denne toksisiteten. Flere studier taler for at denne interaksjonen er av en ikke-genomisk art (Takahashi, 2002, Jacobs et al., 2006b). Funn som taler for dette er en rask celledød og at det høye  $Ca^{2+}$ -nivået ikke blir redusert ved tilsetning av cyklohexamid (hemmer proteinsyntesen) (Takahashi, 2002). Denne studien har også foreslått at det kan være en signalvei avhengig av proteinkinase, fra overflaten glukokortikoidreseptoren til NMDA-reseptorer.

Tidligere masteroppgaver har vist at ko-transfeksjon med GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A i deksametasoneksponerte CV1-celler ga lavere luciferasegenekspressjon sammenlignet med celler som var transfektert med GR alene (Wehus, 2007, Feng, 2009, Wendelbo Aanensen, 2010). Denne interaksjonen kunne ikke ses i PC12-celler, en celletype med nevronkaraktistika (Wendelbo Aanensen, 2010). Det er viktig å undersøke dette videre i nevronkulturer.



---

## 1.7 Hensikt med studien

Det overordnede målet med studien var å studere mekanismer deksametasonindusert celledød i PC12-celler og kornceller fra lillehjerne hos kylling.

Delmålene har vært å:

1. Teste om det foreligger en interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og glukokortikoidreseptoren ved å benytte reportergener og ko-immunpresipitering.
2. Bruke kyllingkornceller som modell for å:
  - Studere kyllingkorncellenes morfologi og differensiering over tid i kultur.
  - Studere deksametasonindusert celledød på ulike utviklingsstadier i kultur, og se om denne lar seg blokkere av NMDA-reseptorantagonister, MR- og GR-antagonister.
  - Påvise om det er en korrelasjon mellom uttrykket av NMDA-reseptorsubenheter og GR, i forhold til deksametasonindusert celledød i kyllingkornceller på ulike utviklingsstadier i kultur.

---

## 2. MATERIALER OG METODER

### 2.1 Kjemikaler og biologiske produkter

Tabell 2-1: Kjemikaler og biologiske produkter

<b>Produkt:</b>	<b>Produsent</b>
Adenosin-5-trifosfat (ATP)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Akrylamid 30 % BIS solution	Bio-Rad, California, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
BCA Protein Assay kit	Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA
BES (N,N-bis-(2-hydroksyetyl)-2-aminoetansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Blottebuffer (TG 10X)	Bio-Rad, California, USA
BME (Basal Medium Eagle med Earle's salter med glutamin)	Invitrogen Co., California, USA
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Bromfenolblått	Merck & Co. Inc., New Jersey, USA
CGP 39551	Novartis International AG Basel, Sveits
Cytosin- $\beta$ -D-arabino-furanoside (Ara-C)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Deksametason (dex)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Deoksyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	Invitrogen Co., California, USA
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham, GE Healthcare, Norge
ELFO-buffer (TGS 10X)	Bio-Rad, California, USA
Etanol 96 % (EtOH)	Arcus, Kemetyl Norge AS
Fenolrødt	Merck & Co. Inc., New Jersey, USA
GFP-trap A ®	Chromotek, Tyskland
Glukose	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
Glutamin (L-glutamin)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Glyserol	VWR International Ltd, Poole, England

Hesteserum	Gibco BRL Life Technologies Ltd
Insulin, fra bovine pancreas	Paislet, Skottland
ITS (Insulin Transferrin Selenitt)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Kaliumhydrogenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Kaliumklorid (KCl)	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
Kalsiumklorid (CaCl <sub>2</sub> )	VWR International Ltd, Leuven, Nederland
Kalveserum, føtalt (FBS)	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
Leupeptin (LP)	Invitrogen Co., California, USA
Luciferin (D-luciferin)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Magnesiumacetat (Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> )	Duchefa Haarlem, Nederland
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
2-merkaptøtanol	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
MES (2-(N-morpholino)etansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Metafectene® Pro	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Metanol	Biontex laboratories, Tyskland
Mifepriston (RU 486)	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
MK 801 (dizocilpin((5R, 10S)-(+)-5-metyl- 10,11-dihydro-5H-dibenzo(a, d)syklohepten-5,10-imim hydrogenmaleat))	Tocris Bioscience, USA
Natrium deoxycholate monohydrat (DOC)	RBI Massachusetts, USA
Natrium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumhydrogenfosfatdihydrat (Na <sub>2</sub> HPO)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
Natriumklorid (NaCl)	J.T. Baker, Nederland
Natriumpyruvat (100 mM)	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
Natriumortovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumselenitt (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Nerve Growth Factor (NGF)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Invitrogen Co., California, USA

Pepstatin A	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Phenylmetansulfonmylflourid (PMSF)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Poly-L-lysin hydrobromid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Precision Plus Protein All Blue Standard	Bio-Rad, California, USA
Putrescin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA
RU 28318 ((7 $\alpha$ , 17 $\alpha$ )-17-hydroksy-3-okso-7-propylpregn-4-ene-21-karboksylysyre kaliumsalt)	Tocris Bioscience, USA
Saltsyre (HCl)	Merck & Co., Inc., New Jersey, USA
Stop & Glo-buffer og -substrat	Promega Co., Wisconsin, USA
Supersignal West Femto	Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA
Supersignal West Pico	Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyl-etylenediamin)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Transferrin (humant)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tri-jodid-L-tyronin-natriumsalt (T <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tris-base (tris[hydroksymetyl]aminometan)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypsin T9201	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Invitrogen Co., California, USA
Trypsininhibitor T9003	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tween 20 (polyoksyetylen sorbitan monolaurat)	Calbiochem, California, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge

## 2.2 Utstyr- og apparaturliste

Tabell 2-2 Utstyr- og apparaturliste

Utstyr	Produsent
Autoklav	Matachana 350 L-2, Thune, Norge
Cellekulturflaske 175 cm <sup>2</sup> og skåler	Nunc, Roskilde, Danmark
Celleskrape	Corning Incorporated, USA
CO <sub>2</sub> -inkubatorskap	Thermo Forma, Rockford, USA
Finnpipette	Thermo Electron, Rockford, USA
Fluorescensmikroskop	Nikon eclipse TE 300 med SPOT RT, Japan
Fremkallingsmaskin	Chemi Genius <sup>2</sup> , Bio Imaging System, USA
Gassbrenner	Integra Bioscience, Sveits
Kamera, mikroskop	Nikon Digital Sight DSQi1Mc, Japan
LAF-benk	Holten safe 2000, modell 1.2, USA
Luminometer	Lumat LB 9507 EG&G, Tyskland
Lysmikroskop	Nikon TMS-F 104, Japan
Magnetrører	RCT basic, IKA Labortechnik, Tyskland
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad, California, USA
pH-meter	Metrohm 744, Sveits
Plasmid-kit	Jetstar Maxiprep Kit 105, Genomed, Tyskland
Plateleser: HTS 7000 Plus Bio-Assay	Perkin Elmer, USA
Rør til luminometer	Sarstedt, Tyskland
Roller mixer SRT9	Stuart, USA
Rugermaskin: Covatutto 54	Novital, England
Sentrifuge (13000 rpm = 10 000 x g)	Biofuge fresco, Heraeus, England
Sterilfilter 0,2 µm	Whatman, Tyskland
Strømkilde (Power – AC 300) og blotteapparat (Semidry Blot)	Bio-Rad, California, USA
Tellekammer	Bürker
Trysineringsflaske	Bellco, USA
Vannbad	Sub Aqua 12, Grant, England
Vannrensanlegg	Aquatron A45, Sverige
Vekt AB54-S	Mettler Toledo, USA
Wirl-mikser: MS2 Minishaker	Tamro lab AS, Sverige

---

## 2.3 Korncellekulturer

Primærkulturer av kornceller fra rotte ble etablert for første gang for snart 30 år siden (Gallo et al., 1982, Thangnipon et al., 1983), og har siden da vært brukt som en *in vitro* modell for studier av mange aspekter av utvikling, funksjon og patologisk nevrobiologi (Contestabile, 2002).

Kornceller fra kylling er en egnet modell for studier av nevronal celledød og utvikling (Jacobs et al., 2006a). Utvikling og nevronal modning er godt beskrevet for kyllingens lillehjerne (Chuong et al., 1987, Jacobs et al., 2006a).

### 2.3.1 Poly-L-lysin-behandling av kulturskåler

For at korncellene skal feste seg bedre til skålene, behandles kulturskålene med poly-L-lysin dagen før preparering av kulturene. Antall skåler som skal behandles regnes ut fra antagelsen at én kyllinghjerne gir inntil 3-6 medium skåler eller 1-2 store skåler.

#### Prosedyre for poly-L-lysin-behandling av kulturskålene

1. 10 ml autoklavert MQ-vann overføres til en steril flaske med 5 mg poly-L-lysin. Løsningen blandes godt.
2. Løsningen overføres tilbake til en flaske med 490 ml autoklavert MQ-vann, slik at sluttkonsentrasjonen blir 0,01 mg/ml. Løsningen blandes godt.
3. 1 ml av denne løsningen tilsettes til små skåler (8,8 cm<sup>2</sup>), 2 ml til medium skåler (21,5 cm<sup>2</sup>) og 5 ml til store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>). Skålene beveges rundt slik at hele bunnen dekkes.
4. Poly-L-lysin-løsningen suges av etter 30–60 minutter, og skålene tørkes over natt i en LAF-benk.

---

### 2.3.2 Preparering av korncellekulturer

Befruktede kyllingegg (*Gallus gallus*, Ross 308 strain) fra Nortura i Våler, ruges i rugemaskin ved 37 °C i 18 dager. For å opprettholde optimal luftfuktighet i rugemaskinen, tilsettes vann i eget kammer. Fra dag 4 til dag 17 snus eggene maskinelt morgen og kveld. På dag 7 gjennomlyses eggene, og ubefruktede egg fjernes. Dag 18, tre dager før normal klekkesetid, tas eggene ut av rugemaskinen.

Eggene gjennomlyses, og de eggene som inneholder levende kyllingfostre, bedøves ved at eggene legges i is i ca. 7 minutter. 10 egg tas av gangen og eggene vaskes med 70 % sprit før de knekkes. Kyllingene tas ut av eggene og avlives ved dekapitering. Hodene fraktes til en LAF-benk, der lillehjernen tas ut til preparering av korncellekulturer. Alt arbeid med preparering av kyllingkornceller foregår i LAF-benk og med sterilt utstyr (Tabell 2-3).

#### Prosedyre for preparering av korncellekulturer

1. Lillehjernen dissekeres ut ved hjelp av steril saks og pinsett, og overføres til en stor petriskål med løsning 1 (Løsning 1-5: Tabell 2-4 og Tabell 2-5).
2. Hjernehinnene fjernes forsiktig med to pinsetter og lillehjernen overføres til en ny petriskål med løsning 1.
3. Løsning 1 suges av fra skålen og lillehjernen kuttes i mindre biter med en skalpell. Det kuttes i to retninger vinkelrett på hverandre.
4. 10 ml av løsning 1 tilsettes skålen, og bitene overføres til et sterilt 50 ml rør som inneholder 10 ml av løsning 1.
5. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt. Supernatanten fjernes, og pelleten resuspenderes i 8 ml av løsning 2. Det pipetteres forsiktig opp og ned til pelleten har løst seg.
6. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske. Flasken settes i vannbad ved 37 °C i 15 minutter. Korkene skrues halvveis igjen og flasken ristes forsiktig med jevne mellomrom.
7. Bitene fra trypsineringsflasken suges opp og overføres til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 4. Røret fylles opp til 50 ml med løsning 4 og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter. Hvis supernatanten ikke er klar etter sentrifugering, kan en liten mengde av løsning 3 tilsettes i røret og sentrifugeringen gjentas.
8. Supernatanten suges av og røret tilsettes 3 ml av løsning 3.

9. Pelleten løses forsiktig ved å pipettere opp og ned 15–20 ganger med en pasteurpipette med avrundet og smal spiss (avrundes i flamme). Når celleklumpene har sunket ned i bunnen av røret, overføres den øverste, klumpfrie delen av løsningen til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 5.
10. Ved behov kan trinn 8-9 gjentas helt til at det ikke lenger er synlige celleklumper til stede. Resten av løsningen overføres til røret med løsning 5.
11. Cellesuspensjonen med løsning 5 sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.
12. Supernatanten suges av, og 10 ml platemedium tilsettes.
13. Pelleten løses opp, og alt overføres til en glassflaske med samme medium som inneholder halvparten av den mengden medium som er beregnet ut fra antall preparerte skåler og antall tilgjengelige hjerner. Det behøves 10–12 ml medium per hjerne. En liten prøve tas ut til celledtelling i et Bürkers tellekammer.
14. Cellesuspensjonen fortynnes med platemedium slik at den endelige celledtettheten blir  $1,7 \times 10^6$  celler per ml medium. Dette oppnås ved hjelp av formelen:

$$ml \text{ platemedium} = \frac{ml \text{ cellesuspensjon} \times \text{celletetthet per ml cellesuspensjon}}{\text{Ønsket celledtetthet per ml}}$$

15. Cellesuspensjonen overføres til skåler som er forbehandlet med poly-L-lysin (fra dagen før, 2.3.1) (Tabell 2-7).
16. Skålene inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabell 2-3: Sterilt utstyr til preparering av korncellekulturer**

Saks og pinsett til disseksjon
To pinsetter for fjerning av hjernehinner
Skalpell
Trypsineringsflaske
Glassflasker for løsningene 1-5 og platemedium
Petriskåler
50 ml glassrør
Pasteurpipette
Autoklaveres ved 120 °C i 20 minutter.
Glassrør er sterilt engangsutstyr og skal ikke autoklaveres før bruk.



**Tabell 2-4: Krebs-Ringerløsning 10 X**

Innholdsstoffer	Mengde	Konsentrasjon
Fenolrødt	50 mg	0,3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,83 g	12 mM
KCl	1,80 g	48 mM
Glukose	12,85 g	0,14 M
NaCl	35,35 g	1,21 M
NaHCO <sub>3</sub>	10,70 g	0,25 M
Destillert vann	ad 500 ml	
Sterilfiltreres 0,2 µm.		
Løsningen kan lagres i kjøleskap opptil 5-6 måneder.		

**Tabell 2-5: Løsninger 1-5**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Løsning 1	Bovint serum albumin (BSA)	1,5 g
	MgSO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	4 ml
	Krebs-Ringerløsning 10X (Tabell 2-4)	50 ml
	Destillert vann	ad 500 ml
Løsning 2	Trypsin type III	25 mg
	Løsning 1	100 ml
Løsning 3	MgSO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	0,5 ml
	Deoksyribonuklease I (DNase I)	6,25 mg
	Trypsininhibitor (Type 1-S)	26,0 mg
	Løsning 1	ad 50 ml
Løsning 4	Løsning 3	16 ml
	Løsning 1	100 ml
Løsning 5	MgSO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	0,32 ml
	CaCl <sub>2</sub> (1,20 g/100 ml destillert vann)	0,32 ml
	Løsning 1	40 ml
Løsningene 1-5 lages for hver korncellepreparering og sterilfiltreres (0,2 µm) før bruk.		

**Tabell 2-6: Platemedium til kyllingkornceller**

Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
Hesteserum (varmeinaktivert)	50 ml	10 %
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml + 10000 µg/ml)	5 ml	100 U/ml +100 µg/ml
L-glutamin	146 mg	2 mM
KCl	825 mg *	22 mM
Insulin (1 mM)	50 µl	100 nM
Sterilfiltreres (0,2 µm) før bruk.		
Oppbevares kjølig.		
*5,4 mg er allerede til stede i mediet.		

**Tabell 2-7: Antall ml celleduspensjon per skål**

Skåler	Størrelse	Antall ml
Store skåler	66,5 cm <sup>2</sup>	10 ml
Medium skåler	21,5 cm <sup>2</sup>	3,3 ml
Små skåler	8,8 cm <sup>2</sup>	1 ml

### 2.3.3 Tilsetning av Ara-C

Cytosin-β-D-arabino-furanoside (Ara-C) tilsettes 16–20 timer etter preparering av cellene. Ara-C er et potent cytostatikum og brukes blant annet for å hindre vekst av ikke-nevronale celler, som for eksempel astrocytter. Det byttes fra platemedium (Tabell 2-6) til lik mengde definert ernæringsmedium (Tabell 2-8) samtidig som Ara-C-løsning tilsettes.

#### Prosedyre for tilsetning av Ara-C

- 1 mg Ara-C løses i 10 ml definert ernæringsmedium og løsningen sterilfiltreres (0,2 µm). Det brukes støvmaske og hansker ved utveiling av Ara-C tørrstoff.
2. Det tilsettes 25 µl Ara-C-løsning per ml definert ernæringsmedium, det vil si 250 µl Ara-C-løsning i store skåler, 83 µl i medium og 25 µl i små skåler.

**Tabell 2-8: Definert ernæringsmedium til kyllingkorncellekulturer**

Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
L-glutamin	146 mg	2 mM
KCl	825 mg *	22 mM
Humant transferrin	50 mg	100 µg/ml
Putrescin	4,8 mg	60 µM
Natriumselenitt (100 µM)	150 µl	30 nM
Trijodtyronin (T <sub>3</sub> ) (20 µg/ml)	17 µl	1 nM
Insulin	12,5 mg	25 µg/ml

T<sub>3</sub> og natriumselenitt tilsettes fra stamløsninger.  
Sterilfiltreres (0,2 µm) før bruk.  
Oppbevares kjølig.  
\*5,4 mg er allerede til stede i mediet.

## 2.4 PC12-celler

PC12 (ATCC CRL-1721) er en cellelinje som er avledet fra feokromocytom, en svulst i binyremargen hos rotte. Denne svulsten er forbundet med økt produksjon av adrenalin og noradrenalin. PC12-cellene ligner på nevroner i det sympatiske nervesystemet ved at de innehar enzymapparatet som behøves for å syntetisere, lagre og sekreere katekolaminene dopamin og noradrenalin. I tillegg slutter PC12-celler å dele seg, og differensierer når de blir behandlet med nervevekstfaktor. Dette gjør at PC12-cellelinjen er en velegnet modell for studier innenfor nevrobiologien, særlig studier av nevronal differensiering (Greene and Tischler, 1976). I dette arbeidet som skal utføres, er det brukt både udifferensierte og differensierte PC12-celler.

### 2.4.1 Splitting av PC12-celler

PC12-cellene dyrkes i 175 cm<sup>2</sup> cellekulturflasker og inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Cellene splittes fra konfluente cellekulturflasker to ganger i uken. Splittingen foregår aseptisk i LAF-benk.

---

### Prosedyre for splitting av PC12-celler til cellekulturflasker

1. Cellekulturflasken undersøkes i mikroskop for å se om cellene er konfluente.
2. Gammelt medium tømmes av flasken, og rester suges av ved hjelp av en pipette.
3. 10 ml av PC12-medium (Tabell 2-9) tilsettes flasken. Cellene løsnes ved å banke på sidene av flasken. Cellene inspiseres ved hjelp av mikroskop for å kontrollere at de har løsnet fra bunnen.
4. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned ca. 10 ganger for å løse opp celleaggregater og for å få en jevn fordeling av cellene. Hele bunnen av flasken skylles når cellesuspensjon pipetteres ned.
5. Cellene inspiseres ved hjelp av mikroskop for å kontrollere at celleaggregater er løst. Ved behov pipetteres cellesuspensjonen opp og ned 15–20 ganger med en avrundet og smal pasteurpipette (spissen avrundes i flamme) for å få en mest mulig homogen cellesuspensjon.
6. 20 ml av PC12-medium tilsettes i en ny cellekulturflaske.
7. 1,5 ml av cellesuspensjonen overføres til den nye flasken med PC12-medium og blandes.
8. 1,5 ml av den opprinnelige cellesuspensjonen beholdes i den gamle flasken og resten kastes. 20 ml PC12-medium tilsettes til den gamle flasken. Denne brukes som reserveflaske.

**Tabell 2-9: PC12-medium med serum**

Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Dulbecco's MEM (DMEM)	500 ml	
Føtalt kalveserum (FBS)	50 ml	10 %
Hesteserum (HS)	25 ml	5 %
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml	1 mM
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml +10000 µg/ml)	5 ml	100 U/ml +100 µg/ml
Oppbevares kjølig.		

### Prosedyre for splitting av PC12-celler til skåler

9. Cellene splittes som beskrevet i punkt 1-5. Ved splitting til skåler bestemmes først celletettheten i cellekulturflasken. En liten prøve av cellesuspensjonen tas ut til telling i et Bürkers tellekammer ved hjelp av mikroskop. Det telles to rutenett (4 x 4 ruter), ett på hver side av midten på tellekammeret. Celletettheten i flasken blir beregnet ut ifra gjennomsnittet av de to tellingene.

---

10. Ønsket celletetthet i skålene er  $7 \times 10^4$  celler/ml. Den mengden celsesuspensjon som skal tas fra flasken, beregnes ut fra denne formelen:

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

11. Celsesuspensjon fra flasken skal tilsettes nytt PC12-medium før splitting til skåler. Nødvendig volum PC12-medium beregnes ved denne formelen:

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

12. Celsesuspensjonen og PC12-medium blandes godt for å oppnå en jevn fordeling av celler, og overføres til sterile skåler.

13. Skålene inkuberes ved  $37^\circ\text{C}$  og  $5\% \text{ CO}_2$ .

## 2.4.2 Differensiering av PC12-celler

NGF (nerve growth factor) tilsettes PC12-celler for at de skal differensieres og sende ut utløpere. De får induert en nevronal fenotype og på denne måten ligner de mer på nerveceller. Når PC12-celler dyrkes i medium med  $1\%$  hesteserum og NGF, blir cellene avhengig av NGF som vekstfaktor. Ved NGF-deprivasjon vil utløperne trekke seg tilbake, og cellene vil dø (Greene and Tischler, 1976). Differensierte PC12-celler uttrykker endogen glukokortikoidreseptor (Morsink et al., 2006).

### Prosedyre for differensiering i små skåler

1. Gammelt medium pipetteres av skålene.
2.  $1 \text{ ml}$  PC12-medium med  $1\%$  hesteserum (Tabell 2-10 og Tabell 2-11) og  $50 \text{ ng/ml}$  NGF (Tabell 2-12) settes til hver skål.
3. Skålene settes i inubatorskap ved  $37^\circ\text{C}$  og  $5\% \text{ CO}_2$ . De inkuberes i 3 dager før eventuell NGF-deprivering eller eksponering for deksametason.

**Tabell 2-10: Serumfritt PC12-medium**

Innholdsstoffer	Mengder	Sluttkonsentrasjon
DMEM	500 ml	
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml	1 mM
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml +10000 µg/ml)	5 ml	100 U/ml + 100 µg/ml
Lagres ved 4 °C.		

**Tabell 2-11: PC12-medium med 1 % hesteserum**

Innholdsstoffer	Mengder
Serumfritt PC12-medium	50 ml
Hesteserum, varmeinaktivert ved 60 °C i 10 minutter	0,5 ml
Lagres ved 4 °C.	

**Tabell 2-12: NGF stamløsning (20 ng/µl)**

Innholdsstoffer	Mengder
NGF	10 µg (=1 hetteglass)
CV1-medium (Tabell 2-13)	0,5 ml
Blandingen fordeles i alikvoter på 100 µl. Lagres ved -20 °C.	
Stamløsningen har en konsentrasjon på (20 ng/µl), dvs. 2,5 µl NGF-stamløsning per ml medium.	

## 2.5 CV1-celler

CV1-celler (ATCC CCL-70) er en fibroblastcellelinje som stammer fra nyreceller hos en afrikansk apeart, *Cercopithecus aethiops* (Hopps et al., 1963). Cellelinjen er stabil, vokser jevnt og blir konfluente 3-4 dager etter splitting til celleflaske. CV1-celler uttrykker vanligvis ikke GR eller NMDA-reseptorer naturlig (Giguere et al., 1986, Feng, 2009), men lar seg lett transfektere for å få ønsket egenskap.

### 2.5.1 Splitting av CV1-celler

CV1-cellene dyrkes i 175 cm<sup>2</sup> cellekulturflasker og inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Cellene splittes til ny flaske hver 3. eller 4. dag.

---

### Prosedyre for splitting av CV1-celler til cellekulturflasker

1. Cellekulturflasken undersøkes i mikroskop for å se om cellene er konfluente.
2. Gammelt medium tømmes av flasken, rester suges av ved hjelp av en pipette.
3. 2 ml Trypsin-EDTA tilsettes. Flasken beveges slik at hele bunnen skylles. Deretter tømmes trypsinen av.
4. 2 ml Trypsin-EDTA tilsettes igjen. Dette pipetteres av etter ca. 30 sekunder.
5. Flasken inkuberes i 5-10 minutter ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.
6. Flasken tas ut og bankes på siden slik at cellene løsner fra bunnen.
7. Løsner ikke cellene gjentas punkt 4-6.
8. 10 ml av CV1-medium (Tabell 2-13) tilsettes flasken.
9. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned ca. 10 ganger for å løse opp celleaggregater og for å få en jevn fordeling av cellene. Hele bunnen av flasken skylles når cellesuspensjon pipetteres ned.
10. 20 ml av CV1-medium tilsettes i en ny cellekulturflaske.
11. 1,5 ml av cellesuspensjonen overføres til den nye flasken med CV1-medium og blandes.
12. 1,5 ml av den opprinnelige cellesuspensjonen beholdes i den gamle flasken og resten kastes. 20 ml CV1-medium tilsettes til den gamle flasken. Denne brukes som reserveflaske.

**Tabell 2-13: CV1-medium med serum**

Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Dulbecco's Modified Eagles' Medium (DMEM)	500 ml	
Føtalt kalveserum (FBS)	50 ml	10 %
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml	1 mM
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml +10000 µg/ml)	5 ml	100 U/ml +100 µg/ml
Oppbevares kjølig.		

### Prosedyre for splitting av CV1-celler til skåler

13. Cellene splittes som beskrevet i punkt 1-9. Ved splitting til skåler bestemmes først celledettheten i cellekulturflasken. En liten prøve av cellesuspensjonen tas ut til telling i et Bürkers tellekammer ved hjelp av mikroskop. Det telles to rutenett (4 x 4 ruter), ett på hver side av midten på tellekammeret. Celledettheten i flasken blir beregnet ut ifra gjennomsnittet av de to tellingene.

- 
14. Ønsket celletetthet i skålene er  $3,5 \times 10^4$  celler/ml. Den mengden cellesuspensjon som skal tas fra flasken, beregnes ut fra denne formelen:

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

15. Cellesuspensjon fra flasken skal tilsettes nytt CV1-medium før splitting til skåler. Nødvendig volum CV1-medium beregnes ved denne formelen:

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

16. Cellesuspensjonen og CV1-medium blandes godt for å oppnå en jevn fordeling av celler, og overføres til sterile skåler.
17. Skålene inkuberes ved  $37^\circ\text{C}$  og 5 %  $\text{CO}_2$ .

## 2.6 Transfeksjon av CV1-, PC12- og kyllingkornceller

Transfeksjon er en prosess som tar sikte på å introdusere nukleinsyrer til eukaryote celler, ved bruk av ikke-virale metoder, for å mangfoldiggjøre DNA-molekyler. Ved bruk av ulike kjemikalier, lipider eller fysiske metoder, er denne genoverføringsteknologien et verktøy for å studere genfunksjoner og proteinuttrykk i en celle, som for eksempel protein-protein-interaksjoner (Groskreutz and Schenborn, 1997) og for studier av molekylære signalveier. I dette arbeidet ble transfeksjon av CV1-celler utført ved bruk av kalsiumfosfat (se avsnitt 2.6.1), mens Metafectene® Pro ble brukt til transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller (se avsnitt 2.6.2).

### 2.6.1 Transfeksjon av CV1-celler med kalsiumfosfat

Bruken av kalsiumfosfat som transfeksjonsteknikk ble utviklet i 1973 (Graham and van der Eb, 1973). Denne metoden er basert på at DNA blandes med kalsiumklorid, tilsettes en bufret fysiologisk saltvann/fosfat-løsning og inkuberes i romtemperatur. Inkuberingen fører til at kalsiumfosfat danner presipitat (bunnfall) med DNA. Kalsiumionets positive ladning bindes til de negative fosfatgruppene på DNA-molekylet, og dette tas opp av cellene ved endocytose (Chen and Okayama, 1987).



---

Cellene ble transfektert dagen etter splitting til skåler. For Westernblotting ble cellene dyrket i store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) med 10 ml medium. For mikroskopi og luciferasemålinger ble cellene dyrket i medium skåler (21,5 cm<sup>2</sup>) med 3,3 ml medium.

### Prosedyre for transfeksjon av CV1-celler med kalsiumfosfat

1. Den totale DNA-konsentrasjonen i medium skal være 1 µg/ml og det blandes ut i 1/10 av volumet i skålene.
2. Mengde transfeksjonsløsning beregnes ut fra denne formelen:

$$X(ml) = \frac{\text{antall skåler} \times \text{antall ml medium per skål}}{10}$$

3. Transfeksjonsløsningen lages ved å blande like mengder BBS og 0,25 M CaCl<sub>2</sub> (Tabell 2-14).
4. Det tilsettes 10 µg DNA til 1 ml transfeksjonsløsning. Mengde DNA som brukes er angitt i (Tabell 2-15).
5. Volumet av hver plasmidløsning som skal tilsettes beregnes etter denne formelen:

$$Y(ml) = \frac{\text{Ønsket konsentrasjon i transfeksjonsløsninger}(\mu\text{g} / \mu\text{l}) \times \text{volum transfeksjonsløsning}(\mu\text{l})}{\text{Plasmidløsningens konsentrasjon}(\mu\text{g} / \mu\text{l})}$$

6. Når plasmidene er tilsatt, fylles det opp med tomt plasmid (CMV) slik at det blir 10 µg DNA totalt til 1 ml transfeksjonsløsning (optimal DNA-mengde).
7. Eppendorfrøret wirlmikses i 10 sekunder og inkuberes i romtemperatur i 20 minutter.
8. Mengde transfeksjonsløsning som skal tilsettes til hver skål regnes ut etter denne formelen:

$$Z(ml) = \frac{\text{antall ml medium per skål}}{10}$$

9. Transfeksjonsløsningen tilsettes dråpevis i hver skål mens de beveges forsiktig.
10. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.
11. Mediet skiftes etter 24 timer.

**Tabell 2-14: Løsninger til transfeksjon av CV1-celler**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
BBS	BES	5,33 g
	Na <sub>2</sub> HPO	0,1335 g
	NaCl (5 M)	28 ml
	MQ-vann	ad 500 ml
Volumet fordeles i 5 flasker der pH justeres med NaOH til 6,75; 6,85; 6,95; 7,00; 7,05 og sterilfiltreres (0,2 µm). Transfeksjonseffektiviteten ved ulike pH testes ved å transfektere inn gener som gir luciferaseproduksjon. Luciferaseaktiviteten måles i et luminometer. Løsningen med best transfeksjonseffektivitet brukes videre til transfeksjon. Oppbevares kjølig.		
0,25 M CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	1,375 g
	Destillert vann	50 ml
Sterilfiltreres (0,2 µm). Oppbevares kjølig		

### 2.6.2 Transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller med Metafectene® Pro

Metafectene® Pro er en kationisk lipidblanding (Alatorre-Meda et al., 2010). Kationiske liposomer kondenserer negativt ladete DNA-molekyler til kompakte strukturer, og beskytter DNA fra å bli degradert av nukleaser. Den fremmer adhesjon av DNA-lipid-komplekser til cellemembranen, og opptak DNA ved endocytose (Felgner et al., 1987, Radler et al., 1997). En av fordelene med kationiske liposomtransfeksjonsreagenser er lav toksisitet (Djurovic et al., 2004).

Kyllingkornceller og PC12-celler transfekteres dagen etter de prepareres eller splittes til skåler. BME/DMEM uten serum og antibiotika brukes for dannelse av liposom-DNA-komplekset. Serum destabiliserer liposom-DNA-komplekset, mens antibiotika inaktiverer transfeksjonsreagenset og forårsaker celledød. For mikroskopi og luciferasemålinger ble cellene dyrket i små skåler. Kyllingkorncellene ble transfektert med kun GRE-luc siden kornceller uttrykker GR og NMDA-reseptor naturlig.

---

### Prosedyre for transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller med Metafectene® Pro

1. 2 µl Metafectene® Pro tilsettes i 50 µl DMEM/BME for hver skål (8,8 cm<sup>2</sup>). Løsningen blandes ved å pipettere forsiktig opp og ned et par ganger (Metafectene® Pro tåler ikke wirlmiksing).
2. 1 µg DNA lages (Tabell 2-15 for PC12-celler og Tabell 2-16 kyllingkornceller) og tilsettes i 50 µl DMEM/BME for hver skål. Blandes ved å wirlmikse i 10 sekunder.
3. Metafectene® Pro løsningen overføres til DNA-løsningen, og blandes ved å pipettere forsiktig opp og ned et par ganger.
4. Transfeksjonsløsningen inkuberes ved romtemperatur i 20 minutter.
5. 100 µl av transfeksjonsløsning tilsettes dråpevis til hver skål, mens de beveges forsiktig rundt.
6. Transfeksjonsløsningen fjernes etter 3 timer og erstattes med ernæringsmedium for celletypen (Tabell 2-8 for kyllingkornceller og Tabell 2-9 for PC12-celler).

**Tabell 2-15: Plasmider som ble brukt til transfeksjon av PC12- og CV1-celler**

Genprodukt	Kilde	Plasmidets forkortelse	Konsentrasjon per ml transfeksjonsløsning
Ildflueluciferase under kontroll av GRE promotor	Gave fra J. Milbrandt, Washington University School of Medicine	GRE-luc	4 µg
Renillaluciferase under kontroll av thymidin-kinase promotor	Promega Co, Wisconsin, USA	RL-tk	1 µg
Ingen genprodukt	(Wilson et al., 1991)	CMV	Til totalt 10 µg plasmid
Glukokortikoid reseptor	Gave fra J. Milbrandt, Washington University School of Medicine	GR	2 µg
NMDA-reseptorsubenheter NR1-1a	Gave fra S. Vincini Georgetown School of Medicine	NR1-1a	2 µg
NMDA-reseptorsubenheter NR2A	Gave fra S. Vincini Georgetown School of Medicine	NR2A	2 µg
NMDA-reseptorsubenheter NR3A	Gave fra dr. D. Chang, Burnham institute	NR3A	2 µg
NMDA-reseptorsubenheter NR3B	Gave fra dr. D. Chang, Burnham institute	NR3B	2 µg
Glukokortikoid reseptor merket med gfp	Gave fra M.D. Giligniana, University of Buenos Aires	GR-gfp	5 µg
NMDA-reseptorsubenheter NR3A merket med gfp	Gave fra Perez-Otano, The Stalk Institute for Biological Studies	NR3A-gfp	5 µg

**Tabell 2-16: Plasmider som ble brukt til transfeksjon av kyllingkornceller**

Genprodukt	Kilde	Plasmidets forkortelse	Konsentrasjon per ml transfeksjonsløsning
Ildfluoluciferase under kontroll av GRE promotor	Gave fra J. Milbrandt, Washington University School of Medicine	GRE-luc	9 µg
Renillaluciferase under kontroll av thymidin-kinase promotor	Promega Co, Wisconsin, USA	RL-tk	1 µg

## 2.7 Eksponering av PC12-celler, CV1-celler og kyllingkornceller

Deksametason og antagonister tilsettes 24 timer etter transfeksjonen av PC12-celler, CV1-celler og kyllingkornceller (Tabell 2-17 til Tabell 2-22). Antagonistene tilsettes 15 minutter før tilsetting av deksametason til korncellene. Telling av celledød eller måling av luciferase skjer dagen etter eksponering. I skåler der cellene transfekteres med kalsiumfosfat skiftes mediet rett før tilsetting av ligander for å fjerne den høye kalsiummengden i mediet.

