

HOVEDFAGSOPPGAVE FOR GRADEN
Candidatus pharmaciae

**Mekanismer ved dexametason- og
glutamatindusert celledød i
nervecellekulturer**



Minh Dung Trinh

Farmasøytisk institutt

Det matematiske-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Høst 2004

FORORD

Denne hovedfagsoppgaven har blitt utført ved biologisk seksjon, Farmasøytisk institutt i tidsrommet november 2003 til desember 2004, som et ledd i graden cand.pharm. ved Universitetet i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke min hovedveileder professor Ragnhild E. Paulsen for å ha vist en inspirerende interesse for mitt arbeid. Hennes faglige kunnskaper og positive innstilling er meget beundringsverdig og har gitt meg mye veiledning og oppmuntring gjennom hele hovedfagsarbeidet.

En kjempestor takk går også til min medveileder Chris Jacobs som fortjener all ros for hans positive humør og vilje til å stille opp til enhver tid med støtte, veiledning og praktisk hjelp. Videre ønsker jeg også å takke Gro Mathiesen og Mona Gaarder for verdifull opplæring, hjelp og støtte på laben.

En spesiell takk går til alle ved biologisk seksjon på ZEB-bygget for å ha gjort hovedfagsåret til en utrolig hyggelig, morsom og minnerik tid av studieperioden.

Ellers vil jeg også takke Petra Aden ved Ullevål Universitetssykehus for hennes faglige innspill.

Oslo, desember 2004

Minh Dung Trinh

SAMMENDRAG

Dexametason er et kjent legemiddel som brukes til behandling av en rekke inflammatoriske sykdommer. Legemidlet benyttes også til behandling av premature barn for å hindre kronisk lungesykdom ved å fremme modningsprosessen i lungene. Denne behandling av tidligfødte barn har vist å gi uønskede langtidsvirkninger.

I denne oppgaven ble det brukt primære nevronkulturer fra rotter. Det ble benyttet dexametason i ulike konsentrasjoner for å undersøke toksisiteten i korncellene, og videre ble det undersøkt hvilke reseptorer som er involvert i denne toksisiteten. Det ble benyttet glutamat til å indusere celledød for å studere intracellulære mekanismer ved nevrotoksisitet. Det ble fokusert på proteinene caspase-3, AIF og PARP, som alle er markører for apoptose.

Dexametason var toksisk for korncellene ved konsentrasjoner på 0,1 μM og høyere. Denne toksisiteten involverte både en reseptor følsom for mineralkortikoid-reseptorantagonisten RU28318. Toksisiteten lot seg blokkere av glutamatreseptorantagonisten MK801. Virkningen av dexametason og glutamat på NMDA-reseptoren viste seg å være forskjellig.

Både caspase-3 og AIF var involvert ved glutamatindusert celledød, hvorav caspase-3 ble aktivert før AIF. Caspase-3 var aktivert både i glutamatinduserte celler og i bufferbehandlede (kontroll) celler. I glutamatbehandlede celler var caspase-3 i stand til å kløyve PARP i større grad enn caspase-3 i bufferbehandlede celler. Caspasen var aktivert og redistribuerte seg forskjellig ved de ulike behandlingene.

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	1
SAMMENDRAG	2
INNHALDSFORTEGNELSE	3
1 INNLEDNING	6
1.1 <i>GLUKOKORTIKOIDER</i>	6
1.1.1 Glukokortikoidreseptorer.....	6
1.1.2 Klassiske steroideffekter.....	7
1.1.3 Ikke-klassiske steroideffekter.....	9
1.1.4 Glukokortikoider og nevrotoksisitet.....	9
1.2 <i>GLUTAMAT</i>	10
1.2.1 Glutamatreseptorer.....	10
1.2.2 Glutamat reseptoraktivering og nevrotoksisitet.....	13
1.3 <i>CELLEDØD</i>	13
1.3.1 Nekrose.....	14
1.3.2 Apoptose.....	14
1.4 <i>CASPASE-AVHENGIG APOPTOSE</i>	16
1.4.1 Caspaser.....	16
1.4.2 Mitokondriet fører til aktivering av caspase-9.....	18
1.4.3 Dødsreseptorer fører til aktivering av caspase-8.....	18
1.4.4 Aktivert caspase-3 kløyver PARP.....	19
1.5 <i>CASPASE-UAVHENGIG APOPTOSE</i>	20
1.5.1 AIF.....	20
1.6 <i>MÅL MED OPPGAVEN</i>	21
2 METODER	22
2.1 <i>KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER</i>	22
2.2 <i>UTSTYR</i>	23
2.3 <i>DYR TIL CELLEKULTURER</i>	24
2.4 <i>PREPARERING AV KORNCCELLER FRA ROTTER</i>	24
2.4.1 Cellekulturmedium med føtalt kalveserum.....	24
2.4.2 Løsninger til preparering av korncellekulturer.....	25
2.4.3 Utstyr til preparering av korncellekulturer.....	26
2.4.4 Coating av skåler med poly-L-lysin.....	26
2.4.5 Prosedyre for preparering av kornceller.....	27
2.4.6 Tilsetting av Cytosin β -D-Arabino-Furanoside.....	28
2.5 <i>EKSPONERING AV KORNCCELLER</i>	28
2.5.1 Locke's løsning.....	28
2.5.2 Serumfritt cellekulturmedium.....	29
2.5.3 Preinkubering.....	30
2.5.4 Eksponering med glutamat eller dexametason.....	30
2.6 <i>DETEKSJON AV CELLEDØD</i>	32

2.7	<i>IMMUNFARGING</i>	33
2.8	<i>STATISTIKK</i>	36
3	RESULTATER	37
3.1	<i>MEKANISMER VED DEXAMETASONINDUSERT CELLEDØD I KORNCCELLER</i>	37
3.1.1	Dexametasonindusert celledød i korncellekulturer.....	37
3.1.2	Effekt av RU28318 på dexametasonindusert celledød	39
3.1.3	Effekt av MK801 på dexametasonindusert celledød	40
3.1.4	Effekt av Mg ²⁺ på dexametasonindusert celledød	41
3.1.5	Effekt av Mg ²⁺ på glutamatindusert celledød	42
3.1.6	Effekt av Mg ²⁺ på dexametason- og glutamatindusert celledød i hyperpolariserende medium.....	43
3.1.7	Effekt av Mg ²⁺ på dexametason- og glutamatindusert celledød i depolariserende medium.....	44
3.1.8	Effekt av RU28318 på glutamatindusert celledød.....	45
3.2	<i>CELLULÆRE MEKANISMER VED GLUTAMATINDUSERT CELLEDØD</i>	46
3.2.1	Glutamatindusert celledød	46
3.2.2	Deteksjon av apoptosemarkøren caspase-3 i bufferbehandlede versus glutamatbehandlede celler	47
3.2.3	Deteksjon av apoptosemarkøren caspase-3	48
3.2.4	Deteksjon av apoptosemarkøren AIF	49
3.2.5	Effekt av caspase-3 hemmer på glutamat- og bufferindusert aktivering av caspase-3.....	50
3.2.6	Effekt av caspase-2 hemmer på celledød og immunfarging av aktivert caspase-3.....	52
3.2.7	Deteksjon av PARP	54
3.2.8	Effekt av caspase-8 hemmer på glutamat- og bufferindusert aktivering av caspase-3.....	55
3.2.9	Effekt av caspase-9 hemmer på glutamat- og bufferindusert aktivering av caspase-3.....	57
4	DISKUSJON	59
4.1	<i>BRUK AV KORNCCELLER FRA ROTTER SOM CELLEMODELL</i>	59
4.1.1	Dyrkningsbetingelser	59
4.1.2	Primære cellekulturer versus <i>in vivo</i> forsøk i dyr.....	59
4.1.3	Primære cellekulturer versus cellelinjer	60
4.1.4	Dexametasontoksisitet i kornceller	60
4.2	<i>MEKANISMER VED DEXAMETASONINDUSERT TOKSISITET</i>	61
4.2.1	Dexametasontoksisitet er reseptormediert.....	61
4.2.2	Dexametasontoksisitet involverer NMDA-reseptoren.....	62
4.2.3	Dexametasontoksisitet involverer NMDA-reseptoren via en annen mekanisme enn glutamateksitoksisitet.....	63
4.3	<i>GLUTAMATINDUSERT CELLEDØD</i>	64
4.3.1	Caspase-3 er involvert ved glutamatindusert celledød etter 30 minutter, mens AIF frigjøres fra mitokondriet etter 2 timer	64

4.3.2	Caspase-3 hemmer reduserer celledøden, men ikke immunfarging av kløyvet caspase-3	65
4.3.3	Caspase-2 er ikke involvert i aktiveringen av caspase-3	66
4.3.4	Caspase-3 kløyver PARP i glutamateksponerte celler, men ikke i buffereksponeerte celler	67
4.3.5	Caspase-3 translokering hemmes av caspase-8 og caspase-9 i glutamateksponerte celler, men ikke i buffereksponeerte celler	67
5 KONKLUSJON		69
FORKORTELSER		70
REFERANSER.....		71

1 INNLEDNING

1.1 GLUKOKORTIKOIDER

Glukokortikoider er steroidhormoner som produseres i binyrebarken. Glukokortikoidene utøver mange fysiologiske effekter i kroppen, blant annet regulering av immunresponsen og kroppens egen stressrespons. En viktig funksjon til glukokortikoidene er kontroll av glukosetransport og metabolisme (Morita *et al.*, 1999). Glukokortikoidene kan påvirke proliferering, differensiering og død av nevroner, og har i hjernen både nevrodegenerativ og nevroprotektiv effekt (Abraham *et al.*, 2001).

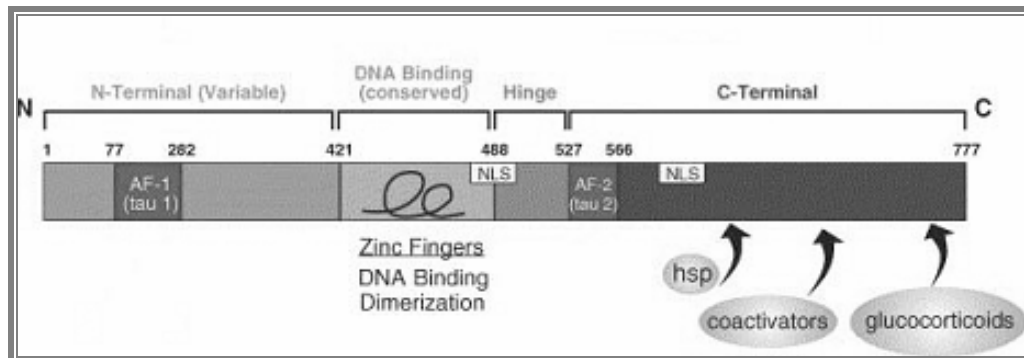
Glukokortikoider brukes i stor grad for å undertrykke inflammasjon i kroniske inflammatoriske sykdommer som astma, reumatoid artritt, inflammatorisk tarmsykdom og autoimmune sykdommer, som alle er assosiert med økt uttrykk av inflammatoriske gener (Barnes, 1998). Glukokortikoider som dexametason benyttes også til å fremme lungemodningsprosessen hos premature barn med stor risiko for å utvikle kronisk lungesykdom (Halliday, 1999) (behandlingen er beskrevet i 4.1.4).

1.1.1 Glukokortikoidreseptorer

Glukokortikoidene utøver sin effekt ved å binde seg til spesifikke, intracellulære glukokortikoidreseptorer. Glukokortikoidreseptorene tilhører den store superfamilien av kjernereseptorer, som forøvrig også består av reseptorer for mineralkortikoider, kjønnshormoner, thyroindhormon, retinolsyre og vitamin D (Pelaia *et al.*, 2003, Smoak and Cidlowski, 2004).

Strukturen til reseptoren består av 3 domener: et variabelt N-terminaldomene, et velkonservert sentraldomene og et velkonservert C-terminaldomene (Pelaia *et al.*, 2003). N-terminaldomenet er et transaktiveringsdomene som blant annet inneholder AF-1 domene som er nødvendig for assosiering av reseptoren med basale transkripsjonsfaktorer. Det sentrale domenet består av to sinkfingre som er nødvendig for reseptordimerisering og DNA-binding. C-terminaldomenet er bindingssetet for glukokortikoidene, samt binding av

”heat shock” proteiner. Forøvrig har reseptoren kjernelokaliseringssignaler som er lokalisert i C-domenet og ved det sentrale domenet (se figur 1.1) (Smoak and Cidlowski, 2004).

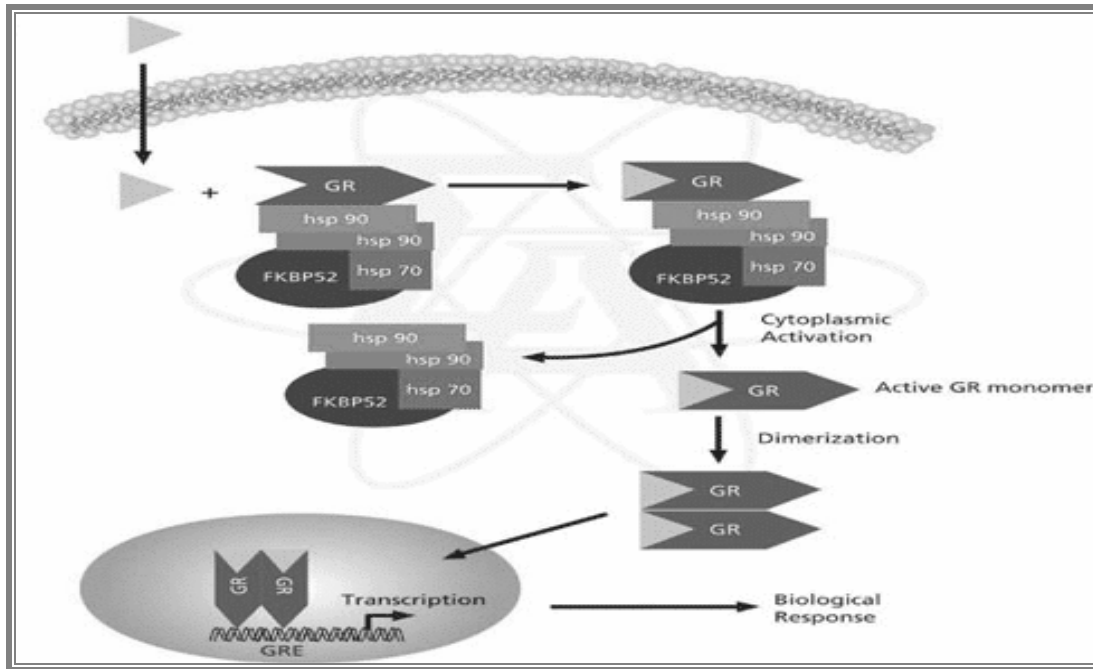


Figur 1.1 Glukokortikoid reseptor. Figuren er hentet fra Smoak and Cidlowski (2004).

Glukokortikoidreseptorene er hovedsakelig lokalisert i cytoplasma bundet som inaktive komplekser med ”heat shock” proteiner (se figur 1.2) (Adcock, 2001). Interaksjonen mellom reseptoren og ”heat shock” proteiner er nødvendig for at C-terminaldomenet skal være mottakelig for ligandbinding (Pelaia *et al.*, 2003) (beskrivelse av ligandbinding, se 1.1.2).

1.1.2 Klassiske steroideffekter

Glukokortikoidene passer lett gjennom plasmamembranen som følge av deres lipofile struktur (Abraham *et al.*, 2001, Smoak and Cidlowski, 2004). Ved binding av glukokortikoidene til sine reseptorer i cytoplasma, aktiveres reseptoren og dissosieres fra ”heat shock” protein komplekset. Glukokortikoid-reseptorkomplekset translokeres til kjernen ved hjelp av kjernelokaliseringssignalet. I kjernen vil komplekset enten stimulere eller hemme gentranskripsjon ved å bindes som reseptordimerer direkte til DNA eller ved interaksjon med andre transkripsjonsfaktorer (Smoak and Cidlowski, 2004) (se figur 1.2). Effekten av denne prosessen vil komme 30 til 60 minutter etter glukokortikoidenes entré inn i cellen (Cato *et al.*, 2002).



Figur 1.2 Aktivering av steroidreseptorer. Figuren er hentet fra www.sigmaaldrich.com.

Aktivering av transkripsjon

Glukokortikoidreseptoren aktiverer gentranskripsjon ved å binde til såkalte glukokortikoid responsive elementer (GRE) på DNA. GRE ligger oppstrøms for det genet som skal transkriberes (Adcock, 2001, Smoak and Cidlowski, 2004). Binding av reseptoren til GRE fremmer tilgangen av en rekke ko-aktivatorer samt endringer i kromatinstruktur som åpner opp DNA slik at det basale transkripsjonsmaskineriet kan binde seg til sin promotor. Resultatet er gentranskripsjon av nye proteiner (Smoak and Cidlowski, 2004).

Undertrykking av transkripsjon

Glukokortikoidene kan undertrykke transkripsjon ved interaksjon med andre transkripsjonsfaktorer som NF- κ B og AP-1 (Smoak and Cidlowski, 2004, Adcock, 2001). Interaksjonen resulterer i nedsatte transkripsjonsegenskaper hos disse transkripsfaktorene. Glukokortikoidene kan også indirekte hemme transkripsjonsfaktorer ved å interferere med signalveier involvert i reguleringen av transkripsjonsfaktorene. Andre mekanismer er hemming av histonacetylering, noe som resulterer i tettere kveiling av DNA og aktivering av mRNA-degraderende ribonukleaser (Pelaia *et al.*, 2003, Barnes, 1998, Adcock, 2001).

1.1.3 Ikke-klassiske steroideffekter

I tillegg til å utøve sine effekter som regulatorer av gentranskripsjon via klassiske kjernereseptorer, har steroidene også vist å utøve rask effekt på intracellulære signalveier uavhengig av gentranskripsjon (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2004). Disse effektene blir ofte betraktet som ikke-klassiske steroideffekter. Imotsetning til de klassiske steroideffektene kommer disse effektene etter sekunder til minutter (Cato *et al.*, 2002). De ikke-klassiske steroideffektene krever ofte høye steroidkonsentrasjoner sammenlignet med de klassiske effektene (Wehling, 1997).

Forsøk har vist at steroidene kan interagere med plasmamembranbundne reseptorer som enten er spesifikke for steroidene, eller for andre ligander som reguleres av steroidene, samt inducere koplinger mellom membranreseptorer og ulike ionekanaler. Kandidater for disse ikke-klassiske reseptormederte effektene er G-protein koblede reseptorer, som aktiverer en rekke signaloverføringsveier, og acetylkolin reseptorkanalen (Cato *et al.*, 2002). Forsøk har også vist at steroidene kan påvirke NMDA-reseptoren (Takahashi *et al.*, 2002). Det er også foreslått at de klassiske steroidreseptorene kan være lokalisert ved plasma membranen, der de kan trigge raske kjedereaksjoner (Cato *et al.*, 2002). Effekter på plasmamembranen som ikke er reseptormediert, for eksempel interaksjoner med membranlipider og/eller uspesifikke proteiner, er også rapportert (Cato *et al.*, 2002, Schmidt *et al.*, 2000).

De raske steroideffektene er mangfoldige, og mange av disse ikke-klassiske effektene ser ut til å involvere mitogen-aktiverede proteinkinaser (MAPK), adenylyl cyclase, fosfolipaser, fosfoinositidomsetning, intracellulær pH og kalsium, protein kinase C, cytokrom c og tyrosinkinaser (Cato *et al.*, 2002, Wehling, 1997, Schmidt *et al.*, 2000).

1.1.4 Glukokortikoider og nevrotoksisitet

Mangel på eller for høy konsentrasjon av glukokortikoider kan virke direkte på nevronale funksjoner og medvirke til at hjernen blir mer utsatt for nevrotoksiske skader (Abraham *et al.*, 2001). Glukokortikoidene har blant annet vist å forsterke skaden på nevroner induisert ved hjerneslag og av eksitotoksiner (Morita *et al.*, 1999).

Glukokortikoidene medierer sin toksisitet blant annet via hemming av glukoseopptak og opptak av andre næringsstoffer i hjernen fra sirkulasjonen. Kronisk eksponering av for høye konsentrasjoner av glukokortikoider vil kunne trigge frigjøring av glutamat og intracellulær Ca^{2+} til eksitotoksiske konsentrasjoner (Abraham *et al.*, 2001). En effekt via NMDA-reseptoren kan også kunne bidra til nevrotoksisitet (Takahashi *et al.*, 2002).

1.2 GLUTAMAT

Glutamat er kvantitativt den viktigste eksitatoriske neurotransmitteren i CNS (Sommer and Seeburg, 1992). Glutamatmediert eksitatorisk neurotransmisjon er viktig for mange av hjernens integrative funksjoner (hukommelse, læring), samt nevronal plastisitet, nevronal utvikling og nevrodegenerering (Nakanishi *et al.*, 1994, Nakanishi *et al.*, 1998).

1.2.1 Glutamatreseptorer

Glutamatreseptorer kan deles inn i to hovedgrupper: ionotrofe og metabotrofe reseptorer. De metabotrofe reseptorene er koblet til G-proteiner, mens de ionotrofe reseptorene er kationspesifikke ionekanaler. De ionotrofe reseptorene deles videre inn i 3 undergrupper: AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionat), kainat og NMDA (N-methyl-D-aspartat) reseptorkanaler (Ozawa *et al.*, 1998, Nakanishi, 1992) (se tabell 1.1). Mens de ionotrofe reseptorkanalene medierer forholdsvis rask nevronal eksitasjon, medierer de metabotrofe reseptorene relativt sene glutamatresponser (Nakanishi, 1992).

