

**MASTEROPPGAVEN I GRADEN**

MASTER I FARMASI

**Mulig interaksjon mellom NMDA  
reseptorsubenheten 3A og  
glukokortikoidreseptoren**



**Yuan Zeng Feng**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Mai 2009

## FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo i tidsrommet fra juni 2008 til mai 2009, som et ledd i graden Master i farmasi.

Jeg vil spesielt takke min hovedveileder professor Ragnhild E. Paulsen for et faglig inspirerende år. Hennes faglige kunnskaper og positive innstilling er meget beundringsverdig, og hun har gitt meg mye veiledning og oppmuntring gjennom hele masteroppgaven. Jeg vil også takke min medveileder Petra Aden for god opplæring, hjelp og innspill.

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

Jeg vil også takke Liv Halland for hjelp til korrekturlesing, og min samboer Halvor Halland for all støtte gjennom studiet.

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

Oslo, mai 2009

Yuan Zeng Feng

## SAMMENDRAG

Deksametason er et syntetisk glukokortikoid som er mye brukt i forebygging og behandling av bronkopulmonal dysplasi hos premature 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. En interaksjon mellom glukokortikoidreseptoren (GR) og NMDA reseptoren kan være mekanismen bak denne toksisiteten i nevroner, siden NMDA reseptorantagonister reduserer toksisiteten. NMDA reseptorer er heteromere komplekser som består av flere subenheter, og disse subenhetene uttrykkes i ulike grad under utviklingen. Tidligere arbeid i laboratoriet har vist en mulig interaksjon mellom GR og NMDA reseptorsubenheten 3A (NR3A).

I dette prosjektet ble kyllingkornceller brukt til å undersøke om aldosteron og deksametason induserer celledød i nevroner. Det ble vist at både deksametason og aldosteron induserer liknende celledød i kyllingkornceller.

Videre ble en cellelinje (CV-1 celler) brukt til å undersøke om: CV-1 celler uttrykker NR3A eller GR naturlig; NMDA reseptorsubenheter fordeles til cellemembranen etter transfeksjon; aldosteron, et mineralkortikoid, kan aktivere GR i et luciferase assay; NFκB-luc promotoren nedreguleres av GR og mineralkortikoidreseptoren (MR); NMDA reseptorantagonister kan påvirke GRs transkripsjonelle aktivitet; det er en interaksjon mellom GR og ulike NMDA reseptorsubenheter og om karboksylterminalen til GR er involvert i interaksjonen.

Westernblotting, fluorescensmikroskop og luciferase assay som kan reguleres av GR ble brukt. Det ble bekreftet at CV-1 celler ikke uttrykker GR eller NR3A naturlig. NMDA reseptorsubenheter fordelte ikke til cellemembranen etter transfeksjon av subenhetene hver for seg. Aldosteron aktiverte GR ved høyere konsentrasjon enn deksametason. GR i motsetning til MR nedregulerte NFκB-luc promotoren. NMDA reseptorantagonister påvirket ikke GRs agonistinduserte transkripsjonelle aktivitet. CV-1 celler ble ko-transfektet med GR og NMDA reseptorsubenheter, og tilstedeværelse av NR3A hemmet GRs nedregulering av NFκB-luc promotoren. Dette støtter antagelsen om en interaksjon mellom GR og NR3A, og kan ha betydning for mekanismen for deksametasons nevrotoksisitet hos premature barn.

---

# INNHOLDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	<b>2</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>3</b>
<b>INNHOLDSFORTEGNELSE</b> .....	<b>4</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>9</b>
1.1 GLUTAMATRESEPTORER .....	9
1.1.1 <i>NMDA reseptoren</i> .....	9
1.1.2 <i>Eksitotoksisitet</i> .....	12
1.2 APOPTOSE OG NEKROSE .....	14
1.3 STEROIDER .....	16
1.3.1 <i>Glukokortikoider og glukokortikoidreseptoren</i> .....	16
1.3.2 <i>Mineralkortikoider og mineralkortikoidreseptoren</i> .....	18
1.3.3 <i>Klassiske steroideffekter</i> .....	19
1.3.4 <i>Ikke-klassiske steroideffekter</i> .....	21
1.4 GLUKOKORTIKOIDINDUSERT NEVROTOKSISITET .....	23
1.4.1 <i>Interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren</i> .....	23
1.5 HENSIKTEN MED STUDIEN.....	25
<b>2. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>26</b>
2.1 CELLETYPER .....	26
2.1.1 <i>Korncellekulturer</i> .....	26
2.1.2 <i>CV-1 celler</i> .....	26
2.2 KORNCELLEKULTURER .....	27
2.2.1 <i>Poly-L-lysin behandling av kulturskåler</i> .....	27

---

2.2.2	<i>Preparering av korncellekulturer</i> .....	27
2.2.3	<i>Tilsetting av Ara-C</i> .....	31
2.3	SPLITTING AV CV 1 CELLER .....	32
2.4	TRANSFEKSJON AV CV-1 CELLER OG KYLLINGKORNCCELLER .....	34
2.4.1	<i>Transfeksjon av CV-1 celler med kalsiumfosfat</i> .....	34
2.4.2	<i>Transfeksjon av kyllingkornceller med Metafectene PRO®</i> .....	37
2.5	EKSPONERING AV CV-1 OG KYLLINGKORNCCELLER .....	38
2.6	TELLING AV DØDE CELLER .....	40
2.7	WESTERNBLOTTING .....	41
2.7.1	<i>Høsting av celler til Westernblotting</i> .....	41
2.7.2	<i>Metode for Westernblotting</i> .....	42
2.8	MIKROSKOPERING .....	48
2.9	LUCIFERASE .....	49
2.9.1	<i>Ildflueluciferase</i> .....	49
2.9.2	<i>Renillaluciferase</i> .....	50
2.9.3	<i>Høsting av celler til luciferasemåling</i> .....	50
2.9.4	<i>Måling av ildflueluciferase</i> .....	51
2.9.5	<i>Måling av renillaluciferaseaktivitet</i> .....	52
2.10	FIGURER OG STATISTIKK .....	53
2.11	KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER .....	53
<b>3.</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>56</b>
3.1	EFFEKTEN AV AGONISTER PÅ CELLEDØD I NEVRONER .....	56
3.2	WESTERNBLOTTING .....	57
3.3	MIKROSKOPERING .....	58

---

3.4	TRANSFEKSJON AV CV-1 CELLER OG KYLLINGKORNCCELLER MED LUCIFERASEPLASMIDER ....	61
3.4.1	<i>Renillaluciferase</i> .....	62
3.4.2	<i>Deksametason- og aldosteronaktivering av luciferaseaktivitet via GRE-luc</i> .....	67
3.4.3	<i>Deksametason- og aldosteronaktivering av luciferaseaktivitet via NFkB-luc</i> .....	69
3.4.4	<i>Antagonisters effekt på luciferaseaktivitet</i> .....	72
3.4.5	<i>Interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren</i> .....	76
3.4.6	<i>Transfeksjon med GRtr</i> .....	84
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>88</b>
4.1	EFFEKTEN AV AGONISTER PÅ CELLEDØD I NEVRONER.....	88
4.2	GLUKOKORTIKOID- OG MINERALKORTIKOIDEFFEKTER PÅ TRANSFEKTERTE CELLER .....	90
4.2.1	<i>Proteinuttrykk i transfekterte celler</i> .....	90
4.2.2	<i>Fordeling av NMDA reseptorsubenheter og GR i CV-1 celler</i> .....	92
4.2.3	<i>Diskusjon av luciferase reportersystemer</i> .....	94
4.3	KONKLUSJON.....	105
	<b>REFERANSER</b> .....	<b>106</b>

## FORKORTELSER

Aldo	Aldosteron
AMP	Adenosin monofosfat
AMPA	Alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate
ANOVA	Analysis of Variance
Ara-C	Cytosine $\beta$ -D-arabino-furanoside
ATP	Adenosin 5-trifosfat
BBS	BES-bufret saltvann
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BES	N,N-Bis-(2-hydroksyetyl)-2-aminoetansulfonsyre
BME	Basal medium eagle
BSA	Bovint serum albumin
CBG	kortisolbindende globulin
CMV	Cytomegalovirus
CNS	Sentralnervesystemet
Cyt c	Cytokrom c
DBD	DNA-bindende domene
Dex	Deksametason
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DNase1	Deoksyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ER	Endoplasmatisk retikulum
EtOH	Etanol
FBS	Føtalt kalveserum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GABA	Gamma-aminosmørsyre
GC	Glukokortikoider
Gfp	Grønt fluorescerende protein
GR	Glukokortikoidreseptor
GRE	Glukokortikoid responselement

---

GRtr	Trunkert glukokortikoidreseptor
HRP	Horseradish peroksidase
Hsp90	90 kDa heat shock protein
LBD	Ligandbindende domene
LUC	luciferase
MAPK	Mitogenaktiverte proteinkinaser
Mef 2C	Myocyte enhancer factor 2C
MES	(2-(N-morpholino)etansulfonsyre)
mGR	Membran assosiert glukokortikoidreseptor
MQ	Milli Q
MR	Mineralkortikoidreseptor
mRNA	messenger-ribonukleinsyre
NFκB	nuclear factor-κB
NMDA	N-metyl-D-aspartat
nNOS	Nevronal nitrogenoksid syntase
NO	Nitrogenoksid
NR	NMDA reseptorsubenheter
PBS	Fosfat-bufret saltvann
PSD-95	Postsynaptic density-95
RL	Renillaluciferase
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
S & G	Stop & Glow
SDS	Natrium dodecyl sulfat
SE	Standardfeil
TBS	Tris bufret saltvann
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylenediamin
TG	Tris-glysin buffer
TGS	Tris-glysin-SDS buffer
TK	Tymidinkinase
Tris	Trishydroksymetylaminometan
Yfp	Gult fluorescerende protein



# 1. INNLEDNING

## 1.1 Glutamatreseptorer

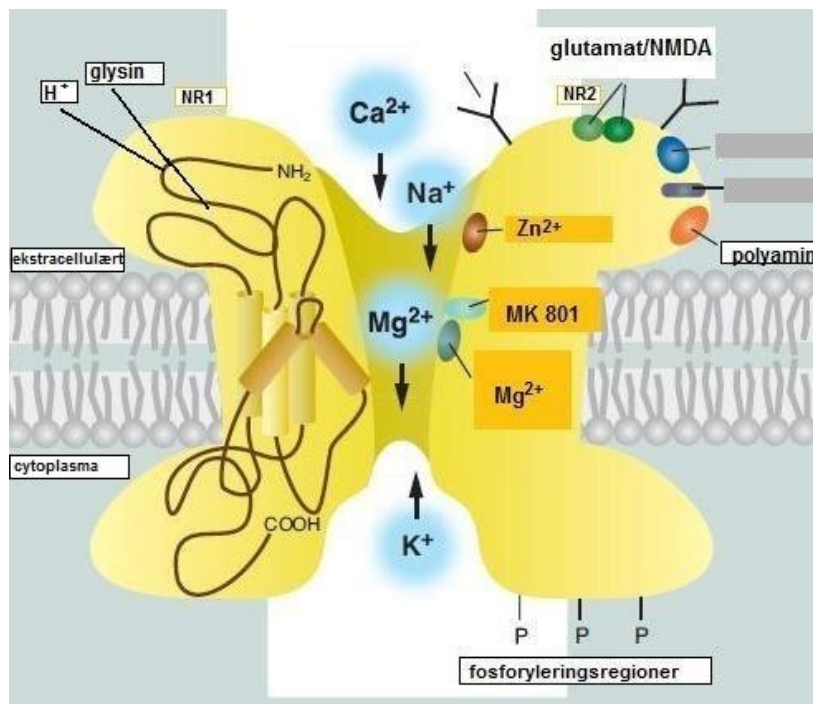
Eksitatorisk neurotransmisjon i hjernen er hovedsakelig mediert av glutamat. Så mye som 90 % av nevronene i hjernen bruker glutamat som neurotransmitter. Glutamatreseptorer kan deles inn i ionotrope og metabotrope glutamatreseptorer. Ionotrope glutamatreseptorer er ligandopererte ionekanaler som medierer størstedelen av eksitatorisk neurotransmisjon i hjernen. Disse reseptorene deles inn i 3 hovedklasser, og er oppkalt etter deres selektive agonister, nemlig N-metyl-D-aspartat-(NMDA), alfa-amino-3-hydroksey-5-metyl-4-isoxazolepropionate-(AMPA) og kainatreseptorer (Mayer, 2005). NMDA reseptoren er involvert i synaptisk plastisitet, læring, hukommelse, utvikling og er hovedansvarlig for eksitotoksisitet og omtales derfor videre her (Wollmuth *et al*, 2004).

### 1.1.1 NMDA reseptoren

NMDA reseptorer er lokalisert i cellemembranen. Synaptiske NMDA reseptorer som responderer til fysiologisk (lav dose) NMDA reseptor aktivering er assosiert med økt celleoverlevelse, mens ekstrasynaptiske NMDA reseptorer som er lokalisert på cellekroppen, aksoner eller dendritter, er assosiert med apoptose (Lu *et al*, 2003). NMDA reseptorer er heteromere komplekser bestående av flere subenheter. Disse subenhetene kodes av tre genfamilier: NR1, NR2 og NR3. Det er åtte ulike NR1 subenheter, og disse fås ved alternativ spleising av et enkelt gen. Det er fire ulike NR2 subenheter (A, B, C og D) og to NR3 subenheter (A og B). Seks ulike gener koder for NR2 og NR3 subenheter. Konklusjonen om at subenhetene danner tetramerer eller pentamerer er ikke endelig, men konsensusen er at NMDA reseptorer vanligvis er tetramerer som består av to NR1 og to NR2 subenheter eller en NR2 og en NR3 subenhet (Kloda *et al*, 2007; Paoletti *et al*, 2007).

NMDA reseptorer er en av de mest regulerte neurotransmitterreseptorene. Reseptoren har seks ulike bindingssteder for endogene ligander som kan regulere ionekanalåpningen. Aktivering av NMDA reseptorer som består av NR1- og NR2 subenheter krever samtidig binding av to agonister, nemlig glutamat og glysin.

Bindingssetet for glysin sitter på NR1 og bindingssetet for glutamat sitter på NR2 (Figur 1.1) (Paoletti *et al*, 2007). I tillegg finner vi polyamin regulatorisk sete som fremmer aktivering og bindingsseter for  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  og  $H^+$  som er med på å hemme ionefluksen gjennom reseptoren (Figur 1.1) (Kloda *et al*, 2007; Waxman *et al*, 2005).



**Figur 1.1: Skjematisk fremstilling av NMDA reseptoren.**

Figuren viser bindingsseter for glutamat og glysin, og blokkeringsseter for  $Mg^{2+}$  og  $Zn^{2+}$ . Figuren er modifisert fra (Dannhardt *et al*, 2007).

Kationkanalen i NMDA reseptoren blokkeres av  $Mg^{2+}$  og denne blokkeringen er spenningsavhengig. Dette betyr at NMDA reseptoren kun aktiveres etter depolarisering av cellemembranen for da fjernes  $Mg^{2+}$  blokkeringen.

Depolariseringen kan for eksempel skyldes aktivering av AMPA reseptorene som sitter ved NMDA reseptorene i den postsynaptiske membranen (Eriksson *et al*, 2007; Kloda *et al*, 2007).

Forskjellige subenheter i NMDA reseptorkomplekset resulterer i funksjonelt forskjellige reseptorer som har ulik sensitivitet til endogene og eksogene ligander, permeabilitet for og blokkering av divalente ioner, kinetiske egenskaper og interaksjon med intracellulære proteiner. Ulike NR1 subenheter i NMDA reseptorkomplekset påvirker evnen til å bli modulert av polyaminer,  $H^+$  og spenningsuavhengig  $Zn^{2+}$  modulering (Cull-Candy *et al*, 2001). NR2 subenheterne bestemmer biofysiologiske karakteristika av ione kanalen, som ledningsevne,

gjennomsnittlig åpningstid og sensitivitet til  $Mg^{2+}$  blokkering og  $Zn^{2+}$  blokkering (Cull-Candy *et al*, 2001; Cull-Candy *et al*, 1998; Perez-Otano *et al*, 2001; Waxman *et al*, 2005). NR3 subenheten danner ikke funksjonell reseptor alene, men kan uttrykkes sammen med NR1/NR2 komplekset eller kun NR1 subenheter (Cull-Candy *et al*, 2001). NR1 subenheter holdes igjen i ER, men en samling av NR1 subenhet sammen med NR2 og/eller NR3 vil føre til en funksjonell reseptor som transporteres til cellemembranen (Kloda *et al*, 2007; McIlhinney *et al*, 1998; Perez-Otano *et al*, 2001). Reseptorer som består av NR1- og NR2 subenheter karakteriseres av relativ høy kalsiumpermeabilitet, men inkorporeres NR3 i et kompleks sammen med NR1 og NR2 vil kalsiumpermeabiliteten (Kloda *et al*, 2007),  $Mg^{2+}$  blokkeringen (Awobuluyi *et al*, 2007; Paoletti *et al*, 2007) og ledningsresponsen reduseres (Cavara *et al*, 2008). I forsøk der *Xenopus* oocyter er injisert med NR1 og NR3 subenheter er det vist at NR1 i kombinasjon med enten NR3A eller NR3B kan danne eksitatoriske glysinreseptorer. Agonistbinding til NR3 subenheten alene er nok til å aktivere slike reseptorer. Disse reseptorene har vist seg å være relativt impermeable for  $Ca^{2+}$  ioner og er resistente mot  $Mg^{2+}$  blokkering og glutamat effekt (Chatterton *et al*, 2002).

NMDA reseptorsubenheter kan interagere med ulike intracellulære forankrings- og signalmolekyler som er assosiert med den postsynaptiske membranen (Cull-Candy *et al*, 2001). NR2C subenheten har bindingssete for flere proteiner i karboksylterminalen, som for eksempel PSD-95 (postsynaptic density-95). Gjennom dette proteinet kan reseptoren bli lokalisert med ulike nedstrømssignalmolekyler som medierer mange av reseptorens effekter (Waxman *et al*, 2005).

De forskjellige NMDA reseptorsubenhetene uttrykkes i forskjellig grad i ulike stadier av utviklingen, og er avhengig av lokaliseringen i hjernen. Hos rotter er NR1 subenheter distribuert over hele hjernen, både under utvikling og i moden alder, mens NR2 og NR3 subenheter er region- og aldersspesifikke reseptorer. NR2B og NR2D subenheter er hovedsakelig tilstede i embryonal rottehjerne, men blir supplementert eller erstattet med NR2A og i noen regioner, som i lillehjernen, med NR2C etter fødsel (Cull-Candy *et al*, 2001; Monyer *et al*, 1994; Popp *et al*, 2008; Wenzel *et al*, 1997).

---

Det er funnet uttalt ekspresjon av NR3A i både embryonale og voksne humane hjerner (Nilsson *et al*, 2007). Dette er i kontrast til nesten ikke-eksisterende NR3A ekspresjon hos voksne gnagere. Det er indikasjoner på at NR3A ekspresjonen i humane- og gnagerhjerner endrer seg forskjellig med alderen. Hos gnagere er ekspresjonen av NR3A hovedsakelig begrenset til embryonal hjerne og de første postnatale ukene. I de første postnatale ukene når NR3A ekspresjonen et maksimum, men deretter synker nivået drastisk, og hos voksne gnagere finnes NR3A kun i enkelte avgrensede områder i hjernen (Sucher *et al*, 1995). Visse regioner i humane voksne hjerner beholder høy NR3A ekspresjonen, men andre regioner i hjernen nedregulerer NR3A ekspresjonen (Eriksson *et al*, 2007; Henson *et al*, 2008; Nilsson *et al*, 2007). I mus forblir ekspresjonen av NR3B konstant gjennom det postnatale- og senere stadier i livet (Matsuda *et al*, 2002).

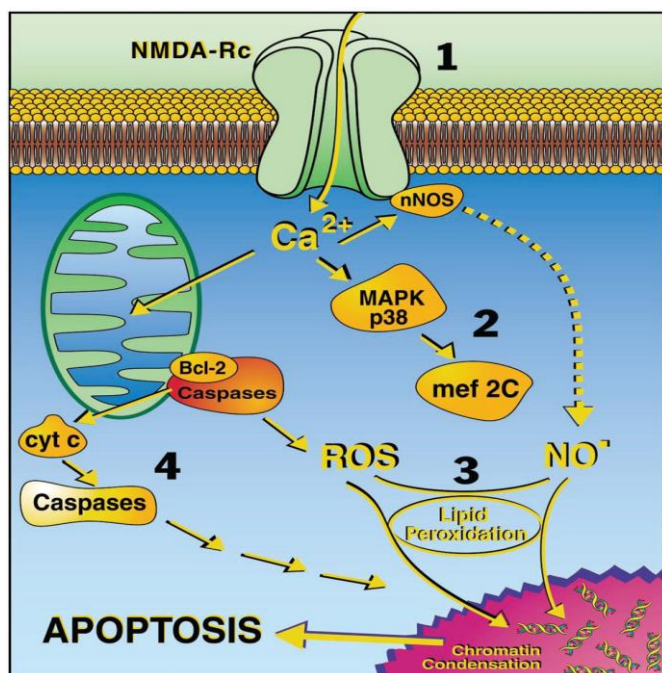
NMDA reseptoren kan blokkeres av selektive hemmere. MK 801 er en selektiv non-kompetitiv NMDA reseptorblokker. For at MK 801 skal blokkere kanalen må kanalen aktiveres først av agonister. Det er antatt at MK 801 og  $Mg^{2+}$  binder seg til et felles bindingssete i ionekanalene (se Figur 1.1).  $Mg^{2+}$  er en mer potent blokker av NMDA reseptorer som består NR1/NR2A og NR1/NR2B enn NR1/NR2C og NR1/NR2D subenheter. Dette gjelder også for MK 801 (Cull-Candy *et al*, 2001; Paoletti *et al*, 2007).

CGP 39551 er et annet eksempel på en selektiv NMDA reseptorantagonist. Dette er en kompetitiv antagonist og har samme bindingssete som glutamat (Cotterell *et al*, 1992).

### 1.1.2 Eksitotoksisitet

Eksitotoksisitetbegrepet ble lansert av John Olney i 1969 (Olney, 1969). Det ble definert som nevrodegenerasjon mediert av eksitatoriske aminosyrer. De fleste former for eksitotoksisitet krever aktivering av NMDA reseptoren (se Figur 1.2) (Waxman *et al*, 2005). Forlenget glutamatfrigjøring fører til overstimulering av NMDA reseptorer som fører til økt intracellulært  $Ca^{2+}$  og celledød via forskjellige intracellulære signalveier. Økt intracellulært  $Ca^{2+}$  aktiverer mange proteiner (for eksempel calpain,  $Ca^{2+}$ /calmodulin avhengige kinase II, calcineurin og mitogenaktiverte proteinkinaser (MAPK)) som er involvert i nedbrytning av proteiner,

fosforlipider og DNA og syntesen av nitrogen oksid (NO) (Koutsilieri *et al*, 2007; Waxman *et al*, 2005). Økt intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  fører til at mitokondriene tar opp  $\text{Ca}^{2+}$ , og dermed depolariserer mitokondriemembranen. Dette opptaket av  $\text{Ca}^{2+}$  fører til tap av ATP-produksjon på grunn av manglende mitokondriepotensial til å drive elektrontransportkjeden. Reduksjon av ATP-produksjon fører til at cellemembranens potensial ikke gjenoprettes, og dermed økt NMDA reseptoraktivering. Dysfunksjon av elektrontransportkjeden kan også føre til produksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS) som kan føre til celledød.  $\text{Ca}^{2+}$  avhengig aktivering av nevronal nitrogenoksid syntase (nNOS) fører til produksjon av NO som reagerer med superoksidradikal til å danne den veldig toksiske og reaktive forbindelsen peroksintritt (Lipton, 2004). Mitokondrielt opptak av kalsium kan også fremme frigjøring av proapoptotiske faktorer som cytokrom c (cyt c), og dermed aktivering av caspase-enzymmer. Disse enzymene kløyver proteinkinaser, cytoskjelettproteiner og DNA som leder til den morfologiske endringen ved apoptotisk celledød (se avsnitt 1.2) (Waxman *et al*, 2005).



**Figur 1.2: Skjematiske illustrasjon av noen apoptotiske signalveier som aktiveres av NMDA reseptor overaktivitet.**

1. NMDA reseptoren overaktiveres og dette fører til opphoping av intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ .
2. Aktivering av MAPK fører til aktivering av transkripsjonsfaktorer som bidrar til apoptose.
3. Frie radikaler som NO og ROS gir toksiske effekter.
4. Aktivering av apoptose induserende enzymmer som f.eks. cyt c og caspaser. Bcl-2 = B-cell lymphoma-2, nNOS = nevronal nitrogenoksid syntase, mef 2C = myocyte enhancer factor 2C, MAPK = mitogen aktiverede proteinkinaser. Figuren er modifisert fra (Lipton, 2004).

---

Transfekterte cellystemer er blitt brukt til å studere NMDA reseptorsubenhetsens spesifikke eksitotoksisitet. Det er vist at det er høyest celledød i celler som har NR1 og NR2A subenheter og aktivering av disse reseptorene gav også størst økning i intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  (Koutsilieri *et al*, 2007; Waxman *et al*, 2005). I motsetning er det vist at NR2A subenhet i NMDA reseptorer er assosiert med økt overlevelse av kortikale nevroner, mens NMDA reseptorer som har NR2B, fremmer apoptose (Liu *et al*, 2007). Dette er vist i både *in vitro* og *in vivo* systemer.

Eksitotoksisitet oppstår under cerebral iskemi (etter hjerneslag eller hjernetraume), og kan være involvert i nevrodegenerative sykdommer som Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom og Huntingtons sykdom. Overaktivitet av eksitatoriske signalveier er også observert i epilepsi og ved nevropatisk smerte (Kloda *et al*, 2007; Koutsilieri *et al*, 2007; Paoletti *et al*, 2007; Paulsen, 2000). Blokkering av NMDA reseptorer er derfor av stor terapeutisk interesse selv om de fleste NMDA reseptorantagonistene som ble oppdaget på 1980- og 1990-tallet gav uakseptable bivirkninger som for eksempel hallusinasjoner og hukommelsessvikt. Bivirkningene skyldes at NMDA reseptorantagonistene hemmet normal synaptisk transmisjon. Det antas at ikke alle NMDA reseptorsubenheterne er like viktige i nevronal død. Subenhet-selektive NMDA reseptorantagonister kan være løsningen i fremtiden, og studier har allerede vist en forbedret bivirkningsprofil. For eksempel er det funnet høy tetthet av NMDA reseptorer som består av NR2B subenheter i basalkjerner, og en NR2B-selektiv antagonist vil derfor kunne brukes i behandling av Parkinsons sykdom (Cull-Candy *et al*, 2001; Kloda *et al*, 2007; Koutsilieri *et al*, 2007; Paoletti *et al*, 2007).

## 1.2 Apoptose og nekrose

Tradisjonelt beskrives celledød som enten nekrose eller apoptose ut fra morfologiske og biokjemiske kriterier. Programmert celledød, apoptose, som ble først beskrevet i 1972 (Kerr *et al*, 1972) er en normal fysiologisk prosess som er viktig for fosterutvikling, CNS utvikling, celleturnover og immunsystemet. Celler som er blitt alvorlig skadet, har nådd sin levealder, eller som det ikke lenger er behov for, har en innebygd evne til selvødeleggelse ved aktivering av apoptose. Under apoptose kondenseres kjernen og cytoplasma, og DNA fragmenteres.

Cellefragmenter pakkes inn i membranfragmenter som så fagocyteres av makrofager. På denne måten blir celler raskt fjernet, og det forhindrer at andre celler i nærheten skades. Nekrose derimot kan resultere i større cellulære skader. Nekrose har tradisjonelt sett blitt karakterisert som en ukontrollert celledød hvor cellen sveller og sprekker slik at det frigjøres cytoplasmatiske materiale og inflammatoriske faktorer som ofte trigger inflammasjonsresponsen i organismen. Dermed kan nekrose resultere i større cellulære skader (Fink *et al*, 2005; Jana *et al*, 2007). Studier i senere tid har vist at disse to formene for celledød involverer mange av de samme cellulære mekanismene (Proskuryakov *et al*, 2003).

Apoptose kan induseres av mange typer stimuli som: toksiner, dannelse av frie radikaler, aktivering av dødsreseptorer (Jana *et al*, 2007; Vaudry *et al*, 2003), influks av ioner og mangel på vekstfaktorer (Vaudry *et al*, 2003). Eksponering av umoden hjerne til noen sedativa, antiepileptika, høyt oksygen og deksametason kan trigge apoptose av nevroner som igjen kan føre til kognitive eller motoriske defekter hos foster og spedbarn (Aden *et al*, 2008; Ikonomidou, 2009; Jacobs *et al*, 2006b).

Forstyrrelser i apoptosemekanismen (for mye eller for lite) er en faktor som spiller inn i mange ulike sykdommer. Tap av normal celledøds mekanisme hos selvfornyende celler kan resultere i kreft (Schulze-Bergkamen *et al*, 2004). Økt apoptose er assosiert med nevrodegenerative sykdommer som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom og amyotrofisk lateral sklerose. Ved hjerteinfarkt og hjerneslag vil celler i den iskemiske kjernen dø raskt av nekrose, mens celler som ligger rundt (penumbra) vil dø senere ved apoptose (Jana *et al*, 2007). Det er viktig at forskningen fortsetter å avdekke trinn som er involvert i apoptosemekanismer slik at sykdommer hvor apoptose er involvert, kan behandles mer effektivt (Elmore, 2007; Jana *et al*, 2007).

---

## 1.3 Steroider

Steroidhormonene kan deles inn i ulike klasser: glukokortikoider, mineralokortikoider, androgener, østrogener og progestogener (Kawata, 1995). Steroider som produseres fra kolesterol i hjernen uavhengig av endokrine kjertler, kalles neuroaktive steroider (Joels, 1997).

### 1.3.1 Glukokortikoider og glukokortikoidreseptoren

Glukokortikoider utøver mange fysiologiske effekter i kroppen, blant annet regulering av metabolisme, vekst, immunsystemet, nevronal funksjon og kroppens stressrespons. Glukokortikoider er en av de største markedsførte legemiddelgruppene på grunn av dens anti-inflammatoriske og immunsuppressive virkning (Borski, 2000).

Endogent glukokortikoid, kortisol, produseres i binyrebarkens zona fasciculata- og reticularis (Kemppainen *et al*, 1997). Kortisol sirkulerer i blodet bundet til kortisolbindende globulin (CBG) (ca. 60 %) og albumin (ca. 30 %), mens 5–10 % sirkulerer ubundet (Czock *et al*, 2005; Haug, 2007). Kortisol i spytt gjenspeiler den frie og biologisk aktive fraksjonen i serum (Løvås *et al*, 2007). Kortisol har en døgnvariasjon med høye nivåer tidlig på dagen ( $10^{-8}$  M i spytt) og lave nivåer sent på dagen ( $10^{-9}$  i spytt) (Laudat *et al*, 1988). Kortisolnivået øker ved stress ( $\geq 10$  ganger) (King *et al*, 2002). Siden glukokortikoider er fettløslige kan den frie fraksjonen passere blod-hjernebarrieren ved diffusjon (Abraham *et al*, 2001), men konsentrasjonen i hjernen kan reguleres ytterligere med blant annet lokalomdanning av aktive glukokortikoider til inaktive metabolitter og omvendt (De Kloet *et al*, 1998)

Glukokortikoidreseptoren (GR) er et medlem i steroid-tyroidea-retinoidreseptor superfamilien, og disse reseptorene virker som ligandavhengige transkripsjonsfaktorer. Til denne gruppen reseptorer hører reseptorer for steroidhormoner, tyroidea-hormoner, hormoner derivert fra vitamin A og D, men også en rekke "orphan"-reseptorer hvor ligander forløpig er ukjent (Falkenstein *et al*, 2000; Pippal *et al*, 2008).



Det finnes to ulike GR isoformer,  $\alpha$ GR og  $\beta$ GR.  $\alpha$ GR isoformen er uttrykt i nærmest alle celletyper og er funksjonell når de aktiveres av glukokortikoider.  $\beta$ GR isoformen utgjør kun 0,2-1,0 % av all GR ekspresjon og har ikke evne til å binde glukokortikoider grunnet deformert ligandbindene domene (Stahn *et al*, 2008).

Den klassiske GR er en intracellulær reseptor som befinner seg i cytoplasma når ligand ikke er bundet. GR er uttrykt i nevroner og gliaceller. I rotte er GR lokalisert i hele hjernen med økt ekspresjon i det limbiske systemet (hippocampus og septum) og deler av hjernebarken (Joels *et al*, 1994; Ozawa, 2005). I en studie er det vist at lillehjerner i neonatale rotter inneholder det høyeste nivået av GR som er målt i hjernen (Pavlik *et al*, 1984).

## Deksametason

Deksametason (9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -metylprednisolon) er et syntetisk høy-potent glukokortikoid som har omtrent ingen saltretarderende egenskaper (Rosenberg *et al*, 1980). Deksametason er det glukokortikoidet som oftest har vært brukt til å forebygge og behandle bronkopulmonal dysplasi hos premature barn (Grier *et al*, 2005). Bronkopulmonal dysplasi er en kronisk lungesykdom og tilstanden kjennetegnes av kroniske forandringer i lungestrukturen (Farstad *et al*, 2007). Både dosering og behandlingstid av premature barn varierer mye. Det vanligste doseringsregimet som er undersøkt i en systematisk oversiktartikkel, gir en maksimal dose på 0,5mg/kg/døgn fordelt på to doser (Grier *et al*, 2005). Hos voksne vil en deksametasondose på 0,25mg/kg føre til en maksimal plasmakonsentrasjon på ca. 0,5  $\mu$ M (Czock *et al*, 2005). Deksametason har ingen affinitet til CBG, men binder til albumin i plasma (ca. 75 %) (Cummings *et al*, 1990). På slutten av 1990-tallet kom det data som viste at postnatal deksametasonbehandling av premature barn førte til hemmet neurologisk utvikling (Barrington, 2001). Det er vist at deksametasonbehandling hos premature barn kan gi defekter i motorisk og kognitiv funksjon, og en høyere risiko for cerebral parese er rapportert (Shinwell *et al*, 2000; Yeh *et al*, 2004). Dette har ført til reduksjon i postnatal bruk av høy-potente glukokortikoider (Grier *et al*, 2005). Selv om man antar at profylaktisk glukokortikoidbehandling av gravide er sikker, er man usikre på langtidseffekter ved gjentatte doseringer (Crowther *et al*, 2007).

---

### 1.3.2 Mineralkortikoider og mineralkortikoidreseptoren

Mineralkortikoider spiller en viktig rolle i regulering av væske- og elektrolyttbalansen og kontroll av blodtrykk (Booth *et al*, 2002; Pippal *et al*, 2008).

