

HOVEDOPPGAVE FOR GRADEN

*Candidata pharmaciae*

# Mulige interaksjoner mellom NMDA-reseptorsubenheter og glukokortikoidreseptoren



Laila Elisabeth Wehus

Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet

Universitetet i Oslo

Høsten 2007

## **FORORD**

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i tidsrommet fra november 2006 til november 2007, som et ledd i graden cand. pharm.

Jeg vil takke min hovedveileder Ragnhild E. Paulsen for hennes hjelp, oppmuntring og alltid positive innstilling. Jeg vil også takke min medveileder Petra Aden for god opplæring, hjelp og innspill.

I tillegg vil jeg takke Mona Gaarder, Gro Mathisen, Karen Debernard og Bjørn-Oddvar Strøm for hjelp og opplæring på laben.

Jeg vil også takke Tina Dale Tønnessen, Hege K. Omland og Ingunn Wehus for hjelp til korrekturlesing, og Andreas Klokkhammer for hjelp ved dataproblemer.

Til slutt vil jeg takke alle på ZEB for et hyggelig og lærerikt år.

Oslo, november 2007

Laila Elisabeth Wehus

## SAMMENDRAG

Deksametason er et syntetisk glukokortikoid som har blitt mye brukt i behandlingen av bronkopulmonal dysplasi hos for tidlig fødte barn. Denne behandlingen har vist seg å føre til hemmet nevrologisk utvikling hos mange av barna som har fått denne behandlingen.

Det er tidligere vist at deksametason er toksisk for flere typer celler i kultur. NMDA-reseptoren kan være involvert i mekanismen bak denne toksisiteten i nevroner, siden NMDA-reseptorblokkere hemmer toksisiteten. NMDA-reseptoren er bygget opp av flere ulike subenheter, og disse subenhetene uttrykkes i ulik grad under utviklingen. Subenheten NR3A uttrykkes hovedsakelig i fosterstadiet og den første tida etter fødselen.

I dette prosjektet ble det brukt en cellelinje (CV-1) for å undersøke om:

- 1) glukokortikoiders potens kan detekteres i et reporter-gen assay.
- 2) NMDA-reseptorantagonister kan virke direkte på glukokortikoidreseptoren (GR).
- 3) det er en interaksjon mellom GR og ulike NMDA-reseptorsubenheter.

Et luciferasesystem som aktiveres av GR ble brukt. Det ble bekreftet at deksametason er mer potent enn hydrokortison i å aktivere gentranskripsjon, og at NMDA-reseptorantagonister ikke hemmer GR-mediert gentranskripsjon. CV-1 celler ble transfektert med GR og NMDA-reseptorsubenheter. Tilstedeværelse av gfp-merket NMDA-reseptorsubenhet NR3A hemmer GRs aktivering av et reporter-gen. Dette kan ha betydning for mekanismen for deksametasons nevrotoksisitet hos premature barn.

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	<b>2</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>3</b>
<b>INNHALDSFORTEGNELSE</b> .....	<b>4</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>7</b>
<b>1 INNLEDNING</b> .....	<b>9</b>
1.1 Glutamatreseptorer .....	9
1.1.1 NMDA-reseptoren .....	9
1.2 Eksitotoksisitet.....	12
1.3 Apoptose og nekrose .....	14
1.4 Steroider .....	14
1.4.1 Glukokortikoider .....	15
1.4.2 Hydrokortison.....	15
1.4.3 Deksametason .....	15
1.4.4 Klassiske steroideffekter .....	15
1.4.5 Ikke klassiske steroideffekter .....	16
1.5 Glukokortikoidreseptoren .....	17
1.6 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren .....	18
1.7 Hensikten med studien .....	20
<b>2 MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>21</b>
2.1 CV-1 celler.....	21
2.1.1 Splitting av CV-1 celler.....	21
2.1.2 Transfeksjon av CV-1 celler.....	22
2.2 Eksponering med agonister og antagonister .....	25
2.2.1 Deksametason .....	25
2.2.2 Hydrokortison.....	26
2.2.3 MK 801 .....	26
2.2.4 CGP 39551 .....	26
2.3 Luciferase .....	26
2.3.1 Ildflueluciferase .....	27
2.3.2 Renillaluciferase .....	27
2.3.3 Høsting av celler til luciferasemåling.....	27

2.3.4 Måling av ildflueluciferase .....	29
2.3.5 Måling av renillaluciferase.....	29
2.4 Mikroskopering .....	30
2.5 Produkter og utstyr .....	31
2.5.1 Produkter .....	31
2.5.2 Utstyr .....	32
2.6 Figurer og statistikk .....	33
<b>3 RESULTATER .....</b>	<b>34</b>
3.1 Agonister og antagonisters konsentrasjonsavhengige virkning på luciferaseaktivering.....	34
3.1.1 Hydrokortison og deksametasons aktivering av luciferaseaktivitet	34
3.1.2 NMDA-reseptorantagonisters effekt på luciferasemålingene .....	35
3.2 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren .....	36
3.2.1 Deksametasons påvirkning på renillaluciferase .....	36
3.2.2 NMDA-reseptorsubenheters påvirkning på renillaluciferase .....	37
3.2.3 Deksametasons påvirkning på ildflueluciferase .....	37
3.2.4 NMDA-reseptorsubenheterenes påvirkning på ildflueluciferase.....	38
3.2.5 GRE-luc-aktivering.....	40
3.2.6 NMDA-reseptorsubenheterenes påvirkning på GRE-luc-målingene .	41
3.2.7 Villtype NMDA-reseptorsubenheters interaksjon med GR .....	44
3.3 NMDA-reseptorsubenheterenes fordeling i CV-1 celler.....	45
<b>4 DISKUSJON .....</b>	<b>47</b>
4.1 Agonister og antagonisters virkning på luciferaseaktivitet .....	47
4.1.1 Hydrokortison og deksametasons aktivering av luciferaseaktiviteten .....	47
4.1.2 NMDA-reseptorantagonisters påvirkning på GR.....	48
4.2 Er et luciferasereportersystem i CV-1 celler egnet til å undersøke interaksjoner mellom GR og NMDA-reseptoren? .....	48
4.2.1 CV-1 celler .....	48
4.2.2 Renillaluciferase som intern standard .....	49
4.2.3 Ildflueluciferase .....	51
4.2.4 GRE-luc .....	52
4.3 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren .....	53
4.3.1 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren.....	53

4.3.2 Villtype NMDA-reseptorsubenheters interaksjon med GR .....	54
4.4 NMDA-reseptorsubenheterenes fordeling i CV-1 celler .....	56
4.5 KONKLUSJON .....	57
<b>LITTERATURLISTE .....</b>	<b>58</b>

## **FORKORTELSER**

AMPA	Alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosin 5-trifosfat
BBS	BES-bufret saltvann
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BES	N,N-Bis-(2-hydroksyetyl)-2-aminoetansulfonsyre
Cyt c	Cytokrom c
Dex	Deksametason
DBD	DNA-bindende domene
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Endoplasmatisk reticulum
FBS	Fetal bovine serum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GABA	Gamma-aminosmørsyre
Gfp	Grønt fluorescerende protein
GR	Glukokortikoidreseptor
GRE	Glukokortikoid respons element
HC	Hydrokortison
HSP90	90-kDa Heatshock protein
LBD	Ligandbindende domene
MAPK	Mitogenaktiverede protein kinaser
Mef 2C	Myocyte enhancer factor 2C
mRNA	messenger-ribonukleinsyre
NMDA	N-methyl-D-aspartate
nNOS	Nevronal nitrogenoksid syntase
NO	Nitrogenoksid
NR	NMDA-reseptor
PBS	Fosfat-bufret saltvann

ROS	Reaktiv oxygen forbindelse
Tris	Trishydroksymetylaminometan
Yfp	Gult fluorescerende protein



# 1 INNLEDNING

## 1.1 Glutamatreseptorer

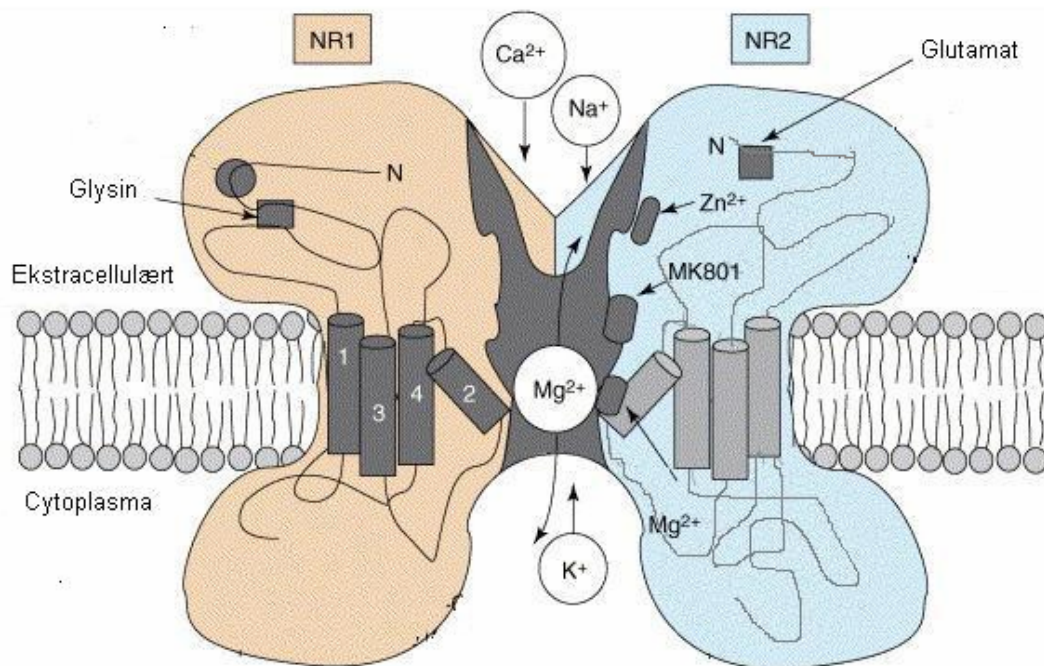
Glutamatreseptorer kan deles inn i ionotrope og metabotrope glutamatreseptorer. Ionotrope glutamatreseptorer er ligandopererte ionekanaler som medierer størstedelen av eksitatorisk neurotransmisjon i hjernen, og uttrykkes hovedsakelig i sentralnervesystemet. Disse reseptorene deles inn i 3 hovedklasser, oppkalt etter deres selektive agonister, nemlig N-methyl-D-aspartate-(NMDA), alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate-(AMPA) og kainat- reseptorer. NMDA-reseptoren er hovedansvarlig for eksitotoksisitet og omtales derfor videre her (Dingledine et al. 1999; Ozawa et al. 1998).

### 1.1.1 NMDA-reseptoren

NMDA-reseptorer er heteromere komplekser bestående av flere subenheter (Dingledine et al. 1999). Disse subenhetene kodes for av 3 genfamilier: NR1, NR2 og NR3. Det finnes åtte ulike NR1 subenheter. Disse kodes for av ett gen, men har forskjellig aminosyresekvens pga variabel genspleising. Av NR2 subenheter finnes det fire (A-D), og av NR3 subenheter finnes det to (A og B). Disse kodes for av seks forskjellige gener (Paoletti and Neyton 2007). Hver av NR2- og NR3-subenhetene, utenom NR2A, kommer også i flere varianter pga genspleising. Det er uvisst om dette har noen funksjonell relevans (Cull-Candy et al. 2001).

Vanligvis består reseptorene av en kombinasjon av NR1- og NR2-subenheter (se figur 1.1) (Al-Hallaq et al. 2002; Danysz and Parsons 1998). Det har lenge vært uklart om subenhetene danner tetramerer med to NR1-subenheter og to NR2-subenheter eller pentamerer med tre NR1-subenheter og to NR2-subenheter (Dingledine et al. 1999). Konklusjonen er ikke endelig, men konsensusen i dag er at NMDA-reseptorer er tetramerer (Paoletti and Neyton 2007).

NMDA-reseptorer er koblet til kationkanaler med høy ledningsevne, som er permeable for  $K^+$ ,  $Na^+$  og  $Ca^{2+}$  (Danysz and Parsons 1998). Kationkanalen blokkeres av  $Mg^{2+}$ , og denne blokkeringen er spenningsavhengig. Dette betyr at NMDA-reseptoren bare aktiveres etter depolarisering av membranen, siden  $Mg^{2+}$  da dissosierer fra kanalen. Depolariseringen kan for eksempel skyldes aktivering av AMPA-reseptorer (Danysz and Parsons 1998).



**Figur 1.1: Skjematiske fremstilling av NMDA-reseptoren.** NR1- og NR2-subenheterenes tertiære struktur er skissert, med bindingssiter for glutamat og glysin ved N-terminalen. Figuren er modifisert fra Kristiansen et al. (Kristiansen et al. 2007).

Forskjellige subenheter gir funksjonelt forskjellige reseptorer. Inkorporering av forskjellige NR1-subenheter i NMDA-reseptorkomplekset påvirker evnen til å bli modulert av polyaminer og protein kinase C, spenningsuavhengig sinkmodulering og bindingsevnen til intracellulære proteiner. NR2-subenheterene bestemmer biofysiske karakteristika av ionekanalene, som ledningsevne, gjennomsnittlig åpningsstid og sensitivitet for  $Mg^{2+}$  blokkering og  $Zn^{2+}$  blokkering (Perez-Otano et al. 2001; Rachline et al. 2005).

Reseptorer som består av NR1- og NR2-subenheter krever både glutamat og glysin for å aktiveres. Bindingssetet for glysin sitter på NR1 og bindingssetet for glutamat sitter på NR2 (se figur 1.1). Denne typen reseptorer

karakteriseres av relativ høy kalsiumpermeabilitet. NR3 kan inkorporeres i et kompleks sammen med NR1 og NR2, og da reduseres kalsiumpermeabiliteten (Al-Hallaq et al. 2002; Burnashev et al. 1995; Chatterton et al. 2002; Danysz and Parsons 1998; Das et al. 1998; Schneggenburger 1996). I forsøk der *Xenopus* oocyter er injisert med NR1- og NR3-subenheter er det vist at NR1 i kombinasjon med enten NR3A eller NR3B alene kan danne eksitatoriske reseptorer. Disse reseptorene aktiveres av glysin alene, og påvirkes ikke av glutamat eller NMDA (Brody et al. 2005; Chatterton et al. 2002). Slike reseptorer er også transfektert inn i HEK 293 celler, som er fra human embryonyre (Smothers and Woodward 2007). Studier på cerebrokortikale rottenevrone i kultur tyder på at disse nevronene kan ha en reseptortype som består av NR1 sammen med NR3A eller NR3B alene (Chatterton et al. 2002).

Det finnes spesifikke antagonister til NMDA-reseptoren. MK 801 er en selektiv og ikke-kompetitiv antagonist til NMDA-reseptoren (Wong et al. 1986). For at MK 801 skal blokkere reseptoren, må reseptoren først aktiveres av en agonist. Agonisten kan dissosiere fra reseptoren og ionekanal lukkes mens MK 801 fortsatt er bundet. Bindingssetet til antagonisten er antagelig i ionekanal (se figur 1.1) (Huettner and Bean 1988).

Et annet eksempel på en selektiv NMDA-reseptorantagonist er CGP 39551 (Pozza et al. 1990). Dette er en kompetitiv antagonist, og har derfor samme bindingssete som agonisten glutamat (Croucher et al. 1992).

De forskjellige NMDA-reseptorsubenheterne uttrykkes i forskjellig grad i ulike stadier av utviklingen og avhengig av vevstypen. I den embryonale rottelillehjernen uttrykkes bare NR2B og NR2D, mens NR2A og NR2C først kan påvises i tiden rundt fødselen. NR2B ekspresjonen reduseres til et minimum etter fødselen (Monyer et al. 1994; Neyton and Paoletti 2006; Ozawa et al. 1998). NR1 uttrykkes i det meste av rottehjernen både i den embryonale hjernen og hos voksne rotter (Monyer et al. 1994).