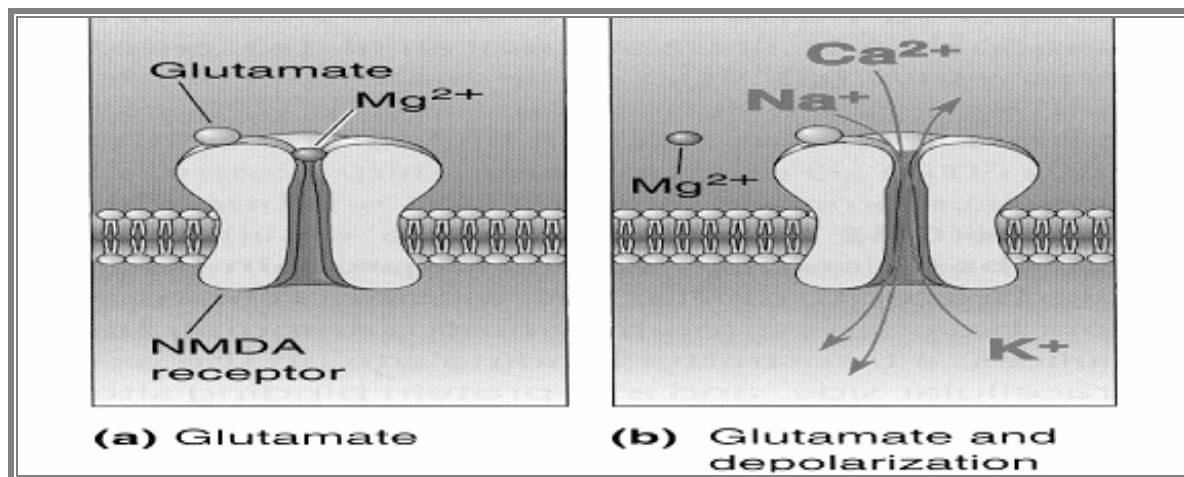
Tabell 1.1 Klassifisering av glutamatreseptorer. Ozawa *et al.* (1998), Nakanishi *et al.* (1998).

GLUTAMATRESEPTORER	
<p>Ionotrofe reseptorer: Ionekanalreseptorer</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ NMDA-reseptorer: NMDAR1, NMDAR2 ▪ AMPA reseptorer: GluR1-GluR4 ▪ Kainat reseptorer: GluR5-GluR7 	<p>Metabotrofe reseptorer G-protein koblede reseptorer</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Gr 1: mGluR1 og 5 ▪ Gr 2: mGluR2 og 3 ▪ Gr 3: mGluR4, 6, 7 og 8

NMDA-reseptorer

NMDA-reseptoren er en ligandstyrt ione kanal lokalisert i den postsynaptiske membranen til eksitatoriske synapser (Hynd *et al.*, 2004). Reseptorkanalen er permeabel for Ca^{2+} , K^+ og Na^+ . I tillegg til NMDA-bindingssetet har reseptoren også bindingssete for Mg^{2+} , MK801, glycin, Zn^{2+} og polyaminer (Scatton, 1993).

NMDA-reseptoren er en spenningsstyrt ione kanal, som ved hvilemembranpotensialet er blokkert av Mg^{2+} . Denne blokaden oppheves ved depolarisering av cellemembranen, da Mg^{2+} vil miste sin affinitet til reseptoren og dissosiere fra sitt bindingssete. I tillegg til binding av glutamat krever NMDA-reseptoren også binding av glycin for å aktiveres (Ozawa *et al.*, 1998, Sprengel and Seeburg, 1993). Ved aktivering av reseptoren vil Ca^{2+} og Na^+ transporteres inn i cellen, mens K^+ diffunderer ut av cellen (se figur 1.3).



Figur 1.3 Aktivering av NMDA-reseptoren. a) NMDA-reseptoren er blokkert av Mg²⁺ ved normalt membranpotensial. b) Mg²⁺ dissosieres fra NMDA-reseptoren ved depolarisering av cellemembranen etterfulgt av åpning av ione kanalen. Figuren er hentet fra www.mbfys.kun.nl (Medical Physics & Biophysics).

AMPA-kainat reseptorer

AMPA-reseptoren er en ligandstyrt ione kanal permeabel for Na⁺ og K⁺. I motsetning til NMDA-reseptoren viser AMPA-reseptoren betraktelig mindre selektivitet for divalente kationer som Ca²⁺ og Mg²⁺. Reseptoren er spenningsuavhengig (Ozawa *et al.*, 1998).

Kainatreseptoren har mange likheter med AMPA-reseptoren, og mange av AMPA-reseptorens agonister og antagonister virker også på kainatreseptoren og omvendt. Disse to reseptorene har i mange litterære sammenhenger derfor fått fellesbetegnelse som non-NMDA-reseptorer (Ozawa *et al.*, 1998).

Metabotrofe reseptorer

Glutamat metabotrofe reseptorer er G-protein reseptorer som er koblet til intracellulære signalsubstanser. De metabotrofe reseptorene kan deles inn i 3 grupper, gruppe I-III, basert på reseptorens aminosyresekvens (se tabell 1.1). Gruppe I reseptorene er koblet til fosfolipase C med påfølgende aktivering av inositol-trifosfat (IP₃). Gruppe II og III er knyttet til hemming av cAMP (Ozawa *et al.*, 1998).

1.2.2 Glutamat reseptoraktivering og nevrotoksisitet

Overaktivering av glutamatreseptorer under stress i hjernen kan trigge en kaskade av cellulære effekter som resulterer i nevronal degenerering og celledød (Ozawa *et al.*, 1998, Nakanishi, 1992).

Glutamatnevrotoksisitet skyldes hovedsakelig en overaktivering av NMDA-reseptoren, selv om aktivering av alle glutamatreseptorene er vist å ha betydning for nevrotoksisitet (Dawson and Dawson, 2004). Glutamataktivering av AMPA-reseptoren vil først bidra til en depolarisering av cellemembranen som følge av Na^+ -innfluks (Rang *et al.*, 1999). Denne depolariseringen gjør NMDA-reseptoren mottakelig for aktivering, med påfølgende innfluks av ekstracellullær Ca^{2+} . Depolarisering av cellemembranen vil også medføre åpning av andre spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler (Arundine and Tymianski, 2003). I tillegg til den økte innfluksen av Ca^{2+} vil metabotrofe reseptorer mobilisere frisetting av Ca^{2+} fra intracellulære lagre som ER (endoplasmatisk retikulum) (Arundine and Tymianski, 2003, Sattler and Tymianski, 2000). Den markante økningen av intracellulær Ca^{2+} vil overstyre det cellulære Ca^{2+} -regulatoriske maskineriet, og resultatet er en uheldig aktivering av en rekke Ca^{2+} -avhengige prosesser som fører til celledød (Arundine and Tymianski, 2003).

Glutamat nevrotoksisitet er underliggende årsak til nevronal degenerering i mange CNS tilstander som hjerneslag, traume, epilepsi, AIDS, Parkinson's og Alzheimers sykdom (Arundine and Tymianski, 2003, Meldrum, 1992, Nakanishi, 1992).

1.3 CELLEDØD

Celledød er viktig for utviklingen i CNS. Tradisjonelt beskrives celledød som enten nekrose eller apoptose. Studier i senere tid har vist at disse to formene for celledød involverer mange av de samme cellulære mekanismene (Proskuryakov *et al.*, 2003), slik at en mer dynamisk overgang mellom disse to formene for celledød er blitt akseptert (Zeiss, 2003).

1.3.1 Nekrose

Nekrose kan i mange tilfeller betegnes som en patologisk celledød induert av ekstreme påkjenninger på cellen (Martin *et al.*, 1998, Proskuryakov *et al.*, 2003). Karakteristisk ved nekrotiske celler er at disse mister sin plasmamembran-integritet i en tidlig fase av celledødsprosessen. Resultatet er en svelling av hele cellen som tilslutt lyseres (se figur 1.4). Som følge av at cellemembranen oppløses frigjøres det intracellulære rester som vil trigge en inflammatorisk respons i det omkringliggende vev (se tabell 1.2, figur 1.4) (Kroemer *et al.*, 1998, McConkey, 1998, Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).

Nekrose har i mange tilfeller blitt betraktet som en uheldig form for ukontrollert celledød (Assuncao Guimaraes and Linden, 2004), men studier har vist at nekrose har mange fellestrekk med programmert celledød, og at det finnes en regulert form for nekrotisk celledød (Proskuryakov *et al.*, 2002).

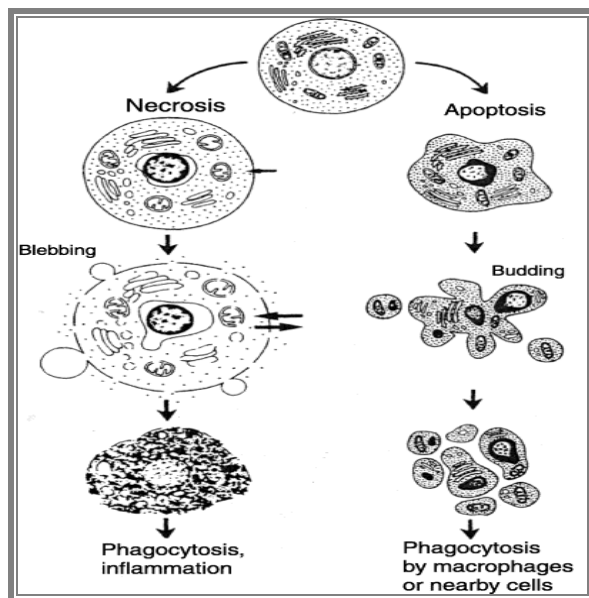
1.3.2 Apoptose

Apoptose er en biologisk programmert celledød som er nødvendig for normal celleutvikling og vevshomeostase. Apoptose kan betraktes som en fysiologisk celledødsprosess (Martin *et al.*, 1998) som er viktig blant annet for å eliminere overskudd av celler og skadede eller skadelige celler, og er helt sentralt ved celleutvelgelse og utvikling av sentralnervesystemet under embryonisk utvikling (Jozsa *et al.*, 2002). Karakteristisk for denne typen celledød er morfologiske endringer i cellen som membran "blebbing", kromatin kondensering, nukleær fragmentering og DNA-degradering med påfølgende krymping av cellen (Vaudry *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2004).

Apoptose involverer aktiveringen av katabolske prosesser og enzymer (Roue *et al.*, 2003). Mitokondriet er en viktig organelle p.g.a. av deres innhold av pro-apoptotiske proteiner som er lokalisert mellom mitokondriets ytter- og innermembran (Zhu *et al.*, 2003). Ved apoptose vil disse proteinene kunne frigjøres, translokere til cytosol og/eller kjernen der de blant annet aktiverer caspaser (se 1.4.1). Caspaseaktiverte prosesser er en sentral mekanisme ved apoptose (se 1.4.1), men det er i senere tid også vist caspase-uavhengige celledødsmekanismer (Roue *et al.*, 2003) (se 1.5.1).

Ved apoptose omringes rester av cellens kjerne og cytoplasma av en intakt plasmamembran under hele apoptoseprosessen (Proskuryakov *et al.*, 2002). Disse apoptotiske cellene fagocytteres av makrofager før plasmamembranen mister sin integritet. De intracellulære restene vil derfor ikke lekkes ut i omkringliggende vev som ved nekrose, og apoptotiske celler induserer derfor ikke inflammasjon (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002) (se figur 1.4, tabell 1.2).

Feil i reguleringen av apoptose resulterer i en ubalanse mellom nygenerering og tap av celler, og er involvert i en rekke sykdommer som epilepsi, Parkinson's og Alzheimer's sykdom, sepsis, hepatitis, kreft, hjertesvikt og hjerneslag (Roue *et al.*, 2003, Vaudry *et al.*, 2003).



Figur 1.4 Nekrose versus apoptose. Figuren er modifisert etter Van Cruchten and Van Den Broeck (2002).

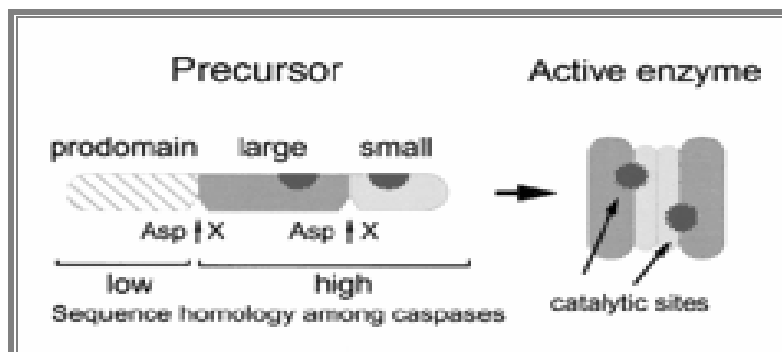
Tabell 1.2 Morfologiske kjennetegn ved apoptose og nekrose. Tabellen er hentet fra McConkey (1998).

Apoptose	Nekrose
<ul style="list-style-type: none"> ▪ krymping av cellen ▪ kjernekonddensering ▪ intakt membran ▪ ingen lekkasje av cellens innhold 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ svelling av cellen ▪ tap av membranintegritet ▪ lekkasje av cellens innhold

1.4 CASPASE-AVHENGIG APOPTOSE

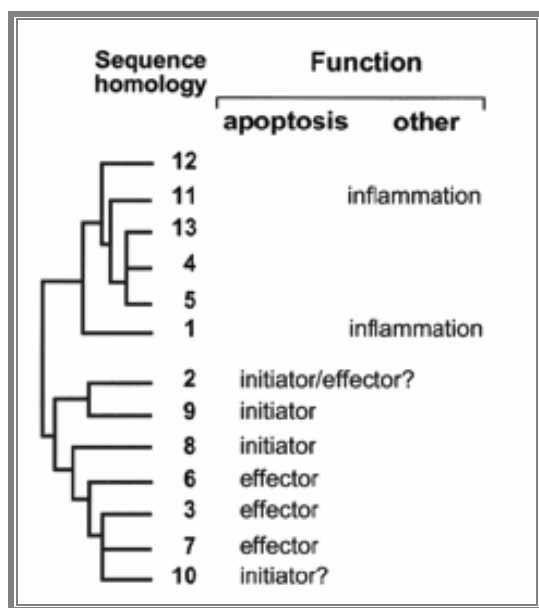
1.4.1 Caspaser

Caspaser er en familie av spesifikke cysteinproteaser som har likheter i aminosyresekvens, struktur og substratspesifisitet. Caspasene syntetiseres som inaktive enzymer, såkalte procaspaser, som inneholder 3 domener: et N-terminaldomene, en stor subenhet (~20 kD) og en liten subenhet (~10 kD) (Thornberry and Lazebnik, 1998). Aktivering av caspasene involverer proteolytisk kløyving etter en aspartat-aminosyre mellom subenhetene, som deretter vil dissosieres for å danne en aktiv tetramer bestående av to store subenheter og to små subenheter (se figur 1.5). Caspasene kan enten aktiveres autokatalytisk eller som følge av enzymer med liknende spesifisitet (Thornberry and Lazebnik, 1998, Bilslund and Harper, 2002).



Figur 1.5 Oppbygging og aktivering av caspaser. Figuren er hentet fra Thornberry and Lazebnik (1998).

Caspasene kan deles inn i 3 grupper basert på deres substratspesifisitet og funksjon: 1) caspaser involvert i inflammasjon, 2) initiatorcaspaser og 3) effektorcaspaser (se figur 1.6). De to sistnevnte er involvert ved apoptose (Bilsland and Harper, 2002, Thornberry and Lazebnik, 1998). I en caspasekaskade vil initiatorcaspasene først aktiveres autokatalytisk direkte i respons til apoptotiske stimuli. Initiatorcaspasene vil videre kløyve og aktivere effektorcaspasene som degraderer spesifikke cellulære proteiner og fører til celledød (Joza *et al.*, 2002). Caspasefamilien består i dag av 14 medlemmer, hvorav caspase-3 regnes som den viktigste caspasen involvert ved apoptose i nervesystemet (Vaudry *et al.*, 2003, Zeiss, 2003).



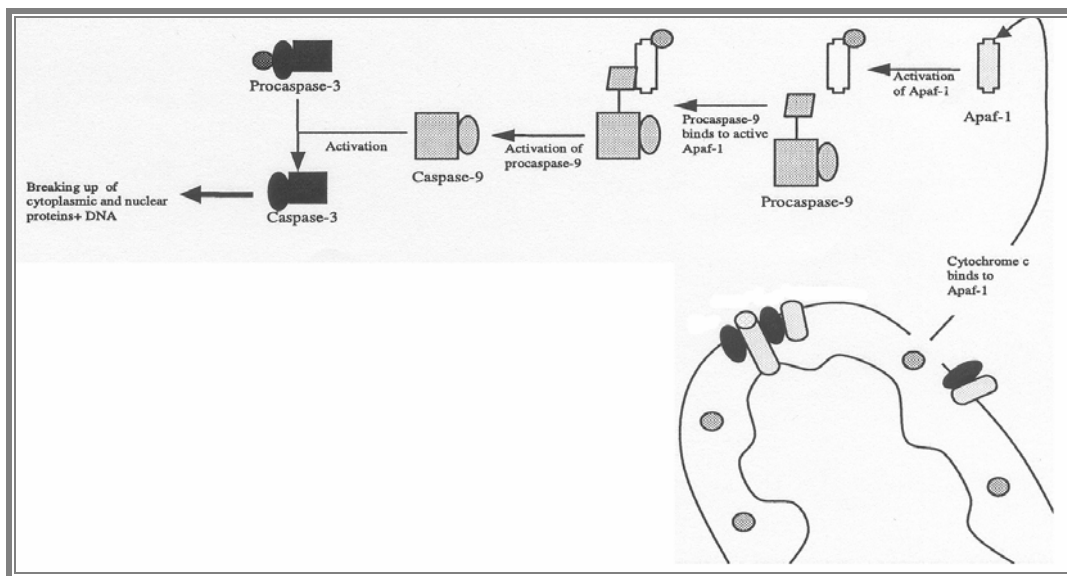
Figur 1.6 Caspaser og funksjon. Figuren er hentet fra Thornberry and Lazebnik (1998). Funksjonen til caspase-14 er ukjent.

Det er hovedsakelig 3 veier som kan føre til aktivering av caspaser ved apoptose: 1) ligandbinding av dødsreseptorer, 2) økt permeabilisering av mitokondriet og 3) stressprosesser som involverer endoplasmastisk retikulum (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002, Assuncao Guimaraes and Linden, 2004, Hitomi *et al.*, 2004). De to førstnevnte mekanismene regnes som de mest dominerende.

1.4.2 Mitokondriet fører til aktivering av caspase-9

En tidlig cellulær respons ved apoptose er økt permeabilisering av mitokondriet. Denne økte permeabilisering resulterer i frigjøring av en del pro-apoptotiske proteiner som befinner seg mellom mitokondriets ytre- og innermembran. Et slikt protein er cytokrom c (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002, Joza *et al.*, 2002).

Normalt fungerer cytokrom c som en viktig komponent i elektrontransportskjeden lokalisert i mitokondriets innermembran (Wang, 2001). Ved apoptose frigjøres cytokrom c fra mitokondriet og translokteres til cytosol der den danner et kompleks med proteinet Apaf-1 (se figur 1.7). Apaf-1 har et caspaserekrutterende domene (CARD) (Wang, 2001). Binding av procaspase-9 til komplekset aktiverer caspasen som disosieres fra komplekset. Caspase-9 kan videre binde procaspase-3 og proteolytisk aktivere den. I tillegg til caspase-3, har caspase-9 også vist å kunne kløyve caspase 6 og caspase-7 (McConkey, 1998).



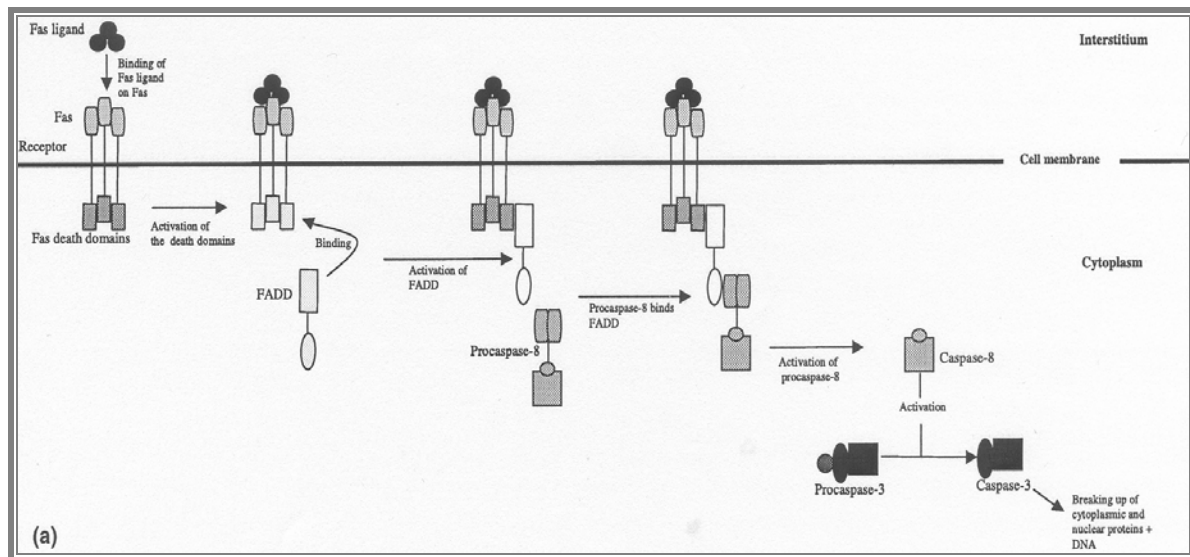
Figur 1.7 Aktivering av caspase-3 via mitokondriet og caspase-9. Figuren er modifisert etter Van Cruchten and Van Broeck (2002).

1.4.3 Dødsreseptorer fører til aktivering av caspase-8

Dødsreseptorer er spesifikke reseptorer som er lokalisert i celledmembranen. Kjente ligander som bindes til disse reseptorene er Fas ligand og TNF α (tumor nekrose faktor α).

Dødsreseptorene har et cytoplasmatisk domene, dødsdomenet, som overfører dødssignaler

ved apoptose (figur 1.8). Ved ligandbinding vil dødsdomenet assosiere med intracellulære adaptormolekyler som FADD (Fas-assosiert dødsdomene). Dette dødsdomene-FADD komplekset vil deretter kunne interagere med procaspase-8, indusere en autokatalytisk kløyving av caspasen og danne en aktiv caspase-8. Caspase-8 vil dissosieres fra FADD og kunne interagere med procaspase-3 i cytoplasma og proteolytisk aktivere den (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).



Figur 1.8 Aktivering av caspase-3 via dødsreseptorer og caspase-8. Figuren er hentet fra Van Cruchten and Van Den Broeck (2002).

I tillegg til å aktivere caspase-3 direkte, har caspase-8 også vist å kunne aktivere caspase-3 indirekte ved å virke på proteiner i mitokondriets ytre membran og indusere en økt permeabilisering av mitokondriet (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002). Andre caspaser som aktiveres via dødsreseptorene er caspase-2 og caspase-10 (Zeiss, 2003).