Mineralkortikoidreseptoren (MR) er en intracellulær cytoplasmatisk reseptor som er uttrykt i blant annet epitelceller som finnes i for eksempel nyrer, svettekjertler og kolon. MR er også uttrykt i spesifikke regioner i rottehjernen med uttalt ekspresjon i hippocampus, hypothalamus og hjernebarken (Ozawa, 2005; Rogerson *et al*, 2004). MR er en fysiologisk viktig reseptor for to klasser hormoner, mineralkortikoidene aldosteron og deoksykortikosteron og glukokortikoidene kortisol (hos mennesker) og kortikosteron (hos gnager). Plasmakonsentrasjonen av kortisol er 1000 ganger høyere enn aldosteron, og når de binder til MR med lik affinitet vil det bety at kortisol okkuperer mesteparten av all MR i kroppen. Dette er forhindret av at målceller for aldosteron har et enzym som omdanner kortisol til metabolitter som verken kan binde til MR eller GR. I celler hvor dette enzymet ikke er uttrykt sammen med MR, fungerer MR hovedsakelig som en kortisol reseptor (Pippal *et al*, 2008; Rogerson *et al*, 2004). Aminosyresekvensen i ligandbindende domene i humane GR og MR er 57 % identisk (Pippal *et al*, 2008). Dette betyr at agonister og antagonister, som er spesifikk for MR, kan interagere med GR ved høyere ligandkonsentrasjoner.

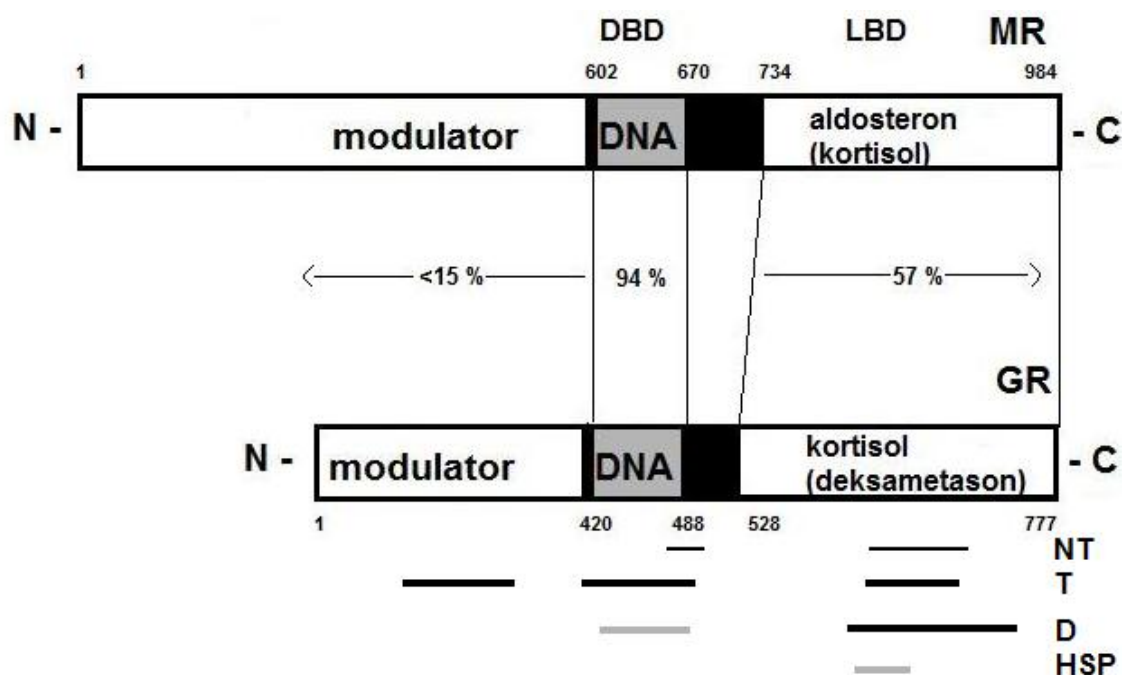
#### Aldosteron

Aldosteron er et endogent mineralkortikoid som produseres i binyrebarkens zona glomerulosa. Senere studier har vist at aldosteron også produseres i CNS (Losel *et al*, 2008; Pippal *et al*, 2008). Aldosteron medierer sine effekter ved å virke på MR, men kan også binde til GR med lav affinitet (Reagan *et al*, 1997). Aldosteron er assosiert med hypertensjon og er økt ved hjertesvikt. Spironolakton, en MR antagonist, brukes blant annet i behandling av ødemer, hypertensjon og hjertesvikt (Booth *et al*, 2002). RU 28318, en selektiv MR antagonist, har blitt rapportert å være bedre enn spironolakton med tanke på en høyere *in vivo* anti-mineralkortikoid aktivitet og lavere anti-androgen aktivitet, men *in vitro* reseptor bindingsstudier viser at RU 28318 også interagerer med GR (Kim *et al*, 1998; Sutanto *et al*, 1988). RU 28318 er rapportert til å ha lik bindingsaffinitet til GR og MR *in vitro* (Coirini *et al*, 1985), men i *in vivo* omdannes RU 28318 raskt til gamma-laktonformen (RU 26752) som har høy bindingsaffinitet til MR (Kim *et al*, 1998).

### 1.3.3 Klassiske steroideffekter

De klassiske effektene av glukokortikoider og mineralokortikoider medieres gjennom intracellulære kjernereseptorer som virker som ligandavhengige transkripsjonsfaktorer. Effekten kjennetegnes ved at virkningene er forsinket i forhold til eksponering av steroider. I lymfocytter fra rottethymus er endringer i mRNA tidligst sett etter 15 minutter. Proteinkonsentrasjoner kan endres etter minimum 30 minutter og effekter på vev eller organnivå etter timer eller dager. I tillegg er den klassiske steroideffekten sensitiv for hemmere av transkripsjon og translasjon (Czock *et al*, 2005; Falkenstein *et al*, 2000).

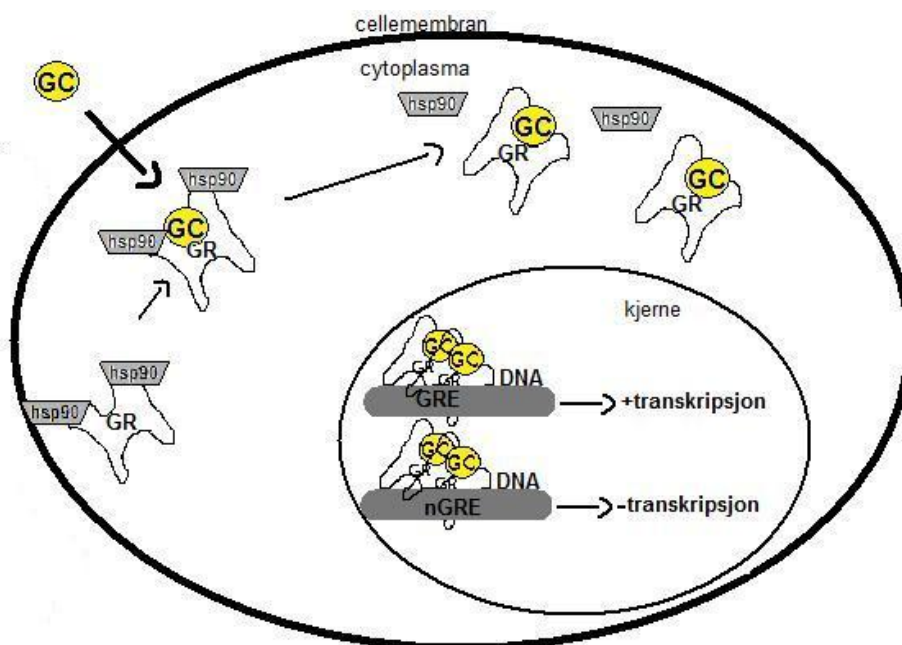
Både GR og MR består av et ligandbindende domene, et DNA-bindende domene og flere strukturdeler med transaktiveringsfunksjoner slik som andre medlemmer i steroid-tyroidea-retinoidreseptor superfamilien (se Figur 1.3) (Falkenstein *et al*, 2000; Pippal *et al*, 2008)



**Figur 1.3: Struktur og funksjonell organisering av steroidreseptoren.**

Modulator = en variabel N-terminal region som kan ha modulatorisk effekt på transaktiveringen. DBD = DNA-bindende domene med åtte cystein aminosyrer som danner to sinkfingrer. LBD = ligandbindende domene som er ansvarlig for steroidbinding og kjernetranslokasjon. Tallene angir aminosyreposisjon. Prosentene angir samsvar i aminosyrer mellom hvert domene. MR = mineralokortikoidreseptor, GR = glukokortikoidreseptor, NT = nukleær translokasjon, T = transaktivering, D = dimerisering, HSP = binding for 90 kDa heat shock protein (Beato, 1989; Fuller *et al*, 2000).

Den ligand-frie GR og MR er del av et større kompleks bestående av flere proteiner som regulerer reseptorens ansamling, stabilitet, ligandaffinitet og evne til å bli aktivert og translokert til kjernen (Figur 1.4). Et av de viktigste proteinene er hsp90 (90 kDa heat shock protein). En av hovedoppgavene til hsp90, er å holde bindingssetet i GR i en optimal folding med høy affinitet til ligander. GR inneholder også en rekke fosforyleringssteder og fosforyleringsgraden kan endre ligandaffiniteten og transkripsjonseffektiviteten. Når ligand bindes til reseptoren i cytoplasma, dissosierer GR eller MR fra proteinene i komplekset før reseptor-ligandkomplekset translokeres til kjernen ved hjelp av nukleær lokaliseringsssekvens (Kumar *et al*, 2005). I kjernen virker GR eller MR komplekset som transkripsjonsfaktorer som binder kritiske regulatoriske seter på DNA. Disse setene kalles GRE (glukokortikoid responselementer). GR og MR bindes til DNA som homodimerer. Sluttresultatet er enten aktivering eller hemming av genekspressjon (Falkenstein *et al*, 2000; Rogerson *et al*, 2004; Stahn *et al*, 2008). Responselement, som er spesifikk for MR men ikke for GR, er fortsatt ikke oppdaget (Pippal *et al*, 2008).



**Figur 1.4: Glukokortikoiders virkningsmekanisme via den klassiske GR.**

Den inaktive GR er bundet til proteiner i cytoplasma. Når et glukokortikoid (GC) diffunderer gjennom celledmembranen og binder GR, vil proteinene dissosiere fra GR som da vil translokeres inn i kjernen. Homodimerer av GR vil binde GRE/nGRE og fører til opp- eller nedregulering av spesifikke gener. GC = glukokortikoider, GR = glukokortikoidreseptor, hsp90 = 90 kDa heat shock protein, nGRE = negativ glukokortikoid responselementer (Falkenstein *et al*, 2000; Stahn *et al*, 2008).

Glukokortikoider kan også regulere transkripsjon uten å binde direkte til DNA, men ved å assosiere med andre transkripsjonsfaktorer, og dermed regulere deres transkripsjonelle aktivitet (Cato *et al*, 2002; Tasker *et al*, 2006). Interaksjonen mellom ligandokkupert GR og transkripsjonsfaktor AP-1 (aktiverende protein 1) eller NFκB (kjerne reseptor-κB) vil føre til nedregulering av aktiviteten til disse transkripsjonsfaktorene. Dette danner basisen for den anti-inflammatoriske virkningen av glukokortikoider (Cato *et al*, 2002; Stahn *et al*, 2008).

### 1.3.4 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 en effekt via genekspressjon. Disse raske effektene kalles ikke-genomiske effekter. Eksempler på slike effekter er endret hormonsekresjon, nevronal eksitabilitet, cellemorfologi og karbohydratmetabolisme (Borski, 2000). Det er antatt at alle steroidklassene kan ha en ikke-genomisk effekt (Falkenstein *et al*, 2000; Levin, 2008). Raske ikke-genomiske steroideffekter er ofte koblet til "second messenger" kaskader (Tasker *et al*, 2006; Wehling *et al*, 2006).

Molekylære mekanismer som medierer ikke-genomiske effekter av steroider er klassifisert på mange måter. En såkalt Mannheim-klassifisering deler mekanismene inn i to hovedgrupper: direkte effekter hvor steroidene virker alene (A) og indirekte effekter hvor steroidene trenger en agonistpartner til å generere raske responser (B). Gruppe A er igjen delt inn i en ikke-spesifikk (A.I) og en spesifikk gruppe (A.II) hvor en steroidreseptor er involvert. Spesifikke effekter er antatt å mediere gjennom enten en klassisk steroid reseptor (A.II.a) eller en ikke-klassisk steroidreseptor (A.II.b) (Haller *et al*, 2008).

**A.I:** Steroider kan interagere direkte med membraner og cytoplasmatiske proteiner som proteinkinaser, uten at en spesifikk reseptor er involvert. Steroider kan bli satt inn i membranlipidene og kan dermed endre membranens fysiokjemiske egenskaper slik som fluiditeten. Dette påvirker aktiviteten til membranassosierte proteiner som kalsium- og natriumionekanaler (Grier *et al*, 2005; Haller *et al*, 2008). Dette skjer antagelig ikke før ved høye, ikke fysiologiske steroidkonsentrasjoner ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) (Cato *et al*, 2002; Falkenstein *et al*, 2000; Haller *et al*, 2008).

---

**A.II.a:** Den klassiske steroidreseptoren er også involvert i ikke-genomiske effekter, men da er reseptoren assosiert med cellemembranen (Tasker *et al*, 2006). Denne typen effekt kan også medieres via andre membranreseptorer som ligandopererte ionekanaler og nevrotransmittreseptorer (klassifisert som B) (Haller *et al*, 2008).

**A.II.b:** Ikke-genomiske effekter er også mediert via membran-steroidreseptorer som har egenskaper som er ulik den klassiske intracellulære steroidreseptoren. Det er antatt at ikke-genomiske effekter av glukokortikoider er mediert via en membran assosiert glukokortikoidreseptor (mGR) (Chen *et al*, 1999). Ved bruk av elektronmikroskop på rottehjerner er det funnet GR i postsynaptiske membraner i lateral amygdala (Johnson *et al*, 2005). Studier har vist en del forskjeller mellom mGR og GR. Forskjellene er cellulær lokalisering, molekylvekt og bindingsaffinitet for glukokortikoider. Det antas at mGR er en modifisert form av GR (Falkenstein *et al*, 2000; Gametchu *et al*, 2002; Stahn *et al*, 2008). En alternativ spleising av GR transkriptet er assosiert med tilstedeværelse av mGR i lymfocytter til mus. mGR (150 kDa) har høyere molekylvekt enn GR (94 kDa). Transkriptet av mGR gir ingen ekstra sekvenser som forklarer den høye molekylvekten, men det er antydning at det kan skyldes post-translasjonelle modifikasjoner (Chen *et al*, 1999). mGR har en  $K_d$  verdi for deksametasonbinding som er mer enn 10 ganger høyere enn deksametasonbinding til GR (Powell *et al*, 1999), noe som kan bety at glukokortikoider kan mediere effekter ved andre konsentrasjoner enn effekter som er mediert via genekspressjon.

Det er også funnet likheter mellom disse to reseptorene. For eksempel har både mGR og GR gjenkjennelsesepitope for tre GR antistoffer. De kan binde den samme steroidklassen og GRE og assosiere med de samme heat shock proteinene og kan bli fosforylert.

Ikke-genomiske effekter som er mediert av aldosteron, er insensitiv til tradisjonelle hemmere av MR, for eksempel spironolakton. Det spekuleres derfor om det finnes en membran MR (mMR) slik som for GR (Losel *et al*, 2008). Det antas at denne mMR har egenskaper og bindingsaffinitet til aldosteron som er forskjellig fra den klassiske MR, men det har ikke lyktes å isolere og karakterisere denne putative reseptoren (Booth *et al*, 2002; Funder, 2005).

## 1.4 Glukokortikoidindusert nevrotoksisitet

Både glukokortikoider og mineralkortikoider er involvert i sentrale funksjoner som er viktig for nevronal overlevelse og remodellering, men de er også involvert i nevronal død (Abraham *et al*, 2001; Reagan *et al*, 1997). Mangel på eller for høy konsentrasjon av glukokortikoider medvirker til at hjernen blir mer utsatt for nevrotoksiske skader, mens fysiologiske konsentrasjoner av glukokortikoider kan virke beskyttende mot eksitotoksiske stimuli (Abraham *et al*, 2001). I tillegg til det som er nevnt under avsnittet deksametason (avsnitt 1.3.1), er det vist at glukokortikoider produsert endogent ved stress eller eksogent tilført over lang tid kan gi nerveskader (Morita *et al*, 1999; Takahashi *et al*, 2002). Korncellekulturer fra rotter som ble eksponert for deksametason prenatalt, viste økt sensitivitet til oksidativ stressindusert celledød (Ahlbom *et al*, 2000). Glukokortikoidinduserte nerveskader skjer oftere i hippocampus hvor det er en høy mengde av GR (Lee *et al*, 2002). Glukokortikoider kan mediere sin toksisitet gjennom ulike mekanismer som for eksempel via hemming av opptak av glukose i hjernen fra sirkulasjonen eller interaksjon med andre reseptorer (Abraham *et al*, 2001).

### 1.4.1 Interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren

Flere studier tyder på at det kan være en sammenheng mellom glukokortikoidindusert nevrotoksisitet og NMDA reseptoren. Det er vist at eksponering med glukokortikoider kan endre eller øke antall NMDA reseptorer (Lu *et al*, 2003). Kronisk eksponering eller stressindusert frigjøring av høye konsentrasjoner av glukokortikoider kan trigge frigjøring av glutamat og intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  til eksitotoksiske konsentrasjoner, noe som er svært skadelig for hjernen (se avsnitt 1.1.2) (Abraham *et al*, 2001).

Hos nevroner fra rotte hippocampus er det vist at kortikosteron fører til forlengelse av NMDA reseptormediert økning i intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$  (Takahashi *et al*, 2002). Både deksametason og kortisol har en lignende effekt. Denne økningen kan blokkeres av NMDA reseptorantagonisten MK 801. Kortikosteroneffekten er ikke mediert via den klassiske genreguleringen av glukokortikoid siden effekten inntrådte raskt og ikke ble forhindret av proteinsyntese-hemmeren cykloheximid. BSA-konjugerte kortikosteron som ikke kommer inn i cytoplasma, førte også til forlengelse av NMDA

---

reseptormediert økning i intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ . Dette tyder på at reseptoren som er involvert kan sitte i cellemembranen (mGR, se avsnitt 1.3.4). Det er derfor antatt at kalsiumøkningen skyldes en interaksjon mellom en putativ membranreseptor og NMDA reseptoren. En studie utført på rotte hippocampus, viser at eksponering med kortikosteron i tillegg til NMDA øker den NMDA medierte toksisiteten (Mulholland *et al*, 2006). Dette skjedde uavhengig av GRs funksjon eller proteinsyntese siden disse effektene ikke ble forhindret av MR antagonisten spironolakton, GR antagonisten RU 38486 eller cykloheximid. MK 801 blokkerte også effekten her.

Deksametasonindusert celledød i kornceller fra rotte-lillehjerne ble redusert av NMDA reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551 og GR/MR antagonisten RU 28318, men celledøden var ikke additiv eller synergisk til glutamat (Jacobs *et al*, 2006b). I kornceller fra kylling-lillehjerne er det vist at lav-potent glukokortikoid hydrokortison induserer celledød ved lik konsentrasjon som høy-potent glukokortikoid deksametason, og at denne toksisiteten kan reduseres med MK 801 og RU 28318 (Aden *et al*, 2008).

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



## 1.5 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 både deksametason og aldosteron induserer celledød i kyllingkornceller;
- om CV-1 celler uttrykker GR eller NMDA reseptorer naturlig;
- hvordan NMDA reseptorsubenheter fordeles når CV-1 celler transfekteres for å uttrykke dem;
- om GRE-luc og NF $\kappa$ B-luc promotorene kan nedreguleres av GR og MR og om aldosteron kan aktivere GR;
- om antagonistene MK 801, CGP 39551 og RU 28318 har en direkte virkning på GR;
- om det er en interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren og om interaksjonen skjer i karboksylterminalen til GR.

## 2. MATERIALER OG METODER

### 2.1 Celle typer

#### 2.1.1 Korncellekulturer

Primærkulturer av kornceller fra nyfødte rotter er en mye brukt modell i studier av nevronal celledød og overlevelse og har bidratt til viktig forståelse av mekanismene bak celledød (Contestabile, 2002; Vaudry *et al*, 2003). En av ulempene med denne kulturen er at den er avhengig av depolariserende forhold (25 mM kalium) i mediet (Gallo *et al*, 1987). Fysiologiske forhold er ca. 5 mM kalium (Jacobs *et al*, 2006a).

Primærkulturer av kornceller fra kyllingembryo kan brukes som en alternativ modell for å studere celledøds mekanismer. Disse korncellene kan både vokse under depolariserende forhold og fysiologiske konsentrasjoner av kalium. Siden kyllingembryo kan ruges uten at man trenger dyrestallfasiliteter, er den også et rimeligere alternativ sammenlignet med rotter. Dessuten utvikler kyllingkornceller raskere glutamatsensitivitet i kultur (3 dager *in vitro*) enn kornceller fra rotter (7 dager *in vitro*) (Jacobs *et al*, 2006a). Dermed er det mulig å studere eksitotoksisitet som forutsetter glutamatsensitivitet tidligere, og dette blir derfor mer tidsbesparende.

#### 2.1.2 CV-1 celler

CV-1 celler er en fibroblastcellelinje som stammer fra nyreceller til en afrikansk apeart, *Cercopithecus aethiops* (Hopps *et al*, 1963). Cellelinjen er stabil, vokser bra og blir konfluent etter 3-4 dager. CV-1 cellene lar seg lett transfektere. CV-1 celler uttrykker vanligvis ikke GR eller MR (Giguere *et al*, 1986). Siden CV-1 celler er fibroblastceller, er det lite sannsynlig at de uttrykker NMDA reseptorer naturlig. Dette er også vist i resultatdelen (3.2).

## 2.2 Korncellekulturer

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

For å oppnå bedre feste av korncellene til skålene behandles skålene med poly-L-lysin dagen før preparering av kulturene.

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

1. 10 ml fra en flaske med 500 ml autoklavert MQ vann overføres til en steril flaske med 5 mg poly-L-lysin.
2. Blandingen overføres tilbake til 500 ml flasken.
3. 1 ml av denne løsningen tilsettes til 8,8 cm<sup>2</sup> skåler, 2 ml til 21,5 cm<sup>2</sup> skåler og 5 ml til 66,5 cm<sup>2</sup> skåler.
4. Poly-L-lysin løsningen suges av etter 30-60 minutter og skålene tørkes over natt i en steril LAF benk.

### 2.2.2 Preparering av korncellekulturer

Befruktede kyllingegg fra Samvirkekylling, i Våler, ruges i rugemaskin ved 37 °C i 18 dager. Kyllingene tas ut av eggene og avlives ved dekapitering, og lillehjernen tas ut til preparering av korncellekulturer. Alt arbeid med cellene frem til eksponering foregår sterilt. Sterilisert utstyr er vist i Tabell 2.1.

#### Prosedyre for preparering av korncellekulturer

1. Kyllingene bedøves ved at eggene legges i isvann i ca. 10 minutter.
2. 6 egg tas av gangen.
3. Eggene vaskes med 70 % sprit før de knekkes.
4. En steril skalpell brukes til å skjære over halsen. Hodene fraktes til LAF-benk og lillehjernen dissekteres ut med saks og pinsett og overføres til en stor petriskål med løsning 1 (Krebs-Ringerløsning 10X i Tabell 2.2, Tabell 2.3).
5. Hjernehinnene fjernes forsiktig med 2 pinsetter og lillehjernen overføres til en ny stor petriskål med løsning 1.
6. Løsning 1 suges av og lillehjernen kuttes i små biter med en skalpell. Det kuttes i to retninger vinkelrett på hverandre.

7. 10 ml av løsning 1 tilsettes igjen skålen og bitene overføres til et sterilt 50 ml rør med nye 10 ml av løsning 1. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt. Supernatanten fjernes. Pelleten resuspenderes i 8 ml løsning 2 (Tabell 2.3).
8. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske og settes i vannbad ved 37 °C i 15 minutter. Korkene skruses halvveis og flasken ristes forsiktig med jevne mellomrom.
9. Bitene fra trypsineringsflasken suges opp og overføres til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 4 (Tabell 2.3). Røret fylles opp til 50 ml med løsning 4 og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter. Hvis supernatanten etter sentrifugering ikke er klar, kan en liten mengde løsning 3 (Tabell 2.3) tilsettes røret og sentrifugeringen gjentas.
10. Supernatanten suges av og i røret tilsettes 3 ml løsning 3.
11. Pelleten løses forsiktig ved å pipettere opp og ned 15-20 ganger med en pasteurpipette med avrundet spiss (avrundes i flamme). Når celleklumpene har sunket ned i røret, overføres den øverste klumpfrie delen av løsningen til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 5 (Tabell 2.3).
12. Ved behov kan trinn 10-11 gjentas helt til det ikke er lenger synlige celleklumper tilstede og resten av løsningen overføres til røret som inneholder løsning 5.
13. Cellesuspensjonen med løsning 5 sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.
14. Supernatanten suges av, og 10 ml platemedium (Tabell 2.4) tilsettes.
15. Pelleten løses og alt overføres til en glassflaske med samme medium som inneholder halvparten av den mengden medium som er beregnet ut fra antall preparerte skåler. En liten prøve tas ut til celledelling i et Burcher tellekammer.
16. Cellesuspensjonen fortynnes med platemedium til en tetthet på  $1,7 \times 10^6$  celler per ml medium. Dette oppnås ved hjelp av formelen:

Antall ml platemedium totalt

= antall ml cellesuspensjon x celletetthet per ml i cellesuspensjonen

ønsket celletetthet per ml

17. Cellesuspensjonen overføres til skåler som er behandlet med poly-L-lysin dagen før. Antall ml cellesuspensjon per skål er angitt i Tabell 2.5.
18. Skålene inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabell 2.1: Sterilt utstyr til preparering av korncellekulturer**

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

**Tabell 2.2: Krebs-Ringerløsning 10X**

Innholdsstoffer	Mengde
Fenolrødt	50 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,83 g
KCl	1,80 g
Glukose	12,85 g
NaCl	35,35 g
$\text{NaHCO}_3$	10,70 g
Destillert vann	ad 500 ml
Krebs-Ringerløsningen kan lagres i kjøleskap i 5-6 måneder	

Løsningene 1-5 (Tabell 2.3) lages ny for hver korncellepreparering og sterilfiltreres (0,2  $\mu$ M) før bruk.

**Tabell 2.3: Løsninger 1-5**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Løsning 1	Bovint serum albumin (BSA)	1,50 g
	MgSO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	4 ml
	Krebs-Ringerløsning 10X (Tabell 2.2)	50 ml
	Destillert vann	ad 500 ml
Løsning 2	Trypsin type III	25 mg
	Løsning 1	100 ml
Løsning 3	MgSO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	0,50 ml
	Deoksyribonuklease I (Dnase I)	6,25 mg
	Trypsinhemmer (Type1-S)	26,0 mg
	Løsning 1	ad 50 ml
Løsning 4	Løsning 3	16 ml
	Løsning 1	100 ml
Løsning 5	MgSO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	0,320 ml
	CaCl <sub>2</sub> (1,20 g/100 ml destillert vann)	0,320 ml
	Løsning 1	40 ml

**Tabell 2.4: Platemedium til kylling korncellekulturer**

Innholdsstoffer	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
Kyllingserum (varmeinaktivert)	50 ml
Hesteserum (varmeinaktivert)	50 ml
Gentamycinsulfat	50 mg
L-glutamin	146 mg
KCl	825 mg*
Oppbevares kjølig	
* 5,4 mg er allerede tilstedet i mediet	

**Tabell 2.5: Antall ml cellesuspensjon per skål**

Store skåler (66,5 cm <sup>2</sup> ): 10 ml
Medium skåler (21,5 cm <sup>2</sup> ): 3,3 ml
Små skåler (8,8 cm <sup>2</sup> ): 1 ml cellesuspensjon pluss 1 ml cellemedium

### 2.2.3 Tilsetting av Ara-C

Cytosine  $\beta$ -D-arabino-furanoside (Ara-C) tilsettes kulturene 16-20 timer etter preparering for å hindre vekst av ikke-nevronale celler.

Det byttes fra platemedium til lik mengde ernæringsmedium (Tabell 2.6) samtidig med tilsetting av Ara-C. 1 mg Ara-C løses i 10 ml ernæringsmedium og sterilfiltreres (0,2  $\mu$ m). Det tilsettes 25  $\mu$ l per ml ernæringsmedium.

**Tabell 2.6: Ernæringsmedium til kylling korncellekulturer**

Innholdsstoffer	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
Kyllingserum (varmeinaktivert)	25 ml
Gentamycinsulfat	50 mg
L-glutamin	146 mg
KCl	825 mg*
Oppbevares kjølig	
*5,4 mg er allerede tilstedet i mediet	

## 2.3 Splitting av CV 1 celler

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

### Prosedyre for splitting av CV-1 celler til cellekulturflasker

1. Cellekulturflasken undersøkes i mikroskop for å se om cellene er konfluente.
2. Gammelt medium tømmes av flasken.
3. 2 ml trypsin-EDTA tilsettes. Flasken beveges slik at hele bunnen skylles.  
Deretter tømmes trypsinen av.
4. 2 ml trypsin-EDTA tilsettes igjen. Dette pipetteres av etter ca. 30 sekunder.
5. Flasken inkuberes i 5-10 minutter ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.
6. Flasken tas ut og bankes på siden slik at cellene løsner fra bunnen.
7. Løsner ikke cellene gjentas punkt 4-6.
8. 10 ml CV-1 medium med serum (Tabell 2.7) tilsettes flasken.
9. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned ca. 10 ganger for å få jevn fordeling av cellene. Hele bunnen av flasken skylles når cellesuspensjonen pipetteres ned.
10. 1,5 ml tilsettes til en ny cellekulturflaske som brukes ved neste splitting og 1,5 ml settes igjen i den gamle flasken som brukes som "back up".



11. Til hver cellekulturflaske tilsettes 20 ml CV-1 medium med serum.

**Tabell 2.7: CV-1 medium med føtalt kalveserum**

Innholdsstoffer	Mengde
Dulbecco`s modified Eagles`s medium (DMEM)	500 ml
Føtalt kalveserum (FBS)	50 ml
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 000 µg/ml)	5 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
Oppbevares kjølig	

### Prosedyre for splitting av CV-1 celler til skåler

12. Cellene splittes som beskrevet i punkt 1-9 ovenfor.

13. Volum av cellesuspensjonen som skal brukes til skåler regnes ut etter denne formelen:

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

Antall ml cellesuspensjon per skål er angitt i Tabell 2.5.

14. En liten prøve tas ut til celledelling i et Burcher tellekammer. Det telles 2 rutenett (4 x 4 ruter), ett på hver side av midten på tellekammeret. Celledettheten i flasken blir gjennomsnittet av de 2 tellingene.

15. Den utregnede mengden cellesuspensjon tilsettes et volum av CV-1 medium med serum funnet ved denne formelen:

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

16. Cellesuspensjonen og CV-1 medium med serum blandes og overføres til sterile skåler.

## 2.4 Transfeksjon av CV-1 celler og kyllingkornceller

### 2.4.1 Transfeksjon av CV-1 celler med kalsiumfosfat

Metoden går ut på at kalsiumfosfat danner presipitat med DNA, og dette presipitatet tas opp av cellene med endocytose (Chen *et al*, 1987). Cellene transfekteres dagen etter at de splittes til skåler. For Westernblotting ble cellene dyrket i store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) med 10 ml medium. For mikroskopi og luciferasemålinger ble cellene dyrket i medium skåler (21,5 cm<sup>2</sup>) med 3,3 ml medium.

#### Prosedyre for transfeksjon av CV-1 celler

1. Den totale konsentrasjonen av DNA i medium skal være 1 µg/ml, og blandes ut i 1/10 av volumet i skålene. Mengde DNA som brukes er angitt i (Tabell 2.8).
2. Mengde transfeksjonsløsning beregnes ut etter denne formelen:

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

3. Transfeksjonsløsningen lages ved å blande like mengder av BBS og 0,25 M CaCl<sub>2</sub> (Tabell 2.9).
4. Det tilsettes 10 µg DNA til 1 ml transfeksjonsløsning.
5. Volumet av hver plasmidløsning som skal tilsettes beregnes etter denne formelen:

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

6. Når plasmidene som er ønsket i forsøket er tilsatt, fylles det opp med CMV slik at det blir 10 µg DNA totalt til 1 ml transfeksjonsløsning (optimal DNA mengde).
7. Eppendorfrøret whirlmikses i 10 sekunder og inkuberes i romtemperatur i 20 minutter.

8. Mengde transfeksjonsløsning som skal tilsettes til hver skål regnes ut etter denne formelen:

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

9. Transfeksjonsløsningen tilsettes dråpevis mens skålene beveges forsiktig.  
 10. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.  
 11. Mediet skiftes dagen etter.

**Tabell 2.8: Plasmider brukt til transfeksjon**

Genprodukt	Kilde	Plasmidets forkortelse	Konsentrasjon per ml transfeksjonsløsning
Ildfluoluciferase under kontroll av GRE promotor	Gave fra J.Milbrandt, Washington University School of Medicine	GRE-luc <sup>1</sup>	4 µg
Ilfluoluciferase under kontroll av NFκB følsom promotor	Gave fra O.C. Meijer University of California	NFκB-luc <sup>2</sup>	4 µg
Renillaluciferase under kontroll av cytomegalovirus promotor	Promega Co., Wisconsin, USA	RL-cmv	0,05 µg
Renillaluciferase under kontroll av thymidin kinase promotor	Promega Co., Wisconsin, USA	RL-tk	1 µg
Ingen genprodukt	(Wilson <i>et al</i> , 1991)	CMV	Til totalt 10 µg plasmid
Glukokortikoid reseptor	Gave fra J.Milbrandt, Washington University School of Medicine	GR	2 µg
Trunkert glukokortikoid reseptor	Gave fra J.Milbrandt, Washington University School of Medicine	GRtr	2 µg

Mineralkortikoid reseptor	Gave fra D. Pearce University of California	MR	2 µg
NMDAR subenhet NR1-1a	Gave fra S.Vicini Georgetown University School of Medicine	NR1-1a	2 µg
NMDAR subenhet NR2A	Gave fra S.Vicini Georgetown University School of Medicine	NR2A	2 µg
NMDAR subenhet NR2C	Gave fra S.Vicini Georgetown University School of Medicine	NR2C	2 µg
NMDAR subenhet NR3A	Gave fra dr. D. Chang Burnham institute	NR3A	2 µg
NMDAR subenhet NR3B	Gave fra dr. D. Chang Burnham institute	NR3B	2 µg
Yfp-merket NMDAR subenhet NR1-1a	Gave fra S.Vicini Georgetown University School of Medicine	NR1-1a-yfp	5 µg eller 10 µg
Gfp-merket NMDAR subenhet NR2A	Gave fra S.Vicini Georgetown University School of Medicine	NR2A-gfp	10 µg
Gfp-merket NMDAR subenhet NR3A	Gave fra I. Pèrez-Otano The Salk Institute for Biological Studies	NR3A-gfp	5 µg eller 10 µg
Gfp-merket GR	Gave fra M.D. Galigniana University of Buenos Aires	GR-gfp	5 µg eller 10 µg

<sup>1</sup> GRE-luc plasmidet består av prolaktin pro36 basalpromotor med tre GRE oppstrøms som styrer luciferasegenet. Når ligandbundet GR bindes til GRE vil dette aktivere luciferasetranskripsjonen.