Det tilsettes etanol i kontrollskålene slik at konsentrasjonen i mediet blir 1 %. Dette gjøres siden mange av ligandene som brukes er løst i etanol.

### 2.7.1 Eksponering av udifferensierte PC12-, CV1-celler og kyllingkornceller

#### Prosedyre for eksponering av udifferensierte PC12-, CV1-celler og kyllingkornceller

1. Mediet suges opp i en pipette for å se hvor mye medium som er igjen i skålen (Varierende mengde fordampes).
2. Deksametason, etanol og antagonister tilsettes direkte i mediet i riktig volum for å oppnå ønsket konsentrasjon i mediet (Tabell 2-22).
3. Cellene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer, før celledød detekteres ved hjelp av farging med trypanblå (se avsnitt 2.8) eller fram til høsting.

**Tabell 2-17: 10 mM deksametason**

Deksametason	39,2 mg
96 % etanol	10 ml
Deksametasonløsningen ble fortynnet i 96 % etanol til 1 mM, 100 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM og tilsatt i mediet i forhold 1:1000. Etanolkonsentrasjonen i mediet blir 1 %. Oppbevares ved -20 °C	

**Tabell 2-18: 1 mM MK 801**

MK 801	10 mg
MQ-vann	29,641 ml
Oppbevares ved -20 °C.	

**Tabell 2-19: 100 mM CGP 39551**

CGP 39551	10 mg
MQ-vann	0,420 ml
Oppbevares ved -20 °C.	

**Tabell 2-20: 10 mM RU 28318**

RU 28318	4,4 mg
EtOH	1 ml
Oppbevares ved -20 °C.	

**Tabell 2-21: 10 mM mifepriston**

Mifepriston /RU 486	4,4 mg
EtOH	1 ml
Oppbevares ved -20 °C.	

**Tabell 2-22: Antagonister som brukes ved eksponering**

Hemmere	Farmakologisk virkning	Konsentrasjon i mediet
MK 801	Ikke-kompetitiv NMDA-reseptorantagonist	1 $\mu$ M
CGP 39551	Kompetitiv NMDA-reseptorantagonist	100 $\mu$ M
RU 28318	Mineral (MR) glukokortikoid reseptorantagonist	10 $\mu$ M
Mifepriston/ RU 486	Glukokortikoid reseptorantagonist	10 $\mu$ M

### 2.7.2 Eksponering av differensierte PC12-celler

Differensierte PC12-celler eksponeres for deksametason og hemmere.

#### Prosedyre for eksponering av differensierte PC12-celler i små skåler

1. Gammelt medium pipetteres av.
2. Skålene vaskes 2 ganger med 1 ml serumfritt PC12-medium (Tabell 2-10).
3. 1 ml PC12-medium med 1 % hesteserum tilsettes med ønsket løsning i hver skål (Tabell 2-23).
4. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabell 2-23: Løsninger som ble brukt under eksponering av PC12-celler**

Løsning	Innholdsstoffer
Kontrolløsning	PC12-medium med 1 % hesteserum
EtOH-løsning	PC12-medium med 1 % hesteserum 1 : 1000 EtOH
EtOH + hemmer-løsning	PC12-medium med 1 % hesteserum 1 : 1000 EtOH Hemmer
Deksametason-løsning	PC12-medium med 1 % hesteserum 10 $\mu$ M deksametason
Deksametason + hemmer-løsning	PC12-medium med 1 % hesteserum 10 $\mu$ M deksametason Hemmer

---

## 2.8 Deteksjon av celledød og telling av døde celler

Celledød i PC12-celler og kyllingkornceller ble detektert ved hjelp av farging med trypanblå og påfølgende celledøding i mikroskop. Trypanblå er et hydrofilt stoff som ikke kan passere intakte cellemembraner. Døde celler har tapt membranintegritet og dermed vil fargeløsningen trenge inn i døde cellers cytoplasma og farge dem blå (Tennant, 1964). Levende celler har intakt cellemembran, og disse vil forbli ufargede (Aras et al., 2008). Trypanblåfarging er en egnet metode for å detektere og telle døde celler i et lysmikroskop.

### Prosedyre for farging med trypanblå

1. Trypanblå fargeløsning lages ved å blande like mengder av 2 % trypanblå og 1,8 % NaCl-løsning (Tabell 2-24).
2. Det lages et volum av trypanblå fargeløsning som er passende til antall skåler som skal telles. Dette gjøres rett før bruk.
3. Cellemediet i skålene (21,5 cm<sup>2</sup>) pipetteres av til det er 1 ml igjen.
4. 250 µl trypanblå fargeløsning tilsettes i hver av skålene. Skålene beveges forsiktig slik at det blandes jevnt.
5. Skålene inkuberes i 30 minutter ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.
6. Fargeløsningen helles av skålen, og en og en skål telles av gangen.
7. Antall blåfargede celler (døde) og ufargede celler i minst 4 områder av skålen telles i et lysmikroskop. Det telles i alt ca. 100 celler per skål.
8. Celledøden beregnes etter følgende formel:

$$Celledød = \frac{\text{Antall blå celler}}{\text{Det totale celleantallet}} \times 100\%$$

**Tabell 2-24: Løsninger for trypanblåfarging**

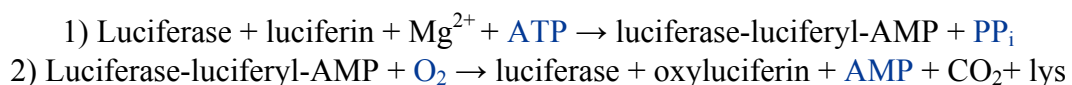
Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Trypanblå 2 %	Trypanblå	1 g
	MQ-vann	50 ml
	Komponentene blandes og varmes opp til kokepunktet under avtrekk og under omrøring. Løsningen settes til avkjøling i romtemperatur før den filtreres. Oppbevares i romtemperatur.	
NaCl 1,8 %	NaCl	1,8 g
	MQ-vann	100 ml
	Oppbevares i romtemperatur.	

## 2.9 Luciferase

Luciferaser er enzymer som katalyserer reaksjoner som kan avgi lys (Fan and Wood, 2007). Slike fotonemitterende substrater kan for eksempel være luciferiner. Lysintensiteten som dannes kan måles i et luminometer. Ved å koble et responselement (for eksempel GRE) til et ønsket gen (for eksempel ildflueluciferasegenet *luc*) kan man detektere GR-transkripsjonell aktivitet som lyssignal av en viss bølgelengde. Lysintensiteten vil da være et mål for hvor mye ildflueluciferase som har blitt uttrykt, og dermed være et indirekte mål for genekspressjonen (Marques and Esteves da Silva, 2009).

### 2.9.1 Ildflueluciferase

Ildflueluciferase er et enzym isolert fra *Photinus pyralis*, en ildfluetype (Fan and Wood, 2007). Dette er den mest brukte bioluminescensreporteren. Enzymet (61 kDa) katalyserer en to trinns oksideringsreaksjon som gir lys, typisk mellom 550–570 nm (Marques and Esteves da Silva, 2009). For at reaksjonen skal gå, trengs det et overskudd av luciferin, ATP, O<sub>2</sub> og Mg<sup>2+</sup> (Gould and Subramani, 1988).





---

## 2.9.2 Renillaluciferase

Renillaluciferase er et enzym som kommer fra *Renilla reniformis*, et koralldyr som har bioluminiserende egenskaper (Lorenz et al., 1991). Enzymet (36 kDa) katalyserer den oksidative dekarboksyleringen av koelenterazin (renillaluciferin) i nærvær av oppløst oksygen som gir koelenteramid (oksyluciferin), karbondioksid og lys (Lorenz et al., 1991).

Renillaluciferase kan benyttes som intern standard for å korrigere for ulike variabler som for eksempel transfeksjonseffektivitet og cellemengde (Fan and Wood, 2007).

## 2.9.3 Høsting av celler til luciferasemåling

Cellene høstes to dager etter at de er transfektert med et reporter-gen som gir luciferase-produksjon.

### Prosedyre for høsting av celler til luciferasemåling fra små skåler

1. Det tilsettes DTT (Tabell 2-25) i konsentrasjon 1 mM til et volum 0,1 % LUC (Tabell 2-25) som er passende til antall skåler som skal høstes. Et passende volum av høstebuffer beregnes ut fra følgende formel:

$$X \text{ (ml)} = 235 \text{ } \mu\text{l til medium skåler (21,5 cm}^2) \times \text{antall skåler som skal høstes}$$

$$X \text{ (ml)} = 100 \text{ } \mu\text{l til små skåler (8,8 cm}^2) \times \text{antall skåler som skal høstes}$$

2. Mediet helles av skålene og restene fjernes med pipette.
3. Skålene vaskes to ganger med 1 ml iskaldt PBS (Tabell 2-26) og skålene beveges forsiktig slik at hele skålen skylles.
4. PBS helles av og restene fjernes med pipette.
5. 100  $\mu\text{l}$  0,1 % LUC med 1 mM DTT tilsettes til midten av hver skål.
6. Skålene inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
7. Cellene skrapes løs med en celleskraper i én retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skrapning.
8. Cellesuspensjonen overføres til et eppendorfrør. Disse sentrifugeres i en kjølesentrifuge ved 4 °C i 5 minutter ved 13000 rpm.

**Tabell 2-25: Løsninger til høsting av celler til luciferase**

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

**Tabell 2-26: PBS-løsning**

Løsning	Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon
PBS (Fosfat-bufret saltvann)	NaCl	32,0 g	138 mM
	KCl	0,8 g	2,7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,08 g	2 mM
	NaHPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	7,12 g	11,5 mM
	MQ-vann	ad 4000 ml	
Justeres til pH 7,4 med HCl/NaOH og autoklaveres.			
Oppbevares kjølig			

## 2.9.4 Måling av ildflueluciferase

Ildflueluciferase måles rett etter cellehøsting, siden enzymet er ustabil.

### Prosedyre for måling av ildflueluciferaseaktivitet

- 1 mM luciferinløsning (Tabell 2-27) plasseres i dispenseren på luminometeret (EG&G Berthold Lumat 171 LB9507).
1. 50 µl av supernatanten fra cellehøstingen blandes med 150 µl LUC-coctail (Tabell 2-27) i et plastrør.
2. Plastrøret med prøveløsningen settes ned i luminometeret. Maskinen innstilles slik at 100 µl tilsettes automatisk og lysintensiteten måles i 2 sekunder (program 2).

**Tabell 2-27: Løsninger for måling av ildflueluciferase**

Løsning	Innholdsstoffer	Mengde
1 mM luciferin	D-luciferin	11 mg
	MQ-vann	36,7 ml
	Oppbevares kjølig og beskyttet mot lys	
LUC-coctail	Adenosin-5-trifosfat (ATP)	240 mg
	Magnesiumacetat (1 M)	2 ml
	Tris/ 1 M MES pH 7,8 (1 M)	8,3 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	Oppbevares ved -20 °C	

### 2.9.5 Måling av renillaluciferaseaktivitet

Renillaluciferaseaktiviteten kan måles rett etter cellehøstingen, eller prøven kan oppbevares ved -20 °C for senere måling.

#### Prosedyre for måling av renillaluciferaseaktivitet

1. Stop & Glo®-reagens (Tabell 2-28) fortynnes 10 ganger med MQ-vann.
2. Luminometeret innstilles for manuell prosedyre. Lysintensiteten måles i 10 sekunder (program 5).
3. 100 µl fortynnet Stop & Glo®-reagens overføres til et plastrør. I røret tilsettes supernatanten fra cellehøstingen. Volumet av supernatanten som tilsettes ligger vanligvis mellom 0,5 µl og 50 µl. Det måles ved flere ulike volum for å sjekke at målingene er i det lineære området. Ut fra dette finner man et passende volum til å foreta alle målingene ved. Verdiene bør ligge i et 5- eller 6-sifret område.
4. Det måles to paralleller av hver prøve og gjennomsnittet brukes som et resultat. Avviker parallellene med mer enn 10 %, måles en tredje parallell og medianen av tre paralleller brukes som resultat.

**Tabell 2-28: Løsninger til måling av renilluciferaseaktivitet**

Løsning	Innholdsstoffer	Mengde
Stop & Glo®-reagens	Stop & Glo®-substrat	20 µl
	Stop & Glo®-buffer	1 ml
	MQ-vann	9 ml
	Oppbevares ved -70 °C	

## 2.10 Westernblotting

Westernblotting, også kjent som immunblotting, brukes for å identifisere spesifikke antigener som gjenkjennes av polyklonale eller monoklonale antistoffer (Gallagher et al., 2008). Westernblotting består vanligvis av fire trinn: separering av proteiner (elektroforese, se avsnitt 2.10.5), overføring av protein til membran (blotting, se avsnitt 2.10.6), binding av antistoffer til målmolekyl (se avsnitt 2.10.9-2.10.10) og visualisering av bundet antistoff (se avsnitt 2.10.11).

### 2.10.1 Høsting av celler til Westernblotting

Ubehandlede kyllingkornceller høstes på dag *in vitro* (DIV) 1, 3, 5, 7 og 9, og transfekterte celler høstes to døgn etter transfeksjon. Alle trinnene skal gjøres på is, om ikke annet er spesifisert, for å unngå proteindegradering.

#### Prosedyre for høsting av celler til Westernblotting fra store skåler

1. Mediet helles av skålene og resten suges av.
2. Skålene vaskes to ganger med 3 ml iskald PBS (Tabell 2-26). Overflødig PBS fjernes ved hjelp av pipette.
3. 100 µl av 2 % SDS-løsning med proteasehemmere (Tabell 2-29) tilsettes hver skål.
4. Celler skrapes løs med en celleskraper. Først skrapes det over hele skålen i én retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skraping.
5. Cellesuspensjonen overføres til et eppendorfrør, som settes på is.
6. Røret kokes ved 95 °C i 2 minutter.
7. Cellene fryses ved -70 °C frem til bruk.

**Tabell 2-29: Løsning til høsting av celler til Westernblotting**

Løsning	Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon
SDS 2 % med protease- og fosfatasehemmere	SDS 20 %	Per ml løsning 100 µl	2 %
	Leupeptin (5 mg/ml)	1 µl	5 µg/ml
	Pepstatin A (1 mg/ml)	5µl	5 µg/ml
	PMSF (100 mM)	3 µl	0,3 mM
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (10 mM)	10 µl	0,1 mM
	PBS (Tabell 2-26)	ad 1 ml	
Protease- og fosfatasehemmere tilsettes for å hindre spalting av prøvens egne enzymer. Et volum av høsteløsning som er passende til antall skåler lages.			

### 2.10.2 Proteinmåling

Før celleprøver brukes til Westernblotting, måles proteininnholdet i hver prøve ved hjelp av "BCA Protein Assay kit" (Pierce). Metoden baserer seg på at kobberioner (Cu<sup>2+</sup>) danner komplekser med amidbindinger i et alkalisk miljø (Lowry et al., 1951), fulgt av reduksjon av BCA-reagens ("Bicinchoninic acid") (Smith et al., 1985). Reagensen endrer farge som funksjon av proteinkonsentrasjon, og endringer i absorbans ved 570 nm kan avleses i en plateleser.

#### Prosedyre for proteinmåling

1. Standardløsning og "working reagent" lages klart (Tabell 2-30).
2. Alle brønnene tilsettes 200 µl "working reagent" (Tabell 2-30).
3. 12 av brønnene i en blank 96-brønnersplate tilsettes standardløsning i de mengdene som tabellen med plateoppsettet viser (Tabell 2-31).
4. 2 µl av celleprøve tilsettes i de neste brønnene. Hver prøve tilsettes i tre ulike brønner (Tabell 2-31).
5. Brettet inkuberes ved 37 °C i 1 time.
6. Absorbans måles ved 570 nm i plateleser (HTS 7000 Plus Bio-Assay reader).
7. Proteinkonsentrasjonen beregnes ved å bruke standardkurven (OD mot µg/brønn) og antall µl prøve i brønnen.

**Tabell 2-30: Løsning til proteinmåling**

Løsning	Innholdsstoffer	Mengde
Standardløsning	Bovint serumalbumin 2 mg/ml	50 µl
	PBS (Tabell 2-26)	150 µl
”Working reagent”	Mengde som skal lages avpasses i forhold til antall brønner som skal brukes: Volum ”working reagent” = antall brønner × 200 µl per brønn BCA Protein Assay reagent A BCA Protein Assay reagent B	50 deler 1 del

**Tabell 2-31: Plateoppsett for proteinmåling**

Blank	10 µl standard (6,67 µg)	Prøve 1	Prøve 4		
Blank	10 µl standard (6,67 µg)	Prøve 2	Prøve 4		
1 µl standard (0,67 µg)	20 µl standard (13,4 µg)	Prøve 2	Osv.		
1 µl standard (0,67 µg)	20 µl standard (13,4 µg)	Prøve 2			
2,5 µl standard (1,67 µg)	40 µl standard (26,8 µg)	Prøve 3			
2,5 µl standard (1,67 µg)	40 µl standard (26,8 µg)	Prøve 3			
5 µl standard (3,35 µg)	Prøve 1	Prøve 3			
5 µl standard (3,35 µg)	Prøve 1	Prøve 4			

---

### 2.10.3 Proteinjustering av prøver

Basert på absorbansmålingene justeres sammensetningen av hver prøveløsning, slik at de får samme proteinkonsentrasjon. Prøven med høyest absorbansmåling inneholder mest protein, og skal dermed fortynnes mest.

1. Utgangspunktet for prøveløsningene oppnås ved å blande tre deler celleprøve med én del laemmlibuffer (4X) (Tabell 2-32). Alternativt kan prøveløsningene justeres ved å blande én del celleprøve med én del laemmlibuffer (2X).
2. Optimal proteinmengde er 50  $\mu\text{g}$ , og maksimalt volum som kan tilsettes i en brønn er 45  $\mu\text{l}$ . Ved hjelp av de målte proteinkonsentrasjonene (se avsnitt 2.10.2), regnes det ut hvor mange  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  prøve det er i hver brønn etter fortynning med laemmlibuffer. Deretter beregnes mengde i  $\mu\text{l}$  som skal tas ut fra prøveløsingen for å få 50  $\mu\text{g}$  protein.
3. Basert på forholdstallet mellom den laveste absorbansmålingen og absorbansmålingen til hver enkelt prøve, beregnes det hvor mye ekstra volum som skal tilsettes i form av laemmlibuffer (1X), slik at proteinkonsentrasjonen og volumet blir den samme i hver prøveløsning som settes på gelen.

**Tabell 2-32: Laemmlibuffere**

<b>Buffere</b>	<b>Innholdsstoffer</b>	<b>Mengde</b>	<b>Sluttkonsentrasjon</b>
Laemmlibuffer 1 X	SDS (10 %)	2 ml	4 % *
	Glyserol 50 %	1 ml	5 %
	Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	1,5 ml	15 %
	MQ-vann	5 ml	
	2-merkaptoetanol	0,5 ml	5 %
	Bromfenolblått	Noen korn	
Laemmlibuffer 2 X	SDS (10 %)	4 ml	4 % *
	Glyserol (50 %)	2 ml	5 %
	Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	3 ml	15 %
	2-merkaptoetanol	1 ml	5 %
	Bromfenolblått	Noen korn	
	Bufferen tilsettes prøvene i forhold 1:1		
Laemmlibuffer 4 X	SDS (20 %)	4 ml	4 % *
	Glyserol (85 %)	2,35 ml	5 %
	Tris-HCl pH 6,8 (4 M)	0,75 ml	15 %
	MQ-vann	0,9 ml	
	2-merkaptoetanol	2 ml	5 %
	Bromfenolblått	Noen korn	
Bufferen tilsettes prøvene i forhold 1:3			
De to siste stoffene tilsettes i avtrekk.			
Noen korn bromfenolblått tilsettes slik at løsningen blir farget mørkeblå.			
2-merkaptoetanol tilsettes rett før laemmlibufferen skal brukes.			
* Ettersom cellene er høstet i 2 % SDS, blir sluttkonsentrasjonen av SDS 4 %.			



---

## 2.10.4 Gelstøping

Konsentrasjon av akrylamid bestemmer oppløsningen av gelen. Høyere konsentrasjon av akrylamid er bedre til deteksjon av proteiner med lav molekylvekt, og lave konsentrasjoner av akrylamid brukes til deteksjon av proteiner med høy molekylvekt. Proteiner som er interessante for denne oppgaven, ligger mellom 40 og 130 kDa og det velges 8 % gel.

Det lages 1,5 mm tykke geler med 10 brønner i Bio-Rad Mini PROTEAN® oppsettet. Støpingen utføres i avtrekk.

1. En frontplate og en bakplate vaskes med sprit slik at alt fett fjernes og platene tørkes. Støpeformen settes godt sammen, slik at det ikke lekker.
2. Bufferløsninger for nedre og øvre gel lages (Tabell 2-33).
3. 8 % polyakrylamid-gelløsningen (nedre gel) (Tabell 2-34) blandes i et 50 ml plastrør.
4. Løsningen helles umiddelbart i spalten mellom glassplatene.
5. MQ-vann tilsettes til toppen for å sikre at gelen får en rett overflate.
6. Gelen stivner i løpet 30 minutter.
7. Stoffene for øvre gel (Tabell 2-34) blandes i et 50 ml plastrør.
8. Vannet i formen helles av og resten suges av med papir.
9. Den øvre gelløsningen helles over nedre gel.
10. En plastkam med 10 tagger settes ned i den øvre gelløsningen for å støpe brønner.
11. La stå i 30 minutter til den øvre gelen har stivnet.

**Tabell 2-33: Bufferløsninger som ble brukt til gelstøping**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Nedre gelbuffer	Tris-base	18,17 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	Justeres til pH 8,8 med HCl/NaOH	
Øvre gelbuffer	Tris-base	6,06 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	Justeres til pH 6,8 med HCl/NaOH	

**Tabell 2-34: Gelløsninger til Westernblotting**

Løsning	Innholdsstoffer	Mengde
<b>Polyakrylamid gel (nedre gel, 8 %, 1,5 mm)</b>	MQ-vann	4,6 ml
	Nedre gelbuffer	2,5 ml
	Akrylamid (30 %)	2,7 ml
	APS (10 %)	100 µl
	TEMED	6 µl
Gelstøping utføres i avtrekk og med hansker. TEMED får gelen til å stivne og tilsettes derfor rett før gelløsningen helles over i formen.		
<b>Polyakrylamid "stacking" gel (øvre gel, 1,5 mm)</b>	MQ-vann	2,4 ml
	Øvre gelbuffer	1,0 ml
	Akrylamid (30 %)	0,6 ml
	APS (10 %)	20 µl
	TEMED	4 µl
Gelstøping utføres i avtrekk og med hansker. TEMED får gelen til å stivne og tilsettes derfor rett før gelløsningen helles over i formen.		

### 2.10.5 Elektroforese

I proteinbufferen er det SDS som dekker proteinene i prøven med negative ladninger, slik at proteinene beveger seg mot den positivt ladede elektroden gjennom akrylamidgelen, når spenningen er satt til. Proteiner migrerer med ulik hastighet (Gallagher, 2001). Små proteiner migrerer fortere gjennom gelen, og proteinene blir separert etter størrelse som funksjon av logaritmen til molekylvekten (målt i kDa).

12. Når gelen har stivnet, kan glassplatene med gelen i mellom skylles med kaldt vann for å fjerne eventuelt søl på utsiden av glassplatene, og plastkammen tas forsiktig ut.
13. Glassplatene med gelen plasseres i et kar med frontplaten inn mot midten. Både det indre og ytre karet fylles opp med ELFO-buffer (Tabell 2-35).
14. Eventuelle luftbobler fjernes ved hjelp av en bøyd kanyle.
15. En påføringsapplikator settes over gelen for å angi brønnes plassering.
16. 5 µl standard (Precision Plus All Blue Standard) påsettes den første brønnen.

17. Prøvene kokes ved 95 °C i 5 minutter før påsetting.
18. Prøvene kjøres først gjennom øvre gel på 90 volt i ca. 15 minutter, og deretter kjøres de gjennom nedre gel på 150 volt i ca. 1 time.

**Tabell 2-35: ELFO-buffer**

Løsninger	Innholdsstoffer	Sluttkonsentrasjon
<b>ELFO-buffer</b>	10 X Tris/Glycine/SDS buffer (TGS) fortynnes med 9 deler destillert vann til 1 X TGS som gir en konsentrasjon på:	
	Tris	25 mM
	Glysin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	pH 8,3	

### 2.10.6 Blotting av gelen

For å gjøre proteiner tilgjengelige for en interaksjon med antistoffer slik at de kan detekteres, blir proteinene overført fra gelen til en nitrocellulosemembran. Ved bruk av strøm beveger proteinene seg til membranen, mens de opprettholder samme organisering som de hadde i gelen (Ursitti et al., 2001). Proteinbindingene er basert på hydrofobe interaksjoner og ladningsinteraksjoner mellom membranen og proteinene.

19. En membran, to skrubber og to filterpapir fuktes i blotterbuffer (Tabell 2-36).
20. Gelen løsnes forsiktig fra den tykke glassplaten ved hjelp av en plastspatel. Den øvre gelen skjæres av og fjernes.
21. Et filterpapir legges over gelen og gelen løsnes fra den tynne glassplaten med en plastspatel og overføres til filterpapiret.
22. Gelen pakkes på følgende måte:
  - Gelbeholderens svarte side legges ned
  - Skrubber
  - Filterpapir som er festet til gelen
  - Gel
  - Membran
  - Filterpapir

- Skrubb
  - Hvit side på gelbeholderen
23. Luft mellom gelen og membranen fjernes med en plastpipette som rulles fra midten av membranen.
  24. Gelbeholderen settes i blottekaret hvor den svarte siden til gelbeholderen vendes mot det svarte i karet.
  25. En magnetrører og en iskasset legges i blottekaret. Blottekaret fylles med blottebuffer til det dekker gelpakken.
  26. Gelen blottes i kjølerom ved 400 milliampere i 1 ½ time eller til neste dag ved 50 milliampere.

**Tabell 2-36: Blottebuffer**

Løsninger	Innholdsstoffer	Sluttkonsentrasjon
<b>Blottebuffer</b>	10 X Tris/Glycine buffer (TG) fortynnes med 7 deler destillert vann og 2 deler metanol til 1 X TG som gir en konsentrasjon på:	
	Tris	25 mM
	Glysin	192 mM
	Metanol	20 % (v/v)
	pH 8,3	

### 2.10.7 Ponceaufarging av membranen

Effektiviteten av proteinoverføringen fra gel til membran kan undersøkes ved å farge membranen med Ponceau S (Harper and Speicher, 2001). Dette fargestoffet har høy sensitivitet og er vannløselig, noe som gjør at det lett kan fjernes (Burnette, 1981).

27. Proteinbåndene farges ved at membranen legges i Ponceau S fargeløsning i 1 minutt med proteinsiden opp.
28. Overflødig farge fjernes ved at membranen vaskes 3 ganger i destillert vann.
29. Overflødig væske får renne av membranen før den legges i en plastlomme. Bilde av båndene kan tas i fremkallingsmaskinen eller i en kopimaskin.

## 2.10.8 Blokking

Nitrocellulosemembranen er valgt fordi den har egenskaper som binder proteiner. Ettersom både antistoffer og deres mål er proteiner, må interaksjoner mellom membranen og det antistoffet som skal brukes for deteksjon av målproteinet forhindres. Blokking av ikke-spesifikke bindinger kan oppnås ved å tilsette tørrmelk i tris-bufret saltvann (TBS). Melkeproteinene fester seg til membranen på alle steder der prøveproteinet ikke har festet seg. Når antistoffet er tilsatt, er det ikke plass til å feste proteiner på membranen noe annet sted enn på bindingsstedet for det spesifikke målproteinet. Dette reduserer bakgrunnen og eliminerer uspesifikke bånd.

30. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten.

31. Røret tilsettes 5 ml 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween (Tabell 2-37 og Tabell 2-38).

Røret legges til rulling på kjølerom til neste dag eller i romtemperatur i 1-2 timer.

**Tabell 2-37: 5 % tørrmelk**

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

**Tabell 2-38: Tris bufret saltvann (TBS) med 0,1 % Tween**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Tris bufret saltvann (TBS) med 0,1 % Tween	Tris-base	2,42 g
	NaCl	8,0 g
	HCl (1 M)	3,8 ml
	Tween 20	1,0 ml
	MQ-vann	ad 1000 ml
	Justeres til pH 7,6 med HCl/NaOH	
Oppbevares kjølig		

## 2.10.9 Tilsetting av primærantistoff

Antistoffer brukes som sensitive og spesifikke verktøy som kan binde proteiner direkte (Gallagher et al., 2008). Inkuberingen kan foregå ved ulike temperaturer. Høyere temperaturer er assosiert med flere bindinger, både spesifikke og ikke-spesifikke.

32. Tørrmelk tømmes og rester suges ut. Primærantistoff tilsettes i røret med 3 ml 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween. Blandingsforhold avhengig av type primærantistoff (Tabell 2-39).

33. Røret legges til rulling på kjølerom til neste dag.

34. Dagen etter vaskes membranen 3 ganger i 15 minutter med 5 ml TBS med 0,1 % Tween ved romtemperatur. Røret legges til rulling mellom hver gang.

**Tabell 2-39: Primære antistoffer som ble brukt til Westernblotting**

Antistoff	Mengde	Type	Lot. nr.	Leverandør
GR	1:100	Sc 1004	J2908 I2310	Santa Cruz Biotechnologies, USA
NMDAR1	1:200 1:1000	4042 4042S	1 1	Cell Signaling, Danvers, USA
NMDAR2A ( $\epsilon 1$ ) <sup>1</sup>	1:100	Sc 1468	B1904 B1207	Santa Cruz Biotechnologies, USA
NMDAR2B ( $\epsilon 2$ ) <sup>1</sup>	1:100	Sc 1469	C0606	Santa Cruz Biotechnologies, USA
NMDAR3A	1:100 1:500 1:500	07-356	22403 DAM 17800382 DAM 1745323	Upstate, USA Millipore, USA Millipore, USA
NMDAR3B	1:200	07-351	22395	Upstate, USA
GFP (Living color A.v. Monoclonal Antibody)	1:1000	JL-8	9014501	Clontech, USA
$\beta$ -aktin	1:5000	A5316	128K4805	Sigma-Aldrich, USA

<sup>1</sup>  $\epsilon 1$  og  $\epsilon 2$  svarer til NR2A og NR2B, jamført med denne artikkelen: Munemoto Y, Kuriyama H, Doi T, Sato K, Matsumoto A, Sugatani J, Cho H, Komeda M, Altschuler RA, Kitajiri M, Mishina M, Yamashita T (Auditory pathway and auditory brainstem response in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 and epsilon 4 subunits. *Neurosci Lett* 251:101-104.1998).

### 2.10.10 Tilsetting av sekundærantistoff

Etter vasking av membranen for å fjerne ubundne primærantistoff, blir membranen eksponert for et antistoff som er rettet mot en arts-spesifikk del av primærantistoffet, et sekundært antistoff. Sekundærantistoffet er ofte bundet til et reporterenzym, som for eksempel pepperrot peroksidase (Horseradish peroxidase) (Gallagher et al., 2008).

35. Sekundærantistoff tilsettes i røret med minst 3 ml 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween. Blandingsforhold er avhengig av type antistoff (Tabell 2-40).
36. Røret legges til rulling i 1-2 timer i romtemperatur.
37. Blandingen av antistoff og tørrmelk helles av. Membranen vaskes 3 ganger i 15 minutter med 5 ml TBS med 0,1 % Tween ved romtemperatur.

**Tabell 2-40: Sekundære antistoffer som ble brukt til Westernblotting**

Antistoff	Mengde	Type	Lot. nr.	Leverandør
Donkey anti-rabbit	1:5000	Sc 2313	C2609	Santa Cruz
			C6209	Biotechnologies, USA
			A0711	
Sheep anti-mouse	1:5000	NA913V	382441	GE Healthcare UK Limited, England
Donkey anti-goat	1:5000	Sc2020	A1207	Santa Cruz
			D2506	Biotechnologies, USA

### 2.10.11 Fremkalling

Fremkallingsvæske som Super Signal West Femto og Super Signal West Pico inneholder substratet til peroksidasen. Substratet omdannes i en kjemisk reaksjon som avgir lys. Lyssignalet er proporsjonalt med mengde protein på membranen. Femto er mer sensitiv, har lengre varighet, og kan detektere lavere mengder av antigen enn Pico. Pico brukes for proteiner som har høyere konsentrasjoner, som for eksempel  $\beta$ -aktin. Bruk av Femto på membraner med høy proteinkonsentrasjon kan føre til at substratet brukes opp, og det dannes brune bånd på membranen på grunn av oksidert pepperrot peroksidase.

- 
38. Fremkallingsvæsken (Super Signal West Femto eller Pico) tas ut i romtemperatur ca. 1 time før den skal brukes.
  39. Membranen tas ut av røret og rester av TBS med Tween fjernes.
  40. Membranen legges på en glassplate med proteinene opp.
  41. Fremkallingsvæsken består av to løsninger som blandes i forhold 1:1.
  42. 1 ml ferdig blandet fremkallingsvæske dryppes på fra midten av membranen og får virke i 5 minutter.
  43. Overflødig fremkallingsvæske fjernes og membranen legges i en egnet plastlomme.
  44. Luft fjernes ved at det trykkes lett mot plastomslaget.
  45. Proteinbåndene fremkalles i fremkallingsmaskinen (Chemi Genius<sup>2</sup> fra Bio Imaging System) med Genesnap som fremkallingsprogram.
  46. Etter fremkalling kan membranen legges tilbake i røret i TBS med 0,1 % Tween som legges til rulling på kjølerom i påvente av en eventuell stripping av membranen.

### **2.10.12 Stripping**

Dersom det er ønskelig å teste for flere proteiner, fjernes pålagte antistoff ved bruk av strippebuffer. Dermed kan man tilsette primærantistoff av en annen type.

1. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten. Det tilsettes 5 ml Restore Western Blot Stripping Buffer og legges til rulling ved romtemperatur i 15 minutter.
2. Strippebufferen helles av og membranen vaskes i TBS med 0,1 % Tween i 15 minutter.
3. Membranen blokkes med 5 ml 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween ved romtemperatur i 1-3 timer.
4. Nytt primærantistoff tilsettes ved å følge samme prosedyre som nevnt over, under primærantistoff.