1.4.4 Aktivert caspase-3 kløyver PARP

Caspase-3 er kjent for å kløyve en rekke cellulære proteiner, deriblant PARP (poly(ADP-ribose)polymerase-1) (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002). PARP er et DNA-reparerende kjerneenzym som normalt aktiveres av DNA skade, og fungerer som en viktig nøkkelkomponent for å opprettholde den genomiske stabiliteten ved å stanse feil i DNA

transkripsjonen og assosiere med replikasjonsmaskineriet (Dantzer *et al.*, 1998, Gilliams-Francis *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2004).

Etter aktivering i cytosol, vil caspase-3 kunne vandre inn i kjernen og kløyve PARP slik at proteinet blir ute av stand til å svare til DNA skade (Yang *et al.*, 2004). Utilstrekkelig DNA-reparasjon vil trigge cellen til apoptose via aktivering av blant annet ATM (ataxia telangiectasia mutated protein kinase) og p53 (Gilliams-Francis *et al.*, 2003).

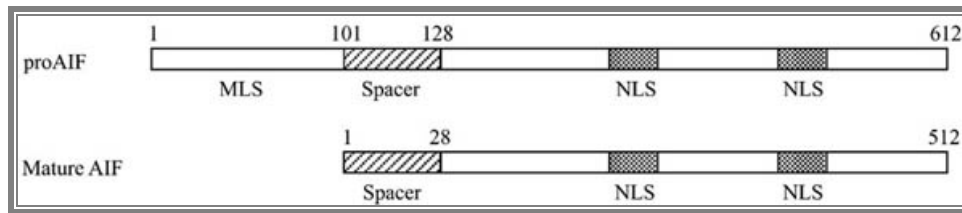
Andre cellulære proteiner som også kløyves av caspase-kaskaden er "DNA-dependent protein kinase", lamin, protein kinase C og aktin (Zeiss, 2003).

1.5 CASPASE-UAVHENGIG APOPTOSE

Studier har vist at apoptose også kan trigges som følge av cellulære mekanismer uavhengig av caspaser. En slik apoptosevei er vist å involvere AIF (apoptose induserende faktor).

1.5.1 AIF

AIF er et flavoprotein som nylig er blitt klonet og karakterisert (Susin *et al.*, 2000). Aminosyresekvensen i proteinet er høyt konserverert i pattedyr, med over 90% homologi (Lu *et al.*, 2003). AIF-proteinet syntetiseres som et proAIF-protein som i mus består av tre domener: en N-terminal mitokondrie-lokaliseringsssekvens (MLS), en "spacer"-sekvens og et C-terminal oksidoreduktase-domene med små kjernelokaliseringsssekvenser. MLS kløyves av når AIF er transportert til mitokondriets IMS ("intermembrane space") (se figur 1.9) (van Gurp *et al.*, 2003). AIF har både NADH oksiderende og apoptose induserende aktivitet (Lu *et al.*, 2003).



Figur 1.9. Oppbygging av AIF. Figuren er hentet fra Lu *et al.*, 2003.

Normalt er AIF lokalisert mellom mitokondriets ytre- og innermembran (Daugas *et al.*, 2000, Zeiss, 2003). Ved spesifikke dødssignaler frigjøres AIF fra mitokondriet og translokteres til kjernen (Cregan *et al.*, 2002). I kjerne vil AIF sammen med et annet protein fra mitokondriet, Endo G, virke direkte på DNA og bidra til DNA-fragmentering og kromatinkondensering. I tillegg har AIF en selvamplifiserende effekt ved å virke tilbake på mitokondriet og bidra til ytterligere permeabilisering (Lu *et al.*, 2003, van Gurp *et al.*, 2003).

Selv om AIF hovedsakelig beskrives å være involvert ved caspase-uavhengig apoptose, viser studier at det er "crosstalk" mellom AIF og caspaser på flere nivåer (Joza *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2003).

1.6 MÅL MED OPPGAVEN

Målet med denne oppgaven var å benytte primære nevronkulturer fra rotter (se 4.1) til å undersøke følgende:

1. Dexametasontoksisitet i kornceller
2. Reseptorer involvert ved dexametasontoksisitet
3. Cellulære mekanismer ved nevrotoxisitet med fokus på:
 - differensiell aktivering av caspase-3 og AIF
 - PARP-kløyving
 - ulike aspekter ved caspase-3 aktivering

2 METODER

2.1 KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER

PRODUKT	PRODUSENT
Alkohol, absolutt Prima	Arcus produkter, Oslo, Norge
AIF (D20) antistoff	Santa Cruz Biotechnonology, Inc, California, USA
Ara-C, Cytosin β -D-Arabino-Furanoside	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
BME, Basal Medium Eagle med Earl's salter med glutamin	GIBCO BRL Life technologies LTD., Paislet, Skottland
BSA, Bovint serumalbumin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Caspase-3 inhibitor III	Calbiochem Nova Biochem Corporation, La Jolla, USA
Caspase-2 inhibitor I	Calbiochem Nova Biochem Corporation, La Jolla, USA
Caspase-8 inhibitor II	Calbiochem Nova Biochem Corporation, La Jolla, USA
Caspase-9 inhibitor III	Calbiochem Nova Biochem Corporation, La Jolla, USA
"Cleaved Caspase-3 (Asp175)" antistoff	Cell signaling Technology R, Inc, Beverly, USA
"Cleaved PARP" antistoff	Cell signaling Technology R, Inc, Beverly, USA
Cy ^{TM2} -konjugert mus anti-kanin IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, Pennsylvania, USA
Cy ^{TM3} -konjugert mus anti-geit IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, Pennsylvania, USA
Dexametason (9 α -flouro-16 α -metyl- prednisolon)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DMSO, Dimetylsulfoksid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dnase I, Deoksyribonuklease I	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Fenolrødt	Merck, Darmstadt, Tyskland
Geiteserum, normal	Jackson Immuno Research Laboratories, Pennsylvania, USA
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
D-(+)-Glukose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Glutamat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Glycin	INC Biochemicals, Tyskland
Kaliumhydrogenfosfat	Laborat GMBH, Berlin, Tyskland
Kaliumklorid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kalsiumklorid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kalveserum, føtalt	GIBCO BRL Life technologies LTD., Paislet, Skottland
Kaninserum, normal	Jackson Immuno Research Laboratories, Pennsylvania, USA
Magnesiumkloridheksahydrat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Magnesiumsulfat	J.T Baker, Deventer, Nederland
MK801, dizocilpin ((5R,10S)-(+)-5-metyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)syklohepten-5,10-iminhydrogenmaleat)	RBI, Massachusetts, USA
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid	J.T Baker, Deventer, Nederland
"PAP-pen Liquid blocker"	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
RU28318	Roussel Uclaf SA, Frankrike
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblå, C.I 23850; Direct Blue 14	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin inhibitor fra soyabønne	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

2.2 UTSTYR

- Cellekulturskåler, Nunclon, Strålesteriliserte.
- CO₂ inkubator, Thermo Forma, Steri-Cycle.
- Disseksjonsutstyr, øyesaks Lawton, sterkt bøyet pinsett Elcon (13cm) og spiss irispinsett Noda nr.4.
- Flourescensmikroskop, Nikon Eclipse TE 300 DV med kamera fra RT Diagnostic instruments.
- Gassbrenner, Fireboy Eco, Integra Bioscience.
- LAF-benk, Holten Safe 2000 Model 1.2.

- Lysmikroskop, Nikon, TMS type 104.
- Miniryster, IKA® Works MS1 Minishaker.
- Sentrifuge, Kubota 2010.
- Sentrifuge, Biofuge Fresco, Heraeus instruments.
- Sterilfilter, FP 30/0,2 CA-S, Schleider & Schuell, EPO sterilisert.
- Tellekammer, Burker.
- Trypsineringsflaske, Bellco.
- Vannbad, Techne TE-10A.
- Vannrenseanlegg, Aquatron A4S

2.3 DYR TIL CELLEKULTURER

Forsøkene utføres i kornceller fra rotter. Rottene som benyttes er 7 dager gamle Wistar hannrotter levert av BK Universal, Sverige. Dyrene oppbevares på dyrestallen ved Biologisk institutt. Dyrene står i ro på dyrestallen ett døgn før avlaving og preparering av cellekulturer.

2.4 PREPARERING AV KORNCCELLER FRA ROTTER

2.4.1 Cellekulturmedium med føtalt kalveserum

Tabell 2.1 Cellekulturmedium med føtalt kalveserum

Kjemikalium	Innveid mengde	Konsentrasjon
Gentamycinsulfat	50 mg	100 ug/ml
Glutamin	146 mg	2 mM
KCl	825 mg	25 mM (sluttkons.)
Varmeinaktivert føtalt kalveserum	50 ml	10 %
Basal Medium Eagle	500 ml	

Føtalt kalveserum varmeinaktiveres ved 56°C på vannbad i 30 minutter. Gentamycinsulfat, glutamin og KCl løses i ca. 30 ml medium fra en flaske sterilt Basal Medium Eagle (BME). Løsningen sterilfiltreres (0,22µm) tilbake i flasken. 50 ml sterilt varmeinaktivert føtalt kalveserum tilsettes, og innholdet blandes godt.

2.4.2 Løsninger til preparering av korncellekulturer

Tabell 2.2 Krebs-Ringerløsning (10x)

Kjemikalium	Innveid mengde	Konsentrasjon
NaCl	35,35 g	1,2 M
KCl	1,80 g	50 mM
KH ₂ PO ₄	0,83 g	10 mM
Glukose	12,85 g	0,14 M
NaHCO ₃	10,70 g	0,25 M
Fenolrødt	50 mg	0,3 mM
Destillert vann	ad 500ml	

Det lages 5 løsninger til bruk i preparering av kornceller, løsning 1-5 (tabell 2.3). Mengden av løsningene er beregnet til preparering av cellekulturer fra 40-80 rotter. Ved preparering av 10-30 rotter, halveres mengden av løsning 2, 3 og 4. Alle løsninger nylages og filtreres gjennom et 0,22 µm sterilfilter.

Tabell 2.3 Løsning 1-5

Løsning 1	-	1,50 g Bovint serum albumin (BSA) 50 ml Krebs-Ringerløsning (10x) 4,0 ml MgSO ₄ (3,82g/100ml) Fylles opp til 500 ml med destillert vann
Løsning 2	-	25 mg trypsin løses i 100 ml av løsning 1
Løsning 3	-	6,25 mg Dnase I 26,0 mg Trypsin inhibitor 0,5 ml MgSO ₄ (3,82g/100ml) Fylles opp til 50 ml med løsning 1

Løsning 4	-	16 ml løsning 3 100 ml løsning 1
Løsning 5	-	320 ul MgSO ₄ (3,82g/100ml) 320 ul CaCl ₂ (1,20g/100ml) 40 ml løsning 1

2.4.3 Utstyr til preparering av korncellekulturer

Alt utstyr som brukes til preparering av korncellekultur autoklaveres ved 120°C i 20 minutter.

Tabell 2.4 Utstyr til preparering av kornceller

saks og pinsett til disseksjon
2 pinsetter til fjerning av hjernehirner
1 skalpell
1 trypsineringsflaske
4 100 ml glassflasker med kork
1 stor glassflaske med kork
2 store petriskåler
3 50 ml plastrør
1 erlenmeyerkolbe
pasteurpipetter
sentrifuge Kubota 2010

2.4.4 Coating av skåler med poly-L-lysin

Prosedyren utføres i LAF-benk. 10 ml autoklavert MQ-vann tilsettes en flaske med 5 mg poly-L-lysin og blandes godt. Løsningen fortynnes 1:50 med autoklavert MQ-vann i en steril erlenmeyerkolbe. Av denne løsningen tilsettes 2 ml til 5,8 cm diameter (3,3 ml) skåler og 5 ml tilsettes 9,2 cm diameter (10 ml) skåler. Etter 30-60 minutters henstand suges løsningen av, og skålene tørkes over natt. Det beregnes 10 stk. 5,8 diameter skåler per 3 rottehjerner.

2.4.5 Prosedyre for preparering av kornceller

1. 7 dager gamle hannrotter avlives ved dekapitering med saks på dyrestallen. Hodene fraktes snarest til LAF-benk.
2. Lillehjernen dissekeres ut med steril saks og pinsett, og legges over i en stor petriskål med løsning 1.
3. Hjernehinne fjernes med 2 sterile irispinsetter. Hjernen overføres til ny stor petriskål inneholdende løsning 1.
4. Løsning 1 fjernes, og lillehjernen kuttes i mindre biter med en steril skalpell.
5. Bitene overføres til et 50 ml rør inneholdende 15 ml løsning 1. Løsningen sentrifugeres ved 1000 rpm i 30 sekunder.
6. Supernatanten fjernes, og pelleten resuspenderes i 10 ml løsning 2. Cellesuspensjonen overføres til en trypsineringsflaske inneholdende resten av løsning 2, og flasken settes på vannbad ved 37°C i 15 minutter. Flasken omristes forsiktig ca. hvert 3. minutt.
7. Bitene suges opp og overføres til et nytt 50 ml rør inneholdende ca. 10 ml løsning 4. Røret fylles opp med løsning 4, og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter.
8. Supernatanten fjernes, og pelleten tilsettes 3 ml av løsning 3. Pelleten løses ved å pipettere opp og ned 15-20 ganger med en steril pasteurpipette med avrundet spiss (avrundes i gassflamme). Suspensjon får stå litt i ro slik at eventuelle celleklumper synkes ned i bunnen. Den klumpefrie delen overføres til et nytt 50 ml rør inneholdende ca. 15 ml av løsning 5.
9. 2 ml av løsning 3 tilsettes de gjenværende celleklumpene, og punkt 8 gjentas med en ny pasteurpipette med smalere åpning. Dersom behov, kan trinn 8-9 gjentas 1-2 ganger.
10. Cellesuspensjonen sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.
11. Supernatanten fjernes, og pelleten resuspenderes i 10 ml cellekulturmedium med føtalt kalveserum. Blandingen overføres til en steril flaske inneholdende cellekulturmedium med føtalt kalveserum.
12. En liten prøve tas ut til celletelling i et Burcher tellekammer.

Antall ml cellesuspensjon som trengs til utplating beregnes etter følgende formel:

$$\frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{ønsket tetthet per ml}}{\text{antall celler i tellekammer} \times 10^4}$$

Det ønskes en tetthet på $1,2 \times 10^6$ celler per ml.

13. Cellesuspensjonen fortynnes med ytterligere cellekulturmedium med føtalt kalveserum for å oppnå den ønskede tettheten.
14. 3,3 ml cellesuspensjon tilsettes 5,8 cm diameter skåler, og 10 ml cellesuspensjon til 9,2 cm diameter skåler.
15. Skålene inkuberes i inkubatorskap ved 37°C og 5% CO₂.

2.4.6 Tilsetting av Cytocin β -D-Arabino-Furanoside

1 mg Ara-C (*Cytocin β -D-Arabino-Furanoside*) løses i 10 ml cellekulturmedium med føtalt kalveserum og sterilfiltreres (0,22 μ m). Løsningen tilsettes cellekulturskålene 16-18 timer etter preparering av korncellene. Det tilsettes 83 μ l til 5,8 cm diameter og 250 μ l til 9,2 cm diameter skåler slik at sluttkonsentrasjonen i skålene blir 10 μ M.

2.5 EKSPONERING AV KORNCCELLER

7 dager etter preparering eksponeres korncellene med glutamat eller dexametason, enten alene eller i kombinasjon med hemmere.

2.5.1 Locke's løsning

Til eksponering av korncellene benyttes Locke's løsning som fysiologisk eksponeringsbuffer.

Tabell 2.5 Locke's løsning uten magnesium

Reagens	Konsentrasjon	Innveid mengde
NaCl	154 mM	9,00 g
NaHCO ₃	3,6 mM	0,30 g
CaCl ₂	2,3 mM	0,34 g
Glukose	5,6 mM	1,00 g
Hepes (pH 7,4)	5,0 mM	1,19 g
KCl	1 mM	0,075 g
	5,6 mM	0,42 g
	25 mM	1,87 g
Destillert vann		ad 1000 ml

Tabell 2.6 Locke's løsning med magnesium

Reagens	Konsentrasjon	Innveid mengde
NaCl	154 mM	9,00 g
NaHCO ₃	3,6 mM	0,30 g
CaCl ₂	2,3 mM	0,34 g
Glukose	5,6 mM	1,00 g
Hepes (pH 7,4)	5,0 mM	1,19 g
MgCl ₂ x 7 H ₂ O	1,2 mM	0,24 g
KCl	1 mM	0,075 g
	5,6 mM	0,42 g
	25 mM	1,87 g
Destillert vann		ad 1000 ml

2.5.2 Serumfritt cellekulturmedium

Tabell 2.7 Serumfritt cellekulturmedium

Kjemikalium	Innveid mengde	Konsentrasjon
Gentamycinsulfat	50 mg	100 ug/ml
Glutamin	146 mg	2 mM
KCl	825 mg	25 mM
Basal Medium Eagle	500 ml	

Gentamycinsulfat, glutamin og KCl løses i ca. 30 ml medium fra en flaske sterilt Basal Medium Eagle (BME). Løsningen sterilfiltreres (0,22µm) tilbake i flasken, og innholdet blandes godt.

2.5.3 Preinkubering

Korncellene preinkuberes med Locke's løsning, med eller uten ulike hemmere, i 15 minutter før eksponering med glutamat eller dexametason.

Tabell 2.8 Hemmere som benyttes ved preinkubering/eksponering

Hemmere/reseptorblokkere	Stockløsning	Konsentrasjon i mediet
Caspase 2 inhibitor	25 mM	25 µM
Caspase 3 inhibitor	10 mM	1 µM
Caspase 8 inhibitor	20 mM	20 µM
Caspase 9 inhibitor	20 mM	20 µM
MK-801	1 mM	1 µM
RU28318	10 mM	1 µM

Beregnet mengde av hemmere tilsettes Locke's løsning. Til skåler som skal eksponeres for glutamat tilsettes hemmere Locke's løsning uten magnesium. Til skåler som skal eksponeres for dexametason eller benyttes som bufferkontroll tilsettes hemmere Locke's løsning med magnesium. Det beregnes 2 ml Locke's løsning til preinkubering for hver 5,8 cm diameter skål. Cellene vaskes 1 gang med 1 ml av samme Locke's løsning som de preinkuberes med.

Prosedyre for preinkubering:

1. Mediet på skålen suges av og cellene vaskes med 1 ml Locke's løsning.
2. 2 ml preinkuberingsløsning med eller uten hemmere tilsettes.
3. Skålene inkuberes i 15 minutter ved romtemperatur.

2.5.4 Eksponering med glutamat eller dexametason

Etter preinkubering eksponeres korncellene for glutamat eller dexametason.

Tabell 2.9 Stamløsninger til eksponering

<u>Glutamat 10 mM stockløsning</u>	
Glutamat	1,69 mg
Destillert vann	1 ml
Lagres ved -20°C	
<u>Glycin 1 mM stockløsning</u>	
Glycin	0,075 mg
Destillert vann	1 ml
Lagres ved -20°C	
<u>Dexametason 40 mM stockløsning</u>	
Dexametason	15,7 mg
96% etanol	1 ml
Lagres ved -20°C	
Dexametason 40 mM stockløsning benyttes til videre fortynning med etanol 96% til følgende stockløsninger: 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM og 20 mM dexametason.	

Tabell 2.10 Eksponeringsløsning

Bufferkontroll	Locke's løsning med magnesium
Glutamateksponering	100 µM glutamat og 10 µM glycin i Locke's løsning uten magnesium
Dexametasoneksponering	10 µM dexametason i Locke's løsning med magnesium Eller henholdsvis 0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 20 µM og 40 µM dexametason i locke's løsning med magnesium

Eventuelle hemmere tilsettes eksponeringsløsning med samme sluttkonsentrasjon som ved preinkubering (se tabell 2.7). Det beregnes 2 ml Locke's løsning til eksponering for hver 5,8 cm diameter skål. Cellene vaskes 1 gang med 1 ml av samme Locke's løsning som de eksponeres med.

Prosedyre for eksponering:

1. Preinkuberingsløsning suges av og cellene vaskes med 1 ml Locke's løsning.
2. 2 ml av eksponeringsløsning alene eller med hemmere tilsettes.

3. Skålene inkuberes i 15 minutter ved romtemperatur.
4. Eksponeringsløsningen suges av og cellene vaskes med 1 ml serumfritt cellekulturmedium.
5. 2 ml serumfritt cellekulturmedium tilsettes.
6. Skålene settes til inkubering ved 37°C og 5% CO₂ i luft i 24 timer for måling av celledød (2.6) og 30 minutter, 2 timer eller 4 timer for immunfarging (2.7).

2.6 DETEKSJON AV CELLEDØD

Tabell 2.11 Løsninger til trypanblå-farging

<u>2 % Trypanblå stockløsning:</u>	
Trypanblå	1 g
Destillert vann	50 ml
Løsningen varmes opp til kokepunktet under stadig omrøsting og settes til avkjøling ved romtemperatur. Løsningen filtreres. Oppbevares i romtemperatur.	
<u>NaCl stockløsning:</u>	
NaCl	1,8 g
Destillert vann	100 ml
Oppbevares i romtemperatur.	

Prosedyre:

1. 2 % Trypanblå stockløsning blandes med NaCl stockløsning i forholdet 1:1.
2. 250 µl av fargeløsningen tilsettes 1 ml medium i skålene.
3. Skålene inkuberes i inkubatorskap ved 37°C i 30 minutter.
4. Løsningen suges av, og cellene telles i mikroskop. Det telles både blå celler (døde celler) og celler som ikke har tatt opp fargestoff (levende celler).
5. Celledøden beregnes etter følgende formel:
$$\frac{\text{antall blå celler} \times 100 \%}{\text{antall blå celler} + \text{ufargede celler}}$$

2.7 IMMUNFARGING

Tabell 2.12 PBS (fosfatbuffret saltvann)

Kjemikalium	Konsentrasjon	Innveid mengde
NaCl	137 mM	8,0 g
Na ₂ HPO ₄	6,5 mM	1,44 g
KCl	2,7 mM	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,24 g
Destillert vann		ad 1000 ml
pH justeres til 7,4		

Tabell 2.13 Stockløsninger til immunfarging

<u>5 % Triton X-100 i PBS:</u>	
Triton X-100	0,5 g
PBS (pH 7,4)	10 ml
<u>1 % Sodium Azide-løsning:</u>	
Sodium Azide	0,1 g
PBS (pH 7,4)	10 ml

Tabell 2.14 Løsninger til immunfarging av aktivert caspase-3 og PARP

<u>Primærantistoff:</u>		
1.	"Cleaved Caspase-3 (Asp-175)" antistoff (laget i kanin)	
2.	"Cleaved PARP" antistoff (laget i kanin)	
<u>Sekundær antistoff:</u>		
Cy TM ² -konjugert mus anti-kanin IgG (laget i mus)		
<u>Pre-inkuberingsløsning med geiteseum:</u>		
Kjemikalium	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Normal geiteseum	2,0 ml	10 %
5 % Triton X-100	2,0 ml	0,5 %
PBS (pH 7,4)	16,0 ml	
Løsningen fordeles i 4 ml aliquoter. Oppbevares ved -20°C.		

