

# Vekstfaktorers interaksjoner med caspaser i PC12-cellelinjen og kornceller fra rotte

Helle Lindland-Tjønn



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

27.november 2009

## FORORD

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo i periodene juni 2008-november 2008 og juni 2009-november 2009, som et ledd i graden Master i farmasi.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder professor Ragnhild E. Paulsen for faglig inspirerende, oppmuntrende og lærerik veiledning. Du har vært en uvurderlig støtte under arbeidet med oppgaven. Takk for alle gode råd og konstruktive tilbakemeldinger. Jeg vil også takke min medveileder Karen Boldingh Debernard for god hjelp og nyttige innspill under arbeidet.

I tillegg vil jeg takke Mona Gaarder, Gulzeb Aziz, Bjørn Oddvar Strøm, Gro Mathisen og Petra Aden for hjelp og opplæring, og for å bidra til å skape et hyggelig arbeidsmiljø.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for all støtte og tålmodighet. En spesiell takk går til ektemannen min Brynjulf for all hjelp, omsorg og motivasjon under studiet og lille Olav for å gjøre dette året helt uforglemmelig.

Oslo, november 2009

Helle Lindland-Tjønn

## SAMMENDRAG

Apoptose er en type celledød som er av fundamental betydning i flere fysiologiske prosesser, blant annet utvikling av nervesystemet. Ubalanse i reguleringen av apoptose er involvert i flere neurodegenerative sykdommer. Bedre kunnskap om mekanismene som fører til apoptose samt signaleringsveier som kan beskytte mot slik celledød, kan gjøre det mulig å utvikle legemidler som griper inn i de apoptotiske prosessene og hindrer celledød.

Caspaser er en gruppe proteaser som har en nøkkelfunksjon i apoptose. Aktiverte caspaser fører til celledød gjennom kløyving av cellulære substrater. Vekstfaktorer kan fremme celleoverlevelse gjennom MEK/ERK-signaleringsveien. I dette arbeidet har PC12-celler og kornceller fra rotte blitt brukt som modeller for å studere celledød og aktivering av caspase-3. I tillegg til å indusere apoptose gjennom serumdeprivasjon, har caspase-3-aktivatoren PAC-1 blitt brukt som et eksperimentelt verktøy for å studere caspase-3 sin rolle i celledød samt mulig "crosstalk" til andre apoptoseveier eller til MEK/ERK-veien.

PAC-1 induserte celledød i både PC12-celler og kornceller fra rotte. Caspase-3- og -8-inhibitorer reduserte PAC-1-indusert caspase-3-aktivering, men beskyttet ikke mot PAC-1-indusert død i PC12-celler. I kornceller var det en tendens til at caspase-3-inhibitor beskyttet mot PAC-1-indusert celledød. Caspase-3, -8- og -9-inhibitorer viste en tendens til å beskytte mot celledød induisert av serumdeprivasjon i PC12-celler. Vekstfaktorene EGF og NGF beskyttet mot celledød etter serumdeprivasjon, men ikke mot PAC-1-indusert caspase-3-aktivering og celledød i PC12-celler. Westernblotting viste at både PAC-1 og serumdeprivasjon førte til lavere nivåer av fosforylert ERK. Caspase-3-inhibitor beskyttet mot denne reduksjonen i kornceller, men ikke i PC12-celler.

Det kan konkluderes med at PAC-1 induserer caspaseavhengig død i kornceller fra rotte og caspaseuavhengig død i PC12-celler. Resultatene viser også at det skjer "crosstalk" mellom ulike caspaser og mellom caspaser og ERK ved celledød.

---

# Innhold

<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>3</b>
<b>INNHold</b> .....	<b>4</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>10</b>
1.1 CELLEDØD .....	10
1.1.1 Nekrose.....	11
1.1.2 Apoptose.....	11
1.1.3 Caspaser.....	12
1.1.4 Caspasene deles inn i tre grupper.....	12
1.1.5 Caspaser aktiveres gjennom kløyving .....	13
1.1.6 Caspase-8 aktiveres gjennom dødsreseptorer.....	14
1.1.7 Caspase-9 aktiveres ved hjelp av mitokondriene .....	15
1.1.8 Caspase-3 er ansvarlig for apoptotiske kjennetegn .....	17
1.2 MEK/ERK-SIGNALERINGSVEIEN .....	18
1.3 APOPTOSEINDUSERENDE STIMULI .....	21
1.3.1 Serumdeprivasjon.....	21
1.3.2 PAC-1.....	22
1.4 CELLEKULTURER TIL STUDIER AV CELLEDØD .....	23
1.4.1 Kornceller fra rotte .....	23
1.4.2 PC12-celler .....	23
1.5 MÅL MED OPPGAVEN.....	24
<b>2. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>25</b>

---

2.1	KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER.....	25
2.2	PC12-CELLER.....	27
2.2.1	<i>Splitting av PC12-celler.....</i>	27
2.3	KORNCCELLER FRA ROTTE.....	29
2.3.1	<i>Poly-L-lysin-behandling av kulturskåler.....</i>	29
2.3.2	<i>Preparering av korncellekulturer .....</i>	30
2.3.3	<i>Tilsetning av eræringsmedium med Ara-C.....</i>	34
2.4	DETEKSJON AV CELLEDØD .....	35
2.4.1	<i>Deteksjon av celledød i PC12-celler.....</i>	35
2.4.2	<i>Deteksjon av celledød i kornceller fra rotte.....</i>	37
2.4.3	<i>Farging med trypanblå .....</i>	37
2.5	KVANTIFISERING AV MITOKONDRIEAKTIVITET I PC12-CELLER .....	39
2.6	MÅLING AV CASPASE-3 I PC12-CELLER .....	41
2.7	WESTERNBLOTTING .....	43
2.7.1	<i>Westernblotting av proteiner fra PC12-celler.....</i>	43
2.7.2	<i>Westernblotting med protienner fra kornceller fra rotte.....</i>	45
2.7.3	<i>Høsting av celler til westernblotting .....</i>	46
2.7.4	<i>Proteinmåling .....</i>	47
2.7.5	<i>Prosedyre for westernblotting.....</i>	50
2.7.6	<i>Måling av westernbåndstyrke .....</i>	57
2.8	KVANTIFISERING AV UTLØPERE I PC12-CELLER .....	60
2.9	GRAFER OG STATISTIKK.....	62
<b>3.</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>63</b>
3.1	CELLEDØD I PC12-CELLER INDUSERT AV DEPRIVASJON ELLER PAC-1 .....	63

---

3.1.1	<i>Celledød induisert av serumdeprivasjon i PC12-celler.....</i>	63
3.1.2	<i>PAC-1-indusert celledød i PC12-celler .....</i>	66
3.2	CELLEDØD I PAC-1-EKSPONERTE KORNCCELLER FRA ROTTE.....	70
3.3	MTT-ANALYSE AV SERUMDEPRIVERTE PC12-CELLER.....	75
3.4	CASPASEAKTIVITET I PC12-CELLER EKSPONERT FOR PAC-1.....	79
3.5	WESTERNBLOTTING .....	82
3.5.1	<i>Westernblotting med proteiner fra serumdepriverte PC12-celler.....</i>	83
3.5.2	<i>P-ERK i PC12-celler ved serumdeprivasjon + EGF, NGF eller caspaseinhibitor....</i>	85
3.5.3	<i>Westernblotting med proteiner fra PC12-celler eksponert for PAC-1 .....</i>	88
3.5.4	<i>P-ERK i PC12-celler eksponert for PAC-1 + EGF, NGF og caspaseinhibitorer.....</i>	91
3.5.5	<i>Westernblotting med proteiner fra kornceller eksponert for PAC-1 .....</i>	93
3.6	KVANTIFISERING AV UTLØPERE I PAC-1-EKSPONERTE PC12-CELLER.....	97
3.6.1	<i>Andel PC12-celler med celleutløpere.....</i>	98
3.6.2	<i>Antall celleutløpere per PC12-celle.....</i>	100
3.6.3	<i>Lengden på celleutløpere i PC12-celler.....</i>	101
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>105</b>
4.1	DISKUSJON AV METODER.....	105
4.1.1	<i>Cellemodeller .....</i>	105
4.1.2	<i>Metoder for å måle celledød .....</i>	106
4.1.3	<i>Metoder for å studere proteiner involvert i celledød .....</i>	108
4.2	DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN.....	109
4.2.1	<i>PAC-1 induserer caspaseavhengig død i kornceller og caspaseuavhengig død i PC12-celler</i> <i>109</i>	
4.2.2	<i>Caspase-3-uavhengig tilbaketrekning av utløpere på PC12-celler .....</i>	112

---

4.2.3	<i>PAC-1 er ingen effektiv procaspase-3-aktivator i PC12-celler .....</i>	<i>115</i>
4.2.4	<i>Caspase-8- og -9-inhibitorer beskytter mot direkte caspase-3-aktivering.....</i>	<i>116</i>
4.2.5	<i>Serumdeprivasjon og PAC-1 reduserer nivået av P-ERK.....</i>	<i>118</i>
4.2.6	<i>EGF og NGF beskytter mot celledød i serumdepriverte PC12-celler.....</i>	<i>119</i>
4.3	KONKLUSJON.....	122
5.	<b>REFERANSER.....</b>	<b>123</b>

## **FORKORTELSER**

Ac-DEVD-amc	N-acetyl-aspartat-glutamat-valin-aspartat-7-amino-4-metylkumerin
Ad	Opp til
AIF	Apoptoseinduserende faktor
APAF-1	Apoptoseaktiverende faktor-1
ASP	Aspartat
Caspase	”Cystein-aspartate-spesific-proteases”
DISC	Dødsinduserende signalkompleks
DMEM	“Dulbecco`s modified eagle medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGF	“Epidermal growth factor”
EGTA	Etylenglykoltetraeddiksyre
ERK	“Extracellular signal-regulated kinase”
FADD	Fas-assosiert dødsdomene
FBS	Føtalt kalveserum
Grb2	Vekstfaktorreseptorbindende protein-2
mA	Milliampere
MEK	Mitogen-aktivert protein kinase/ERK-kinase
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium



---

MQ	Milli Q
NGF	“Nerve growth factor”
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PBS	Fosfat-bufret saltvann
R <sup>2</sup>	Multipel korrelasjonskoeffisient
RIPA	“Radioimmunoprecipitation assay”
SDS	Natrium dodecyl sulfat
SOS	”Son of sevenless”
TBE	Trisborat-EDTA-buffer
TBS	Tris bufret saltvann
TEMED	N,N,N',N'-tetrametylenediamin
TG	Tris-glysin buffer
TGS	Tris-glysin-SDS-buffer

# 1. INNLEDNING

Celledød er en livsnødvendig prosess, men kan også være involvert i en rekke sykdomstilstander. Programmert celledød (apoptose) (se avsnitt 1.1.2) kan føre til flere typer neurodegenerative sykdommer slik som Parkinsons sykdom og Alzheimers sykdom (Lorz and Mehmet 2009). Det er stor forskningsinteresse knyttet til kartlegging av de cellulære mekanismene bak apoptose (Xia, Dickens et al. 1995; Loo and Rillemaa 1998). Bedre kunnskap om prosessene bak slik celledød og beskyttende signaleringsveier involvert, kan gjøre det mulig å utvikle legemidler som griper inn i disse mekanismene og hindrer celledød.

## 1.1 CELLEDØD

Celledød er helt avgjørende for utviklingen til nesten alle organismer (Penalosa, Lin et al. 2006), og starter allerede når et embryo er åtte celler stort. Hver dag dør millioner av celler, som et ledd i homeostase, utvikling og aldring (Lockshin and Zakeri 2007). Tradisjonelt blir celledød delt inn i apoptose og nekrose. Mens apoptose regnes som velprogrammert celledød, blir gjerne nekrose beskrevet som en passiv prosess (Elmore 2007).

Nye studier tyder imidlertid på at det ikke er et klart skille mellom disse to typene celledød. Blant annet kan enkelte neurotoksiske komponenter i lave konsentrasjoner indusere apoptose, mens høye konsentrasjoner resulterer i nekrose. Det finnes også eksempler på at apoptose og nekrose skjer etter aktivering av de samme initielle celledødsmechanismene, og at reaksjonsmønsteret kan skifte fra apoptotisk død til nekrotisk død, eller omvendt, avhengig av tilgangen på ATP (Kim, He et al. 2003). Hvorvidt en celle dør av nekrose eller apoptose avhenger blant annet av typen celledødssignal, vevstype og det fysiologiske miljøet rundt cellen (Elmore 2007).

---

### 1.1.1 Nekrose

Nekrose beskrives gjerne som en tilfeldig, uspesifikk og uregulert form for celledød (De Saint-Hubert, Prinsen et al. 2009), som ikke krever energi. Nekrotisk celledød rammer oftest et større celleområde og kan enten induseres av direkte skade på cellemembranen eller av forhold som påvirker energitilgangen i cellen (Elmore 2007). Iskemi er et klassisk eksempel på et nekroseinduserende stimuli, men også varme, kulde, mekanisk kraft og membranpermeabiliserende toksiner kan føre til nekrose (Hotchkiss, Strasser et al. 2009).

Nekrotiske celler kjennetegnes blant annet av kromatinflokkulering og tap av membranintegritet, som fører til at  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  og vann trenger inn i cellen. Cellens cytoplasma vil da svulle og cellemembranen revne, slik at cytoplasma-innholdet kommer ut i det ekstracellulære rommet, og fører til inflammasjon (Harwood, Yaqoob et al. 2005).

### 1.1.2 Apoptose

Begrepet apoptose ble første gang brukt i 1972 for å beskrive en kontrollert type celledød med bestemte morfologiske kjennetegn (Kerr, Wyllie et al. 1972). Celler som dør ved apoptose får endret morfologi i form av redusert cellevolum, avrundet form, kjernefragmentering, kromatinkondensering, "blebbing" av plasmamembran og dannelse av membranbundne vesikler ("budding"). Apoptotiske celler har intakt plasmamembran frem til de siste stadiene av celledødsprosessen (MacFarlane 2009). Det er verdt å merke seg at apoptose i cellekulturer *in vitro* fører til en såkalt sekundær nekrose, i form av permeabilisering av plasmamembranen (Harwood, Yaqoob et al. 2005). Den apoptotiske prosessen avsluttes med at de membranbundne vesiklene fagocyteres av naboceller, for deretter å bli enzymatisk degradert (Kerr, Wyllie et al. 1972). Denne formen for celledød gjør det dermed mulig å fjerne uønskede og skadede celler uten å skape inflammasjon (Lorz and Mehmet 2009). I motsetning til nekrose, er apoptose en energikrevende prosess som krever ATP (Edinger and Thompson 2004).

Apoptose er viktig i flere fysiologiske prosesser. Denne formen for celledød er av fundamental betydning for utviklingen av nervesystemet (CNS) og er blant annet nødvendig for å kontrollere det endelige antallet neuroner og gliaceller. Samtidig som apoptose spiller

en viktig rolle for mange vitale funksjoner, kan en ubalanse i reguleringen av apoptose føre til sykdom. Mens overdreven celledød kan føre til neurodegenerative sykdommer, slik som Alzheimers sykdom og Parkinsons sykdom, kan mangel på apoptose føre til utvikling av tumorer (Lorz and Mehmet 2009). Det er nødvendig å definere de cellulære og molekylære mekanismene som medierer neuronal død for å kunne forstå mekanismene bak patologiske hendelser i sentralnervesystemet, og kunne utvikle behandling mot degenerative prosesser (Li, Oppenheim et al. 2000).

Apoptose kan induseres av mange ulike typer stimuli, slik som stråling, mangel på vekstfaktorer, kalsium-influks, DNA-skade og en rekke ulike virus og andre patogener (Gómez-Angelats and Cidlowski 2002). Reguleringen av apoptose er kompleks og involverer flere ulike signaleringsveier, molekylære interaksjoner og biokjemiske regulatorer. En type proteaser som kalles caspaser, ser ut til å ha en nøkkelfunksjon i den apoptotiske prosessen (Boccellino, Cuccovillo et al. 2003). Caspaseaktiviteten er årsaken til mange av de morfologiske endringene som kjennetegner apoptotiske celler (Edinger and Thompson 2004).

### **1.1.3 Caspaser**

Navnet caspase er en forkortelse av cystein-avhengig aspartat-spesifikk protease. Caspaser er en familie av intracellulære proteaser som både er involvert i apoptose, proliferasjon og inflammasjon. Ved aktivering vil caspasene kløyve nedstrøms substrater, og på den måten føre til en kaskade av hendelser som til slutt gir en biologisk respons (Pop and Salvesen 2009). Caspaser er blitt vist å være aktivert i både akutte og neurodegenerative prosesser, og har blitt fremmet som et mulig terapeutisk mål for å beskytte neuroner fra apoptotisk celledød (Nuttall, Lee et al. 2001).

### **1.1.4 Caspasene deles inn i tre grupper**

De ulike caspasene kan deles inn i to hovedgrupper, avhengig av om de er apoptotiske (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 og -10) eller pro-inflammatoriske (caspase-1, -4, -5, -11, -12, -

---

13). De apoptotiske caspasene kan videre kategoriseres som initiatorer (caspase-2, -8, -9 og -10) eller effektorer (3, -6 og -7) (Thornberry and Lazebnik 1998; Wang, Liu et al. 2005). Når initiatorcaspasene aktiveres, vil de aktivere nedstrøms effektorcaspaser, som igjen kløyver sine substrater, og fører til de cellulære, morfologiske og biokjemiske endringene som er karakteristisk for apoptose (Wang, Liu et al. 2005).

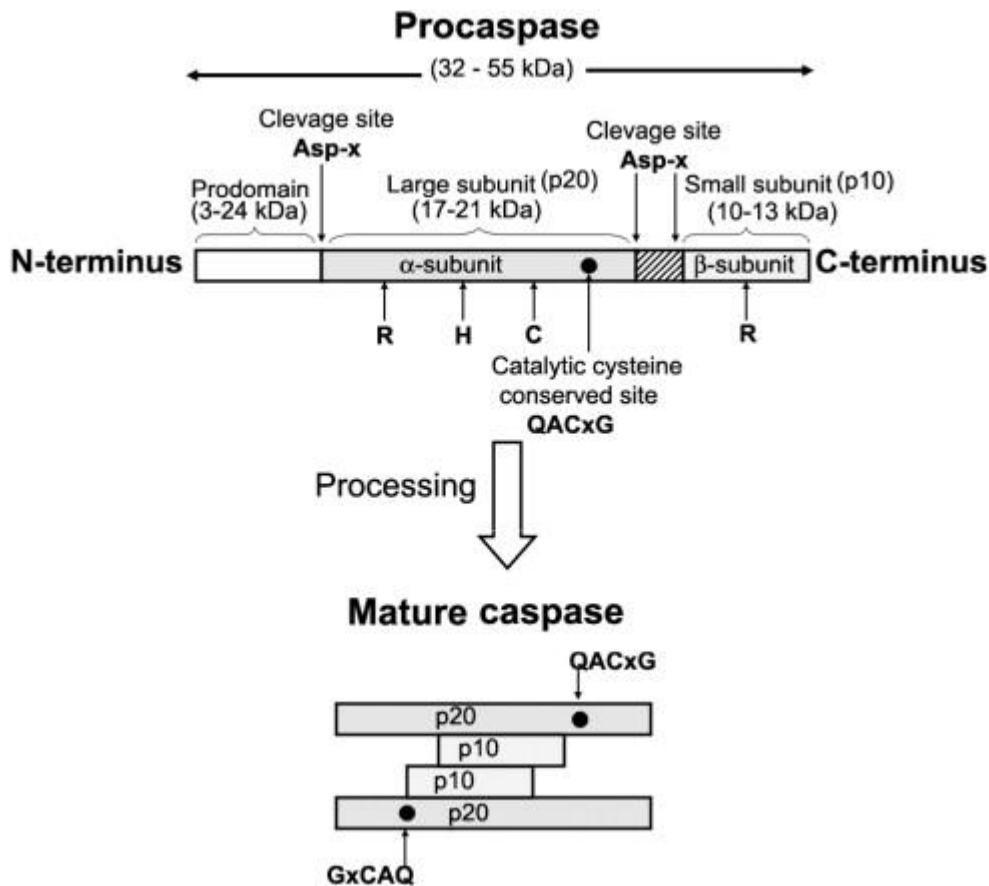
Det er verdt å merke seg at klassifiseringen av caspasene er en forenkling basert på deres hovedfunksjon og plassering i caspasekaskaden. Nyere studier har vist at de fleste apoptotiske caspaser også kan utøve effekter som ikke er assosiert med celledød. Tilsvarende tyder det på at noen av de pro-inflammatoriske caspasene kan føre til celledød som følge av massiv aktivering av inflammatoriske celler (Li, Yuan et al. 2008; Pop and Salvesen 2009).

### **1.1.5 Caspaser aktiveres gjennom kløyving**

De ulike caspasene har lignende struktur, aminosyresekvenser og substratspesifisitet. Caspasene syntetiseres som zymogener (proenzymmer) med lav aktivitet (Peterson, Hsu et al. 2009), som er konstitutivt uttrykt i de fleste, om ikke alle celler, inkludert neuroner (Chan and Mattson 1999).

Procaspasene består av en enkelt kjede (30-50 kDa) som er bygget opp av tre domener: Et NH<sub>2</sub>-terminalt prodomene, en stor subenhet (~ 20 kDa) og en liten subenhet (~ 10 kDa) (figur 1.1). Mens initiatorcaspasene har lange prodomener, har effektorcaspasene korte prodomener (Wang, Liu et al. 2005).

Effektorcaspasene foreligger som stabile homodimerer i cellene. Ved aktivering skjer det en proteolytisk kløyving mellom hver av procaspasens subenheter, slik at prodomenet fjernes og den store og lille subenheten separeres. De inaktive initiatorcaspasene er monomerer, og krever i tillegg dimerisering for å bli aktivert (Chowdhury, Tharakan et al. 2008; Milam and Clark 2009). Både kløyving og dimerisering er nødvendig for å danne det aktive setet som caspasesubstratet kan binde seg til (figur 1.1) (Hardy, Lam et al. 2004).

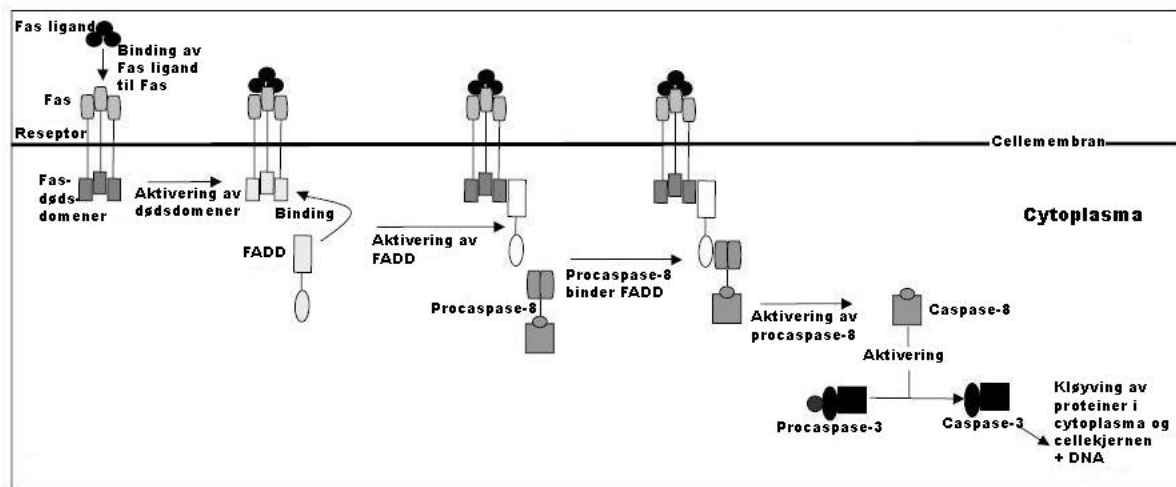


**Figur 1.1** Skjematisk fremstilling av caspasenes strukturelle kjennetegn.

Procaspasen krever proteolytisk kløyving for å bli aktivert. C, H og R representerer aminosyrer i det aktive setet. Figuren er hentet fra (Chowdhury, Tharakan et al. 2008).

### 1.1.6 Caspase-8 aktiveres gjennom dødsreseptorer

De apoptotiske caspasene kan føre til apoptose gjennom to signaleringsveier, henholdsvis den ytre ("extrinsic") eller den indre ("intrinsic") veien. Procaspase-8 virker gjennom den ytre apoptoseveien, som styres av dødsreseptorer i celledmembranen (figur 1.2). Disse reseptorene fungerer som sensorer som detekterer ekstracellulære faresignaler. Når reseptoren interagerer med en ligand, skjer det en oligomerisering av reseptoren, før den rekrutterer et adaptormolekyl og de sammen danner signaleringskomplekset DISC ("Death inducing signaling complex"). En av de best karakteriserte dødsreseptorene, Fas, rekrutterer adaptormolekylet FADD (Fas-assosiert dødsdomene). Procaspase-8 rekrutteres til DISC gjennom bindinger til FADD, noe som fører til oligomerisering av procaspase-8. Deretter skjer det en autokatalytisk aktivering av procaspase-8. Caspase-8 kan deretter kløyve og aktivere procaspase-3 (Li, Yuan et al. 2008).



**Figur 1.2 Aktivering av caspase-8 skjer via dødsreseptorer**

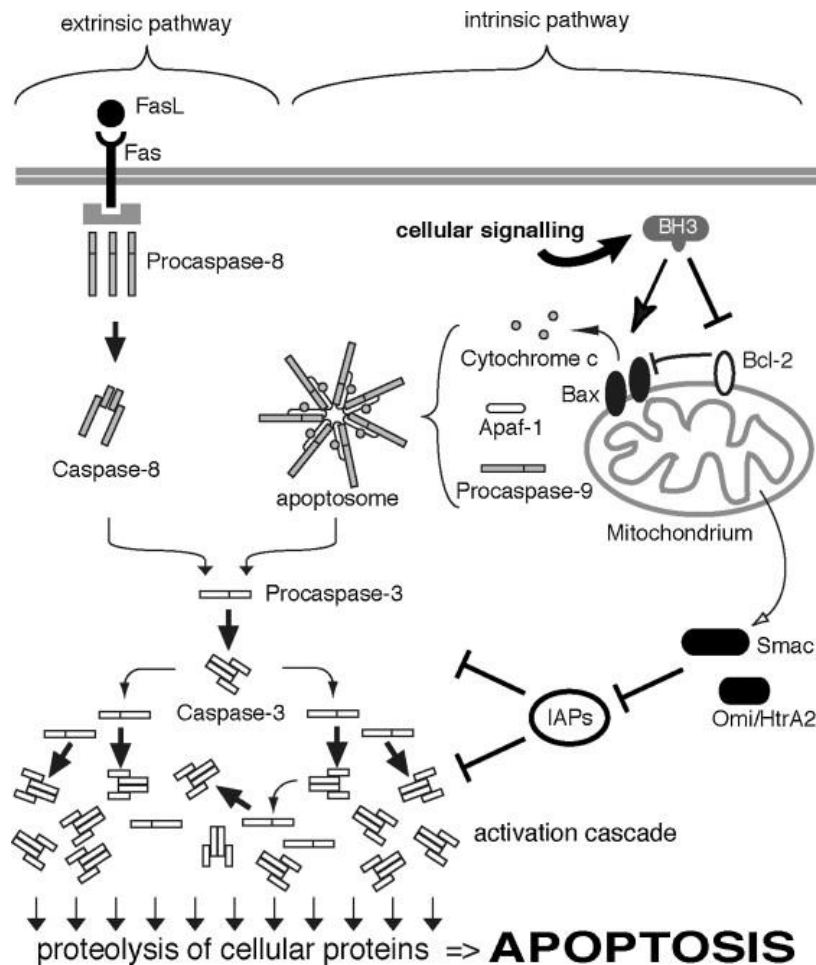
En ligand bindes til dødsreseptoren Fas, slik at dødsdomenet på reseptoren aktiveres og rekrutterer adaptormolekylet FADD. Procaspase-8 aktiveres gjennom binding til FADD, og kan videre aktivere effektorcaspase-3. Figuren er modifisert fra (Van Cruchten and Van Den Broeck 2002).

Det har også blitt vist at caspase-8 kan forsterke caspase-3-aktiveringen ved å virke på mitokondriene. Aktiv caspase-8 kløyver det proapoptotiske proteinet Bid til tBid, som translokaliseres til mitokondrien og fører til aktivering av den indre/mitokondrielle apoptoseveien (avsnitt 1.1.7) (Scaffidi, Fulda et al. 1998; Li, Yuan et al. 2008). Den fysiologiske betydningen av caspase-8 har blitt demonstrert gjennom studier med caspase-8<sup>-/-</sup>-mutante embryoer fra mus, hvor mangel på caspase-8 blant annet resulterte i unormal utvikling av hjertet (Varfolomeev, Schuchmann et al. 1998) og prenatal død (Li, Yuan et al. 2008).

### 1.1.7 Caspase-9 aktiveres ved hjelp av mitokondriene

Caspase-9 regnes som den viktigste initiatorcaspasen i den indre, mitokondrielle apoptoseveien (Chowdhury, Tharakan et al. 2008). Når cellen utsettes for cytotoxiske stoffer eller andre apoptotiske stimuli, kan proapoptotiske BH3-proteiner oppheve den antiapoptotiske effekten til Bcl-2, og føre til at det apoptoseinduserende proteinet Bax translokaliseres til mitokondrien. Disse hendelsene fører til at cytokrom c frigjøres fra

mitokondrien og ut i cytosol, hvor den sammen med Apaf-1, kofaktorene dATP/ATP og procaspase-9 danner et multiproteinkompleks som kalles apoptosom. Komplekset fungerer som en signaleringsplattform, hvor prodomenet på procaspase-9 interagerer med bestemte sekvenser på Apaf-1. Ved hjelp av konformasjonsendringer aktiveres procaspase-9 til caspase-9, som igjen kan aktivere procaspase-3 (figur 1.3) (Li, Yuan et al. 2008).



**Figur 1.3 Caspasekaskaden involverer caspase-8, -9 og -3.**

Caspase-3 kan aktiveres gjennom både den indre ("intrinsic") og ytre ("extrinsic") apoptoseveien. I førstnevnte aktiveres procaspase-8 av såkalte dødsrespetorer i celledmembranen. Aktiv caspase-8 kløyver procaspase-3 til aktiv caspase-3. Den indre apoptoseveien innebærer frigjøring av cytokrom c fra mitokondriene, som en respons på apoptotisk stimuli. Cytokrom c, Apf-1 og procaspase-9 danner multiproteinkomplekset apoptosom, hvor procaspase-9 blir aktivert. Caspase-9 aktiverer procaspase-3, som fører til apoptose gjennom kløyving av en rekke substrater. Smac og Omi/HtrA2 er to proapoptotiske proteiner som frisettes fra mitokondrien og inhiberer IAPs ("Inhibitors of Apoptosis"). Figuren er hentet fra (Jäger 2007).

Caspase-9 er av vesentlig betydning for apoptose i sentralnervesystemet. Hjernen til caspase-9-"knockout"-embryoer fra mus viser flere utviklingsavvik som følge av manglende



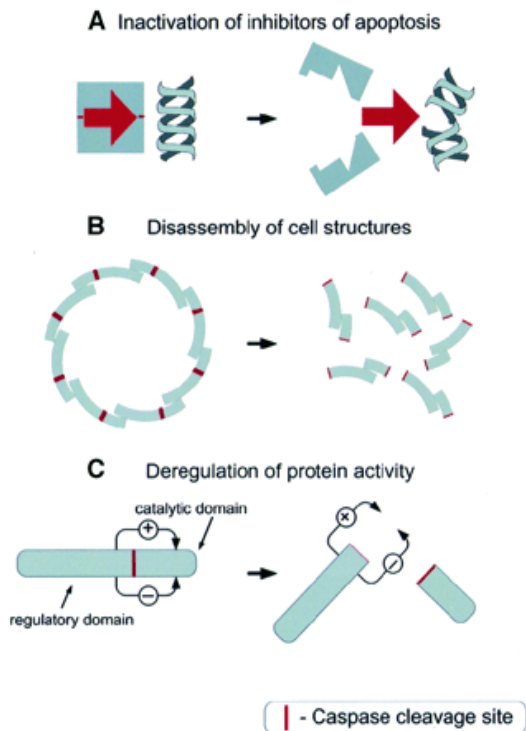
---

apoptose, blant annet hyperplasi. Musene dør før eller kort tid etter fødsel. Celler som ikke uttrykker caspase-9 er resistente mot apoptose induisert av cytotoksiske midler eller stråling (Kumar 2007).

### **1.1.8 Caspase-3 er ansvarlig for apoptotiske kjennetegn**

Effektorcaspase-3 kløyver mesteparten av de cellulære substratene som fører til apoptotiske celler. Denne caspasen regnes derfor som den viktigste av effektorcaspasene (Kumar 2007), og studier viser at caspase-3 er aktivert i de fleste apoptosemodeller (Nuttall, Lee et al. 2001). Caspase-3 kan aktiveres av både initiatorcaspasene-8 og -9 (figur 1.3) (Chowdhury, Tharakan et al. 2008). Det er også gjort funn som tyder på at aktivert caspase-3 kan virke tilbake på mitokondriene ved å svekke den mitokondrielle membranbarrieren, slik at den blir permeabel for blant annet cytokrom c. Disse observasjonene indikerer at det går en sirkulær, selvforsterkende sløyfe fra caspasene til mitokondrien (Marzo, Susin et al. 1998).

Kort fortalt dreper caspasene celler ved å inaktivere proteiner som hemmer apoptose, ødelegge cellestrukturen direkte og kløyve proteiner som er viktige for blant annet DNA-reparasjon (figur 1.4) (Thornberry and Lazebnik 1998). Mange av de naturlige caspase-3-substratene er proteiner som bidrar til å opprettholde eller reparere cellen (Nuttall, Lee et al. 2001), slik som poly(ADP-ribose)polymerase (PARP), lamin og fokal adhesjonskinase. Førstnevnte er en DNA-reparatør som inaktiveres når den kløyves av caspase-3. Degradering av lamin bidrar til fragmentering av cellekjernen, mens kløyving av fokal adhesjonskinase svekker cellens evne til å feste seg til matrix (Widmann, Gibson et al. 1998).



**Figur 1.4 Oversikt over hvordan caspasene dreper celler**

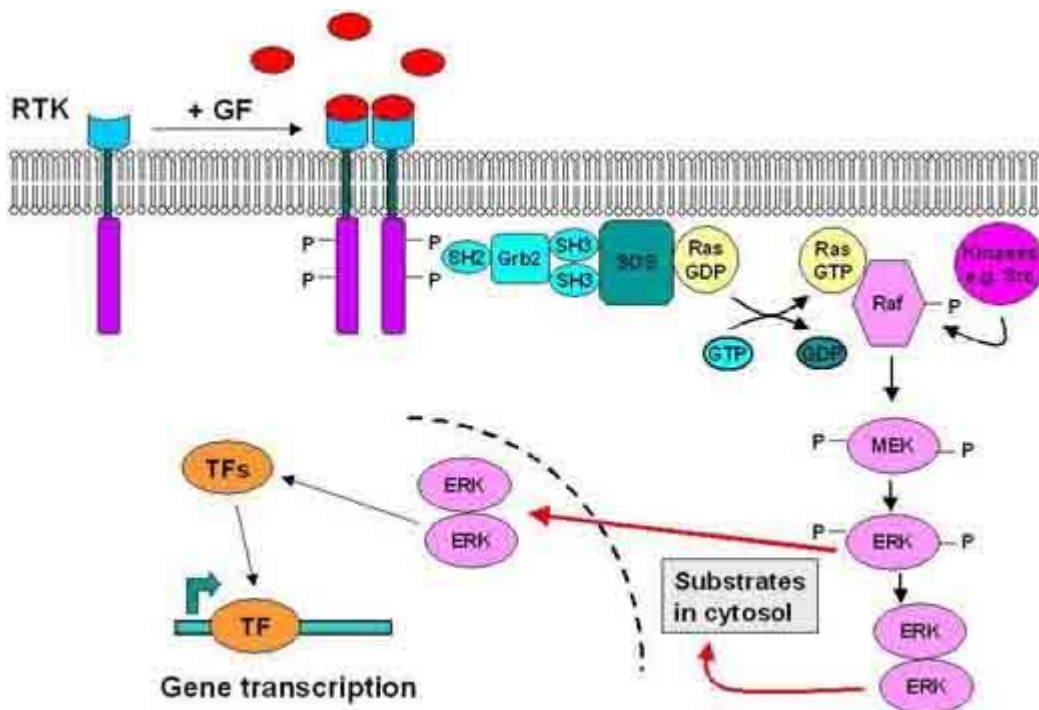
Caspasene kan inaktivere inhibitorer av proteiner som fremmer apoptose (A), ødelegge cellestrukturer, for eksempel ved å kløyve lamin (B) og deregulere proteiner ved å separere regulatoriske og katalytiske domener (C). Figuren er hentet fra (Thornberry and Lazebnik 1998).

