

Sikkerhetsfarmakologiske studier av
deksametason - mulige effekter på
nevronkulturer

Karina Borgund



Masteroppgave i farmasi
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

Masteroppgave for graden Master i farmasi

**Sikkerhetsfarmakologiske studier av
deksametason – mulige effekter på
nevronkulturer**

Karina Borgund

Oppgaven er utført ved

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Veiledere:

Professor Ragnhild Elisabeth Paulsen

Stipendiat Lars Peter Engeset Austdal

Copyright Karina Borgund

2014

Sikkerhetsfarmakologiske studier av deksametason – mulige effekter på nevronkulturer

Karina Borgund

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Farmasøytisk institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo. Arbeidet ble påbegynt i mars 2013 og avsluttet i mai 2014. Masteroppgaven er blitt støttet med driftsmidler fra Norges forskningsråds ISP-FARM-satsning i Sikkerhetsfarmakologi.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere professor Ragnhild Elisabeth Paulsen og stipendiat Lars Peter Austdal, dere har gjennom hele arbeidet med masteroppgaven gitt meg god hjelp. Ragnhild, dine faglige kunnskaper er beundringsverdige og jeg har satt stor pris på din veiledning og entusiasme i faget. Lars, tusen takk for all hjelp på laben og for at du alltid har vært tilgjengelig for faglige diskusjoner.

Tusen takk til forskningsgruppa på ZEB. Dere har alle bidratt til å gjort dette hovedfagsåret til et spennende og lærerikt år! En spesiell takk til avdelingsingeniør Mona Gaarder for god opplæring og hjelp på laben.

Takk til mamma og pappa, dere har hatt troen på meg og støttet meg gjennom hele studiet. Det har jeg satt stor pris på.

Stor takk til medstudent Kjersti Jenssen Daling. Du har vært en støtte gjennom uendelige mange timer på laben, og jeg er takknemlig for alle våre faglige- og ikke faglige diskusjoner. Vi har hatt mange morsomme episoder på laben, og jeg sitter igjen med gode minner fra hovedfagsåret takket være deg.

Til slutt vil jeg takke Eirik. Du stiller alltid opp for meg og har vært en oppmuntring hver dag gjennom hele farmasistudiet.

Oslo, mai 2014
Karina Borgund

Sammendrag

Under utvikling av nervesystemet spiller prosesser som celleproliferasjon, migrasjon, nevruttvekst og apoptose en viktig rolle. Legemidler som benyttes under svangerskapet kan forstyrre disse prosessene og føre til permanente endringer av hjernens funksjon. Deksametason er et legemiddel som gis til gravide ved fare for prematur fødsel for å fremme lungemodning, og det er studier som viser at dette legemiddelet kan føre til forstyrrelser i hjerneutviklingen. Sikkerhetsfarmakologiske studier og bruk av *in vitro*-modeller kan øke forståelsen for hvilke skadelige effekter kjemiske stoffer har på fysiologiske funksjoner, og hvilke mekanismer som ligger bak effektene.

I denne oppgaven ble PC12-celler og kyllingkornceller fra lillehjerne benyttet som *in vitro*-modeller. Mekanismer for nevruttvekst ble studert i PC12-celler, med NGF som positiv kontroll. For å kartlegge nevruttvekst mediert via TrkA og TrkB, ble det brukt antagonister til disse reseptorene i kombinasjon med NGF, BDNF og deksametason. For å få kunnskap om flere mulige mekanismer ble MMP-9 og p53 studert da disse i nylige studier er vist å ha viktige funksjoner i nevronal modning. Luciferaseassay og westernblotting ble anvendt som metoder. Effekter av MMP-9-antagonist ble også undersøkt i PC12-celler for å se etter hemmende effekter på nevruttvekst mediert via NGF eller deksametason. Videre ble denne antagonisten testet i kyllingkornceller for å se om antagonisten gav tilsvarende funn i primærnevroner. Til slutt ble det gjort promotorstudier med GCS. Ettersom GCS er viktig i syntesen av glutation, var det interessant å se om uttrykk av den ble endret hos PC12-celler eksponert for deksametason.

I PC12-celler ble det vist at deksametason gav økt nevruttvekst. Deksametason økte uttrykket av MMP-9 og p53 i PC12-celler, og det kunne se ut som det var tendenser til hemming i nevruttvekst hos PC12-celler eksponert for MMP-9-antagonist i de morfologiske undersøkelsene. Westernblotting viste tendenser til økt uttrykk av MMP-9 for PC12-celler eksponert for deksametason. GCS-uttrykk så også ut til å bli økt hos celler eksponert for deksametason, noe som kan tyde på at deksametason kan virke inn på forsvarsmekanismer.

Ettersom det ble sett effekter ved flere endepunkt ved bruk av luciferaseassay, kan denne metoden bli et nyttig supplement som screeningverktøy ved sikkerhetsfarmakologiske studier.

Forkortelser

| | |
|-----------|---------------------------------------|
| Ad | Opp til |
| ANA | ANA-12 |
| ANOVA | Variansanalyse (analysis of variance) |
| AP-1 | Aktivatorprotein 1 |
| APS | Ammonium persulfat |
| BDNF | Hjernederivert vekstfaktor |
| BME | Basal Medium Eagle |
| BSA | Bovint serumalbumin |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CNTF | Ciliær nevrotrofisk faktor |
| DEX | Deksametason |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimetylsulfoksid |
| DTT | Dithiothreitol |
| EGL | Ytre "germinal"-lag |
| EtOH | Etanol |
| FBS | Føtalt kalveserum |
| GAP-43 | Vekstassoisert protein-43 |
| GCS | γ -glutamylcystein syntetase |
| GDNF | Gliaderivert vekstfaktor |
| GR | Glukokortikoidreseptor |
| GRE | Glukokortikoid responselement |
| GSH | Glutation |
| GW | GW 441756 |
| HPA-aksen | Hypotalamus-hypofyse-binyrebark-aksen |
| HS | Hesteserum |
| HSP | "Heat shock"-proteiner |
| IGF-1 | Insulin-lignende vekstfaktor-1 |
| IGL | Indre korncellelag |
| LDH | laktatdehydrogenase |
| LUC | Ildflueluciferase |

| | |
|---------------|------------------------------------|
| MAPK | Mitogen-aktivert proteinkinase |
| MMP | Matriks metalloprotein |
| MQ | Milli Q |
| mRNA | Messenger-ribonukleinsyre |
| NF κ B | Kjernefaktor- kappaB |
| NGF | Nervevekstfaktor |
| P75NTR | P75 nevrotrofinreseptor |
| PBS | Fosfatbufret saltvann |
| RL | Renillaluciferase |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| SE | Standardfeil |
| SHH | Sonic hedgehog |
| TBS | Trisbufret saltvann |
| TG | Tris-Glycin-buffer |
| TGS | Tris-Glycin-SDS-buffer |
| TK | Thymidinkinase |
| Tris | Trishydroksymetylaminometan |
| Trk | Tropomycin-reseptor kinase |
| Tween | Polyoksyetylen-sorbitan-monolaurat |

Innholdsfortegnelse

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INNLEDNING | 1 |
| 1.1 | Sikkerhetsfarmakologi | 1 |
| 1.1.1 | Noen nevrobiologiske modeller innen sikkerhetsfarmakologi | 2 |
| 1.2 | Glukokortikoidbehandling hos premature barn | 3 |
| 1.2.1 | Glukokortikoider og lungeutvikling | 3 |
| 1.2.2 | Glukokortikoidreseptoren og dens effekter | 3 |
| 1.2.3 | Glukokortikoidinduserte effekter i sentralnervesystemet under utvikling | 5 |
| 1.2.4 | Glukokortikoider | 6 |
| 1.3 | Sentralnervesystemet under utvikling og effekt av glukokortikoider | 6 |
| 1.3.1 | Proliferasjon, differensiering og nevrutvekst | 6 |
| 1.3.2 | Nevrotrofiner og nevrotrifinreseptorer | 8 |
| 1.3.3 | Lillehjernen under utvikling | 10 |
| 1.3.4 | Markører for differensiering av nevrer | 12 |
| 1.4 | Antioksidantforsvaret i hjernen under utvikling | 14 |
| 1.5 | Målet med oppgaven | 15 |
| 2 | MATERIALER OG METODER | 16 |
| 2.1 | Oversikt over kjemikalier, biologiske produkter og utstyr | 16 |
| 2.2 | PC12-celler | 21 |
| 2.2.1 | PC12-celler | 21 |
| 2.2.2 | Splitting av PC12-celler til flaske | 21 |
| 2.2.3 | Splitting av PC12-celler til skåler | 22 |
| 2.2.4 | Eksposering av PC12 | 23 |
| 2.3 | Korncellekulturer fra kylling | 25 |
| 2.3.1 | Korncellekulturer | 25 |
| 2.3.2 | Coating av skåler med poly-L-lysin | 26 |
| 2.3.3 | Preparering av korncellekulturer | 26 |
| 2.3.4 | Eksposering av kornceller | 31 |
| 2.4 | Morfometrisk analyse i mikroskop | 32 |
| 2.5 | Transfeksjon | 34 |
| 2.5.1 | Transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller | 34 |
| 2.6 | Luciferase | 36 |
| 2.6.1 | Ildflueluciferase | 36 |
| 2.6.2 | Høsting av celler til luciferasemåling | 36 |
| 2.6.3 | Måling av ildflueluciferaseaktivitet | 38 |
| 2.6.4 | Renillaluciferase | 38 |
| 2.6.5 | Måling av renillaluciferaseaktivitet | 39 |
| 2.7 | Westernblotting | 40 |
| 2.7.1 | Høsting av celler til westernblotting | 40 |
| 2.7.2 | Proteinmåling | 41 |
| 2.7.3 | Proteinjustering av prøver | 42 |
| 2.7.4 | Støping av gel | 43 |
| 2.7.5 | Gelelektroforese | 45 |
| 2.7.6 | Blotting av gel | 46 |
| 2.7.7 | Ponceaufarging og blokking av membran | 47 |
| 2.7.8 | Tilsetting av primære- og sekundære antistoff | 49 |
| 2.7.9 | Fremkalling og måling av intensitet | 50 |
| 2.7.10 | Stripping av membran | 51 |
| 2.8 | Figurer og statistiske analyser | 51 |
| 3 | RESULTATER | 52 |
| 3.1 | Effekt av NGF på nevrutvekst i PC12-celler | 53 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 3.2 | Effekt av BDNF på nevruttvekst i PC12-celler | 55 |
| 3.3 | Effekt av TrkA- og B- antagonist på nevruttvekst i PC12-celler | 56 |
| 3.3.1 | Effekt av DMSO på PC12-celler | 57 |
| 3.3.2 | Effekt av TrkA- antagonist på udifferensierte PC12- celler | 59 |
| 3.3.3 | Effekt av TrkA- antagonist på PC12-celler under differensiering..... | 61 |
| 3.3.4 | Effekt av TrkA- antagonist på PC12-celler eksponert for BDNF | 64 |
| 3.3.5 | Effekt av TrkB- antagonist på udifferensierte PC12- celler | 66 |
| 3.3.6 | Effekt av TrkB- antagonist på PC12-celler under differensiering..... | 68 |
| 3.3.7 | Effekt av TrkB- antagonist på PC12-celler eksponert for BDNF | 71 |
| 3.4 | Effekt av TrkB- agonist på nevruttvekst i PC12-celler | 73 |
| 3.5 | Deksametason og nevruttvekst..... | 75 |
| 3.5.1 | Effekt av deksametason 1 μ M på nevruttvekst i PC12-celler | 75 |
| 3.5.2 | Effekt av deksametason 10 μ M på nevruttvekst i PC12-celler | 77 |
| 3.5.3 | Effekt av deksametason på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for BDNF | 79 |
| 3.5.4 | Effekt av TrkA/B- antagonist på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for deksametason | 81 |
| 3.6 | Effekt av MMP-9-antagonist på nevruttvekst i PC12-celler | 86 |
| 3.6.1 | Effekt av MMP-9- antagonist hos PC12-celler eksponert for NGF | 88 |
| 3.6.2 | Effekt av MMP-9-antagonist på nevruttvekst hos PC12-celler eksponert for deksametason | 90 |
| 3.7 | Effekt av MMP-9-antagonist på nevruttvekst i kyllingkornceller | 92 |
| 3.8 | Renilluciferaseaktivitet i PC12-celler | 94 |
| 3.8.1 | Påvirkning av kotransfeksjon og behandling på enzymaktiviteten til renilluciferase .. | 94 |
| 3.8.2 | Forskjeller mellom rl-CMV og rl-tk..... | 97 |
| 3.9 | Effekt av deksametason på MMP-9-luc, p53-luc og GCS-luc i PC12-celler | 98 |
| 3.9.1 | Effekt av deksametason på promotoraktivitet av MMP-9 | 98 |
| 3.9.2 | Effekt av deksametason på p53-nivåer målt ved p53-luc | 100 |
| 3.9.3 | Effekt av deksametason på promotoraktivitet av GCS..... | 103 |
| 3.10 | Effekt av deksametason på promotoraktivitet av MMP-9 i kyllingkornceller..... | 105 |
| 3.11 | Proteinnivåer av MMP-9 målt ved westernblotting..... | 107 |
| 3.11.1 | Proteinbånd for MMP9 i PC12-celler eksponert for deksametason | 107 |
| 4 | DISKUSJON | 111 |
| 4.1 | Diskusjon av metoder | 111 |
| 4.1.1 | Valg av cellemodeller | 111 |
| 4.1.2 | Morfometrisk analyse i mikroskop..... | 113 |
| 4.1.3 | Valg av eksponeringer | 114 |
| 4.1.4 | Valg av endepunkt | 115 |
| 4.1.5 | Luciferaseassay som metode for å undersøke utviklingsmarkører..... | 116 |
| 4.1.6 | Analyse av utviklingsmarkører ved bruk av westernblotting | 117 |
| 4.2 | Diskusjon av biologiske funn | 119 |
| 4.2.1 | Effekt av NGF og BDNF på nevruttvekst | 119 |
| 4.2.2 | Effekt av Trk-antagonister på nevruttvekst i PC12-celler | 120 |
| 4.2.3 | Effekt av deksametason på nevruttvekst | 120 |
| 4.2.4 | MMP-9s rolle i nevruttvekst..... | 123 |
| 4.2.5 | p53s funksjon i nevruttvekst..... | 125 |
| 4.2.6 | GCS som markør for antioksidantforsvaret i PC12-celler..... | 126 |
| 4.2.7 | Veien videre..... | 128 |
| 5 | KONKLUSJON | 129 |
| 6 | LITTERATURLISTE..... | 130 |

1 INNLEDNING

1.1 Sikkerhetsfarmakologi

Under utviklingsprosessen til et legemiddel må det gjennomføres tre typer farmakologiske studier; primære-, sekundære- og sikkerhetsfarmakologiske studier (ICH7A 2001). Primære farmakologiske studier har som mål å finne effekter hos en substans knyttet til dens ønskede terapeutiske target. Studier knyttet til effekter som ikke er rettet mot det terapeutiske target kalles sekundære farmakologiske studier. Sikkerhetsfarmakologiske studier derimot, har som mål å undersøke potensielle uønskede farmakologiske effekter hos en substans i terapeutiske doser og i doser over det terapeutiske området (Valentin and Hammond 2008). Slike studier har som hovedmål å undersøke farmakodynamiske effekter på blant annet sentralnervesystemet, det kardiovaskulære systemet og respirasjonssystemet (ICH7A 2001, Pugsley, Authier et al. 2008). Sikkerhetsfarmakologiske studier skal også evaluere effekter observert i toksikologiske og/eller i kliniske studier, i tillegg til å studere mekanismene som ligger bak de observerte eller antatte effektene (ICH7A 2001).

Både under utvikling av et nytt legemiddel, og etter at legemiddelet har kommet på markedet, kan det oppdages uønskede legemiddelreaksjoner og senbivirkninger som gjør at studier må avbrytes, eller at legemidler må trekkes fra markedet (Valentin and Hammond 2008). Hjernen er et følsomt organ under utvikling, og eksponering for legemidler kan forstyrre prosessen og skape uønskede effekter. Dersom eksponering skjer før eller etter utviklingen av et organ, er det mindre følsomt for endringer enn dersom eksponeringen skjer under utviklingen (Rice and Barone Jr 2000).

1.1.1 Noen neurobiologiske modeller innen sikkerhetsfarmakologi

Uønskede effekter av legemidler under utvikling er ofte knyttet til ikke-farmakologiske target. Det å undersøke slike effekter er ikke alltid like enkelt fordi det kan være mange mulige target som ikke er knyttet til den ønskede effekten av legemiddelet (Guengerich and MacDonald 2007). For substanser som har en effekt i sentralnervesystemet er det derfor viktig å gjøre reseptor-bindingsstudier tidlig i utviklingsfasen av et legemiddel. Forståelse om hvordan binding til reseptor foregår, i tillegg til de funksjonelle cellulære hendelsene som oppstår i ettertid, som for eksempel frigjøring av neurotransmittorer og ”second messenger”-aktivitet, kan si mye om hvordan legemiddelet virker på et cellulært nivå (CHMP 2006).

Selv om det er ønskelig å studere effekter i celler av human opprinnelse, kan affinitet og funksjonelle effekter til den aktive substansen også undersøkes i dyrestudier og ikke-kliniske modeller (CHMP 2006). Cellekulturer avledet fra vev i sentralnervesystemet har vist seg å være et godt verktøy for å belyse cellulære- og molekylære mekanismer i nervesystemets utvikling og funksjon. I nyere tid har også *in vitro*-modeller vist seg å være nyttige for å forstå mekanismene til mulige nevrotoksiske kjemikalier. Slike modeller kan benyttes til å belyse kritiske cellulære hendelser i nerveutvikling, som differensiering og nevrutvekst (Radio and Mundy 2008). I denne masteroppgaven har det blitt benyttet blant annet en PC12-cellelinje og primærkulturer fra lillehjerne hos kylling som modeller for å studere nevrutvekst. En cellelinje definerer en populasjon av celler som kan vedlikeholdes i kultur for en bestemt periode. Disse linjene er vanligvis klonede, slik at hele cellepopulasjonen stammer fra en felles stamcelle. Flere nevronale cellelinjer er tilgjengelige og benyttes som *in vitro*-modeller for å undersøke nevrutvekst. Nevronale primærkulturer er celler som er hentet fra vev i det perifere nervesystem eller sentralnervesystemet. Disse cellene har mange av de morfologiske, nevrokjemiske og elektrofysikalske egenskapene som nevroner *in situ*. Dersom slike celler blir vedlikeholdt ved egnede betingelser kan de vise egenskaper til modne nevroner og sende ut nevrerter (Radio and Mundy 2008).

1.2 Glukokortikoidbehandling hos premature barn

1.2.1 Glukokortikoider og lungeutvikling

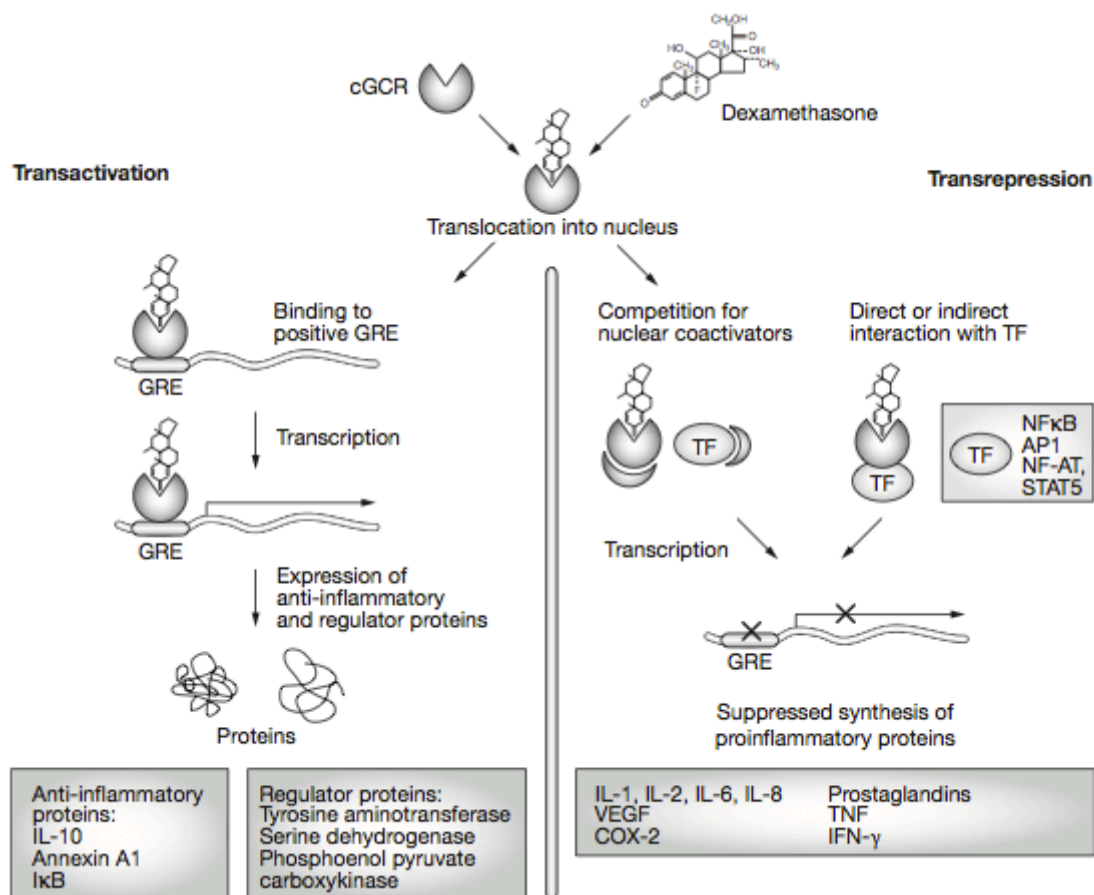
I væskefylte lunger hos et ufødt barn er stabiliteten til lungene hovedsakelig avhengig av strukturelle trekk ved alveolene. Etter fødsel, når lungene fylles med luft, er det nødvendig med surfaktant for å senke overflatespenningen i grenseoverflaten mellom væske og luft i alveolene. Under svangerskapet er glukokortikoidreseptoren (GR) uttrykt i den føtale lunge. Glukokortikoider stimulerer til produksjon av surfaktant-assosierte proteiner og øker fosfolipidsyntesen (Bolt, Van Weissenbruch et al. 2001). Pre- og postnatal behandling med glukokortikoider blir rutinemessig brukt for å øke lungemodning samt å forhindre komplikasjoner knyttet til luftveiene hos premature barn. Denne behandlingen har vist seg å være effektiv i å forhindre respiratorisk distress- syndrom og øke overlevelse (Tam, Chau et al. 2011).

1.2.2 Glukokortikoidreseptoren og dens effekter

De sterke anti-inflammatoriske og immunsuppressive effektene til glukokortikoider er hovedsakelig mediert via cystolisk glukokortikoidreseptor. En aktivering av GR kan resultere i økt uttrykk av regulatoriske proteiner, inkludert anti-inflammatoriske proteiner (transaktivering). Aktivering kan også føre til nedsatt produksjon av proinflammatoriske proteiner (transrepresjon) (figur 1.1) (Stahn and Buttgereit 2008). Glukokortikoider utøver også sin effekt via raske, ikke-genomiske mekanismer. Det kan være ikke-spesifikke interaksjoner mellom glukokortikoider og cellulære membraner, der disse legemidlene kan la seg inkorporere i og endre fysiske karakteristika hos cellemembraner. Binding av glukokortikoider til cystolisk glukokortikoidreseptor kan i tillegg ha raske effekter på cellulær metabolisme forårsaket av en frisetting og aktivering av "heat shock"- proteiner og medlemmer av MAPK-signalveien (Stahn and Buttgereit 2008) (Grier and Halliday 2005).

Glukokortikoidreseptoren er en ligand-aktivert transkripsjonsfaktor. I fravær av ligand er reseptoren lokalisert i cytoplasma som et proteinkompleks sammen med "heat shock"- proteiner (HSP) og flere komponenter av MAPK-signalveien, inkludert Src (Grier and

Halliday 2005). Ved binding av ligand vil komplekset dissosiere og reseptoren translokere til kjernen og binde som homodimer til regulatoriske elementer i promotorregionen til glukokortikoid-responsive gener, noe som resulterer i modulert gentranskripsjon. Det er som nevnt flere måter som glukokortikoidreseptor-ligandkomplekset kan modulere transkripsjonen på. Den positive reguleringen av targetgener er mediert av spesifikk binding av aktivert GR til glukokortikoid-responselement (GRE) etterfulgt av en økt gentranskripsjon. Den negative reguleringen til GR er mer variabel. Aktivert GR kan binde til negativ GRE, som fører til represjon av gentranskripsjon. GR kan også interagere med transkripsjonsfaktorer som aktivatorprotein (AP)-1 og NF- κ B via protein-protein-interaksjoner og hindre transkripsjon aktivert av disse (Se figur 1.1. Her er GR kalt GCR.) (Schäcke, Döcke et al. 2002).



Figur 1.1 Genomiske effekter av glukokortikoider inkluderer transaktivering og transrepressjon. Binding av glukokortikoid-GCR komplekset til GRE fører til uttrykk av anti-inflammatoriske og regulatoriske proteiner som IL-10 eller I κ B (transaktivering). En hemmet syntese av proinflammatoriske proteiner (transrepressjon) er forårsaket av en binding til kjerne-koaktivatorer, eller direkte eller indirekte interaksjoner med transkripsjonsfaktorer. Forkortelser: AP1, aktivator protein 1; cGCR, cystolisk glukokortikoidreseptor; COX-2, cyklooxygenase; GRE, glukokortikoidresponselement; I κ B, inhibitor av NF κ B; IFN- γ , interfeon γ ; IL, interleukin; NF-AT, kjernefaktor av aktivert t-celle; NF κ B, kjernefaktor κ B; STAT5, signal transducer and activator of transcription 5; TF, transkripsjonsfaktor; TNF, tumornekrosefaktor; VEGF, vaskulær endotelvekstfaktor. Figur hentet fra (Stahn and Buttgerit 2008).

1.2.3 Glukokortikoidinduserte effekter i sentralnervesystemet under utvikling

Den primære fysiologiske funksjonen til glukokortikoider i kroppen er å vedlikeholde homeostase som respons på indre- eller ytre forandringer. De lar organismen respondere på miljømessige faktorer ved å tilpasse gentranskripsjon til de faktiske fysiologiske behovene. Dette er godt illustrert ved respons på stress. Fysikalsk skade eller infeksjon kan raskt aktivere hypotalamus-hypofyse-binyrebark (HPA)-aksen, som resulterer i frisetting av glukokortikoider. Disse vil deretter gi responser på immunsystemet, det endokrine system i tillegg til nervesystemet (Tronche, Kellendonk et al. 1998). Glukokortikoider har også andre roller som ikke er knyttet til stress, som proliferasjon og død, i tillegg til differensiering av flere celletyper (Anderson and Axel 1986), blant annet differensiering av nevroner (Glick, Medary et al. 2000).

Glukokortikoider er nødvendig for normal hjerneutvikling. De har et bredt spektrum av effekter i de fleste regionene i den utviklende hjerne, alt fra subcellulær reorganisering til nevron-nevron-interaksjoner og nevron-glia-interaksjoner. En økning eller fjerning av disse hormonene i den føtale hjernen kan ha store innvirkninger på disse prosessene og kan permanent modifisere strukturer og funksjoner i hjernen (Matthews 2001).

Til tross for at pre- og postnatal behandling med glukokortikoider viser å øke lungemodning samt å forhindre komplikasjoner, er det imidlertid oppstått bekymring knyttet til denne behandlingen da den kan være assosiert med uheldige effekter på hjerneutvikling og nevro-motorfunksjoner (Bolt, Van Weissenbruch et al. 2001). En studie hos premature barn viste at barn som hadde blitt behandlet med deksametason postnalt hadde 20% mindre lillehjerne, sammenlignet med premature barn som ikke hadde fått steroidbehandling (Parikh, Lasky et al. 2007). Økt risiko for andre uønskede effekter knyttet til nevronal utvikling er også observert, som nedsatt kognitiv funksjon (Tam, Chau et al. 2011).

1.2.4 Glukokortikoider

Virkninger av glukokortikoider er relativt komplekse, og dette gjør at den kliniske profilen til hvert glukokortikoid er forskjellig. Metylprednisolon har for eksempel noe større potens sammenlignet med prednisolon, men mer enn tre ganger så stor potens knyttet til ikke-genomiske effekter. Glukokortikoidene deksametason og betametason er de som oftest benyttes i perinatal behandling av premature barn (Grier and Halliday 2005). Begge legemidlene passerer morkaken og blir ikke inaktivert i stor grad av enzymer som er tilstede der. Både deksametason og betametason har et fluor inkorporert i strukturen som gjør dem mer potente sammenlignet med andre glukokortikoider. I tillegg har de mindre mineralkortikoideffekt (Whitelaw and Thoresen 2000).

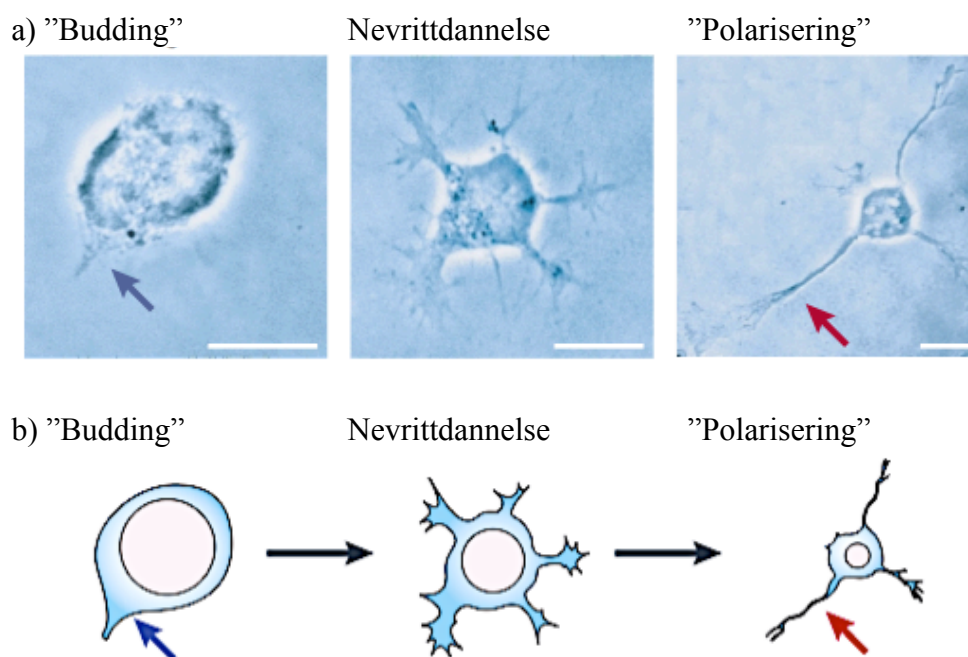
1.3 Sentralnervesystemet under utvikling og effekt av glukokortikoider

Utvikling av nervesystemet er en omfattende prosess der alt skal skje på riktig sted til riktig tid. Koordinering av prosessene proliferasjon, migrasjon, differensiering, nevruttvekst, myelinering, synapsedannelse og apoptose er nødvendig for at nervesystemet skal fungere korrekt (Anthony, Montine et al. 2001). På et tidlig fosterstadium dannes nevrallrøret, og celler i veggene av nevrallrøret gir opphav til alle nervecellene i sentralnervesystemet (Sand, Sjaastaf et al. 2001). Første tegn til utvikling av nervesystemet kan sees rundt tre uker inn i svangerskapet, og hovedstrukturene av sentralnervesystemet er definert allerede åtte uker inn i svangerskapet (Stiles and Jernigan 2010).

1.3.1 Proliferasjon, differensiering og nevruttvekst

Prenatal hjerneutvikling starter med at nevronale forløperceller blir født, deretter skjer det proliferasjon, migrasjon og differensiering. Store celler som pyramidale celler flytter lengre på seg enn små celler. Egnede innervering blir guidet ved hjelp av astroglia-celler eller nevrotrofiner. Etter at nevroner har nådd sitt endelige mål, danner de utløpere for å etablere egnede tilkoblinger (Andersen 2003). Disse utløperne kan være aksoner (som leder

nerveimpulser fra en nervecelle) eller dendritter (som mottar signaler). "Sprouting" og forlenging av aksoner og dendritter på riktig tidspunkt i riktig retning danner grunnlaget for tilstrekkelig nevronele tilkoblinger og egnet hjernefunksjon. Begrepet nevrutt benyttes når det er vanskelig å skille mellom akson og dendritt, noe som først og fremst gjelder for nevrone under utvikling. Det første trinnet i nevruttveksten kalles "budding" og drives av cytoskjelettproteinene aktin. Dette fører til dannelsen av en voksende tupp, kalt "growth cone". Nevrittvekst øker etter hvert som cellen differensierer og fører til dannelsen av aksoner og dendritter (Da Silva and Dotti 2002) (figur 1.2). Viktige bestanddeler i cellens cytoskjelett er aktin og tubulin. Disse spiller en viktig rolle for nevruttvekst. α - og β -tubulin er uttrykt i alle celler, men noen isoformer er hovedsakelig uttrykt i hjernen. Aktin er hovedbestanddelen i mikrofilamenter og er lokalisert i nevrone og glia, beriket i "growth cones" og i cytoskjelettet (Dent and Gertler 2003, Pigino, Song et al. 2012). Etter at den innledende fasen med innervering har oppstått, blir omtrent 50% av alle nevrone eliminert perinatalt via programmert celledød (Andersen 2003).



Figur 1.2 Tidlige trinn i nevriddannelse. Fasekontrast-bilder (a) og skjematisk tegning (b) av tidlige trinn i dannelsen av nevrone i kultur som stammer fra hippocampus i rotteembryo. Cellevegg brytes ned idet en lokalisert "bud" begynner å ta form (blå pil), og nevritter spirer ut av denne og andre "budder" på celleoverflaten. Nevrittene vokser idet cellen differenser, med en morfologisk "polarisering" som fører til dannelsen av akson (rød pil) og dendritter. Figur hentet fra (Da Silva and Dotti 2002).

1.3.2 Nevrotrofiner og nevrotrofinreseptorer

Nevrotrofiner

Utviklingen av det mammalske nervesystemet er svært avhengig av vekstfaktorer og de effektene de utøver. Hjernerivert vekstfaktor (BDNF), nervevekstfaktor (NGF), gliaderivert vekstfaktor (GDNF), ciliær nevrotrofisk faktor (CNTF) og insulinlignende vekstfaktor-1 (IGF-1) påvirker blant annet migrasjonen til nevronene. De fortsetter også å spille en viktig rolle i dannelsen av dendrittiske nettverk etter at nevronet har funnet sitt ”target”. I tillegg har nervevekstfaktorer en rolle i synaptisk plastisitet gjennom hele livet og er nødvendig for nevronale endringer knyttet til læring, legemiddeleksponering og nevronal reparasjon etter skade (Andersen 2003) (Barbacid 1994).

Det finnes flere familier av vekstfaktorer og nevrotrofinene er en av dem. Denne familien består av NGF, BDNF, nevrotrofin 3 (NT-3) og nevrotrofin 4 (NT-4), også kjent som NT-4/5 eller NT-5 (Barbacid 1994). Nevrotrofiner binder til to forskjellige typer transmembrane reseptorer; tropomyosin reseptor kinasene (Trk)-reseptorene A, B og C i tillegg til nevrotrofin reseptoren p75 (p75NTR). NGF binder til TrkA, BDNF og NT-4/5 aktiverer TrkB og NT-3 aktiverer TrkC. I tillegg kan også NT-3 aktivere TrkA og TrkB i enkelte cellulære sammenhenger (Patapoutian and Reichardt 2001).

NGF har evnen til å påvirke overlevelse av perifere sympatiske og sensoriske nevroner i tillegg til afferente kolinerge nevroner i sentralnervesystemet. NGF påvirker også differensiering av nevroner ved å regulere vekst av aksonale og dendrittiske utløpere. I sentralnervesystemet er NGF uttrykt i svært små mengder, hovedsakelig i hjernebarken og hippocampus. BDNF uttrykkes over alt i hjernen og fremmer overlevelse av spesifikke populasjoner av nevroner i sentralnervesystemet. Det er viktig å påpeke at nevrotrofinene ikke bare påvirker nevronal overlevelse, differensiering og funksjon, men at de også har en effekt på ikke-nevronale celler. BDNF har blant annet vist å ha en viktig rolle i funksjon av gliaceller og interaksjoner mellom nevroner og glia (Friedman 2012).

Nevrotrofinreseptorer

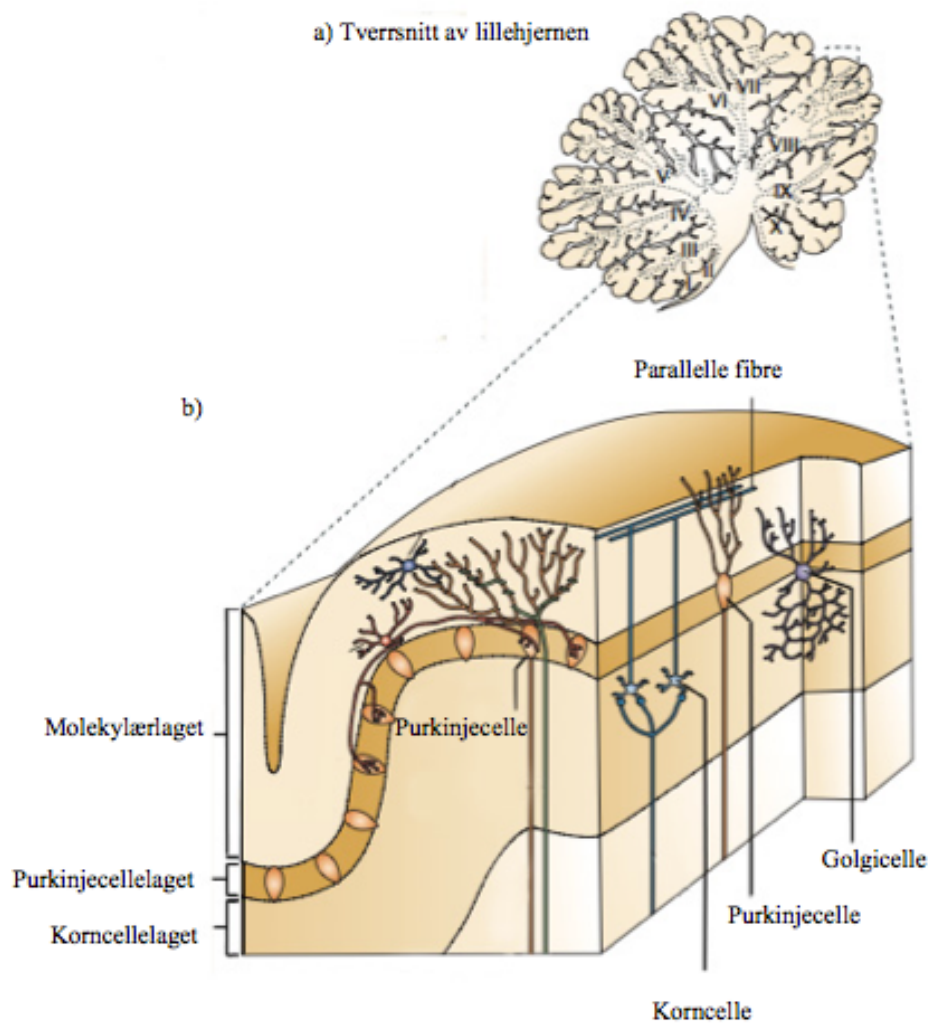
Trk-reseptorene og p75NTR-reseptoren utøver svært forskjellige effekter. Celledød blir mediert via p75, men overlevelse av cellen og differensiering er knyttet til Trk-reseptorene (Bibel and Barde 2000). Disse reseptorene kan enten samarbeide med hverandre, eller hemme hverandres funksjoner når de medierer nevrotrofineffekter. Utvikling og overlevelse av nevroner er basert på samspillet i signalene generert av Trk og p75NTR (Kaplan and Miller 2000).

Binding av nevrotrofiner til Trk- reseptorer trigger dimerisering av reseptorene, og de blir autofosforylert på spesifikke tyrosinmolekyler i det intracellulære domenet. Disse fosforylerte tyrosinmolekylene fungerer som bindingssted for flere proteiner, og rekruttering av disse setter i gang ulike signaleringsveier (Friedman 2012). Tyrosinmolekylet lokalisert i den juxtamembrane regionen til Trk-reseptoren medierer signalering i MAPK- og PI3K/Akt-signalveiene. MAPK-signalveien induserer differensiering av nevroner og nevrutvekst og PI3K/Akt-signalveien medierer overlevelsesfunksjoner. Fosforylert tyrosin i C-terminal av Trk- reseptoren rekrutterer fosfolipase C γ (PLC γ), som medierer synaptisk plastisitet (Bibel and Barde 2000).

Nervesystemet og det endokrine system er involvert i en intens ”biologisk dialog”. De deler mange kjemiske signaler og interagerer på flere nivåer for å beskytte organismen mot skadelige miljøforandringer. Forskning har fokusert på hypotesen om at adenale steroider kan være viktige regulatorer i trofiske prosesser involvert i synaptisk plastisitet. Som nevnt tidligere er glukokortikoider involvert i cellevekst og differensiering under utvikling, typiske responser som er assosiert med synaptisk plastisitet (Mocchetti, Spiga et al. 1996, Glick, Medary et al. 2000). Glukokortikoiders regulering av BDNF kan skje på flere nivåer i BDNF-signaleringen. Flere studier har foreslått at glukokortikoider kan endre BDNF-signalering ved å modulere nedstrømssignaler i MAPK-, PLC γ - og PI3K/Akt-signalveiene (Suri and Vaidya 2013).