<sup>2</sup> NFκB-luc er en 5-HT1A reseptor promotor som er koblet til luciferasegenet som kan aktiveres av transkripsjonsfaktorene Sp1 og NFκB subenhet p65. Denne promotoren vil være konstitutiv aktiv i cellene, men ligandbundet GR eller MR kan nedregulere Sp1- og/eller p65- stimulert transkripsjon (Meijer *et al*, 2000).

**Tabell 2.9: Løsninger til transfeksjon**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
BBS	BES Na <sub>2</sub> HPO NaCl (5 M) MQ vann  Volumet fordeles i 5 flasker der pH justeres med NaOH til 6.75, 6.85, 6.95, 7.00, 7.05 og sterilfiltreres. Transfeksjonseffektiviteten ved ulike pH testes ved å transfektere inn gener som gir luciferaseproduksjon. Luciferaseaktiviteten måles på et luminometer. Løsningen med best transfeksjonseffektivitet brukes videre til transfeksjon. Oppbevares kjølig	5,33 g 0,1335 g 28 ml ad 500 ml
0,25 M CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub> Destillert vann  Fortynnes i forhold 1:10 med MQ vann og sterilfiltreres. Oppbevares kjølig	36,75 g 100 ml

### 2.4.2 Transfeksjon av kyllingkornceller med Metafectene PRO®

Metafectene Pro® er en polykationisk liposom transfeksjonsreagens. Det antas at kationiske liposomer kondenserer DNA til kompakte strukturer gjennom ioniske interaksjoner og beskytter DNA fra degradering av nukleaser og fremmer adhesjon av DNA-lipid kompleks til cellemembranen og opptak ved endocytose (Djurovic *et al*, 2004; Duzgunes *et al*, 2003). En av fordelene med kationiske liposom transfeksjonsreagenser er lav toksisitet (Djurovic *et al*, 2004).

Kyllingkornceller transfekteres dagen etter preparering. Serum destabiliserer DNA-lipid komplekset (Duzgunes *et al*, 2003), og derfor tilsettes transfeksjonsløsningen i serumfritt medium.

## Prosedyre for transfeksjon av kyllingkornceller

1. 2 µl Metafectene PRO® tilsettes i 50 µl serumfritt medium uten gentamycinsulfat (Tabell 2.10) for hver skål (8,8 cm<sup>2</sup>). Blandes ved å pipettere forsiktig opp og ned et par ganger (Metafectene PRO® tåler ikke whirlmiksing).
2. 1 µg DNA (0,9 µg GRE-luc og 0,1 µg RL-tk) tilsettes i 50 µl serumfritt medium uten gentamycinsulfat for hver skål. Blandes ved å whirlmikse røret.
3. DNA løsningen overføres til Metafectene PRO® løsningen, og blandes ved å pipettere forsiktig opp og ned et par ganger.
4. Transfeksjonsløsningen inkuberes ved romtemperatur i 20 minutter.
5. 100 µl transfeksjonsløsning tilsettes dråpevis til hver skål mens den beveges forsiktig.
6. Transfeksjonsløsningen fjernes etter 5 timer og erstattes med ernæringsmedium (Tabell 2.6).

**Tabell 2.10: Serumfritt medium uten gentamycinsulfat til korncellekulturer**

Innholdsstoffer	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
L-glutamin	146 mg
KCl	825 mg*
Oppbevares kjølig	
*5,4 mg er allerede tilstedet i mediet	

## 2.5 Eksponering av CV-1 og kyllingkornceller

Agonister og antagonister tilsettes 24 timer etter transfeksjonen i både CV-1 celler og kyllingkornceller (Tabell 2.11 - Tabell 2.14). Antagonistene tilsettes 15 minutter før tilsetting av agonister til korncellene. Kyllingkornceller til celledøds telling eksponeres med agonister 3 dager etter preparering, og celledød ble talt dagen etter.

Eksponeringsløsningene tilsettes direkte i mediet. På skåler der cellene ble transfektert med kalsiumfosfat ble mediet skiftet umiddelbart før tilsetting av ligander

---

for å fjerne høy kalsium i mediet. Det tilsettes etanol i kontrollskålene slik at konsentrasjonen i mediet blir 1 promille. Dette gjøres siden mange av ligandene som brukes, er løst i etanol. Skålene oppbevares i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> fram til høsting.

**Tabell 2.11: 10 mM deksametason**

Deksametason	39,2 mg
96 % etanol	10 ml

Deksametasonløsningen ble fortynnet i 96 % etanol til 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1nM, 100 pM og tilsatt i mediet i forhold 1:1000. Etanolkonsentrasjon i mediet blir 1 promille.

**Tabell 2.12: 1 mM MK 801**

MK 801	10 mg
MQ vann	29,641 ml
Tilsatt i mediet i forhold 1:1000	

**Tabell 2.13: 100 mM CGP 39551**

CGP 39551	10 mg
MQ vann	0,420 ml
Tilsatt i mediet i forhold 1:1000	

**Tabell 2.14: 10 mM RU 28318**

RU 28318	4,4 mg
96 % etanol	1 ml
Tilsatt i mediet i forhold 1:1000	

Løsningene (Tabell 2.11 - Tabell 2.14) oppbevares ved -20 °C.

## 2.6 Telling av døde celler

Trypanblå farging brukes til å detektere celler som er døde. Metoden ble introdusert av Pappenheimer i 1917. Trypanblå vil trenge inn i celler hvor cellemembranen ikke er intakt, noe som vil være tilfelle for de døde cellene. Dette fører til at apoptotiske og nekrotiske celler vil vises som blåfargede celler under et lysmikroskop, mens de levende cellene vil være ufarget. Kyllingkorncellene telles dagen etter eksponering med ligander.

### Prosedyre for farging med trypanblå

1. Trypanblå fargeløsning lages ved å blande like mengder av 2 % trypanblå og 1,8 % NaCl løsning (Tabell 2.15). Det lages et volum av trypanblå fargeløsning som er passende til antall skåler som skal telles.
2. Cellemediet i skålene (21,5 cm<sup>2</sup>) justeres til 1 ml. 250 µl trypanblå løsning tilsettes skålene. Skålene beveges forsiktig slik at det blandes jevnt.
3. Skålene inkuberes i 30 min ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.
4. Fargeløsningen helles av en skål av gangen ettersom cellene telles.
5. Blåfargede celler (døde) telles i forhold til ufargede celler (levende). Det telles totalt 100 celler per skål.

**Tabell 2.15: Løsninger for trypanblå farging**

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



## 2.7 Westernblotting

Westernblotting består vanligvis av fire trinn: elektroforese, overføring av protein til papir, binding av antistoffer til målmolekylet og visualisering av bundet antistoff. Blandingen av proteiner separeres i ulike komponenter ved elektroforese gjennom en SDS-polyakrylamidgel. Proteinets molekylvekt bestemmer vandring og endelig lokalisering i membranen. Tykkelsen på gelen velges etter ønsket mengde protein tilsatt i brønnen. Prosentandel på gelen velges etter målproteinets molekylvekt. Proteinene overføres deretter til en nitrocellulosemembran. Primærantistoff bindes til målproteinets som er overført til membranen ved blotting. Antigen-antistoffkomplekset kan deretter identifiseres med et sekundært antistoff som er rettet mot det primære antistoffet og er merket med for eksempel horseradish peroksidase (HRP) (Gallagher *et al*, 2008). Fremkallingsvæske som Super Signal West Femto inneholder substratet til peroksidasen. Substratet omdannes i en kjemisk reaksjon som avgir lys. Lyset detekteres av et kamera i geldokumentasjonsmaskinen (Chemi Genius<sup>2</sup> fra Bio Imaging System).

### 2.7.1 Høsting av celler til Westernblotting

Skålene ble høstet 2 døgn etter transfeksjon av cellene.

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

1. Mediet helles av skålene og restene suges av.
2. Skålene vaskes 2 ganger med 3 ml iskald PBS (Tabell 2.16).
3. Cellene høstes fra to like transfekterte skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) for å oppnå store nok mengde med ønsket protein med 100 µl 2 % SDS tilsatt proteasehemmere (Tabell 2.16).
4. Cellene skrapes løs med en celleskraper og overføres til eppendorfrør på is. Først skrapes det over hele skålen i en retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skraping.
5. Cellesuspensjonen kokes ved 95 °C i 2 minutter og fryses ved -70 °C.

**Tabell 2.16: Løsninger til høsting av celler til Westernblotting**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
PBS	NaCl	32,0 g
	KCl	0,8 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,08 g
	NaHPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	7,12 g
	MQ vann	ad 4000 ml
	Justeres til pH 7,4 med HCl/NaOH	
	Oppbevares kjølig	
SDS 2 % med proteasehemmere	Et volum av 2 % SDS som er passende til antall skåler som skal høstes, tilsettes:	Per ml 2 % SDS
	Leupeptin (5 mg/ml)	1 µl/ml
	Pepstatin A (1 mg/ml)	5 µl/ml
	PMSF (100 mM)	3 µl/ml
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (200 mM)	0,5 µl/ml

## 2.7.2 Metode for Westernblotting

### Gelstøping

Det ble laget 1,5 mm tykke, 10 brønns geler i Bio Rad Mini PROTEAN® oppsett.

1. Glassplatene vaskes med sprit slik at alt fett fjernes. Støpeformen settes sammen.
2. Løsning for 6 % polyakrylamid gel (nedre gel) lages (Tabell 2.17).
3. Løsningen helles i spalten mellom glassplatene.
4. MQ vann tilsettes til toppen for å sikre at gelen får en rett linje.
5. Gelen stivner i løpet av 30 minutter.
6. Vannet helles av og restene suges av med papir.
7. Løsning for øvre gel (Tabell 2.17) lages og helles over nedre gel. En kam med 10 tagger settes i og gelen stivner i løpet av 30 minutter.

## Elektroforese

8. Glassplatene med gelen i mellom skylles med kaldt vann for å fjerne eventuelt søl på utsiden av glassplatene og kammen tas ut.
9. Glassplatene med gelen plasseres i et kar med den lille glassplaten inn mot midten. Både det indre og ytre karet fylles opp med elfobuffer (Tabell 2.17).
10. Luftbobler fjernes med en bøyd kanyle.
11. En påføringsapplikator settes over gelen.
12. 5 µl standard (Precision Plus Protein Dual Color Standard) påsettes den første brønnen.
13. Prøvene blandes med 4X Laemmeli buffer (Tabell 2.17) i forholdet 3:1. Blandingen kokes ved 95 °C i 5 minutter før påsetting.
14. 50 µl prøve påsettes i hver brønn.
15. Prøvene kjøres først gjennom øvre gel på 90 volt i ca. 15 minutter, og deretter kjøres de gjennom nedre gel på 150 volt i ca. 1 time.

## Blotting av gelen

16. Membran, skrubber og filterpapir fuktes i blottebuffer (Tabell 2.17).
17. Gelen løsnes forsiktig fra den tykke glassplaten med hjelp av en plastspatel. Den øvre gelen skjæres av og fjernes.
18. Et filterpapir legges over gelen og gelen løsnes fra den tynne glassplaten med en plastspatel og overføres til filterpapiret.
19. Gelen pakkes på følgende måte:
  - Gelholderens svarte side legges ned
  - Skrubber
  - Filterpapir som er festet til gelen
  - Gel
  - Membran
  - Filterpapir
  - Skrubber
  - Hvit side på gelholderen
20. Luft mellom gelen og membranen fjernes med en plastpipette som rulles fra midten av membranen.
21. Gelholderen settes i blottekaret hvor den svarte siden til gelholderen vendes mot det svarte i karet.
22. En magnetrører og en iskassett legges i blottekaret. Blottekaret fylles med blottebuffer til det dekker gelpakken.

---

23. Blotteoppsatsen settes kjølig og kjøres til neste dag ved 50 milliampere.

### **Farging av membranen**

24. Proteinbåndene farges ved at membranen legges i Ponceaus fargeløsning i 1 minutt.

25. Overflødig farge fjernes ved at membranen vaskes 3 ganger i destillert vann.

26. Bilde av båndene kan tas i fremkallingsmaskinen eller i en kopimaskin.

### **Blokking**

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

28. Røret tilsettes 5 ml 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween (Tabell 2.17). Røret legges til rulling på kjølerom til neste dag.

### **Primærantistoff**

29. Primærantistoff tilsettes i røret i 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween i ulike blandingsforhold avhengig av type antistoff (Tabell 2.18).

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

31. Dagen etter vaskes membranen 3 ganger i 15 minutter med 5 ml TBS med 0,1 % Tween (Tabell 2.17).

### **Sekundærantistoff**

32. Sekundærantistoff (Tabell 2.18) tilsettes i røret i 5 % tørrmelk i TBS med 0,1 % Tween i forholdet 1:5000.

33. Røret legges til rulling i 1-2 timer i romtemperatur.

34. Deretter vaskes membranen 3 ganger i 15 minutter med 5 ml TBS med 0,1 % Tween.

### **Fremkalling**

35. Fremkallingsvæsken (Super Signal West Femto detection reagent kit) tas ut i romtemperatur ca. 1 time før den skal brukes.

36. Membranen tas ut av røret og rester av TBS med Tween fjernes.

37. Membranen legges på en glassplate med proteinene opp.

38. Fremkallingsvæsken består av to løsninger som blandes i forhold 1:1.

39. 1 ml ferdig blandet fremkallingsvæske dryppes på fra midten av membranen og får virke i 5 minutter.

40. Overflødig fremkallingsvæske fjernes og membranen legges i en egnet plastlomme.
41. Luft fjernes ved at det trykkes lett mot plastomslaget.
42. Proteinbåndene fremkalles i fremkallingsmaskinen (Chemi Genius<sup>2</sup> fra Bio Imaging System) med Genesnap som fremkallingsprogram.
43. Etter fremkalling kan membranen legges tilbake i røret i TBS med 0,1 % Tween som legges til rulling på kjølerom i påvente av en eventuell stripping av membranen.

## **Stripping**

Ved stripping av membranen fjernes alle antistoffer slik at det kun er proteiner igjen på membranen. Dermed kan man tilsette primærantistoff av annen type.

1. Membranen inkuberes med 5 ml Restore Western Blot Stripping Buffer i 15 minutter.
2. Membranen vaskes i TBS med 0,1 % Tween i 15 minutter.
3. Nytt primærantistoff tilsettes ved å følge samme prosedyre som nevnt over, under primærantistoff.

Tabell 2.17: Løsninger til Westernblotting

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
Nedre gelbuffer	Tris-base SDS (20 %) MQ vann Justeres til pH 8,8 med HCl/NaOH	18,170 g 2,0 ml ad 100 ml
Øvre gelbuffer	Tris-base SDS (20 %) MQ vann Justeres til pH 6,8 med HCl/NaOH	6,06 g 2,0 ml ad 100 ml
Polyakrylamid gel (nedre gel, 6 %, 1,5 mm)	MQ vann Nedre gelbuffer Akrylamid (30 %) APS (10 %) TEMED	4,4 ml 2,0 ml 1,6 ml 40 µl 6,5 µl
Polyakrylamid stacking gel (øvre gel, 1,5 mm)	MQ vann Øvre gelbuffer Akrylamid (30 %) APS (10 %) TEMED	2,4 ml 1,0 ml 0,6 ml 20 µl 4 µl
Elfobuffer	10 X Tris/Glycine/SDS buffer (TGS) fortynnes med 9 deler med destillert vann til 1 X TGS som gir en sluttkonsentrasjon på:  Tris Glysin SDS pH 8,3	  25 mM 192 mM 0,1 % (w/v)

Laemmlibuffer 4X	SDS (20 %) Glycerol Tris-HCl pH 6,8 (2M) 2-merkaptoetanol MQ vann Noen korn bromfenolblått	1,5 ml 1,6 ml 1,5 ml 2 ml 3,4 ml
Blottebuffer	10 X Tris/Glycine buffer (TG) fortynnes med 7 deler med destillert vann og 2 deler med metanol til 1X TG som gir en sluttkonsentrasjon på: Tris Glysin Metanol pH 8,3	25 mM 192 mM 20 % (v/v)
Tris bufret saltvann (TBS) med 0,1 % Tween	Tris-base NaCl HCl (1 M) Tween 20 MQ vann Justeres til pH 7,6 med HCl/NaOH Oppbevares kjølig	2,420 g 8,000 g 3,8 ml 1,0 ml ad 1000 ml
5 % tørrmelk	Tørrmelk TBS med 0,1 % Tween Oppbevares kjølig	2,5 g 50 ml

**Tabell 2.18: Antistoffer brukt til Westernblotting**

Antistoff	Mengde	Type	Lot.nr.	Leverandør
GR sc 1004	1:50	Primærantistoff Polyklonalt IgG fra kanin	J2908	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA
GR sc 8992	1:50	Primærantistoff Polyklonalt IgG fra kanin	B2208	Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA
NR3A/3B 60100	1:100	Primærantistoff Polyklonalt IgG fra mus	011503- 061705	QED, Bioscience Inc, San Diego, USA
Donkey antirabbit 1858415	1:5000	Sekundærantistoff IgG koblet HRP antistoff	1A110693	Thermo Scientific Pierce Rockford, USA
Goat antimouse A2304	1:5000	Sekundærantistoff IgG koblet HRP antistoff	064K4855	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA

## 2.8 Mikroskopering

"Green fluorescent protein" (gfp) ble klonet fra maneten *Aequorea victoria* (Prasher *et al*, 1992; Yuste, 2005). Gfp er et fluorescerende protein som ikke trenger andre ko-faktorer eller substrat for dannelse av grønt lys. Ved kun å utsette gfp for langbølget lys (for eksempel fra fluorescensmikroskop) vil det dannes bioluminescens som kan studeres i mikroskop. Dette brukes i praksis ved at man forbinder genet gfp med et gen til målproteinet i et plasmid som man bruker til å transfektere celler. Gfp proteinet har blitt mutert til flere varianter, blant annet yfp (yellow fluorescens protein) (Nagai *et al*, 2002). Emisjonsmaksimum for gfp er en bølgelengde på 507 nm og for yfp er det 527 nm. Nyere varianter av yfp har redusert klorid sensitivitet, bedre ekspresjon ved 37 °C og i organeller og økt skarphet (Griesbeck *et al*, 2001).

CV-1 cellene ble mikroskopert med et fluorescensmikroskop (Nikon Eclipse TE 300 DV) 2 dager etter transfeksjon med forskjellige plasmider som inneholder gener for NMDA reseptorsubenheter og GR merket med gfp eller yfp. På denne måten kan



man studere lokalisasjonen til proteinene. Det er imidlertid viktig å være klar over at gfp-halen er relativ stor (27 kDa) og kan derfor påvirke funksjonen til det aktuelle proteinet (Misteli *et al*, 1997). Det ble tatt bilder fra 2-3 ulike steder fra hver cellekulturskål med et kamera som er koblet til mikroskopet (Nikon DS-Qi1Mc). På hvert sted ble det tatt et fluorescensbilde og et fasekontrastbilde.

## 2.9 Luciferase

Luciferaser er enzymer som katalyserer omdanning av luciferiner i en prosess som avgir lys. Det finnes ulike luciferasesystemer og luciferiner som er isolert fra ulike organismer (Fan *et al*, 2007). Lysintensiteten som dannes kan måles i et luminometer (Lorenz *et al*, 1991). Ved å koble et responselement (for eksempel GRE) til et ønsket gen. Med for eksempel ildflueluciferase genet (*luc*) kan man detektere cellulære endringer som lyssignal av en viss bølgelengde (Fan *et al*, 2007).

### 2.9.1 Ildflueluciferase

Ildflueluciferase er isolert fra ildfluen *Photinus pyralis* (Fan *et al*, 2007). Enzymet ildflueluciferase trenger luciferin, ATP og O<sub>2</sub> som substrat og katalyserer reaksjonene:



I den første reaksjonen dannes enzymbundet luciferyl-AMP og dette mellomproduktet reagerer med O<sub>2</sub> i en oksidativ dekarboksylering som resulterer i dannelsen av oksyluciferin, AMP, CO<sub>2</sub> og lys (Fan *et al*, 2007). Når overskudd av substratene settes til ildflueluciferase, lager reaksjonen et lysglimt som er proporsjonal med mengde ildflueluciferase i reaksjonsblandingen (de Wet *et al*, 1987).

## 2.9.2 Renillaluciferase

Renillaluciferase er et luciferasesystem som er isolert fra korallen *Renilla reniformis* (Fan *et al*, 2007). 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).

*renillaluciferase + koelenterazin* → *renillaluciferase*•*koelenterazin*

*renillaluciferase*•*koelenterazin* → *renillaluciferase* + *koelenteramid* + CO<sub>2</sub> + lys

Renillaluciferase kan benyttes som en intern standard for å korrigere for ulike variabler som for eksempel transfeksjonseffektivitet og cellemengde.

## 2.9.3 Høsting av celler til luciferasemåling

Cellene høstes to døgn etter at de er transfektert med et reporter-gen som gir luciferaseproduksjon. Plasmidene som ble brukt, er listet opp i Tabell 2.8.

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

1. Det tilsettes DTT (Tabell 2.19) i konsentrasjon 1 mM til et volum 0,1 % LUC (Tabell 2.19) som er passende til antall skåler som skal høstes (235 µl 0,1 % LUC med 1 mM DTT per 21,5 cm<sup>2</sup> skål)
2. Mediet helles av skålene og restene fjernes med pipette.
3. Skålene vaskes 2 ganger med 1 ml PBS (Tabell 2.16) og skålen beveges forsiktig slik at hele skålen skylles.
4. PBS helles av og restene fjernes med pipette.
5. 235 µl 0,1 % LUC med 1 mM DTT tilsettes til midten av hver skål.
6. Skålene inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
7. Cellene skrapes løs med en celledraper. Først skrapes det over hele skålen i en retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skraping.
8. Cellesuspensjonen overføres til et eppendorfrør. Disse sentrifugeres i en kjølesentrifuge ved 4 °C i 5 min ved 13000 rpm (16 000 x g).

**Tabell 2.19: Løsninger til høsting av celler til luciferasemåling**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
0,1 % LUC	1 M Tris/1 M MES pH 7,8	5 ml
	Triton X-100	0,1 ml
	MQ vann romtemperert	ad 100 ml
	Oppbevares kjølig	
DTT	Dithiothreitol	77,2 mg
	MQ vann	1,0 ml
	Oppbevares ved -20 °C	

## 2.9.4 Måling av ildflueluciferase

Ildflueluciferase måles rett etter cellehøsting, siden enzymet er ustabilt.

### Prosedyre for måling av ildflueluciferaseaktivitet

1. 1 mM luciferinløsning (Tabell 2.20) plasseres i dispenseren på luminometeret (Lumat LB 9507).
2. 50 µl av supernatanten fra cellehøstingen blandes med 150 µl LUC-coctail (Tabell 2.20) i et plastrør.
3. Plastrøret med prøveblandingen settes på luminometeret. Maskinen innstilles slik at 100 µl tilsettes automatisk og lysintensiteten måles i 2 sekunder (program 2).

**Tabell 2.20: Løsninger til måling av ildflueluciferase**

Løsninger	Innholdsstoffer	Mengde
1 mM luciferin	D-luciferin	11 mg
	MQ vann	36,7 ml
	Oppbevares kjølig beskyttet mot lys	

LUC-coctail	Adenosin 5-trifosfat (ATP)	240 mg
	1 M magnesiumacetat	2 ml
	1 M Tris/1 M MES pH 7,8	8,3 ml
	MQ vann	ad 100 ml

## 2.9.5 Måling av renillaluciferaseaktivitet

Renillaluciferase måles rett etter celledøsting eller oppbevares ved -20 °C for senere måling.

### Prosedyre for måling av renillaluciferaseaktivitet

1. Stop & Glo® reagens (Tabell 2.21) fortynnes 10 ganger med MQ vann.
2. Luminometeret innstilles for manuell prosedyre. Lysintensiteten måles i 10 sekunder (program 5).
3. 100 µl fortynnet Stop & Glo reagens overføres til glassrør. Denne tilsettes supernatanten fra celledøstingen. Volumet av supernatanten som tilsettes ligger vanligvis mellom 0,5 µl og 50 µl. Det måles på flere ulike volum for å sjekke at målingene er i det lineære området. Ut i fra dette finner man 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 10 %, måles en tredje parallell og medianen av tre paralleller brukes som resultat.

**Tabell 2.21: Løsning til måling av renillaluciferase**

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

## 2.10 Figurer og statistikk

Grafer og tabeller ble laget ved hjelp av Microsoft Office Excel 2007. Figurer viser gjennomsnitt med standardfeil (SE). Resultatene ble analysert ved hjelp av Sigma Stat versjon 3.2 fra SPSS Inc., Chicago, USA. For å sammenligne gjennomsnittet av to grupper ble t-test brukt. Dersom datasettet ikke var normalfordelt ble Mann-Whitney rank sum test brukt. For å sammenligne flere grupper ble "One Way Analysis of Variance" (One Way ANOVA) brukt. Ved ikke normalfordelte datasett ble Kruskal-Wallis one Way ANOVA on ranks med Dunns metode og Holm-Sidak posthoc test brukt. Signifikans er oppgitt med \*/# ( $p < 0,05$ ).

## 2.11 Kjemikalier og biologiske produkter

Produkt	Leverandør
Acrylamid 30 % BIS solution	Bio-Rad California, USA
Aldosteron (aldo)	Sigma-Aldrich Co St. Louis, USA
APS (ammonium persulfat)	Sigma-Aldrich Co.
Ara-C (Cytosin $\beta$ -D-Arabino-Furanoside)	Sigma-Aldrich Co.
ATP (adenosin 5`-trifosfat)	Sigma-Aldrich Co.
BES (N,N-bis-(2-hydroksyetyl)-2-aminoetansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co.
BME (Basal Medium Eagle med Earle`s salter med glutamin)	Invitrogen Co. California, USA
Blottebuffer (TG10X)	Bio-Rad
BSA (Bovint serumalbumin)	Sigma-Aldrich Co.
CaCl <sub>2</sub> (kalsiumklorid)	Merck & Co., Inc. New Jersey, USA
CGP 39551	Norartis International AG Basel, Sveits
Deksametason (dex)	Sigma-Aldrich Co.

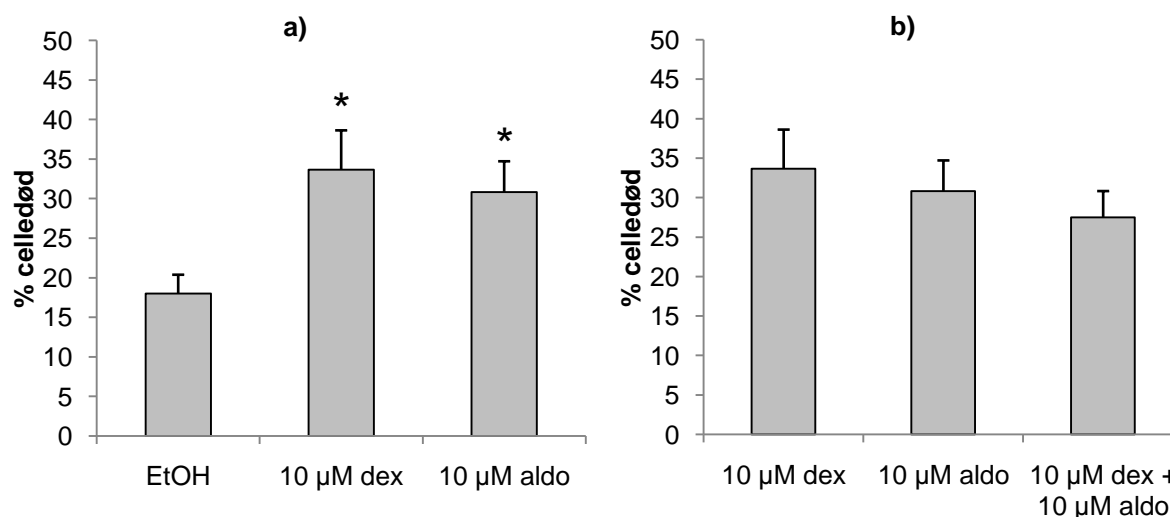
D-luciferin	Duchefa Haarlem, Nederland
DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium)	Invitrogen Co.
DNaseI (Deoksyribonuklease I) D5025	Sigma-Aldrich Co.
DTT (dithiotreitol)	Sigma-Aldrich Co.
Elfobuffer (TGS 10X)	Bio-Rad
Etanol 96 %	Arcus produkter Oslo, Norge
FBS (ftalt kalveserum)	Invitrogen Co.
Fenolrdt	Merck & Co., Inc.
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich Co.
Glukose	Merck & Co., Inc.
Glyserol	Prolab, Frankrike
Hesteserum	Gibco BRL Life Technologies Ltd Paislet, Skottland
KCl (kaliumklorid)	Genzyme Pharmaceuticals , USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (kaliumdihydrogenfosfat)	Merck & Co., Inc.
Kyllingserum	Invitrogen Co.
Leupeptin (LP)	Sigma-Aldrich Co.
L-glutamin	Sigma-Aldrich Co.
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich Co.
MES (2-(N-morpholino)etansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co.
Methanol	Merck & Co., Inc.
Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (magnesiumacetat)	Merck & Co., Inc.
MK 801, dizocilpin((5R,10S)-(+)-5-metyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)syklohepten-5,10-imin hydrogenmaleat	RBI Massachusetts, USA
NaCl (natriumklorid)	J.T. Baker, Nederland

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (di-natriumhydrogenfosfatdihydrat)	Merck & Co., Inc.
NaOH (natriumhydroksid)	J.T. Baker
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Co.
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Co.
Penicillin-Streptomycin (10000U/ml / 10000 µl/ml)	Invitrogen Co.
Pepstatin-A (PS)	Sigma-Aldrich Co.
PMSF (pentametansulfonmylfluorid)	Sigma-Aldrich Co.
Poly-L-lysin	Sigma-Aldrich Co.
Ponceaus solution	Sigma-Aldrich Co.
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific Pierce Rockford, USA
RU 28318 (7α,17α)-17-hydroksy-3-okso-7-propylpregn-4-ene-21-karboksylysyre kaliumsalt	Roussel Uclaf SA, Frankrike
SDS sodium dodecyl sulfat	Sigma-Aldrich Co.
Stop & Glo buffer og substrat	Promega Co. Wisconsin, USA
Supersignal West Femto	Thermo Scientific Pierce
TEMED (N,N,N,N,-tetrametyl-etylendiamin)	Sigma-Aldrich Co.
Tris-base (tris[hydroksymetyl]aminometan)	Sigma-Aldrich Co.
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co.
Trypanblå	Sigma-Aldrich Co.
Trypsin T9201	Sigma-Aldrich Co.
Trypsin-EDTA	Invitrogen Co.
Trysinhemmer T9003	Sigma-Aldrich Co.
Tween 20 (polyoksyetylen sorbitan monolaurat)	Calbiochem California, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge

## 3. RESULTATER

### 3.1 Effekten av agonister på celledød i nevroner

Det er tidligere vist at 10  $\mu$ M aldosteron kan indusere celledød i kyllingkornceller slik som deksametasonindusert nevrandød. Behandling av kyllingkorncellene med RU 28318 (GR og MR antagonist) og spironolakton (MR antagonist) har vist å gi beskyttende effekt mot deksametason- eller aldosteronindusert celledød (Aden *et al*, 2008). Det var ønskelig å undersøke om både MR og GR reseptoren er involvert i celledøden. Kyllingkorncellene ble derfor eksponert for 10  $\mu$ M deksametason, 10  $\mu$ M aldosteron eller 10  $\mu$ M av begge agonistene samtidig. Det antas at hvis begge reseptorene er involvert, vil aldosteron gi additiv celledød til deksametasonindusert celledød. Resultatet viser at deksametason og aldosteron induserer liknende celledød i kyllingkornceller, men aldosteron gir ikke additiv celledød til deksametasonindusert celledød (Figur 3.1a og b).



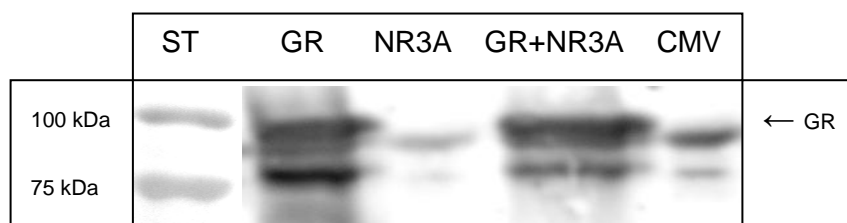
**Figur 3.1a-b: Celledød ved deksametason- og aldosteroneksponering.**

Kyllingkorncellene ble eksponert for 10  $\mu$ M deksametason (dex), 10  $\mu$ M aldosteron (aldo) eller 10  $\mu$ M av begge agonistene samtidig etter 3 dager i kultur. Etter eksponering ble cellene inkubert i 24 timer og celledød talt ved hjelp av trypanblå farging og mikroskop. Figurene viser celledød som prosent av det totale celleantallet. Verdiene er hentet fra uavhengige forsøk og uttrykt som gjennomsnitt med SE,  $n = 6$ . Verdiene for dex og aldo er gjengitt i både figur a og b. \* betyr en statistisk signifikant forskjell mellom eksponering for dex eller aldo og etanolkontrollen. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom behandling med dex, aldo eller begge agonistene samtidig.



## 3.2 Westernblotting

Westernblotting ble brukt til å undersøke om CV-1 celler uttrykker GR og/eller NMDA reseptor naturlig. Primærantistoffer mot GR og NR3A ble brukt. CV-1 celler ble ko-transfektet med GR og NR3A og etter to døgn høstet til Westernblotting. Molekylstørrelsen på intracellulær GR er 94 kDa (Gametchu *et al*, 2002), og molekylstørrelsen for NR3A subenheten er ca. 130 kDa når NR3A ikke er satt inn i NMDA reseptorkomplekset (Perez-Otano *et al*, 2001). Nye primærantistoffer ble testet ut for å se om de ga bånd ved riktig størrelse. Westernbånd for GR og NR3A er vist i Figur 3.2 og Figur 3.3. Figurene viser bånd i celler som er transfektet med riktig plasmid, men ikke i celler som er transfektet med andre plasmider. Et protein hemmer ikke uttrykket av et annet siden båndintensiteten til GR er det samme ved transfeksjon av GR alene eller sammen med NR3A og omvendt.