Den fysiologiske betydningen av caspase-3-indusert apoptose har blitt bekreftet gjennom forsøk med genetisk modifiserte dyr. Mus som mangler caspase-3 har alvorlige defekter i sentralnervesystemet, kjennetegnet av ekstremt høye celletall, og dør innen fem uker (Chan and Mattson 1999; Porter and Jänicke 1999).

## 1.2 MEK/ERK-SIGNALERINGSVEIEN

I levende organismer er det en balanse mellom celledød og celleoverlevelse. Vekstfaktorer er noen av de viktigste ekstracellulære signalmolekylene som fremmer celleoverlevelse (Henson and Gibson 2006). Ras/Raf/MEK/ERK-kaskaden kobler signaler fra reseptorer på celleoverflaten til transkripsjonsfaktorer som regulerer genekspressjon (figur 1.5). Avhengig av stimuli og cellype, kan denne reaksjonsveien formidle signaler som hindrer eller induserer apoptose eller progresjon av cellyklus (Chang, Steelman et al. 2003). Generelt er aktiveringen av ERK assosiert med undertykking av apoptose (Martin, Allan et al. 2007).

Signaleringen starter med at en vekstfaktor eller annen ekstracellulær faktor binder seg til en tyrosinkinasereseptor. Det finnes flere ulike tyrosinkinasereseptorer, blant annet epidermal vekstfaktor-reseptor (EGFR). Aktivert Ras rekrutterer Raf til plasmamembranen og leder til aktivering av Raf. Aktivert Raf fosforylerer og aktiverer MEK1 og 2 (mitogen-aktivert protein kinase/ERK-kinaser), som igjen fosforylerer og aktiverer ERK1 og 2 (ekstracellulær-signal-regulerte kinaser 1 og 2) (figur 1.5). ERK representerer endepunktet i signalveien, og har mer enn 50 substrater. ERK1 og ERK2 ser ut til å ha lik funksjon (Leirdal and Sioud 2002; Meier, Schittek et al. 2005; McCubrey, Steelman et al. 2007).

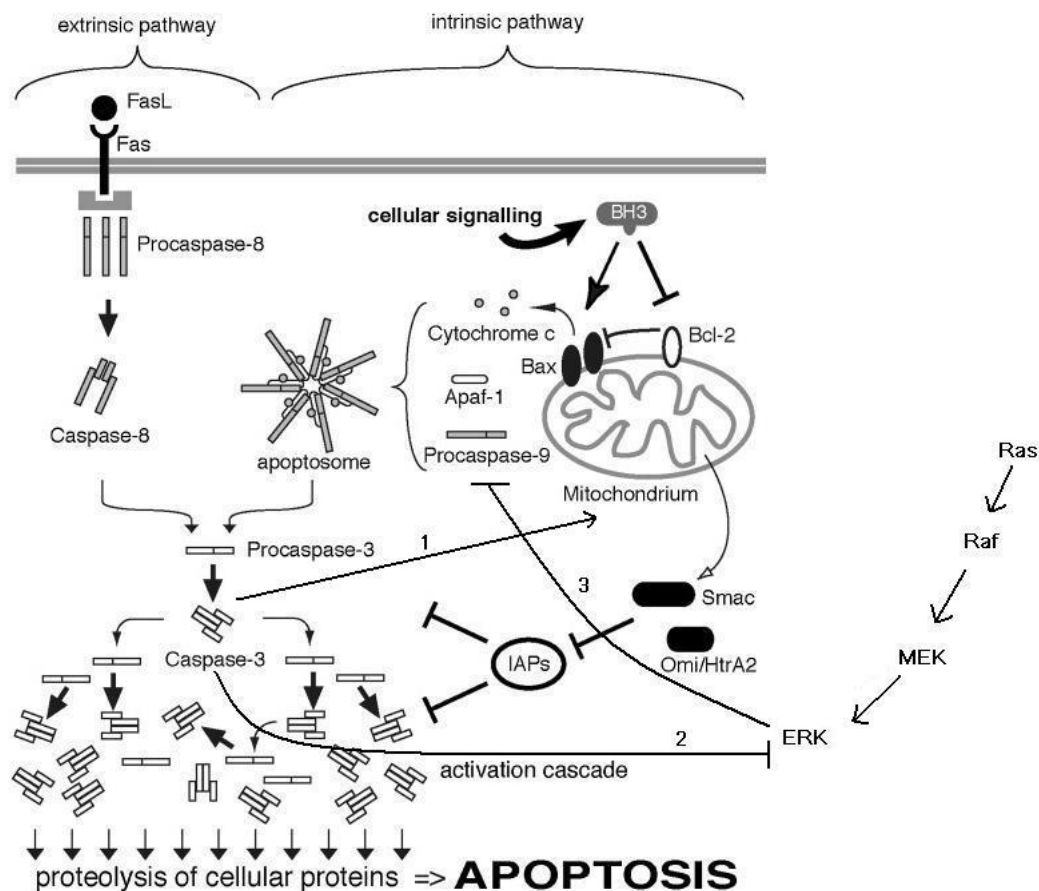


### Figur 1.5 Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien

En ekstracellulær faktor slik som en vekstfaktor (GF) intereagerer med sin respektive tyrosinkinasereseptor (RTK), og induserer reseptordimerisering og autofosforylering av tyrosin. Fosforylert tyrosin fungerer som ”docking-site” for vekstfaktorreseptorbindende protein-2 (Grb2), som fører til at GDT/GTP-utveklingsfaktoren SOS (”Son of sevenless”) forflyttes opp til cellemembranen. SOS binder seg til Ras, som aktiveres ved utbytting av GDP med GTP. Aktivert Ras rekrutterer Raf til plasmamembranen, og Raf aktiveres. Aktivert Raf fosforylerer og aktiverer MEK, som igjen fosforylerer og aktiverer ERK. Aktivert ERK har mange substrater i cytosol og kan i tillegg gå inn i cellekjernen for å regulere genekspressjon ved å fosforylere transkripsjonsfaktorer (TFs) (Leirdal and Sioud 2002; Meier, Schittek et al. 2005). Figuren er hentet fra Meier, Schittek et al 2005.

Epidermal vekstfaktor (EGF) har en nøkkelfunksjon innen fremming av celleoverlevelse, blant annet gjennom MEK/ERK-signalveien. Hvis EGF fjernes fra det ekstracellulære miljøet, blir cellene mer sensitive for apoptotiske stimuli (Henson and Gibson 2006). Nervevekstfaktor (NGF) kan indusere celleproliferasjon og differensiering gjennom MEK/ERK-signalveien (Vaudry, Stork et al. 2002). Forsøk har demonstrert at NGF fremmer overlevelse i PC12-celler etter ulike typer apoptotiske stimuli (Boniece and Wagner 1993; Luo, West et al. 1997), mens fjerning av NGF fører til nedsatt ERK-aktivitet og apoptose i differensierte PC12-celler (Xia, Dickens et al. 1995).

Flere studier indikerer at det skjer ”crosstalk” mellom MEK/ERK-signalveien og caspase-kaskaden. Det har blitt vist at ERK1/2 kan blokkere aktivering av procaspase-9 gjennom fosforylering, og dermed blokkere videre caspase-3-aktivering (Allan, Morrice et al. 2003). Videre finnes det indikasjoner på at caspase-3 direkte eller indirekte kan regulere ERK negativt. Oncosuppressoren p53 kan indusere caspase-3-mediert kløyving av ERK2 (Marchetti, Cecchinelli et al. 2004). I tillegg er det vist at scaffoldproteinet KSR1 (Kinasesuppresor av Ras 1), som er en positiv regulerer av Ras/ERK-signaliering, kløyves av caspase-3 i apoptotiske celler (McKay and Morrison 2007), slik at caspase-3 indirekte hemmer aktiviteten til ERK (figur 1.6).



**Figur 1.6 Crosstalk mellom MEK/ERK-signalveien og caspasene**

Studier tyder på at det skjer crosstalk innad i caspasekaskaden og mellom caspasene og MEK/ERK-signalveien. Aktivert caspase-3 virker tilbake på mitokondrien, slik at mer cytokrom c frigjøres (1). Caspase-3-mediert kløyving kan også direkte eller indirekte hemme aktiveringen av ERK (2). ERK kan fosforylere og dermed hindre aktiveringen av procaspase-9 (3). Figuren er modifisert fra (Jäger 2007).

## 1.3 APOPTOSEINDUSERENDE STIMULI

### 1.3.1 Serumdeprivasjon

Serumdeprivasjon er en velkjent metode for å indusere apoptose i PC12-celler (Greene 1978). Naive (udifferensierte) PC12-celler undergår apoptotisk død når trofiske faktorer (serum) fjernes, men kan reddes ved å tilsette trofiske faktorer, slik som NGF (Maroney, Finn et al. 1999). Serumdeprivasjon induserer celledød gjennom den indre ("intrinsic") apoptoseveien. Ved serumdeprivasjon utsettes cellen for en økning i ROS (Reaktive oksygen forbindelser), nivået av det antiapoptotiske proteinet Bcl-2 synker, og det proapoptotiske

proteinet Bax oppreguleres. Mitokondriens membranpotensial synker og fører til at cytokrom c frigjøres, etterfulgt av caspase-9- og caspase-3-aktivering (Charles, Khalyfa et al. 2005). Serumdeprivasjon kan også føre til aktivering av caspase-8 og videre aktivering av caspase-3 (Mogi, Ozeki et al. 2004).

### **1.3.2 PAC-1**

Modulering av aktiviteten til caspasene har blitt fremmet som en mulig terapeutisk strategi mot sykdommer knyttet til både overdreven apoptose (Nuttall, Lee et al. 2001) og kreft (Sun and Peng 2009). Det lille molekylet PAC-1 ble i 2006 presentert som en direkte aktivator av procaspase-3 in vitro. PAC-1 har vist å kunne indusere apoptose i mange ulike celletyper, både primærcekkulturer og kreftcellelinjer. I tillegg har forsøk med kreftcellelinjen HL-60 demonstrert at caspaseinhibitor (z-VADC-fmk) beskytter mot PAC-1-indusert apoptose (Putt, Chen et al. 2006).

Ut fra disse resultatene har PAC-1 blitt foreslått som en mulig kandidat til fremtidig kreftbehandling, ved å indusere apoptose i kreftceller (Putt, Chen et al. 2006). Denne caspase-3-aktivatoren kan også bli et nyttig eksperimentelt verktøy for å studere signaleringsveier og effekter knyttet til caspase-3-aktivering, inkludert ”crosstalk” til andre signaleringsveier slik som MEK/ERK-veien.

Den presise mekanismen for hvordan PAC-1 aktiverer procaspase-3 er ukjent (Peterson, Goode et al. 2009). Det er gjort funn som tyder på at PAC-1 kan interagere med en sikkerhetskappe som normalt hindrer autoaktivering av procaspase-3 (Putt, Chen et al. 2006). Nye studier viser at zink-ioner hemmer den enzymatiske aktiviteten til procaspase-3 og caspase-3 in vitro, og indikerer at PAC-1 aktiverer disse caspasene ved å binde opp zink (Peterson, Goode et al. 2009; Peterson, Hsu et al. 2009). Zink inngår også som en funksjonell komponent i mange andre enzymer, blant annet DNA-polymerase (Wu and Wu 1987). En tidligere hovedfagsoppgave har vist at PAC-1 aktiverer caspase-3 og induserer celledød i PC12-celler (Rimul 2007).

---

## 1.4 CELLEKULTURER TIL STUDIER AV CELLEDØD

### 1.4.1 Kornceller fra rotte

Kornceller fra cerebellum regnes for å være en av de mest pålitelige modellene for å studere neuronal utvikling, funksjon og patologi (Contestabile 2002), og har bidratt med viktig informasjon om grunnleggende mekanismer knyttet til celledød (Vaudry, Falluel-Morel et al. 2003). Mer enn 90 % av neuronene i lillehjernen er kornceller. Flere in vivo- og in vitro-studier har vist at caspase-aktivitet spiller en sentral rolle i naturlig og manipulert apoptose i denne celletypen (Contestabile 2002).

### 1.4.2 PC12-celler

PC12 er en kreftcellelinje avledet fra binyremargen til rotte (Greene and Tischler 1976), og kan brukes som et alternativ til neuronkultuer for å studere neuronal differensiering, funksjon og død. Når PC12-celler dyrkes i medium med serum, får de en rund til manglekantet form. Cellene proliferer og danner små, tette klynger som er løst festet til skålen. PC12-celler responderer reversibelt på behandling med NGF. Ved tilsetning av fysiologiske nivåer av NGF (50-100 ng/ml), danner PC12-cellene lange utløpere. Mange ulike biokjemiske og farmakologiske stoffer kan brukes for å indusere død i PC12-celler, blant annet serumdeprivasjon (Valavanis, Hu et al. 2001). PC12 står også på Putts liste IC<sub>50</sub>-verdier for PAC-1-indusert celledød i forhold til nivået av procaspase-3 (Putt, Chen et al. 2006). I likhet med sympatiske neuroner, kan PC12-celler syntetisere og lagre neurotransmitterne dopamin og noradrenalin. Disse egenskapene gjør PC12-celler godt egnet til bruk i nevrobiologiske og nevrokjemiske studier (Greene and Tischler 1976).

## 1.5 MÅL MED OPPGAVEN

Målene med oppgaven var følgende:

- Undersøke om PC12-celler og kornceller fra rotte er egnede modeller for å studere caspaseavhengig celledød induisert av serumdeprivasjon og PAC-1.
- Undersøke om MTT-analyse er en egnet metode for å måle celledød i serumdepriverte PC12-celler.
- Undersøke om Caspase-3, -8 og -9 er involvert i celledød induisert av serumdeprivasjon og PAC-1.
- Utføre innledende forsøk med westernblotting for å teste ut antisotffer mot ERK og caspaser.
- Undersøke om tilbaketrekning av celleutløpere på PC12-celler er caspase-3-avhengig.
- Undersøke om vekstfaktorene EGF og NGF kan beskytte mot celledød induisert av serumdeprivasjon, PAC-1-indusert caspase-3-aktivering og celledød samt tilbaketrekning av celleutløpere.



## 2. MATERIALER OG METODER

### 2.1 KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER

Produkt:	Produsent:
Ac-DEVD-amc	Bachem, Bubendorf, Sveits
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BamH1	BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA
BamH1-buffer	BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Basal Medium Eagle (BME)	Invitrogen, California, USA
BCA Protein Assay kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromfenolblått	Merck, Darmstadt, Tyskland
Caspase-3-antistoff	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Caspase-3 Rabbit pAb-antistoff	Calbiochem, San Diego, USA
Caspase-9-antistoff (rottespesifikk)	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Caspase-3-inhibitor III	Calbiochem, San Diego, USA
Caspase-8-inhibitor II	Calbiochem, San Diego, USA
Caspase-9-inhibitor III	Calbiochem, San Diego, USA
Cytosin $\beta$ -D-Arabino-Furanoside (Ara-C)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deoksyribonuklease I (DNaseI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Riedel-de Haën, Seelze, Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO), sterilfiltrert	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Di-natriumhydrogenfosfat-dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dulbecco`s modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, California, USA

ECL Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)	Amersham Biosciences, UK
Epidermal vekstfaktor (EGF)	Pepro Tech Inc., New Jersey, USA
ERK-2-antistoff	Santa Cruz Biotechnology, USA
Fenolrødt	Merck og Co, New Jersey, USA
Føtalt kalveserum (FBS)	Invitrogen, California, USA
Gentamycinsulfat	Sigma-ALdrich, St. Louis, USA
Glukose	Merck og Co, New Jersey, USA
Glyserol	BDH Prolabo, Poole, England
Hesteserum	Gibco BRL Life Technologies, Paislet, Skottland
Igepal	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck og Co, New Jersey, USA
Kaliumklorid (KCl)	Koch-Light laboratories, England
2-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Metanol	Merck & Co, New Jersey, USA
MTT	Calbiochem, San Diego, USA
Natrium deoxycholot	Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook Bucks, England
Natriumklorid (NaCl)	J. T. Baker, Deventer, Holland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Nerve Growth Factor (NGF)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PAC-1	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Penicillin-streptomycin	Invitrogen, California, USA
P-ERK Antibody	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Precision Plus Dual Color Protein Standard	Bio-Rad, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce Biotechnonology, Rockford, USA

Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Stabilized Goat Anti Rabbit HRP	Pierce Biotechnonology, Rockford, USA
Supersignal West Femto	Pierce Biotechnonology, Rockford, USA
Tris/Glycine Buffer (TG) 10 X	Bio-Rad, USA
Tris/Glycine/SDS Buffer (TGS) 10 X	Bio-Rad, USA
Trizma base (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trizma hydroklorid (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tubulin (B-7): sc-5286	Santa Cruz, California, USA
Tween 20	Calbiochem, San Diego, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge

## 2.2 PC12-CELLER

PC12 er en kreftcellelinje avledet fra binyremargen til rotte. Celletypen responderer reversibelt på NGF, både med hensyn til celledeling og celleutløpere. Ved NGF-eksponering vil PC12-cellene først dele seg og deretter danne celleutløpere lignende de som dannes av sympatiske neuroner i primærcellekulturer (Greene and Tischler 1976). I arbeidet som nå skal beskrives, ble det brukt udifferensierte PC12-celler.

### 2.2.1 Splitting av PC12-celler

PC12-cellene ble splittet med tre og fire dagers mellomrom, slik at de var konfluente ved splittetidspunktet. Cellene ble inkubert ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub>.

**Splitteprosedyre:**

1. Gammelt medium i cellekulturflasken helles av.
2. PC12-medium, 10 ml (tabell 2.1) tilsettes flasken. Cellene løsnes ved å banke på sidene av flasken. Cellene inspiseres ved hjelp av mikroskop for å kontrollere at de har løsnet fra bunnen.
3. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned ca. 10 ganger for å løse opp celleaggregater og for å få en jevn fordeling av cellene.
4. Cellene inspiseres ved hjelp av mikroskop for å kontrollere at celleaggregatene er løst opp. Ved behov pipetteres cellesuspensjonen opp og ned noen ganger med en pasteurpipette for å løse opp resten av celleaggregatene.
5. Ved splitting til flaske overføres 1,5 ml av cellesuspensjonen til en cellekulturflaske, som deretter tilsettes 20 ml PC12-medium (tabell 2.1).
6. Ved splitting til skåler bestemmes først celledettheten i cellekulturflasken. En liten prøve cellesuspensjon telles ved hjelp av Bürkers tellekammer og mikroskop.
7. Ønsket celledetthet i skålene er  $7 \times 10^4$  celler/ml. Nødvendig mengde cellesuspensjon fra flasken beregnes ved hjelp av formelen:

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

8. Det beregnede volumet cellesuspensjon fra flasken skal tilsettes nytt PC12-medium før splitting til skåler. Nødvendig volum PC12-medium beregnes ved hjelp av formelen:

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

9. Cellesuspensjon fra flasken og nytt PC12-medium blandes godt for å oppnå en jevn fordeling av celler, og overføres til sterile skåler.
10. Skålene inkuberes ved  $37^\circ \text{C}$  og  $5\% \text{CO}_2$ .

**Tabell 2.1 PC12-medium med serum**

Komponent	Mengde
DMEM	500 ml
Føtalt kalveserum	50 ml
Hesteserum	25 ml
Natriumpyruvat	5 ml
Penicillin-streptomycin	5 ml

## 2.3 KORNCCELLER FRA ROTTE

Primærkulturer av neuroner (kornceller) ble hentet fra lillehjernen til syv dager gamle hannrotter. Dyrene ble levert av Charles River Laboratories i Tyskland, og oppbevart på dyrestallen ved Nasjonalt folkehelseinstitutt, før de ble avlivet og brukt til preparering av cellekulturer.

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

For at korncellene skal feste seg bedre til cellekulturskålene, behandles kulturskålene med poly-L-lysin dagen før cellekulturene prepareres.

#### Prosedyre for poly-L-lysin-behandling:

1. Fra en flaske med 500 ml autoklavert MQ-vann overføres 10 ml til en flaske med 5 mg poly-L-lysin.
2. Løsningen blandes og tilbakeføres til flasken med MQ-vann.
3. Av dette tilsettes 1 ml løsning til små skåler (8,8 cm<sup>2</sup>), 2 ml til medium skåler (21,5 cm<sup>2</sup>) og 5 ml til store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>).
4. Etter 30-60 minutter suges poly-L-løsningen av, og skålene tørkes over natt i en LAF-benk.

### 2.3.2 Preparering av korncellekulturer

Syv dager gamle rotter avlives ved dekapitering. Rottehodene fraktes til en LAF-benk, hvor korncellekulturer prepareres under sterile betingelser (tabell 2.2).

#### Prosedyre for preparering av korncellekulturer:

1. Lillehjernene dissekeres ut av rottehodene ved hjelp av steril saks og pinsett, og overføres til en stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.3 og 2.4).
2. Hjernehinnene fjernes forsiktig ved hjelp av to pinsetter. Lillehjernene overføres til en ny stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.3 og 2.4).
3. Løsning 1 fjernes fra skålen, og lillehjernen kuttes i små biter. Det kuttes i to retninger vinkelrett på hverandre med skalpell.
4. 10 ml av løsning 1 (tabell 2.3 og 2.4) tilsettes skålen, og bitene overføres til et sterilt rør som inneholder 10 ml av løsning 1 (tabell 2.3 og 2.4).
5. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt, før supernatanten fjernes. Pelleten resuspenderes i 10 ml løsning 2 (tabell 2.4).
6. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske inneholdende 40 ml løsning 2 (tabell 2.4), og settes i vannbad ved 37 ° C i 15 minutter. Korkene på flasken løsnes halveis, og flasken ristes med jevne mellomrom.
7. Bitene fra trypsineringsflasken suges opp og overføres til et sterilt rør med 15 ml løsning 4 (tabell 2.4). Røret fylles opp til 50 ml med løsning 4 (tabell 2.4) og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter.
8. Spissen på en pasteurpipette avrundes ved å holde den over en gassflamme.
9. Supernatanten fjernes og pelleten tilsettes ca. 3 ml med løsning 3 (tabell 2.4)) ved hjelp av pasteurpipetten. Pelleten løses opp ved å pipettere opp og ned 15-20 ganger med pasteurpipetten. Når celleklumpene har sunket ned til bunnen av røret, overføres den øverste, klumpfrie delen av løsningen til et rør inneholdende løsning 5 (tabell 2.4).
10. Ved behov kan trinn 9 gjentas.
11. Cellesuspensjonen med løsning 5 (tabell 2.4) sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.
12. Supernatanten fjernes, og 10 ml platemedium (tabell 2.5) tilsettes.
13. Pelleten løses opp, og alt overføres til en glassflaske med platemedium. Det tas ut en liten prøve til celledelling i Bürkers tellekammer.

14. Cellesuspensjonen fortynnes med platemedium slik at den endelige celletettheten blir  $1,2 \times 10^6$  celler per ml medium. Antall ml platemedium (tabell 2.5) totalt beregnes ved hjelp av formelen:

$$X \text{ (ml)} = \frac{\text{antall ml cellesuspensjon} \times \text{celletetthet per ml i cellesuspensjonen}}{\text{Ønsket celletetthet per ml}}$$

15. Cellesuspensjonen overføres til poly-L-lysin-forbehandlede skåler. Små skåler (8,8 cm<sup>2</sup>) tilsettes 1 ml cellesuspensjon og 1 ml cellemedium, medium skåler (21,5 cm<sup>2</sup>) tilsettes 3,3 ml cellesuspensjon, og store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) tilsettes 10 ml cellesuspensjon.
16. Skålene inkuberes ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabell 2.2 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

2 petriskåler

50 ml glassrør

Pasteurpipette

Autoklaveres ved 120 ° C i 20 minutter

**Tabell 2.3 Krebs-Ringerløsning 10 X**

<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>
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
Kan lagres kjølig i 5-6 måneder.	



**Tabell 2.4 Løsninger 1-5**

<b>Løsninger</b>	<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>
Løsning 1	Bovint serum albumin (BSA)	0,75 g
	MgSO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	2 ml
	Krebs-Ringerløsning (Tabell 2.3)	25 ml
	Destillert vann	Ad 250 ml
Løsning 2	Trypsin	12,5 mg
	Løsning 1	50 ml
Løsning 3	MgSO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	0,25 ml
	Deoksyribonuklease I (DNase I)	3,125 ml
	Trypsininhibitor	13,0 ml
	Løsning 1	Ad 25 ml
Løsning 4	Løsning 3	8 ml
	Løsning 1	50 ml
Løsning 5	Mg SO <sub>4</sub> (3,82 g/100 ml destillert vann)	0,16 ml
	CaCl <sub>2</sub> (1,20 g/100 ml destillert vann)	0,16 ml
	Løsning 1	20 ml

**Tabell 2.5 Platemedium**

Komponenter	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
Gentamycinsulfat	50 mg
Glutamin	146 mg
KCl	825 mg*
Hesteserum (varmeinaktivert)	50 ml
Føtalt kalveserum (varmeinaktivert)	50 ml
* 5,4 mg er allerede til stede i mediet	
Oppbevares kjølig	

**Tabell 2.6 Ernæringsmedium**

Komponenter	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
Gentamycinsulfat	50 mg
Glutamin	146 mg
KCl	825 mg*
Hesteserum (varmeinaktivert)	50 ml
Føtalt kalveserum (varmeinaktivert)	25 ml
* 5,4 mg er allerede til stede i mediet	
Oppbevares kjølig	

### 2.3.3 Tilsetning av ernæringsmedium med Ara-C

For å hindre vekst av ikke-neuronale celler, tilsettes cellekulturene cystosin  $\beta$ -arabino-furanoside (Ara-C) 16-20 timer etter preparering av cellene.

---

1 mg Ara-C løses i 10 ml ernæringsmedium (tabell 2.6) og sterilfiltreres (0,2  $\mu\text{m}$ ). Det tilsettes 25  $\mu\text{l}$  per ml ernæringsmedium. Platemediet i cellekulturskålene erstattes med lik mengde ernæringsmedium med Ara-C.

## 2.4 DETEKSJON AV CELLEDØD

Celledød i både kornceller fra rotte og PC12-celler ble detektert ved hjelp av farging med trypanblå og påfølgende celledetelling i mikroskop. Trypanblå er et hydrofilt stoff som ikke kan passere intakte cellemembraner. Døde celler har tapt membranintegritet. Dermed vil fargeløsningen trenge inn i døde cellers cytoplasma og farge dem blå, mens celler med intakt membran vil forbli ufargede (Aras, Hartnett et al. 2008).

### 2.4.1 Deteksjon av celledød i PC12-celler

PC12-cellene ble splittet ut i små plastskåler (8,8  $\text{cm}^2$ ) med en celledetthet på  $7 \times 10^4$  celler/ml. Eksponeringen av cellene ble utført 24-48 timer etter splittingen.

#### **Prosedyre for eksponering og deteksjon av celledød i PC12-celler:**

1. Celler som skal serumdepriveres eller brukes som kontroll til deprivasjon, vaskes to ganger med 2 ml serumfritt medium (tabell 2.7).
2. Vaskemediet helles av, og 2 ml serumfritt medium/PC12-medium med eventuelle stoffer til eksponering (tabell 2.8) tilsettes.
3. PAC-1 og andre stoffer som skal tilsettes sammen med PAC-1 eller brukes i kontrollskålene (tabell 2.8), tilsettes direkte i mediet på celledålene.
4. Cellene inkuberes ved  $37^\circ\text{C}$  og 5 %  $\text{CO}_2$  i 24 timer, før celledød detekteres ved hjelp av farging med trypanblå (se avsnitt 2.4.3).

**Tabell 2.7 Serumfritt medium til serumdeprivasjon**

Komponent	Mengde
DMEM	500 ml
Natriumpyruvat	5 ml
Penicillin-streptomycin	5 ml

**Tabell 2.8 Oversikt over eksponeringer for deteksjon av celledød i PC12-celler og westernblotting med prøver fra PC12-celler**

Eksponeringsserie	Eksponeringer
Vasket kontroll til serumdeprivasjon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PC12-medium (tabell 2.1)</li> <li>• PC12-medium (tabell 2.1) + 5 ng/ml EGF</li> <li>• PC12-medium (tabell 2.1) + 50 ng/ml NGF</li> <li>• PC12-medium (tabell 2.1) + 1 <math>\mu</math>M Caspase 3-inhibitor</li> <li>• PC12-medium (tabell 2.1) + 10 <math>\mu</math>M Caspase 3-inhibitor</li> <li>• PC12-medium (tabell 2.1) + 20 <math>\mu</math>M Caspase 8-inhibitor</li> <li>• PC12-medium (tabell 2.1) + 20 <math>\mu</math>M Caspase 9-inhibitor</li> </ul>
Serumdeprivasjon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serumfritt medium (Tabell 2.7)</li> <li>• Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 5 ng/ml EGF</li> <li>• Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 50 ng/ml NGF</li> <li>• Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 1 <math>\mu</math>M Caspase 3-inhibitor</li> <li>• Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 10 <math>\mu</math>M Caspase 3-inhibitor</li> <li>• Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 20 <math>\mu</math>M Caspase 8-inhibitor</li> <li>• Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 20 <math>\mu</math>M Caspase 9-inhibitor</li> </ul>
Kontroll til PAC-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Celler oppbevart i LAF-benk mens de andre skålene behandles</li> <li>• DMSO (0,1 %) rett i mediet</li> <li>• 5 ng/ml EGF</li> <li>• 50 ng/ml NGF</li> <li>• 1 <math>\mu</math>M Caspase 3-inhibitor</li> <li>• 10 <math>\mu</math>M Caspase 3-inhibitor</li> <li>• 20 <math>\mu</math>M Caspase 8-inhibitor</li> <li>• 20 <math>\mu</math>M Caspase 9-inhibitor</li> </ul>
PAC-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 <math>\mu</math>M PAC-1</li> <li>• 100 <math>\mu</math>M PAC-1 + 5 ng/ml EGF</li> <li>• 100 <math>\mu</math>M PAC-1 + 50 ng/ml NGF</li> <li>• 100 <math>\mu</math>M PAC-1 + 1 <math>\mu</math>M Caspase 3-inhibitor</li> <li>• 100 <math>\mu</math>M PAC + 10 <math>\mu</math>M Caspase 3-inhibitor</li> <li>• 100 <math>\mu</math>M PAC + 20 <math>\mu</math>M Caspase 8-inhibitor</li> <li>• 100 <math>\mu</math>M PAC + 20 <math>\mu</math>M Caspase 9-inhibitor</li> </ul>

## 2.4.2 Deteksjon av celledød i kornceller fra rotte

Korncellene ble plattet ut i mellomstore skåler (21,5 cm<sup>2</sup>) og inkubert ved 37° C og 5 % CO<sub>2</sub> i syv eller åtte dager før de ble eksponert. Alle stoffene til eksponering (tabell 2.9) tilsettes direkte i mediet i cellekulturskålen.

### Prosedyre for eksponering og deteksjon av celledød i kornceller fra rotte:

1. Cellene tilsettes stoffer til eksponering (tabell 2.9). Caspase-3-inhibitor tilsettes 15 minutter (0 timer), 2 timer eller 4 timer etter PAC-1. I tidsrommet fra tilsetning av PAC-1 til tilsetning av caspase-3-inhibitor etter 2 og 4 timer inkuberes cellene ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub>.
2. Alle cellene inkuberes ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub> i totalt 24 timer, regnet fra tidspunkt for PAC-1-tilsetning, før de farges med trypanblå (se avsnitt 2.4.3 ).

**Tabell 2.9 Eksponeringer ved deteksjon av celledød i kornceller fra rotte**

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Celler oppbevart i LAF-benken mens de andre celleskålene behandles</li><li>• DMSO (0,25 ‰)</li><li>• 1 µM Caspase 3-inhibitor</li><li>• 25 µM PAC-1</li><li>• 25 µM PAC-1 + 1 µM caspase 3-inhibitor (tilsatt etter 0 timer)</li><li>• 25 µM PAC-1 + 1 µM caspase 3-inhibitor (tilsatt etter 2 timer)</li><li>• 25 µM PAC-1 + 1 µM caspase 3-inhibitor (tilsatt etter 4 timer)</li><li>• 50 µM PAC-1</li><li>• 50 µM PAC-1 + 1 µM caspase 3-inhibitor (tilsatt etter 0 timer)</li><li>• 50 µM PAC-1 + 1 µM capsase 3-inhibitor (tilsatt etter 2 timer)</li><li>• 50 µM PAC-1 + 1 µM capsase 3-inhibitor (tilsatt etter 4 timer)</li></ul> |
|---|

## 2.4.3 Farging med trypanblå

Ved deteksjon av celledød i henholdsvis kornceller og PC12-celler, ble farging med trypanblå og påfølgende celledeling i mikroskop utført på samme måte.

**Prosedyre for farging med trypanblå:**

1. PC12-celler som var inkubert i 24-48 timer etter splitting (se avsnitt 2.4.1) eller kornceller dyrket i 7-8 dager etter preparering (se avsnitt 2.4.2), eksponeres i 24 timer før farging med trypanblå.
2. Cellemediet på skålen pipetteres av til det er 1 ml igjen.
3. Hver skål tilsettes 250 µl trypanblå-løsning (tabell 2.10).
4. Cellene inkuberes ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub> i 30 minutter.
5. Fargeløsningen i skålen pipetteres av.
6. Antall blå (døde) og ufargede (levende) celler i minst fire områder av skålen telles i mikroskop, og prosentandel døde celler beregnes.

**Tabell 2.10 Løsninger til cellefarging med trypanblå****Trypanblå-stockløsning 2 %**

Trypanblå	1 g
Destillert vann	50 ml

Komponentene blandes og varmes opp til kokepunktet under avtrekk. Løsningen settes til avkjøling i romtemperatur før den filtreres. Oppbevares i romtemperatur.

**NaCl-stockløsning 1,8 %**

NaCl	1,8 g
Destillert vann	100 ml

Oppbevares i romtemperatur.

Trypanblå-løsning til farging av celler lages ved å blande trypanblå-stockløsning og NaCl-stockløsning i forholdet 1:1 rett før bruk.

---

## 2.5 KVANTIFISERING AV MITOKONDRIEAKTIVITET I PC12-CELLER

Mitokondrieaktiviteten i PC12-celler ble kvantifisert ved hjelp av en 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromid (MTT)-analyse. Dette er en kolorimetrisk metode for å måle celleoverlevelse, som blir mye brukt som et alternativ til celledelling (Aras, Hartnett et al. 2008). Metoden baserer seg på reduksjon av tetrazoliumringen i MTT ved hjelp av enzymet succinat dehydrogenase i cellenes mitokondrier (Slater, Sawyer et al. 1963). Reduksjon av MTT gir et lilla formazan-produkt som kan kvantifiseres, og dermed gi et mål på mitokondrieaktiviteten (Mosmann 1983).