1.3.3 Lillehjernen under utvikling

Lillehjernen har som hovedoppgave å kontrollere bevegelser som finmotorikk i tillegg til at den er knyttet til kognitive egenskaper (Hibi and Shimizu 2012). Mer enn 90% av nevronene i lillehjernen er kornceller og dette er den største homogene populasjonen av nevroner i hjernen (Contestabile 2002). Nevroner i lillehjernen er lokalisert i en trelagsstruktur; korncellelaget innerst, deretter purkinjecellelaget før man når molekylærlaget ytterst (figur 1.3) (Hibi and Shimizu 2012). I kontrast til andre nevroner som stammer fra ventrikulærsonen, stammer kornceller fra utsiden av lillehjernen, i en region kalt det ytre "germinale" laget (EGL). I de første ukene etter fødsel hos mennesker gjennomgår cellene i EGL omfattende proliferasjon for å lage mange forløpere til korncellene (GCP). Disse cellene går deretter ut av cellesyklus, sender ut parallellfibre (som etter hvert danner synapser med dendritter fra purkinjeceller i molekylærlaget) og migrerer innover til sin endelige destinasjon som er det indre korncellelaget (IGL) (Wechsler-Reya and Scott 1999, Contestabile 2002). Nervevekstfaktoren BDNF øker under utvikling av lillehjernen, og kornceller uttrykker også TrkB, høyaffinitetsreseptoren for BDNF. Det er vist at BDNF fremmer overlevelse og stimulerer vekst av aksoner av kornceller. I tillegg er det vist at BDNF stimulerer direkte til migrasjon av kornceller (Borghesani, Peyrin et al. 2002).



Figur 1.3: Fremstilling av lillehjernebarken og noen celletypers plassering i lillehjernen. Figuren viser et tverrsnitt av lillehjernen (a), mens (b) viser lillehjernebarken og noen celletyper, og hvordan disse fordeler seg i lillehjernebarkens distinkte lag. Molekylærlaget inneholder purkinjecellens dendritter og aksoner fra korncellene. Purkinjecellelaget inneholder purkinjecellenes cellekropper, mens korncellelaget består av cellekroppene til korncellene og goljiceller. Goljiceller er viktige inhiberende celler som bidrar på å styre korncelleaktiviteten (Vos, Maex et al. 1999) Modifisert figur hentet fra (Ramnani 2006).

1.3.4 Markører for differensiering av nevritter

p53

p53 er en transkripsjonsfaktor som først ble identifisert som et tumorsuppressorgen og har blitt et av de mest studerte genene innenfor humane sykdommer, ettersom mange tumorer har defekter i p53-signalveien. p53 aktiverer uttrykk av flere gener i cellen og fører til blant annet reversibel låsing av cellesyklus eller apoptose. Den proapoptotiske effekten til p53 oppstår ofte når celler er eksponert for store mengder genotoksisk stress, mens dens effekter på låsing av cellesyklus kan oppstå ved moderat DNA-skade (Murray-Zmijewski, Slee et al. 2008). I senere tid har en nyere rolle for p53 dukket opp innenfor nevrobiologien, hvor man har sett at p53 har en rolle i regulering av nevruttvekst og aksonal regenerering (Di Giovanni and Rathore 2012). Høye nivåer av p53- mRNA har blant annet blitt detektert i hjernevev under utvikling i områder som viser lite eller ingen tegn til apoptose (Di Giovanni, Knights et al. 2006). En tidligere studie utført med PC12-celler har vist at p53 spiller en viktig rolle i NGF-mediert nevronal differensiering i PC12-celler. Differensieringen initiert av NGF i PC12-celler ble økt ved overuttrykk av vill-type p53, men hemmet av mutant p53 eller ”knockdown” av endogen villtype p53. p53-”knockdown” eller overuttrykk av mutant p53 dempet også NGF-mediert aktivering av TrkA og aktivering av MAPK-signalveien (Zhang, Yan et al. 2006). En annen studie viste også at p53 var transkripsjonell aktiv i både PC12-celler i respons på NGF-TrkA-signaler og hos primærnevroner. Luciferaseassay viste at p53 aktiverte transkripsjon av flere cytoskjelettmodulerende gener, inkludert GAP-43, cGKI, aktinbindende proteinet Coronin 1b og Rab13 som er medlem av RAS-familien (Di Giovanni and Rathore 2012).

Nevronal stopp av cellesyklus induisert av glukokortikoidreseptoren er i tillegg assosiert med en økning i p53 sin translokering og transkripsjonsaktivitet i kjernen. Studier har vist at celler eksponert for deksametason låses i cellesyklusfasen G₁, uten å vise tegn til apoptose selv etter overuttrykk av p53 (Crochemore, Michaelidis et al. 2002).

MMP-9

Hjerneutvikling består som nevnt av en ordnet koordinering av hendelser som cellulær vekst, differensiering og apoptose. Celle-celle-interaksjoner og interaksjoner mellom celler og ekstracellulær matriks sørger for viktig informasjon i kontrollering av disse prosessene. MMP-9 er en ekstracellulær, sink-bindende endopeptidase som koordinerer disse interaksjonene ved å kløve proteiner og reseptorer i ekstracellulær matriks (Vaillant, Meissirel et al. 2003). Andre studier har vist at cellelinjen SKSNBE uttrykker nevronale markører og er egnet som modell for å studere nevruttvekst. Dette ble konstatert ettersom den viste til nevruttvekst etter respons på retinoidsyre. Studien viste også at MMP-9 var induert og funnet lokalisert i disse nevruttene, noe som indikerer at dette proteinet deltar i nevruttvekst (Chambaut - Guérin, Hérigault et al. 2000). Dette har blitt støttet av andre *in vitro*-modeller som også har vist at MMP-er er lokalisert i aksoner, blant annet hos perifere nevroner og PC12-celler eksponert for NGF (Nordstrom, Lochner et al. 1995), (Pittman and Williams 1989).

Koblingen mellom MMP-er og glukokortikoider er også interessant. Studier har demonstrert at uttrykk av MMP- gener kan bli hemmet eller induert av glukokortikoider i flere modellsystemer, og at en eksponering av glukokortikoider kan føre til forstyrrelser under utvikling hos flere arter. Derfor kan det spekuleres i om glukokortikoid-indusert teratogenese er delvis mediert gjennom glukokortikoidreseptorens endring i uttrykk og aktivitet av MMP-er (Hillegass 2008).

1.4 Antioksidantforsvaret i hjernen under utvikling

Legemidler og andre xenobiotika kan føre til frie radikaler og oksidativt stress (Aust, Chignell et al. 1993). Alle aerobe organismer er utsatt for et vist nivå av fysiologisk oksidativt stress fra mitrokondriell respirasjon. Superoksid og hydrogenperoksid er mellomprodukter som dannes i denne prosessen. Disse kan føre til dannelse av toksiske oksygenradikaler som kan skape lipidperoksidering og celledskade (Lu 2009). En ubalanse i likevekten mellom dannelsen av frie radikaler og antioksidantforsvaret kan derfor være svært ugunstig. Hjerneceller er spesielt utsatt for frie radikaler, fordi hjernen har høyt oksygenforbruk og sentralnervesystemet er rikt på polyumettede fettsyrer som er potensielle target for lipidperoksidering (Behl, Lezoualc'h et al. 1997). En umoden hjerne er spesielt sårbar overfor frie radikaler. Antioksidantforsvaret er ikke ferdig "utviklet" og det er stor tilgjengelighet på jern som katalyserer dannelsen av frie radikaler. Nevroner er i tillegg mer følsomme overfor frie radikaler enn gliaceller, men forløpere til oligodendrocytter og umodne oligodendrocytter hos svært premature barn er også følsomme overfor mangel på antioksidanter og angrep av frie radikaler (Blomgren and Hagberg 2006).

Glutation (GSH) er et viktig intracellulært peptid som deltar i antioksidantforsvaret i kroppen. Dette molekylet detoksifiserer elektrofiler, vedlikeholder tiorstatusen for proteiner ved å forhindre oksidasjon av SH-grupper, detoksifiserer frie radikaler og modulerer kritiske cellulære prosesser som DNA-syntese, mikrotubuli-relaterte prosesser og immunfunksjoner. Faktorer som er med og bestemmer glutationsyntesen er tilgjengeligheten av cystein og aktiviteten til det hastighetsbestemmende enzymet γ -glutamylcystein syntetase (GCS), også kjent som glutamat-cysteinligase. Transkripsjonelle og post-transkripsjonelle mekanismer kan modulere aktiviteten til dette viktige enzymet og endre nivåer av glutationsyntese (Lu 1999). Deksametason har tidligere vist seg å kunne påvirke syntesen av GSH og føre til en nedgang i nivåer av GCS og GCS-HS-mRNA-uttrykk (Lu 2009).

1.5 Målet med oppgaven

Hensikten med oppgaven har vært å teste om deksametason kan virke inn på utvalgte trinn i nevronal utvikling. Glukokortikoider blir rutinemessig brukt prenatalt for å fremme lungemodning, men det er interessant å vite om denne bruken kan skape konsekvenser for hjerneutvikling hos barnet, og eventuelt hvilke mekanismer som ligger bak effektene.

Delmålene har vært:

1. Undersøke effekter på nevruttvekst i PC12-celler, forårsaket av deksametason og nevrotrofinene NGF og BDNF, og videre se om nevruttveksten er mediert via reseptorene TrkA og TrkB.
2. Undersøke om legemiddeleffekter av deksametason kan påvirke proteinuttrykk av p53 og MMP-9, to proteiner koblet til nevruttvekst, ved bruk av luciferaseassay, westernblotting og morfologisk undersøkelse i mikroskop.
3. Undersøke effekter av MMP-9-antagonist hos korncellekulturer fra lillehjerne hos kylling, og se om disse resultatene kan sammenlignes med observasjoner fra PC12-celler.
4. Undersøke om deksametason kan påvirke antioksidantforsvaret i PC12-celler ved å se på GCS som markør.

2 MATERIALER OG METODER

2.1 Oversikt over kjemikalier, biologiske produkter og utstyr

Tabell 2.1 Kjemikalier og biologiske produkter

| Produkt | Leverandør |
|--|--|
| Adenosin-5-trifosfat (ATP) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Acrylamide/BIS solution, 30% | Bio-Rad Laboratories Inc., USA |
| Ammoniumsulfat (APS) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| ANA-12 | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Basal Medium Eagle (BME) | Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA |
| BCA TM Protein Assay Kit Pierce ® | Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA |
| BDNF (hjernerivert vekstfaktor) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Bovint serumalbumin (BSA) (A9418) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Bromfenolblå | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| CaCl ₂ (kalsiumklorid) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Deksametason | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| DMSO | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| DNase1, bovint (D5015) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Donkey-anti rabbit (SC2313) | Santa Cruz Biotechnology |
| Dual luciferase Reporter Assay System | Promega Corporation, USA |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Etanol (absolutt alkohol) | Kemetyl Norge AS, Vestby, Norge |
| Føtalt kalveserum (FBS) | Lonza, Walkersville, USA |
| Glukose | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| L-Glutamin | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Glyserol | VWR International Ltd, England |

| | |
|--|---|
| GW 441756 | Tocris Bioscience, UK |
| HCl (hydrogenklorid) | VWR International Ltd, England |
| Hesteserum (HS) | Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Insulin, bovint (91882) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Isopropanol | Kemetyl Norge AS, Vestby, Norge |
| KCl (kaliumklorid) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| KH ₂ PO ₄ (kaliumhydrogenfosfat) | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| Kyllingserum | Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Leupeptin | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| LM 22A-4 | Tocris Bioscience, UK |
| D-Luciferin | Duchefa Biochemistry, Nederland. |
| Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| Luminata™ Forte Western HRP Substrate | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| MAb to lamin A/C | Alexis Biochemicals, Switzerland |
| 2- mercaptoetanol | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| MES (2-(N-morpholino)etansulfonsyre) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Metafectene® Pro | Biontex laboratories, Tyskland |
| Metanol | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Mg(CH ₃ COO) ² (magnesiumacetat) | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| MgSO ₄ (magnesiumsulfat) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| MMP-9 inhibitor I | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| NaCl (natriumklorid) | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| NaHCO ₃ (natriumbikarbonat) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Na ₂ HPO ₄ (dinatriumhydrogenfosfat) | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| NaOH (natriumhydroksid) | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| Na ₂ SeO ₃ (natriumselenitt) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Natriumpyruvat | Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA |
| Na ₃ VO ₄ (natriumortovanadat) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| NGF (nervevekstfaktor) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml- 10 mg/ml) | Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA |

| | |
|--|--------------------------------|
| Pepstatin-A | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| PMSF | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Poly-L-lysin | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Ponceaus fargeløsning | Bio-Rad Laboratories Inc., USA |
| Precision Plus Protein TM Standards All Blue | Bio-Rad Laboratories Inc., USA |
| Putrescin | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Rbt X Rat MMP-9 | Merck KGaA Darmstad, Tyskland |
| Restore TM PLUS Western Blot Stripping Buffer | Thermo Fischer Scientific, USA |
| SDS (natrium-dodecylsulfat) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| TEMED | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Transferrin (humant) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Trijodid-L-tyronin-natriumsalt (T ₃) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Tris-Base | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Tris/Glycin, 10X | Bio-Rad Laboratories Inc., USA |
| Tris/Glycin/SDS, 10X | Bio-Rad Laboratories Inc., USA |
| Triton | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Trypsin (bovint) | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Trypsinhemmer | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Tween 20 | Sigma- Aldrich, St.Louis, USA |
| Tørrmelk | Normilk, Levanger, Norge |

Tabell 2.2 Utstyr

| Utstyr | Leverandør |
|--|---|
| Autoklav (Matachana 350 L-2) | Thune, Norge |
| Brett, 96 brønner | Nunc TM , Danmark |
| Cellekulturflaske 75 cm ² | Nunc TM , Danmark |
| Cellekulturskåler | Nunc TM , Danmark |
| Celleskrape | Corning Incorporated, USA |
| CO ₂ - inkubatorskap | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Elektroforeseapparat (PowerPac 300) | Bio Rad, USA |
| Finnpipette | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Fluorescensmikroskop (Eclipse TE300) | Nikon, Japan |
| Fremkallingsmaskin (Chemi Genius2) | Bio Imaging System, Syngene Frederick, USA |
| Gassbrenner (Fireboy) | Integra Biosciences Zizers, Sveits |
| Kamera til fluorescensmikroskop (Digital Sight DS-QiIMc) | Nikon, Japan |
| Kjølesentrifuge (Hergeus Fresco 21) | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| LAF-benk (Holten LaminAir, modell 1.2) | Eco Holten AS, Danmark |
| Luminometer (Lumat LB 9507) | EG&G, Tyskland |
| Lysmikroskop (TMS 2.2.1) | Nikon, Japan |
| Magnetrorer | RCT basic, IKA Labortechnik, Tyskland |
| Nitrocellulosemembran | Bio-Rad, California, USA |
| pH-meter (Metrohm 744) | Metrohm, Sveits |
| Pipetboy | Integra Bioscience, Zizers, Sveits. |
| Pipetter | Corning Incorporated, Mexico |
| Pipettespisser | Sartorius Biohit, Helsinki, Finland |
| Plasmid-kit (Jetstar Maxiprep Kit 105) | Genomed, Tyskland |
| Plateleser (HTS 7000 Plus Bio-Assay) | Perkin Elmer, USA |
| Roller Mixer SRT9 | Stuart, USA |
| Rugemaskin: Brinsea Ova-Easy Advance | Sandford, UK. |
| Rør til luminometer | Sarstedt, Tyskland |
| Sentrifuge (13000 rpm = 10 000 x g) Kubota 2000 | Biofuge fresco, Heraeus, England |
| Sentrifugerør | Corning Incorporated, Mexico |

| | |
|---|------------------------|
| Sterilfilter 0,2 µm | Whatman, Tyskland |
| Støpeformer til westernblotting Mini-PROTEAN® | Bio-Rad Lab. Inc., USA |
| Tellekammer | Bürcher |
| Trypsineringsflaske | Bellco, USA. |
| Vannbad (Sub Aqua 12) | Grant, England |
| Vekt AB54-S | Mettler Toledo, USA |
| Whirlmixer M52 Minishaker | Tamro Lab. AS, Sverige |

2.2 PC12-celler

2.2.1 PC12-celler

PC12-celler er klonede celler som stammer fra et feokromocytom i binyre hos rotte. Foruten sine egenskaper assosiert med feokromocytomer, har PC12-celler evnen til å respondere på nervevekstfaktor (NGF). En eksponering for NGF gjør at cellene endrer fenotype og får mange egenskaper som er karakteristiske for sympatiske nevroner. Typiske egenskaper er at proliferasjon opphører, cellene får nevruttvekst og de blir elektrisk eksiterbare (Greene and Tischler 1976). Disse egenskapene gjør PC12-cellene egnet til å undersøke mekanismer hos mulige nevrotoksiske stoffer, og hvilket potensial de kan ha til å påvirke nevronal differensiering.

2.2.2 Splitting av PC12-celler til flaske

PC12- celler er dyrket i cellekulturflasker og inkubert i inkubatorskap ved 37 °C og 5% CO₂. For å vedlikeholde cellene splittes de til nye flasker hver 3. eller 4. dag.

1. Cellekulturflasken inspiseres i et mikroskop for å se om cellene er konfluente.
2. Gammelt PC12-medium (tabell 2.3) tømmes av.
3. 10 ml nytt PC12-medium (tabell 2.3) tilsettes flasken.
4. Flasken bankes hardt på sidene for at cellene skal løsne.
5. Flasken inspiseres i mikroskop for å se om cellene har løsnet.
6. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned et tilstrekkelig antall ganger for å bryte opp celleaggregater. Cellesuspensjonen kan også etter behov pipetteres med en innsnevret pasteurpipette til alle celleaggregater er brutt opp.
7. Cellene inspiseres i mikroskop for å undersøke om alle celleaggregater har blitt splittet opp i enkeltceller.
8. 1,5 ml cellesuspensjon og 20 ml nytt PC12-medium (tabell 2.3) overføres både til en ny cellekulturflaske (75cm²) og tilbake til opprinnelig flaske.

2.2.3 Splitting av PC12-celler til skåler

1. Cellene splittes som beskrevet i trinnene 1-7 over.
2. En liten prøve av cellesuspensjonen tas ut til telling. Bürcher tellekammer i lysmikroskop brukes for å bestemme celletettheten i denne suspensjonen.
3. Fire rutenett (4x4 ruter) telles, to på hver side av midten av tellekammeret. Gjennomsnittet av disse tellingene brukes.
4. Ønsket celletetthet i skålene varierer ut ifra hvordan de skal behandles. Mengde cellesuspensjon som skal brukes beregnes med formelen:

Mengde cellesuspensjon (ml)

$$= \frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{ønsket celletetthet per ml}}{\text{celletetthet i cellesuspensjonen} \times 10^4}$$

5. Deretter beregnes mengde medium som skal benyttes:

Mengde medium (ml)

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

6. Beregnet mengde cellesuspensjon og PC12-medium (tabell 2.3) blandes godt og overføres til sterile skåler, og 1ml ekstra tilsettes små skåler dersom de skal stå lenge til inkubasjon. Mengde cellesuspensjon per skål er angitt i tabell 2.4. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5% CO₂.

Celler blir splittet ut på celleskåler i ulike størrelse og med ulike tettheter ut fra hvilken metode som skal benyttes:

- Til mikroskopering: små skåler med en tetthet på $1,7 \times 10^4$ celler/ml eller medium skåler med en tetthet på $3,5 \times 10^4$ celler/ml (avsnitt 2.4)
- Til luciferase: små skåler med en tetthet på 7×10^4 celler/ml (avsnitt 2.6)
- Til høsting til western: store skåler med en tetthet på 7×10^4 celler/ml (avsnitt 2.7)

Tabell 2.3 PC12-medium

| Komponenter | Mengde | Konsentrasjon |
|---|--------|---------------|
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) | 500 ml | |
| Føtalt kalveserum (FBS) | 50 ml | 10 % |
| Hesteserum (HS) | 25 ml | 5 % |
| Natriumpyruvat (100 mM) (P) | 5 ml | 1 % |
| Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml) (PS) | 5 ml | 1 % |

- Komponentene tilsettes i LAF-benk aseptisk
- Mediet oppbevares ved 2-8 °C

Tabell 2.4 Mengde celleduspensjon per skål

| Skål | Størrelse | Mengde |
|--------|----------------------|--------|
| Liten | 8,8 cm ² | 1 ml |
| Medium | 21,5 cm ² | 3,3 ml |
| Stor | 66,5 cm ² | 10 ml |

Tabell 2.5 Oversikt over serum brukt i PC12-medium

| Serum | Lot-nr. | Katalognr. | Leverandør |
|-------------------|---------|------------|------------|
| Hesteserum | 1131917 | 16050 | Gibco, USA |
| Føtalt kalveserum | 0SB017 | DE14-801F | Lonza, USA |

2.2.4 Eksponering av PC12

Hos skålene som skulle analyseres i mikroskop, ble eksponering gjort 24 timer etter utsplitting. Antagonistene GW441756 og ANA-12 i tillegg til MMP-9-hemmeren ble tilsatt 15 minutter før tilsetning av vekstfaktorer og deksametason. Forsøkene ved bruk av mikroskop ble utført blindet ved at medstudent gav skålene randomiserte tall. For alle metodene som ble benyttet, ble skålene inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 48 eller 72 timer. Eksponeringer er vist i tabeller under (tabell 2.6 og 2.7).

Tabell 2.6 Eksponering av PC12-celler til mikroskop

| Stockløsning | Konsentrasjon i skål |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Ubehandlet | |
| NGF 20 µg/ml | 50 ng/ml |
| BDNF 0,1 µg/µl | 100 ng/ml eller 300 ng/ml |
| DMSO | 1 µl/ml |
| Deksametason 1,0 mM | 1 µM |
| Deksametason 10 mM | 10 µM |
| Deksametason 1,0 mM + BDNF 0,1 µg/µl | 1 µM + 100 ng/ml |
| Deksametason 1,0 mM + ANA-12 10 mM | 1 µM + 10 µM |
| ANA-12 0,1 mM | 0,1 µM |
| ANA-12 1,0 mM | 1 µM |
| ANA-12 10 mM | 10 µM |
| ANA-12 50 mM | 100 µM |
| GW441756 0,1 mM | 0,1 µM |
| GW441756 1,0 mM | 1 µM |
| GW441756 10 mM | 10 µM |
| ANA-12 0,1 mM + BDNF 0,1 µg/µl | 0,1 µM + 100 ng/ml |
| ANA-12 1,0 mM + BDNF 0,1 µg/µl | 1 µM + 100 ng/ml |
| ANA-12 10 mM + BDNF 0,1 µg/µl | 10 µM + 100 ng/ml |
| ANA-12 50 mM + BDNF 0,1 µg/µl | 100 µM + 100 ng/ml |
| GW441756 0,1 mM + BDNF 0,1 µg/µl | 0,1 µM + 100 ng/ml |
| GW441756 1,0 mM + BDNF 0,1 µg/µl | 1 µM + 100 ng/ml |
| GW441756 10 mM + BDNF 0,1 µg/µl | 10 µM + 100 ng/ml |
| ANA-12 0,1 mM + NGF 20 µg/ml | 0,1 µM + 50 ng/ml |
| ANA-12 1,0 mM + NGF 20 µg/ml | 1 µM + 50 ng/ml |
| ANA-12 10 mM + NGF 20 µg/ml | 10 µM + 50 ng/ml |
| ANA-12 50 mM + NGF 20 µg/ml | 100 µM + 50 ng/ml |
| GW441756 0,1 mM + NGF 20 µg/ml | 0,1 µM + 50 ng/ml |
| GW441756 1,0 mM + NGF 20 µg/ml | 1 µM + 50 ng/ml |
| GW441756 10 mM + NGF 20 µg/ml | 10 µM + 50 ng/ml |
| LM22A-4 1000 µM | 1000 nM |
| LM22A-4 100 µM | 100 nM |
| LM22A-4 10 µM | 10 nM |

| | |
|---|---------------------|
| MMP9-antagonist 100 μ M | 100 nM |
| Deksametason 10 mM + MMP9-antagonist 100 μ M | 10 μ M + 100 nM |
| MMP9-antagonist 100 μ M + NGF 20 μ g/ml | 100 nM + 50 ng/ml |

Tabell 2.7: Eksponering av PC12-celler til westernblot, transfeksjon og luciferase

| Stockløsning | Konsentrasjon i skål |
|---|-----------------------|
| Ubehandlet | |
| NGF 20 μ g/ml | 50 ng/ml |
| Deksametason 10 μ M | 10 nM |
| Deksametason 1,0 mM | 1 μ M |
| Deksametason 10 mM | 10 μ M |
| Deksametason 10 μ M + NGF 20 μ g/ml | 10 nM + 50 ng/ml |
| Deksametason 1,0 mM + NGF 20 μ g/ml | 1 μ M + 50 ng/ml |
| Deksametason 10 mM + NGF 20 μ g/ml | 10 μ M + 50 ng/ml |
| EtOH | 1‰ |
| EtOH + NGF 20 μ g/ml | 1‰ + 50 ng/ml |

2.3 Korncellekulturer fra kylling

2.3.1 Korncellekulturer

Primærkulturer av kornceller fra lillehjerne ble etablert som *in vitro*-modell for nesten 40 år siden for å studere flere aspekter innenfor nevrobiologien, blant annet nevronal utvikling, funksjon og patologi (Contestabile 2002).

2.3.2 Coating av skåler med poly-L-lysin

Et døgn før korncellekulturene skal prepareres, behandles skålene med poly-L-lysin for å øke celleadhesjon til overflaten på skålen og bedre vekst av cellene.

Prosedyre for coating av skåler:

1. 10 ml MQ-vann tilsettes en flaske med 5 mg poly-L-lysin.
2. Løsningen overføres til en steril erlenmeyerkolbe og fortynnes til en konsentrasjon på 0,01 mg/ml i 500 ml MQ-vann og blandes godt.
3. 1 ml av poly-L-lysin-løsningen tilsettes små skåler (8,8 cm³), 2 ml tilsettes medium skåler (21,5 cm³) og 5 ml tilsettes store skåler (66,5 cm³). Skålene beveges for at hele overflaten skal dekkes av løsningen.
4. Etter at skålene har stått i 30-60 minutter, pipetteres poly-L-lysin-løsningen av og skålene tørkes over natt i LAF-benk med luftstrøm på maksimal styrke.

2.3.3 Preparering av korncellekulturer

Befruktede kyllingegg fra kyllingarten *Gallus gallus* skaffes fra Nortura i Våler. Eggene oppbevares kjølig i inntil 7 døgn før de legges i rugemaskiner. Rugemaskinen har en konstant temperatur på 37-39 °C og 45 % luftfuktighet opprettholdes ved å tilsette vann i eget kammer på rugemaskinen. Eggene vendes maskinelt hver dag fra dag 0. På dag 7 gjennomlyses eggene, og ubefruktede egg fjernes. Eggene tas ut av rugemaskinen på dag 17-18, 3-4 dager før normal klekkesetid. Eggene gjennomlyses og døde kyllingfostre fjernes.

Preparering av korncellekulturer foregår i LAF-benk med sterilt utstyr (tabell 2.8). Prepareringen av kyllingkornceller ble kun observert og ikke utført selv.

Tabell 2.8 Sterilt utstyr til preparering av korncellekulturer fra kylling

Skalpell

Saks og buet pinsett til disseksjon av hjernen

Rette pinsetter til å fjerne hjernehinner

Glassflasker til løsningene 1-5

Trypsineringsflasker

50 ml plastrør

Pipetter

Pasteurpipetter

Målesylinder

Erlenmeyerkolbe

Petriskåler

Prosedyre for preparering av korncellekulturer fra kylling:

1. Egg legges på is i 7 minutter for å bedøve kyllingfostrene.
2. 6-7 egg av gangen vaskes i 70 % etanol.
3. Eggene knuses i store sterile petriskåler, og kyllingfostrene avlives ved rask dekapitering med steril skalpell.
4. Hodene fraktes til LAF-benk der lillehjernene tas ut ved hjelp av steril saks og pinsett. Lillehjernene legges i en stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.9).
5. Hjernehinnene fjernes fra lillehjernene ved hjelp av pinsetter og legges i en ny stor petriskål med løsning 1.
6. Løsning 1 suges av. Lillehjernene samles på midten av skålen og kuttes i mindre biter vinkelrett på hverandre. 10 ml av løsning 1 tilsettes skålen.
7. Hjernebitene sammen med løsningen pipetteres over til et sterilt rør og tilsettes 10 ml av løsning 1. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt i Kubota 2000 sentrifuge.
8. Supernatant fjernes og pelleten tilsettes 8-15 ml av løsning 2 (tabell 2.9). Pelleten løses opp ved å pipettere forsiktig opp og ned.
9. Cellesuspensjonen overføres til steril trypsineringsflaske og settes på vannbad ved 37 °C i 15 minutter. Flasken rystes med jevne mellomrom. Korkene på flaskene må ikke skrus helt til.
10. Cellebiter fra trypsineringsflasken suges opp og overføres til et sterilt 50 ml rør med 15 ml av løsning 4 (tabell 2.9). Røret fylles opp med løsning 4.

11. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter. Hvis supernatanten etter sentrifugeringen ikke er klar, tilsettes det en liten mengde av løsning 3 (tabell 2.9) og sentrifugeringen gjentas.
12. Supernatant fjernes og røret tilsettes 3 ml av løsning 3.
13. Pelleten pipetteres opp og ned med en steril pipette et tilstrekkelig antall ganger for å homogenisere celleduspensjonen. Homogeniseringen kan effektiviseres ved å brenne av tuppen av pipetten for å få en smal og rund åpning. Homogeniseringen utføres til løsningen har et blakket utseende.
14. La røret stå slik at de tyngste klumpene synker til bunnen. Den øverste delen av løsningen overføres til et sterilt 50 ml rør som er tilsatt 15ml av løsning 5 (tabell 2.9).
15. 2 ml av løsning 3 tilsettes røret med celleklumpene. Punkt 12 -13 gjentas helt til alle celleklumpene er homogenisert og løsningen er blakket. Løsningen overføres til røret med løsning 5 og sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.
16. Supernatanten fjernes og 10 ml platemedium med serum (tabell 2.11) tilsettes røret.
17. Pelleten løses i mediet og celleduspensjonen overføres til en steril glassflaske som er tilsatt halvparten av beregnet mengde platemedium med serum ut fra antall preparerte hjerner. Det trengs 15-20 ml platemedium med serum for hver lillehjerne. Løsningen blandes godt.
18. En liten del av celleduspensjonen overføres til et Bürcher tellekammer. Celleduspensjonen fortynnes med cellemedium slik at cellene som plates ut har en tetthet på $1,7 \times 10^6$ celler/ml. Følgende formel benyttes for å bestemme mengde platemedium med serum som trengs:

Mengde medium (ml)

$$= \frac{\text{antall ml celleduspensjon} \times \text{celletetthet per ml celleduspensjon}}{1,7 \times 10^6}$$

19. Celleduspensjonen overføres til sterile skåler coatet med poly-L-lysin nevnt i delkapittel 2.3.2. Mengde celleduspensjon i liten skål ($8,8\text{cm}^3$) er 1 ml.
20. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5% CO₂.
21. Etter 24 timer ble platemedium med serum erstattet med serumfritt vekstmedium (tabell 2.12).

Tabell 2.9 Løsninger til preparering av korncellekulturer

| Løsning | Komponenter | Mengde |
|-----------|--|-----------|
| Løsning 1 | Bovint serumalbumin (BSA) | 1,50 g |
| | Krebs-Ringer-løsning, 10X (tabell 2.10) | 50 ml |
| | MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann) | 4,0 ml |
| | Destillert vann | ad 500 ml |
| Løsning 2 | Trypsin | 25 mg |
| | Løsning 1 | 100 ml |
| Løsning 3 | Trypsinhemmer | 26 g |
| | DNase I | 6,25 mg |
| | MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann) | 0,5 ml |
| | Løsning 1 | ad 50 ml |
| Løsning 4 | Løsning 1 | 100 ml |
| | Løsning 3 | 16 ml |
| Løsning 5 | Løsning 1 | 40 ml |
| | MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann) | 320 µl |
| | CaCl ₂ (12,0 mg/ml destillert vann) | 320 µl |

1. Løsningene tillages rett før bruk
2. Løsning 1-5 sterilfiltreres (0,2 µm)
3. Mengdene er tilpasset cellekulturer med opptil 80 hjerner.

Tabell 2.10 10X Krebs-Ringer-løsning

| Komponenter | Mengde | Konsentrasjon |
|---------------------------------|-----------|---------------|
| NaCl | 35,35 g | 1,21 M |
| Glukose | 12,85 g | 0,14 M |
| NaHCO ₃ | 10,70 g | 0,25 M |
| KCl | 1,80 g | 48 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 0,83 g | 12 mM |
| Fenolrødt | 50 mg | 0,28 mM |
| Destillert vann | Ad 500 ml | |

- Løsningen sterilfiltreres (0,2 µm)
- Oppbevares ved 2-8°C i inntil 5-6 måneder

Tabell 2.11 Platemedium med serum til korncellekulturer fra kylling

| Komponenter | Mengde | Konsentrasjon |
|--|---------|--------------------|
| Basal Medium Eagle (BME) | 500 ml | |
| Varmeaktivert kyllingserum | 50 ml | 7,5 % |
| Penicillin- Streptomycin (10 000 U/ml-10mg/ml) | 5 ml | 100 U/ml-0,1 mg/ml |
| Insulin (1 mM) | 50 µl | 100 nM |
| KCl | 825 mg* | 22 mM |
| L-Glutamin | 146 mg | 2 mM |

- Sterilfiltreres (0,2 µm)
- Oppbevares ved 2-8°C

* 5,4 mg er allerede til stede i mediet.

Tabell 2.12 Definert ernæringsmedium for kyllingkornceller

| Komponenter | Mengde | Konsentrasjon |
|--|---------|--------------------|
| Basal Medium Eagle (BME) | 500 ml | |
| L-glutamin | 146 mg | 2 mM |
| KCl | 825 mg* | 22 mM |
| Humant transferrin | 50 mg | 100 µg/ml |
| Penicillin- Streptomycin (10 000 U/ml-10mg/ml) | 5 ml | 100 U/ml-0,1 mg/ml |
| Putrescin | 4,8 mg | 60 µM |
| Natriumselenitt (100 µM) | 150 µl | 30 nM |
| Trijodtyronin (T ₃) (20 µg/ml) | 17 µl | 1 nM |
| Insulin | 12,5 mg | 25 µg/ml |

- Sterilfiltreres (0,2 µm) før bruk
- T₃ og natriumselenitt tilsettes fra stamløsninger
- Oppbevares ved 2-8°C

* 5,4 mg er allerede til stede i mediet.

Tabell 2.13 Oversikt over serum brukt til korncellekulturer fra kylling

| Serum | Lot.nr | Katalognr. | Leverandør |
|--------------|---------|------------|------------|
| Kyllingserum | 8148918 | 16110 | Gibco, USA |

2.3.4 Eksponering av kornceller

Cellene som skulle undersøkes i mikroskop ble eksponert 24 timer etter utplating før videre inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂ i 48 timer før kvalitativ analyse i mikroskop (tabell 2.14). Transfektering ble utført 24 timer etter utplating (avsnitt 2.5), og disse skålene ble stående i 48 timer etter transfektering før høsting av celler og måling av luciferase (tabell 2.15).

Tabell 2.14 Oppsett for eksponering av kornceller til kvalitativ analyse i mikroskop

Eksponering

- Ubehandlet
 - DMSO 1 ‰
 - MMP-9-antagonist 100 nM
 - MMP-9-antagonist 10 nM
 - MMP-9-antagonist 1 nM
-

Tabell 2.15 Oppsett for eksponering av kornceller til måling av luciferase

Eksponering

- Ubehandlet
 - Etanol 1 ‰
 - Deksametason 10 µM
 - Deksametason 1 µM
 - Deksametason 10 nM
-

2.4 Morfometrisk analyse i mikroskop

PC12- celler ble platet ut i små (8,8 cm²) eller medium (21,5 cm²) skåler og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før eksponering. PC12-cellene ble studert og tatt bilde av etter 72 timer ved hjelp av et Nikon Eclipse TE 300 fluorescensmikroskop og et Nikon Digital Sight DS-Qi1Mc kamera som er koblet til mikroskopet. Det ble tatt bilder i forstørrelsene 10X, 20X og 40X. Bildene ble analysert med programmet NIS-Elements BR fra Nikon.

Bilder ble tatt av 5 ulike synsfelt på skålen. Områdene var tilfeldig utvalgt. Dersom kvantifisering ikke var mulig i aktuelle området, ble et nært område hvor dette var mulig valgt til analysering. Dette ble gjort når cellene lå for tett eller hvis det ikke var celler i det tilfeldige synsfeltet. Morfometrisk analyse ble utført på syv endepunkter (figur 2.1).

1. Celleantall

Totalt antall celler i synsfeltet som er festet i skålen.

2. Andel celler med nevrutter

Totalt antall celler med nevrutter telles. En nevrutt er lengre enn den er bred. Andel celler med nevrutter av totalt antall celler beregnes.

3. Antall nevrutter per celle med nevrutter

Antall nevrutter telles. Antall nevrutter av totalt antall celler med nevrutter beregnes.

4. Andel ”knoppceller”

Andel ”knoppceller” av totalt antall celler. En ”knoppcelle” er en egendefinert celleform som har fem eller flere utstikkere. Disse utstikkerne kan ikke klassifiseres som nevrutter, det vil si at de ikke er lengre enn de er brede, og kan ligne på nevrutter i tidlig vekststadium (”budding”), se avsnitt 1.3.1.

5. Andel celler med lange nevritter

Antall celler med lange nevritter telles. En nevritt blir klassifisert som lang dersom den er lengre enn diameteren på cellekroppen den har opphav i. Andel celler med lange nevritter av totalt antall celler beregnes.

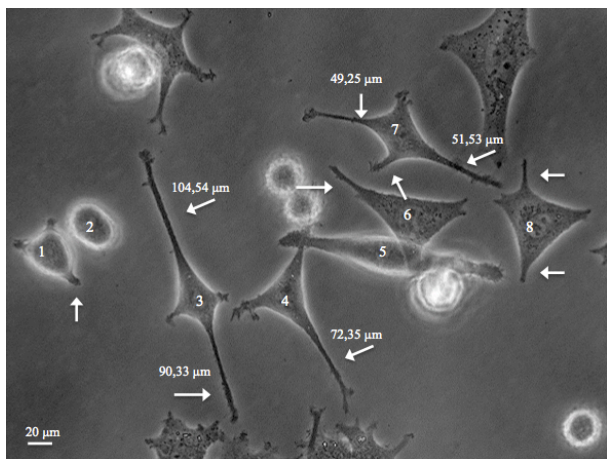
6. Nevrittlengde per celle

Nevrittlengder måles manuelt. Total nevrithlengde av totalt antall celler beregnes. Det ble kun målt lengde på nevritter karakterisert som lange.

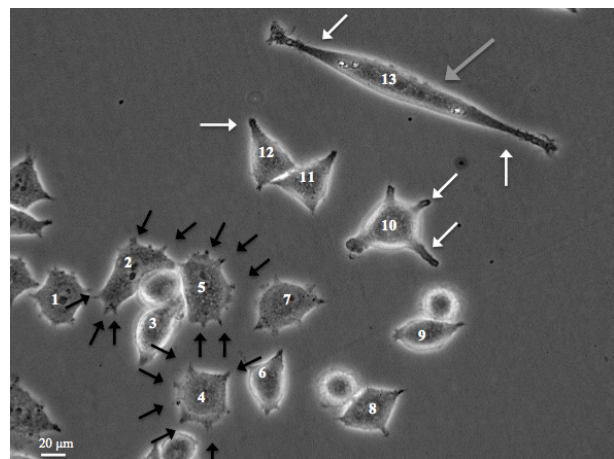
7. Andel ”spydceller”

Dette er en egendefinert celleform som har en avlang form med to karakteristiske spisser vendt 180° på hverandre. Totalt antall ”spydceller” telles og andel ”spydceller” av totalt antall celler beregnes.

A)



B)



| | Antall celler | Andel celler med nevritter | Antall nevritter per celle med nevritt | Andel ”knoppceller” | Andel celler med lange nevritter | Nevrittlengde per celle | Andel ”spydceller” |
|----|---------------|----------------------------|--|---------------------|----------------------------------|---|--------------------|
| A) | 8 | 6/8 | 10/6 | 0/8 | 3/8 | (104,54+90,33+ 49,25+51,53+ 72,35)μm /8 | 0/8 |
| B) | 13 | 3/13 | 5/3 | 3/13 | 0/13 | - | 1/13 |

Figur 2.1 Morfometrisk analyse i PC12-celler. PC12-celler eksponert for NGF ble analysert i mikroskopi ved 40X forstørrelse. Totalt antall celler, andel celler med nevritter, andel nevritter per celle, andel ”knoppceller”, andel celler med lange nevritter, nevrithlengde per celle og andel ”spydceller” ble kvantifisert. A) Celle 1, 3, 4, 6, 7 og 8 telles som celler med nevritter. Nevrittene som er lengre enn cellediameteren til cellen den kommer fra er en lang nevritt. De lange nevrittene er markert med antall μm. B) Celle 10, 12 og 13 telles som celler med nevritter. Celle 13 telles som ”spydcelle” (grå pil). Celle 2, 4 og 5 telles som ”knoppceller”. Nevrittene er markert med hvite piler og ”knopper” er markert med sorte piler.

2.5 Transfeksjon

Transfeksjon er en metode for å introdusere DNA inn i celler. Denne teknologien er et nyttig verktøy for å studere transkripsjonsaktivitet og proteinuttrykk hos en celletype (Groskreutz 1997). Flere transfeksjonsmetoder finnes for å få cellene til å ta opp eksogent DNA. Som transfeksjonsreagens i denne masteroppgaven ble det benyttet Metafectene™ Pro, et kommersielt liposomalt transfeksjonsreagens (Alatorre-Meda, González-Pérez et al. 2010). Ved denne transfeksjonsprosedyren er det kationiske lipider som danner liposomer. Disse liposomene interagerer med DNA spontant og fremmer levering av funksjonelt DNA inn i cellen (Felgner, Gadek et al. 1987).

2.5.1 Transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller

Transfeksjonen ble utført 1 døgn etter at cellene ble platet ut på skåler. På grunn av fare for inaktivering av transfeksjonsreagenset og destabilisering av liposom-DNA-komplekset i tillegg til toksisitet, ble det benyttet DMEM som var fritt for penicillin/streptomycin og serum.