---

## 2.11 Ko-immunpresipitering med GFP-trap

Immunpresipitering (IP) er en teknikk for å presipitere et antigen fra en løsning ved å bruke et antistoff som spesifikt binder til proteinet (Bonifacino et al., 2001). Denne metoden kan brukes til å isolere og/eller konsentrere et spesifikt protein fra en prøve som kan inneholde mange ulike proteiner.

Ko-immunpresipitering (Co-IP) er en variant av IP, og er karakterisert som immunpresipitering av intakte protein-komplekser. Denne metoden går ut på at man velger et antistoff som gjenkjenner et kjent protein som man tror kan være et medlem av et protein-kompleks. Ved å benytte et antistoff mot det kjente medlemmet, tenker man seg at man kan trekke hele protein-komplekset ut av løsningen, og dermed identifisere ukjente medlemmer av komplekset. GFP-trap kan brukes til å rense gfp-fusjonsproteiner av interesse.

Alle trinnene skal gjøres på is om ikke annet er spesifisert.

### Prosedyre for høsting og lysering av celler

1. Mediet helles av, og restene fjernes med en pipette.
2. Cellene vaskes 3 ganger med 3 ml iskaldt PBS (Tabell 2-26).
3. Cellene høstes fra to like skåler for å oppnå store nok mengder av ønsket protein. Cellene fra den ene skålen skrapes i 1 ml iskald PBS, og celleduspensjonen overføres til den andre skålen og skrapes. Først skrapes det over hele skålen i én retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skrapping.
4. Celleduspensjonen overføres til eppendorfrør på is.
5. Cellene spinnes i 3 minutter ved 2000 rpm og 4 °C.
6. Supernatanten fjernes.
7. I røret tilsettes det 300 µl lysisbuffer (Tabell 2-41).
8. Cellene fryses og tines 3 ganger i tørris/etanolbad eller i flytende nitrogen. Cellene kan tines på vannbad ved 37 °C.
9. Cellene spinnes ned i 5 minutter ved 13000 rpm, og pelleten kastes.
10. 50 µl av celledysatet tas ut for Westernanalyse.
11. Celledysatet fryses ved -70 °C frem til bruk.

---

### **Prosedyre for vasking av GFP-trap og immunpresipitering**

1. 25  $\mu$ l GFP-trap tas ut i et rør og resuspenderes i 500  $\mu$ l iskald fortynningsbuffer (Tabell 2-41).
2. Røret spinnes i 2 minutter ved 5000 rpm og 4 °C.
3. Supernatanten fjernes og det vaskes 2 ganger til med 500  $\mu$ l fortynningsbuffer.
4. Supernatanten fjernes og cellelysatsatet tilsettes røret.
5. Røret inkuberes i 2 timer ved 4 °C og i bevegelse.

### **Prosedyre for vasking av prøvene**

1. Prøvene spinnes i 2 minutter ved 13000 rpm. Supernatanten overføres til et nytt rør og spares på.
2. Pelleten vaskes med vaskebuffer (Tabell 2-41) med ulike mengde NaCl, 500 mM, 300 mM og 0 mM, i synkende konsentrasjon. Det sentrifugeres i 2 minutter ved 13000 rpm mellom hver vask.
3. Pelleten tilsettes deretter 100  $\mu$ l 2X laemmlibuffer (Tabell 2-32) for gelkjøring og kokes i 10 minutter før nedfrysning eller gelkjøring.

**Tabell 2-41: Løsninger til ko-immunpresipitering med GFP-trap**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Lysisbuffer	Det lages 5 ml fersk for hver gang	Per 5 ml løsning	
	BSA	5 mg	1 mg/ml
	Tris, pH 7,5 (1 M)	250 µl	50 mM
	EDTA (0,5 M)	100 µl	10 mM
	Triton X-100	50 µl	1 %
	Deoxycholate (DOC) (20 %)	250 µl	1 %
	Leupeptin (5 mg/ml)	5 µl	5 µg/ml
	Pepstatin A (1 mg/ml)	25 µl	5 µg/ml
	PMSF (0,1 M)	15 µl	0,3 mM
	NaVO <sub>4</sub> (10 mM)	50 µl	0,1 mM
	NaCl (5 M)	300 µl	300 mM
	MQ-vann	ad 5 ml	
Fortynnings- buffer	Det lages 100 ml løsning:		
	Tris, pH 7,5 (1 M)	1 ml	10 mM
	NaCl (5 M)	3 ml	150 mM
	EDTA (0,5 M)	100 µl	0,5 mM
	MQ-vann	ad 100 ml	
Vaskebuffer	Det lages 50 ml løsning:		
	Tris, pH 7,5 (1 M)	2,5 ml	50 mM
	EDTA (0,5 M)	1 ml	10 mM
	NaCl (5 M)	5 ml/ 3 ml/ 0 ml	500 mM/ 300 mM/ 0 mM
	MQ-vann	ad 50 ml	

---

## 2.12 Figurer og statistikk

Grafer og tabeller ble laget i Microsoft Office Excel 2008 for Mac. Alle figurene baserer seg på gjennomsnitt av flere uavhengige forsøk med standardfeil (SE). Resultatene ble analysert ved hjelp av Sigma Stat versjon 3.2. fra SPSS Inc., Chicago, USA.

For parvis sammenligning av normalfordelte data ble t-test brukt. Dersom dataene ikke var normalfordelte ble Mann-Whitney rank sum test benyttet. "One Way Analysis of Variance" med Dunnetts' post test ble benyttet for å sammenligne flere grupper der dataene er normalfordelte. Dersom dataene ikke besto testen for normalfordeling ble enten Kruskal-Wallis One Way ANOVA on ranks med Dunns post hoc test benyttet.

Resultatene ble ansett som statistisk signifikant ved en p-verdi  $<0,05$ . Signifikans er oppgitt med \*/#/◆.

---

## 3. RESULTATER

Det ble studert deksametasonindusert celledød i udifferensierte og differensierte PC12-celler ved å eksponere cellene for deksametason (3.1). Antagonister ble benyttet for å undersøke om de ga en hemming i deksametasonindusert celledød (3.2). Molekylære mekanismer bak effekter av deksametason på celledød ble undersøkt ved å bruke et luciferaseassay (3.3). En mulig protein-protein-interaksjon mellom GR og NR3A ble studert ved ko-immunpresipitering (3.4).

Kyllingkorncellers morfologiske utvikling i kultur ble studert (3.5). Deksametasonindusert celledød og effekten av hemmere i korncellekulturer ble også undersøkt (3.6). Westernblotting-analyser ble benyttet for å studere uttrykket av GR og NMDA-reseptorsubenheter i kornceller (3.7).

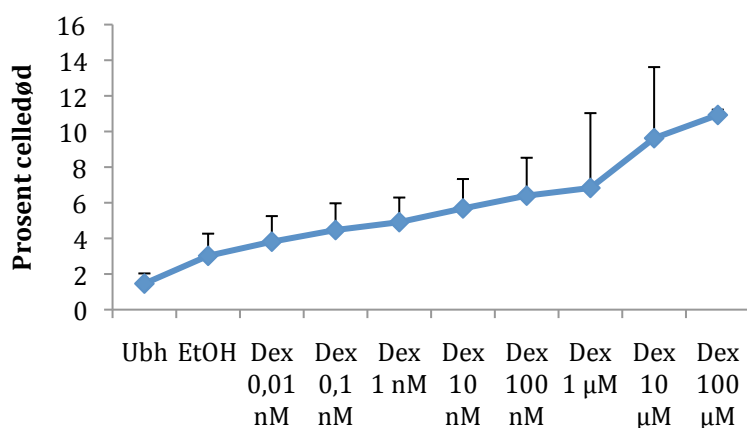
### 3.1 Effekt av deksametason på celledød i PC12-celler

Det er tidligere vist at 10  $\mu$ M deksametason kan indusere celledød i kyllingkornceller (Aden et al., 2008). Morsink beskrev i 2006 at differensierte PC12-celler uttrykker endogen GR (Morsink et al., 2006), men så langt har det ikke blitt beskrevet om udifferensierte PC12-celler har samme egenskap. Det var ønskelig å undersøke effekten av deksametason og antagonister i PC12-celler ettersom de uttrykker GR, men ikke NMDA-reseptorer. Målet med bruk av PC12-celler var å finne mekanismer som kan forklare deksametasonindusert celledød i korncellene.

#### 3.1.1 Doserespons for deksametasonavhengig celledød

Først var det ønskelig å finne deksametasontoksisiteten til PC12-celler. I forsøket ble PC12-celler eksponert for deksametason i konsentrasjoner på 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M og 100  $\mu$ M dagen etter splitting. Ubehandlete og etanoleksponerte celler ble brukt som kontroll. Cellene ble inkubert i 24 timer og trypanblåfarget før telling med lysmikroskop.

Resultatene viste at det ikke var en statistisk signifikant forskjell mellom behandlingene, men det var en tendens til at den deksametasoninduserte celledøden økte litt med økende konsentrasjon (Figur 3-1). PC12-celler var robuste mot deksametasonindusert celledød.



**Figur 3-1: Deksametasonindusert celledød hos PC12-celler**

Udifferensierte PC12-celler ble eksponert for ulike deksametasonkonsentrasjoner dagen etter splitting til skåler. Etter eksponering ble cellene inkubert i 24 timer, og celledød ble kvantifisert ved hjelp av trypanblåfarging og mikroskop. Figuren viser celledød som prosent av det totale celleantallet. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk og uttrykkes som gjennomsnitt med SE, n=2-3. Det er ingen signifikant forskjell mellom målingene. Rådataene er vist i Tabell 3-1.

**Tabell 3-1: Tallmaterialet som Figur 3-1 er basert på**

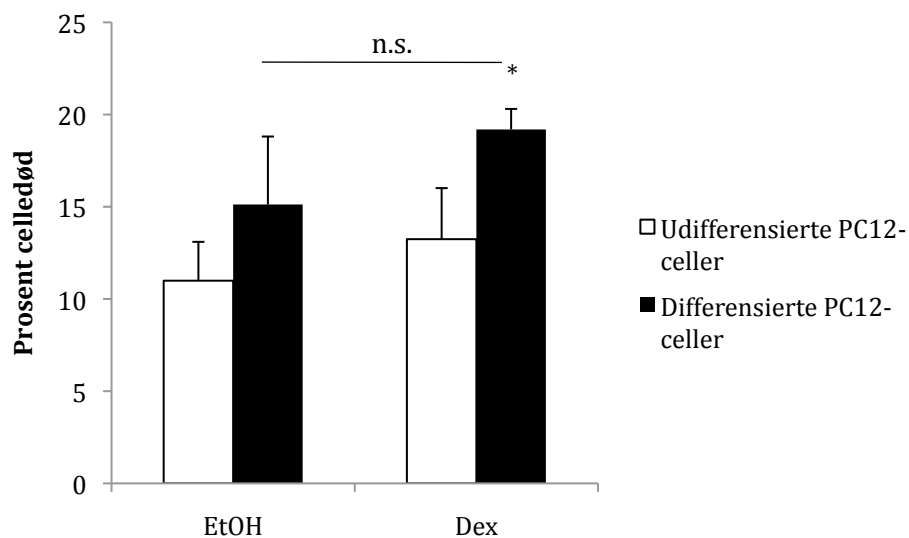
	Gjennomsnitt celledød	SE	Antall forsøk
Ubh	1,46	0,6	3
EtOH	3,02	1,2	3
0,01 nM dex	3,81	1,4	3
0,1 nM dex	4,47	1,5	3
1 nM dex	4,91	1,4	3
10 nM dex	5,68	1,7	3
100 nM dex	6,40	2,1	3
1 µM dex	6,83	4,2	3
10 µM dex	9,62	4,0	3
100 µM dex	10,93	0,3	2

### 3.1.2 Celledød i differensierte vs. udifferensierte PC12-celler

Resultat fra forsøk med udifferensierte PC12-celler ga veldig lav deksametasonindusert celledød (se avsnitt 3.1.1). Vi ønsket å se om det var en forskjell mellom deksametasonindusert celledød hos differensierte og udifferensierte PC12-celler, ettersom differensierte PC12-celler har nevronkarakteristika. PC12-cellene var enten udifferensierte, eller ble differensiert med 50 ng/ml NGF (nerve growth factor) dagen etter splitting. Et problem som oppstod under

differensiering av PC12-celler var at mange av cellene falt av. For å få bedre feste, ble skålene dekket med poly-L-lysin.

Resultatet viste at det var statistisk signifikant forskjell mellom differensierte og udifferensierte PC12-celler når cellene ble eksponert for deksametason (Figur 3-2). Heller ikke i differensierte PC12-celler var det en stor deksametasonindusert død. Det var ikke en signifikant forskjell mellom deksametason og etanolbehandlingene, verken for differensierte og udifferensierte PC12-celler. I dette forsøket var basaldøden også høyere sammenlignet med tidligere forsøk (se avsnitt 3.1.1).



**Figur 3-2: Celledøden var høyere i differensierte enn i udifferensierte PC12-celler**

PC12-cellene var udifferensiert, eller ble differensiert med 50 ng/ml NGF dagen etter splitting. Tre dager etter differensiering ble PC12-cellene eksponert for 10  $\mu$ M deksametason (dex) eller etanol. Etter eksponering ble cellene inkubert i 24 timer og celledød ble talt ved hjelp av trypanblåfarging og lysmikroskop. Figuren viser celledød som prosent av det totale celleantallet. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk og uttrykkes som gjennomsnitt med SE, n=4-8. \* betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom differensiert og udifferensiert når cellene ble eksponert med deksametason. n.s. står for ikke signifikant. Rådataene er vist i Tabell 3-2.

**Tabell 3-2: Tallmaterialet som Figur 3-2 er basert på**

	Snitt	SE	Antall forsøk
Udifferensierte PC12-celler + EtOH	10,99	2,8	4
Udifferensierte PC12-celler + 10 $\mu$ M dex	13,24	2,1	4
Differensierte PC12-celler + EtOH	15,12	3,7	8
Differensierte PC12-celler + 10 $\mu$ M dex	19,19	1,1	8

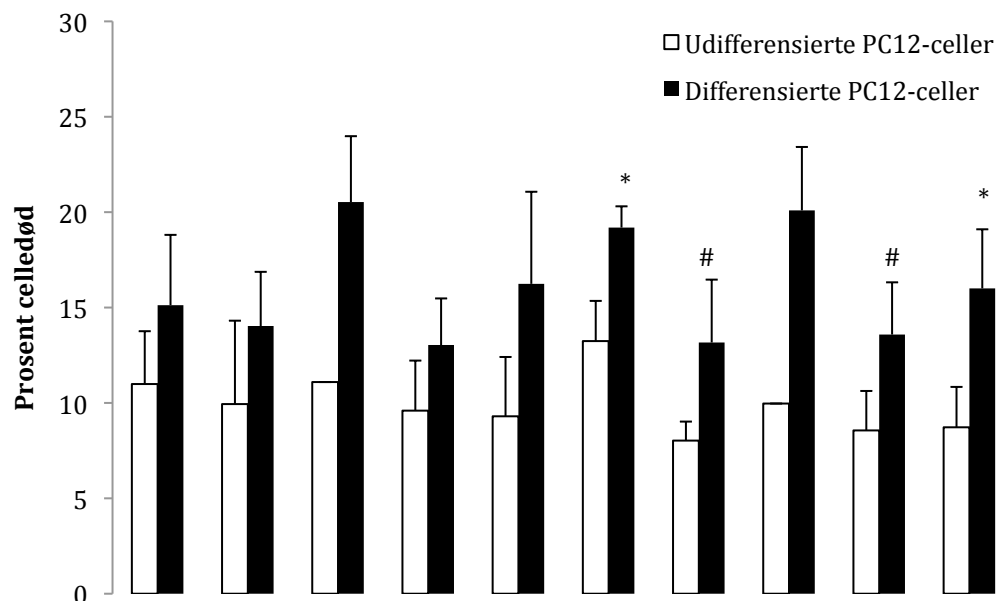
---

### **3.2 Antagonisters påvirkning på deksametasonindusert celledød i PC12-celler**

Tidligere er det vist at behandling av kyllingkornceller med RU 28318 (MR-antagonist) gir en beskyttende effekt mot deksametasonindusert celledød (Aden et al., 2008). Det var ønskelig å undersøke om den samme effekten kunne ses hos PC12-celler og hvordan antagonistene CGP 39551, RU 28318, MK 801 og mifepriston påvirket celledøden. PC12-cellene var enten udifferensierte eller ble differensiert med 50 ng/ml NGF. Udifferensierte og differensierte PC12-celler ble eksponert for 10  $\mu$ M deksametason og ulike hemmere. Eksponeringen skjedde dagen etter splitting for udifferensierte celler og etter fire dager for differensierte celler. Ettersom deksametason og mange av hemmere var løst i etanol, ble etanol tilsatt i kontrollskålene.

Resultatet viste at det var en beskyttende effekt av RU 28318 og MK 801 når antagonistene ble tilsatt sammen med deksametason i differensierte PC12-celler, men ikke i de udifferensierte (Figur 3-3). For CGP 39551 og deksametason var det en statistisk signifikant forskjell mellom differensiert og udifferensierte PC12-celler. Det var ingen statistisk forskjell mellom de udifferensierte PC12-cellene. Når det gjelder mifepriston ga den en høy celledød i seg selv. På mikroskopibildene kunne det ses at mifepriston har endret morfologien til cellene og trypanblåfargen var diffus (ikke vist). Dette har bidratt til at det var vanskeligere å telle celledøden og dette har ført til færre resultater.





Etanol	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10 μM dexametason	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
10 μM RU 28318	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
10 μM mifepriston	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
1 μM MK 801	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
100 μM CGP 39551	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

### Figur 3-3: Effekt av hemmere på differensierte PC12-celler

PC12-celler var enten udifferensierte eller ble differensiert med 50 ng/ml NGF. 3 dager etter differensiering ble PC12-cellene eksponert for MK 801, CGP 39551, RU 28318 eller mifepriston, 10 μM dexametason og etanol. Etter eksponering ble cellene inkubert i 24 timer og celledød ble talt ved hjelp av trypanblåfarging og mikroskop. Figuren viser celledød som prosent av det totale celleantallet. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk og uttrykkes som gjennomsnitt med SE, n=1-8. Den hvite søylen representerer udifferensierte og den svarte søylen er differensierte. \* betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom differensiert og udifferensiert. # betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom dexametason og hemmer, og dexametason alene. Rådataene er vist i Tabell 3-3.

**Tabell 3-3: Tallmaterialet som Figur 3-3 er basert på**

	Snitt	SE	Antall forsøk
<b>Udifferensierte</b>			
EtOH	10,99	2,8	4
EtOH + 1 $\mu$ M MK 801	9,59	2,6	4
EtOH + 100 $\mu$ M CGP 39551	9,30	3,1	4
EtOH + 10 $\mu$ M RU 28318	9,94	4,4	4
EtOH + 10 $\mu$ M mifepriston	11,10	-	1
10 $\mu$ M dex	13,24	2,1	4
10 $\mu$ M dex + 1 $\mu$ M MK 801	8,56	2,0	4
10 $\mu$ M dex + 100 $\mu$ M CGP 39551	8,72	2,1	4
10 $\mu$ M dex + 10 $\mu$ M RU 28318	8,03	1,0	4
10 $\mu$ M dex + 10 $\mu$ M mifepriston	9,97	-	1
<b>Differensierte</b>			
EtOH	15,12	3,7	8
EtOH + 1 $\mu$ M MK 801	13,04	2,4	8
EtOH + 100 $\mu$ M CGP 39551	16,24	4,8	8
EtOH + 10 $\mu$ M RU 28318	14,03	2,8	8
EtOH + 10 $\mu$ M mifepriston	20,53	3,5	5
10 $\mu$ M dex	19,19	1,1	8
10 $\mu$ M dex + 1 $\mu$ M MK 801	13,58	2,7	8
10 $\mu$ M dex + 100 $\mu$ M CGP 39551	16,00	3,1	8
10 $\mu$ M dex + 10 $\mu$ M RU 28318	13,17	3,3	8
10 $\mu$ M dex + 10 $\mu$ M mifepriston	20,09	3,3	5

### 3.3 Transfeksjon av kyllingkornceller, PC12- og CV1-celler

Plasmidet GRE-luc ble benyttet som reporter-gen for GR i alle transfeksjonsforsøkene. GRE-luc består av prolaktin basalpromotor (pro 36) med tre GRE foran, og inneholder genet for ildflueluciferase. Når ligandbundet GR binder til GRE-luc fører denne interaksjonen til at luciferasetranskripsjonen starter. Dette gjør at GRE-luc er egnet som reporter-gen for GR. Dersom GRE-luc ga luciferaseproduksjon etter tilsetning av deksametason, ville dette være et uttrykk for at luciferaseproduksjonen var forårsaket av endogen GR.

Luciferaseresultater kan ikke sammenlignes på kryss av forsøk. Dette skyldes at mengde luciferase varierte fra forsøk til forsøk. For å korrigere for forskjeller i transfeksjonseffektivitet

---

og antall celler mellom skålene, ble det brukt et plasmid som koder for renillaluciferase (RL-tk). RL-tk er konstitutiv aktiv og drives av en herpes simplex virus thymidinkinase-promotor. Det var tidligere vist at renillaluciferaseverdiene ikke lot seg påvirket av NMDA-reseptorsubenheter, deksametason eller antagonister (Feng, 2009). Dette gjør at renillaluciferase er egnet som intern standard i dette forsøksoppsettet.

Udifferensierte PC12-celler og CV1-celler ble transfektert dagen etter splitting til skåler, mens differensierte PC12-celler ble transfektert tre dager etter differensiering. Kyllingkornceller ble transfektert dagen etter preparering. Alle celletypene ble eksponert for ligander dagen etter transfeksjon. Deksametason er en høypotent GR-agonist, og denne ble tilsatt i skålene. I en tidligere masteroppgave ble det vist at 1 nM deksametason ga maksimal luciferaseproduksjon uten å være toksisk for cellene (Feng, 2009). I tillegg til den fysiologiske konsentrasjonen på 1 nM, var det ønskelig å se hvordan luciferaseproduksjonen ville endre seg ved tilsetning av 10 µM deksametason, som har vist seg å være en toksisk konsentrasjon i kornceller (Jacobs et al., 2006b). Det ble tilsatt etanol i kontrollskålene ettersom mange av ligandene var løst i etanol. Sluttkonsentrasjonen av etanol i mediet er 1 %. 48 timer etter transfeksjonen ble cellene høstet, og ildflue- og renillaluciferaseaktiviteten ble målt.

For å få sammenlignbare resultater ble alle resultatene normalisert, og oppgitt i prosent. Luciferaseresultatene for PC12-celler ble normalisert til CMV-transfektete celler tilsatt etanol, mens for CV1-celler ble det normalisert mot GR-transfektete celler tilsatt 10 µM deksametason. Kyllingkorncellene ble normalisert mot transfektete celler tilsatt etanol.

Hypotesen var at en interaksjon mellom GR og NR3A ville kunne ses som en reduksjon i ildflueluciferaseaktivitet i cellene som ble ko-transfektet med disse plasmidene, sammenlignet med celler som ble transfektet med GR alene. Det var ønskelig å påvise denne interaksjonen først i CV1-celler, så i celler som lignet mer på nevroner.

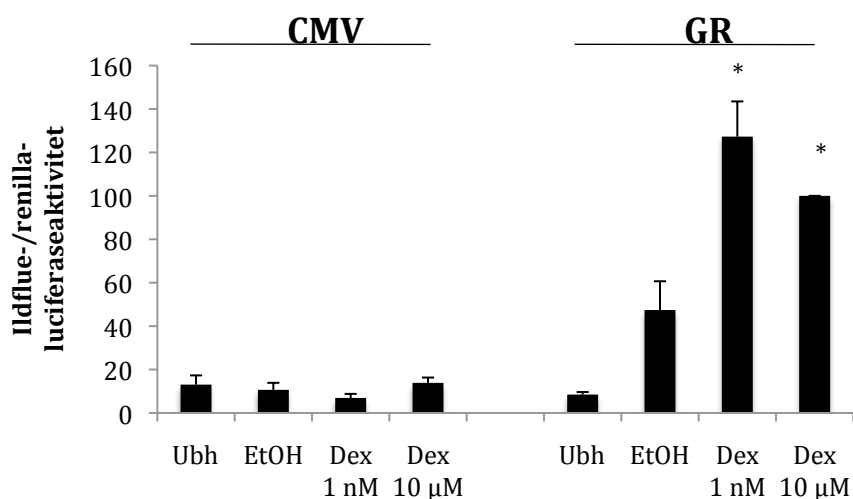
### **3.3.1 Transfeksjon av CV1-celler med luciferaseplasmider**

#### **Transfeksjon av CV1-celler med GR og NMDA-subenheten NR3A**

Tidligere ble det vist at det foreligger en funksjonell interaksjon mellom GR og NR3A i CV1-celler, ved at en ko-transfeksjon av disse plasmidene førte til en reduksjon i ildflueluciferase-

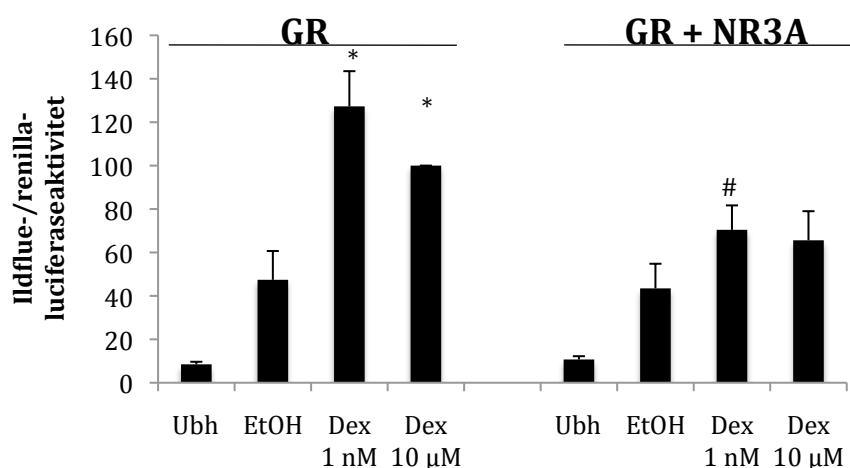
aktivitet (Feng, 2009). For å undersøke om det var en interaksjon mellom GR og NR3A i cytoplasma i CV1-celler, ble GR ko-transfektet med NMDA-reseptorsubenheten NR3A. Det ble benyttet to ulike deksametasolkonsentrasjoner, både fysiologisk (1 nM) og toksisk (10  $\mu$ M). CMV, et plasmid som ikke koder for noen proteiner, ble transfektet inn i CV1-celler sammen med GRE-luc og RL-tk. CV1-celler ble transfektet med GR ettersom de ikke uttrykker reseptoren endogen. Subenheten NR1-1a ble benyttet som en kontroll fordi tidligere ble det vist at denne subenheten ikke skulle gi en nedgang i luciferaseaktivitet når denne ko-transfektet med GR og det tilsettes ligand (Feng, 2009). Resultatene ble normalisert mot GR tilsatt 10  $\mu$ M deksametason.

Resultatet viste at når CV1-celler ble transfektet med GR og tilsatt deksametason ble luciferaseaktiviteten høy, mens den var lav med CMV. Dette tydet på at CV1-celler ikke kan uttrykke endogen GR (Figur 3-4). Resultatet viste at det var en statistisk signifikant nedgang i luciferaseaktiviteten når GR ble ko-transfektet med NR3A og tilsatt 1 nM deksametason sammenlignet med GR alene (Figur 3-5), og at 1 nM deksametason ga høyere luciferaseaktivitet enn 10  $\mu$ M. Det var ikke en statistisk signifikant nedgang i ko-transfeksjonen med NR1-1a (Figur 3-6). Dette stemmer godt overens med tidligere masteroppgaver (Feng, 2009, Wendelbo Aanensen, 2010).



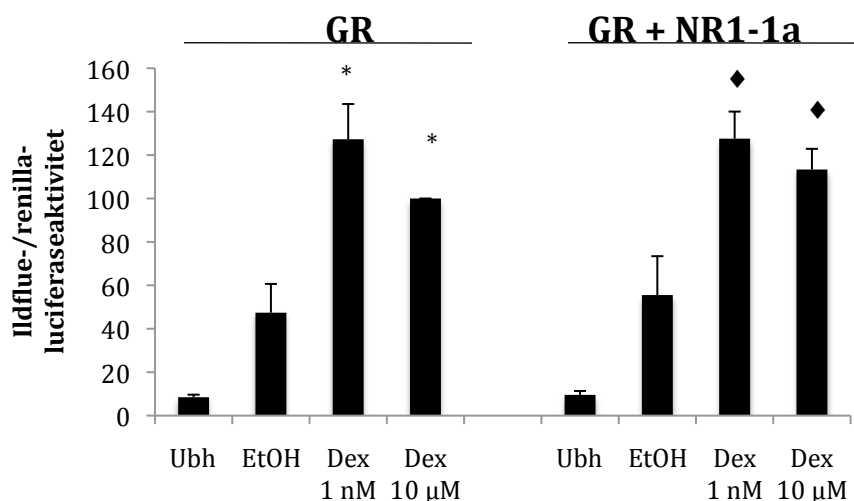
**Figur 3-4: CMV er egnet som negativ kontroll ved transfeksjon av CV1-celler**

CV1-celler ble transfektet med GRE-luc, RL-tk og CMV  $\pm$  GR, og eksponert for etanol eller deksametason (dex) etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=6. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble transfektet med GR er gjengitt til høyre. \* betyr at målingene med GR og deksametason er statistisk signifikant forskjellig fra målingene med CMV og deksametason. Rådataene er vist i Tabell 3-4.



**Figur 3-5: Ved ko-transfeksjon med GR og NR3A i CV1-celler ble luciferaseaktiviteten redusert sammenlignet med GR alene**

CV1-celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk, GR og subenheten NR3A, og eksponert for etanol eller deksametason (dex) etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=6. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble ko-transfektert med NR3A og GR er gjengitt til høyre. \* betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom etanolkontrollen og deksametasoneksponerte celler som er transfektert med GR. # betyr at det er en signifikant forskjell mellom GR og ko-transfeksjonen GR og NR3A. Rådataene er vist i Tabell 3-4.



**Figur 3-6: GR ko-transfektert sammen med NR1-1a ga ikke redusert luciferaseaktivitet**

CV1-celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk, GR og subenheten NR1-1a, og eksponert for etanol eller deksametason (dex) etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=6. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble ko-transfektert med NR1-1a og GR er gjengitt til høyre. \* betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom etanolkontrollen og deksametasoneksponerte celler som er transfektert med GR. ♦ betyr at det er signifikant forskjell fra etanoleksponerte NR1-1a-transfektete celler. Rådataene er vist i Tabell 3-4.

**Tabell 3-4: Tallmaterialet som Figur 3-4 til Figur 3-6 er basert på**

	Gjennomsnitt ildflueluciferase- aktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferase- aktivitet	SE	Antall forsøk
CMV	2019	607	458187	143963	6
CMV + EtOH	1552	388	446284	134327	6
CMV + 1 nM dex	932	123	442137	107274	6
CMV + 10 µM dex	1656	153	344859	78280	6
CMV + GR	1763	228	613997	153753	6
CMV + GR + EtOH	10735	3672	552591	132473	6
CMV + GR + 1 nM dex	26689	8112	575521	187560	6
CMV + GR + 10 µM dex	17208	4976	449334	127984	6
CMV + GR + NR3A	3659	989	762959	192879	6
CMV + GR + NR3A + EtOH	11607	3477	670081	119820	6
CMV + GR + NR3A + 1 nM dex	14469	2852	495815	98427	6
CMV + GR + NR3A + 10 µM dex	10060	2204	370034	71608	6
CMV + GR + NR1-1a	1842	349	549210	129339	6
CMV + GR + NR1-1a + EtOH	9864	3176	462409	102359	6
CMV + GR + NR1-1a + 1 nM dex	20468	4113	437198	106069	6
CMV + GR + NR1-1a + 10 µM dex	12629	3053	289805	70362	6

### 3.3.2 Transfeksjon av PC12-celler med luciferaseplasmider

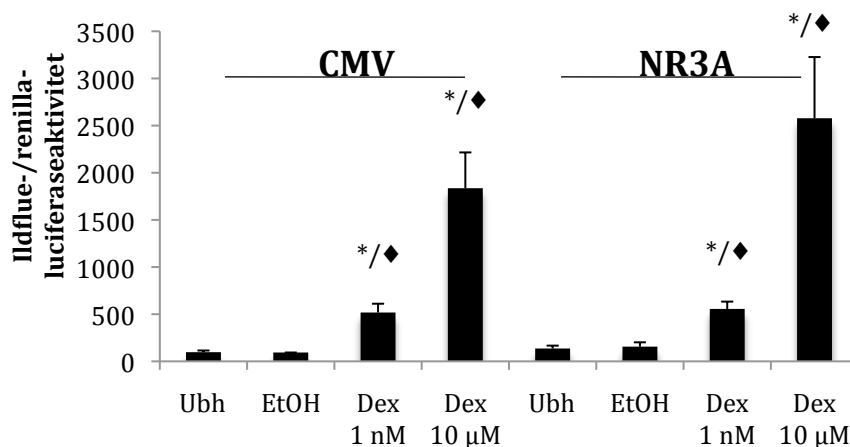
#### Interaksjon mellom NR3A og endogen GR i PC12-celler

Resultatet viste at det var en interaksjon mellom NR3A og GR i CV1-celler (se avsnitt 3.3.1). Det var ønskelig å gå videre med dette forsøksoppsettet for å se om denne interaksjonen kan ses i PC12-celler, en cellelinje med nevronkarakteristika. Resultatet fra en tidligere masterstudent viser at PC12-celler som ble transfektert med GR og NR3A, ikke gir en reduksjon i luciferaseproduksjon ved tilsetning av 1 nM deksametason (Wendelbo Aanensen, 2010). Interaksjonen ble heller ikke sett mellom NR3A og overuttrykt GR i PC12-celler.

Vi ønsket å fortsette med dette forsøket, for å se om endogen GR kunne aktiveres av 1 nM og 10 µM deksametason i PC12-celler. Metafectene® Pro ble benyttet til transfeksjon av PC12-celler. PC12-cellene ble transfektert med CMV alene eller CMV sammen med NR3A. Resultatene ble normalisert mot CMV tilsatt etanol.

Dataene viste at det var statistisk signifikant forskjell for begge deksametasonkonsentrasjonene fra etanolkontrollen og fra den ubehandlede skålen når det ble tilsatt deksametason (Figur 3-7). Dette tydet på at PC12-celler har endogen GR. Resultatet viste også at tilsetning av 10  $\mu$ M deksametason ga en høyere luciferaseaktivitet enn 1 nM deksametason. Det var ingen statistisk forskjell mellom behandlingene med og uten NR3A (Figur 3-7).