I mus uttrykkes NR3A-subenheten i det meste av hjernen under utviklingen, og nivået av den når et maksimum omtrent i den første postnatale uken. Deretter synker nivået gradvis, og hos voksne finnes den bare i enkelte avgrensede steder i hjernen. Liknende ekspresjonsmønster er funnet hos rotte (Sucher et al. 1995). NR3B-subenheten finnes i et begrenset antall avgrensede steder i bakre del av hjernen. Den uttrykkes i omtrent like stor grad i hjernen til nyfødte mus og hos voksne mus (Matsuda et al. 2002; Nishi et al. 2001). I mus uttrykkes ikke NR3B i særlig grad i fosterlivet (Fukaya et al. 2005).

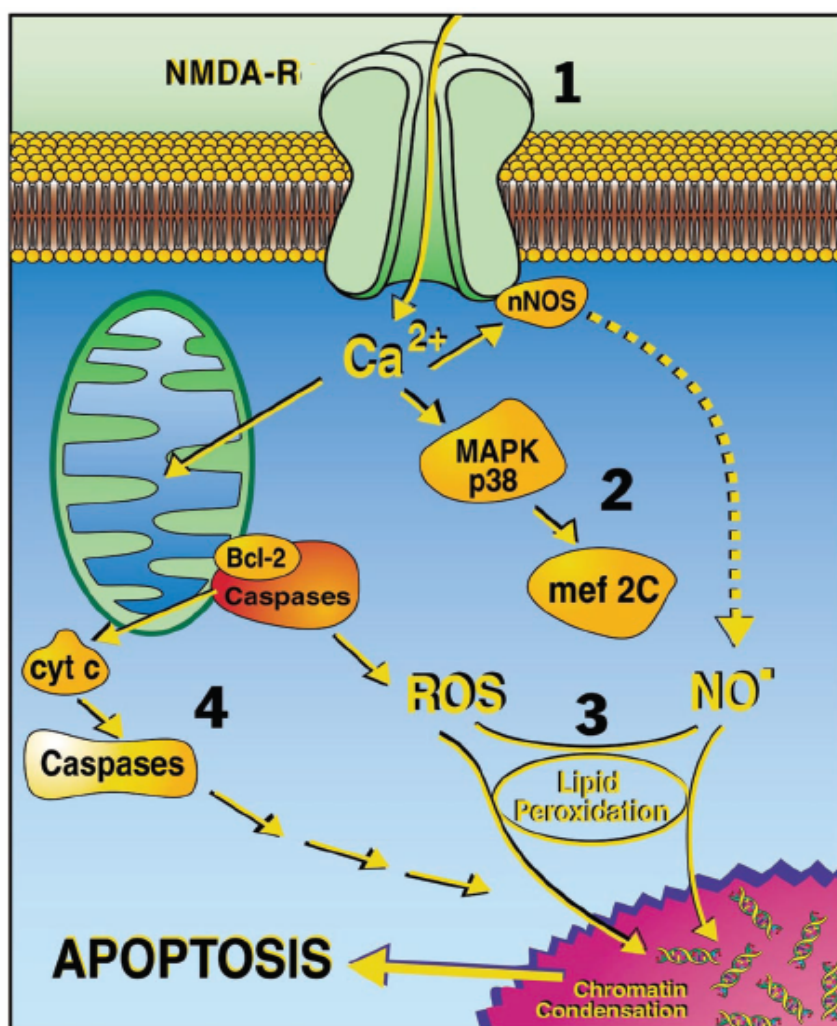
NMDA-reseptoren har en funksjon i hjernen i en rekke fysiologiske og patologiske prosesser som hukommelse og læring (Neyton and Paoletti 2006). NMDA-reseptorene har en kritisk rolle i eksitotoksisitet (se avsnitt 1.2) i forbindelse med for eksempel hjerneslag (Neyton and Paoletti 2006; Zarain-Herzberg et al. 2005).

## **1.2 Eksitotoksisitet**

Eksitotoksisitetbegrepet ble lansert i 1969, da det ble definert som nevrodegenerasjon mediert av eksitatoriske aminosyrer (Olney 1969). Mekanismen kan være forskjellig i ulike dyre- og cellekulturmodeller. Den utløsende årsak kan være vaskulær eller iskemisk, genetisk, metabolsk eller immunologisk. Glutamat er vanligvis den medierende agonisten, men i stedet for glutamat, kan glysin eller quinolinat være utløsende agens (Lynch and Guttman 2002).

De fleste former for eksitotoksisitet krever aktivering av NMDA-reseptoren (se figur 1.2). Forlenget glutamateksponering fører til økt intracellulær kalsium og celledød via forskjellige intracellulære signalveier. Økt intracellulær kalsium fører til at mitokondriene tar opp kalsium, og dermed depolariserer mitokondriemembranen. Dette senker det mitokondrielle membranpotensialet og ATP-produksjonen minsker, noe som gjør at cellemembranens membranpotensial ikke gjenoprettes og NMDA-reseptorer aktiveres. Mitokondrielt kalsiumopptak kan også promotere frigjøring av proapoptotiske

faktorer som cytokrom c (cyt c), og dermed aktivering av caspase-enzymmer. Disse enzymene katalyserer reaksjoner som fører til DNA-spaltning i kjernen og bidrar til en apoptotisk celledød (se avsnitt 1.3). Dysfunksjon i den mitokondrielle elektrontransportkjeden kan føre til produksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS) som kan føre til celledød. NMDA-reseptormediert kalsiumøkning kan også aktivere flere typer proteiner som medierer eller fremmer celledød. Eksempler på slike proteiner kan være calcineurin, calpain og mitogenaktiverte protein kinaser (MAPK) (Martin et al. 1998; Waxman and Lynch 2005).



**Figur 1.2: Skjematisk illustrasjon av apoptotiske veier som aktiveres av NMDA-reseptor overaktivitet.** 1. NMDA-reseptoren overaktiveres. 2. Aktivering av MAPK fører til aktivering av transkripsjonsfaktorer som kan gi apoptose. 3. Frie radikaler som nitrogenoksid ( $NO$ ) og ROS gir toksiske effekter. 4. Apoptoseinduserende enzymer induseres. Bcl-2 = B-cell lymphoma-2, nNOS = nevronal nitrogenoksid syntase, mef 2C = myocyte enhancer factor 2C. Figuren er modifisert fra Lipton (Lipton 2004).

Eksitotoksisitet kan være involvert i patofysiologien til en rekke sykdommer, som epilepsi, Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom og hjerneslag (Lynch and Guttman 2002; Waxman and Lynch 2005)

### **1.3 Apoptose og nekrose**

Celledød kan foregå ved enten apoptose eller nekrose. Apoptose ble først beskrevet på 1970-tallet (Kerr et al. 1972). Denne mekanismen er nødvendig for å fjerne overflødige, skadde eller skadelige celler fra en organisme. Apoptose er en aktiv, programmert prosess. Den kan indueres av mange typer stimuli, som toksiner, dannelse av frie radikaler, innfluks av ioner (se avsnitt 1.2) og mangel på vekstfaktorer (Joza et al. 2002). Kjenntegn er kjerne- og cytoplasmakondensasjon, og en karakteristisk fragmentering av DNA. Cellefragmenter pakkes inn i membranfragmenter. I en organisme vil disse fragmentene bli fjernet av fagocytter (Fink and Cookson 2005).

Nekrose kan indueres av mange av de samme stimuliene som apoptose, og komplekse cellulære mekanismer avgjør hva resultatet av disse stimuliene blir (Denecker et al. 2001). Nekrose har tradisjonelt sett blitt karakterisert som passiv, ukontrollert celledød som fører til frigjøring av inflammatoriske faktorer fra cellene. Cellemembranen ødelegges og cellene lyseres (Fink and Cookson 2005; Proskuryakov et al. 2003). Det er blitt satt spørsmålsteget ved om det er et skarpt skille mellom apoptose og nekrose, siden det er vist at mange cellulære mekanismer er felles for begge to. Tradisjonell apoptose og nekrose kan derfor sies å være ytterkantene i et spektrum av celledøds mekanismer (Proskuryakov et al. 2003).

### **1.4 Steroider**

Steroidene deles inn i ulike klasser; Gonadesteroider, glukokortikoider, mineralokortikoider, neuroaktive steroider, D-vitaminer, tyroideahormoner (Falkenstein et al. 2000).

### **1.4.1 Glukokortikoider**

Glukokortikoider har virkning på nær sagt alle organsystemer som regulerer metabolisme, hydromineral balanse, vekst, utvikling og nevronal funksjon. Denne stoffgruppen er en av de største markedsførte legemidlene på grunn av dens anti-inflammatoriske og immunsuppressive virkning (Borski 2000).

### **1.4.2 Hydrokortison**

Hydrokortison (HC) er et syntetisk glukokortikoid som er identisk med det kroppsegne hormonet kortisol. Vanlig produksjon av kortisol er på omtrent 10mg pr døgn, og denne produksjonen kan øke opp til 400mg pr døgn i stress-situasjoner. Maksimal kortisolkonsentrasjon på et døgn uten stresssituasjon er på rundt 0,4 $\mu$ M (Czock et al. 2005).

### **1.4.3 Deksametason**

Deksametason (9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -metylprednisolon) er et syntetisk glukokortikoid med 25 til 30 ganger høyere anti-inflammatorisk virkning enn samme konsentrasjon hydrokortison. Det har omtrent ingen saltretarderende egenskaper (Rosenberg and Lysz 1980). Deksametason er det glukokortikoidet som oftest har vært brukt hos premature barn til behandling av bronkopulmonal dysplasi (Grier and Halliday 2005). Doseringen brukt i behandlingen av premature barn varierer mye. Det vanligste doseringsregimet som er revidert i en systematisk oversiktsartikkel gir en maksimal dose på 0,5mg/kg/døgn fordelt på 2 doser (Halliday et al. 2001). Hos voksne, friske frivillige førte en deksametasondose på 0,07-0,08mg/kg til en maksimal plasmakonsentrasjon på ca. 100ng/ml, som tilsvarer 0,25 $\mu$ M (Mager et al. 2003). På slutten av 1990-tallet kom det data som viste at deksametasonbehandling av premature barn førte til hemmet nevrologisk utvikling hos mange av disse (Barrington 2001).

### **1.4.4 Klassiske steroideffekter**

De klassiske effektene av glukokortikoider medieres gjennom intracellulære kjernereseptorer som virker som ligandavhengige transkripsjonsfaktorer (se

avsnitt 1.5). Effekten kjennetegnes av at virkningen er forsinket i forhold til eksponering for steroider. I lymfocytter fra rottethymus har endringer i mRNA tidligst vært sett etter 15 minutter. Proteinkonsentrasjoner kan endres etter minimum 30 minutter, og effekter på vev eller organnivå kan trenge timer til dager. I tillegg er den klassiske steroideffekten sensitiv for hemmere av transkripsjon og translasjon (Czock et al. 2005; Falkenstein et al. 2000).

#### **1.4.5 Ikke klassiske steroideffekter**

Det var lenge antatt at steroider bare virker ved å regulere genekspressjon gjennom sine transkripsjonsfaktorer. Noen steroideffekter kommer etter få minutter, og dette er raskere enn det som kan forventes ved effekt på genekspressjonen. Eksempler på slike raske effekter er endret hormonsekresjon, nevronal eksitabilitet, cellemorfologi og karbohydratmetabolisme. Alle steroidklassene kan ha en ikke klassisk steroideffekt, og det er antatt at effekten medieres via membranreseptorer (Borski 2000).

I flere studier er det vist at den klassiske steroidhormonreseptoren er involvert også i ikke-genomiske effekter, og at denne reseptoren da er lokalisert til cellemembranen. Denne typen effekt kan også medieres via andre membranreseptorer, som ioneopererte neurotransmitterreseptorer. Et eksempel på dette er at neuroaktive steroider kan modulere  $\gamma$ -aminosmørsyre (GABA) som en allosterisk koagonist eller antagonist (Falkenstein et al. 2000). I vannsalamanderen *Taricha granulosa* er det vist at steroidreseptoren kan danne et kompleks med G-proteinkoblede reseptorer i nevronale membraner (Orchinik et al. 1994).

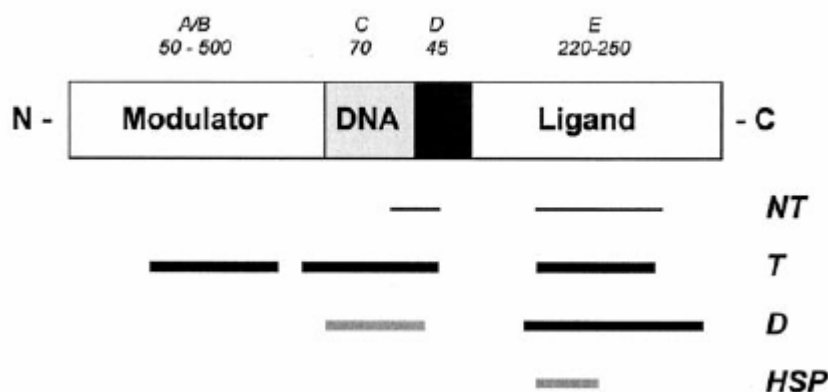
Steroider kan også interagere direkte med membraner, uten at en spesifikk reseptor er involvert. Dette kan endre membranens fysiokjemiske egenskaper, som fluiditeten. Dette skjer antagelig ikke før ved høye steroidkonsentrasjoner, som mer enn 10 $\mu$ M (Falkenstein et al. 2000).



## 1.5 Glukokortikoidreseptoren

Glukokortikoidreseptoren (GR) er en type kjerne-hormon-reseptor i steroid-tyroidea-retinoidreseptor-superfamilien. Til denne gruppen reseptorer hører reseptorer for steroider, tyroidea-hormoner, hormoner derivert fra vitamin A og D og noen fettsyrer (Kumar and Thompson 1999).

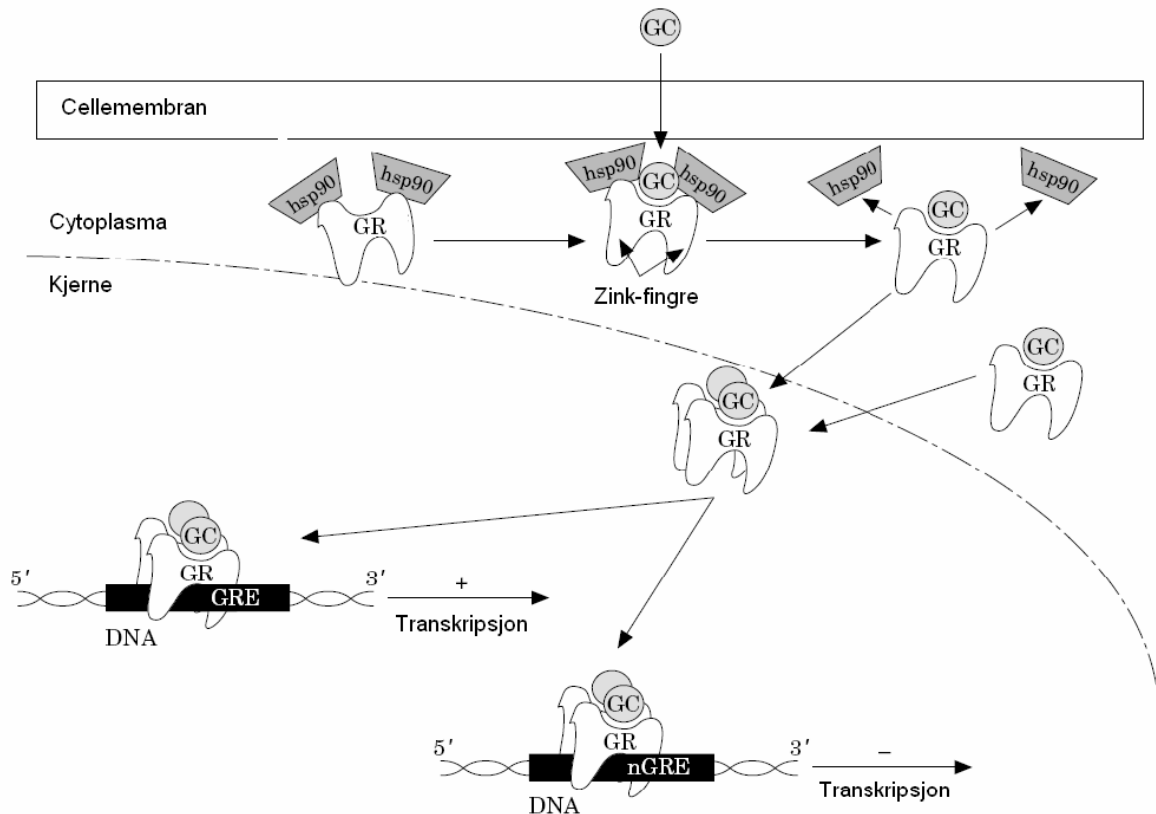
Reseptorene består av et ligandbindende domene (LBD), et DNA-bindende domene (DBD) og flere strukturdeler med transaktiveringsfunksjoner (se figur 1.3) (Falkenstein et al. 2000).