**Figur 3.2: Westernbånd for GR.**

CV-1 celler ble transfektet med 10 µg/ml GR, 10 µg/ml NR3A, 5 µg/ml GR og 5 µg/ml NR3A eller 10 µg/ml CMV plasmid. Etter to døgn ble cellene høstet til Westernblotting. Det nye primærantistoffet (GR sc8992) mot GR ble brukt. Molekylvekt for GR er 94 kDa.

Den samme membranen ble strippet, og et nytt primærantistoff ble tilsatt.



**Figur 3.3: Westernbånd for NR3A.**

CV-1 celler ble transfektet med 10 µg/ml GR, 10 µg/ml NR3A, 5 µg/ml GR og 5 µg/ml NR3A eller 10 µg/ml CMV plasmid. Etter to døgn ble cellene høstet til Westernblotting. Det nye primærantistoffet mot NR3A/3B ble brukt. Molekylvekt for NR3A er ca. 130 kDa.

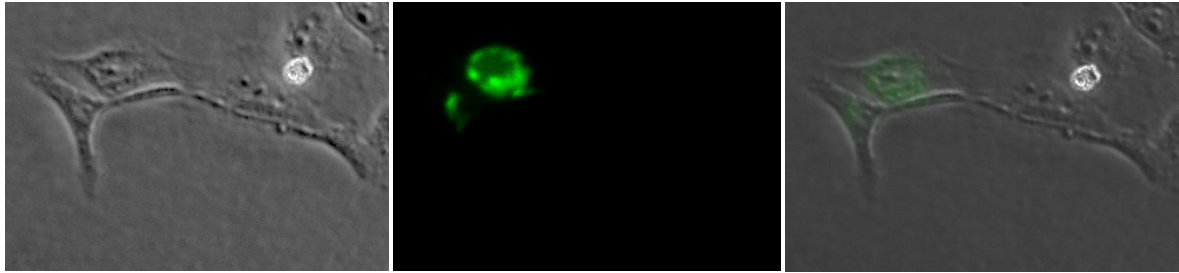
---

### 3.3 Mikroskopering

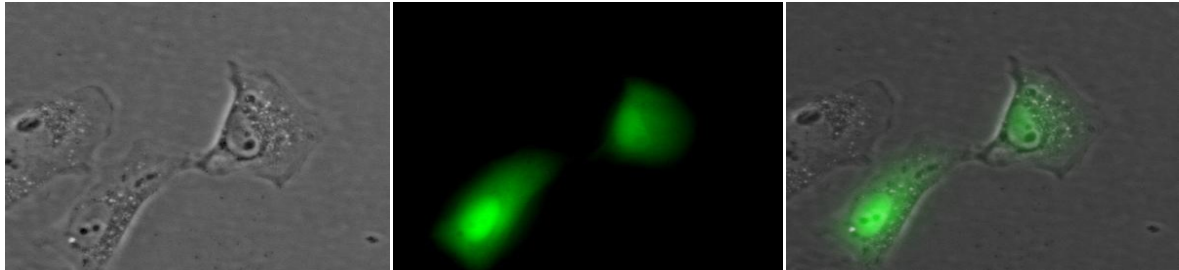
Celler som ble studert i mikroskop, ble transfektert med NMDA reseptorsubenheter (Figur 3.4 og Figur 3.5) og/eller GR (Figur 3.6 og Figur 3.7) plasmider koblet til gfp eller yfp. Cellene ble studert i Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescensmikroskop med 40x objektiv, to døgn etter transfeksjonen. Det ble gjort et forsøk på å vurdere proteinenes lokalisering i cellen ut i fra hvor det meste av den fluorescerende grønnfargen befant seg.

CV-1 celler ble transfektert med NR1-1a-yfp, NR2A-gfp eller NR3A-gfp. I tillegg ble NR1-1a og NR3A-gfp transfektert sammen for å se om fordelingen endret seg siden NR1-1a subenheten må være tilstede for at NR3A skal lokaliseres til cellemembranen (Perez-Otano *et al*, 2001). Cellene ble mikroskopert for å se på hvordan NMDA reseptorsubenheterne ble fordelt i cellene. Figur 3.4 viser at NR1-1a-yfp fordeler seg i avgrensede områder utenfor kjernen, og mot cellemembranen. NR2A-gfp fordeler seg jevnt i hele cellen med spesielt mye protein i kjernen. NR3A-gfp fordeler seg slik som for NR1-1a-yfp, men NR3A-gfp er lite fordelt mot cellemembranen. Figur 3.5 viser at når NR3-gfp transfekteres sammen med NR1-1a fordeler NR3A-gfp seg fremdeles utenfor kjernen, men også nærmere cellemembranen. For å se om det er i cellemembranen, bør man farge membranen.

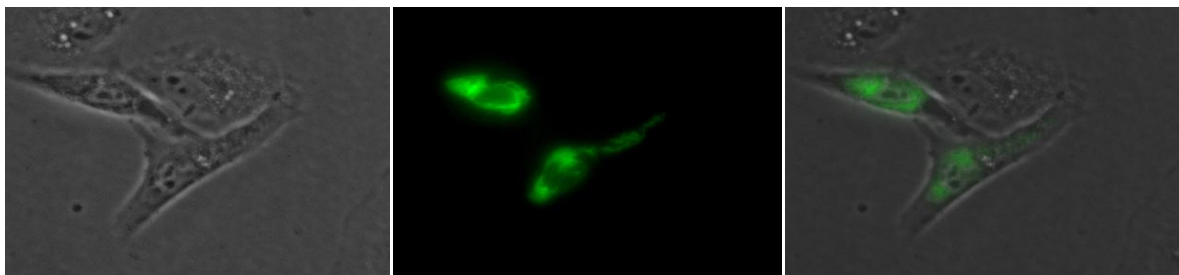
CV-1 celler ble transfektert med GR-gfp alene eller sammen med NR3A for å undersøke hvordan GR-gfp fordeler seg i cellen og om det var mulig å visualisere en interaksjon mellom GR og NR3A reseptorsubenheten. Det antas at GR holdes igjen i cytoplasma av NR3A og dermed vil det kunne vises mer grønn farge i cytoplasma enn hos celler som er transfektert med kun GR-gfp. Figur 3.6 viser at GR-gfp fordeler seg i avgrensede områder både i og utenfor kjernen. Figur 3.7 viser at når GR-gfp transfekteres sammen med NR3A, fordeler fremdeles GR-gfp seg både i og utenfor kjernen. For å kvantifisere forskjeller, blir det nødvendig å dobbelfarge for eksempel med en kjernemarkør.



NR1-1a-yfp



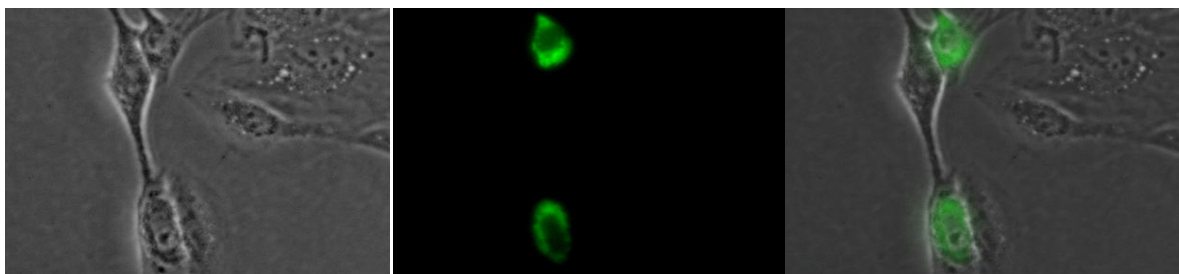
NR2A-gfp



NR3A-gfp

**Figur 3.4: NMDA reseptorsubenheterenes fordeling i cellen.**

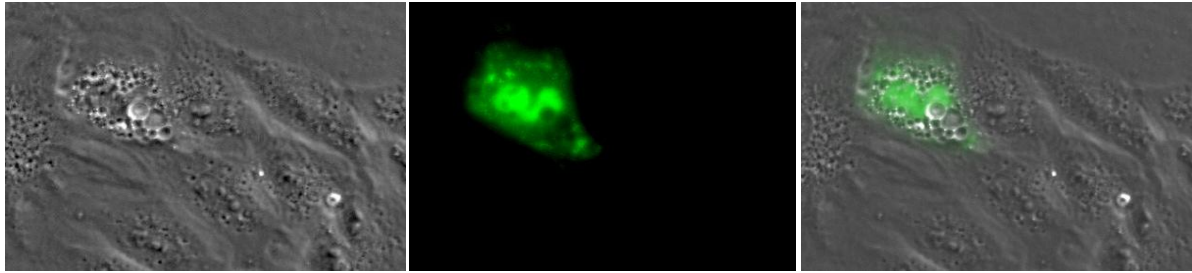
CV-1 celler ble transfektert med NR1-1a-yfp, NR2A-gfp eller NR3A-gfp. Cellene ble studert i mikroskopet to dager etter transfeksjon. Fra venstre mot høyre: fasekontrastbilde, fluorescensbilde og fasekontrastbilde lagt over fluorescensbilde av ulike de NMDA reseptorsubenheterene.



NR3A-gfp + NR1-1a

**Figur 3.5: Fordeling av NR3A-gfp sammen med NR1-1a i cellen.**

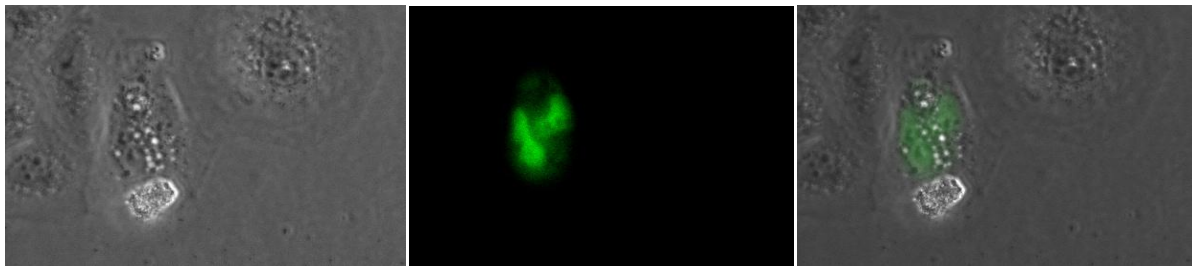
CV-1 celler ble transfektert med NR3A-gfp sammen med NR1-1a. Cellene ble studert i mikroskopet to dager etter transfeksjon. Fra venstre mot høyre: fasekontrastbilde, fluorescensbilde av samme celle og fasekontrastbilde lagt over fluorescensbilde.



GR-gfp

**Figur 3.6: GRs fordeling i cellen.**

CV-1 celler ble transfektert med GR-gfp. Cellene ble studert i mikroskopet to dager etter transfeksjon. Fra venstre mot høyre: fasekontrastbilde, fluorescensbilde av samme celle og fasekontrastbilde lagt over fluorescensbilde.



GR-gfp + NR3A

**Figur 3.7: GRs fordeling i cellen sammen med NR3A.**

CV-1 celler ble transfektert med GR-gfp sammen med NR3A. Cellene ble studert i mikroskopet to dager etter transfeksjon. Fra venstre mot høyre: fasekontrastbilde, fluorescensbilde av samme celle og fasekontrastbilde lagt over fluorescensbilde.

### 3.4 Transfeksjon av CV-1 celler og kyllingkornceller med luciferaseplasmider

For å korrigere for forskjeller i transfeksjonseffektivitet ble det undersøkt hvordan den interne standarden renillaluciferase (RL) ville egne seg i dette celledsystemet (avsnitt 3.4.1). Det ble brukt to reporterger, GRE-luc og NFκB-luc (avsnitt 3.4.2 - 3.4.6). GRE-luc er et plasmid med GRE som promotor, og det inneholder genet for ildflueluciferase. GRE-luc skal brukes som reporterger for GR og MR. Det skal undersøkes om NFκB-luc plasmidet kan brukes som et reporterger for GR og MR. Det skal undersøkes om aldosteron kan aktivere GR, og om NMDA reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551 og GR/MR antagonisten RU 28318 kan påvirke GRs transkripsjonelle aktivitet. Begge reportergerene skal brukes til å undersøke om det er en interaksjon mellom GR og ulike NMDA reseptorsubenheter, og om karboksylterminalen til GR er involvert i interaksjonen.

Luciferaseresultater fra ulike forsøk kan ikke sammenlignes direkte siden mengden luciferase varierer fra forsøk til forsøk. Derfor ble alle resultatene normalisert, og oppgitt i prosent. Luciferaseresultater for GRE-luc er normalisert til GR transfekterte celler tilsatt 10 μM deksametason. Luciferaseresultater for NFκB-luc er normalisert til CMV transfekterte celler tilsatt etanol.

CV-1 celler ble transfektert dagen etter splitting til skåler. Kyllingkornceller ble transfektert dagen etter preparering. Både CV-1 celler og kyllingkornceller ble eksponert for ligander dagen etter transfeksjonen. Det ble tilsatt etanol i kontrollskålene siden mange av ligandene som brukes er løst i etanol. Sluttkonsentrasjonen av etanol i mediet ble 1 promille. Cellene ble høstet 2 dager etter transfeksjonen, og deretter ble det gjort målinger av ildflueluciferase og renillaluciferase.

---

### 3.4.1 Renillaluciferase

For at renillaluciferase skal kunne brukes som intern standard for transfeksjonseffektivitet, er det viktig at ingen av komponentene i forsøket påvirker renillaluciferaseverdiene direkte. Det ble undersøkt om reportergenene, RL-cmv og RL-tk, kan brukes som intern standard. Både plasmidet RL-cmv og RL-tk inneholder et gen som koder for renillaluciferase. Genet i RL-cmv drives av en sterk promotor (cytomegalovirus) som uttrykkes uavhengig av andre transkripsjonsfaktorer, og vil derfor uttrykkes i alle celler som er transfektert med dette plasmidet.

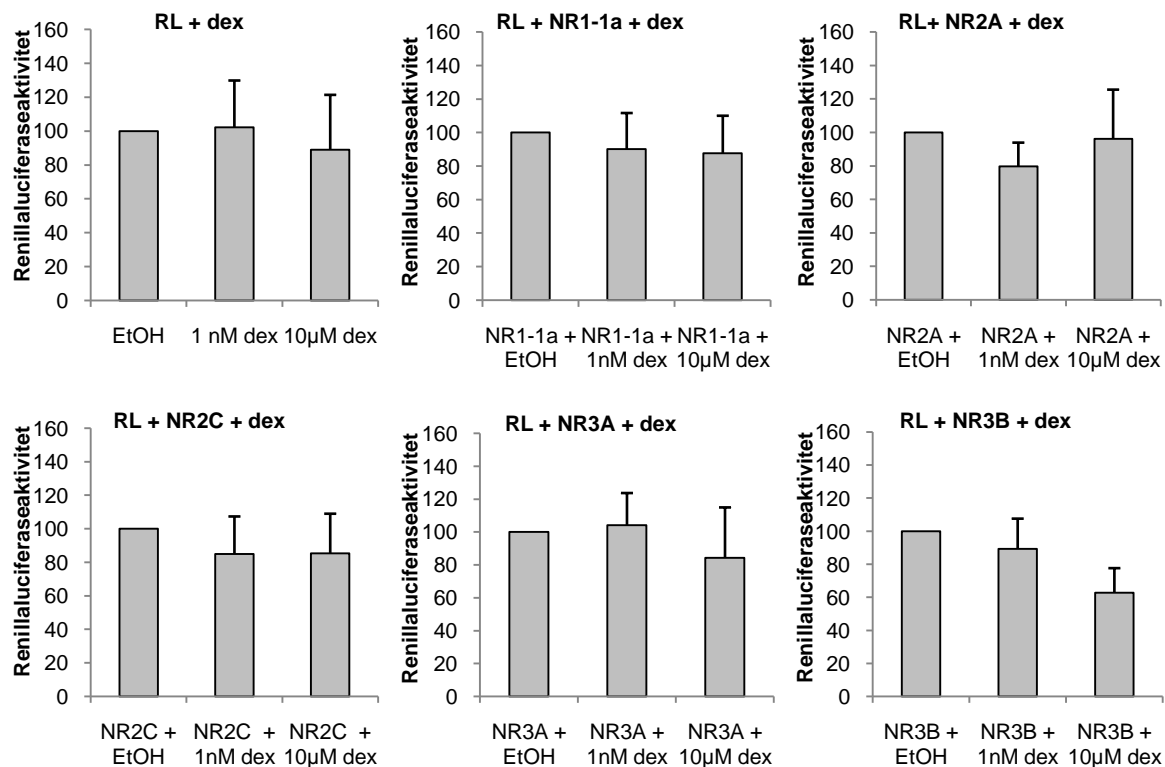
Renillaluciferasegenet i RL-tk drives en konstitutiv aktiv herpes simplex virus tymidinkinase (HSV-tk) (Ho *et al*, 2004).

Renillaluciferasemålingene gjort i dette avsnittet kommer fra de samme forsøkene som beskrives i avsnittene 3.4.2 - 3.4.6.

#### **Deksametasons og aldosterons påvirkning på renillaluciferase**

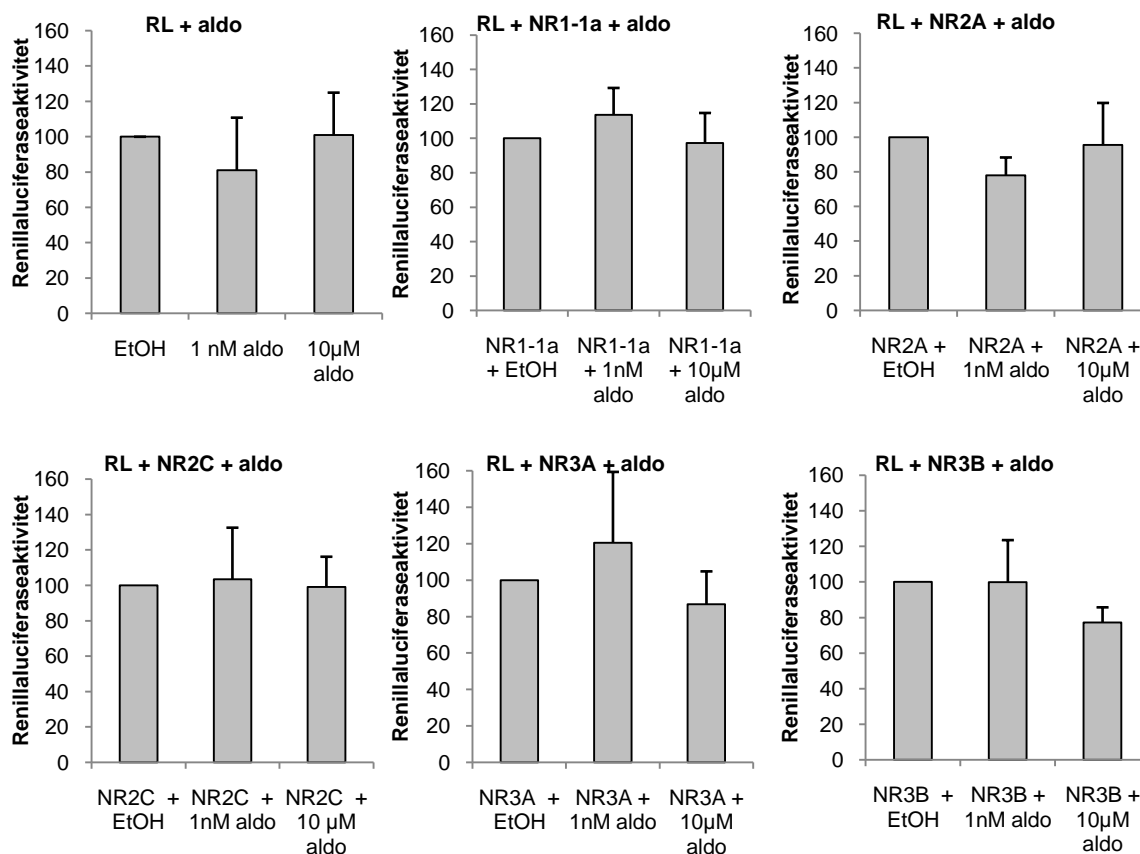
For å undersøke om tilsetning av deksametason (dex) eller aldosteron (aldo) vil påvirke renillaluciferaseaktiviteten, ble CV-1 celler transfektert med RL-tk, GRE-luc og GR i tillegg til ulike NMDA reseptorsubenheter. Cellene ble eksponert for 2 ulike konsentrasjoner av deksametason og aldosteron (1nM og 10 µM). Disse ble sammenlignet med skåler som ble eksponert for etanol. Konsentrasjonene ble valgt på bakgrunn av resultatet fra dosereponsmålingene (se avsnitt 3.4.2).

Resultatet viser at deksametason ikke påvirker renillaluciferasemålingene direkte (Figur 3.8). Resultatet for aldosteron viser at aldosteron heller ikke påvirker renillaluciferasemålingene direkte (Figur 3.9). Deksametason påvirker heller ikke renillaluciferasemålingene når RL-tk ble brukt sammen ildflueluciferase reportergenet NFκB-luc, men resultatene er ikke vist.



**Figur 3.8: Deksametason påvirker ikke renillaluciferase.**

CV-1 celler ble transfektert med RL-tk, GRE-luc, GR ± subenheter og eksponert for etanol, 1 nM dex eller 10 μM dex. Figurene viser gjennomsnittlig renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4-5. Det var ingen statistisk signifikant forskjell i skålene med og uten dex.



**Figur 3.9: Aldosteron påvirker ikke renillaluciferase.**

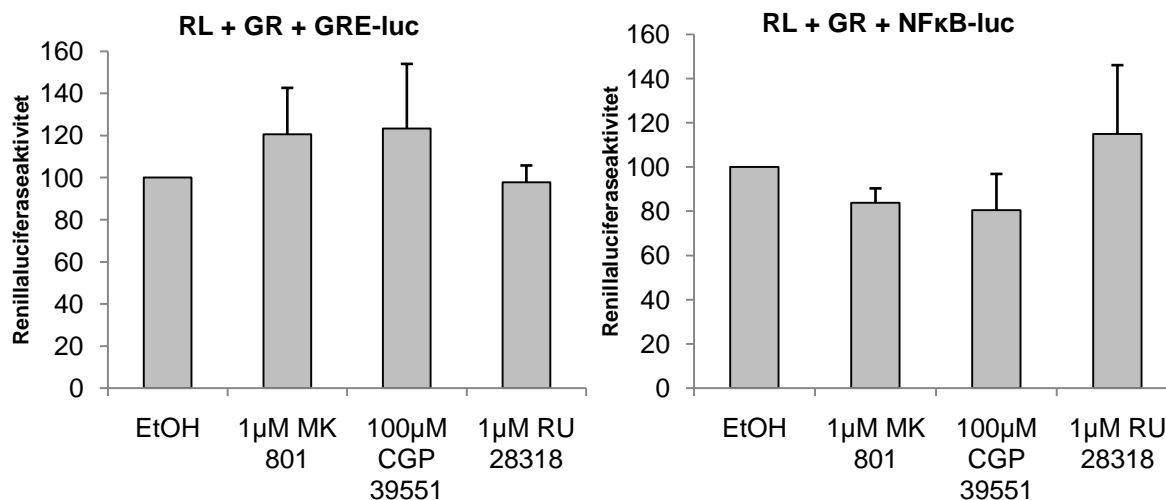
CV-1 celler ble transfektert med RL-tk, GRE-luc, GR ± subenheter og eksponert for etanol, 1 nM aldo eller 10 μM aldo. Figurene viser gjennomsnittlig renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4. Det var ingen statistisk signifikant forskjell i skålene med og uten aldo.

### Antagonisters påvirkning på renillaluciferase

To ulike NMDA reseptorantagonister (MK 801 og CGP 39551) og en GR/MR-antagonist (RU 28318) som reduserer nevrondød induisert av deksametason eller aldosteron (Aden *et al*, 2008; Jacobs *et al*, 2006b) ble tilsatt for å se om disse påvirket renillaluciferase direkte. Cellene ble transfektert med RL-cmv, GR og GRE-luc eller NFκB-luc og eksponert for antagonistene.

Resultatet viser at antagonistene ikke påvirker renillaluciferasemålingene direkte (Figur 3.10). Dette gjelder både for celler transfektert med RL-cmv sammen med ildflueluciferase reportergenene GRE-luc eller NFκB-luc.





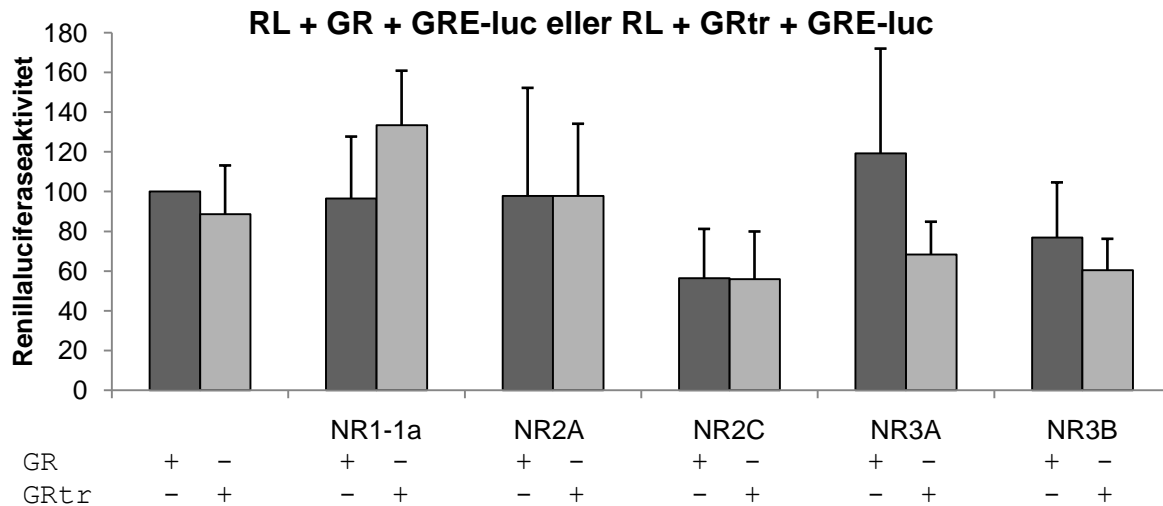
**Figur 3.10: Antagonistene påvirker ikke renillaluciferase.**

CV-1 celler ble transfektert med RL-cmv, GR, og GRE-luc eller NFκB-luc og eksponert for etanol, MK 801, CGP 39551 eller RU 28318. Figurene viser gjennomsnittlig renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.

### NMDA reseptorsubenheters påvirkning på renillaluciferase

CV-1 celler ble ko-transfektet med RL-tk, GR eller GRtr og de ulike NMDA reseptorsubenheterne for å undersøke om renillaluciferase ble påvirket av subenheterne (Figur 3.11 og Figur 3.12).

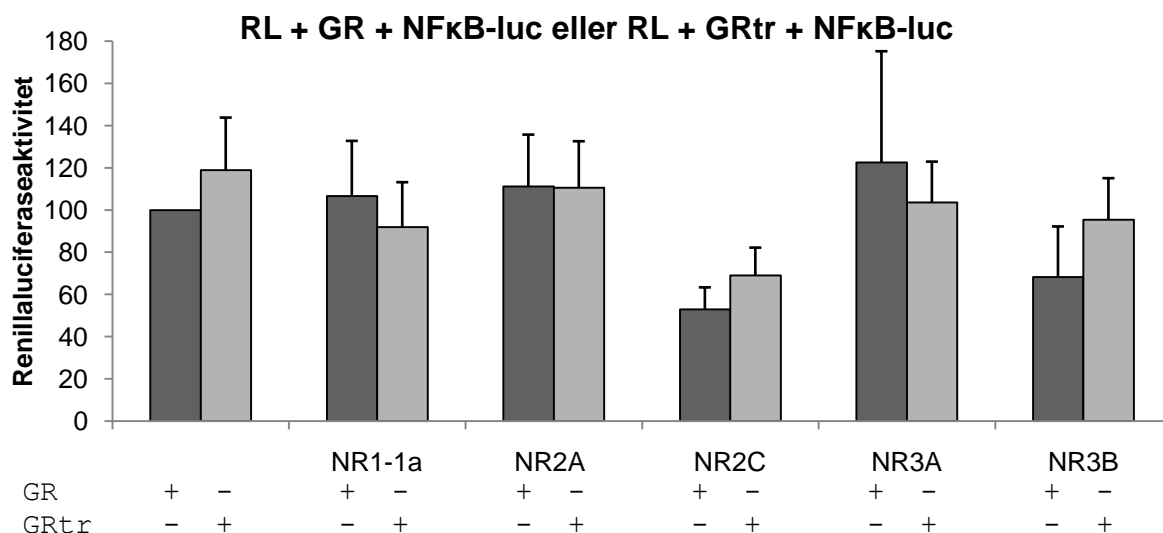
Resultatet for celler transfektet med RL-tk sammen med ildflueluciferase reporter-genet, GRE-luc, viser at renillaluciferaseverdiene kan ha en tendens til å reduseres noe når NR2C og NR3B transfekteres sammen med GR. Det er tilsvarende resultater for celler som ble ko-transfektet med GRtr og subenheterne, men der gir også NR3A en reduksjon i renillaluciferaseverdiene. Forskjellen er ikke statistisk signifikant (Figur 3.11).



**Figur 3.11: NMDA reseptorsubenheter påvirker ikke renillaluciferase.**

CV-1 celler ble ko-transfektet med RL-tk, GRE-luc,  $\pm$  subenheter og GR eller GRtr og eksponert for etanol. Figuren viser gjennomsnittlig renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE,  $n = 4$ . Verdiene er hentet fra de samme uavhengige forsøkene. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.

Resultatet for celler transfektet med RL-tk sammen med ildflueluciferase reporter-genet, NF $\kappa$ B-luc, viser at renillaluciferaseverdiene kan ha en tendens til å reduseres noe når NR2C transfekteres sammen med GR eller GRtr. Forskjellen er ikke statistisk signifikant (Figur 3.12).



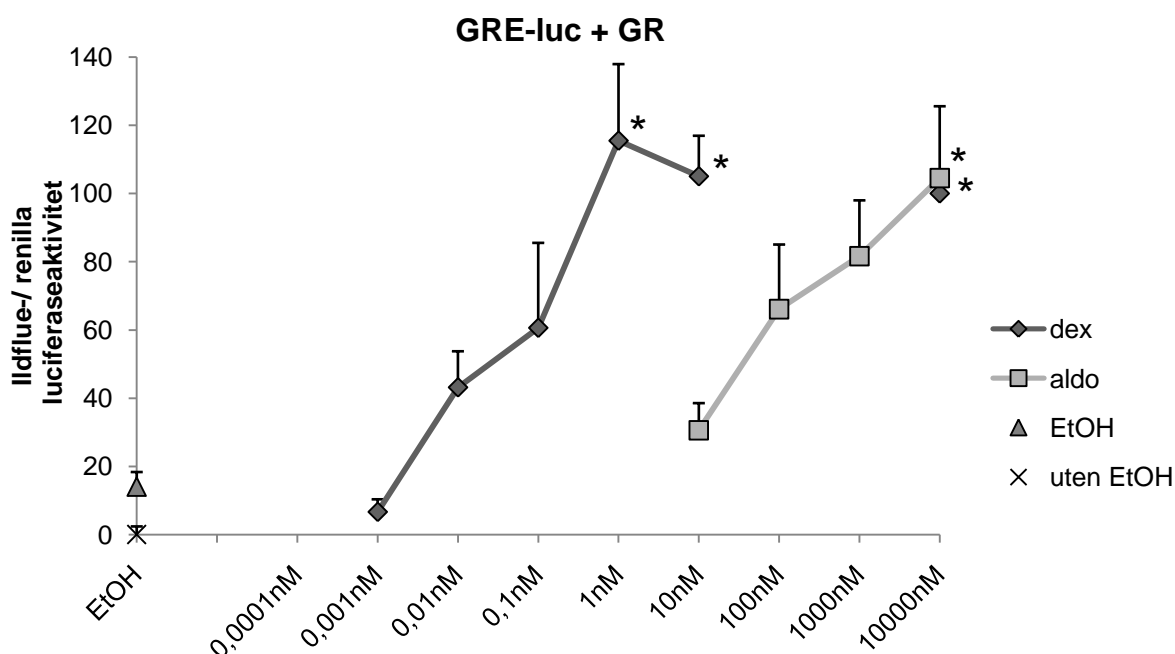
**Figur 3.12: NMDA reseptorsubenheter påvirker ikke renillaluciferase.**

CV-1 celler ble ko-transfektet med RL-tk, NF $\kappa$ B-luc,  $\pm$  subenheter og GR eller GRtr og eksponert for etanol. Figuren viser gjennomsnittlig renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE,  $n = 4$ . Verdiene er hentet fra de samme uavhengige forsøkene. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.

### 3.4.2 Deksametason- og aldosteronaktivering av luciferaseaktivitet via GRE-luc

Siden aldosteron ikke gir additiv celledød i tillegg til deksametasonindusert celledød i kyllingkornceller (se Figur 3.1b) ble det antatt at aldosteron også kan virke på GR. CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc og GR og eksponert for ulike konsentrasjoner av deksametason (dex) eller aldosteron (aldo) for å finne ut i hvilken grad disse stoffene fører til ildfluelluciferaseaktivering ved de ulike konsentrasjonene. Siden renilluciferase ikke ble påvirket av deksametason eller aldosteron, ble renilluciferase brukt som intern standard (se avsnitt 3.4.1). Luciferaseaktiviteten er korrigert med den interne standarden ved å dele ildfluelluciferaseverdiene på de korresponderende renilluciferaseverdiene.

Resultatet viser at deksametason gir maksimal respons ved en konsentrasjon på 1 nM (Figur 3.13). For aldosteron ble det målt maksimal respons ved 10  $\mu$ M (Figur 3.13). Resultatet viser også at 10  $\mu$ M deksametason og 10  $\mu$ M aldosteron gir liknende luciferaseaktivitet.