Primærinkuberingsløsning med geiteseum:

Kjemikalium	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Normal geiteseum	600 ul	3 %
5 % Triton X-100 løsning	2,0 ml	0,5 %
1 % Natriumazide løsning	1,0 ml	0,05 %
PBS (pH 7,4)	16,4 ml	

Løsningen fordeles i 4 ml aliquoter. Oppbevares ved -20°C.

Primærantistoffløsning:

Primærantistoff fortynnes 1:400 med primærinkuberingsløsning med geiteseum.

Sekundærinkuberingsløsning med geiteseum:

Kjemikalium	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Normal geiteseum	600 ul	3 %
5 % Triton X-100 løsning	2,0 ml	0,5 %
PBS (pH 7,4)	17,4 ml	

Løsningen fordeles i 4 ml aliquoter. Oppbevares ved -20°C

Sekundærantistoffløsning:

Sekundærantistoffet sentrifugeres i 10 minutter ved 13000 rpm. Antistoffet fortynnes 1:100 med sekundærinkuberingsløsning med geiteseum. Løsningen sentrifugeres i 10 minutter ved 13000 rpm.

Tabell 2.15 Løsninger til immunfarging av AIF

Primærantistoff:

anti-AIF (D-20) antistoff (laget i geit)

Sekundær antistoff:

Cy^{TM3}-konjugert mus anti-geit IgG (laget i mus)

Pre-inkuberingsløsning med kanin serum:

Kjemikalium	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Normal kanin serum	2,0 ml	10 %
5 % Triton X-100	2,0 ml	0,5 %
PBS (pH 7,4)	16,0 ml	

Løsningen fordeles i 4 ml aliquoter. Oppbevares ved -20°C.

Primærinkuberingsløsning med kaninserum:

Kjemikalium	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Normal kaninserum	600 ul	3 %
5 % Triton X-100 løsning	2,0 ml	0,5 %
1 % Natriumazide løsning	1,0 ml	0,05 %
PBS (pH 7,4)	16,4 ml	

Løsningen fordeles i 4 ml aliquoter. Oppbevares ved -20°C.

Primærantistoffløsning:

Primærantistoff fortynnes 1:400 med primærinkuberingsløsning med kaninserum.

Sekundærinkuberingsløsning med kaninserum:

Kjemikalium	Mengde	Sluttkonsentrasjon
Normal kaninserum	600 ul	3 %
5 % Triton X-100 løsning	2,0 ml	0,5 %
PBS (pH 7,4)	17,4 ml	

Løsningen fordeles i 4 ml aliquoter. Oppbevares ved -20°C

Sekundærantistoffløsning:

Sekundærantistoffet sentrifugeres i 10 minutter ved 13000 rpm. Antistoffet fortynnes 1:400 med sekundærinkuberingsløsning med kaninserum. Løsningen sentrifugeres i 10 minutter ved 13000 rpm.

Prosedyre for immunfarging:

1. Mediet på skålen pipetteres av og cellene vaskes 2 ganger med PBS.
2. Cellene fikseres med 2 ml 4 % PFA løsning i 4 minutter ved romtemperatur.
3. Cellene vaskes 2 ganger med PBS.
4. 2 ml PBS tilsettes skålene. Skålene kan oppbevares i kjøleskap ved 4°C.
5. PBS pipetteres av skålene.
6. Skålene tørkes i et par minutter ved romtemperatur.
7. PAP-penn benyttes til å tegne sirkler (1 cm i diameter) på skålene. Det lages en ring per antistoff.
8. Ca. 30 µl preinkuberingsløsning tilsettes sirklene.
9. Cellene inkuberes i 1 time ved romtemperatur.
10. Cellene vaskes 2 ganger med PBS.

11. Skålene tørkes i et par minutter.
12. Ca. 30 μ l primærantistoff-løsning med primær antistoff tilsettes per sirkel.
13. Cellene inkuberes over natt ved romtemperatur i et fuktekammer.
14. Neste dag: Cellene vaskes 3 ganger med PBS.
15. Skålen tørkes i et par minutter.
16. Ca. 30 μ l sekundærantistoff-løsning med sekundær antistoff tilsettes sirkelene.
17. Cellene inkuberes i 1 time ved romtemperatur på et mørkt sted.
18. Cellene vaskes 2 ganger med PBS, hver gang i 5 minutter.
19. 2 ml PBS tilsettes skålene.
20. Cellene studeres i mikroskop (Nikon Eclipse TE 300 DV Flourescensmikroskop), og det tas digitale bilder med kamera (fra RT Diagnostic Instruments). Representative bilder hentes opp i Photoshop 6.0 og presenteres.

2.8 STATISTIKK

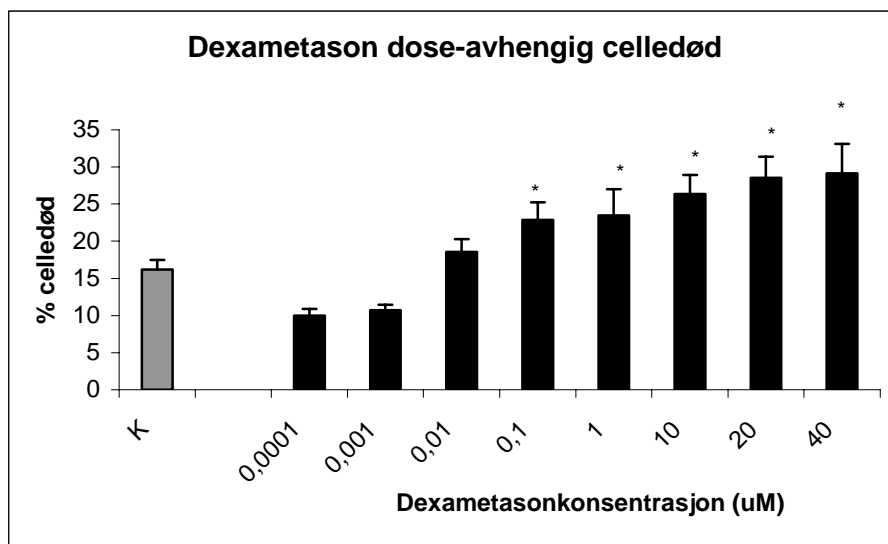
Resultatene ble analysert ved hjelp av statistikkprogrammet Sigma Stat versjon 3.0 fra SPSS Inc., Chicago, USA. Det ble valgt One Way Analysis of Variance (one way anova) som testmetode, etterfulgt av Dunnett's post hoc test dersom data passerte normalitetskravene. For data som ikke passerte normalitetskravene, ble det valgt One Way Analysis on Ranks, etterfulgt av Dunnett's post hoc test.

3 RESULTATER

3.1 MEKANSIMER VED DEXAMETASONINDUSERT CELLEDØD I KORNCCELLER

3.1.1 Dexametasonindusert celledød i korncellekulturer

Det ble utført forsøk for å undersøke celledøden i nærvær av dexametason i korncellene. 15 minutters eksponering med ulike dexametasonkonsentrasjoner viste en dose-avhengig celledød. Dexametasoneksponeringen gav en signifikant økning av celledøden sammenliknet med bufferkontrollen ved 0,1 μM dexametason og høyere (se figur 3.1, tabell 3.1).



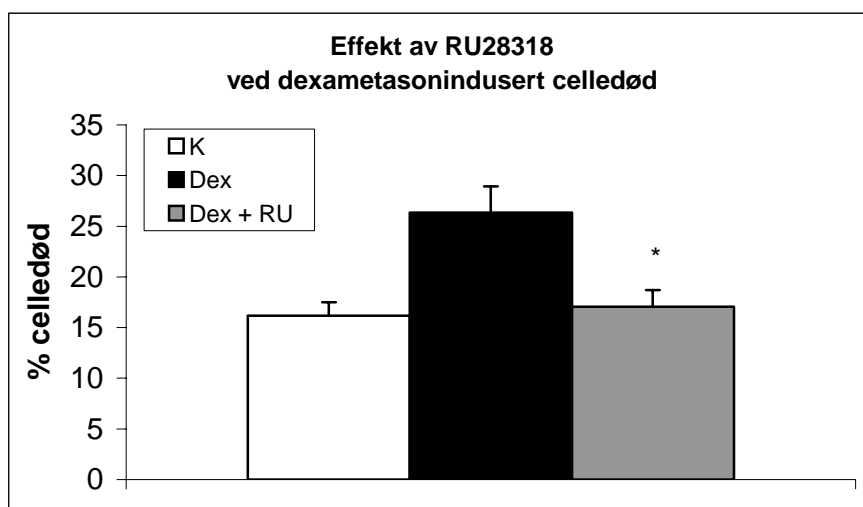
Figur 3.1 Dexametason dose-avhengig celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød \pm SEM målt ved trypanblåfarge etter 24 timer (* signifikant i forhold til K). K=bufferkontroll. N=6-10 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.1 Dexametasonindusert celledød. Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.1.

Behandling	% gj.snitt celledød ± SEM	N = ant. uavhengige celleforsøk
K	16,2 ± 1,3	9
Dex-konsentrasjon (µM):		
0,0001	10,0 ± 0,9	6
0,001	10,7 ± 1,8	6
0,01	18,6 ± 1,7	8
0,1	22,8 ± 2,4	8
1	23,5 ± 3,6	6
10	26,4 ± 2,6	10
20	28,5 ± 2,9	6
40	29,2 ± 4,0	6

3.1.2 Effekt av RU28318 på dexametasonindusert celledød

For å undersøke om dexametason toksisiteten i korncellene var reseptormediert, ble det benyttet en mineralokortikoid-reseptorantagonist, RU28318 (Kim 1998). 15 minutters preinkubering med RU28318 etterfulgt av 15 minutters dexametasoneksponering med RU28318 gav en signifikant reduksjon (91 %) av celledøden sammenlignet med dexametasonindusert celledød uten nærvær av RU28318 (se figur 3.2, tabell 3.2). Det ble benyttet 10 μ M dexametason i forsøkene. RU28318 er tidligere vist å ikke påvirke kontroll døden (Khuong, 2003).



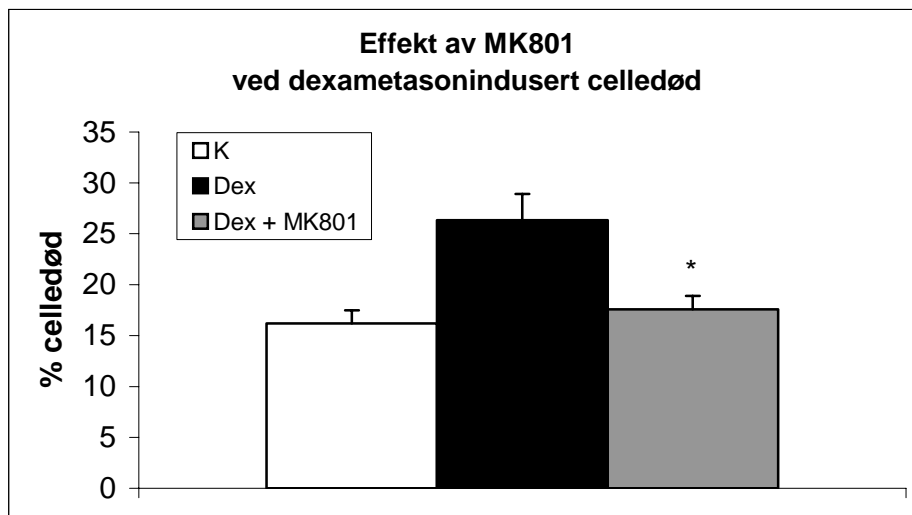
Figur 3.2 Effekt av RU28318 på dexametasonindusert celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød \pm SEM målt ved trypanblåfarge etter 24 timer (* signifikant i forhold til Dex). K=bufferkontroll, Dex=dexametason, RU=RU28318. N=9-10 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.2 Dexametasonindusert celledød ved tilstedeværelse av RU28318. Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.2.

	K	Dex	Dex + RU
% gjennomsnittlig celledød \pm SEM	16,2 \pm 1,3	26,4 \pm 2,6	17,1 \pm 1,7
antall forsøk (N)	9	10	10

3.1.3 Effekt av MK801 på dexametasonindusert celledød

Siden dexametason er vist å forlenge Ca^{2+} -innfluksen via NMDA-reseptoren (Takahashi *et al.*, 2002), var det ønskelig å undersøke dexametsontoksisiteten i nærvær av en NMDA-reseptorblokker. MK801 er en mye brukt NMDA-reseptorblokker (Loscher and Honack, 1992). 15 minutters preinkubering med MK801 etterfulgt av 15 minutters dexametasoneksponering med MK801 viste en signifikant reduksjon (86 %) av celledøden sammenlignet med dexametasonindusert celledød uten nærvær av reseptorblokkeren (se figur 3.3, tabell 3.3). Det ble benyttet 10 μM dexametason i forsøkene. MK801 er tidligere vist å ikke påvirke kontroll døden (Khuong, 2003).



Figur 3.3 Effekt av MK801 på dexametasonindusert celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød \pm SEM målt ved trypanblåfarge etter 24 timer (* signifikant i forhold til Dex).

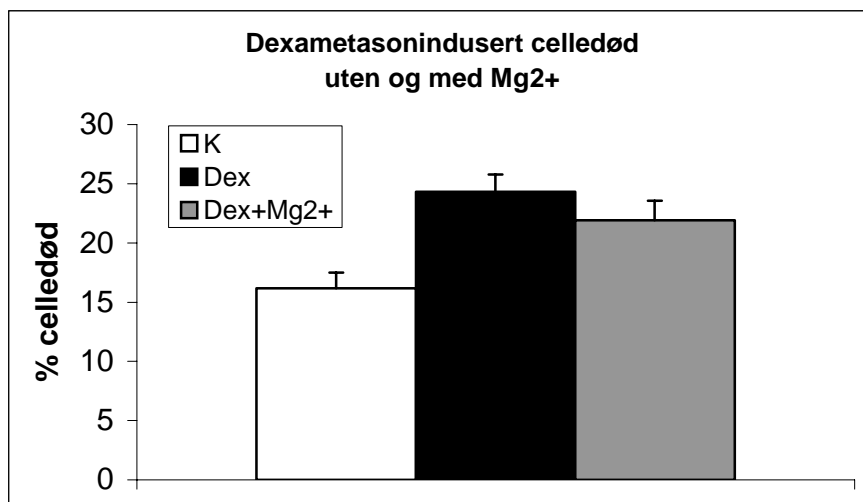
K=bufferkontroll, Dex=dexametason. N=9-10 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.3 Dexametasonindusert celledød ved tilstedeværelse av MK801. Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.3.

	K	Dex	Dex + MK801
% gjennomsnittlig celledød \pm SEM	16,2 \pm 1,3	26,4 \pm 2,6	17,6 \pm 1,3
antall forsøk (N)	9	10	9

3.1.4 Effekt av Mg^{2+} på dexametasonindusert celledød

For å studere om dexametasonindusert celledød var påvirket av tilstedeværelse av Mg^{2+} , ble korncellene eksponert med dexametason i Locke's løsning med magnesium eller Locke's løsning uten magnesium. Mg^{2+} ga ingen signifikant forskjell i dexametasonindusert celledød sammenlignet med indusert celledød uten nærvær av Mg^{2+} (se figur 3.4, tabell 3.4). Det ble benyttet 10 μ M dexametason i forsøkene.



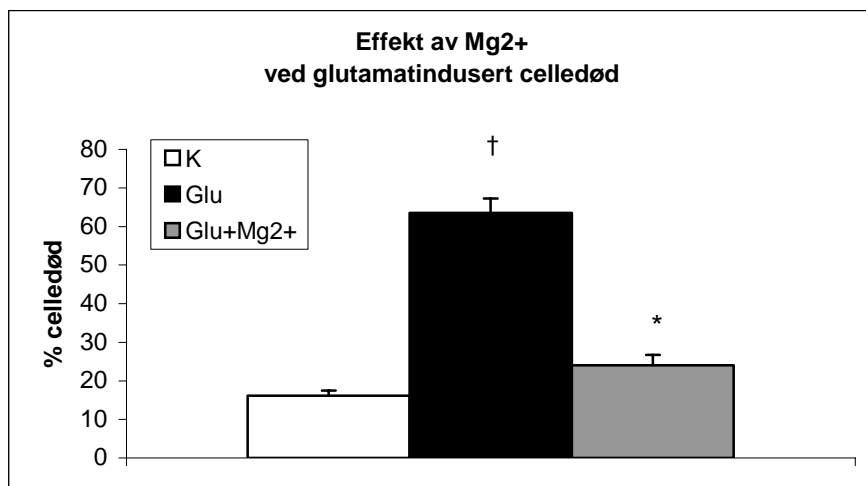
Figur 3.4 Effekt av Mg^{2+} ved dexametasonindusert celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød \pm SEM målt ved trypanblåfarge etter 24 timer. K=bufferkontroll, Dex=dexametason. N=9-11 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.4 Dexametasonindusert celledød med og uten Mg^{2+} . Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.4.

	K	Dex	Dex + Mg^{2+}
% gjennomsnittlig celledød \pm SEM	16,2 \pm 1,3	26,4 \pm 2,6	21,9 \pm 1,6
antall forsøk (N)	9	10	11

3.1.5 Effekt av Mg²⁺ på glutamatindusert celledød

Det var ønskelig å sammenligne Mg²⁺-effekten ved dexametasonindusert celledød med Mg²⁺-effekten på glutamatindusert celledød. 15 minutters eksponering med glutamat i Locke's løsning uten magnesium eller Locke's løsning med magnesium viste at nærvær av Mg²⁺ gav en signifikant reduksjon (86 %) i glutamatindusert celledød sammenlignet med indusert celledød uten nærvær av Mg²⁺ (se figur 3.5, tabell 3.5).



Figur 3.5 Effekt av Mg²⁺ ved glutamatindusert celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød ± SEM målt ved trypanblåfarge etter 24 timer († signifikant iforhold til K, * signifikant i forhold til Glu). K=bufferkontroll, Glu=glutamat. N=5-9 uavhengige celleforsøk.

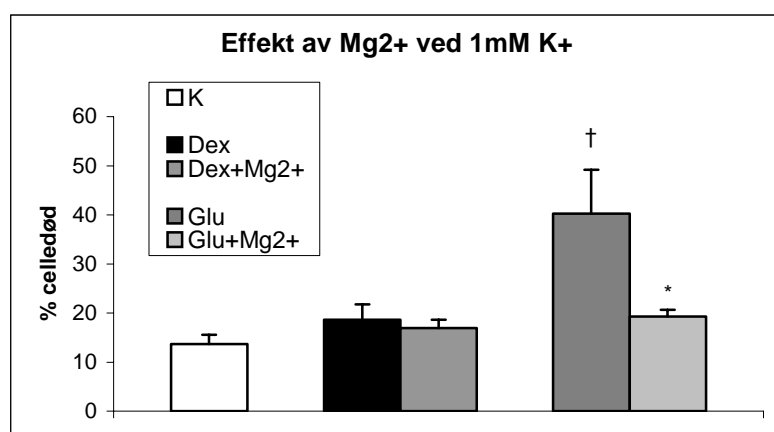
Tabell 3.5 Glutamatindusert celledød med og uten Mg²⁺ tilstede. Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.5.

	K	Glu	Glu + Mg ²⁺
% gjennomsnittlig celledød ± SEM	16,2 ± 1,3	63,5 ± 3,8	24,0 ± 2,7
antall forsøk (N)	9	9	5

3.1.6 Effekt av Mg^{2+} på dexametason- og glutamat induisert celledød i hyperpolariserende medium

For å studere dexametasonindusert celledød med og uten Mg^{2+} i hyperpolariserende medium, ble korncellene eksponert med dexametason eller glutamat i Locke's løsning med 1 mM K^+ med eller uten magnesium. Det ble benyttet 10 μ M dexametason og 100 μ M glutamat. Etter 15 minutters dexametasoneksponering gav Mg^{2+} ingen signifikant reduksjon i dexametasonindusert celledød etter 24 timer (se figur 3.6, tabell 3,6). Dexametasonindusert celledød var ikke signifikant høyere enn bufferkontrollen. Celledøden var ikke-signifikant lavere enn dexametasonindusert celledød ved 5,6 mM K^+ .

Til sammenligning gav Mg^{2+} en signifikant reduksjon (79 %) i glutamatindusert celledød i depolariserende medium (se figur 3.6, tabell 3.6). Glutamatdøden var ikke-signifikant lavere enn celledøden ved 5,6 mM K^+ .



Figur 3.6 Effekt av Mg^{2+} ved dexametason- og glutamatindusert celledød ved 1 mM K^+ .

Figuren viser gjennomsnittlig celledød \pm SEM målt ved trypanblåfarge etter 24 timer († signifikant i forhold til K, * signifikant i forhold til Glu). K=bufferkontroll, Dex=dexametason, Glu=glutamat. N=6 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.6 Dexametason- og glutamatindusert celledød med og uten Mg^{2+} ved 1 mM K^+ .

