

Sikkerhetsfarmakologiske studier av lamotrigin og valproat – mekanismestudier i nevronkulturer

Kjersti Jenssen Daling



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

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

Sikkerhetsfarmakologiske studier av lamotrigin og valproat – mekanismestudier i nevronkulturer

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Kjersti Jenssen Daling

Oppgaven er utført ved

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Veiledere:

Professor Ragnhild Elisabeth Paulsen

Stipendiat Lars Peter Austdal

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo

© Kjersti Jenssen Daling

2014

Sikkerhetsfarmakologiske studier av lamotrigin og valproat – mekanismestudier i
nevronkulturer

Kjersti Jenssen Daling

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

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

Jeg vil starte med å takke mine to flotte veiledere, Professor Ragnhild Elisabeth Paulsen og stipendiat Lars Peter Engeset Austdal. Ragnhild, din imponerende kunnskap og engasjement i faget har vært inspirerende for arbeidet. Tusen takk for god veiledning og konstruktive tilbakemeldinger, og for at du har kommet med beroligende ord i en stressende skriveperiode. Takk til Lars for at du alltid var tilgjengelige for faglige diskusjoner og hjelp på laben. Du har et svar på alt og jeg setter stor pris på ditt gode humør og støtte igjennom hele perioden.

Jeg vil også takke resten av forskningsgruppen på ZEB. Dere har alle gjort masterperioden spennende og lærerik.

En spesiell takk til avdelingsingeniør Mona Gaarder. Alltid med et smil har du bidratt med den praktisk opplæring på laben. Du har vært tilgjengelig, uansett, når ikke alt gikk som planlagt.

Takk til venner og familie, og en spesiell takk til mamma for korrekturlesing og støtte igjennom fem år på farmasistudiet. Takk til pappa for din positivitet og den interessen du har vist for studievalget mitt.

Jeg setter stor pris på å ha fått delt denne masterperioden med Karina Borgund. Du er en fantastisk person. Takk for alle hyggelige samtaler vi har hatt på laben. Du har gjort denne perioden med utallig mange timer på laben utrolig morsom og lærerik. Vi har alltid funnet en løsning sammen, om den så ikke alltid har vært like god.

Til slutt vil jeg takke Kai, som alltid har stilt opp for meg, beroliget meg og ikke minst vist stor omtanke igjennom hele studiet.

Sammendrag

Under utvikling av nervesystemet er nevroner spesielt følsomme for ytre påvirkning, slik som legemidler eller oksidativt stress. Legemiddelbruk under svangerskap og hos små barn kan potensielt påvirke nevronal utvikling og gi uønskede langtidseffekter. Dette har blitt sett ved bruk av antiepileptika som lamotrigin (LTG) og valproat (VPA). Behandling av epilepsi er allikevel nødvendig under svangerskapet fordi ukontrollerte anfall kan være skadelig for både mor og foster. Det er derfor ønskelig å vite mer om hvilke mekanismer slike legemidler påvirker. I sikkerhetsfarmakologiske studier undersøkes potensielt skadelige effekter av et legemiddel på fysiologiske funksjoner, men de kan også gi ny kunnskap om de cellulære mekanismene som forårsaker slike effekter. Bruk av forsøksdyr er utbredt i slike studier, og det er ønskelig å erstatte dette med flere *in vitro*-modeller. Substanser som forstyrrer nevronal utvikling kan testes *in vitro* ved å se på påvirkning på nevruttvekst i cellelinjer. Nevrittutvekst i cellelinjen PC12 er karakterisert og kan analyseres ved morfometrisk analyse. Dette skal kunne erstatte dyreforsøk og ble derfor brukt i denne oppgaven. NGF stimulerer PC12-celler via TrkA-reseptor til nevruttvekst og ble brukt som en positiv kontroll. Det ble også undersøkt om nevruttvekst i PC12 er mediert via TrkB-signalering ved å bruke BDNF og TrkB-agonist, men PC12 viste seg ikke å være egnet til å studere dette.

LTG og VPA ga økt nevruttvekst i PC12. For å studere underliggende mekanismer bak dette ble det anvendt TrkA- og TrkB-reseptorantagonister. Dette viste at LTG og VPA påvirket nevruttvekst via de samme signalveiene som nevrotrofinene. For ytterligere å belyse mekanismer som ligger bak nevruttvekst, ble markørene p53 og MMP9 studert ved luciferaseassay og westernblotting. Både LTG og VPA så ut til å øke MMP9, og det antas at MMP9 er viktig i mekanismen bak nevruttvekst. Luciferaseassay viste seg som et egnet supplement i screening i sikkerhetsfarmakologiske studier. Det er også viktig å studere om legemidler kan påvirke oksidativt stress, da dette kan gi skade på nevroner under utvikling. I produksjon av kroppens viktigste antioksidant glutation er enzymet GCS det hastighetsbestemmende trinnet. GCS ble derfor studert ved luciferaseassay. VPA ga økt, mens LTG ga redusert GCS. Dette samsvarer med celledødstall for begge eksponeringer. For å undersøke relevansen av PC12-celler som erstatning for dyreforsøk ble forsøk utført i korncellekulturer fra kyllinglillehjerne. Studier av MMP9 viste lik trend i effekter av VPA og LTG som sett i PC12. Dette styrker grunnlaget for bruk av PC12 i sikkerhets- og basalfarmakologiske studier som erstatning for forsøksdyr.