PC12-celler til MTT-analyse ble splittet ut i blanke 96 brønners brett (se avsnitt 2.2.1). Cellene ble forsøksvis inkubert i 24 timer og 48 timer etter splitting, og eksponert i enten 4 timer, 24 timer eller 48 timer før mitokondrieaktiviteten ble undersøkt.

### **Prosedyre for eksponering av celler:**

1. Brønnene i en av radene i 96-brønnersbrettet spares som ubehandlet kontroll.
2. De øvrige brønnene vaskes to ganger med 200 µl serumfritt medium (tabell 2.7).  
Under vaskingen fjernes og erstattes mediet i en rad av gangen for å unngå at cellene tørker.
3. Hver brønn tilsettes 100 µl PC12-medium/serumfritt medium med eventuelle stoffer til eksponering (tabell 2.11), og brettet med celler inkuberes ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub> i 4 timer, 24 timer eller 48 timer.

**Tabell 2.11 Oversikt over eksponeringer til bruk ved MTT-analyse av PC12-celler**

- PC12-medium (tabell 2.1)
- PC12-medium (tabell 2.1) + 5 ng/ml EGF
- PC12-medium (tabell 2.1) + 50 ng/ml NGF
- PC12-medium (tabell 2.1) + 1  $\mu$ M Caspase 3-inhibitor
- PC12-medium (tabell 2.1) + 10  $\mu$ M Caspase 3-inhibitor
- Serumfritt medium (Tabell 2.7)
- Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 5 ng/ml EGF
- Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 50 ng/ml NGF
- Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 1  $\mu$ M Caspase 3-inhibitor
- Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 10  $\mu$ M Caspase 3-inhibitor
- Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 20  $\mu$ M Caspase 8-inhibitor
- Serumfritt medium (Tabell 2.7) + 20  $\mu$ M Caspase 9-inhibitor

**Prosedyre for MTT-analyse i PC12-celler:**

1. Når det gjenstår 4 timer av eksponeringstiden, tilsettes hver brønn 10  $\mu$ l MTT-løsning (tabell 2.12 og 2.13), med unntak av de 3 siste brønnene per rad, som skal brukes som mål på bakgrunnsabsorbansen.
2. Cellene inkuberes videre i 4 timer ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub>.
3. Alt medium fjernes fra brønnene.
4. Hver av brønnene tilsettes 100  $\mu$ l DMSO, og inkuberes i 30 minutter ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub>.
5. Absorbansen måles ved 570 nm i plateleser.

**Tabell 2.12 MTT-løsning**

5 mg MTT per ml PBS (Tabell 2.13)

Mengde MTT-løsning som lages avpasses i forhold til antall brønner som skal eksponeres.

Komponentene blandes sammen, og løsningen filtreres.



**Tabell 2.13 PBS**

Komponent	Mengde
NaCl	32 g
KCl	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,08 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,12 g
Destillert vann	Ad 4000 ml
pH justeres til 7,4 med HCl.	
Autoklaveres.	

## 2.6 MÅLING AV CASPASE-3 I PC12-CELLER

PC12-celler ble splittet ut i hvite 96-brønnersplater med en celletetthet på  $4 \times (7 \times 10^4)$  celler/ml) (se avsnitt 2.2.1). To av radene ble spart for å kunne brukes som kontroll på fluorescens i brønner uten celler. I tillegg ble en rad med ubehandlede celler tilsatt RIPA-buffer, men ikke caspase-3-substrat, brukt som kontroll. Bakgrunnen ble målt ved at to brønner for hver type eksponering ble tilsatt caspase-3-inhibitor.

**Tabell 2.14 Eksponeringer ved måling av caspase-3-aktivitet i PC12-celler**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMSO (0,1 %)</li> <li>• 100 µM PAC-1</li> <li>• 100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF</li> <li>• 100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF</li> <li>• 100 µM PAC-1 + 1 µM Caspase 3-inhibitor</li> <li>• 100 µM PAC-1 + 20 µM Caspase 8-inhibitor</li> <li>• 100 µM PAC-1 + 20 µM Caspase 9-inhibitor</li> </ul>
--

### Prosedyre for måling av caspase-3:

1. Stoffer til eksponering (tabell 2.14) tilsettes cellebrønnene.
2. Cellene settes til inkubering 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub> i 2 timer.

3. Etter eksponering fjernes 50 µl av mediet i hver brønn.
4. De fire første brønnene i 96-brønnersbrettet tilsettes 100 µl RIPA-buffer (2X) (tabell 2.15 og tabell 2.16) tilsatt caspase-3-substratet ac-DEVD-amc (20 µM).
5. De to neste brønnene tilsettes 100 µl RIPA-buffer (2X) (tabell 2.15 og tabell 2.16) tilsatt ac-DEVD-amc (20 µM) + caspase-3-inhibitor (1 µM).
6. Brettet med celler inkuberes ved 37 ° C, og fluorescens avleses i plateleseren ved 360/465 nm etter 30 minutter, 4 timer og 24 timer.
7. Fluorescensmålingene i brønnene tilsatt både caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor brukes som bakgrunn, og trekkes fra gjennomsnittsmålingene til de respektive radene.

**Tabell 2.15 RIPA-buffer (2X)**

Komponent	Mengde i 100 ml buffer
Tris HCl 1 M pH 7,4	10 ml
Igepal 100 %	2 ml
Natrium deoxycholat	0,5 g
EGTA 1mM	2 ml
NaCl-løsning 5M (Tabell 2.16)	6 ml
MQ-vann	Ad 100 ml

**Tabell 2.16 NaCl-løsning (5 M)**

NaCl	146,1 g
MQ-vann	400 ml
Volumet justeres til 500 ml i en målekolbe.	
Autoklaveres.	

---

## 2.7 WESTERNBLOTTING

Westernblotting (immunoblotting) kan brukes for å detektere, identifisere og kvantifisere proteiner (Tovey, Ford et al. 1987). Dette skjer ved hjelp av antistoffer som gjenkjenner spesifikke antigener i en celleprøve. Metoden består av flere trinn. Først separeres proteinene etter molekylvekt ved hjelp av elektroforese gjennom en gel. Deretter overføres proteinene til en nitrocellulosemembran. Uspesifikke bindingssteder blokkeres med tørrmelk, før et primærantistoff tilsettes for å detektere det spesifikke antigenet. Primærantistoff-antigen-komplekset gjenkjennes av et sekundærantistoff, som er merket med for eksempel horseradish peroxidase (HRP). Til slutt legges membranen i en løsning med HRP-substrat. Ved fremkalling av membranen vil omdanning av substratet gi et signal som detekteres av kamera. (Gallagher, Winston et al. 2008).

Før prøver fra eksponerte PC12-celler og kornceller kunne bli brukt i westernblotting, ble cellene høstet og proteininnholdet i de ulike celleprøvene målt og justert.

### 2.7.1 Westernblotting av proteiner fra PC12-celler

PC12-celler ble splittet ut på store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) og inkubert ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub> i 48 timer før de ble eksponert.

#### **Prosedyre for eksponering av PC12-celler til westernblotting:**

1. Cellene som skal deprivieres eller brukes som kontroll til deprivasjon, vaskes to ganger med 2 ml serumfritt medium (tabell 2.7) Deretter tilsettes 4 ml PC12-medium/serumfritt medium med eventuelle stoffer til eksponering (tabell 2.8, tabell 2.17 og tabell 2.18).
2. Cellene som skal eksponeres for PAC-1 eller brukes som kontroll til PAC-1-eksponeringene, blir tilsatt stoffer til eksponering (tabell 2.8, tabell 2.17 og tabell 2.19) direkte i mediet på skålen.
3. Cellene eksponeres 1, 1 ½, 2, 4 eller 24 timer før høsting.

**Tabell 2.17 Forsøksoppsett for westernblotting av proteiner fra PC12-celler eksponert i ulik tid**

<b>Behandling:</b>	<b>Eksponeringstid:</b>			
Vasket kontroll	1 time	2 timer	4 timer	24 timer
Serumdeprivasjon	1 time	2 timer	4 timer	24 timer
Kontroll	1 ½ time	2 timer	4 timer	24 timer
DMSO (0,1 %)	1 ½ time	2 timer	4 timer	24 timer
100 µM PAC-1	1 ½ time	2 timer	4 timer	24 timer

**Tabell 2.18 Forsøksoppsett for westernblotting med proteiner fra serumdepriverte PC12-celler**

<b>Behandling:</b>	<b>Eksponeringstid: 4 timer</b>
Vasket kontroll	
Serumdeprivasjon	
Serumdeprivasjon + 5 ng/ml EGF	
Serumdeprivasjon + 50 ng/ml NGF	
Serumdeprivasjon + 1 µM caspase-3-inhibitor	
Serumdeprivasjon + 20 µM caspase-8-inhibitor	
Serumdeprivasjon + 20 µM caspase-9-inhibitor	

**Tabell 2.19 Forsøksoppsett for westernblotting med proteiner fra PAC-1-eksponerte PC12-celler**

<b>Behandling:</b>	<b>Eksposeringstid: 4 timer</b>
Kontroll	
Kontroll + 5 ng/ml EGF	
Kontroll + 50 ng/ml NGF	
Kontroll + 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	
Kontroll + 20 $\mu$ M caspase-8-inhibitor	
Kontroll + 20 $\mu$ M caspase-9-inhibitor	
100 $\mu$ M PAC-1	
100 $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF	
100 $\mu$ M PAC-1 + 50 ng/ml NGF	
100 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	
100 $\mu$ M PAC-1 + 20 $\mu$ M caspase-8-inhibitor	
100 $\mu$ M PAC-1 + 20 $\mu$ M caspase-9-inhibitor	

### 2.7.2 Westernblotting med proteiner fra kornceller fra rotte

Kornceller fra rotte ble platet ut i store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) og inkubert ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub> i 7 døgn før de ble eksponert.

#### Prosedyre for behandling av kornceller fra rotte til westernblotting:

1. 1 ml av cellemediet i skålen pipetteres over i et ependorfrør, tilsettes eksponering (tabell 2.20), blandes og pipettes tilbake til skålen.
2. Cellene inkuberes ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub> i 4 timer før høsting.

**Tabell 2.20 Eksponeringer av kornceller fra rotte til bruk i westernblotting**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Celler oppbevart i LAF-benken mens de andre cellene eksponeres</li> <li>• DMSO (0,25 ‰)</li> <li>• 1 µM Caspase-3-inhibitor</li> <li>• 25 µM PAC-1</li> <li>• 25 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor</li> <li>• 25 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor (tilsatt etter 2 timer)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMSO (0,1 ‰)</li> <li>• 100 µM PAC-1</li> <li>• 100 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor</li> </ul>

### 2.7.3 Høsting av celler til westernblotting

Hver skål ble høstet i 50 µl, 75 µl eller 100 µl avhengig av hvor høy proteinkonsentrasjon det ble tilstrebet å oppnå i prøven ved hvert forsøk.

**Tabell 2.21 Løsning til høsting av celler**

Volumet SDS 2 % avpasses i forhold til antall skåler som skal høstes.	
Til hver ml SDS 2 % tilsettes:	
Komponent:	Mengde:
Leupeptin 5 mg/ml	1 µl
Pepstatin A 1 mg/ml	5 µl per ml SDS 2%
PMSF 100 mM	3 µl per ml SDS 2%
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 10 mM pH 10	10 µl per ml SDS 2%

#### Prosedyre for høsting av celler:

1. Cellemediet i skålen fjernes, før det vaskes forsiktig to ganger med 3 ml kald PBS (tabell 2.13) oppbevart i en boks med is.
2. Valgt mengde løsning til cellehøsting (tabell 2.21) pipetteres over i skålen.

3. Cellene løsnes ved å skrape med en celleskraper langs bunnen av skålen i to retninger vinkelrett på hverandre.
4. Cellesuspensjonen pipetteres over til ependorfrør og settes på is. Deretter kokes prøven ved 95 ° C i 2 minutter før den fryses ned ved - 80° C frem til bruk.

### **2.7.4 Proteinmåling**

Før celleprøver ble bruk til westernblotting, ble proteininnholdet i hver prøve bestemt ved hjelp av "BCA protein assay kit" (Pierce).

#### **Prosedyre for proteinmåling:**

1. Standardløsning og "working reagent" lages klart (tabell 2.22).
2. 12 av brønnene i en blank 96-brønnersplate tilsettes standardløsning i de mengdene som figuren over plateoppsettet viser (tabell 2.23).
3. 10 µl celleprøve tilsettes i de neste brønnene. Hver prøve tilsettes i to ulike brønner (tabell 2.23).
4. Alle brønnene tilsettes 200 µl "working reagent" (tabell 2.22).
5. De to blanke brønnene og brønnene med standardløsning tilsettes 2,5 µl av løsningen til høsting av celler (tabell 2.21).
6. Brettet inkuberes ved 37 ° C i 1 time.
7. Absorbans måles ved 570 nm i plateleseren.





**Proteinjustering av prøver:**

Basert på absorbansmålingene justeres sammensetningen av hver prøveløsning, slik at de får lik proteinkonsentrasjon.

1. Prøven med lavest absorbansmåling inneholder minst protein, og skal derfor fortynnes minst.
2. Utgangspunktet for prøveløsningene oppnås ved å blande 3 deler celleprøve med 1 del laemmlibuffer (4X) (tabell 2.24).
3. Basert på forholdstallet mellom den laveste absorbansmålingen og absorbansmålingen til hver enkelt prøve, beregnes hvor mye ekstra volum som skal tilsettes i form av laemmlibuffer (1X) (tabell 2.24), slik at proteinkonsentrasjonen blir lik i hver prøveløsning som settes på gelen.

**Tabell 2.24 Laemmlibuffere**

<b>Laemmlibuffer (1X):</b>	
Komponent:	Mengde:
Tris-HCl (0,5 M) pH=6,8	1,5 ml
SDS 10 %	2 ml
Glycerol 50 %	1 ml
MQ-vann	5 ml
Bromfenolblått	Noen korn
Mercaptoetanol	0,5 ml
<b>Laemmlibuffer (4X):</b>	
Komponent:	Mengde:
Tris-HCl (2 M) pH 6,8	1,5 ml
SDS 20 %	1, 5 ml
Glycerol 40 %	4 ml
MQ-vann	1 ml
Mercaptoetanol	2 ml
Bromfenolblått	Noen korn
Følgende komponenter tilsettes i avtrekk:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Noen korn bromfenolblått tilsettes til løsningen blir farget mørk blå.</li> <li>• Mercaptoetanol tilsettes rett før laemmlibufferen skal brukes.</li> </ul>	

### 2.7.5 Prosedyre for westernblotting

Westernblotting innledes med støping av en polyakrylamidgel.

Gelens prosentandel: Velges ut fra molekylvekten til proteinet som blir forsøkt detektert. For proteiner med relativt lav molekylvekt, slik som hel og kløyvet caspase-3 (molekylvekt 35

kDa og 17 kDa) støpes 12 % geler. For proteiner med høyere molekylvekt, slik som hel og kløyvet caspase-9 (51 kDa, 40 kDa, 38 kDa og 17 kDa) støpes 10 % geler.

Gelens tykkelse: Velges ut fra ønsket volum prøveløsning.

Antall brønner: Velges ut fra antall prøver som skal settes på gelen og ønsket volum.

### **Støping av gel**

1. Støpingen utføres i avtrekk.
2. For- og bakplate vaskes med sprit, tørkes, og legges sammen, kant i kant.
3. Glassplatene og de øvrige delene av støpeformen settes godt sammen, slik at det ikke lekker.
4. Komponentene til nedre gel (tabell 2.25 og 2.26) blandes i en liten kolbe, og helles umiddelbart ned mellom glassplatene. MQ-vann helles over for å sikre en rett kant.
5. La stivne i 30 minutter.
6. Komponentene til øvre gel (tabell 2.25 og tabell 2.26) blandes i en liten kolbe.
7. Vannet i formen helles av, og den øvre gelløsningen helles over nedre gel.
8. En plastkam settes ned i den øvre gelløsningen for å støpe brønner.
9. La stå i 30 minutter til den øvre gelen har stivnet.

**Tabell 2.25 Geler til westernblotting**

Til en tynn gel (0,75 mm):

Nedre gel:

	10 % gel:	12 % gel:
MQ-vann	1,5 ml	3,3 ml
Nedre gelbuffer (tabell 2.26)	0,9 ml	2,6 ml
Akrylamid	1,2 ml	4,0 ml
APS 10 %	18 µl	100 µl
TEMED	1,8 µl	4 µl

Øvre gel:

MQ-vann	1,2 ml
Øvre gelbuffer (Tabell 2.26)	0,5 ml
Akrylamid	0,3 ml
APS 10 %	10 µl
TEMED	2,0 µl

- Angitt mengde er beregnet til en tynn gel (0,75 mm). Til tykk gel (1,5 mm) kreves dobbel mengde av alle komponentene.
- Gelstøping utføres i avtrekk og med hansker.
- TEMED får gelen til å stivne og tilsettes derfor til slutt, rett før gelløsningen helles over i formen.

**Tabell 2.26 Løsninger til bruk i westernblotting**

<b>Nedre gelbuffer:</b>	
Tris-base	18,170 g
SDS (20 %)	2,0 ml
MQ-vann	ad 100ml
HCl og NaOH brukes for å justere pH til 8,8	
<b>Øvre gelbuffer:</b>	
Tris-base	6,06 g
SDS (20 %)	2,0 ml
MQ-vann	ad 100 ml
HCl og NaOH brukes for å justere pH til 6,8	
<b>Elfobuffer:</b>	
TGS	100 ml
Destillert vann	900 ml
<b>Blottebuffer:</b>	
TG	100 ml
Metanol	200 ml
Destillert vann	700 ml

**Elektroforese**

10. Når den øvre gelen har stivnet, fjernes plastkammen forsiktig. Glassplatene med gelen i mellom skylles forsiktig med vann, og monteres i et kar for gelkjøring.

11. Elfo-buffer (tabell 2.26) helles oppi karet.
12. Eventuelle luftbobler fjernes ved hjelp av en bøyd kanyle.
13. En plastkam settes over gelen for å angi brønnes plassering.
14. I den første brønnen tilsettes 5  $\mu$ M standard (Precision Plus Protein Dual Color Standard). Prøveløsningene pipetteres opp i de andre brønnene.
  - Volum som tilsettes små brønner: 15  $\mu$ l prøveløsning.
  - Volum som tilsettes store brønner: 50  $\mu$ l prøveløsning.
15. Gelen kobles til strøm, først 90 volt i 15 minutter, deretter 150 volt til prøvene har vandret gjennom hele gelen (ca 1 time).

### **Blotting**

16. En membran, to filterpapir og to skrubber fuktes i blottebuffer.
17. Gelen fjernes forsiktig fra glassplatene ved hjelp av en plastspatel. En membran legges oppå den ene siden av gelen, og et av filterpapirene på den andre siden av gelen. Det hele legges sammen som en sandwich i denne rekkefølgen:

Svart plastramme

Skrubb

Filterpapir

Gel

Membran

Filterpapir

Skrubb

Hvit plastramme

18. Rammen med gelen plasseres i et blottekar. En iskasett og magnetører legges oppi, før karet fylles med blottebuffer (tabell 2.26).
19. Gelen blottes i kjølerom ved 400 mA i 1 ½ time eller ved 50 mA til neste dag.

### **Farging av membranen**

20. Membranen legges i et kar med Ponceau S løsning i 1 minutt med proteinsiden opp.

21. Membranen skylles i et kar med destillert vann.
22. Overflødig væske får renne av før membranen legges i en plastlomme. Det tas bilde av poteinbåndene på membranen ved hjelp av en kopimaskin.

### Blokking

23. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten.
24. Røret tilsettes 5 ml 5 % tørrmelk i TBS (1 X) med tween (tabell 2.27), og legges til rulling ved romtemperatur i 1 time.

**Tabell 2.27 Tørrmelk (5 %) i TBS med tween**

Tørrmelk	1,5 g
TBS (1X) med tween (tabell 2.28)	30 ml
Oppbevares kjølig	

**Tabell 2.28 Tris bufret saltvann (TBS) med tween**

TBS (1 X) med tween	
<u>Komponent:</u>	<u>Mengde:</u>
Trizma base	1,21 g
NaCl	4,00 g
Tween 20	0,25 ml
Destillert vann	Ad 500 ml
pH justeres til 7,6 med HCl/NaOH	

### Tilsetning av antistoff

25. Primært antistoff og minst 3 ml 5 % tørrmelk i TBS (1X) med tween (tabell 2.27 og tabell 2.28) tilsettes membranen. Blandingsforholdet avhenger av type antistoff (tabell 2.29). Membranen og antistoffløsningen legges til rulling på kjølerom til neste dag.
26. Antistoff-tørrmelkblandingen helles av, og membranen vaskes tre ganger i 15 minutter med TBS (1X) med tween (tabell 2.27 og tabell 2.28) ved romtemperatur.
27. Sekundært antistoff i minst 3 ml 5 % tørrmelk i TBS (1X) med tween tilsettes (tabell 2.27 og tabell 2.28). Blandingsforholdet avhenger av type antistoff (tabell 2.29). Membranen og antistoffløsningen legges til rulling ved romtemperatur i 1 time.
28. Antistoff-tørrmelkblandingen helles av, og membranen vaskes tre ganger i 15 minutter med TBS (1X) med tween (tabell 2.28) ved romtemperatur.

**Tabell 2.29 Oversikt over antistoffer og konsentrasjoner brukt til westernblotting**

Primærantistoff	Lot.nr:	Kons.	Sekundærantistoff	Lot.nr:	Kons.
A-Tubulin (B-7) sc-5286	311296	1:500	Anti-mus IgG NA931V	311296	1:15000
Caspase-3 Nr. 9662	11	1:750	Geit-anti-kanin HRP Nr. 1858415	1A110693	1:10000
Caspase-9 Nr. 9506	9506	1:1000 1:1000 1:600	Geit-anti-kanin HRP Nr. 1858415	1A110693	1:15000 1:10000 1.10000
Erk-2 (C-14) P sc-154P	K131	1:1000	Geit-anti-kanin HRP Nr. 1858415	1A110693	1:10000
P-Erk M 8159	064K4767	1:5000	Anti-mus IgG Nr. NA931V	311296	1:15000
Anti-Caspase-3 Rabbit pAb Nr. 235412	D00060132	1:2000	Geit-anti-kanin HRP Nr. 1858415	1A110693	1:5000



## Fremkalling

29. Fremkallingsvæsken (Piko i forsøk med  $\alpha$ -tubulin, Femto i forsøk med andre antistoffer) settes ut i romtemperatur 1 time før bruk.
30. Membranen tas ut av plastrøret, og overflødig TBS med tween får renne av.
31. De to komponentene til fremkallingsvæsken blandes i forholdet 1:1, og 1 ml av fremkallingsvæsken pipetteres ut på en glassplate.
32. Membranen legges oppå fremkallingsvæsken med proteinsiden ned. Eventuelle luftbobler fjernes ved å dunke lett med en pinsett. La ligge i 5 minutter.
33. Overflødig fremkallingsvæske fjernes fra membranen, før membranen legges i en plastlomme og fremkalles ved hjelp av programmet GeneSnap fra SynGene.
34. Membranen oppbevares i TBS (1X) med tween (tabell 2.28) og legges til rulling i kjølerom frem til eventuell stripping og påføring av nytt antistoff.

## Stripping

35. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten.
36. Plastrøret tilsettes 5 ml strippebuffer (Western Blot Stripping Buffer), og legges til rulling ved romtemperatur i 15 minutter.
37. Strippebufferen helles av, 5 ml TBS (1X) med tween (tabell 2.28) tilsettes, og røret legges til rulling ved romtemperatur i 15 minutter, før væsken helles av.
38. Membranen blokkes med 5 ml 5 % tørrmelk i TBS (1 X) med tween (tabell 2.27 og tabell 2.28) ved romtemperatur i 3 timer.
39. Den videre prosedyren for westernblotting utføres som beskrevet (se punkt 22-31).

### 2.7.6 Måling av westernbåndstyrke

Membranene fra westernblottingen ble brukt videre i en semikvantitativ sammenligning av proteininnholdet i celleprøvene. Ved hjelp av bildebehandlingsprogrammet ImageJ ble styrken til proteinbåndene målt i antall pixels. Båndstyrken kan måles og oppgis på flere måter i det samme programmet. Før bearbeidingen av proteinbåndene tok til, ble det derfor

gjort forsøk med en fortynningsrekke med et DNA-plasmid for å finne den målemetoden som ga mest lineær sammenheng mellom konsentrasjon og antall pixels.

**Prosedyre for elektroforese med plasmid:**

1. Plasmidet N1-gfp pipetteres opp i et ependorfrør. Enzymet BamH1 lineariserer dette plasmidet og tilsettes sammen med de øvrige komponentene i kutteløsningen (tabell 2.30).
2. Løsningen blandes og varmes ved 37 ° C i 2 ½ timer.
3. Det lages en to-fold fortynningsrekke med i alt syv ulike konsentrasjoner av plasmidløsningen. Den første prøven består av 10 µl ufortynnet plasmidløsning, den andre prøven består av 5 µl plasmidløsning og 5 µl MQ-vann, osv.
4. Hver plasmidprøve tilsettes 3 µl orangemix (tabell 2.30).
5. 1 % agarosegel lages (tabell 2.30).Gelløsningen helles oppi støpeformen, og en plastkam settes oppi for å forme brønner.
6. Når gelen har stivnet, fjernes plastkammen, og TBE-buffer (tabell 2.30) helles oppi karet med gelen.
7. 13 µl plasmidprøve pipetteres opp i brønnene, før prøvene kjøres gjennom gelen ved 100 volt i ca .1 time.

**Tabell 2.30 Løsninger til elektroforese med plasmid**

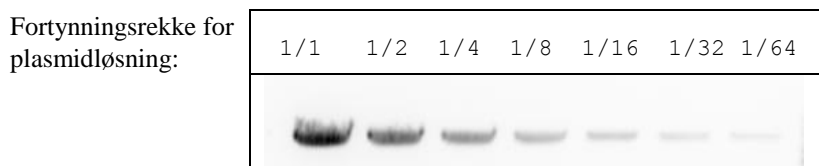
Løsning	Komponent	Mengde
Kutteløsning med N1-gfp	N1-gfp	5,0 µg
	BamH1	1 µl
	BamH1-buffer	
	MQ-vann	5 µl
		Ad 50 µl
Orangemix	Ficoll	10 g
	Orange G	0,125 g
	EDTA 0,5 M	2 ml
	MQ-vann	38 ml
	Sterilfiltreres. Oppbevares ved – 20 ° C	
Trisborat-EDTA-(TBE)-buffer (1 X)	Tris base	10,8 g
	Borsyre	55 g
	EDTA	9,3 g
	MQ-vann	Ad 1000ml
1 % Agarosegel	SeaKem LE Agarose	1 g
	TBE-buffer	100 ml
	Etidiumbromid	10 µg
	Agarose og TBE-buffer varmes opp. Avkjøles til 50 ° C, før etidiumbromid tilsettes.	

### Utprøving av metoder for måling av båndstyrke

Bildet av plasmidbåndene (figur 2.1) ble analysert i bildebehandlingsprogrammet ImageJ ved å tegne en ramme rundt hvert enkelt bånd, og måle antall pixels i hver ramme. Bakgrunnen ble funnet ved å måle antall pixels i områder uten bånd. Tre verdier ble brukt for å kvantifisere båndstyrkene:

- Integraltetthet
- Maksimalt antall pixels – antall pixels i bakgrunnen
- (Gjennomsnittlig antall pixels – antall pixels i bakgrunnen)/arealet av rammen.

Hver målemetode ble utprøvd tre ganger, før regresjonslinjen og den multiple korrelasjonskoeffisienten,  $R^2$  ble beregnet for hver av dem. Sammenligning av metodene ble gjort på bakgrunn av gjennomsnitt  $\pm$  SE for  $R^2$ -verdiene (tabell 2.31).



**Figur 2.1 Bånd for plasmidet N1-gfp i syv løsninger med ulike konsentrasjoner av plasmidet.** N1-gfp ble kuttet med enzymet BamH1. Det ble laget en to-fold fortynningsrekke med i alt syv ulike konsentrasjoner av plasmidløsning, før det ble utført elektroforese med prøvene. Figuren viser N1-gfp-bånd for hver av de syv prøvene i fortynningsrekken.

**Tabell 2.31 Resultater fra utprøving av metoder for måling av båndstyrke**

	Integraltetthet	<u>(Gjennomsnitt-bakgrunn)</u>	Maksimal verdi
		Areal	
Gjennomsnittlig $R^2$	0,815366667	0,867833333	0,8917
Standardfeil, SE	0,006656409	0,041419252	0

Resultatene fra utprøvingen (tabell 2.31) viste at måling av maksimal verdi gav  $R^2$  nærmest 1, og dermed mest lineær sammenheng mellom båndstyrke og konsentrasjon. I tillegg gav denne metoden nøyaktig samme verdi i de gjentatte målingene. Styrken til proteinbåndene fra westernblottingen ble derfor sammenlignet på bakgrunn av maksimalt antall pixels.

## 2.8 KVANTIFISERING AV UTLØPERE I PC12-CELLER

Tilbaketrekning av celleutløpere i PC12-celler ble studert ved å måle antall utløpere og deres lengde. PC12-celler ble splittet ut i små skåler ( $8,8 \text{ cm}^2$ ) og inkubert ved  $37^\circ \text{ C}$  og  $5\% \text{ CO}_2$  i 48 timer før de ble eksponert.

---

**Prosedyre for eksponering av celler og kvantifisering av celleutløpere:**

- Stoffene som cellene skal eksponeres for (tabell 2.32) tilsettes direkte i mediet på skålen.
- Cellene inkuberes ved 37 ° C og 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer, før de farges med trypanblå (avsnitt 2.4.3, punkt 1-6).
- Ufargede (levende) celler i minst fire områder av skålen studeres i mikroskop, og celleutløpere kvantifiseres på følgende måte:
  - Antall celler med og uten utløpere telles, og prosentandel celler med utløpere beregnes.
  - Cellene med utløpere studeres nærmere for å beregne:
    - Gjennomsnittlig antall utløpere per celle.
    - Gjennomsnittlig antall utløpere som er lengre enn cellediameteren per celle.

**Tabell 2.32 Eksponeringer brukt ved kvantifisering av celleutløpere i PC12-celler**

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Celler oppbevart i LAF-benken mens de andre cellene blir behandlet</li><li>• DMSO (0, 1 %)</li><li>• 5 ng/ml EGF</li><li>• 50 ng/ml NGF</li><li>• 1 µM Caspase-3-inhibitor</li><li>• 100 µM PAC-1</li><li>• 100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF</li><li>• 100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF</li><li>• 100 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor</li></ul> |
|--|

## 2.9 GRAFER OG STATISTIKK

Resultatene ble fremstilt grafisk ved hjelp av Microsoft Office Excel 2003. Dataene ble analysert statistisk ved hjelp av Sigma Stat versjon 3.0 fra SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA. Signifikansnivået ble satt til  $p < 0,05$ . Parvis sammenligning av normalfordelte data ble utført ved hjelp av t-test, mens Mann-Whitney rank sum test ble brukt til sammenligning av to ikke-normalfordelte datasett. For sammenligning av flere grupper hvor dataene var normalfordelte, ble det brukt One Way Analysis of Variance (ANOVA) med Dunnett`s metode. Ved ikke-normalfordelte datasett ble det brukt Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, med Dunns`s metode.

---

## 3. RESULTATER

### 3.1 CELLEDØD I PC12-CELLER INDUSERT AV SERUMDEPRIVASJON ELLER PAC-1

#### 3.1.1 Celledød induert av serumdeprivasjon i PC12-celler

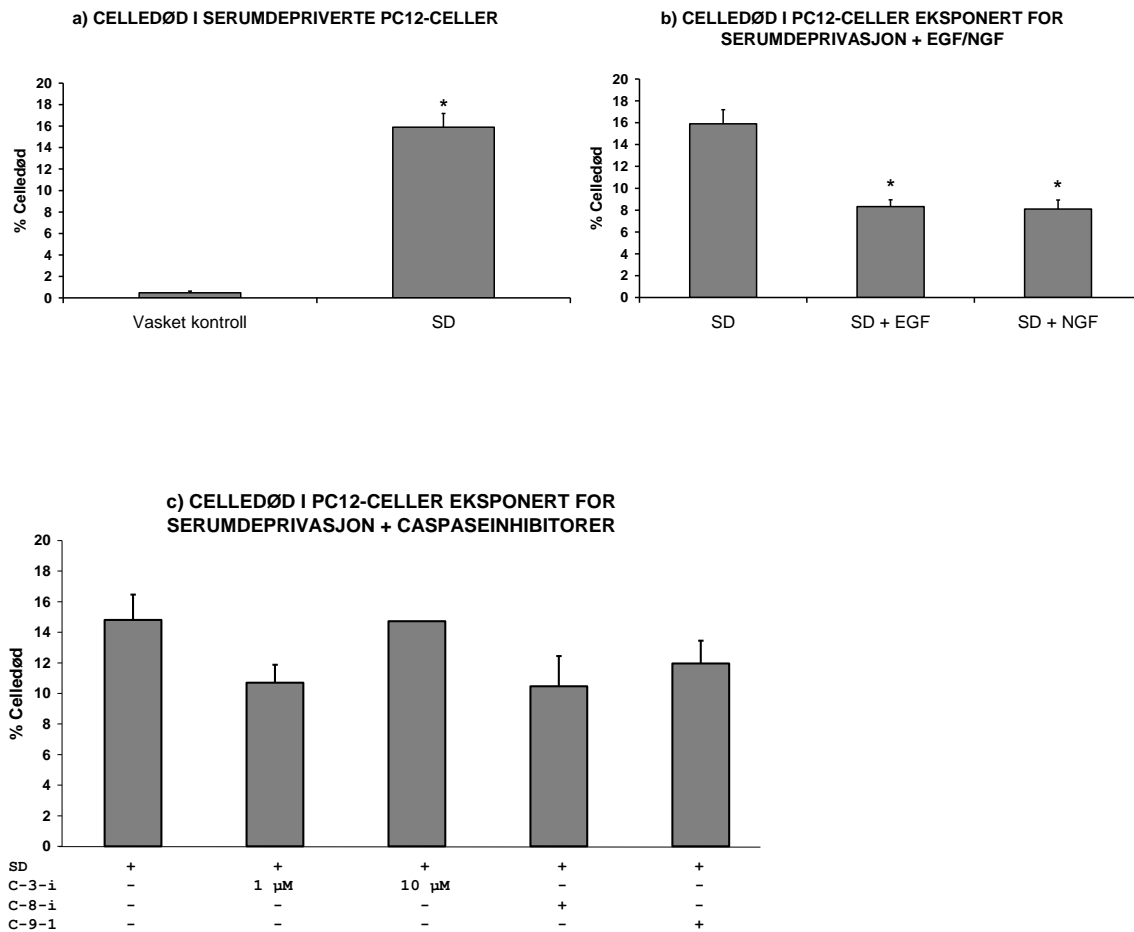
Serumdeprivasjon er en etablert metode for å indusere celledød i PC12-celler. Ved dyrking i serumfritt medium, har det blitt vist at 90 % av cellene dør innen 4-6 dager (Greene 1978). Serumdeprivasjon ble derfor ansett som en godt egnet metode for å indusere apoptose og studere mekanismene for slik celledød i PC12-celler.

For å kunne påvise eventuell hemming av apoptose, var det ønskelig å bruke en eksponeringstid som ikke gav full celledød. Innledende forsøk viste ingen signifikant forskjell i celledød mellom serumdeprivasjon i 24 timer og 48 timer. I de videre forsøkene ble det derfor valgt å serumdeprivere cellene i 24 timer før farging med trypanblå og celledøding i mikroskop.