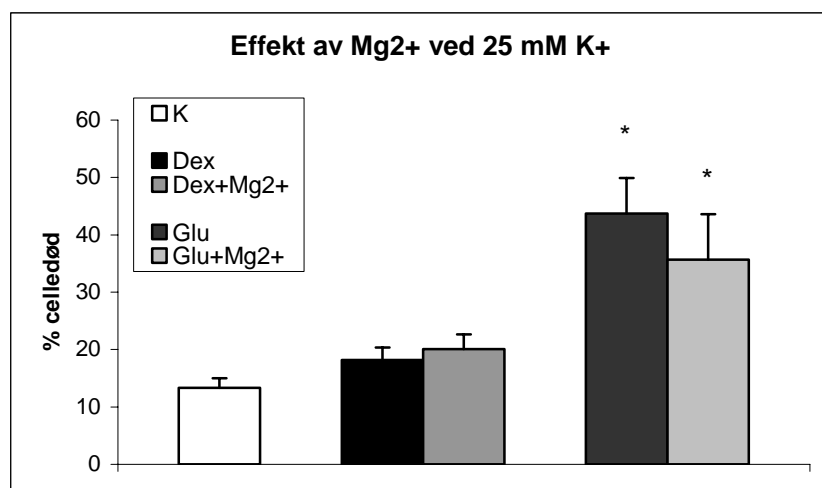
Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.6.

	K	Dex	Dex + Mg^{2+}	Glu	Glu + Mg^{2+}
% gjennomsnittlig celledød \pm SEM	13,7 \pm 1,9	18,6 \pm 3,1	17,0 \pm 1,7	40,3 \pm 8,9	19,3 \pm 1,4
antall forsøk (N)	6	6	6	6	6

3.1.7 Effekt av Mg^{2+} på dexametason- og glutamat induisert celledød i depolariserende medium

For å studere dexametasonindusert celledød med og uten Mg^{2+} i depolariserende medium, ble korncellene eksponert med dexametason (10 μM) i Locke's løsning med 25 mM K^+ med eller uten magnesium. Etter 15 minutters dexametasoneksponering gav Mg^{2+} ingen signifikant endring i dexametasonindusert celledød etter 24 timer (se figur 3.7, tabell 3.7). Dexametason døden var ikke signifikant høyere enn bufferkontrollen. Celledøden var ikke-signifikant lavere enn dexametasonindusert celledød ved 5,6 mM K^+ .

Tilsvarende ble korncellene eksponert med glutamat (100 μM) i Locke's løsning med 25 mM K^+ med eller uten magnesium. Etter 15 minutters glutamateksponering gav Mg^{2+} ingen signifikant endring i glutamatindusert celledød sammenlignet med glutamatindusert celledød uten nærvær av Mg^{2+} (se figur 3.7, tabell 3.7). Glutamat døden var ikke signifikant lavere enn celledøden ved 5,6 mM K^+ .



Figur 3.7 Effekt av Mg^{2+} ved dexametason- og glutamat induisert celledød ved 25 mM K^+ .

Figuren viser gjennomsnittlig celledød \pm SEM målt ved trypanblåfarge etter 24 timer (* signifikant i forhold til K). K=kontroll, Dex=dexametason, Glu=glutamat. N=6 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.7 Dexametason- og glutamatindusert celledød med og uten Mg^{2+} ved 25 mM K^+ .

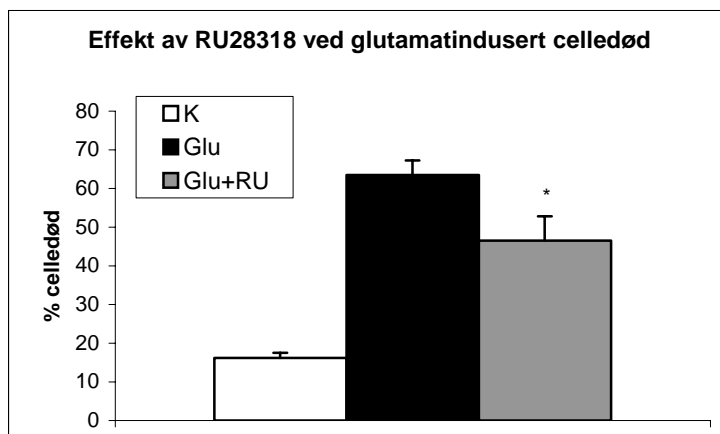
Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.7.

	K	Dex	Dex + Mg^{2+}	Glu	Glu + Mg^{2+}
% gjennomsnittlig celledød \pm SEM	13,4 \pm 1,7	18,2 \pm 2,2	20,1 \pm 2,6	43,7 \pm 6,2	35,7 \pm 8,0
antall forsøk (N)	6	6	6	6	6

3.1.8 Effekt av RU28318 på glutamatindusert celledød

Siden NMDA-reseptorblokkeren MK801 reduserer dexametasonindusert celledød, var det også ønskelig å se om MR-antagonisten RU28318 hadde noen innvirkning på glutamatindusert celledød. 15 minutters preinkubering med RU28318 etterfulgt av 15 minutters glutamateksponering med RU28318 gav en signifikant reduksjon (36 %) i celledød sammenlignet med glutamatindusert celledød uten nærvær av RU28318 (se figur 3.8, tabell 3.8).

I et pilotforsøk viste RU28318 en additiv beskyttelse med Mg^{2+} (totalt 94%) mot celledød ved glutamateksponering (N=1, resultatet ikke vist).



Figur 3.8 Effekt av RU28318 på glutamatindusert celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød ± SEM målt ved trypanblåfarge etter 24 timer (* signifikant i forhold til Glu).

K=bufferkontroll, Glu=glutamat, RU=RU28318. N=8-9 uavhengige celleforsøk.

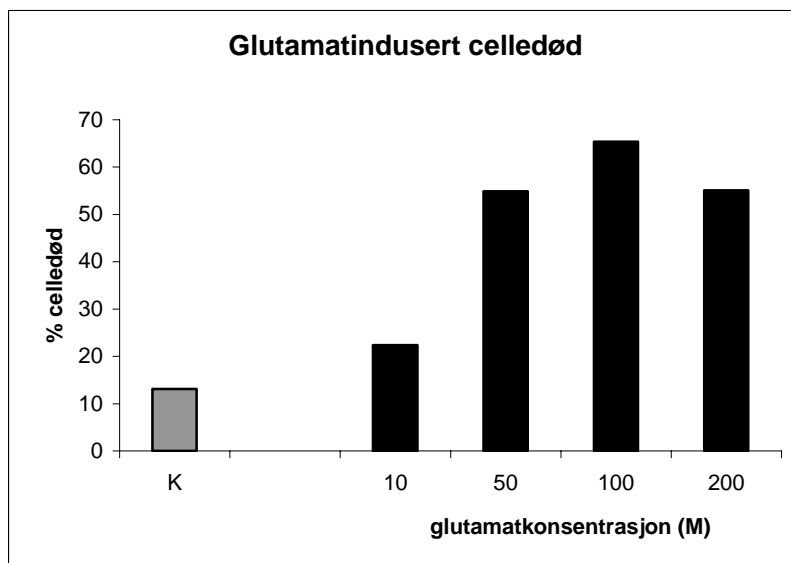
Tabell 3.8 Glutamatindusert celledød i nærvær av RU28318. Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.8.

	K	Glu	Glu + RU
% gjennomsnittlig celledød ± SEM (N)	16,2 ± 1,3	63,5 ± 3,8	46,5 ± 6,3
antall forsøk (N)	9	9	8

3.2 CELLULÆRE MEKANISMER VED GLUTAMATINDUSERT CELLEDØD

3.2.1 Glutamatindusert celledød

15 minutters eksponering av korncellene med ulike konsentrasjoner av glutamat gav en celledød som toppet seg ved 100 μM (se figur 3.9, tabell 3.9). Det ble valgt å gjøre dette forsøket kun en gang, da dette allerede er vist tidligere (Wood and Bristow, 1998).



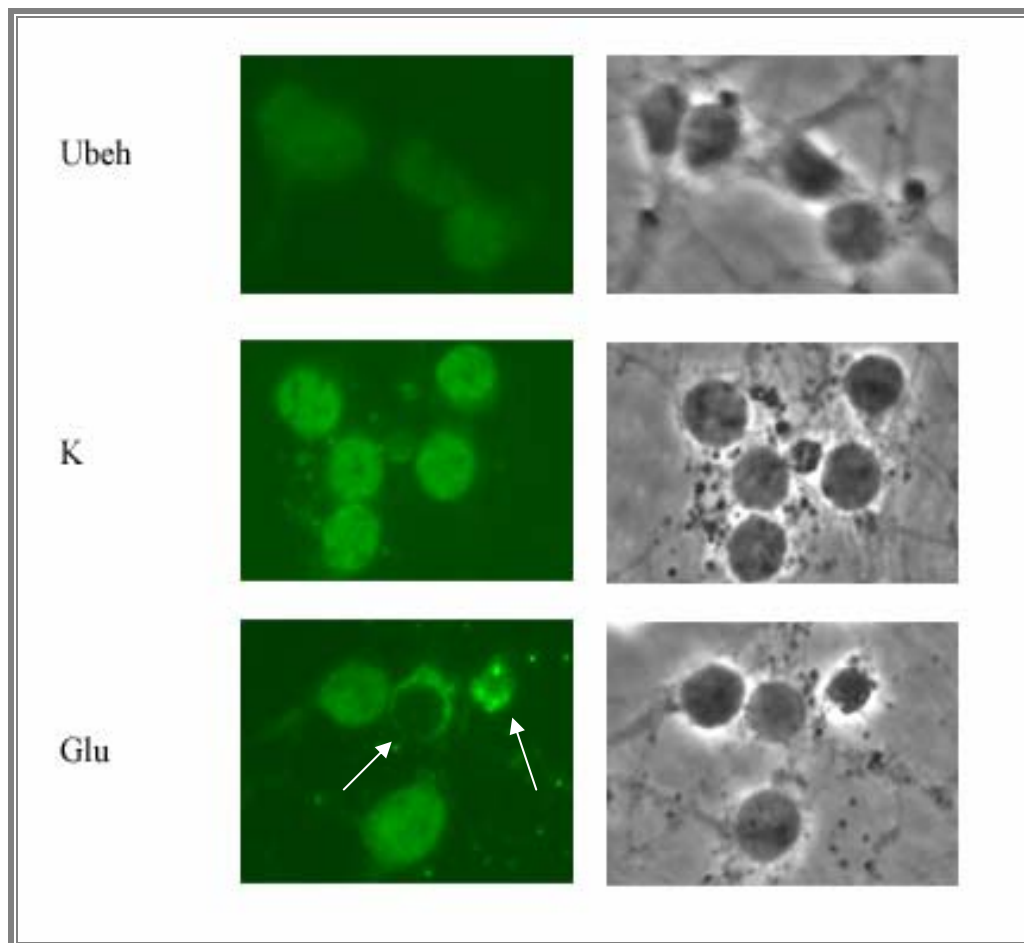
Figur 3.9 Glutamatindusert celledød. Figuren viser celledød målt ved trypanblåfarge etter 24 timer. K=bufferkontroll. N=1 celleforsøk.

Tabell 3.9 Glutamatindusert celledød. Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.9. N=1 celleforsøk.

Behandling	% celledød
K	13,1
Glutamatkonsentrasjon (μM):	
10	22,4
50	54,9
100	65,4
200	55,1

3.2.2 Deteksjon av apoptosemarkøren caspase-3 i bufferbehandlede versus glutamatbehandlede celler.

Det var ønskelig å undersøke aktivering av caspase-3 ved glutamat- og bufferbehandling. Korncellene ble glutamat- eller bufferekspontert i 15 minutter og satt til inkubering i 2 timer før de ble fiksert og immunfarget for aktivert caspase-3. Flourescensbilder viste aktivering av caspase-3 i både bufferkontrollen og glutamatbehandlede celler sammenlignet med ubehandlede celler, men distribusjonen mellom disse behandlingene var forskjellige. Celler som var bufferbehandlet viste en aktiv caspase-3 farging over hele cellen, mens glutamatbehandlede celler i tillegg viste en perifer farge av aktiv caspase-3 rundt cellen eller en kondensert farge av caspasen i midten (se figur 3.10).



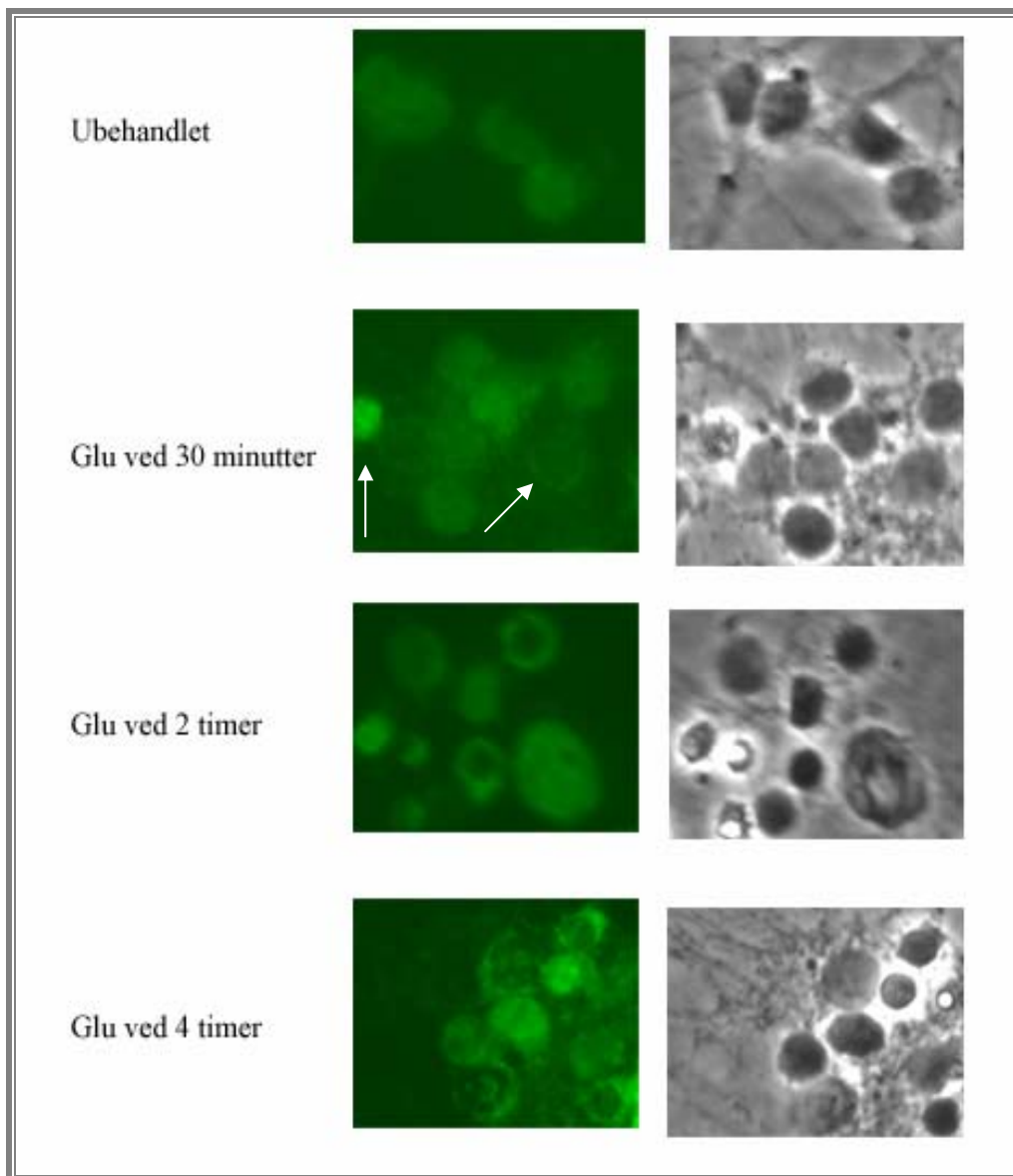
Figur 3.10 Aktivering av caspase-3 i bufferbehandlede versus glutamatbehandlede celler.

Pilene viser celler med perifer eller kondensert farge av aktiv caspase-3. Cellene ble immunfarget med "cleaved caspase-3" antistoff og Cy^{TM2} flourescerende antistoff. Bildene er tatt med Nikon Eclipse TE 300 DV Flourescensmikroskop og kamera fra RT Diagnostic Instruments.

Ubeh=ubehandlet, K=bufferkontroll, Glu=glutamat. N=7 uavhengige celleforsøk.

3.2.3 Deteksjon av apoptosemarkøren caspase-3

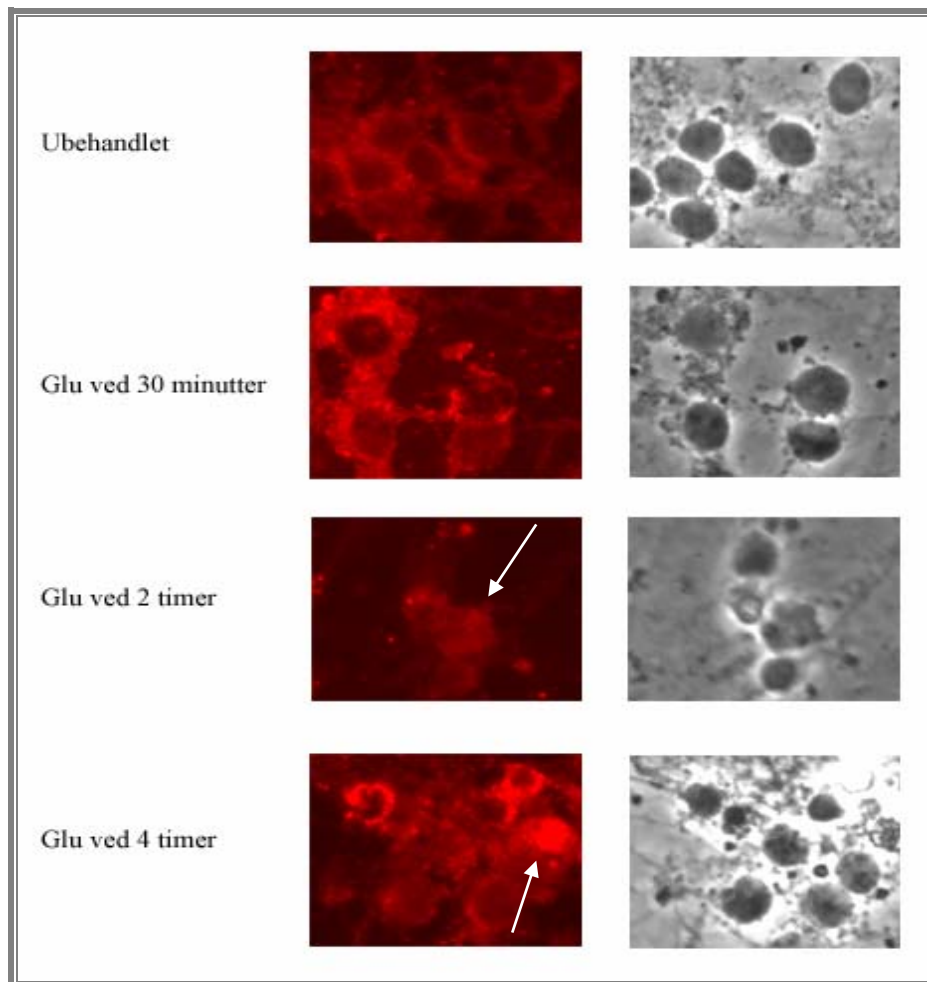
For å studere tidsforløpet ved aktivering av caspase-3 ved glutamatindusert celledød, ble korncellene glutamateksponert i 15 minutter og satt til inkubering i 30 minutter, 2 timer og 4 timer før de ble fiksert og immunfarget for aktivert caspase-3. Flourescensbilder viste aktivering av caspase-3 allerede ved 30 minutter i glutamatinduserte celler (se figur 3.11).



Figur 3.11 Aktivering av caspase-3. Pilene viser eksempler på celler med innhold av aktivert caspase-3. Cellene ble immunfarget med "cleaved caspase-3" antistoff og CyTM2 flourescerende antistoff. Bildene er tatt med Nikon Eclipse TE 300 DV Flourescensmikroskop og kamera fra RT Diagnostic Instruments. Glu=glutamat. N=3 uavhengige celleforsøk.

3.2.4 Deteksjon av apoptosemarkøren AIF

For å studere lokalisering av AIF ved glutamatindusert celledød, ble korncellene glutamat- eller buffereksonert i 15 minutter og satt til inkubering i 30 minutter, 2 timer og 4 timer før de ble fiksert og immunfarget for AIF. Flouescensbilder indikerte en relokalisering av AIF til kjernen i glutamatinduserte celler etter 2 timer (se figur 3.12). Siden flouescensbildene viste at AIF translokeres fra perifere områder til cellekroppen senere enn caspase-3, var det ønskelig å undersøke om sekundærantistoffet Cy^{TM3} (rødt flouescenslys) var vanskeligere å observere enn Cy^{TM2} (grønt flouescenslys), og om dette kunne være årsaken til ingen observasjon av AIF i cellekroppen ved 30 minutter. Det ble utført forsøk der fargen på AIF og caspase-3 ble byttet om. Resultatet fra denne fargebytingen viste samme resultater (resultatene ikke vist).

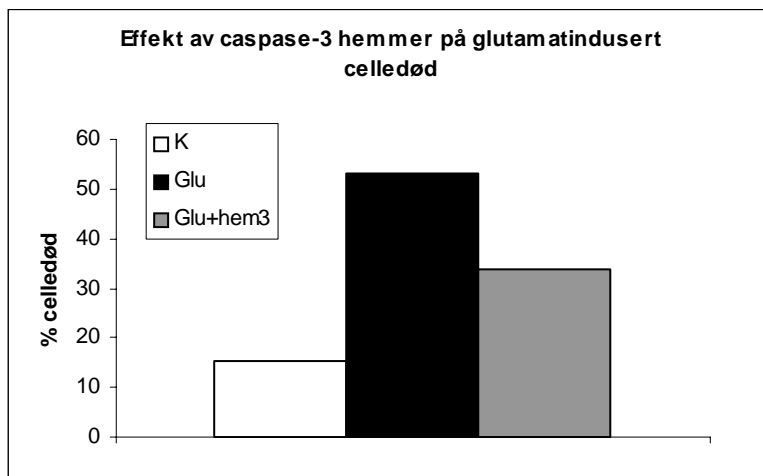


Figur 3.12 Lokalisering av AIF. Pilene viser celler med innhold av AIF i kjernen. Cellene ble immunfarget med AIF (D20) antistoff og Cy^{TM3} flouescerende antistoff. Bildene er tatt med Nikon Eclipse TE 300 DV Flouescensmikroskop og kamera fra RT Diagnostic Instruments. Glu=glutamat. N=3 uavhengige celleforsøk.