Tidligere studier antydte at etanol kan påvirke luciferaseaktiviteten (Wendelbo Aanensen, 2010), og dermed var det ønskelig å undersøke ubehandlede celler for å se hvor mye av luciferaseaktiviteten skyldes etanolen. Resultatene viste at etanolen ikke påvirket luciferaseaktiviteten (Figur 3-7).

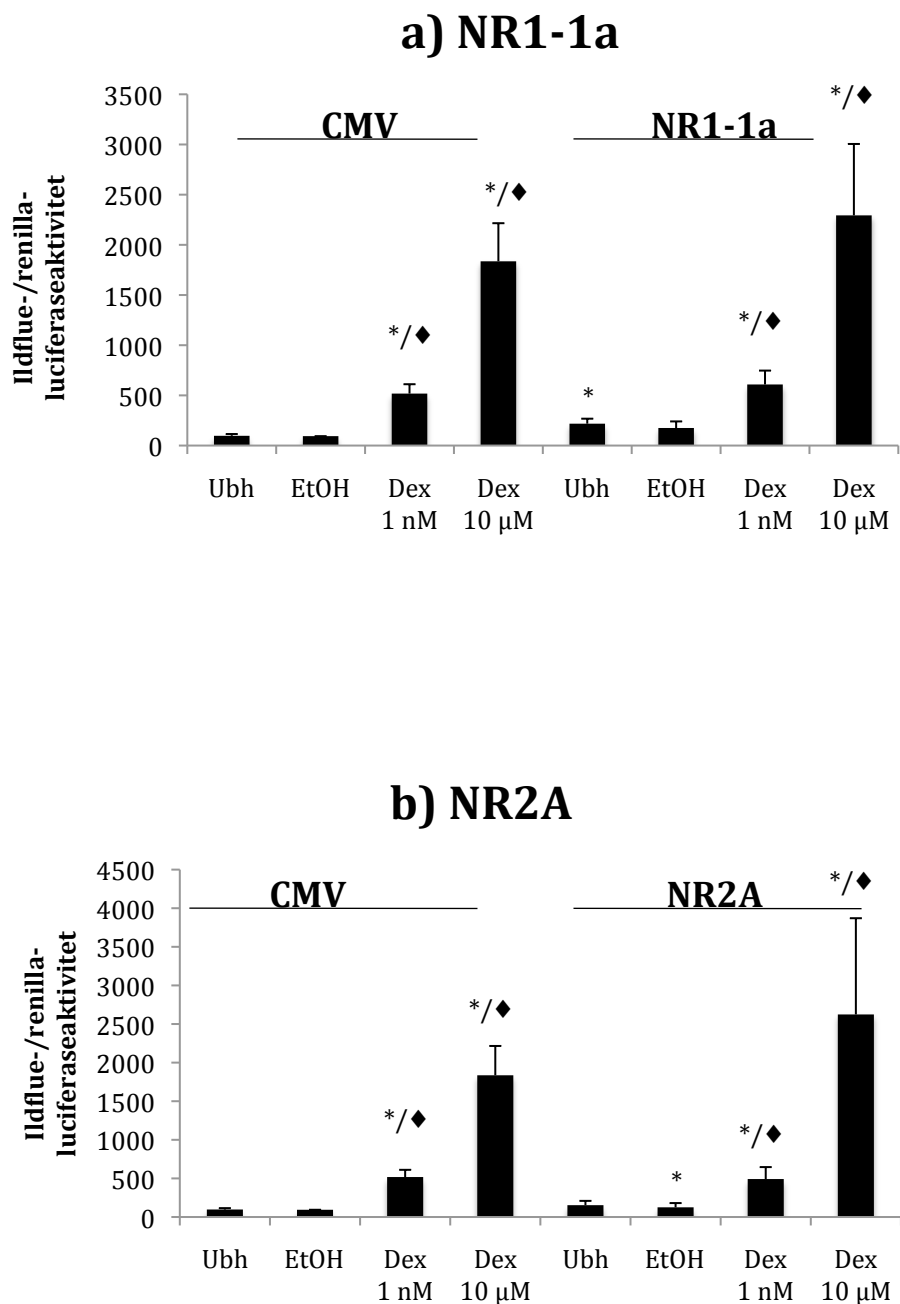


### Figur 3-7: NMDA-reseptorsubenheten NR3A påvirker ikke luciferaseaktiviteten

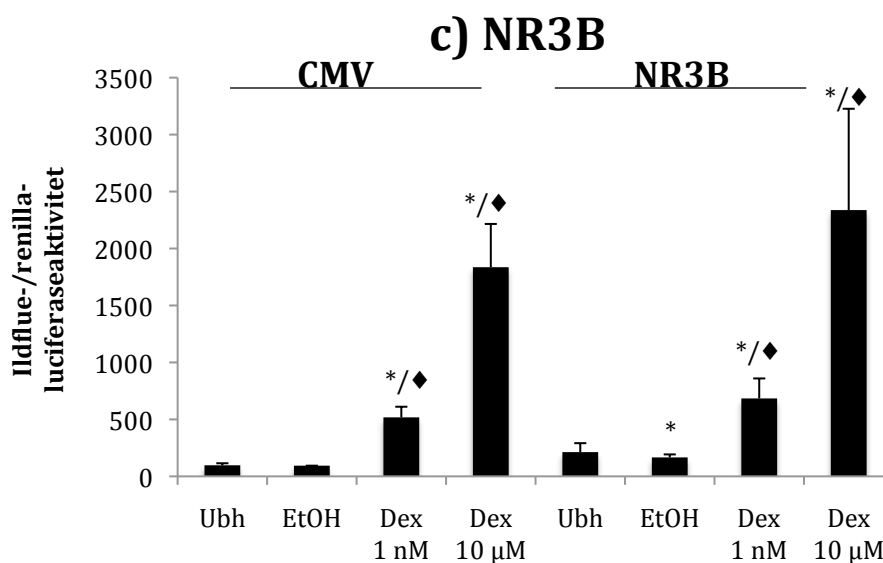
PC12-celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk, CMV  $\pm$  NR3A-subenheten. Dagen etter ble cellene eksponert for etanol eller deksametason (dex). Figuren viser ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i forhold til etanolkontrollen (CMV) med SE, n=13. Alle verdiene i figuren er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble transfektert med NR3A er gjengitt til høyre. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom luciferaseaktiviteten til CMV og NR3A, verken når de er eksponert for etanol alene eller etanol tilsatt 1 nM og 10  $\mu$ M deksametason. \* betyr at det er statistisk signifikant forskjellig fra etanolkontrollen (CMV). ♦ betyr at det er statistisk signifikant forskjellig fra den ubehandlede kontrollen (CMV). Rådataene er vist i Tabell 3-5.

## Interaksjon mellom andre NMDA-reseptorsubenheter og endogen GR i PC12-celler

Resultatet fra ko-transfeksjonen med NR3A ga ikke en reduksjon i luciferaseproduksjonen etter tilsetning av deksametason (Figur 3-7). Tidligere studier med CV1-celler har vist at det ikke foreligger en interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheterene NR1-1a, NR2A og NR3B (Feng, 2009). Derfor var det ønskelig å se om disse NMDA-reseptorsubenheterene kan forårsake en interaksjon med endogen GR i PC12-celler. PC12-celler ble transfektert med CMV alene, CMV sammen med NR1-1a, NR2A eller NR3B. Resultatene viste at det ikke var endringer i luciferaseverdier (Figur 3-8).







**Figur 3-8 a-c: NMDA-reseptorsubenheterne påvirker ikke luciferaseaktiviteten**

PC12-celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk, CMV ± subenheter og eksponert for etanol eller deksametason (dex) etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=12-13. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble transfektert med subenhet er gjengitt til høyre. \* betyr at det er statistisk signifikant forskjellig fra etanolkontrollen (CMV). ♦ betyr at det er statistisk signifikant forskjellig fra den ubehandlede kontrollen (CMV). Rådataene er vist i Tabell 3-5.

**Tabell 3-5: Tallmaterialet som Figur 3-7 og Figur 3-8 er basert på (dataene er ikke normalisert her)**

	Gjennomsnitt ildflueluciferaseaktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferaseaktivitet	SE	Antall forsøk
CMV	670	180	134071	29220	13
CMV + EtOH	683	144	149081	43027	13
CMV + 1 nM dex	3037	501	121489	29194	13
CMV + 10 µM dex	9032	2557	112043	32017	13
CMV + NR1-1a	1089	345	106136	27578	12
CMV + NR1-1a + EtOH	601	138	118642	31342	12
CMV + NR1-1a + 1 nM dex	2704	697	89457	24010	13
CMV + NR1-1a + 10 µM dex	8311	3030	74229	20035	13
CMV + NR2A	931	260	145044	24066	13
CMV + NR2A + EtOH	802	155	162011	27202	13
CMV + NR2A + 1 nM dex	3578	788	141703	28371	13
CMV + NR2A + 10 µM dex	11962	3320	152243	32100	13
CMV + NR3A	543	158	78571	16529	13

CMV + NR3A + EtOH	517	107	85820	21003	13
CMV+ NR3A+ 1 nM dex	1947	421	63020	15586	13
CMV + NR3A + 10 $\mu$ M dex	7836	2707	51041	14445	13
CMV + NR3B	742	301	85052	17705	13
CMV + NR3B + EtOH	472	98	72922	18817	13
CMV + NR3B + 1 nM dex	1567	393	56783	14513	13
CMV + NR3B + 10 $\mu$ M dex	5828	2086	64747	17531	13

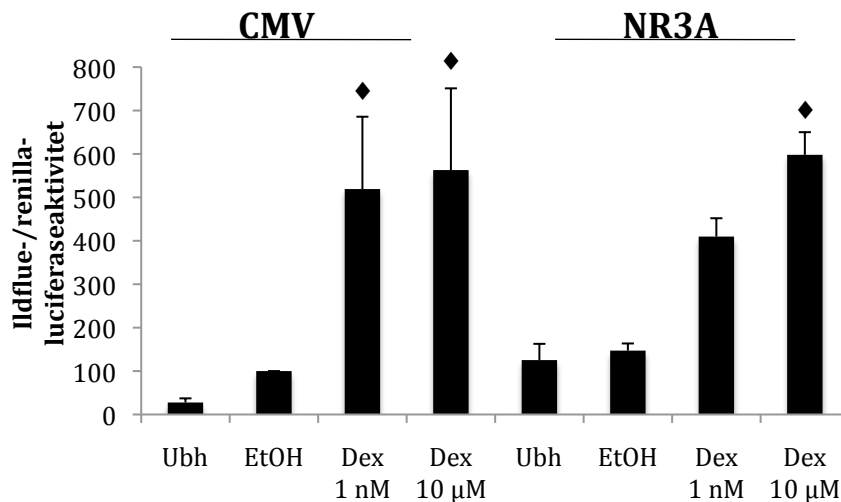
### 3.3.3 Transfeksjon av differensierte PC12-celler med luciferaseplasmider

Resultater fra en tidligere masteroppgave og denne oppgaven har vist at det ikke foreligger en interaksjon mellom NR3A og endogen GR i PC12-celler (Wendelbo Aanensen, 2010) (se avsnitt 3.3.2). Udifferensierte PC12-celler uttrykker endogen GR (se avsnitt 3.3.2), men luciferaseverdiene ble ikke påvirket av NR3A. Vi ønsket å undersøke nærmere og valgte differensierte PC12-celler ettersom det har blitt vist at disse uttrykker endogen GR (Morsink et al., 2006). Så sannsynligvis er det mer endogen GR i differensierte PC12-celler (endogen GR er påvist i Figur 3-25).

Vi ønsket derfor å transfektere differensierte PC12-celler med NR3A og andre subenheter for å se om det foreligger en interaksjon. Det ble gjort en pilotstudie på dette. Det ble forsøkt å differensiere og transfektere PC12-celler mange ganger, men det var bare tre forsøk med målbare luciferaseverdier. Ettersom mange av cellene hadde falt av og det lå ofte få celler igjen i skålen, var det en utfordring å transfektere på dag 4.

### Interaksjon mellom NR3A og endogen GR i differensierte PC12-celler

Det var ikke en statistisk signifikant forskjell når differensierte PC12-celler ble ko-transfektet med NR3A sammenlignet med GR-transfektete celler, men det var en tendens til reduksjon i luciferaseverdier ved tilsetning av 1 nM deksametason (Figur 3-9). Ved ko-transfeksjon med NR3A var 1 nM deksametason ikke lenger signifikant i forhold til den ubehandlede kontrollen (CMV).

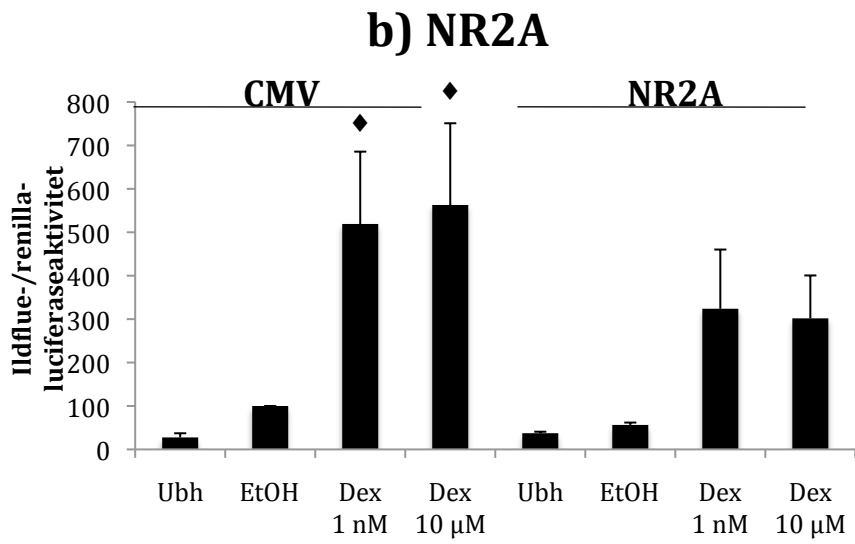
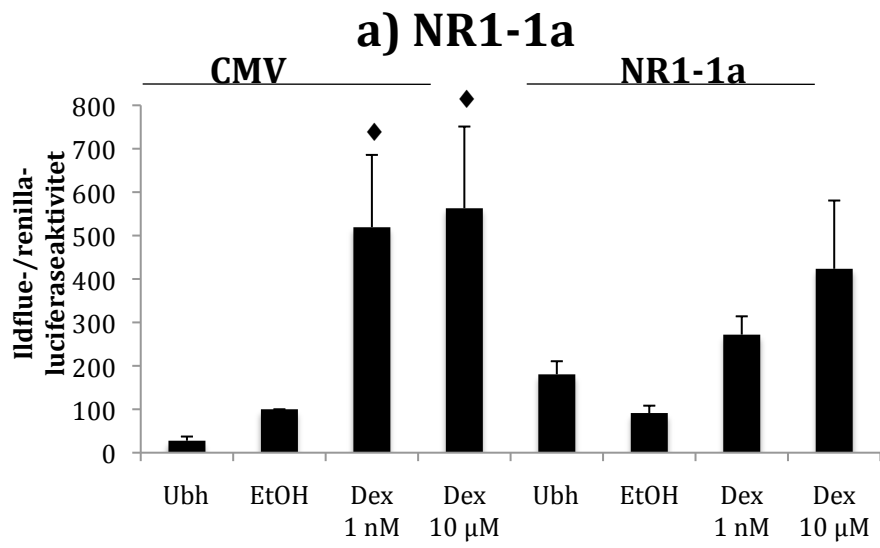


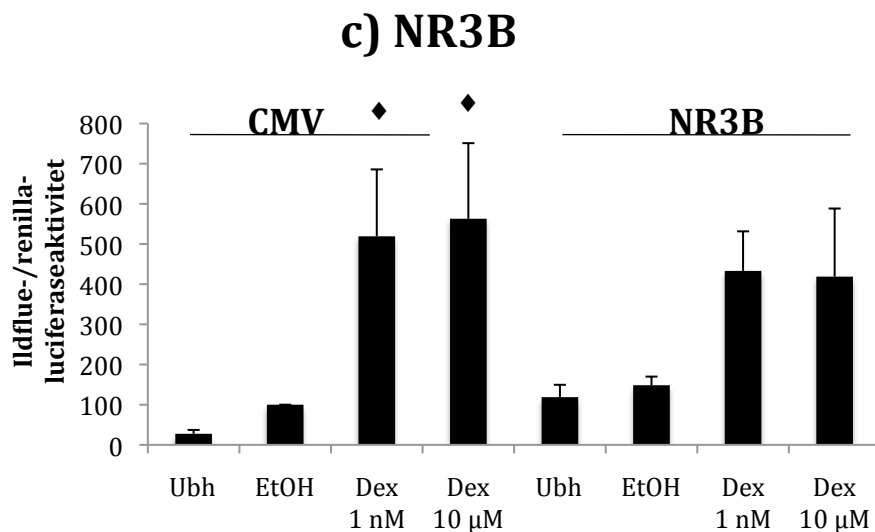
### Figur 3-9: NMDA-reseptorsubenheten NR3A påvirker ikke luciferaseaktiviteten i differensierte PC12-celler

PC12-celler ble differensiert med 50 ng/ml NGF, og etter tre dager transfektert med GRE-luc, RL-tk, CMV ± NR3A-subenheten. Dagen etter ble cellene eksponert for etanol eller deksametason (dex). Figuren viser ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i forhold til etanolkontrollen med SE, n=3. Alle verdiene i figuren er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble transfektert med NR3A er gjengitt til høyre. ◆ betyr at det er statistisk signifikant forskjellig fra ubehandlet kontrollen (CMV). Rådataene er vist i Tabell 3-6.

### Interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheter og endogen GR i differensierte PC12-celler

Resultatet viste at det ikke var signifikant forskjell mellom differensierte PC12-celler som uttrykte endogen GR og ble ko-transfektet med visse NMDA-reseptorsubenheter. Det var en tendens til reduksjon i luciferaseverdiene ved tilsetting av 1 nM og 10 µM deksametason, dette gjaldt for NR1-1a, NR2A og NR3B (Figur 3-10). For alle subenhetene ga de verken en økning over sin egen kontroll eller en reduksjon i forhold til GR alene. Renillaluciferaseverdiene har en tendens å være lavere for NR3B enn for de andre subenhetene (se rådata i Tabell 3-6).





**Figur 3-10 a-c: NMDA-reseptorsubenheterne påvirker ikke luciferaseaktiviteten i differensierte PC12-celler**

PC12-celler ble differensiert med 50 ng/ml NGF, og etter tre dager transfektert med GRE-luc, RL-tk, CMV ± subenheter. Cellene ble eksponert for etanol eller deksametason (dex) 24 timer etter. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=2-3. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble transfektert med subenheterne er gjengitt til høyre. Det er ikke en statistisk signifikant forskjell mellom behandlingene. Rådataene er vist i Tabell 3-6.

**Tabell 3-6: Tallmaterialet som Figur 3-9 og Figur 3-10 er basert på (dataene er ikke normalisert her)**

	Gjennomsnitt ildflueluciferase- aktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferase- aktivitet	SE	Antall forsøk
CMV	200	104	340689	121225	3
CMV + EtOH	915	586	336013	116811	3
CMV + 1 nM dex	3173	2282	287073	70059	3
CMV + 10 µM dex	2557	459	246313	66752	3
CMV + NR1-1a	548	220	145829	47447	3
CMV + NR1-1a + EtOH	314	171	149169	51881	3
CMV + NR1-1a + 1 nM dex	692	287	119347	38224	3
CMV + NR1-1a + 10 µM dex	818	259	112810	39262	3
CMV + NR2A	1138	784	1125068	472113	3
CMV + NR2A + EtOH	2432	1713	1517181	703394	3
CMV + NR2A + 1 nM dex	5390	2370	1018501	411296	3
CMV + NR2A + 10 µM dex	6384	2357	1346178	591272	3

CMV + NR3A	491	384	200395	140738	3
CMV + NR3A + EtOH	974	867	177054	109382	3
CMV + NR3A + 1 nM dex	2490	2128	179322	94761	3
CMV + NR3A + 10 $\mu$ M dex	1720	1266	121511	58074	3
CMV + NR3B	286	159	125964	60624	3
CMV + NR3B + EtOH	374	239	99238	49642	3
CMV + NR3B + 1 nM dex	796	427	82547	37983	3
CMV + NR3B + 10 $\mu$ M dex	1423	566	120709	75961	2

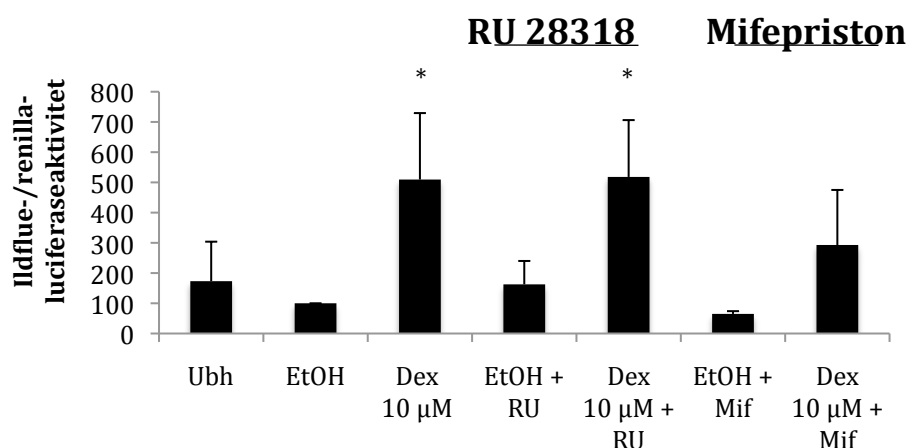
### 3.3.4 Transfeksjon av kyllingkornceller med luciferaseplasmider

#### Transfeksjon av kyllingkornceller med GRE-luc og RL-tk

Siden NMDA-reseptorantagonister reduserer celledøden i både kylling- og rottekornceller, var det interessant å se om hemmere har effekter på luciferaseaktiviteten hos kyllingkornceller. Kyllingkorncellene ble transfektert med kun GRE-luc og RL-tk siden korncellene uttrykker GR og NMDA-reseptorene naturlig. Renillaluciferase ble brukt som intern standard. Metafectene® Pro ble brukt til transfeksjon av kyllingkorncellene dagen etter preparering. Cellene ble inkubert med transfeksjonsløsning i 3 timer ved 37 °C, og det ble skiftet til definert ernæringsmedium med Ara-C.

Resultatene viste at endogen GR aktiveres ved tilsetning av deksametason (Figur 3-11), og dette stemte overens med at kyllingkorncellene uttrykker endogen GR. Vi så også at antagonistene ble ikke påvirket med denne luciferaseaktiviteten (Figur 3-11 og Figur 3-12), ettersom ved tilsetning av antagonistene MK 801, CGP 39551 og RU 28318 kunne det ikke ses en nedgang i luciferaseaktiviteten. Det var statistisk signifikant forskjell mellom deksametason med hemmere, og etanolkontrollen. For CGP 39551 var det også statistisk signifikant forskjell mellom deksametason med hemmer og etanol med hemmer (Figur 3-12). Det er ingen statistiske signifikante forskjeller mellom deksametason og deksametason med hemmere, men ved tilsetning av mifepriston var det en tendens til reduksjon i luciferaseproduksjonen.

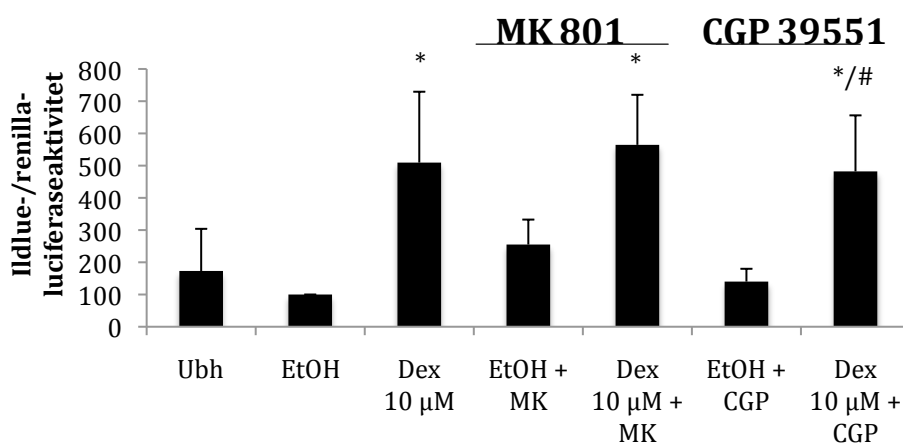
## GR- og MR-antagonister



**Figur 3-11: GR- og MR-antagonist påvirker ikke luciferaseaktiviteten**

Hver skål med kyllingkornceller ble transfektert med 0,9 µg GRE-luc, 0,1 µg RL-tk og 2 µl Metafectene® Pro. Inkuberingstiden med transfeksjonsløsning var 3 timer. Cellene ble eksponert for 10 µM RU 28318 (RU), 10 µM mifepriston (Mif) i tillegg til dex 24 timer etter transfeksjonen. Cellene ble høstet 48 timer etter transfeksjonen og luciferaseaktiviteten ble målt. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet i prosent med SE, n=6. \* betyr at det er en statistisk signifikant forskjell mellom deksametasoneksponerte celler mot etanol kontrollen (GRE-luc + RL-tk). Rådataene er vist i Tabell 3-7.

## NMDAR-antagonister



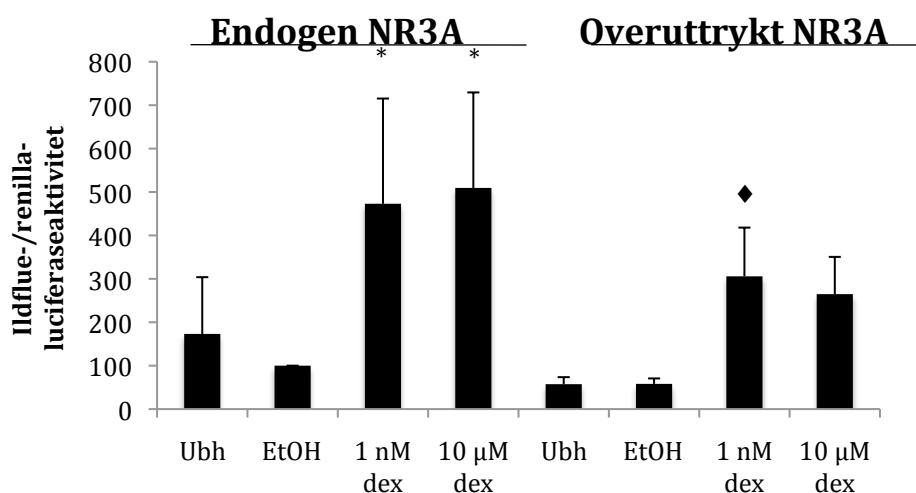
**Figur 3-12: NMDA-reseptorantagonistene påvirker ikke luciferaseaktiviteten**

Hver skål med kyllingkornceller ble transfektert med 0,9 µg GRE-luc, 0,1 µg RL-tk og 2 µl Metafectene® Pro. Inkuberingstiden med transfeksjonsløsning var 3 timer. Cellene ble eksponert for 1 µM MK 801, 100 µM CGP 39551, i tillegg til deksametason dagen etter. Cellene ble høstet 48 timer etter transfeksjonen og luciferaseaktiviteten ble målt. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet i prosent med SE, n=6. \* betyr at det er en statistisk signifikant forskjell mellom deksametasoneksponerte celler mot etanol kontrollen (GRE-luc + RL-tk). # betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom deksametason og hemmer, og etanol kontrollen og hemmer. Rådataene er vist i Tabell 3-7.

## Transfeksjon av kyllingkornceller med overuttrykt NR3A og NR1-1a

Vi ønsket å undersøke om det foreligger en interaksjon mellom GR og NR3A i kyllingkornceller. Kyllingkorncellene uttrykte både GR (Figur 3-11) og NMDA-reseptorene endogen. MR-antagonisten, GR-antagonisten og NMDA-reseptorantagonistene påvirket ikke luciferaseaktiviteten (Figur 3-11 og Figur 3-12). Det var ønskelig å se om interaksjonen mellom GR og NR3A kunne påvises i kyllingkornceller med overuttrykt NMDA-reseptor. Kyllingkorncellene ble transfektert med GRE-luc, RL-tk i tillegg til NR3A eller NR1-1a.

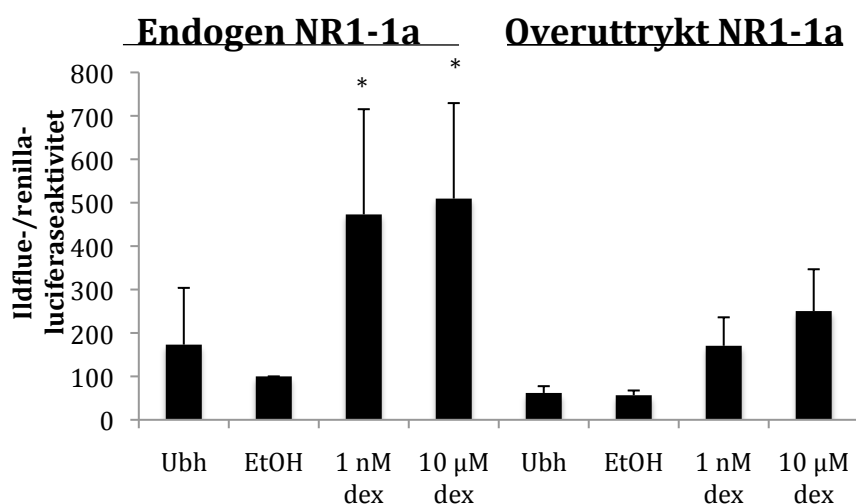
Det var ikke statistisk signifikant forskjell mellom kyllingkorncellene som ble transfektert med overuttrykt NR3A og de som ble transfektert med kun GRE-luc og RL-tk når det ble tilsatt deksametason, men det var en tendens til en reduksjon i luciferaseaktiviteten (Figur 3-13). Det samme gjaldt for overuttrykt NR1-1a (Figur 3-14). Felles for begge subenhetene var at i cellene med overuttrykte proteiner var luciferaseverdiene for ubehandlet og etanolkontrollen lavere enn for celler med endogen NMDA-reseptorsubenhet.



### Figur 3-13: Overuttrykt NR3A påvirker ikke luciferaseaktiviteten i kyllingkornceller

Hver skål med kyllingkornceller ble transfektert med 0,7 µg GRE-luc, 0,1 µg RL-tk, 0,2 µg NR3A og 2 µl Metafectene® Pro. Inkuberingstiden med transfeksjonsløsning var 3 timer. Cellene ble eksponert for etanol eller deksametason 24 timer etter transfeksjonen. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=6. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble transfektert med subenheten NR3A er gjengitt til høyre. \* betyr at det er en statistisk signifikant forskjell mellom deksametasoneksponerte celler mot etanolkontrollen (GRE-luc + RL-tk). ◆ betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom etanol og deksametason i NR3A-overuttrykte celler. Rådataene er vist i Tabell 3-7.





**Figur 3-14: Overuttrykt NR1-1a påvirker ikke luciferaseaktivitet i kyllingkornceller**

Hver skål med kyllingkornceller ble transfektert med 0,7 µg GRE-luc, 0,1 µg RL-tk, 0,2 µg NR1-1a og 2 µl Metafectene® Pro. Inkuberingstiden med transfeksjonsløsning var 3 timer. Cellene ble eksponert for etanol eller deksametason (dex) 24 timer etter transfeksjonen. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=6. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. Verdiene for celler som ble transfektert med subenheten NR1-1a er gjengitt til høyre. \* betyr at det er en statistisk signifikant forskjell mellom deksametasoneksponerte celler mot etanolkontrollen (GRE-luc + RL-tk). Rådataene er vist i Tabell 3-7.

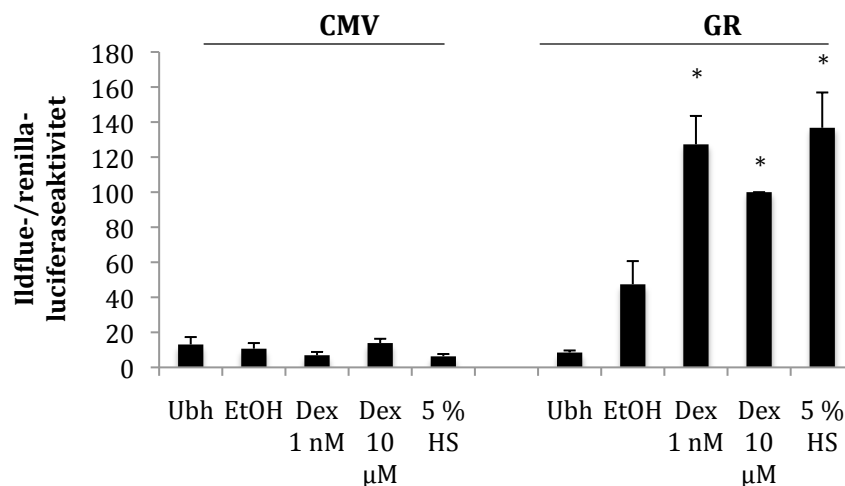
**Tabell 3-7: Tallmaterialet som Figur 3-11 til Figur 3-14 basert på (dataene er ikke normalisert her)**

Transfektort med GRE-luc + RL-tk (i tillegg til) og eksponert med:	Gjennomsnitt ildfluorluciferase-aktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferase-aktivitet	SE	Antall forsøk
Ubh	794	336	1133	501	6
1 nM dex	1864	452	427	65	6
10 µM dex	2608	410	679	183	6
10 µM dex+ MK 801	3094	863	522	108	6
10 µM dex+ RU 28318	2102	564	408	58	6
10 µM dex+ CGP 39551	2153	549	490	85	6
10 µM dex+ mifepriston	1047	516	416	66	6
EtOH	599	123	469	80	6
EtOH+ MK 801	1189	301	423	48	6
EtOH+ RU 28318	674	210	457	68	6
EtOH+ CGP 39551	807	168	515	78	6
EtOH+ mifepriston	313	84	386	66	6
NR3A	263	44	423	48	6
NR3A+ EtOH	286	40	454	40	6
NR3A+ 1 nM dex	1272	233	443	65	6
NR3A+ 10 µM dex	1414	363	502	47	6
NR1-1a	321	62	505	84	6
NR1-1a+ EtOH	285	47	427	41	6
NR1-1a+ 1 nM dex	815	180	476	78	6
NR1-1a+ 10 µM dex	1057	287	466	74	6

### 3.3.5 Faktorer som kan påvirke luciferaseaktiviteten mellom CV1- og PC12-celler

Det ble påvist en interaksjon mellom GR og NR3A i CV1-celler (se avsnitt 3.3.1). Ko-transfeksjon av GR og NR3A i PC12-celler førte ikke til nedgang i luciferaseproduksjon (se avsnitt 3.3.2). Det var derfor ønskelig å finne forskjeller mellom cellelinjene, og hvorfor det kan ses en funksjonell interaksjon mellom GR og NR3A i CV1-celler, men ikke i PC12-celler. Det var tidligere foreslått at hesteserum kan være forklaringen på dette (Wendelbo Aanensen, 2010). Det finnes hesteserum i PC12-mediet, men ikke i CV1-mediet, og det kan tenkes at serumet påvirket luciferaseaktiviteten i PC12-celler. Vi ønsket å se om hesteserum endrer luciferaseaktiviteten for CV1-celler. Det ble tilsatt samme mengde av hesteserum til CV1-skåler som er i vanlig PC12-mediet, det vil si 5 %.