Flere studier har vist at deprivasjon av celler fører til celledød gjennom aktivisering av caspase-3, -8 og -9 (Mogi, Ozeki et al. 2004; Lee, Shin et al. 2008). Det er også kjent at vekstfaktorene EGF og NGF kan stimulere til celleoverlevelse (Luo, West et al. 1997). Det ble derfor undersøkt om tilsetning av caspase-3-inhibitor, caspase-8-inhibitor, caspase-9-inhibitor eller vekstfaktorene EGF eller NGF kunne beskytte mot celledød induert av serumdeprivasjon.

Resultatene fra forsøkene viser at serumdeprivasjon gav signifikant økning i celledød i forhold til vasket kontroll (figur 3.1 a, tabell 3.1). Både EGF og NGF gitt ved serumdeprivasjon gav signifikant lavere celledød i forhold til serumdeprivasjon alene (figur 3.1 b, tabell 3.2). Tilsetning av caspaseinhibitorer gav ikke signifikant forskjell i celledød sammenlignet med serumdeprivasjon alene. Caspase-8-inhibitor, caspase-9-inhibitor og 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor viste likevel en tendens til å redusere celledød induert av serumdeprivasjon (figur 3.1 c, tabell 3.3).

Under mikroskoperingen ble det observert færre celler i skålene med serumfritt medium. Flere av de serumdepriverte cellene var også runde, i motsetning til de kontrollvaskede cellene, som i større grad var stjerneformede med flere celleutløpere (figur 3.2 a-b). Tilsetning av vekstfaktor gav ingen synlig endring i morfologi i forhold til serumdeprivasjon etter 24 timer (figur 3.2 c).



**Figur 3.1a-c: EGF og NGF reduserer celledød induisert av serumdeprivasjon (SD).**

PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting. Cellene ble deretter vasket to ganger med serumfritt medium før de ble eksponert for serumfritt medium (figur a), serumfritt medium tilsatt 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF (figur b) eller serumfritt medium tilsatt 1  $\mu$ M eller 10  $\mu$ M caspase-3-inhibitor, 20  $\mu$ M caspase-8-inhibitor eller 20  $\mu$ M caspase-9-inhibitor (figur c). Som kontroll ble det brukt PC12-celler vasket med serumfritt medium og deretter tilsatt PC12-medium med serum. Etter 24 timer med eksponering, ble cellene farget med trypanblå og antall døde og levende celler talt i mikroskop. I figuren er celledød oppgitt som prosentvis antall døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er hentet fra 2-6 uavhengige forsøk, og uttrykt som gjennomsnitt  $\pm$  SE. Totalt antall observasjoner, n = 2-6. \* angir statistisk signifikant forskjell i forhold til vasket kontroll (figur a) og i forhold til serumdeprivasjon (figur b).



**Tabell 3.1 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.1 a**

<b>Eksponering</b>	<b>% Celledød</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
Vasket kontroll	0,48	0,16	6	6
Serumdeprivasjon	15,90	1,28	6	6

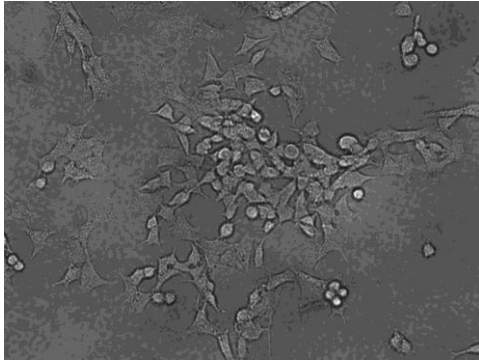
**Tabell 3.2 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.1 b**

<b>Eksponering</b>	<b>% Celledød</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
Serumdeprivasjon	15,90	1,28	6	6
Serumdeprivasjon + 5 ng/ml EGF	8,32	0,62	6	6
Serumdeprivasjon + 50 ng/ml NGF	8,10	0,82	6	6

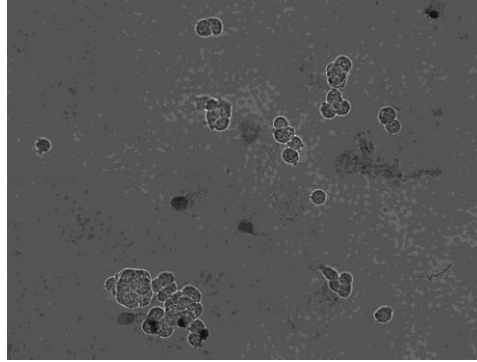
**Tabell 3.3 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.1 c**

<b>Eksponering</b>	<b>% Celledød</b>	<b>± SE (Ved n &lt; 3 oppgis range)</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
Serumdeprivasjon	14,80	1,67	4	4
Serumdeprivasjon + 1 µM caspase-3-inhibitor	10,69	1,16	4	4
Serumdeprivasjon + 10 µM caspase-3-inhibitor	14,73	Range: 13,86-15,60	2	2
Serumdeprivasjon + 20 µM caspase-8-inhibitor	10,47	1,99	4	4
Serumdeprivasjon + 20 µM caspase-9-inhibitor	11,97	1,48	3	3

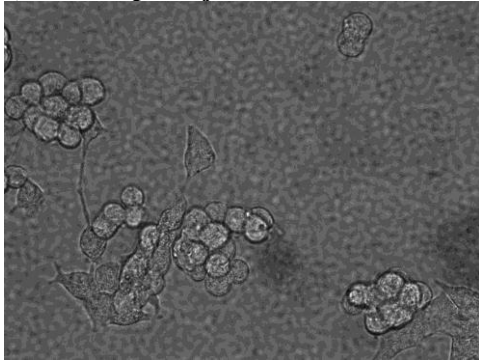
a) Vasket kontroll



b) Serumdeprivasjon



c) Serumdeprivasjon + EGF



**Figur 3.2 a-c: Serumdeprivasjon fører til økt celledød og endret morfologi i PC12-celler.**

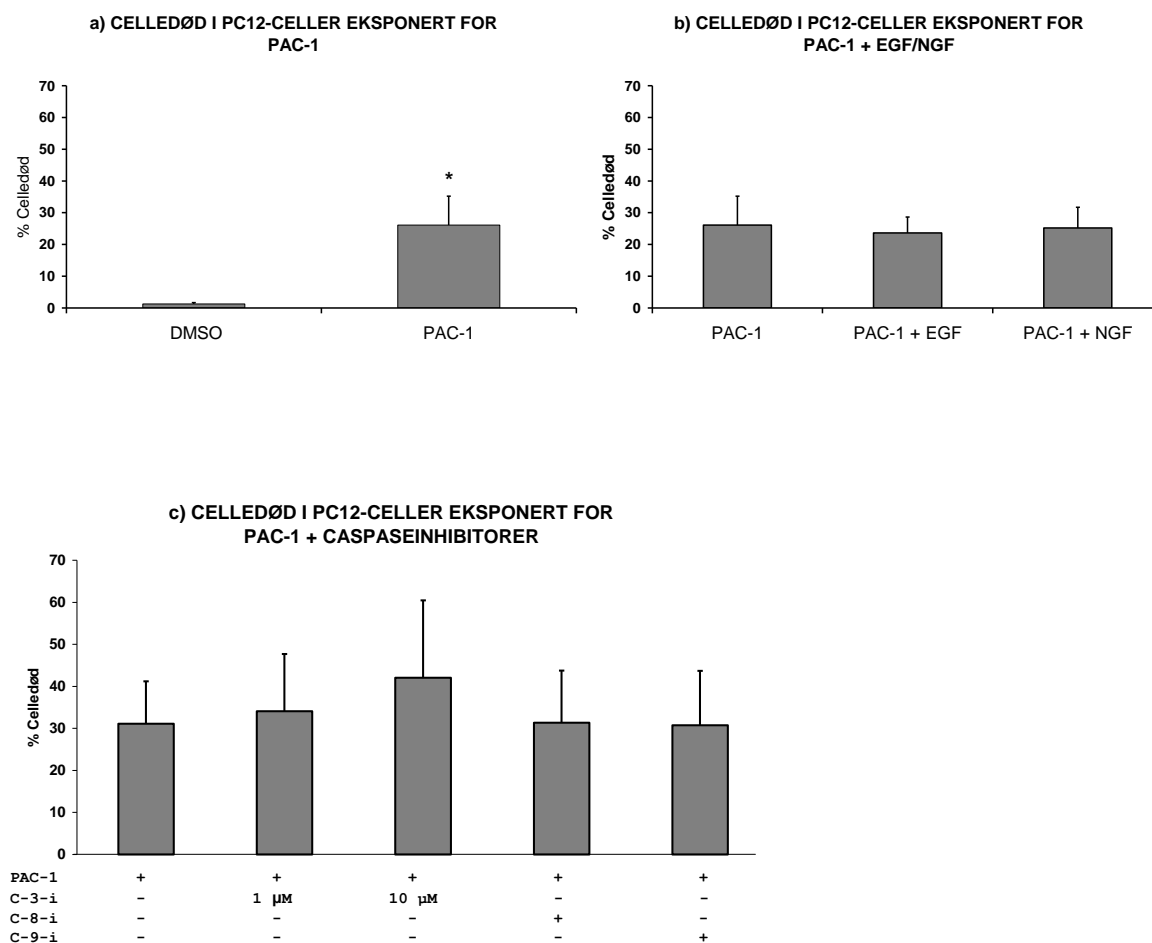
Fasekontrastbildene viser eksempler på celler fra forsøkene vist i Figur 3.1. PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting, før de ble vasket to ganger med serumfritt medium. Etter vaskingen ble cellene i kontrollskålen (figur a) tilsatt medium med serum, cellene til serumdeprivasjon (figur b) tilsatt serumfritt medium og cellene til serumdeprivasjon + EGF (figur c) tilsatt serumfritt medium med 5 ng/ml EGF. Cellene ble eksponert i 24 timer før de ble farget med trypanblå og antall levende og døde celler talt i mikroskop. Celler som er blå/mørke er døde, mens de ufargede cellene er levende.

### 3.1.2 PAC-1-indusert celledød i PC12-celler

PAC-1 er et molekyl som direkte aktiverer procaspase-3 til caspase-3 (Putt, Chen et al. 2006). Eksponering med PAC-1 gir dermed mulighet til å studere caspase-3 sin rolle i celledød, og eventuell crosstalk til andre apoptoseveier. I tillegg til å undersøke effekten av PAC-1 på celledød, var det interessant å undersøke om tilsetning av caspase-3-inhibitor, caspase-8-inhibitor, caspase-9-inhibitor eller vekstfaktorene EGF eller NGF beskytter mot celledød når caspase-3 blir aktivert direkte. Innledende forsøk viste at PAC-1 kunne gi nesten fullstendig celledød etter 48 timer (data ikke vist). Det ble derfor valgt å eksponere cellene i 24 timer før farging og telling. I forsøkene ble det brukt PAC-1 løst i DMSO. Som kontroll ble det brukt celler tilsatt samme volum DMSO (0,1 %) som volum PAC-1 brukt til eksponering.

Resultatene viser at eksponering for PAC-1 gav signifikant økning i celledød i forhold til ubehandlet kontroll med DMSO (figur 3.3 a, tabell 3.4). Verken EGF eller NGF gitt i kombinasjon med PAC-1 gav signifikant endring i celledød sammenlignet med eksponering for PAC-1 alene (figur 3.3 b, tabell 3.5). Heller ikke eksponering for PAC-1 med caspase-3-inhibitor (1  $\mu$ M og 10  $\mu$ M), caspase-8-inhibitor eller caspase-9-inhibitor gav signifikant forskjell i celledød sammenlignet med PAC-1 alene (figur 3.3 c, tabell 3.6)

Under mikroskoperingen ble det observert færre celler i skålene tilsatt PAC-1 enn i kontrollskålene. Cellene som var eksponert for PAC-1 var også rundere, med færre celleutløpere enn cellene brukt som kontroll (figur 3.4 a-e).



**Figur 3.3 a-c: EGF, NGF og caspase-inhibitorer reduserer ikke PAC-1-indusert celledød.**

PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting. Cellene ble deretter eksponert for 100  $\mu$ M PAC-1 (figur a), 100  $\mu$ M PAC-1 i kombinasjon med 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF (figur b) eller 100  $\mu$ M PAC-1 sammen med 1  $\mu$ M eller 10  $\mu$ M caspase-3-inhibitor, 20  $\mu$ M caspase-8-inhibitor eller 20  $\mu$ M caspase-9-inhibitor (figur c). Som kontroll er det brukt celler tilsatt DMSO (0,1 %). Etter 24 timer med eksponering, ble cellene farget med trypanblå og antall døde og levende celler talt i mikroskop. I figuren er celledød oppgitt som prosentvis antall døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er hentet fra 3-6 uavhengige forsøk og uttrykt som gjennomsnitt  $\pm$  SE. Totalt antall observasjoner, n = 6-9. \* angir statistisk signifikant forskjell i forhold til ubehandlet kontroll med DMSO.

**Tabell 3.4 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.3 a**

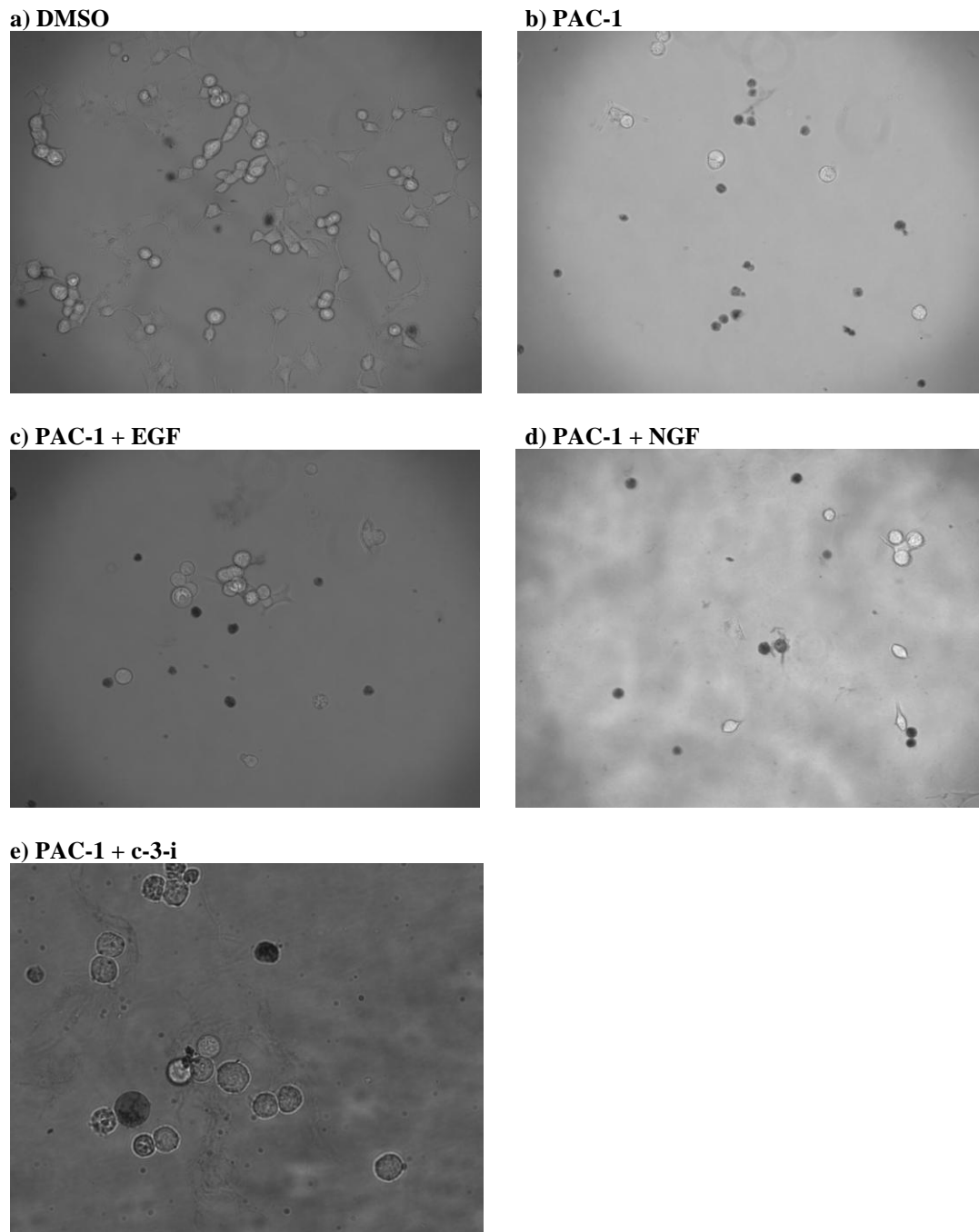
<b>Eksponering</b>	<b>% Celledød</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
DMSO (0,1 %)	1,29	0,42	6	6
100 µM PAC-1	26,14	8,39	9	6

**Tabell 3.5 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.3 b**

<b>Eksponering</b>	<b>% Celledød</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
100 µM PAC-1	26,14	8,39	9	6
100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	23,63	4,98	9	6
100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	25,21	5,94	9	6

**Tabell 3.6 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.3 c**

<b>Eksponering</b>	<b>% Celledød</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
100 µM PAC-1	31,13	10,09	7	4
100 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor	34,09	13,64	3	3
100 µM PAC-1 + 10 µM caspase-3-inhibitor	42,05	18,43	3	3
100 µM PAC-1 + 20 µM caspase-8-inhibitor	31,34	12,39	4	4
100 µM PAC-1 + 20 µM caspase-9-inhibitor	30,75	12,96	4	4



**Figur 3.4 a-e: PAC-1 fører til økt celledød og endret morfologi i PC12-celler.**

Figuren viser eksempler på celler fra forsøkene vist i Figur 3.3. PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting, før de ble behandlet. Etter 24 timer med eksponering ble cellene farget med trypanblå og antall levende og døde celler talt i mikroskop. Figuren viser fasekontrastbilder av kontrollceller tilsatt DMSO slik at sluttkonsentrasjonen ble 0,1 % (figur a) og celler eksponert for henholdsvis 100  $\mu$ M PAC-1 (figur b), 100  $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF (figur c), 100  $\mu$ M PAC-1+ 50 ng/ml NGF og 100  $\mu$ M PAC-1 + 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. Celler som er blå/mørke er døde, mens de ufargede cellene er levende.

## 3.2 CELLEDØD I PAC-1-EKSPONERTE KORNCELLER FRA ROTTE

I forsøkene med PC12-celler reduserte ikke caspase-3-inhibitor PAC-1-indusert celledød (figur 3.3 c, tabell 3.6). Det var derfor ønskelig å gjøre tilsvarende forsøk i kornceller fra rotte for å se om caspase-3-inhibitor beskytter mot celledød induert av direkte caspase-3-aktivering i denne celletypen.

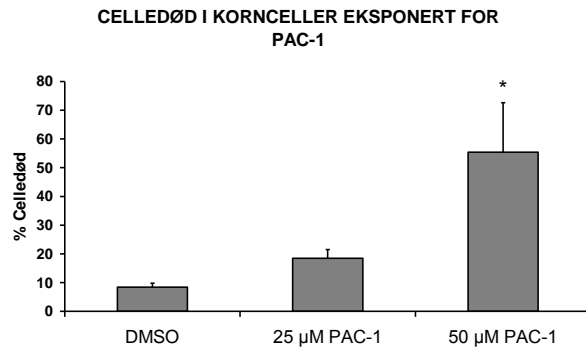
Kornceller fra rotte ble eksponert for 25  $\mu\text{M}$  eller 50  $\mu\text{M}$  PAC-1. Det ble også utført et enkelt forsøk med eksponering for 10  $\mu\text{M}$  PAC-1. Siden PAC-1 er løst i DMSO, ble kornceller tilsatt DMSO brukt som kontroll. Det ble valgt å bruke samme volum DMSO som 25  $\mu\text{M}$  PAC-1, slik at sluttkonsentrasjonen av DMSO i cellemediet ble 0,25 %. I tillegg til å undersøke om caspase-3-inhibitor beskytter mot celledød induert PAC-1, var det interessant å studere tidsforløpet for caspase-3-aktivering og celledød. 1  $\mu\text{M}$  caspase-3-inhibitor ble derfor tilsatt 15 minutter (0 timer), 2 timer og 4 timer etter tilsetning av PAC-1.

Resultatene viser at 50  $\mu\text{M}$  PAC-1 gav signifikant økning i celledød i forhold til DMSO-kontrollen, mens 25  $\mu\text{M}$  PAC-1 bare viste en tendens til økt celledød (Figur 3.5, Tabell 3.7). Tilsetning av 10  $\mu\text{M}$  PAC-1 (ikke vist), gav tilnærmet lik celledød som eksponering for 25  $\mu\text{M}$  PAC-1.

Caspase-3-inhibitor tilsatt etter henholdsvis 0 timer, 2 timer og 4 timer reduserte ikke celledød induert av 25  $\mu\text{M}$  PAC-1. I forsøkene med 50  $\mu\text{M}$  PAC-1 viste imidlertid caspase-3-inhibitor en tendens til å beskytte mot celledød. Denne tendensen ble sterkere jo senere caspase-3-inhibitoren ble tilsatt (figur 3.6, tabell 3.8). På grunn av stor spredning i resultatene, ble celledødstallene regnet om til prosent av celledød induert av henholdsvis 25  $\mu\text{M}$  og 50  $\mu\text{M}$  PAC-1 innenfor hver uke, og gjennomsnittet av de normaliserte dataene ble beregnet. Normaliseringen førte til mindre spredning i dataene, men heller ikke nå var det statistisk signifikant forskjell i celledød mellom eksponering for PAC-1 alene og PAC-1 i kombinasjon med caspase-3-inhibitor tilsatt etter 0, 2 eller 4 timer (figur 3.7 a-b).

Under mikroskoperingen ble det observert at mange av de PAC-1-eksponerte cellene som var i live hadde endret morfologi, i form av kornete nevritter og mer ujevne cellemembraner sammenlignet med cellene i kontrollskålene. Disse forskjellene var særlig tydelige blant

cellene eksponert for 50  $\mu\text{M}$  PAC-1. Tilsetning av caspase-3-inhibitor førte ikke til noen påfallende endring i morfologi (figur 3.8).



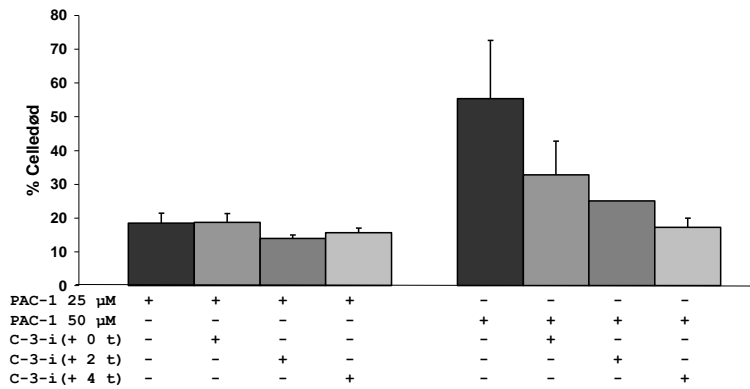
**Figur 3.5 Eksponering for 50  $\mu\text{M}$  PAC-1 gir signifikant økning i celledød.**

Kornceller fra rotte ble plattet ut og inkubert i 7 eller 8 døgn før eksponering for 25  $\mu\text{M}$  eller 50  $\mu\text{M}$  PAC-1. Som kontroll ble det brukt celler tilsatt DMSO (0,25 %). Etter 24 timer med eksponering, ble cellene farget med trypanblå og antall døde og levende celler talt i mikroskop. I figuren er celledød oppgitt som prosentvis antall døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er hentet fra 3 uavhengige forsøk, og fremstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SE. Totalt antall observasjoner,  $n = 3-6$ . \* angir statistisk signifikant forskjell i forhold til DMSO-kontrollen.

**Tabell 3.7 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.5**

Eksposering	% Celledød	$\pm$ SE	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,1 %)	8,38	1,43	6	3
25 $\mu\text{M}$ PAC-1	18,50	2,99	6	3
50 $\mu\text{M}$ PAC-1	55,37	17,28	3	3

CELLEDØD I KORNCELLER EKSPONERT FOR 25  $\mu\text{M}$  ELLER 50  $\mu\text{M}$   
PAC-1 + CASPASE-3-INHIBITOR TILSATT ETTER 0, 2 ELLER 4 t



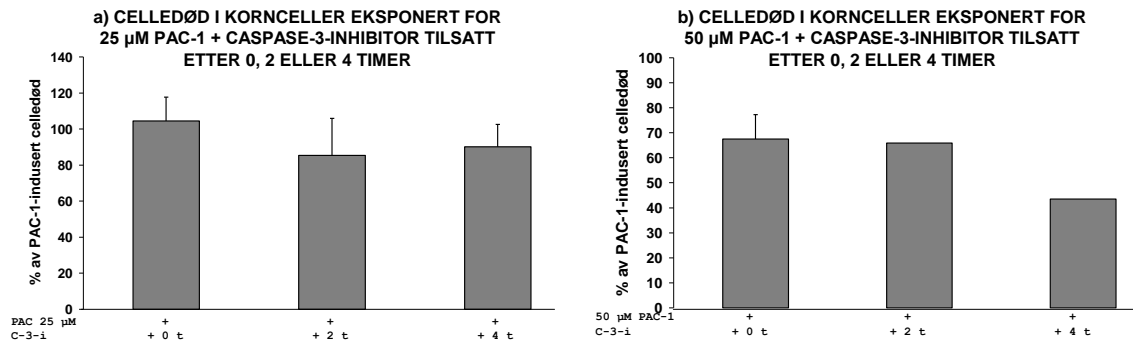
**Figur 3.6** Sen tilsetning av caspase-3-inhibitor viser en tendens til å beskytte mot celledød induisert av 50  $\mu\text{M}$  PAC-1.

Kornceller fra rotte ble platet ut og inkubert i 7 eller 8 døgn før eksponering for 25  $\mu\text{M}$  eller 50  $\mu\text{M}$  PAC-1. Tre av skålene ble tilsatt 1  $\mu\text{M}$  caspase-3-inhibitor etter henholdsvis 0, 2 og 4 timer. Cellene ble eksponert i til sammen 24 timer før de ble tilsatt trypanblå og antall døde og levende celler ble talt i mikroskop. Figuren viser antall døde celler som prosent av det totale antallet celler. Resultatene er hentet fra 2-3 uavhengige forsøk, og fremstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SE. Totalt antall observasjoner,  $n = 2-6$ .



**Tabell 3.8 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.6**

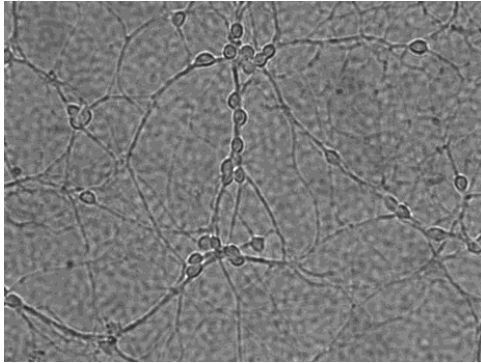
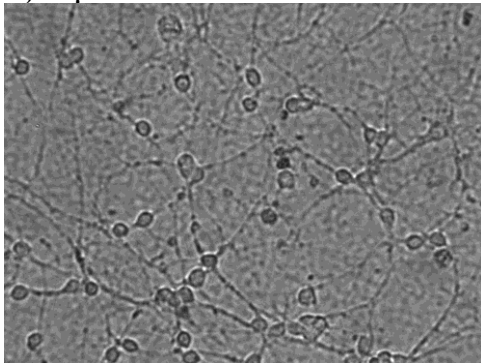
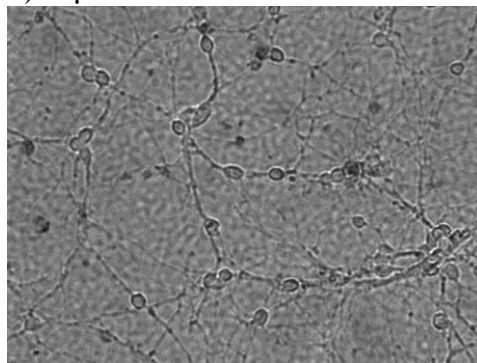
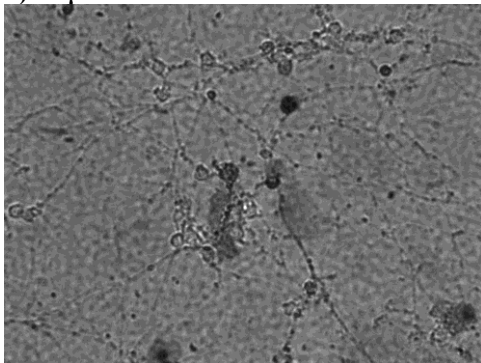
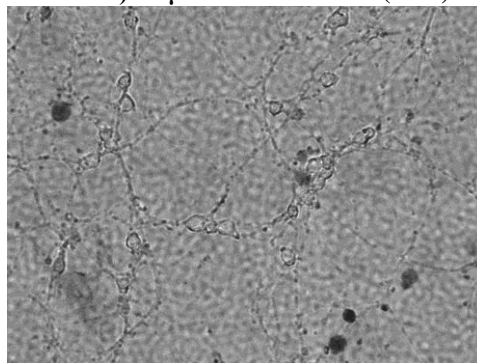
<b>Eksponering</b>	<b>% Celledød</b>	<b>± SE (ved n &lt; 3 oppgis range)</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
25 µM PAC-1	18,50	2,99	6	3
25 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor (+ 0 t)	18,71	2,63	6	3
25 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor (+ 2 t)	13,96	1,06	5	3
25 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor (+ 4 t)	15,63	1,36	3	3
50 µM PAC-1	55,37	17,28	3	3
50 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor (+ 0 t)	32,84	9,97	5	3
50 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor (+ 2 t)	25,1	Range: 23,8-26,4	2	2
25 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor (+ 4 t)	17,23	2,72	3	2



**Figur 3.7 a-b: Caspase-3-inhibitor viser en tendens til å redusere celledød induisert av 50 µM PAC-1.**

Kornceller fra rotte ble platet ut og inkubert i 7-8 døgn før eksponering for 25 µM PAC-1 (figur a) eller 50 µM PAC-1 (figur b). 1 µM caspase-3-inhibitor ble tilsatt etter 0, 2 eller 4 timer. Cellene ble eksponert i til sammen 24 timer, før de ble tilsatt trypanblå og antall døde og levende celler ble talt i mikroskop. Figurene viser celledød ved eksponering for PAC-1 + caspase-3-inhibitor som prosent av celledød ved eksponering for PAC-1 alene. Dataene er normalisert innenfor hvert uavhengige forsøk, og fremstilt som gjennomsnitt ± SE. Resultatene er tidligere vist som rådata i figur 3.6, og er hentet fra 2-3 uavhengige forsøk.

a) DMSO

b) 25  $\mu$ M PAC-1c) 25  $\mu$ M PAC-1 + c-3-id) 50  $\mu$ M PAC-1e) 50  $\mu$ M PAC-1 + c-3-I (+ 4 t)

**Figur 3.8 a-e: PAC-1 gir økt celledød og endret morfologi i kornceller fra rotte.**

Fasekontrastbildene viser eksempler på celler fra forsøkene som Figur 3.5- Figur 3.7 bygger på. Kornceller fra rotte ble inkubert i 7-8 døgn før behandling. Etter 24 timer med eksponering ble cellene farget med trypanblå, og antall døde og levende celler talt i mikroskop. Figuren viser fasekontrastbilder av kontrollceller tilsatt 0,25 % DMSO (figur a) og celler eksponert for henholdsvis 25  $\mu$ M PAC-1 (figur b), 25  $\mu$ M PAC-1 + 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor (figur c), 50  $\mu$ M PAC-1 (figur d) og 50  $\mu$ M PAC-1 + 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor tilsatt etter 4 timer (figur e). Celler som er blå/mørke er døde, mens de ufargede cellene er levende.

### 3.3 MTT-ANALYSE AV SERUMDEPRIVERTE PC12-CELLER

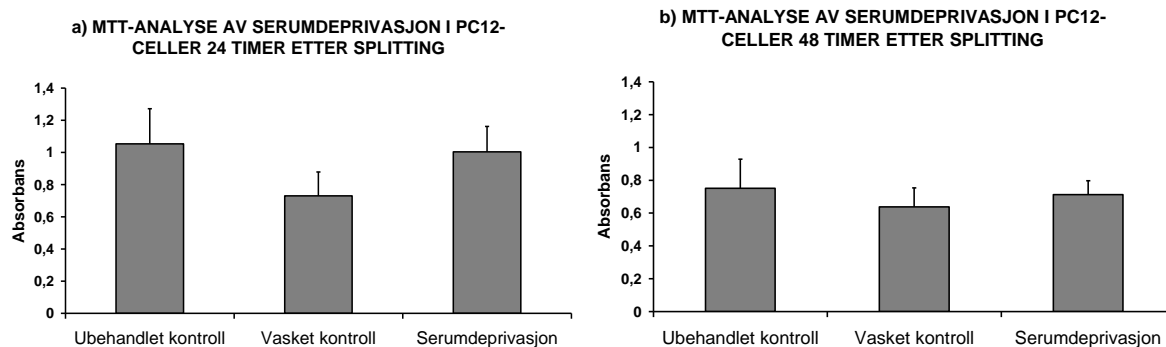
Det var ønskelig å bruke en teknikk som ga en mer objektiv og lettere kvantifiserbar deteksjon av celledød i PC12-celler. MTT-analyse ble utført for å måle

mitokondrieaktiviteten, og dermed gi et indirekte mål på celleoverlevelsen i serumdepriverte celler. I tillegg ble det gjort forsøk med tilsetning av 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml NGF og 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor, for å se om disse økte celleoverlevelsen ved serumdeprivasjon. Som kontroll ble det både brukt ubehandlede celler og celler vasket med serumfritt medium. Bakgrunnen ble målt i form av absorbans i celler uten tilsatt MTT. Mitokondrieaktiviteten til cellene ble fremstilt som absorbans etter at bakgrunnen var trukket fra.

Resultatene viser en tendens til lavere mitokondrieaktivitet i vasket kontroll sammenlignet med ubehandlet kontroll. Serumdeprivasjon førte til tilnærmet uendret mitokondrieaktivitet sammenlignet med de ubehandlede cellene, men økt aktivitet sammenlignet med vasket kontroll (figur 3.9 a-b). Ingen av forskjellene var statistisk signifikante.

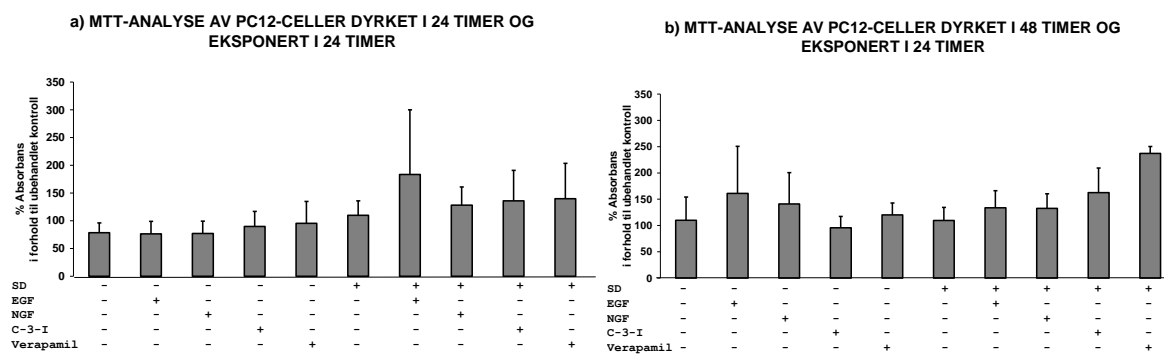
Ut fra denne observasjonen ble det gjort forsøk med tilsetning av kalsiumkanalblokkeren verapamil (10  $\mu$ M), for å undersøke om vasking med serumfritt medim kan føre til åpning av  $\text{Ca}^{2+}$ -kanaler og påfølgende endring i mitokondrieaktivitet. Det ble også forsøkt å inkubere PC12-celleene i 24 eller 48 timer etter splitting, for deretter å eksponere dem i 4, 24 eller 48 timer for å se om forholdet mellom mitokondrieaktiviteten til serumdepriverte celler og kontrollene ble endret. Resultatene ble normalisert ved at bakgrunnen, i form av absorbansmålingene i celler uten tilsatt MTT-løsning, ble trukket fra. Deretter ble målingene til de ulike eksponeringene fremstilt som prosent av absorbansen til den ubehandlede kontrollen. Eksempler på resultatene fra MTT-analysen er vist i form av absorbansmålingene fra PC12-celler inkubert i 24 timer etter splitting og eksponert i 24 timer (figur 3.10 a, tabell 3.9) og celler inkubert i 48 timer etter splitting og eksponert i 48 timer (figur 3.10 b og tabell 3.10).