3.2.5 Effekt av caspase-3 hemmer på glutamat- og bufferindusert aktivering av caspase-3

Det var ønskelig å se hvorvidt celledøden og aktiveringen av caspase-3 var påvirket av caspase-3 hemmer. Korncellene ble preinkubert med caspase-3 hemmer i 15 minutter etterfulgt av glutamat- eller buffereksposering i 15 minutter. Cellene ble deretter satt til inkubering i 24 timer før celledødsmåling eller i 2 timer før de ble fiksert og immunfarget for aktivert caspase-3.

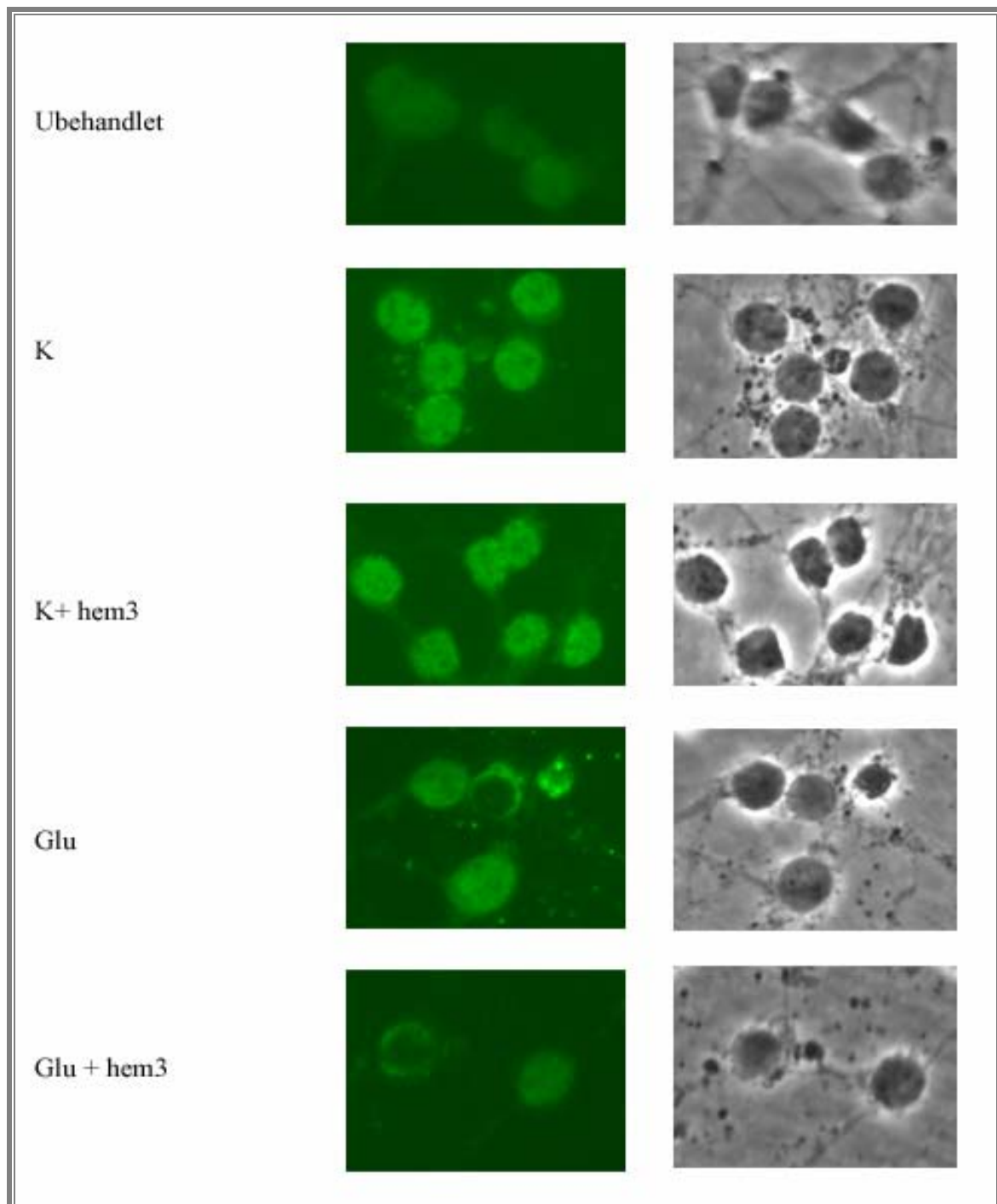
Måling av celledøden etter 24 timer viste en reduksjon (51 %) i glutamatindusert celledød i nærvær av caspase-3 hemmeren (se figur 3.13a og tabell 3.10). Måling av celledøden ble gjort kun 1 gang da det er blitt vist tidligere at caspase-3 hemmer reduserer celledøden i glutamatbehandlede celler (Slagsvold *et al.*, 2003). Flourescensbilder viste ingen reduksjon av aktivert caspase-3 farging med caspase-3 hemmer sammenlignet med glutamat- og buffereksposerte celler uten nærvær av hemmeren (se figur 3.13b).



Figur 3.13a Effekt av caspase-3 på glutamatindusert celledød. Figuren viser celledød målt ved trypanblåfarging etter 24 timer. K=bufferkontroll, Glu=glutamat, hem3=caspase-3 hemmer. N=1 celleforsøk.

Tabell 3.10 Glutamatindusert celledød i nærvær av caspase-3 hemmer. Tabellen viser resultater som ligger til grunn for figur 3.13a. N=1 celleforsøk.

	K	Glu	Glu+hem3
% celledød	15,3	53	33,9

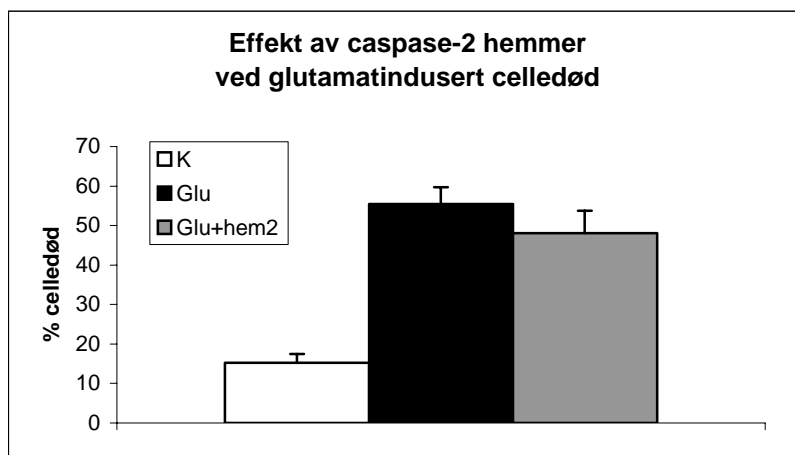


Figur 3.13b Effekt av caspase-3 hemmer på buffer- og glutamatindusert aktivering av caspase-3. Cellene ble immunfarget med "cleaved caspase-3" antistoff og Cy^{TM2} fluorescerende antistoff. Bildene er tatt med Nikon Eclipse TE 300 DV Flourescensmikroskop og kamera fra RT Diagnostic Instruments. K=bufferkontroll, Glu=glutamat, hem3=caspase-3 hemmer. N=1 celleforsøk.

3.2.6 Effekt av caspase-2 hemmer på celledød og immunfarging av aktivert caspase-3

Siden det ble observert caspase-3 aktivering i både buffer- og glutamatbehandlede celler, var det ønskelig å teste om caspase-2 kunne være toksisk for korncellene siden den har lignende substratspesifisitet som caspase-3 (Bilsland and Harper, 2002). Videre var det interessant å finne ut hvorvidt caspase-2 hemmeren ville påvirke den detekterte aktiveringen av caspase-3. Korncellene ble preinkubert med caspase-2 hemmer i 15 minutter etterfulgt av glutamat- eller buffereksposering i 15 minutter, og satt til inkubering i 24 timer før celledødsmåling eller i 2 timer før de ble fiksert og immunfarget for aktivert caspase-3.

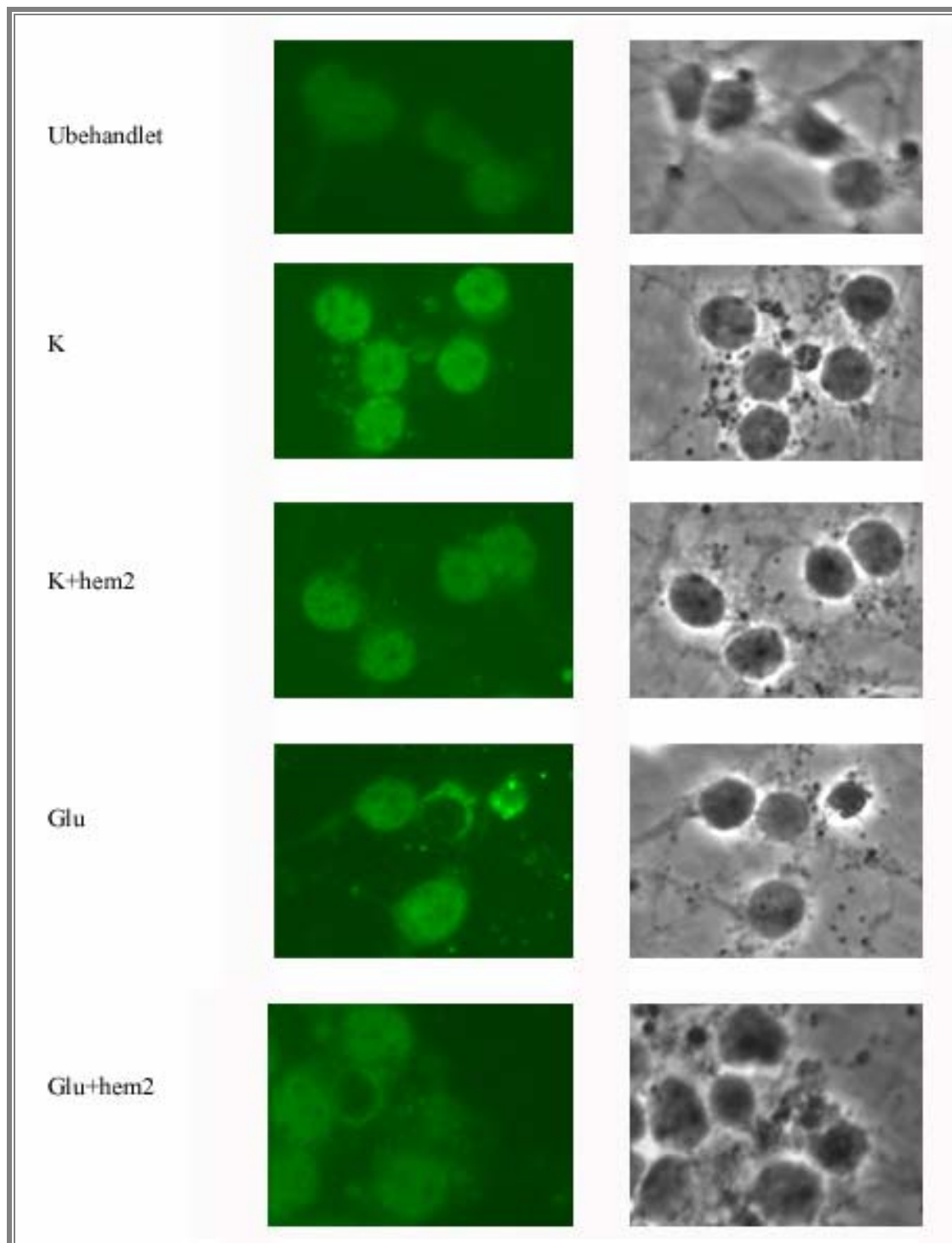
Måling av celledøden etter 24 timer viste ingen signifikant reduksjon av glutamatindusert celledød i nærvær av caspase-2 hemmeren (se figur 3.14a og tabell 3.11). Flourescensbilder viste ingen endring i aktivert caspase-3 farging med caspase-2 hemmer sammenlignet med glutamat- og bufferbehandlede celler uten nærvær av hemmeren (figur 3.14b).



Figur 3.14a Effekt av caspase-2 hemmer ved glutamatindusert celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød ± SEM målt ved trypanblåfarging etter 24 timer K=bufferkontroll, Glu=glutamat, hem2=caspase-2 hemmer. N=3 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.11 Glutamatindusert celledød i nærvær av caspase-2 hemmer. Tabellen viser resultater som ligger til grunn for figur 3.14a.

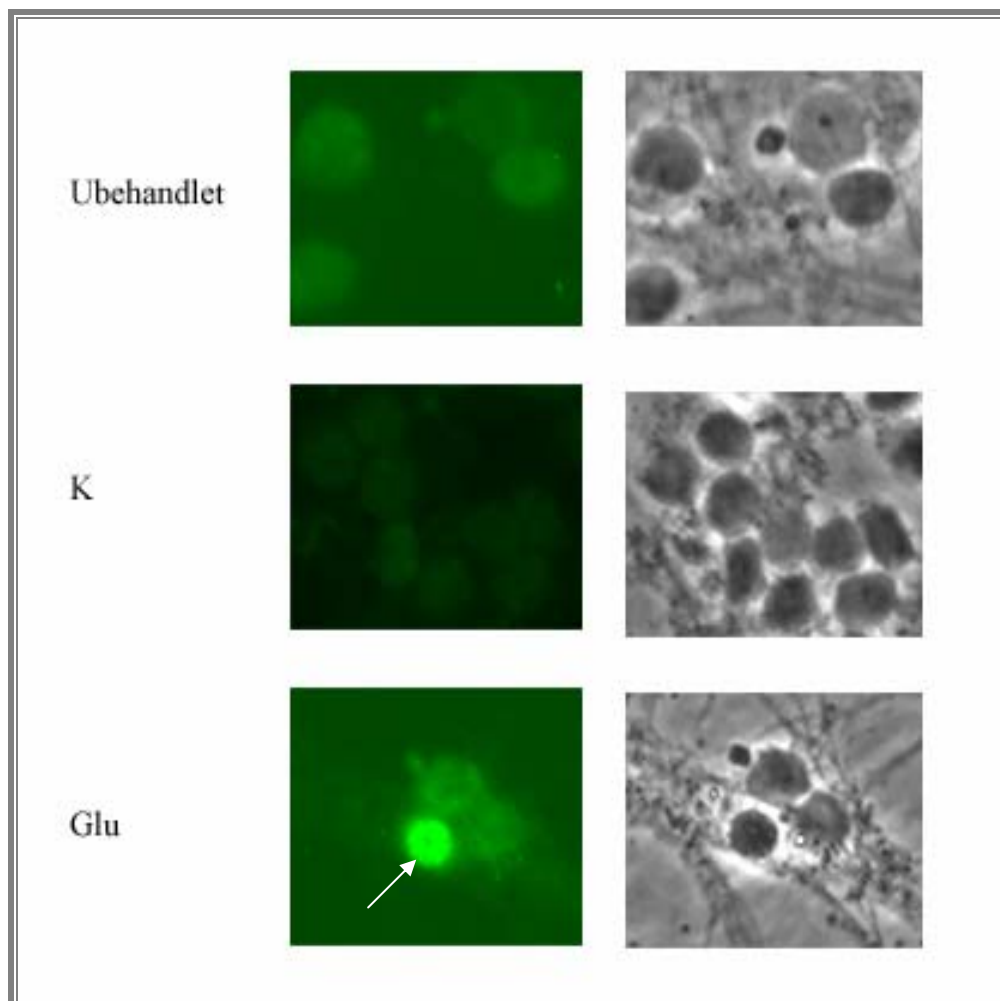
	K	Glu	Glu + hem2
% gjennomsnittlig celledød ± SEM	15,3 ± 2,2	55,4 ± 4,3	48,0 ± 5,7
antall forsøk (N)	3	3	3



Figur 3.14b Effekt av caspase-2 hemmer på immunfarging av aktivert caspase-3. Cellene ble immunfarget med "cleaved caspase-3" antistoff og Cy^{TM2} fluorescerende antistoff. Bildene er tatt med Nikon Eclipse TE 300 DV Flourescensmikroskop og kamera fra RT Diagnostic Instruments. K=bufferkontroll, Glu=glutamat, hem2=caspase-2 hemmer. N=3 uavhengige forsøk.

3.2.7 Deteksjon av PARP

Siden det er observert caspase-3 aktivering i både buffer- og glutamatbehandlede celler, var det interessant å undersøke om caspase-3 var i stand til å kløyve PARP. Korncellene ble glutamat- eller buffereksponeert i 15 minutter, og satt til inkubering i 2 timer før de ble fiksert og immunfarget for kløvet PARP. Flourescensbilder av ubehandlede celler og bufferkontrollen viste en svak farge av kløvet PARP, mens enkelte glutamatbehandlede celler viste en sterkere farge av kløvet PARP (se figur 3.15).

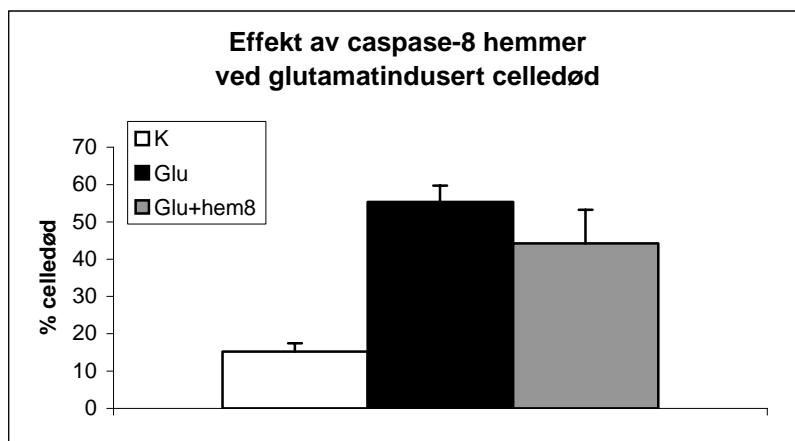


Figur 3.15 Immunfarging av kløvet PARP i buffer- og glutamatinduserte celler. Pilen viser celle med økt mengde kløvet PARP. Cellene ble immunfarget med "cleaved PARP" antistoff og Cy^{TM2} flourescerende antistoff. Bildene er tatt med Nikon Eclipse TE 300 DV Flourescensmikroskop og kamera fra RT Diagnostic Instruments. K=bufferkontroll, Glu=glutamat. N=5 uavhengige celleforsøk.

3.2.8 Effekt av caspase-8 hemmer på glutamat- og bufferindusert aktivering av caspase-3

Det var ønskelig å finne ut hvorvidt aktivert caspase-3 i glutamat- og bufferbehandlede celler var aktivert via caspase-8. Korncellene ble preinkubert med caspase-8 hemmer i 15 minutter etterfulgt av glutamat- eller buffereksposering i 15 minutter, og satt til inkubering i 24 timer før celledødsmåling eller i 2 timer før de ble fiksert og immunfarget for aktivert caspase-3.

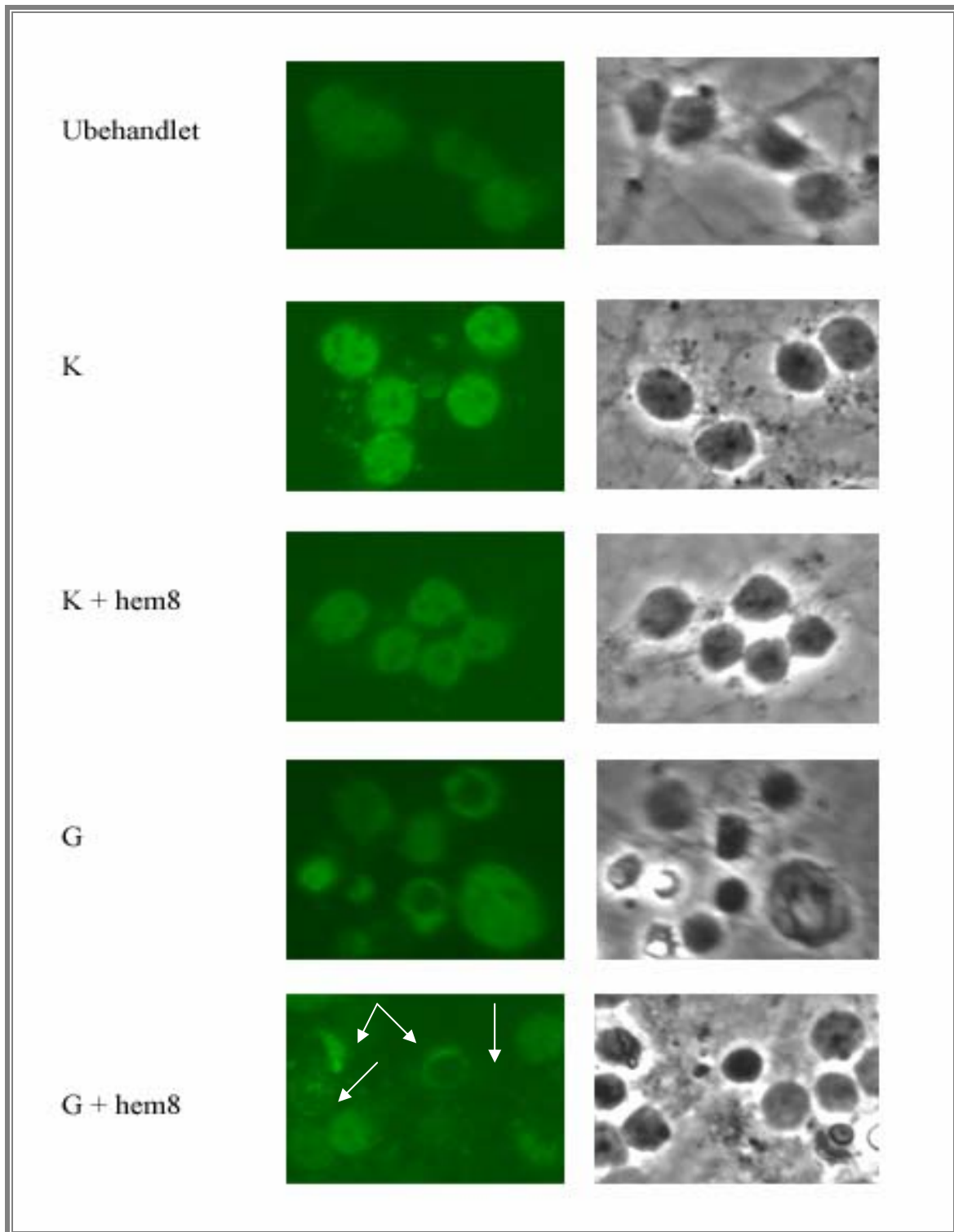
Måling av celledøden viste ikke signifikant reduksjon av celledøden i glutamatbehandlede celler i nærvær av caspase-8 hemmer (se figur 3.16a og tabell 3.12). Flourescensbilder viste ingen endring av aktivert caspase-3 i bufferkontrollen. I glutamatbehandlede celler viste immunfargingen at caspase-8 hemming bidro til en økt "arrestasjon" av aktivert caspase-3 i cytosol, samt reduserte caspase-3 farging i en del celler sammenlignet med glutamateksposerte celler uten nærvær av caspase-8 hemmer (se figur 3.16b).