Forkortelser

Ad	Opp til
AE	Antiepileptika
ANOVA	Variansanalyse (analysis of variance)
APS	Ammonium persulfat
BDNF	Hjernederivert nevroτροφisk faktor (brain-derived neurotrophic factor)
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Bovint serumalbumin
Caspase	Cystein-aspartat-spesifikk-protease
CNS	Sentralnervesystemet (central nervous system)
DAG	Diacetylglyserol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DNase	Deoksyribonuklease
EGL	Germinallaget (external germinal layer)
ERK	Ekstracellulær signalregulert proteinkinase
FBS	Føtalt kalveserum
GABA	Gamma-amino-smørsyre (gamma amino butyric acid)
GABA-T	GABA-transaminase
GAD	Glutaminsyre dekarboksylase
GAP-43	Vekstassosiert protein-43 (growth associated protein-43)
GCL	Glutamat cystein ligase
GCP	Korncelle forløpercelle (granule cell precursor)
GCS	γ -glutamylcystein
GSH	Glutation
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Pepperrot peroksidase
HS	Hesteserum
IGL	Indre korncellelag
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfat

JNK	Jun N-terminal kinase
LTD	”Long term depression”
LTG	Lamotrigin
LTP	Langtidspotensialet
MAPK	Mitogen-aktivert proteinkinase
MMP	Matrix metalloproteinase
MQ	Milli Q
NGF	Nervevekstfaktor (nerve growth factor)
NT	Nevrotrofin
p75 ^{NTR}	p75 nevrotrofinreseptor
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PI3K	Fosfoinositid-3-kinase
PLC- γ 1	Fosfolipase C- γ 1
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Pentametansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsyre
RNS	Reaktive nitrogenforbindelser (reactive nitrogen species)
ROS	Reaktive oksygenforbindelser (reactive oxygen species)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SE	Standardfeil
TBS	Trisbufret saltvann
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylenediamin
TG	Tris-glycin-buffer
TGS	Tris-glycin-SDS-buffer
TNF _R	Tumor nekrosefaktor-reseptor
Tris	Trishydroksymetylaminoetan
Trk	Tropomyocin-reseptor-kinase
Tween	Polyoksyetylen-sorbitan-monolaurat
VPA	Valproat

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	14
1.1. Sikkerhetsfarmakologi og bruk av modeller	14
1.2. Epilepsi	15
1.3. Antiepileptika og graviditet	16
1.3.1. Valproat	17
1.3.2. Lamotrigin	18
1.4. Sentralnervesystemet under utvikling	19
1.4.1. Proliferasjon og differensiering i sentralnervesystemet	19
1.4.2. Utvikling av lillehjernen	19
1.4.3. Nevrittutvekst i nervesystemet	20
1.5. Nevrotrofiner og deres reseptorer	22
1.5.1. NGF	22
1.5.2. BDNF	23
1.5.3. Signalering mediert via Trk-reseptorer	23
1.5.4. Signalering mediert via p75NTR	25
1.6. Markører med effekt på nevrutvekst og differensiering	25
1.6.1. p53	25
1.6.2. MMP9	26
1.7. Oksidativt stress og glutationsforsvar	27
1.7.1. Glutation og γ -glutamylcystein syntetaser (GCS)	28
1.8. Mål med oppgaven	29
2. Materialer og metoder	30
2.1. Oversikt over kjemikalier, biologiske produkter og utstyr	30
2.2. PC12-celler	34
2.2.1. PC12-celler som modell	34
2.2.2. Splitting av PC12-celler til flaske	34
2.2.3. Splitting av PC-12 celler til skåler	35
2.2.4. Eksponering av PC12-celler	36
2.3. Kyllingkornceller	40
2.3.1. Korncellekulturer	40
2.3.2. Coating av skåler med poly-L-lysin	40
2.3.3. Preparering av korncellekulturer	40
2.3.4. Prosedyre for preparering av korncellekulturer fra kylling	41
2.3.5. Eksponering av kyllingkornceller	45
2.4. Morfometrisk analyse i mikroskop	46
2.5. Transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller	49
2.5.1. Protokoll for transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller	50
2.6. Luciferase Reporter Assay	52
2.6.1. Ildflueluciferase	52
2.6.2. Høsting av celler til luciferasemåling	52
2.6.3. Måling av ildflueluciferaseaktivitet	53
2.6.4. Renillaluciferase	54
2.6.5. Måling av renillaluciferaseaktivitet	55
2.7. Deteksjon av celledød med trypanblå	56
2.8. Westernblotting	57
2.8.1. Høsting av celler til westernblotting	57