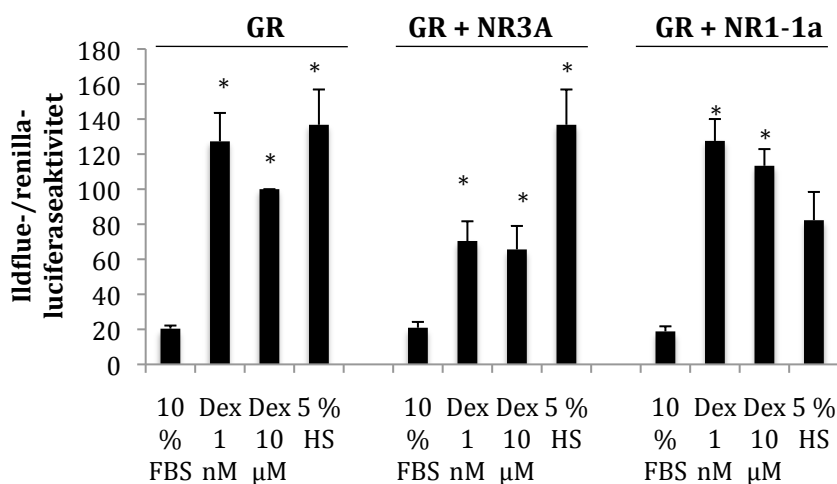
Resultatet viste at 5 % hesteserum påvirket luciferaseaktiviteten. Samme mengde hesteserum som i PC12-mediet, påvirket luciferaseaktiviteten like mye som eksponering med 1 nM deksametason (Figur 3-15). Det kan tenkes at hesteserum inneholder et kortikosteroid som kan binde til GR, dermed aktiverer GRE-luc og luciferaseproduksjonen. I tillegg var det ønskelig å se om hesteserumet kan påvirke luciferaseaktiviteten hos GR ko-transfektet med NMDA-reseptorsubenheterne NR3A og NR1-1a.



**Figur 3-15: Hesteserum påvirker luciferaseaktiviteten like stor grad som deksametason**

CV1-celler ble transfektet med GRE-luc, RL-tk, CMV og GR, og eksponert for etanol, deksametason (dex) eller 5 % hesteserum (HS) etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=6. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. \* betyr at det er statistisk signifikant forskjell mellom skålene som ble transfektet med GR og eksponert med dex og hesteserum i sammenligning med etanolkontroll (CMV-transfektete). Rådataene er vist i Tabell 3-8.

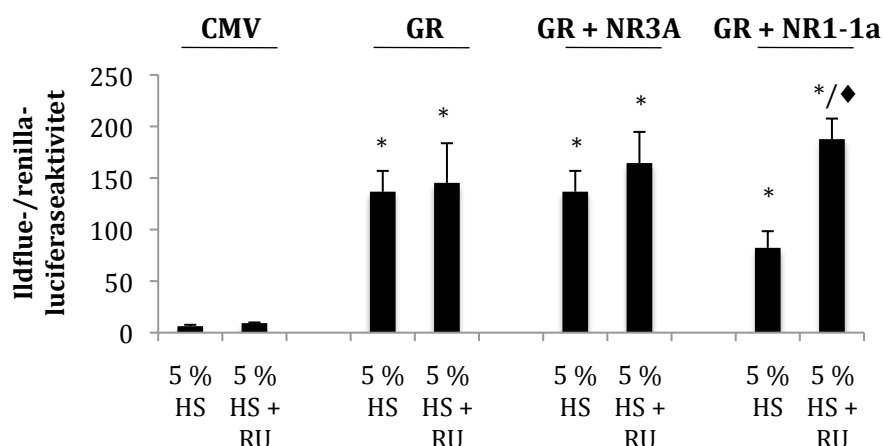
Som kontroll for at det var kun hesteserum som påvirket luciferaseaktiviteten, ble 10 % FBS (Føtalt kalveserum) tilsatt i skålene. Både NR3A og NR1-1a ko-transfektet med GR ga høy luciferaseaktivitet når 5 % hesteserum ble tilsatt. Det var signifikant økning for GR ko-transfektet med NR3A når det ble eksponert med deksametason og 5 % hesteserum sammenlignet med FBS eksponerte GR-transfektete celler (Figur 3-16). Ved tilsetning av hesteserum til NR3A ko-transfektete celler førte det ikke til en reduksjon i luciferaseverdiene sammenlignet med tilsetning av deksametason. Verdien var like høy som for GR-transfektete celler med hesteserum. For NR1-1a ga hesteserum ikke en signifikant reduksjon i luciferaseverdi, men ved tilsetning av hesteserum ga det lavere luciferaseaktivitet enn deksametason. Resultatet viste i tillegg at FBS ikke påvirket luciferaseaktiviteten (Figur 3-16).



**Figur 3-16: Hestaserumet påvirker luciferaseaktivitet til NR1-1a, men ikke NR3A**

CV1-celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk, CMV, GR, NR3A eller NR1-1a og eksponert for dex, 5 % hestaserum (HS) eller 10 % føtalt kalveserum (FBS) etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 2 døgn i prosent med SE, n=6. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. \* betyr at det var statistisk signifikant forskjellig fra GR-transfektet celler eksponert med FBS. Rådataene er vist i Tabell 3-8.

Det var interessant å se om tilsetning av en GR-antagonist kunne påvirke hestaserumets effekt på GR-transfektet CV1-celler. Det kunne tenkes at ved tilsetning av en antagonist, ville den hindre et eventuelt kortikosteroid i hestaserumet å aktivere luciferase. Mifepriston ville være et egnet valg siden den er spesifikk for GR, men tidligere luciferasemålinger og tellinger har vist at mifepriston påvirket cellene på en negativ måte. Derfor ble MR-antagonisten RU 28318 valgt. Resultatet viste at tilsetning av RU 28318 ikke førte til en reduksjon i luciferaseaktiviteten når den ble tilsatt sammen med 5 % hestaserum. Derimot ga NR1-1a transfektet celler signifikant høyere luciferaseverdi ved tilsetning av MR-antagonisten RU 28318 og hestaserum sammenlignet med hestaserumet alene (Figur 3-17).



**Figur 3-17: RU 28318 påvirker ikke luciferaseaktiviteten induisert av hestenserumet i NR3A**

CV1-celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk, CMV, GR, NR3A eller NR1-1a og eksponert for 5 % hestenserum og 10  $\mu$ M RU 28318 etter 24 timer. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter 48 timer i prosent med SE, n=4-6. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. \* betyr at det er signifikant forskjell mellom behandlingene av CMV-transfektet celler og eksponert for 5 % HS. ♦ betyr at det er signifikant forskjell med og uten hemmer. Rådataene er vist i Tabell 3-8.

**Tabell 3-8: Tallmaterialet som Figur 3-15 til Figur 3-17 er basert på**

	Gjennomsnitt ildflueluciferase- aktivitet	SE	Gjennomsnitt renillaluciferase- aktivitet	SE	Antall forsøk
CMV	2019	607	458187	143963	6
CMV + EtOH	1552	388	446284	134327	6
CMV + 1 nM dex	932	123	442137	107274	6
CMV + 10 $\mu$ M dex	1656	153	344859	78280	6
CMV + 5 % HS	943	70	448586	105616	6
CMV + GR	1763	228	613997	153753	6
CMV + GR + EtOH	10735	3672	552591	132473	6
CMV + GR + 1 nM dex	26689	8112	575521	187560	6
CMV + GR + 10 $\mu$ M dex	17208	4976	449334	127984	6
CMV + GR + 5 % HS	34431	10840	558478	123979	6
CMV + GR + NR3A	3659	989	762959	192879	6
CMV + GR + NR3A + EtOH	11607	3477	670081	119820	6
CMV + GR + NR3A + 1 nM dex	14469	2852	495815	98427	6
CMV + GR + NR3A + 10 $\mu$ M dex	10060	2204	370034	71608	6
CMV + GR + NR3A + 5 % HS	28820	7078	622546	125102	6
CMV + GR + NR1-1a	1842	349	549210	129339	6

CMV + GR + NR1-1a + EtOH	9864	3176	462409	102359	6
CMV + GR + NR1-1a + 1 nM dex	20468	4113	437198	106069	6
CMV + GR + NR1-1a + 10 $\mu$ M dex	12629	3053	289805	70362	6
CMV + GR + NR1-1a + 5 % HS	14307	3023	433424	81295	6
CMV + 10 % FBS	861	78	439160	119585	6
CMV + GR + 10 % FBS	4337	803	536925	116688	6
CMV + GR + NR3A + 10 % FBS	5806	1360	588240	108297	6
CMV + GR + NR1-1a + 10 % FBS	2639	390	396246	75753	6
CMV + 5 % HS + RU 28318	1058	84	390841	150176	4
CMV + GR + 5 % HS + RU 28318	17256	5015	430425	180236	4
CMV + GR + NR3A + 5 % HS + RU 28318	25066	6577	485370	181682	4
CMV + GR + NR1-1a + 5 % HS + RU 28318	20924	3379	381267	152385	4

### 3.4 Immunpresipitering

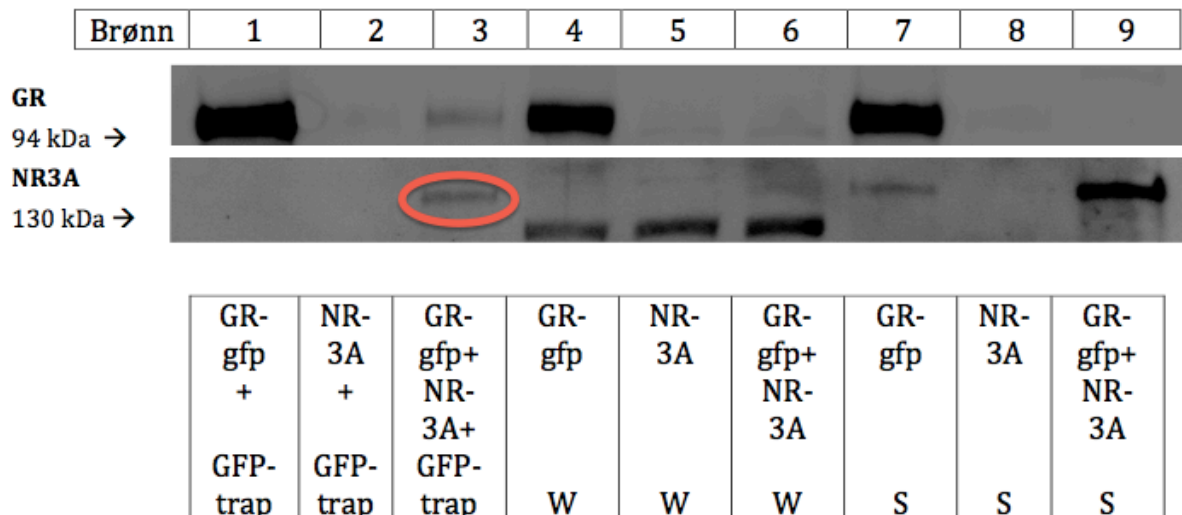
For å undersøke om det foreligger en protein-protein-interaksjon mellom NR3A og GR, ble det benyttet CV1-celler til immunpresipitering. CV1-cellelinjen er egnet som modell ettersom den ikke uttrykker endogen GR eller NMDA-reseptorsubenheter, og vi kan kontrollere proteinuttrykket i cellene. CV1-celler ble transfektert med GR eller NR3A koblet til gfp, GR eller NR3A alene, eller en ko-transfeksjon. Dagen etter transfeksjon ble mediet skiftet og dagen etter det ble cellene høstet. Før høsting ble skålenes kvalitet vurdert ved lysmikroskopi eller ved fluorescensmikroskop. Det ble tilsatt GFP-trap for å fange og få ned kun det som er merket med gfp. Dette fører til et renere og mer konsentrert cellelysat. Celleprøve ble kjørt gjennom SDS-PAGE og overført til en nitrocellulosemembran. Etter at ønsket protein ble påvist, ble membranen strippet for primære antistoffer og nytt antistoff mot partneren ble påsatt.

De tre første brønnene (brønn 1-3) var transfekterte CV1-celler inkubert med GFP-trap. Westernprøvene ble satt til de tre følgende brønnene (brønn 4-7) for å kontrollere at proteinene som ble transfektert er uttrykt. Det ble tatt ut 50  $\mu$ l av cellelysatet før inkubering med GFP-trap til Westernanalyse. De tre siste brønnene bestod av supernatanten, for å se hvor mye av proteiner som ikke var bundet til kulene.

Det er tenkt at dersom det er en interaksjon mellom GR og NR3A, vil den binde seg til partneren som er koblet til GFP. GFP-halen vil igjen binde seg til GFP-trap. Resultatet viste at i

brønnen der GR-gfp ble ko-transfektet med NR3A (brønn 3) var det et bånd mellom 100 og 150 kDa da membranen ble farget med NR3A-antistoffet (Figur 3-18). Dette stemmer overens med at NR3A har en molekylvekt på ca. 130 kDa. Båndet tydet på at det var mulig å få ned NR3A sammen med GR-gfp ved å bruke GFP-Trap. NR3A kom ikke ned sammen med kun GFP-trap (brønn 2), dette tydet på at NR3A ikke kan binde til trap uavhengig av GR-gfp. Det var ikke mulig å få ned GR ved bruk av NR3A-gfp (resultat ikke vist).

Westernprøven i brønn 5 (NR3A-prøven) var positiv kontroll for at NR3A ble transfektet i CV1-cellene. Her ble det sett et svakt bånd da membranen ble farget med NR3A. Det svake båndet kan skyldes dårlig transfeksjonseffektivitet (diskutert videre i avsnitt 4.2.2). GR-gfp ble transfektet inn i cellene. Det skulle være bånd i brønn 1, 3, 4, 6, 7 og 9, men det var et svakt bånd i brønn 6 og ingen bånd i brønn 9. I ko-transfeksjonen var det uttrykt mye mindre GR-gfp enn i prøver der GR-gfp var alene (brønn 1, 4, og 7). Dette kan komme av at det var en konkurranse for å danne proteiner i ko-transfektete celler. Prøvene som inneholdt supernatanten viste at lite av GR-gfp var bundet til trap, der båndintensiteten til GR-gfp i supernatanten var like intens som for den første brønnen. Metoden krever optimalisering slik at GFP i større grad kan binde til GFP-trap. Det er også viktig at negative og positive kontroller gir korrekte resultater for å kunne trekke en konklusjon.



**Figur 3-18: NR3A fulgte med GR-gfp ved å bruke GFP-trap**

CV1-celler ble transfektet med GR-gfp, NR3A eller GR-gfp sammen med NR3A. To døgn etter ble de høstet og lysert. GFP-trap® ble vasket og inkubert med cellelysatet i to timer før det ble vasket og tilsatt laemmlibuffer. Øverst, er membranen farget med GR-antistoffet med bånd ved 94 kDa. Nederst, er membranen farget med NR3A-antistoffet. Figuren viser et bånd ved 130 kDa i den brønnen der CV1-celler var transfektet med GR-gfp og NR3A. W står for Westernprøver, S står for supernatant.

---

### 3.5 Kyllingkorncellers morfologiske utvikling i kultur

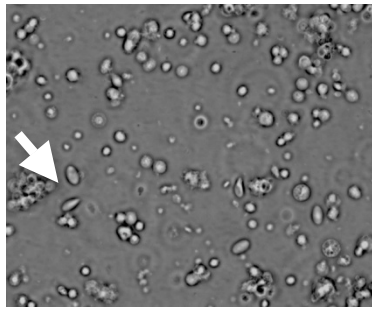
Det er rapportert at kornceller fra mus og rotter i primærkulturer endrer seg og gjennomgår en utvikling *in vitro*, derfor var det interessant å studere om dette også gjelder for kyllingkornceller når disse får utvikle seg i kultur.

Det ble tatt bilder av kyllingkornceller fra lillehjernen på ulike tidspunkter, fra utplatingsdagen, dag 0 *in vitro* (DIV 0) til dag 7 (DIV 7) (Figur 3-19). I noen av kulturskålene ble det tilsatt cytosin- $\beta$ -D-arabino-furanoside (Ara-C) dagen etter utplating, mens andre var ubehandlet. Mikroskopibildene viste at kyllingkorncellene lå spredt i skålen dagen de ble platet ut. De første dagene var det uttalt celledød, og man kunne se at mange celler hadde falt av. Utløpere dannes under utviklingen i kultur, og var synlig fra DIV 2 og 3. Fra DIV 5 til 7 dannet cellene klynger og etablerte synaptisk kontakt med hverandre. De cellene som hadde dannet utløpere og etablert synapser med andre kornceller, var de som overlevde i kulturen. På dette tidspunktet hadde mange av korncellene dødd og falt av skålen.

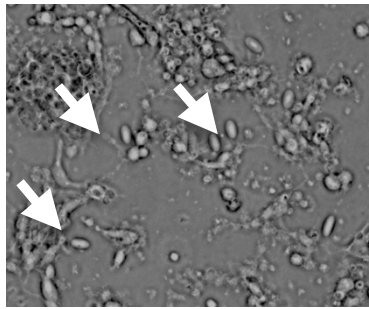
Det ble også sett at korncellene endret morfologien. Noen av cellene hadde en avlang fasong (merket med hvite piler), mens andre var mer runde og globulære (merket med blåe piler) (Figur 3-19). De avlange var først og fremst å se på tidlige tidspunkter etter utplating til kultur. De senere dagene, DIV 5 og 7, var korncellene mer globulære i morfologien. I skålene der Ara-C ble tilsatt, lå korncellene langt fra hverandre, mens i skåler uten Ara-C lå korncellene tettere sammen. Astrocytter var mer dominerende i skåler uten Ara-C.



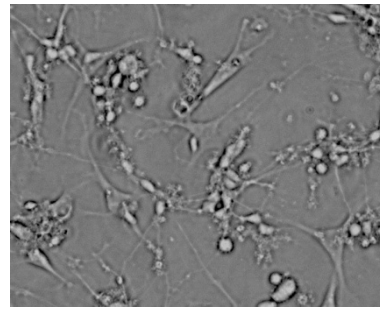
**Med Ara-C**



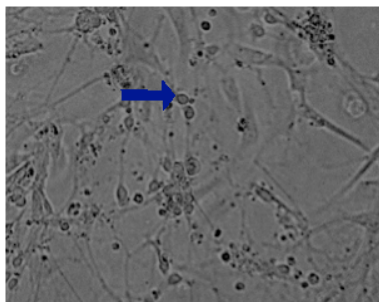
**DIV 0**



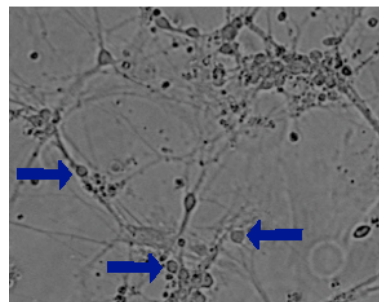
**DIV 1**



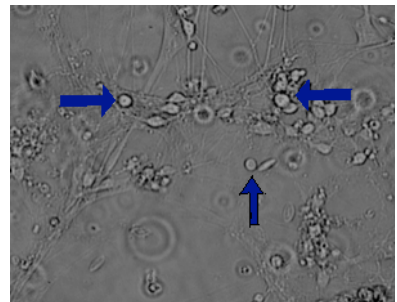
**DIV 2**



**DIV 3**

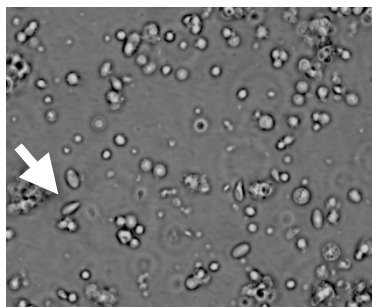


**DIV 5**

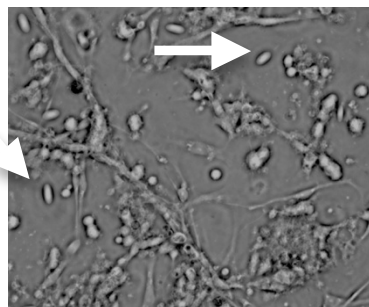


**DIV 7**

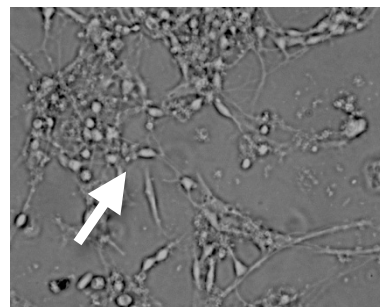
**Uten Ara-C**



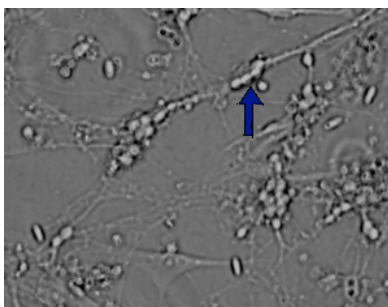
**DIV 0**



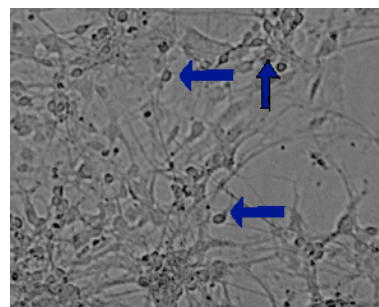
**DIV 1**



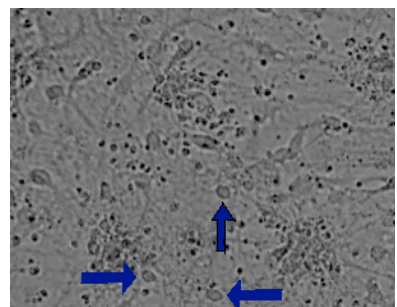
**DIV 2**



**DIV 3**



**DIV 5**



**DIV 7**

**Figur 3-19: Morfologisk utvikling av kyllingkornceller fra lillehjernen**

Bilder av ubehandlede kyllingkornceller med og uten Ara-C på utplatingsdagen (DIV 0), og på DIV 1, 2, 3, 5 og 7. De blåe pilene peker på eksempler av kornceller med en globulær morfologisk karakter, mens de hvite pilene peker på de med en avlang morfologisk karakter.

---

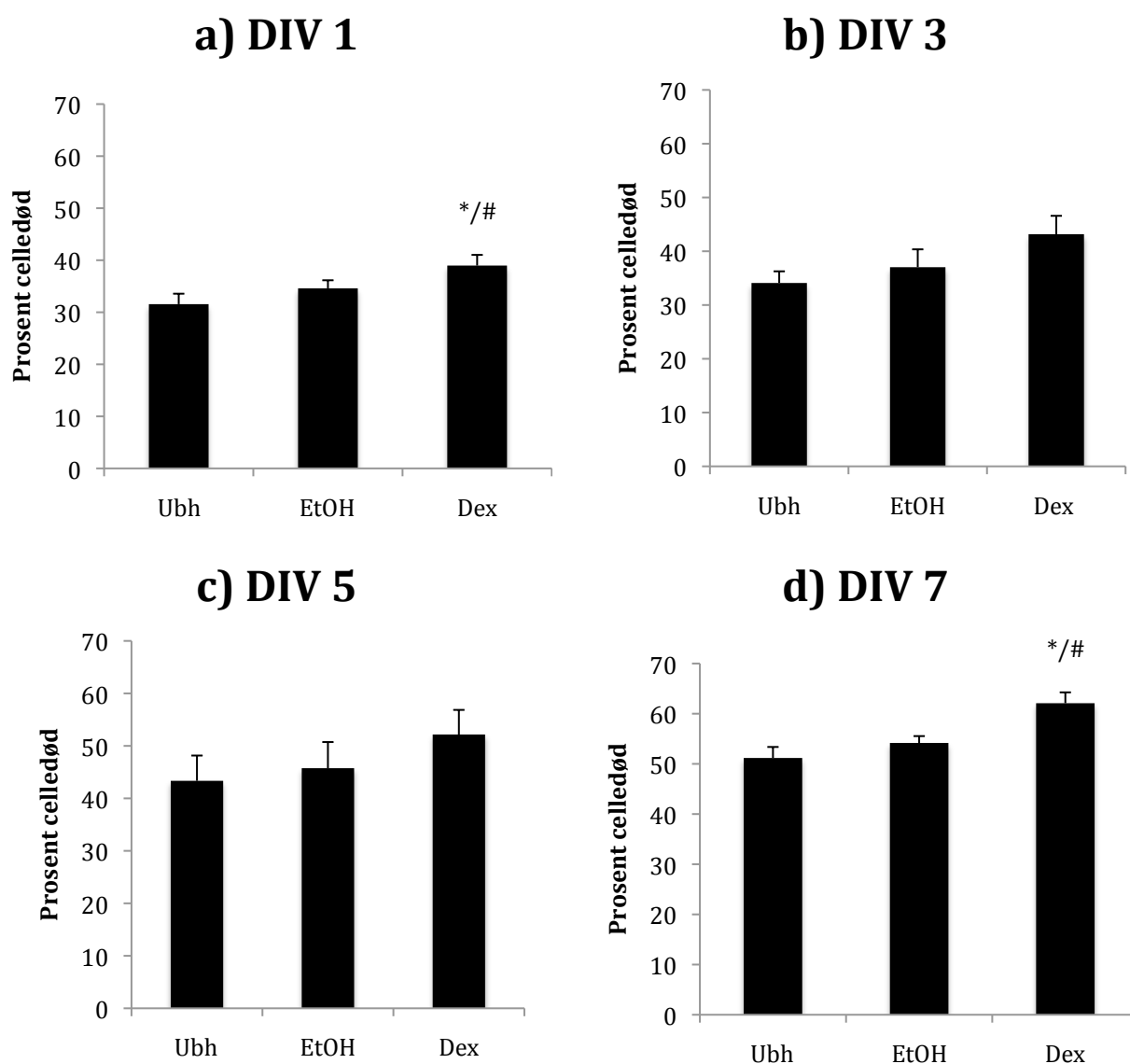
## **3.6 Deksametasonindusert celledød i korncellekulturer**

### **3.6.1 Utvikling av deksametasonindusert celledød i korncellekulturer fra kylling**

Studier har vist at deksametason induserer celledød i rotte- og kyllingkornceller når cellene eksponeres for deksametason, i henholdsvis DIV 7 og DIV 3 (Jacobs et al., 2006b, Aden et al., 2008). Det var ønskelig å studere effekten av deksametason på celledød ved ulike tidspunkter i kultur.

Det ble gjort en tidsserie der korncellene ble eksponert for deksametason på DIV 1, 3, 5 og 7. Deksametason var løst i etanol, derfor ble det tilsatt en tilsvarende mengde etanol til kontrollskålene. En skål ved hvert eksponeringstidspunkt var ubehandlet for å kunne studere den basale celledøden til korncellene. Cellene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer etter eksponering. Celledøden ble kvantifisert ved å telle døde trypanblåfargede celler og levende celler i et lysmikroskop.

Resultatet viste at den deksametasoninduserte celledøden på DIV 1 og 7 var signifikant høyere enn den ubehandlede skålen og etanolkontrollen (Figur 3-20). Den deksametasoninduserte celledøden var lav og basaldøden var høy. På DIV 7 ble det kun utført fire forsøk. Årsaken til dette var at cellene var av dårlig kvalitet lengre ut i kultur.



**Figur 3-20 a-d: Deksametasonindusert celledød hos kyllingkornceller fra lillehjernen**

Korncellene ble eksponert for 10  $\mu$ M deksametason på dag 1, 3, 5 og 7 i kultur. 24 timer etter eksponering ble celledøden kvantifisert ved trypanblåfarging og telling i lysmikroskop. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med SE, n=4-6. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. \* betyr at den deksametasoninduserte celledøden er statistisk signifikant forskjellig fra etanolkontrollen. # betyr at den deksametasoninduserte celledøden er statistisk signifikant forskjellig fra ubehandlet skål. Rådataene er vist i Tabell 3-9.

**Tabell 3-9: Tallmaterialet som Figur 3-20 er basert på**

DIV 1	Snitt	SE	Antall forsøk	DIV 3	Snitt	SE	Antall forsøk
Ubh	31,5	2,0	7	Ubh	34,1	2,2	6
EtOH	34,6	1,5	7	EtOH	37,0	3,3	6
Dex	38,9	2,0	7	Dex	43,2	3,4	6
DIV 5	Snitt	SE	Antall forsøk	DIV 7	Snitt	SE	Antall forsøk
Ubh	43,3	4,8	6	Ubh	51,2	2,2	4

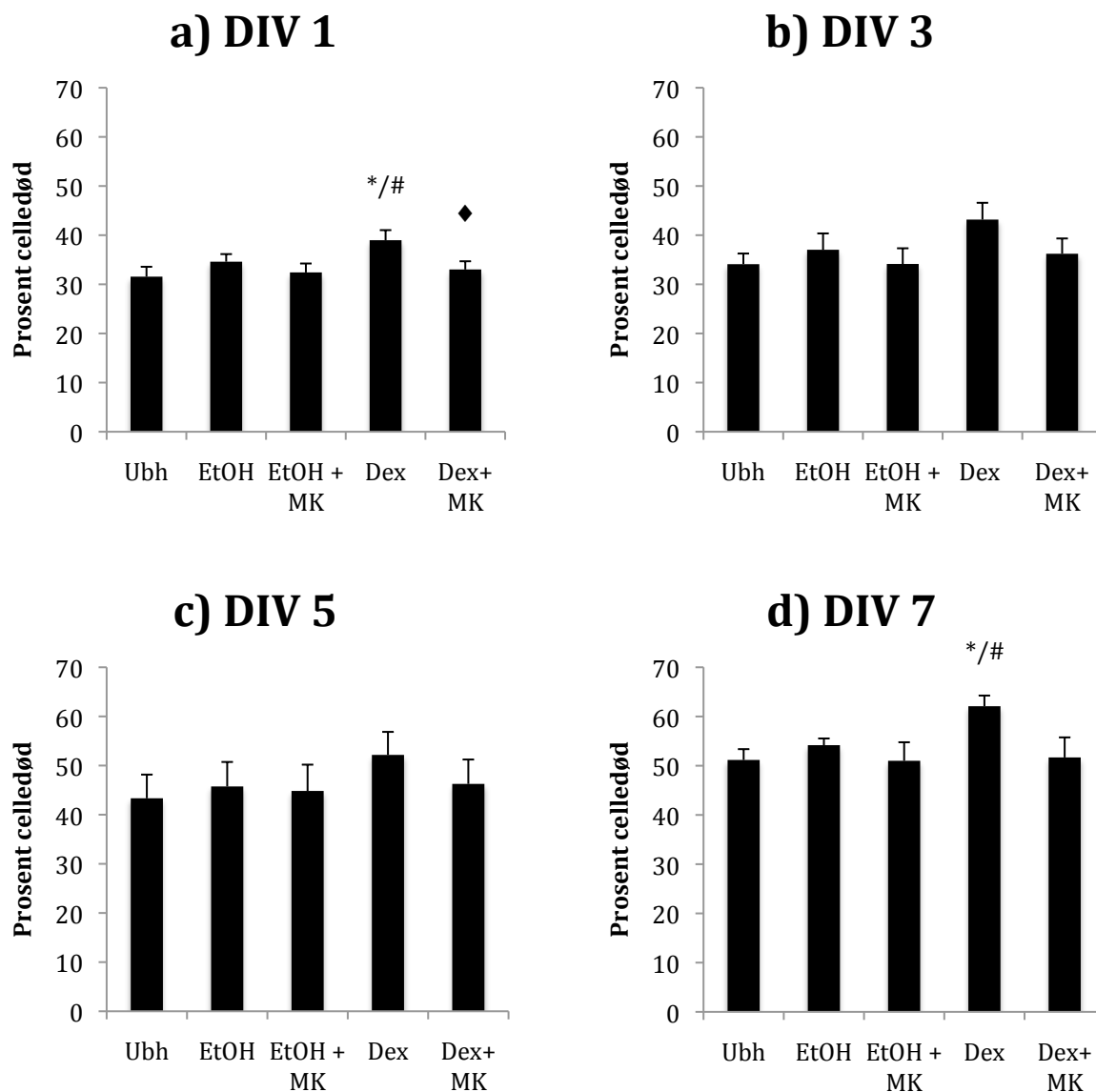
EtOH	45,7	4,9	6	EtOH	54,2	1,4	4
Dex	52,2	4,7	6	Dex	62,1	2,2	4

### 3.6.2 GR-, MR- og NMDA-reseptorantagonisters påvirkning på celledød i deksametasoneksponerte kyllingkornceller

Tidligere var det foreslått at deksametason økte  $Ca^{2+}$ -innstrømningen gjennom NMDA-reseptoren (Takahashi, 2002). Derfor var det interessant å studere om deksametasonindusert celledød lot seg blokkere av en NMDA-reseptorantagonist, og om eventuell blokkering var forbundet med cellenes utvikling i kultur. I tillegg var det ønskelig å studere effekten av MR- og GR-reseptorantagonister.