Figur 3.16a Effekt av caspase-8 hemmer ved glutamatindusert celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød ± SEM målt ved trypanblåfarging etter 24 timer. K=kontroll, Glu=glutamat, hem8=caspase-8 hemmer. N=3 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.12 Glutamatindusert celledød i nærvær av caspase-8 hemmer. Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.16a.

	K	Glu	Glu + hem8
% gjennomsnittlig celledød ± SEM	15,3 ± 2,2	55,4 ± 4,3	44,2 ± 9,0
antall forsøk (N)	3	3	3

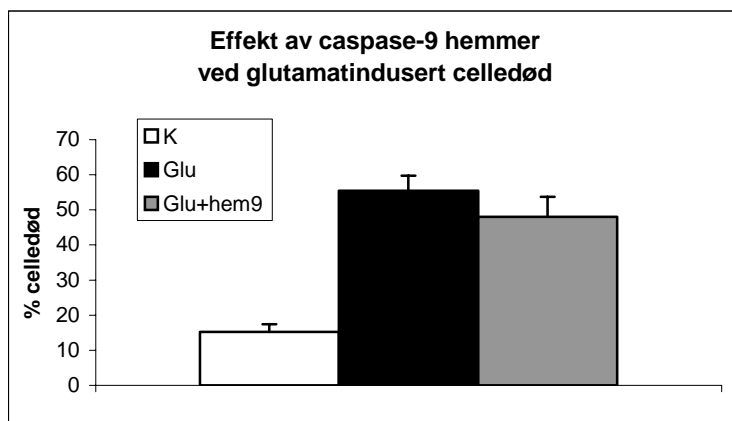


Figur 3.16b Effekt av caspase-8 hemmer på buffer- og glutamatindusert aktivering av caspase-3. Pilene viser celler med redusert eller kun perifer farging av aktiv caspase-3. Cellene ble immunfarget med "cleaved caspase-3" antistoff og Cy^{TM2} flourescerende antistoff. Bildene er tatt med Nikon Eclipse TE 300 DV Flourescensmikroskop og kamera fra RT Diagnostic Instruments. K=bufferkontroll, Glu=glutamat, hem8=hemmer 8. N=7 uavhengige celleforsøk.

3.2.9 Effekt av caspase-9 hemmer på glutamat- og bufferindusert aktivering av caspase-3

For å studere hvorvidt aktivert caspase-3 i glutamat- og bufferinduserte celler var aktivert via caspase-9, ble korncellene preinkubert med caspase-9 hemmer i 15 minutter etterfulgt av glutamat- eller buffereksposering i 15 minutter, og satt til inkubering i 24 timer før celledødsmåling eller i 2 timer før de ble fiksert og immunfarget for aktivert caspase-3.

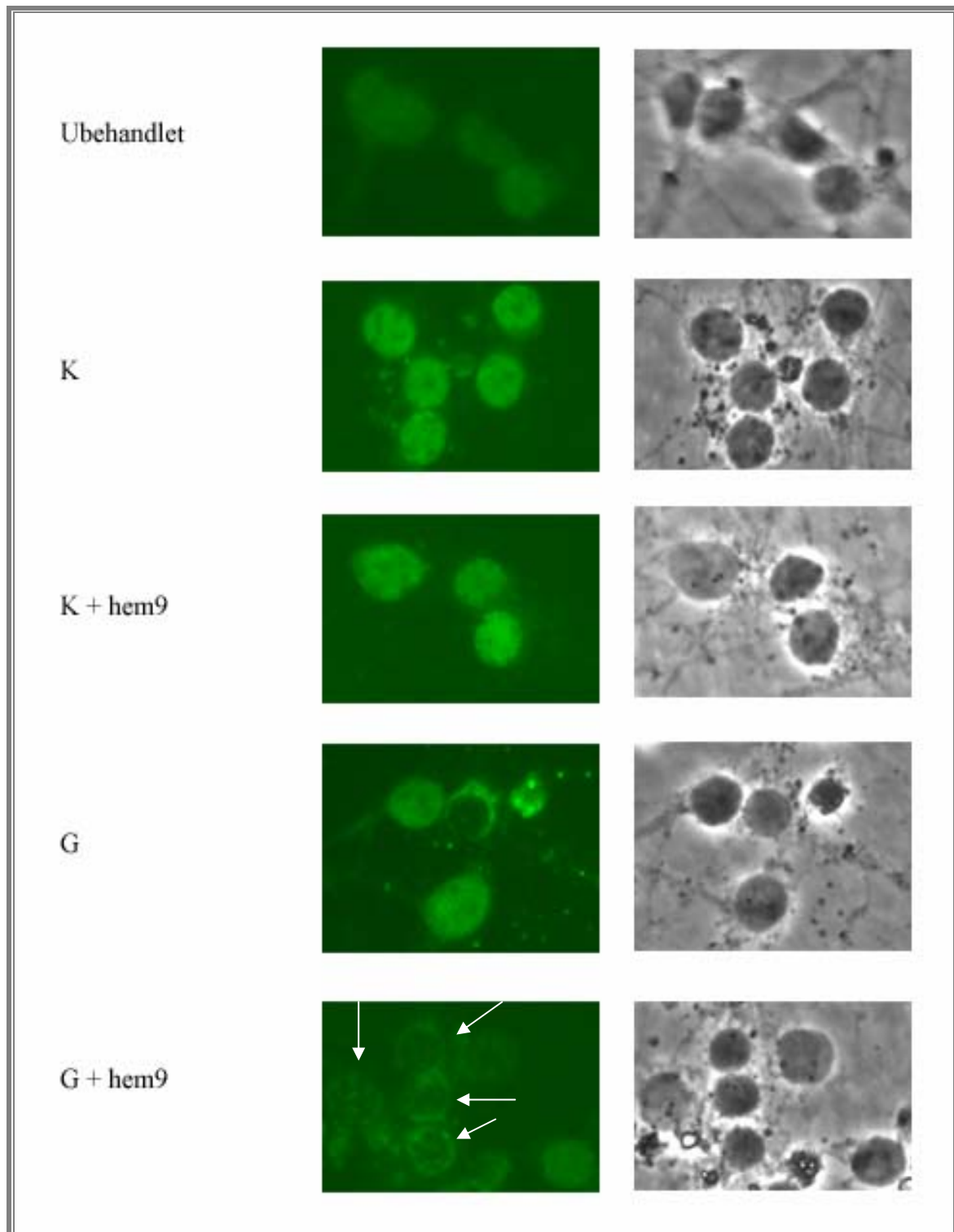
Måling av celledøden etter 24 timer viste en ikke signifikant reduksjon av glutamatindusert celledød i nærvær av caspase-9 hemming sammenlignet med glutamatbehandlede celler uten nærvær av hemmeren (se figur 3.17a og tabell 3.13). Flourescensbilder viste ingen endring av aktivert caspase-3 i bufferkontrollen. Til sammenligning viste immunfarging av glutamatinduserte celler at caspase-9 hemming bidro til en økt ”arrestasjon” av aktivert caspase-3 i cytosol samt reduserte caspase-3 farging i en del celler sammenlignet med glutamateksposerte celler uten nærvær av hemmeren (se figur 3.17b).



Figur 3.17a Effekt av caspase-9 hemmer ved glutamatindusert celledød. Figuren viser gjennomsnittlig celledød ± SEM målt ved trypanblåfarging etter 24 timer. K=kontroll, Glu=glutamat, hem9=caspase-9 hemmer. N=3 uavhengige celleforsøk.

Tabell 3.13 Glutamatindusert celledød i nærvær av caspase-9 hemmer. Tabellen viser resultatene som ligger til grunn for figur 3.17a.

	K	Glu	Glu + hem9
% gjennomsnittlig celledød ± SEM	15,3 ± 2,2	55,4 ± 4,3	48,0 ± 5,7
antall forsøk (N)	3	3	3



Figur 3.17b Effekt av caspase-9 hemmer på glutamat- og bufferindusert aktivering av caspase-3. Pilene viser celler med redusert eller kun perifer farge av aktivert caspase-3. Cellene ble immunfarget med "cleaved caspase-3" antistoff og Cy^{TM2} flourescerende antistoff. Bildene er tatt med Nikon Eclipse TE 300 DV Flourescensmikroskop og kamera fra RT Diagnostic Instruments. K=bufferkontroll, Glu=glutamat, hem9=hemmer 9. N=4 uavhengige celleforsøk.

4 DISKUSJON

4.1 BRUK AV KORNCCELLER FRA ROTTER SOM CELLEMODELL

Korncellekulturer er en veletablert og velkjent modell som har mange fordeler fremfor andre modeller. Korncellekulturer har en meget uniform cellepopulasjon av differensierte nevroner hvor over 80% av cellene er kornceller (Gallo *et al.*, 1982). Dette er en stor fordel da det gjør det mulig å studere mange nevroner over et lite område samtidig. Korncellene fra rotter uttrykker dessuten reseptorer som NMDA-reseptorer (Van der Valk *et al.*, 1991), og egner seg derfor meget godt til å studere cellulære mekanismer som er involvert ved nevrotoksisitet.

4.1.1 Dyrkingsbetingelser

Celler som dyrkes i kultur tas ut av sine normale omgivelser og dyrkes ved spesifikke betingelser tilpasset den enkelte celletype. Korncellene dyrkes i nærvær av cytotstatikum (AraC) for å redusere antall uønskede celler som astrocytter, fibroblaster og endotelceller for å oppnå en så ren korncellekultur som mulig. Korncellene påvirkes ikke av cytotstatika da disse cellene ikke lenger prolifererer. En ulempe med AraC er at den i høye konsentrasjoner (60 μM) gir apoptose i korncellene (Dessi *et al.*, 1995). Korncellekulturene fra rotter dyrkes med 25 mM K^+ . Dette er fordi korncellene har vist seg å være avhengig av kronisk depolariserende forhold for overlevelse (Gallo *et al.*, 1987, Miller and Johnson, 1996). Den høye K^+ -konsentrasjonen er nødvendig for å bidra til Ca^{2+} -innfluks og uttrykk av BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Larmet *et al.*, 1992). Ved fysiologisk 5 mM K^+ over lengre tid vil korncellene dø ved apoptose (Contestabile, 2002).

4.1.2 Primære cellekulturer versus *in vivo* forsøk i dyr

In vivo modeller av dyr utgjør et kompleks system der mange fysiologiske variabler ikke kan kontrolleres. Samtidig vil det i slike modeller være vanskelig å studere intracellulære mekanismer. På dette området vil cellekulturer representere et mye lettere kontrollert

system. I tillegg har cellekulturmodeller en praktisk fordel fremfor *in vivo* forsøk i at det tar relativt kortere tid å oppnå resultater.

4.1.3 Primære cellekulturer versus cellelinjer

Korncellene utgjør en primær cellekultur med nevroner. I tillegg til primærkulturer finnes det cellekulturer basert på cellelinjer og kontinuerlige cellelinjer. Cellelinjer lages ved å ta celler ut fra normalt vev og vedlikeholde disse i et begrenset antall celledelinger.

Kontinuerlige cellelinjer lages fra kreftceller og deler seg hele tiden. Ulempen ved kontinuerlige cellelinjer er blant annet at cellene gjennom flere celledelinger med tiden vil pådra seg en rekke mutasjoner som kan føre til endringer i cellens reseptorsammensetning og intracellulære reguleringsprosesser. Dette vil gjøre cellelinjene mindre egnet til studier av cellulære mekanismer. Primærkulturer vil derfor i større grad reflektere de cellene man finner *in vivo*.

I motsetning til primære cellekulturer inneholder cellelinjer generelt mer homogene cellepopulasjoner da alle cellene har opphav i en felles stammapopulasjon. Cellene i en primærkultur vil fra forsøk til forsøk stamme fra flere forskjellige dyr, noe som gir utslag i en dårligere reproducerbarhet. Dessuten krever primære cellekulturer mer kompliserte dyrkningsbetingelser, og er mer følsom for ytre påvirkninger enn hva som er tilfellet med cellelinjer som er mer hardføre. Dette resulterer blant annet i en høyere basaldød i primære cellekulturer sammenlignet med cellelinjer.

4.1.4 Dexametasontoksisitet i kornceller

Kornceller fra rotter er en velegnet cellekultur til å studere toksisitet av dexametason fordi korncellene blir påvirket av dexametason *in vivo* (Aden *et al.*, 2004). Dette er ikke tilfellet ved for eksempel studier av Alzheimer's sykdom og hjerneslag hvor det er andre celler enn korncellene som påvirkes *in vivo*.

Dexametason har vært i bruk lenge til behandling av premature barn for å forhindre eller behandle kronisk lungesykdom ved å fremme modningsprosessen i lungene (Halliday,

1999). I den senere tid har det imidlertid vært en økende bekymring for langtidsvirkningen av denne behandlingen. En studie viste at premature barn som hadde fått dexametasonbehandling ved fødselen hadde gjennomsnittlig dårligere motorikk ved skolealderen sammenlignet med barn som ikke hadde fått denne behandlingen (Yeh *et al.*, 2004). Mange av disse effektene er nært knyttet til lillehjernen (Kandel *et al.*, 1991).

I Norge gis dexametasonbehandlingen per i dag til barn med en start døgndose på 0,6 mg/kg, dvs. tilsvarende ca. 2 μM , og deretter nedtrapping av dosen (Petra Aden, Ullevål Universitetssykehus, personlig meddelse). Forsøkene viste en signifikant, toksisk dexametasonkonsentrasjon fra 0,1 μM og høyere. Dette er dexametasonkonsentrasjoner som ligger i det terapeutiske området. Til tross for at resultater funnet i primære cellekulturer ikke er direkte sammenlignbare med de kliniske, vil en toksisk dexametasonkonsentrasjon innenfor det terapeutiske området gjøre det lettere å trekke paralleller mellom ulike funn fra *in vivo* og *in vitro* forsøk.

4.2 MEKANISMER VED DEXAMETASONINDUSERT TOKSISITET

Å kunne kartlegge mekanismer ved dexametasonindusert toksisitet er viktig for forståelsen bak dexametasoneffekten. Dexametasontoksisiteten nådde en maksimal verdi over 10 μM , og det ble derfor valgt å benytte denne konsentrasjonen i videre forsøk.

4.2.1 Dexametasontoksisiteten er reseptormediert

Studier har vist at både glukokortikoid- og mineralkortikoidreseptorer uttrykkes i hjernen (Korte *et al.*, 1996, Patel *et al.*, 2000). RU28318 er en mineralkortikoidantagonist som ved 1 μM konsentrasjon har vist å være spesifikk for MR-reseptoren (Kim *et al.*, 1998, Korte *et al.*, 1996).

RU28318 reduserte dexametasontoksisiteten med 83%. Disse resultatene indikerer at dexametason medierer sin toksisitet via en reseptor som er følsom for mineralkortikoid-

antagonisten. Fordi blokkering av mineralokortikoidreseptoren gav så høy reduksjon i celledød, ble det ikke gjort forsøk med GR-antagonister. En tidligere hovedfagsoppgave viste at glukokortikoidagonisten RU28362 ikke gir signifikant økning i celledød i rottekorncellene (Khuong, 2003).

4.2.2 Dexametason toksisiteten involverer NMDA-reseptoren

Det er i senere tid kommet mange studier på at det finnes raske steroideffekter (Cato *et al.*, 2002). Dette er effekter som ikke kan resultere fra steroidenes klassiske genreguleringen, da effekter via genregulering ikke forventes å komme før etter 30 minutter (se 1.1.3). Blant annet viste Takahasi *et al.* at dexametason kunne påvirke NMDA-reseptoren slik at Ca^{2+} -innfluksen gjennom reseptoren ble forlenget (Takahashi *et al.*, 2002). Det var derfor av interesse å studere om NMDA-reseptoren var involvert i dexametason toksisiteten observert i korncellene.

MK801 er en non-kompetitiv NMDA-reseptorantagonist som har vært mye brukt til å hemme NMDA-reseptormediert glutamateksitoksisitet (Wong *et al.*, 1986). En stor reduksjon i dexametason toksisiteten med MK801 i korncellene bekrefter at dexametason også kan påvirke andre reseptor utenom de klassiske reseptorene. Denne studien viser at dexametason, i tillegg til å forlenge Ca^{2+} -innfluksen via NMDA-reseptoren (Takahashi *et al.*, 2002), også bidrar til en økt celledød i nerveceller.

Studiene viser at dexametason toksisiteten observert i korncellene medieres via to ulike reseptorer (følsom for henholdsvis RU28318 og MK801). Selv om mange av forsøkene viste en trend til en svakere hemmende effekt av MK801 sammenlignet med RU28318, var det ingen signifikant forskjell mellom disse to hemmerene. Glutamattoksisiteten lot seg også reduseres av begge antagonistene. Forsøkene har vist store variasjoner i dexametasonindusert celledød som har variert fra 20-59 % av glutamats sin celledød. Den underliggende årsaken kan være at dexametason toksisiteten er styrt via flere reseptorer. Variasjonen i celledød kan skyldes en reseptorheterogenitet mellom cellene hvorav noen celler i større grad har NMDA-reseptorer koblet til dexametasonmedierte reseptorer enn andre celler. Det kan også skyldes en celleheterogenitet fra batch til batch eller en utvikling

av celleheterogenitet i kulturen under dyrking (Resink *et al.*, 1995, Xia *et al.*, 1995). Dexametasonindusert celledød synes å utgjøre en del av glutamatindusert celledød som er Mg^{2+} -uavhengig. En forklaring kan være at det finnes en subpopulasjon av celler som uttrykker disse dexametasonfølsomme NMDA-reseptorene, og at andelen av denne subpopulasjonen varierer fra forsøk til forsøk.

4.2.3 Dexametason toksisitet involverer NMDA-reseptoren via en annen mekanisme enn glutamateksitotoksisitet

Dexametasonforsøkene er utført i fysiologisk buffer med Mg^{2+} tilstede. NMDA-reseptoren er en spenningsavhengig ionekanal som ved hvilemembranpotensial er blokkert av Mg^{2+} (se 1.2.1, Sprengel and Seeburg, 1993). Denne blokkaden oppheves først når membranpotensialet depolariseres. Det var derfor ønskelig å undersøke dexametason toksisiteten uten nærvær av Mg^{2+} -blokkaden. Videre var det interessant å se om dexametasoneffekten var spenningsavhengig tilsvarende som for glutamat. Det ble valgt å gjøre dexametasonforsøkene sammen med glutamat for å kontrollere at NMDA-reseptoren fungerte normalt.

Ved fysiologisk K^+ -konsentrasjon var cellene ikke beskyttet mot dexametason toksisitet i nærvær av Mg^{2+} . Til sammenligning var glutamateksponerte celler som forventet beskyttet mot celledød. Mg^{2+} , imotsetning til MK801 og RU28318, fungerer som en viktig fysiologisk beskyttende faktor, og det er derfor interessant at dexametason via en ukjent mekanisme kan omgå denne fysiologiske hemmeren. Selv i hyperpolariserende medium, som vil ha en forsterkende effekt på reseptorblokkaden av Mg^{2+} , gav Mg^{2+} ingen signifikant reduksjon i dexametasonindusert celledød. I tråd med dette gav nærvær av Mg^{2+} heller ingen signifikant endring i dexametasonindusert celledød i depolariserende medium. I nærvær av Mg^{2+} var glutamat som forventet ikke toksisk i hyperpolariserende medium, men toksisk i depolariserende medium.

Dexametason- og glutamatindusert celledød var lavere i hyperpolariserende- og depolariserende medium sammenlignet med indusert celledød ved fysiologisk K^+ -konsentrasjon. En forklaring på den lavere celledøden i depolariserende medium kan være at

cellene i større grad er i stand til å overleve ved depolarisering tilsvarende som under dyrkningsbetingelsene (se 4.1.1, Larmer *et al.*, 1992). I hyperpolariserende medium kan endogen Mg^{2+} blokkere NMDA-reseptoren i større grad enn ved fysiologiske K^{+} -konsentrasjoner, og dermed bidra til en lavere glutamatindusert celledød.

4.3 GLUTAMATINDUSERT CELLEDØD

Siden dexametason og glutamat virker via felles mekanismer (toksisiteten reduseres av NMDA-reseptorblokkeren MK801) ble det i videre forsøk valgt å studere cellulære mekanismer ved glutamatindusert celledød. Glutamat har lenge vært brukt til å inducere både nekrose og apoptose i korncellekulturer fra rotte (Wood and Bristow, 1998, Bobba *et al.*, 2004). I forsøkene har glutamat vist seg å inducere høyere celledød sammenlignet med dexametason, samt gi en celledød som har vært mer stabil fra forsøk til forsøk. Siden glutamatindusert celledød var maksimal ved 100 μM , ble det valgt å benytte denne konsentrasjonen til videre forsøk.

4.3.1 Caspase-3 er involvert ved glutamatindusert celledød allerede etter 30 minutter, mens AIF frigjøres fra mitokondriet etter 2 timer

Siden caspase-3 kan aktiveres etter frigjøring av cytokrom c fra mitokondriet (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002), og AIF også frigjøres fra mitokondriet (Cregan *et al.*, 2002), var det ønskelig å undersøke om det var noen tidsmessig forskjell i aktivering av caspase-3 og AIF, da begge disse to er sentrale apoptosemarkører. Ved apoptose kløyver caspase-3 viktige kjernesubstrater som PARP (Yang *et al.*, 2004) og cytosolsubstrater som aktin (Zeiss, 2003), mens AIF translokeres til kjernen (Cregan *et al.*, 2002).