2.8.2. Proteinmåling	58
2.8.3. Proteinjustering av prøver.....	59
2.8.4. Støping av gel.....	60
2.8.5. Gelelektroforese	62
2.8.6. Blotting av gel.....	63
2.8.7. Ponceausfarging og blokking av membran.....	64
2.8.8. Tilsetning av primære og sekundære antistoff.....	66
2.8.9. Fremkalling.....	67
2.8.10. Stripping av membranen	67
2.9. Statistikk og grafisk fremstilling.....	68
3. Resultater	69
3.1. Effekter på nevruttvekst i PC12-celler	70
3.1.1. Effekter av NGF på nevruttvekst i PC12-celler.....	70
3.1.2. Effekt av DMSO og BDNF på nevruttvekst i PC12-celler	72
3.1.3. Valg av konsentrasjon av TrkA-hemmeren GW 441756	76
3.1.4. Selektivitet av TrkA-hemmeren GW 441756.....	78
3.1.5. Valg av konsentrasjon av TrkB-hemmeren ANA-12.....	79
3.1.6. Selektiviteten av TrkB-hemmeren ANA-12	81
3.2. Lamotrigins effekter på nevruttvekst i PC12-celler	83
3.2.1. Lamotrigins effekter på nevruttvekst via TrkA-signalvei	84
3.2.2. Lamotrigins effekt på nevruttvekst via TrkB-signalvei.....	86
3.3. Valproats effekt på nevruttvekst i PC12-celler	87
3.3.1. Valproats effekter på nevruttvekst og TrkA-signalveier	89
3.3.2. Valproat og TrkB-signalveier.....	90
3.4. Renillaluciferaseaktivitet i PC12-celler.....	92
3.4.1. Påvirkning av kotransfeksjon og behandling på enzymaktiviteten til renillaluciferase	92
3.4.2. Forskjeller mellom reportergenene rl-CMV og rl-tk.....	96
3.5. Ildfluoluciferaseaktivitet i PC12-celler og kyllingkornceller.....	98
3.5.1. Lamotrigins effekter på p53-aktivitet i PC12-celler	98
3.5.2. Valproats effekter på p53-aktivitet i PC12-celler	99
3.5.3. Lamotrigins effekter på MMP9-promotoraktivitet i PC12-celler.....	100
3.5.4. Valproats effekter på MMP9-promotoraktivitet i PC12-celler	101
3.5.1. Effekter av lamotrigin på MMP9-promotoraktivitet i kyllingkornceller	102
3.5.2. Effekter av valproat på MMP9-promotoraktivitet i kyllingkornceller.....	103
3.6. Lamotrigin og valproats effekter på GCS-promotor målt ved luciferaseassay... 105	
3.6.1. Lamotrigins effekter på GCS-promotoraktivitet i PC12-celler	105
3.6.2. Valproats effekter på GCS-promotoraktivitet i PC12-celler	106
3.7. Celledød i PC12-celler etter behandling med lamotrigin og valproat..... 107	
3.7.1. Effekter av Lamotrigin på celledød i PC12-celler.....	107
3.7.2. Effekter av valproat på celledød i PC12-celler	109
3.8. MMP9-protein målt ved westernblotting..... 110	
3.8.1. Lamotrigins effekter på MMP9-proteinuttrykk	110
3.8.2. Valproats effekter på MMP9-proteinuttrykk	112
3.9. Mikroskopering av kyllingkornceller eksponert for MMP9-hemmer	114
4. Diskusjon	116
4.1. Diskusjon av valg av metode	116
4.1.1. Valg av cellemodeller	116
4.1.2. Valg av eksponering med vekstfaktor	117
4.1.3. Valg av eksponering med legemidler	118
4.1.4. Valg av endepunkt til morfometrisk analyse	119
4.1.5. Luciferaseassay som metode	121
4.1.6. Westernblotting som metode	123

4.1.7. Tryptanblå som metode for deteksjon av celledød	124
4.2. Relevans av biologiske endepunkt.....	125
4.2.1. MMP9 som differensierings- og nevruttvekstsmarkører	125
4.2.2. p53 som differensierings- og nevruttvekstmarkør	127
4.2.3. GCS som markør på cellens antioksidantforsvar	128
4.3. Diskusjon av biologiske funn	128
4.3.1. BDNF og effekter på nevruttvekst i PC12-celler.....	128
4.3.2. Valproats effekter på nevruttvekst og nevronale markører	129
4.3.3. Lamotrigins effekter på nevruttvekst og nevronale markører	132
4.3.4. Hva vil fremtiden bringe?	134
5. Konklusjon	135
Litteraturliste.....	136
Vedlegg / Appendiks.....	142

1. Innledning

1.1. Sikkerhetsfarmakologi og bruk av modeller

Farmakologiske studier kan deles inn i primær- og sekundærfarmakodynamiske studier (hva substansen gjør med kroppen) og sikkerhetsfarmakologiske studier. Sikkerhetsfarmakologi defineres som ”studier av potensielt uønskede farmakodynamiske effekter av substanser på fysiologiske funksjoner når de eksponeres i terapeutiske konsentrasjoner eller høyere” [1]. I 2000 introduserte Internasjonal Konferanse for Harmonisering (ICH) nye retningslinjer – Safety Pharmacology studies for Human Pharmaceuticals (S7A) - for å beskytte pasienter og forsøkskandidater mot potensielt skadelige (toksiske) farmakodynamiske effekter av farmakologiske substanser. Det er også ønskelig å begrense unødvendig bruk av dyretesting og andre ressurser. Evaluering av farmakodynamiske eller patofysiologiske effekter observert i toksikologiske eller kliniske studier, i tillegg til mekanismestudier av potensielt nye og markedsførte legemidler, inngår også som en del av sikkerhetsfarmakologien [1].