Prosedyre for transfeksjon av celler med Metafectene® Pro:

- Det benyttes 1 µg DNA per ml medium i skålen. For små skåler blandes 1 µg i 50 µl serumfritt DMEM ved hjelp av wirlmikser i noen sekunder, og står i 5 min. Hos plasmidet som skal undersøkes benyttes det en konsentrasjon på 0,8 µg/ml, og som intern standard benyttes enten renillaluciferase under kontroll av thymidinkinase-promotor (rl-tk) eller renillaluciferase under kontroll av cytomegalovirus- promotor (rl-cmv), begge i konsentrasjonen 0,2 µg/ml.
- Det benyttes 2 µl transfeksjonsreagens per ml medium i skålen. For små skåler blandes 2 µl Metafectene® Pro i 50 µl serumfritt DMEM. Det er viktig at denne blandes forsiktig ved å pipettere opp og ned et par ganger og får stå i 5 min.
- Metafectene® Pro- løsningen blandes med DNA-løsningen forsiktig ved å pipettere forsiktig opp og ned noen ganger.
- Transfeksjonsløsningen inkuberes ved romtemperatur i 20 min.
- Transfeksjonsblandingen dryppes på cellene. 100 µl benyttes ved små skåler. Skålene settes til inkubering ved 5 % CO₂ og 37 °C i ca. 4 timer.

- Transfeksjonsløsningen fjernes etter ca. 4 timer og erstattes med ernæringsmedium for egnet celletype (tabell 2.3 eller tabell 2.12). Ernæringsmedium for kylling (tabell 2.12) varmes opp til ca. 37 °C før tilsetning i skål.

Cellene eksponeres rett etter at transfeksjonsløsningen er fjernet og nytt medium er tilsatt skålene (avsnitt 2.2.4 og 2.3.4).

Tabell 2.16: Plasmider brukt i transfeksjon av PC12-celler

| Genprodukt | Plasmidets forkortelse | Konsentrasjon per ml celleduspensjon |
|--|-------------------------------|---|
| Ildflueluciferase under kontroll av MMP9- promotor | MMP9-luc | 0,8 µg |
| Ildflueluciferase under kontroll av GCS- promotor | GCS-luc | 0,8 µg |
| Ildflueluciferase under kontroll av p53 | p53-luc | 0,8 µg |
| Renillaluciferase | rl-CMV | 0,2 µg |
| Renillaluciferase | rl-Tk | 0,2 µg |

Tabell 2.17: Plasmider brukt i transfeksjon av kyllingkornceller

| Genprodukt | Plasmidets forkortelse | Konsentrasjon per ml transfeksjons-løsning |
|--|-------------------------------|---|
| Ildflueluciferase under kontroll av MMP9- promoter | MMP9-luc | 0,8 µg |
| Renillaluciferase | rl-CMV | 0,2 µg |

2.6 Luciferase

2.6.1 Ildflueluciferase

Denne metoden er basert på en måling av bioluminescens generert av enzymet luciferase, ved hjelp av et luminescerende substrat, luciferin. Enzymet katalyserer dannelsen av lys fra ATP og luciferin. Et reporter-gen (luc-genet) blir fusjonert sammen med en promotor av interesse inn i en ekspresjonsvektor, som overføres til egnet celletype. Etter at cellene har stått noen dager kan de høstes, og man måler den enzymatiske aktiviteten til reporterproteinet ved å bruke et luminometer (Allard and Kopish 2008). Relative endringer i aktiviteten til reporter-genet vil korrelere til endringer i transkripsjonsaktivitet til den koblede promotoren (Sherf, Navarro et al. 1996).

2.6.2 Høsting av celler til luciferasemåling

Cellene høstes 48 timer etter transfeksjon med et plasmid som gir luciferaseaktivitet.

Prosedyre for høsting av celler til luciferasemåling fra små skåler:

- Det tilsettes høstebuffer bestående av LUC 0,1 % med DTT 1,0 mM (tabell 2.18). Et passende volum av høstebuffer beregnes ut fra følgende formel:

$$X \text{ (ml)} = 135 \mu\text{l til små skåler (8,8 cm}^2) \times \text{antall skåler som skal høstes}$$

- Mediet pipetteres av skålene.
- Skålene vaskes to ganger med 0,5 ml iskald PBS (tabell 2.19) og beveges forsiktig slik at hele skålen skylles.
- PBS (tabell 2.19) fjernes med pipette.
- 135 μl LUC 0,1 % med DTT 1,0 mM tilsettes til midten av hver skål.
- Skålene inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
- Cellene skrapes løs med en celledrape i 2 retninger vinkelrett på hverandre.
- Cellesuspensjonen overføres til et eppendorfrør og settes på is. Disse sentrifugeres i en kjølesentrifuge ved 4 °C i 5 minutter ved 13000 rpm.

Tabell 2.18: Løsninger benyttet til høsting av celler til måling av luciferaseaktivitet

| Løsning | Innholdsstoffer | Mengde |
|---|------------------------|-----------|
| 0,1% LUC | 1 M Tris/1M MES pH 7,8 | 5 ml |
| | Triton X-100 | 0,1 ml |
| | MQ-vann | ad 100 ml |
| <ul style="list-style-type: none">• Oppbevares ved 2-8°C | | |
| 1M DTT | Dithiothreitol | 154,4 mg |
| | MQ-vann | 1,0 ml |
| <ul style="list-style-type: none">• Oppbevares ved -20 °C | | |

Tabell 2.19: PBS-løsning

| Løsning | Innholdsstoffer | Mengde | Sluttkonsentrasjon |
|--|---------------------------------------|-----------|--------------------|
| PBS (fosfatbufret saltvann) | NaCl | 32,0 g | 138 mM |
| | KCl | 0,8 g | 2,7 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,08 g | 2 mM |
| | NaHPO ₄ x2H ₂ O | 7,12 g | 10 mM |
| | MQ-vann | ad 4000ml | |
| <ul style="list-style-type: none">• Justeres til pH 7,4 med HCl/NaOH og autoklaveres• Oppbevares kjølig | | | |

2.6.3 Måling av ildflueluciferaseaktivitet

Ildflueluciferase måles rett etter cellehøsting.

- 1 mM luceferinløsning (tabell 2.20) plasseres i dispenseren på luminometeret.
- 50 µl av supernatanten fra cellehøstingen blandes med 150 µl LUC-coctail (tabell 2.20) i et glassrør.
- Røret med prøveblandingen settes i luminometeret. Maskinen innstilles slik at 100 µl tilsettes automatisk og lysintensiteten måles i 2 sekunder.

Tabell 2.20: Løsninger benyttet for måling av ildflueluciferase

| Løsning | Innholdsstoffer | Mengde |
|-----------------------|--|-----------|
| 1 mM luciferin | D- luciferin | 11 mg |
| | MQ-vann | 36,7 ml |
| | <ul style="list-style-type: none">• Oppbevares kjølig og beskyttet mot lys | |
| LUC-coctail | Adenosin-5-trifosfat (ATP) | 240 mg |
| | Magnesiumacetat 1 M | 2 ml |
| | 1 M Tris/ 1 M MES pH 7,8 | 8,3 ml |
| | MQ-vann | ad 100 ml |
| | <ul style="list-style-type: none">• Oppbevares ved -20 °C | |

2.6.4 Renillaluciferase

Renillaluciferase benyttes som intern kontroll for luciferasebaserte forsøk. Renillaluciferase er uttrykt under kontroll av en konstitutiv promotor, mens ildflueluciferase er uttrykt under kontroll av en ”eksperimentell” promotor. Ved å bruke begge disse luciferasene, kan man minimalisere variabiliteter som kan komme av forskjeller i transfeksjonseffektivitet og håndtering av prøvene (Sherf, Navarro et al. 1996).

2.6.5 Måling av renilluciferaseaktivitet

Renilluciferaseaktiviteten kan måles rett etter cellehøstingen, men prøvene kan også oppbevares ved -20 °C for måling ved en senere anledning.

Prosedyre for måling av renilluciferaseaktivitet

1. Stop&Glo®-reagens (tabell 2.21) fortynnes 100 ganger med MQ-vann i et rør og beskyttes mot lys.
2. Luminometeret innstilles i egnet program for renillamåling, og lysintensitet måles i 10 sekunder.
3. 100 µl fortynnet Stop&Glo®-løsning overføres til et glassrør sammen med supernatant fra cellehøsting. Volumet som tilsettes av supernatanten ligger mellom 0,5 µl og 8 µl. Passende volum bestemmes ved at man undersøker hvilke som befinner seg i det lineære området. Dette gjøres ved å teste ut ulike volum, og man ser om verdien dobles ved dobbel mengde volum, femdobles ved femdoblet mengde volum osv.
4. Flere målinger utføres på hver prøve til man har tre verdier som ikke avviker mer enn 10 % fra hverandre, og median av disse tre parallellene benyttes som resultat.

Tabell 2.21 : Løsning benyttet til måling av renilluciferaseaktivitet

| Løsning | Innholdsstoffer | Mengde |
|-------------------|---------------------|--------|
| Stop&Glo®-reagens | Stop&Glow®-substrat | 20 µl |
| | Stop&Glow®-buffer | 1 ml |

- Oppbevares ved -20 °C

2.7 Westernblotting

Westernblot blir ofte brukt til å separere og identifisere proteiner. Denne teknikken gjør det mulig å identifisere spesifikke proteiner av interesse fra en kompleks blanding av proteiner ekstrahert fra en celletype. Teknikken baserer seg på tre trinn, der første går ut på å separere proteinene etter størrelse, andre trinn på å overføre proteinene til en membran og til slutt markere target-proteinet ved å bruke egnede primær- og sekundærantistoff. Separasjonen gjøres ved hjelp av gelelektroforese, og antistoff bundet til membran kan gi bånd ved deteksjon (Liu, Mahmood et al. 2014).

2.7.1 Høsting av celler til westernblotting

1. 20 % SDS-løsning fortynnes til 2 % SDS-løsning med MQ-vann. 2 % SDS-løsningen oppbevares i romtemperatur.
2. En tilstrekkelig mengde 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere lages (tabell 2.22).
3. Mediet helles av skålene og rester pipetteres av.
4. Skålene vaskes forsiktig to ganger med 3 ml (store skåler) kald PBS (tabell 2.19). Rester etter siste vasking pipetteres av.
5. 100 μ l (store skåler) 2% SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere tilsettes skålen og fordeles rundt ved å vippe forsiktig på skålen. Cellene skrapes løs med en celleskraper i 2 retninger vinkelrett på hverandre.
6. Cellesuspensjonen overføres til eppendorfrør og settes på is.
7. Prøvene kokes ved 95°C i 5 minutter og fryses ved -20°C frem til bruk.

Tabell 2.22 2% SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere

| Komponenter | Mengde (per ml løsning) | Konsentrasjon |
|--|-------------------------|---------------|
| 2 % SDS | 1000 μ l | 2 % |
| Leupeptin (5 mg/ml) | 1 μ l | 5 μ g/ml |
| PMSF (100 mM) | 3 μ l | 0,3 mM |
| Pepstatin A (1 mg/ml) | 5 μ l | 5 μ g/ml |
| Na ₃ VO ₄ (200 mM) | 0,5 μ l | 0,1 mM |

2.7.2 Proteinmåling

For å kunne kjøre westernblotting må proteinkonsentrasjonen i hver celleprøve bestemmes da mengden protein som settes på i hver brønn skal være lik. Mengde protein bestemmes ved hjelp av Pierce® BCA™ Protein Assay Kit. Utstyret består av reagens A, reagens B og bovint serumalbumin-standard (2mg/ml).

Prosedyre for måling av proteinmengde:

1. Working reagent (tabell 2.23) og fortynnet standardløsning (tabell 2.23) lages.
2. Fortynnet standardløsning tilsettes 14 brønner i et blankt 96-brønners brett til sluttmengder på 0,65 µg, 1,25 µg, 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg, og 15 µg. Mengde fortynnet standardløsning per brønn er vist i plateoppsettet (figur 2.2).
3. Celleprøver hentes fra fryseren (-20°C) og tines. Prøvene blandes godt på whirlmikser før bruk. Dersom prøvene er svært seige kokes de i 2 minutter og fortynnes 1:1 med PBS.
4. 6 µl og 12 µl fra samme prøve tilsettes to brønner hver ved siden av hverandre horisontalt etter standardløsning på 96-brønners brettet (figur 2.2).
5. 200 µl working reagent (tabell 2.23) tilsettes alle brønnene som skal brukes.
6. 96-brønners brettet pakkes inn i aluminiumsfolie og inkuberes ved 37 °C i 60 minutter.
7. Absorbansen måles ved 590 nm i en plateleser.
8. Proteinmengde i hver celleprøve beregnes.

Tabell 2.23 Løsninger for måling av proteinmengde

| Løsning | Komponenter | Mengde |
|---------------------------|------------------------------------|----------|
| Standardløsning (0,5m/ml) | Bovint serum albumin (BSA) 2 mg/ml | 1 ml |
| | PBS | 3 ml |
| Working reagent | Reagent A | 50 deler |
| | Reagent B | 1 del |

Figur 2.2 Plateoppsett for proteinmåling:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---|---|---|----|----|----|
| A | Blank | Blank | Prøve 1 | Prøve 1 | Prøve 1 | Prøve 1 | | | | | | |
| B | 1,3 µl | 1,3 µl | Prøve 2 | Prøve 2 | Prøve 2 | Prøve 2 | | | | | | |
| C | 2,5 µl | 2,5 µl | osv. | | | | | | | | | |
| D | 5 µl | 5 µl | | | | | | | | | | |
| E | 10 µl | 10 µl | | | | | | | | | | |
| F | 15 µl | 15 µl | | | | | | | | | | |
| G | 20 µl | 20 µl | | | | | | | | | | |
| H | 30 µl | 30 µl | | | | | | | | | | |

2.7.3 Proteinjustering av prøver

1. Det skal settes på 45 µl prøve med 50 µg protein på geler med 10 brønner og en tykkelse på 1,5 mm. Dette er bestemt ut fra erfaringer fra laben. Prøvene proteinjusteres for å få lik mengde protein i hver prøve som settes på gelen.
2. Sluttkonsentrasjonen i den ferdige prøven skal være 1X Laemmlibuffer, og 4X Laemmlibuffer (tabell 2.24) må derfor tilsettes prøven i forhold 1:3. Det resterende volumet fylles opp av MQ-vann.
3. Prøvene varmes ved 95 °C i 5 minutter og avkjøles før de påsettes gelen.

Tabell 2.24 4X Laemmlibuffer

| Komponenter | Mengde | Sluttkonsentrasjon i den ferdige prøven |
|--|---------|---|
| SDS (20 %) | 4 ml | 2 % |
| Glyserol (85%) | 2,35 ml | 5 % |
| 2- merkaptoetanol | 2 ml | 5 % |
| MQ-vann | 0,9 ml | |
| Tris-HCl (4 M) pH 6,8 | 0,75 ml | 75 mM |
| Noen korn bromfenolblått | | |
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 2- merkaptoetanol og bromfenolblått tilsettes løsningen i avtrekk 2. 2- merkaptoetanol tilsettes løsningen rett før bruk. Før dette kan løsningen stå oppbevart i romtemperatur på lab-benken. | | |

2.7.4 Støping av gel

1. Gelene støpes med utstyr fra Mini-PROTEAN® fra Bio-Rad. Ytterglass og dekkglass vaskes med 70 % etanol for å fjerne rester av fett og protein, og tørkes med cellepapir. Støpeformen settes sammen (tykk + tynn glassplate og grønt stativ + gummilist). Glassplatene plasseres i støpeformen. Oppsatsen sjekkes om den er tett ved å helle MQ-vann i spalten mellom glassplatene.
2. Komponenter til separerende gel (tabell 2.25) av ønsket polyakrylamidkonsentrasjon blandes og helles i spalten mellom glassplatene. Valg av konsentrasjon i polyakrylamid i gelen bestemmes av molekylvekten til proteinene som blir forsøkt detektert. Proteinene av interesse ligger i størrelsesorden 15-100 kDa, og derfor benyttes polyakrylamidgel på 10%.
3. 1 ml isopropanol pipetteres på toppen av separerende gel for å sikre at gelen får en jevn overflate.
4. La stå i 40 minutter for at akrylamiden i gelen skal polymerisere.
5. Isopropanol helles av og rester suges av med et cellepapir.
6. Komponenter til øvre gel (tabell 2.25) blandes og helles over separerende gel.
7. En kam med tagger plasseres forsiktig ned i gelen. Det er viktig å unngå å få luftbobler langs kammen da dette kan ødelegge brønnene.
8. La stå i 30 minutter for at gelen skal polymerisere.

Tabell 2.25 Gel-løsninger

| Separerende gel | Komponenter | Mengde |
|------------------------------|-------------------------------|---------------|
| Polyakrylamidgel 10 % | MQ-vann | 6,0 ml |
| 2 geler á 1,5mm | Nedre gelbuffer (tabell 2.26) | 3,6 ml |
| | Akrylamid (30 %) | 4,8 ml |
| | TEMED | 7,2 µl |
| | APS | 72 µl |
| Øvre gel | MQ-vann | 4,8 ml |
| | Øvre gelbuffer (tabell 2.26) | 2,0 ml |
| | Akrylamid (30 %) | 1,2 ml |
| | TEMED | 8,0 µl |
| | APS | 40 µl |

1. Gelstøping utføres i avtrekk med vernebriller, nitrilhansker og labfrakk.
2. TEMED tilsettes løsningen til slutt.

Tabell 2.26 Løsninger brukt til gelstøping

| Løsning | Komponenter | Mengde |
|------------------------|--|---------------|
| Nedre gelbuffer | Tris-base | 18,17 g |
| | SDS (20 %) | 2,0 ml |
| | MQ-vann | ad 100 ml |
| | <ul style="list-style-type: none">• pH justeres til 8,8 med HCl/NaOH | |
| Øvre gelbuffer | Tris-base | 6,057 g |
| | SDS (20 %) | 2,0 ml |
| | MQ-vann | ad 100 ml |
| | <ul style="list-style-type: none">• pH justeres til 6,8 med HCl/NaOH | |

2.7.5 Gelelektroforese

1. Glassplatene tas ut fra støpeformen og vaskes på utsiden med vann for å fjerne eventuelle gelrester på utsiden av platene. Kammen tas forsiktig ut av gelen.
2. Glassplatene plasseres i et kar for gelelektroforese, med den tynne glassplaten vendt inn mot midten. Det indre rommet i karet fylles helt opp med elfobuffer (tabell 2.27), og det ytre rommet fylles opp med elfobuffer (tabell 2.27) til elektrodene er tildekket. Eventuelle luftbobler fjernes ved hjelp av en bøyd kanyle.
3. En påføringsapplikator plasseres over gelen og 5 µl standard (Precision Plus Protein™ Standards All Blue) påsettes forsiktig i første brønn.
4. De proteinjusterte prøvene påsettes i hver sin brønn. Dette må gjøres forsiktig for å unngå at prøven flyter over i neste brønn.
5. Prøvene kjøres først gjennom øvre gel på 90 V i 15 minutter, og deretter gjennom separerende gel på 150 V i ca. 60 minutter. Strømmen bør stoppes før linjen med bromfenylblått når bunnen av gelen, men heller ikke for tidlig da dette gir dårligere separasjon av proteinbåndene.

Tabell 2.27 Elfobuffer

| Komponenter | Mengde |
|-----------------------|--------|
| 10X TGS (tabell 2.28) | 100 ml |
| Destillert vann | 900 ml |

Tabell 2.28 10X TGS

| Komponenter | Konsentrasjon |
|-------------|---------------|
| Tris | 25 mM |
| Glycin | 192 mM |
| SDS | 0,1 % (v/v) |

2.7.6 Blotting av gel

1. Én membran, to filterpapir og to skrubber fuktes i blottebuffer (tabell 2.29).
2. Gelen løsnes forsiktig fra den tykke glassplaten ved hjelp av en plastspatel. Øvre gel kuttes av og kastes.
3. Et fuktig filterpapir legges oppå gelen på den tynne glassplaten. Unngå at det kommer luftbobler mellom gel og filterpapir.
4. Gelen pakkes i en gelbeholder i følgende rekkefølge:
 - Gelbeholderens sorte side
 - Skrubb
 - Filterpapir
 - Gel
 - Membran
 - Filterpapir
 - Skrubb
 - Gelbeholderens hvite side
5. Luftbobler mellom gel og membran fjernes ved å rulle en stor plastspiss fra midten av membranen både vertikalt og horisontalt.
6. Gelbeholderen lukkes forsiktig og settes i et blottekare med den sorte siden vendt mot den sorte siden av karet.
7. En magnetrører og en is-kassett plasseres i blottekaret, og karet fylles opp med blottebuffer slik at gelen dekkes.
8. Blotteopsatsen settes på en magnetrører ved 2-8 °C og blottes ved 50 mA over natt eller 400 mA i 1 ½ time.

Tabell 2.29 Blottebuffer

| Komponenter | Mengde |
|--|--------|
| 10X TG (tabell 2.30) | 100 ml |
| Metanol | 200 ml |
| Destillert vann | 700 ml |
| • pH 8,3 | |
| • Håndtering av metanol skjer avtrekk med vernebriller, nitrilhansker og labfrakk. | |

Tabell 2.30 10X TG

| Komponenter | Konsentrasjon |
|-------------|---------------|
| Tris | 25 mM |
| Glycin | 192 mM |

2.7.7 Ponceaufarging og blokking av membran

For å sikre at proteinene ble tilfredsstillende overført etter blotting, farges membranen med Ponceaufarge. Ponceau binder seg til aminosyrene i proteinet, og kan raskt og reversibelt detektere proteinbånd på membranen.

1. Membranen pakkes forsiktig ut av gelbeholderen og legges i et kar med Ponceau fargeløsning i 1 minutt.
2. Fargeløsningen fjernes ved å vaske membranen i destillert vann slik at fargen kun sitter igjen på proteinbåndene.
3. Overflødig væske får renne av på et cellepapir og membranen legges i en plastlomme. For å dokumentere at båndene er tilfredsstillende tas det et bilde i fremkallingsmaskinen Chemi Genius2 Bio Imaging system.
4. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten.
5. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.31) tilsettes røret og det legges til rulling i romtemperatur i 1 ½ time eller ved 2-8 °C over natt.

Tabell 2.31 Blokkeløsning

| Komponenter | Mengde |
|---|---------------|
| Tørrmelk | 2,5 g |
| 1X TBS med 0,1% Tween (tabell 2.32) | 50 ml |
| <ul style="list-style-type: none">• Oppbevares ved 2-8 °C | |

Tabell 2.32 Trisbufret saltvann med Tween

| Løsning | Komponenter | Mengde |
|--|----------------------|---------------|
| 10X TBS med 1% Tween | Tris- base | 24,2 g |
| | NaCl | 80 g |
| | Tween 20 | 10 ml |
| | MQ-vann | ad 1000 ml |
| <ul style="list-style-type: none">• Justeres til pH 7,6 med HCl/NaOH• Oppbevares ved 2-8 °C | | |
| 1X TBS med 0,1% Tween | 10X TBS med 1% Tween | 1 del |
| | Destillert vann | 9 deler |
| <ul style="list-style-type: none">• Oppbevares ved 2-8 °C | | |

2.7.8 Tilsetting av primære- og sekundære antistoff

1. Blokkeløsningen helles av og 5 ml ny blokkeløsning tilsettes røret med membranen.
2. Primærantistoff tilsettes røret i riktig blandingsforhold avhengig av type antistoff. Røret med primærantistoffløsningen (tabell 2.33) legges til rulling ved 2-8 °C over natt.
3. Primærantistoffløsningen (tabell 2.33) helles av og spares på til bruk for neste membran innen én uke. Membranen vaskes 3 ganger i 15 minutter med 5 ml 1X TBS med 0,1% Tween (tabell 2.32) ved rulling i romtemperatur.
4. 5 ml blokkeløsning tilsettes røret.
5. Sekundærantistoff (tabell 2.34) tilsettes røret i riktig blandingsforhold avhengig av type antistoff. Røret legges til rulling i romtemperatur i 2 timer eller ved 2-8 °C over natt.
6. Sekundærantistoffløsningen (tabell 2.34) helles av og membranen vaskes 3 ganger i 10 minutter ved rulling i romtemperatur med 5 ml 1X TBS med 0,1% Tween (tabell 2.32).

Tabell 2.33 Primærantistoff brukt i westernblotting

| Primærantistoff | Fortynning | Lot.nr | Katalognr. | Leverandør |
|-----------------------|------------|---------|--------------|---|
| MMP9 Catalytic domain | 1:500 | 2279495 | AB19016 | Millipore, Temecula California, USA Alexis |
| Lamin A/C | 1:1000 | 22914 | 804-672-C200 | Biochemicals, Sveits |

Tabell 2.34 Sekundærantistoff brukt i westernblotting

| Sekundærantistoff | Fortynning | Lot.nr | Katalognr. | Leverandør |
|--------------------|------------|-----------|------------|------------------------------------|
| Donkey anti-rabbit | 1:10 000 | C1212 | Sc-2313 | SantaCruz Biotechnology, USA |
| Donkey anti-mouse | 1:10 000 | LS1706516 | 170-6516 | Bio-Rad, USA |

2.7.9 Fremkalling og måling av intensitet

1. Luminata™ Forte Western HRP Substrate eller Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate brukes til fremkalling av westernblottet.
2. Membranen tas ut av plastrøret og overflødig væske får renne av på et cellepapir.
3. Membranen legges med proteinsiden opp på en ren glassplate og 1-2 ml fremkallingsvæske pipetteres over til hele membranen er dekket. La fremkallingsvæsken virke i 2-5 minutter.
4. Fremkallingsvæsken får renne av på et cellepapir før det legges forsiktig i en plastlomme. Luftbobler fjernes forsiktig ved å gni på plastlommen og overflødig væske rundt plastlommen tørkes av med cellepapir.
5. Membranen fremkalles i fremkallingsmaskinen Chemi Genius2 fra Bio Imaging System. Programmet som benyttes heter Genesnap fra SynGene. Lysintensitet måles og brukes til å beregne båndstyrke. Styrken i proteinbåndene måles i antall piksler med bildebehandlingsprogrammet ImageJ. Det benyttes en intern standard som hvert bånd relateres til, og man finner en ratio mellom de ulike eksponeringene og den interne standarden.
6. Etter fremkalling kan membranen vaskes i 3 x 15 minutter og oppbevares i 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.32) ved 2-8 °C frem til eventuell stripping og påføring av nytt antistoff.

2.7.10 Stripping av membran

Om det er ønskelig å teste den samme membranen for flere proteiner i samme område, kan det være man må fjerne påsatte antistoff ved hjelp av en strippebuffer mellom hver tilsetting av antistoff og fremkalling. Dette gjelder i de tilfellene der proteiner som skal detekteres ligger nær hverandre i størrelse eller hvis de har svært ulike intensitet.

1. TBS m/Tween – løsningen i røret med membranen helles av og membranen vaskes 3 ganger i 5 minutter ved rulling i romtemperatur med 5 ml 1X TBS med 0,1% Tween (tabell 2.32).
2. 1X TBS med 0,1% Tween helles av og røret tilsettes 5ml Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer. Røret legges til rulling i romtemperatur i 15 minutter.
3. Strippebufferen helles av og membranen vaskes 3 ganger i 15 minutter med 1X TBS med 0,1% Tween (tabell 2.32). Røret legges til rulling i romtemperatur.
4. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.31) tilsettes røret og det legges til rulling i 2 timer i romtemperatur eller over natt ved 2-8 °C.
5. Dermed følges prosedyren under delkapittel 2.7.8 Tilsetting av primære og sekundære antistoff.

2.8 Figurer og statistiske analyser

Figurene er laget i Microsoft ® Excel for Mac 2011. Resultatene er fremstilt som gjennomsnittet av flere uavhengige forsøk med standardfeil (SE).

Statistiske analyser er gjort ved hjelp av programmet SigmaPlot 12.5. Det ble benyttet t-test ved sammenligning av to normalfordelte datasett. Ved parvis sammenligning av data som ikke var normalfordelte ble det benyttet Mann-Whitney Rank Sum Test. Sammenligning av flere normalfordelte datasett ble gjort ved hjelp av One Way Analysis of Variance (ANOVA), og dersom datasett ikke var normalfordelte, ble det benyttet Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. En p-verdi på <0,05 ble ansett som signifikant, og er merket med *.

3 RESULTATER

Effekter av NGF på nevruttvekst i PC12-celler ble undersøkt ved syv ulike endepunkt (avsnitt 3.1). Videre ble det undersøkt om BDNF også hadde en effekt på nevruttvekst (avsnitt 3.2). TrkA- og B-antagonister ble benyttet for å undersøke om disse hadde hemmende effekter på nevruttvekst, både hos PC12-celler eksponert for NGF og for celler eksponert for BDNF (avsnitt 3.3). Det ble i tillegg undersøkt om nevruttvekst i PC12-celler ble induisert av TrkB-agonisten LM22A-4 (avsnitt 3.4).

Deksametason ble undersøkt for effekter på nevruttvekst i to konsentrasjoner (1 μ M i 72 timer eller 10 μ M i 2 timer). Deksmetason 1 μ M ble undersøkt for effekter på nevruttvekst, både med og uten BDNF, Trk A- antagonist og Trk B-antagonist (avsnitt 3.5).

For å undersøke om MMP-9 er involvert i nevruttvekst, ble det benyttet MMP-9-antagonist, både hos PC12-celler (avsnitt 3.6) og hos kyllingkornceller (avsnitt 3.7).

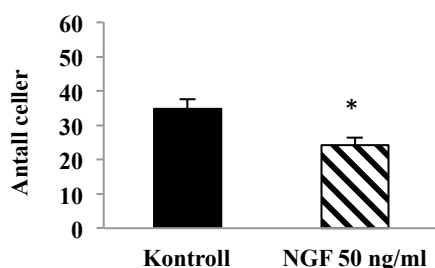
Deksametasons aktivering av luciferaseaktivitet hos PC12-celler ble målt, både med og uten NGF (avsnitt 3.9). Det ble sett på luciferaseaktivitet hos PC12-celler transfektert med MMP9-plasmid (avsnitt 3.9.1), p53-plasmid (avsnitt 3.9.2) og GCS-plasmid (avsnitt 3.9.3). Renillaluciferase ble benyttet som intern kontroll, og det ble i tillegg undersøkt om aktiviteten til dette enzymet ble endret av behandling, og om valg av type renillaplasmid hadde en betydning (avsnitt 3.8). Deksametasons påvirkning på MMP-9-promotoraktivitet ble også målt i kyllingkornceller ved hjelp av luciferaseassay (avsnitt 3.10).

Westernblotting ble utført på prøver fra PC12-celler eksponert for deksametason med og uten NGF, for å undersøke uttrykk av proteinet MMP-9 (avsnitt 3.11).

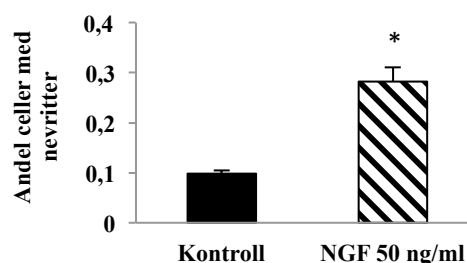
3.1 Effekt av NGF på nevruttvekst i PC12-celler

Cellene som var eksponert for NGF viste en tendens til forskjell i alle endepunktene i forhold til ubehandlet kontroll. For endepunktene andel celler med nevritter, andel celler med lange nevritter, antall nevritter per celle og andel "spydceller" (figur 3.1 B, C, D og F) var det en signifikant økning for NGF sammenlignet med ubehandlet kontroll. Det var ikke en signifikant økning i endepunktene nevrittelengde per celle og andel "knoppceller" (figur 3.1 E og G).

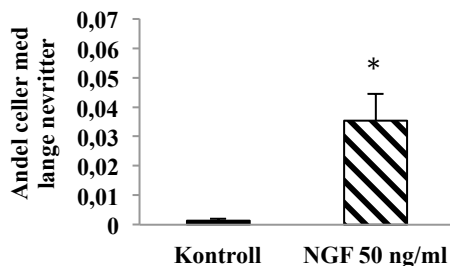
A)



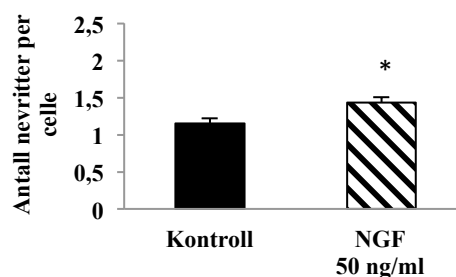
B)



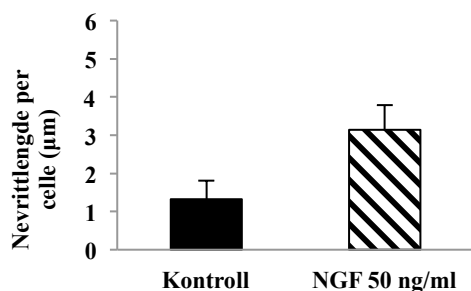
C)



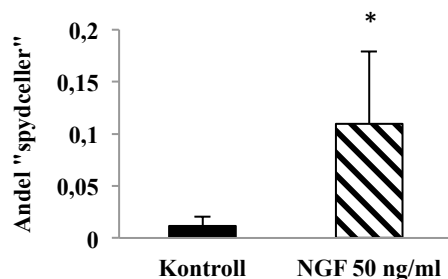
D)



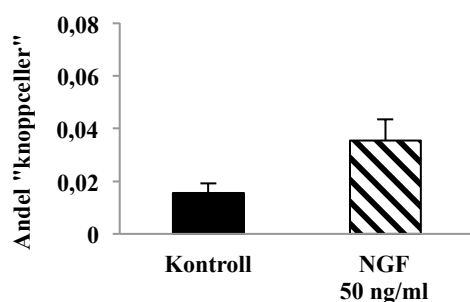
E)



F)



G)



Figur 3.1 NGF gir økt nevruttvekst i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for NGF 50 ng/ml 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. A) Antall celler, n=11. *p = 0,01. Mann-Whitney Rank Sum Test. B) Andel celler med nevrutter. n=11. p* < 0,001. Mann-Whitney Rank Sum Test. C) Andel celler med lange nevrutter. n=11. p* < 0,001. Mann-Whitney Rank Sum Test. D) Antall nevrutter per celle med nevrutter. n=11. p* = 0,009. t-test. E) Nevrittlengde per celle (nevrittlengde/totalt antall celler). n=3/11. F) Andel "spyceller". n=11. p* = 0,002. Mann-Whitney Rank Sum Test. G) Andel "knoppceller". n=11. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

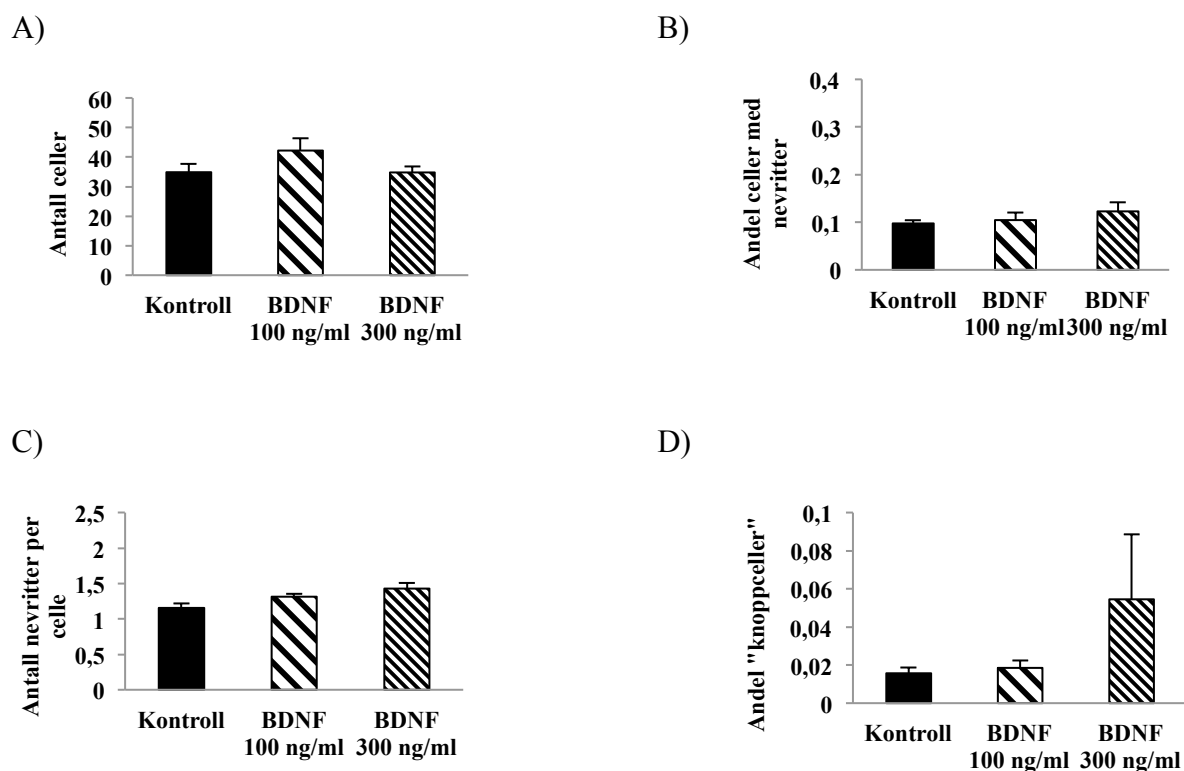
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.1 A-G

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|--------------|--------------|-------|---------------|
| 3.1 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 24,227 | 2,168 | 11 |
| 3.1 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,282 | 0,028 | 11 |
| 3.1 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,035 | 0,009 | 11 |
| 3.1 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 1,4311 | 0,072 | 11 |
| 3.1 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | NGF 50 ng/ml | 3,138 | 0,640 | 11 |
| 3.1 F | Kontroll | 0,011 | 0,008 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,109 | 0,069 | 11 |
| 3.1 G | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,035 | 0,008 | 11 |

Endepunktet i figur 3.1 E Nevrittlengde per celle har færre paralleller enn de andre endepunktene fordi ubehandlede PC12-celler viste kun lange nevrutter i 3 av forsøkene.

3.2 Effekt av BDNF på nevruttvekst i PC12-celler

I tillegg til å se på effekt av NGF i PC12-celler, var det ønskelig å se om en annen nevroτροφisk faktor som BDNF kunne vise de samme effektene på nevruttvekst. Det ble undersøkt nevruttvekst ved to konsentrasjoner av BDNF (100 ng/ml og 300 ng/ml). BDNF viste ikke de samme resultatene som NGF på nevruttvekst i PC12-celler (avsnitt 3.1). Antall celler, andel celler med nevrutter, antall nevrutter per celle og andel ”knoppceller” gav ingen signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for BDNF (figur 3.2 A-D). Ubehandlete celler viste til lange nevrutter i kun tre av elleve forsøk, og hadde en andel ”spydceller” på 0,01, ikke signifikant forskjellig fra celler eksponert for BDNF alene som ikke viste til noen ”spydceller” eller lange nevrutter. Andel celler med lange nevrutter, nevruttlengde per celle og andel ”spydceller” er derfor ikke vist i figuren.



Figur 3.2 BDNF viser ikke samme effekt på nevruttvekst som NGF hos PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for BDNF 100 ng/ml og 300 ng/ml 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Ubehandlete celler ble brukt som kontroll. ANOVA ble benyttet til statistisk analyser BDNF i kons. 300 ng/ml hadde kun to paralleller, så her er avvik vist i ”range”. A) Antall celler. n=2-11 B) Andel celler med nevrutter. n=2-11 C) Antall nevrutter per celle med nevrutter. n=2-11 D) Andel ”knoppceller”. n=2-11. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 A-D:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|--------------------|---------------------|---------------|----------------------|
| 3.2 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 42,214 | 4,073 | 7 |
| | BDNF 300 ng/ml | 34,8 | 4,00 "range" | 2 |
| 3.2 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0,104 | 0,015 | 7 |
| | BDNF 300 ng/ml | 0,122 | 0,039 "range" | 2 |
| 3.2 C | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 1,313 | 0,042 | 7 |
| | BDNF 300 ng/ml | 1,427 | 0,257 "range" | 2 |
| 3.2 D | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0,018 | 0,004 | 7 |
| | BDNF 300 ng/ml | 0,054 | 0,034 "range" | 2 |

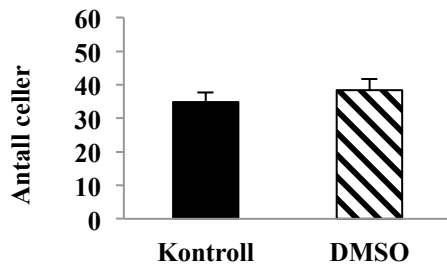
3.3 Effekt av TrkA- og B- antagonistene på nevrutvekst i PC12-celler

Videre ble det undersøkt om TrkA- antagonist og TrkB-antagonist påvirket nevrutvekst i PC12-celler eksponert for NGF og BDNF. Forsøkene ble innledet ved å undersøke om DMSO hadde en effekt på PC12-celler ettersom begge antagonistene i tillegg til BDNF var løst i dette løsemiddelet (avsnitt 3.3.1). Videre ble det undersøkt om antagonistene hadde noen effekt på PC12-celler alene. TrkA- antagonist GW441756 ble derfor sammenlignet med ubehandlede celler og celler eksponert for NGF (som har kjent effekt på nevrutvekst) (avsnitt 3.3.2), og det samme ble gjort med TrkB- antagonist ANA-12 (avsnitt 3.3.5). Effekt av TrkA- antagonist ble undersøkt på celler eksponert for NGF (avsnitt 3.3.3) og celler eksponert for BDNF (avsnitt 3.3.4), og tilsvarende ble utført med TrkB- antagonist (avsnitt 3.3.6 og 3.3.7).

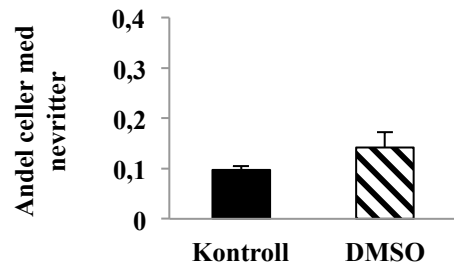
3.3.1 Effekt av DMSO på PC12-celler

Ettersom både BDNF i tillegg til TrkA- og B- antagonistene var løst i DMSO, var det interessant å undersøke om løsemiddelet alene hadde en effekt på nevrutvekst i PC12-celler. Ingen av parameterne viste signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for DMSO (figur 3.3 A-G).