**Figur 1.3: Struktur og funksjonell organisering av steroidreseptoren.** A/B: Variabel N-terminal-region som kan ha modulatorisk effekt på transaktivering. C/D: DNA-bindende del. E: Region ansvarlig for glukokortikoidbinding og kjernetranslokasjon. NT=nukleær transkripsjon. T = transaktivering. D = dimerisering. HSP = 90-kDa Heat-shock protein binding. Figuren er hentet fra Falkenstein (Falkenstein et al. 2000).

GR medierer mesteparten av den biologiske responsen til glukokortikoider. Dette er en intracellulær reseptor som finnes i form av et større kompleks. Komplekset er bestående av GR sammen med flere proteiner, der et av de viktigste proteinene er HSP90 (se figur 1.4) (Kumar and Thompson 2005). Glukokortikoidene kommer inn i cellene ved hjelp av diffusjon (Rosen and Miner 2005). Når liganden bindes til reseptoren, dissosierer GR fra proteinene i komplekset før reseptor-ligand-komplekset går inn i kjernen. Der interagerer komplekset med kritiske regulatoriske seter på såkalte glukokortikoidrespons-elementer (GRE) i DNA. Binding til GRE fører til opp- eller nedregulering av relevante gener. Interaksjonen kan være direkte med

spesifikke DNA-sekvenser eller sammen med et utvalg av proteiner (Kumar and Thompson 1999).



**Figur 1.4: Glukokortikoiders virkningsmekanisme via den klassiske GR.** Den inaktive GR befinner seg bundet til proteiner i cytoplasma. Når et glukokortikoid diffunderer gjennom cellemembranen og binder GR, vil proteinene dissosiere fra GR som da kan bevege seg inn i kjernen. Der binder den GRE og fører til opp- eller nedregulering av spesifikke gener. Figuren er modulert fra Umland et al. (Umland et al. 2002).

## 1.6 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren

Flere studier tyder på at det kan være en sammenheng mellom glukokortikoidindusert neurotoksisitet og NMDA-reseptoren. Hos nevrone fra rottehippocampus er det vist at corticosterone fører til forlengelse av NMDA-reseptormediert økning i fritt intracellulært kalsium. Denne kalsiumøkningen gjør at mitokondrienes membranpotensial tapes. Både deksametason og kortisol har en lignende effekt. Corticosterone-effekten er ikke mediert via den klassiske mekanismen for glukokortikoidvirkning via kjerne reseptorer. Det er derimot vist at reseptoren sitter i cellemembranen, og det er antatt at kalsiumøkningen skyldes en interaksjon mellom denne

reseptoren og NMDA-reseptoren (Takahashi et al. 2002). Denne antakelsen støttes av at GR er funnet i cellemembranen. Ved bruk av elektronmikroskop på rottehjerner ble det funnet GR i postsynaptiske membraner i lateral amygdala (Johnson et al. 2005). En studie utført på hippocampus fra rotte viser at eksponering med corticosterone i tillegg til NMDA øker den NMDA-medierte cytotoxiciteten. Her skjedde dette uavhengig av glukokortikoidreseptorens funksjon eller proteinsyntese siden disse effektene ikke ble forhindret av mineralokortikoidreseptorantagonisten spironolakton, GR-antagonisten RU-486 eller proteinsyntesehemmeren cycloheximide. Effektene ble blokkert av NMDA-reseptorantagonisten MK-801 (Mulholland et al. 2006). I en annen celletype, korncellenevroneer fra rottecerebellum, vises det at deksametason fører til apoptose, og at denne effekten reduseres av NMDA-reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551.  $Mg^{2+}$  har ikke den samme effekten (Jacobs et al. 2006).

Det er ikke kjent om interaksjonen mellom GR og NMDA-reseptoren er direkte eller indirekte. Det er heller ikke vist om NMDA-reseptorens subenhets sammensetning har betydning for denne interaksjonen.

## 1.7 Hensikten med studien

Flere studier tyder på at glukokortikoidindusert nevrotoksisitet har en sammenheng med NMDA-reseptoren. Det er vist at deksametasonindusert celledød reduseres av NMDA-reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551.

Målene med denne oppgaven har vært å:

- Undersøke om glukokortikoiders potens kan detekteres i et reporter-gen assay.
- Undersøke om NMDA-reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551 har en direkte virkning på GR.
- Finne ut om et luciferasereportersystem i CV-1 celler er egnet til å undersøke interaksjoner mellom GR og NMDA-reseptoren.
- Undersøke om det er en interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren.
- Undersøke hvordan NMDA-reseptorsubenheter fordeles når CV-1 celler transfekteres for å uttrykke dem.

## 2 MATERIALER OG METODER

### 2.1 CV-1 celler

CV-1 celler er en nyrecellelinje som ble startet på begynnelsen av 1960-tallet. Den kommer fra nyreceller fra en afrikansk apeart, *Cercopithecus aethiops*. Cellelinjen er stabil, vokser bra og blir konfluent etter 3-4 dager (Hopps et al. 1963).

#### 2.1.1 Splitting av CV-1 celler

CV-1 cellene ble dyrket i 175 cm<sup>2</sup> flasker, og inkubert i inkubatorskap ved 37 °C og 5% CO<sub>2</sub>. Cellene ble splittet hver 3. eller 4. dag.

**Tabell 2.1: CV-1 medium**

Fetal bovine serum (FBS) 50ml
Natriumpyruvat (100mM) 5ml
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 000µg/ml) 5ml
Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM) 500ml

Prosedyre for splitting av CV-1 celler til cellekulturflaske:

1. Cellekulturflasken undersøkes i mikroskop for å finne ut om cellene er konfluente.
2. Gammelt medium tømmes av flasken.
3. 2 ml trypsin-EDTA tilsettes. Flasken beveges slik at hele bunnen skylles. Væsken tømmes av.
4. 2 ml trypsin-EDTA tilsettes igjen. Denne tømmes av etter ca. 30 sekunder.
5. Flasken settes i inkubatorskap i 5-10 minutter.
6. Flasken tas ut og det bankes godt på sidene av flasken slik at cellene løsner fra bunnen.
7. Løsner ikke cellene gjentas punkt 4-6.
8. 10 ml CV-1 medium med serum (tabell 2.1) tilsettes.

9. Løsningen pipetteres opp og ned ca 10 ganger for å få en jevn fordeling av cellene. Når løsningen pipetteres ned, spyles bunnen av flasken.
10. 1,5 ml celleduspensjon settes igjen i den gamle flasken som brukes som "back-up" og 1,5ml tilsettes til en ny cellekulturflaske som brukes ved neste splitting.
11. Cellekulturflaskene tilsettes 20 ml CV-1 medium med serum hver.

Prosedyre for splitting av CV-1 celler til skåler:

1. Cellene splittes som beskrevet i punkt 1-9 ovenfor.
2. Volum av celleduspensjonen som skal brukes til skåler regnes ut etter denne formelen:

$$X(\text{ml}) = \frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{celletettheten per skål}}{\text{Celletettheten i flasken}}$$

3. Når cellene er konfluente er celletettheten i flasken ca.  $140 \times 10^4$  celler pr ml. Er cellene ikke konfluente, må celletettheten finnes ved telling. En dråpe av celleduspensjonen legges i et tellekammer. Det telles 2 rutenett, et på hver side av midten av tellekammeret. Celletettheten i flasken beregnes ved å finne gjennomsnittet av de 2 tellingene.
4. Den utregnede mengden celleduspensjon tilsettes et volum av CV-1 medium funnet ved hjelp av denne formelen:

$$Y(\text{ml}) = (\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler}) - \text{Volum av celleduspensjonen brukt}$$

5. Celleduspensjonen og CV-1 mediet blandes og overføres til sterile skåler.

### 2.1.2 Transfeksjon av CV-1 celler

Cellene transfekteres dagen etter at de er splittet ut til skåler.

**Tabell 2.2: BBS**

BES 5,33g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1335g

5M NaCl 28ml

MQ vann til 500ml

Fordeles i 5 flasker der pH justeres med NaOH til 6.75, 6.85, 6.95, 7.00, 7.05 og sterilfiltreres. Transfeksjonseffektiviteten for løsningene med ulik pH testes ved å transfektere inn gener som gir luciferaseproduksjon. Deretter måles luciferaseaktivitet på et luminometer. Løsningene med best transfeksjonseffektivitet brukes videre til transfeksjon.

**Tabell 2.3: 0,25M CaCl<sub>2</sub>**CaCl<sub>2</sub> 36,75g

Destillert vann 100ml

Sterilfiltreres

Fortynnes i forhold 1:10 med sterilisert MQ vann.

Prosedyre for transfeksjon av CV-1 celler:

1. Den totale konsentrasjonen av DNA skal være 1µg/ml medium i skålene som skal transfekteres, og blandes ut i 1/10 av volumet i skålene. Mengde DNA som brukes er angitt i tabell 2.4.
2. Mengde transfeksjonsløsning regnes ut etter denne formelen:

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

3. Like mengder BBS (tabell 2.2) og 0,25 M CaCl<sub>2</sub> (tabell 2.3) blandes for å oppnå beregnet mengde transfeksjonsløsning.
4. Volumet av hver plasmidløsning som skal tilsettes beregnes etter denne formelen:

$$Y(\mu\text{l}) = \frac{\text{ønsket konsentrasjon i transfeksjonsløsningen } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{volum transfeksjonsløsning } (\mu\text{l})}{\text{plasmidløsningens konsentrasjon } (\mu\text{g}/\mu\text{l})}$$

5. Når plasmidene som er ønsket i forsøket er tilsatt, fylles det opp med CMV slik at mengden DNA blir totalt 10µg/ml transfeksjonsløsning. CMV er et tomt plasmid som ikke koder for noen gener.
6. Røret med transfeksjonsløsningen whirlmikses i 10 sekunder.
7. Transfeksjonsløsningen inkuberes i romtemperatur i 20 minutter.
8. Mengde transfeksjonsløsning som skal tilsettes til hver skål regnes ut etter denne formelen:

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

9. Transfeksjonsløsningen tilsettes skålen dråpevis mens skålen beveges forsiktig slik at transfeksjonsløsningen blandes i mediumet.
10. Skålene inkuberes ved 37° C og 5% CO<sub>2</sub>.
11. På skålene som brukes til mikroskopering skiftes mediumet etter ca. 6 timer. På skålene som brukes til luciferasemålinger blir mediumet skiftet etter ca. 24 timer.

**Tabell 2.4: Plasmider brukt til transfeksjon**

Genprodukt	Kilde	Plasmidets forkortelse	Konsentrasjon pr ml transfeksjonsløsning
Ildfluoluciferase	Gave fra J.Milbrandt, Washington University School of Medicine	GRE-luc	4µg
Ildfluoluciferase	Promega Co. Wisconsin, USA	rsv-luc	0,05µg
Renillaluciferase	Promega Co. Wisconsin, USA	RL-CMV	0,05µg
Ingen genprodukt	(Wilson et al. 1991)	CMV	Til totalt 10µg plasmid
GR	Gave fra J.Milbrandt, Washington University School of Medicine	GR	2µg



NMDAR subenhet NR1-1a	Gave fra S.Vicini, Georgetown University School of Medicine	NR1-1a	2µg
NMDAR subenhet NR2A	Gave fra S.Vicini, Georgetown University School of Medicine	NR2A	2µg
NMDAR subenhet NR2C	Gave fra S.Vicini, Georgetown University School of Medicine	NR2C	2µg
NMDAR subenhet NR3A	Gave fra dr.D Zhang, Burnham institute	NR3A	2µg
NMDAR subenhet NR3B	Gave fra dr.D Zhang, Burnham institute	NR3B	2µg
Yfp-merket NMDAR subenhet NR1-1a	Gave fra S.Vicini, Georgetown University School of Medicine	NR1-1a-yfp	1µg eller 2µg
Gfp-merket NMDAR subenhet NR2A	Gave fra S.Vicini, Georgetown University School of Medicine	NR2A-gfp	1µg eller 2µg
Gfp-merket NMDAR subenhet NR3A	Gave fra I. Pérez-Otaño, The Salk Institute for Biological Studies	NR3A-gfp	2µg

## 2.2 Eksponering med agonister og antagonister

Agonister og antagonister ble tilsatt 24 timer etter transfeksjonen. På skålene til luciferasemålinger ble medium skiftet umiddelbart før tilsetting.

### 2.2.1 Deksametason

Der ikke annet er oppgitt ble det tilsatt en mengde som svarte til en konsentrasjon på 10nM i mediet.

**Tabell 2.5: Deksametasonløsning 10mM**

Deksametason 39,2mg 96 % etanol 10ml
---

Deksametasonløsningen ble fortynnet videre i 96 % etanol til 10mM, 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 0,01 $\mu$ M, 0,001 $\mu$ M og 0,0001 $\mu$ M, og tilsatt i mediet i forhold 1:1000.

### 2.2.2 Hydrokortison

**Tabell 2.6: Hydrokortisonløsning 10mM**

Hydrokortison 36,2mg
96% etanol 10ml

Hydrokortisonløsningen ble fortynnet videre i 96% etanol til 10mM, 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M, 0,01 $\mu$ M og 0,001 $\mu$ M og tilsatt mediet i forhold 1:1000.

### 2.2.3 MK 801

**Tabell 2.7: MK 801-løsning 1mM**

MK 801 10mg
MQ vann 29,641ml

### 2.2.4 CGP 39551

**Tabell 2.8: CGP 39551-løsning 100mM**

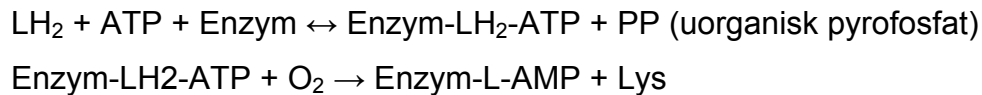
CGP 39551 10mg
MQ vann 0,420ml

## 2.3 Luciferase

Luciferaser er enzymer som katalyserer omdanning av luciferiner i en prosess som avgir fotoner. Det finnes ulike luciferaseenzymer og luciferiner, som er isolert fra forskjellige organismer (Fan and Wood 2007). Lyssignalet som avgis kan måles med et luminometer (Lorenz et al. 1991).

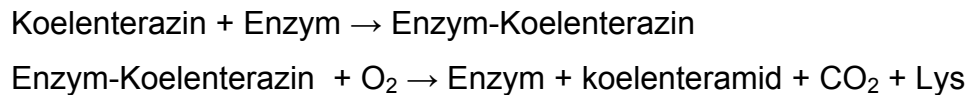
### 2.3.1 Ildflueluciferase

Ildflueluciferase er isolert fra ildfluen *Photinus pyralis* (Fan and Wood 2007). D-luciferin (D-LH<sub>2</sub>) aktiveres i en enzymavhengig prosess der det reagerer med adenosine 5-trifosfate (ATP) slik at det dannes et kompleks som består av D-LH<sub>2</sub>, AMP og enzymet luciferase. Neste trinn i reaksjonen er avhengig av oksygen, og det er denne reaksjonen som frigir lys (Seliger et al. 1961).