Det var stor variasjon mellom absorbansmålingene fra forsøk til forsøk innenfor samme tidsintervall, og mellom MTT-resultatene som helhet. Det var ingen signifikant forskjell mellom noen av de ulike eksponeringene, men samtlige tidsprotokoller viste en tendens til uendret eller økt mitokondrieaktivitet i serumdepriverte celler i forhold til vasket kontroll. Det var også en tendens til at EGF, NGF, caspase-3-inhibitor og verapamil økte mitokondrieaktiviteten ytterligere ved serumdeprivasjon, slik eksemplene gjengitt i figur 3.10 viser.



**Figur 3.9 a-b: Vasket kontroll gir en tendens til lavere mitokondrieaktivitet.**

PC12-celler ble splittet ut i transparente 96-brønnersbrett og inkubert i 24 timer (figur a) eller 48 timer (figur b). Cellene ble deretter vasket to ganger med serumfritt medium og eksponert for serumfritt medium i 24 timer. MTT-løsning ble tilsatt de siste 4 timene av eksponeringstiden, og absorbans målt i plateleseren ved 570 nm. I tillegg til ubehandlet kontroll, ble det brukt vasket kontroll, hvor cellene ble vasket to ganger med serumfritt medium, før tilsetning av nytt PC12-medium med serum. Celler uten tilsatt MTT-løsning er brukt for å måle bakgrunnsabsorbansen til hver enkelt type behandling. Figuren viser absorbans ved 570 nm, etter at bakgrunnen er trukket fra. Resultatene er hentet fra 4 uavhengige forsøk, og uttrykt som gjennomsnitt ± SE. Det var ingen signifikant forskjell mellom eksponeringene.



**Figur 3.10 a-b: Mitokondrieaktivitet ved eksponering for serumdeprivasjon + 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml NGF, 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor eller 10  $\mu$ M verapamil.**

PC12-celler ble dyrket i 24 timer (figur a) eller 48 timer (figur b) etter splitting, før de ble vasket to ganger med serumfritt medium og eksponert for serumfritt medium (SD) alene eller i kombinasjon med 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml NGF, 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor eller 10  $\mu$ M verapamil i 24 timer. MTT-løsning ble tilsatt de siste 4 timene av eksponeringstiden, og absorbans målt i plateleseren ved 570 nm. I tillegg til ubehandlet kontroll, ble det brukt vaskede kontroll, hvor cellene først ble vasket to ganger med serumfritt medium, og deretter tilsatt nytt PC12-medium med serum og eventuelt EGF, NGF, caspase-3-inhibitor eller verapamil. Celler uten tilsatt MTT-løsning er brukt for å måle bakgrunnsabsorbansen. Figuren viser absorbans ved 570 nm uten bakgrunn fremstilt som prosent av absorbansen til ubehandlet kontroll. Resultatene er hentet fra 3-4 uavhengige forsøk, og uttrykt som gjennomsnitt ± SE. Totalt antall observasjoner, n = 10-44. Det var ingen signifikant forskjell mellom de ulike eksponeringene.

**Tabell 3.9** Oversikt over normaliserte data som ligger til grunn for Figur 3.10 a

<b>Eksponering</b>	<b>% Absorbans i forhold til ubehandlet kontroll</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
Vasket kontroll	79,76	14,60	24	4
Vasket kontroll + 5 ng/ml EGF	78,18	18,27	15	3
Vasket kontroll + 50 ng/ml NGF	78,84	17,54	15	3
Vasket kontroll + 1 µM caspase-3-inhibitor	88,42	21,35	15	3
Vasket kontroll + 10 µM verapamil	90,80	29,88	15	3
Serumdeprivasjon	104,21	18,66	44	4
Serumdeprivasjon + 5 ng/ml EGF	151,41	80,26	10	3
Serumdeprivasjon + 50 ng/ml NGF	118,15	22,90	15	3
Serumdeprivasjon + 1 µM caspase-3-inhibitor	120,97	38,04	15	3
Serumdeprivasjon + 10 µM verapamil	122,90	43,95	15	3
<b>Bakgrunn</b>	17,72			

**Tabell 3.10** Oversikt over normaliserte data som ligger til grunn for Figur 3.10 b

<b>Eksponering</b>	<b>% Absorbans i forhold til ubehandlet kontroll</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
Vasket kontroll	102,66	30,68	30	4
Vasket kontroll + 5 ng/ml EGF	137,07	60,13	20	3
Vasket kontroll + 50 ng/ml NGF	124,64	40,18	25	4
Vasket kontroll + 1 µM caspase-3-inhibitor	94,82	16,28	15	3
Vasket kontroll + 10 µM Verapamil	113,29	14,84	15	3
Serumdeprivasjon	104,48	18,38	45	4
Serumdeprivasjon + 5 ng/ml EGF	122,77	23,40	20	3
Serumdeprivasjon + 50 ng/ml NGF	121,00	19,72	25	4
Serumdeprivasjon + 1 µM caspase-3-inhibitor	140,47	32,86	25	4
Serumdeprivasjon + 10 µM Verapamil	192,12	6,22	20	3
<b>Bakgrunn</b>	25,30			

### 3.4 CASPASEAKTIVITET I PC12-CELLER EKSPONERT FOR PAC-1

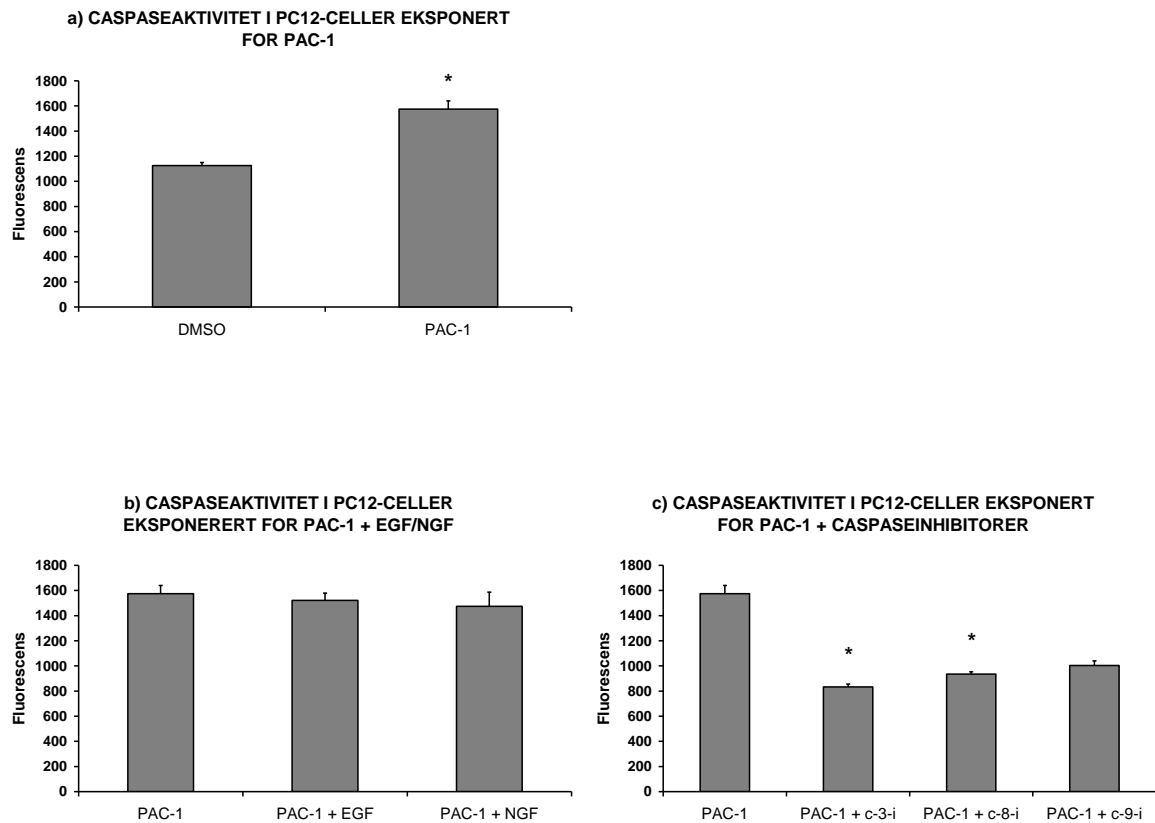
Siden forsøk vist i avsnitt 3.1.2 demonstrerer at PAC-1 induserer celledød i PC12-celler, var det interessant å undersøke hvor mye caspase-3 som blir aktivert i cellene ved PAC-1-eksponering. Ut fra ønsket om å studere eventuell "crosstalk" mellom caspase-3 og andre

signaleringsveier, ble det også gjort forsøk med tilsetning av vekstfaktorer og caspaseinhibitorer. For å få detekterbare caspase-3-nivåer ble cellene splittet ut med en celletetthet på  $4 \times (7 \times 10^4)$  celler/ml. Det var ønskelig å utføre caspaseanalysen på et tidspunkt med høy caspaseaktivitet. Det ble derfor utført et innledende forsøk hvor PC12-celler ble eksponert i 1 time, 2 timer eller 4 timer før tilsetning av RIPA-buffer og caspase-3-substrat, og påfølgende måling av fluorescens ved 360/465 nm.

Celler eksponert for PAC-1 i 2 timer viste høyere caspaseaktivitet (fluorescenssignal uten bakgrunn = 1269,50) enn celler eksponert for PAC-1 i 1 time (fluorescenssignal uten bakgrunn = 272) eller 4 timer (fluorescenssignal uten bakgrunn = 845). I den påfølgende caspaseanalysen ble derfor cellene eksponert for 100  $\mu$ M PAC-1 alene eller i kombinasjon med EGF, NGF, caspase-3-inhibitor, caspase-8-inhibitor eller caspase-9-inhibitor i 2 timer før RIPA-buffer og caspase-substrat ble tilsatt. Siden PAC-1 er løst i DMSO, ble celler tilsatt DMSO (0,1 %) brukt som kontroll.

Figur 3.11 a-c og tabell 3.11 viser caspase-3-aktiviteten til cellene målt 24 timer etter tilsetning av RIPA-buffer og caspasesubstrat. Bakgrunnen, i form av fluorescens i eksponerte celler tilsatt caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor, er trukket fra verdiene fra hver enkelt type eksponering. PAC-1 førte til statistisk signifikant økning i caspase-3-aktivitet sammenlignet med DMSO-kontrollen (figur 3.11 a, tabell 3.11). Vekstfaktorene EGF og NGF gitt i tillegg til PAC-1 gav ingen endring i caspaseaktivitet i forhold til PAC-1 (figur 3.11 b, tabell 3.11). Alle de tre caspaseinhibitorene reduserte caspaseaktiviteten induert av PAC-1. Tilsetning av caspase-3-inhibitor og caspase-8-inhibitor reduserte caspaseaktiviteten signifikant i forhold til PAC-1, mens caspase-9-inhibitor viste en tendens til nedsatt caspaseaktivitet (figur 3.11 c, tabell 3.11).





**Figur 3.11 a-c: Caspaseinhibitor reduserer PAC-1-indusert caspaseaktivitet.**

PC12-celler ble splittet ut i hvite 96-brønnersbrett, og inkubert i 48 timer før eksponering for 100  $\mu$ M PAC-1 (figur a), 100  $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF (figur b), eller 100  $\mu$ M PAC-1 + 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor, 20  $\mu$ M caspase-8-inhibitor eller 20  $\mu$ M caspase-9-inhibitor (figur c). Som kontroll ble det brukt celler tilsatt DMSO (0,1 %). Cellene ble eksponert i 2 timer før tilsetning av RIPA-buffer, caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor. Fluorescens ble målt i plateleseren ved 360/465 nm etter 30 minutter, 4 timer og 24 timer. Figuren viser fluorescens målt etter 24 timer etter at bakgrunnen, i form av fluorescens fra eksponerte celler tilsatt caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor, er trukket fra. Resultatene er hentet fra 1 forsøk, hvor antall observasjoner,  $n = 4-8$ . Figuren viser resultatene som gjennomsnitt  $\pm$  SE. \* angir statistisk signifikant forskjell i forhold til DMSO (figur a) og i forhold til PAC-1 (figur c).

**Tabell 3.11 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.11 a-c**

<b>Eksponering</b>	<b>Fluorescens uten bakgrunn</b>	<b>± SE</b>	<b>Bakgrunn</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall forsøk</b>
0,1 % DMSO	1125,25	24,72	500,5	4	1
100 µM PAC-1	1574,38	65,69	522,75	8	1
100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	1521	58,47	514,75	8	1
100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	1473,88	113,39	521,75	8	1
100 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor	833,63	21,65	486	8	1
100 µM PAC-1 + 20 µM caspase-8-inhibitor	935,13	18,61109	545,75	8	1
100 µM PAC-1 + 20 µM caspase-9-inhibitor	1004	35,78644	523,25	8	1

### 3.5 WESTERNBLOTTING

For å kunne studere celledøds mekanismene ved serumdeprivasjon og direkte caspase-3-aktivering, var det ønskelig å undersøke om aktuelle proteiner var uttrykt i cellene og om nivået av disse proteinene endret seg ved eksponering. Westernblotting ble derfor utført på prøver fra PC12-celler og kornceller eksponert for serumfritt medium eller PAC-1.

Det var ønskelig å undersøke i hvilken grad serumdeprivasjon og PAC-1 aktiverer caspase-3. I forsøkene ble det brukt et caspase-3-antistoff som kan påvise både procaspase-3

---

(molekylvekt 35 kDa) og kløyvet caspase-3 (molekylvekt 17 kDa). Dermed kunne man undersøke hvordan nivåene av hel og kløyvet caspase-3 forandrer seg i forhold til hverandre.

En tidligere hovedfagsoppgave (Rimul 2007) har vist at EGF og NGF kan redusere PAC-1-indusert caspaseaktivitet. Disse funnene er forenelige med at fosforylert ERK2 kan fosforylere procaspase-9, og dermed redusere aktivering av caspase-3 (Allan, Morrice et al. 2003). Det ble utført westernblotting med et P-ERK-antistoff for å detektere eventuell fosforylering av ERK1/2 (molekylvekt 44/42 kDa). Ved bruk av dette antistoffet kunne en også undersøke om det går en sløyfe motsatt vei, hvor caspase-3 degraderer ERK. I tillegg ble det forsøkt å bruke et caspase-9-antistoff for å se om nivået av aktivert caspase-9 endret seg tilsvarende. Det ble også utført westernblotting med et ERK2-antistoff for å påvise den totale mengden av fosforylert og ufosforylert ERK2 i celleprøvene. I alle forsøk ble et  $\alpha$ -tubulin-antistoff benyttet som en intern kontroll på proteinmengden i celleprøvene.  $\alpha$ -tubulin har molekylvekt 55 kDa.

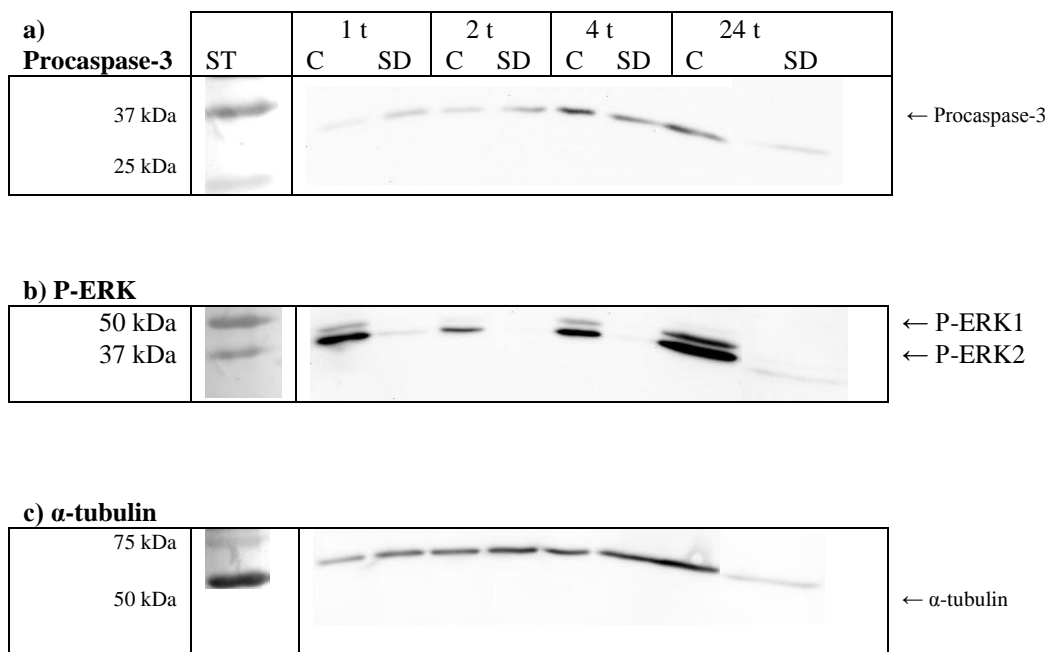
Det lyktes ikke å fremkalle westernbånd for caspase-9, selv i forsøk med økte konsentrasjoner av primær- og sekundærantistoff. Heller ikke bruken av ERK2-antistoff resulterte i westernbånd. Forsøkene med caspase-3-antistoffet gav bare bånd for procaspase-3, uten at kløyvet og aktivert caspase ble detektert. Deteksjon av procaspase-3 kan likevel brukes som et indirekte mål på caspase-3-aktivering, ved at båndstyrken går ned ved aktivering.

### **3.5.1 Westernblotting med proteiner fra serumdepriverte PC12-celler**

Det var interessant å studere tidsforløpet for noen av celledødsprosessene ved å studere hvordan nivåene av de involverte proteinene varierer over tid. PC12-celler ble serumdeprivert i 1 time, 2 timer, 4 timer eller 24 timer før høsting. Westernblottingen detekterte procaspase-3 i prøvene fra både de serumdepriverte og kontrollvaskede cellene (figur 3.12 a). Den semikvantitative analysen av westernbåndene viser at det var mindre procaspase-3 i prøvene fra cellene som hadde blitt serumdeprivert i 4 timer sammenlignet med de vaskede kontrollcellene. Ifølge beregningene steg imidlertid procaspase-3-nivået

kraftig etter 24 timer med serumdeprivasjon (figur 3.13 a, tabell 3.12). Denne målingen er imidlertid basert på et svært svakt  $\alpha$ -tubulin-bånd (figur 3.12 c), hvilket gir stor grad av usikkerhet. Det er derfor nødvendig med flere forsøk for å undersøke om den kraftige økningen av procaspase-3 ved dette tidspunktet er reell.

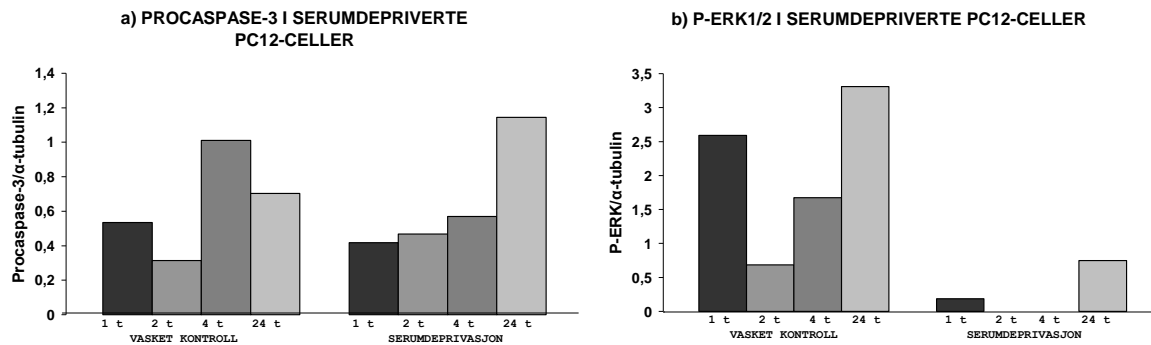
Ifølge resultatene fører serumdeprivasjon til redusert mengde fosforylert ERK allerede etter 1 time, sammenlignet med vasket kontroll. Etter serumdeprivasjon i 2 og 4 timer var ikke nivået av P-ERK lenger detekterbart, mens nivået var høyere igjen etter 24 timer. P-ERK-nivået var også lavere i kontrollvaskede celler høstet etter 2 og 4 timer, mens celler høstet etter 24 timer viste et sterkere proteinbånd for P-ERK (figur 3.12 b, figur 3.13 b og tabell 3.12).



**Figur 3.12 a-c: Serumdeprivasjon (SD) reduserer nivået av P-ERK1/2.**

PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting. Cellene ble deretter vasket to ganger med serumfritt medium, før de ble serumdeprivert. Som kontroll (C) ble det brukt celler som ble vasket to ganger med serumfritt medium og deretter eksponert for medium med serum. Cellene ble eksponert i 1, 2, 4 eller 24 timer før de ble høstet til westernblotting. Etter fremkalling ble samme membran strippet og nytt antistoff tilsatt.

Westernbåndene viser procaspase-3 med molekylvekt 35 kDa (figur a), P-ERK1 og P-ERK2 med molekylvekt 44 kDa og 42 kDa (figur b) og  $\alpha$ -tubulin med molekylvekt 55 kDa (figur c).



**Figur 3.13 a-b: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrkene ved vasket kontroll og serumdeprivasjon.** Styrken på westernbåndene vist i figur 3.12 er målt i antall pixels, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til procaspase-3 og  $\alpha$ -tubulin (figur a) og P-ERK1/2 og  $\alpha$ -tubulin (figur b) etter at bakgrunnen, målt i pixels, er trukket fra. Målingene er basert på 1 forsøk. Figuren viser båndene i en annen rekkefølge enn på bildet av westernbåndene (Figur 3.12 a-b).

**Tabell 3.12 Målinger av båndstyrke (pixels) som ligger til grunn for Figur 3.13**

	Procaspase-3	P-ERK1/2	$\alpha$ -tubulin
Vasket kontroll, 1 t	1140	4300	1641
Vasket kontroll, 2 t	1100	2075	2657
Vasket kontroll, 4 t	3525	5545	3227
Vasket kontroll, 24 t	3075	13190	3996
Serumdeprivasjon, 1 t	1265	700	2399
Serumdeprivasjon, 2 t	1830	-	3355
Serumdeprivasjon, 4 t	2365	-	3686
Serumdeprivasjon, 24 t	1080	780	714
<b>Bakgrunn</b>	263	328	109

### 3.5.2 P-ERK i PC12-celler ved serumdeprivasjon + EGF, NGF eller caspaseinhibitor




Tidligere laboratoriearbeid i forskningsgruppen har vist at caspaseaktivitet øker ved serumdeprivasjon, og at denne økningen i caspaseaktivitet blir blokkert av EGF og NGF

(Rimul 2007). Siden båndet for kløyvet caspase-3 ikke lot seg detektere i prøvene fra serumdepriverte celler (se avsnitt 3.5.1), ble det ikke gjort forsøk med caspase-3-antistoff.




For å undersøke om endringene i P-ERK-nivå etter serumdeprivasjon (figur 3.12 b og figur 3.13 b) skyldtes en caspaseavhengig prosess, ble det utført westernblotting på prøver fra PC12-celler eksponert for serumfritt medium og caspase-3-inhibitor, caspase-8-inhibitor og caspase-9-inhibitor. I tillegg ble det forsøkt å tilsette EGF eller NGF for å se om vekstfaktorene øker nivået av fosforylert ERK ved serumdeprivasjon. Cellene ble vasket to ganger med serumfritt medium før de ble serumdeprivert. Som kontroll ble det derfor brukt celler vasket på tilsvarende måte, før de ble tilsatt nytt PC12-medium med serum. Det ble valgt å eksponere cellene i 4 timer før høsting til westernblotting.

Det ble påvist et svakt proteinbånd for P-ERK i den vaskede kontrollen. I prøven fra de serumdepriverte cellene var P-ERK-båndet fraværende (figur 3.14 a). Dette samsvarer med western-resultatene fra tidsstudien med serumdeprivasjon (figur 3.12 b, figur 3.13 b og tabell 3.12). Et annet forsøk med westernblotting med PC12-celler som var serumdeprivert i 4 timer gav samme resultat (ikke vist). Serumdeprivasjon i kombinasjon med EGF førte til en økning i P-ERK-nivå, mens tilsetning av NGF og caspase-inhibitorer ikke resulterte i westernbånd for P-ERK (figur 3.14 a, figur 3.15 a og tabell 3.13).

## a) P-ERK1/2

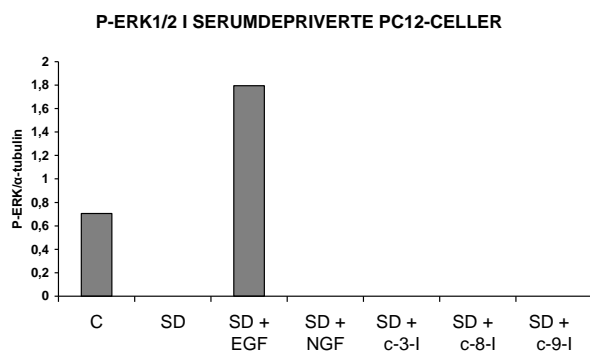
SD		-	+	+	+	+	+	SD	+
EGF		-	-	+	-	-	-	C-9-i	+
NGF		-	-	-	+	-	-		
C-3-i		-	-	-	-	+	-		
C-8-i	ST	-	-	-	-	-	+		
50 kDa 37 kDa								← P-ERK1/2	

b)  $\alpha$ -tubulin

75 kDa 50 kDa								← $\alpha$ -tubulin →	
------------------	---	---	--	--	--	--	--	-----------------------	---

**Figur 3.14 a-b:** Nivået av P-ERK ved serumdeprivasjon (SD) i kombinasjon med EGF, NGF eller caspase-3, -8- eller -9-inhibitor.

PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting. Cellene ble deretter vasket to ganger med serumfritt medium, før de ble eksponert for serumfritt medium alene eller i kombinasjon med 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml NGF, 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor, 20  $\mu$ M caspase-8-inhibitor eller 20  $\mu$ M caspase-9-inhibitor. Som kontroll (C) ble det brukt celler som ble vasket to ganger med serumfritt medium og deretter eksponert for medium med serum. Cellene ble eksponert i 4 timer før de ble høstet til westernblotting. Etter fremkalling ble samme membran strippet og nytt antistoff tilsatt. Westernbåndene viser P-ERK 1 og 2 med molekylvekt 44 kDa og 42 kDa (figur a), og  $\alpha$ -tubulin med molekylvekt 55 kDa (figur b).



**Figur 3.15 Grafisk fremstilling av styrken på westernbåndene.**

Styrken på westernbåndene vist i Figur 3.14 er målt i antall pixels, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til P-ERK (figur 3.14 a) og  $\alpha$ -tubulin (figur 3.14 b). Figuren viser nivået av P-ERK i vasket kontroll (C) og celler eksponert for serumfritt medium (SD) alene eller i kombinasjon med EGF, NGF eller caspase-3-, -8- eller -9-inhibitor i 4 timer før høsting til westernblotting. Målingene er basert på 1 forsøk.

**Tabell 3.13 Målinger av båndstyrke (pixels) som ligger til grunn for Figur 3.15**

	<b>P-ERK1/2</b>	<b><math>\alpha</math>-tubulin</b>
Vasket kontroll	640	906
Serumdeprivasjon	-	866
Serumdeprivasjon + 5 ng/ml EGF	1540	858
Serumdeprivasjon + 50 ng/ml NGF	-	688
Serumdeprivasjon + 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	-	628
Serumdeprivasjon + 10 $\mu$ M caspase-8-inhibitor	-	640
Bakgrunn	247	232
Serumdeprivasjon + 10 $\mu$ M caspase-9-inhibitor	-	1329
<b>Bakgrunn</b>	499	108

### 3.5.3 Westernblotting med proteiner fra PC12-celler eksponert for PAC-1

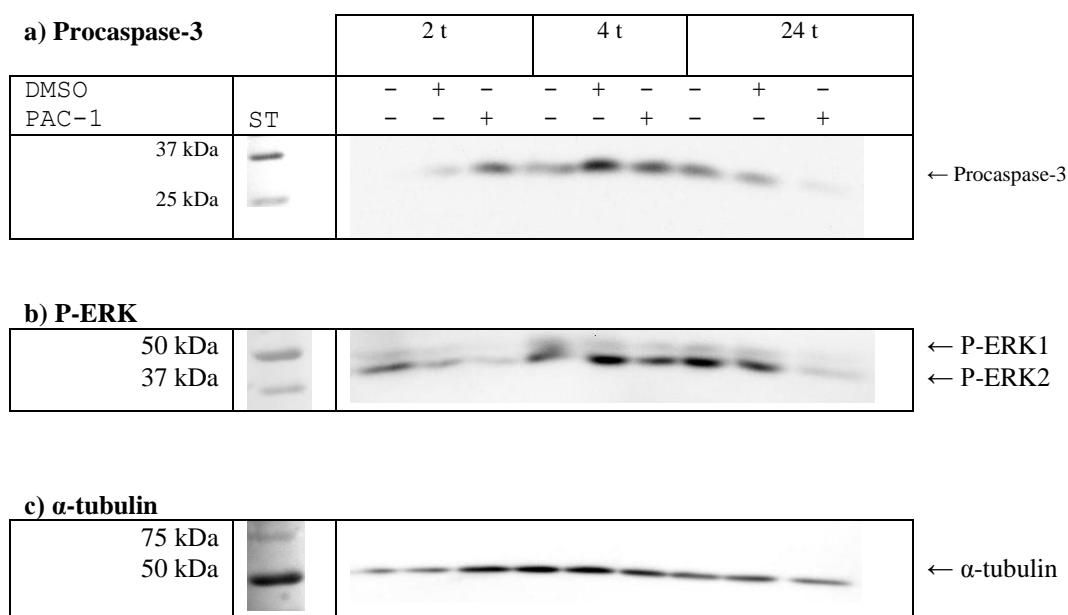
Det var ønskelig å studere tidsforløpet for kløyving av procaspase-3 til aktiv caspase-3 etter tilsetning av PAC-1, siden den er en direkte caspase-3-aktivator. For å undersøke en mulig caspase-3-mediert degradering av ERK, var det også ønskelig å studere endringer i nivået av P-ERK over tid. PC12-celler ble derfor eksponert for 100  $\mu$ M PAC-1 i 1 ½ time, 2 timer, 4 timer og 24 timer før de ble høstet, og brukt til westernblotting med caspase-3-antistoff og P-ERK-antistoff. Som kontroll ble det brukt celler som ble satt ut i LAF-benken mens de andre cellene ble behandlet. I tillegg ble det brukt kontrollceller tilsatt DMSO (0,1 %).

Verken celleprøvene som ble høstet etter 1½ time eller kontrollen som ble høstet etter 2 timer resulterte i westernbånd, og det så ut som at bare halve båndet for DMSO-kontrollen høstet etter 2 timer var kommet med. Sannsynlige årsaker er luftbobler på membranen eller at proteinene ikke har blitt over. Resultatene viste ellers forekomst av procaspase-3 i samtlige celleprøver (figur 3.16 a). Ifølge den semikvantitative analysen av westernbåndene varierte nivået av procaspase over tid, både i de to ulike kontrollene og i de PAC-1-eksponerte cellene. Fremstillingen tyder på at PAC-1 fører til reduksjon av procaspase-3



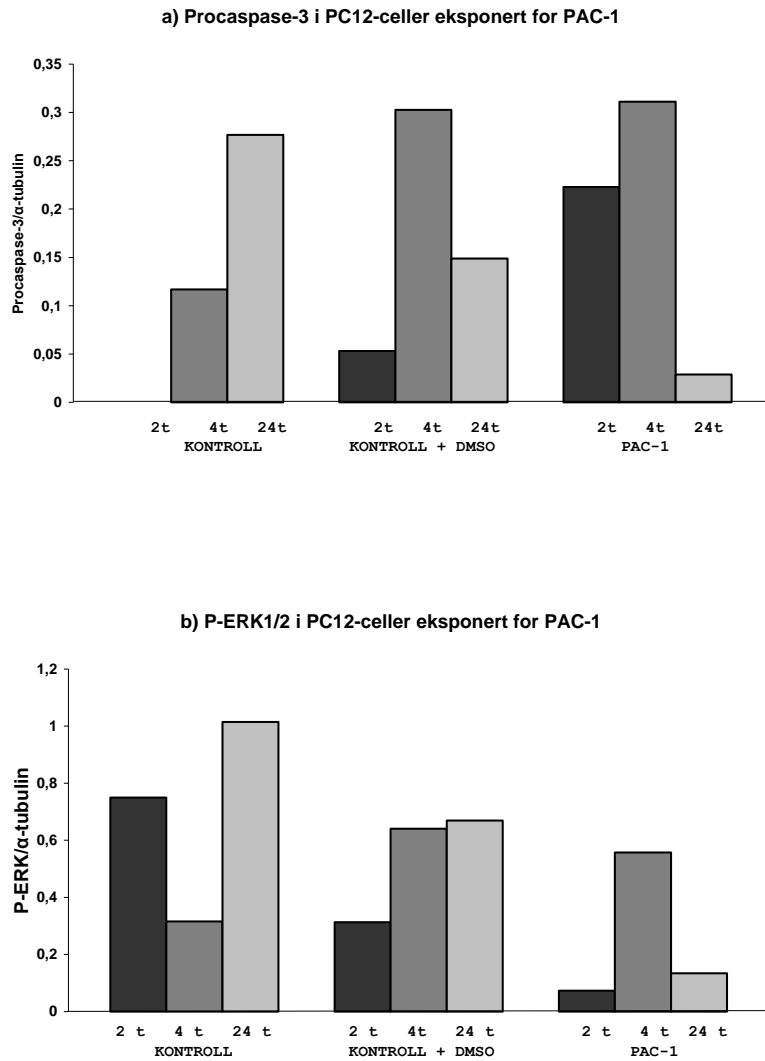
først etter 24 timer (figur 3.17 a og tabell 3.14). Siden alle de tre antistoffene som ble brukt gav svakere bånd ute på sidene av membranen, kan det ikke utelukkes at variasjonene skyldes feilkilder i forsøket og ikke gjenspeiler reelle endringer i proteininnhold. Det er derfor nødvendig å gjenta forsøket for å kunne sannsynliggjøre den mulige effekten av PAC-1 etter 24 timer.

Westernblotting med P-ERK-antistoff viste at nivået av fosforylert ERK varierte over tid. Cellene som var eksponert for PAC-1 viste en tendens til å uttrykke mindre P-ERK enn kontrollene ved alle eksponeringstidspunktene (figur 3.16 b). Den grafiske fremstillingen av båndstyrkene i forhold til  $\alpha$ -tubulin (figur 3.16 c), viser at nivået av P-ERK er spesielt lavt etter eksponering for PAC-1 i 2 og 24 timer, mens nedgangen er mer beskjeden etter eksponering i 4 timer (figur 3.17 b og tabell 3.14). Siden westernblottingen bare er utført en gang, er det nødvendig med flere forsøk for å kunne fastslå om nedgangen i nivået av P-ERK er reell.