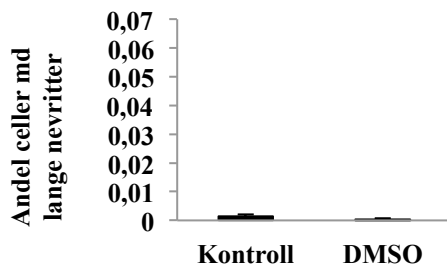
A)



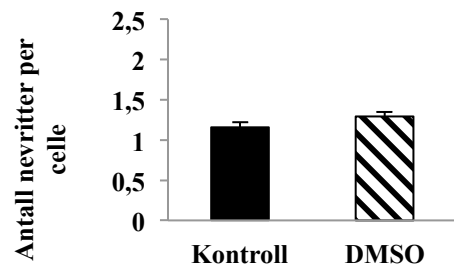
B)



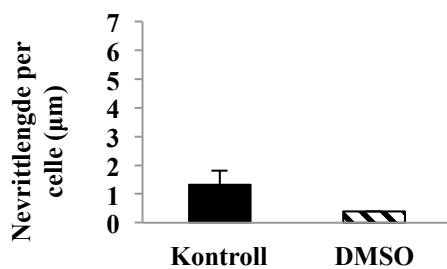
C)



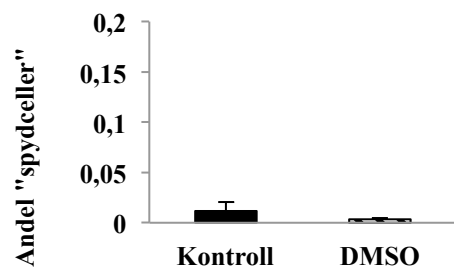
D)



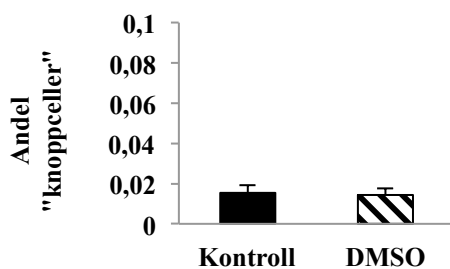
E)



F)



G)



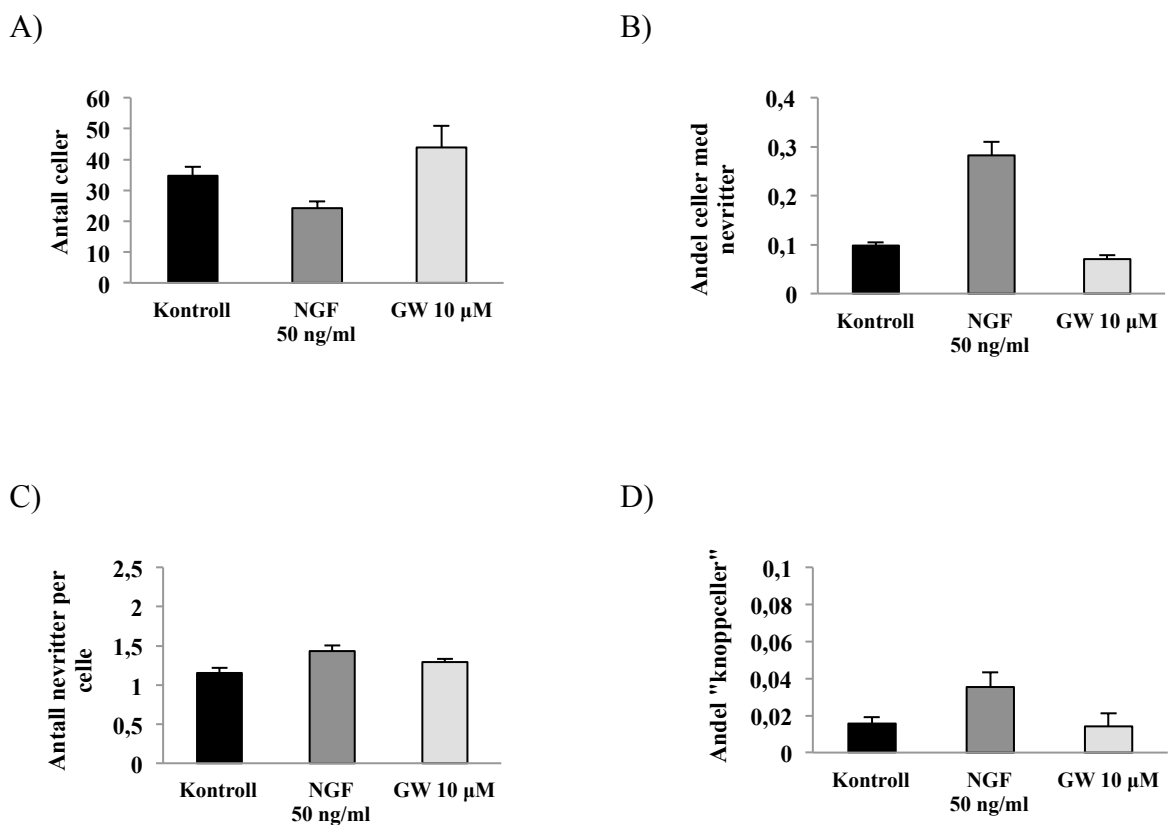
Figur 3.3 DMSO påvirker ikke nevruttvekst i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for DMSO 1 ‰ 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Ubehandlete celler ble brukt som kontroll. T-test ble benyttet til statistisk analyser der det var normalfordelte data, og Mann-Whitney Rank Sum test ble utført ved ikke-normalfordelte data. A) Antall celler, n=7-11. B) Andel celler med nevrutter. n=7-11. C) Andel celler med lange nevrutter. n=7-11. D) Antall nevrutter per celle med nevrutter. n=7-11. E) Nevritt lengde per celle (nevritt lengde/totalt antall celler). n=1-3. F) Andel "spydceller". n=7-11. G) Andel "knopp-celler". n=7-11. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3 A-G:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|--------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.3 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | DMSO 1 ‰ | 38,371 | 3,293 | 7 |
| 3.3 B | Kontroll | 0,0978 | 0,006 | 11 |
| | DMSO 1 ‰ | 0,1418 | 0,030 | 7 |
| 3.3 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | DMSO 1 ‰ | 0,000 | 0,000 | 7 |
| 3.3 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | DMSO 1 ‰ | 1,291 | 0,052 | 7 |
| 3.3 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | DMSO 1 ‰ | 0,394 | | 1 |
| 3.3 F | Kontroll | 0,011 | 0,008 | 11 |
| | DMSO 1 ‰ | 0,003 | 0,001 | 7 |
| 3.3 G | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | DMSO 1 ‰ | 0,014 | 0,003 | 7 |

3.3.2 Effekt av TrkA- antagonist på udifferensierte PC12- celler

Det var interessant å se om TrkA- antagonisten GW441756 hadde hemmende effekter på nevruttvekst hos PC12-celler eksponert for NGF og BDNF. Det ble også undersøkt om antagonistene alene hadde noen effekter på nevruttvekst i PC12-celler. Celler eksponert for GW 441756 i 10 μ M ble sammenlignet med ubehandlede celler og celler eksponert for NGF. Ingen av parameterne viste signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for TrkA- antagonist (figur 3.4 A-D). Ubehandlede celler vist lange nevritter i kun tre av elleve forsøk, og hadde en andel ”spydceller” på 0,01, ikke signifikant forskjellig fra celler eksponert for GW 441756 alene som ikke viste til noen ”spydceller” eller lange nevritter. Andel celler med lange nevritter, nevrittelengde per celle og andel ”spydceller” er derfor ikke vist i figur.



Figur 3.4 Trk A- antagonisten GW 441756 alene har ingen effekt på PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for GW 441756 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som negativ kontroll og NGF som positiv kontroll. A) Antall celler. n=3-11 B) Andel celler med nevritter. n=3-11 C) Antall nevritter per celle med nevritter. n=3-11 D) Andel ”knoppceller”. n=3-11. Statistiske beregninger ble gjort ved hjelp av ANOVA. Ved ikke-normalfordelte data, ble Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks benyttet. Signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for NGF, er vist i figur 3.1. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

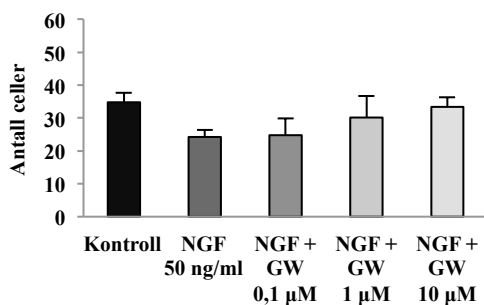
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.4 A-D:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|--------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.4 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 24,227 | 2,168 | 11 |
| | GW 441756 10 µM | 43,9 | 7,021 | 3 |
| 3.4 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,282 | 0,028 | 11 |
| | GW 441756 10 µM | 0,070 | 0,008 | 3 |
| 3.4 C | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 1,431 | 0,072 | 11 |
| | GW 441756 10 µM | 1,291 | 0,040 | 3 |
| 3.4 D | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,035 | 0,008 | 11 |
| | GW 441756 10 µM | 0,014 | 0,007 | 3 |

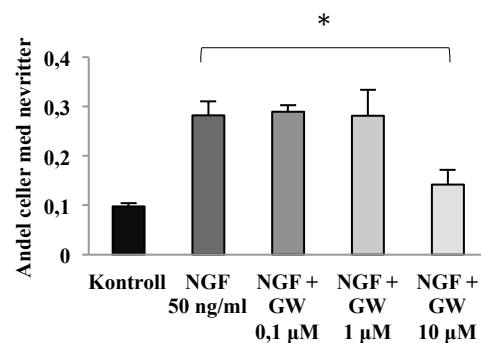
3.3.3 Effekt av TrkA- antagonist på PC12-celler under differensiering

Det ble undersøkt om TrkA- antagonisten GW 441756 hadde hemmende effekter på nevrutvekst i PC12-celler induisert av NGF- eksponering. Det ble valgt tre konsentrasjoner (0,1 μ M, 1 μ M og 10 μ M) av TrkA- antagonisten. GW 441756 10 μ M sammen med NGF viste en signifikant reduksjon i parameterne andel celler med nevritter, andel celler med lange nevritter og andel ”spydceller” sammenlignet med celler eksponert for NGF (figur 3.5 B, C og F). Nevrittlengde per celle så også ut til å bli redusert ved konsentrasjonen 10 μ M av GW441756 sammen med NGF sammenlignet med celler kun eksponert for NGF. Men av alle forsøkene var det kun én lang nevrutt som ble observert og målt ved denne konsentrasjonen, derfor er det ikke regnet statistikk ved dette endepunktet (figur 3.5 E).

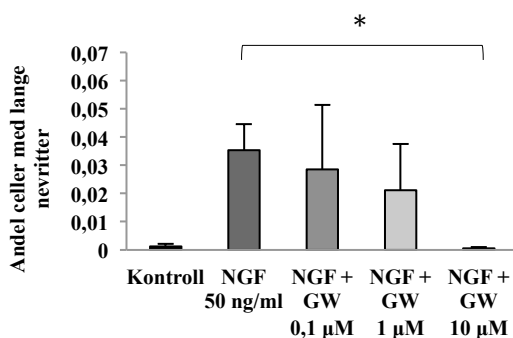
A)



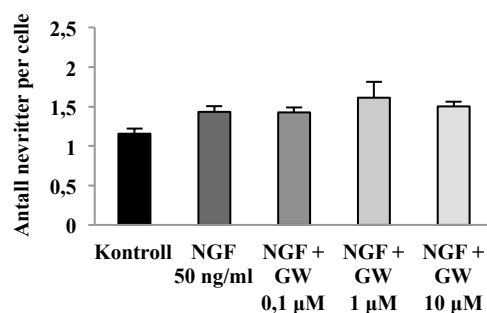
B)



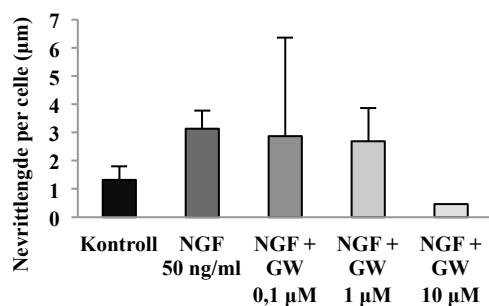
C)



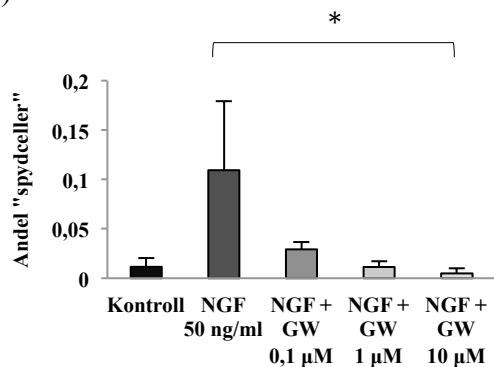
D)



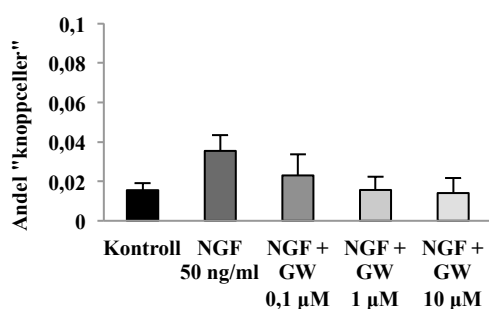
E)



F)



G)



Figur 3.5 GW 441756 hemmer nevruttvekst hos NGF- differensierte PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for GW 441756 24 timer etter utplating, og 15 minutter før NGF-eksponering. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. ANOVA ble benyttet til statistiske beregninger. A) Antall celler. n=3-11 B) Andel celler med nevritter. n=3-11. p*=0,050. ANOVA Holm- Sidak method. C) Andel celler med lange nevritter. n=3-11. p*<0,05. Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Dunn's method. D) Antall nevritter per celle med nevritt. n=3-11 E) Nevrittlengde per celle. n=1-11 F) Andel "spyceller". n=3-11. p*<0,05. Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Dunn's method. G) Andel "knoppceller". n=3-11. Det var også signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for NGF + antagonist (kun enkelte konsentrasjoner). Dette gjaldt endepunktene andel celler med nevritter og antall nevritter per celle med nevritter (signifikans ikke vist i figur). Statistikkberegninger av ubehandlede celler og celler eksponert for NGF er vist i figur 3.1. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

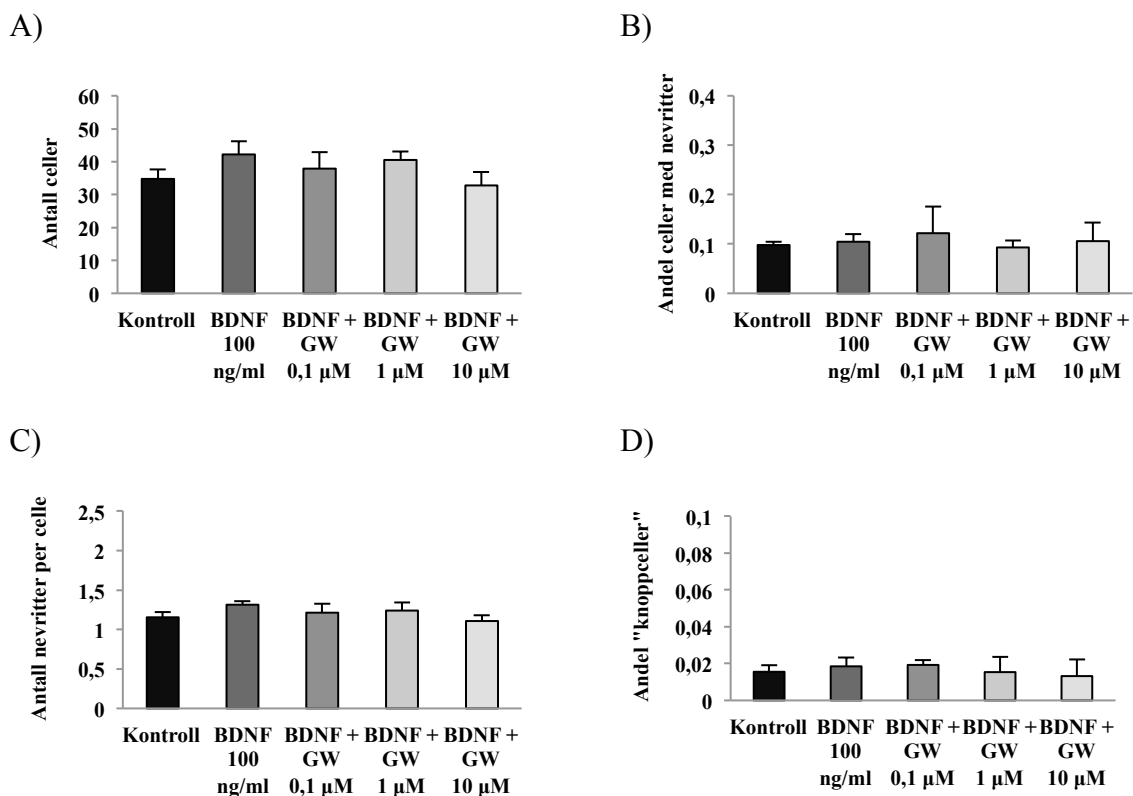
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5 A-G:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|------------------------|--------------|-------|---------------|
| 3.5 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 24,227 | 2,168 | 11 |
| | NGF + GW 441756 0,1 µM | 24,766 | 5,071 | 3 |
| | NGF + GW 441756 1 µM | 30,133 | 6,537 | 3 |
| | NGF + GW 441756 10 µM | 33,4 | 2,807 | 4 |
| 3.5 B | Kontroll | 0,097 | 0,000 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,282 | 0,009 | 11 |
| | NGF + GW 441756 0,1 µM | 0,289 | 0,022 | 3 |

| | | | | |
|--------------|-----------------------------|-------|---------------|----|
| | NGF + GW 441756 1 μ M | 0,281 | 0,016 | 3 |
| | NGF + GW 441756 10 μ M | 0,141 | 0,000 | 4 |
| 3.5 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,035 | 0,009 | 11 |
| | NGF + GW 441756 0,1 μ M | 0,028 | 0,022 | 3 |
| | NGF + GW 441756 1 μ M | 0,021 | 0,016 | 3 |
| | NGF + GW 441756 10 μ M | 0,000 | 0,000 | 4 |
| 3.5 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 1,431 | 0,072 | 11 |
| | NGF + GW 441756 0,1 μ M | 1,424 | 0,060 | 3 |
| | NGF + GW 441756 1 μ M | 1,611 | 0,202 | 3 |
| | NGF + GW 441756 10 μ M | 1,501 | 0,057 | 4 |
| 3.5 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | NGF 50 ng/ml | 3,138 | 0,640 | 11 |
| | NGF + GW 441756 0,1 μ M | 2,874 | 1,424 "range" | 2 |
| | NGF + GW 441756 1 μ M | 2,693 | 1,182 | 3 |
| | NGF + GW 441756 10 μ M | 0,467 | | 1 |
| 3.5 F | Kontroll | 0,011 | 0,008 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,109 | 0,069 | 11 |
| | NGF + GW 441756 0,1 μ M | 0,029 | 0,007 | 3 |
| | NGF + GW 441756 1 μ M | 0,011 | 0,005 | 3 |
| | NGF + GW 441756 10 μ M | 0,004 | 0,004 | 4 |
| 3.5 G | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,035 | 0,008 | 11 |
| | NGF + GW 441756 0,1 μ M | 0,022 | 0,010 | 3 |
| | NGF + GW 441756 1 μ M | 0,015 | 0,006 | 3 |
| | NGF + GW 441756 10 μ M | 0,014 | 0,007 | 4 |

3.3.4 Effekt av TrkA- antagonist på PC12-celler eksponert for BDNF

BDNF viste ikke de samme effektene på nevruttvekst i PC12-celler (avsnitt 3.2) sammenlignet med hva NGF gjorde (avsnitt 3.1). Det ble likevel undersøkt om nevruttveksten ble endret ved å eksponere med TrkA- antagonisten GW441756 sammen med BDNF. Det ble valgt tre konsentrasjoner av TrkA- antagonisten: 0,1 μM , 1 μM og 10 μM . Det var ingen parametre som viste signifikante forskjeller mellom celler eksponert for BDNF og celler eksponert for både BDNF og TrkA- antagonist (figur 3.6 A-D). Celler eksponert for BDNF viste ingen lange nevritter og ”spydceller” (avsnitt 3.2), derfor er disse endepunktene i tillegg til nevrittelengde ekskludert fra figur ettersom det var eventuell hemming av BDNF-effekt som var aktuelt å se på i dette tilfellet.



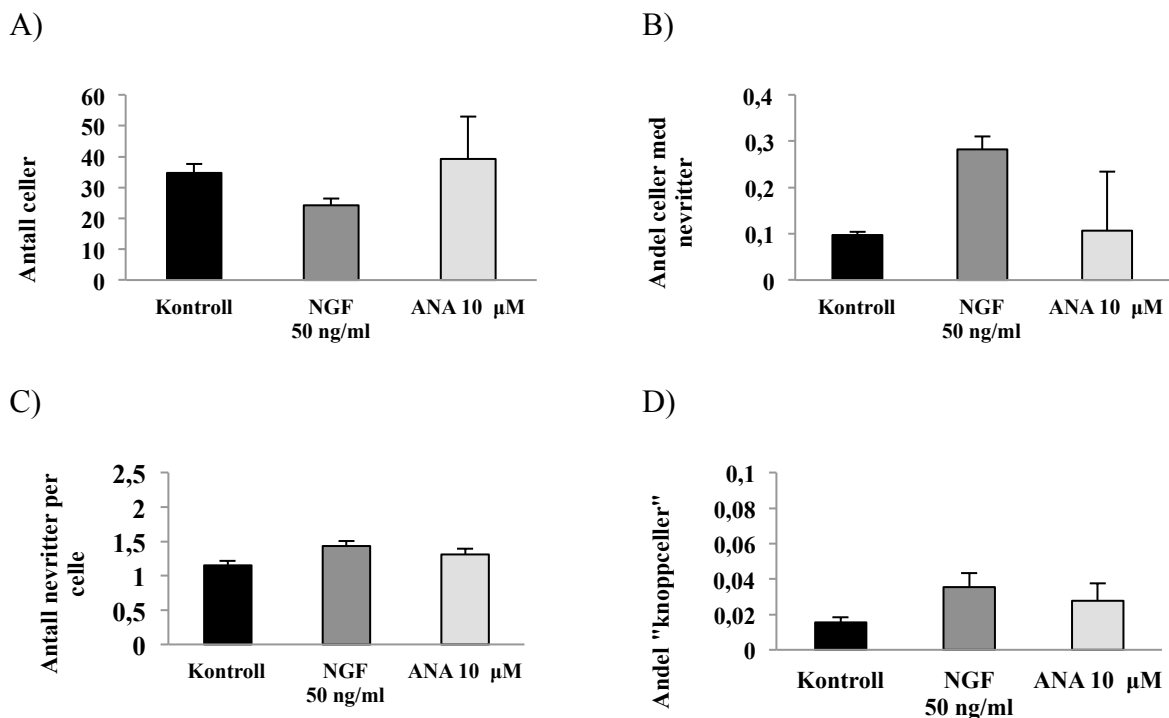
Figur 3.6 Trk A- antagonisten GW 441756 påvirker ikke PC12-celler eksponert for BDNF. PC12-celler ble eksponert for GW 441756 24 timer etter utplating, og 15 minutter før eksponering av BDNF. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Statistiske beregninger ble gjort ved hjelp av ANOVA. Ved ikke-normalfordelte data ble Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks benyttet som statistisk test. Det var ingen signifikante forskjeller mellom behandlingene. A) Antall celler n=3-11. B) Andel celler med nevritter. n=3-11. C) Antall nevritter per celle. n=3-11. D) Andel ”knoppceller”. n=3-11. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jensen Daling.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.6 A-D:

| | Ekponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|------------------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.6 A | Kontroll | 34,77 | 2,880 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 42,21 | 4,073 | 7 |
| | BDNF + GW 441756 0,1 μ M | 37,9 | 5,105 | 3 |
| | BDNF + GW 441756 1 μ M | 40,53 | 2,645 | 3 |
| | BDNF + GW 441756 10 μ M | 32,7 | 4,186 | 3 |
| 3.6 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0,104 | 0,015 | 7 |
| | BDNF + GW 441756 0,1 μ M | 0,121 | 0,053 | 3 |
| | BDNF + GW 441756 1 μ M | 0,092 | 0,014 | 3 |
| | BDNF + GW 441756 10 μ M | 0,105 | 0,037 | 3 |
| 3.6 C | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 1,313 | 0,042 | 7 |
| | BDNF + GW 441756 0,1 μ M | 1,212 | 0,113 | 3 |
| | BDNF + GW 441756 1 μ M | 1,239 | 0,105 | 3 |
| | BDNF + GW 441756 10 μ M | 1,107 | 0,068 | 3 |
| 3.6 D | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0,018 | 0,004 | 7 |
| | BDNF + GW 441756 0,1 μ M | 0,019 | 0,002 | 3 |
| | BDNF + GW 441756 1 μ M | 0,015 | 0,008 | 3 |
| | BDNF + GW 441756 10 μ M | 0,013 | 0,009 | 3 |

3.3.5 Effekt av TrkB- antagonist på udifferensierte PC12- celler

Det var interessant å se om TrkB- antagonisten ANA-12 hadde hemmende effekter på nevruttvekst hos PC12-celler eksponert for NGF og BDNF. Det ble i tillegg undersøkt om antagonisten alene hadde noen effekter på nevruttvekst i PC12-celler. Celler eksponert for ANA-12 i 10 μ M ble sammenlignet med ubehandlede celler og celler eksponert for NGF. Ingen av parameterne viste signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for TrkB- antagonisten (figur 3.7 A-D). Ubehandlede celler viste lange nevrutter i kun én av forsøkene, og hadde en andel ”spyceller” på 0,01, ikke signifikant forskjellig fra celler eksponert for ANA-12 alene som ikke viste til noen ”spyceller” eller lange nevrutter. Andel celler med lange nevrutter, nevruttlengde per celle og andel ”spyceller” er derfor ikke vist i figuren.



Figur 3.7 Trk B- antagonisten ANA-12 alene har ingen effekt på PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for ANA-12 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som negativ kontroll og NGF-eksponerte celler som positiv kontroll. A) Antall celler. n=2-11. B) Andel celler med nevrutter. n=2-11. C) Antall nevrutter per celle med nevrutter. n=2-11. D) Andel ”knoppceller”. n=2-11. Statistiske beregninger ble gjort ved hjelp av ANOVA. ANA-12 hadde kun to paralleller og avvik er vist som ”range”. Ved normalfordelte data ble Holm-Sidak method benyttet, og ved ikke-normalfordelte data, ble Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Dunn’s method benyttet. Signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for NGF, er vist i figur 3.1. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

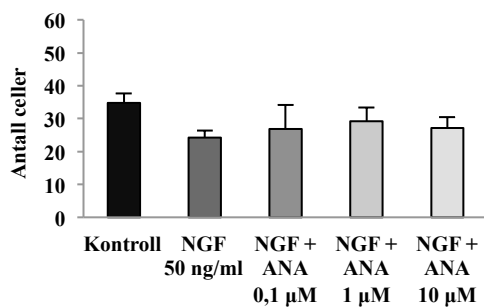
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.7:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|--------------------|---------------------|---------------|----------------------|
| 3.7 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 24,227 | 2,168 | 11 |
| | ANA-12 10 μ M | 39,25 | 13,7 "range" | 2 |
| 3.7 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,282 | 0,028 | 11 |
| | ANA-12 10 μ M | 0,106 | 0,127 "range" | 2 |
| 3.7 C | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 1,431 | 0,072 | 11 |
| | ANA-12 10 μ M | 1,309 | 0,158 "range" | 2 |
| 3.7 D | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,035 | 0,008 | 11 |
| | ANA-12 10 μ M | 0,027 | 0,01 "range" | 2 |

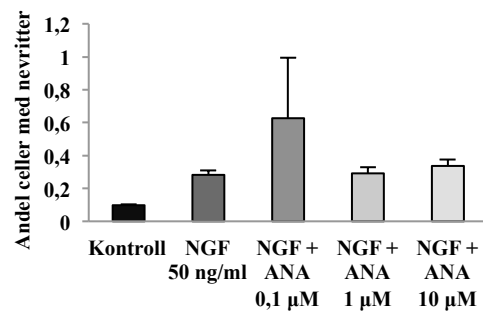
3.3.6 Effekt av TrkB- antagonist på PC12-celler under differensiering

Det ble undersøkt om TrkB- antagonisten ANA-12 hadde hemmende effekter på nevruttvekst i PC12-celler induisert av NGF- eksponering. Det ble valgt tre konsentrasjoner av TrkB- antagonisten (0,1 μM , 1 μM og 10 μM). Det var ingen signifikante forskjeller mellom celler eksponert for NGF og celler eksponert for både NGF og TrkB-antagonist (figur 3.8 A-G). Det ble også testet ut om ANA-12 i konsentrasjonen 100 μM hadde en hemmende effekt, men denne konsentrasjonen viste seg å være toksisk og en del celledød ble observert (ikke vist i figuren).

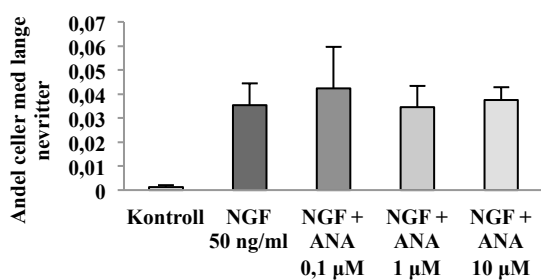
A)



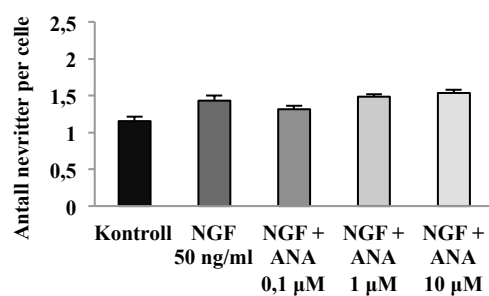
B)

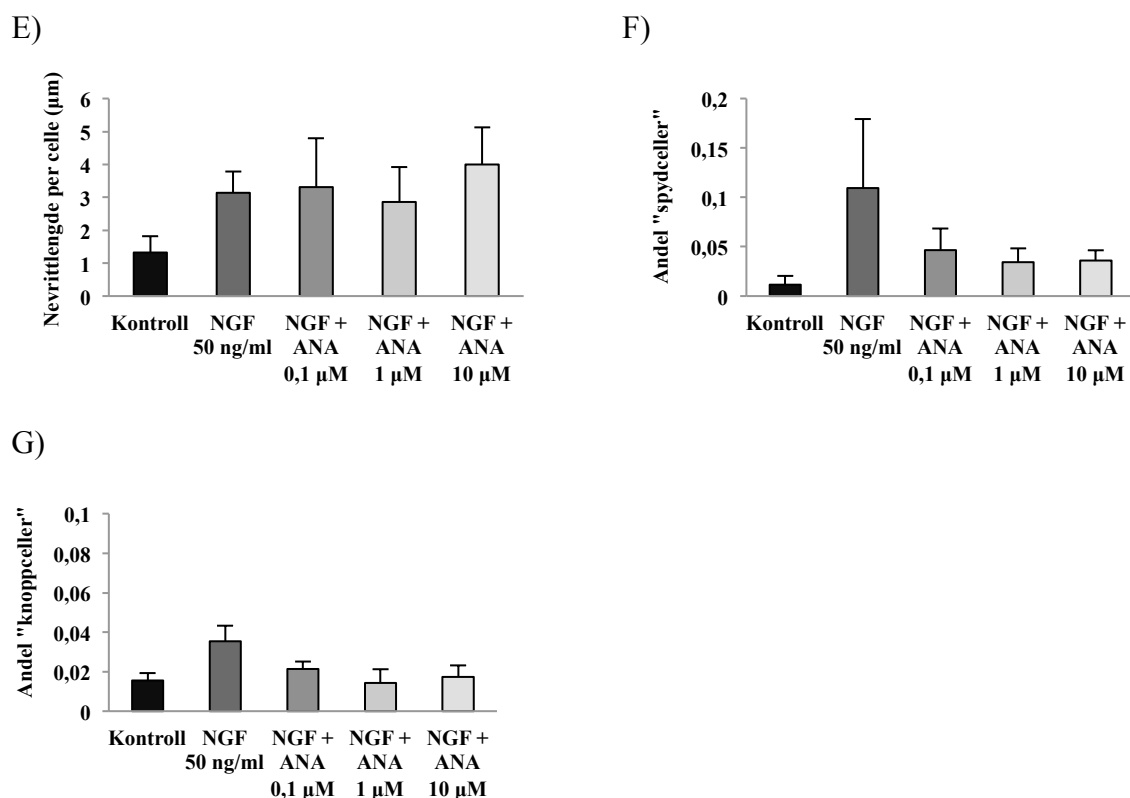


C)



D)





Figur 3.8 ANA-12 hemmer ikke nevritutvekst hos NGF- differensierte PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for ANA-12 24 timer etter utplating, og 15 minutter før NGF-eksponering. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. ANOVA ble valgt i statistiske analyser. ANOVA Holm-Sidak method ble benyttet ved normalfordelte data, og ved ikke-normalfordelte data ble Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, Dunn's method benyttet. A) Antall celler. n=3-11 B) Andel celler med nevritter. n=3-11. C) Andel celler med lange nevritter. n=3-11. D) Antall nevritter per celle med nevritt. n=3-11 E) Nevrittlengde per celle. n=3-11 F) Andel "spyceller". n=3-11. G) Andel "knoppceller". n=3-11. Det var signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for NGF + antagonist (kun enkelte konsentrasjoner). Dette gjaldt endepunktene andel celler med nevritter, antall nevritter per celle med nevritter og andel celler med lange nevritter (signifikans ikke vist i figur). Statistikkberegninger av ubehandlede celler og NGF-differensierte celler er vist i figur 3.1. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

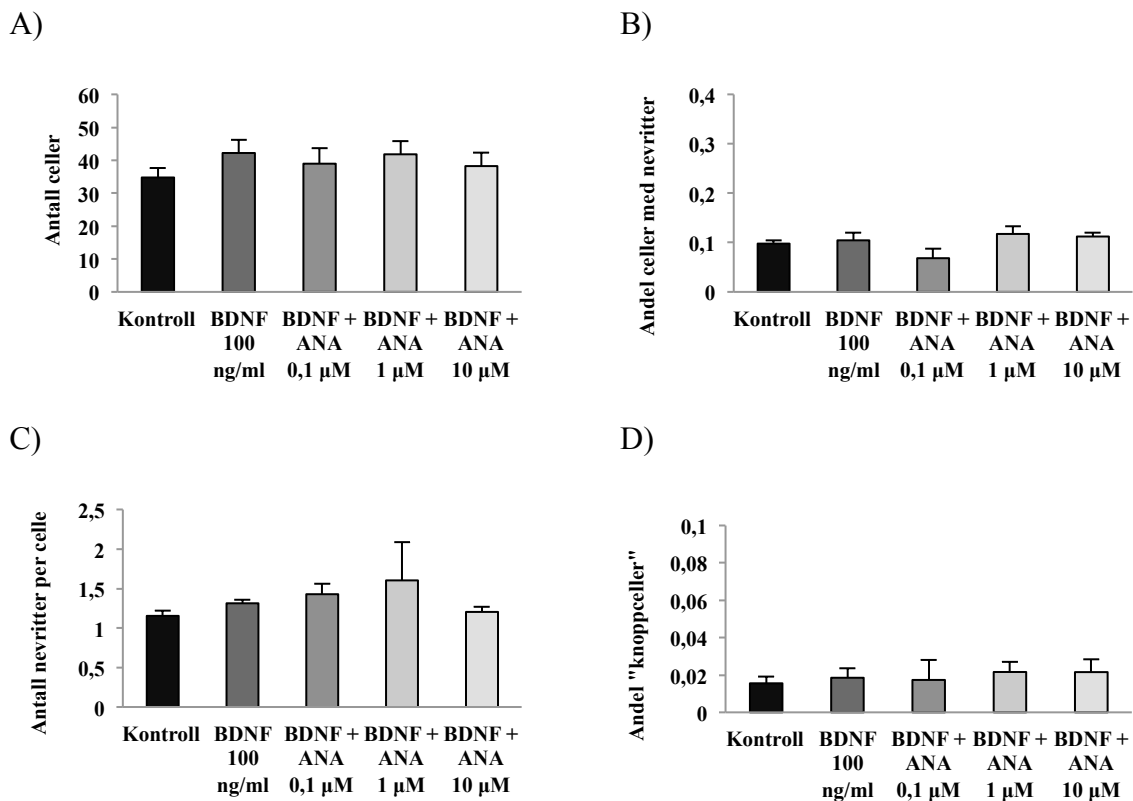
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8 A-G:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|---------------------|--------------|-------|---------------|
| 3.8 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 24,227 | 2,168 | 11 |
| | NGF + ANA-12 0,1 µM | 26,85 | 7,281 | 3 |
| | NGF + ANA-12 1 µM | 29,2 | 4,099 | 5 |
| | NGF + ANA-12 10 µM | 27,22 | 3,307 | 5 |
| 3.8 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,282 | 0,028 | 11 |
| | NGF + ANA-12 0,1 µM | 0,626 | 0,366 | 3 |

| | | | | |
|--------------|--------------------------|-------|-------|----|
| | NGF + ANA-12 1 μ M | 0,291 | 0,035 | 5 |
| | NGF + ANA-12 10 μ M | 0,337 | 0,038 | 5 |
| 3.8 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,035 | 0,009 | 11 |
| | NGF + ANA-12 0,1 μ M | 0,042 | 0,017 | 3 |
| | NGF + ANA-12 1 μ M | 0,034 | 0,008 | 5 |
| | NGF + ANA-12 10 μ M | 0,037 | 0,005 | 5 |
| 3.8 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 1,431 | 0,072 | 11 |
| | NGF + ANA-12 0,1 μ M | 1,315 | 0,048 | 3 |
| | NGF + ANA-12 1 μ M | 1,485 | 0,051 | 5 |
| | NGF + ANA-12 10 μ M | 1,534 | 0,036 | 5 |
| 3.8 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | NGF 50 ng/ml | 3,138 | 0,640 | 11 |
| | NGF + ANA-12 0,1 μ M | 3,311 | 1,491 | 3 |
| | NGF + ANA-12 1 μ M | 2,860 | 1,056 | 5 |
| | NGF + ANA-12 10 μ M | 3,997 | 1,134 | 5 |
| 3.8 F | Kontroll | 0,011 | 0,008 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,109 | 0,069 | 11 |
| | NGF + ANA-12 0,1 μ M | 0,046 | 0,021 | 3 |
| | NGF + ANA-12 1 μ M | 0,034 | 0,013 | 5 |
| | NGF + ANA-12 10 μ M | 0,036 | 0,010 | 5 |
| 3.8 G | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,035 | 0,008 | 11 |
| | NGF + ANA-12 0,1 μ M | 0,021 | 0,003 | 3 |
| | NGF + ANA-12 1 μ M | 0,014 | 0,006 | 5 |
| | NGF + ANA-12 10 μ M | 0,017 | 0,005 | 5 |

3.3.7 Effekt av TrkB- antagonist på PC12-celler eksponert for BDNF

BDNF hadde liten effekt på nevruttvekst i PC12-celler. Resultatene var ikke signifikant forskjellige sammenlignet med ubehandlede celler (Figur 3.2). Det ble likevel undersøkt om nevruttveksten ble endret ved å eksponere PC12-celler med TrkB- antagonist ANA-12 sammen med BDNF. Det ble valgt tre konsentrasjoner av TrkB- antagonist (0,1 μM , 1 μM og 10 μM). Det var ingen parametre som viste signifikante forskjeller mellom celler eksponert for BDNF og celler eksponert for både BDNF og ANA-12 (figur 3.9 A-D). Celler eksponert for BDNF gav ingen lange nevrutter og ”spydceller” (avsnitt 3.2), derfor er disse endepunktene i tillegg til nevruttlengde ekskludert fra figur ettersom det var eventuell hemming av BDNF-effekt som var aktuelt å se på i dette tilfellet.