### 2.3.2 Renillaluciferase

Renillaluciferase er et luciferaseenzym som er isolert fra korallen *Renilla reniformis*. Dette enzymet katalyserer en oksidativ dekarboksylering av koelenterazin (renillaluciferin) i nærvær av oppløst oksygen, og gir koelenteramid (oksy-luciferin), CO<sub>2</sub> og lys (Lorenz et al. 1991).



### 2.3.3 Høsting av celler til luciferasemåling

Cellene høstes 2 dager etter at de er transfektert med et reporter-gen som gir luciferaseproduksjon. Plasmidene som ble brukt er rsv-luc, GRE-luc og RL-CMV.

#### Tabell 2.9: 0,1 % LUC

1M Tris, pH justert med 1M MES til pH 7,8: 5ml
MQ vann, romtemperert: 95ml
Triton x-100: 100µl
Oppbevares i kjøleskap

**Tabell 2.10: PBS**

NaCl: 32g

KCl: 0,8g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1,08g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ : 7,12g

MQ vann: 3950ml

HCl: Til pH 7,4

Autoklaveres, oppbevares i kjøleskap.

Prosedyre for høsting av celler til luciferasemåling fra 58mm skåler:

1. Et volum 0,1 % LUC (tabell 2.9) som er passende til antall skåler som skal høstes, tilsettes DTT i konsentrasjon 1mM.
2. Mediet helles av skålene og restene fjernes med en pipette.
3. Skålene vaskes ved at 2 ml PBS (tabell 2.10) tilsettes og skålen beveges forsiktig slik at hele skålen skylles.
4. PBS helles av og restene fjernes med en pipette.
5. Punkt 3 og 4 gjentas.
6. 300  $\mu\text{l}$  0,1 % LUC med 1mM DTT tilsettes til midt på hver skål.
7. Skålene inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
8. Cellene skrapes løs med en celledrape. Først skrapes det over hele skålen i en retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skraping.
9. Cellesuspensjonen overføres til et eppendorfrør ved hjelp av en pipette.
10. Eppendorfrørene sentrifugeres ved 4 °C i 5 minutter ved 13000 rpm (16 000 x g).

### 2.3.4 Måling av ildflueluciferase

**Tabell 2.11 Luciferin 1mM**

Luciferin: 11mg MQ vann: 36,7ml Oppbevares i kjøleskap beskyttet mot lys.
---

**Tabell 2.12 LUC-coctail**

Adenosin 5-trifosfat (ATP): 240mg 1M Magnesiumacetat: 2ml 1M Tris/1M MES pH 7,8: 8,3ml MQ vann: 89,7ml Oppbevares ved -20° C.
---

Måling av ildflueluciferaseaktivitet:

1. 1mM luciferinløsning (tabell 2.11) plasseres i dispenseren på maskinen.
2. Det tas ut 50 µl av supernatanten fra cellehøstingen. Denne blandes med 150 µl LUC-coctail (tabell 2.12) i et lite glassrør.
3. Glassrøret med prøveblandingen settes i luminometeret. Apparatet innstilles på program 2 slik at 100µl luciferin tilsettes automatisk og lysintensiteten måles i 2 sekunder.

### 2.3.5 Måling av renillaluciferase

**Tabell 2.13: Stop & Glo reagens**

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

Måling av renillaluciferaseaktivitet:

1. Stop & Glo-reagens (tabell 2.13) fortynnes 10 ganger med MQ vann.
2. Luminometeret innstilles på program 5, for manuell prosedyre.

3. 100  $\mu$ l fortynnet Stop & Glo-reagens overføres til et glassrør. Denne tilsettes supernatanten fra cellehøstingen. Volumet av supernatanten som tilsettes ligger vanligvis mellom 0,5  $\mu$ l og 50  $\mu$ l. Det måles på flere ulike volum for å sjekke at målingene er i det lineære området, og ut i fra dette finnes et passende volum å foreta alle målingene på. Verdiene bør helst ligge i et 5- eller 6-sifret område.
4. Det måles to paralleller av hver prøve og gjennomsnittet brukes som resultat. Avviker parallellene mer enn 20 % måles en tredje parallell og medianen av de 3 parallellene brukes som resultat.

## 2.4 Mikroskopering

CV-1 cellene ble mikroskopert med et fluorescens mikroskop (Nicon eclipse TE 300) 2 dager etter transfeksjon med et gen som koder for NMDA-reseptorsubenheter merket med gult fluoreserende protein (yfp) eller grønt fluoreserende protein (gfp). Gfp er et fluoriserende protein som opprinnelig ble klonet fra maneten *Aequoria victoria* (Yuste 2005). Dette proteinet har blitt mutert i flere varianter, blant annet til yfp (Nagai et al. 2002). På denne måten er det mulig å se NMDA-reseptorsubenheterens fordeling i cellene. Det ble tatt bilder fra 2-3 ulike steder fra hver skål med celler. På hvert sted ble det tatt et fluorescensbilde og et fasekontrastbilde.

## 2.5 Produkter og utstyr

### 2.5.1 Produkter

Produkt	Produsent
ATP (Adenosin 5-trifosfat)	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
BES (N,N-Bis-(2-hydroksyetyl)-2-aminoetansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
CaCl <sub>2</sub> (Kalsiumklorid)	Merck & Co., Inc. New Jersey, USA
CGP 39551	Ciba Geigy, nå Novartis International AG Basel, Sveits
Deksametason (dex)	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
D-Luciferin	Duchefa Haarlem, Nederland
Dulbecco`s modified Eagle`s medium (D-MEM)	Invitrogen Co. California, USA
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
Etanol 96%	Arcus produkter, Oslo, Norge
Fetal bovine serum (FBS)	Invitrogen Co. California, USA
Hydrokortison (HC)	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
KCl (Kaliumklorid)	Koch-Light Laboratories Ltd. Colnbrook Bucks, England
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenfosfat)	Merck & Co., Inc. New Jersey, USA
NaCl (Natriumklorid)	J.T. Baker Deventer, Nederland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (di-Natriumhydrogenfosfat-dihydrat)	Merck & Co., Inc. New Jersey, USA
NaOH (Natriumhydroksid)	J.T.Baker Deventer, Nederland

Magnesiumacetat ( $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ )	Merck & Co., Inc. New Jersey, USA
MK 801	RBI Massachusetts, USA
MES (2-(N-morpholino)etansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen Co. California, USA
Stop & Glo buffer	Promega Co. Wisconsin, USA
Stop & Glo substrat	Promega Co. Wisconsin, USA
Tris (Trishydroksymetylaminometan)	MP Biomedicals Ohio, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Invitrogen Co. California, USA

### 2.5.2 Utstyr

- Cellekulturflasker 175 cm<sup>2</sup>, Nunclon
- Cellekulturskåler 21,5cm<sup>2</sup>, Nunclon
- CO<sub>2</sub> inkubatorskap, Thermo Forma, Steri-cycle CO<sub>2</sub> incubator med hepafilter, Forma Scientific
- Fluorescens mikroskop, Nikon eclipse TE 300 med SPOT RT fargekamera fra Diagnostic instrumens
- Gassbrenner, Fireboy plus, Integra biosciences
- LAF-benk, Holten safe 2000, model 1.2
- Luminometer, Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Tyskland
- Lysmikroskop, Nikon TMS-F 104
- pH-meter, Metrohm 744



- Sentrifuge, Biofuge fresco, Thermo electron corporation
- Sterilfilter, Whatman 0,2µm, Schleicher & Schual
- Tellekammer, Bürker, Marienfeld, Tyskland
- Vannbad, Techne TE-10A
- Vannrenseanlegg, Aquatron A4S
- Vekt, Sartorius basic, Kebolab AS, Norge
- Vekt, Mettler Toledo AB54-S, Sveits

## **2.6 Figurer og statistikk**

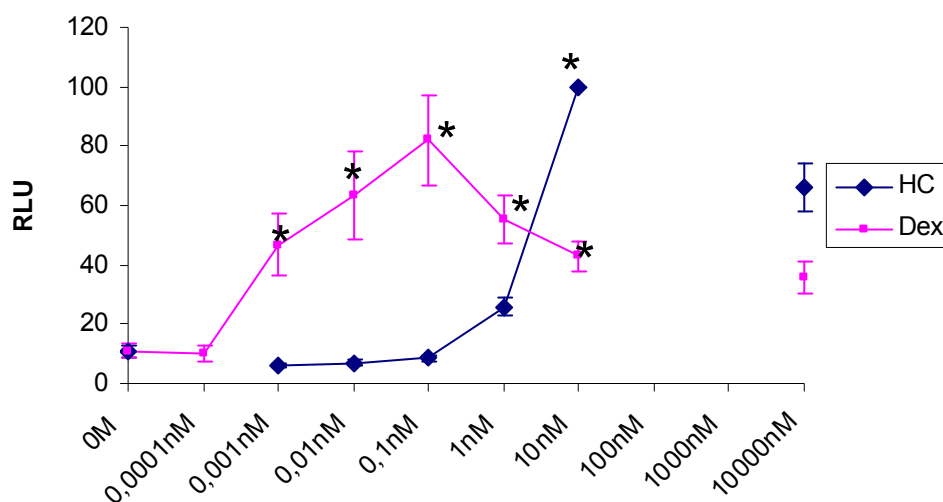
Grafer og tabeller ble laget ved hjelp av Microsoft Office Excel 2003 fra Microsoft Corporation. Figurer viser gjennomsnitt med standard feil. Programvaren Sigma Stat 3.2 fra SPSS Inc., Chicago USA ble brukt til den statistiske analysen av dataene. For å sammenligne flere grupper ble One Way Analysis of Variance (One Way ANOVA) brukt. Hvis tallmaterialet ikke var normalfordelt, ble Kruskal-Wallis one way ANOVA on ranks med Dunns metode brukt. For å sammenligne 2 grupper ble t-test brukt. Dersom tallmaterialet ikke var normalfordelt ble Mann-Whitney rank sum test brukt.

### 3 RESULTATER

#### 3.1 Agonister og antagonisters konsentrasjonsavhengige virkning på luciferaseaktivering

##### 3.1.1 Hydrokortison og deksametasons aktivering av luciferaseaktivitet

Celler ble transfektert med GRE-luc og GR, og eksponert for ulike konsentrasjoner av deksametason og hydrokortison for å finne ut i hvilken grad disse stoffene fører til ildfluelluciferaseaktivering ved de ulike konsentrasjonene. Resultatet viser at deksametason har maksimal respons ved en konsentrasjon på 0,1nM (figur 3.1). Over denne konsentrasjonen går luciferaseverdien ned. Hydrokortison har en målt maksimal respons på 10nM, og ved målingen på 10000nM går luciferaseverdien ned.

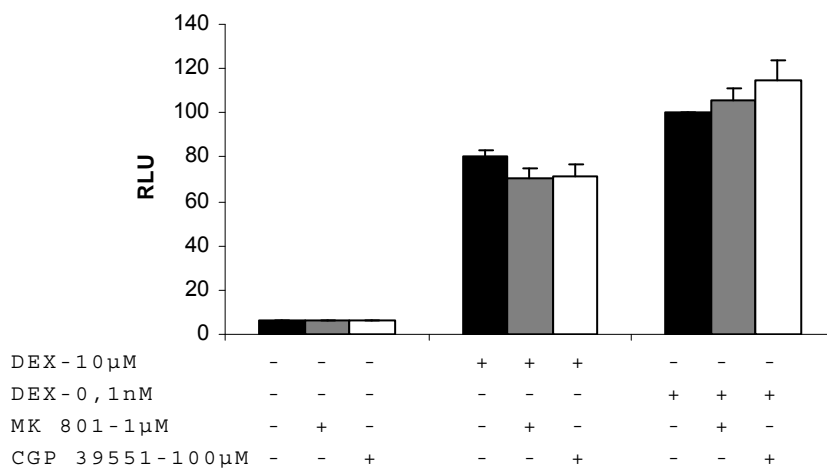


**Figur 3.1: Konsentrasjonsavhengig respons fra HC og dex.** Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet i prosent for ulike konsentrasjoner av HC og dex med standard feil. Antall forsøk (n)=4-5. Punktene angir der målinger er foretatt. \* betyr at målingene er statistisk signifikant forskjellige fra målinger uten ligand. RLU=Relative luciferase units.

### 3.1.2 NMDA-reseptorantagonisters effekt på luciferasemålingene

Cellene ble transfektert med GRE-luc og GR. Det ble tilsatt 2 ulike konsentrasjoner av deksametason. Konsentrasjonene ble valgt på bakgrunn av resultatet fra målingene på konsentrasjonsavhengig deksametason- og hydrokortison-respons. Den ene konsentrasjonen som ble valgt var den som gav maksimal deksametasonrespons (0,1nM), og den andre konsentrasjonen som ble valgt er tidligere vist å være toksisk i nevroner (10µM). To ulike NMDA-reseptorhemmere som reduserer nevrondød induert av deksametason ble tilsatt for å se om disse påvirker GR direkte (Jacobs et al. 2006).

Resultatet viser at ingen av de to NMDA-reseptorhemmerene har en direkte virkning på GR (figur 3.2).



**Figur 3.2: NMDA-reseptor antagonisters påvirker ikke på GRs transkripsjonelle aktivitet.** Figuren viser gjennomsnittlig ildfluoluciferaseaktivitet med standard feil. n = 4. Statistisk sammenligning av hver av gruppene viser at det ikke er en statistisk signifikant forskjell mellom bare dex, og dex i tillegg til MK 801 eller CGP 39551. RLU=Relative luciferase units.

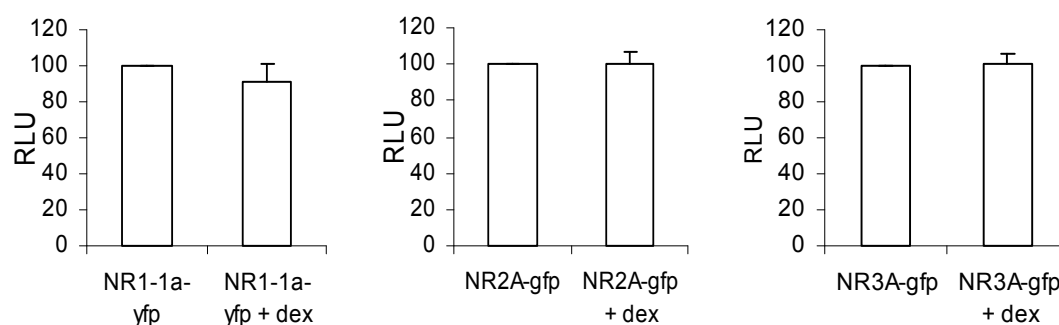
### 3.2 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren

For å undersøke om det er en direkte protein-protein interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren, ble et analyseforsøk der CV-1 celler ble transfektert med reporter gener som gir ildflueluciferase, satt opp. Cellene ble også transfektert med RL-CMV som gir renillaluciferase, og ble brukt som en intern standard for å korrigere for forskjell i transfeksjonseffektiviteten. Luciferaseresultater fra ulike forsøk kan ikke sammenlignes direkte siden mengden luciferase varierer fra forsøk til forsøk. Derfor er alle resultatene standardisert, og oppgis i prosent.

#### 3.2.1 Deksametasons påvirkning på renillaluciferase

Renillaluciferase kodes for av et gen med sterk promotor (CMV). For å undersøke om renillaluciferase kan brukes som intern standard ble det undersøkt om deksametason påvirker renillaluciferaseaktiviteten (figur 3.3). CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc i tillegg til de ulike NMDA-reseptorsubenheter som skal brukes i senere forsøk. Deksametason ble satt til halvparten av skålene og sammenlignet med ubehandlede skåler.