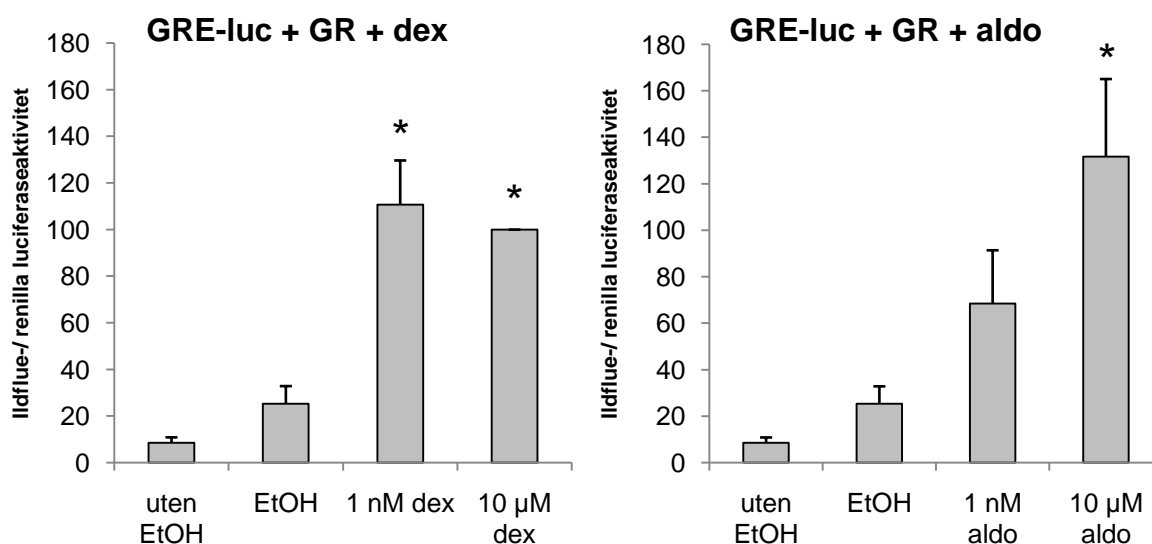


**Figur 3.13: Doseresponskurve for deksametason og aldosteron med GRE-luc og GR.** CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, RL-cmv og GR og eksponert for ulike konsentrasjoner av dex eller aldo. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renilluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 3-6. Punktene angir der målinger er foretatt. \* betyr at målingene er statistisk signifikant forskjellige fra målinger med etanol.

Det ble valgt ut to konsentrasjoner av deksametason og aldosteron.

Konsentrasjonene ble valgt på bakgrunn av resultatet fra doseresponsmålingene (Figur 3.13). Den ene konsentrasjonen som ble valgt var den som gav maksimal deksametasonrespons (1nM). Den andre konsentrasjonen som ble valgt er tidligere vist å være toksisk i nevroner (10  $\mu$ M) (Aden *et al*, 2008; Jacobs *et al*, 2006b). Det ble gjort mange flere uavhengige forsøk ved disse to konsentrasjonene.

Resultatet viser at deksametason og aldosteron gir luciferaseaktivitet via GR og GRE-luc (Figur 3.14).

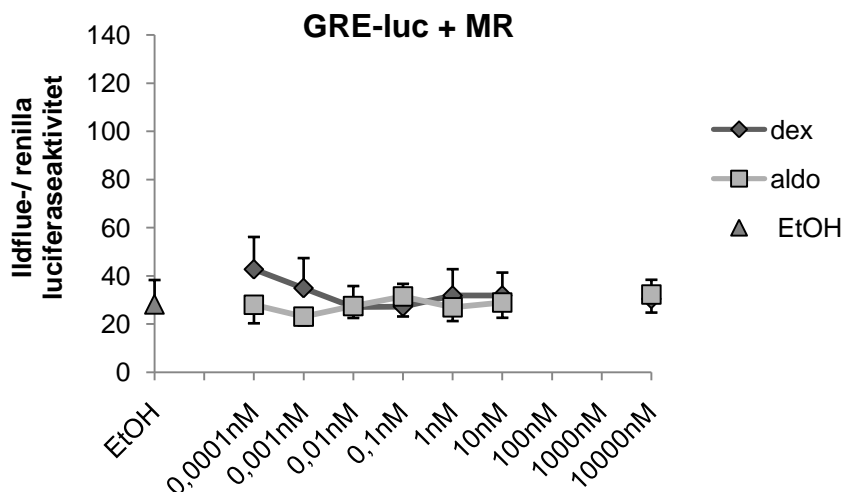


**Figur 3.14: Deksametason og aldosteron aktiverer GRE-luc via GR.**

CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, GR og RL-tk eller RL-cmv og eksponert for 1nM eller 10  $\mu$ M dex eller aldo. Figurene viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 5-9. \* betyr at målingene er statistisk signifikant forskjellige fra målinger med etanol.

Det var ønskelig å finne et reportersystem for MR siden RU 28318, en GR/MR antagonist har vist å redusere nevrondød som er induisert av deksametason i kyllingkornceller (Aden *et al*, 2008). CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc og MR og eksponert for ulike konsentrasjoner av deksametason eller aldosteron for å undersøke om GRE-luc kan være reporter gen for MR.

Resultatet viser at verken deksametason eller aldosteron aktiverer GRE-luc via MR (Figur 3.15).



**Figur 3.15: Deksametason og aldosteron aktiverer ikke GRE-luc via MR.**

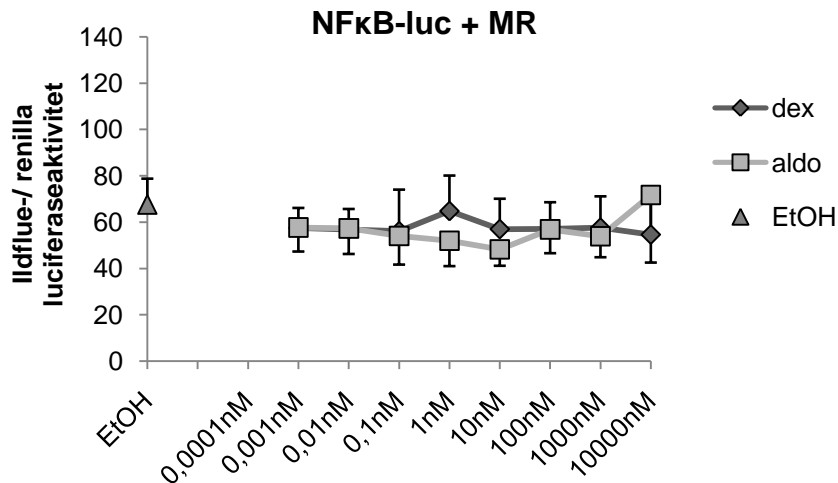
CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, MR og RL-tk eller RL-cmv og eksponert for ulike konsentrasjoner av dex eller aldo. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE,  $n = 4-7$ . Punktene angir der målinger er foretatt. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.

### 3.4.3 Deksametason- og aldosteronaktivering av luciferaseaktivitet via NF $\kappa$ B-luc

Siden GRE-luc ikke kan brukes som reporter-gen for MR, ble NF $\kappa$ B-luc plasmidet undersøkt som et mulig reporter-gen for MR. Siden  $EC_{50}$  for GRE-luc ( $\sim 0,1$  nM) er lavere enn den fysiologiske, var det også ønskelig å finne en promotor som gir en  $EC_{50}$  nærmere den fysiologiske (1 nM - 10 nM, den frie fraksjonen) (se avsnitt 1.3.1). NF $\kappa$ B-luc inneholder responselementer som gir konstitutiv ildfluelluciferaseaktivitet og ligandbundet GR eller MR kan redusere denne luciferaseaktiviteten (Meijer *et al*, 2000).

CV-1 celler ble transfektert med NF $\kappa$ B-luc og MR og eksponert for ulike konsentrasjoner av deksametason eller aldosteron for å undersøke om NF $\kappa$ B-luc kan være reporter-gen for MR. Siden renillaluciferase ikke ble påvirket av deksametason eller aldosteron, ble renillaluciferase brukt som intern standard (se avsnitt 3.4.1). Luciferaseaktiviteten er korrigert med den interne standarden ved å dele ildfluelluciferaseverdiene på de korresponderende renillaluciferaseverdiene.

Resultatet viser at heller ikke NF $\kappa$ B-luc kan brukes som reporter-gen for MR (Figur 3.16).

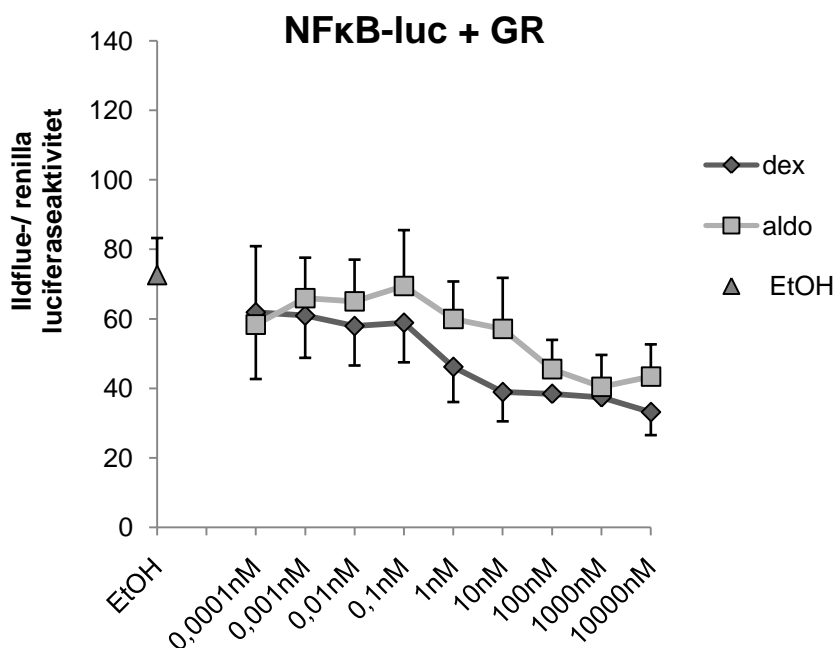


**Figur 3.16: Deksametason og aldosteron aktiverer ikke NFkB-luc via MR.**

CV-1 celler ble transfektert med NFkB-luc, MR og RL-tk eller RL-cmv og eksponert for ulike konsentrasjoner av dex eller aldo. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 3-5. Punktene angir der målinger er foretatt. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.

Det ble også undersøkt om NFkB-luc kan være et reporter-gen for GR. CV-1 celler ble transfektert med NFkB-luc og GR, og eksponert for ulike konsentrasjoner av deksametason eller aldosteron slik som for GRE-luc for å finne ut i hvilken grad disse stoffene fører til reduksjon av ildflueluciferaseaktivitet. Renillaluciferase ble brukt som intern standard.

Resultatet viser at deksametason og aldosteron har en tendens til å redusere luciferaseverdiene (Figur 3.17). Forskjellen er ikke statistisk signifikant.

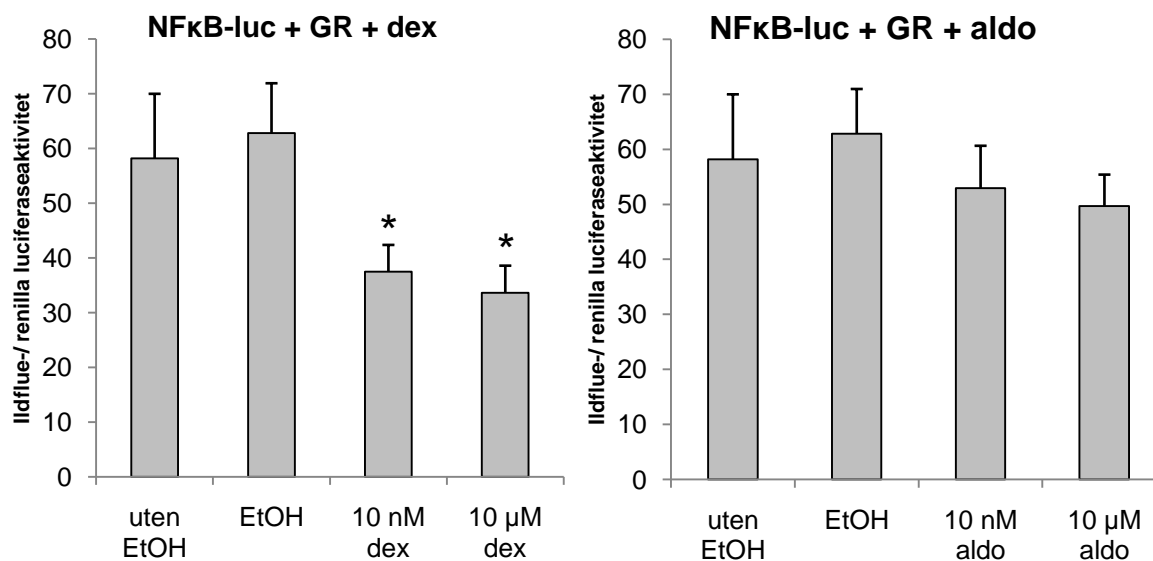


**Figur 3.17: Doseresponskurve for deksametason og aldosteron med NFκB-luc og GR.**

CV-1 celler ble medtransfektet med NFκB-luc, GR og RL-tk eller RL-cmv og eksponert for ulike konsentrasjoner av dex eller aldo. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 3-7. Punktene angir der målinger er foretatt. Det er ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.

Det ble valgt ut to konsentrasjoner av deksametason og aldosteron på samme grunnlag som GRE-luc (se avsnitt 3.4.2), men maksimal respons for deksametason ble satt til 10 nM. Det ble gjort mange flere uavhengige forsøk ved disse to konsentrasjonene (10 nM og 10 μM).

Resultatet viser at kun deksametason nedregulerer NFκB-luc via GR, og gir dermed en reduksjon i ildflueluciferaseaktivitet (Figur 3.18).



**Figur 3.18: Deksametason aktiverer NFκB-luc via GR.**

CV-1 celler transfektert med NFκB-luc, GR og RL-tk eller RL-cmv, ble eksponert for 10 nM eller 10 μM dex eller aldo. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 8-13. \* betyr at målingene er statistisk signifikant forskjellige fra målinger med etanol.

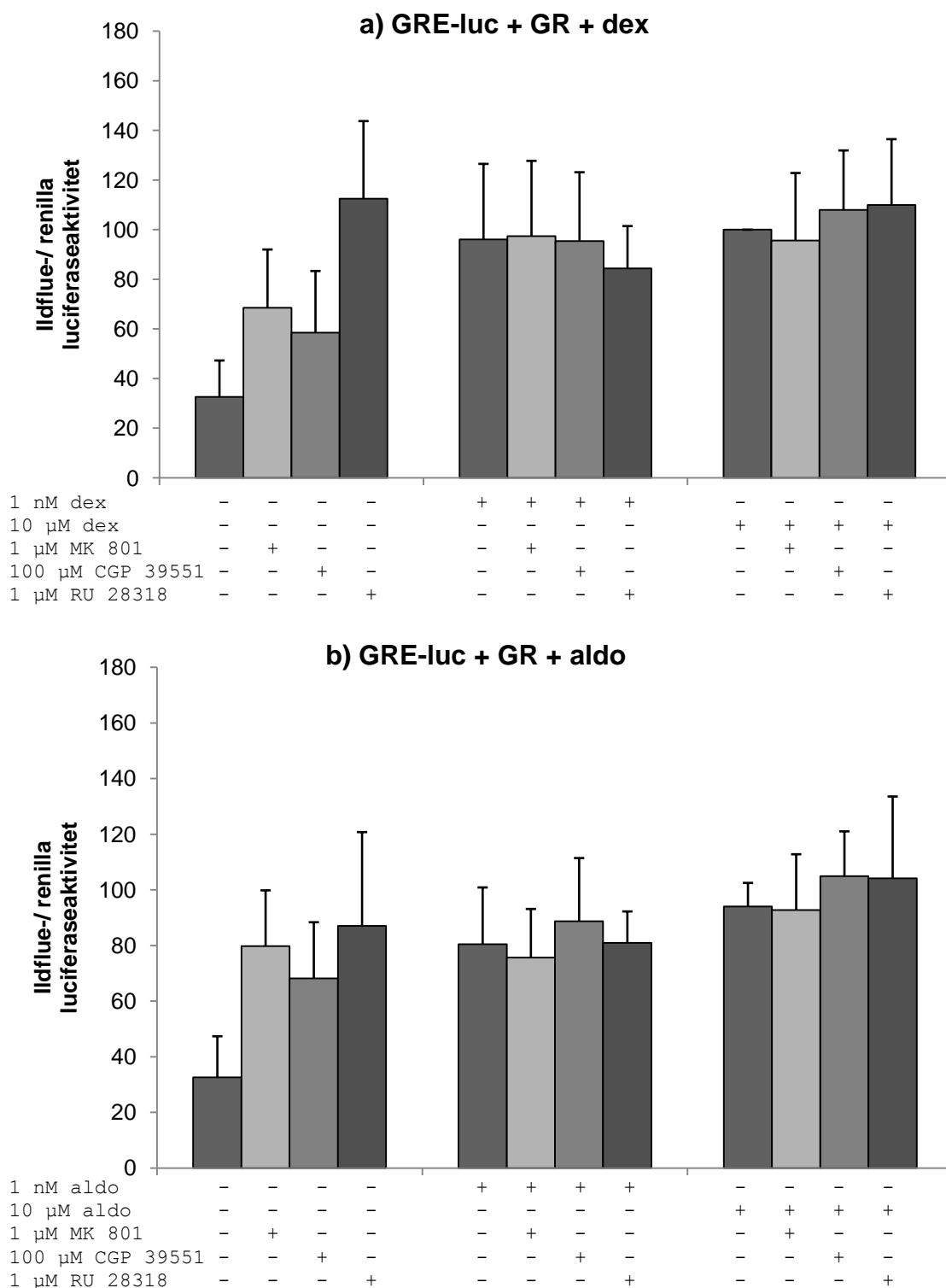
### 3.4.4 Antagonisters effekt på luciferaseaktivitet

#### Transfeksjon av CV-1 celler med GRE-luc

CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc og GR. Siden renillaluciferase ikke ble påvirket av antagonister, ble renillaluciferase brukt som intern standard (se avsnitt 3.4.1). Luciferaseaktiviteten er korrigert med den interne standarden ved å dele ildfluelluciferaseverdiene på de korresponderende renillaluciferaseverdiene. Det ble tilsatt to konsentrasjoner av deksametason eller aldosteron (1 nM og 10 μM). To ulike NMDA reseptorantagonister (MK 801 og CGP 39551) og en GR/MR antagonist (RU 28318) som reduserer nevrondød induisert av deksametason og aldosteron, ble tilsatt for å se om disse påvirket GR direkte (Aden *et al*, 2008; Jacobs *et al*, 2006b).

Resultatet viser at antagonistene ikke påvirker deksametason- eller aldosteronindusert luciferaseaktivitet. Resultatet viser overraskende at antagonistene har en tendens til å aktivere GRE-luc via GR når agonistene ikke er tilsatt. Dette gjelder da særlig RU 28318. Forskjellen er ikke statistisk signifikant (Figur 3.19a/b).





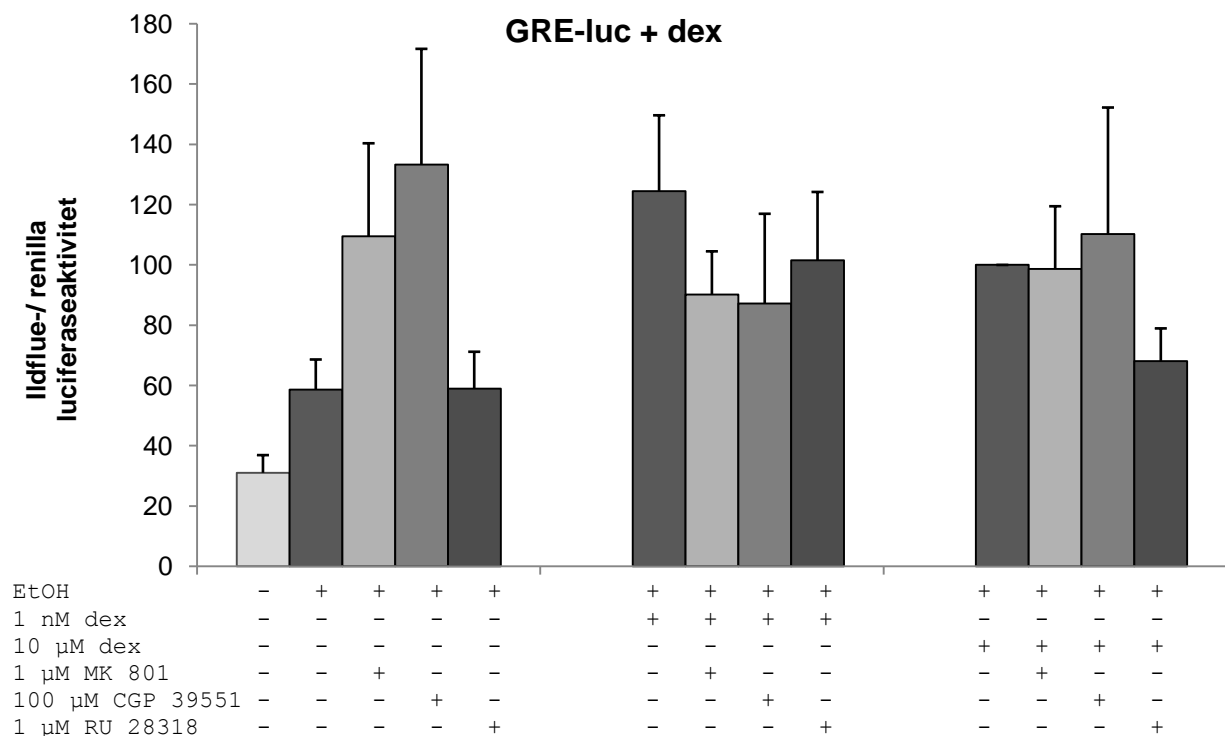
**Figur 3.19a/b: Antagonisters effekter på luciferasemålingene.**

CV-1 cellene ble transfektert med GRE-luc, RL-cmv og GR og eksponert for MK 801, CGP 39551 eller RU 28318. Det er tilsatt dex i figur a og aldo i figur b. Det er etanol i alle skålene. Figurene viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 3-4. Sammenligning av hver av gruppene viser at det ikke er en statistisk signifikant forskjell mellom bare dex/aldo og dex/aldo i tillegg til MK 801, CGP 39551 eller RU 28318. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom antagonist- og etanolkontrollen.

## Transfeksjon av kyllingkornceller med GRE-luc

Det var ønskelig å se om antagonistene har samme effekt i kyllingkornceller som i CV-1 celler. Kyllingkornceller ble transfektert med kun GRE-luc siden korncellene uttrykker GR og NMDA reseptor naturlig. Renillaluciferase ble brukt som intern standard. Siden kyllingkornceller ikke lar seg transfekttere med kalsiumfosfat-metoden, ble disse cellene transfektert med Metafectene PRO® transfeksjonsreagens (se avsnitt 2.4.2). Det ble tilsatt de samme ligandene som i CV-1 celler transfektert med GRE-luc.

Resultatet viser at endogen GR aktiveres ved tilsetning av deksametason og at antagonistene ikke interagerer med denne luciferaseaktiviteten. Antagonistene MK 801 og CGP 39551 har en tendens til aktivere GRE-luc når deksametason ikke er tilsatt, men forskjellen er ikke statistisk signifikant (Figur 3.20).



**Figur 3.20: Antagonisters effekter på luciferasemålingene i kyllingkornceller.**

Hver skål (8,8 cm<sup>2</sup>) med kyllingkornceller ble transfektert med 0,9 µg GRE-luc, 0,1 µg RL-tk og 2 µl Metafectene PRO®. Cellene ble eksponert for MK 801, CGP 39551 eller RU 28318 i tillegg til dex. Inkuberingstiden med transfeksjonsløsning var 5 timer. Cellene ble høstet to døgn etter start av transfeksjon og luciferase målt. Figuren viser gjennomsnittlig ildflu luciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet i prosent med SE, n = 5.

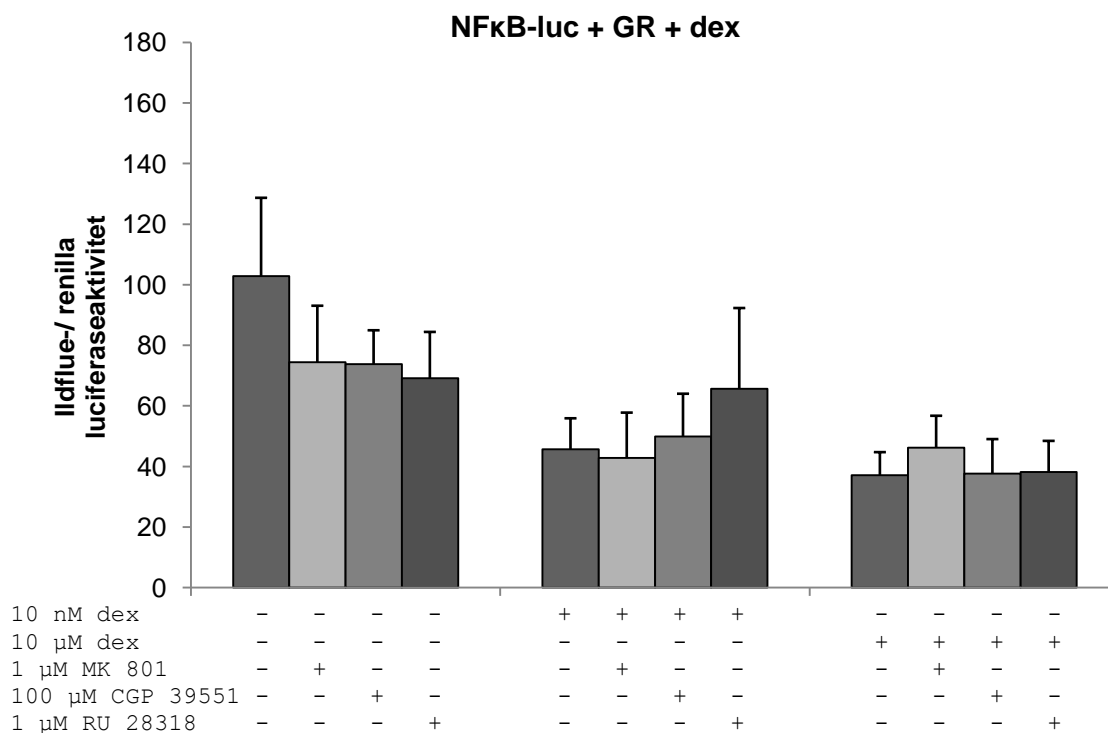
Sammenligning av hver av gruppene viser at det ikke er en statistisk signifikant forskjell mellom bare dex, og dex i tillegg til MK 801, CGP 39551 eller RU 28318. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom antagonist- og etanolkontrollen.

### Transfeksjon av CV-1 celler med NFκB-luc

CV-1 celler ble transfektert med NFκB-luc og GR. Renillaluciferase ble brukt som intern standard. Forsøksoppsettet ble satt opp slik som for GRE-luc.

Resultatet viser at antagonistene ikke påvirker deksametasonindusert luciferaseaktivitet. Antagonistene har en tendens til å påvirke NFκB-luc (reduserer luciferaseaktivitet) via GR når deksametason ikke er tilstede, men forskjellen er ikke statistisk signifikant (Figur 3.21).

Det synes derfor som at NMDA antagonistene ikke kan påvirke klassisk GR direkte (Figur 3.19 - Figur 3.21), men at beskyttelsen de gir mot deksametasonindusert celledød i nevroner heller går via en effekt på NMDA reseptoren.



**Figur 3.21: Antagonisters effekt på luciferasemålingene.**

CV-1 cellene ble transfektert med NFκB-luc, RL-cmv og GR og eksponert for MK 801, CGP 39551 eller RU 28318 i tillegg til dex. Det er etanol i alle skålene. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 6. Sammenligning av hver av gruppene viser at det ikke er en statistisk signifikant forskjell mellom bare dex og dex i tillegg til MK 801, CGP 39551 eller RU 28318. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom antagonist- og etanolkontrollen.

---

### 3.4.5 Interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren

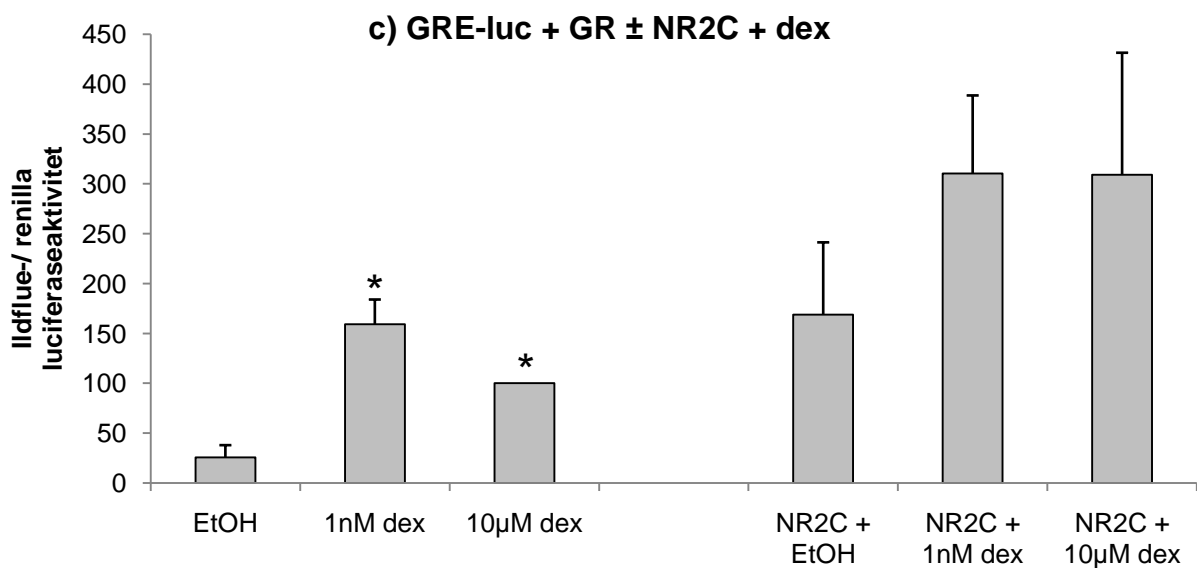
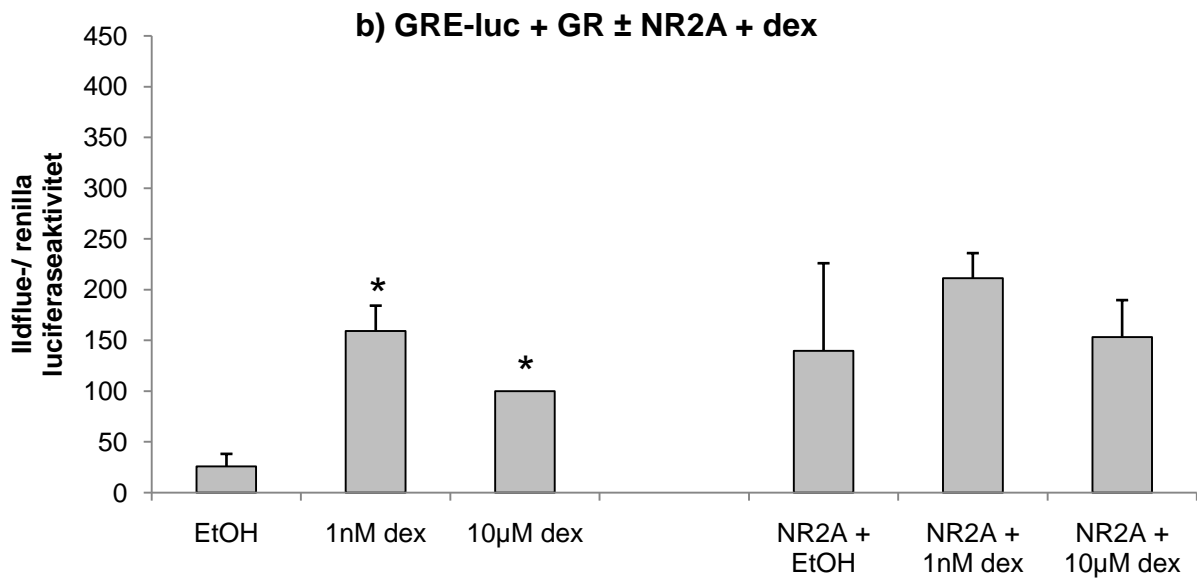
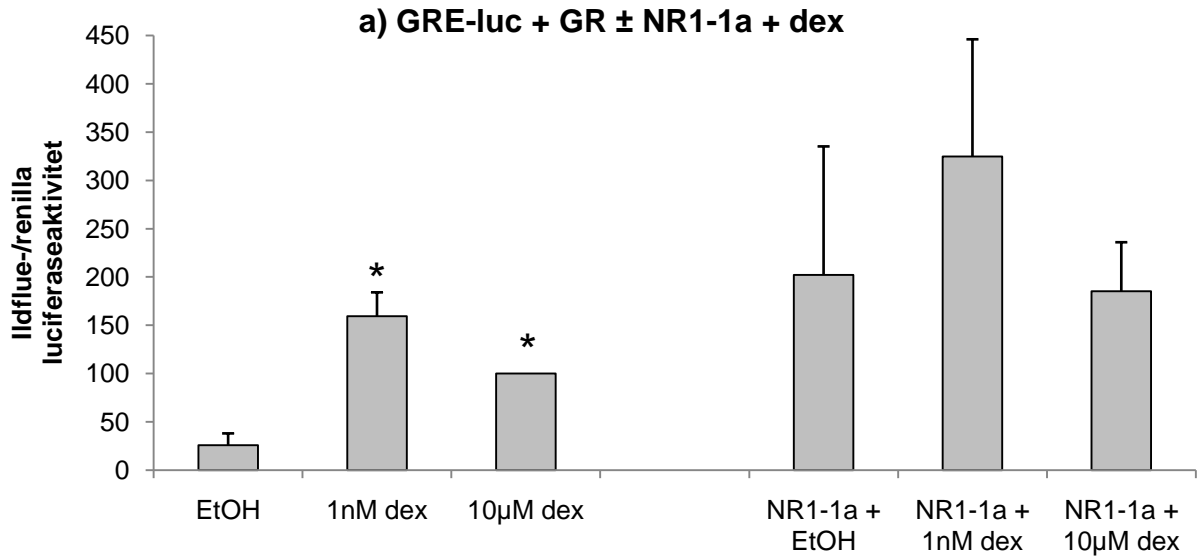
Siden det var vanskelig å se etter en eventuell interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren i mikroskopet (se avsnitt 3.2) ble luciferase reportersystemet i CV-1 celler brukt. For å undersøke om det er en protein-protein interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren ble CV-1 celler ko-transfektet med GR og ulike NMDA reseptorsubenheter og i tillegg med GRE-luc eller NFκB-luc som reporter-gen. Det ble tilsatt to ulike konsentrasjoner av deksametason eller aldosteron (1 nM eller 10 μM til celler transfektet med GRE-luc og 10 nM eller 10 μM til celler transfektet med NFκB-luc). Siden renilluciferase ikke ble påvirket av subenhetene, ble renilluciferase brukt som intern standard (se avsnitt 3.4.1). Luciferaseaktiviteten er korrigeret med den interne standarden ved å dele ildfluoluciferaseverdiene på de korresponderende renilluciferaseverdiene.