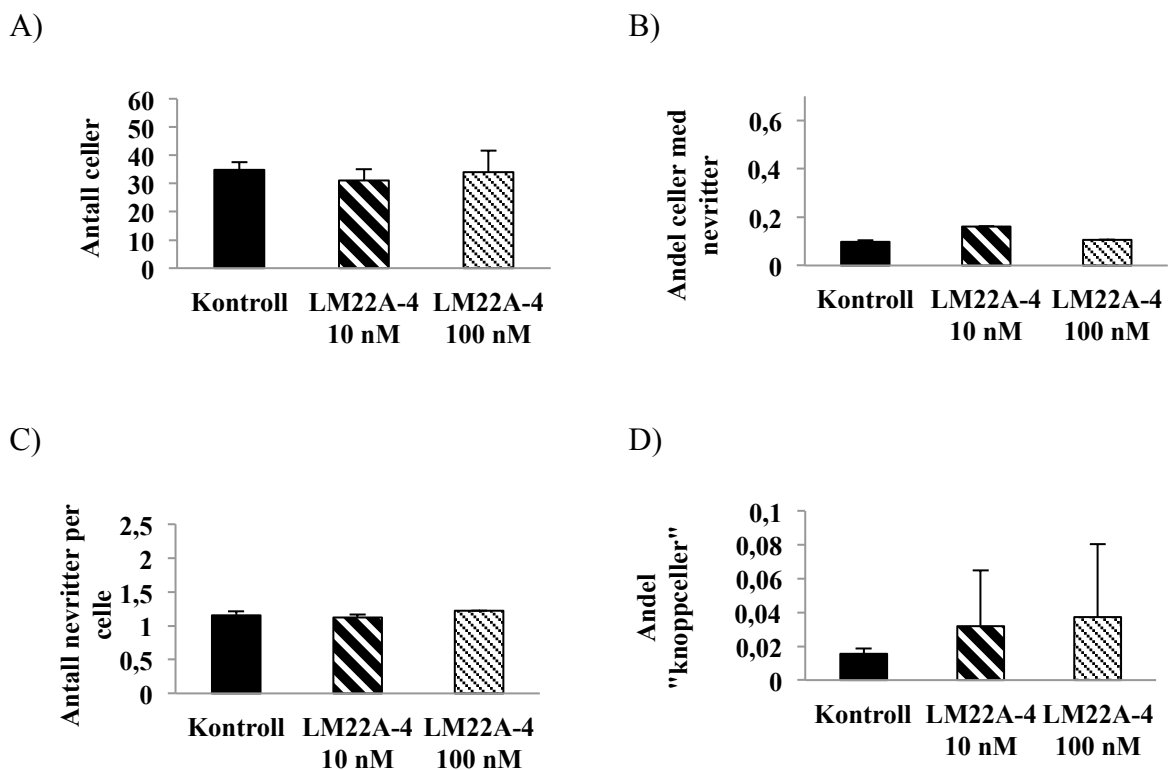
Figur 3.9 Verken BDNF eller BDNF i kombinasjon med ANA-12 påvirker nevruttvekst i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for ANA-12 24 timer etter utplating, og 15 minutter før BDNF-eksponering. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. ANOVA ble valgt i statistiske analyser. One Way ANOVA ble benyttet til statistiske analyser. Ved ikke-normalfordelte data ble Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks benyttet. Det var ingen signifikante forskjeller mellom behandlingene. A) Antall celler. n=3-11 B) Andel celler med nevrutter. n=3-11. C) Antall nevrutter per celle med nevrutt. n=3-11. D) Andel ”knoppceller”. n=3-11. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9 A-D:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|--------------|------------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.9 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 42,214 | 4,073 | 7 |
| | BDNF + ANA 0,1 μ M | 38,966 | 4,718 | 3 |
| | BDNF + ANA 1 μ M | 41,82 | 3,988 | 5 |
| | BDNF + ANA 10 μ M | 38,18 | 4,144 | 5 |
| 3.9 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0,104 | 0,015 | 7 |
| | BDNF + ANA 0,1 μ M | 0,068 | 0,018 | 3 |
| | BDNF + ANA 1 μ M | 0,117 | 0,015 | 5 |
| | BDNF + ANA 10 μ M | 0,112 | 0,007 | 5 |
| 3.9 C | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 1,313 | 0,042 | 7 |
| | BDNF + ANA 0,1 μ M | 1,428 | 0,128 | 3 |
| | BDNF + ANA 1 μ M | 1,603 | 0,488 | 5 |
| | BDNF + ANA 10 μ M | 1,200 | 0,070 | 5 |
| 3.9 D | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0,018 | 0,004 | 7 |
| | BDNF + ANA 0,1 μ M | 0,017 | 0,010 | 3 |
| | BDNF + ANA 1 μ M | 0,021 | 0,005 | 5 |
| | BDNF + ANA 10 μ M | 0,021 | 0,006 | 5 |

3.4 Effekt av TrkB- agonist på nevruttvekst i PC12-celler

Effekt av BDNF på nevruttvekst viste seg å være en del mindre enn den induisert av NGF. Utgiftene ved å eksponere med BDNF var også en del større, så til tross for at det kunne se ut som BDNF i konsentrasjonen 300 ng/ml viste en større andel "knoppceller" sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.2), ble det ikke aktuelt å fortsette med denne høye konsentrasjonen. Det ble derfor undersøkt om TrkB-agonisten LM22A-4 kunne skape noen effekter som ikke ble vist av BDNF. To konsentrasjoner ble valgt av LM22A-4; 10 nM og 100 nM. Det var ingen signifikante forskjeller i nevruttvekst hos celler eksponert for TrkB-agonist og ubehandlede celler (figur 3.10 A-D). Ubehandlete celler gav lange nevrutter i kun ét av forsøkene, og hadde en andel "spydceller" på 0,01, ikke signifikant forskjellig fra celler eksponert for LM 22A-4 alene som ikke viste til noen "spydceller". Celler eksponert for LM 22A-4 viste heller ingen lange nevrutter. Andel celler med lange nevrutter, nevruttlengde per celle og andel "spydceller" er derfor ikke vist i figuren.



Figur 3.10 TrkB-agonisten LM22A-4 påvirker ikke nevruttvekst i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for LM22A4 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. ANOVA ble valgt i statistiske analyser. LM22A-4 hadde kun to paralleller, så her er avvik

vist som "range". Ved ikke-normalfordelte data ble Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks benyttet. Det var ingen signifikante forskjeller mellom behandlingene. A) Antall celler. n=2-11 B) Andel celler med nevritter. n=2-11. C) Antall nevritter per celle med nevritt. n=2-11. D) Andel "knoppceller". n=2-11. Datamaterialet er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|--------------------|---------------------|---------------|----------------------|
| 3.10 A | Kontroll | 34,77 | 2,88 | 11 |
| | LM22A-4 10 nM | 31,1 | 7,8 "range" | 2 |
| | LM22A-4 100 nM | 34,05 | 15,3 "range" | 2 |
| 3.10 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | LM22A-4 10 nM | 0,161 | 0,005 "range" | 2 |
| | LM22A-4 100 nM | 0,105 | 0,002 "range" | 2 |
| 3.10 C | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | LM22A-4 10 nM | 1,121 | 0,09 "range" | 2 |
| | LM22A-4 100 nM | 1,221 | 0,01 "range" | 2 |
| 3.10 D | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | LM22A-4 10 nM | 0,031 | 0,033 "range" | 2 |
| | LM22A-4 100 nM | 0,037 | 0,043 "range" | 2 |

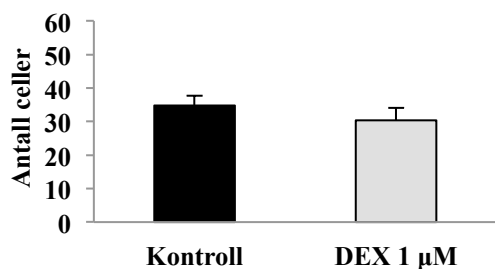
3.5 Deksametason og nevruttvekst

PC12-celler ble eksponert for deksametason i to ulike konsentrasjoner, enten 1 μM i 72 timer eller 10 μM i 2 timer.

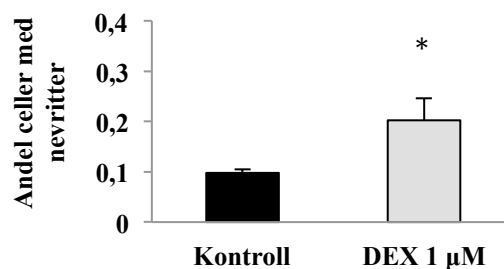
3.5.1 Effekt av deksametason 1 μM på nevruttvekst i PC12-celler

For endepunktene andel celler med nevritter og antall nevritter per celle (figur 3.11 B og D) var det en signifikant økning for deksametason 1 μM sammenlignet med ubehandlet kontroll. Det var ikke en signifikant økning i endepunktene antall celler, andel celler med lange nevritter, nevrittelengde per celle og andel ”knoppceller” (figur 3.11 A, C, E og F). Både ubehandlede kontrollceller og celler eksponert for deksametason viste svært få ”spyceller”, og dette endepunktet er derfor ikke vist i figuren.

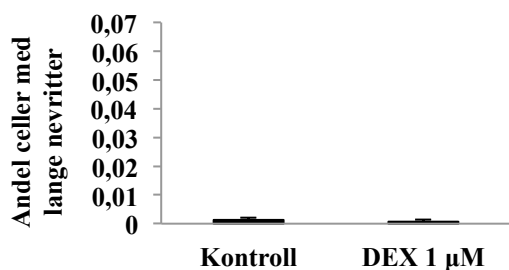
A)



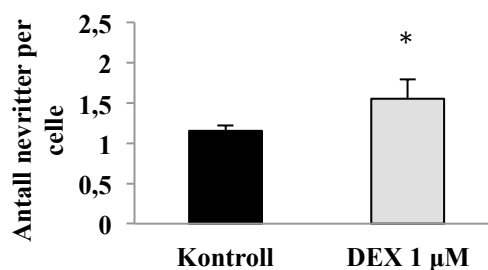
B)



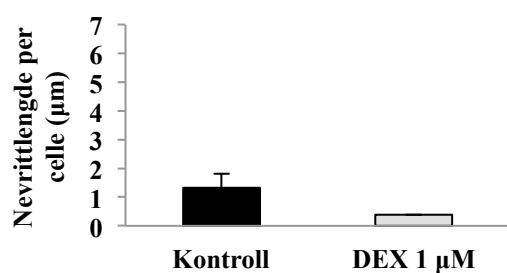
C)



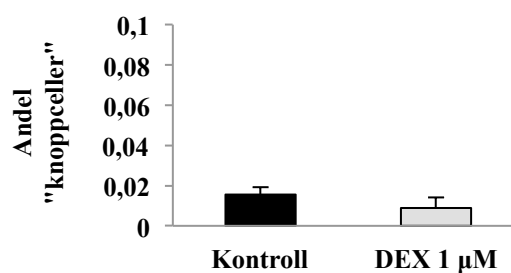
D)



E)



F)



Figur 3.11 Deksametason 1 µM påvirker nevruttvekst i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for deksametason 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. Til statistiske beregninger ble det gjort t-test ved alle endepunktene. A) Antall celler. n=4-11. B) Andel celler med nevrutter. n=4-11. $p^* < 0,05$. C) Andel celler med lange nevrutter. n=4-11. D) Antall nevrutter per celle med nevrutter. n=4-11. $p^* < 0,05$. E) Nevritt lengde per celle. n=1-3. F) Andel "knoppceller". n=4-11.

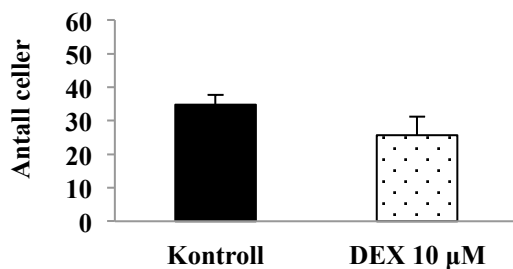
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11:

| | Eksposering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|-------------------|--------------|-------|---------------|
| 3.11 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 30,35 | 3,627 | 4 |
| 3.11 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 0,202 | 0,043 | 4 |
| 3.11 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 0,000 | 0,000 | 4 |
| 3.11 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 1,552 | 0,241 | 4 |
| 3.11 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | Deksametason 1 µM | 0,386 | | 1 |
| 3.11 F | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 0,008 | 0,005 | 4 |

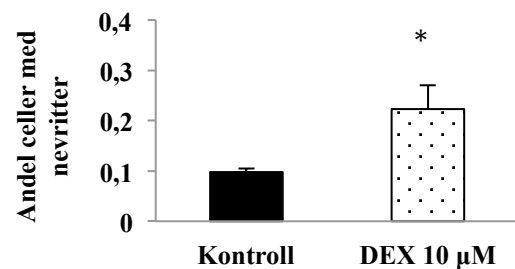
3.5.2 Effekt av deksametason 10 μM på nevruttvekst i PC12-celler

Deksametason ble tilsatt i konsentrasjonen 10 μM , og fjernet igjen etter 2 timer. Grunnen til at denne konsentrasjonen ble valgt i tillegg til 1 μM , var for å undersøke om en ”støtdose” i høy konsentrasjon over kort tid kunne gi nevruttvekst sammenlignet med lavere konsentrasjon over lengre tid. For endepunktene andel celler med nevritter og antall nevritter per celle (figur 3.12 B og D) var det en signifikant økning for deksametason 10 μM sammenlignet med ubehandlet kontroll. Det var ikke en signifikant økning i endepunktene antall celler, andel celler med lange nevritter, nevrittelengde per celle og andel ”knoppceller” (figur 3.12 A, C, E og F). Både ubehandlede celler og celler eksponert for deksametason viste svært få ”spyceller”, og dette endepunktet er derfor ikke vist i figur. Det var ingen forskjeller i nevruttvekst mellom PC12-celler eksponert for deksametason 1 μM (72 timer) og 10 μM (2 timer).

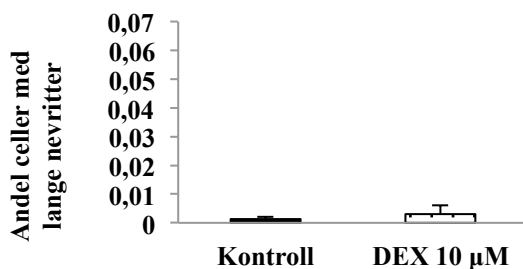
A)



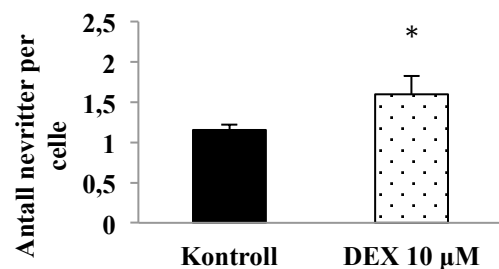
B)



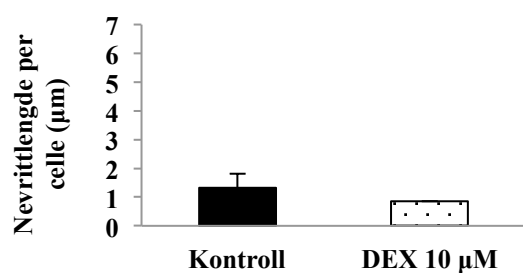
C)



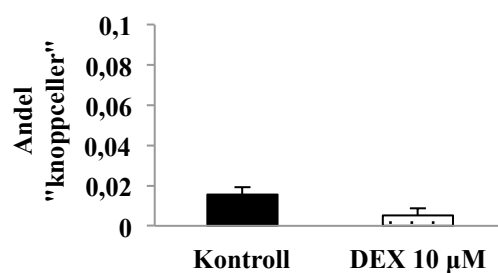
D)



E)



F)



Figur 3.12 Deksametason 10 µM i 2 timer påvirker nevruttvekst i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for deksametason 24 timer etter utplating i 2 timer. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. Til statistiske beregninger ble det gjort t-test ved alle endepunktene. A) Antall celler. n=3-11. B) Andel celler med nevrutter. n=3-11. $p^* < 0,05$. C) Andel celler med lange nevrutter. n=3-11. D) Antall nevrutter per celle med nevrutter. n=3-11. $p^* < 0,05$. E) Nevrittlengde per celle. n=1-3. F) Andel "knoppeller". n=3-11.

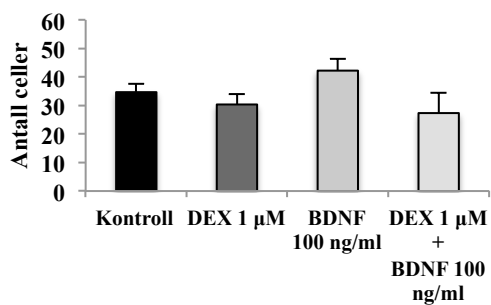
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.12:

| | Eksposering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|--------------------|--------------|-------|---------------|
| 3.12 A | Kontroll | 34,77 | 2,880 | 11 |
| | Deksametason 10 µM | 25,66 | 5,625 | 3 |
| 3.12 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | Deksametason 10 µM | 0,223 | 0,047 | 3 |
| 3.12 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | Deksametason 10 µM | 0,003 | 0,003 | 3 |
| 3.12 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | Deksametason 10 µM | 1,597 | 0,229 | 3 |
| 3.12 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | Deksametason 10 µM | 0,850 | | 1 |
| 3.12 F | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | Deksametason 10 µM | 0,005 | 0,003 | 3 |

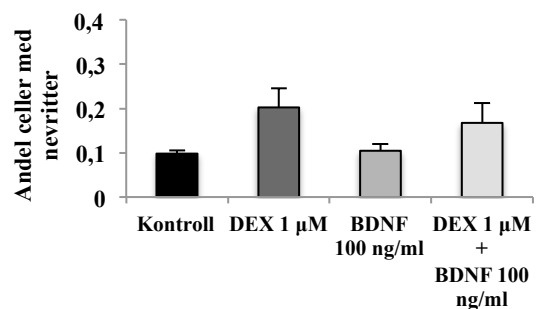
3.5.3 Effekt av deksametason på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for BDNF

Videre ble det undersøkt om en eksponering for BDNF sammen med deksametason kunne påvirke nevruttvekst i PC12-celler. Kombinasjonen med BDNF ble kun utført på én konsentrasjon av deksametason (1 μ M). Antall celler, andel celler med nevritter, antall nevritter per celle med nevritter og andel ”knoppceller” var ikke forskjellig fra celler eksponert for BDNF sammenlignet med celler eksponert for BDNF og deksametason. (figur 3.13 A, B, D, E og F). Det var én signifikant forskjell mellom celler eksponert for BDNF og de eksponert for BDNF og deksametason ved endepunktet andel celler med lange nevritter (figur 3.13 C)

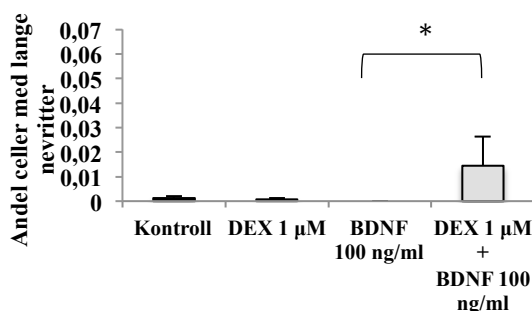
A)



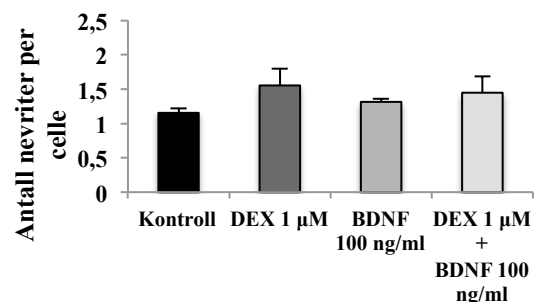
B)



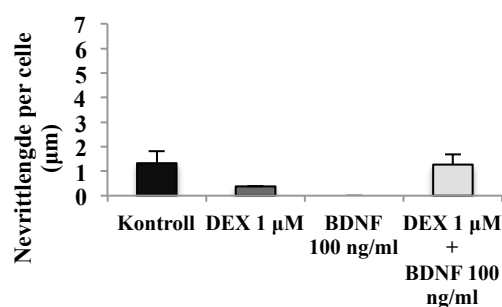
C)



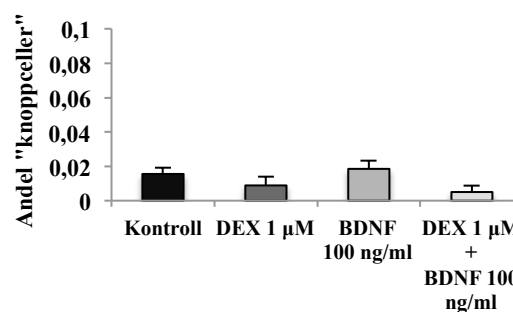
D)



E)



F)



Figur 3.13 Deksametason 1 µM har muligens en additiv effekt på nevruttvekst hos PC12-celler eksponert for BDNF. PC12-celler ble eksponert for deksametason og BDNF 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. Til statistiske beregninger ble det gjort ANOVA for å undersøke om det var statistiske forskjeller mellom behandlingene. I tillegg ble det utført t-tester mellom deksametason med/uten BDNF. A) Antall celler. n=3-11. B) Andel celler med nevrutter. n=3-11. C) Andel celler med lange nevrutter. $p^* < 0,05$. n=3-11. D) Antall nevrutter per celle med nevrutter. n=3-11. E) Nevrittlengde per celle. n=1-3. F) Andel knopp-celler. n=3-11. Statistiske beregninger mellom ubehandlede celler og celler eksponert for deksametason 1 µM er vist i figur 3.11.

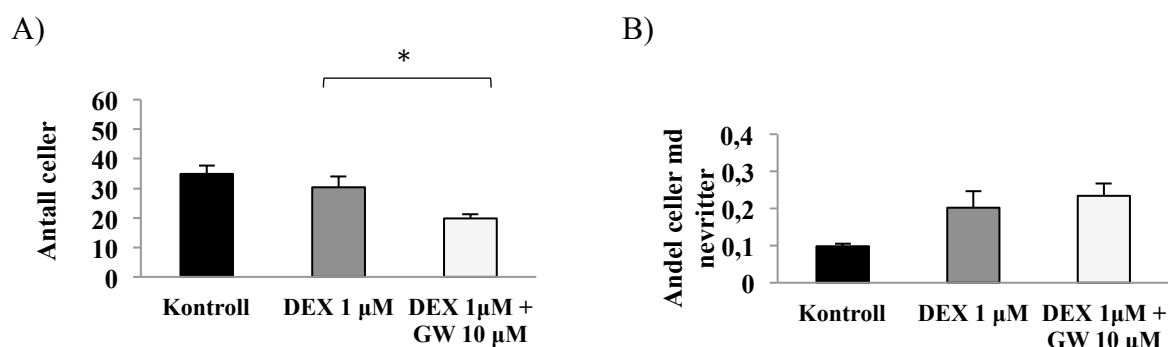
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13:

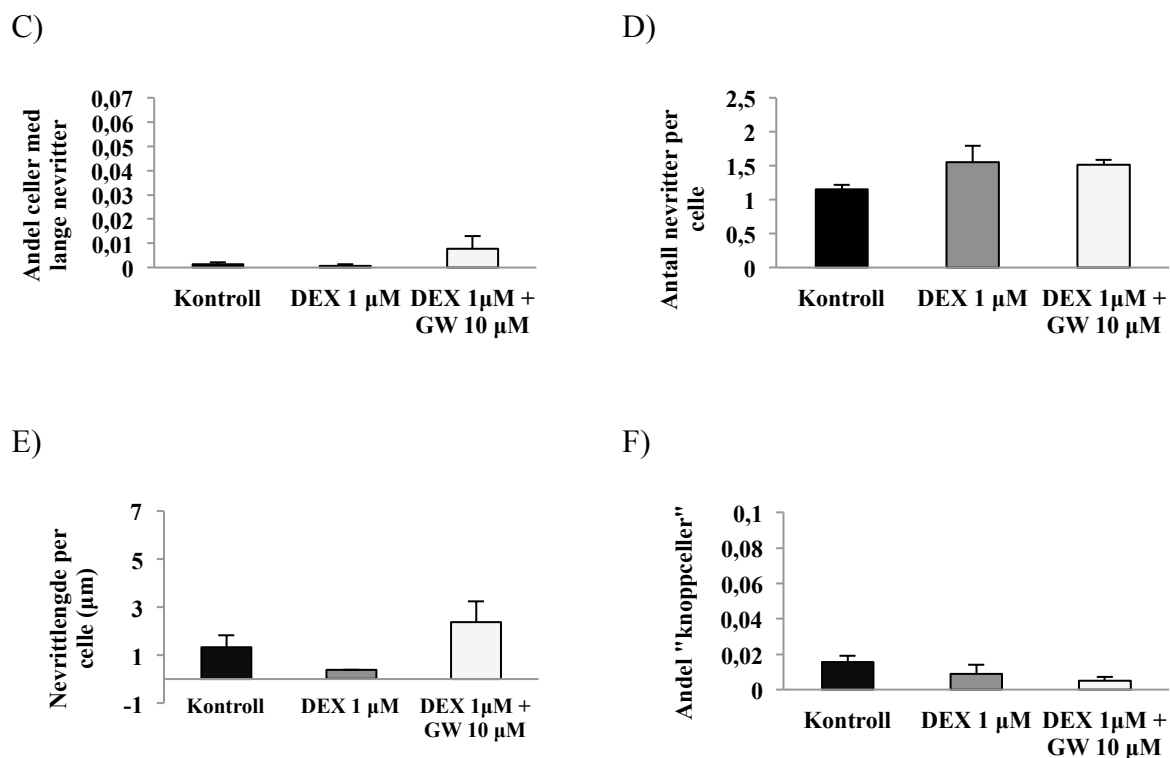
| | Eksposering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|------------------------------------|--------------|-------|---------------|
| 3.13 A | Kontroll | 34,77 | 2,880 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 30,35 | 3,627 | 4 |
| | BDNF 100 ng/ml | 42,21 | 4,074 | 7 |
| | Deksametason 1 µM + BDNF 100 ng/ml | 27,33 | 7,188 | 3 |
| 3.13 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 0,202 | 0,043 | 4 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0,104 | 0,016 | 7 |
| | Deksametason 1 µM + BDNF 100 ng/ml | 0,167 | 0,045 | 3 |
| 3.13 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 0,000 | 0,000 | 7 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0 | - | 4 |
| | Deksametason 1 µM + BDNF 100 ng/ml | 0,014 | 0,011 | 3 |
| 3.13 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | Deksametason 1 µM | 1,552 | 0,241 | 4 |
| | BDNF 100 ng/ml | 1,313 | 0,043 | 7 |
| | Deksametason 1 µM + BDNF 100 ng/ml | | | |

| | | | | |
|---------------|---|-------|-------|----|
| | | 1,446 | 0,236 | 3 |
| 3.13 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | Deksametason 1 μ M | 0,386 | - | 1 |
| | BDNF 100 ng/ml | - | - | 0 |
| | Deksametason 1 μ M + BDNF 100 ng/ml | 1,266 | 0,411 | 3 |
| 3.13 F | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | Deksametason 1 μ M | 0,008 | 0,005 | 4 |
| | BDNF 100 ng/ml | 0,019 | 0,005 | 7 |
| | Deksametason 1 μ M + BDNF 100 ng/ml | 0,005 | 0,003 | 3 |

3.5.4 Effekt av TrkA/B- antagonister på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for deksametason

Ettersom TrkA- antagonisten GW441756 viste seg å hemme nevruttvekst induisert av NGF, ble et undersøkt om denne antagonisten i tillegg til TrkB- antagonisten ANA-12 kunne hemme nevruttvekst induisert av deksametason 1 μ M. Begge antagonistene ble undersøkt ved konsentrasjonen 10 μ M. Endepunktet antall celler viste seg å være signifikant forskjellig mellom celler eksponert for deksametason og deksametason sammen med TrkA-antagonisten GW 441756 (figur 3.14 A). Ingen av de andre parameterne for nevruttvekst var signifikant forskjellige mellom PC12-celler eksponert for deksametason alene og celler eksponert for både deksametason og antagonist, dette gjaldt både GW441756 (figur 3.14 B-F) og ANA-12 (figur 3.15 A-F). Deksametason med/uten antagonist viste svært få ”spydceller”, derfor er den parameteren ekskludert i figur 3.14 og 3.15.

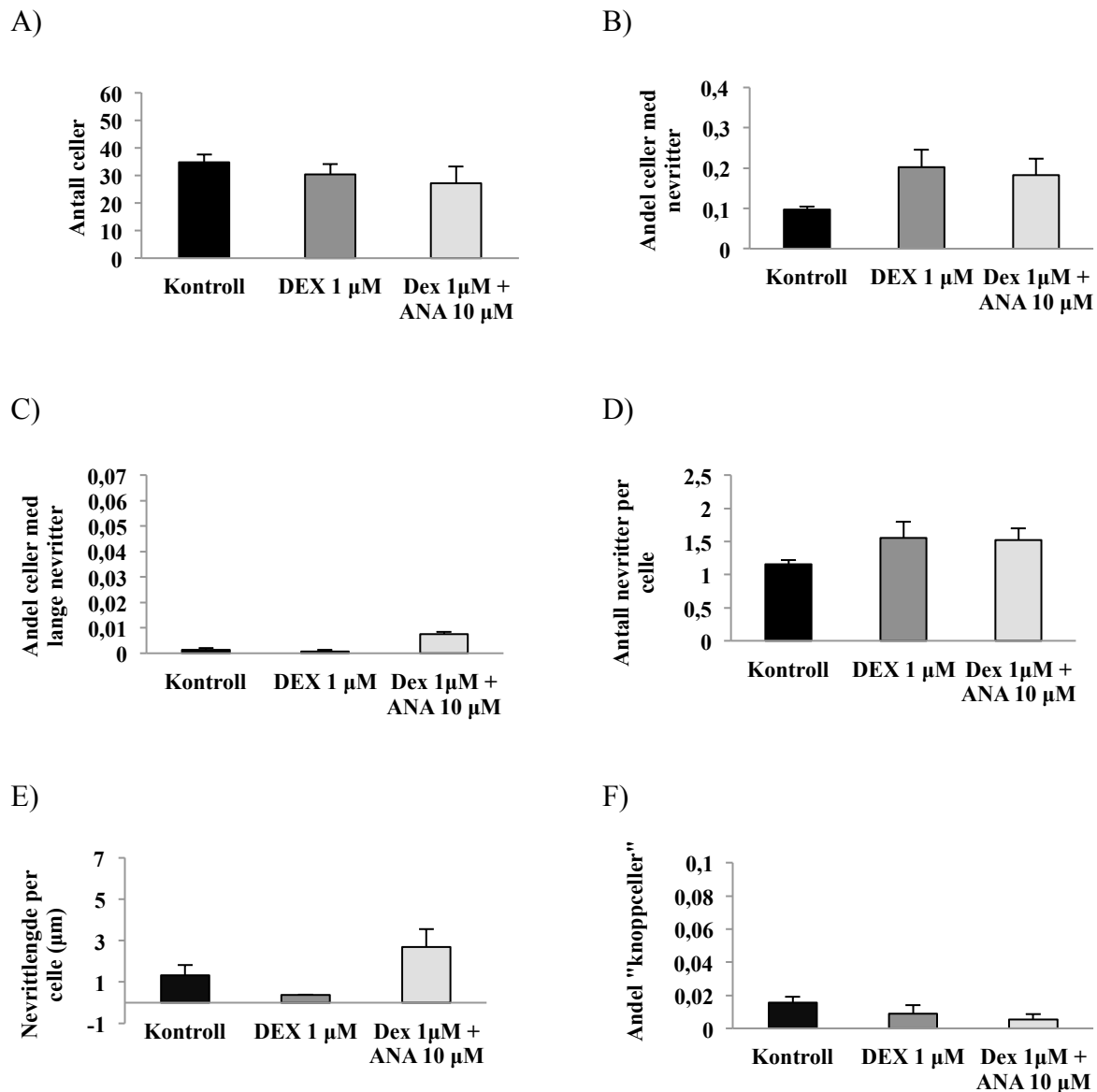




Figur 3.14 Trk A- hemmer GW441756 ser ikke ut til å påvirke nevruttvekst induisert av deksametason 1 μ M i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for GW441756 24 timer etter utplating, og 15 minutter før deksametason. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. Til statistiske beregninger ble det gjort ANOVA for å undersøke om det var statistiske forskjeller mellom behandlingene. A) Antall celler. n=4-11. $p^* < 0,05$. B) Andel celler med nevritter. n=4-11. C) Andel celler med lange nevritter. n=4-11. D) Antall nevritter per celle med nevritter. n=4-11. E) Nevrittlengde per celle. n=1-3. F) Andel "knoppceller". n=4-11. Statistiske beregninger mellom ubehandlede celler og celler eksponert for deksametason 1 μ M er vist i figur 3.11.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.14:

| | Eksposering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|--|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.14 A | Kontroll | 34,772 | 2,880 | 11 |
| | Deksametason 1 μM | 30,35 | 3,627 | 4 |
| | Deksametason 1 μM + GW 10 μM | 19,8 | 1,435 | 4 |
| 3.14 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | Deksametason 1 μM | 0,202 | 0,043 | 4 |
| | Deksametason 1 μM + GW 10 μM | 0,234 | 0,034 | 4 |
| 3.14 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | Deksametason 1 μM | 0,000 | 0,000 | 4 |
| | Deksametason 1 μM + GW 10 μM | 0,007 | 0,005 | 4 |
| 3.14 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | Deksametason 1 μM | 1,552 | 0,241 | 4 |
| | Deksametason 1 μM + GW 10 μM | 1,514 | 0,067 | 4 |
| 3.14 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | Deksametason 1 μM | 0,386 | | 1 |
| | Deksametason 1 μM + GW 10 μM | 2,368 | 0,861 | 3 |
| 3.14 F | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | Deksametason 1 μM | 0,008 | 0,005 | 4 |
| | Deksametason 1 μM + GW 10 μM | 0,005 | 0,002 | 4 |



Figur 3.15 Trk B- hemmer ANA-12 ser ikke ut til å påvirke nevruttvekst induisert av deksametason 1 µM i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for ANA-12 24 timer etter utplating, og 15 minutter før deksametason. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. Til statistiske beregninger ble det gjort ANOVA for å undersøke om det var statistiske forskjeller mellom behandlingene. A) Antall celler. n=3-11. B) Andel celler med nevritter. n=3-11. C) Andel celler med lange nevritter. n=3-11. D) Antall nevritter per celle med nevritter. n=3-11. E) Nevrittlengde per celle. n=1-3. F) Andel "knoppceller". n=3-11. Statistiske beregninger mellom ubehandlede celler og celler eksponert for deksametason 1 µM er vist i figur 3.11.

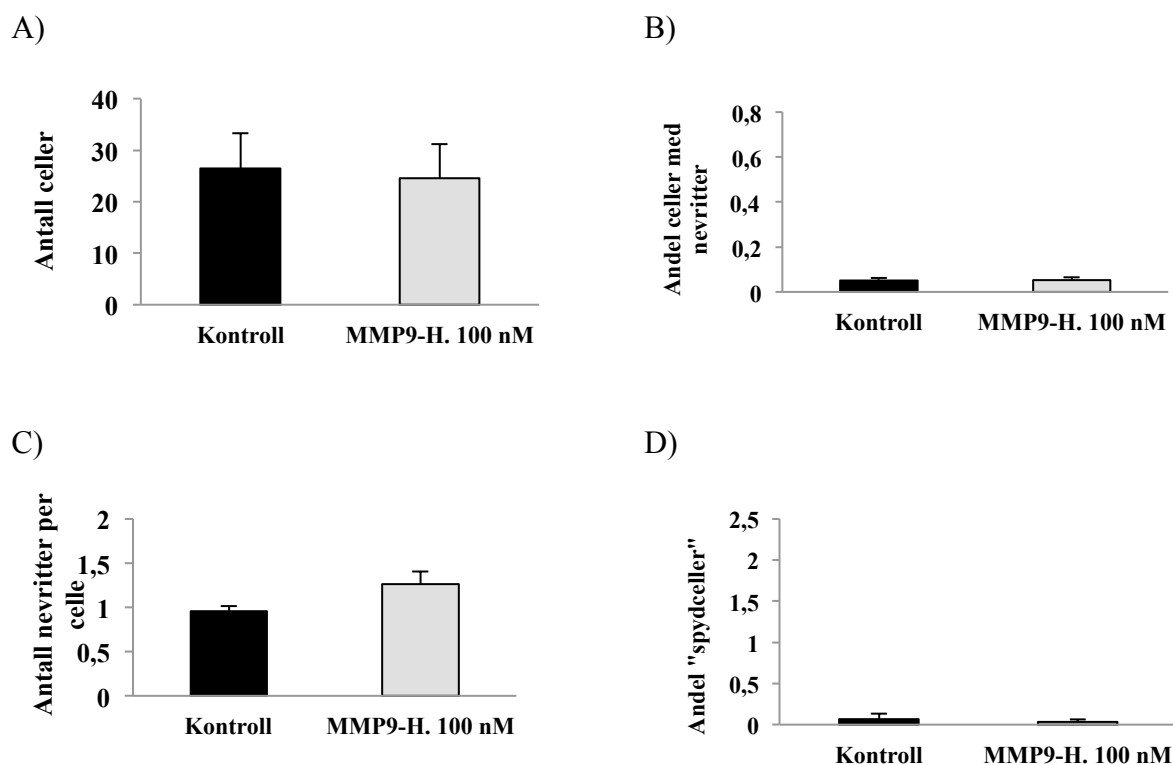
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.15:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|---|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.15 A | Kontroll | 34,77 | 2,880 | 11 |
| | Deksametason 1 μ M | 30,35 | 3,627 | 4 |
| | Deksametason 1 μ M + ANA 10 μ M | 27,13 | 6,043 | 3 |
| 3.15 B | Kontroll | 0,097 | 0,006 | 11 |
| | Deksametason 1 μ M | 0,202 | 0,043 | 4 |
| | Deksametason 1 μ M + ANA 10 μ M | 0,182 | 0,040 | 3 |
| 3.15 C | Kontroll | 0,001 | 0,000 | 11 |
| | Deksametason 1 μ M | 0,000 | 0,000 | 4 |
| | Deksametason 1 μ M + ANA 10 μ M | 0,007 | 0,000 | 3 |
| 3.15 D | Kontroll | 1,153 | 0,062 | 11 |
| | Deksametason 1 μ M | 1,552 | 0,241 | 4 |
| | Deksametason 1 μ M + ANA 10 μ M | 1,520 | 0,181 | 3 |
| 3.15 E | Kontroll | 1,323 | 0,492 | 3 |
| | Deksametason 1 μ M | 0,386 | | 1 |
| | Deksametason 1 μ M + ANA 10 μ M | 2,690 | 0,876 | 3 |
| 3.15 F | Kontroll | 0,015 | 0,003 | 11 |
| | Deksametason 1 μ M | 0,008 | 0,005 | 4 |
| | Deksametason 1 μ M + ANA 10 μ M | 0,005 | 0,003 | 3 |

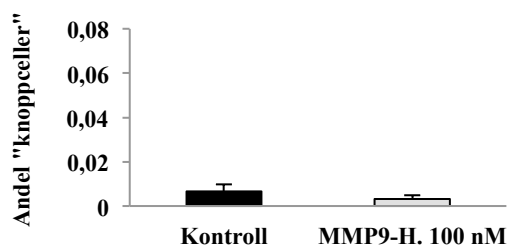
3.6 Effekt av MMP-9-antagonist på nevruttvekst i PC12-celler

Tidligere studier har vist at uttrykk av MMP- genen kan bli hemmet eller induisert av glukokortikoider i flere modellsystemer, og at en eksponering av glukokortikoider kan føre til forstyrrelser under utvikling hos flere arter (Hillegass 2008). PC12-celler ble derfor eksponert for MMP9- antagonist både alene og i kombinasjon med deksametason eller NGF. Konsentrasjon av MMP-9-antagonist ble valgt til 100 nM.

For å kunne undersøke om MMP-9- antagonist hadde en hemmende effekt på nevruttvekst hos PC12-celler eksponert for NGF eller deksametason, ble det først undersøkt om antagonist alene hadde en effekt på nevruttvekst. Det var ingen signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for MMP-9-antagonist alene (figur 3.16 A-E). Verken ubehandlede celler eller celler eksponert for antagonist viste lange nevrutter, derfor er endepunktene "andel celler med lange nevrutter" og "nevrittlengde per celle" ekskludert i figuren. MMP-9-antagonist er kalt "MMP9-H" i alle figurer i avsnitt 3.6.



E)



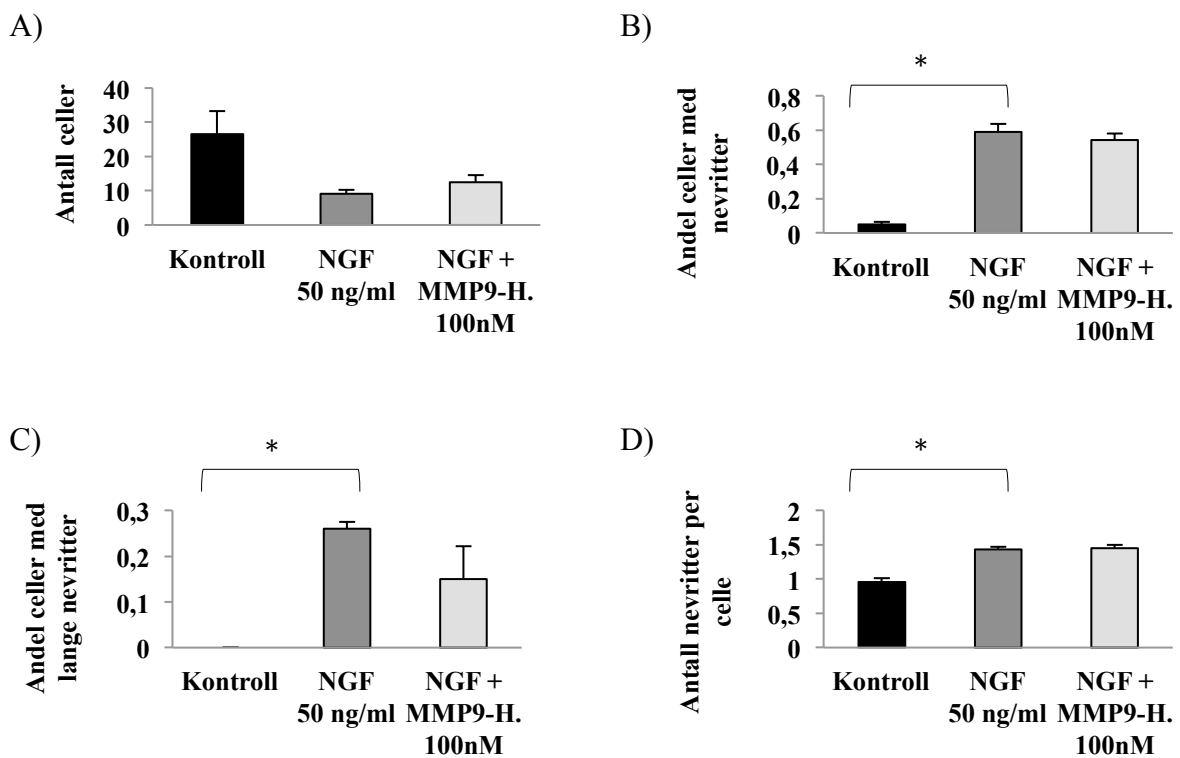
Figur 3.16 MMP-9- antagonist i konsentrasjonen 100 nM alene ser ikke ut til å ha en effekt på nevruttvekst i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for MMP9-hemmer 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. Til statistiske beregninger ble det gjort t-test. A) Antall celler. n=3. B) Andel celler med nevritter. n=3. C) Antall nevritter per celle med nevritter. n=3. D) Andel "spydceller". n=3. E) Andel "knopp-celler". n=3.