Resultatet viser at deksametason ikke påvirker renillaluciferasemålingene direkte.

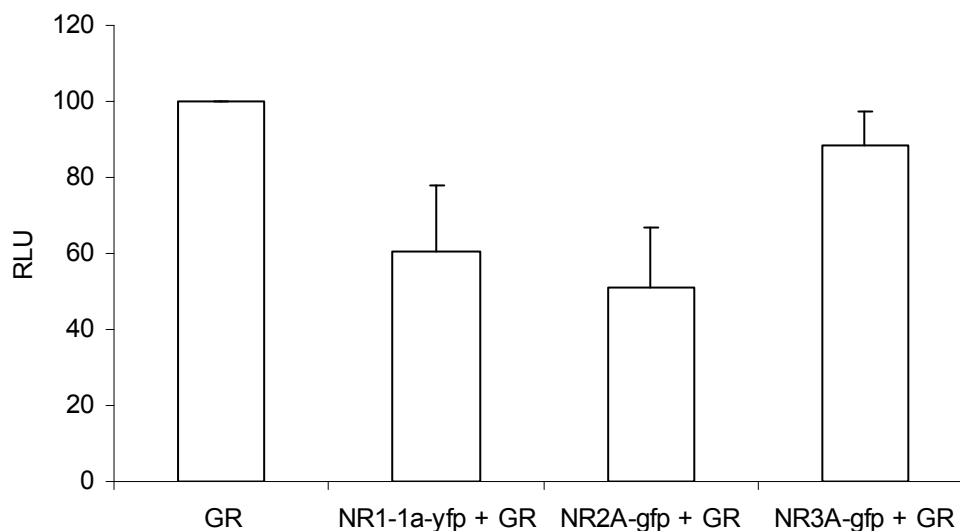


**Figur 3.3: Dex påvirker ikke renillaluciferase.** Celler transfektert med RL-CMV, GRE-luc og ulike NMDA-reseptorsubenheter ble tilsatt dex (10nM). Cellene ble høstet og renillaluciferasemålinger ble foretatt på disse og på et sett like prøver som ikke var blitt tilsatt dex. Figurene viser gjennomsnittlige renillaluciferasemålinger med standard feil. n=5-6. Det var ingen statistisk signifikant forskjell i skålene med og uten dex. RLU=Relative luciferase units.

### 3.2.2 NMDA-reseptorsubenheters påvirkning på renillaluciferase

For å undersøke om renillaluciferase kan brukes som intern standard, ble det undersøkt om de ulike NMDA-reseptorsubenhetene påvirker renillaluciferasemålinger. CV-1 celler ble kotransfektet med GRE-luc, GR og de ulike subenhetene (figur 3.4).

Resultatet viser at renillaluciferaseverdiene kan ha en tendens til å reduseres noe når subenhetene transfekteres inn sammen med GR. Forskjellen er ikke statistisk signifikant. Det er også en tendens til at NR3A-gfp ikke gir like stor reduksjon i renillaluciferaseverdiene som de to andre subenhetene.

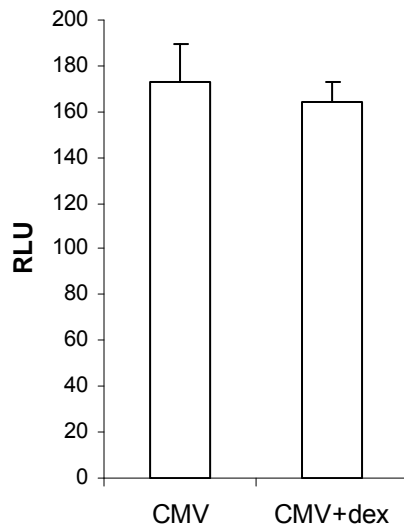


**Figur 3.4: NMDA-reseptorsubenheter påvirker ikke renilla.** Celler kotransfektet med GR og de ulike subenhetene er høstet og renillaluciferaseaktivitet er målt. Figuren viser gjennomsnittlige renillaluciferasemålinger med standard feil. n=5-6. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene. RLU=Relative luciferase units.

### 3.2.3 Deksametasons påvirkning på ildflueluciferase

For å undersøke om deksametason påvirker ildflueluciferase direkte ble CV-1 celler transfektet med rsv-luc, et plasmid som uttrykker ildflueluciferase under kontroll av en sterk promotor (rsv). Cellene ble tilsatt deksametason, og sammenlignet med en kontroll uten deksametason.

Resultatet viser at deksametason ikke påvirker ildflueluciferasemålingene direkte (figur 3.5).

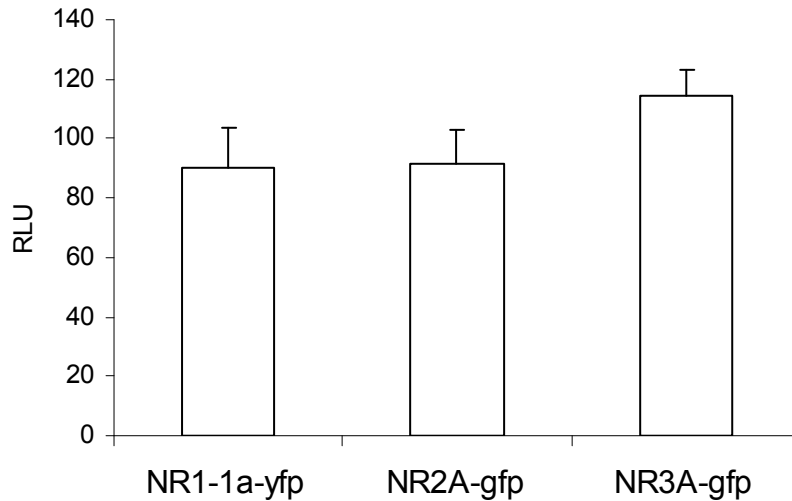


**Figur 3.5: Dex påvirker ikke ildflueluciferase.** Rsv-luc transfekterte celler ble høstet, og luciferase ble målt for celler med og uten tilsatt dex. Renillaluciferase ble brukt som intern standard. Figuren viser gjennomsnittlige ildflueluciferasemålinger delt på renilla i prosent med standard feil. Antall forsøk (n) = 4. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene. RLU=Relative luciferase units.

### 3.2.4 NMDA-reseptorsubenhetenes påvirkning på ildflueluciferase

For å undersøke om de ulike NMDA-reseptorsubenhetenes påvirker ildflueluciferase direkte ble cellene kotransfektet med rsv-luc og en av subenhetenes etter tur. De ulike subenhetenes ble sammenlignet med hverandre (figur 3.6).

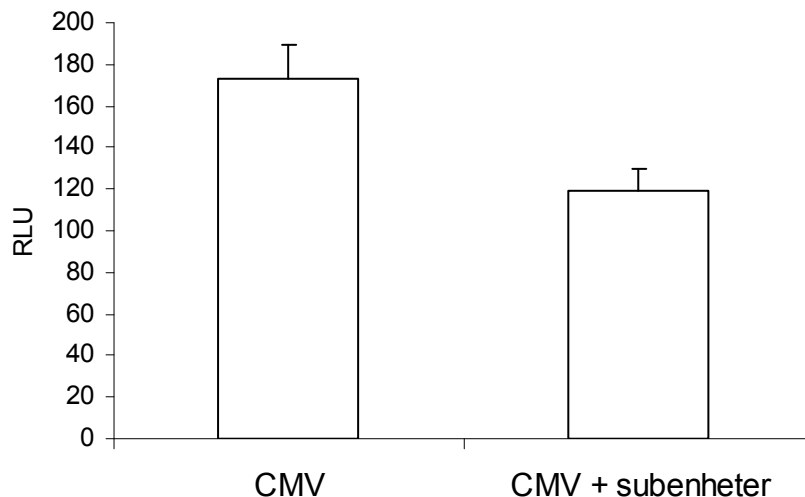
Resultatet viser at det ikke er en statistisk signifikant forskjell mellom NR1-1a-yfp, NR2A-gfp og NR3A-gfp. Samme resultat gjelder for subenhetenes når de er tilsatt deksametason (ikke vist). NR3A-gfp viser en tendens til høyere ildflueluciferaseaktivitet enn de to andre subenhetenes.



**Figur 3.6: NMDA-reseptorsubenheter påvirker ikke ildflueluciferase.** Rsv-luc-transfektete celler ble høstet og luciferase målt for celler transfektet med de ulike subenheterne. Renillaluciferase ble brukt som intern standard. Figuren viser gjennomsnittlige ildflueluciferasemålinger delt på renilla i prosent med standard feil. Antall forsøk (n) = 5-7. RLU=Relative luciferase units.

For å undersøke om subenheterne påvirker ildflueluciferase ble cellene kotransfektet med rsv-luc og de enkelte subenheterne enkeltvis og sammenliknet med et "tomt plasmid" (CMV) (figur 3.7).

Ildflueluciferaseverdiene viser en tendens til å gå ned når cellene transfekteres med subenheter i tillegg til rsv-luc. Forskjellen er ikke statistisk signifikant.



**Figur 3.7: NMDA-reseptorens subenheter påvirker ikke ildflueluciferase.** Rsv-luc transfekterte celler ble høstet og luciferase målt for celler transfektert med subenheter, og celler ikke transfektert med subenheter. Renillaluciferase ble brukt som intern standard. Figuren viser gjennomsnittlige ildflueluciferasemålinger i prosent med standard feil. Antall forsøk (n) = 3-4. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene. RLU=Relative luciferase units.

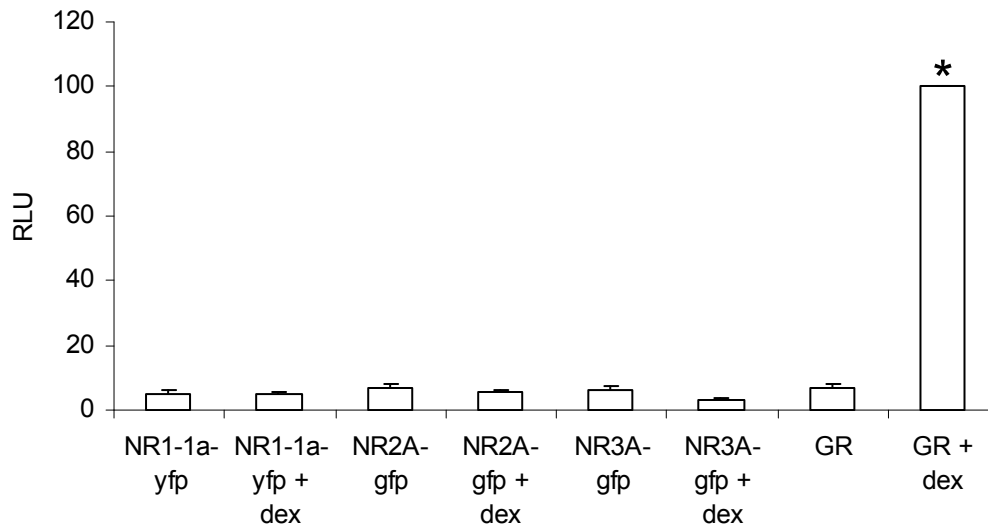
### 3.2.5 GRE-luc-aktivering

GRE-luc er et plasmid med GRE som promotor, og skal brukes som reporter gen for GR. For å undersøke om GRE-luc aktiveres av subenheterne eller GR alene, ble cellene transfektert med gener for de ulike subenheterne og GR i tillegg til GRE-luc (figur 3.8). Renillaluciferase ble brukt som intern standard.

Det er en mulighet for at mediet kan inneholde en liten mengde GR-ligand. Derfor var det også et mål å undersøke om celler transfektert med GR har høyere luciferaseaktivitet enn celler uten GR.

Subenheterne eller GR uten deksametason fører til lav luciferaseproduksjon. GR med deksametason førte til høy luciferaseproduksjon, og dette viser at GRE-luc er induserbar av GR med deksametason som ligand. GRE-luc aktiveres ikke av NMDA-reseptorsubenheterne eller av GR uten ligand. Det var heller ingen statistisk signifikant forskjell i luciferaseaktivitet mellom cellene med GR som ikke var tilsatt ligand og cellene uten GR.





**Figur 3.8: Ildfluoluciferase krever GR og dex for aktivitet.** Celler transfektert med GRE-luc og de ulike subenhetene ble høstet og luciferase målt. Renillaluciferase er brukt som intern standard. Figuren viser gjennomsnittlige ildfluoluciferasemålinger med standard feil. n = 5-6.\* betyr en statistisk signifikant forskjell når prøven tilsatt dex er sammenlignet med sin parallell som ikke er tilsatt dex. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom GR uten dex, og de ulike subenhetene med og uten dex. RLU=Relative luciferase units.

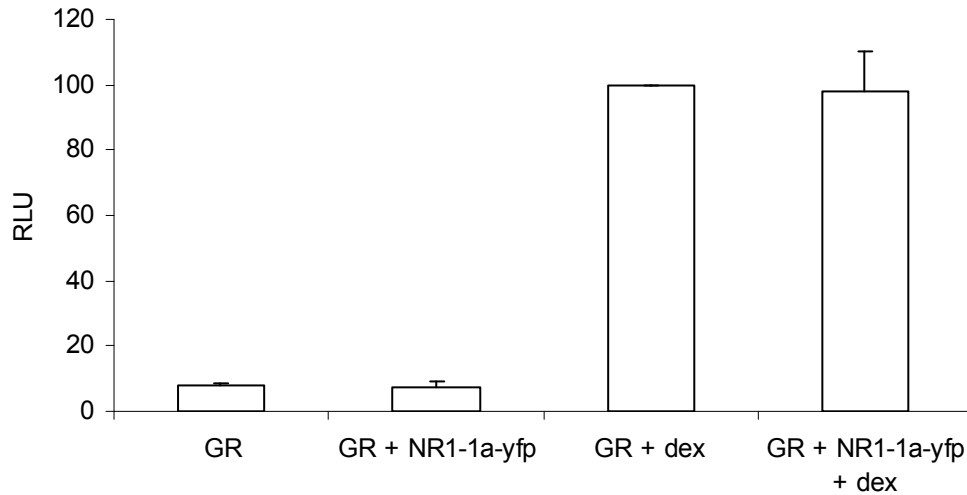
### 3.2.6 NMDA-reseptorsubenhetenes påvirkning på GRE-luc-målingene

For å teste om det er en interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren ble CV-1 celler transfektert med GR og ulike NMDA-reseptorsubenheter. GRE-luc ble brukt som reporter gen. Ved interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren i cytosol, forventes redusert luciferaseaktivitet. Ildfluoluciferasemålinger for celler transfektert med GR ble sammenlignet med celler kotransfektet med GR og en NMDA-reseptorsubenhet (figur 3.9-3.11). I tillegg til å måle luciferaseaktivitet hos disse cellene var det ønskelig å se på fordelingen til de ulike NMDA-reseptorsubenhetene i cellene (avsnitt 3.3). Derfor ble det brukt subenheter merket med fluoriserende protein (yfp eller gfp).