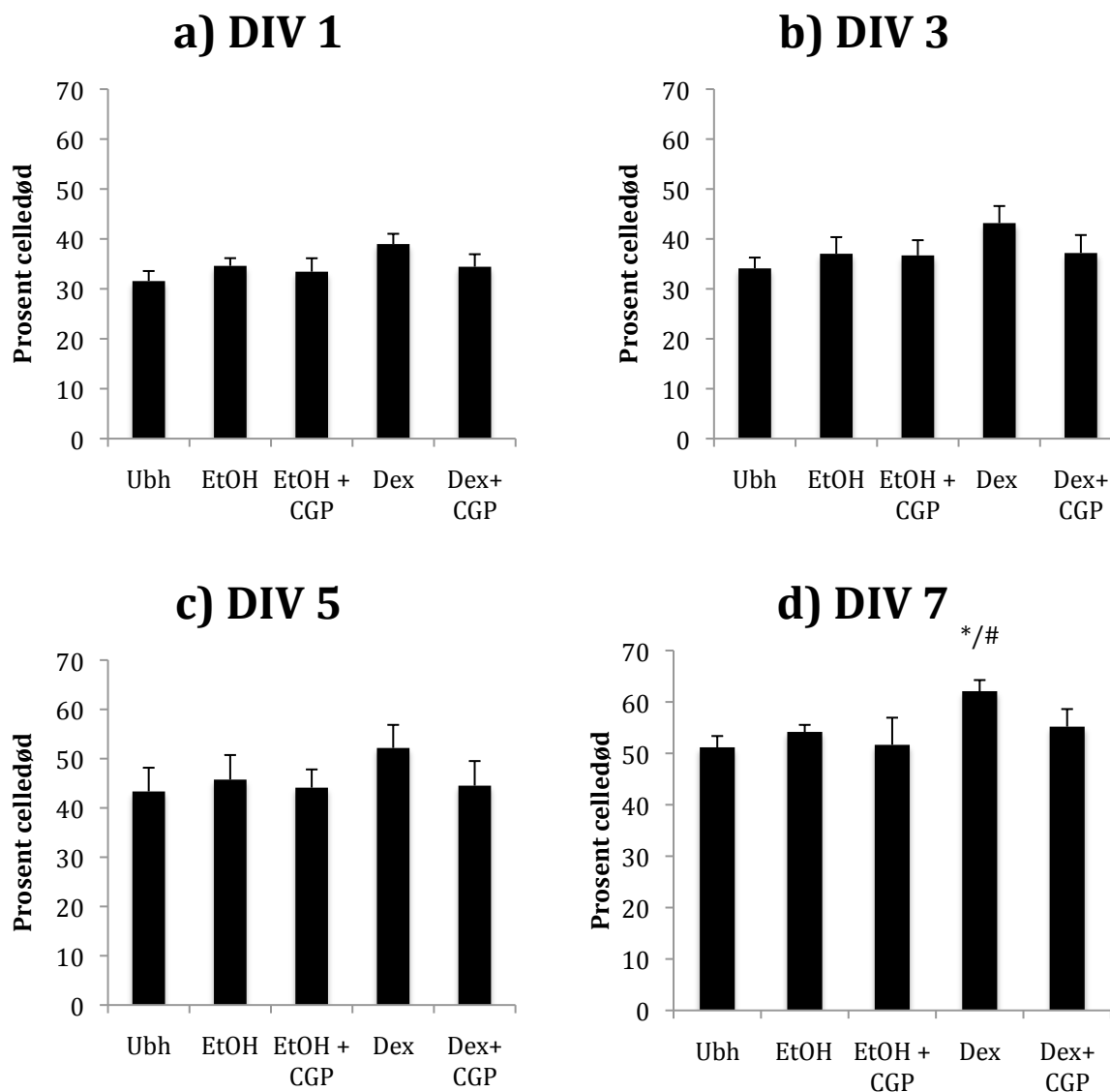
I denne oppgaven ble kyllingkorncellene behandlet med fire ulike hemmere, MK 801 (1  $\mu$ M) og CGP 33951 (100  $\mu$ M) som var henholdsvis ikke-kompetitiv og kompetitiv NMDA-reseptorantagonister, og RU 28318 (10  $\mu$ M) og RU 486 (Mifepriston, 10  $\mu$ M) som var henholdsvis MR- og GR-antagonist. Deksametason og hemmere ble tilsatt på DIV 1, 3, 5 og 7. En skål fra hvert eksponeringstidspunkt var ubehandlet for å kunne studere korncellenes basaldød. Etter eksponering, ble korncellene inkubert i 24 timer, og celledød ble kvantifisert ved å telle døde trypanblåfargede celler og levende celler i lysmikroskop. Etanoleksponerte kornceller ble brukt som kontroll for deksametasonindusert celledød. På avdelingen ble det tidligere sett på effekten av MK 801 og CGP 33951 på deksametasonindusert celledød i kyllingkornceller (Wendelbo Aanensen, 2010).

Resultatet viste at på DIV 1 ga MK 801 en beskyttelse mot deksametasonindusert celledød. Deksametason ga signifikant høyere celledød enn ubehandlet, etanolkontrollen, og MK 801 med deksametason (Figur 3-21). CGP 39551 ga ikke en signifikant beskyttelse (Figur 3-22). RU 28318 ga signifikant beskyttelse på DIV 1 og 7 sammenlignet med ubehandlet og deksametason, men forskjellen fra etanolkontrollen var ikke signifikant på DIV 1 (Figur 3-23). Generelt ga mifepriston mye celledød, dette kan ses i DIV 1-7 (Figur 3-24). På mikroskopibildene var det mulig å se at GR-antagonisten også hadde endret på morfologien til korncellene (bilde ikke vist). På DIV 7 kunne man se at deksametason førte til en signifikant høyere celledød enn ubehandlet, etanolkontrollen og deksametason med mifepriston. Mifepriston-resultatene må tolkes med forsiktighet ettersom det bare ble gjort to forsøk.



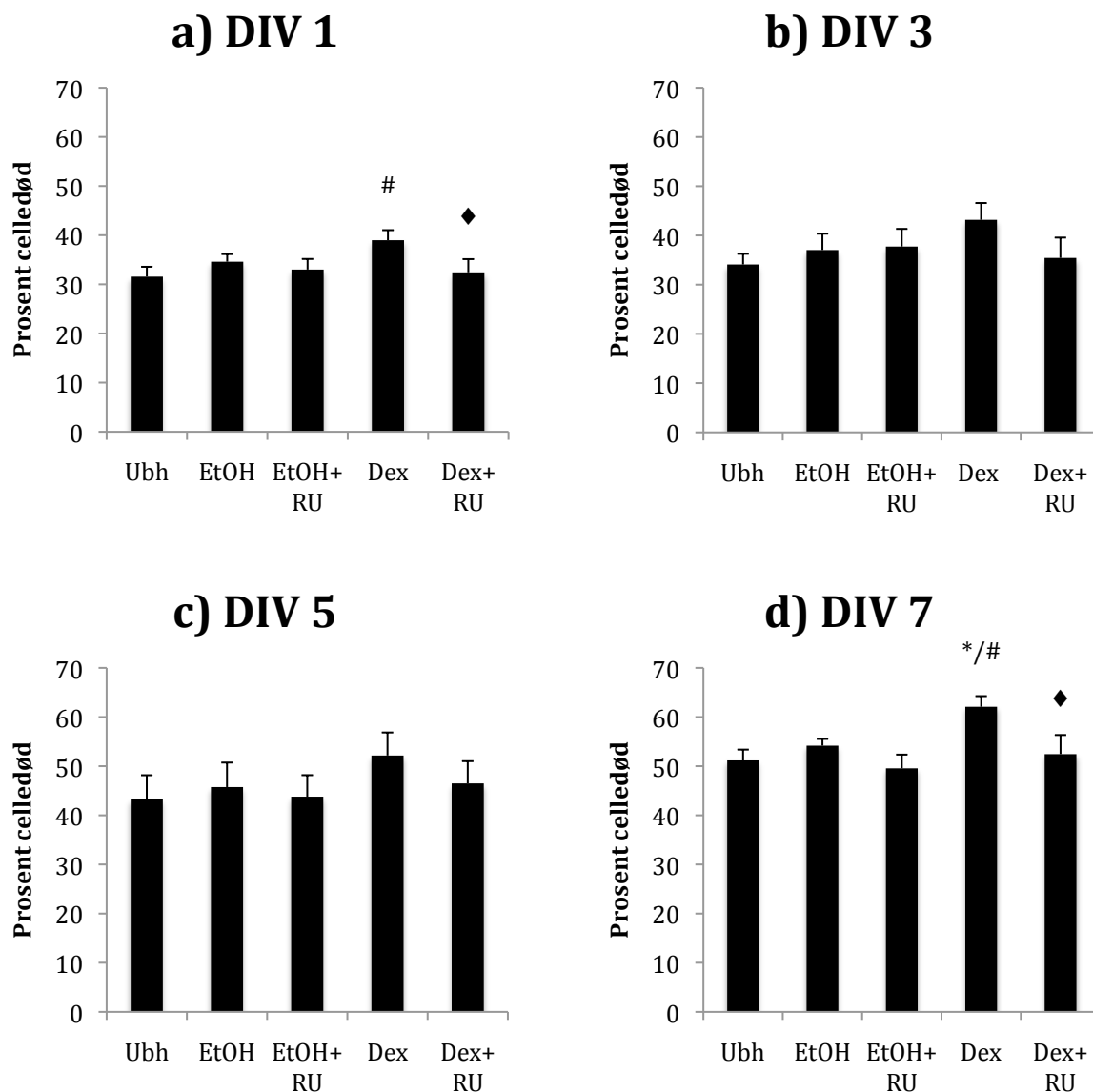
**Figur 3-21 a-d: Effekt av NMDA-reseptorantagonisten MK 801 på deksametasonindusert celledød hos kyllingkornceller**

Korncellene ble eksponert for NMDA-reseptorantagonisten MK 801 (1  $\mu$ M) og deksametason (10  $\mu$ M) på DIV 1, 3, 5 og 7. 24 timer etter eksponering ble celledøden kvantifisert ved trypanblåfarging og telling i lysmikroskop. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med SE, n=4-7. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. \* betyr at den deksametasoninduserte celledøden er statistisk signifikant forskjellig fra etanolskålene og # betyr at den deksametasoninduserte celledøden er signifikant forskjellig fra ubehandlet skål.  $\blacklozenge$  betyr at deksametasonindusert celledød er signifikant forskjellig fra Dex + MK. Rådataene er vist i Tabell 3-10.



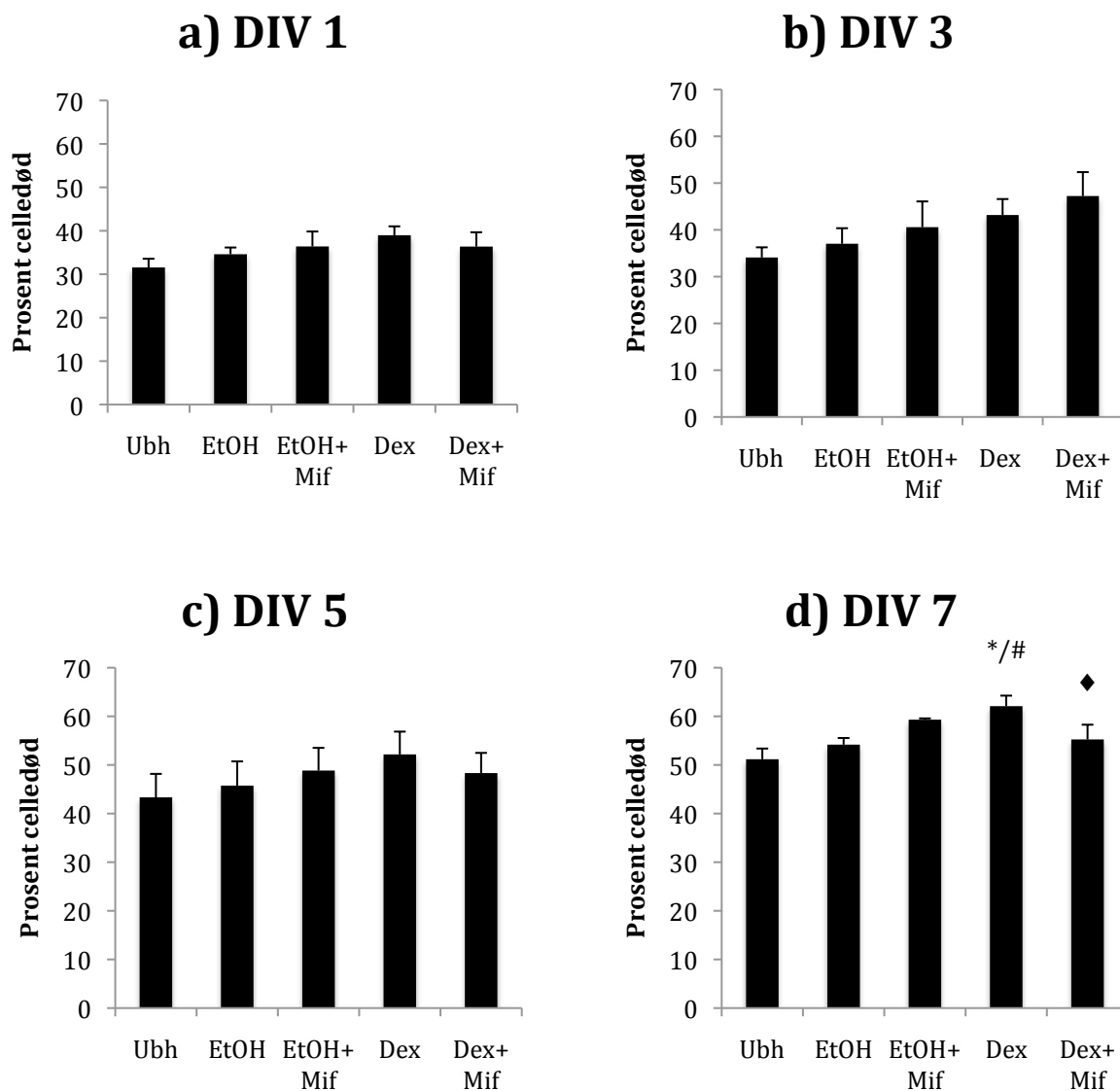
**Figur 3-22 a-d: Effekt av NMDA-reseptorantagonisten CGP 33951 på deksametasonindusert celledød hos kyllingkornceller**

Korncellene ble eksponert for NMDA-reseptorantagonisten CGP 33951 (100  $\mu$ M) og deksametason (10  $\mu$ M) på DIV 1, 3, 5 og 7. 24 timer etter eksponering ble celledøden kvantifisert ved trypanblåfarging og telling i lysmikroskop. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med SE, n=4-7. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. \* betyr at den deksametasoninduserte celledøden er statistisk signifikant forskjellig fra etanolskålene og # betyr at den deksametasoninduserte celledøden er signifikant forskjellig fra den ubehandlede skålen. Rådataene er vist i Tabell 3-10.



**Figur 3-23 a-d: Effekt av MR-reseptorantagonisten RU 28318 på deksametasonindusert celledød hos kyllingkornceller**

Korncellene ble eksponert for MR-reseptorantagonisten RU 28318 (10  $\mu$ M) og deksametason (10  $\mu$ M) på DIV 1, 3, 5 og 7. 24 timer etter eksponering ble celledøden kvantifisert ved trypanblåfarging og telling i lysmikroskop. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med SE, n=4-7. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. \* betyr at den deksametasoninduserte celledøden er statistisk forskjellig fra etanolskålene og # betyr at den deksametasoninduserte celledøden er signifikant forskjellig fra den ubehandlede skålen. ♦ betyr at deksametasonindusert celledød er signifikant forskjellig fra Dex + RU. Rådataene er vist i Tabell 3-10.



**Figur 3-24 a-d: Effekt av GR-reseptorantagonisten mifepriston på deksametasonindusert celledød hos kyllingkornceller**

Korncellene ble eksponert GR-reseptorantagonisten mifepriston (10  $\mu$ M) og deksametason (10  $\mu$ M) på DIV 1, 3, 5 og 7. 24 timer etter eksponering ble celledøden kvantifisert ved trypanblåfarging og telling i lysmikroskop. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent av det totale celleantallet med SE, n=2-7. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk. \* betyr at den deksametasoninduserte celledøden er statistisk signifikant forskjellig fra etanolskålene og # betyr at den deksametasoninduserte celledøden er signifikant forskjellig fra ubehandlet skål. ♦ betyr at deksametasonindusert celledød er signifikant forskjellig fra Dex + Mif. Rådataene er vist i Tabell 3-10.



**Tabell 3-10: Tallmaterialet som Figur 3-21 til Figur 3-24 er basert på**

	Snitt DIV 1	SE DIV 1	Snitt DIV 3	SE DIV 3	Snitt DIV 5	SE DIV 5	Snitt DIV 7	SE DIV 7	Antall forsøk
Ubh	31,6	2,0	34,1	2,3	43,3	4,8	51,2	2,2	4-7
EtOH	34,6	1,5	37,0	3,3	45,7	4,9	54,2	1,4	4-7
EtOH + MK 801	32,4	1,8	34,1	3,2	44,8	5,4	51,0	3,8	4-7
EtOH + CGP 39551	33,4	2,7	36,7	3,1	44,1	3,7	51,7	5,3	4-7
EtOH + RU 28318	33,0	2,2	37,7	3,6	43,8	4,4	49,6	2,8	4-7
EtOH + mifepriston	36,4	3,5	40,6	5,5	48,8	4,7	59,3	0,3	2-7
10 $\mu$ M dex	38,9	2,0	43,2	3,4	52,2	4,7	62,1	2,2	4-7
10 $\mu$ M dex + MK 801	33,0	1,7	36,2	3,1	46,3	4,9	51,7	1,4	4-7
10 $\mu$ M dex + CGP 39551	34,4	2,5	37,2	3,6	44,5	5,0	55,2	3,4	4-7
10 $\mu$ M dex + RU 28318	32,4	2,7	35,2	4,1	46,5	4,5	52,4	3,9	4-7
10 $\mu$ M dex + mifepriston	36,4	3,3	47,2	5,1	48,3	4,2	55,2	3,0	4-7

### 3.7 Westernblotting

Westernblotting ble brukt for å studere hvordan kyllingkornceller utvikler seg og differensierer i kultur. Denne metoden kan også brukes for å knytte subenhets sammensetningen av NMDA-reseptorer opp mot korncellenes utviklingstrinn. Kyllingkorncellene ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 og 9, på samme tidspunkt som kyllingkorncellene ble eksponert for deksametason med tanke på kvantifisering av celledød. Hensikten var å studere sammenheng mellom deksametasonindusert celledød, og uttrykket av GR og NMDA-reseptorerens sammensetning. Før høsting ble skålene undersøkt i et mikroskop for å se om korncellene var av god kvalitet. Etter elektroforese og blotting, ble alle proteinene på membranen farget med Ponceau S fargeløsning. Når ønsket protein ble påvist, ble membranen strippet for primære antistoffer og nytt primærantistoff mot  $\beta$ -aktin ble påsatt.

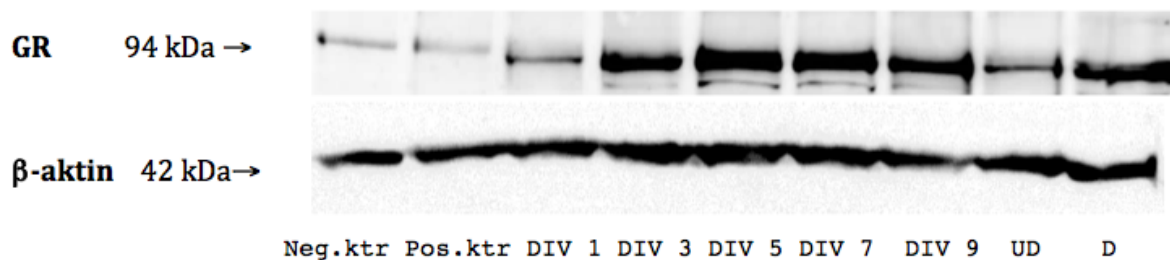
---

Alle proteinbåndene ble semikvantifisert i bildebehandlingsprogrammet ImageJ ved at det ble tegnet en ramme rundt hvert enkelt bånd, og lysstyrken i hver ramme ble målt. For å sammenligne båndene innen samme membran, ble bakgrunnsstøy trukket fra. Bakgrunnen ble funnet ved å måle lysstyrken i et område uten bånd. Det finnes flere metoder for å kvantifisere proteinbåndene, men metoden valgt i denne oppgaven baserte seg på en tidligere studie der det ble laget en fortynningsrekke med ulike konsentrasjoner av et plasmid. Fortynningsrekken ble analysert i ImageJ, og parametrene maksimal båndstyrke og integraltetthet ble sammenlignet. Det var størst lineær sammenheng mellom maksimal båndstyrke og konsentrasjon av plasmid i fortynningsrekken (Lindland-Tjønn, 2009).

Vi ønsket å studere om det var en sammenheng mellom deksametasonindusert toksisitet, og uttrykket av GR eller NMDA-reseptors subenhets sammensetning. Uttrykket av NMDA-reseptorsubenheter på ulike tidspunkter vil kunne si noe om korncellers modenhet under utvikling i kultur (Cull-Candy et al., 1998). CV1-celler ble transfektert med de ulike NMDA-reseptorsubenheter som skulle studeres, og disse ble høstet på samme måte som for kyllingkorncellene. Transfektete CV1-celler ble da en positiv kontroll, mens ikke-transfektete CV1-celler som ikke uttrykket endogene NMDA-reseptorsubenheter, ble brukt som negativ kontroll.

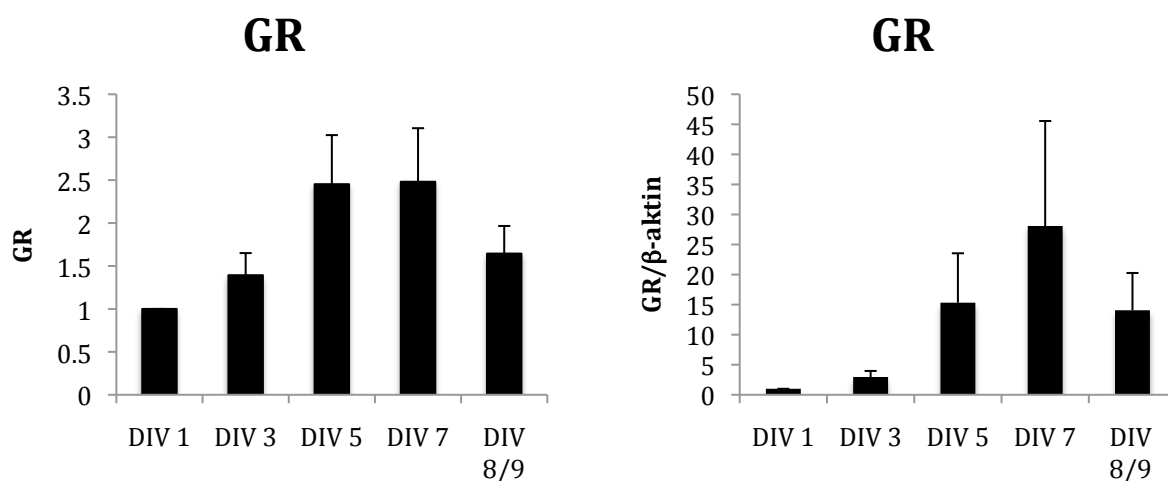
### **3.7.1 Uttrykk av GR i kyllingkornceller**

Westernblottene viste at GR var uttrykt alle dagene i kultur (Figur 3-25). GR-uttrykket økte fra DIV 1 til DIV 7 og var størst DIV 5 og 7, før den ble redusert i DIV 9 (Figur 3-25). Blottet viste et uspesifikt bånd i den negative kontrollen, ettersom CV1-celler ikke uttrykker GR (Giguere et al., 1986). Det kunne ikke ses bånd i den positive kontrollen. Årsaken til at dette kan skyldes at GR-antistoffet ikke gjenkjenner humant GR som ble transfektet inn i CV1-cellene, selv om det er oppgitt på databladet at antistoffet gjenkjenner humant GR. En annen årsak kan være at det var dårlig transfeksjonseffektivitet (diskutert i avsnitt 4.1.4). Det var også interessant å se om PC12-celler uttrykker GR. I de to siste brønnene ble det tilsatt prøver fra udifferensierte og differensierte PC12-celler. Hos udifferensierte var det et svakere bånd enn for de differensierte cellene.  $\beta$ -aktin har en tendens til å reduseres over tid, der uttrykket av proteinet er sterkest tidlig i kultur.



**Figur 3-25: GR er til stede i alle dagene hos kyllingkornceller**

Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 og 9. I de to siste brønnene ble PC12-celler benyttet. UD står for udifferensiert og D er differensiert. PC12-celler ble differensiert med NGF. Figurene viser Westernbånd for GR med tilhørende Westernbånd for  $\beta$ -aktin fra et representativt blott av seks ulike kyllingpreparasjoner. CV1-celleprøver ble benyttet som positiv og negativ kontroll.



**Figur 3-26: Grafisk fremstilling av Westernbåndstyrke til GR**

Figuren viser proteinbåndenes styrke målt som gjennomsnittlig lysnivå. Til venstre er det GR, mens til høyre er det fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til GR og  $\beta$ -aktin etter at bakgrunnen er trukket fra med SE,  $n=6$ . Det er ingen statistisk signifikans mellom dagene *in vitro*. Rådatene er vist i Tabell 3-11.

**Tabell 3-11: Måling av båndstyrke som ligger i grunn for Figur 3-26**

	Gjennomsnitt GR	SE	Gjennomsnitt $\beta$ -aktin	SE
<b>DIV 1</b>	266,4	108	232,7	71
<b>DIV 3</b>	522,4	303	207,2	58
<b>DIV 5</b>	898,7	492	201,4	52
<b>DIV 7</b>	871,2	457	178,3	45
<b>DIV 9</b>	561,6	317	168,6	39
<b>Bakgrunn</b>	101,7	27	105,7	0.7

---

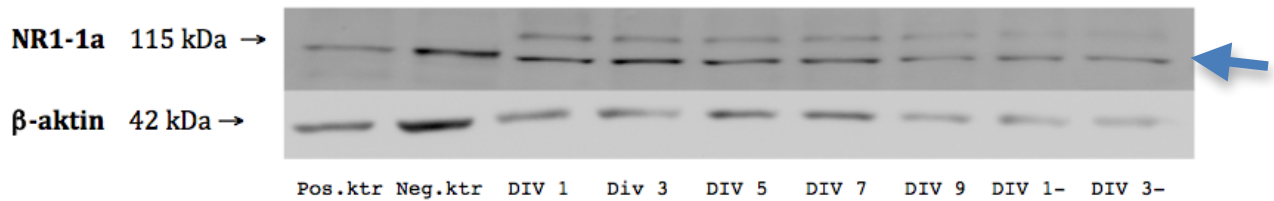
### 3.7.2 Uttrykk av NMDA-reseptorsubenheter i kyllingkornceller

Blottene viste at NR1-1a var til stede på alle dagene i kultur (Figur 3-27). Uttrykket var størst i begynnelsen av kulturen (DIV 1 og DIV 3), og reduserte med tiden (Figur 3-27). I de to siste brønnene ble det brukt kyllingkornceller som ikke fikk tilsatt Ara-C dagen etter preparering. Båndene uten tilsetning av Ara-C var svakere enn båndene med. Det kan ses et bånd i den negative kontrollen selv om CV1-celler ikke uttrykker endogene NMDA-reseptorer (Giguere et al., 1986) og derfor må det være et uspesifikt bånd.

Resultatet fra Westernanalyse viste at uttrykket av NR2A økte med økende dager i kultur (Figur 3-29). På DIV 5 var det et sterkere bånd, men dette var ikke mulig å se etter korrigering med  $\beta$ -aktin (Figur 3-30).

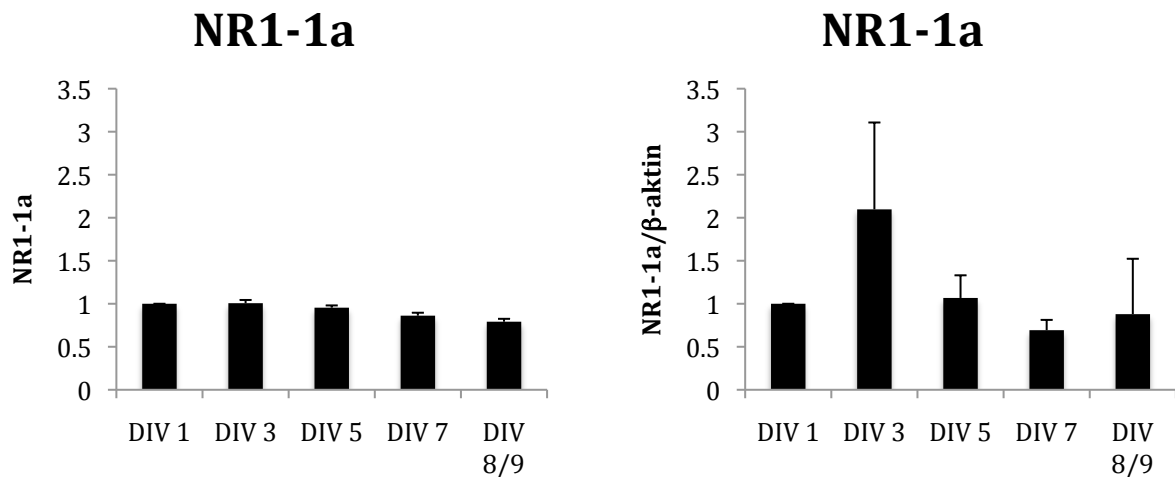
NR2B-uttrykket var størst rett etter utplating til kultur, og avtok gradvis (Figur 3-31). Ettersom vi ikke hadde NR2B-plasmidet tilgjengelig, ble rottekornceller benyttet som positiv kontroll. Det er kjent at de uttrykker endogen NR2B (Liu et al., 2004). På DIV 5 var det et sterkere bånd, både for farging med NR2A- og  $\beta$ -aktin-antistoff.

Westernblottene viste at NR3A-uttrykket økte fra DIV 1 til DIV 5, før det ble redusert på DIV 7 (Figur 3-33). Dette blottet viste ingen bånd på den positive kontrollen, dette kan skyldes at det var dårlig transfeksjonseffektivitet akkurat denne gangen. I de to siste brønnene ble det brukt kyllingkornceller som ikke fikk tilsatt Ara-C dagen etter preparering. Blottet viste svakere bånd uten Ara-C tilsetning, særlig for  $\beta$ -aktin. Det var ingen bånd i den positive kontrollen, selv om det står i databladet at NR3A-antistoffet gjenkjenner den humane subenheten. Det kan også skyldes at den positive kontrollen var fra en periode med dårlig transfeksjonseffektivitet. Det var kun på de tre første membranene der NR3A-båndet kom opp. Dette kan skyldes at det ble benyttet antistoff fra en annen batch i de senere forsøkene, som ikke klarte å gjenkjenne NR3A.



**Figur 3-27: NR1-1a-uttrykket er størst på DIV 1 og 3, og avtar etter DIV 3**

Kyllingcornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 og 9. Figurene viser Westernbånd for NR1-1a med tilhørende Westernbånd for  $\beta$ -aktin fra én av åtte ulike kyllingpreparasjoner. CV1-celleprøver ble benyttet som positiv og negativ kontroll. Pilen peker på NR1-1a-båndet.

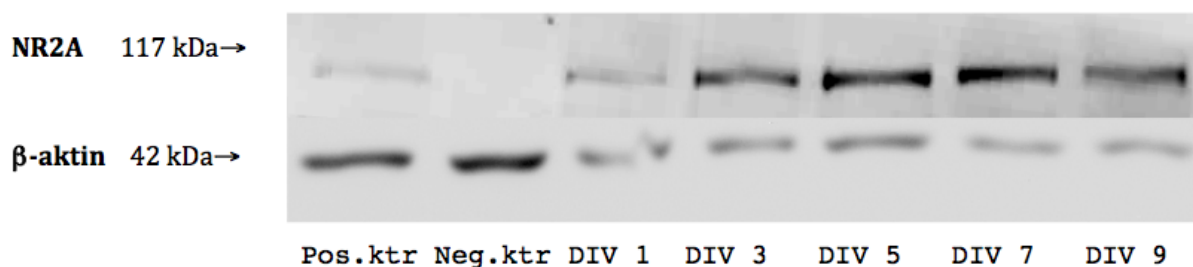


**Figur 3-28: Grafisk fremstilling av Westernbåndstyrken til NR1-1a**

Figuren viser proteinbåndenes styrke målt som gjennomsnittlig lysnivå. Til venstre er det NR1-1a, mens til høyre er det fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til NR1-1a og  $\beta$ -aktin etter at bakgrunnen er trukket fra med SE, n=8. Det er ingen statistisk signifikans mellom gruppene. Rådataene er vist i Tabell 3-12.

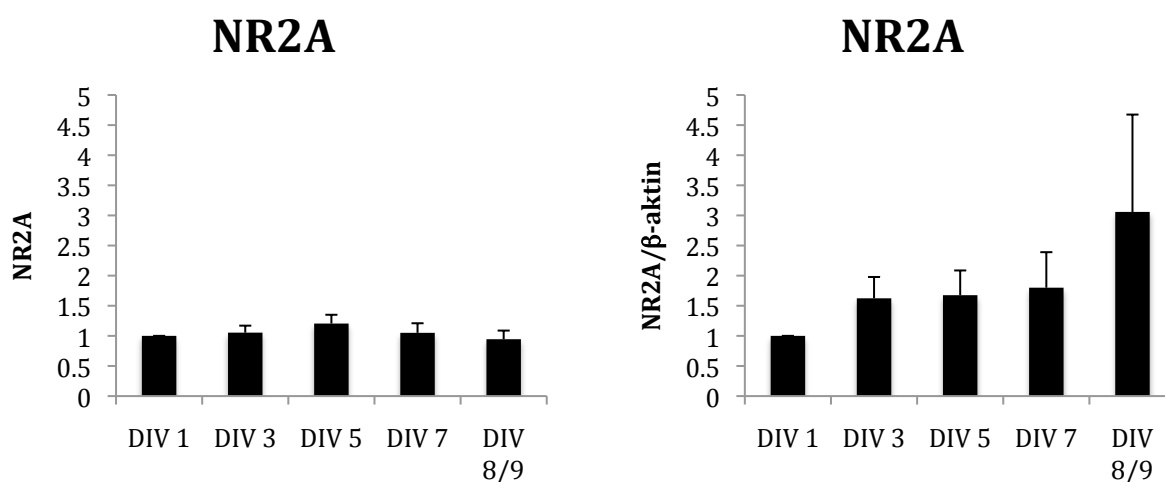
**Tabell 3-12: Målinger av båndstyrke som ligger i grunn for Figur 3-28**

	Gjennomsnitt NR1-1a	SE	Gjennomsnitt $\beta$ -aktin	SE
DIV 1	236,1	90	510,2	294
DIV 3	241,3	98	400,9	220
DIV 5	200,7	56	501,1	311
DIV 7	169,7	40	470,0	299
DIV 9	136,7	20	474,0	302
Bakgrunn	109,5	10	101,1	3



**Figur 3-29: NR2A-uttrykket øker fra DIV 1 til DIV 9**

Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 og 9. Figurene viser Westernbånd for NR2A med tilhørende Westernbånd for  $\beta$ -aktin fra én av syv ulike kyllingpreparasjoner. CV1-celleprøver ble benyttet som positiv og negativ kontroll.