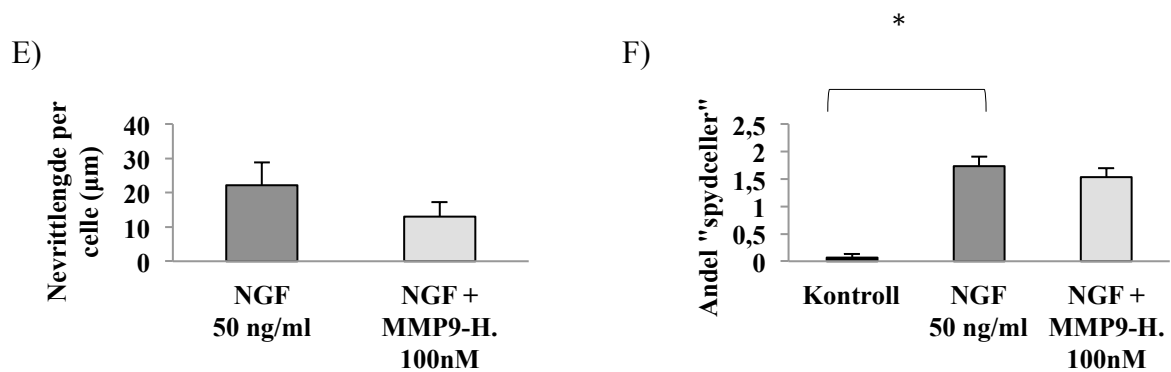
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.16 A-E:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|-------------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.16 A | Kontroll | 26,43 | 6,848 | 3 |
| | MMP9- antagonist 100 nM | 24,56 | 6,568 | 3 |
| 3.16 B | Kontroll | 0,050 | 0,012 | 3 |
| | MMP9- antagonist 100 nM | 0,052 | 0,011 | 3 |
| 3.16 C | Kontroll | 0,954 | 0,061 | 3 |
| | MMP9- antagonist 100 nM | 1,261 | 0,144 | 3 |
| 3.16 D | Kontroll | 0,066 | 0,066 | 3 |
| | MMP9- antagonist 100 nM | 0,033 | 0,033 | 3 |
| 3.16 E | Kontroll | 0,006 | 0,003 | 3 |
| | MMP9- antagonist 100 nM | 0,003 | 0,001 | 3 |

3.6.1 Effekt av MMP-9- antagonist hos PC12-celler eksponert for NGF

Resultatene viste at det var ingen signifikante forskjeller mellom celler eksponert for NGF og celler eksponert for både NGF og MMP-9-antagonist. Dette gjaldt alle parameterne for nevruttvekst (figur 3.17 A-F). Det kunne likevel se ut som det ble en antydning til færre celler med lange nevritter og kortere nevrittelengde hos celler eksponert for MMP-9-antagonist i kombinasjon med NGF sammenlignet med NGF-eksponerte celler (figur 3.17 C og E). Det ble ikke observert ”spydceller” blant cellene eksponert for NGF både med og uten MMP-9-antagonist. Endepunktet andel ”spydceller” er derfor ikke vist i figur 3.17 ettersom det var eventuell hemming NGF-effekt som var aktuelt å se på i dette tilfellet.





Figur 3.17 MMP-9-antagonist 100 nM ser ikke ut til å ha en effekt på nevruttvekst i PC12-celler induisert av NGF. PC12-celler ble eksponert for MMP-9-hemmer 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. Til statistiske beregninger ble det gjort ANOVA for å se etter statistiske forskjeller mellom behandlingene. A) Antall celler. n=3. B) Andel celler med nevritter. p*<0,001. ANOVA Holm-Sidak method. n=3. C) Andel celler med lange nevritter. p*=0,011 Kruskal-Wallis One Way ANOVA on ranks.n=3. D) Antall nevritter per celle med nevritter. p*<0,001. ANOVA Holm-Sidak method n=3. E) Nevrittlengde per celle. n=3. F) Andel "spydceller". n=3. p*<0,001 ANOVA Holm Sidak-method.

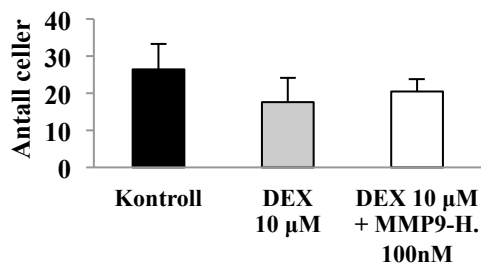
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.17:

| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|------------------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.17 A | Kontroll | 26,43 | 6,848 | 3 |
| | NGF 50 ng/ml | 9,1 | 1,209 | 3 |
| | NGF + MMP9-antagonist 100 nM | 12,46 | 2,085 | 3 |
| 3.17 B | Kontroll | 0,050 | 0,012 | 3 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,589 | 0,048 | 3 |
| | NGF + MMP9-antagonist 100 nM | 0,542 | 0,036 | 3 |
| 3.17 C | Kontroll | 0,000 | 0,000 | 3 |
| | NGF 50 ng/ml | 0,260 | 0,031 | 3 |
| | NGF + MMP9-antagonist 100 nM | 0,149 | 0,047 | 3 |
| 3.17 D | Kontroll | 0,954 | 0,061 | 3 |
| | NGF 50 ng/ml | 1,431 | 0,034 | 3 |
| | NGF + MMP9-antagonist 100 nM | 1,449 | 0,051 | 3 |
| 3.17 E | NGF 50 ng/ml | 22,16 | 6,698 | 3 |
| | NGF + MMP9-antagonist 100 nM | 13,01 | 4,199 | 3 |
| 3.17 F | Kontroll | 0,066 | 0,066 | 3 |
| | NGF 50 ng/ml | 1,733 | 0,176 | 3 |
| | NGF + MMP9-antagonist 100 nM | 1,533 | 0,166 | 3 |

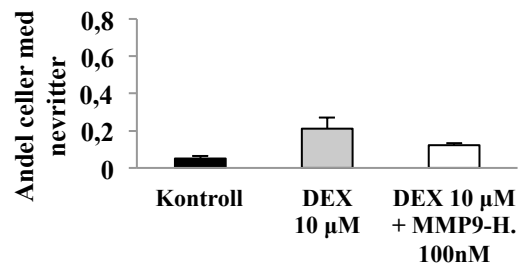
3.6.2 Effekt av MMP-9-antagonist på nevruttvekst hos PC12-celler eksponert for deksametason

Resultatene viste at cellene som var eksponert for både deksametason og MMP-9-antagonist gav en tendens til færre celler med nevritter sammenlignet med deksametason alene (figur 3.18 B). Det var derimot ingen signifikante forskjeller mellom celler eksponert for deksametason og celler eksponert for både deksametason og MMP-9-antagonist. Dette gjaldt alle parametre for nevruttvekst (figur 3.18 A-E). Deksametason gav ingen tegn til verken ”knoppceller” eller ”spyceller”. Disse endepunktene er derfor ikke inkludert i figuren ettersom det var en eventuell hemming av nevruttvekst mediert via deksametason som var interessant i dette tilfellet.

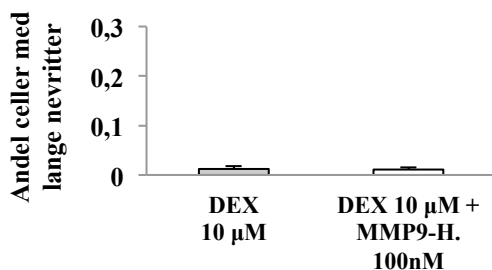
A)



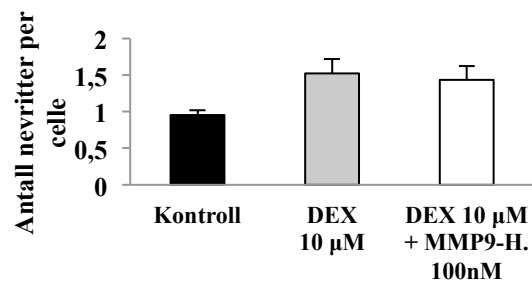
B)



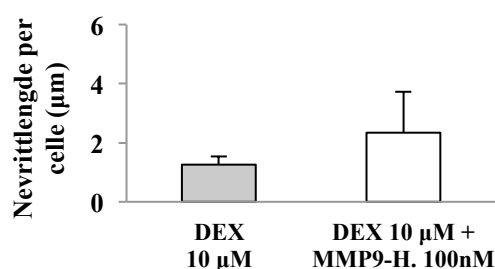
C)



D)



E)



Figur 3.18 MMP-9-hemmer 100 nM ser ikke ut til å ha en effekt på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for deksametason 10 µM. PC12-celler ble eksponert for MMP-9-hemmer 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. Til statistiske beregninger ble det gjort ANOVA for å se etter statistiske forskjeller mellom behandlingene. A) Antall celler. n=3. B) Andel celler med nevrutter. n=3. C) Andel celler med lange nevrutter. n=3. D) Antall nevrutter per celle med nevrutter. n=3. E) Nevrittlengde per celle. n=3. Det var signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for deksametason med/uten MMP-9-hemmer. Dette gjaldt endepunktet andel celler med nevrutter (signifikans ikke vist i figur).

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.18 A-E:

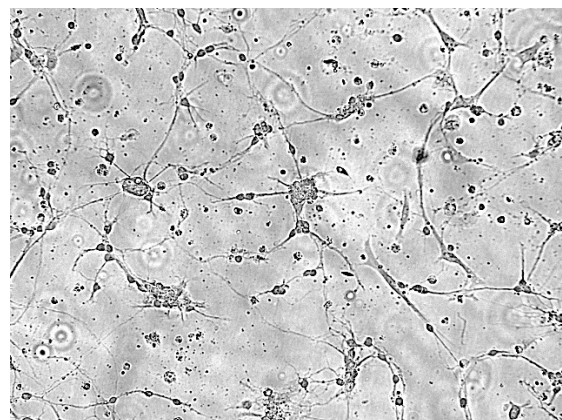
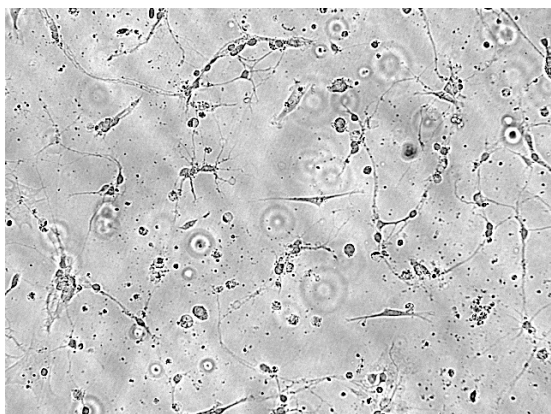
| | Eksponering | Gjennomsnitt | SE | Antall forsøk |
|---------------|-------------------------------|---------------------|-----------|----------------------|
| 3.18 A | Kontroll | 26,43 | 6,848 | 3 |
| | Deksametason 10 µM | 17,6 | 3,318 | 3 |
| | DEX + MMP-9-antagonist 100 nM | 20,46 | 3,170 | 3 |
| 3.18 B | Kontroll | 0,050 | 0,012 | 3 |
| | Deksametason 10 µM | 0,211 | 0,060 | 3 |
| | DEX + MMP-9-antagonist 100 nM | 0,122 | 0,010 | 3 |
| 3.18 C | Deksametason 10 µM | 0,012 | 0,005 | 3 |
| | DEX + MMP-9-antagonist 100 nM | 0,010 | 0,004 | 3 |
| 3.18 D | Kontroll | 0,954 | 0,061 | 3 |
| | Deksametason 10 µM | 1,524 | 0,193 | 3 |
| | DEX + MMP-9-antagonist 100 nM | 1,435 | 0,192 | 3 |
| 3.18 E | Deksametason 10 µM | 1,258 | 0,268 | 3 |
| | DEX + MMP-9-antagonist 100 nM | 2,340 | 1,383 | 3 |

Ubehandlede celler viste ingen celler med lange nevrutter og er ikke inkludert i figur (figur 3.18 C). Figur 3.18 E Nevrittlengde per celle viser derfor kun DEX med/uten MMP-9-hemmer.

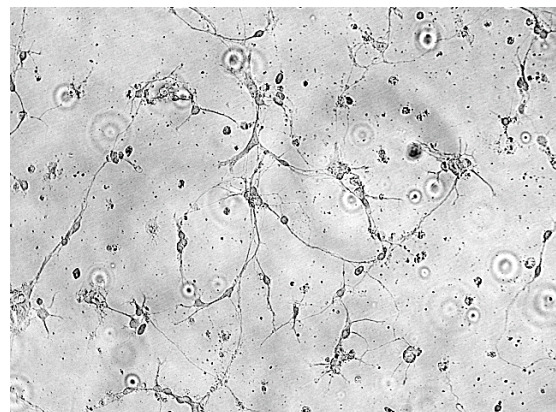
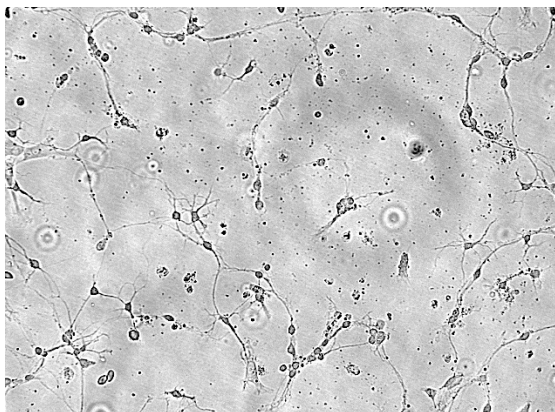
3.7 Effekt av MMP-9-antagonist på nevruttvekst i kyllingkornceller

Det har tidligere vist seg å være vanskelig å kvantifisere bilder av primærkulturer av lillehjerne fra kylling. Det var likevel ønskelig å gjøre en kvalitativ analyse for å se om nevruttvekst ble forandret hos kyllingkornceller ved MMP-9-antagonist tilstede. Det ble testet et pilotforsøk med tre konsentrasjoner av MMP-9-antagonist (1 nM, 10 nM og 100 nM). Bilder ble tatt ved 20X forstørrelse under fasekontrast etter 48 timer. Ettersom MMP-9-antagonisten var løst i DMSO, ble det også tatt bilder av celler eksponert for DMSO i tillegg til ubehandlede celler. Det kunne se ut som det ble færre nevritter hos cellene eksponert for 1 nM MMP-9-antagonist (figur 3.19 C), og ved konsentrasjonen 100 nM var det færre celler sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.19 E).

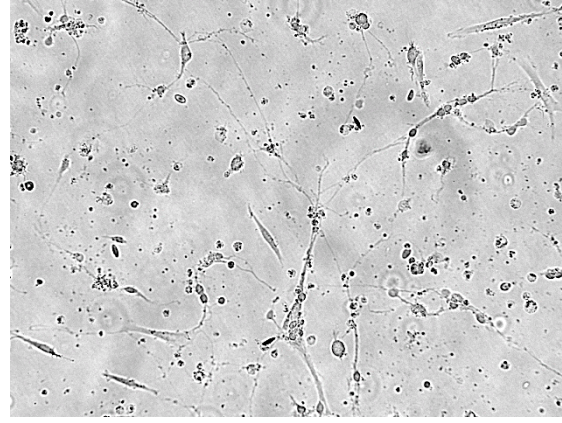
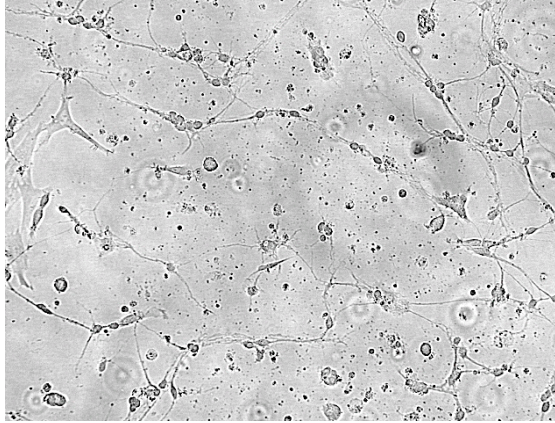
A) Ubehandlede



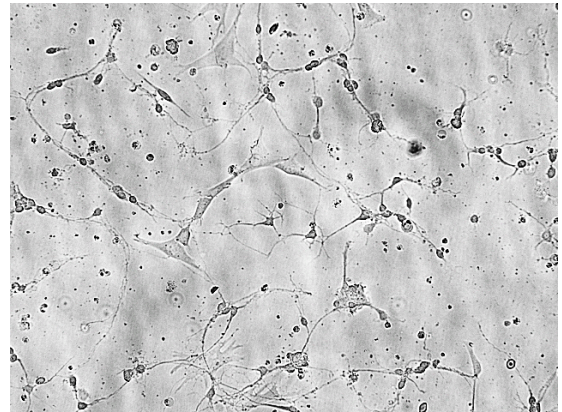
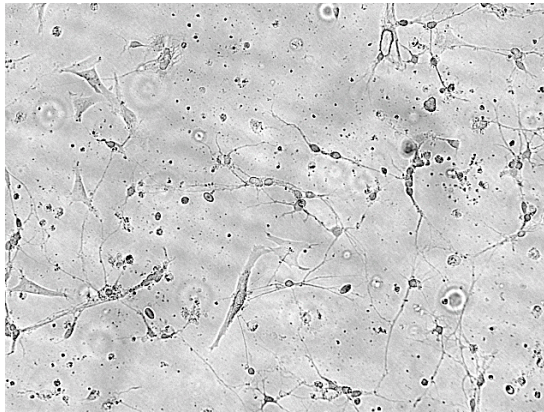
B) DMSO 1 %



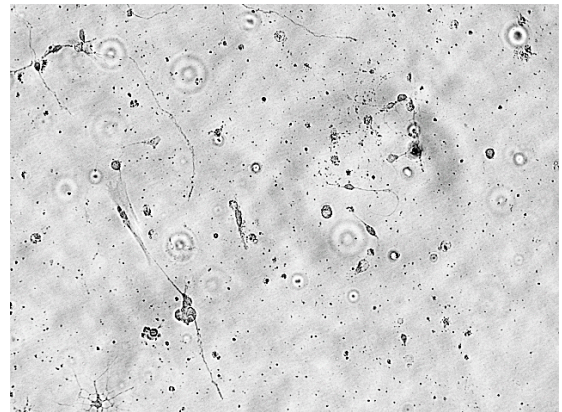
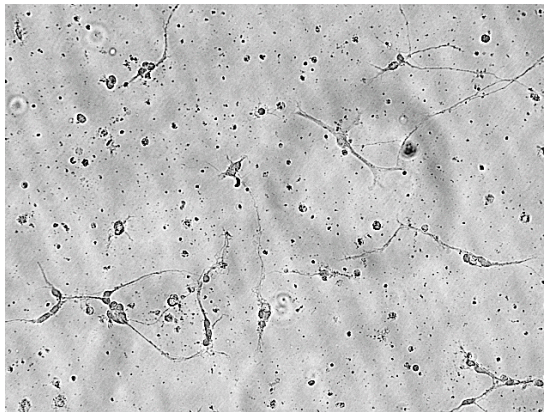
C) MMP9-hemmer 1 nM



D) MMP9- hemmer 10 nM



E) MMP9- hemmer 100 nM



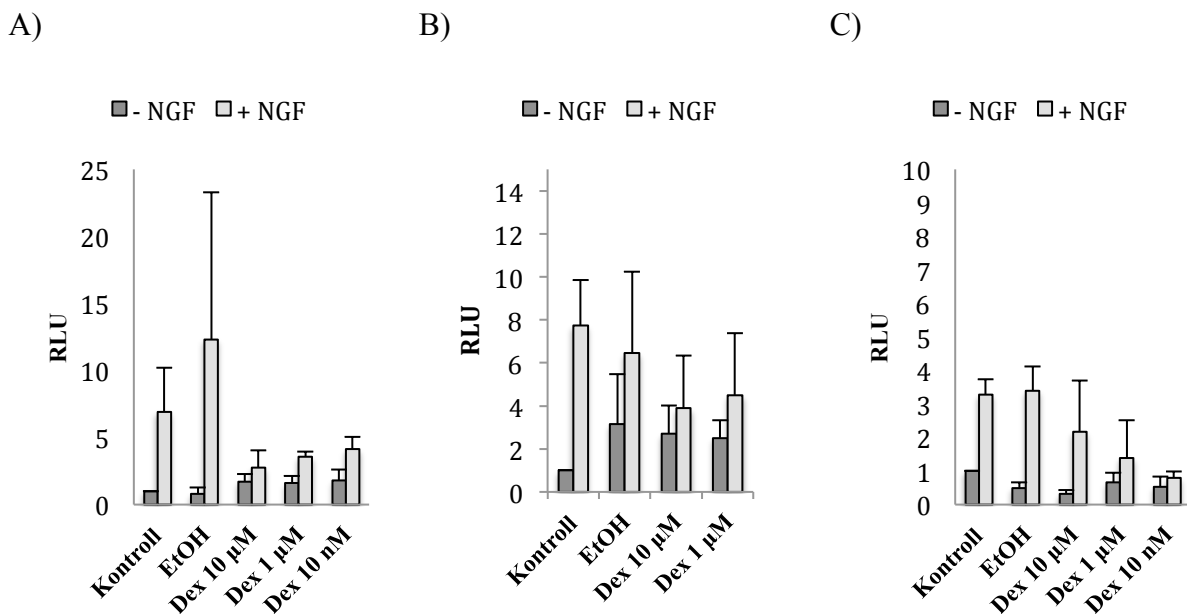
Figur 3.19 Effekt av MMP-9-antagonist på kornceller fra lillehjerne hos kylling. Kyllingkornceller ble eksponert for MMP9-hemmer 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 48 timer etter eksponering. A) Ubehandlede celler. B) Celler eksponert for 1 % DMSO. C) Celler eksponert for MMP-9-antagonist 1 nM. D) Celler eksponert for MMP-9-antagonist 10 nM. E) Celler eksponert for MMP9-antagonist 100 nM. n=1. Dette var et pilotforsøk og ble kun utført én gang. Datamateriale er felles med masterstudent Kjersti Jenssen Daling.

3.8 Renillaluciferaseaktivitet i PC12-celler

Resultatene viste seg å variere en del under måling av renillaluciferase. Variasjonen var også stor etter at luciferaseverdiene ble korrigert med verdier fra renillaluciferase. Det var derfor interessant å undersøke om behandling eller om valg av renillaplasmid hadde en betydning for resultatene.

3.8.1 Påvirkning av kotransfeksjon og behandling på enzymaktiviteten til renillaluciferase.

NGF viste seg å gi økte renillaverdier hos PC12-celler kotransfektet med MMP-9-plasmid (figur 3.20 A), p53- plasmid (figur 3.20 B) og GCS- plasmid (3.20 C). Dette gjaldt både celler eksponert for NGF alene, og i kombinasjoner med etanol eller deksametason.

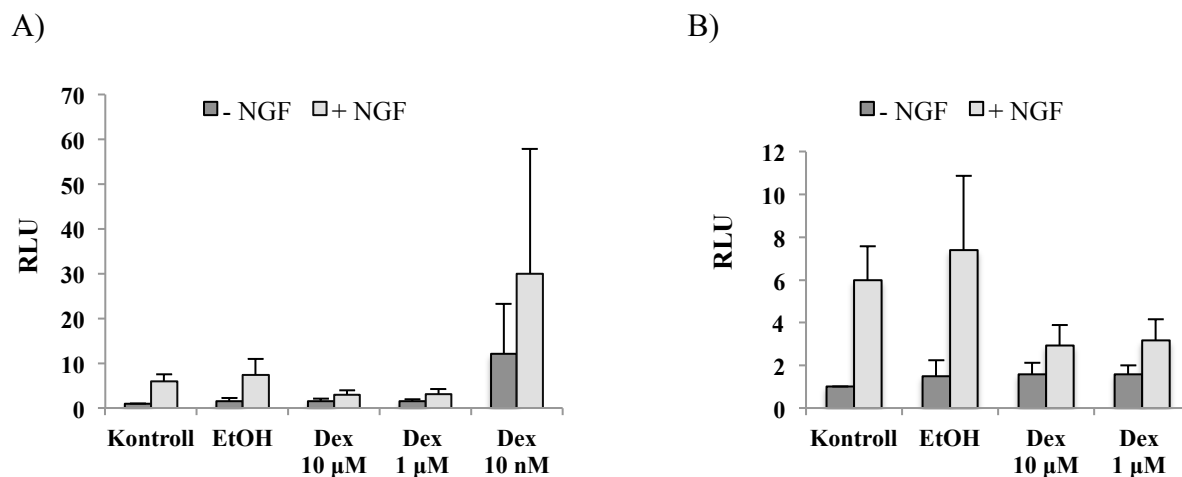


Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.20 A-C:

| Eksponering | Renilla MMP9 | | Renilla p53 | | Renilla GCS | |
|---|--------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | | SE | | SE | | SE |
| Kontroll | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| NGF 50 ng/ml | 6,911 | 0,505 | 7,734 | 2,134 | 3,728 | 0,170 |
| Etanol 1 ‰ | 0,791 | 10,977 | 3,151 | 2,314 | 0,500 | 0,729 |
| Etanol 1 ‰ + NGF 50 ng/ml | 12,31 | 3,131 | 6,462 | 3,786 | 3,388 | 0,467 |
| Deksametason 10 µM | 1,716 | 0,553 | 2,693 | 1,334 | 0,318 | 0,108 |
| Deksametason 10 µM + NGF 50ng/ml | 2,755 | 1,297 | 3,888 | 2,444 | 2,169 | 1,535 |
| Deksametason 1 µM | 1,592 | 0,533 | 2,513 | 0,829 | 0,667 | 0,280 |
| Deksametason 1 µM + NGF 50 ng/ml | 3,568 | 0,386 | 4,509 | 2,883 | 1,387 | 1,12 |
| Deksametason 10 nM | 1,808 | 0,810 | 44,95* | 89,75 # | 0,536 | 0,290 |
| Deksametason 10 nM + NGF 50 ng | 4,121 | 0,936 | 112,5* | 225,03 # | 0,792 | 0,120 |

* Ikke vist i figur pga svært store variasjoner. # avvik som "range"

Det ble også forsøkt å slå sammen renillaverdier for alle MMP-9, p53- og GCS-forsøkene (figur 3.21). Her viste resultatene enda klarere NGF sin effekt på aktivitet av renilla-luciferase.



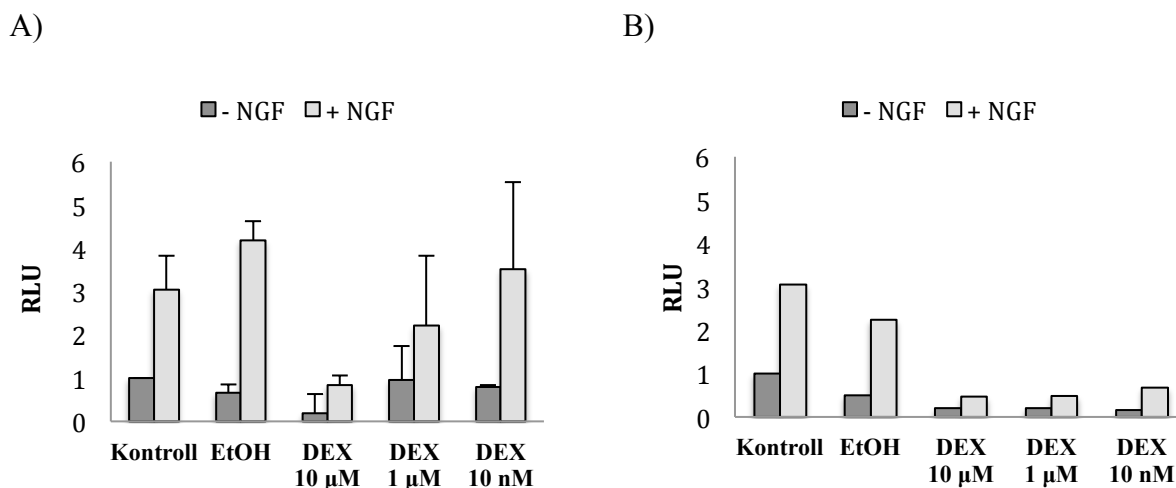
Figur 3.21 A-B: NGF ser ut til å påvirke renilla-luciferase. PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating. Etter transfeksjon i 4 timer ble cellene eksponert og luciferaseaktivitet ble målt etter ytterligere 48 timer. Figurene viser både rl-tk og rl-cmv. Figurene viser renillaverdier når alle forsøkene med MMP-9, p53 og GCS er slått sammen. Verdiene er normalisert til ubehandlede celler. A) Alle konsentrasjoner med deksametason med/uten NGF. B) Kun to konsentrasjoner av deksametason (10 µM og 1 µM) med/uten NGF. Kontroll er ubehandlede transfekterte celler og celler eksponert for NGF. n=8-9

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.21 A-B:

| | GCS | GCS | GCS | MMP9 | MMP9 | MMP9 | p53 | p53 | p53 | SE |
|-----------------------------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|
| Kontroll | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| NGF 50 ng/ml | 2,38 | 3,95 | 3,51 | 12,88 | 6,42 | 1,43 | 0,77 | 13,79 | 8,64 | 1,61 |
| Etanol 1 % | 0,82 | 0,43 | 0,25 | 1,73 | 0,01 | 0,64 | 1,12 | 7,42 | 0,92 | 0,76 |
| Etanol 1 % + | 4,51 | 3,64 | 2,02 | 34,22 | 0,15 | 2,56 | 3,97 | 11,09 | 4,33 | 3,50 |
| NGF 50 ng/ml | | | | | | | | | | |
| Deksametason 10 µM | 0,53 | 0,23 | 0,19 | 1,53 | 0,86 | 2,75 | 1,18 | 5,35 | 5,54 | 0,54 |
| Deksametason 10 µM + | 5,20 | 1,08 | 0,23 | 1,92 | 1,05 | 5,30 | 1,86 | 8,75 | 1,05 | 0,95 |
| NGF 50ng/ml | | | | | | | | | | |
| Deksametason 1 µM | 1,13 | 0,71 | 0,16 | 2,14 | 0,52 | 2,11 | 1,68 | 4,17 | 1,68 | 0,40 |
| Deksametason 1 µM + | 3,63 | 0,42 | 0,11 | 3,90 | 2,80 | 4,01 | 3,18 | 10,03 | 0,31 | 1,01 |
| NGF 50 ng/ml | | | | | | | | | | |
| Deksametason 10 nM | 0,16 | 1,11 | 0,34 | 0,41 | 1,79 | 3,22 | 0,08 | 89,82 | | 11,1 |
| Deksametason 10 nM + | 0,63 | 1,18 | 0,57 | 5,11 | 2,25 | 5,00 | 0,05 | 225,0 | | 27,9 |
| NGF 50 ng | | | | | | | | | | |

3.8.2 Forskjeller mellom rl-CMV og rl-tk

Ved transfeksjon med GCS-plasmid ble det testet ut kotransfeksjon med tk-renilla i tillegg til CMV-renilla. Resultatene tydet på at det var store forskjeller mellom plasmidene renilla-CMV og renilla- tk (figur 3.22). Men det var også store forskjeller mellom de to forsøkene der renilla- CMV ble benyttet (figur ikke vist).



Figur 3.22 Det ser ut til å være store variasjoner mellom rl-CMV og rl-tk. PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating. Etter transfeksjon i 4 timer ble cellene eksponert og luciferaseaktivitet ble målt etter ytterligere 48 timer. A) 2 forsøk med CMV. B) 1 forsøk med tk. Figurene viser gjennomsnittlige verdier normalisert til ubehandlet. Kontroll er ubehandlede transfekterte celler og celler eksponert for NGF.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.22:

| Eksponering | rl-CMV | rl-CMV | rl-tk | SE CMV |
|---|--------|--------|-------|--------|
| | 1.gang | 2.gang | | |
| Kontroll | 1 | 1 | 1 | 0 |
| NGF 50 ng/ml | 2,379 | 3,948 | 3,040 | 0,784 |
| Etanol 1 ‰ | 0,824 | 0,431 | 0,492 | 0,196 |
| Etanol 1 ‰ + NGF 50 ng/ml | 4,508 | 3,636 | 2,234 | 0,436 |
| Deksametason 10 µM | 0,159 | 0,232 | 0,202 | 0,037 |
| Deksametason 10 µM + NGF 50ng/ml | 0,630 | 1,081 | 0,472 | 0,225 |
| Deksametason 1 µM | 1,127 | 0,711 | 0,206 | 0,208 |
| Deksametason 1 µM + NGF 50 ng/ml | 3,627 | 0,422 | 0,495 | 1,602 |
| Deksametason 10 nM | 0,533 | 1,105 | 0,160 | 0,286 |
| Deksametason 10 nM + NGF 50 ng | 5,199 | 1,182 | 0,690 | 2,009 |

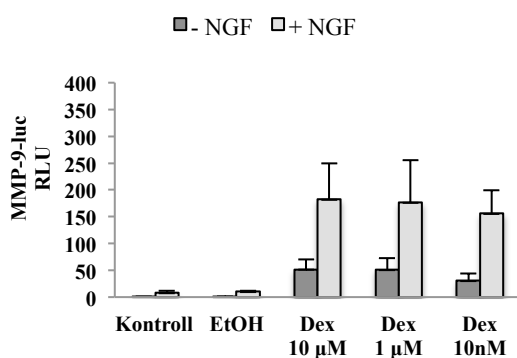
3.9 Effekt av deksametason på MMP-9-luc, p53-luc og GCS-luc i PC12-celler

PC12-celler ble transfektert med enten MMP9-luc-plasmid, p53-luc- plasmid eller GCS-luc-plasmid. Videre ble cellene eksponert for deksametason med og uten NGF for å se om disse behandlingene kunne endre transkripsjonen av proteinene. Deksametason ble undersøkt i tre konsentrasjoner; 10 nM, 1 μ M og 10 μ M. NGF-eksponerte celler viste seg å øke renilla-aktivitet hos celler transfektert med både CMV-promotor og tk-promotor (figur 3.20-3.22). Det var også en del variasjoner i resultatene, derfor er resultater fra luciferaseassay vist både med og uten renillakorrigeringsfaktor. Det ble gjort statistiske analyser for å se etter signifikante forskjeller, men ingen av behandlingene viste dette på grunn av store variasjoner. Alle y-akser er angitt i RLU (relativ luminescensenhet).

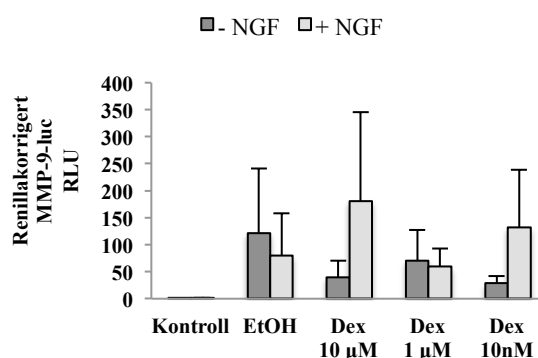
3.9.1 Effekt av deksametason på promotoraktivitet av MMP-9

Celler eksponert for deksametason både med og uten NGF gav en tendens til økning i aktivitet av MMP-9-luc sammenlignet med ubehandlede, transfekterte PC12-celler (figur 3.23 A). Dette gjaldt alle konsentrasjonene av deksametason. Denne økningen var også tilstede etter at luciferaseverdiene ble korrigert med renillaverdier (figur 3.23 B), men her kom det i tillegg også fram en effekt hos cellene eksponert for etanol.

A)



B)



Figur 3.23 Deksametason ser ut til å øke aktivitet av MMP-9-promotor. PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating. Etter transfeksjon i 4 timer ble cellene eksponert og luciferaseaktivitet ble målt etter ytterligere 48 timer. Kontroll er ubehandlede, transfekterte celler og NGF-eksponerte celler. Figur A viser gjennomsnittlig ildfluoluciferaseaktivitet. Figur B viser gjennomsnittlig ildfluoluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet. n=3. Verdier er normalisert til ubehandlet. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.23 A:

| Eksposering | Gjennomsnittlig ildfluoluciferaseaktivitet | SE | Antall forsøk |
|-----------------------------------|--|-------|---------------|
| Kontroll | 1 | 0,00 | 3 |
| NGF 50 ng/ml | 8,268 | 0,30 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 1,238 | 2,31 | 3 |
| Etanol 1 ‰ + NGF 50 ng/ml | 10,06 | 3,32 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 51,63 | 18,81 | 3 |
| Deksametason 10 µM + NGF 50 ng/ml | 182,5 | 67,35 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 51,33 | 21,61 | 3 |
| Deksametason 1 µM + NGF 50 ng/ml | 176,8 | 78,26 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 30,91 | 12,82 | 3 |
| Deksametason 10 nM + NGF 50 ng/ml | 156,1 | 43,11 | 3 |

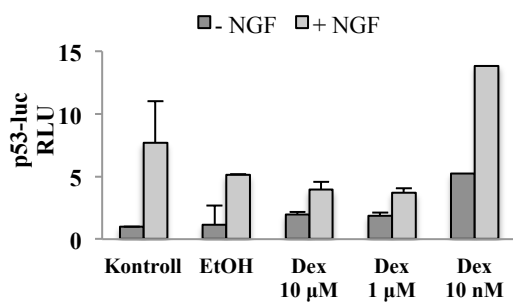
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.23 B:

| Eksponering | Gjennomsnittlig renillakorrigert ildflueluciferase-aktivitet | SE | Antall forsøk |
|--|---|-----------|----------------------|
| Kontroll | 1 | 0 | 3 |
| NGF 50 ng/ml | 1,493 | 0,438 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 121,1 | 78,59 | 3 |
| Etanol 1 ‰ + NGF 50 ng/ml | 79,96 | 119,7 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 39,75 | 30,86 | 3 |
| Deksametason 10 µM + NGF 50 ng/ml | 181,0 | 164,6 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 70,66 | 56,59 | 3 |
| Deksametason 1 µM + NGF 50 ng/ml | 59,15 | 34,16 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 28,68 | 13,15 | 3 |
| Deksametason 10 nM + NGF 50 ng/ml | 131,8 | 107,1 | 3 |

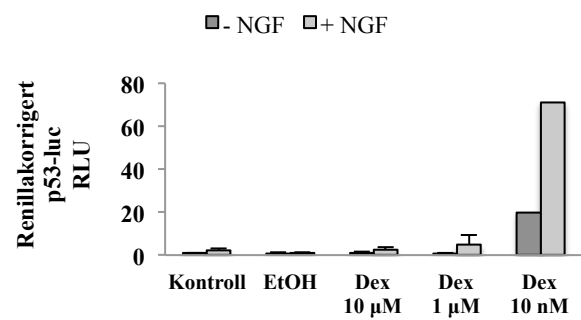
3.9.2 Effekt av deksametason på p53-nivåer målt ved p53-luc

Celler eksponert for NGF gav en tendens i økning av p53-luc. Dette gjaldt både celler eksponert for NGF alene og i de tilfellene celler ble eksponert for NGF i kombinasjon med enten etanol eller deksametason (figur 3.24). Deksametason i konsentrasjonen 10 nM ble kun utført to ganger pga mangel på p53-plasmid. Resultater fra deksametason 10 nM viste store variasjoner, så denne konsentrasjonen er utelatt i figur 3.24 C og D. Deksametason i konsentrasjonene 10 nM og 1 µM så ut til å øke renillakorrigerte luciferaseverdier, men da kun i kombinasjon med NGF.