Tradisjonelle sikkerhetsfarmakologiske analyser baserer seg på store antall dyreforsøk, og nevrologiske analyser har basert seg på å observere endringer i atferd, koordinasjon og reflekser, i tillegg til å se etter nevropatologiske forandringer, hos rotte eksponert *in utero* eller via mor i ammeperioden. En utvikling av nye *in vitro*-modeller, som har evne til å gjengi cellulære prosesser relatert til nevronal utvikling, slik som nevruttvekst, kan være godt egnet til å erstatte de tradisjonelle sikkerhetsfarmakologiske analysene. *In vitro*-cellelinjer fra hjernevev har blitt brukt i mange år som et viktig verktøy for å studere nervesystemet og dens funksjoner på et molekylært og cellulært nivå. Kjemikalier som påvirker en eller flere av de essensielle utviklingsprosessene i denne metoden kan velges ut til videre forskning [2].

Både nevronale cellelinjer og primærkulturer av nerveceller har blitt brukt som *in vitro*-modeller i kjemisk ”screening” [3]. Utvekst av aksonale og dendrittiske prosesser (videre kalt nevritter, se avsnitt 1.4.3) utgjør grunnlaget for nevronal differensiering og modning, og er en prosess som kjemikalier lett kan forstyrre. Nevrittutvekst er viktig under utvikling av nervesystemet, og dette er derfor et godt egnet endepunkt for bruk i cellelinjer til å undersøke effekter på utviklingen. Både nevronale cellelinjer og primærkulturer er mye brukt som *in vitro*-modeller for nevruttvekst [2], og de er begge brukt i denne oppgaven.

PC12-celler er en klonet nevronal cellelinje som stammer fra et feokromocytom i binyremargen hos rotte [4]. Under stimulering med nervevekstfaktor (NGF), vil cellene differensiere og tilegne seg egenskaper karakteristisk for nevroner, slik som utsendelse av nevritter, syntese av katekolaminerge neurotransmittere og reseptorer, og de får elektrisk aktivitet. Fordi cellelinjen stammer fra kreftceller, vil deres fenotype ikke være lik hva man oppnår med primærcelelinjer. Nevrittene fra PC12-celler kan ikke karakteriseres som aksoner eller dendritter, da de ikke har funksjonelle synapser [3]. Fordelen ved bruk av cellelinjer er at man får en homogen populasjon av celler, fordi cellelinjene vanligvis klones fra en stamcelle, noe som gir mindre variasjoner mellom forsøk [2].

Primære nevronale kulturer består av celler hentet fra nevronale vev og kan stamme fra flere regioner i sentralnervesystemet [3]. Når primærkulturer sås ut i optimale vekstforhold beholder de egenskaper til modne nevroner og kan spontant utvikle nevritter uten ytre stimulus. Nevrittene kan også deles inn i aksoner og dendritter. Fordi kulturer hentes fra hjernevev, består de ikke av en enkelt celletype [2].

1.2. Epilepsi

Epilepsi defineres som en nevronal lidelse karakterisert av gjentatte og uforutsette forstyrrelser i normal signalering i hjernen. Dette blir kalt epileptiske anfall. Epilepsi er ikke en bestemt sykdom, men flere tilstander som reflekterer en underliggende hjernedysfunksjon med ulikt opphav [5]. Hjernebarken og hippocampus er to områder som er spesielt utsatt for å sette i gang store synkroniserte fyringer av aktivitet i nevroner og dette forårsaker de fleste former for anfall. Dette gir sterke gjentatte eksitatoriske koblinger som forårsaker en hypereksitabilitet [6]. Epileptiske anfall blir grovt klassifisert som enten fokale (partielle) anfall eller generaliserte anfall. Fokale anfall har oppstart i hjernebarken og deles videre inn i enkle partielle anfall, komplekse partielle anfall og partielle med sekundært generalisert anfall. Denne typen epilepsi er assosiert med lavere grad av bevissthetstap.

Elektrofysiologiske analyser viser at nevroner under fokale anfall får en depolarisering og hyppig firing av aksjonspotensialer som utgjør den essensielle årsaken til anfall [7].

Generaliserte anfall settes i gang av større områder i forhjernen [6], og deles inn i absense anfall (fraværende), myokloniske anfall og tonisk-kloniske anfall. Denne typen er i større

grad assosiert med muskelkontraksjoner, kramper og tap av bevissthet. Et epileptisk anfall oppstår trolig på grunn av en ubalanse mellom inhibitorisk (GABAerge) og eksitatorisk (glutamaterge) synaptisk transmisjon. Dette har blitt vist både i *in vivo* og *in vitro*-studier [7].

Nevroner er avhengig av aerobisk metabolisme på grunn av det høye energiforbruket som kreves for å opprettholde ionegradienter. Hjernen er derfor følsom for selv små forstyrrelser i oksygen- og glukosetilgjengelighet, og et epileptisk anfall som hemmer aerobisk respirasjon kan føre til tidlig tegn til nevronal dysfunksjon [8].

1.3. Antiepileptika og graviditet

Legemidler som benyttes til behandling av epilepsi kalles antiepileptika (AE). Behandling av epilepsi er ofte langvarig, vanligvis livslang. Valg av behandling baserer seg på effektiviteten i å hindre anfall, men også toleransen av behandlingen hos den enkelte pasient [9].