#### Interaksjon mellom NR1-1a-yfp og GR

Resultatet viser at ildfluoluciferaseaktiviteten ikke påvirkes når celler kotransfektet med NR1-1a-yfp og GR sammenlignet med transfeksjon med

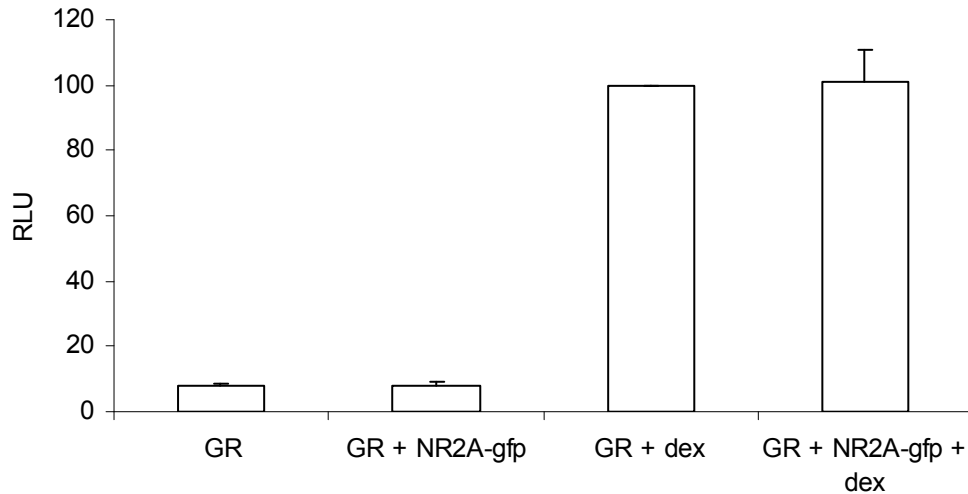
GR alene (figur 3.9). Dette tyder på at det ikke er en interaksjon mellom GR og NR1-1a-yfp.



**Figur 3.9: NR1-1a-yfp påvirker ikke ildfluLuciferaseaktiviteten.** Figuren viser gjennomsnittlig luciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet i prosent med standard feil. Renillaluciferase er brukt som intern standard. n = 5. Cellene transfektert med GR er sammenlignet med cellene som er kotransfektet med GR og NR1-1a-yfp. De som ikke er tilsatt dex er sammenlignet med hverandre, og de som er tilsatt dex er sammenlignet med hverandre. Det ble ikke funnet noen statistisk signifikant forskjell. RLU=Relative luciferase units.

### Interaksjon mellom GR og NR2A-gfp

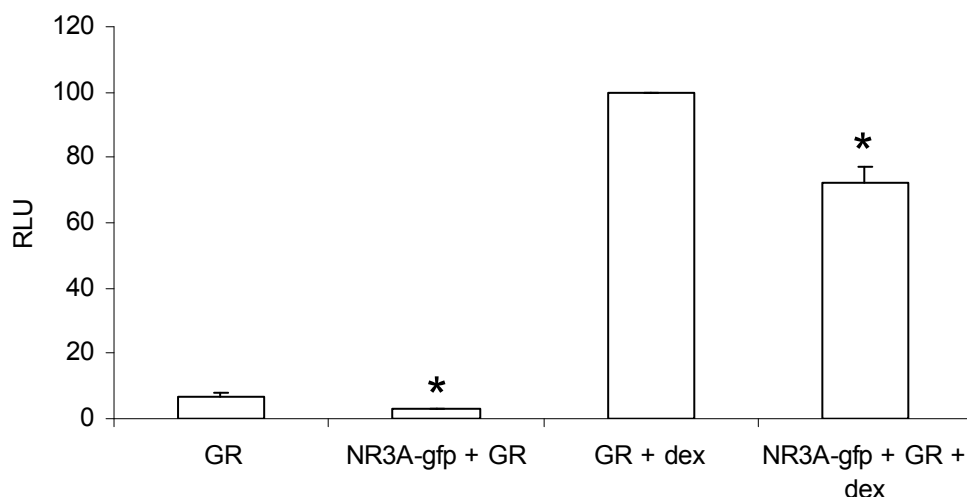
Resultatet viser at ildfluLuciferaseaktiviteten ikke påvirkes når celler kotransfekteres med NR2A-gfp og GR sammenlignet med transfeksjon med GR alene (figur 3.10). Dette tyder på at det ikke er en interaksjon mellom GR og NR2A-gfp.



**Figur 3.10: NR2A-gfp påvirker ikke ildfluoluciferaseaktiviteten.** Figuren viser gjennomsnittlig ildfluoluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet i prosent med standard feil.  $n = 5$ . Renillaluciferase er brukt som intern standard. Cellene transfektert med GR er sammenlignet med cellene som er kotransfektet med GR og NR2A-gfp. De som ikke er tilsatt dex er sammenlignet med hverandre, og de som er tilsatt dex er sammenlignet med hverandre. Det ble ikke funnet noen statistisk signifikant forskjell. RLU=Relative luciferase units.

### Interaksjon mellom GR og NR3A-gfp

Resultatet viser reduksjon i luciferaseaktivitet når celler kotransfekteres med GR og NR3A-gfp sammenlignet med når celler transfekteres med GR alene (figur 3.11). Dette tyder på at det er en interaksjon mellom GR og NR3A-gfp. Denne reduksjonen kan sees både når cellen tilsettes deksametason, og når cellene ikke blir tilsatt noen ligand. Grunnen til dette kan være at det kan finnes små mengder glukokortikoid i cellemediet.



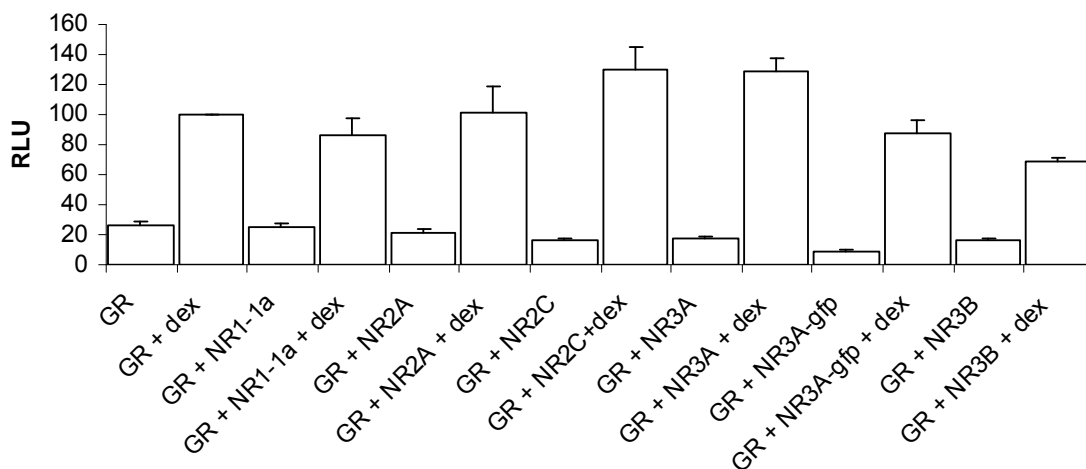
**Figur 3.11: NR3A-gfp reduserer ildfluoluciferaseaktivitet.** Figuren viser gjennomsnittlig luciferaseaktivitet i prosent med standard feil.  $n = 6$ . NR3A-gfp kotransfektet med GR gir en statistisk signifikant reduksjon i luciferaseverdien sammenlignet med transfeksjon med GR alene. Dette gjelder både for cellene som er eksponert med dex og cellene som ikke er eksponert med dex. RLU=Relative luciferase units.

### 3.2.7 Villtype NMDA-reseptorsubenheters interaksjon med GR

Det er ønskelig å teste om NMDA-reseptorsubenheter av villtype gir samme resultat som subenhetene som er merket med en fluoriserende del. Det er mulig at den fluoriserende delen kan påvirke luciferaseresultatene. CV-1 celler er derfor transfektet med GR, GRE-luc og ulike villtype NMDA-reseptorsubenheter i tillegg til NR3A-gfp (figur 3.12). Renillaluciferase er brukt som intern standard. Dette forsøket er kun et pilotprosjekt med to paralleller. Det ble gjennomført to paralleller til, men resultatet fra disse parallellene er ikke tatt med i figur 3.9. Grunnen til dette var uvanlig lave ildfluoluciferaseverdier. Tallgrunnlaget i dette forsøket er derfor lite, og det bør gjøres flere paralleller.

Ut ifra resultatet sees fortsatt den samme trenden som er vist tidligere med at NR3A-gfp fører til en nedgang i luciferaseaktiviteten. Den samme subenheten i form av villtypeprotein viser ikke den samme tendensen. Villtype NR1-1a og NR2A gir liknende resultat som de yfp- og gfp-merkede variantene. NR2C og NR3B er ikke testet før, verken i villtype eller i gfp-merket versjon. NR3B viser

en tendens til å redusere luciferaseverdiene. Flere paralleller er ønskelig for å se om dette stemmer. Det er tidligere vist at deksametasonindusert celledød ikke lar seg blokkere av  $Mg^{2+}$ , og at NR2C-subenheten har lav sensitivitet for  $Mg^{2+}$  (Jacobs et al. 2006; Takahashi et al. 1996). Det er derfor ønskelig å se om denne subenheten er involvert i en direkte interaksjon med GR. Resultatet fra dette forsøket tyder ikke på reduksjon i luciferase når NR2C kotransfekteres inn i CV-1 celler sammen med GR. Det er nødvendig med flere paralleller for å bekrefte eller avkrefte dette.

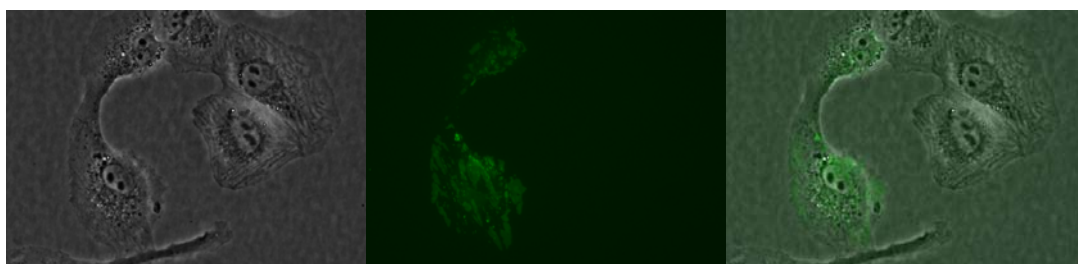


**Figur 3.12: NMDA-reseptorsubenheters påvirkning på ildflueluciferase.** Figuren viser gjennomsnittlig luciferaseaktivitet delt på renilla med standard feil. n=2. Renillaluciferase er brukt som intern standard. RLU=Relative luciferase units.

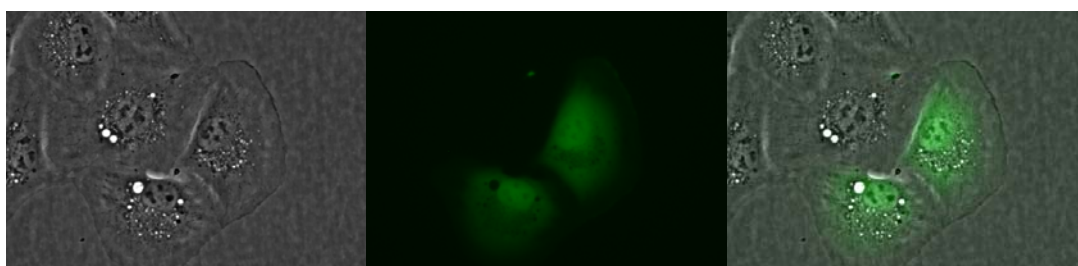
### 3.3 NMDA-reseptorsubenhetenes fordeling i CV-1 celler

CV-1 celler ble transfektert med NR1-1a-yfp, NR2A-gfp og NR3A-gfp enkeltvis. Cellene ble mikroskopert for å se på hvordan NMDA-reseptorsubenheten ble fordelt i cellene. CV-1 celler uttrykker ikke denne reseptortypen naturlig, og det er ønskelig å se på hvordan proteinene fordeler seg i cellen.

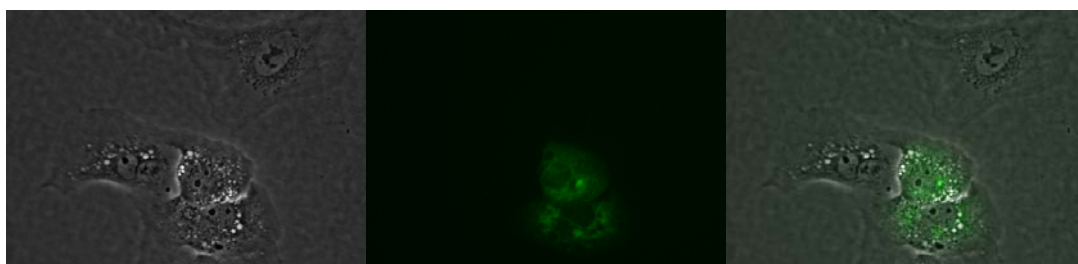
Bildene viser at NR1-1a-yfp fordeler seg i avgrensede områder jevnt over hele cellen. NR2A-gfp fordeler seg jevnt i hele cellen, med spesielt mye protein i kjernen. NR3A-gfp er fordelt over det meste av cellen, men med lite i den ytre delen av cellen, mot cellemembranen.



NR1-1a-yfp



NR2A-gfp



NR3A-gfp

**Figur 3.13: NMDA-reseptorsubenheterenes fordeling i cellen.** Fra venstre mot høyre: Fasekontrastbilde, fluorescensbilde og fasekontrastbilde lagt over fluorescensbilde av de ulike NMDA-reseptorsubenheterene

## 4 DISKUSJON

### 4.1 Agonister og antagonisters virkning på luciferaseaktivitet

#### 4.1.1 Hydrokortison og deksametasons aktivering av luciferaseaktiviteten

Deksametason i CV-1 celler gir en økende respons opp til 0,1nM ( $10^{-10}$ M), som er den konsentrasjonen som gir maksimal respons (figur 3.1). Over denne konsentrasjonen går luciferaseverdien ned. I kornceller fra rotte er det vist at deksametason fører til en statistisk signifikant økning i celledød i konsentrasjoner over  $10^{-7}$ M (Jacobs et al. 2006). CV-1 celler har ikke NMDA-reseptorer (se avsnitt 4.2.1). Hvis nedgangen i luciferaseaktivitet skyldes deksametasontoksisitet, vil dette derfor antagelig ikke medieres via samme mekanismer som i kornceller. Ved hjelp av et celledødsassay kan det testes om nedgangen i luciferaseaktivitet skyldes en toksisk effekt på cellene. Det er mulig at CV-1 celler har forskjellig følsomhet for deksametason sammenlignet med kornceller fra rotte. Reduksjon i luciferasemålingene over 0,1nM kan skyldes at proteinproduksjonen svekkes. På renillaluciferasemålinger på disse cellene sees ikke noe av denne tendensen. Disse verdiene varierer lite fra konsentrasjon til konsentrasjon (ikke vist). Dette tyder på at cellene ikke svekkes generelt eller dør på grunn av høy deksametasonkonsentrasjon. Den mest sannsynlige forklaringen kan være at et glukokortikoids respons kan variere når mengden reseptor som er transfektert inn varierer (Szapary et al. 1996).

CV-1 celler eksponert for hydrokortison gir maksimal målt respons på 10nM ( $10^{-8}$ M). En konsentrasjon på 10000nM gir lavere respons. Dette likner det som skjer for deksametason.

Deksametason gir respons ved lavere konsentrasjoner enn hydrokortison. Deksametason regnes som et mer potent steroid enn hydrokortison med 25-

30 ganger høyere anti-inflammatorisk aktivitet (Rosenberg and Lysz 1980). Det var derfor som forventet at deksametason skulle gi respons ved lavere ligandkonsentrasjon enn hydrokortison, men ikke at forskjellen skulle være like stor som den var. Studier har vist at hydrokortison og deksametason har ulik forskjell i potens avhengig av hva som brukes som mål på potensen, og hvordan den måles. Når lymfocyttsupprimerende egenskaper testes in vitro vises det at hydrokortison har en relativ supprimerende evne på 1, mens deksametason er på 0,8 (Langhoff and Ladefoged 1983).