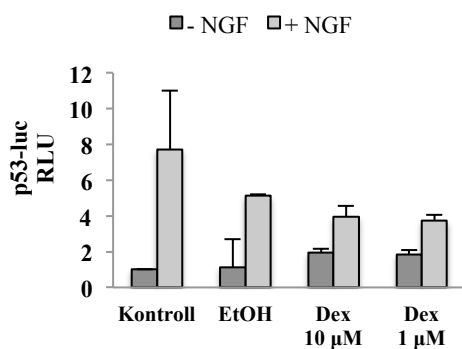
A)



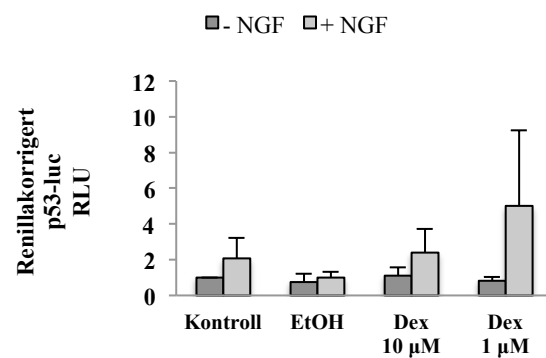
B)



C)



D)



Figur 3.24 Effekt av deksametason på p53-luc hos PC12-celler. PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating. Etter transfeksjon i 4 timer ble cellene eksponert og luciferaseaktivitet ble målt etter ytterligere 48 timer. Kontroll er ubehandlede, transfekterte celler og NGF-eksponerte celler. A) Gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet. B) Gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet. C) Gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet, uten deksametason 10 nM med/uten NGF. D) Gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet, uten deksametason 10 nM med/uten NGF. n=2-3. Verdier er normalisert til ubehandlet. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.24 A/C:

| Eksposering | Gjennomsnittlig ildflueluciferase- aktivitet | SE | Antall forsøk |
|--|---|---------------|--------------------------|
| Kontroll | 1 | 0 | 3 |
| NGF 50 ng/ml | 7,699 | 3,298 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 1,139 | 1,563 | 3 |
| Etanol 1 ‰ + NGF 50 ng/ml | 5,124 | 0,086 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 1,954 | 0,224 | 3 |
| Deksametason 10 µM + NGF 50ng/ml | 3,961 | 0,598 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 1,846 | 0,257 | 3 |
| Deksametason 1 µM + NGF 50 ng/ml | 3,727 | 0,341 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 5,224 | 3,76 "range" | 2 |
| Deksametason 10 nM + NGF 50 ng/ml | 13,84 | 12,45 "range" | 2 |

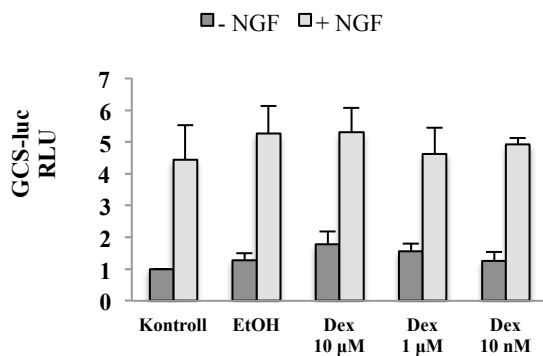
Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.24 B/D:

| Eksposering | Gjennomsnittlig renillakorrigert ildflueluciferase- aktivitet | SE | Anta ll forsø k |
|--|--|----------------|------------------------------------|
| Kontroll | 1 | 0 | 3 |
| NGF 50 ng/ml | 2,086 | 1,118 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 0,755 | 0,455 | 3 |
| Etanol 1 ‰ + NGF 50 ng/ml | 1,015 | 0,291 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 1,111 | 0,460 | 3 |
| Deksametason 10 µM + NGF 50ng/ml | 2,409 | 1,298 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 0,835 | 0,188 | 3 |
| Deksametason 1 µM + NGF 50 ng/ml | 4,996 | 4,238 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 19,78 | 39,41 "range" | 2 |
| Deksametason 10 nM + NGF 50 ng/ml | 71,14 | 142,13 "range" | 2 |

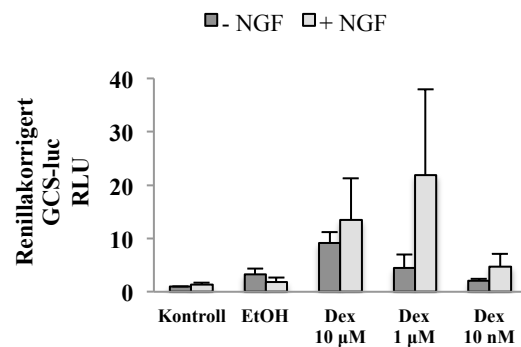
3.9.3 Effekt av deksametason på promotoraktivitet av GCS

NGF gav en økning i aktivitet av GCS-luc, både alene og gitt sammen med etanol eller deksametason (figur 3.25 A). Celler eksponert for deksametason gav en tendens til økning i renillakorrigerede luciferaseverdier sammenlignet med ubehandlede celler. Dette gjaldt hovedsakelig konsentrasjonene 1 μM og 10 μM , både med og uten NGF (figur 3.25 B).

A)



B)



Figur 3.25 Deksametason ser ut til å øke aktivitet av GCS-promotor. PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating. Etter transfeksjon i 4 timer ble cellene eksponert og luciferaseaktivitet ble målt etter ytterligere 48 timer. Kontroll er ubehandlede, transfekterte celler og NGF-eksponerte celler. A) Gjennomsnittlig ildfluorluciferaseaktivitet. B) Gjennomsnittlig ildfluorluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet. $n=3$. Verdier er normalisert til ubehandlet. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.25 A:

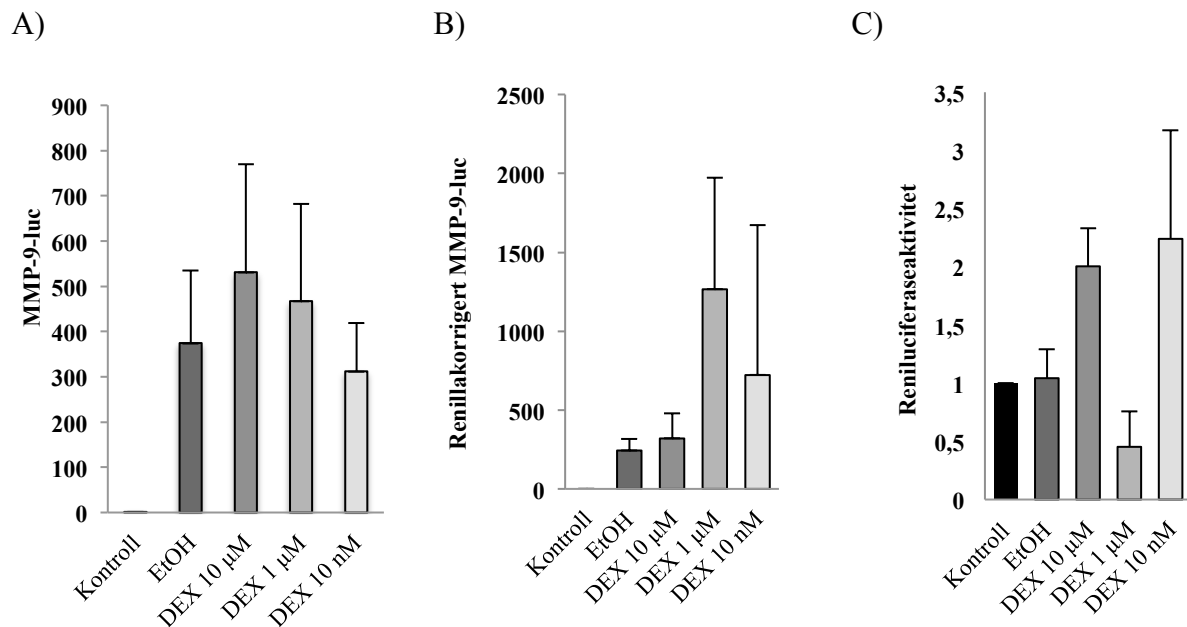
| Eksposering | Gjennomsnittlig ildflueluciferase- aktivitet | SE | Antall forsøk |
|--|---|-----------|--------------------------|
| Kontroll | 1 | 0 | 3 |
| NGF 50 ng/ml | 4,433 | 1,097 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 1,278 | 0,221 | 3 |
| Etanol 1 ‰ + NGF 50 ng/ml | 5,274 | 0,855 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 1,779 | 0,395 | 3 |
| Deksametason 10 µM + NGF 50ng/ml | 5,308 | 0,754 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 1,554 | 0,237 | 3 |
| Deksametason 1 µM + NGF 50 ng/ml | 4,630 | 0,806 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 1,265 | 0,280 | 3 |
| Deksametason 10 nM + NGF 50 ng/ml | 4,913 | 0,206 | 3 |

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.25 B:

| Eksposering | Gjennomsnittlig renillakorrigert ildflueluciferase- aktivitet | SE | Antall forsøk |
|--|--|-----------|--------------------------|
| Kontroll | 1 | 0 | 3 |
| NGF 50 ng/ml | 1,369 | 0,276 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 3,293 | 1,085 | 3 |
| Etanol 1 ‰ + NGF 50 ng/ml | 1,878 | 0,753 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 9,190 | 1,964 | 3 |
| Deksametason 10 µM + NGF 50ng/ml | 13,41 | 7,798 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 4,408 | 2,554 | 3 |
| Deksametason 1 µM + NGF 50 ng/ml | 21,81 | 16,13 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 2,068 | 0,402 | 3 |
| Deksametason 10 nM + NGF 50 ng/ml | 4,759 | 2,391 | 3 |

3.10 Effekt av deksametason på promotoraktivitet av MMP-9 i kyllingkornceller

Kyllingkornceller ble transfektert med MMP-9-plasmid og senere eksponert for deksametason i tre konsentrasjoner; 10 nM, 1 μ M og 10 μ M. Forsøket ble gjort for å undersøke om resultatene sett i PC12 kunne reproduseres i primærnevronkulturer. Ubehandlete, transfekterte celler ble brukt som kontroll i tillegg til celler eksponert for etanol, ettersom deksametason var løst i dette. Celler eksponert for deksametason gav en tendens til økning i aktivitet av MMP-9-luc sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.26 A). Dette gjaldt alle konsentrasjonene av deksametason. Denne økningen var også tilstede etter renillakorrigering (figur 3.26 B), men da høyest ved deksametason 10 nM og 1 μ M. Etanol gav også en tendens til økning i luciferaseaktivitet, både før og etter luciferaseverdiene var korrigert med renillaresultatene.



Figur 3.26 Deksametason ser ut til å øke promotoraktivitet av MMP-9 i kyllingkornceller. Kyllingkornceller ble transfektert 24 timer etter utplating. Etter transfeksjon i 4 timer ble cellene eksponert og luciferaseaktivitet ble målt etter ytterligere 48 timer. Kontroll er ubehandlede celler. A) Gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet. B) Gjennomsnittlig ildflueluciferaseaktivitet delt på renillaluciferaseaktivitet. C) Renillaluciferaseverdier. n=2-3. Verdier er normalisert til ubehandlet. Alle verdiene er hentet fra uavhengige forsøk.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.26 A:

| Eksponering | Gjennomsnittlig ildflueluciferase- aktivitet | SE | Antall forsøk |
|---------------------------|---|-----------|--------------------------|
| Kontroll | 1 | 0 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 374,45 | 160,23 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 531,08 | 237,85 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 467,15 | 215,04 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 312,01 | 107,29 | 3 |

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.26 B:

| Eksponering | Gjennomsnittlig renillakorrigert ildflueluciferase- aktivitet | SE | Antall forsøk |
|---------------------------|--|-----------|--------------------------|
| Kontroll | 1 | 0 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 243,48 | 72,61 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 319,84 | 159,03 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 1265,6 | 706,15 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 721,68 | 949,46 | 3 |

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.26 C:

| Eksponering | Gjennomsnittlig renillaluciferase- aktivitet | SE | Antall forsøk |
|---------------------------|---|-----------|--------------------------|
| Kontroll | 1 | 0 | 3 |
| Etanol 1 ‰ | 1,04 | 0,25 | 3 |
| Deksametason 10 µM | 2,00 | 0,36 | 3 |
| Deksametason 1 µM | 0,45 | 0,31 | 3 |
| Deksametason 10 nM | 2,24 | 0,93 | 3 |

3.11 Proteinnivåer av MMP-9 målt ved westernblotting

Under luciferaseassay ble det økte nivåer av MMP-9-promotoraktivitet hos PC12-celler eksponert for deksametason sammenlignet med ubehandlet (figur 3.23). Det var ønskelig å se om resultatene fra denne undersøkelsen kunne gi økte proteinmengder av MMP-9 ved bruk av westernblotting. Det ble utført tre uavhengige forsøk. Det ble tilsatt antistoff mot MMP-9 og lamin A/C, der lamin A/C var intern kontroll.

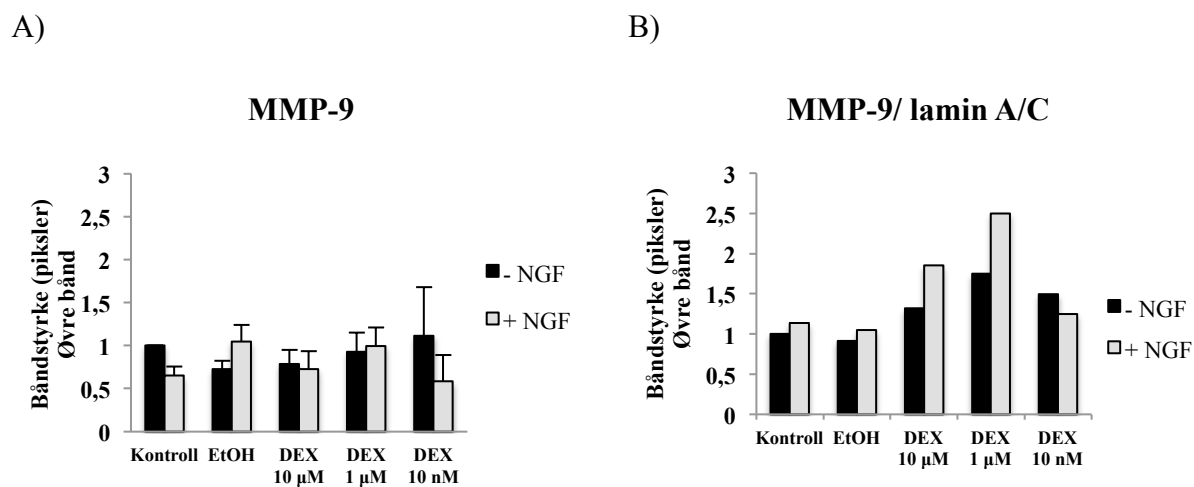
3.11.1 Proteinbånd for MMP9 i PC12-celler eksponert for deksametason

Westernblotting med prøver fra PC12-celler gav spesifikke og tydelige bånd ved bruk av antistoff mot lamin A/C. Antistoff mot MMP-9 gav tydelige bånd, to tettliggende ved ca 130 kDa og to ved 80-100 kDa (figur 3.27). Båndene ved 80-100 kDa var å se på alle membranene, men ved 130 kDa kunne det noen ganger se ut som det kun var et bånd. Flere bånd kan tyde på pro-former, komplekser eller metabolitter av MMP-9. Proteinuttrykket av MMP-9 så ut til å være noe økt hos celler eksponert for deksametason, dette gjaldt hovedsakelig øvre bånd (figur 3.28).



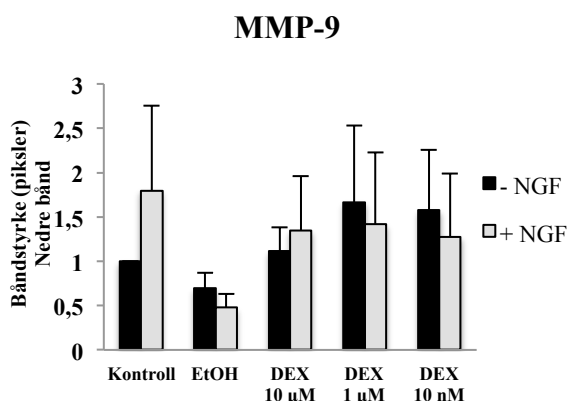
| Eksponering | EtOH | EtOH + NGF | Kontroll | NGF | DEX 10 µM | DEX 10 µM + NGF | DEX 1 µM | DEX 1 µM + NGF | DEX 10 nM | DEX 10 nM + NGF |
|-------------|------|------------|----------|-----|-----------|-----------------|----------|----------------|-----------|-----------------|
| | | | | | | | | | | |

Figur 3.27 Westernblotting av MMP-9 fra PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF, 1 % etanol, 10 µM deksametason, 1 µM deksametason og 10 nM deksametason i 24 timer etter utsplitting. Cellene ble høstet 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Figuren viser proteinbånd for lamin A/C (intern standard) og MMP-9. EtOH og EtOH + NGF er hentet fra en annen membran.

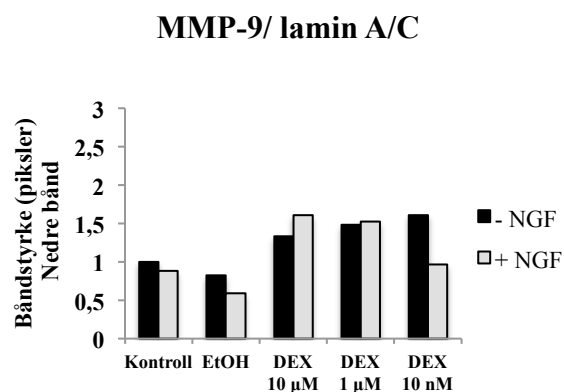


Figur 3.28 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til MMP-9 for øvre bånd. PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF, 1 % etanol, 10 µM deksametason, 1 µM deksametason og 10 nM deksametason i 24 timer etter utsplitting. Cellene ble høstet 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. A) Båndstyrke til det øvre proteinbåndet til MMP-9 etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler med spredning n=2-3 B) Forholdet mellom båndstyrken til MMP-9 øvre bånd og intern kontroll (lamin A/C) etter at bakgrunnen er trykket fra, målt i piksler med spredning. n=1.

A)



B)



Figur 3.29 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke til MMP9 for nedre bånd. PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF, 1 % etanol, 10 µM deksametason, 1 µM deksametason og 10 nM deksametason i 24 timer etter utsplitting. Cellene ble høstet 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. A) Båndstyrke til det nedre proteinbåndet til MMP-9 etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i pikslar med spredning n=3 B) Forholdet mellom båndstyrken til MMP-9 nedre bånd og intern kontroll (lamin A/C) etter at bakgrunnen er trykket fra, målt i pikslar med spredning. n=1.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.28 A og 3.29 A

| Eksponering | Gjennomsnitt | Spredning | Gjennomsnitt | Spredning | Antall forsøk |
|-----------------|--------------|-----------|--------------|-----------|---------------|
| | Øvre MMP-9 | | Nedre bånd | | |
| Kontroll | 1 | 0,000 | 1,000 | 0,000 | 3 |
| EtOH | 0,725 | 0,098 | 0,698 | 0,169 | 4 |
| EtOH + NGF | 1,047 | 0,194 | 0,480 | 0,153 | 4 |
| NGF 50 ng/ml | 0,652 | 0,104 | 1,795 | 0,963 | 3 |
| DEX 10 µM | 0,787 | 0,163 | 1,116 | 0,271 | 4 |
| DEX 10 µM + NGF | 0,729 | 0,207 | 1,343 | 0,620 | 4 |
| DEX 1 µM | 0,931 | 0,219 | 1,667 | 1,552* | 2-3 |
| DEX 1 µM + NGF | 0,997 | 0,214 | 1,416 | 1,997* | 2-3 |
| DEX 10 nM | 1,112 | 0,565 | 1,576 | 0,999* | 2-3 |
| DEX 10 nM + NGF | 0,585 | 0,303 | 1,275 | 0,708* | 2-3 |

* Spredning som "range".

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.28 B og 3.29 B

| Eksponering | Gjennomsnitt Øvre MMP-9 | Gjennomsnitt Nedre bånd | Antall forsøk |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| Kontroll | 1 | 1 | 1 |
| EtOH | 1,134 | 0,883 | 1 |
| EtOH + NGF | 0,916 | 0,820 | 1 |
| NGF 50 ng/ml | 1,045 | 0,588 | 1 |
| DEX 10 µM | 1,316 | 1,330 | 1 |
| DEX 10 µM + NGF | 1,851 | 1,607 | 1 |
| DEX 1 µM | 1,746 | 1,483 | 1 |
| DEX 1 µM + NGF | 2,499 | 1,527 | 1 |
| DEX 10 nM | 1,493 | 1,611 | 1 |
| DEX 10 nM + NGF | 1,249 | 0,967 | 1 |

4 DISKUSJON

4.1 Diskusjon av metoder

4.1.1 Valg av cellemodeller

Legemidler er kjent for å kunne påvirke kritiske prosesser under utviklingen av nervesystemet, inkludert proliferasjon, migrasjon, differensiering, apoptose, myelinering og dannelse av synapser (Bal-Price, Coecke et al. 2012). Til tross for at pre- og postnatal behandling med glukokortikoider er vist å øke lungemodning og forhindre komplikasjoner, er det imidlertid oppstått bekymring knyttet til denne behandlingen da den kan være assosiert med uheldige effekter på hjerneutvikling og nevro-motorfunksjoner (Bolt, Van Weissenbruch et al. 2001). Det bør nevnes at det er andre sykdommer og komplikasjoner knyttet til premature barn, og det kan være vanskelig å skape et klart årsak-effekt-forhold mellom glukokortikoideffekter og uønskede effekter. Dyrestudier av glukokortikoideffekter på hjerneutvikling kan derfor skille glukokortikoideffekter fra andre uønskede effekter til en viss grad (Jameson, Seidler et al. 2005).

In vitro-modeller kan ikke etterligne hele kompleksiteten av hjerneutvikling *in vivo*, men de er et nyttig verktøy for å studere én eller flere av prosessene involvert i utviklingen av nervesystemet (Bal-Price, Coecke et al. 2012). For å studere effekter av deksametason på nevruttvekst ble det i denne oppgaven benyttet PC12-celler og kornceller fra lillehjerne hos kylling.

PC12-celler

PC12-celler er en *in vitro*-modell som stammer fra et feokromocytom hos rotte og er omfattende karakterisert (Bal-Price, Coecke et al. 2012). Fordeler med å benytte seg av en cellelinje som *in vitro*-modell er mange. De utgjør en homogen populasjon av celler, de er enkle å skaffe og kan lagres på ubestemt tid i flytende nitrogen. De er relativt enkle å holde i vekst, de deler seg raskt og kan kontinuerlig splittes for å skape mange celler på kort tid (Banker and Goslin 1998, Radio and Mundy 2008). PC12-celler uttrykker NGF-reseptorene TrkA og p75NTR (Rossner, Ueberham et al. 1998) og har enzymapparatet til å syntetisere katekolaminene dopamin og noradrenalin i tillegg til acetylcholin (Fujita, Lazarovici et al.

1989). Resultater fra en tidligere masteroppgave har vist at PC12-celler uttrykker GR endogent, og at det endogene GR-uttrykket øker når cellene differensieres med NGF (Nguyen 2011). PC12-celler har også i andre studier vist seg å være godt egnet til å studere mekanismer som ligger til grunn for effekter av deksametason på nevronal cellereplikasjon og differensiering (Jameson, Seidler et al. 2005). Dette gjør PC12-celler egnet som modell for å studere effekter av NGF og deksametason.

Ulemper med å benytte PC12-celler som modell for å studere nevrutvekst, er at disse cellene er kreftceller, og er forskjellige fra nevroner. Selv om cellelinjer kan vise mange av de samme karakteristika som nevroner, representerer de sjelden spesifikke subpopulasjoner av nevroner. Her er PC12-cellelinjen et godt eksempel ettersom PC12-celler ikke har evne til å skape definerte aksoner og dendritter til tross for omfattende nevrutvekst, og de danner ikke fullstendige synapser med hverandre (Das, Freudrich et al. 2004, Radio and Mundy 2008). Det kan også oppstå endringer i genmateriale etter repeterte cellepassasjer med samtidig endring i fenotype (Das, Freudrich et al. 2004).

Kyllingkornceller

Kornceller fra lillehjerne hos kylling ble også benyttet som cellemodell. Primære nevronale cellekulturer består av celler som kommer fra vev i nervesystemet, derfor har slike celler mange av de morfologiske, nevrokjemiske og elektrofysiske egenskapene til nevroner (Radio and Mundy 2008). Til tross for artsforskjeller er denne modellen mer lik nevroner *in vivo*. Bruk av kyllingembryo representerer en praktisk og kostnadseffektiv dyremodell som ikke krever dyrestall. Modningen av et kyllingembryo krever kun korrekt temperatur og luftfuktighet under inkubering (Aden 2011). Glukokortikoider er også vist i en studie å kunne hemme proliferasjon og fremme differensiering av kornceller fra lillehjerne hos kylling (Aden, Paulsen et al. 2011). Dette gjør disse cellene egnet til å studere effekter induert av deksametason. Deksametason viste også i samme studie en signifikant effekt på både proliferasjon og apoptose ved embryonal dag 17 hos kyllingkorncellene. Dette tidspunktet kan sammenlignes med lillehjernens utvikling i slutten av andre trimester/begynnelsen av tredje trimester hos et humant svangerskap, den tiden der premature behandles med glukokortikoider (Aden, Paulsen et al. 2011). Fordelen med å kunne bruke forskjellige cellemodeller er at man kan sammenligne resultater. Dersom resultater viser seg å være de samme i flere modeller, kan dette bidra til å styrke resultatene og skape en sterkere korrelasjon til mennesker.

4.1.2 Morfometrisk analyse i mikroskop

De endepunktene som er best studert i de ulike *in vitro*-modellene er celleproliferasjon og nevruttvekst (Bal-Price, Coecke et al. 2012). Både i cellelinjer og primærkulturer fra lillehjerne har nevruttvekst vist seg å være et mer sensitivt endepunkt enn cellenes levedyktighet (Radio, Freudenrich et al. 2010). Derfor ble også fokuset lagt på nevruttvekst i denne oppgaven. Etter hvert som cellen modner vil disse øke i lengde og kompleksitet. I noen *in vitro*-modeller vil nevroner bli ”polarisert” ved å utvikle et langt akson og flere kortere dendritter (Radio and Mundy 2008).

Valg av morfometriske endepunkt ble gjort med utgangspunkt i tidligere masteroppgaver fra denne forskningsgruppen (Bekkevold 2011, Evensen 2013, Rodum 2013), i tillegg til andre studier (Radio and Mundy 2008, Radio, Freudenrich et al. 2010). Endepunktet ”andel knoppeller” ble i tillegg inkludert, ettersom det kunne se ut som celler eksponert for BDNF hadde flere celler i tidlig vekststadium, nærmere bestemt i ”budding”-fase (Se avsnitt 1.3.1). Det kunne også se ut som celler eksponert for NGF gav celler med spydlignende form, så dette endepunktet ble også inkludert. Endepunktet nevruttlengde per celle ble vurdert til å være et mindre robust endepunkt. Hos celler eksponert for NGF ble det observert lange nevrutter i alle elleve forsøk, men kun tre forsøk kunne vise til lange nevrutter hos ubehandlede celler. Nevruittlengde hos ubehandlede celler var også nokså lange, og det var derfor ingen signifikante forskjeller mellom ubehandlede celler og celler eksponert for NGF ved dette endepunktet. Dette kom også frem hos celler eksponert for deksametason. Kun én lang nevrutt ble kvantifisert og målt, og denne ene nevruttlengden kan svekke resultatene når den blir sammenlignet mot andre behandlinger. Andel celler med nevrutter og antall nevrutter per celle ble derfor ansett som mer robuste endepunkt. Morfometriske analyser kan utføres manuelt eller ved hjelp av automatisert programvare. I denne oppgaven ble det benyttet manuell telling og måling av celler og nevrutter. Manuell kvantitativ morfometrisk analyse av nevruttvekst er tidkrevende og stiller store krav til observatør (Radio and Mundy 2008). For å redusere denne usikkerheten ble skålene blindet ved at en medstudent gav skålene randomiserte tall under mikroskopering og kvantifisering. Denne blindingen begrenser seg derimot til behandling og ikke til område på skålen. Et semi-automatisert eller fullautomatisert analyseprogram hadde forenklet datainnsamlingen og fjernet feilkilden knyttet til subjektive vurderinger. Likevel kan det være at automatiserte analyser ikke har samme sensitivitet som manuell måling innehar (Ramm, Alexandrov et al. 2003). Enkelte

automatiserte analysemetoder har hatt problemer med å skille nevritter fra bakgrunnen (Radio and Mundy 2008), og disse analyseprogrammene ser ikke ut til å ta like mye hensyn til korte nevritter.

Kvantifisering av nevritter i korncellekulturer fra lillehjerne hos kylling ble ikke utført. Grunnen til dette var at tidligere masterstudenter ved forskningsgruppen erfarte at slik form for analyse var vanskelig å gjennomføre. Det å skille nevrone celler fra andre celler i en slik ikke-homogen kultur viste seg å være utfordrende (Evensen 2013, Rodum 2013). I stedet ble det utført en kvalitativ analyse ved at bilder ble tatt på tilfeldige plasser. Bildene ble sammenlignet i ettertid basert på mengde nevritter som var i synsfeltet.

4.1.3 Valg av eksponeringer

Deksametason

Valg av glukokortikoid falt på deksametason ettersom dette er et av de legemidlene som benyttes mest i perinatal behandling av premature barn (Grier and Halliday 2005). I tillegg har også deksametason høy selektivitet mot glukokortikoidreseptoren og liten mineralkortikoideffekt (Whitelaw and Thoresen 2000). Hos mennesker er de typiske konsentrasjonsnivåene på omtrent 0,06 μM i fetus etter administrasjon av relativ lav dose på 0,1-0,15 mg/kg når deksametason gis til mor (Jameson, Seidler et al. 2005). Aden et al. benyttet en konsentrasjon på 0,1 μM i eksponering av kyllingkornceller i kultur, og denne konsentrasjonen viste å redusere antall prolifererende celler. Dette ble vist ved å måle uttrykk av prolifererende markør PCNA (Aden, Paulsen et al. 2011). I denne oppgaven ble det derfor benyttet konsentrasjoner både under, i og over det terapeutiske området: 10 nM, 1 μM og 10 μM . Kornceller er trolig mer følsomme enn PC12-celler, og det kan tenkes at de ikke trenger like høye konsentrasjoner for at man skal kunne se en effekt på nevruttvekst. En studie har for eksempel vist at PC12-celler fanger opp effekter på nevruttvekst etter eksponering for ulike xenobiotika i færre tilfeller enn kornceller (Radio, Freudenrich et al. 2010).

BDNF og Trk-antagonister

Tidligere masteroppgaver har vist at BDNF øker nevrittelengde og andel lange nevritter i PC12-celler og konkluderte med at effektene var via TrkB-signalering (Evensen 2013, Rodum 2013). Disse forsøkene ble fulgt opp i denne masteroppgaven, og fokuset falt naturlig på BDNF i starten av forsøkene. Det ble undersøkt om nevruttvekst mediert via NGF og BDNF kunne hemmes av TrkA- og TrkB-antagonister. TrkB-antagonist ble også benyttet framfor antistoff, fordi BDNF-antistoff har tidligere vist seg ikke å fungere helt optimalt, mulig på grunn av kryssbindinger av reseptorene (Evensen 2013, Rodum 2013).

På grunn av store kostnader knyttet til BDNF, ble det undersøkt om en TrkB-agonist (LM22A-4) kunne føre til nevruttvekst i PC12-celler. LM22A-4 er en småmolekylær ligand som er designet til å mimikere loop II- domenet til BDNF og binder selektivt og spesifikt til TrkB- reseptoren. Den fungerer som en partiell agonist og ved fosforylering av TrkB blir det aktivert flere nedstrømssignaler *in vivo* og *in vitro* (Massa, Yang et al. 2010). LM22A-4 kunne ikke vise til nevruttvekst, og det ble derfor konkludert med at PC12-cellene ikke var egnet til å studere TrkB-effekter.

4.1.4 Valg av endepunkt

Proteiner i nevroner og gliaceller har blitt benyttet for å detektere kjemisk-indusert skade hos nevroner under utvikling *in vivo*. Det har blitt foreslått at nevrokjemiske endringer av spesifikke proteiner kan bli benyttet som markører for differensiering *in vitro* (Das, Freudenrich et al. 2004). Utviklingsmarkører ble derfor et fokus i denne oppgaven, deriblant MMP-9 og p53. Mikroskopforsøkene med MMP-9- antagonist i PC12- celler og kyllingkornceller ble utført etter luciferaseassay. Dette var for å se etter en eventuell sammenheng mellom endrede nivåer av MMP-9-luc og funksjonelle endringer i cellen. MMP-9 har i andre studier vist å indusere nevruttvekst induert av NGF i PC12-celler. Tilsvarende har nevruttvekst induert av NGF blitt hemmet et nøytraliserende MMP-9-antistoff (Shubayev and Myers 2004). Diskusjon av MMP-9- resultater er gjennomgått i avsnitt 4.2.4.

Effekter av p53 er også svært nødvendig for utvikling av nervesystemet. Tidligere studier har vist at p53 kan modulere flere molekulære signalveier og potensielt føre til nevronal celledød,

DNA-reparering og differensiering (Miller, Pozniak et al. 2000), En rolle for p53 har også vært sett i overlevelse og stopp av cellesyklus hos PC12-celler mediert via TrkA-reseptoraktivering (Hughes, Gollapudi et al. 2000). Når det gjelder nevrutvekst og p53s involvering viser ulike studier forskjellige resultater, dette kan være på grunn av bruk av forskjellige mutante p53-proteiner og PC12-cellelinjer (Di Giovanni, Knights et al. 2006). I denne oppgaven ble det sett på aktivering av p53-luc etter eksponering for deksametason i PC12-celler, disse resultatene er diskutert i avsnitt 4.2.5.

4.1.5 Luciferaseassay som metode for å undersøke utviklingsmarkører

Transfeksjon med et reporter-gen er en nyttig metode for å undersøke om det dannes protein fra de genpromotorene som studeres. I denne oppgaven ble det benyttet MMP-9-luc og p53-luc i tillegg til GCS-luc som reporter-gen. Aktiviteten av ildflueluciferase ble da målt for å se om behandling av deksametason i ulike konsentrasjoner påvirket aktiviteten av disse reporter-genene i forhold til kontrollskåler. Luciferasen blir dermed et indirekte mål for genekspressjon. Luciferaseassay er også en relativt rask metode, og flere behandlinger utgjør ikke stor tidsforskjell i prøveoppbeidelse og måling av luciferaseaktivitet. Både uendifferensierte PC12-celler og PC12-celler under differensiering med NGF ble eksponert for deksametason, der NGF-eksponerte PC12-celler kan være en modell for nevroner under utvikling. Denne kombinasjonen har heller ikke vært utprøvd tidligere i forskningsgruppen i luciferasebaserte forsøk.

For at man skal kunne sammenligne forskjellige skåler i transfeksjonsforsøk, bør alle skålene ha samme antall transfekterte celler. Dette er ikke mulig å få til i praksis, derfor er det nødvendig å benytte en intern kontroll som kan korrigere for variasjoner i transfeksjonseffektivitet og variasjoner som kan være forårsaket av håndtering av prøvene. Renillaluciferase benyttes ofte som intern kontroll i luciferasebaserte forsøk, og flere plasmider som koder for renillaluciferase under kontroll av konstitutivt aktive promotorer er kommersielt tilgjengelige. Validiteten til renillaluciferase som en intern kontroll er basert på antagelsen at den er konstitutivt uttrykt i transfekterte celler og at uttrykket ikke lar seg påvirke av eksperimentelle faktorer som kan resultere i enten oppregulering eller nedregulering av mengden enzym som blir produsert (Shifera and Hardin 2010). I denne

oppgaven ble det benyttet to ulike plasmider under kontroll av promotorene cmv (cytomegalovirus) eller tk (thymidin kinase). Dette ble gjort for å undersøke om de to promotorene ble påvirket av behandling. Dersom noen faktorer skulle vise seg å hemme det konstitutive uttrykk av renillaluciferase, vil det å benytte slike renillaverdier for normalisering kunne resultere i en falsk økning av normalisert verdi for det eksperimentelle reportergenet. Og likeså hvis eksperimentelle variabler er vist å oppregulere uttrykk av renillaluciferase, kan slike renillaverdier resultere i en falsk nedgang av normalisert verdi.

Et problem som oppsto under arbeidet med denne oppgaven var store variasjoner i aktivitet av renillaluciferasene. Renillaluciferaseaktivitet så ut til å øke hos celler eksponert for NGF. Det ble observert opptil en syvdobling av renillaaktivitet hos celler eksponert for NGF sammenlignet med ubehandlede, transfekterte celler (figur 3.20). Variasjonen til renilla gjaldt kotransfeksjon med alle de tre eksperimentelle plasmidene MMP-9-luc, p53-luc og GCS-luc. Det var derfor nødvendig å kontrollere om det var en forskjell tilstede både med og uten korrigerende med den interne kontrollen. Dette er årsaken til at resultatene ble presentert både renillakorrigert og uten (avsnitt. 3.9). Det var likevel trender som gikk igjen før og etter renillakorrigerende. Ved flere paralleller kunne spredningen gått ned, og effektene muligens kommet tydeligere frem.

I tillegg til renillaluciferase er det også andre tilnæringer man kan benytte for å normalisere luciferaseverdier. Man kan for eksempel benytte et null-plasmid, ”flow cytometrisk” kvantifisering av GFP-uttrykk (Dandekar, Kumar et al. 2005) eller måle total mengde protein.

4.1.6 Analyse av utviklingsmarkører ved bruk av westernblotting

Bruk av nevrokjemiske målinger for differensiering har et potensial til å tilføye data fra morfologiske undersøkelser. Slike metoder kan være radioligandbinding, westernblotting og ELISA (Das, Freudrich et al. 2004). Fordeler med western er at denne metoden gjør det mulig å separere en blanding av proteiner ekstrahert fra celler og identifisere et spesifikt protein av interesse (Liu, Mahmood et al. 2014). I denne oppgaven ble antistoff mot MMP-9 og lamin A/C benyttet, der lamin A/C var intern kontroll. En intern kontroll benyttes for å verifisere at det er påsatt lik mengde protein i hver brønn, og eventuelt for å korrigere for mengde detektert protein. Teoretisk sett er et ideelt protein for intern kontroll et protein som

er uttrykt på et konstant nivå gjennom hele cellesyklus, blant forskjellige celletyper og vev, under alle trinn i utviklingen og som ikke lar seg påvirke av en eksperimentell behandling (Liu and Xu 2006). Lamin er et viktig protein som finnes i kjernen til alle eukaryote celler (Dechat, Adam et al. 2009) og er nødvendig i regulering av cellesyklus, kromatinorganisering, DNA-replikasjon, celledifferensiering og apoptose (Gruenbaum, Wilson et al. 2000). MMP-9- ble benyttet som markør for differensierende nevroner, ettersom studier har vist at MMP-9- uttrykk i nevritter øker ved nevruttvekst (Chambaut - Guérin, Hérigault et al. 2000).

Transkripsjonsaktiviten til MMP-9-promotoren ble målt i luciferaseassay, og effekter på nevruttvekst ble undersøkt ved hjelp av MMP-9-antagonist. Sammenlignet med luciferaseassay der man måler transkripsjonsaktivitet, og mRNA/qPCR der mRNA-nivåer måles, kan westernblot si noe om det faktiske proteinnivået, og om behandling av legemiddel kan endre disse nivåene. Men man kan ikke konkludere med at det er et kausalforhold mellom mengden protein og proteinfunksjon. MMP-9 finnes blant annet både i latent form og aktiv form. I tillegg kontrolleres MMP-aktivitet gjennom interaksjoner til vevshemmere av metalloproteinaser (TIMP). Disse kan binde til det katalytiske setet på MMP-ene og føre til en inaktivering (Yong, Power et al. 2001). Det kan også oppstå lokale proteinendringer i cellene som ikke lar seg detektere med western. I slike tilfeller kan man benytte immunfarging. I denne prosedyren blir celler fiksert og farget med antistoff mot ønsket protein, for eksempel et protein karakteristisk for nevruttvekst. GAP-43 er blant annet et protein som har en mer spesifikk lokalisering i nevritter og har vært foreslått som en mulig indikator for differensering (Das, Freudenrich et al. 2004).

4.2 Diskusjon av biologiske funn

4.2.1 Effekt av NGF og BDNF på nevruttvekst

Eksponering med NGF gav en signifikant økning i andel celler med nevrutter, andel celler med lange nevrutter, antall nevrutter per celle og ”andel spydceller”. I tillegg ble antall celler signifikant redusert hos celler eksponert for NGF sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.1). Ettersom PC12-celler uttrykker p75NTR og TrkA som er reseptorer for NGF (Hartman, McCormack et al. 1992), var denne effekten som forventet. NGF ble benyttet som positiv kontroll i videre forsøk.

BDNF har tidligere i forskningsgruppen vist å kunne øke nevruttlengder sammenlignet med ubehandlede celler (Evensen 2013, Rodum 2013). I denne oppgaven var det derimot ingen signifikante forskjeller i nevruttvekst mellom celler eksponert for BDNF og ubehandlede celler (figur 3.2). Flestparten av de nevronale effektene til BDNF er mediert via binding til TrkB, gjennom ligandindusert dimerisering, fosforylering og aktivering (Kondo, Saruta et al. 2010). Ettersom endepunktene benyttet i denne oppgaven ikke fanget opp noen BDNF-effekter, oppsto det tvil om cellelinjen i det hele tatt uttrykket TrkB-reseptoren. Det ble testet om en TrkB-agonist kunne skape nevruttvekst i større grad enn BDNF, men også her var det ingen signifikante forskjeller sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.10). TrkB-reseptoraktivitet ble derfor ikke bekreftet i denne oppgaven ved bruk av PC12-celler. En avkortet form av TrkB-reseptoren har vært detektert ved hjelp av RT-PCR hos PC12-celler tidligere, men ikke TrkB-FL (full-lengde) (Kondo, Saruta et al. 2010). For å øke en eventuell BDNF-effekt er det mulig å transfektere PC12-celler med TrkB- plasmid, da dette har vist seg tidligere å kunne øke effekten av BDNF på nevruttvekst (Iwasaki, Ishikawa et al. 1997). Ved samtidig kotransfeksjon med grønt fluoriserende protein kan man se om grønne celler utøver forskjellige responser på nevruttvekst etter eksponering for deksametason med/uten vekstfaktor. I tillegg kan man også gjøre et westernblot for å undersøke om bånd kan detekteres ved hjelp av TrkB- antistoff for å konstatere om proteinet er tilstede i cellene. En annen teori er at cellene uttrykker TrkB, men at reseptoren ikke er funksjonell eller at det er defekter i nedstrømssignalering.

4.2.2 Effekt av Trk-antagonister på nevruttvekst i PC12-celler

Det ble utført en morfometrisk analyse av PC12-celler eksponert for Trk-antagonister med og uten nevrotrofinene NGF og BDNF (avsnitt 3.3). Deksametason har tidligere i forskningsgruppen blitt kombinert sammen NGF-differensierte PC12-celler (Nguyen 2011), men ikke i kombinasjon med BDNF. Deksametason har også i andre studier vist seg å kunne påvirke nevruttvekst induert av BDNF (Kumamaru, Numakawa et al. 2008). Derfor var det først og fremst involvering av TrkB i BDNF-indusert nevruttvekst som var fokus, og om deksametason kunne ha evne til å påvirke disse signalveiene. TrkA- reseptorantagonist og NGF ble inkludert for å utelukke eventuelle kryssreaksjoner. TrkA-antagonisten GW441756 i konsentrasjon på 10 μ M i kombinasjon med NGF viste en signifikant reduksjon i andel celler med nevrutter, andel celler med lange nevrutter og andel ”spydceller” sammenlignet med celler eksponert for NGF (figur 3.5). GW441756 hadde ingen effekt på celler eksponert for BDNF (figur 3.6), noe som var forventet ettersom GW 441756 skal være en selektiv TrkA-antagonist ifølge produsenten Tocris Bioscience.

TrkB-antagonisten ANA-12 er i tidligere studier vist å hemme TrkB-signaleringsveien uten å påvirke funksjoner av TrkA- eller TrkC-reseptorene (Cazorla, Prémont et al. 2011). I denne oppgaven viste ANA-12 ingen effekter på nevruttvekst mediert via NGF (figur 3.8) som forventet ettersom ANA-12 er en TrkB-antagonist. Det ble heller ikke sett effekter av ANA-12 på nevruttvekst mediert via BDNF (figur 3.9). Dette var også forventet ettersom BDNF ikke induerte nevruttvekst i utgangspunktet.