Indikasjonen for AE innebærer ikke lenger kun behandling av epilepsi, men også behandling av nevrologiske og psykologiske tilstander som nevrologiske smerter, migrene og bipolar lidelse. En norsk studie utført i perioden 2004-2007 [10] viste at av all AE forskrevet i Norge, ble 71 % benyttet til behandling av epilepsi, 15 % benyttet til behandling i psykiatriske tilstander, 13 % til nevrologiske smerter og mindre enn 1 % til behandling av migrene og andre tilstander [10].

En del av AE benyttet under svangerskapet er assosiert med økt risiko for misdannelser (teratogene effekter) hos foster. Disse misdannelsene innebærer blant annet strukturelle misdannelser, lav fødselsvekt, dårligere fødselstilstand og atferds- og kognitive vansker, sammenlignet med foster hos kvinner med epilepsi som ikke ble behandlet med AE [9]. Behandlingen anses likevel som svært nødvendig da ukontrollerte anfall kan være skadelig for både mor og foster [11]. 96 % av alle barn eksponert for AE *in utero* viste ingen skadelige effekter og monoterapi ser ut til å være det tryggeste for å unngå teratogene effekter [12]. Karbamazepin, lamotrigin og valproat de tre mest brukte antiepileptiske midlene i Norge [10].

Molekylære mål for eksisterende og potensielle AE involverer spenningsstyrte Na⁺-, K⁺- og Ca²⁺-kanaler, GABA_A-reseptorer, eksitatoriske aminosyrereseptorer, noen enzymer og

synaptiske proteiner. GABA-mimetiske effekter og blokkering av spenningsstyrte natriumkanaler dominerer virkningsmekanismene til AE. GABA er den viktigste inhibitoriske (hemmende) transmittoren i CNS, og selv små forstyrrelser i GABAerg transmisjon kan føre til hypereksitabilitet og patologiske nevronale utladninger [7, 13] (figur 1.1).

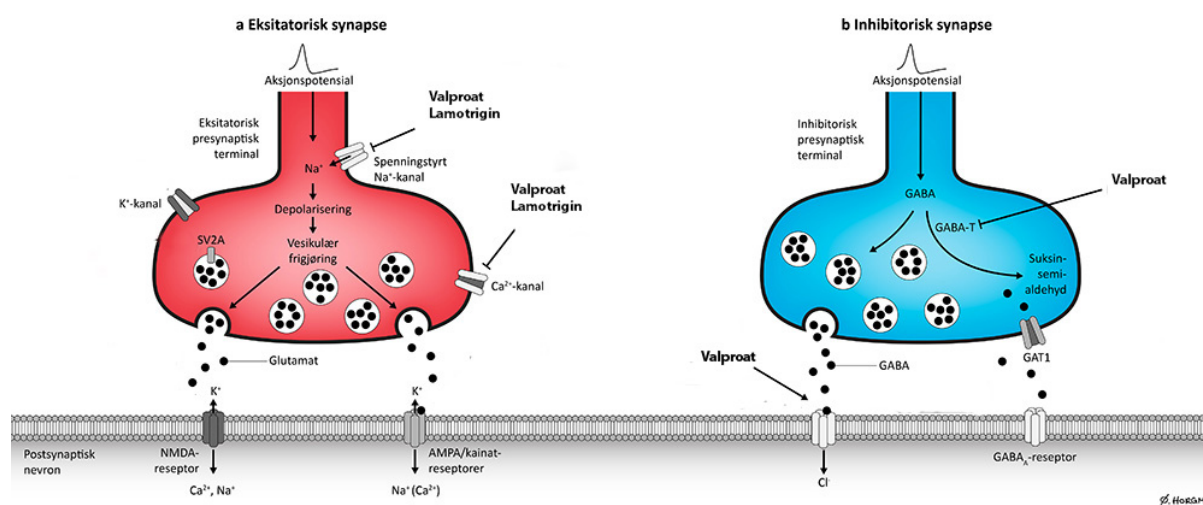
1.3.1. Valproat

Valproat (VPA) er en enkel monokarboksytsyre, kjemisk ubeslektet med andre klasser av AE. VPA er effektiv mot alle typer anfall, med lav toksisitet og uten sedative bivirkninger. Den har et vidt klinisk behandlingsområde og benyttes også i behandling av bipolar lidelse og migreneprofylakse [14].

VPAs virkningsmekanisme er ikke fullstendig klarlagt og VPA anses som et AE med flere mulige mekanismer. I terapeutiske konsentrasjoner vil VPA redusere frekvensen av den gjentatte og hyppige firingen av aksjonspotensialer ved å virke på spenningsstyrte natriumkanaler. VPA modellerer høyfrekvente fyringer uten å påvirke lavfrekvente, da disse spenningsstyrte natriumkanalene krever en gjenvinningsperiode for å fyre i gang igjen [7]. Likt som andre AE fremmer VPA GABA-mediert signalering og gir synaptisk blokkering og reduisering av nevronal eksitabilitet. VPA har ingen direkte virkning på GABAs stimulering av nevronale celler, men det er vist at den øker GABA-konsentrasjoner i hjernen i *in vivo*-studier. Det er vist at VPA stimulerer det GABA-syntetiserende enzymet glutamat dekarboksylase (GAD), og hemmer GABA-metaboliseringsenzymet GABA transaminase (GABA-T) (figur 1.1). Spenningsstyrte t-kalsiumkanaler har også vist redusert aktivitet under eksponering med VPA [13].