**Figur 3.16 a-c: Effekt av PAC-1 på nivået av procaspase-3 og P-ERK.**

PC12-celler ble dyrket i 48 timer før tilsetning av 100  $\mu$ M PAC-1. Som kontroll ble det brukt celler oppbevart i LAF-benken mens de andre celledskålene ble behandlet, og celler tilsatt DMSO (0,1 %). Cellene ble eksponert i 2, 4 eller 24 timer før de ble høstet til westernblotting. Etter fremkalling ble samme membran strippet og nytt antistoff tilsatt. Westernbåndene viser procaspase-3 med molekylvekt 35 kDa (figur a), P-ERK1 og 2 med molekylvekt 44 kDa og 42 kDa (figur b) og  $\alpha$ -tubulin med molekylvekt 55 kDa (figur c).



**Figur 3.17 a-b: Grafisk fremstilling av styrken på westernbåndene.**

Styrken på westernbåndene vist i figur 3.14 er målt i antall pixels, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til procaspase-3 og  $\alpha$ -tubulin (figur a) og mellom P-ERK og  $\alpha$ -tubulin (figur b). Målingene er basert på 1 forsøk. Figuren viser båndene i en annen rekkefølge enn på bildet av westernbåndene (Figur 3.16 a-c).

**Tabell 3.14 Målinger av båndstyrke (pixels) som ligger til grunn for Figur 3.17**

	Procaspase-3	P-ERK1/2	$\alpha$ -tubulin
Kontroll, 2 t	-	994	1132
Kontroll, 4 t	552	1020	2488
Kontroll, 24 t	606	1476	1366
Kontroll med DMSO (0,1 %), 2 t	342	634	1274
Kontroll med DMSO (0,1 %), 4 t	930	1664	2336
Kontroll med DMSO (0,1 %), 24t	472	1140	1462
100 $\mu$ M PAC-1, 2 t	692	434	2032
100 $\mu$ M PAC-1, 4 t	760	1150	1732
100 $\mu$ M PAC-1, 24 t	314	434	1206
<b>Bakgrunn</b>	285	300	207

### 3.5.4 P-ERK i PC12-celler eksponert for PAC-1 + EGF, NGF og caspaseinhibitorer

Siden eksponering for PAC-1 viste små endringer i nivået av procaspase-3 (figur 3.16 a, figur 3.17 a og tabell 3.14), og det ikke ble detektert bånd for kløyvet caspase-3 (se avsnitt 3.5.3), ble det ikke utført videre forsøk med procaspase-3-antistoff på prøver fra PAC-1-eksponerte celler.

Westernblotting ble brukt for å undersøke om vekstfaktorer kan føre til økt fosforylering av ERK i nærvær av PAC-1. Som tidligere nevnt var det også interessant å undersøke om caspase-3 kan degradere ERK. Det var derfor naturlig å undersøke om caspase-inhibitorer beskytter mot en eventuell PAC-1-indusert reduksjon av fosforylert ERK. PC12-celler ble eksponert for PAC-1 alene eller i kombinasjon med 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml NGF, 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor, 20  $\mu$ M caspase-8-inhibitor eller 20  $\mu$ M caspase-9-inhibitor i 4 timer før høsting til westernblotting. Som kontroll ble det brukt celler oppbevart i LAF-benken mens de andre cellene ble behandlet, og celler tilsatt EGF, NGF, caspase-3-inhibitor, caspase-8-inhibitor eller caspase-9-inhibitor i de samme konsentrasjonene som i PAC-1-skålene.

Westernblottingen påviste proteinbånd for P-ERK i cellene tilsatt EGF, men ikke i noen av de andre kontrollene. Blant de PAC-1-eksponerte cellene ble det funnet fosforylert ERK i cellene tilsatt henholdsvis EGF og NGF (figur 3.18 a). Den semikvantitative analysen viser at nivået av P-ERK er lavere i cellene eksponert for PAC-1 og EGF eller NGF (Figur 3.19 b og tabell 3.15) enn i kontrollen med EGF (Figur 3.19 a og tabell 3.15).

#### a) P-ERK

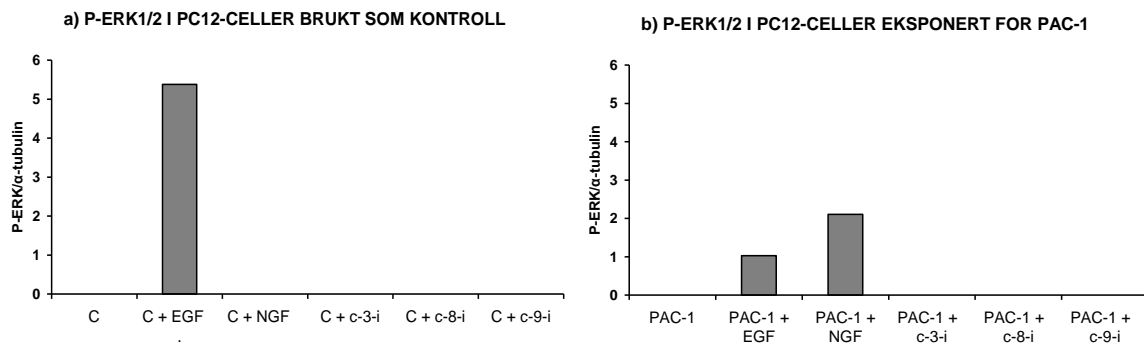
PAC-1		-	-	-	-	-	-	+	+	+	PAC-1	+	+	+
EGF		-	+	-	-	-	-	-	+	-				
NGF		-	-	+	-	-	-	-	-	+				
C-3-i		-	-	-	+	-	-	-	-	-	C-3-i	+	-	-
C-8-i		-	-	-	-	+	-	-	-	-	C-8-i	-	+	-
C-9-i		-	-	-	-	-	+	-	-	-	C-9-i	-	-	+
	ST													
50 kDa											-P-ERK1			
37 kDa											-P-ERK2			

#### b) $\alpha$ -tubulin

75 kDa											A-tubulin	
50 kDa												

**Figur 3.18 a-b:** Nivået av P-ERK ved eksponering for PAC-1 i kombinasjon med vekstfaktorer og caspase-inhibitorer.

PC12-celler ble dyrket i 48 timer før tilsetning av 100  $\mu$ M PAC-1 alene eller i kombinasjon med 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml NGF, 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor, 20  $\mu$ M caspase-8-inhibitor eller 20  $\mu$ M caspase-9-inhibitor. Som kontroll ble det brukt celler som ble oppbevart i LAF-benken mens de andre cellene ble behandlet, og celler tilsatt EGF, NGF eller caspase-3-, -8- eller -9-inhibitor. Cellene ble eksponert i 4 timer før de ble høstet til westernblotting. Etter fremkalling ble samme membran strippet og nytt antistoff tilsatt. Westernbåndene viser P-ERK1 og 2 med molekylvekt 44 kDa og 42 kDa (figur a) og  $\alpha$ -tubulin med molekylvekt 55 kDa (figur b).



**Figur 3.19 a-b:** Grafisk fremstilling av styrken på westernbåndene.

Styrken på westernbåndene vist i figur 3.18 **Error! Reference source not found.** er målt i antall pixels, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til P-ERK (figur 3.18 a) og  $\alpha$ -tubulin (figur 3.18 b) i kontrollene (figur a) og de PAC-1-eksponerte cellene (figur b). Som kontroll (C) ble det brukt celler som ble satt ut i LAF-benken mens cellene til PAC-1-eksponering ble behandlet, og celler tilsatt EGF, NGF, caspase-3-inhibitor, caspase -8-inhibitor eller caspase-9-inhibitor. Figuren er basert på resultatene fra 1 forsøk.

**Tabell 3.15 Målinger av båndstyrke (pixels) som ligger til grunn for Figur 3.19**

	<b>P-ERK1/2</b>	<b><math>\alpha</math>-tubulin</b>
Kontroll	-	1356
Kontroll med 5 ng/ml EGF	5326	1162
Kontroll med 50 ng/ml NGF	-	1026
Kontroll med 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	-	692
Kontroll med 10 $\mu$ M caspase-8-inhibitor	-	830
Kontroll med 10 $\mu$ M caspase-9-inhibitor	-	1040
100 $\mu$ M PAC-1	-	940
100 $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF	1068	936
100 $\mu$ M PAC-1 + 50 ng/ml NGF	1836	944
100 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	-	940
100 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M caspase-8-inhibitor	-	936
100 $\mu$ M PAC-1 + 10 $\mu$ M caspase-9-inhibitor	-	944
<b>Bakgrunn</b>	348	237

### 3.5.5 Westernblotting med proteiner fra kornceller eksponert for PAC-1

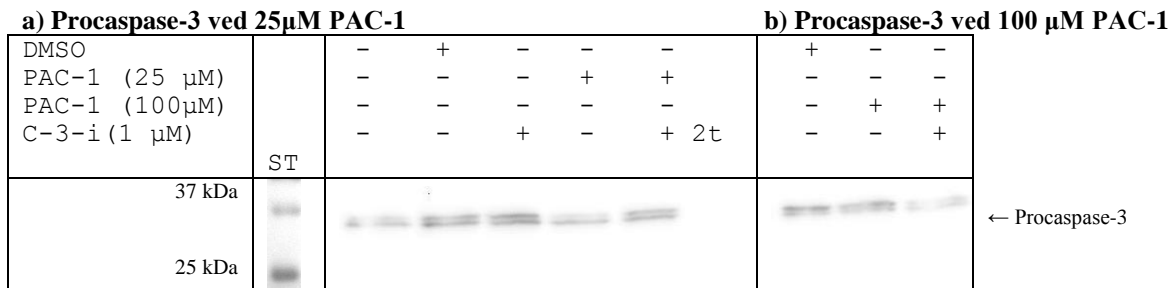
Kornceller fra rotte ble brukt i westernblotting for å gjøre ytterligere studier av caspase-3 sin rolle i celledød, og eventuell "crosstalk" til ERK. Westernblotting med PC12-celler eksponert for PAC-1 resulterte ikke i proteinbånd for kløvet caspase-3 (avsnitt 3.5.3). I forsøkene med kornceller ble det valgt å bruke en høyere konsentrasjon av PAC-1 (100  $\mu$ M) i håp om å oppnå detekterbare nivåer av kløvet caspase-3. For å videreføre studiene av celledød i kornceller, ble det også valgt å bruke en lavere konsentrasjon av PAC-1 (25  $\mu$ M) og caspase-3-inhibitor tilsatt etter 15 minutter og 2 timer. Siden PAC-1 er løst i DMSO, ble celler tilsatt DMSO i samme volum som PAC-1 brukt til eksponering (0,1 % eller 0,25 %) benyttet som en av kontrollene. Cellene ble inkubert i 4 timer før de ble høstet til westernblotting. P-ERK-antistoff ble bare benyttet på forsøksserien med 25  $\mu$ M PAC-1,

mens ERK2-antistoff og procaspase-3-antistoff ble brukt på alle celleprøvene bortsett fra celler eksponert for 25  $\mu\text{M}$  PAC-1 alene. I tillegg ble et  $\alpha$ -tubulin-antistoff brukt som intern standard.

Forsøket resulterte ikke i proteinbånd for kløyvet caspase-3. Procaspase-3 ble imidlertid påvist i alle celleprøver (figur 3.20 a og b). For å prøve å få proteinbånd for aktivert caspase-3 ble det utført westernblotting med et annet caspase-antistoff (Anti-Caspase-3 Rabbit pAb), men heller ikke da ble det oppnådd bånd for kløyvet caspase-3 (ikke vist). Heller ikke forsøkene med ERK2-antistoff resulterte i proteinbånd.

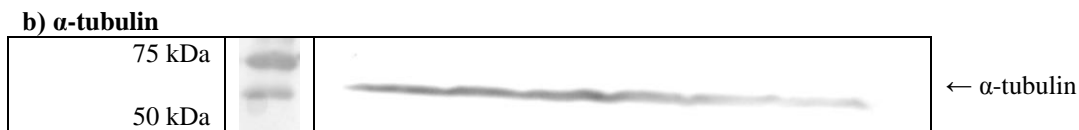
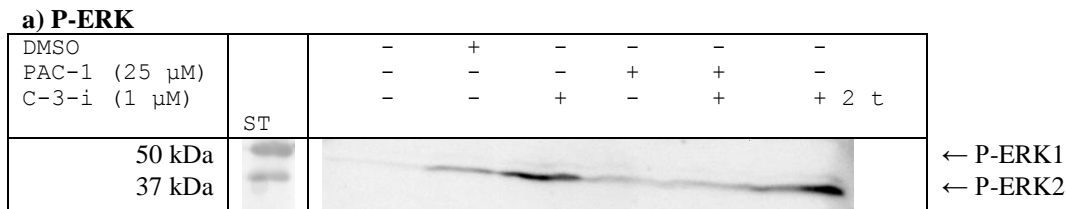
Styrken til procaspase-3-båndene ble beregnet uavhengig av  $\alpha$ -tubulin, fordi det ikke ble funnet bånd for tubulin i alle prøvene (trolig på grunn feilkilder slik som luftbobler på membranen). Den semikvantitative analysen av båndstyrkene (figur 3.22 a-b og tabell 3.16) bekrefter det visuelle inntrykket av westernbåndene. Ifølge analysen var proteinbåndet for procaspase-3 svakere ved eksponering for 25  $\mu\text{M}$  PAC-1 sammenlignet med DMSO-kontrollen. Tilsetning av caspase-3-inhibitor 2 timer etter PAC-1 førte til sterkere proteinbånd for procaspase-3 (figur 3.22 a og tabell 3.16). Bruk av 100  $\mu\text{M}$  PAC-1 førte til mindre procaspase-3 sammenlignet med kontrollen. Tilsetning av caspase-3-inhibitor reduserte nivået av procaspase-3 ytterligere (figur 3.22 b og tabell 3.17).

Bruk av P-ERK-antistoff resulterte i proteinbånd i alle celleprøvene (figur 3.21 a). Grafisk fremstilling av forholdet mellom båndstyrkene til P-ERK (figur 3.21 a) og  $\alpha$ -tubulin (figur 3.21 b) viser at mengden fosforylert ERK er høyere i kontrollen med caspase-3-inhibitor enn i de to andre kontrollene (figur 3.22 c og tabell 3.18). I de PAC-1-eksponerte cellene gav også caspase-3-inhibitor økt P-ERK-nivå i forhold til PAC-1 alene. Cellene hvor caspase-3-inhibitor ble tilsatt 2 timer etter PAC-1 hadde aller høyest nivå av P-ERK (figur 3.22 c og tabell 3.18). Proteinbåndet for  $\alpha$ -tubulin var imidlertid svakere for denne prøven sammenlignet med båndene for de andre celleprøvene. Beregningen av båndstyrken blir dermed mer usikker, slik at økningen i P-ERK-nivå kanskje ikke er fullt så stor som figur 3.22 c gir uttrykk for.



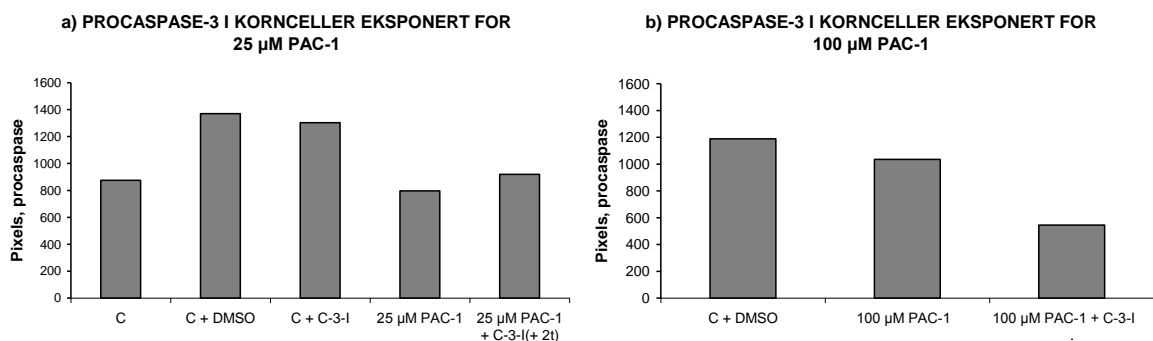
**Figur 3.20 Caspase-3-inhibitor tilsatt 2 timer etter PAC-1 fører til økt nivå av procaspase-3.**

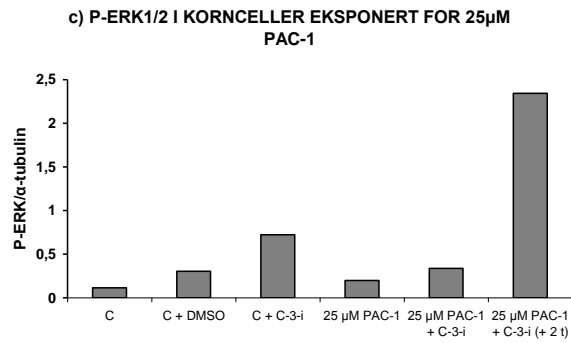
Kornceller fra rotte ble preparert og inkubert i 7 døgn før de ble eksponert. Figur a viser westerblotting med prøver fra celler tilsatt 25 µM PAC-1 og 25 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor tilsatt etter 2 timer. Som kontroll ble det brukt celler som ble oppbevart i LAF-benken mens de andre celleskålene ble behandlet, celler tilsatt DMSO (0,25 %) og celler tilsatt caspase-3-inhibitor. Figur b viser celler tilsatt DMSO (0,1 %), celler eksponert for 100 µM PAC-1 og celler tilsatt 100 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor. Cellene ble høstet til westernblotting etter 4 timer med inkubering. Westernbåndene viser procaspase-3 (35 kDa).



**Figur 3.21 a-b: Caspase-3-inhibitor øker nivået av P-ERK.**

Westernblotting ble utført med de samme celleprøvene som ligger til grunn for resultatene vist i Figur 3.20 a, men på en ny gel. Kornceller fra rotte ble preparert og inkubert i 7 døgn, før de ble tilsatt PAC-1. To av skålene ble i tillegg tilsatt caspase-3-inhibitor etter henholdsvis 0 og 2 timer. Som kontroll ble det brukt celler som ble oppbevart i LAF-benken mens de andre celleskålene ble behandlet, celler tilsatt DMSO (0,25 %) og celler tilsatt caspase-3-inhibitor. Cellene ble høstet til westernblotting etter 4 timer med inkubering. Etter fremkalling ble membranene strippet og nytt antistoff tilsatt. Westernbåndene viser P-ERK1 og 2 med molekylvekt 44 kDa og 42 kDa (figur a) og α-tubulin med molekylvekt 55 kDa (figur b).





**Figur 3.22 Grafisk fremstilling av styrken på westernbåndene.**

Styrken på westernbåndene vist i Figur 3.20 og Figur 3.21 er målt i antall pixels og fremstilt grafisk. Figur a viser styrken til proteinbånd for procaspase-3 i celler brukt som kontroll og celler eksponert for 25  $\mu$ M alene eller sammen med 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. Figur b viser kontrollceller tilsatt DMSO (0,25%) og celler tilsatt 100  $\mu$ M PAC-1 alene eller sammen med caspase-3-inhibitor. Figur c viser ratioen mellom båndstyrken til P-ERK og  $\alpha$ -tubulin i celler brukt som kontroll og celler eksponert for 25  $\mu$ M PAC-1 alene eller sammen med caspase-3-inhibitor. Hver av de tre figurene er basert på resultatene fra 1 forsøk, hvorav figur a og b bygger på funn i de samme celleprøvene.

**Tabell 3.16 Målinger av båndstyrke (pixels) som ligger til grunn for Figur 3.22 a**

	Procaspase-3
Kontroll	1004
Kontroll med DMSO (0,25 %)	1500
Kontroll med 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	1433
25 $\mu$ M PAC-1	926
25 $\mu$ M PAC-1+ 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor (+ 2 t)	1049
<b>Bakgrunn</b>	129

**Tabell 3.17 Målinger av båndstyrke (pixels) som ligger til grunn for Figur 3.22 b**

	Procaspase-3
Kontroll med DMSO (0,1 %)	1318
100 $\mu$ M PAC-1	1164
100 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	674
<b>Bakgrunn</b>	129



**Tabell 3.18 Målinger av båndstyrke (pixels) som ligger til grunn for Figur 3.22 c**

	<b>P-ERK1/2</b>	<b><math>\alpha</math>-tubulin</b>
Kontroll	596	1284
Kontroll med DMSO (0,1 %)	756	1288
Kontroll med 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	1212	1428
25 $\mu$ M PAC-1	652	1212
25 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor	680	980
25 $\mu$ M PAC-1+ 1 $\mu$ M caspase-3-inhibitor (+ 2 t)	1508	872
<b>Bakgrunn</b>	499	441

### 3.6 KVANTIFISERING AV UTLØPERE I PAC-1-EKSPONERTE PC12-CELLER

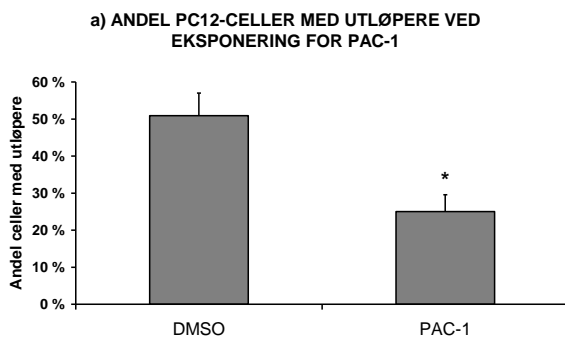
Under kvantifiseringen av celledød i PC12-celler (se avsnitt 3.1.2) ble det observert morfologiske forskjeller mellom de levende cellene i kontrollskålene og skålene tilsatt serumfritt medium eller PAC-1. Det var ønskelig å følge opp disse funnene for å finne ut om caspase-3-aktivering fører til tilbaketrekning av celleutløpere uavhengig av celledød. I tillegg var det interessant å undersøke om vekstfaktorer eller caspaseinhibitorer kan beskytte celler mot slike endringer. Antall celler med og uten utløpere ble talt. I tillegg var det interessant å studere cellene med utløpere nærmere for å finne ut om lengden på utløperne og antall utløpere per celle varierte avhengig av behandling.

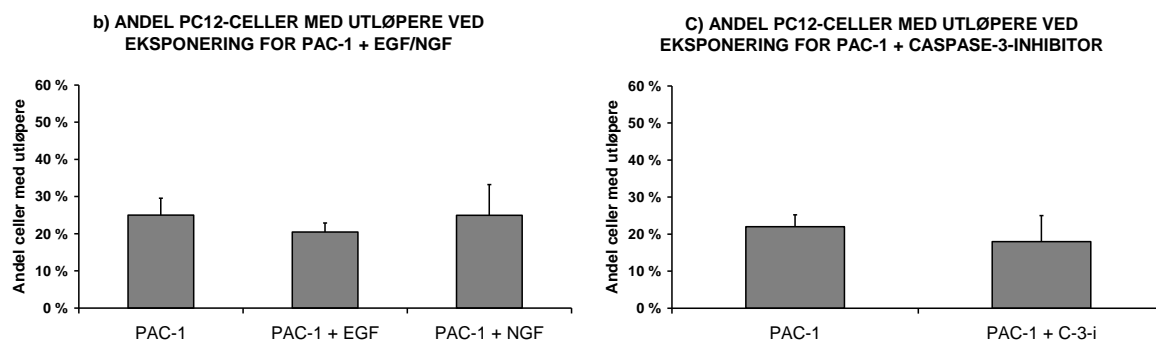
PC12-celler ble inkubert i 48 timer før de ble eksponert for 100  $\mu$ M PAC-1 alene eller i kombinasjon med 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml NGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. Som kontroll ble det brukt celler satt ut i LAF-benken mens de andre skålene ble behandlet, celler tilsatt DMSO (0,1 %) og celler tilsatt vekstfaktorer eller caspase-3-inhibitor i samme konsentrasjon som i de PAC-1-eksponerte celledålene. Etter eksponering i 24 timer ble cellene farget med trypanblå og celleutløpere studert i mikroskop. Ettersom det ikke ble funnet noen døde (blå) celler med utløpere, ble bare levende (ufargede) celler talt.

Resultatene fra de tre målte parametrene bygger på observasjoner fra de samme cellene. Eksempler på celler som inngikk i forsøkene er vist i Figur 3.26.

### 3.6.1 Andel PC12-celler med celleutløpere

Antall levende celler med og uten celleutløpere ble talt, og prosentandel celler med utløpere ble beregnet ut fra det totale antallet levende celler. Eksponering for PAC-1 gav statistisk signifikant reduksjon i antall celler med utløpere sammenlignet med celler tilsatt DMSO (figur 3.23 a og tabell 3.19). Verken tilsetning av EGF, NGF eller caspase-3-inhibitor endret andel celler med utløpere signifikant i forhold til eksponering for PAC-1 alene (figur 3.23 b-c, tabell 3.19 og 3.20). Det var ingen statistisk signifikant forskjell i andel celler med utløpere i skålen tilsatt DMSO og de andre kontrollskålene (ikke vist).





**Figur 3.23 a-c: EGF, NGF og caspase-3-inhibitor beskytter ikke mot PAC-1-indusert reduksjon av antall PC12-celler med utløpere.**

PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting. Cellene ble deretter eksponert for 100  $\mu\text{M}$  PAC-1 (figur a), 100  $\mu\text{M}$  PAC-1 i kombinasjon med 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF (figur b) eller 100  $\mu\text{M}$  PAC-1 i kombinasjon med 1  $\mu\text{M}$  caspase-3-inhibitor (figur c). Som kontroll ble det brukt celler oppbevart i LAF-benken mens de andre skålene ble behandlet, celler tilsatt EGF, NGF eller caspase-3-inhibitor (ikke vist) og celler tilsatt DMSO (0,1 %). Etter 24 timer med eksponering ble cellene farget med trypanblå, og antall levende celler med og uten celleutløpere talt. I figuren er antall levende celler med celleutløpere oppgitt som prosent av det totale antallet levende celler. Resultatene er hentet fra 5-6 uavhengige forsøk, og uttrykt som gjennomsnitt  $\pm$  SE, hvor  $n = 5-6$ .

**Tabell 3.19 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.23 a-b**

Eksponering	% Celler med utløpere	$\pm$ SE	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
DMSO (0,1 %)	50,88	6,12	6	6
100 $\mu\text{M}$ PAC-1	24,99	4,56	6	6
100 $\mu\text{M}$ PAC-1 + 5 ng/ml EGF	20,46	2,46	6	6
100 $\mu\text{M}$ PAC-1 + 50 ng/ml NGF	24,96	8,27	6	6

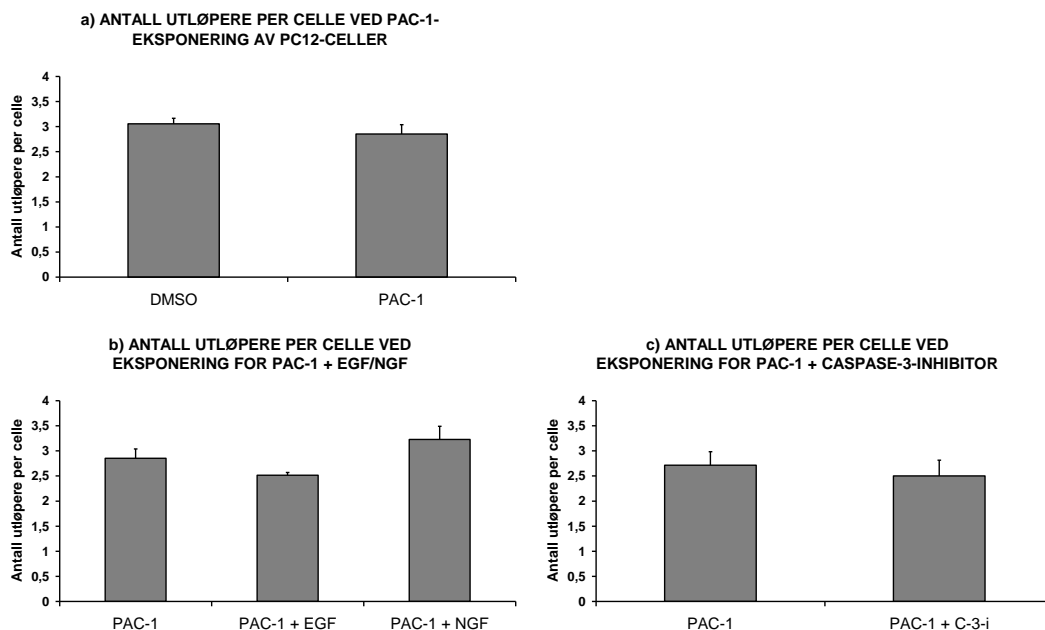
**Tabell 3.20 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.23 c**

Eksponering	% Celler med utløpere	$\pm$ SE	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
100 $\mu\text{M}$ PAC-1	21,59	3,21	4	4
100 $\mu\text{M}$ PAC-1 + 1 $\mu\text{M}$ caspase-3-inhibitor	18,01	6,99	4	4

### 3.6.2 Antall celleutløpere per PC12-celle

De levende cellene med celleutløpere ble studert nærmere. Antall utløpere på hver av dem ble talt, og gjennomsnittlig antall utløpere per celle ble beregnet. Cellene uten utløpere ble ikke tatt med i beregningene.

Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom hvor mange utløpere hver celle med utløpere hadde i celleskålene tilsatt henholdsvis PAC-1 og DMSO (figur 3.24 a og tabell 3.21). Eksponering for PAC-1 sammen med EGF, NGF eller caspase-3-inhibitor førte ikke til signifikant endring i antall celleutløpere per celle med utløpere (figur 3.24 b-c, tabell 3.21 og tabell 3.22). Det var heller ikke statistisk signifikant forskjell mellom cellene eksponert for DMSO og cellene i de andre kontrollskålene (ikke vist).



**Figur 3.24 a-c: PAC-1 reduserer ikke antall utløpere per celle i andelen PC12-celler med utløpere.** PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting, før de ble eksponert for 100  $\mu$ M PAC-1 (figur a), 100  $\mu$ M PAC-1 i kombinasjon med 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF (figur b) eller 100  $\mu$ M PAC-1 i kombinasjon med 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor (figur c). Som kontroll ble det brukt celler satt ut i LAF-benken mens de andre cellene ble behandlet, celler tilsatt EGF, NGF og caspase-3-inhibitor (ikke vist) og celler tilsatt DMSO (0,1 %). Etter 24 timer med eksponering, ble cellene farget med trypanblå og levende celler med utløpere studert i mikroskop. Antall utløpere på hver av cellene med celleutløpere ble talt. Figuren viser gjennomsnitt  $\pm$  SE. Resultatene er hentet fra 4-7 uavhengige forsøk. Totalt antall observasjoner, n = 4-7. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom eksponeringene.

**Tabell 3.21 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.24 a-b**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig antall utløpere per celle med utløpere</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
DMSO (0,1 %)	3,06	0,11	7	7
100 µM PAC-1	2,85	0,19	7	7
100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	2,51	0,06	7	7
100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	3,23	0,26	7	7

**Tabell 3.22 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.24 c**

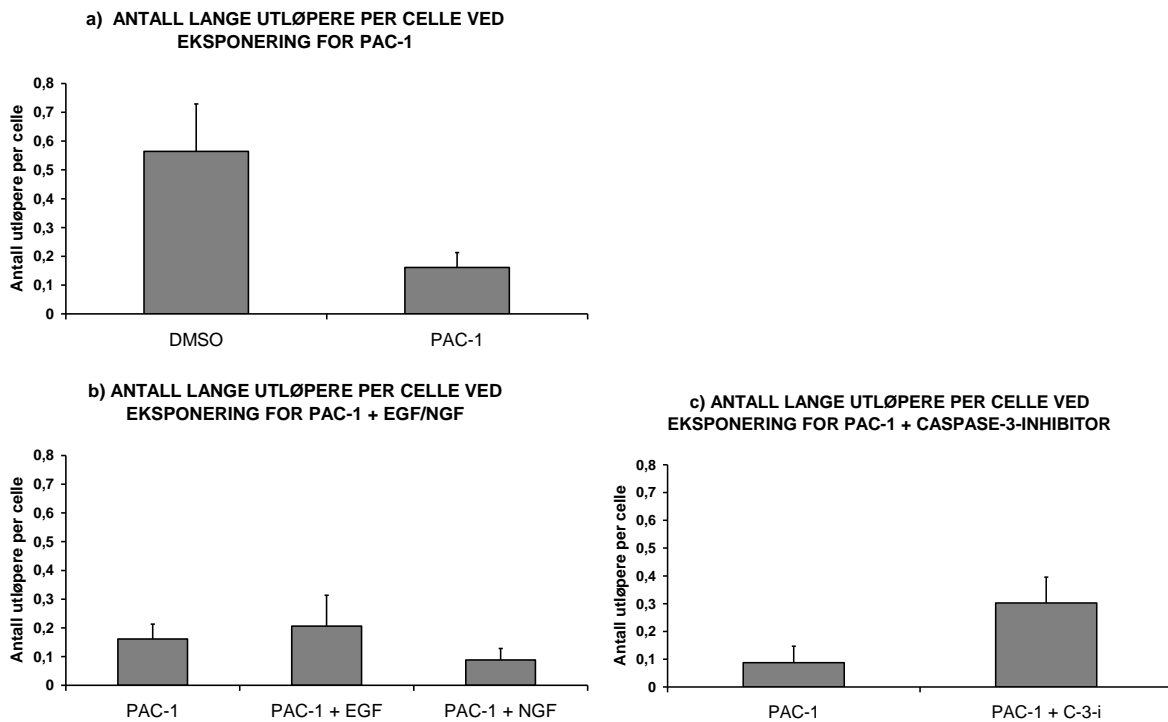
<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig antall utløpere per celle med utløpere</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
100 µM PAC-1	2,72	0,27	4	4
100 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor	2,50	0,31	4	4

### 3.6.3 Lengden på celleutløpere i PC12-celler

Lengden på celleutløpere ble estimert i forhold til cellediameteren. Bare celler med utløpere ble studert, mens cellene uten utløpere ble ignorert. Lange utløpere ble definert som utløpere lengre enn cellens diameter, mens utløpere med lengde under cellediameteren ble regnet som korte. Lengden til hver utløper ble vurdert. Deretter ble antall lange utløpere dividert på totalt antall celler med utløpere.

Resultatene viser at PAC-1 har en tendens til å gi færre lange utløpere per celle sammenlignet med cellene tilsatt DMSO, men denne effekten var ikke statistisk signifikant (figur 3.25 a og tabell 3.23). Tilsetning av vekstfaktorene EGF og NGF førte ikke til signifikant endring i andel lange utløpere sammenlignet med eksponering for PAC-1 alene

(figur 3.25 b og tabell 3.23). Eksponering for caspase-3-inhibitor sammen med PAC-1 viste en tendens til å øke andelen lange utløpere per celle i forhold til PAC-1, men denne endringen var heller ikke statistisk signifikant (figur 3.25 c og tabell 3.24). Det var ingen signifikant forskjell mellom kontrollskålene med DMSO, EGF, NGF, caspase-3-inhibitor eller kontrollskålen oppbevart i LAF-benken mens behandlingen av de andre cellene pågikk (ikke vist).



**Figur 3.25 a-c: Caspase-3-inhibitor viser en tendens til å øke antall lange utløpere ved PAC-1-eksponering.**

PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting. Cellene ble deretter eksponert for 100  $\mu$ M PAC-1 (figur a), 100  $\mu$ M PAC-1 i kombinasjon med 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF (figur b) eller 100  $\mu$ M PAC-1 i kombinasjon med 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. Som kontroll ble det brukt celler satt ut i LAF-benken mens de andre cellene ble behandlet, celler tilsatt EGF, NGF eller caspase-3-inhibitor (ikke vist) og celler tilsatt DMSO (0,1 %) Etter 24 timer med eksponering, ble cellene farget med trypanblå og levende celler med utløpere studert i mikroskop. Lange utløpere ble definert som utløpere lengre enn cellediameteren. Antall lange utløpere ble talt, og gjennomsnittlig antall per celle med utløpere ble beregnet. Figuren viser gjennomsnittlig antall lange utløpere per celle med utløpere. Resultatene er hentet fra uavhengige forsøk, og uttrykt som gjennomsnitt  $\pm$  SE, hvor  $n = 4-7$ . Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom eksponeringene.