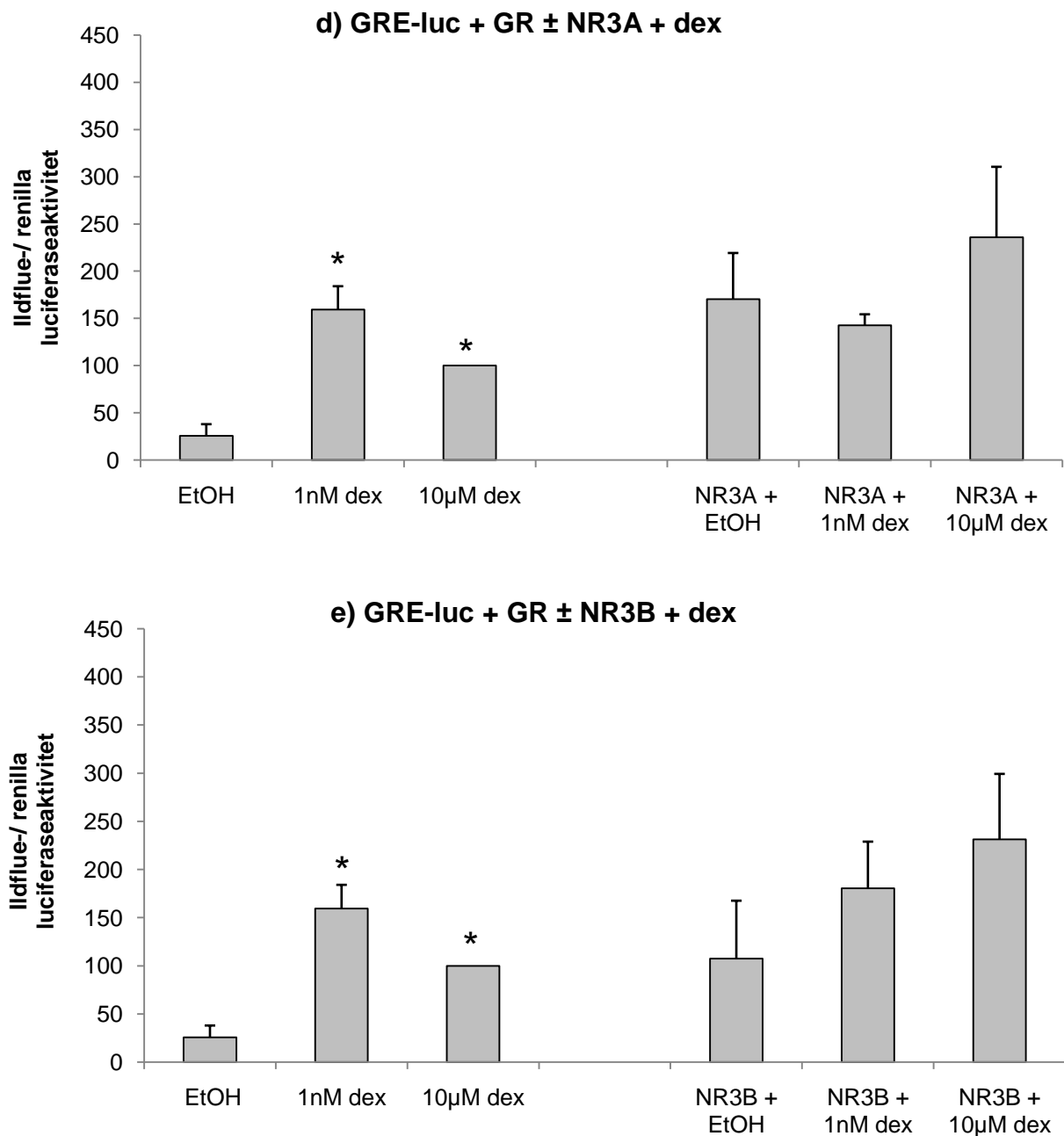
Finnes en interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren i cytoplasma slik som for heat shock proteinene, forventes en reduksjon i luciferaseaktivitet for GRE-luc og en nedsatt reduksjon eller en økning i luciferaseaktivitet for NFκB-luc.

Luciferasemålinger for celler transfektet med GR ble sammenlignet med celler ko-transfektet med GR og en NMDA reseptorsubenheter (Figur 3.22 - Figur 3.26).

#### **GRE-luc**

Resultatet viser at luciferaseaktiviteten påvirkes når celler ko-transfektet med NMDA reseptorsubenheter og GR sammenlignet med transfeksjon med GR alene. Ko-transfektet celler gir høye bakgrunnsmålinger (celler som ble eksponert for etanol), men resultatet er ikke statistisk signifikant (Figur 3.22a-e).



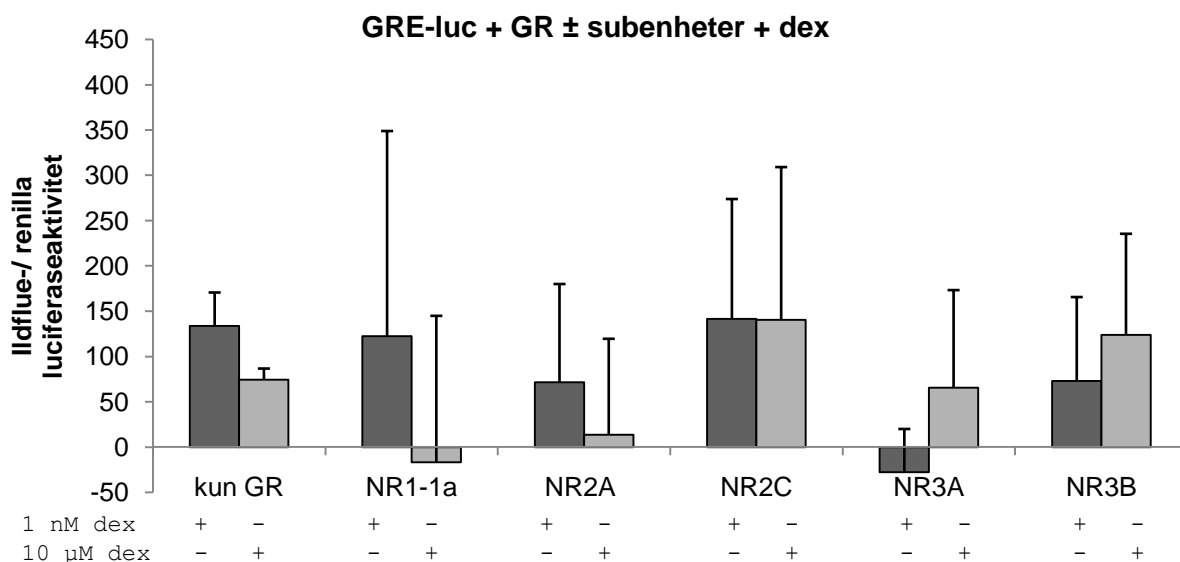


**Figur 3.22a-e: NMDA reseptorsubenheterne påvirker luciferaseaktiviteten til GRE-luc.**

CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk og GR ± subenheter og eksponert for etanol eller dex. Figurene viser gjennomsnittlig ildflu luciferaseaktivitet delt på renilla luciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4. Alle verdiene i figurene er hentet fra de samme uavhengige forsøkene. Verdier for celler som ble transfektert med GR alene, er gjengitt i alle figurene (a-e). \* betyr at målingene med dex er statistisk signifikant forskjellige fra målingene med etanol for celler som er transfektert med GR alene. Det var ingen statistisk signifikant forskjell i målingene for celler som er ko-transfektet med GR og subenheter. Cellene transfektert med GR er sammenlignet med cellene som er ko-transfektet med GR og subenheter. Det var ingen statistisk signifikant forskjell i målingene fra skåler tilsatt etanol.

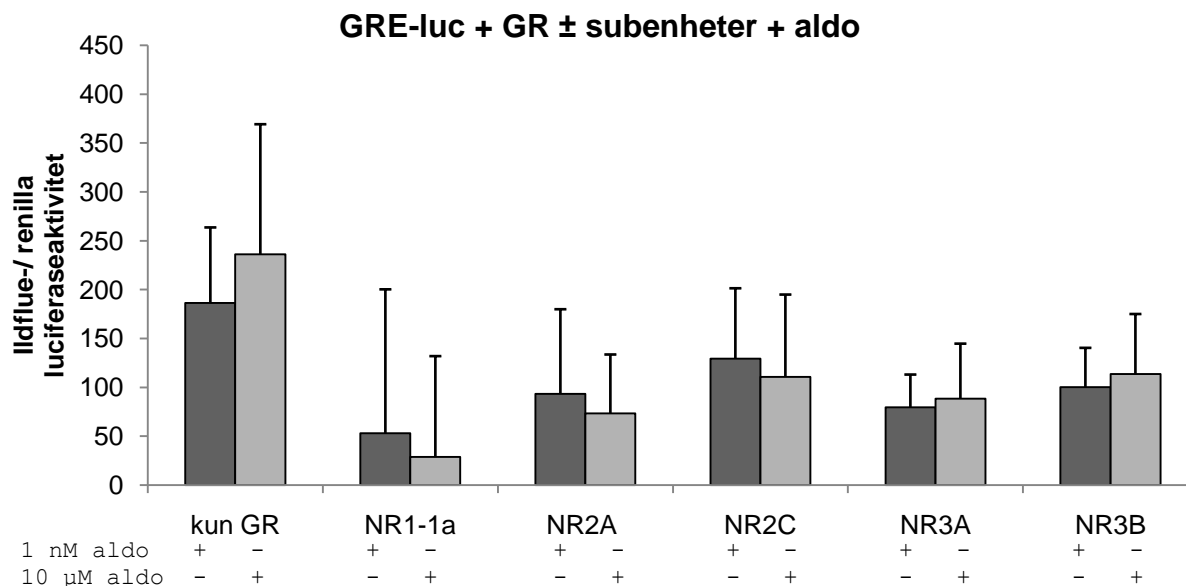
Siden bakgrunnsmålingene (etanolmålingene) syntes å gi høy luciferaseaktivitet, har vi valgt å trekke etanolmålingene fra målingene som var tilsatt med deksametason eller aldosteron (Figur 3.23 og Figur 3.24). Subenheter som gir liten differanse i luciferasemålinger (en mindre økning eller reduksjon i luciferaseaktivitet) antas som en mulig interaksjon mellom subenheten og GR.

Resultatet viser at CV-1 celler som ble ko-transfektet med visse NMDA reseptorsubenheter har en tendens til å gi reduksjon i luciferasemålingene. Dette gjelder for NR3A med 1 nM deksametason, NR1-1a eller NR2A med 10  $\mu$ M deksametason og alle subenheterne med aldosteron, men resultatet er ikke statistisk signifikant (Figur 3.23 og Figur 3.24).



**Figur 3.23: NMDA reseptorsubenheterne påvirker deksametasonindusert luciferaseaktivitet.**

CV-1 celler ble transfektet med GRE-luc, RL-tk og GR  $\pm$  subenheter og eksponert for dex. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE,  $n = 4$ . Alle verdiene i figuren er hentet fra de samme uavhengige forsøkene og er vist før i Figur 3.22, men her har vi valgt å trekke etanolverdiene fra sine korresponderende verdier tilsatt dex. Cellene transfektet med GR er sammenlignet med cellene som er ko-transfektet med GR og subenheter. De som fikk samme konsentrasjon dex, er sammenlignet med hverandre. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.



**Figur 3.24: NMDA reseptorsubenheterne påvirker aldosteronindusert luciferaseaktivitet.**

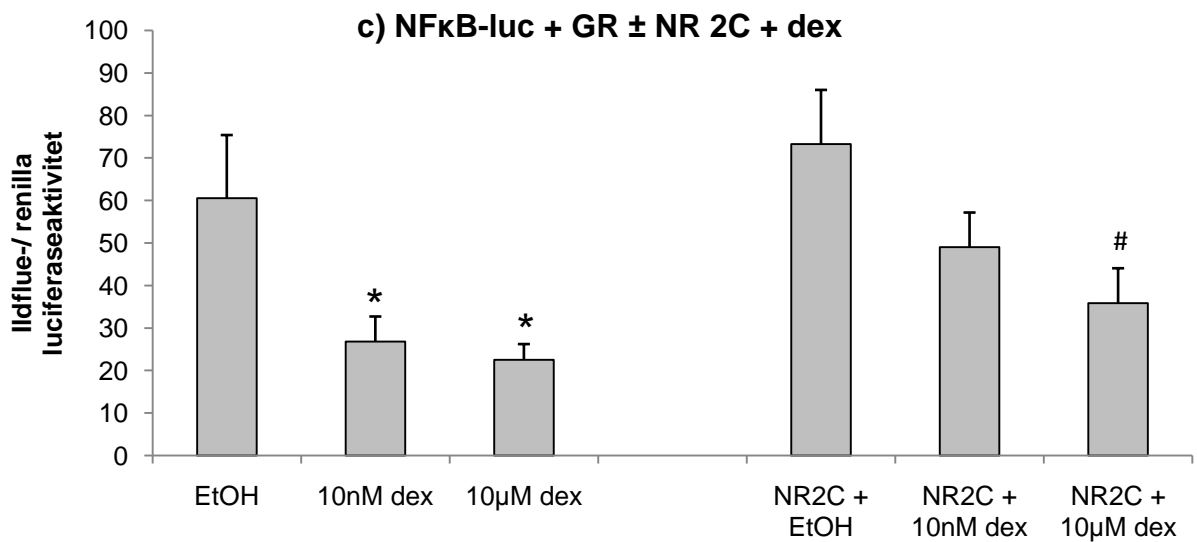
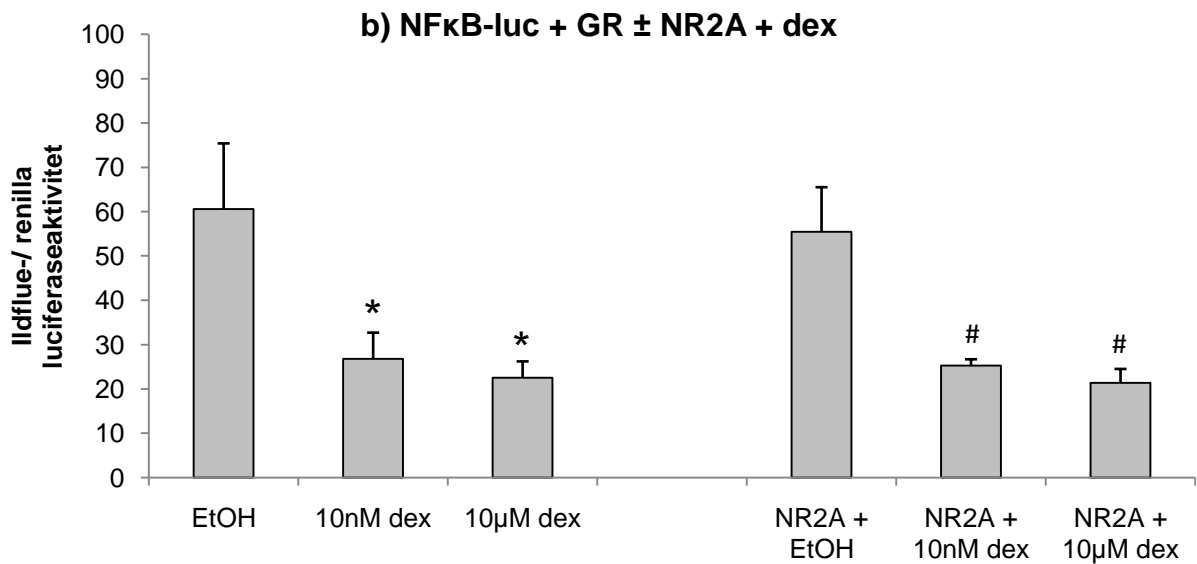
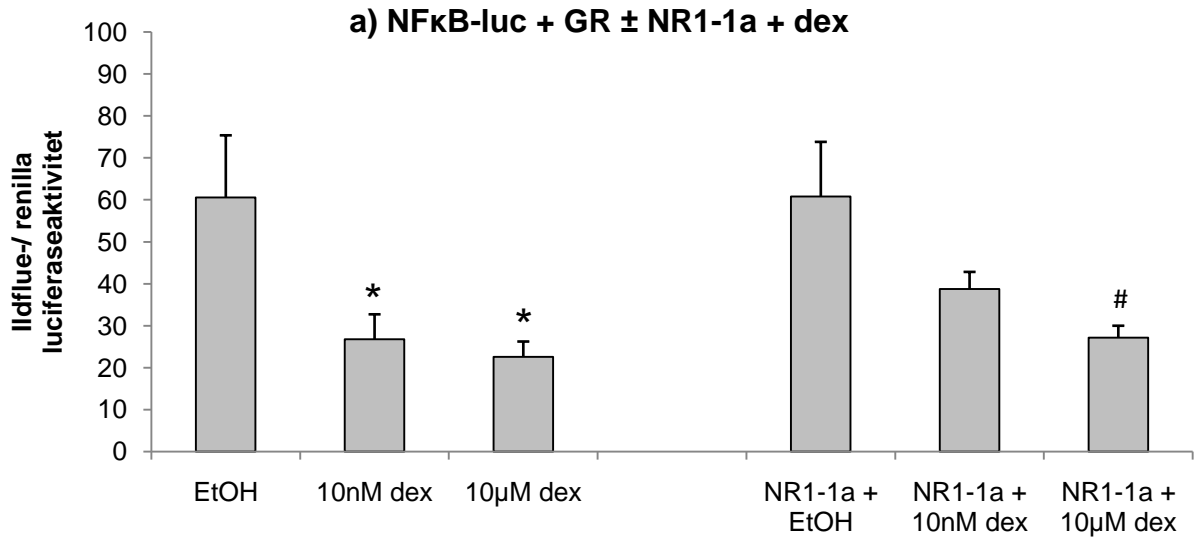
CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk og GR ± subenheter og eksponert for aldo. Figuren viser gjennomsnittlig ildflu luciferaseaktivitet delt på renilla luciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4. Alle verdiene i figuren er hentet fra de samme uavhengige forsøkene. Vi har valgt å trekke etanolverdiene fra sine korresponderende verdier tilsatt dex. Cellene transfektert med GR er sammenlignet med cellene som er ko-transfektert med GR og subenheter. De som fikk samme konsentrasjon dex, er sammenlignet med hverandre. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.

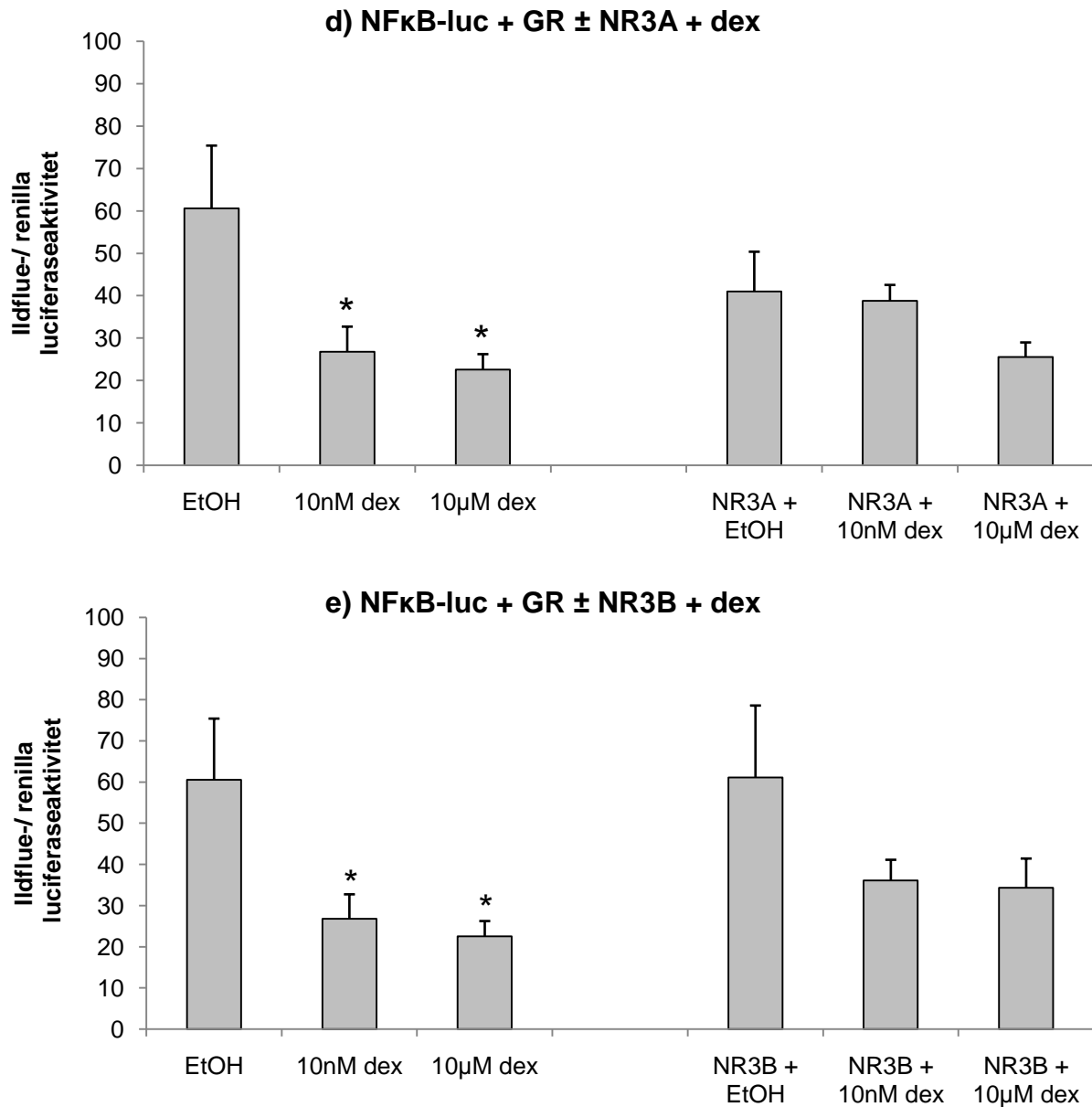
### NFκB-luc

Ved interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren i cytoplasma forventes en nedsatt reduksjon eller en økning i luciferaseaktivitet for NFκB-luc. Luciferasemålinger fra skåler med deksametason sammenlignes med skåler uten deksametason for celler som er transfektert med samme subenhet. Når det ikke er statistisk signifikant forskjell mellom skålene, blir det ansett som en interaksjon mellom GR og subenheter.

Resultatet viser at deksametason gir mindre reduksjon i luciferaseaktivitet når celler ko-transfekteres med GR og subenheter sammenlignes med celler som transfekteres med GR alene (Figur 3.25a-e). Det er sterkest effekt når NR3A eller NR3B ble ko-transfektert med GR siden begge deksametasonkonsentrasjonene ikke gir statistisk signifikant reduksjon i luciferaseaktivitet (Figur 3.25d og e). Det må antas en interaksjon mellom GR og NR3A eller NR3B i dette celledsystemet. Interaksjonen mellom NR2A og GR anses som minst sannsynlig, siden begge konsentrasjonene gir signifikant reduksjon i luciferaseaktivitet (Figur 3.25b).



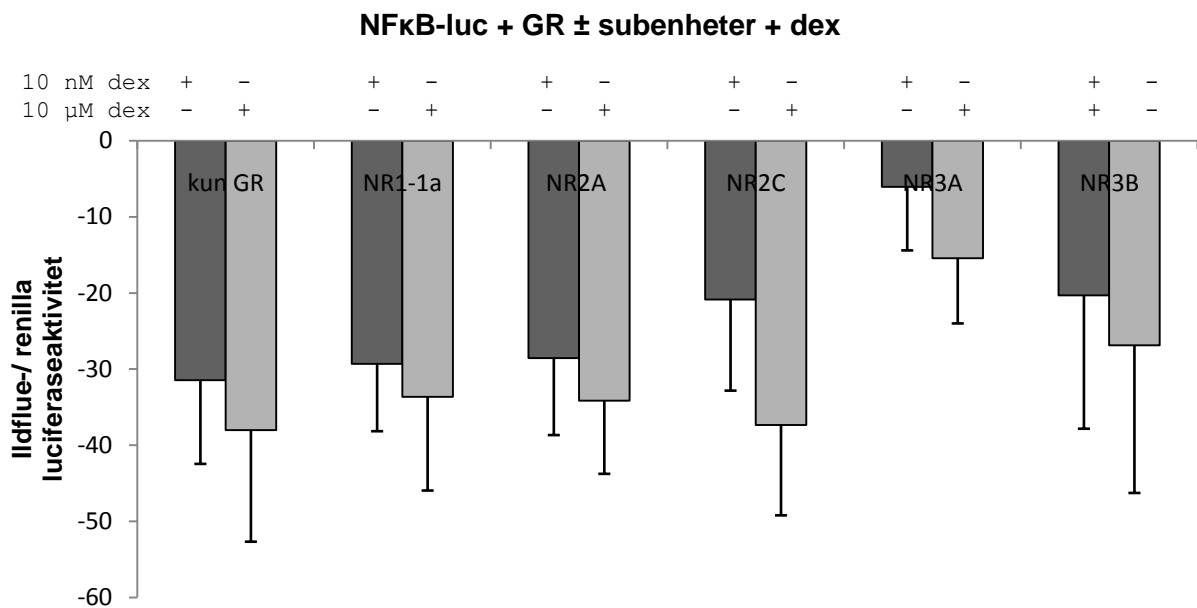




**Figur 3.25a-e: NMDA reseptorsubenheterne påvirker luciferaseaktiviteten til NFκB-luc.** CV-1 celler ble transfektert med NFκB-luc, RL-tk og GR ± subenheter og eksponert for etanol eller dex. Figurene viser gjennomsnittlig ildflu luciferaseaktivitet delt på renilluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 5. Alle verdiene i figurene er hentet fra de samme uavhengige forsøkene. Verdier fra celler som ble transfektert med GR alene, er gjengitt i alle figurene (a-e). \* betyr at målingene med dex er statistisk signifikant forskjellige fra målingen med etanol for celler som er transfektert med GR alene. # betyr at målingene med dex er statistisk signifikant forskjellige fra målingene med etanol for celler som ble ko-transfektet med GR og ulike subenheter. Det var ingen statistisk signifikant forskjell i målingene fra skåler tilsatt etanol.

Det ble valgt å trekke etanolmålingene fra målingene som var tilsatt med deksametason slik som for GRE-luc (Figur 3.23). Subenheter som gir liten differanse i luciferasemålinger (mindre reduksjon i luciferaseaktivitet) antas som en mulig interaksjon mellom subenheten og GR.

Resultatet viser at CV-1 celler som ble ko-transfektet med GR og NR3A har en tendens til å gi minst reduksjon i luciferasemålingene, men resultatet er ikke statistisk signifikant (Figur 3.26). Dette funnet støttes av en tilsvarende effekt på GRE-luc for NR3A.



**Figur 3.26: NMDA reseptorsubenheterne påvirker deksametasonindusert luciferaseaktivitet.**

CV-1 celler ble transfektet med NFκB-luc, RL-tk og GR ± subenheter og eksponert for dex. Figuren viser gjennomsnittlig ildfueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 5. Alle verdiene i figuren er hentet fra de samme uavhengige forsøkene, og er vist før i **Figur 3.25**, men her vi har valgt å trekke etanolverdiene fra sine korresponderende verdier tilsatt dex. Cellene transfektet med GR er sammenlignet med cellene som er ko-transfektet med GR og subenheter. De som fikk samme konsentrasjon dex er sammenlignet med hverandre. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene.

---

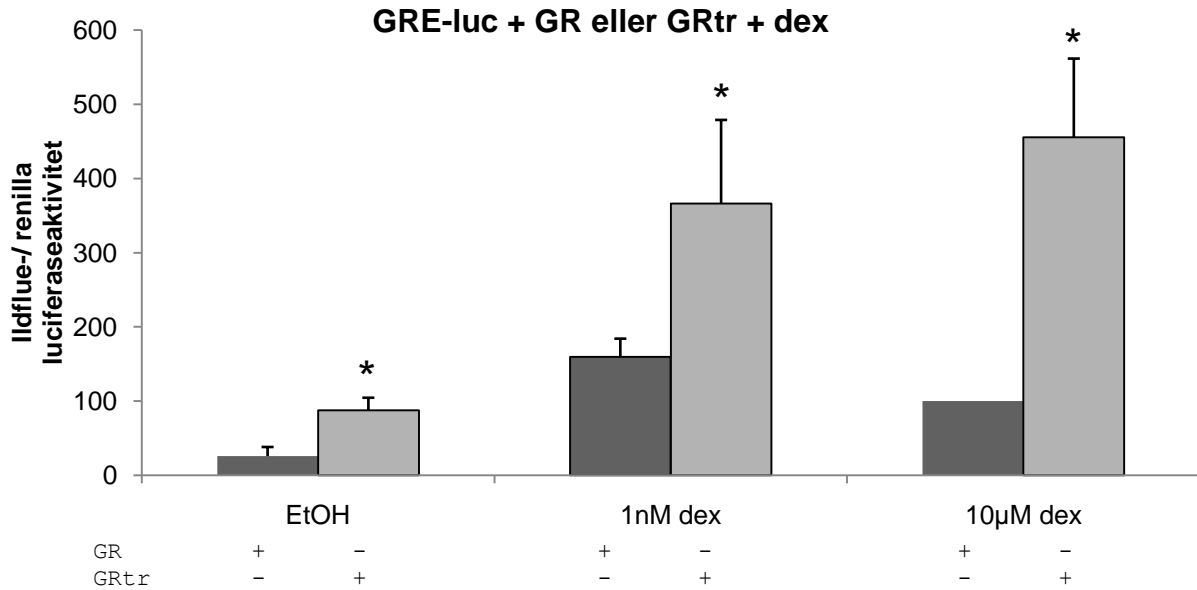
### 3.4.6 Transfeksjon med GRtr

Genet i GRtr plasmidet koder for en glukokortikoid reseptor der karboksylterminalen (ligandbindende domene) er fjernet. Fjerning av ligandbindende domenet resulterer i en reseptor som er konstitutiv aktiv fordi den kan aktivere transkripsjon i fravær av agonister (Danielsen *et al*, 1987). Bindingssetet for hsp90 og annen dimerisering er også fjernet. Dette plasmidet kan brukes for å se om denne regionen er ansvarlig for en eventuell interaksjon med NMDA reseptorsubenheter.

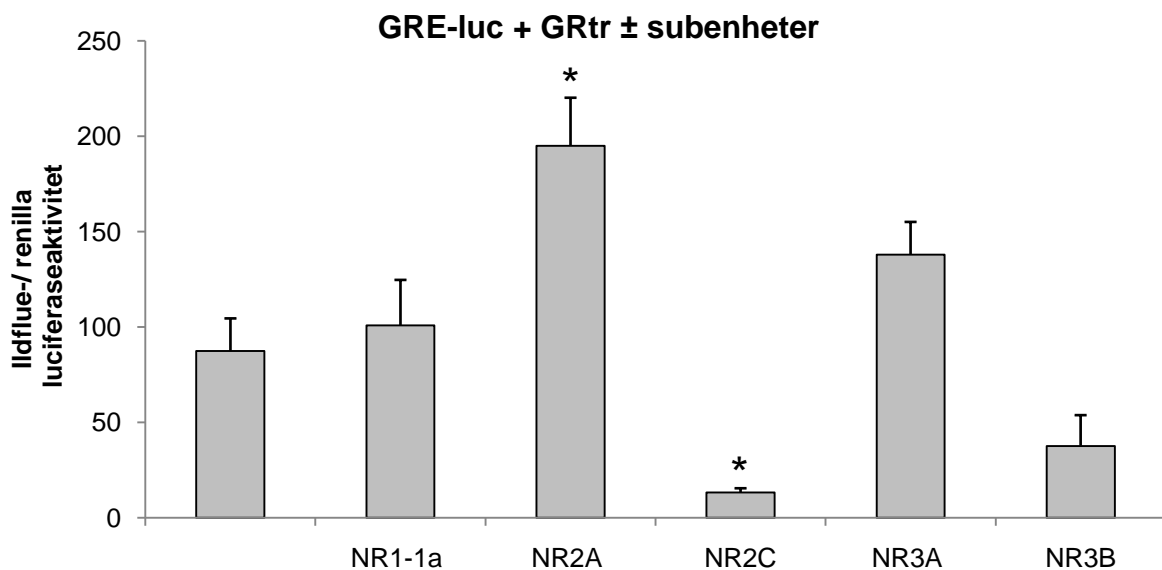
CV-1 celler ble ko-transfektet med GR eller GRtr og ulike NMDA reseptorsubenheter. GRE-luc eller NFκB-luc ble brukt som reporter-gen. Siden renillaluciferase ikke ble påvirket av GRtr, ble renillaluciferase brukt som intern standard (se avsnitt 3.4.1). Luciferaseaktiviteten er korrigeret med den interne standarden ved å dele ildfluoluciferaseverdiene på de korresponderende renillaluciferaseverdiene. Luciferasemålinger for celler transfektet med GR ble sammenlignet med celler transfektet med GRtr.

#### GRE-luc

Resultatet viser at celler som er transfektet med GRtr, har en høyere luciferaseaktivitet når deksametason ikke er tilsatt sammenlignet med celler som er transfektet med GR. Luciferaseaktiviteten økes ytterligere ved tilsetting av deksametason (Figur 3.27). Den konstitutive aktiviteten med GRtr blir ikke redusert NR3A subenheten (Figur 3.28) (NR3A interagerer ikke med luciferaseaktiviteten til GRtr slik som for GR i Figur 3.23 og Figur 3.26). NR2C subenheten ko-transfektet med GRtr reduserer luciferaseaktiviteten sammenlignet med celler transfektet med GRtr alene, mens NR2A transfektet sammen med GRtr øker luciferaseaktiviteten (Figur 3.28). Luciferaseaktiviteten økes også når deksametason tilsettes til celler som er ko-transfektet med GRtr og subenheter (Figur 3.29).