De teratogene effektene av VPA er velkjent, og man antar at disse ikke er relatert til den farmakologiske aktiviteten. VPA er en hemmer av histon deacetylaser (HDACer) [15], en familie av enzymer involvert i reguleringen av DNA-transkripsjon. Histoner er positivt ladete proteiner med evne til å binde og pakke DNA til kromatin. Denne tettpakkede kromatinstrukturen med DNA og protein hindrer tilgangen av transkripsjonsfaktorer og gentranskripsjon blir ikke mulig. HDACer er ansvarlige for å deacetylere histoner slik at kromatinstrukturen forblir tettpakket og DNA blir utilgjengelig for transkripsjonsfaktorer. Når VPA hemmer HDAC fører dette til en økt DNA-transkripsjon. HDAC er helt nødvendig

for fosterutvikling, og HDAC-hemmere forårsaker misdannelser trolig på grunn av gentranskripsjon av apoptotiske proteiner [15]. Spesielt nevrالرørdefekter og kognitive vansker er neurologiske teratogene effekter observert hos barn eksponert for VPA under utviklingen [9]. VPA antas å stimulere MAPK/ERK-signalering (se avsnitt 1.5.3). Denne signalveien blir vanligvis aktivert av nevrotrifiner, og er en viktig del i reguleringen av celledifferensieringer, celleoverlevelse og nevroners strukturelle og funksjonelle plastisitet (figur 1.4) [16].



Figur 1.1 Noen av de viktigste virkningsmekanismane til valproat og lamotrigin

Figuren viser en eksitatorisk(a) og en inhibitorisk synapse (b). Valproat hemmer spenningsstyrte Na^+ -kanaler, t-kalsiumkanaler og GABA-T. Lamotrigin hemmer spenningsstyrte Na^+ -kanaler, og kanskje t-kalsiumkanaler. Figuren er modifisert fra [17].

1.3.2. Lamotrigin

Lamotrigin (LTG) viser farmakologiske effekter lik andre AE slik som karbamazepin og fenytoin [14]. LTG binder seg til de inaktiverede konformasjoner av spenningsstyrte natriumkanaler (figur 1.1) som dannes under forlenget depolarisering eller epileptisk utladning [13] og forlenger hvileperioden til natriumkanaler. Dette fører til en hemmet frigjøring av de eksitatoriske aminosyrene (f.eks. glutamat) fordi det reduserer høyfrekvent firing av aksjonspotensialer og stabiliserer de presynaptiske nevronale membraner. Dette gir en reduksjon av eksitatorisk glutamaterg signalering fordi konsentrasjonen av glutamat reduseres i synapsen. LTG viser effektiv hemming av flere typer av epileptiske anfall sammenlignet med lignende AE. I tillegg er det også vist at LTG er effektiv i behandling av nevrologiske smerter og bipolar lidelse, spesielt for å hindre de depressive periodene [7]. Det er varierende konklusjoner om LTG også viser teratogene effekter, og om dette kan være

doserelatert [12, 18]. LTG viser lavere teratogenisitet sammenlignet med VPA, men det bør nevnes at kontroll av epileptiske anfall er dårligere [18].

1.4. Sentralnervesystemet under utvikling

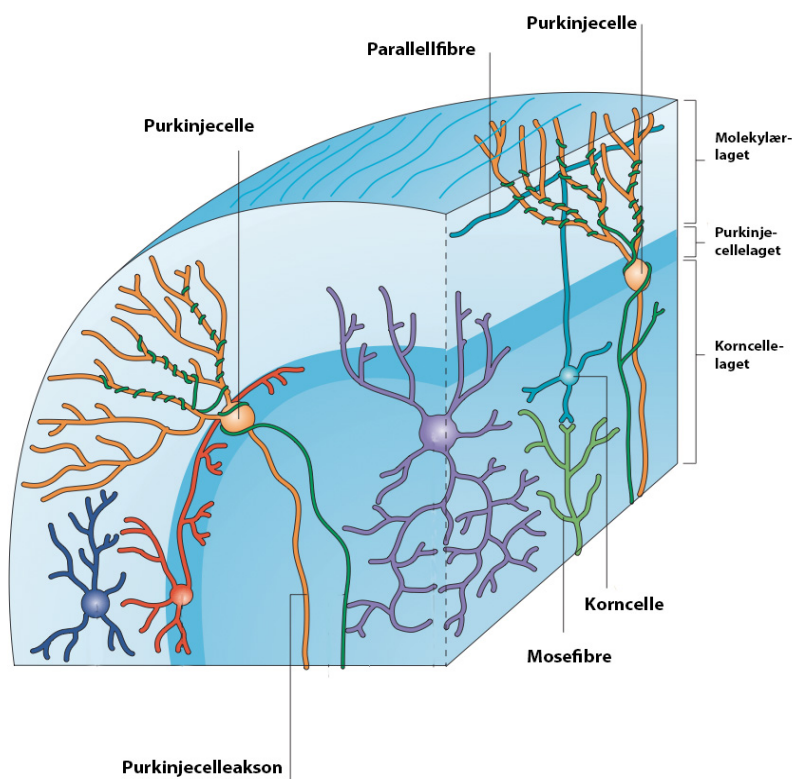
1.4.1. Proliferasjon og differensiering i sentralnervesystemet