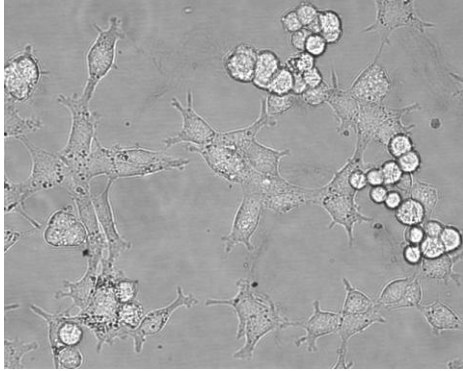
**Tabell 3.23 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.25 a-b**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig antall utløpere med lengde &gt; cellediameteren per celle</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
DMSO (0,1 %)	0,56	0,17	7	7
100 µM PAC-1	0,16	0,05	7	7
100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	0,21	0,11	7	7
100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	0,09	0,04	7	7

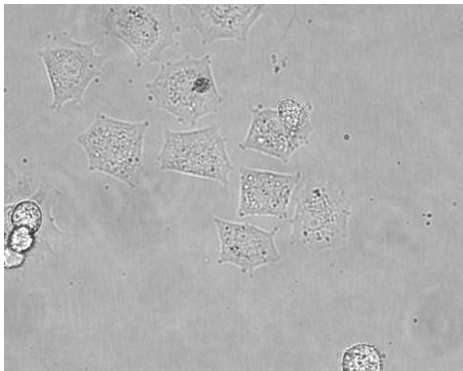
**Tabell 3.24 Tallmateriale som ligger til grunn for Figur 3.25 c**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig antall utløpere med lengde &gt; cellediameteren per celle</b>	<b>± SE</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
100 µM PAC-1	0,0875	0,059073	4	4
100 µM PAC-1 + 1 µM caspase-3-inhibitor	0,30	0,09	4	4

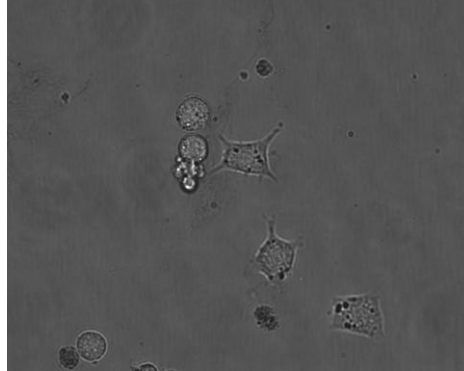
a) DMSO



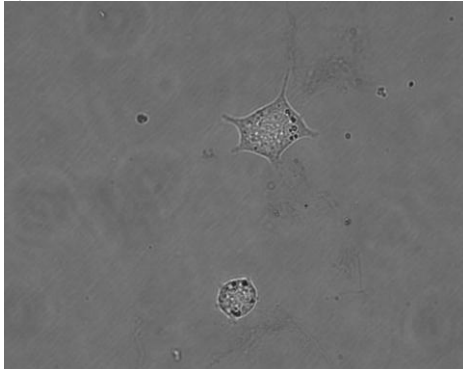
b) PAC-1



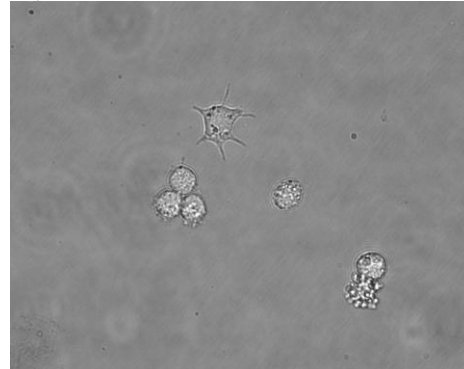
c) PAC-1 + EGF



d) PAC-1 + NGF



e) PAC-1 + c-3-i



**Figur 3.26 a-c: Eksponering for PAC-1 reduserer andel PC12-celler med utløpere.**

PC12-celler ble inkubert i 48 timer etter splitting. Cellene som skulle brukes til kontroll ble tilsatt 0,1 % DMSO (figur a), mens de andre cellene ble tilsatt 100  $\mu$ M PAC-1 (figur b), 100  $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF (figur c), 100  $\mu$ M PAC-1 + 50 ng/ml NGF (figur d) eller 100  $\mu$ M PAC-1 + 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor (figur e). I tillegg ble det brukt kontroller tilsatt EGF, NGF, caspase-3-inhibitor og celler oppbevart i LAF-benken mens de andre cellene ble behandlet (ikke vist). Etter eksponering i 24 timer ble cellene farget med trypanblå, antall levende celler med og uten utløpere ble talt. I tillegg ble cellene med utløpere studert videre, og antall utløpere per celle og antall utløper lengre enn cellediameteren per celle ble talt. Fasekontrastbildene viser eksempler på celler som ligger til grunn for resultatene vist i Figur 3.23 - Figur 3.25 og Tabell 3.19-Tabell 3.24.



## 4. DISKUSJON

### 4.1 DISKUSJON AV METODER

#### 4.1.1 Cellemodeller

I dette arbeidet ble det utført forsøk med både prolifererende PC12-celler og ikke-prolifererende kornceller fra rotte. Det finnes fordeler og ulemper med begge disse celletypene. PC12 er en kontinuerlig kreftcellelinje, hvilket innebærer at cellene hele tiden deler seg i kultur. Det kan tenkes at cellene i en kreftcellelinje slik som PC12, har mistet noen av de differensierte egenskapene til en ”normal” celle og blitt mer lik en kreftcelle (Adler 2006), i motsetning til primærkulturer som i større grad vil gjenspeile de forholdene man finner in vivo. Siden alle cellene i en cellelinje slik som PC12, har samme opprinnelse, blir cellepopulasjonen mer homogen enn primærkulturer. Av samme årsak gir kontinuerlige cellelinjer mer reproduerbare resultater. Primærkulturer inneholder celler som har blitt høstet fra dyr og sådd ut på kulturskåler. Disse cellene har langt kortere levetid enn cellelinjer (Adler 2006). Siden cellene i en primærkultur hentes fra ulike dyr ved hvert forsøk, blir resultatene mindre reproduerbare. Cellelinjer er robuste og krever relativt enkle dyrkningsbetingelser sammenlignet med primærkulturer.

Korncellekulturer fra rotte er en av de mest brukte og best studerte modellene til studier av neuronal utvikling, funksjon og patologi (Contestabile 2002). En fordel med korncellekulturer fra lillehjerne i forhold til andre typer neuronkulturer, er at nivået av ”forurensing” i form av andre celletyper kan være så lavt som 5-10 % (Gorman, Ceccatelli et al. 2000). Studier har vist at ulike apoptotiske stimuli aktiverer caspasekaskader i kornceller fra lillehjernen til rotte. Også tidligere arbeid i forskningsgruppen har demonstrert caspase-3-aktivering i denne celletypen (Slagsvold, Rosseland et al. 2003).

PC12-cellelinjen er en nyttig modell for å studere celledifferensiering, blant annet fordi cellene responderer på de fleste vekstfaktorer, neurotrofiner og hormoner (Vaudry, Stork et al. 2002). PC12-celler er en mye brukt modell for å undersøke mekanismer for neuronal differensiering, signaloverføring, regulering av neurotransmittere og celledød i kultur (Wada, Okada et al. 1996), hvilket gjorde den egnet til å studere apoptosesignaler i dette arbeidet.

I tillegg har en rekke studier demonstrert caspase-3-mediert død i PC12-celler (Haviv, Lindenboim et al. 1997; Sharifi, Eslami et al. 2009).

#### **4.1.2 Metoder for å måle celledød**

Farging med trypanblå regnes som gullstandarden for å måle celledød (Aras, Hartnett et al. 2008). Denne metoden er basert på et enkelt prinsipp om at levende celler stenger trypanblåmolekylene ute, i motsetning til døde celler som har defekt cellemembran og dermed farges blå. Celletelling i mikroskop er en tidkrevende prosess, men gir til gjengjeld morfologisk informasjon om cellene (Aras, Hartnett et al. 2008), hvilket er en fordel i forhold til andre og mer tidsbesparende metoder for å måle celledød. I deteksjon av celledød i korncellekulturer, som også har innslag av andre celletyper, er celletelling ekstra godt egnet i forhold til andre metoder for å måle celledød, fordi man ser hva man teller. Trypanblåfarging ble derfor ansett som en meget godt egnet metode for å detektere celledød i både PC12-celler og kornceller fra rotte i dette arbeidet. En ulempe ved metoden er at den tar utgangspunkt i en subjektiv vurdering av fargeopptak i cellene, slik at skadede celler med liten grad av fargeopptak kan bli oversett (Warren 1997). Døde celler som har løsnet fra skålen eller blitt fragmentert (Aras, Hartnett et al. 2008), kan også føre til underestimert celledød.

Trypanblåfarging kombineres ofte med andre metoder for å måle celleoverlevelse. MTT-analyse tar i bruk spektrofotometer (plateleser) for å detektere graden av mitokondriell aktivitet i levende celler, og har vist å gi raske, presise og reproducerbare resultater (Aras, Hartnett et al. 2008). Metoden brukes ofte som et indirekte mål på celleoverlevelse (Loo and Rillemaa 1998). MTT-analyse ble derfor ansett som et egnet supplement til celletelling for å gi et mer objektivt mål på celledød i PC12-celler. I flere studier har MTT-analyse blitt brukt for å måle celleoverlevelse i neuroner (Verdaguer, Alvira et al. 2005; Monti, D'Alessandro et al. 2007). Det er imidlertid ikke mulig å oppnå rene primærkulturer av neuroner (Gorman, Ceccatelli et al. 2000), noe som vil bidra til feilkilder og usikkerhet rundt resultatene fra en MTT-analyse. Forskjellige celletyper kan bidra ulikt til absorbanmålingen, noe som har blitt demonstrert ved å sammenligne MTT-formazan-produksjon i ulike cellelinjer (Vistica, Skehan et al. 1991). MTT-analyse ble derfor ansett som en uegnet metode for å detektere celledød i kornceller fra rotte. Det er vist at MTT-analyse er i stand til å detektere selv et lite

---

antall levende celler (Mosmann 1983). Dette gjenspeiles i studier hvor det har blitt vist god korrelasjon mellom resultater fra MTT-analyse og celledødd med trypanblå (Koh, Kwon et al. 2005).

Siden serumdeprivasjon er en veletablert metode for å indusere apoptose, ble det forventet at PC12-celler eksponert for serumfritt medium ville ha færre aktive mitokondrier og resultere i lavere MTT-måling, sammenlignet med kontrollene. Det var derfor overraskende at gjentatte forsøk med denne metoden resulterte i en tendens til høyere MTT-målinger, og følgelig høyere estimert overlevelse, i serumdepriverte celler sammenlignet med kontrollvaskede celler. Denne indirekte kvantifisering av celledød gav motsatt resultat enn celledødd ved hjelp av trypanblåfarging, hvor serumdeprivasjon førte til signifikant økning i celledød sammenlignet med vasket kontroll. MTT-analysen gav også variable resultater innenfor og mellom forsøk, hvilket kan skyldes ulikt volum i brønnene (Aras, Hartnett et al. 2008). Det er også vist at reduksjon av MTT kan variere sterkt innenfor og mellom cellepopulasjoner avhengig av cellevekstbetingelser (Berridge, Herst et al. 2005).

Resultatene fra MTT-analysene står i kontrast til en rekke publiserte data som viser at serumdeprivasjon av PC12-celler gir lavere MTT-målinger (Ji and Liu 2001; Huang, Lin et al. 2004; Ji, Dong et al. 2006). Det finnes imidlertid eksempler på at MTT-analyse ikke gir et like pålitelig mål på celleoverlevelse ved alle typer behandlinger. Laktatdehydrogenase (LDH)-analyse detekterer celleoverlevelse ut fra membranintegritet, ved å måle utslipp av enzymet LDH fra cytoplasma (Aras, Hartnett et al. 2008). En sammenligning av MTT-analyse og LDH-analyse viste samsvarende resultater i tre av fire celledøddmodeller. Ved eksponering for ceramid-analogen C2-ceramid kombinert med antiapoptotiske stoffer, gav MTT-analysen et annet resultat enn LDH-analyse og celledødd etter trypanblåfarging (Lobner 2000). Disse funnene samsvarer med resultatene presentert i denne oppgaven, ved at MTT-analyse og celledødd gir motstridende tallfesting av celledød. En mulig årsak kan være at MTT-analyser ikke skiller mellom celledød og reversibel skade eller svekkelse av mitokondrien (Aras, Hartnett et al. 2008). Både cellemembranen og mitokondriene forblir ofte intakte frem til slutten av den apoptotiske prosessen, slik at tapt mitokondriell funksjon og membranpermeabilitet er sene indikatorer på apoptose. I en studie ble det imidlertid demonstrert at neuroner utsatt for apoptotiske stimuli viste morfologiske kjennetegn på apoptose flere timer før en målbar reduksjon av MTT-omdanning kunne observeres (Loo and Rillemaa 1998). Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor apoptose indusert av

serumdeprivasjon ikke lot seg måle ved hjelp av MTT-analyse, mens celledøds telling basert på tapt membranintegritet detekterte økt celledød ved serumdeprivasjon.

MTT-metoden er sensitiv for celleproliferasjon (Loo and Rillemaa 1998). Siden PC12-celler deler seg (Valavanis, Hu et al. 2001) og det er kjent at vekstfaktorer kan stimulere til celleproliferasjon (Vaudry, Stork et al. 2002; Henson and Gibson 2006), kan dette bidra til å forklare hvorfor tilsetning av vekstfaktorer viste en tendens til å gi økt absorbansmåling i MTT-analysen. Siden tidligere studier har demonstrert at MTT-reduksjon kan brukes for å kvantifisere celledød ved serumdeprivasjon, kan det være hensiktsmessig å følge en annen protokoll ved senere forsøk. Blant annet kan MTT-reduksjon måles som ratioen mellom absorbans ved 570 nm og 630 nm (Aras, Hartnett et al. 2008). På grunn av manglende absorpsjonsfilter lot det seg ikke gjøre å måle absorbansen ved begge disse bølgelengdene i dette arbeidet.

Siden forsøkene med MTT-analyse av PC12-celler førte til lite reproducerbare resultater som i tillegg brøt med tilsvarende studier, ble resultatene fra celledøds telling etter trypanblåfarging brukt som mål på celledød i dette arbeidet. En fordel med manuell celledøds telling i forhold til MTT-analyse er at den gir en direkte deteksjon av celledød, og at man bokstavelig talt ser hva man kvantifiserer. Celledøds telling etter trypanblåfarging ble derfor ansett som en mer egnet metode for å detektere celledød.

#### **4.1.3 Metoder for å studere proteiner involvert i celledød**

Westernblotting er trolig den mest populære teknikken for å studere proteiner (Naryzhny 2009). Ved hjelp av westernblotting kan individuelle proteiner i en kompleks blanding detekteres, karakteriseres og kvantifiseres (Tovey, Ford et al. 1987). Siden samme membran kan stripes og brukes på nytt med et annet antistoff, er det mulig å undersøke forekomsten av flere ulike proteiner i samme celleprøve. Dette gjorde westernblotting til en egnet metode for å studere mulig "crosstalk" mellom proteiner involvert i apoptose.

Det finnes to hovedmetoder for å detektere forekomsten av caspaser, enten ved bruk av spesifikke antistoffer, slik som ved westernblotting, eller ved å detektere kløyvingsprodukter fra bestemte caspasesubstrater, slik som det fluorogene caspase-3-substratet Ac-DEVD-AMC i analyse av caspaseaktivitet ("caspase-assay") (Harwood, Yaqoob et al. 2005). I dette arbeidet ble begge metoder brukt. Analyse av caspaseaktivitet er mindre tidkrevende enn westernblotting, og fører til både detektering og kvantifisering av aktivert caspase-3. Et viktig aspekt ved caspase-3-analyse er at caspaser, i motsetning til antistoffene som brukes i westernblotting, har overlappende substratspesifisitet (Pop and Salvesen 2009). Hvis et relativt uspesifikt substrat tilsettes både med og uten en spesifikk inhibitor, kan analysen av caspaseaktivitet likevel anses som spesifikk (Harwood, Yaqoob et al. 2005). I utførelsen av forsøket ble det derfor også målt fluorescens i celler tilsatt caspase-3-inhibitor.

## 4.2 DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN

### 4.2.1 PAC-1 induserer caspaseavhengig død i kornceller og caspaseuavhengig død i PC12-celler

Resultatene fra celledellingen viser at 24 timer med serumdeprivasjon av PC12-celler resulterte i økt celledød, slik flere tidligere studier har demonstrert (Sato, Sakai et al. 1996; Haviv, Lindenboim et al. 1997; Jiang, Zhang et al. 2005). Caspase-3-aktivatoren PAC-1 førte til høyere celledød i PC12-celler sammenlignet med serumdeprivasjon, og resulterte også i signifikant økt caspase-3-aktivitet. Dette er i tråd med hva tidligere utprøving av PAC-1 i PC12-celler har demonstrert (Putt, Chen et al. 2006; Rimul 2007). Det er vist at graden av PAC-1-indusert celledød varierer mellom ulike celletyper, og at denne sensitiviteten for PAC-1 korrelerer med konsentrasjonen av procaspase-3 i cellene (Putt, Chen et al. 2006). Kornceller fra rotte var mer sensitive for PAC-1 enn PC12-cellene. I disse primærkulturene førte en halvering av PAC-1-konsentrasjonen (50  $\mu\text{M}$ ) til høyere celledød sammenlignet med 100  $\mu\text{M}$  PAC-1 i PC12-celler.

I PC12-celler eksponert for PAC-1 førte tilsetning av caspase-3-inhibitor (1  $\mu\text{M}$ ) til en signifikant reduksjon av caspase-3-aktivitet. Dette samsvarer med introduksjonen av PAC-1 som en direkte aktivator av caspase-3 (Putt, Chen et al. 2006). Caspase-3-inhibitor (1  $\mu\text{M}$ )

beskyttet imidlertid ikke mot PAC-1-indusert celledød i PC12-celler, slik man skulle forvente ut fra teorien om at PAC-1 aktiverer procaspase-3 direkte (Putt, Chen et al. 2006). Til sammenligning var det en tendens til at caspase-3-inhibitor beskyttet mot død i kornceller eksponert for 50  $\mu\text{M}$  PAC-1. Ifølge resultatene fra westernblottingen, beskyttet også caspase-3-inhibitor mot økt caspase-3-aktivitet etter eksponering for 25  $\mu\text{M}$  PAC-1. Det ble ikke oppnådd proteinbånd for kløyvet caspase-3, men siden tidligere studier har vist at redusert intensitet i westernbånd for intakt procaspase er en indikasjon på aktivert caspase-3 (Gorman, Ceccatelli et al. 2000; Harwood, Yaqoob et al. 2005), kan procaspasebåndet brukes som et estimat på hvor mye caspase-3 som er aktivert. Det har tidligere blitt vist en doseavhengig effekt av Pac-1 in vitro (Putt, Chen et al. 2006), som til dels har blitt bekreftet i deteksjonen av celledød i kornceller (figur 3.5). I kornceller fra rotte ble det imidlertid observert at eksponering for 25  $\mu\text{M}$  PAC-1 gav sterkere nedgang i procaspase-3-nivå, og følgelig høyere estimert caspase-3-aktivitet, enn eksponering for 100  $\mu\text{M}$  PAC-1. Siden westernblottingen bare er utført én gang, er det knyttet usikkerhet til denne observasjonen. I kornceller eksponert for 25  $\mu\text{M}$  PAC-1 førte tilsetning av caspase-3-inhibitor etter 2 timer til en økning i procaspase-3-båndet, og følgelig lavere estimert caspase-3-aktivering. Både den PAC-1-induserte reduksjonen i procaspase-3-nivå og økningen som ble observert etter tilsetning av caspase-3-inhibitor, tyder på at PAC-1 aktiverer caspase-3 i kornceller fra rotte.

De samlede resultatene tyder på at PAC-1 induserer en caspaseavhengig død i kornceller fra rotte og en caspaseuavhengig død i PC12-celler, hvilket indikerer at ulike celledøds mekanismer er involvert i de ulike celletypene. Kort tid etter introduksjonen av PAC-1 ble det reist spørsmål om hvorvidt dette syntetiske molekylet virkelig aktiverer caspase-3 direkte. Blant annet ble det vist til forsøk hvor PAC-1-eksponering førte til død i MC57-celler (Denault, Drag et al. 2007), til tross for at denne celletypen ikke uttrykker procaspase-3 (Putt, Chen et al. 2006). Disse funnene underbygger muligheten for at PAC-1 kan føre til celledød gjennom mekanismer som er uavhengige av caspase-3. I senere tid er det foreslått at PAC-1 virker som en zinkchelator som opphever zink-ionenes blokkering av procaspase-3, slik at procaspasen blir enzymatisk aktiv og kan aktivere andre procaspase-3-molekyler til aktiv caspase-3 (Peterson, Goode et al. 2009; Peterson, Hsu et al. 2009).

---

Zink inngår som en nødvendig, funksjonell komponent i mer enn 200 enzymer (Wu and Wu 1987). Hvis PAC-1 binder opp zink, kan det tenkes at også andre zink-avhengige enzymer enn caspase-3 påvirkes, hvilket i så fall betyr at PAC-1 ikke er en selektiv hemmer av caspase-3. Flere studier har vist at redusert zinknivå fører til nedsatt celleproliferasjon (Wong, Zhao et al. 2007), og at mangel på zink kan gjøre celler og vev mer utsatt for apoptose (Truong-Tran, Carter et al. 2001). PC12 er en prolifererende cellelinje (Valavanis, Hu et al. 2001), i motsetning til korncelleneuroner. Ut fra kunnskap om zinks rolle i celleproliferasjon, kan det tenkes at PAC-1-indusert celledød i PC12-celler hovedsakelig skyldes hemming av cellesyklus og ikke direkte caspase-3-aktivering. En slik hypotese vil kunne forklare hvorfor caspase-3-inhibitor ikke beskytter mot PAC-1-indusert celledød i PC12. Zink inngår som en nødvendig komponent i flere metalloenzymer som styrer DNA-syntesen, blant annet DNA-polymerase (Wu and Wu 1987). Det har også blitt foreslått at zink er nødvendig for DNA-syntesen, ved å regulere thymidinkinase-mRNA gjennom zink-avhengig binding til promotoren og ved å påvirke cellens inngang til S-fasen (S = syntese) i cellesyklus (MacDonald 2000). Det er også vist at mangel på zink fører til nedregulering av cyclinkinaseinhibitoren p21, som hemmer celleproliferasjon, men den fysiologiske betydningen av denne nedreguleringen er foreløpig uklar (Wong, Zhao et al. 2007). Det kan spekuleres i om en eventuell PAC-1-indusert hemming av cellesyklus i prolifererende celler medieres gjennom noen av disse zinkavhengige enzymene og mekanismene. Affiniteten mellom PAC-1-molekylet og zink-ionene vil avgjøre om PAC-1 eventuelt er en effektiv hemmer av disse enzymene eller ikke.

I kornceller fra rotte så det ut til at tilsetning av caspase-3-inhibitor ved senere tidspunkter gav økt beskyttelse mot celledød induert av 50  $\mu$ M PAC-1, selv om forskjellen ikke var statistisk signifikant. Dette er et overraskende funn. I forskningsgruppen er det tidligere vist at caspase-3-inhibitor tilsatt samtidig med PAC-1 gir god beskyttelse mot celledød i kornceller fra kylling (Gulzeb Aziz, manuskript). Ifølge tidligere studier fører PAC-1 til en rask aktivering av procaspase-3, blant annet i kreftcellelinjen HL-60 hvor over 50 % av aktiveringen skjer innen 2 timer (Putt, Chen et al. 2006), og det er vanskelig å forstå hvordan caspase-3-inhibitor tilsatt etter 4 timer forhindrer caspase-3-aktivering i større grad enn om den tilsettes etter 15 minutter eller 2 timer. En mulig forklaring kunne vært at DMSO, som caspase-3-inhibitoren er løst i, induserer celledød, og at celler som tilsettes caspase-3-inhibitor på et tidlig tidspunkt dermed utsettes for et sterkere celledødsstimuli. DMSO er

imidlertid brukt som kontroll i samtlige forsøk med PAC-1, uten å ha ført til økt celledød. Det vil være interessant å gjøre gjentatte forsøk, som også inkluderer tilsetning av caspase-3-inhibitorer senere enn 4 timer, for å studere om denne observerte effekten gjenspeiler tidsaspekter knyttet til caspase-3-aktivering. Blant annet kan en eventuell sen caspase-3-aktivering skyldes en selvforsterkende sløyfe fra caspase-3 til mitokondriene, som fører til økt aktivering av caspase-9, etterfulgt av ytterligere caspase-3-aktivering (Marzo, Susin et al. 1998). Hvis en slik "feedback-mekanisme" finner sted og står for en vesentlig del av caspase-3-aktiviteten etter PAC-1-eksponering, kan dette forklare en eventuell forsinket effekt av caspase-3-inhibitor.

Tidligere studier har demonstrert en oppregulering av caspase-3-mRNA i PC12-celler eksponert for bestemte typer apoptotiske stimuli, slik man også har observert etter traumatiske hjerneskader (Ito, Oh-Hashi et al. 2006). Hvis PAC-1 er en type dødsstimuli som kan føre til økning av caspase-3-genekspresjon, kan en slik oppregulering av caspase-3 være en mulig årsak til utsatt caspase-3-aktivering. En alternativ forklaring kan være at celledøden skyldes effektorcaspase-7, som i likhet med caspase-3 kan føre til apoptose, blant annet gjennom kløyving av DNA-reparatøren PARP (Chowdhury, Tharakan et al. 2008). PAC-1 kan aktivere procaspase-7, men mindre effektivt sammenlignet med procaspase-3 (Putt, Chen et al. 2006). En studie har demonstrert at også caspase-7 blir induisert, oppregulert og aktivert i rotteneuroner etter traumatisk hjerneskade (Larner, McKinsey et al. 2005). Hvis den PAC-1-induserte celledøden i kornceller fra rotte i stor grad skyldes caspase-7, kan en eventuell oppregulering av denne caspasen være en mulig årsak til den forsinkede effekten av caspaseinhibitor. Siden caspase-3 og -7 har lignende substratpreferanse (Kumar 2007), og det på grunn av overlappende substratspesifisitet ikke finnes spesifikke, syntetiske caspaseinhibitorer (Pop and Salvesen 2009), kan det tenkes at caspase-3-inhibitoren også kan hemme aktivering av caspase-7.

#### **4.2.2 Caspase-3-uavhengig tilbaketrekning av utløpere på PC12-celler**

Når PC12-celler plates ut vil de normalt etter 24 timer i kultur utvikle en polygonal form med synlige neuritter (Boccellino, Cuccovillo et al. 2003). Neuritter er tynne, dynamiske



---

mikrotubuli-baserte celleframskytninger, som dannes gjennom aktiv vekst fra cellekroppen og slutter i en dynamisk, aktin-rik tupp som kalles "growth cone" (Dehmelt and Halpain 2003). I forsøk hvor PC12-celler ble tilsatt caspase-3-aktivatoren PAC-1 48 timer etter splitting og eksponert i 24 timer, var andelen levende celler med utløpere signifikant lavere sammenlignet med celler tilsatt DMSO. Samtidig tilsetning av caspase-3-inhibitor beskyttet ikke mot denne PAC-1-induserte tilbaketrekningen av celleutløpere, hvilket indikerer at denne morfologiske forandringen er caspaseuavhengig. Aktin er et kjent caspase-3-substrat (Chan and Mattson 1999), men det ser ikke ut til at caspase-3-mediert degradering er mekanismen her, siden caspase-3-inhibitor ikke er beskyttet. Det er foreslått at degenerering av neuritter krever selvdestruktive programmer som er uavhengige av celledødsprogrammene (Kawataki, Osafune et al. 2008). Blant annet er det vist at tilbaketrekning av utløpere i differensierte PC12-celler skjer raskt, mens celledød ikke inntreffer før etter 24-48 timer (Dispersyn, Nuydens et al. 1999). Ved eksponering for styrene-7,8-oksidi (SO), er det vist at PC12-celler mister utløpere allerede etter 1 time, lenge før aktivering av caspase-3, og at tilbaketrekningen av neuritter ble observert samtidig med depolymerisering av aktin (Boccellino, Cuccovillo et al. 2003). Disse funnene er i tråd med den caspase-3-uavhengige tilbaketrekningen som ble observert etter eksponering for PAC-1.

Siden PAC-1 er en zinkchelator (Peterson, Goode et al. 2009) og zink inngår som en nødvendig komponent i mange cellulære enzymer (Wu and Wu 1987), kan det tenkes at den PAC-1-induserte tilbaketrekningen av utløpere skyldes hemming av zink, i stedet for aktivering av caspase-3. Zink kan stimulere veksten av neuritter i celler fra retina til gullfisk, og forsøk med zinkchelatorer har ført til redusert neurittlengde (Nuseti, Obregón et al. 2005). Ut fra disse funnene kan det spekuleres i om PAC-1 binder opp intracellulære zinkmolekyler og på den måten fører til caspase-3-uavhengig tilbaketrekning av neuritter. I enkelte artikler sees tilbaketrekning av neuritter og avrunding av cellen i sammenheng med den apoptotiske prosessen (Kayalar, Ord et al. 1996). Hvis dette er tilfelle i PC12-celler, kan det spekuleres i om PAC-1 i kraft av sin rolle som zinkchelator, fører til apoptose gjennom effekter på både cellestruktur og cellyklus. For å undersøke om tilbaketrekning av celleutløpere inngår som en del av celledødsprosessen eller skjer som følge av den, vil det være interessant å studere tilbaketrekning av neuritter ved tidlige tidspunkter for eksponering.

For å få en bedre forståelse av hvilken innvirkning PAC-1 har på cellenes morfologi, var det interessant å undersøke andelen celler med utløpere nærmere. Det viste seg at PAC-1 ikke reduserte det gjennomsnittlige antallet utløpere per celle, men viste en tendens til å redusere antall lange utløpere per celle. Caspase-3-inhibitor viste en tendens til å beskytte mot reduksjonen i lengden på celleutløperne. Dette er et overraskende funn som indikerer at utløpernes lengde er caspase-3-avhengig, mens tilbaketreking av utløpere og avrunding av cellen skjer uavhengig av caspase-3. Reguleringen av neurittvekst i neuronene foregår på to nivåer: i cellekroppen og i den voksende tuppen av aksoner eller dendritter (Schwab 1996). Det kan tenkes at skillet mellom caspase-3-avhengige og -uavhengige effekter har sammenheng med denne forskjellen i regulering. Det er kjent at caspase-3 kløyver en rekke strukturelle proteiner i cytoskjelettet, blant annet spektrin og aktin, som begge er involvert i reguleringen av effekter i "growth cone", og det kan regnes som sannsynlig at caspase-indusert kløyving av substrater er involvert i endring av morfologi (Chan and Mattson 1999). I videre studier vil det være interessant å undersøke en eventuell sammenheng mellom neurittlengde og aktindepolymerisering, for eksempel gjennom westernblotting med aktinmonomerer og -polymerer etter fraksjonering, eller ved merking av aktin med en fluorescerende probe, slik som phalloidin, og påfølgende mikroskopering.

En alternativ forklaring kan være at caspase-3-indusert kløyving av substrater indirekte fører til nedsatt neurittlengde. Aktiviteten til ERK1/2 er vist å være essensiell for å opprettholde en differensiert fenotype (Kao, Jaiswal et al. 2001). Nedsatt ERK-fosforylering som følge av overuttrykt Bcl-2, er vist å føre til tilbaketreking av neuritter, celleavrunding og redusert aktin-nivå. Det har blitt foreslått at disse effektene skyldes hemming av Raf1 (Mi, Mirnics et al. 2006). Caspase-3 er vist å kunne redusere nivået av P-ERK både gjennom kløyving av Raf1 (Widmann, Gibson et al. 1998) og den positive regulatoren av Ras/ERK-signalering, KSR1, som normalt fasiliterer fosforyleringen som er nødvendig for ERK-aktivering. I tillegg til at kløyvingen destruerer KSR1-proteinet, tyder forsøk på at et av fragmentene som dannes kan hemme ERK-aktivering gjennom binding til MEK (McKay and Morrison 2007). Det kan derfor tenkes at tendensen til caspase-3-avhengig reduksjon i celleutløpernes lengde, skyldes hemming av ERK-fosforylering. En slik "crosstalk" mellom caspase-3 og ERK ble ikke bekreftet i westernblottingen med PC12-celler, men siden forsøkene bare har blitt utført én gang, kan det heller ikke utelukkes.

### 4.2.3 PAC-1 er ingen effektiv procaspase-3-aktivator i PC12-celler

I tidsstudien med PC12-celler eksponert for PAC-1 skjer det ingen synlig nedgang i nivået av procaspase-3 før etter 24 timer, ifølge resultatene fra westernblottingen. Proteinbåndene var imidlertid svakere utover på sidene av blottet (figur 3.16 a), og det mistenkes derfor at feilkilder i forsøket kan ha ført til feilaktig lave båndstyrker i noen av prøvene. Til sammenligning påviste analysen av caspase-3-aktivitet at PAC-1 fører til økt caspase-3-aktivitet i PC12-celler allerede etter 2 timer. Den tidlige aktiveringen samsvarer med resultater fra forsøk i HL-60-celler hvor over halvparten av aktiveringen skjedde innen litt over 2 timer (Putt, Chen et al. 2006).

Ifølge tidsstudien av serumdepriverte PC12-celler fører eksponering for serumfritt medium i 4 timer til økt caspase-3-nivå, observert i form av svakere proteinbånd for procaspase-3. Forsøket er bare utført én gang. Tilsvarende resultat er vist i tidligere studier, blant annet har det blitt vist ved hjelp av westernblotting at serumdeprivasjon av PC12-celler fører til reduksjon av procaspase-3-nivå etter 4 timer, og resultatet har blitt bekreftet gjennom analyse av caspase-3-aktivitet (Haviv, Lindenboim et al. 1997). I en annen studie ble det målt økt caspase-3-aktivitet i naive PC12-celler allerede etter 2,5 timer i serumfritt medium. Aktiviteten var høyest etter 4 timer, lavere ved 10 timer og nede på utgangsnivået etter 16 timer (Vaghefi, Hughes et al. 2004). Sett i lys av disse studiene, tyder resultatet fra westernblottingen på at serumdeprivasjon fører til en relativt rask aktivering av caspase-3.

Westernblottet viser at det er mye procaspase-3 igjen i de PAC-1-eksponerte PC12-cellene. Dette samsvarer med resultatene fra målingen av caspase-3-aktivitet. Selv om 2 timer med eksponering for PAC-1 resulterte i signifikant økning i caspaseaktivitet, var forskjellen relativt liten sammenlignet med nivået av caspase-3-aktivitet i DMSO-kontrollen.