Immunfarging viste at caspase-3 aktiveres og redistribueres allerede etter 30 minutter. Det kan være vanskelig ut fra fluorescensbildene å konkludere om caspase-3 er lokalisert i cytosol eller i kjernen. Bildene fra glutamatbehandlede celler viser en klar perifer farge rundt cellen som sterkt indikerer en cytosolfarge av aktiv caspase-3, mens celler som viser

en sterk farge av hele cellen også må ha lokalisering av caspase-3 til kjernen. AIF-immunfarging viste en redistribuering (fra perifere områder til cellekroppen) først etter 2 timer. For å kunne si sikkert at caspase-3 og AIF translokeres til kjernen, er det nødvendig med dobbelfarging, for eksempel DAPI-farging (kjernefarging) (se for eksempel Jacobs *et al.*, 2004). Subcellulær fraksjonering har vist caspase-3 aktivitet både i cytosol og kjerne, men ingen kvantitativ forskjell mellom disse fraksjonene i bufferbehandling og glutamatbehandling (Slagsvold *et al.*, 2003).

Translokering av caspase-3 før AIF kan indikere enten at cytokrom c frigjøres fra mitokondriet før AIF og/eller at caspase-3 aktiveres via caspase-8 før økt permeabilisering av mitokondriet finner sted. Førstnevnte alternativ vil være i overensstemmelse med tidligere studier som indikerer at AIF sitter tettere ved mitokondriets innermembran sammenlignet med cytokrom c, og derfor translokeres til kjernen senere enn caspase-3 (Arnoult *et al.*, 2003, Arnoult *et al.*, 2002). Andre studier har vist at AIF kan frisettes fra mitokondriet før cytokrom c (Susin *et al.*, 2000, Daugas *et al.*, 2000, Zhu *et al.*, 2003). Det er ikke mulig utfra denne studien å si om det er cytokrom c eller AIF som frisettes fra mitokondriet først ved glutamatindusert celledød i rottekorncellene, da caspase-3 som observeres ved 30 minutter også kan skyldes aktivering av caspase-8. For å kunne konkludere hvorvidt cytokrom c frisettes fra mitokondriet før AIF eller motsatt, bør en gjøre immunfarging av cytokrom c.

4.3.2 Caspase-3 hemmer reduserer celledøden, men ikke immunfarging av kløyvet caspase-3

Ifølge litteratursøk er caspase-3 den viktigste effektorcaspasen som etter aktivering bidrar til celledød (Zeiss, 2003). Som forventet gav caspase-3 hemmer en reduksjon i glutamatindusert celledød. Dette er forenlig med det tidligere studier (Slagsvold *et al.*, 2003, Du *et al.*, 1997).

Tross en reduksjon i glutamatindusert celledød i nærvær av caspase-3 hemmer, viste flouescensbildene ingen reduksjon av immunfarget aktivert caspase-3 i verken glutamat- eller buffereksponte celler. Dette kan skyldes at hemmingen ikke er fullstendig. Med

tanke på at caspase-3 hemmer ikke reduserer kløyvingen av caspase-3, men i stedet hemmer virkningen av den, kan det tenkes at caspase-3 hemmer bindes til et sete som ikke affiseres av antistoffet. Caspase-3 hemmer vil av den grunn ikke kunne hindre immunfargingen av kløyvet caspase-3. Disse resultatene viser at immunfarging bare er egnet til å visualisere kløyvet caspase-3. For å måle caspase-aktivitet kan en bruke målbare (for eksempel flourescerende) caspasesubstrater (Slagsvold *et al.*, 2003).

4.3.3 Caspase-2 er ikke involvert i aktivering av caspase-3

Det var et overraskende funn at kløyvet caspase-3 også var tilstede i bufferkontrollen selv om celledøden var ubetydelig. Det var derfor ønskelig å undersøke alternative forklaringer på toksisiteten i glutamatbehandlede celler. Caspase-3 har veldig lik sekvens med to andre caspaser, caspase-2 og caspase-7 (Bilsland and Harper, 2002). Av disse finnes kun caspase-2 i hjernen (Shimohama *et al.*, 2001). Caspase-2 har vist å kunne være involvert ved apoptose (Allen *et al.*, 2001). Det var derfor interessant å undersøke om caspase-2 kunne være caspasen som bidrar til toksisiteten i glutamatbehandlede celler.

Caspase-3 hemmer består av 4 aminosyrer, mens caspase-2 har en lengre sekvens samt modifiserte aminosyrer. Caspase-2 hemmer kan derfor regnes å være mer spesifikk enn caspase-3 hemmer. Imidlertid gav caspase-2 hemmer ingen signifikant reduksjon i glutamatindusert celledød. Siden det ble benyttet en konsentrasjon av caspase-2 hemmer som er publisert (Robertson *et al.*, 2002), er det lite sannsynlig at hemmingen ikke har vært tilstrekkelig. Det er også lite sannsynlig at eksponeringstiden ikke har vart lenge nok da caspase-3 hemmer, med samme eksponeringstid, ga reduksjon i glutamatindusert celledød (se 3.2.5). Dette resultatet utelukker dermed at caspase-2 er involert i celledøden i korncellene ved glutamatbehandling.

Videre var det ønskelig å klargjøre om immunfargingen av aktivert caspase-3, spesielt i bufferkontrollen og bakgrunnsfargen i ubehandlede celler, kunne skyldes delvis uspesifikk farging av kløyvet caspase-2. Flourescensebildene viste at caspase-2 hemmeren ikke endret immunfargingen av kløyvet caspase-3. Dette kan tyde på at caspase-2 ikke har bidratt til fargingen (forutsatt at hemmeren forandrer antigenet), og at det primære antistoffet er

spesifikk for kløyvet caspase-3. Resultatet fra immunfargingen viser at caspase-2 ikke ligger oppstrøms for caspase-3, og er derfor ikke involvert i aktiveringen av effektorcaspasen.

4.3.4 Caspase-3 kløyver PARP i glutamateksponte celler, men ikke i buffereksponte celler

PARP-kløyving har lenge vært benyttet som en markør for aktivert caspase-3 (Yang *et al.*, 2004). Det var derfor ønskelig å undersøke hvorvidt caspase-3 kløyvet PARP i bufferkontrollen sammenlignet med i glutamatbehandlede celler.

Glutamatbehandlede celler viste en sterk farge av PARP i en del celler. Til sammenligning viste fluorescensbildene kun en svak farge av kløyvet PARP i bufferkontrollen som tilsvarte bakgrunnsfargingen observert i ubehandlede celler. Det er vanskelig å si hvorvidt denne bakgrunnsfargingen skyldes en basal kløyving av PARP eller en uspesifikk binding av primær- eller sekundærantistoff. Immunfargingen indikerer at PARP kløyves i større grad i glutamatbehandlede celler enn i bufferkontrollen, men det bør imidlertid understrekes at metoden alene ikke er tilstrekkelig til å kunne konkludere dette. Ved å bruke Western blot med PARP-antistoffer vil det være mulig å bekrefte dette (se for eksempel Chandler *et al.*, 2004, Gilliams-Francis *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2004).

4.3.5 Caspase-3 translokering hemmes av caspase-8 og caspase-9 i glutamateksponte celler, men ikke i buffereksponte celler

For å finne eventuelle flere forskjeller mellom caspase-3 i glutamat- og buffereksponte celler ble det valgt å fokusere på tidligere trinn i caspase-3 aktiveringen. Caspase-3 aktivering domineres av to veier hvorav den ene går via dødsreseptorer og caspase-8, mens den andre går via mitokondriet og caspase-9 (se 1.4.2, 1.4.3). I motsetning til caspase-3 hemmer vil caspase-8 og caspase-9 hemmer hindre kløyvingen av caspase-3, og kan visualiseres immunohistokjemisk.

Å sammenligne ulike bilder basert på fargeintensitet ved immunfarging er en vanskelig måte å studere forskjellen mellom ulike behandlinger. Dette er fordi fluorescenslyset reduseres fort når cellene utsettes for lys. Det er derfor viktig å observere cellene like lenge. Immunfarging er bedre egnet til å sammenligne lokaliseringen av caspase-3 i cellen ved de ulike behandlingene.

Caspase-8- og caspase-9-hemmer gav en ikke signifikant reduksjon i glutamatindusert celledød. Fluorescensbildene viste imidlertid at begge disse hemmerene påvirket aktivert caspase-3 i glutamatbehandlede celler slik at den i større grad holdt seg i cytosol. Disse resultatene kan tyde på at caspase-3-kløyving av viktige kjernesubstrater som PARP og lamin er viktig for celledøden.

Immunfarging av bufferbehandlede celler viste ingen endring av aktivert caspase-3 med caspase-8 eller caspase-9 hemmer. Fluorescensbilder av bufferkontrollen uten hemmere viste også en distribusjon av caspase-3 som var annerledes enn i glutamatbehandlede celler uten hemmere. Dette er spennende funn som indikerer at caspase-3 i bufferkontrollen aktiveres via en annen mekanisme enn glutamatbehandlede celler, og at det kan finnes to former av denne caspasen hvorav den ene er mer toksisk enn den andre. Caspase-3 kan, i tillegg til caspase-8 og caspase-9, også aktiveres via endoplasmatisk retikulum og caspase-12 ved stress (Hitomi *et al.*, 2004, Jayanthi *et al.*, 2004). En mulig forklaring på forskjellen mellom bufferbehandlede og glutamatbehandlede celler kan derfor være at caspase-12 er involvert i bufferkontrollen da disse blir utsatt for stress under behandlingen, og at caspase-8 og caspase-9 vil dominere ved sterkere påkjenning på cellen som ved glutamatbehandling. Ifølge litteratursøk finnes det ennå ikke en caspase-12 hemmer, men det vil være mulig å kunne undersøke caspase-12 involveringen ved glutamat- og bufferindusert celledød når en slik hemmer blir tilgjengelig.

5 KONKLUSJON

Basert på de foregående resultater og diskusjon kan det konkluderes følgende:

1. Dexametason er toksisk for kornceller ved 0,1 μ M og høyere konsentrasjoner
2. Dexametasantoksisiteten involverer reseptorerer følsom for MR-antagonisten RU28318 og NMDA-reseptorblokkeren MK801. Dexametasons aktivitet på NMDA-reseptoren er spenningsuavhengig, mens glutamat kun aktiverer reseptoren ved depolarisering.
3. Caspase-3 aktiveres og translokeres før AIF.
4. Caspase-3 induert i bufferbehandlede og glutamateksponerte celler har forskjellig aktivitet. Caspase-3 ved glutamatindusert celledød bidrar til PARP-kløyving i større grad enn caspase-3 i bufferinduserte celler.
5. Caspase-3 aktiveres via ulike mekanismer i bufferbehandlede og glutamateksponerte celler. Ved glutamatindusert celledød er caspase-3 påvirket av caspase-8 og caspase-9. Caspase-3 som aktiveres ved bufferindusert celledød er ikke påvirket av caspase-8 eller caspase-9.

FORKORTELSER

AIDS	”Acquired immunodeficiency syndrome”
AF-1	“Activation function-1”
AIF	Apoptose-induserende faktor
AMPA	α -Amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoxazolpropionsyre
Apaf-1	Apoptose-protease aktiverende faktor-1
AP-1	”Acid phosphatase-1”
AraC	Cytosin β -D-arabino-Furanoside
ATM	”Ataxia telangiectasia mutated protein kinase”
BDNF	“Brain Derived Neurotrophic Factor”
cAMP	Syklisk adenosine 3’-5’-monofosfat
CARD	Caspaserekruiterende domene
CNS	Sentralnervesystemet
DAPI	4’-6-diamino-2-fenyl-indol
DNA	Deoxyribonukleinsyre
ER	Endoplasmatisk retikulum
FADD	Fas-assosiert dødsdomene
GR	Glukokortikoid-reseptorer
GRE	Glukokortikoid responsive elementer
IMS	”Intermembrane space”
MAPK	mitogen-aktiverede proteinkinaser
MK801	(5R,10S)-(+)-5-metyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)syklohepten-5,10-imin natriumhydrogenkarbonat
MLS	Mitokondrie-lokaliseringssekvens
mRNA	”messenger”-ribonukleinsyre
MR	Mineralkortikoid-reseptor
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NF- κ B	Nukleær faktor- κ B
NMDA	N-metyl-D-aspartat
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase-1
TNF α	Tumor nekrose faktor α

REFERANSER

- Abraham, I.M., Harkany, T., Horvath, K.M. & Luiten, P.G. (2001) Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? *J Neuroendocrinol*, **13**, 749-760.
- Adcock, I.M. (2001) Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther*, **14**, 211-219.
- Allen, J.W., Eldadah, B.A., Huang, X., Knoblach, S.M. & Faden, A.I. (2001) Multiple caspases are involved in beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci Res*, **65**, 45-53.
- Arnoult, D., Gaume, B., Karbowski, M., Sharpe, J.C., Cecconi, F., Youle, R.J., Parone, P., Martinou, J.C., Antonsson, B., Estaquier, J. & Ameisen, J.C. (2003) Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization
Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *Embo J*, **22**, 4385-4399.
- Arnoult, D., Parone, P., Martinou, J.C., Antonsson, B., Estaquier, J. & Ameisen, J.C. (2002) Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol*, **159**, 923-929.
- Arundine, M. & Tymianski, M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, **34**, 325-337.
- Assuncao Guimaraes, C. & Linden, R. (2004) Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*, **271**, 1638-1650.
- Barnes, P.J. (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*, **94**, 557-572.
- Bilsland, J. & Harper, S. (2002) Caspases and neuroprotection. *Curr Opin Investig Drugs*, **3**, 1745-1752.
- Bobba, A., Atlante, A., Azzariti, A., Sgaramella, G., Calissano, P. & Marra, E. (2004) Mitochondrial impairment induces excitotoxic death in cerebellar granule cells. *Int J Mol Med*, **13**, 873-876.
- Boonyaratanakornkit, V. & Edwards, D.P. (2004) Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem*, **40**, 105-120.
- Cato, A.C., Nestl, A. & Mink, S. (2002) Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*, **2002**, RE9.
- Chandler, N.M., Canete, J.J. & Callery, M.P. (2004) Caspase-3 drives apoptosis in pancreatic cancer cells after treatment with gemcitabine. *J Gastrointest Surg*, **8**, 1072-1078.

- Contestabile, A. (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum*, **1**, 41-55.
- Cregan, S.P., Fortin, A., MacLaurin, J.G., Callaghan, S.M., Cecconi, F., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Park, D.S., Kroemer, G. & Slack, R.S. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol*, **158**, 507-517.
- Dantzer, F., Nasheuer, H.P., Vonesch, J.L., de Murcia, G. & Menissier-de Murcia, J. (1998) Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1891-1898.
- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N. & Kroemer, G. (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, **476**, 118-123.
- Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (2004) Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr*, **36**, 287-294.
- Dessi, F., Pollard, H., Moreau, J., Ben-Ari, Y. & Charriaut-Marlangue, C. (1995) Cytosine arabinoside induces apoptosis in cerebellar neurons in culture. *J Neurochem*, **64**, 1980-1987.
- Du, Y., Bales, K.R., Dodel, R.C., Hamilton-Byrd, E., Horn, J.W., Czilli, D.L., Simmons, L.K., Ni, B. & Paul, S.M. (1997) Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11657-11662.
- Gallo, V., Ciotti, M.T., Coletti, A., Aloisi, F. & Levi, G. (1982) Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 7919-7923.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balazs, R. & Jorgensen, O.S. (1987) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, **7**, 2203-2213.
- Gilliams-Francis, K.L., Quaye, A.A. & Naegele, J.R. (2003) PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death. *Exp Neurol*, **184**, 359-372.
- Halliday, H.L. (1999) Clinical trials of postnatal corticosteroids: inhaled and systemic. *Biol Neonate*, **76 Suppl 1**, 29-40.
- Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K. & Tohyama, M. (2004) Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett*, **357**, 127-130.
- Hynd, M.R., Scott, H.L. & Dodd, P.R. (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, **45**, 583-595.

- Jacobs, C.M., Bolding, K.A., Slagsvold, H.H., Thoresen, G.H. & Paulsen, R.E. (2004) ERK2 prohibits apoptosis-induced subcellular translocation of orphan nuclear receptor NGFI-B/TR3. *J Biol Chem*, **279**, 50097-50101.
- Jayanthi, S., Deng, X., Noailles, P.A., Ladenheim, B. & Cadet, J.L. (2004) Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talks between endoplasmic reticulum and mitochondria-dependent death cascades. *Faseb J*, **18**, 238-251.
- Joza, N., Kroemer, G. & Penninger, J.M. (2002) Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet*, **18**, 142-149.
- Kim, P.J., Cole, M.A., Kalman, B.A. & Spencer, R.L. (1998) Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **67**, 213-222.
- Korte, S.M., Korte-Bouws, G.A., Koob, G.F., De Kloet, E.R. & Bohus, B. (1996) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor antagonists in animal models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, **54**, 261-267.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. & Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, **60**, 619-642.
- Larmet, Y., Dolphin, A.C. & Davies, A.M. (1992) Intracellular calcium regulates the survival of early sensory neurons before they become dependent on neurotrophic factors. *Neuron*, **9**, 563-574.
- Lu, C.X., Fan, T.J., Hu, G.B. & Cong, R.S. (2003) Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, **35**, 881-885.
- Martin, L.J., Al-Abdulla, N.A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E. & Portera-Cailliau, C. (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*, **46**, 281-309.
- McConkey, D.J. (1998) Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*, **99**, 157-168.
- Meldrum, B.S. (1992) Excitatory amino acid receptors and disease. *Curr Opin Neurol Neurosurg*, **5**, 508-513.
- Miller, T.M. & Johnson, E.M., Jr. (1996) Metabolic and genetic analyses of apoptosis in potassium/serum-deprived rat cerebellar granule cells. *J Neurosci*, **16**, 7487-7495.
- Morita, K., Ishimura, K., Tsuruo, Y. & Wong, D.L. (1999) Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors. *Brain Res*, **816**, 309-316.
- Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, **258**, 597-603.

- Nakanishi, S., Masu, M., Bessho, Y., Nakajima, Y., Hayashi, Y. & Shigemoto, R. (1994) Molecular diversity of glutamate receptors and their physiological functions. *Exs*, **71**, 71-80.
- Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata, S. & Okada, M. (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev*, **26**, 230-235.
- Ozawa, S., Kamiya, H. & Tsuzuki, K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, **54**, 581-618.
- Patel, P.D., Lopez, J.F., Lyons, D.M., Burke, S., Wallace, M. & Schatzberg, A.F. (2000) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatr Res*, **34**, 383-392.
- Pelaia, G., Vatrella, A., Cuda, G., Maselli, R. & Marsico, S.A. (2003) Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci*, **72**, 1549-1561.
- Proskuryakov, S.Y., Gabai, V.L. & Konoplyannikov, A.G. (2002) Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Mosc)*, **67**, 387-408.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G. & Gabai, V.L. (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*, **283**, 1-16.
- Rang, H.P., Dale, M.M. & J.M., R. (1999) Pharmacology, 471-477.
- Resink, A., Villa, M., Benke, D., Mohler, H. & Balazs, R. (1995) Regulation of the expression of NMDA receptor subunits in rat cerebellar granule cells: effect of chronic K(+)-induced depolarization and NMDA exposure. *J Neurochem*, **64**, 558-565.
- Robertson, J.D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (2002) Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 29803-29809.
- Roue, G., Bitton, N., Yuste, V.J., Montange, T., Rubio, M., Dessauge, F., Delettre, C., Merle-Beral, H., Sarfati, M. & Susin, S.A. (2003) Mitochondrial dysfunction in CD47-mediated caspase-independent cell death: ROS production in the absence of cytochrome c and AIF release. *Biochimie*, **85**, 741-746.
- Sattler, R. & Tymianski, M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med*, **78**, 3-13.
- Scatton, B. (1993) The NMDA receptor complex. *Fundam Clin Pharmacol*, **7**, 389-400.
- Schmidt, B.M., Gerdes, D., Feuring, M., Falkenstein, E., Christ, M. & Wehling, M. (2000) Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol*, **21**, 57-94.
- Shimohama, S., Tanino, H. & Fujimoto, S. (2001) Differential subcellular localization of caspase family proteins in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, **315**, 125-128.

Slagsvold, H.H., Rosseland, C.M., Jacobs, C., Khuong, E., Kristoffersen, N., Gaarder, M., Fallgren, A.B., Huitfeldt, H.S. & Paulsen, R.E. (2003) High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons. *Brain Res*, **984**, 111-121.

Smoak, K.A. & Cidlowski, J.A. (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*, **125**, 697-706.

Sommer, B. & Seeburg, P.H. (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends Pharmacol Sci*, **13**, 291-296.

Sprengel, R. & Seeburg, P.H. (1993) The unique properties of glutamate receptor channels. *FEBS Lett*, **325**, 90-94.

Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C. & Kroemer, G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, **192**, 571-580.

Takahashi, T., Kimoto, T., Tanabe, N., Hattori, T.A., Yasumatsu, N. & Kawato, S. (2002) Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurochem*, **83**, 1441-1451.

Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.

Van Cruchten, S. & Van Den Broeck, W. (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*, **31**, 214-223.

Van der Valk, J.B., Resink, A. & Balazs, R. (1991) Membrane depolarization and the expression of glutamate receptors in cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol*, **201**, 247-250.

van Gorp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X. & Vandenabeele, P. (2003) Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 487-497.

Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Leuillet, S., Vaudry, H. & Gonzalez, B.J. (2003) Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways. *Science*, **300**, 1532-1534.

Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 2922-2933.

Wehling, M. (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, **59**, 365-393.

Wong, E.H., Kemp, J.A., Priestley, T., Knight, A.R., Woodruff, G.N. & Iversen, L.L. (1986) The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 7104-7108.

Wood, A.M. & Bristow, D.R. (1998) N-methyl-D-aspartate receptor desensitisation is neuroprotective by inhibiting glutamate-induced apoptotic-like death. *J Neurochem*, **70**, 677-687.

Xia, Y., Ragan, R.E., Seah, E.E., Michaelis, M.L. & Michaelis, E.K. (1995) Developmental expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced neurotoxicity, NMDA receptor function, and the NMDAR1 and glutamate-binding protein subunits in cerebellar granule cells in primary cultures. *Neurochem Res*, **20**, 617-629.

Yang, Y., Zhao, S. & Song, J. (2004) Caspase-dependent apoptosis and -independent poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by transforming growth factor beta 1. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 223-234.

Yeh, T.F., Lin, Y.J., Lin, H.C., Huang, C.C., Hsieh, W.S., Lin, C.H. & Tsai, C.H. (2004) Outcomes at school age after postnatal dexamethasone therapy for lung disease of prematurity. *N Engl J Med*, **350**, 1304-1313.

Zeiss, C.J. (2003) The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*, **40**, 481-495.

Zhu, C., Qiu, L., Wang, X., Hallin, U., Cande, C., Kroemer, G., Hagberg, H. & Blomgren, K. (2003) Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem*, **86**, 306-317.