Normal utvikling av nervesystemet er en dynamisk prosess som krever et koordinert molekylært og cellulært samarbeid som skjer til riktig tid og på riktig sted i hjernen. De vesentlige cellulære trinnene under utviklingen består av proliferasjon (celledeling), differensiering fra progenitorceller (forløperceller) til nevroner eller gliaceller, migrering til bestemte destinasjoner, dannelse av aksoner og dendritter (for å komme i kontakt med andre celler og vev), synaptogenese (kontaktpunkt med andre celler og vev), myelinering (utført av gliaceller) og programmert celledød [2]. Nervesystemets funksjoner er avhengig av den komplekse strukturen av nevronale nettverk [19]. Proliferasjonen og differensiering av de fleste nevroner starter i nevrallrøret (ventrikulærsonen) og cellene migrerer herfra til bestemmelsessted [20]. Nevroner er spesielt utsatt for skade da alle prosessene i nevroner krever en høy metabolsk kapasitet, som støttes av cellekroppen, og de har en eksitabel membran som raskt depolariserer og repolariserer [8]. Tap av nevroner i sentralnervesystemet er irreversibelt, da modne nevroner er postmitotiske med et dårlig repareringssystem. At nevroner er postmitotiske betyr at nevronene ikke har mulighet til å gå inn i mitose og dele seg til nye celler [21].

1.4.2. Utvikling av lillehjernen

Lillehjernen (cerebellum) er en struktur i hjernen som består av mer enn 90 % korncellenevroner. Disse korncellene er lokalisert under flere lag av lillehjernebark og utgjør den største homogene nevronale populasjonen i hjernen [22]. Lillehjernen er et viktig motorisk koordinasjonssenter i det sentrale nervesystemet (CNS) og er også involvert i kognitive og sensoriske prosesser. Utviklingen av lillehjernen er avhengig av et samspill mellom genetiske faktorer og miljøfaktorer [23]. Lillehjernebarken består av tre lag, molekylærlaget, purkinjecellelaget og korncellelaget [24]. I motsetning til andre nevroner, som stammer fra ventrikulærsonen i nevrallrøret, oppstår korncellene på utsiden av lillehjernen og utgjør et ytre lag kalt det ”ytre germinallaget” (EGL). De første ukene etter fødsel hos menneske og gnagere vil cellene i EGL proliferere til å danne forløperceller

(GCP). Når GCP utvikler seg går de ut av cellyklusen, sender ut aksoner og migrerer gjennom molekylærlaget og purkinjecellelaget innover til sitt endelige bestemmelsessted; det indre korncellelaget (IGL) [20, 24]. Aksonene danner parallelle fibre med kontaktpunkter (synapser) til purkinjeceller under vandringen (se figur 1.2) [20]. EGL forsvinner når korncellene har migrert inn til korncellelaget [23]. Nevrotrofiner, slik som BDNF (se avsnitt 1.5.2), er en av flere ekstracellulære faktorer som er med og styrer differensiering og migrering av korncellene under utvikling [25]. Primære korncellekulturer fra lillehjerne er en godt egnet primærkultur for å studere nevronal utvikling, fordi denne populasjonen er den mest homogene populasjon i hjernen og består hovedsakelig av kornceller [22].



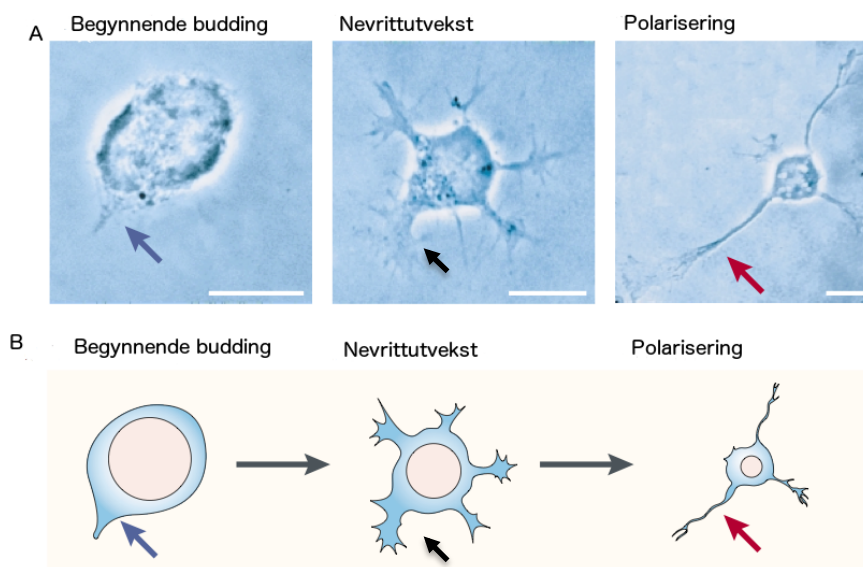
Figur 1.2 Oppbygging av lillehjernebarken (cerebellum cortex)

Lillehjernebarken består av tre lag, molekylærlaget, purkinjecellelaget og korncellelaget. Kornceller oppstår i et ytre lag kalt germinallaget (EGL) på utsiden av molekylærlaget. Korncellene migrerer innover mot sitt endelige bestemmelsessted, korncellelaget, og danner synapser med purkinjeceller på veien. Figuren er en modifisert versjon av figur hentet fra [24].