#### **4.1.2 NMDA-reseptorantagonisters påvirkning på GR**

Det er tidligere vist at NMDA-reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551 blokkerer for deksametasonindusert celledød i korncellekulturer (Jacobs et al. 2006). Når MK 801 og CGP 39551 tilsettes til CV-1 celler sammen med deksametason gir dette ingen endring i deksametasons GR-induserte respons (figur 3.2). Dette gjelder både for en fysiologisk og toksisk deksametasonkonsentrasjon (se avsnitt 3.1.1). Dette viser at MK 801 og CGP 39551 ikke har en direkte virkning på GR. Grunnen til at disse stoffene blokkerte for deksametasonindusert celledød skyldtes derfor ikke at de interagererte direkte med GR. Dette styrker antagelsen om at NMDA-reseptoren er involvert i deksametasonindusert nevrotoksisitet.

Det ville vært interessant å undersøke om det ville ha blitt en endring i deksametasons GR-induserte respons hvis det samme var blitt gjort i celler som kouttrykker GR og NMDA-reseptoren.

### **4.2 Er et luciferasereportersystem i CV-1 celler egnet til å undersøke interaksjoner mellom GR og NMDA-reseptoren?**

#### **4.2.1 CV-1 celler**

CV-1 celler er en stabil cellelinje som er lett å dyrke (Hopps et al. 1963). Cellene forandrer seg lite over tid og varierer lite fra forsøk til forsøk. CV-1 cellene uttrykker vanligvis ikke GR (Giguere et al. 1986). Det er derfor bare



GR til stede i cellene når genet for GR er transfektert inn i cellene. Dette vises også i figur 3.8, der GRE-luc ikke aktiveres av deksametason når GR ikke er transfektert inn. NMDA-reseptoren uttrykkes hovedsaklig i sentralnervesystemet, men noen unntak finnes. Det er blant annet studier som tyder på at NMDA-reseptoren finnes i beinvev og noen typer nerveceller i huden (Dingledine et al. 1999). Disse unntakene er få, og det er lite sannsynlig at NMDA-reseptoren uttrykkes naturlig i CV-1 celler. Ved å transfektere inn spesifikke gener som koder for bestemte NMDA-reseptorsubenheter holdes det kontroll over hvilke subenheter cellene uttrykker. Hvis det hadde blitt brukt en celletype som uttrykker NMDA-reseptoren naturlig, ville ikke dette vært mulig. Dette gjør at CV-1 celler er en modell det er mulig å bruke til å undersøke om det er en interaksjon mellom GR og spesifikke NMDA-reseptorsubenheter. Siden CV-1 celler ikke uttrykker GR eller NMDA-reseptoren naturlig, er det ikke sikkert at disse cellene har de cellekomponentene som disse proteinene interagerer med når de uttrykkes naturlig i celler. Det er derfor mulig at GR og NMDA-reseptorsubenheter ikke fordeles eller prosesseres i CV-1 celler på samme måte som i celler der de finnes naturlig. Det er også mulig at overuttrykk av proteinene gjør at cellene ikke har nok av forskjellige kofaktorer nødvendig for transkripsjonsaktivering eller translasjon (Szapary et al. 1996). NMDA-reseptorsubenheter som transfekteres inn i celler alene vil ikke fordele seg til plasmamembranen, der NMDA-reseptoren er naturlig. Det er i stedet vist at disse subenhetene holdes tilbake i endoplasmatisk reticulum (ER) (se også avsnitt 4.4)(McIlhinney et al. 1998). Interaksjoner som oppdages i et in vitro system kan derfor ikke nødvendigvis overføres direkte til et in vivo system, men kan gi et pekepinn som så kan undersøkes videre i systemer som likner mer på det virkelige.

#### **4.2.2 Renillaluciferase som intern standard**

Renillaluciferase brukes primært som en ko-reporter sammen med ildflueluciferase for å gi en internkontroll på avvikende prøver (Fan and Wood 2007; Matthews et al. 1977). Her er renillaluciferase brukt som intern standard for å korrigere for variasjoner i transfeksjonseffektiviteten, og det er derfor viktig at ingen av komponentene i forsøket påvirker renillaluciferaseverdiene

direkte slik at dette kan påvirke resultatet. Enzymaktiviteten bør bare avhenge av antall celler som har tatt opp plasmid-DNA.

Tidligere er det vist i CV-1 celler transfektert med GR og behandlet med 10nM deksametason, at renillaluciferaseaktiviteten synker i cellene behandlet med deksametason (Ibrahim et al. 2000). Det var derfor viktig å undersøke om dette er tilfellet i vårt forsøksoppsett. Her ble det vist at deksametason ikke påvirker renillaluciferasemålingene direkte (se figur 3.3). I studien som viste deksametasonpåvirkning på renillaluciferase er det brukt andre renillaluciferaseplasmider enn RL-CMV, nærmere bestemt thymidine kinase promoter renillaluciferase reporter plasmid (pRL-TK) og thromboxane synthase promoter renillaluciferase plasmid (pRL-TS). Det kan derfor se ut som om deksametason påvirker noen typer renillaluciferaseplasmider, men ikke det som ble brukt i vårt forsøk. RL-CMV, pRL-TK og pRL-TS har forskjellig promotor. Deksametason interagerer antageligvis med promotoren til pRL-TK og pRL-TS, men ikke med promotoren til RL-CMV.

Når enten NR1-1a-yfp, NR2A-gfp eller NR3A-gfp transfekteres inn i cellene i tillegg til GR er det en tendens til at renillaluciferaseaktiviteten går ned. Denne tendensen er ikke statistisk signifikant. Når genet for en subenhet transfekteres inn i cellen sammen med GR, må cellene produsere flere typer proteiner enn når de bare transfekteres med GR. Tendensen kan derfor skyldes at når cellene må produsere flere typer proteiner, så har de ikke kapasitet til å produsere like mye av hver av proteintype. For å finne ut om dette er tilfelle, kunne en analysere mengden protein med Western blotting. Den samme tendensen kan sees når NMDA-reseptorsubenheterne transfekteres inn i cellene sammen med rsv-luc. Renillaluciferase jevner derfor ut denne forskjellen når ildflueluciferase deles på renillaluciferase.

Det er også en tendens til at NR3A-gfp ikke reduserer renillaluciferaseaktiviteten like mye som NR1-1a-yfp og NR2A-gfp. Dette viser at det er viktig å bruke intern standard. Når renillaluciferase brukes som intern standard, vil den korrigere for hele eller deler av denne forskjellen. Det er

ønskelig å teste ut flere batcher av de ulike subenhetenes plasmider for å finne plasmidblandinger som påvirker den interne standarden mindre.

### **4.2.3 IldfluLuciferase**

Det er viktig å kontrollere at ingen av komponentene vi bruker i eksperimentet påvirker ildfluLuciferasemålingene direkte, og derfor kan gi falskt positivt eller negativt resultat. Rsv-luc er et plasmid som uttrykker ildfluLuciferase under kontroll av en sterk promotor (rsv). Det vises at deksametason ikke påvirker ildfluLuciferasemålingen direkte, da celler som ikke er tilsatt deksametason og celler som er tilsatt deksametason ikke gir forskjellig resultat.

Når en av NMDA-reseptorsubenhetene, NR1-1a-yfp, NR2A-gfp eller NR3A-gfp, transfekteres inn i cellene, fører dette til en tendens til reduksjon i ildfluLuciferasemålingene. Denne tendensen er ikke statistisk signifikant. Tendensen kan skyldes at når cellene må produsere flere typer proteiner har de ikke kapasitet til å produsere like mye av hver av proteintype. En annen mulighet er at noen av plasmidene påvirker cellenes opptak av plasmidblandingen. Siden denne reduksjonen også gjelder renillaluciferase, som brukes som intern standard, vil dette bli korrigert for av denne interne standarden.

Det er en tendens til at NR1-1a-yfp og NR2A-gfp reduserer ildfluLuciferasemålingene fra cellene som er transfektert med rsv-luc mer enn NR3A-gfp. Dette er ikke en statistisk signifikant forskjell. Dette kan skyldes at NR1-1a-yfp og NR2A-gfp fører til høyere produksjon av proteinene de koder for sammenlignet med NR3A-gfp. Alternativt kan NR3A-gfp redusere opptaket av plasmidblandingen mer enn NR1-1a-yfp og NR2A-gfp. Når cellene settes til å produsere mer av en type protein, kan det bli mindre kapasitet til å produsere andre proteiner. NR1-1a-yfp og NR2A-gfp produserer derfor mindre ildfluLuciferase. Hvis dette påvirker resultatet i figur 3.11, så vil det da gi en mindre reduksjon, og utfallet av dette forsøket påvirkes derfor ikke.

#### 4.2.4 GRE-luc

GRE-luc plasmidet består av en basalpromotor (prolaktinpromotoren pro36) med 3 GRE oppstrøms som styrer luciferasegenet. Hvis ligandbundet GR bindes, vil dette aktivere luciferasetranskripsjonen. Lysintensiteten korrelerer til den kjemiske konsentrasjonen av komponentene i reaksjonen. Ved å holde konsentrasjonen til alle komponentene utenom én konstant, kan lysintensiteten brukes som mål på denne komponenten (Fan and Wood 2007). Her holdes konsentrasjonen av ATP og luciferin konstant slik at luciferase brukes som en genetisk reporter (Ylikomi et al. 2004).

Celler transfektert med NR1-1a-yfp, NR2A-gfp eller NR3A-gfp gir ikke høy luciferaseaktivitet alene. For disse er det ingen forskjell i luciferaseaktivitet om det tilsettes deksametason eller ikke. Når cellene transfekteres med GR, og det ikke tilsettes deksametason, gir dette også en veldig lav luciferaseaktivitet. Derimot, når cellene transfektert med GR tilsettes deksametason, øker luciferaseaktiviteten tydelig. Dette viser at GRE-luc bare aktiveres slik at luciferase produseres når cellene inneholder aktivert GR. Måling av luciferaseaktivitet kan derfor brukes som et mål på mengde aktivert GR i cellene som er tilgjengelig i cellekjernen for aktivering av GRE-luc.

Det ble valgt en deksametasonkonsentrasjon på 10nM. Tilsvarende konsentrasjon er brukt tidligere (Giguere et al. 1986). Denne konsentrasjonen gir en statistisk signifikant deksametasonrespons, og ligger litt høyere enn konsentrasjonen som gir maksimal deksametasonrespons i CV-1 celler (figur 3.1). Konsentrasjonen er lavere enn de konsentrasjoner som er vist å gi celledød i kornceller fra rotte (Jacobs et al. 2006). Konsentrasjonen som ble valgt ble valgt litt høyere enn konsentrasjonen som gir maksimal respons for å være sikker på å ha nok ligand, men lavere enn toksisk deksametasonkonsentrasjon.

## 4.3 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren

### 4.3.1 Interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren

For å undersøke om det er en interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren ble luciferasemålinger fra CV-1 celler transfektert med GR alene sammenlignet med målinger fra celler transfektert med GR i tillegg til ulike NMDA-reseptorsubenheter. Hvis NMDA-reseptorsubenheter interagerer med GR i cytosol, ble det antatt at luciferasemålingene ville reduseres. GR befinner seg vanligvis i cytosol bundet til proteiner, blant annet HSP 90, og reseptoren kan ikke gå inn i kjernen og virke som en transkripsjonsfaktor før den dissosierer fra proteinene den er bundet til (se avsnitt 1.5). Det ble antatt at hvis GR interagerer med en NMDA-reseptorsubenheter ville dette hindre at GR beveget seg inn i kjernen og førte til luciferaseproduksjon. For subenhetene NR1-1a-yfp og NR2A-gfp var det ingen endring i luciferasemålingene sammenlignet med celler med GR alene. Dette tyder på at det ikke er noen interaksjon mellom GR og disse to subenhetene, og at en eventuell interaksjon mellom NMDA-reseptoren og GR skyldes andre subenheter av NMDA-reseptoren.

Celler som uttrykker NR3A-gfp sammen med GR viser lavere ildfluoluciferaseaktivitet sammenliknet med celler som bare uttrykker GR. Dette tyder på at NR3A-gfp holder GR tilbake i cytosol, slik at den ikke går inn i kjernen og aktiverer genet for luciferase. Dette tyder på at det er en direkte eller indirekte interaksjon mellom GR og NR3A-gfp. Reduksjonen i ildfluoluciferaseaktivitet er også til stede når cellene ikke er tilsatt deksametason. Dette kan skyldes at mediet inneholder en liten mengde glukokortikoid slik at en liten andel av GR aktiveres. Hvis det finnes glukokortikoid i mediet er denne mengden veldig liten, derfor er det et lite antall GR som aktiveres når ikke glukokortikoid tilsettes. Interaksjonen mellom NR3A-gfp og GR kan detekteres også ved så lav grad av reseptoraktivering. Det er også mulig at dette kan skyldes en uspesifikk nedregulering. Når cellene som ikke er tilsatt deksametason, men transfektert med NR1-1a-yfp og NR2A-gfp i tillegg til GR sammenlignes med cellene som bare er transfektert med GR, ser vi ingen tilsvarende reduksjon i luciferaseverdiene.

Dette gjør det lite sannsynlig at reduksjonen som sees for NR3A-gfp skyldes en uspesifikk nedregulering.

#### 4.3.2 Villtype NMDA-reseptorsubenheters interaksjon med GR

Det er forventet at villtype NMDA-reseptorsubenheterne viser samme mønster av interaksjoner med GR, som de subenheterne som er merket med et fluoreserende protein. Villtype NR1-1a og NR2A gir ingen reduksjon i luciferaseaktivitet, akkurat som de yfp og gfp merkede variantene.

NR3A ser derimot ikke ut til å vise samme tendens som NR3A-gfp. Dette kan være et tegn på at villtypeproteinet ikke har en interaksjon med GR, og derfor ikke fører til nedgang i luciferaseaktiviteten. Det ville bety at den reduksjonen i luciferaseaktivitet som NR3A-gfp skyldtes gfp-merkingen. NR2A som var merket med gfp ga ingen reduksjon i luciferaseaktivitet. Det er derfor lite sannsynlig at det er denne merkingen som er årsak til reduksjonen i luciferaseaktivitet. En annen mulighet er at dette bare skyldes en tilfeldig variasjon i resultatene, og det er derfor ønskelig med flere paralleller for å se om dette er en tendens som vedvarer. Alternativt fører denne batchen med NR3A til liten produksjon av dette proteinet. Dette kan oppklares ved å analysere prøvene med Western blotting. I tillegg er det ønskelig å teste ut en ny batch med NR3A-plasmid for å se om denne gir samme resultat.

NR3B viser også en tendens til å redusere luciferaseaktiviteten. NR3B har store strukturelle likheter med NR3A, med 62 % likhet i aminosyresekvens (Matsuda et al. 2002). Det er derfor ikke uventet at den ser ut til å ha den samme interaksjonen som NR3A-gfp. Uttrykket av NR3B viser ikke den samme variasjonen gjennom utviklingen som NR3A (Matsuda et al. 2002). Denne subenheten forklarer derfor ikke de aldersspesifikke deksametasonbivirkningene.

Deksametasonindusert celledød lar seg ikke blokkere av  $Mg^{2+}$  (Jacobs et al. 2006). NMDA-reseptorer med NR2C og NR3A har lav sensitivitet for  $Mg^{2+}$  blokkering (Sasaki et al. 2002; Takahashi et al. 1996). Det var derfor forventet

at en eller begge av disse subenhetene kunne være involvert i en interaksjon med GR. Resultatet fra figur 3.12 tyder ikke på at det er en reduksjon i luciferaseresultatet for NR2C. Det er derfor antageligvis ikke NR2C som er ansvarlig for den deksametasoninduserte celledøden. Dette resultatet forsterker teorien om at NR3A-subenheten kan være involvert i mekanismen bak deksametasonindusert celledød.