4.2.3 Effekt av deksametason på nevruttvekst

Deksametasons effekt på umodne lunger er mediert via glukokortikoidreseptoren. Den låser celler i G₁-G₀-fase av celledeling, og gjør at pneumocytter slutter å dele seg og starter differensiering (Jameson, Seidler et al. 2005). Denne aktiveringen av glukokortikoidreseptoren fører til økt gentranskripsjon og syntese av surfaktantproteiner (Gross 1990). Deksametason påvirker flere trinn i nerveutviklingen, alt fra cellereplikasjon og vekst, tidlig differensiering og nevruttvekst. Dette har blant annet vært vist i en studie utført på PC12-celler i konsentrasjoner under de som benyttes i terapi hos premature barn (Jameson, Seidler et al. 2005).

En tidligere masteroppgave har vist at eksponering av PC12-celler for deksametason ikke hadde noen effekt på antall nevritter, men at det ble en tidsavhengig økning av nevrittelengder (Bekkevold 2011). Disse resultatene ble ikke reproduisert i denne oppgaven. Eksponering med deksametason gav svært få celler med lange nevritter (figur 3.11 C) og var ikke signifikant forskjellig fra ubehandlede celler som ble benyttet som en negativ kontroll. Nevritt lengden var også mindre enn de sett ved ubehandlede celler (figur 3.11 E). Deksametason viste seg derimot å ha effekt på andel celler med nevritter og antall nevritter per celle (figur 3.11 B, D). Dette gjaldt også deksametason i høy dose over korttids-eksponering (figur 3.12 B, D). Effekt av NGF i oppgaven til Bekkevold gav signifikante utslag på mange av de samme parameterne brukt i denne oppgaven, men effektene var mye lavere i denne oppgaven. Bekkevold kunne for eksempel se omtrent 80 % andel celler med nevritter hos NGF-eksponerte, men i tidlige PC12-forsøk i denne oppgaven ble det kun vist en andel på omtrent 30 % (figur 3.1 B) (Bekkevold 2011). Det bør nevnes at da de morfometriske undersøkelsene av MMP-9-antagonist ble utført en god stund senere, var NGF-responsen mye større, og andelen celler med nevritter lå på omtrent 60 % (figur 3.16.1B). Disse variasjonene kan komme av ulike egenskaper ved PC12-cellene. Bekkevold undersøkte også effekter av deksametason i nokså høy konsentrasjon (10 μM) på nevrittutvekst etter 24, 48 og 72 timer (Bekkevold 2011). I de morfologiske undersøkelsene med deksametason i denne oppgaven, ble det benyttet to konsentrasjoner; 1 μM i 24 timer eller 10 μM i 2 timer. Dette var for å se om en langtidseksponering i lavere dose kunne gi forskjellige resultater sammenlignet med en korttidseksponering i høy dose. Under svangerskap benyttes glukokortikoider både akutt og noen ganger over lengre tid, og det kan være interessant å undersøke om en korttidseksponering fører til mindre langtidseffekter sammenlignet med en langtidseksponering. I denne oppgaven hadde derimot konsentrasjon og lengde av eksponering ingen betydning for nevrittutveksten (figur 3.11 og 3.12).

Effekter på nevrittutvekst i PC12-celler eksponert for BDNF i kombinasjon med deksametason var ikke vesentlig forskjellige fra de cellene som kun var eksponert for BDNF, bortsett fra endepunktet andel celler med lange nevritter, der det ble sett en økning (figur 3.13). Andre studier har sett at glukokortikoider påvirker nevrotrofiner og at deksametasons regulering av BDNF kan skje på flere nivåer i BDNF-signaleren. Flere studier har foreslått at glukokortikoider kan endre BDNF-signaleren ved å modulere nedstrømssignaler i MAPK, PLC γ - og PI3K/Akt-signalveiene (Suri and Vaidya 2013). I en studie utført på nevroner fra

hippocampus i tidlige utviklingstrinn, ble det sett at vekst av dendritter og uttrykk av synaptiske proteiner mediert via BDNF ble hemmet av en forbehandling med deksametason. Dette kan være et tegn på at deksametason har en effekt på synaptisk modning og funksjon mediert via BDNF. Mekanismen bak så ut til å være deksametason sin hemming av MAPK/ERK-signalveien (Kumamaru, Numakawa et al. 2008). Dette stemmer ikke overens med resultatet i denne oppgaven der det ble observert økt andel celler med lange nevritter hos celler eksponert for kombinasjonen deksametason og BDNF. Dette kan se ut som det er additive effekter mellom deksametason og antagonist, men effektene kan ikke skyldes BDNF-effekter, ettersom BDNF alene ikke kunne vise til nevruttvekst. PC12-cellene ble vurdert å ikke ha TrkB-reseptoren, derfor må denne effekten komme fra en annen mekanisme.

Siden PC12-cellene ikke viser til effekter av TrkB-reseptoren, antas det at effekten bak nevruttveksten til deksametason observert i denne oppgaven skyldes en annen mekanisme. Selv om det er varierte proteiner som er involvert i stimulering av aksonvekst, er det noen fellestegn i signaleringsveier. Aktivering av ERK (ekstracellulær signaleringsregulert kinase)-kaskaden ser ut til å være felles for flere reseptorer involvert i regulering av aksonvekst. Aktivering av reseptortyrosinkinaser av vekstfaktorer som NGF og FGF (fibroblastderivert vekstfaktor) stimulerer ERK-aktivitet i flere celletyper (Perron and Bixby 1999). Reseptor til FGF er tidligere vist i PC12-celler (Togari, Dickens et al. 1985). I videre studier er det mulig å eksponere PC12-celler for deksametason og i tillegg inkludere en ERK-hemmer, for å undersøke om nevruttveksten mediert via deksametason går via denne signalveien.

Det er hypoteser om at en langvarig aktivering av glukokortikoidreseptoren kan ha en negativ effekt på nevrotrofinreseptorene, og at denne effekten er med på å forklare glukokortikoiders nevrotoksisitet. Tidligere studier har vist at aktivering av glukokortikoidreseptoren er ansvarlig for den transkripsjonelle nedreguleringen av p75NTR-reseptoren, en cellulær prosess som er knyttet til økt fosforylering av TrkA-reseptoren og en forstyrrelse i NGF-indusert proliferasjon og differensiering (Lecht, Arien-Zakay et al. 2007). Deksametasons effekt på nevrotrofiner ble også undersøkt i denne oppgaven ved bruk av TrkA- og B-antagonister i PC12-celler. Deksametason i kombinasjon med TrkA-antagonisten GW441756 gav signifikant færre celler sammenlignet med celler eksponert for deksametason alene, dette kan være på grunn av en forstyrrelse i NGF-indusert proliferasjon. Ingen av de andre

endepunktene for nevruttvekst viste signifikante endringer der deksametason var eksponert i kombinasjon med TrkA-antagonisten (figur 3.14). Andre studier har derimot sett neurobeskyttende egenskaper av glukokortikoider via aktivering av Trk-reseptorer. Jeanneteau et al. så at deksametason aktiverte TrkB-signalering hos nevronale celler *ex vivo*. I tillegg ble det observert at deksametason vedlikehold overlevelse av nevroner fra primærkultur i rotteembryo ved fjerning av vekstfaktorer fra mediet. En Trk-antagonist og en hemmer av PI3/Akt-signalveien (LY294001) viste også redusere de beskyttende egenskapene til deksametason i denne studien (Jeanneteau, Garabedian et al. 2008).

Etttersom BDNF ikke viste nevruttvekst i PC12-celler var det ikke forventet at TrkB-antagonisten ANA-12 ville påvirke nevruttvekst mediert via deksametason. Dette ble heller ikke observert i de morfologiske undersøkelsene der deksametason i kombinasjon med ANA-12 ble tilsatt vekstmedium for PC12-celler (figur 3.15). Siden verken effekter via TrkA eller TrkB kunne forklare mekanismene for deksametasoninduserte utløpere i PC12-celler var det ønskelig å undersøke andre retninger. Kyllingkornceller er muligens en bedre egnet modell for å se på eventuelle legemiddeleffekter mediert via BDNF og TrkB. Videre fokus i oppgaven ble dermed markører for nevruttvekst, og om uttrykk og effekt av disse kunne la seg påvirke av deksametason.

4.2.4 MMP-9s rolle i nevruttvekst

Studier har vist at uttrykk av MMP- gener kan bli hemmet eller indusert av glukokortikoider i flere modellsystemer, og at en eksponering med glukokortikoider kan føre til unormal utvikling hos flere arter. Derfor kan det spekuleres i om glukokortikoid-indusert teratogenese er til dels mediert gjennom glukokortikoidreseptorens endring i uttrykk og aktivitet av MMP-er (Hillegass 2008).

I denne oppgaven ble effekter av MMP-9 på nevruttvekst først undersøkt ved hjelp av luciferaseassay, der PC12-celler ble eksponert for deksametason med/uten NGF. Deksametason så ut til å øke MMP-9-luc i alle konsentrasjoner som ble utprøvd, både alene og i kombinasjon med NGF, sammenlignet med ubehandlede kontrollceller (figur 3.23). MMP9-luc så også ut til å bli økt i forsøkene gjort i kyllingkornceller, men da hovedsakelig i konsentrasjonene 10 nM og 1 µM (Figur 3.26 B). Disse funnene stemmer overens med andre studier, der sebrafisk har blitt benyttet som modell for utvikling. Her har de blant annet sett at

eksponering av sebrafisk i embryostadiet for deksametason og hydrokortison økte uttrykk av MMP-2 og MMP-9 (Hillegass 2008). Andre studier har i motsetning sett en hemming av MMP-er etter eksponering for glukokortikoider. Aljada et al. viste at hydrokortison blant annet reduserte mengden MMP-2 og MMP-9 i plasma isolert fra mennesker etter en intravenøs injeksjon (Aljada, Ghanim et al. 2001). Denne studien ble derimot gjort på voksne frivillige for å undersøke inflammasjonsprosesser, og studien med sebrafisk kan muligens lettere knyttes til studiene som ble gjort i denne oppgaven på PC12-celler og kyllingkornceller. Sebrafiskene var også på embryostadiet under studien og kan derfor si mer om prosesser knyttet til utvikling. Sebrafisk har også mange fordeler som nevrotoksisk modell, som at tid for fertilisering kan styres ved hjelp av lys og et responsivt nervesystem utvikles nokså rask etter fertilisering (Linney, Upchurch et al. 2004).

På grunn av endringer i MMP-9-luc, var det ønskelig å gjøre en morfometrisk undersøkelse av PC12-celler eksponert for MMP-9-antagonist (avsnitt 3.6). Selv om transkripsjon av MMP-9 endres behøver ikke dette å bety at proteinsyntesen settes i gang eller at det dannes en funksjonelt protein. MMP-er blir ofte skilt som inaktive enzymer, og det er viktig å være oppmerksom på at proteinnivåer ikke alltid korrelerer med aktivitet av proteinet. Etter sekresjon, må disse proteinene gjennom en aktiveringsprosess før de er funksjonelle enzymer (Gjennomgått i (Milward, Fitzsimmons et al. 2007)). En morfometrisk analyse kan fortelle mer om funksjonelle endringer sammenlignet med luciferaseassay og westernblot, og da spesielt endringer i nevruttvekst i dette tilfellet. Celler ble eksponert for NGF eller deksametason i tillegg til antagonist. Resultatene viste at det ikke var signifikante forskjeller ved verken NGF eller deksametason med/uten MMP-9-antagonist. Resultatene gav tendenser til at celler med lange nevritter og nevrittelengde ble noe redusert hos PC12-celler eksponert for NGF og MMP-9-antagonist sammenlignet med celler eksponert for kun NGF (figur 3.17 C, E). Dette var ved konsentrasjonen 100 nM av MMP-9-antagonisten. Deksametason viste tidligere i denne oppgaven å gi økt andel celler med nevritter og økt antall nevritter per celle sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.11 og 3.12). Det kunne se ut som at deksametason sammen med MMP-9-antagonist gav færre celler med nevritter sammenlignet med celler eksponert for deksametason alene (figur 3.18 B), men det var som nevnt ingen signifikante forskjeller, her trengs det flere paralleller før man kan si noe sikkert.

I pilotforsøket med kyllingkornceller kunne det se ut som det var færre nevritter blant kyllingkornceller ved en konsentrasjon på 10 nM MMP-9-antagonist (figur 3.19). Ettersom

dette var et pilotforsøk trengs det flere paralleller før man kan si noe sikkert om MMP-9-antagonisten hadde noen effekter på nevruttvekst. Det kan tenkes at å øke konsentrasjon av antagonist vil føre til en sterkere hemming, men i dette forsøket ble det observert en del celledød iblant cellene som ble eksponert for 100 nM. I dette forsøksoppsettet kan man også inkludere deksametason for å se om korncellene lar seg påvirke av dette legemiddelet. Dersom deksametason påvirker nevruttvekst kan det være interessant å inkludere MMP-9-antagonisten, og se om funn i PC12-celler også er tilstede i primærnevroner.

Westernresultatene gav også tegn til økning i mengden MMP-9 hos PC12-celler eksponert for deksametason. Dette gjaldt spesielt konsentrasjonene 1 μ M og 10 μ M (figur 3.28). Her trengs det også flere paralleller før man kan si om det er signifikante forskjeller. Det kunne se ut som de øvre båndene gav en høyere respons enn de nedre ved eksponering for deksametason. Dette kan skyldes kløyvinger av MMP-9. Flere bånd gjorde analyseringen utfordrende. Et antistoff som ikke er rettet mot det katalytiske domenet er muligens bedre egnet. Av tre membraner var det kun den ene som viste lamin-bånd, og resultatene som ikke er korrigert for intern kontroll viste ikke like store forskjeller mellom behandlingene, og det trengs flere paralleller med intern kontroll. Endringer knyttet til nevruttvekst mediert av MMP-9 kan også skje lokalt i cellen, men disse effektene kommer ikke fram ved westernblot. Her kunne immunfarging vært en bedre egnet metode, for å se etter lokale endringer i cellene.

4.2.5 p53s funksjon i nevruttvekst

p53 er nødvendig for nevronal differensiering og vekst. Dette er vist i andre studier med PC12-celler, der p53-mRNA og p53- proteinnivåer har økt etter eksponering for NGF. Likeså har en hemming av p53-genet eller dominante negative former for p53 er vist å blokkere p53-transaktivering og hemme NGF-avhengig nevruttvekst. (Gjennomgått i (Di Giovanni and Rathore 2012)). Dette stemmer overens med resultatene fra denne oppgaven. Det ble observert en økt aktivitet av p53-luc hos celler eksponert for NGF (figur 3.24 A/C).

Det har også i tidligere studier blitt observert interaksjoner mellom p53 og glukokortikoidreseptoren. Aktivering av både endogen og eksogen glukokortikoidreseptor har vist å kunne hemme funksjoner mediert via p53, inkludert transaktivering, opp- og nedregulering av endogene gener, en stopp av cellyklus og apoptose (Sengupta, Vonesch et al. 2000).

Deksametason alene så ikke ut til å påvirke p53-luc, men i kombinasjon med NGF ble det observert en økning (figur 3.24). Dette ble sett for konsentrasjonene 10 ng og 1 μ M sammenlignet med ubehandlede celler. Det var derimot store spredninger i disse resultatene, og effekten kan være på grunn av ren NGF-effekt. Ved å gjøre flere paralleller kan man senke spredningen, og muligens få frem klarere resultater. Effektene sett i denne oppgaven er likevel i tråd med effekter vist i en studie som ble utført på cellelinjen HT-22 (nevronal cellelinje fra mus). Der kunne man se at glukokortikoidbehandling førte til translokering av p53 til kjernen og en økning i dens transkripsjonsaktivitet. Cellene ble stoppet i G₁- fase av cellesyklus, og til tross for overuttrykk av p53, viste ingen av cellene tegn til apoptose (Crochemore, Michaelidis et al. 2002). Den samme studien viste også en aktivering av GR hos den ikke-nevronale cellelinjen Saos-2, men her førte det til en hemmende effekt på p53. I tillegg er det også sett hemmende effekter av GR på p53-aktivitet hos fibroblastceller og humane nevroblastoma-cellelinjer (Sengupta, Vonesch et al. 2000, Crochemore, Michaelidis et al. 2002). Dette kan være et tegn på at interaksjonen mellom p53 og GR er cellespesifikk og/eller artsspesifikk. I tillegg til gjenkjennelsesekvenser på DNA, krever de begge protein-protein-interaksjoner med andre transkripsjonsfaktorer og flere proteiner (McEwan, Wright et al. 1997). Tilstedeværelsen av vevsspesifikke sett av transkripsjonsfaktorer og regulatorer for transkripsjon kan forklare de ulike effektene på GRs aktivering/hemming av p53 i ulike eksperimentelle modeller (Crochemore, Michaelidis et al. 2002). I tillegg til å gjøre flere paralleller i luciferaseassay, kunne man også kjørt et westernblot ved bruk av p53-antistoff, og sett om proteinmengden av p53 ble endret i PC12-celler eksponert for deksametason. Det er også mulig å undersøke om p53-hemmeren pifithrin påvirker nevrutvekst i kombinasjon med NGF og/eller deksametason.

4.2.6 GCS som markør for antioksidantforsvaret i PC12-celler

En hjerne under utvikling er svært sensitiv overfor oksidativt stress. Dette skyldes at det er økt metabolsk aktivitet assosiert med vekst, men det er også et mindre lager av beskyttende enzymer og antioksidanter som glutation (GSH). Sammenlignet med en voksen hjerne er det i tillegg færre gliaceller. Disse spiller en viktig rolle i å beskytte nevroner mot oksidative molekyler (Qiao, Seidler et al. 2005). Deksametason har tidligere vist seg å kunne påvirke syntesen av GSH. I en studie som ble gjort på humane alveolære epitelceller, ble det undersøkt om regulering av GSH-syntesen var endret etter respons på både pro-

inflammatoriske- og anti-inflammatoriske proteiner. TNF- α ble benyttet som protein med pro-inflammatoriske egenskaper og deksametason som anti-inflammatorisk protein. Deksametason i konsentrasjonen 3 μ M viste i denne studien å gi en signifikant nedgang i nivåer av GSH, senket aktivitet til GCS og GCS-HS- mRNA-uttrykk etter 24 timer (Rahman, Antonicelli et al. 1999). Etersom GCS fungerer som det hastighetsbestemmende enzymet i produksjonen av glutation (Lu 2009), kan det tenkes at ved nedsatt aktivitet eller mangel på dette enzymet vil nivåer av glutation gå ned. Dette kan ha betydning for antioksidantforsvaret i cellen.

I denne oppgaven ble det derimot sett at nivåene av GCS-luc var nokså uforandret hos PC12-celler eksponert for deksametason, dersom man kun så på nivåene av GCS-luc. Dette gjaldt alle konsentrasjonene av deksametason (10 nM, 1 μ M og 10 μ M) (figur 3.25 A). Etter korrigering med renillaluciferase, ble det sett en økning hos celler eksponert for deksametason i konsentrasjonene 10 μ M og 1 μ M. Aktiviteten økte ytterligere hos celler eksponert for deksametason i kombinasjon med NGF (figur 3.25 B). Det kan tenkes at denne økningen kommer av at cellene er i en stress-situasjon etter eksponering for deksametason, eller at deksametason oppregulerer GCS-aktivitet. For å undersøke dette er det mulig å måle GSH-nivåer. Ved en stressreaksjon vil cellen bruke glutation for å beskytte seg selv, og aktivitet av GCS vil være høy mens GSH-nivåer vil være lave. Dersom deksametason skulle vise seg å oppregulere GCS-aktivitet, vil nivåer av GSH muligens øke litt, eller forbli uforandret på grunn av en ”negativ feedback”-mekanisme (Njålsson 2005). Studier har vist at deksametason kan redusere oksidativt stress hos differensierende nevronale celler, og det er spekulert om denne effekten kan bidra med beskyttende effekter i forhold til hypoksisk-iskemisk hjerneskade (Barks, Post et al. 1991). Mekanismer bak disse beskyttende effektene er relativt ukjente (Ikeda, Mishima et al. 2002). En oversiktartikkel av Abraham et al. har foreslått at neurobeskyttende effekter av glukokortikoider kan være mediert via flere mekanismer som involverer (1) økt syntese av nevroτροφiske faktorer, (2) økt syntese av lipocortin-1, (3) deres evne til å svekke lipidperoksidering, og (4) modulering av kalsiumionestrømmer. (Abraham, Harkany et al. 2001). Nøkkelfaktoren kan være både dose og tid for administrering av deksametason. For å teste eventuelle beskyttende egenskaper til deksametason, kan man eksponere celler for deksametason og videre utsette dem for H₂O₂-indusert cytotoxicitet. Eventuell redusert cytotoxicitet og lipidperoksidering hos celler eksponert for deksametason kan undersøkes ved å måle for eksempel frisetting av

laktatdehydrogenase (LDH). Dette har vært gjort tidligere på PC12-celler for å undersøke beskyttende egenskaper av et flavonoid (Hong and Liu 2004).

4.2.7 Veien videre

Mekanismer som ligger til grunn for glukokortikoids effekter på hjerneutvikling er ikke fullstendig kartlagt, men også andre signalveier som ikke er medierte via glukokortikoidreseptoren bør få oppmerksomhet. Det er studier som viser at glukokortikoider kan binde og aktivere sonic hedgehog (SHH)-signalveien (Heine, Griveau et al. 2011). Signaler via SHH-signalveien spiller en viktig rolle i normal utvikling av sentralnervesystemet under embryogenesen (Wang, Pan et al. 2010). SHH-signaler er blant annet nødvendig for celleproliferasjon under hjerneutviklingen og i migrasjonsfasen til nydannende nevroner. Noen av disse effektene kan derfor motvirke noen av de negative effektene av GR på utvikling. Observasjonene gjort i denne oppgaven er i alle fall aktuelt å følge videre, og da også på et annet glukokortikoid.

5 KONKLUSJON

- PC12-celler er en egnet modell for å studere effekter av NGF og deksametason på nevruttvekst.
- PC12-celler er ikke en egnet modell for å studere effekter av BDNF, og om legemiddeleffekter er mediert via TrkB-reseptoren.
- Deksametason gir økt andel celler med nevritter og økt antall nevritter per celle, men endrer ikke andel lange nevritter i forhold til ubehandlet kontroll i PC12-celler.
- Deksametason ser ut til å øke uttrykk av MMP-9 både i luciferaseassay og westernblot både i PC12-celler og kyllingkornceller. Det ble også sett tendenser til hemmende nevruttvekst i forsøk med de samme cellemodellene der MMP-9-antagonist ble benyttet.
- Deksametason har muligens en effekt på uttrykk av p53, en annen markør for nevruttvekst.
- Deksametason ser ut til å øke GCS-uttrykk i PC12-celler, og har muligens en effekt på antioksidantforsvaret i disse cellene.
- Deksametason kan påvirke nevruttvekst, en prosess som er viktig under utviklingen av sentralnervesystemet. Sikkerhetsfarmakologiske studier som undersøker effekter på nevronal utvikling er nødvendig for å sikre at uønskede effekter av legemidler oppdages, og at man finner mekanismene som ligger bak disse effektene.

6 LITTERATURLISTE

Abraham, I., T. Harkany, K. Horvath and P. Luiten (2001). "Action of Glucocorticoids on Survival of Nerve Cells: Promoting Neurodegeneration or Neuroprotection? 1." Journal of neuroendocrinology **13**(9): 749-760.

Aden, P., R. E. Paulsen, J. Mæhlen, E. M. Løberg, I. L. Goverud, K. Liestøl and J. Lømo (2011). "Glucocorticoids dexamethasone and hydrocortisone inhibit proliferation and accelerate maturation of chicken cerebellar granule neurons." Brain research **1418**: 32-41.

Aden, P. K. (2011). "Glucocorticoid effects on neuronal proliferation, cell death and differentiation in the immature nervous system."

Alatorre-Meda, M., A. González-Pérez and J. R. Rodríguez (2010). "DNA–METAFFECTENE™ PRO complexation: a physical chemistry study." Physical Chemistry Chemical Physics **12**(27): 7464-7472.

Aljada, A., H. Ghanim, P. Mohanty, D. Hofmeyer, D. Tripathy and P. Dandona (2001). "Hydrocortisone suppresses intranuclear activator-protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9)." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **86**(12): 5988-5988.

Allard, S. and K. Kopish (2008). "Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research " Promega Cell Notes(21): 23-26.

Andersen, S. L. (2003). "Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?" Neuroscience & Biobehavioral Reviews **27**(1): 3-18.

Anderson, D. J. and R. Axel (1986). "A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids." Cell **47**(6): 1079-1090.

Anthony, D. C., T. J. Montine and D. G. Graham (2001). "Toxic responses of the nervous system." Casarett and Doull's toxicology the basic science of poisons **5**: 541-542.

Aust, S., C. Chignell, T. Bray, B. Kalyanaraman and R. Mason (1993). "Free radicals in toxicology." Toxicology and applied pharmacology **120**(2): 168-178.

Bal-Price, A. K., S. Coecke, L. Costa, K. M. Crofton, E. Fritsche, A. Goldberg, P. Grandjean, P. J. Lein, A. Li and R. Lucchini (2012). "Advancing the science of developmental neurotoxicity (DNT): testing for better safety evaluation." Altex **29**(2): 202-215.

Banker, G. and K. Goslin (1998). Culturing nerve cells, MIT press.

Barbacid, M. (1994). "The Trk family of neurotrophin receptors." Journal of neurobiology **25**(11): 1386-1403.

Barks, J. D., M. Post and U. I. Tuor (1991). "Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat." Pediatric research **29**(6): 558-563.

Behl, C., F. Lezoualc'h, T. Trapp, M. Widmann, T. Skutella and F. Holsboer (1997). "Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro." Endocrinology **138**(1): 101-106.

Bekkevold, R.-M. S. (2011). Sikkerhetsfarmakologi og nevronal utvikling: PC12-celler og kyllingkornceller som modeller, Universitetet i Oslo.

Bibel, M. and Y.-A. Barde (2000). "Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system." Genes & development **14**(23): 2919-2937.

Blomgren, K. and H. Hagberg (2006). "Free radicals, mitochondria, and hypoxia–ischemia in the developing brain." Free radical biology and medicine **40**(3): 388-397.

Bolt, R. J., M. Van Weissenbruch, H. Lafeber and H. Delemarre-van de Waal (2001). "Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant." Pediatric pulmonology **32**(1): 76-91.

Borghesani, P. R., J. M. Peyrin, R. Klein, J. Rubin, A. R. Carter, P. M. Schwartz, A. Luster, G. Corfas and R. A. Segal (2002). "BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells." Development **129**(6): 1435-1442.

Cazorla, M., J. Prémont, A. Mann, N. Girard, C. Kellendonk and D. Rognan (2011). "Identification of a low–molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice." The Journal of clinical investigation **121**(5): 1846.

Chambaut-Guérin, A. M., S. Hérigault, P. Rouet-Benzineb, C. Rouher and C. Lafuma (2000). "Induction of Matrix Metalloproteinase MMP-9 (92-kDa Gelatinase) by Retinoic Acid in Human Neuroblastoma SKNBE Cells." Journal of neurochemistry **74**(2): 508-517.

CHMP (2006). "Guideline on the non-clinical investigation of the dependence potential of medicinal products." Committee for medicinal products for human use. EMA.

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**(1): 41-55.

Crochemore, C., T. M. Michaelidis, D. Fischer, J.-P. Loeffler and O. F. ALMEIDA (2002). "Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation." The FASEB journal **16**(8): 761-770.

Da Silva, J. S. and C. G. Dotti (2002). "Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis." Nature Reviews Neuroscience **3**(9): 694-704.

Dandekar, D. H., M. Kumar, J. S. Ladha, K. N. Ganesh and D. Mitra (2005). "A quantitative method for normalization of transfection efficiency using enhanced green fluorescent protein." Analytical biochemistry **342**(2): 341-344.

Das, K. P., T. M. Freudenrich and W. R. Mundy (2004). "Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures." Neurotoxicology and teratology **26**(3): 397-406.

Dechat, T., S. A. Adam and R. D. Goldman (2009). "Nuclear lamins and chromatin: when structure meets function." Advances in enzyme regulation **49**(1): 157.

Dent, E. W. and F. B. Gertler (2003). "Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance." Neuron **40**(2): 209-227.

Di Giovanni, S., C. D. Knights, M. Rao, A. Yakovlev, J. Beers, J. Catania, M. L. Avantaggiati and A. I. Faden (2006). "The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration." The EMBO journal **25**(17): 4084-4096.

Di Giovanni, S. and K. Rathore (2012). "p53-dependent pathways in neurite outgrowth and axonal regeneration." Cell and tissue research **349**(1): 87-95.

Evensen, S. (2013). Sikkerhetsfarmakologiske studier av lamotrigin og valproat- mulige effekter på nevronkulturer, Universitetet i Oslo.

Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proceedings of the National Academy of Sciences **84**(21): 7413-7417.

Friedman, W. (2012). Growth Factors. Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular and Medicinal Neurobiology., Elsevier Inc.

Fujita, K., P. Lazarovici and G. Guroff (1989). "Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells." Environmental health perspectives **80**: 127.

Glick, R. D., I. Medary, D. C. Aronson, K. W. Scotto, S. L. Swendeman and M. P. La Quaglia (2000). "The effects of serum depletion and dexamethasone on growth and differentiation of human neuroblastoma cell lines." Journal of pediatric surgery **35**(3): 465-472.

Greene, L. A. and A. S. 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 **73**(7): 2424-2428.

Grier, D. G. and H. L. Halliday (2005). "Management of Bronchopulmonary Dysplasia in Infants." Drugs **65**(1): 15-29.

Groskreutz, D. a. S., E. T. (1997). Methods in Molecular Biology, Humana Press, NJ.

Gross, I. (1990). "Regulation of fetal lung maturation." American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology **259**(6): L337-L344.

Gruenbaum, Y., K. L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg and M. Cohen (2000). "Review: nuclear lamins—structural proteins with fundamental functions." Journal of structural biology **129**(2): 313-323.

Guengerich, F. P. and J. S. MacDonald (2007). "Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety." Chemical research in toxicology **20**(3): 344-369.

Hartman, D. S., M. McCormack, R. Schubeneel and C. Hertel (1992). "Multiple trkA proteins in PC12 cells bind NGF with a slow association rate." Journal of Biological Chemistry **267**(34): 24516-24522.

Heine, V. M., A. Griveau, C. Chapin, P. L. Ballard, J. K. Chen and D. H. Rowitch (2011). "A small-molecule smoothed agonist prevents glucocorticoid-induced neonatal cerebellar injury." Science translational medicine **3**(105): 105ra104-105ra104.

Hibi, M. and T. Shimizu (2012). "Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits." Developmental neurobiology **72**(3): 282-301.

Hillegass, J. M. (2008). The Role of Matrix Metalloproteinases in Zebrafish (Danio Rerio) Embryogenesis and Their Regulation by Glucocorticoids, ProQuest.

Hong, H. and G.-Q. Liu (2004). "Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin." Life sciences **74**(24): 2959-2973.

Hughes, A. L., L. Gollapudi, T. L. Sladek and K. E. Neet (2000). "Mediation of Nerve Growth Factor-driven Cell Cycle Arrest in PC12 Cells by p53: SIMULTANEOUS DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION SUBSEQUENT TO p53 FUNCTIONAL INACTIVATION." Journal of Biological Chemistry **275**(48): 37829-37837.

ICH57A (2001). "International Conference on Harmonisation; guidance on S7A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals." Federal Register **66**(135): 36791-36792.

Ikedo, T., K. Mishima, T. Yoshikawa, K. Iwasaki, M. Fujiwara, Y. X. Xia and T. Ikenoue (2002). "Dexamethasone prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats." Behavioural brain research **136**(1): 161-170.

Iwasaki, Y., M. Ishikawa, N. Okada and S. Koizumi (1997). "Induction of a Distinct Morphology and Signal Transduction in TrkB/PC12 Cells by Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor." Journal of neurochemistry **68**(3): 927-934.

Jameson, R. R., F. J. Seidler, D. Qiao and T. A. Slotkin (2005). "Adverse neurodevelopmental effects of dexamethasone modeled in PC12 cells: identifying the critical stages and concentration thresholds for the targeting of cell acquisition, differentiation and viability." Neuropsychopharmacology **31**(8): 1647-1658.

Jeanneteau, F., M. J. Garabedian and M. V. Chao (2008). "Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(12): 4862-4867.

Kaplan, D. R. and F. D. Miller (2000). "Neurotrophin signal transduction in the nervous system." Current opinion in neurobiology **10**(3): 381-391.

Kondo, Y., J. Saruta, M. To, N. Shiiki, C. Sato and K. Tsukinoki (2010). "Expression and role of the BDNF receptor-TrkB in rat adrenal gland under acute immobilization stress." Acta histochemica et cytochemica **43**(6): 139.

- Kumamaru, E., T. Numakawa, N. Adachi, Y. Yagasaki, A. Izumi, M. Niyaz, M. Kudo and H. Kunugi (2008). "Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase." Molecular Endocrinology **22**(3): 546-558.
- Lecht, S., H. Arien-Zakay, R. Tabakman, H. Jiang, D. W. Fink and P. Lazarovici (2007). "Dexamethasone-Induced Down-Regulation of Nerve Growth Factor Receptor p75 NTR is Mediated by Glucocorticoid Type II Receptor in PC12 Cell Model." Open Pharmacology Journal **1**: 19-26.
- Linney, E., L. Upchurch and S. Donerly (2004). "Zebrafish as a neurotoxicological model." Neurotoxicology and teratology **26**(6): 709-718.
- Liu, N.-K. and X.-M. Xu (2006). " β -Tubulin is a more suitable internal control than β -actin in Western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury." Journal of neurotrauma **23**(12): 1794-1801.
- Liu, Z., T. Mahmood and P. Yang (2014). "Western blot: Technique, theory and trouble shooting." North American Journal of Medical Sciences **6**(3): 160.
- Lu, S. C. (1999). "Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies." The FASEB Journal **13**(10): 1169-1183.
- Lu, S. C. (2009). "Regulation of glutathione synthesis." Molecular aspects of medicine **30**(1): 42-59.
- Massa, S. M., T. Yang, Y. Xie, J. Shi, M. Bilgen, J. N. Joyce, D. Nehama, J. Rajadas and F. M. Longo (2010). "Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents." The Journal of clinical investigation **120**(5): 1774.
- Matthews, S. G. (2001). "Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action". Seminars in Neonatology, Elsevier.
- McEwan, I. J., A. P. Wright and J. Å. Gustafsson (1997). "Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: Role of protein-protein interactions." Bioessays **19**(2): 153-160.
- Miller, F., C. Pozniak and G. Walsh (2000). "Neuronal life and death: an essential role for the p53 family." Cell Death & Differentiation **7**(10).
- Milward, E., C. Fitzsimmons, A. Szklarczyk and K. Conant (2007). "The matrix metalloproteinases and CNS plasticity: an overview." Journal of neuroimmunology **187**(1): 9-19.
- Mocchetti, I., G. Spiga, V. Y. Hayes, P. J. Isackson and A. Colangelo (1996). "Glucocorticoids differentially increase nerve growth factor and basic fibroblast growth factor expression in the rat brain." The Journal of neuroscience **16**(6): 2141-2148.
- Murray-Zmijewski, F., E. A. Slee and X. Lu (2008). "A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress." Nature reviews Molecular cell biology **9**(9): 702-712.

Nguyen, N. D. T. (2011). Mekanismer for deksametasonindusert celledød i PC12-celler og kyllingkornceller, Universitetet i Oslo.

Njålsson, R. (2005). "Glutathione synthetase deficiency." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **62**(17): 1938-1945.

Nordstrom, L. A., J. Lochner, W. Yeung and G. Ciment (1995). "The metalloproteinase stromelysin-1 (transin) mediates PC12 cell growth cone invasiveness through basal laminae." Molecular and Cellular Neuroscience **6**(1): 56-68.

Parikh, N. A., R. E. Lasky, K. A. Kennedy, F. R. Moya, L. Hochhauser, S. Romo and J. E. Tyson (2007). "Postnatal dexamethasone therapy and cerebral tissue volumes in extremely low birth weight infants." Pediatrics **119**(2): 265-272.

Patapoutian, A. and L. F. Reichardt (2001). "Trk receptors: mediators of neurotrophin action." Current opinion in neurobiology **11**(3): 272-280.

Perron, J. C. and J. L. Bixby (1999). "Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation." Molecular and Cellular Neuroscience **13**(5): 362-378.

Pigino, G., Y. Song, L. L. Kirkpatrick and S. T. Brady (2012). The Cytoskeleton of Neurons and Glia. Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology, Elsevier Inc. .

Pittman, R. and A. Williams (1989). "Neurite penetration into collagen gels requires Ca²⁺-dependent metalloproteinase activity." Developmental neuroscience **11**(1): 41-51.

Pugsley, M., S. Authier and M. Curtis (2008). "Principles of safety pharmacology." British journal of pharmacology **154**(7): 1382-1399.

Qiao, D., F. J. Seidler and T. A. Slotkin (2005). "Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos." Toxicology and applied pharmacology **206**(1): 17-26.

Radio, N. M., T. M. Freudenrich, B. L. Robinette, K. M. Crofton and W. R. Mundy (2010). "Comparison of PC12 and cerebellar granule cell cultures for evaluating neurite outgrowth using high content analysis." Neurotoxicology and teratology **32**(1): 25-35.

Radio, N. M. and W. R. Mundy (2008). "Developmental neurotoxicity testing< i> in vitro</i>: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth." Neurotoxicology **29**(3): 361-376.

Rahman, I., F. Antonicelli and W. MacNee (1999). "Molecular mechanism of the regulation of glutathione synthesis by tumor necrosis factor- α and dexamethasone in human alveolar epithelial cells." Journal of Biological Chemistry **274**(8): 5088-5096.

Ramm, P., Y. Alexandrov, A. Cholewinski, Y. Cybuch, R. Nadon and B. J. Soltys (2003). "Automated screening of neurite outgrowth." Journal of biomolecular screening **8**(1): 7-18.

Ramnani, N. (2006). "The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function." Nature Reviews Neuroscience **7**(7): 511-522.

Rice, D. and S. Barone Jr (2000). "Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models." Environmental health perspectives **108**(Suppl 3): 511.

Rodum, M. (2013). Sikkerhetsfarmakologiske studier av SSRI-er - mulige effekter på nevronkulturer, Universitetet i Oslo.

Rossner, S., U. Ueberham, R. Schliebs, J. Perez-Polo and V. Bigl (1998). "p75 and TrkA receptor signaling independently regulate amyloid precursor protein mRNA expression, isoform composition, and protein secretion in PC12 cells." Journal of neurochemistry **71**(2): 757-766.

Sand, O., Ø. B. Sjaastaf and E. Haug (2001). Menneskets fysiologi, Gyldendal akademisk.
Schäcke, H., W.-D. Döcke and K. Asadullah (2002). "Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids." Pharmacology & therapeutics **96**(1): 23-43.

Sengupta, S., J. L. Vonesch, C. Waltzinger, H. Zheng and B. Wasyluk (2000). "Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells." The EMBO journal **19**(22): 6051-6064.

Sherf, B. A., S. L. Navarro, R. R. Hannah and K. V. Wood (1996). "Dual-luciferase reporter assay: an advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays." Promega Notes **57**(2).

Shifera, A. S. and J. A. Hardin (2010). "Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays." Analytical biochemistry **396**(2): 167.

Shubayev, V. I. and R. R. Myers (2004). "Matrix metalloproteinase-9 promotes nerve growth factor-induced neurite elongation but not new sprout formation in vitro." Journal of neuroscience research **77**(2): 229-239.

Stahn, C. and F. Buttgerit (2008). "Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids." Nature Clinical Practice Rheumatology **4**(10): 525-533.

Stiles, J. and T. L. Jernigan (2010). "The basics of brain development." Neuropsychology review **20**(4): 327-348.

Suri, D. and V. Vaidya (2013). "Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: Relevance to hippocampal structural and functional plasticity." Neuroscience **239**: 196-213.

Tam, E. W., V. Chau, D. M. Ferriero, A. J. Barkovich, K. J. Poskitt, C. Studholme, E. D.-Y. Fok, R. E. Grunau, D. V. Glidden and S. P. Miller (2011). "Preterm cerebellar growth impairment after postnatal exposure to glucocorticoids." Science translational medicine **3**(105): 105ra105-105ra105.

Togari, A., G. Dickens, H. Kuzuya and G. Guroff (1985). "The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells." The Journal of neuroscience **5**(2): 307-316.

Tronche, F., C. Kellendonk, H. M. Reichardt and G. Schütz (1998). "Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice." Current opinion in genetics & development **8**(5): 532-538.

Vaillant, C., C. Meissirel, M. Mutin, M.-F. Belin, L. R. Lund and N. Thomasset (2003). "MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum." Molecular and Cellular Neuroscience **24**(2): 395-408.

Valentin, J.-P. and T. Hammond (2008). "Safety and secondary pharmacology: successes, threats, challenges and opportunities." Journal of pharmacological and toxicological methods **58**(2): 77-87.

Vos, B. P., R. Maex, A. Volny-Luraghi and E. De Schutter (1999). "Parallel fibers synchronize spontaneous activity in cerebellar Golgi cells." Journal of Neuroscience **19**: RC6 (1-5).

Wang, K., L. Pan, X. Che, D. Cui and C. Li (2010). "Sonic Hedgehog/GLI1 signaling pathway inhibition restricts cell migration and invasion in human gliomas." Neurological research **32**(9): 975-980.

Wechsler-Reya, R. J. and M. P. Scott (1999). "Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog." Neuron **22**(1): 103-114.

Whitelaw, A. and M. Thoresen (2000). "Antenatal steroids and the developing brain." Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition **83**(2): F154-F157.

Yong, V. W., C. Power, P. Forsyth and D. R. Edwards (2001). "Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system." Nature Reviews Neuroscience **2**(7): 502-511.

Zhang, J., W. Yan and X. Chen (2006). "p53 is required for nerve growth factor-mediated differentiation of PC12 cells via regulation of TrkA levels." Cell Death & Differentiation **13**(12): 2118-2128.