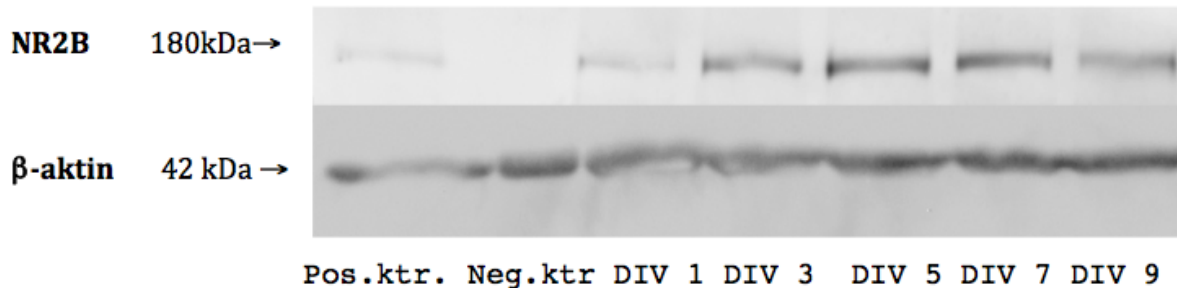


**Figur 3-30: Grafisk fremstilling av Westernbåndene til NR2A**

Figuren viser proteinbåndenes styrke målt som gjennomsnittlig lysnivå. Til venstre er det NR2A, mens til høyre er det fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til NR2A og  $\beta$ -aktin etter at bakgrunnen er trukket fra med SE,  $n=7$ . Det er ingen statistisk signifikans mellom gruppene. Rådatene er vist i Tabell 3-13.

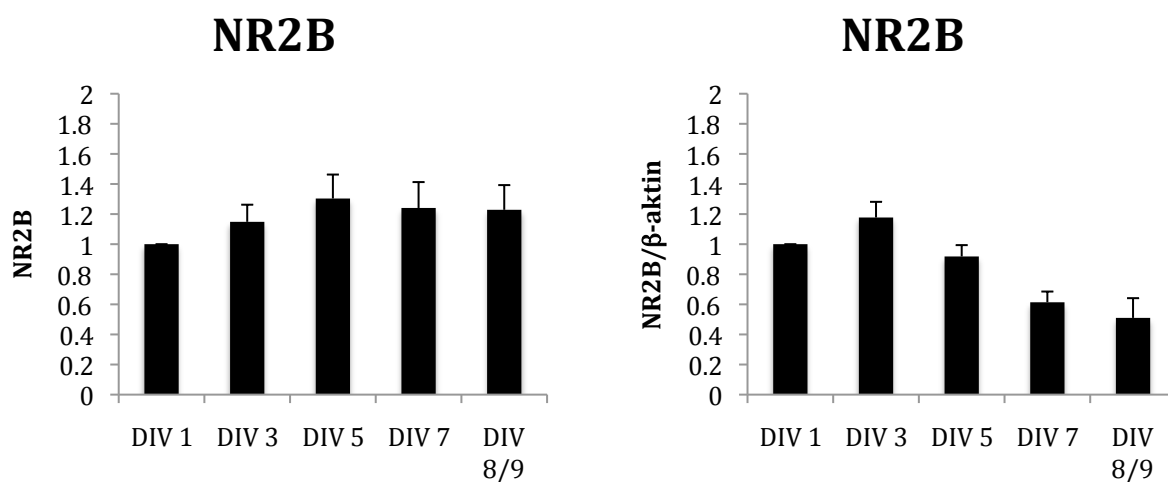
**Tabell 3-13: Målinger av båndstyrke som ligger i grunn for Figur 3-30**

	Gjennomsnitt NR2A	SE	Gjennomsnitt $\beta$ -aktin	SE
DIV 1	589,3	201	225,2	36
DIV 3	669,7	274	198,4	28
DIV 5	850,6	355	188,7	26
DIV 7	737,3	319	161,6	17
DIV 9	603,2	281	145,9	16
Bakgrunn	188,3	58	105,3	1



**Figur 3-31: NR2B-uttrykket reduseres proporsjonalt med antall dager i kultur**

Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 og 9. Figurene viser Westernbånd for NR2B med tilhørende Westernbånd for  $\beta$ -aktin fra én av fem ulike kyllingpreparasjoner. CV1-celleprøver ble benyttet som negativ kontroll, og en rotteprøve ble benyttet som positiv kontroll.

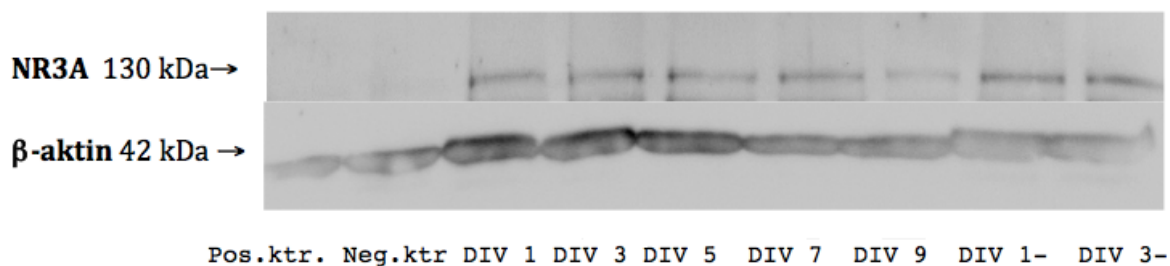


**Figur 3-32: Grafisk fremstilling av Westernbåndene**

Figuren viser proteinbåndenes styrke målt som gjennomsnittlig lysnivå. Til venstre er det NR2B, mens til høyre er det fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til NR2B og  $\beta$ -aktin etter at bakgrunnen er trukket fra med SE,  $n=5$ . Det er ingen statistisk signifikans mellom gruppene. Rådataene er vist i Tabell 3-14.

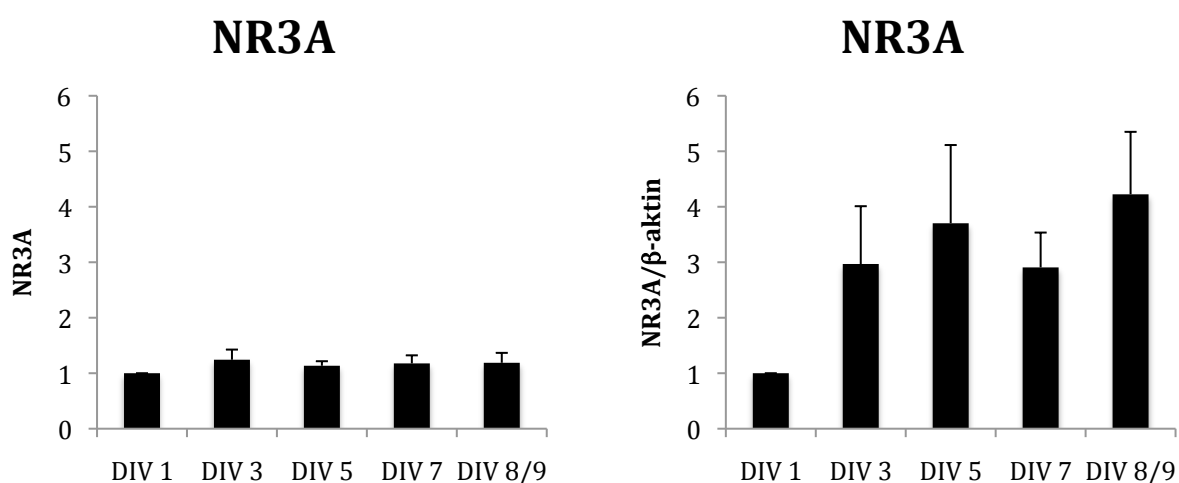
**Tabell 3-14: Målinger av båndstyrke som ligger i grunn for Figur 3-32**

	Gjennomsnitt NR2B	SE	Gjennomsnitt $\beta$ -aktin	SE
DIV 1	655,5	257	217,6	45
DIV 3	730,2	246	193,7	37
DIV 5	813,6	266	199,1	34
DIV 7	756,1	238	179,3	25
DIV 9	544,6	187	176,9	26
Bakgrunn	390,4	160	104,4	0.5



**Figur 3-33: NR3A-uttrykket øker frem til DIV 5, før det reduseres**

Kyllingkornceller ble høstet på DIV 1, 3, 5, 7 og 9. Figurene viser Westernbånd for NR3A med tilhørende Westernbånd for  $\beta$ -aktin fra én av åtte ulike kyllingpreparasjoner. CV1-celleprøver ble benyttet som positiv og negativ kontroll.



**Figur 3-34: Grafisk fremstilling av Westernbåndene for NR3A**

Figuren viser proteinbåndenes styrke målt som gjennomsnittlig lysnivå. Til venstre er det kun NR3A, mens til høyre er det fremstilt som forholdet mellom båndstyrken til NR3A og  $\beta$ -aktin etter at bakgrunnen er trukket fra med SE,  $n=3$ . Det er ingen statistisk signifikans mellom gruppene. Rådataene er vist i Tabell 3-15.

**Tabell 3-15: Målinger av båndstyrke som ligger i grunn for Figur 3-34**

	Gjennomsnitt NR3A	SE	Gjennomsnitt $\beta$ -aktin	SE
DIV 1	236,2	128	230,1	69
DIV 3	351,0	241	203,4	69
DIV 5	293,3	182	187,2	56
DIV 7	323,8	216	196,1	71
DIV 9	336,7	232	181,7	68
Bakgrunn	81,2	20	107,6	3



---

## 4. DISKUSJON

Under metodediskusjonen blir det drøftet valg av cellemodeller, modell for celledød, bruk av luciferaseassay og ko-immunpresipitering for å studere protein-protein-interaksjon (4.1). I den siste delen blir resultatene diskutert (4.2).

### 4.1 Diskusjon av metoder

#### 4.1.1 Valg av cellemodeller

I denne masteroppgaven ble det brukt PC12- og CV1-celler, i tillegg til primærkulturer fra kyllingens lillehjerne. Cellelinjene ble benyttet for å studere en potensiell interaksjon mellom NMDA-reseptorsubenheten NR3A og glukokortikoidreseptoren (GR). De er lette å dyrke i kultur og gir reproducerbare resultater. Reproducerbarheten kommer av at alle cellene stammer fra samme opphav. Data fra cellelinjer må tolkes med forsiktighet ettersom de er celler som deler seg hele tiden i kultur, og kan ha mistet egenskaper som vanlige differensierte celler har.

CV1 er en stabil og kontinuerlig cellelinje som stammer fra fibroblastceller fra apenyre og er uten nevronkarakteristika. CV1-celler uttrykker vanligvis ikke GR eller NMDA-reseptorsubenheter (Giguere et al., 1986, Feng, 2009). Grunnen til at vi valgte å starte med denne celletypen er at man i stor grad kan ha kontroll over reseptortyper, og innføre ønskede egenskaper til cellen ved hjelp av transfeksjon (se avsnitt 2.6.1 og 3.3.1). Proteinene i transfekterte cellelinjer er oftest overuttrykte. Overuttrykte proteiner kan føre til en mangel på forskjellige ko-faktorer som er nødvendig for transkripsjon og translasjon (Szapary et al., 1996). En ulempe med denne metoden er at det ikke er sikkert at CV1-celler har de cellekomponentene som disse proteinene interagerer naturlig med. Dette fører til at en interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren som oppdages i et *in vitro* system ikke nødvendigvis reflekterer et *in vivo* system, men det kan gi en indikasjon på mulige interaksjonsmekanismer som kan studeres videre i systemer som ligner mer på nervesystemet. Det foreligger en funksjonell interaksjon mellom GR og NR3A i CV1-celler (se avsnitt 3.3.1).

PC12-cellelinjen har nevronkarakteristika og er et system som det er naturlig å bruke i videre studier. Flere studier har vist at disse cellene produserer mRNA for NR1, NR2C og NR2D,

---

(Leclerc et al., 1995, Casado et al., 1996, Vazhappilly and Sucher, 2002, Edwards et al., 2007), men de uttrykker ikke funksjonelle NMDA-reseptorer (Edwards et al., 2007). Resultat fra denne masteroppgaven har vist at PC12-celler uttrykker GR endogent (se avsnitt 3.3.2) og det endogene GR-uttrykket øker når cellene differensieres med NGF (se avsnitt 3.3.3 og 3.7.1), men det ble ikke sett en interaksjon mellom GR og NR3A i et luciferaseassay. Interaksjonen mellom GR og NR3A i ulike celletyper er diskutert i avsnitt 4.2.2. Ulempen med bruk av cellelinjer som har endogene reseptorer er at man mister kontrollen over hva cellen produserer av proteiner.

Primærkulturer av nevroner (kornceller) fra syv dager gamle rotter eller mus er en mye brukt modell i studier av nevronal celledød, overlevelse og differensiering (Vaudry et al., 2003). De har bidratt til forståelse av mekanismer bak celledød (Contestabile, 2002). Studier på rotte-kornceller har vist at nevrogenesen skjer sent embryonalt og postnatalt, og derfor vil kornceller utvikle seg i kultur etter utplating (Contestabile, 2002). Primærkulturer er celler fra dyr, og blir sådd ut til skåler. Reproduserbarheten fra disse kulturene er dårligere enn for cellelinjer. Først og fremst skyldes det at de stammer fra forskjellige dyr. Fordelen med kulturene er at de er nevroner, og de kan brukes til å undersøke cellulære mekanismer.

Primærkulturer av kornceller fra kyllingembryo kan brukes som en alternativ modell for å studere celledøds mekanismer (Jacobs et al., 2006a). Disse korncellene kan vokse under depolariserende forhold, så vel som i fysiologiske konsentrasjoner av kalium. Siden kyllingembryo kan ruges uten at man trenger dyrestallfasiliteter, er det også et rimeligere alternativ sammenlignet med rotter. En annen fordel er at kylling ikke vil fremkalle allergi hos personer som arbeider med forsøksdyr, noe som rotter ofte gjør. I motsetning til PC12- og CV1-celler, vil disse primærkulturene ha glutamatindusert død. Deksametason har vist seg å indusere apoptose i umodne kyllingkornceller (Aden et al., 2008). Denne egenskapen gjør at kornceller fra kylling er en egnet modell for å utføre utviklingsstudier og studier av mekanismer for deksametasonindusert celledød.

#### **4.1.2 Valg av metoder for å måle celledød**

I dag eksisterer det flere etablerte metoder for å detektere og kvantifisere celledød. Det er fordeler og ulemper ved de fleste metodene, og det må foretas nøye vurderinger av hvilken metode man skal bruke. Hvilke celletype som skal benyttes, spiller også en vesentlig rolle.

---

Farging med trypanblå er en av de mest brukte metodene for å måle celledød i nevroner (Aras et al., 2008). Prinsippet for denne metoden er at levende celler har intakte cellemembraner og ikke slipper den hydrofile trypanblåfargen inn. Døde celler har defekt cellemembran, og vil farges blå (Tennant, 1964). Denne metoden er egnet for å detektere celledød i PC12-celler og kornceller, først og fremst fordi man får mulighet til å studere morfologien til cellene. I korncellekulturer er det viktig å kunne skille mellom kornceller og andre celler som også er til stede i korncellekulturen. Tap av membranintegritet er en irreversibel prosess som har død som endepunkt. Ulempen med denne metoden er at den er tidkrevende og involverer en subjektiv vurdering av fargeopptaket i cellene. Metoden kan føre til et feilestimat av død, ettersom døde celler kan løsne fra skålen eller bli fragmenterte (Aras et al., 2008).

Alternative metoder som kan brukes til deteksjon og kvantifisering av celledød er 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT)-analyse, laktatdehydrogenase (LDL)-analyse og propidium jodid (Aras et al., 2008). Grunnen til at disse metodene ikke ble valgt er fordi de kan gi over- eller underestimert av celledød (Magistretti and Pellerin, 1999), mange av endepunktene er ikke korrelert med irreversibel celledød (Loo and Rillema, 1998, Aras et al., 2008), og dessuten kan MTT være toksisk for PC12-celler (Hertel et al., 1996).

### **4.1.3 Westernblotting**

For å detektere og karakterisere proteiner i celle- eller vevs-ekstrakter, er Westernblotting en etablert metode (Towbin et al., 1979). En blanding av proteiner separeres ved elektroforese gjennom en SDS-polyakrylamidgel. Proteinets molekylvekt bestemmer vandring og endelig lokalisering i membranen. Etter at proteinene er overført til en nitrocellulosemembran, kan proteinene detekteres ved tilsetting av antistoffer som er spesifikke for målproteinene (Gallagher et al., 2008).

$\beta$ -aktin er brukt som intern standard for kylling-westernblottene.  $\beta$ -aktin er en av seks forskjellige aktinisoformer, og er en av to ikke-muskel cytoskjelett aktiner ( $\alpha$ - og  $\beta$ -aktin) (Lessard, 1988). Aktiner er involvert i cellemobilitet, struktur og integritet (Herman, 1993). Proteinene er involvert i dannelsen av aktin-filamenter som er en hovedbestanddel i cytoskjelettet, og er uttrykt i alle eukaryote celler, også i astrocytter (Ferrier et al., 1994). Et proteinbånd for  $\beta$ -aktin kan bli påvirket av mengden astrocytter i prøven, særlig på senere tider der det er færre nevroner. Figur 3-19 viser at det er flere astrocytter i skåler uten Ara-C, og da

---

vil astrocytter i større grad påvirke mengden  $\beta$ -aktin. Gjennomsnittlig  $\beta$ -aktin-nivå reduseres med økende dager *in vitro* (se avsnitt 3.7.1). Dette kan være en feilkilde når man måler mengden av de ulike markørene ved ulike dager i kultur. Derfor er det vist resultater med og uten aktin-korrigerings. Nyere studier har indikert at ved en rutinekvantifisering av Westernblottene kan Ponceau S-farging brukes som et alternativ til  $\beta$ -aktin (Romero-Calvo et al., 2010). På mine blott ble Ponceau S-fargingen benyttet for å visualisere proteinene etter elektroforese. Det syntes som at det var en jevn fordeling av proteinene, men Ponceau S-fargingen ble ikke brukt kvantitativt.

Andre antistoffer som kan brukes som intern standard er  $\alpha$ -tubulin, lamin og NeuN.  $\alpha$ -tubulin tilsvarer  $\beta$ -aktin ved at den er en del av cytoskjelettet i alle celler, også i astrocytter. Dette representerer en feilkilde når korncellene dør raskere enn astrocytter i kultur. Lamin er en kjernemarkør, men også her kan astrocyttene forstyrre resultatet. NeuN er en nevronmarkør for differensierte nevroner (Mullen et al., 1992), og ved å benytte den vil ikke astrocytter gi et bidrag til målingene. En ulempe er at NeuN ikke klarer å detektere udifferensierte nevroner som er uttrykt tidlig i kultur.

Det kan være artsforskjeller, for eksempel mellom rotte og kylling, som kan påvirke proteinuttrykket. Dersom et antistoff har vist at den kan gjenkjenne et protein i rotte, betyr ikke det nødvendigvis at det kan kjenne igjen tilsvarende protein i kylling. Manglende resultater betyr ikke at proteinet ikke er uttrykt i kylling, men at den også betyr proteinene har litt forskjellige aminosyresekvenser slik at antistoffet ikke gjenkjenner epitopen. En utfordring er å finne gode antistoffer som gir gode proteinbånd. Det er også batch-variasjoner. Samme antistoff fra samme produsent, men fra ulik batch, kan gi forskjellig resultat. Derfor ble batch-nummeret gjengitt i materialer og metoder (se avsnitt 2.10.9-2.10.10).

#### **4.1.4 Bruk av GRE-luc som metode for å studere protein-protein-interaksjoner**

GR befinner seg vanligvis i cytoplasma bundet til proteiner, blant annet hsp90 (90 kDa heat shock protein) (Beato, 1989). Når ligand bindes til GR, translokeres reseptoren til kjernen og bindes til GRE. Det ble antatt at hvis GR interagerer med en NMDA-reseptorsubenheter i cytoplasma eller i cellemembranen, ville dette hindre at GR beveget seg inn i kjernen og dermed endret luciferaseproduksjonen. I tidligere masteroppgave ble det vist at når GR-gfp ble

---

transfektet sammen med NR3A, fordelte GR-gfp seg både i og utenfor kjernen (Feng, 2009). GRE er koblet til luc, et gen som koder for luciferaseprotein. Luciferaseproteinet katalyserer en reaksjon der lys blir avgitt. Lysintensiteten sier noe om proteinmengden, og er et indirekte mål for genekspresjonen og kan detekteres i et luminometer. Bruk av GRE-luc som reportergen er derfor et egnet verktøy for å teste om det foreligger en interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheter.

For å sammenligne på tvers av skålene, ble renillaluciferase benyttet som intern standard (Alatorre-Meda et al., 2010), da antall transfektete celler kan variere. I en tidligere masteroppgave ble det påvist at RL-tk er et egnet plasmid med thymidinkinase som promotor (Feng, 2009). Forsøk der målingene ga tall som var tilsvarende luminometerets instrumentelle bakgrunn ble ekskludert. Den lave renillaluciferaseverdien tydet på lav transfeksjonseffektivitet eller at det var få celler. Ulik celletetthet mellom skålene kan forårsake feilmålinger. Under splitting bør det tilstrebes en så homogen suspensjon som mulig, slik at cellene ikke sedimentere eller klumper seg sammen.

Det tilstrebes å oppnå mest mulig jevne renillaluciferaseverdier dersom denne skal benyttes som en intern standard. Rådataene viste at renillaluciferaseverdiene har en tendens til å være lavere for NR3-subenheterne i PC12-celle (Tabell 3-5). Det er ønskelig at plasmidene som blir laget er av samme kvalitet, konsentrasjonen er riktig og at renheten er god. Et problem vi hadde under forsøk med CV1-celler var at det periodevis var veldig dårlig transfeksjonseffektivitet. Det ble utført totalt 16 forsøk, men kun 6 av dem kunne benyttes. En årsak til dette kan skyldes at det ble dyrket opp nye celler, og at cellene kanskje må splittes et par ganger for å få høy transfeksjonseffektivitet. Normalt er CV1-celler lette å transfektere (Feng, 2009). BBS-løsningens pH er kritisk for å få en god transfeksjonseffektivitet. Denne teknikken er utsatt for variabilitet, og en liten pH-endring ( $\pm 0,1$ ) kan påvirke effektiviteten (Felgner et al., 1987). Til tross for at BBS ble testet for hver ny batch, er den en sannsynlig årsak til den dårlige transfeksjonseffektiviteten.

#### **4.1.5 Bruk av ko-immunpresipitering som metode for å studere protein-protein-interaksjoner**

For å få en molekylær forståelse av signalveiene, er det viktig å identifisere partnere i et proteinkompleks (Trinkle-Mulcahy et al., 2008). En interaksjon mellom GR og NR3A kan

---

bekreftes eller avkreftes ved hjelp av ko-immunpresipitering. Prinsippet baseres på at ønsket kompleks ”fanges” fra for eksempel et cellelysat ved å benytte et spesifikt antistoff. Antistoff-proteinkomplekset felles ut ved å bruke protein A eller protein G som er bundet kovalent til sepharose- eller agarosekuler, som GFP-trap® A. GFP-Trap® A består av et antistoff som er rettet mot GFP, og dette er kovalent bundet til agarosekuler. Proteiner i antistoff-proteinkomplekset kan deretter identifiseres ved Westernblotting.

GFP (Green Fluorescent Protein) er et protein på 27 kDa, og har fluorescerende egenskaper i nærvær av blått lys. Tradisjonelt refererer GFP til proteinet som først ble isolert fra maneten *Aequorea victoria*. I tillegg finnes det en rekke andre marine organismer som har fluorescerende proteiner. I cellebiologien blir proteinet ofte brukt som reporter for et proteinuttrykk (Phillips, 2001). GFP-proteinet er ikke uttrykt i mammalske celler, men kan induseres ved transfeksjon.

Immunpresipitering består av flere trinn, som lysering av celler med vaskemiddel, binding av et spesifikt antigen til et antistoff, presipitering av antistoff-antigen kompleks, vasking av presipitatet og separasjon av antigen fra immunkomplekset (Bonifacino et al., 2001). GFP ble valgt fordi den viser minimale ikke-spesifikke bindinger til proteiner fra mammalske celler, og de kan kvantitativt tas ut av proteinekstrakter (Trinkle-Mulcahy et al., 2008). Fordelen med GFP er at primære antistoffer mot GFP har høy affinitet. En ulempe med GFP er at proteinet må transfekteres inn i cellen og overuttrykt GFP-hale kan forandre proteinets funksjon. Et alternativ til GFP er å bruke vill-type proteiner. Styrken med vill-type proteiner er at proteinene er hentet fra naturlige omgivelsene der de er av riktig mengde og på riktig sted, men primære antistoffer mot vill-typen kan ha lav affinitet og kan trekke ned uspesifikke proteiner.

I denne oppgaven ble CV1-celler transfektert med GR-gfp og NR3A hver for seg, eller begge plasmidene sammen. Vi prøvde også å bruke NR3A-gfp og GR hver for seg, eller en ko-transfeksjon av disse plasmidene. For kun å få ut proteinene av interesse, ble det benyttet GFP-Trap® A. Trapen vil binde til gfp-merkede proteiner, i dette tilfellet GR-gfp eller NR3A-gfp. Dersom det er en interaksjon, så vil trapen kunne ta med partneren ned. Resultatet er diskutert i 4.2.3.

---

## 4.2 Diskusjon av biologiske funn

### 4.2.1 Deksametasonindusert celledød i PC12-celler

Celledød induisert av deksametason i udifferensierte PC12-celler (Figur 3-1) var mye lavere enn det som har vært vist for kyllingkorncellene (Jacobs et al., 2006b). Dette tyder på at cellelinjen er robust mot deksametasoneksponeringen eller at korncellene har andre mekanismer for deksametasonindusert død. Det var en signifikant forskjell mellom differensierte og udifferensierte PC12-celler ved tilsetning av deksametason (Figur 3-2). Dette er forenelig med at NGF induserer flere glukokortikoidreseptorer (se avsnitt 3.7.1).

Deksametason var løst i etanol, og etanol ble brukt som kontroll. Det var interessant å se at etanol selv ga en økt celledød, og det er viktig å skille mellom etanolindusert og deksametasonindusert celledød. Etanolbehandling fører til en konsentrasjonsavhengig reduksjon i proliferasjon hos PC12-celler (Pantazis et al., 1992). Det er også vist at etanol induserer apoptose i kornceller fra rotte ved å inhibere NMDA-reseptorens trofiske effekt (Bhave and Hoffman, 1997). Det må være en annen mekanisme som er involvert her, ettersom NMDA-reseptorer ikke påvirket celledød i PC12-celler (Oberdoerster et al., 1998). Det kan også være interessant å løse deksametason i et annet løsemiddel, som for eksempel DMSO (Dimetylsulfoksid). DMSO (0,5 %) har blitt vist at det ga lav celledød av seg selv, både i PC12-celler og kyllingkornceller (Gjesvik, 2011). Deksametason er løselig i DMSO (Dabelic et al., 2006).

Mifepriston er markedsført som en selektiv GR-antagonist, men ga en høy celledød i seg selv og ingen beskyttelse mot deksametasonindusert celledød (Figur 3-3). At RU 28318 ga en beskyttelse mot deksametasonindusert død i differensierte PC12-celler er også interessant, ettersom det er MR-antagonist. PC12-celler uttrykker mineralkortikoidreseptorer (Goto et al., 2009) og det kan tenkes at RU 28318 gir en beskyttelse via MR. Det kan også tyde på at RU 28318 gir en uspesifikk hemming av GR. RU 28318 har en 50 ganger høyere affinitet til MR enn til GR (Bitran et al., 1998). Ettersom PC12-celler ikke uttrykker NMDA-reseptorer, vil det ikke kunne forventes at NMDA-reseptorantagonistene skulle gi en beskyttende effekt. Likevel viste resultatene at NMDA-reseptorantagonistene, CGP 39551 og MK 801, ga en beskyttende effekt mot deksametasonindusert celledød. MK 801 ga en signifikant reduksjon i celledød i deksametasoneksponerte differensierte PC12-celler (Figur 3-3). Tilsetning av MK

---

801 har vist å gi reduksjon i celledød i PC12-celler som var induisert av oksygen-glukose deprivasjon (Rahbar-Roshandel et al., 2008). Alternativt kan antagonistene ha effekt på andre mål enn NMDA-reseptorer, for eksempel kan MK 801 blokkere kalsiumkanaler (Liesi and Wright, 1996). Det bør utføres flere forsøk på antagonistenes effekt og hvor forsøksoppsettet har med ubehandlede skåler for å si noe som den basale celledøden i differensierte PC12-celler. I tillegg bør det undersøkes om PC12-cellene som vi benytter på laben uttrykker NMDA-reseptorproteinene og om cellene har funksjonelle reseptorer. Dette kan utføres ved bruk av Westernblotting.

Det kan tenkes at det er kortikosteroider i hesteserumet som tilsettes i dyrkningsmediet. PC12-celler kan ha tilpasset seg et høyt nivå av glukokortikoider, slik at de ikke var særlig påvirkbare av deksametason. Effekt av hesteserumet på luciferase er diskutert videre i avsnitt 4.2.2. Celleforsøkene med differensierte PC12-celler viste at det er en fordel å coate skålene dersom cellene skal differensieres. Da får cellene bedre feste og kan overleve lengre i kultur.

#### **4.2.2 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptorsubenheten NR3A**

I CV1-celler ble det sett reduksjon i luciferaseaktivitet når cellene ble ko-transfektet med GR og NR3A, og med GRE-luc som reporter-gen (Figur 3-5), men denne reduksjonen ble verken sett i differensierte eller udifferensierte PC12-celler. Forsøk med CV1-celler viste at den fysiologiske konsentrasjonen på 1 nM deksametason ga høyest ildflueluciferaseaktivitet, og 10  $\mu$ M deksametason (som ga toksisitet i kylling- og rotteprimærkulturer) ga noe lavere aktivitet (Figur 3-4). Det samme ble sett i en tidligere masteroppgave (Feng, 2009). Det kan tyde på at ved 1 nM deksametason skjer det en metning, og konsentrasjoner over dette kan ikke gi høyere luciferaseverdi. To tidligere masterstudenter har også vist interaksjonen mellom GR og NR3A i CV1-celler (Feng, 2009, Wendelbo Aanensen, 2010).

Samme forsøksoppsett ble gjort med PC12-celler. Udifferensierte og differensierte PC12-celler ble eksponert for 1 nM eller 10  $\mu$ M. Resultatet viste at udifferensierte PC12-celler uttrykker GR endogent fordi luciferaseaktiviteten økte ved tilsetning av et glukokortikoid. Transfeksjon med NR3A ga ikke endringer i luciferase, verken ved 1 nM eller 10  $\mu$ M deksametason (Figur 3-7). Dette stemmer bra overens med Aanensens resultater, der hun ikke så en reduksjon i luciferaseverdier ved bruk av 1 nM deksametason (Wendelbo Aanensen, 2010). Tidligere er det sett at overuttrykking av GR og NR3A i PC12-celler, ikke fører til en reduksjon i



---

luciferaseverdier (Wendelbo Aanensen, 2010). I motsetning til CV1-celler, kan det ses at ved økende deksametasonkonsentrasjon, øker ildflueluciferaseaktiviteten (Figur 3-7). Hos differensierte PC12-celler kan det ses en nedgang i luciferaseproduksjon når det er ko-transfektet med subenheter, men denne reduksjonen er ikke statistisk signifikant. Det kan være interessant å se hvordan ildflueluciferaseproduksjonen endrer seg med ulike deksametasonkonsentrasjoner og det bør utføres en doseresponskurve for deksametason med GRE-luc i PC12-celler.

I transfektete kyllingkornceller ga mifepriston en reduksjon i luciferaseverdiene, selv om den ikke var statistisk signifikant. Dette kan tyde på at effekten er mediert via en klassisk respons. Tilsetning av RU 28318, en MR-antagonist, førte ikke til en reduksjon i luciferaseverdiene, men beskyttet korncellene mot deksametasonindusert celledød. Dette støtter indikasjonen om at deksametasonindusert celledød i kornceller er av en ikke-genomisk art (Jacobs et al., 2006b). Renillaluciferaseverdiene var veldig lave i transfektete kyllingkornceller (Tabell 3-7). Det bør utføres flere forsøk, der det brukes et annet forhold mellom GRE-luc og RL-tk, for eksempel som Strøm et. al brukte (Strom et al., 2010). Flere forsøk med differensierte PC12-celler og kyllingkornceller må til for å se om det kan foreligge en interaksjon mellom GR og NR3A. Eventuelt kan det utføres transfeksjon kyllingkorncellene med Cellaxess. Denne metoden benytter elektroporering, der cellemembranen punkteres ved hjelp av en elektrisk strøm fra elektroden, for å indusere plasmider til cellen.

Tidligere studier med PC12-celler viste at GR aktiverer transkripsjonen av ildflueluciferase via GRE-luc til tross for at cellene kun ble eksponert for etanol, og at aktivering av transkripsjonen kan skyldes at det var glukokortikoid i PC12-mediet (Wendelbo Aanensen, 2010). Bruk av ubehandlede skåler viser at det ikke var en forskjell mellom celler som var ubehandlet sammenlignet med de som var eksponert med etanol (Figur 3-7), noe som bekrefter antagelsen om at det var glukokortikoider i mediet. Dette kan forklare hvorfor vi ser interaksjon mellom GR og NR3A i CV1-celler, men ikke i PC12-celler. For å undersøke om hesteserum har noe å si for aktivering av transkripsjonen, ble det tilsatt hesteserum i samme konsentrasjon som i PC12-mediet til CV1-celler.

Resultatet viste at 5 % hesteserum påvirket luciferaseproduksjonen, og i mange tilfeller ga dette en høyere verdi enn ved tilsetning av 1 nM og 10  $\mu$ M deksametason, og at denne ikke kan blokkeres av en MR-reseptorantagonist (Figur 3-17). Det er også interessant at hesteserum i

---

NR3A-transfekterte celler ga en høyere luciferaseaktivitet enn deksametason, mens den var lav i NR1-1a-transfekterte celler (Figur 3-16). Dette kan skyldes at effekten av hesteserumet i NR1-1a-transfekterte celler er mediert via MR, ettersom den lot seg påvirke av en MR-antagonist. Resultatet indikerer at det kan være en mineralkortikoid ligand i hesteserumet og dette kan være årsaken til RU 28318 reverserer effekten av hesteserumet i NR1-1a-transfektert celler. Ut fra resultatet med kyllingkornceller bør det undersøkes videre på NR1-1a-subenheten og en eventuell rolle den har i interaksjonen med GR. Det kan være interessant å lete etter sekvenser i mRNA for NR1-1a, NR3A og GR som ligner på hverandre, og dette kan si noe om hvor interaksjonen skjer. Dersom det viser seg at NR1-1a er involvert i interaksjonen mellom GR og NR3A, så har ikke vi lenger en negativ kontroll.

Det ble ikke forsøkt å bruke 10  $\mu$ M mifepriston ettersom den ga høy celledød i PC12-celler og kyllingkornceller. Det kan være interessant å prøve en annen spesifikk GR-antagonist, eller mifepriston i en annen konsentrasjon, for å se om det fører til en reduksjon. Hvis ikke en reduksjon kan ses, kan det tyde på at det er andre mekanismer som fører til en økning i luciferaseaktivitet ved tilsetning av hesteserumet. I senere studier kan det være interessant å analysere hesteserum ved hjelp av analytiske metoder for å finne ut om det er glukokortikoid eller ei, og eventuelt hvilken.