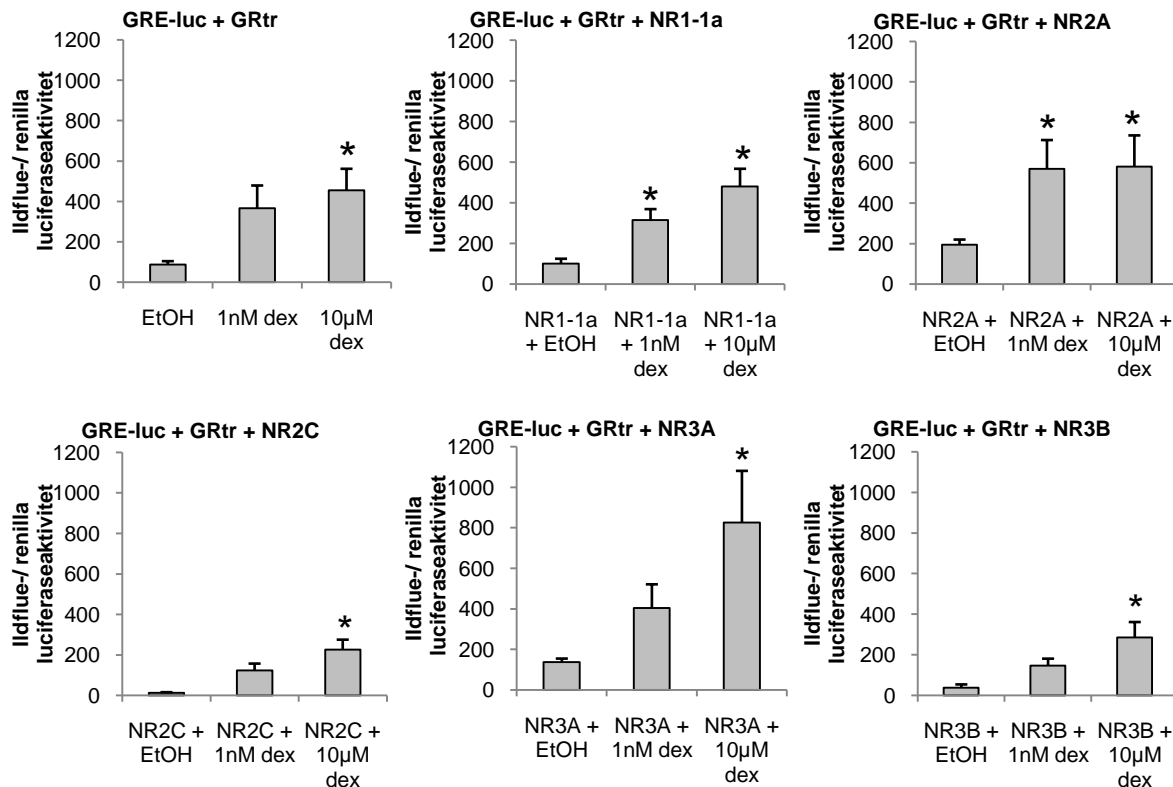


**Figur 3.27: GRtr aktiverer GRE-luc konstitutiv og kan ytterligere aktiveres av dex.** CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk og GR eller GRtr og eksponert for etanol eller dex. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4. Alle verdiene i figuren er hentet fra de samme uavhengige forsøkene, og verdiene til celler som ble transfektert med GR er vist før i Figur 3.22. \* betyr at målingene til celler som er transfektert med GRtr er statistisk signifikant forskjellige fra målingene til celler som er transfektert med GR.



**Figur 3.28: NMDA reseptorsubenheter påvirker den konstitutive luciferaseaktiviteten til GRtr.**

CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk og GRtr ± subenheter og eksponert for etanol. Figuren viser gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4. Alle verdiene i figuren er hentet fra de samme uavhengige forsøkene og verdien til celler som ble transfektert med kun GRtr, er vist før Figur 3.27. \* betyr at målingene til celler som er ko-transfektet med GRtr og subenheter er statistisk signifikant forskjellige fra målingene til celler som er transfektert med kun GRtr.

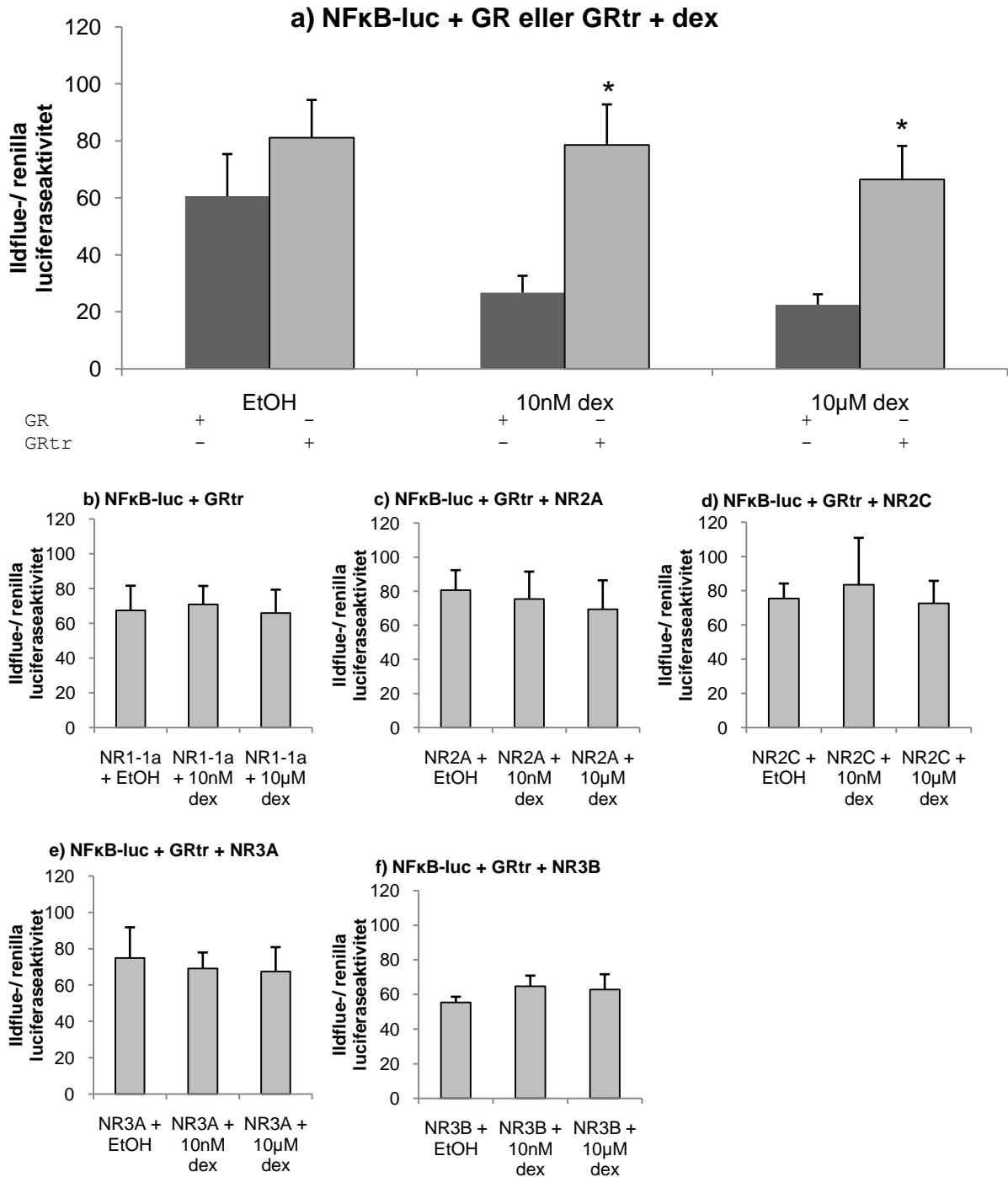


**Figur 3.29: GRtr aktiveres av deksametason.**

CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc, RL-tk og GRtr ± subenheter og eksponert for etanol eller dex. Figuren viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4. Alle verdiene i figuren er hentet fra de samme uavhengige forsøkene og verdiene til celler som ikke fikk dex, er vist før i Figur 3.28. \* betyr statistisk signifikant forskjeller mellom celler som ble eksponert for etanol og celler eksponert for dex.

### NFκB-luc

Resultatet viser at celler som er transfektert med GRtr, har lik luciferaseaktivitet som celler transfektert med GR når deksametason ikke er tilsatt. Tilsetning av deksametason gir ikke reduksjon i luciferaseaktivitet for celler som er transfektert med GRtr (Figur 3.30a). Det ble tilsvarende resultater også når celler ble ko-transfektet med GRtr og subenheter (Figur 3.30b-f). Dette tyder på at denne reporteren er avhengig av karboksylterminalen til GR for å påvirkes. Den kan derfor ikke brukes som verktøy sammen med GRtr til å lete etter interaksjon med NMDA reseptoren. Resultatene viser også at NMDA reseptorsubenheterne ikke gir uspesifikke effekter på luciferaseaktivitet.



**Figur 3.30 a-f: GRtr virker ikke konstitutiv på NFκB-luc promotoren og aktiveres ikke av dex.**

CV-1 celler ble transfektert med NFκB-luc, RL-tk, GR eller GRtr ± subenheter og eksponert for etanol eller dex. Figurene viser gjennomsnittlig ildfluelluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet etter to døgn i prosent med SE, n = 4. Alle verdiene i figurene er hentet fra de samme uavhengige forsøkene. I figur a er verdiene til celler transfektert med GR vist før i Figur 3.25. Celler transfektert med GR er sammenlignet med celler transfektert med GRtr. Celler som ikke er tilsatt dex er sammenlignet med hverandre, og celler som er tilsatt dex er sammenlignet med hverandre. \* betyr statistisk signifikant forskjell mellom målingene. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom målingene for celler som ble transfektert med GRtr ± subenheter.

---

## 4. DISKUSJON

### 4.1 Effekten av agonister på celledød i nevroner

Eksposering med 10  $\mu$ M deksametason eller 10  $\mu$ M aldosteron ga en signifikant økning i celledøden i kornceller fra kylling sammenlignet med etanolkontrollen (Figur 3.1a). Det er tidligere vist at 10  $\mu$ M deksametason induserer celledød i korncellekulturer fra lillehjernen til både rotte og kylling (Aden *et al*, 2008; Jacobs *et al*, 2006b) og at 10  $\mu$ M aldosteron induserer celledød i kyllingkornceller (Aden *et al*, 2008). Funnene er i samsvar med andre studier som viser at glukokortikoider er toksisk for flere typer nevroner som for eksempel hippocampale og kortikale nevroner i kultur (McIntosh *et al*, 1996). *In vivo* studier har vist at deksametason induserer celledød av ulike type nevroner i hippocampus fra rotte og primater (Haynes *et al*, 2001; Mitchell *et al*, 1998; Uno *et al*, 1990). Glukokortikoidindusert celledød i hippocampus er mediert via GR (Packan *et al*, 1990). Det er også vist at både aldosteron- og deksametasonindusert celledød reduseres av MR antagonisten spironolakton. GR/MR antagonisten RU 28318 har vist å beskytte mot deksametasonindusert celledød i kyllingkornceller (Aden *et al*, 2008). Disse funnene indikerer innblanding av en GR/MR reseptortype i deksametason- og aldosteronindusert celledød i korncellene. Ved en innblanding av både GR og MR ville vi forventet at aldosteron induserte en additiv celledød i tillegg til deksametasonindusert celledød. Forsøket som ble gjort, viste ingen additiv effekt av aldosteron (Figur 3.1b), noe som kan tyde på at celledøden medieres gjennom samme type reseptor. Den aldosteronkonsentrasjonen som ble brukt i forsøkene, vil sannsynligvis kunne medføre at aldosteron også kan binde til GR (se avsnitt 3.4.2 og (Arriza *et al*, 1988)). Siden RU 28318 ikke virket som GR antagonist i reportersystemene som ble brukt (Figur 3.19 - Figur 3.21), men allikevel beskytter nevroner kan man ikke utelukke en MR mediert celledød. De tilgjengelige promotorene (GRE-luc og NF $\kappa$ B-luc) kan ikke aktiveres av MR i vårt celledesystem (Figur 3.15 og Figur 3.16). I andre studier har man brukt en MMTV-luc (mouse mammary tumor virus luciferase) promotor til å studere ligandeffekter av MR (Arriza *et al*, 1988), men denne promotoren var ikke tilgjengelig for vår gruppe.



Det er antatt at raske ikke-genomiske effekter av glukokortikoider til dels er mediert via en membran assosiert glukokortikoidreseptor (mGR) (Chen *et al*, 1999). Denne antakelsen støttes av at GR er funnet i cellemembranen. Ved bruk av elektronmikroskop på rottehjerner er det funnet GR i postsynaptiske membraner (Johnson *et al*, 2005). NMDA reseptorer er også lokalisert til cellemembranen. Deksametasonindusert celledød kan reduseres av NMDA reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551 (Aden *et al*, 2008; Jacobs *et al*, 2006b). Effektene observert av MK 801 og CGP 39551 i nevronkulturer og manglende effekt av disse på deksametason- og aldosteronindusert transkripsjon i CV-1 celler (se avsnitt 3.4.4) antyder en interaksjon mellom NMDA reseptoren og GR/MR i cellemembranen. Denne antakelsen støttes av at Takahashi *et al*. har vist at glukokortikoider fører til forlengelse av NMDA reseptormediert økning i fritt intracellulært  $Ca^{2+}$  i rotte hippocampus (Takahashi *et al*, 2002). En studie utført på rotte hippocampus, har vist at eksponering med kortikosteron i tillegg til NMDA øker den NMDA medierte toksisiteten (Mulholland *et al*, 2006).

Studier har vist en del forskjeller mellom mGR og den klassiske GR som for eksempel ulik bindingsaffinitet til glukokortikoider. mGR har en  $K_d$  verdi for deksametasonbinding som er mer enn 10 ganger høyere enn deksametasonbinding til den klassiske intracellulære GR (Powell *et al*, 1999). Det er ikke kjent om RU 28318 kan påvirke mGR. Det er vist både *in vivo* og *in vitro* at lav-potent glukokortikoid hydrokortison induserer liknende toksisitet i kyllingkornceller som deksametason. Dosen som påvirker celledød er det samme for deksametason og hydrokortison, men konsentrasjonen som trengs for å aktivere transkripsjon er mye lavere for deksametason enn hydrokortison (Aden *et al*, 2008). Dette kan bety at glukokortikoider kan mediere effekter ved ulike konsentrasjoner enn effekter som medieres gjennom genekspressjon.

Celledød indusert av både deksametason og hydrokortison fører til aktivering av caspase-3 og kondensering av kjernen og celledøden reduseres av caspase-3-hemmer (Aden *et al*, 2008). I rottekornceller ble også deksametasonindusert celledød redusert av caspase-3-hemmer (Jacobs *et al*, 2006b). Det ble observert små og kondenserte celler i mikroskopet ved trypanblå farging av døde celler, men resultatene er ikke vist. Kondensering av kjernen og cytoplasma og aktivering av

---

caspaser er karakteristisk for apoptose (se avsnittene 1.1.2 og 1.2). Aktivering av caspase-3 og andre apoptose-initiatorer skjer raskt (30 minutter – 2 timer) (Aden *et al*, 2008; Jacobs *et al*, 2006b), noe som kan tyde på at glukokortikoidindusert apoptose ikke skjer via genomiske mekanismer.

En potensiell interaksjon mellom GR og NMDA reseptorsubenheter ble undersøkt i cellelinjer, hvor en kan overuttrykke bestemte par av disse reseptorene.

## **4.2 Glukokortikoid- og mineralkortikoideffekter på transfekterte celler**

### **4.2.1 Proteinuttrykk i transfekterte celler**

Cellelinjer er basert på celler fra normalt vev som vedlikeholdes gjennom et visst antall delinger. De vil ha karakteristiske trekk fra det vevet det stammer fra.

Kontinuerlige cellelinjer baserer seg på kreftceller som deler seg hele tiden i kultur.

Primærkulturer vil i større grad enn cellelinjer være lik de cellene man finner *in vivo* og studier i primærkulturer vil derfor i større grad reflektere de prosessene som forekommer *in vivo*. I motsetning til primærkulturer er cellelinjer lettere å vedlikeholde i kultur og reproduserbarheten fra forsøk til forsøk er bedre.

Primærkulturer krever mer kompliserte dyrkningsbetingelser og er mer sårbar for ytre påvirkninger enn cellelinjer. Fordelen ved bruk av primærkultur av kornceller er at disse utvikler funksjonelle NMDA reseptorer. Det er derimot ingen effektiv metode for transfeksjon av kornceller.

CV-1 celler er en stabil og kontinuerlig fibroblastcellelinje som er lett å dyrke (Hopps *et al*, 1963) og lar seg lett transfektere. CV-1 celler uttrykker vanligvis ikke GR eller MR (Giguere *et al*, 1986). Det er derfor bare GR eller MR tilstede i cellene når plasmider, som koder for GR eller MR, er transfektert inn i cellene. NMDA reseptorer uttrykkes hovedsakelig i CNS, men noen få 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 derfor er det lite sannsynlig at CV-1 celler uttrykker NMDA reseptorer naturlig.

Ved å transfektere inn plasmider som koder for bestemte NMDA reseptorsubenheter, holdes det kontroll over hvilke subenheter cellene uttrykker. CV-1 celler ble transfektert med GR og NR3A plasmid og etter to døgn ble de høstet til Westernblotting. Westernblotting brukes til å identifisere spesifikke proteiner som gjenkjennes av antistoffer. Siden antistoffene ble tatt i bruk for første gang, var det viktig å se at disse var spesifikke nok til å identifisere de aktuelle proteinene. Blottene viste at antistoffene var relativt spesifikke og at de identifiserte proteinene hadde riktig molekylvekt kjent fra litteraturen. GR ble identifisert som et bånd litt mindre enn 100 kDa (Figur 3.2) og i følge litteraturen er molekylvekten 94 kDa (Gametchu *et al*, 2002). NR3A ble identifisert som et bånd mellom 150 kDa og 100 kDa (Figur 3.3) og i følge litteraturen er molekylvekten ca. 130 kDa når NR3A subenheten ikke er satt i NMDA reseptorkomplekset (Perez-Otano *et al*, 2001). GR-blottet viste kun bånd ved 94 kDa av celler som ble transfektert med GR plasmidet, men GR antistoffet eller sekundærantistoffet gav også uspesifikke bånd ved andre molekylvekt. NR3A-blottet viste også kun bånd ved 130 kDa av celler som ble transfektert med NR3A plasmidet. NR3A antistoffet viste seg å være veldig spesifikk siden de to båndene som er vist i Figur 3.3 er de eneste båndene på blottet. Resultatene fra Westernblottingen stemmer overens med litteraturen om at CV-1 celler ikke uttrykker GR eller NMDA reseptorer naturlig (Dingledine *et al*, 1999; Giguere *et al*, 1986). Senere kan antistoffene brukes til for eksempel ko-immunpresipitering.

Siden CV-1 celler ikke uttrykker GR, MR eller NMDA reseptorer naturlig, er det ikke sikkert at disse cellene har de cellekomponentene som disse proteinene interagerer naturlig med. 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 ko-faktorer som er nødvendig for transkripsjon og translasjon (Szapary *et al*, 1996). NMDA reseptorsubenheter som transfekteres alene inn i celler vil ikke fordele seg til cellemembranen, men holdes tilbake i ER (Figur 3.4 og (McIlhinney *et al*, 1998; Perez-Otano *et al*, 2001). Interaksjoner mellom GR/MR og NMDA reseptoren som oppdages i et *in vitro* system kan derfor ikke nødvendigvis overføres direkte til et *in vivo* system, men det kan gi en indikasjon som så kan undersøkes videre i systemer som likner med på nervesystemet.

---

## 4.2.2 Fordeling av NMDA reseptorsubenheter og GR i CV-1 celler

Siden CV-1 celler ikke uttrykker NMDA reseptorer eller GR naturlig ble cellene transfektert med GR og NMDA reseptorsubenheter koblet til gfp eller yfp slik at cellene kan studeres i fluorescensmikroskop.

Mikroskopibildene av CV-1 celler transfektert med NR1-1a-yfp viser at NR1-1a-yfp er fordelt i avgrensede områder utenfor kjernen (Figur 3.4). I en studie i COS celler er det vist at når NR1-1a uttrykkes alene i disse cellene blir NR1-1a proteinet fordelt i store intracellulære vesikler. Studien tyder på at disse strukturene er en del av endoplasmatisk retikulum (ER) (McIlhinney *et al*, 1998). Ut ifra egne mikroskopibilder er det ikke mulig å konkludere om NR1-1a-yfp befinner seg i ER. NR2A subenheten lokaliseres antagelig også i ER når den uttrykkes alene i COS celler (McIlhinney *et al*, 1998). Basert på mikroskopibildene av CV-1 celler transfektert med NR2A-gfp viser at NR2A-gfp har en jevn fordeling i hele cellen med spesielt mye protein i kjernen (Figur 3.4). Dette kan tyde på at NR2A-gfp er lokalisert til andre områder i tillegg til ER. Når CV-1 celler transfekteres med NR3A-gfp fordeler NR3A-gfp seg slik som for NR1-1a-yfp, men NR3A-gfp er lite fordelt i den ytre delen av cellen. Dette kan tyde på en lokalisering i ER, men lokalisering i andre områder kan ikke utelukkes. Det er tidligere vist i HEK293T celler at NR3A-gfp er lokalisert i ER når den uttrykkes i disse cellene uten tilstedeværelse av NR1-1a (Perez-Otano *et al*, 2001).

Mikroskopibildene av CV-1 celler transfektert med NR1-1a sammen med NR3A-gfp viser at NR3A-gfp er fordelt til cellemembranen, men NR3A-gfp er også fordelt i hele cytoplasma (Figur 3.5). Perez-Otano *et al*. fikk liknende resultater i HEK293T celler. Når NR1-1a uttrykkes sammen med NR3A i disse cellene, uttrykkes NR1-1a/NR3A komplekset i cellemembranen og akkumuleringen av NR3A-gfp i ER reduseres. Men uttrykk av NR3A-gfp økes i andre intracellulære områder (Perez-Otano *et al*, 2001).

For å bekrefte om NR1-1a-yfp, NR2A-gfp og NR3A-gfp i CV-1 celler virkelig er lokalisert til ER slik som andre celletyper, kan man bruke dobbelfarging av proteinene og ER. For å bekrefte om NR3A-gfp sammen med NR1-1a virkelig er

lokalisert til cellemembranen, kan cellemembranen og NR3A proteinet farges med to forskjellige fluorescerende antistoffer eller kjøre Westernblotting på membranfraksjoner.

Mikroskopibildene av CV-1 celler transfektert med GR-gfp viser at GR-gfp fordeler seg i avgrensede områder både i kjernen og utenfor (Figur 3.6). Det ble ikke sett forskjell i lokalisering av GR-gfp ved tilsetning av deksametason (bildene er ikke vist). GR-gfp er lokalisert i cytoplasma i COS celler når agonister ikke er tilsatt (Banerjee *et al*, 2008). Ved en optimal distribusjon av GR-gfp er det interessant å se på eventuell endret lokalisering av GR sammen med NR3A proteinet. Hvis GR-gfp lokalisering endrer seg ved ko-transfeksjon med NR3A plasmidet, kan man tenke seg at det er en interaksjon tilstede. Det var ikke mulig å se noe umiddelbar endring i GR-gfps lokalisering ved ko-transfeksjon med NR3A plasmidet (Figur 3.7) og det var vanskelig å finne celler som hadde tydelig kjernelokalisasjon av GR ved tilsetning av deksametason. Det ble derfor vanskelig å måle opp cellens avgrensning for å kvantifisere forholdet mellom GR i kjernen og i cytoplasma. For å kvantifisere forskjeller, vil det være nødvendig å dobbelfarge for eksempel med en kjernemarkør.

Ut i fra mikroskopibildene ser det ut til at NR1-1a-yfp, NR2A-gfp og NR3A-gfp er fordelt i områder som også GR-gfp befinner seg, noe som kan tyde på at en interaksjon mellom disse reseptorene er mulig. Subenhetene og GR som ble brukt er ikke av villtype, men er merket med et fluoriserende protein. Det er derfor mulig at subenhetene fordeler seg annerledes i cellene enn det som ville vært ved bruk av villtypeprotein. For å finne ut hvordan villtype subenheter ville fordelt seg i cellene kunne man testet det med immunfarging av subenhetene. Til tross for at transfeksjon av subenhetene hver for seg ikke resulterer i reseptorer som befinner seg i membranen, har vi allikevel valgt å bruke luciferase reportersystemer til å undersøke interaksjonen mellom GR og NMDA reseptorsubenheter siden protein-protein interaksjoner likevel kan finne sted i cytoplasma.

---

## 4.2.3 Diskusjon av luciferase reportersystemer

### Renillaluciferase som intern standard

For at man skal kunne sammenligne ulike skåler i et transfeksjonsforsøk, bør alle skålene ha samme antall transfekterte celler. Dette er i praksis umulig å få til, derfor er det nødvendig å bruke en intern standard som kan korrigere for variasjoner i transfeksjonseffektivitet. Renillaluciferase brukes primært som en ko-reporter sammen med ildflueluciferase for å gi en internkontroll på avvikende prøver (Fan *et al*, 2007). På grunn av deres evolusjonære opprinnelse har ildflue- og renillaluciferase forskjellig enzymstruktur og substratbehov. Dette gjør det mulig å ko-transfekt disse to reportergenene, fordi man kan selektivt skille dem ved å bruke ulike substrat (Grentzmann *et al*, 1998). For at renillaluciferase skal kunne brukes som intern standard, er det viktig at ingen av komponentene i forsøket påvirker renillaluciferaseverdiene direkte. Enzymaktiviteten bør kun være avhengig av antall celler som har tatt opp plasmidene. Siden RL-tk er en svakere promotor enn RL-cmv ble det tilsatt 1 µg RL-tk per 1 ml transfeksjonsløsning mens det ble tilsatt 0,05 µg/ml av RL-cmv.

Eksposering med 1 nM eller 10 µM av deksametason eller aldosteron påvirker ikke renillaluciferasemålingene direkte (Figur 3.8 og Figur 3.9). I en tidligere studie har likevel deksametason redusert renillaluciferaseaktiviteten når CV-1 celler blir transfektet med GR og behandlet med 10 nM deksametason (Ibrahim *et al*, 2000). I denne studien ble det brukt samme renillaluciferaseplasmid som i vårt forsøksoppsett. Ulike resultater kan skyldes for eksempel at det ble tilsatt ulike mengder av RL-tk i transfeksjonsløsningen (1 µg/ml i vårt forsøksoppsett sammenlignet med 2 µg/ml i studien).

Renillaluciferaseaktiviteten har en tendens til å gå ned når NR2C og NR3B transfekteres sammen GR eller GRtr (Figur 3.11 og Figur 3.12). Dette gjelder både når renillaluciferase plasmidet transfekteres sammen med GRE-luc eller NFκB-luc. Denne tendensen er ikke statistisk signifikant. Når genet for en subenhet transfekteres i cellen sammen med GR, må cellene produsere flere typer proteiner enn når de kun er transfektet 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 proteintype. For finne ut om dette er tilfelle, kunne en analysere mengde protein ved Westernblotting. NR3A transfektert sammen med GR reduserer ikke uttrykket til GR eller omvendt (Figur 3.2 og Figur 3.3). Siden dette ikke gjaldt alle subenhetene, kan nedgangen i luciferaseaktivitet skyldes at konsentrasjonen av plasmidene i plasmidløsningene (NR2C og NR3B) ikke stemmer overens med det som er angitt. Som følge kan man beregne feil mengde plasmid som skal tilsettes. Dette kan føre til at det ikke ble tilsatt optimal DNA i transfeksjonsløsningen (1 µg DNA totalt til 1 ml cellemedium) som igjen kan føre til lavere transfeksjonseffektivitet. Alternativt kan DNAet være av dårlig kvalitet. Det er derfor ønskelig å teste ut flere batcher av de ulike subenhetenes plasmider for å finne plasmidblandinger som påvirker den interne standarden mindre.

Siden nedgang i renillaluciferaseaktivitet ikke gjaldt alle subenhetene, er det viktig å bruke intern standard. Når renillaluciferase brukes som intern standard, vil den korrigere for hele eller deler av denne forskjellen.

### **GRE-luc og NFκB-luc**

GRE-luc plasmidet består av en basalpromotor (prolaktinpromotoren pro36) med tre GRE oppstrøms som styrer luciferasegenet. NFκB-luc er en 5-HT1A reseptor promotor (serotoninreseptor promotor) som er koblet til ildflueluciferasegenet. Det er ulike regulatoriske elementer på 5-HT1A reseptorpromotoren som for eksempel en sekvens som har høy homologi til negativ GRE og positive regulatoriske seter. Disse positive regulatoriske setene reguleres av transkripsjonsfaktorene NFκB subenhet p65 og Spl. Det er vist at GR kan både hemme p65- og p65/Spl-stimulert transkripsjon, mens MR mediert nedregulering er avhengig av hvilke type transkripsjonelle aktivatorer som er tilstede. MR mediert nedregulering er kun sett ved p65/Spl-stimulert transkripsjon og ikke ved p65-stimulert transkripsjon (Meijer *et al*, 2000).

Hvis ligandbundet GR bindes til GRE-luc, vil dette aktivere luciferasetranskripsjon. Ligandbundet GR som bindes til NFκB-luc, vil redusere luciferasetranskripsjon. Lysintensiteten korrelerer med den kjemiske konsentrasjonen av komponentene i reaksjonen. Ved å holde konsentrasjonen av alle komponentene utenom en konstant, kan lysintensiteten brukes som mål på denne komponenten (se avsnitt

---

2.9.1) (Fan *et al*, 2007). I vår studie holdes konsentrasjonen av ATP og luciferin konstant slik at luciferase brukes som en genetisk reporter (Ylikomi *et al*, 2004). Effekt på GRE-luc skjer ved lavere agonistkonsentrasjoner enn for NFκB-luc (Figur 3.13 og Figur 3.17). Det er vist at GR kan binde til promotorer som inneholder multiple GRE (3 GRE i GRE-luc) og utøver en synergisk effekt på luciferaseaktivitet (Rupprecht *et al*, 1993). Effekten av GRtr på GRE-luc er forskjellig fra effekten av GRtr på NFκB-luc (se avsnittet Transfeksjon med GRtr).

### **Deksametason- og aldosteronaktivering av luciferaseaktivitet med GRE-luc og GR**

Deksametason i CV-1 celler gir en økende respons opp til 1 nM ( $10^{-9}$  M) som også er den konsentrasjonen som gir maksimal respons (Figur 3.13). MR agonisten aldosteron gir en økende respons til 10 μM ( $10^{-5}$ ) som også er den konsentrasjonen som gir maksimal respons (Figur 3.13). I kornceller fra både rotte og kylling er det vist at deksametason og aldosteron fører til en signifikant økning i celledød i konsentrasjoner over  $10^{-7}$  M (Aden *et al*, 2008; Jacobs *et al*, 2006b). Siden aldosteron ikke gav additiv celledød til deksametasonindusert celledød (Figur 3.1b), kan det tyde på at aldosteronindusert celledød er mediert via GR. Man kan ikke utelukke muligheten for at aldosteron og deksametason medierer celledød via mGR eller MR. Det er tidligere vist at aldosteron binder til GR (Fuller *et al*, 2000; Reagan *et al*, 1997) siden ligandbindende domene til GR og MR har lignende strukturer (Figur 1.3 og (Pippal *et al*, 2008)), men da med en lavere affinitet. Aldosteron kan aktivere GRE-luc via GR (Figur 3.13 og Figur 3.14). I en tidligere studie ble CV-1 celler transfektert med MMTV-luc og GR og eksponert for aldosteron. Det ble avlest luciferaseaktivitet ved aldosteronkonsentrasjoner over 10 nM slik som i vårt forsøksoppsett (Figur 3.14 og (Arriza *et al*, 1988)). Siden aldosteron egentlig er en MR agonist og binder GR med lav affinitet, er det forventet at aldosteron aktiverer GR ved høyere konsentrasjon enn deksametason.



---

## Deksametason- og aldosteronaktivering av luciferaseaktivitet via MR

MR har mange strukturelle og funksjonelle likheter med GR (se Figur 1.3). MR og GR kan interagere med de samme eller lignende DNA-sekvenser på grunn av aminosyrelikheter i DNA-bindende domene. I *in vitro* systemer kan MR regulere genekspresjon ved å binde til GRE promotoren i et reporter-gen. Rupprecht *et al.* har vist ved hjelp av transfeksjonssystemer at MR stimulerer lavere transkripsjonsaktivitet enn GR. GR kan ved å binde til promotorer som inneholder multiple GRE utøve en synergisk effekt på luciferaseaktivitet (mer enn additiv effekt). Dette gjelder ikke for MR, og det kan skyldes ulikheter i N-terminal regionen i GR og MR (Rupprecht *et al.*, 1993). I en studie ble CV-1 celler transfektert med MMTV-luc og GR eller MR. Det ble vist at MR mediert stimulering av MMTV-luc promotoren førte til 100 ganger økning i luciferaseaktivitet sammenlignet med basal nivå, men at denne aktiviteten tilsvarte kun 5 % av den maksimale responsen sett med GR. Denne forskjellen i responsen av MR og GR er også observert ved bruk av andre promotorer (Arriza *et al.*, 1988). I vårt forsøksoppsett hvor CV-1 celler ble transfektert med GRE-luc og GR, ble det kun sett omtrent 4 ganger økning i luciferaseaktivitet (Figur 3.14). Det at MR-aktiviteten vanligvis tilsvare 5 % av GR-aktiviteten vil det gjøre vanskeligere å lese av luciferaseaktivitet av MR i vårt forsøksoppsett (Figur 3.15).

Deksametason eller aldosteron påvirker heller ikke NFκB-luc via MR (Figur 3.16). MR mediert nedregulering er kun sett når transkripsjonen er aktivert av både transkripsjonsfaktoren p65 og Spl (Meijer *et al.*, 2000). Forklaringen kan være at transkripsjonsfaktoren Spl ikke er tilstede i CV-1 celler. Dermed vil ikke MR kunne nedregulere transkripsjonen, og vi får ingen endring i luciferaseaktivitet (Figur 3.16). Med de tilgjengelige reporter-genene ble det derfor ikke mulig å studere effekter av ligander på MR.

---

## Deksametasonaktivering av luciferaseaktivitet med NFκB-luc og GR

Deksametason i CV-1 celler gir endringer i luciferaseaktivitet produsert av NFκB-luc. Både 10 nM og 10 μM deksametason gir en signifikant reduksjon i luciferaseaktivitet (Figur 3.18). Dette tyder på at deksametasonbundet GR kan nedregulere transkripsjonen av NFκB-luc promotoren. GR kan både hemme p65- og p65/Spl-stimulert transkripsjon (Meijer *et al*, 2000). Vi antar at transkripsjonsfaktoren p65 er tilstede i CV-1 celler siden GR kan nedregulere NFκB-luc aktivitet med bare p65 tilstede.