Resultatene fra begge disse forsøkene indikerer at PAC-1 ikke er noen effektiv procaspase-3-aktivator, og at mye procaspase-3 forblir ukløyyet. Disse indikasjonene disharmonerer med funn som tyder på at graden av PAC-1-indusert celledød korrelerer med den relative konsentrasjonen av procaspase-3 i cellelinjen. Procaspase-3 er først og fremst lokalisert i cytosol, men er også detektert i cellekjernen (Mandal, Adam et al. 1999). Ifølge forsøk med en fluorescerende versjon av PAC-1, kan ikke PAC-1 gå inn i cellekjernen (Peterson, Hsu et al. 2009). Dette innebærer at procaspase-3 i kjernen ikke vil være tilgjengelig for PAC-1, noe som kan være en i hvert fall delvis forklaring på hvorfor nivået av procaspase-3 er høyt, selv

etter eksponering for PAC-1. Det kan også tenkes at PAC-1-indusert celledød medieres gjennom effektorcaspase-7 (se avsnitt 4.2.1). Det har blitt demonstrert at denne caspasen foreligger og kan aktiveres i PC12-celler (Larner, McKinsey et al. 2005), og ettersom PAC-1 kan motvirke zink-mediert inhibering av både procaspase-7 og caspase-7 (Peterson, Goode et al. 2009), kan det tenkes at PAC-1-indusert celledød i stor grad medieres gjennom caspase-7-aktivering, hvilket i så fall kan bidra til å forklare det høye nivået av procaspase-3 etter PAC-1-eksponering.

#### **4.2.4 Caspase-8- og -9-inhibitorer beskytter mot direkte caspase-3-aktivering**

Caspase-8-inhibitor og caspase-9-inhibitor hadde en tendens til å redusere celledød induert av serumdeprivasjon i PC12-celler. Flere tidligere forsøk har vist at serumdeprivasjon fører til caspase-3-aktivering gjennom den indre, mitokondrielle veien i PC12-celler (Kryzanski, Oberdoester et al. 2007), mens caspase-8-mediert aktivering av caspase-3 ikke er like grundig demonstrert i denne celletypen. Selv om nedgangen i celledød ikke var signifikant, kan resultatene tyde på at serumdeprivasjon fører til aktivering av caspase-3 gjennom både den indre, caspase-9-involverte og den ytre, caspase-8-involverte signaleringsveien. Også tidligere studier av henholdsvis PC12-celler eksponert for hyperglykemi og serumdepriverte neuroner fra mus, har demonstrert aktivering av caspase-3, -8-, og -9 og påfølgende apoptose (Xu, Yenari et al. 2002; Sharifi, Eslami et al. 2009).

Ved høy konsentrasjon av caspase-3-inhibitor (10  $\mu$ M) forsvant tendensen til å beskytte mot celledød induert av serumdeprivasjon. Tilsvarende effekt ble observert i PAC-1-eksponerte PC12-celler, hvor 10  $\mu$ M caspase-3-inhibitor viste en tendens til å øke celledøden. Dette kan henge sammen med at syntetiske caspaseinhibitorer også kan virke på andre caspaser enn de i utgangspunktet er tiltenkt, og at denne mangelen på spesifisitet økes ytterligere ved høye konsentrasjoner (Harwood, Yaqoob et al. 2005). Enkelte caspaser, inkludert caspase-3, kan mediere effekter som ikke er knyttet til celledød (Lamkanfi, Festjens et al. 2007), blant annet har det blitt foreslått at caspase-7 kan ha en mulig rolle i mitose (Hashimoto, Yamauchi et al. 2008). Dersom disse caspasene er aktive, kan eventuell hemming av disse være en mulig årsak til at økt konsentrasjon av caspase-3-inhibitor ikke reduserer celledød.

---

Mens caspase-3-inhibitor kan hemme flere caspaser, er caspase-8 og -9-inhibitorer selektive (Martin, Siegel et al. 1998; Mocanu, Baxter et al. 2000). Caspase-8-inhibitor reduserte caspase-3-aktiviteten signifikant, mens det var en tendens til at caspase-9-inhibitor reduserte PAC-1-indusert caspaseaktivitet. Dette er interessante funn som bryter med fremstillingen av PAC-1 som en selektiv caspase-3-aktivator. Det er gjort funn som indikerer at zink også kan hemme aktivering av caspase-8 og -9 (Szuster-Ciesielska, Plewka et al. 2008). En mulig forklaring på den observerte effekten av caspase-8 og -9-inhibitorer, kan være at PAC-1 også aktiverer disse to initiatorcaspasene ved å binde opp zink. For å finne ut om PAC-1 virker gjennom denne mekanismen, vil det være interessant å måle caspase-8 og -9-aktivitet etter eksponering for PAC-1 og caspase-3-inhibitor. Dette kan oppnås ved hjelp av westernblotting med antistoffer for caspase-8 og -9 eller gjennom analyse av caspase-8 og -9-aktivitet etter tilsetning av substrater for disse caspasene. Hvis enn eventuell PAC-1-indusert aktivering av både caspase-3-, -8- og -9 er tilfelle, skulle man forvente at hemming av enten initiatorcaspase-8 eller -9 ville redusere caspase-3-aktiviteten mindre effektivt enn hemming av caspase-3. I analysen av caspase-3-aktivitet førte imidlertid caspase-inhibitorene til omtrent lik reduksjon i caspase-3-aktivitet.

En alternativ forklaring på resultatene kan være at caspase-8 og -9 aktiveres sekundært. En slik sekundær aktivering kan skje i form av en selvforsterkende sløyfe fra aktivert caspase-3 til mitokondriene, som fører til at caspase-9 aktiveres og igjen kan kløyve procaspase-3 (Marzo, Susin et al. 1998). Nyere resultater tyder på at det også kan skje en direkte ”crosstalk” mellom aktivert caspase-3 og procaspase-9. Det er også foreslått at caspase-3 fører til kløyving og aktivering av procaspase-8 gjennom en indirekte mekanisme, hvor caspase-3 aktiverer caspase-6, som igjen aktiverer caspase-8 (Yang, Thor et al. 2006). Den relativt like reduksjonen i caspase-3-aktivitet som de tre caspaseinhibitorene førte til, kan tyde på at en eventuell sekundær aktivering av caspase-8 og -9 står for en vesentlig del av den totale caspase-3-aktiveringen etter eksponering for PAC-1. Dette er interessante funn som bør studeres nærmere gjennom gjentatte forsøk. Siden caspaseinhibitorene hadde en tendens til å redusere PAC-1-indusert caspase-3-aktivitet, var det overraskende at verken caspase-8 eller -9-inhibitorer beskyttet mot celledød induert av PAC-1 i PC12-celler. Resultatene samsvarer imidlertid med forsøkene med caspase-3-inhibitor, som også førte til redusert caspase-3-aktivering, men ikke mot celledød induert av PAC-1. De samlede funnene støtter hypotesen om at PAC-1 inducerer død i PC12-celler uavhengig av caspase-3.

#### 4.2.5 Serumdeprivasjon og PAC-1 reduserer nivået av P-ERK

MEK/ERK-signaleringsveien er en av flere veier som fremmer celleoverlevelse og proliferasjon (Meier, Schittek et al. 2005). Flere studier indikerer at caspase-3 gjennom ulike mekanismer kan skru av overlevelseseveier, slik som MEK/ERK-veien, som ellers kan interferere med den apoptotiske responsen (Widmann, Gibson et al. 1998). I arbeidet med denne oppgaven ble det observert at nivået av fosforylert ERK ble lavere etter 1 time med serumdeprivasjon. Etter 2 og 4 timer var ikke nivået av P-ERK lenger detekterbart. Også i to andre forsøk presentert i dette arbeidet forsvant P-ERK-båndet etter serumdeprivasjon i 4 timer. Etter eksponering i 24 timer kom det igjen til syne et svakt proteinbånd, men båndstyrken var langt lavere enn kontrollen, hvilket samsvarer med forsøk utført i HEK 293-cellelinjen hvor serumdeprivasjon i 24 timer førte til redusert nivå av P-ERK1/2 (Abkhezr, Keramati et al. 2009). Caspase-3-aktivatoren PAC-1 førte også til en rask reduksjon i nivået av fosforylert ERK i PC12-celler. Nedgangen i fosforylert ERK var synlig allerede etter 2 timer. Westernblottet tyder også på at P-ERK-nivået var lavt etter eksponering for PAC-1 i 24 timer. I kornceller fra rotte førte eksponering for 25  $\mu$ M PAC-1 i 4 timer til en svak reduksjon av P-ERK-nivået. Resultatene fra disse forsøkene tyder på at et apoptotisk stimuli i form av serumdeprivasjon eller tilsetning av PAC-1 i løpet av kort tid kan redusere nivået av P-ERK i både PC12-celler og kornceller fra rotte.

Serumdeprivasjon fører til aktivering av procaspase-3 (Charles, Khalyfa et al. 2005), og det er derfor ikke utenkelig at den observerte nedgangen i P-ERK-nivå etter eksponering for PAC-1 eller serumfritt medium skyldes caspase-3-avhengige mekanismer, slik tidligere studier tyder på (Widmann, Gibson et al. 1998). Hvis den observerte nedgangen i fosforylert ERK skyldes caspase-3, er det uventet at P-ERK-nivået blir redusert allerede etter serumdeprivasjon i 1 time, mens caspase-3-aktivering (estimert ut fra procaspase-3-nivå) ikke er synlig før etter 4 timer med serumdeprivasjon. Ut fra hypotesen om caspase-3-involvering, er det også overraskende at verken tilsetning av caspase-3-, -8- eller -9-inhibitorer beskytter mot bortfallet av proteinbåndet for P-ERK ved serumdeprivasjon eller PAC-1-eksponering av PC12-celler i 4 timer. Resultatene tyder på at serumdeprivasjon og PAC-1 fører til caspaseuavhengig nedgang i P-ERK-nivå i PC12-celler. Det har imidlertid blitt vist at en lav caspase-3-aktivitet er tilstrekkelig for å indusere celledød (Slagsvold, Rosseland et al. 2003). Gjentatte forsøk er nødvendig for å kunne fastslå om hemming av disse caspasene virkelig ikke har effekt ved dette tidspunktet.

I kornceller fra rotte førte derimot caspase-3-inhibitor til en svak økning i P-ERK-nivå sammenlignet med PAC-1 alene. Tilsetning av caspase-3-inhibitor etter 2 timer førte til enda større økning av P-ERK-nivå, hvilket samsvarer med resultatene fra PAC-1-indusert celledød, hvor caspase-3-inhibitor viste en tendens til økt beskyttelse mot celledød induert av 50  $\mu$ M PAC-1 ved senere tilsetning. Resultatene fra westernblottingen indikerer at den PAC-1-induserte nedgangen i P-ERK-nivå er caspase-3-avhengig, i motsetning til hva som ble vist i PC12-celler. Det er tidligere vist at caspase-3 kan redusere nivået av P-ERK blant annet gjennom kløyving av Raf1 (Widmann, Gibson et al. 1998) og kløyving av den positive regulatoren av Ras/ERK-signalerings, KSR1 (McKay and Morrison 2007) (se også avsnitt 4.2.2).

Ifølge disse studiene kan caspase-3 regulere ERK negativt gjennom hemming av oppstrøms proteiner, men det er også gjort funn som indikerer at "crosstalk" mellom caspase-3 og ERK kan skje direkte. Proteinet p53, som ved cellulært stress induserer apoptose eller hemming av cellesyklus (Alberts, Johnson et al. 2002), er vist å føre til caspase-3-mediert degradering av ERK2, observert som redusert nivå av både ERK2-protein og fosforylering (Marchetti, Cecchinelli et al. 2004). De samlede resultatene fra disse studiene tegner et kompleks bilde, hvor caspase-3 kan hemme aktiviteten til ERK gjennom flere mulige mekanismer. For å kunne finne årsaken til nedgangen i P-ERK, er det av vesentlig betydning å undersøke om den observerte reduksjonen i båndstyrke skyldes nedsatt fosforylering eller redusert nivå av ERK-proteinet. I videre studier bør det derfor utføres forsøk med antistoff for total ERK.

#### **4.2.6 EGF og NGF beskytter mot celledød i serumdepriverte PC12-celler**

Samtidig tilsetning av vekstfaktorer beskyttet mot celledød induert av serumdeprivasjon i 24 timer. Både EGF og NGF nær halverte celledøden, og hadde følgelig like stor beskyttende effekt. Dette er i samsvar med studier av oksygen- og/eller glukosedepivasjon av PC12-celler, hvor EGF og NGF førte til omtrent like stor reduksjon av celledød (Boniece and Wagner 1993). Det er velkjent at NGF hindrer serumdepriverte PC12-celler fra å dø (Greene 1978). EGF er vist å beskytte mot celledød, selv om denne effekten ikke er like godt studert. Forsøk med serumdeprivasjon av PC12-celler i en uke, har vist at NGF gir langvarig

beskyttelse mot celledød, mens EGF gir en kortvarig beskyttelse og etter en uke ikke lenger hindrer celledød (Rukenstein, Rydel et al. 1991). Ut fra dette kan det tenkes at nedgangen i celledød ved tilsetning av EGF ikke skyldes en reell beskyttelse, men snarere en utsettelse av celledød. For å eventuelt bekrefte dette, vil det være aktuelt å utføre forsøk med utvidet eksponeringstid.

Det er kjent at EGF og NGF kan fremme celleoverlevelse gjennom blant annet MEK/ERK-signaleringsveien (Xia, Dickens et al. 1995; Kim, So et al. 2000; Henson and Gibson 2006). Nedgangen i celledød etter tilsetning av vekstfaktorer ved serumdeprivasjon, kan også skyldes andre mekanismer. ERK2 er demonstrert å kunne fosforylere aminosyren Thr-125 på procaspase-9, og på den måten hindre aktivering av caspase-9, videre aktivering av procaspase-3 og påfølgende apoptose (Allan, Morrice et al. 2003; Martin, Allan et al. 2007). Denne formen for "crosstalk" har i ettertid blitt etterprøvd og bekreftet av en annen forskningsgruppe (McKay and Morrison 2007). Det kan tenkes at denne mekanismen bidrar til den observerte nedgangen i celledød etter tilsetning av EGF og NGF. For å undersøke om en slik "crosstalk" foregår, ville det vært aktuelt å studere om en eventuell nedgang i nivået av kløyvet procaspase-9 korrelerer med økt nivå av P-ERK.

Tidligere forsøk har vist at vekstfaktorene EGF og NGF kan føre til en signifikant reduksjon av PAC-1-indusert caspase-3-aktivitet og en tendens til å beskytte mot celledød i PC12-celler eksponert for PAC-1 (Rimul 2007). I arbeidet som er presentert her hadde ikke EGF eller NGF noen innvirkning på verken PAC-1-indusert caspase-3-aktivitet (Figur 3.11 b), eller celledød (Figur 3.3 b) i PC12-celler. Det er imidlertid knyttet usikkerhet til resultatet fra caspase-3-analysen siden forsøket bare er utført én gang. Som tidligere nevnt, viste analysen av caspase-3-aktivitet, i likhet med tidligere studier (Putt, Chen et al. 2006), at PAC-1 aktiverer procaspase-3 i PC12-celler. Hvis caspase-3 kan virke tilbake på mitokondriene slik at mer procaspase-9 aktiveres (Marzo, Susin et al. 1998), samsvarer ikke den manglende effekten av vekstfaktorer på PAC-1-indusert caspase-3-aktivering og celledød med teorien om "crosstalk" mellom ERK2 og procaspase-9 (Allan, Morrice et al. 2003; Martin, Allan et al. 2007; McKay and Morrison 2007). Det ville vært interessant å utføre westernblotting med proteiner fra kornceller for å undersøke om vekstfaktorer påvirker nivået av caspase-9.

Tilsetning av EGF ved serumdeprivasjon førte som forventet til et nivå av P-ERK, som var langt høyere enn i den vaskede kontrollen. Resultatet samsvarer med den beskyttende



---

effekten EGF demonstrerte mot celledød etter serumdeprivasjon. Det ble ikke observert forekomst av P-ERK i prøvene fra celler som var eksponert for serumfritt medium tilsatt NGF. Dette var overraskende siden det er kjent at både EGF og NGF fører til aktivering av ERK (Vaudry, Stork et al. 2002), og de to vekstfaktorene beskyttet like mye mot celledød induisert av serumdeprivasjon i 24 timer. Til sammenligning beskyttet begge de to vekstfaktorene mot PAC-1-indusert bortfall av P-ERK-bånd etter eksponering i 4 timer, observert som tydelige proteinbånd, som likevel var betydelig svakere enn båndet i EGF-kontrollen på westernblottet. Den beskyttende effekten av EGF ved serumdeprivasjon og PAC-1 er forenelig med at EGF kan føre til blokkering av apoptoseveier ved å aktivere blant annet Ras/ERK-signaleringsveien (Henson and Gibson 2006). For PAC-1 sin del tyder resultatene på at tilsetning av vekstfaktoren EGF eller NGF kan motvirke en eventuell caspase-3-mediert hemming av fosforylert ERK.

Det er velkjent at NGF fører til dannelsen av utløpere i PC12-celler (Greene 1978), som et resultat av langvarig aktivering av ERK1/2 (Barrie, Clohessy et al. 1997; Agell, Bachs et al. 2002). Resultatene fra westernblottingen tyder på at NGF og EGF beskytter mot PAC-1-indusert reduksjon av P-ERK-nivået i PC12-celler. Ut fra disse observasjonene kunne det forventes at tilsetning av vekstfaktorer også ville kunne beskytte mot PAC-1-indusert hemming av neuritter. Det var derfor overraskende at NGF ikke beskyttet mot reduksjon av lengde eller tilbaketrekning av utløpere i PC12-celler eksponert for PAC-1. Heller ikke EGF beskyttet mot effekten av PAC-1 på celleutløperne, men dette samsvarer med studier som viser at EGF er en mitogen faktor som i motsetning til NGF, ikke fører til differensiering av PC12-celler (Boniece and Wagner 1993; Kao, Jaiswal et al. 2001).

## 4.3 KONKLUSJON

- Kornceller fra rotte er en godt egnet modell for å studere caspaseavhengig celledød induisert av PAC-1. I PC12-celler inducerer PAC-1 caspase-3-uavhengig celledød.
- MTT-analyse er ikke egnet til å måle celledød induisert av serumdeprivasjon i PC12-celler.
- Caspase-3, -8 og -9 er involvert i celledød induisert av serumdeprivasjon, men ikke i PAC-1-indusert død i PC12-celler.
- Apoptotiske stimuli i form av PAC-1 og serumdeprivasjon fører til lavere nivå av fosforylert ERK.
- Fullstendig tilbaketrekning av PC12-cellers utløpere er ikke caspase-3-avhengig, mens lengden på de gjenværende celleutløperne ser ut til å kunne påvirkes av caspase-3.
- Vekstfaktorene EGF og NGF beskytter mot celledød induisert av serumdeprivasjon, men ikke mot PAC-1-indusert caspase-3-aktivering, celledød og tilbaketrekning av utløpere i PC12-celler.

---

## 5. REFERANSER

Abkhezr, M., A. R. Keramati, et al. (2009). "The time course of Akt and ERK activation on XIAP expression in HEK 293 cell line." *Molecular Biology Reports Epub ahead of print*

Adler, E. M. (2006). "Teaching resources. Cell culture as a model system for teaching: using PC12 cells." *Science's STKE* 2006(334): tr 5.

Agell, N., O. Bachs, et al. (2002). "Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin." *Cellular Signalling* 14(8): 649-654.

Alberts, B., A. Johnson, et al. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Sciences.

Allan, L. A., N. Morrice, et al. (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." *Nature cell biology* 5(7): 647-654.

Aras, M. A., K. A. Hartnett, et al. (2008). "Assessment of Cell Viability in Primary Neuronal Cultures." *Current Protocols in Neuroscience Chapter 7: Unit 7.18.1-7.18.15*.

Barrie, A. P., A. M. Clohessy, et al. (1997). "Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 or 2 (ERK1/2) activity in a Ras-independent, mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase 1 or 2-dependent manner in PC12 cells." *The Journal of Biological Chemistry* 8(272): 19666-19671.

Berridge, M. V., P. M. Herst, et al. (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." *Biotechnology annual review* 11: 127-152.

Boccellino, M., F. Cuccovillo, et al. (2003). "Styrene-7,8-oxide activates a complex apoptotic response in neuronal PC12 cell line." *Carcinogenesis* 23(3): 535-40.

Boniece, I. R. and J. A. Wagner (1993). "Growth Factors Protect PC12 Cells against Ischemia by a Mechanism That is Independent of PKA, PKC, and Protein Synthesis." *The Journal of Neuroscience* 13(10): 4220-4228.

Chan, S. L. and M. P. Mattson (1999). "Caspase and Calpain Substrates: Roles in Synaptic Plasticity and Cell Death." *Journal of Neuroscience Research* 58(1): 167-190.

Chang, F., L. S. Steelman, et al. (2003). "Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention." *Leukemia* 17(7): 1263-1293.

Charles, I., A. Khalyfa, et al. (2005). "Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46(4): 1330-1338.

Chowdhury, I., B. Tharakan, et al. (2008). "Caspases - an update." *Comparative Biochemistry and Physiology* 151(1): 10-27.

Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." *The Cerebellum* 1: 41-45.

De Saint-Hubert, M., K. Prinsen, et al. (2009). "Molecular imaging of cell death." *Methods* 48(2): 178-187.

Dehmelt, L. and S. Halpain (2003). "Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link?" *Journal of Neurobiology* 58(1): 18-33.

Denault, J. B., M. Drag, et al. (2007). "Small molecules not direct activators of caspases." *Nature Chemical Biology* 3(9): 519.

Dispersyn, G., R. Nuydens, et al. (1999). "Nimodipine and flunarizine have different effects on survival and morphology of PC12 cells during nerve growth factor deprivation." *European Journal of Pharmacology* 384(1): 61-70.

Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." *Current Opinion in Cell Biology* 16(6): 663-669

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516.

Gallagher, S., S. E. Winston, et al. (2008). "Immunoblotting and immunodetection." *Current Protocols in Immunology Chapter 8: Unit 8.10*.

- 
- Gómez-Angelats, M. and J. A. Cidlowski (2002). "Cell volume control and signal transduction in apoptosis." *Toxicologic Pathology* 30(5): 541-551.
- Gorman, A. M., S. Ceccatelli, et al. (2000). "Role of mitochondria in neuronal apoptosis." *Developmental Neuroscience* 22(5-6): 348-358.
- Greene, L. and A. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(7): 2424-8.
- Greene, L. A. (1978). "Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium." *The Journal of cell biology* 78(3): 747-55.
- Hardy, J. A., J. Lam, et al. (2004). "Discovery of an allosteric site in caspases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(34): 12461-12466.
- Harwood, S. M., M. M. Yaqoob, et al. (2005). "Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis." *Annals of Clinical Biochemistry* 42(6): 415-431.
- Hashimoto, T., L. Yamauchi, et al. (2008). "Possible involvement of caspase-7 in cell cycle progression at mitosis." *Genes to Cells* 13(6): 609-621.
- Haviv, R., L. Lindenboim, et al. (1997). "Need for caspases in apoptosis of trophic factor-deprived PC12 cells." *Journal of Neuroscience Research* 50(1): 69-80.
- Henson, E. S. and S. B. Gibson (2006). "Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy." *Cellular Signalling* 18(12): 2089-2097.
- Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009). "Cell Death." *Journal of Medicine* 361(16): 1570-1583.
- Huang, N. K., Y. L. Lin, et al. (2004). "Gastrodia elata prevents rat pheochromocytoma cells from serum-deprived apoptosis: the role of the MAPK family." *Life Sciences* 75(13): 1649-1657.

- Ito, Y., K. Oh-Hashi, et al. (2006). "p44/42 MAP kinase and c-Jun N-terminal kinase contribute to the up-regulation of caspase-3 in manganese-induced apoptosis in PC12 cells." *Brain Research* 1099(1): 1-7.
- Ji, Z. N., T. T. Dong, et al. (2006). "Ginsenoside Re attenuate beta-amyloid and serum-free induced neurotoxicity in PC12 cells." *Journal of Ethnopharmacology* 107(1): 48-52.
- Ji, Z. N. and G. Q. Liu (2001). "Inhibition of serum deprivation-induced PC12 cell apoptosis by tanshinone II A." *Acta Pharmacologica Sinica* 22(5): 459-462.
- Jiang, H., L. Zhang, et al. (2005). "Roles of Ras-Erk in apoptosis of PC12 cells induced by trophic factor withdrawal or oxidative stress." *Journal of Molecular Neuroscience* 25(2): 133-140.
- Jäger, R. (2007). "Targeting the death machinery in mammary epithelial cells: Implications for breast cancer from transgenic and tissue culture experiments." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 63(3): 231-240.
- Kao, S., R. K. Jaiswal, et al. (2001). "Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells." *The Journal of Biological Chemistry* 276(21): 18169-18177.
- Kawataki, T., K. Osafune, et al. (2008). "Neuronal maturation-associated resistance of neurite degeneration caused by trophic factor deprivation or microtubule-disrupting agents." *Brain Research* 16(1230): 37-49.
- Kayalar, C., T. Ord, et al. (1996). "Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(5): 2234-2238.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26(4): 239-257.
- Kim, J.-S., L. He, et al. (2003). "Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304(3): 463-470.

- 
- Kim, M. S., H. S. So, et al. (2000). "Hwansodan protects PC12 cells against serum-deprivation-induced apoptosis via a mechanism involving Ras and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway." *General Pharmacology* 34(4): 227-235.
- Koh, S. H., H. Kwon, et al. (2005). "Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells." *Brain Research* 18(2): 176-186.
- Krzyzanski, W., J. Oberdoester, et al. (2007). "Mechanism of ethanol enhancement of apoptosis and caspase activation in serum-deprived PC12 cells." *Life Sciences* 81(9): 756-764.
- Kumar, S. (2007). "Caspase function in programmed cell death." *Cell Death and Differentiation* 14(1): 32-43.
- Lamkanfi, M., N. Festjens, et al. (2007). "Caspases in cell survival, proliferation and differentiation." *Cell Death and Differentiation* 14(1): 44-55.
- Larner, S. F., D. M. McKinsey, et al. (2005). "Caspase 7: increased expression and activation after traumatic brain injury in rats." *Journal of Neurochemistry* 94(1): 97-108.
- Lee, J. K., J. H. Shin, et al. (2008). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) expression is increased during serum deprivation-induced neuronal apoptosis in vitro and in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a potential modulator of Fas-mediated apoptosis." *Neurobiology of disease* 30(2): 174-185.
- Leirdal, M. and M. Sioud (2002). "Tyrosinkinasereseptor-ras-ERK-signalveien som terapeutisk mål ved kreft." *Tidsskrift for Den norske legeforening* 122(2): 178-182.
- Li, J., J. Yuan, et al. (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." *Oncogene* 27(48): 6194-6206.
- Li, L., R. W. Oppenheim, et al. (2000). "Characterization of the execution pathway of developing motoneurons deprived of trophic support." *Journal of Neurochemistry* 46(4): 249-264.
- Lobner, D. (2000). "Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?" *Journal of Neuroscience Methods* 96(2): 147-152.

- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri (2007). "Cell death in health and disease." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11(6): 1214-1224.
- Loo, D. T. and J. R. Rillemaa (1998). "Measurement of cell death." *Methods in Cell Biology* 57: 251-264.
- Lorz, C. and H. Mehmet (2009). "The role of death receptors in neuronal injury." *Frontiers in Bioscience* 1(14): 583-595.
- Luo, J., J. R. West, et al. (1997). "Nerve growth factor and basic fibroblast growth factor protect rat cerebellar granule cells in culture against ethanol-induced cell death." *Alcoholism: clinical and experimental research* 21(6): 1108-1120.
- MacDonald, R. S. (2000). "The role of zinc in growth and cell proliferation." *The Journal of Nutrition* 130(5S Supplement): 1500S-1508S.
- MacFarlane, M. (2009). "Cell death pathways - potential therapeutic targets." *Xenobiotica* 39(8): 616-624.
- Mandal, M., L. Adam, et al. (1999). "Redistribution of activated caspase-3 to the nucleus during butyric acid-induced apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260(3): 775-780.
- Marchetti, A., B. Cecchinelli, et al. (2004). "p53 can inhibit cell proliferation through caspase-mediated cleavage of ERK2/MAPK." *Cell Death and Differentiation* 11(6): 596-607.
- Maroney, A. C., J. P. Finn, et al. (1999). "CEP-1347 (KT7515), an inhibitor of JNK activation, rescues sympathetic neurons and neuronally differentiated PC12 cells from death evoked by three distinct insults." *Journal of Neurochemistry* 73(5): 1901-1912
- Martin, D. A., R. M. Siegel, et al. (1998). "Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal." *Journal of Biological Chemistry* 273(8): 4345-4349.



- 
- Martin, M. C., L. A. Allan, et al. (2007). "The docking interaction of caspase-9 with ERK2 provides a mechanism for the selective inhibitory phosphorylation of caspase-9 at threonine 125." *Journal of Biological Chemistry* 283(7): 3854-3865.
- Marzo, I., S. A. Susin, et al. (1998). "Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function." *FEBS Letters* 427(2): 198-202.
- McCubrey, J. A., L. S. Steelman, et al. (2007). "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance." *Biochimica et Biophysica Acta* 1773(8): 1263-1284.
- McKay, M. M. and D. K. Morrison (2007). "Caspase-dependent cleavage disrupts the ERK cascade scaffolding function of KSR1." *Journal of Biological Chemistry* 282(36): 26225-26234.
- Meier, F., B. Schitteck, et al. (2005). "The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma." *Frontiers in Bioscience* 10: 2986-3001.
- Mi, Z., Z. K. Mirnics, et al. (2006). "Bcl-2 overexpression disrupts the morphology of PC12 cells through reduced ERK activation." *Brain Research* 1112(1): 46-55.
- Milam, S. L. and A. C. Clark (2009). "Folding and assembly kinetics of procaspase-3." *Protein Science*: 1-45.
- Mocanu, M. M., G. F. Baxter, et al. (2000). "Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury." *British Journal of Pharmacology* 130(2): 197-200.
- Mogi, M., N. Ozeki, et al. (2004). "Dual roles for NF-kappaB activation in osteoblastic cells by serum deprivation: osteoblastic apoptosis and cell-cycle arrest." *Bone* 35(2): 507-516.
- Monti, B., C. D'Alessandro, et al. (2007). "In vitro and in vivo toxicity of type 2 ribosome-inactivating proteins lanceolin and stenodactylin on glial and neuronal cells." *Neurotoxicology* 28(3): 637-644.

- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods* 65(1-2): 55-63.
- Naryzhny, S. N. (2009). "Blue Dry Western: Simple, economic, informative, and fast way of immunodetection." *Analytic Biochemistry* 392: 90-95.
- Nusetti, S., F. Obregón, et al. (2005). "Taurine and zinc modulate outgrowth from goldfish retinal explants." *Neurochemical Research* 30(12): 1483-1492.
- Nuttall, M. E., D. Lee, et al. (2001). "Selective inhibitors of apoptotic caspases: implications for novel therapeutic strategies." *Drug Discovery Today* 6(2): 85-91.
- Penaloza, C., L. Lin, et al. (2006). "Cell death in development: shaping the embryo." *Histochemistry and Cell Biology* 126(2): 149-158.
- Peterson, Q. P., D. R. Goode, et al. (2009). "PAC-1 activates procaspase-3 in vitro through relief of zinc-mediated inhibition." *Journal of molecular Biology* 388(1): 144-158.
- Peterson, Q. P., D. C. Hsu, et al. (2009). "Pro-caspase-3 activation as an anti-cancer strategy: structure-activity relationship of procaspase-activating compound 1 (PAC-1) and its cellular co-localization with caspase-3." *Journal of Medical Chemistry* 52(18): 5721-5731.
- Pop, C. and G. S. Salvesen (2009). "Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation." *The Journal of Biological Chemistry* 284(33): 21777-21781.
- Porter, A. G. and R. U. Jänicke (1999). "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis." *Cell Death and Differentiation* 6(2): 99-104.
- Putt, K. S., G. W. Chen, et al. (2006). "Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy." *Nature Chemical Biology* 2(10): 543-550.
- Rimul, G. F. (2007). "Celledød, aktivering av caspase-3, og NGFI-B-forflytning i cellelinjene PC12 og CV1." Hovedfagsoppgave for graden Candidatus pharmaciae. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Rukenstein, A., R. E. Rydel, et al. (1991). "Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms." *The Journal of Neuroscience* 11(8): 2552-2563.

- 
- Satoh, T., N. Sakai, et al. (1996). "Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells." *Brain Research* 733(1): 9-14.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *The Journal of Biological Chemistry* 274(32): 22532-22538.
- Schwab, M. E. (1996). "Molecules Inhibiting Neurite Growth: A Minireview." *Neurochemical Research* 21(7): 755-761.
- Sharifi, A. M., H. Eslami, et al. (2009). "Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells." *Neuroscience Letters* 459(2): 47-51.
- Slagsvold, H. H., C. M. Rosseland, et al. (2003). "High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons." *Brain Research* 984(1-2): 111-121.
- Slater, T., B. Sawyer, et al. (1963). "Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts." *Biochimica et Biophysica Acta* 77: 383-393.
- Sun, Y. and Z. L. Peng (2009). "Programmed cell death and cancer." *Postgraduate Medical Journal* 85(1001): 134-140.
- Szuster-Ciesielska, A., K. Plewka, et al. (2008). "Zinc inhibits ethanol-induced HepG2 cell apoptosis." *Toxicology and Applied Pharmacology* 229(1): 1-9.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: Enemies Within." *Science* 281(5381): 1312-1316.
- Tovey, E. R., S. A. Ford, et al. (1987). "Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of the resolution and detection of antigens in complex extracts " *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 14(1): 1-17.
- Truong-Tran, A. Q., J. Carter, et al. (2001). "The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death." *Biometals* 14(3-4): 315-330.

- Vaghefi, H., A. L. Hughes, et al. (2004). "Nerve growth factor withdrawal-mediated apoptosis in naive and differentiated PC12 cells through p53/caspase-3-dependent and -independent pathways." *The Journal of Biological Chemistry* 279(15): 15604-15614.
- Valavanis, C., Y. Hu, et al. (2001). "Model cell lines for the study of apoptosis in vitro." *Methods in Cell Biology* 66: 417-436.
- Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck (2002). "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis." *Anatomia, Histologia, Embryologia* 31(4): 214-223.
- Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, et al. (1998). "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally." *Immunity*(2): 267-276.
- Vaudry, D., A. Falluel-Morel, et al. (2003). "Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways." *Journal of Neurochemistry* 91(5): 1231-1243.
- Vaudry, D., P. J. S. Stork, et al. (2002). "Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections." *Science* 296(5573): 1648-1649.
- Verdaguer, E., D. Alvira, et al. (2005). "Inhibition of the cdk5/MEF2 pathway is involved in the antiapoptotic properties of calpain inhibitors in cerebellar neurons." *British Journal of Pharmacology* 145(8): 1103-1111.
- Vistica, D. T., P. Skehan, et al. (1991). "Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production." *Cancer Research* 51(10): 2515.
- Wada, K., N. Okada, et al. (1996). "Nerve growth factor induces resistance of PC12 cells to nitric oxide cytotoxicity." *Neurochemistry International* 29(5): 461-467.
- Wang, Z. B., Y. Q. Liu, et al. (2005). "Pathways to caspase activation." *Cell Biology International* 29(7): 489-496.
- Warren, S. (1997). "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability." *Current Protocols in Immunology Supplement* 21: A.3B.1-A.3B.2.

---

Widmann, C., S. Gibson, et al. (1998). "Caspase-dependent Cleavage of Signaling Proteins during Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 273(12): 7141-7147.

Wong, S. H., Y. Zhao, et al. (2007). "Zinc deficiency depresses p21 gene expression: inhibition of cell cycle progression is independent of the decrease in p21 protein level in HepG2 cells." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 292(6): C2175-2184.

Wu, F. Y. and C. W. Wu (1987). "Zinc in DNA replication and transcription." *Annual Review of Nutrition* 7: 251-272.

Xia, Z., M. Dickens, et al. (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." *Science* 270(5240): 1326-1331.

Xu, L., M. A. Yenari, et al. (2002). "Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 22(1): 21-28.

Yang, S., A. D. Thor, et al. (2006). "Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF-alpha induced apoptosis." *Apoptosis* 11(11): 1987-1997.