Det er foreslått at det er en interaksjon mellom GR og NMDA-reseptoren, som en mulig forklaring på spesifikke bivirkninger sett ved bruk av deksametason. Deksametason er brukt hos premature til behandling av bronkopulmonal dysplasi assosiert med for tidlig fødsel (Grier and Halliday 2005). Det er vist at denne bruken fører til hemmet nevrologisk utvikling (Barrington 2001). NMDA-reseptoren har ulik subenhets sammensetning i ulike stadier av et individs utvikling fra foster til voksen. I rotte- og musestudier er det vist at NR3A hovedsakelig uttrykkes i fosterstadiet, og at uttrykket av dette proteinet er lavt hos voksne (Sucher et al. 1995). Det er derfor mulig at den aldersspesifikke deksametasonbivirkningen skyldes det aldersspesifikke NMDA-reseptor uttrykket. Dette støttes av at NR3A har lav sensitivitet for  $Mg^{2+}$ , og at deksametasonindusert celledød ikke lar seg blokkere av  $Mg^{2+}$ . I denne studien vises det en tendens til at NR3A-gfp og muligens NR3B kan holde GR tilbake i cytoplasma. Det er derfor en mulig interaksjon mellom disse proteinene. For å bekrefte eller avkrefte dette, bør flere metoder brukes for å se på dette. En mulighet er å bruke ko-immunopresipitering. Alternativt kan Fluorescence resonance energy transfer (FRET) benyttes. I FRET blir et donor-fluorogen eksitert av lys. Hvis en akseptor er nær nok kan energien fra eksiteringen overføres fra donoren. Dermed senkes intensiteten og varigheten på donorens fluorescens, og akseptorens emisjonsintensitet økes (Selvin 2000).

Hvis denne interaksjonen bekreftes, kan neste skritt være å bruke delesjonsmutasjoner for å undersøke hvilke deler av GR og NR3-subenhetene som er involvert i interaksjonen.

#### 4.4 NMDA-reseptorsubenheterenes fordeling i CV-1 celler

I en studie i COS celler vises det at NR1-1a som uttrykkes alene i disse cellene fordeles i store intracellulære vesikler eller lammellformede avgrensede områder. Studien tyder på at disse strukturene er en del av endoplasmatisk retikulum (ER) (McIlhinney et al. 1998). Basert på mikroskopibildene av CV-1 celler transfektert med NR1-1a-yfp ser det ut som om NR1-1a-yfp har en liknende fordeling i denne celletypen.

Den samme studien viser et liknende resultat for NR2A. Denne subenheten lokaliseres antagelig også til ER når den uttrykkes alene (McIlhinney et al. 1998). Fordelingen i COS cellene i studien ser lik ut som når NR2A-gfp transfekteres inn i CV-1 celler.

Det er tidligere vist i HEK293T celler at NR3A-gfp er lokalisert i ER, når den uttrykkes i disse cellene uten NR1-1a (Perez-Otano et al. 2001). Det samme ser ut til å være tilfellet i CV-1 celler. Den gfp-merkede subenheten er hovedsakelig lokalisert i området utenfor cellekjernen, som passer med ER lokaliseringen.

For å bekrefte om NR1-1a-yfp, NR2A-gfp og NR3A-gfp i CV-1 celler virkelig er lokalisert til ER, slik det er vist i andre celletyper, måtte dette ha blitt testet videre. Det kunne ha blitt brukt dobbeltfarging av proteinene og ER for å bekrefte om disse subenheterne er lokalisert i ER.

Subenheterne som er brukt er ikke av villtype, men er merket med et fluoriserende protein. Det er derfor mulig at subenheterne fordeler seg annerledes i cellene enn om det hadde vært villtypeprotein som ble brukt. For å finne ut hvordan villtype subenheter ville ha fordelt seg i cellene måtte dette ha blitt testet med immunfarging av subenheterne.

I videre forsøk ville det være interessant å teste om kotransfeksjon av flere NMDA-reseptorsubenheter sammen fører til endret lokalisering av subenheterne. Det ville være ønskelig å undersøke om kotransfeksjon kunne



føre til at subenhetene ble lokalisert i plasmamembranen, om de kunne danne funksjonelle reseptorer, og om GR fremdeles kan interagere med de membranbundne NMDA-reseptorene.

#### **4.5 KONKLUSJON**

- Et luciferasereportersystem i CV-1 celler er egnet til å undersøke funksjoner av GR og interaksjoner mellom GR og NMDA-reseptoren.
- Det er bekreftet at deksametason er et mer potent steroid enn hydrokortison.
- NMDA-reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551 har ikke en direkte virkning på GR-indusert luciferaseaktivitet.
- Studien tyder på at det er en interaksjon mellom GR og NR3A-gfp, og mellom GR og NR3B.
- NR1-1a-yfp, NR2A-gfp og NR3A-gfp ser ut til å fordeles i CV-1 celler slik det er vist for andre celletyper.

## LITTERATURLISTE

Al-Hallaq, R. A., Jarabek, B. R., Fu, Z., Vicini, S., Wolfe, B. B. and Yasuda, R. P. (2002). "Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits." *Molecular Pharmacology* 62(5):1119-1127.

Barrington, K. J. (2001). "The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: A systematic review of RCTs." *BioMed Central Pediatrics* 1(27).

Borski, R. (2000). "Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates." *Trends in endocrinology and metabolism* 11(10):427-436.

Brody, S. A., Nakanishi, N., Tu, S., Lipton, S. A. and Geyer, M. A. (2005). "A developmental influence of the N-methyl-D-aspartate receptor NR3A subunit on prepulse inhibition of startle." *Biological Psychiatry* 57(10):1147-1152.

Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E. and Sakmann, B. (1995). "Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes." *Journal of Physiology* 485(2):403-418.

Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A. and Zhang, D. (2002). "Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits." *Nature* 415(6873):793-798.

Croucher, M. J., Cotterell, K. L. and Bradford, H. F. (1992). "Competitive NMDA receptor antagonists raise electrically kindled generalized seizure thresholds." *Neurochemical research* 17(5):409-413.

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

Czock, D., Keller, F., Rasche, F. M. and Haussler, U. (2005). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids." *Clinical Pharmacokinetics* 44(1):61-98.

Danysz, W. and Parsons, C. G. (1998). "Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: Physiological significance and possible therapeutic applications." *Pharmacological Reviews* 50(4):597-664.

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

Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W. and Vandenabeele, P. (2001). "Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors." *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(3):356-370.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. and Traynelis, S. F. (1999). "The glutamate receptor ion channels." *Pharmacological Reviews* 51(1):7-61.

Falkenstein, E., Tillmann, H., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M. (2000). "Multiple actions of steroid hormone - a focus on rapid, nongenomic effects." *Pharmacological Reviews* 52(4):513-556.

Fan, F. and Wood, K. V. (2007). "Bioluminescent assays for high-throughput screening." *Assay & Drug Development Technologies*. Vol. 5(1):127-136.

Fink, S. L. and Cookson, B. T. (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." *Infection and Immunity* 73(4):1907-1916.

Fukaya, M., Hayashi, Y. and Watanabe, M. (2005). "NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons." *European Journal of Neuroscience* 21(5):1432-1436.

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

Grier, D. G. and Halliday, H. L. (2005). "Management of bronchopulmonary dysplasia in infants: Guidelines for corticosteroid use." *Drugs* 65(1):15-29.

Halliday, H. L., Patterson, C. C. and Halahakoon, C. W. N. L. (2001). "A multicenter, randomized open study of early corticosteroid treatment (OSECT) in preterm infants with respiratory illness: Comparison of early and late treatment and of dexamethasone and inhaled budesonide." *Pediatrics* 107(2):232-240.

Hopps, H. E., Bernheim, B. C., Nisalak, A., Tjio, J. H. and Smadel, J. E. (1963). "Biologic characteristics of a continuous kidney cell line derived from the african green monkey." *Journal of Immunology* 91(3):416-424.

Huettner, J. E. and Bean, B. P. (1988). "Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: Selective binding to open channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(4):1307-1311.

Ibrahim, N. M., Marinovic, A. C., Price, S. R., Young, L. G. and Frohlich, O. (2000). "Pitfall of an internal control plasmid: Response of Renilla luciferase (pRL-TK) plasmid to dihydro-testosterone and dexamethasone." *BioTechniques* 29(4):782-784.

Jacobs, C. M., Trinh, M. D., Rootwelt, T., Lomo, J. and Paulsen, R. E. (2006). "Dexamethasone induces cell death which may be blocked by NMDA receptor antagonists but is insensitive to Mg<sup>2+</sup> in cerebellar granule neurons." *Brain Research* 1070(1):116-123.

Johnson, L. R., Farb, C., Morrison, J. H., McEwen, B. S. and LeDoux, J. E. (2005). "Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala." *Neuroscience* 136(1):289-299.

Joza, N., Kroemer, G. and Penninger, J. M. (2002). "Genetic analysis of the mammalian cell death machinery." *Trends in Genetics* 18(3):142-149.

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

Kristiansen, L. V., Huerta, I., Beneyto, M. and Meador-Woodruff, J. H. (2007). "NMDA receptors and schizophrenia." *Current Opinion in Pharmacology* 7(1):48-55.

Kumar, R. and Thompson, E. B. (1999). "The structure of the nuclear hormone receptors." *Steroids* 64(5):310-319.

Kumar, R. and Thompson, E. B. (2005). "Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship." *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 94(5):383-394.

Langhoff, E. and Ladefoged, J. (1983). "Relative immunosuppressive potency of various corticosteroids measured in vitro." *European Journal of Clinical Pharmacology* 25(4):459-462.

Lipton, S. A. (2004). "Failures and Successes of NMDA Receptor Antagonists: Molecular Basis for the Use of Open-Channel Blockers like Memantine in the Treatment of Acute and Chronic Neurologic Insults." *The Journal of the american society for experimental NeuroTherapeutics* 1(1):101-110.

Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M. and Cormier, M. J. (1991). "Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(10):4438-4442.

Lynch, D. R. and Guttmann, R. P. (2002). "Excitotoxicity: Perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes." *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 300(3):717-723.

Mager, D. E., Lin, S. X., Blum, R. A., Lates, C. D. and Jusko, W. J. (2003). "Dose Equivalency Evaluation of Major Corticosteroids: Pharmacokinetics and Cell Trafficking and Cortisol Dynamics." *Journal of Clinical Pharmacology* 43(11):1216-1227.

- Martin, L. J., Al-Abdulla, N. A., Brambrink, A. M., Kirsch, J. R., Sieber, F. E. and Portera-Cailliau, C. (1998). "Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis." *Brain Research Bulletin* 46(4):281-309.
- Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S. and Yuzaki, M. (2002). "Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: A dominant subunit that reduces calcium permeability." *Molecular Brain Research* 100(1-2):43-52.
- Matthews, J. C., Hori, K. and Cormier, M. J. (1977). "Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase." *Biochemistry* 16(1):85-91.
- McIlhinney, R. A. J., Le Bourdelles, B., Molnar, E., Tricaud, N., Streit, P. and Whiting, P. J. (1998). "Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells." *Neuropharmacology* 37(10-11):1355-1367.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. and Seeburg, P. H. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." *Neuron* 12(3):529-540.
- Mulholland, P. J., Self, R. L., Hensley, A. K., Little, H. J., Littleton, J. M. and Prendergast, M. A. (2006). "A 24 h corticosterone exposure exacerbates excitotoxic insult in rat hippocampal slice cultures independently of glucocorticoid receptor activation or protein synthesis." *Brain Research* 1082(1):165-172.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A. (2002). "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications." *Nature Biotechnology* 20(1):87-90.
- Neyton, J. and Paoletti, P. (2006). "Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach." *Journal of Neuroscience* 26(5):1331-1333.
- Nishi, M., Hinds, H., Lu, H.-P., Kawata, M. and Hayashi, Y. (2001). "Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner." *Journal of Neuroscience* 21(23):181-186.
- Olney, J. W. (1969). "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." *Science* 164(880):719-721.
- Orchinik, M., Moore, F. L. and Rose, J. D. (1994). "Mechanistic and functional studies of rapid corticosteroid actions." *Annals of the New York Academy of Sciences* 746(1):101-112.
- Ozawa, S., Kamiya, H. and Tsuzuki, K. (1998). "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system." *Progress in Neurobiology* 54(5):581-618.

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

Perez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J. and Heinemann, S. F. (2001). "Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors." *Journal of Neuroscience* 21(4):1228-1237.

Pozza, M. F., Olpe, H. R., Brugger, F. and Fagg, G. E. (1990). "Electrophysiological characterization of a novel potent and orally active NMDA receptor antagonist: CGP 37849 and its ethylester CGP 39551." *European Journal of Pharmacology* 182(1):91-100.

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

Rachline, J., Perin-Dureau, F., Le Goff, A., Neyton, J. and Paoletti, P. (2005). "The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B." *Journal of Neuroscience* 25(2):308-317.

Rosen, J. and Miner, J. N. (2005). "The search for safer glucocorticoid receptor ligands." *Endocrine Reviews* 26(3):452-464.

Rosenberg, J. C. and Lysz, K. (1980). "Suppression of the immune response by steroids. Comparative potency of hydrocortisone, methylprednisolone, and dexamethasone." *Transplantation* 29(5):425-428.

Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Das, S., Cui, J., Talantova, M. V., Wong, H. K., Gong, X., Chan, S. F., Zhang, D., Nakanishi, N., Sucher, N. J. and Lipton, S. A. (2002). "Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons." *Journal of Neurophysiology* 87(4):2052-2063.

Schneggenburger, R. (1996). "Simultaneous measurement of Ca<sup>2+</sup> influx and reversal potentials in recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels." *Biophysical Journal* 70(5):2165-2174.

Seliger, H. H., W.D., M., White, E. H. and Field, G. F. (1961). "Stereo-specificity and firefly bioluminescence, a comparison of natural and synthetic luciferins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47:1129-1134.

Selvin, P. R. (2000). "The renaissance of fluorescence resonance energy transfer." *Nature Structural Biology* 7(9):730-734.

Smothers, C. T. and Woodward, J. J. (2007). "Pharmacological characterization of glycine-activated currents in HEK 293 cells expressing N-

methyl-D-aspartate NR1 and NR3 subunits." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322(2):739-748.

Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G. and Lipton, S. A. (1995). "Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain." *The Journal of Neuroscience* 15(10):6509-6520.

Szapary, D., Xu, M. and Simons Jr, S. S. (1996). "Induction properties of a transiently transfected glucocorticoid- responsive gene vary with glucocorticoid receptor concentration." *Journal of Biological Chemistry* 271(48):30576-30582.

Takahashi, T., Feldmeyer, D., Suzuki, N., Onodera, K., Cull-Candy, S. G., Sakimura, K. and Mishina, M. (1996). "Functional correlation of NMDA receptor epsilon subunits expression with the properties of single-channel and synaptic currents in the developing cerebellum." *The Journal of Neuroscience* 16(14):4376-4382.

Takahashi, T., Kimoto, T., Tanabe, N., Hattori, T. A., Yasumatsu, N. and Kawato, S. (2002). "Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated  $Ca^{2+}$  elevation in cultured rat hippocampal neurons." *Journal of Neurochemistry* 83(6):1441-1451.

Umland, S. P., Schleimer, R. P. and Johnston, S. L. (2002). "Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma." *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 15(1):35-50.

Waxman, E. A. and Lynch, D. R. (2005). "N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: Multiple roles in excitotoxicity and neurological disease." *The Neuroscientist* 11(1):37-49.

Wilson, T. E., Fahrner, T., Johnston, M. and Milbrandt, J. (1991). "Identification of the DNA Binding Site for NGFI-B by Genetic Selection in Yeast." *Science* 252(5010):1296-1300.

Wong, E. H. F., Kemp, J. A. and Priestley, T. (1986). "The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(18):7104-7108.

Ylikomi, T., Vienonen, A. and Ahola, T. M. (2004). "G protein-coupled receptor 30 down-regulates cofactor expression and interferes with the transcriptional activity of glucocorticoid." *European Journal of Biochemistry* 271(21):4159-4168.

Yuste, R. (2005). "Fluorescence microscopy today." *Nature Methods* 2(12):902-904.

Zarain-Herzberg, A., Lee-Rivera, I., Rodriguez, G. and Lopez-Colome, A. M. (2005). "Cloning and characterization of the chick NMDA receptor subunit-1 gene." *Molecular Brain Research* 137(1-2):235-251.