### **4.2.3 Ko-immunpresipitering**

Det er første gang det lykkes å få ned NR3A sammen med GR-gfp ved bruk av GFP-trap® A i CV1-celler (Figur 3-18). Dette tyder på at det er en protein-protein-interaksjon mellom GR og NR3A, og er en uavhengig støtte for de luciferaseresultatene som er funnet i CV1-celler. Metoden krever videre optimalisering, blant annet er det ønskelig å få et større utbytte av trappen. I de forsøkene som ble utført, lyktes det å få ned 20-80 % av GR-gfp, og ca. 20 % av NR3A, men det var fortsatt mye proteiner som kunne detekteres i supernatanten. Det bør optimaliseres slik at man får en større andel av partneren ned.

Videre er det ønskelig å se om GR kommer ned sammen NR3A-gfp og bruke cellelysat fra rottekornceller der vi kjenner utviklingen av GR og NMDA-reseptorsubenhetene. Det kan være tenkelig å sette opp forsøk med overuttrykt GR eller NR3A koblet til gfp, og bruke endogen partner som finnes i rottekornceller. Det kan også tenkes at andre NMDA-reseptorproteiner kan være involvert, og det er interessant å studere om andre NMDA-reseptorproteiner kan komme

---

ned sammen med GR-gfp. Dette gjelder først og fremst NR1-1a, der resultat fra luciferaseassay viste at det kan foreligge en interaksjon mellom overuttrykt NR1-1a og endogen GR i kyllingkornceller. Det er fortsatt ikke kjent om det kan være flere proteiner som er involvert i interaksjonen mellom GR og NR3A.

#### **4.2.4 Morfologisk utvikling hos kyllingkornceller i kultur**

Det var interessant å undersøke om kyllingkorncellers morfologi endrer seg i kultur, blant annet for å studere om de utvikler seg på samme måte som de gjør i hjernen. Utviklingsstadiene kan ha betydning for glutamat- og deksametasonindusert toksisitet. Kyllingkorncellenes morfologi forandret seg når de fikk utviklet seg i kultur (Figur 3-19). På utplatingsdagen kunne det ses at mange celler lå i klumper jevnt fordelt i skålen. Kyllingkorncellene endret seg mye mellom DIV 0 og DIV 1-2. I løpet av de to første dagene hadde mange av cellene falt av skålen og dødd. Tilsetning av Ara-C kan være årsaken til noe av denne celledøden. Dette stemmer bra overens med tidligere resultater der det ble studert Ara-Cs effekt på umodne kornceller (Wendelbo Aanensen, 2010). Den høye celledøden tidlig i kultur kan også være forårsaket av naturlige prosesser. Celler som var uten synaptiske kontakter med andre nevroner og som ikke hadde blitt en del av en nevronal krets, gikk lettere i apoptose (Vaudry et al., 2003).

Korncellers utvikling i kultur kan karakteriseres ved at cellene danner utløpere og etablerer kontakt med hverandre fra DIV 1. Morfologien til en umoden korncelle endrer seg når den migrerer fra det ytre til det indre laget i lillehjernebarken. Komuro et al. 1998 beskrev at en umoden korncelle har en avlang form og får en mer globulær karakter når den har migrert fra det ytre til det indre laget. I migreringsfasen er NR2B-uttrykket høyt (Tarnok et al., 2008), og korncellene uttrykker andre nevronmarkører som NeuN og Pax 6 (Kohwi et al., 2005). De første dagene i kultur (DIV 1-3) kunne det ses at korncellene hadde en mer avlang form, mens fra DIV 5 var cellene av en rundere karakter (Figur 3-19). I skåler med Ara-C var det et lavere celleantall sammenlignet med skåler uten Ara-C (Figur 3-19). Korncellene i skåler uten Ara-C lå tettere sammen noe som kan tyde på at de har vandret i skålen ved hjelp av bergmann glia (Figur 1-4), mens det i skåler med Ara-C ikke finnes bergmann glia å vandre langs.

#### **4.2.5 Deksametasonindusert celledød i kyllingkorncellekulturer**

Deksametason induserer celledød i kylling, både *in ovo* og *in vitro* (Aden et al., 2008). Tidligere studier har vist at uttrykket av endogen GR i kyllingens hypofyse er høy mellom

---

embryonal dag 12-17 (E12-17) (Porter et al., 2007), og det kan derfor forventes at en deksametasonindusert celledød vil vises allerede på DIV 1 ettersom utplatingen skjer på embryonal dag 18 (E18). Dette stemmer bra overens med resultatene i dette forsøksoppsettet (Figur 3-20). Tidligere studier viste at på DIV 3 var deksametasonindusert celledød signifikant høyere enn etanolbehandlede skåler (Wendelbo Aanensen, 2010).

Basaldøden har vært høy gjennom hele forsøksperioden, særlig høy på slutten da den var 40-50 %. Mange umodne kornceller vil gå i apoptose som en del av en naturlig prosess i lillehjernes utvikling, og dette kan ses i form av en høy basaldød tidlig i kultur. Etanoleksponering under utviklingen kan føre til alvorlige hjerneendringer og nevrotoksisitet (Castel et al., 2006). Eksponering av etanol (200 mM) på rottekornceller inhiberer nevrutvekst og utløser apoptotisk celledød (Vaudry et al., 2002). En høy etanolindusert død kan maskere noe av deksametasonindusert død, og gir et feil bilde av resultatet. Det kan være interessant å løse deksametason i et annet løsemiddel, og undersøke andel død det nye middelet kan føre til. En annen årsak til en veldig høy basaldød kan være at det brukes hestenserum i platemidiet. Seromet kan inneholde faktorer som gir celledød. Effekten av hestenserumet på luciferaseaktiviteten er diskutert i avsnitt 4.2.2. Det kan være aktuelt å prøve og optimalisere et serumfritt platemedium. På avdelingen ble byttet fra ernæringsmedium med serum til et serumfritt (definert) ernæringsmedium. Den høye basaldøden kan også skyldes av at det definerte ernæringsmediet ikke var optimal for kyllingkorncellene.

I denne masteroppgaven ble det observert at NMDA-reseptorantagonisten MK 801 og MR-antagonisten RU 28318 ga en beskyttelse mot deksametasonindusert celledød i kyllingkornceller på DIV 1, mens mifepriston (GR-antagonist) og RU 28318 ga en beskyttelse i DIV 7 (Figur 3-21 til Figur 3-24). Studier av antagonisters effekt på celledød i kyllingkornceller har vist at MK 801 reduserer deksametasonindusert celledød (Aden et al., 2008), og at NMDA-reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551, og MR-antagonisten RU 28318 ga en beskyttelse i rottekornceller (Jacobs et al., 2006b). Studier fra en tidligere masterstudent har også vist at MK 801 reduserer deksametasonindusert celledød i kyllingkornceller på DIV 5 (Wendelbo Aanensen, 2010). Flere paralleller behøves for å undersøke om antagonistene kan gi en beskyttelse på de andre tidspunktene. Ettersom etanol kan indusere celledød via NMDA-reseptoren (Bhave and Hoffman, 1997), kan det tenkes at en NMDA-reseptorantagonist vil kunne hemme noe av den etanolinduserte døden. Det var overraskende at RU 28318, en selektiv MR-antagonist (Gomez-Sanchez et al., 1990), ga en beskyttelse mot

---

deksametasonindusert celledød. Beskyttelsen kan skyldes at deksametason i farmakologiske konsentrasjoner binder til MR eller at en ikke-klassisk kortikoidreseptor i nevroner er involvert (Jacobs et al., 2006b).

Det er vist at caspase-3 (en apoptotisk mediator) er aktivert i kyllingkornceller to timer etter deksametasoneksponering (Aden et al., 2008). Tidsaspektet forteller oss at det ikke er en gentranskripsjonseffekt, men at apoptosen kan være mediert via en ikke-genomisk mekanisme som involverer membranassosiert GR. Det kan også tenkes at uttrykket av mGR forårsaker deksametasonindusert celledød via NMDA-reseptorer. For å finne ut hvilken rolle mGR spiller, kan man utføre en immunfarging og se uttrykket av denne reseptoren over tid. Studier med rotte- og kyllingkornceller har vist at NMDA-reseptorantagonisten MK 801 beskytter mot deksametasonindusert celledød, hvilket styrker hypotesen om at NMDA-reseptoren er involvert. Det er også vist at deksametason øker  $Ca^{2+}$ -innstrømming gjennom NMDA-reseptoren (Takahashi, 2002). NR3A kan være involvert i deksametasonindusert celledød, ettersom NR3A har lav affinitet for  $Mg^{2+}$ , og deksametasonindusert celledød i rottekornceller ikke lar seg blokkere av magnesium (Jacobs et al., 2006b).

#### **4.2.6 Uttrykket av GR og NMDA-reseptorsubenheter i kyllingkornceller**

Neonatale rottekornceller fra lillehjernen inneholder det høyeste nivået av glukokortikoidreseptorer i hjernen (Pavlik and Buresova, 1984). I rottehjernen er GR-uttrykket lavt under hele svangerskapet, men har en rask økning etter fødselen (Bohn et al., 1994a). Westernblottet viste at uttrykket av GR var høyt, og at GR økte med økende dager i kultur (frem til DIV 7) (Figur 3-25). Dette stemmer godt overens med at deksametason induserer celledød på DIV 1 og DIV 7 (Figur 3-20).

NR1-1a var til stede i alle tidspunktene i kyllingkulturen (Figur 3-27). Tidligere studier antydde at NR1-1a er nødvendig for dannelsen av funksjonelle NMDA-reseptorer, og for at NMDA-reseptorsubenheter-komplekser skal fraktes fra ER til celleoverflaten (Perez-Otano et al., 2001). I en annen del av hjernen, hjernestammen, er det vist at NR1 er uttrykt hos kylling i fosterlivet og i voksen alder, og resultatene fra Westernblotting viste at det ikke var signifikante endringer i NR1-uttrykket fra embryonal dag 18 (E18) til voksen i dette studiet (Tang and Carr, 2007).

---

I mus- og rottekornceller er det beskrevet en "developmental switch", et skifte i utviklingen der uttrykket av NMDA-reseptorsubenheten NR2B reduseres, mens uttrykket av NR2A øker (Rumbaugh and Vicini, 1999, Komuro and Yacubova, 2003, Liu et al., 2004). NR2B er dominant tidlig i postnatal hjerne, men etter hvert vil antall NR2A-subenheter vokse og overstige NR2B. Årsaken til dette byttet er ulik kinetikk for hver enkel NR2-subenhet (Liu et al., 2004). Det er antatt at endringer i NR2A/NR2B-forholdet fører til funksjonelle endringer som skjer under utviklingen. Etanol har vist seg å øke NMDA-reseptorfunksjonen og endre nivået av noen NMDA-reseptorsubenhetproteiner. Tre dager med etanolbehandling av kornceller resulterer i en forsinkelse av skjæringspunktet mellom NR2A og NR2B (Snell et al., 2001). Det er signifikante endringer i NR2-uttrykk også i kyllingens lillehjerne, og NR2A ser ut til å erstatte NR2B ved embryonal dag 14 (E14) (Tang and Carr, 2007).

Westernblottene viste at mengden NR2A økte fra DIV 1 frem til DIV 9 (Figur 3-29). NR2A-subenheten er viktig for utviklingen av funksjonelle synaptiske NMDA-reseptorer. Forskjellen i synaptisk reseptorpopulasjon er avhengig av tilstedeværelse eller fravær av NR2A (Fu et al., 2005). NR2B er til stede i alle tidspunktene i kulturen (Figur 3-31). Dette kan være et uttrykk for at det er mange kornceller som er i migrasjonsfasen ettersom NR2B er viktig for korncellers evne til å migrere gjennom lagene i lillehjernebarken (se Figur 1-4).

Det ble funnet uttrykk av NR3A ved alle tidspunktene i kultur, med høyest uttrykk i DIV 5. Dette stemmer med en tidligere masteroppgave (Wendelbo Aanensen, 2010). I rottekornceller er det sett at uttrykket av NR3A er høyt, og at i rottehjerne øker NR3A-uttrykket fra postnatal dag 0 til 8, mens det reduseres igjen fra dag 8 til 20 (Wong et al., 2002). NR3A er viktig for modning og organisering av glutaminerge synapser før de kritiske periodene av utviklingen. Det ble vist at en forlengelse av tiden der NR3A-uttrykket er høyt, fører til færre synaptiske kontakter mellom nevroner og redusert synaptisk størrelse (Roberts et al., 2009).

Det er vanskelig å trekke en konklusjon for hvordan NMDA-reseptorsubenhets sammensetningen forandrer seg når kyllingkornceller får utvikle seg i kultur, og sammenhengen mellom uttrykket av subenhetene og deksametasonindusert celledød. For at det skal kunne trekkes en konklusjon, må metoden optimaliseres. Det er viktig å finne gode negative og positive kontroller, og finne gode antistoffer som kan detektere proteiner i kylling. Det bør også utføres flere forsøk med ulike konsentrasjoner av antistoffer for å finne den optimale mengden for deteksjon av kyllingproteiner.

---

## 5. Konklusjon

- Det foreligger en funksjonell interaksjon mellom NR3A og GR i CV1-celler.
- En slik interaksjon ble ikke påvist, verken i differensierte eller udifferensierte PC12-celler.
- Ved bruk av GFP-trap® ble det vist at NR3A kom ned sammen med GR-gfp i cellelysat fra transfekterte CV1-celler. Dette kan tyde en protein-protein-interaksjon.
- Kyllingkornceller forandrer sin morfologi når de får utvikle seg i kultur.
- Kyllingkorncellene uttrykker GR, NR1-1a, NR2A, NR2B og NR3A gjennom hele perioden de var i kultur.
- Kyllingkornceller utvikler toksisitet for deksametason tidlig i kultur. NMDA-reseptorantagonisten MK 801 og MR-antagonisten RU 28318 ga en beskyttelse på DIV 1. På DIV 7 ga mifepriston (GR-antagonist) og RU 28318 en redusert deksametasonindusert celledød.

---

## Referanseliste:

- Abraham IM, Harkany T, Horvath KM, Luiten PG (Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? *J Neuroendocrinol* 13:749-760.2001).
- Aden P, Goverud I, Liestol K, Loberg EM, Paulsen RE, Maehlen J, Lomo J (Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum. *Brain Res* 1236:39-48.2008).
- Ahlbom E, Gogvadze V, Chen M, Celsi G, Ceccatelli S (Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14726-14730.2000).
- Alatorre-Meda M, Gonzalez-Perez A, Rodriguez JR (DNA-METAFECTENE PRO complexation: a physical chemistry study. *Phys Chem Chem Phys* 12:7464-7472.2010).
- Allen G, Buxton RB, Wong EC, Courchesne E (Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* 275:1940-1943.1997).
- Allen GI, Tsukahara N (Cerebrocerebellar communication systems. *Physiol Rev* 54:957-1006.1974).
- Andreescu CE, Prestori F, Brandalise F, D'Errico A, De Jeu MT, Rossi P, Botta L, Kohr G, Perin P, D'Angelo E, De Zeeuw CI (NR2A subunit of the N-methyl d-aspartate receptors are required for potentiation at the mossy fiber to granule cell synapse and vestibulo-cerebellar motor learning. *Neuroscience* 176:274-283.2011).
- Aras MA, Hartnett KA, Aizenman E (Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. *Curr Protoc Neurosci Chapter 7:Unit 7* 18.2008).
- Ashkenazi A, Dixit VM (Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.1998).
- Barmack NH, Yakhnitsa V (Functions of interneurons in mouse cerebellum. *J Neurosci* 28:1140-1152.2008).
- Barnes PJ (Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol* 533:2-14.2006).
- Barrington KJ (Postnatal steroids and neurodevelopmental outcomes: a problem in the making. *Pediatrics* 107:1425-1426.2001).
- Beato M (Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344.1989).
- Bhave SV, Hoffman PL (Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA. *J Neurochem* 68:578-586.1997).
- Bitran D, Shiekh M, Dowd JA, Dugan MM, Renda P (Corticosterone is permissive to the anxiolytic effect that results from the blockade of hippocampal mineralocorticoid receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 60:879-887.1998).
- Bohn MC, Dean D, Hussain S, Giuliano R (Development of mRNAs for glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 77:157-162.1994a).
- Bohn MC, O'Banion MK, Young DA, Giuliano R, Hussain S, Dean DO, Cunningham LA (In vitro studies of glucocorticoid effects on neurons and astrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 746:243-258; discussion 258-249, 289-293.1994b).
- Bohus B, de Kloet ER (Adrenal steroids and extinction behavior: antagonism by progesterone, deoxycorticosterone and dexamethasone of a specific effect of corticosterone. *Life Sci* 28:433-440.1981).
- Bonifacino JS, Dell'Angelica EC, Springer TA (Immunoprecipitation. *Curr Protoc Immunol Chapter 8:Unit 8* 3.2001).



- 
- Borski RJ (Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab* 11:427-436.2000).
- Brodal P (*Sentralnervesystemet*.2001).
- Burnette WN ("Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.1981).
- Casado M, Lopez-Guajardo A, Mellstrom B, Naranjo JR, Lerma J (Functional N-methyl-D-aspartate receptors in clonal rat pheochromocytoma cells. *J Physiol* 490 ( Pt 2):391-404.1996).
- Castel H, Vaudry D, Mei YA, Lefebvre T, Basille M, Desrues L, Fournier A, Vaudry H, Tonon MC, Gonzalez BJ (The delayed rectifier channel current IK plays a key role in the control of programmed cell death by PACAP and ethanol in cerebellar granule neurons. *Ann N Y Acad Sci* 1070:173-179.2006).
- Cathala L, Brickley S, Cull-Candy S, Farrant M (Maturation of EPSCs and intrinsic membrane properties enhances precision at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 23:6074-6085.2003).
- Chen C, Okayama H (High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-2752.1987).
- Chen F, Watson CS, Gametchu B (Association of the glucocorticoid receptor alternatively-spliced transcript 1A with the presence of the high molecular weight membrane glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. *J Cell Biochem* 74:430-446.1999).
- Choi DW (Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.1992).
- Chuong CM, Crossin KL, Edelman GM (Sequential expression and differential function of multiple adhesion molecules during the formation of cerebellar cortical layers. *J Cell Biol* 104:331-342.1987).
- Contestabile A (Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum* 1:41-55.2002).
- Cotterell KL, Croucher MJ, Bradford HF (Weak anticonvulsant activity of CGP 37849 and CGP 39551 against kindled seizures following systemic administration. *Eur J Pharmacol* 214:285-287.1992).
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.2001).
- Cull-Candy SG, Brickley SG, Misra C, Feldmeyer D, Momiyama A, Farrant M (NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors. *Neuropharmacology* 37:1369-1380.1998).
- Cummings DM, Larijani GE, Conner DP, Ferguson RK, Rocci ML, Jr. (Characterization of dexamethasone binding in normal and uremic human serum. *DICP* 24:229-231.1990).
- Cutting JC (Chronic mania in childhood: case report of a possible association with a radiological picture of cerebellar disease. *Psychol Med* 6:635-642.1976).
- Czock D, Keller F, Rasche FM, Haussler U (Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 44:61-98.2005).
- Dabelic S, Supraha S, Dumic J (Galectin-3 in macrophage-like cells exposed to immunomodulatory drugs. *Biochim Biophys Acta* 1760:701-709.2006).
- Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N (Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.1998).
- De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W, Levine S (Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 73:101-120.1988).
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301.1998).

- 
- Diaz R, Brown RW, Seckl JR (Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J Neurosci* 18:2570-2580.1998).
- Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F, Christensen G (Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Mol Biotechnol* 28:21-32.2004).
- Edwards MA, Loxley RA, Williams AJ, Connor M, Phillips JK (Lack of functional expression of NMDA receptors in PC12 cells. *Neurotoxicology* 28:876-885.2007).
- Elmore S (Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.2007).
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52:513-556.2000).
- Fan F, Wood KV (Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 5:127-136.2007).
- Farstad T, Bratlid D ([Bronhopulmonary dysplasia]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 127:2374-2377.2007).
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7413-7417.1987).
- Feng YZ (Mulig interaksjon mellom NMDA reseptorsubenheten 3A og glukokortikoidreseptoren. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap Master.2009).
- Ferrier R, Had L, Rabie A, Faivre-Sarrailh C (Coordinated expression of five tropomyosin isoforms and beta-actin in astrocytes treated with dibutyryl cAMP and cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 28:303-316.1994).
- Fine EJ, Ionita CC, Lohr L (The history of the development of the cerebellar examination. *Semin Neurol* 22:375-384.2002).
- Fink SL, Cookson BT (Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73:1907-1916.2005).
- Fu Z, Logan SM, Vicini S (Deletion of the NR2A subunit prevents developmental changes of NMDA-mEPSCs in cultured mouse cerebellar granule neurones. *J Physiol* 563:867-881.2005).
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG (Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Immunol* Chapter 8:Unit 8 10.2008).
- Gallagher SR (One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 10:Unit 10 11.2001).
- Gallo V, Ciotti MT, Coletti A, Aloisi F, Levi G (Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7919-7923.1982).
- Gametchu B (Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science* 236:456-461.1987).
- Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS (Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* 64:107-119.1999).
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM (Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46:645-652.1986).
- Gjesvik A (Interaksjoner mellom MEK/ERK-signalveien og celledød induert av caspaseaktivatorene PAC-1 og 1541. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap.2011).
- Gomez-Sanchez EP, Fort CM, Gomez-Sanchez CE (Intracerebroventricular infusion of RU28318 blocks aldosterone-salt hypertension. *Am J Physiol* 258:E482-484.1990).

- 
- Goto J, Otsuka F, Yamashita M, Suzuki J, Otani H, Takahashi H, Miyoshi T, Mimura Y, Ogura T, Makino H (Enhancement of aldosterone-induced catecholamine production by bone morphogenetic protein-4 through activating Rho and SAPK/JNK pathway in adrenomedullar cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E904-916.2009).
- Gould E, Woolley CS, Cameron HA, Daniels DC, McEwen BS (Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. *J Comp Neurol* 313:486-493.1991).
- Gould SJ, Subramani S (Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem* 175:5-13.1988).
- Graham FL, van der Eb AJ (A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467.1973).
- Gray EG (The granule cells, mossy synapses and Purkinje spine synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations. *J Anat* 95:345-356.1961).
- Greene LA, Tischler AS (Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428.1976).
- Grier DG, Halliday HL (Management of bronchopulmonary dysplasia in infants: guidelines for corticosteroid use. *Drugs* 65:15-29.2005).
- Groskreutz D, Schenborn ET (Reporter systems. *Methods Mol Biol* 63:11-30.1997).
- Haddad HM, Hsia DY, Gellis SS (Studies on respiratory rate in the newborn; its use in the evaluation of respiratory distress in infants of diabetic mothers. *Pediatrics* 17:204-213.1956).
- Harper S, Speicher DW (Detection of proteins on blot membranes. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 10:Unit 10 18.2001).
- He B, Lu N, Zhou Z (Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 21:900-912.2009).
- Herman IM (Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 5:48-55.1993).
- Hertel C, Hauser N, Schubengel R, Seilheimer B, Kemp JA (Beta-amyloid-induced cell toxicity: enhancement of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-dependent cell death. *J Neurochem* 67:272-276.1996).
- Hopps HE, Bernheim BC, Nisalak A, Tjio JH, Smadel JE (Biologic Characteristics of a Continuous Kidney Cell Line Derived from the African Green Monkey. *J Immunol* 91:416-424.1963).
- Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM (Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology* 52:57-64.1990).
- Igney FH, Krammer PH (Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277-288.2002).
- Jacobs CM, Aden P, Mathisen GH, Khuong E, Gaarder M, Loberg EM, Lomo J, Maehlen J, Paulsen RE (Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture. *J Neurosci Methods* 156:129-135.2006a).
- Jacobs CM, Trinh MD, Rootwelt T, Lomo J, Paulsen RE (Dexamethasone induces cell death which may be blocked by NMDA receptor antagonists but is insensitive to Mg<sup>2+</sup> in cerebellar granule neurons. *Brain Res* 1070:116-123.2006b).
- Jana S, Paliwal J (Apoptosis: potential therapeutic targets for new drug discovery. *Curr Med Chem* 14:2369-2379.2007).
- Kawata M (Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system. *Neurosci Res* 24:1-46.1995).
- Kemppainen RJ, Behrend EN (Adrenal physiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27:173-186.1997).

- 
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.1972).
- Kew JN, Kemp JA (Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179:4-29.2005).
- King SL, Hegadoren KM (Stress hormones: how do they measure up? *Biol Res Nurs* 4:92-103.2002).
- Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A (Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:6997-7003.2005).
- Komuro H, Rakic P (Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca<sup>2+</sup> fluctuations. *J Neurobiol* 37:110-130.1998).
- Komuro H, Yacubova E (Recent advances in cerebellar granule cell migration. *Cell Mol Life Sci* 60:1084-1098.2003).
- Lawrence MS, Sapolsky RM (Glucocorticoids accelerate ATP loss following metabolic insults in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 646:303-306.1994).
- Leclerc CL, Chi CL, Awobuluyi M, Sucher NJ (Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the rat pheochromocytoma cell line PC12. *Neurosci Lett* 201:103-106.1995).
- Leiner HC, Leiner AL, Dow RS (Cognitive and language functions of the human cerebellum. *Trends Neurosci* 16:444-447.1993).
- Lessard JL (Two monoclonal antibodies to actin: one muscle selective and one generally reactive. *Cell Motil Cytoskeleton* 10:349-362.1988).
- Liesi P, Wright JM (Weaver granule neurons are rescued by calcium channel antagonists and antibodies against a neurite outgrowth domain of the B2 chain of laminin. *J Cell Biol* 134:477-486.1996).
- Liggins GC, Howie RN (A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50:515-525.1972).
- Lindland-Tjønn (Vekstfaktorers interaksjoner med caspaser i PC12-cellelinjen og kornceller fra rotte. *Farmasøytisk institutt*.2009).
- Lipworth BJ (Therapeutic implications of non-genomic glucocorticoid activity. *Lancet* 356:87-89.2000).
- Liu XB, Murray KD, Jones EG (Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci* 24:8885-8895.2004).
- Loo DT, Rillema JR (Measurement of cell death. *Methods Cell Biol* 57:251-264.1998).
- Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ (Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4438-4442.1991).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.1951).
- Lu J, Goula D, Sousa N, Almeida OF (Ionotropic and metabotropic glutamate receptor mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 121:123-131.2003).
- Magistretti PJ, Pellerin L (Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci* 14:177-182.1999).
- Mammel MC, Green TP, Johnson DE, Thompson TR (Controlled trial of dexamethasone therapy in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Lancet* 1:1356-1358.1983).

- 
- Mancini JD, Atchison WD (The NR2B subunit in NMDA receptors is functionally important during cerebellar granule cell migration. *Neurosci Lett* 429:87-90.2007).
- Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E (Delayed increase of Ca<sup>2+</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol* 36:106-112.1989).
- Marques SM, Esteves da Silva JC (Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life* 61:6-17.2009).
- Matthews SG (Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res* 47:291-300.2000).
- Mayer ML (Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 15:282-288.2005).
- Mayer ML, Armstrong N (Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 66:161-181.2004).
- Morsink MC, Joels M, Sarabdjitsingh RA, Meijer OC, De Kloet ER, Datson NA (The dynamic pattern of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional responses in neuronal PC12 cells. *J Neurochem* 99:1282-1298.2006).
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.1992).
- Munemoto Y, Kuriyama H, Doi T, Sato K, Matsumoto A, Sugatani J, Cho H, Komeda M, Altschuler RA, Kitajiri M, Mishina M, Yamashita T (Auditory pathway and auditory brainstem response in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 and epsilon 4 subunits. *Neurosci Lett* 251:101-104.1998).
- Nandhu MS, Paul J, Kuruvila KP, Abraham PM, Antony S, Paulose CS (Glutamate and NMDA receptors activation leads to cerebellar dysfunction and impaired motor coordination in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rat: functional recovery with bone marrow cells, serotonin and GABA. *Mol Cell Biochem*.2011).
- Nilsson A, Eriksson M, Muly EC, Akesson E, Samuelsson EB, Bogdanovic N, Benedikz E, Sundstrom E (Analysis of NR3A receptor subunits in human native NMDA receptors. *Brain Res* 1186:102-112.2007).
- Norbury CJ, Hickson ID (Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:367-401.2001).
- Oberdoerster J, Kamer AR, Rabin RA (Differential effect of ethanol on PC12 cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 287:359-365.1998).
- Olney JW (Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721.1969).
- Pantazis NJ, Dohrman DP, Luo J, Goodlett CR, West JR (Alcohol reduces the number of pheochromocytoma (PC12) cells in culture. *Alcohol* 9:171-180.1992).
- Pavlik A, Buresova M (The neonatal cerebellum: the highest level of glucocorticoid receptors in the brain. *Brain Res* 314:13-20.1984).
- Pearce IA, Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD (Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 223:143-147.1987).
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 21:1228-1237.2001).
- Persengiev SP (The neuroprotective and antiapoptotic effects of melatonin in cerebellar neurons involve glucocorticoid receptor and p130 signal pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:151-158.2001).
- Peterson RE, Nokes G, Chen PS, Jr., Black RL (Estrogens and adrenocortical function in man. *J Clin Endocrinol Metab* 20:495-514.1960).
- Phillips GJ (Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett* 204:9-18.2001).

- 
- Porter AG, Janicke RU (Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:99-104.1999).
- Porter TE, Ghavam S, Muchow M, Bossis I, Ellestad L (Cloning of partial cDNAs for the chicken glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and characterization of mRNA levels in the anterior pituitary gland during chick embryonic development. *Domest Anim Endocrinol* 33:226-239.2007).
- Powell CE, Watson CS, Gametchu B (Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine* 10:271-280.1999).
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283:1-16.2003).
- Radler JO, Koltover I, Salditt T, Safinya CR (Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* 275:810-814.1997).
- Rahbar-Roshandel N, Razavi L, Tavakoli-Far B, Mahmoudian M (Mebudipine and dibudipine protect PC12 cells against oxygen-glucose deprivation and glutamate-induced cell death. *Pathophysiology* 15:227-231.2008).
- Roberts AC, Diez-Garcia J, Rodriguiz RM, Lopez IP, Lujan R, Martinez-Turrillas R, Pico E, Henson MA, Bernardo DR, Jarrett TM, Clendeninn DJ, Lopez-Mascaraque L, Feng G, Lo DC, Wesseling JF, Wetsel WC, Philpot BD, Perez-Otano I (Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* 63:342-356.2009).
- Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, de Medina FS (Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401:318-320.2010).
- Roosendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL (Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11642-11647.1999).
- Rumbaugh G, Vicini S (Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 19:10603-10610.1999).
- Sapolsky RM (Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 34:721-732.1999).
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:6174-6177.1984).
- Schlett K, Pieri I, Metzger F, Marchetti L, Steigerwald F, Dere E, Kirilly D, Tarnok K, Barabas B, Varga AK, Gerspach J, Huston J, Pfizenmaier K, Kohr G, Eisel UL (Long-term NR2B expression in the cerebellum alters granule cell development and leads to NR2A down-regulation and motor deficits. *Mol Cell Neurosci* 27:215-226.2004).
- Shinwell ES, Karplus M, Reich D, Weintraub Z, Blazer S, Bader D, Yurman S, Dolfen T, Kogan A, Dollberg S, Arbel E, Goldberg M, Gur I, Naor N, Sirota L, Mogilner S, Zaritsky A, Barak M, Gottfried E (Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 83:F177-181.2000).
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.1985).
- Snell LD, Bhavé SV, Tabakoff B, Hoffman PL (Chronic ethanol exposure delays the 'developmental switch' of the NMDA receptor 2A and 2B subunits in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 78:396-405.2001).

- 
- Stahn C, Buttgereit F (Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:525-533.2008).
- Strom BO, Aden P, Mathisen GH, Lomo J, Davanger S, Paulsen RE (Transfection of chicken cerebellar granule neurons used to study glucocorticoid receptor regulation by nuclear receptor 4A (NR4A). *J Neurosci Methods*.2010).
- Szapary D, Xu M, Simons SS, Jr. (Induction properties of a transiently transfected glucocorticoid-responsive gene vary with glucocorticoid receptor concentration. *J Biol Chem* 271:30576-30582.1996).
- Szego PL, Stein LA (Endoscopic retrograde cholangiopancreatography. A review of the rewards and indications. *Gastrointest Radiol* 3:319-324.1978).
- Takahashi T (Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* 83:1441-1451.2002).
- Tang YZ, Carr CE (Development of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in avian auditory brainstem. *J Comp Neurol* 502:400-413.2007).
- Tarnok K, Czondor K, Jelitai M, Czirik A, Schlett K (NMDA receptor NR2B subunit over-expression increases cerebellar granule cell migratory activity. *J Neurochem* 104:818-829.2008).
- Tennant JR (Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability. *Transplantation* 2:685-694.1964).
- Thangnipon W, Kingsbury A, Webb M, Balazs R (Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Brain Res* 313:177-189.1983).
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.1979).
- Trinkle-Mulcahy L, Boulon S, Lam YW, Urcia R, Boisvert FM, Vandermoere F, Morrice NA, Swift S, Rothbauer U, Leonhardt H, Lamond A (Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J Cell Biol* 183:223-239.2008).
- Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G (Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr Opin Genet Dev* 8:532-538.1998).
- Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM (Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 53:157-167.1990).
- Ursitti JA, Mozdzanowski J, Speicher DW (Electroblotting from polyacrylamide gels. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 10:Unit 10* 17.2001).
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Leuillet S, Vaudry H, Gonzalez BJ (Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways. *Science* 300:1532-1534.2003).
- Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6398-6403.2002).
- Vazhappilly R, Sucher NJ (Turnover analysis of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 protein in PC12 cells. *Neurosci Lett* 318:153-157.2002).
- Voogd J, Glickstein M (The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:370-375.1998).
- Walker HK (The Cerebellum.1990).
- Waxman EA, Lynch DR (N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* 11:37-49.2005).

- 
- Wehus L (Mulig interaksjon mellom NMDA reseptorsubenheten 3A og glukokortikoidreseptoren. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap.2007).
- Wendelbo Aanensen J (Mekanismer for glutamat-og deksametasonindusert celledød. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap.2010).
- Wolf U, Rapoport MJ, Schweizer TA (Evaluating the affective component of the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 21:245-253.2009).
- Wong HK, Liu XB, Matos MF, Chan SF, Perez-Otano I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG, Lipton SA, Sucher NJ (Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J Comp Neurol* 450:303-317.2002).
- Wu B, Li P, Liu Y, Lou Z, Ding Y, Shu C, Ye S, Bartlam M, Shen B, Rao Z (3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8348-8353.2004).
- Yacubova E, Komuro H (Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration. *Cell Biochem Biophys* 37:213-234.2003).
- Yeh TF, Lin YJ, Lin HC, Huang CC, Hsieh WS, Lin CH, Tsai CH (Outcomes at school age after postnatal dexamethasone therapy for lung disease of prematurity. *N Engl J Med* 350:1304-1313.2004).
- Yoshida I, Ban N, Inagaki N (Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323:547-555.2004).
- Zeiss CJ (The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40:481-495.2003).