### Antagonisters påvirkning på GR

Det er tidligere vist at NMDA reseptorantagonistene MK 801 og CGP 39551 og GR/MR antagonisten RU 28318 reduserer deksametasonindusert celledød i korncellekulturer (Aden *et al*, 2008; Jacobs *et al*, 2006b). Når antagonistene tilsettes CV-1 celler sammen med deksametason, gir dette ingen endring i deksametasons GR-induserte luciferaserespons (Figur 3.19a). Både tilsetting av aldosteron og bruk av NFκB-luc promotoren ga tilsvarende resultater (Figur 3.19b og Figur 3.21). Dette gjelder både for en fysiologisk og toksisk agonistkonsentrasjon. Dette viser at MK 801 og CGP 39551 ikke har en direkte virkning på GR når agonistene er tilstede. Grunnen til at disse stoffene reduserer deksametasonindusert celledød, skyldes derfor ikke at de interagerer direkte med GR. Dette styrker antagelsen om at NMDA reseptoren er involvert i deksametasonindusert nevrotoksisitet. Men derimot ved fravær av agonister kan MK 801, CGP 39551 og RU 28318 ha en tendens til å påvirke GRE-luc og NFκB-luc. Det gjelder særlig RU 28318. Forskjellen er ikke statistisk signifikant. Det at en antagonist oppfører seg som partiell agonist i fravær av agonister, er også sett med andre forbindelser som virker i steroidreseptorfamilien. RU 38486 (mifepriston) er en antiprogesteron og antiglukokortikoid, men i fravær av agonisten progesteron vil RU 38486 binde til progesteronreseptoren på samme måte som progesteron og påvirke deler av transkripsjonen på samme måte som progesteron. Når både RU 38486 og progesteron er tilstede samtidig, virker RU 38486 som en antagonist (Spitz *et al*, 1993). Dette kan være forklaringen på hvorfor RU 28318 aktiverer GR og gir luciferaseaktivitet. Det er ikke kjent hvorfor MK 801 og CGP 39551 eventuelt kan

øke luciferaseaktivitet. En tidligere hovedfagsoppgave viste ikke denne økningen (Wehus, 2007).

Kyllingkornceller ble transfektert med GRE-luc, men ikke GR eller NMDA reseptorsubenheterne siden disse cellene uttrykker reseptorene naturlig. MK 801 og CGP 39551 har tendens til å gi luciferaseaktivitet når deksametason ikke er tilstede (Figur 3.20). Forskjellen er ikke statistisk signifikant. En forklaring kan være at antagonistene beskytter mot basal celledød, og dermed øker antall celler som kan produsere luciferase enzymer. Men dette ville da gjelde for både ildfluoluciferase og renillaluciferase. Det at antagonistene syntes å aktivere GR, kan også skyldes en tilfeldig variasjon i resultatene og det er derfor ønskelig med flere paralleller for å se om denne tendensen vedvarer.

### **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 cytoplasma, ble det antatt at luciferasemålingene ville reduseres ved bruk av GRE-luc promotoren, og en nedsatt reduksjon eller en økning i luciferaseaktivitet ved bruk av NFκB-luc promotoren. GR befinner seg vanligvis i cytoplasma bundet til proteiner, blant annet hsp90, og reseptoren translokeres ikke til kjernen før ligand bindes (se avsnitt 1.3.3). Det ble antatt at hvis GR interagerer med en NMDA reseptorsubenheter i cytoplasma, ville dette hindre at GR beveget seg inn i kjernen og endret luciferaseproduksjon.

#### **GRE-luc**

For alle subenheterne som ble brukt, er det endringer i luciferasemålingene sammenlignet med celler transfektert med GR alene. CV-1 celler som ble transfektert med GRE-luc, GR og ulike NMDA reseptorsubenheter og eksponert for etanol viste tendens til høyere luciferaseaktivitet enn celler som var transfektert uten subenheterne (Figur 3.22a/e). Forskjellen er ikke statistisk signifikant og det kan skyldes stor variasjon i resultatet. Det er kjent at etanol eksponering *in vivo* hemmer den eksitatoriske aktiviteten til NMDA reseptoren (Allgaier, 2002), men det er ingen kjent sammenheng mellom GR, NMDA reseptor og etanol. Resultatene i vårt

---

forsøksoppsett kan være tegn til artefakter siden verdiene som vi fikk fra celler ko-transfektet med GR og subenheter ikke var konsekvente. Noen målinger gav store verdier i forhold til celler som kun ble transfektet med GR, mens andre målinger av celler som ble transfektet på samme måte, gav verdier som tilsvarte de fra celler som kun fikk GR. I de ukene hvor det ble målt høye etanol luciferasemålinger fra celler transfektet med GR alene, har vi valgt å droppe hele forsøksserien fra resultatet. Dette fenomenet er ikke sett ved bruk av NFκB-luc promotoren.

Siden etanolmålingene syntes å gi høy luciferaseaktivitet, har vi valgt å trekke etanolmålingene fra målingene gjort på celler som fikk tilsatt deksametason eller aldosteron (Figur 3.23 og Figur 3.24). Subenheter som gir liten differanse i luciferasemålinger, er sett på som liten økning eller reduksjon i luciferaseaktivitet og dette ble antatt som en mulig interaksjon mellom subenheten og GR. Det ser ut som at det er flere subenheter som interagerer med luciferaseaktiviteten. Dette gjelder NMDA reseptorsubenheter NR3A med 1 nM deksametason, NR1-1a og NR2A med 10 μM deksametason og alle subenheter med aldosteron. Siden bare noen av subenheterene gir nedgang i luciferaseaktivitet, er det lite sannsynlig at nedgangen skyldes uspesifikk nedgang i proteinproduksjon. NR3A transfektet sammen med GR reduserer ikke uttrykket til GR (Figur 3.2). På grunn av stor spredning i resultatet kan man ikke trekke en sikker konklusjon på hvilken subenhet som gir mest reduksjon i luciferaseaktivitet. En tidligere hovedfagoppgave viste en interaksjon mellom GR og NR3A-gfp og mellom GR og NR3B (Wehus, 2007). I den oppgaven ble det brukt samme promotor og samme transfeksjonsmetode. Ulikheter i resultatene kan skyldes at Wehus fikk mye høyere økning i luciferaseaktivitet sammenlignet med det som vi fikk ved bruk av lik deksametasonkonsentrasjon (10-12 ganger økning sammenlignet med 4 ganger økning). Siden en interaksjon mellom GR og subenheterene ses på som en reduksjon i luciferaseaktivitet, er det vanskeligere å oppdage en interaksjon i vårt forsøksoppsett.

### **NFκB-luc**

Verken 10 nM eller 10 μM deksametason reduserer luciferaseaktiviteten til NFκB-luc når CV-1 celler ko-transfekteres med GR og NR3A (Figur 3.25d og Figur 3.26). Dette kan tyde på at NR3A holder GR tilbake i cytoplasma, slik at den ikke går inn i

kjernen og reduserer aktivering av luciferasegenet. Dette tyder på at det er en direkte eller indirekte interaksjon mellom GR og NR3A.

Deksametason reduserer heller ikke luciferaseaktiviteten når cellene uttrykker NR3B sammen med GR (Figur 3.25e og Figur 3.26). NR3B har store strukturelle likheter med NR3A, med 62 % likhet i aminosyresekvens (Matsuda *et al*, 2002). Det er derfor ikke uventet at NR3B kan ha den samme interaksjonen som NR3A. Wehus viste også en interaksjon mellom GR og NR3B (Wehus, 2007). 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*, 2006b). NMDA reseptorer med NR2C og NR3A har lav sensitivitet for  $Mg^{2+}$  blokkering (Paoletti *et al*, 2007; Sasaki *et al*, 2002). Det er derfor forventet at en eller begge av disse subenhetene kunne være involvert i en interaksjon med GR. Resultatet fra Figur 3.25c tyder på en mindre reduksjon i luciferaseaktivitet for NR2C når skålene ble tilsatt 10 nM deksametason. Celler som ble ko-transfektet med GR og NR2C, gir også høyere luciferaseaktivitet når deksametason ikke er tilsatt. Dette skyldes antagelig ikke en interaksjon mellom NR2C og GR, men det kan skyldes at NR2C plasmidet kan gi lavere renillaluciferaseaktivitet (Figur 3.11 og Figur 3.12). Derfor vil ildfluelluciferase delt på renillaluciferase gi et høyere luciferaseverdi. Det er derfor antageligvis ikke NR2C som er ansvarlig for den deksametasoninduserte celledøden. Dette forsterker hypotesen om at NR3A subenheten kan være involvert i mekanismen bak deksametasonindusert celledød.

Deksametason er det glukokortikoidet som oftest har vært brukt til å forebygge og behandle bronkopulmonal dysplasi hos premature barn (Grier *et al*, 2005). Det er vist at postnatal deksametasonbehandling av premature barn kan føre til hemmet nevrologisk utvikling (Barrington, 2001). En interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren kan være en mulig forklaring på nevrologiske bivirkninger sett ved bruk av deksametason. De forskjellige NMDA reseptorsubenhetene uttrykkes i forskjellig grad i ulike stadier av utviklingen. I rotte- og musestudier er det vist at NR3A hovedsakelig uttrykkes i fosterstadiet og at uttrykket av dette proteinet er lavt hos voksne dyr (Sucher *et al*, 1995). Det er flere studier som beskriver

---

utviklingsreguleringen av subenhetene i dyremodeller enn humane hjerner. Studiene som er gjort på humane hjerner er ofte begrenset til mRNA funn og mengde uttrykt protein kan ikke alltid korreleres med mengde mRNA (Henson *et al*, 2008). Til tross for at det er funnet forskjeller i NR3A ekspresjon i humane hjerner sammenlignet med dyremodeller (se avsnitt 1.1.1) (Eriksson *et al*, 2007; Nilsson *et al*, 2007), er det fortsatt mulig at den aldersspesifikke deksametasonbivirkningene skyldes det aldersspesifikke NMDA reseptoruttrykket. Våre resultater tyder på en interaksjon mellom GR og NR3A subenheten. Dette støttes av at NR3A har lav sensitivitet for  $Mg^{2+}$  blokkering (Paoletti *et al*, 2007; Sasaki *et al*, 2002), og at deksametasonindusert celledød ikke lar seg blokkere av  $Mg^{2+}$  (Jacobs *et al*, 2006b).

En protein-protein interaksjon mellom GR og NR3A kan bekreftes eller avkreftes ved hjelp av andre metoder. En mulighet er å bruke ko-immunpresipitering. Prinsippet baseres på at ønsket kompleks "fanges" fra for eksempel et cellelysat ved å benytte et spesifikt antistoff. Antistoff-proteinkomplekset felles ut ved å bruke protein A eller protein G som er bundet kovalent til sepharose kuler. Proteiner i antistoff-proteinkomplekset kan deretter identifiseres ved Westernblotting (Berggard *et al*, 2007). Det ble utført pilotprosjekter på ko-immunpresipitering. CV-1 celler ble transfektert med GR, NR3A eller begge sammen. Protokollene som ble brukt, gav ingen resultater (resultatene er ikke vist) fordi Westernblottene viste uspesifikke bånd, og bånd ved riktig molekylvekt på negative kontroller (prøver som ikke ble transfektert med plasmider som uttrykker dette proteinet). Det viste seg at antistoffene som var egnet til Westernblotting (se avsnittet 4.2.1) ikke var egnet til ko-immunpresipitering, noe som antyder at antistoffene som ble brukt, ikke kunne identifisere det aktuelle proteinet som del av et proteinkompleks. For at ko-immunpresipitering skal fungere er det nødvendig å optimalisere metoden videre for proteinene i vårt system.

Alternativt kan Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) benyttes til å bekrefte en interaksjon. I FRET benyttes to fluorofore molekyler merket på hvert sitt protein der emisjonsspekteret til donormolekylet overlapper eksitasjonsspekteret for mottagermolekylet. Donor-fluoroforen blir eksitert av lys og når de to proteinene er nær nok hverandre (for eksempel ved en protein-protein interaksjon) vil energien fra eksiteringen overføres fra donor til mottagermolekylet. Dermed reduseres

---

intensiteten og varigheten av donor fluorescens, mens mottagerens emisjonsintensitet økes (Parsons *et al*, 2004).

### Transfeksjon med GRtr

GRtr er en GR hvor karboksylterminalen (ligandbindende domene (LBD)) er fjernet. Dette resulterer i en reseptor som kan aktivere transkripsjon uten at agonister er bundet (Figur 3.27 og (Keightley *et al*, 1995)). I tillegg til å binde ligander kan LBD kontrollere DNA-binding og transaktiveringsegenskaper til reseptoren. LBD er også stedet hvor heat shock proteinene bindes. Disse proteinene interagerer med LBD og DNA-bindende domene (DBD) samtidig og hindrer at reseptoren bindes til DNA. Når agonister bindes til reseptoren vil disse proteinene dissosiere fra reseptoren slik at reseptoren kan bindes til DNA (Danielsen *et al*, 1987). Forklaringen på at GRtr er konstitutiv aktiv, kan skyldes at heat shock proteinene ikke kan bindes ved fravær av LBD og dermed kan heller ikke heat shock proteinene hindre reseptorens binding til DNA. Det ser ut til at deksametason kan aktivere GRE-luc via GRtr selv om LBD mangler (Figur 3.29). Dette er også sett i andre studier hvor GR som ikke har LBD, kan binde deksametason og aktivere transkripsjon (Keightley *et al*, 1995). De har ikke oppgitt noen forklaring på denne effekten. Det motsatte fenomenet er sett med NFκB-luc promotoren. Det ser ut til at GRtr ikke kan nedregulere NFκB-luc promotoren. Dette gjelder både uten og med deksametason (Figur 3.30a-f). Dette tyder på at denne promotoren er avhengig av karboksylterminalen til GR for å påvirkes. Forklaringen kan være at glukokortikoider også kan regulere transkripsjon uten å binde direkte til DNA, men via direkte protein-protein interaksjoner med andre transkripsjonsfaktorer (for eksempel NFκB subenhet p65) og regulere deres transkripsjonelle aktivitet (Cato *et al*, 2002; McKay *et al*, 1998; Meijer *et al*, 2000; Tasker *et al*, 2006). Som nevnt før kan GR hemme både p65- og p65/Spl-stimulert transkripsjon (Meijer *et al*, 2000). Hemming av p65 trenger tilstedeværelse av multiple domener i GR. Dette inkluderer DBD, LBD, og også muligens små regioner i aminoterminalen. I fravær av LBD slik som for GRtr er ikke reseptoren i stand til å hemme NFκB subenhet p65 stimulert transkripsjon. Dette er til tross for at reseptoren er lokalisert til kjernen og har intakt DBD (McKay *et al*, 1998). Dermed kan ikke transfeksjon med NFκB-luc promotoren sammen med GRtr brukes til å undersøke interaksjonen mellom GR og NMDA reseptoren. Men resultatene viser at subenhetene ikke gir uspesifikke effekter på luciferaseaktivitet (Figur 3.30b-f).

---

Ved bruk av GRE-luc promotoren er det antatt at en interaksjon mellom GR og NMDA reseptoren i cytoplasma, vil føre til reduksjon i luciferaseaktivitet. GRtr ble brukt til å undersøke om det er karboksylterminalen i GR som interagerer med NMDA reseptoren. Dette er på bakgrunn av at mange proteiner for eksempel heat shock proteinene interagerer med GR i karboksylterminalen (Kumar *et al*, 2005). Tanken var at når karboksylterminalen er fjernet i GRtr, kan ikke NMDA reseptoren holde GR tilbake i cytoplasma og dermed ikke gi en reduksjon i den konstitutive luciferaseaktiviteten. CV-1 celler som ble ko-transfektet med GRtr sammen med NR3A gir ikke lenger nedgang i luciferaseaktivitet (Figur 3.28 og Figur 3.29), noe som kan tyde på at karboksylterminalen i GR er involvert i interaksjonen. CV-1 celler som er ko-transfektet med GRtr og NR2A gir en økning i luciferaseaktivitet, mens celler som er ko-transfektet med GRtr og NR2C, gir en nedgang i luciferaseaktivitet, og det samme gjelder også ko-transfeksjon med NR3B (Figur 3.28). Forklaringen kan være at ko-transfeksjon med NR2C og NR3B gir lavere transfeksjonseffektivitet (Figur 3.11) eller at dette er en annen type interaksjon. Dette kan eventuelt bekreftes med ko-immunpresipitering.



## 4.3 Konklusjon

- Både deksametason og aldosteron induserer celledød i kyllingkornceller.
- CV-1 celler uttrykker ikke GR eller NR3A naturlig.
- NR1-1a-yfp, NR2A-gfp og NR3A-gfp ser ut til å fordeles i CV-1 celler slik som andre celletyper.
- Et luciferase assay i CV-1 celler er egnet til å undersøke funksjoner av GR og interaksjoner mellom GR og NMDA reseptoren.
- Det er bekreftet at aldosteron aktiverer GR, men ved høyere konsentrasjon enn deksametason.
- Deksametason nedregulerer NFκB-luc promotoren via GR.
- Studien tyder på at det er en interaksjon mellom GR og NR3A.
- GRtr aktiverer GRE-luc konstitutivt og kan ytterligere aktiveres av deksametason.
- Studien tyder på at interaksjonen mellom GR og NR3A skjer i karboksylterminalen til GR.

---

## REFERANSER

Abraham IM, Harkany T, Horvath KM, Luiten PG (2001). "Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection?" *Journal of neuroendocrinology* **13**: 749-60

Aden P, Goverud I, Liestol K, Loberg EM, Paulsen RE, Maehlen J, Lomo J (2008). "Low-potency glucocorticoid hydrocortisone has similar neurotoxic effects as high-potency glucocorticoid dexamethasone on neurons in the immature chicken cerebellum" *Brain research* **1236**: 39-48

Allgaier C (2002). "Ethanol sensitivity of NMDA receptors" *Neurochemistry international* **41**: 377-82

Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM (1988). "The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response" *Neuron* **1**: 887-900

Awobuluyi M, Yang J, Ye Y, Chatterton JE, Godzik A, Lipton SA, Zhang D (2007). "Subunit-specific roles of glycine-binding domains in activation of NR1/NR3 N-methyl-D-aspartate receptors" *Molecular pharmacology* **71**: 112-22

Banerjee A, Periyasamy S, Wolf IM, Hinds TD, Jr., Yong W, Shou W, Sanchez ER (2008). "Control of glucocorticoid and progesterone receptor subcellular localization by the ligand-binding domain is mediated by distinct interactions with tetratricopeptide repeat proteins" *Biochemistry* **47**: 10471-80

Barrington KJ (2001). "The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs" *BMC pediatrics* **1**: 1

Beato M (1989). "Gene regulation by steroid hormones" *Cell* **56**: 335-44

Berggard T, Linse S, James P (2007). "Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions" *Proteomics* **7**: 2833-2842

Booth RE, Johnson JP, Stockand JD (2002). "Aldosterone" *Advances in physiology education* **26**: 8-20

Borski RJ (2000). "Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates" *Trends in endocrinology and metabolism* **11**: 427-36

Cato AC, Nestl A, Mink S (2002). "Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways" *Science's STKE* **2002**: RE9

Cavara NA, Hollmann M (2008). "Shuffling the deck anew: how NR3 tweaks NMDA receptor function" *Molecular neurobiology* **38**: 16-26

Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002). "Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits" *Nature* **415**: 793-8

Chen C, Okayama H (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA" *Molecular and cellular biology* **7**: 2745-52

Chen F, Watson CS, Gametchu B (1999). "Association of the glucocorticoid receptor alternatively-spliced transcript 1A with the presence of the high molecular weight membrane glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells" *Journal of Cellular Biochemistry* **74**: 430-46

Coirini H, Magarinos AM, De Nicola AF, Rainbow TC, McEwen BS (1985). "Further studies of brain aldosterone binding sites employing new mineralocorticoid and glucocorticoid receptor markers in vitro" *Brain research* **361**: 212-6

Contestabile A (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro" *Cerebellum* **1**: 41-55

Cotterell KL, Croucher MJ, Bradford HF (1992). "Weak anticonvulsant activity of CGP 37849 and CGP 39551 against kindled seizures following systemic administration" *European journal of pharmacology* **214**: 285-7

Crowther CA, Doyle LW, Haslam RR, Hiller JE, Harding JE, Robinson JS (2007). "Outcomes at 2 years of age after repeat doses of antenatal corticosteroids" *The New England journal of medicine* **357**: 1179-89

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease" *Current opinion in neurobiology* **11**: 327-35

Cull-Candy SG, Brickley SG, Misra C, Feldmeyer D, Momiyama A, Farrant M (1998). "NMDA receptor diversity in the cerebellum: identification of subunits contributing to functional receptors" *Neuropharmacology* **37**: 1369-80

Cummings DM, Larijani GE, Conner DP, Ferguson RK, Rocci ML, Jr. (1990). "Characterization of dexamethasone binding in normal and uremic human serum" *DICP* **24**: 229-31

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

Danielsen M, Northrop JP, Jonklaas J, Ringold GM (1987). "Domains of the glucocorticoid receptor involved in specific and nonspecific deoxyribonucleic acid binding, hormone activation, and transcriptional enhancement" *Molecular Endocrinology* **1**: 816-22

Dannhardt G, Kiefer W (2007). "Antiepileptics--action principles and structural parameters" *Pharmazie in unserer Zeit* **36**: 270-81

---

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998). "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease" *Endocrine reviews* **19**: 269-301

de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells" *Molecular and cellular biology* **7**: 725-37

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

Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F, Christensen G (2004). "Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes" *Molecular Biotechnology* **28**: 21-32

Duzgunes N, De Ilarduya CT, Simoes S, Zhdanov RI, Konopka K, Pedroso de Lima MC, Duzgunes N, De Ilarduya CT, Simoes S, Zhdanov RI, Konopka K, Pedroso de Lima MC (2003). "Cationic liposomes for gene delivery: novel cationic lipids and enhancement by proteins and peptides" *Current medicinal chemistry* **10**: 1213-20

Elmore S (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death" *Toxicologic pathology* **35**: 495-516

Eriksson M, Nilsson A, Samuelsson H, Samuelsson EB, Mo L, Akesson E, Benedikz E, Sundstrom E (2007). "On the role of NR3A in human NMDA receptors" *Physiology & Behavior* **92**: 54-9

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects" *Pharmacological Reviews* **52**: 513-56

Fan F, Wood KV, Fan F, Wood KV (2007). "Bioluminescent assays for high-throughput screening" *Assay & Drug Development Technologies* **5**: 127-36

Farstad T, Bratlid D (2007). "Bronkopulmonal dysplasi" *Tidsskrift for Den norske legeforening* **18**: 2374-7

Fink SL, Cookson BT (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells" *Infection and immunity* **73**: 1907-16

Fuller PJ, Lim-Tio SS, Brennan FE (2000). "Specificity in mineralocorticoid versus glucocorticoid action" *Kidney International* **57**: 1256-64

Funder JW (2005). "The nongenomic actions of aldosterone" *Endocrine reviews* **26**: 313-21

Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG (2008). "Immunoblotting and immunodetection" *Current protocols in immunology* **Chapter 8**: Unit 8 10

Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987). "The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture" *Journal of Neuroscience* **7**: 2203-13

Gametchu B, Watson CS (2002). "Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid-induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cells lines" *Journal of Cellular Biochemistry* **87**: 133-46

Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM (1986). "Functional domains of the human glucocorticoid receptor" *Cell* **46**: 645-52

Grentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, Gesteland RF, Atkins JF (1998). "A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals" *RNA* **4**: 479-86

Grier DG, Halliday HL (2005). "Management of bronchopulmonary dysplasia in infants: guidelines for corticosteroid use" *Drugs* **65**: 15-29

Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY (2001). "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications" *The Journal of biological chemistry* **276**: 29188-94

Haller J, Mikics E, Makara GB (2008). "The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings" *Frontiers in neuroendocrinology* **29**: 273-91

Haug E (2007). "Spyttprøver til kortisolmåling" *Tidsskrift for Den norske legeforening*: 718

Haynes LE, Griffiths MR, Hyde RE, Barber DJ, Mitchell IJ (2001). "Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders" *Neuroscience* **104**: 57-69

Henson MA, Roberts AC, Salimi K, Vadlamudi S, Hamer RM, Gilmore JH, Jarskog LF, Philpot BD (2008). "Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex" *Cerebral cortex* **18**: 2560-73

Ho CK, Strauss JF, 3rd, Ho CKM, Strauss JF, 3rd (2004). "Activation of the control reporter plasmids pRL-TK and pRL-SV40 by multiple GATA transcription factors can lead to aberrant normalization of transfection efficiency" *BMC Biotechnology* **4**: 10

Hopps HE, Bernheim BC, Nisalak A, Tjio JH, Smadel JE (1963). "Biologic characteristics of a continuous kidney cell line derived from the African Green Monkey" *Journal of immunology* **91**: 416-24

Ibrahim NM, Marinovic AC, Price SR, Young LG, Frohlich O (2000). "Pitfall of an internal control plasmid: response of Renilla luciferase (pRL-TK) plasmid to dihydrotestosterone and dexamethasone" *Biotechniques* **29**: 782-4

- 
- Ikonomidou C (2009). "Triggers of apoptosis in the immature brain" *Brain & development*: Article in Press
- Jacobs CM, Aden P, Mathisen GH, Khuong E, Gaarder M, Loberg EM, Lomo J, Maehlen J, Paulsen RE (2006a). "Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture" *Journal of Neuroscience Methods* **156**: 129-35
- Jacobs CM, Trinh MD, Rootwelt T, Lomo J, Paulsen RE (2006b). "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**: 116-23
- Jana S, Paliwal J (2007). "Apoptosis: potential therapeutic targets for new drug discovery" *Current medicinal chemistry* **14**: 2369-79
- Joels M (1997). "Steroid hormones and excitability in the mammalian brain" *Frontiers in neuroendocrinology* **18**: 2-48
- Joels M, de Kloet ER (1994). "Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems" *Progress in neurobiology* **43**: 1-36
- Johnson LR, Farb C, Morrison JH, McEwen BS, LeDoux JE (2005). "Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala" *Neuroscience* **136**: 289-99
- Kawata M (1995). "Roles of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system" *Neuroscience research* **24**: 1-46
- Keightley MC, Fuller PJ (1995). "Cortisol resistance and the guinea pig glucocorticoid receptor" *Steroids* **60**: 87-92
- Kemppainen RJ, Behrend EN (1997). "Adrenal physiology" *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* **27**: 173-86
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics" *British Journal of Cancer* **26**: 239-57
- Kim PJ, Cole MA, Kalman BA, Spencer RL (1998). "Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies" *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **67**: 213-22
- King SL, Hegadoren KM (2002). "Stress hormones: how do they measure up?" *Biol Res Nurs* **4**: 92-103
- Kloda A, Martinac B, Adams DJ (2007). "Polymodal regulation of NMDA receptor channels" *Channels* **1**: 334-43

Koutsilieri E, Riederer P (2007). "Excitotoxicity and new antiglutamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease" *Parkinsonism & related disorders* **13**: S329-31

Kumar R, Thompson EB (2005). "Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship" *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **94**: 383-94

Laudat MH, Cerdas S, Fournier C, Guiban D, Guilhaume B, Luton JP (1988). "Salivary cortisol measurement: a practical approach to assess pituitary-adrenal function" *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **66**: 343-8

Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM (2002). "Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus" *Bipolar disorders* **4**: 117-28

Levin ER (2008). "Rapid signaling by steroid receptors" *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **295**: R1425-30

Lipton SA (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" *NeuroRx* **1**: 101-10

Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007). "NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo" *The Journal of Neuroscience* **27**: 2846-57

Lorenz WW, McCann RO, Longiaru M, Cormier MJ (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**: 4438-42

Losel RM, Wehling M (2008). "Classic versus non-classic receptors for nongenomic mineralocorticoid responses: emerging evidence" *Frontiers in neuroendocrinology* **29**: 258-67

Lu J, Goula D, Sousa N, Almeida OF (2003). "Ionotropic and metabotropic glutamate receptor mediation of glucocorticoid-induced apoptosis in hippocampal cells and the neuroprotective role of synaptic N-methyl-D-aspartate receptors" *Neuroscience* **121**: 123-31

Løvås K, Husebye ES (2007). "Kortisol i spytt ved sykdom i binyrene" *Tidsskrift for Den norske legeförening* **127**: 730-2

Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002). "Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability" *Molecular brain research* **100**: 43-52

Mayer ML (2005). "Glutamate receptor ion channels" *Current opinion in neurobiology* **15**: 282-8

- 
- McIlhinney RA, Le Bourdelles B, Molnar E, Tricaud N, Streit P, Whiting PJ (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**: 1355-67
- McIntosh LJ, Sapolsky RM (1996). "Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture" *Experimental neurology* **141**: 201-6
- McKay LI, Cidlowski JA (1998). "Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism" *Molecular Endocrinology* **12**: 45-56
- Meijer OC, Williamson A, Dallman MF, Pearce D (2000). "Transcriptional repression of the 5-HT1A receptor promoter by corticosterone via mineralocorticoid receptors depends on the cellular context" *Journal of neuroendocrinology* **12**: 245-54
- Misteli T, Spector DL (1997). "Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology" *Nature Biotechnology* **15**: 961-4
- Mitchell IJ, Cooper AJ, Griffiths MR, Barber DJ (1998). "Phencyclidine and corticosteroids induce apoptosis of a subpopulation of striatal neurons: a neural substrate for psychosis?" *Neuroscience* **84**: 489-501
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors" *Neuron* **12**: 529-40
- Morita K, Ishimura K, Tsuruo Y, Wong DL (1999). "Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors" *Brain research* **816**: 309-16
- Mulholland PJ, Self RL, Hensley AK, Little HJ, Littleton JM, Prendergast MA (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**: 165-72
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A, Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002). "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications.[see comment]" *Nature Biotechnology* **20**: 87-90
- Nilsson A, Eriksson M, Muly EC, Akesson E, Samuelsson EB, Bogdanovic N, Benedikz E, Sundstrom E (2007). "Analysis of NR3A receptor subunits in human native NMDA receptors" *Brain research* **1186**: 102-12
- Olney JW (1969). "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate" *Science* **164**: 719-21



Ozawa H (2005). "Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system" *Journal of Nippon Medical School* **72**: 316-25

Packan DR, Sapolsky RM (1990). "Glucocorticoid endangerment of the hippocampus: tissue, steroid and receptor specificity" *Neuroendocrinology* **51**: 613-8

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

Parsons M, Vojnovic B, Ameer-Beg S (2004). "Imaging protein-protein interactions in cell motility using fluorescence resonance energy transfer (FRET)" *Biochemical Society transactions* **32**: 431-3

Paulsen RE, Ottersen, O.P. (2000). "Glutamat, apoptose og nekrose i nervesystemet" *Tidsskrift for Den norske legeforening* **120**: 63-64

Pavlik A, Buresova M (1984). "The neonatal cerebellum: the highest level of glucocorticoid receptors in the brain" *Brain research* **314**: 13-20

Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF (2001). "Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors" *The Journal of Neuroscience* **21**: 1228-37

Pippal JB, Fuller PJ (2008). "Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor" *Journal of molecular endocrinology* **41**: 405-13

Popp RL, Reneau JC, Dertien JS (2008). "Cerebellar granule cells cultured from adolescent rats express functional NMDA receptors: an in vitro model for studying the developing cerebellum" *Journal of neurochemistry* **106**: 900-11

Powell CE, Watson CS, Gametchu B (1999). "Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90" *Endocrine* **10**: 271-80

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992). "Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein" *Gene* **111**: 229-33

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL, Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?" *Experimental Cell Research* **283**: 1-16

Reagan LP, McEwen BS (1997). "Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus" *Journal of chemical neuroanatomy* **13**: 149-67

Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ (2004). "Mineralocorticoid receptor binding, structure and function" *Molecular and cellular endocrinology* **217**: 203-12

---

Rosenberg JC, Lysz K (1980). "Suppression of the immune response by steroids. Comparative potency of hydrocortisone, methylprednisolone, and dexamethasone" *Transplantation* **29**: 425-8

Rupprecht R, Arriza JL, Spengler D, Reul JM, Evans RM, Holsboer F, Damm K (1993). "Transactivation and synergistic properties of the mineralocorticoid receptor: relationship to the glucocorticoid receptor" *Molecular Endocrinology* **7**: 597-603

Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002). "Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons" *Journal of neurophysiology* **87**: 2052-63

Schulze-Bergkamen H, Krammer PH (2004). "Apoptosis in cancer--implications for therapy" *Seminars in oncology* **31**: 90-119

Shinwell ES, Karplus M, Reich D, Weintraub Z, Blazer S, Bader D, Yurman S, Dolfin T, Kogan A, Dollberg S, Arbel E, Goldberg M, Gur I, Naor N, Sirota L, Mogilner S, Zaritsky A, Barak M, Gottfried E (2000). "Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy" *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* **83**: F177-81

Spitz IM, Bardin CW (1993). "Mifepristone (RU 486)--a modulator of progestin and glucocorticoid action" *The New England journal of medicine* **329**: 404-12

Stahn C, Buttgereit F (2008). "Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids" *Nature clinical practice Rheumatology* **4**: 525-33

Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995). "Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain" *The Journal of Neuroscience* **15**: 6509-20

Sutanto W, de Kloet ER (1988). "ZK91587: a novel synthetic antimineralocorticoid displays high affinity for corticosterone (type I) receptors in the rat hippocampus" *Life sciences* **43**: 1537-43

Szapary D, Xu M, Simons SS, Jr. (1996). "Induction properties of a transiently transfected glucocorticoid-responsive gene vary with glucocorticoid receptor concentration" *The Journal of biological chemistry* **271**: 30576-82

Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, Hattori TA, Yasumatsu N, Kawato S (2002). "Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat hippocampal neurons" *Journal of neurochemistry* **83**: 1441-51

Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R, Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (2006). "Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors" *Endocrinology* **147**: 5549-56

Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM (1990). "Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus" *Developmental brain research* **53**: 157-67

Vaudry D, Falluel-Morel A, Leuillet S, Vaudry H, Gonzalez BJ, Vaudry D, Falluel-Morel A, Leuillet S, Vaudry H, Gonzalez BJ (2003). "Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways" *Science* **300**: 1532-4

Waxman EA, Lynch DR (2005). "N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease" *Neuroscientist* **11**: 37-49

Wehling M, Losel R (2006). "Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors?" *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **102**: 180-3

Wehus LE (2007) "Mulige interaksjoner mellom NMDA-reseptorsubenheter og glukokortikoidreseptoren" DUO

Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1997). "NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins" *Journal of neurochemistry* **68**: 469-78

Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J (1991). "Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast" *Science* **252**: 1296-300

Wollmuth LP, Sobolevsky AI, Wollmuth LP, Sobolevsky AI (2004). "Structure and gating of the glutamate receptor ion channel" *Trends in Neurosciences* **27**: 321-8

Yeh TF, Lin YJ, Lin HC, Huang CC, Hsieh WS, Lin CH, Tsai CH (2004). "Outcomes at school age after postnatal dexamethasone therapy for lung disease of prematurity" *The New England journal of medicine* **350**: 1304-13

Ylikomi T, Vienonen A, Ahola TM (2004). "G protein-coupled receptor 30 down-regulates cofactor expression and interferes with the transcriptional activity of glucocorticoid" *European journal of biochemistry* **271**: 4159-68

Yuste R (2005). "Fluorescence microscopy today" *Nature Methods* **2**: 902-4