1.4.3. Nevrittutvekst i nervesystemet

Evnen til å sende ut aksoner og dendritter har blitt sett hos alle nevroner i en hjerne under utvikling [19]. Utspring og forlengelse av nevritter kontrolleres av både indre og ytre faktorer som regulerer moduleringen av cytoskjelett-elementer slik som aktin og tubulin til filamenter

og mikrotubuli. Disse elementene er med på å bestemme lengde og form av nevritter [2]. Evnen til å sende ut og forlenge aksoner og dendritter, til riktig tid og i riktig retning, gir grunnlaget for nevronkommunikasjon og dermed hjernefunksjon. Nevrittutvekst (synaptogenesen) starter ved at den runde formen av cellen brytes og det dannes en sylindrerformet utvekst ("bud") i en prosess kalt "budding" (se figur 1.3). Ekstracellulære matrix-proteiner, slik som adhesjonsmolekylene kollagen og laminin (som binder sammen ekstracellulære matrix med aktin-cytoskjelettet), er nødvendig for remodelering av celleformen før aksonal vekst og navigasjon [19]. Nevroner er polariserte celler som er avhengig av rask remodelering av cytoskjelettet for forlengelse av aksonet [26]. Den sylindrerformede utveksten, har en aktin-kontrollert vekststopp kalt "growth cone". "Growth cone" fylles med membranorganeller og mikrotubuli, som er nødvendig for opprettholdelse av den voksende nevritten, etter at den først har blitt initiert av aktin. Når cellen differensierer og migrerer til bestemmelsesstedet, har aksonet mulighet til å danne synapser med omkringliggende nevroner og vev (måltarget) (figur 1.3) [19].



Figur 1.3 Innledende steg involvert i dannelsen av nevritter

A) Fasekontrastbilder av de innledende steg involvert i nevruttvekst. Celleformen brytes og det dannes en sylindrerformet utvekst kalt "bud" (blå pil), som gir utspring i nevritter. Nevrittene forlenges under differensiering, med morfologisk polarisering av "growth cone" (sort pil) som fører til dannelsen av aksoner (rød pil) og dendritter. B) Skjematisk fremstilling av de samme innledende steg involvert i dannelsen av nevritter. Figuren er en modifisert versjon fra [19].

1.5. Nevrotrofiner og deres reseptorer

Nevrotrofiner hører til en gruppe proteiner i nær familie klassifisert som vekstfaktorer. I nevrotrofin-familien finner vi nervevekstfaktor (NGF), hjernederivert nevrotrofisk faktor (BDNF), nevrotrofin-3 (NT-3) og nevrotrofin-4/5 (NT-4/5) som alle er nødvendige for normal utvikling av nervesystemet fra tidlig embryostadium. Deres oppgave er å bestemme skjebnen til celler som er i differensiering under utviklingen av nervesystemet, fra å være progenitorceller til å bli enten et nevron eller en gliacelle. Under embryonal utvikling stimulerer nevrotrofinene nevrundene til å etablere stabile og korrekte koblinger med måltarget [27]. Nivået av nevrotrofiner og deres reseptorer varierer selektivt under ulike stadier i utviklingen av nervesystemet [28]. Nevrotrofiner syntetiseres av perifere vev eller i postsynaptiske nevroner ("targets") som har evnen til å tiltrekke seg nevrotrofin-sensitiv nevroner. Under utvikling vil en retrograd bølge av nevrotrofiner etableres og transportere proteiner fra targett inn i nerveterminalen, opp aksonet og inn til cellekroppen. De nevronene som etablerer denne kontakten vil overleve, mens de som ikke har det vil gjennomgå programmert celledød. Da nevrotrofiner produseres i begrenset mengde, vil 50 % av nevronene dø under utvikling. Denne begrensningen av nevrotrofiner bidrar derfor til å fremme konkurransedyktige nevroner, og de andre nevroner vil falle bort [29]. Nevrotrofiner syntetiseres som proformer, kalt pronevrotrofiner, som kløyves intracellulært til modne og aktive ligander. Disse pronevrotrofinene har evne til å indusere apoptose via aktivering av deres høyaffinitetsreseptor p75-nevrotrofinreseptor (se avsnitt 1.5.4) [30].

1.5.1. NGF

Den første nevronele vekstfaktoren som ble identifisert var nervevekstfaktor (NGF). Rita Levi-Montalcini [31] viste at NGF har en essensiell rolle i nevrundtvekst i perifere sympatiske nevroner [31]. NGF fremmer celleoverlevelse av sensoriske nevroner under utvikling [28], og opprettholder de perifere sympatiske nevronene [27]. Stimulering med NGF påvirker differensieringen av nevroner ved å regulere forlengelsen av aksonale og dendritiske utløpere. NGF har også evne til å bestemme neurotransmitter-fenotype av sympatiske nevroner ved å regulere nivået av enzymet tyrosin hydroksylase. Tyrosin hydroksylase er det hastighetsbestemmende enzymet i den katekolaminerge biosyntese, og fremmer dermed den noradrenerge fenotype av nevronene. I sentralnervesystemet er nivået av NGF lavt, men NGF spiller likevel en viktig rolle i opprettholdelse av kolinerge nevroner. Det er vist at ved skade kan nevroner reddes fra celledød om de stimuleres med NGF [27].

NGF og dens høyaffinitetsreseptor TrkA uttrykkes fra uke 14-24 etter konsepsjon under utvikling av lillehjernen hos menneskefoster [28].

1.5.2. BDNF

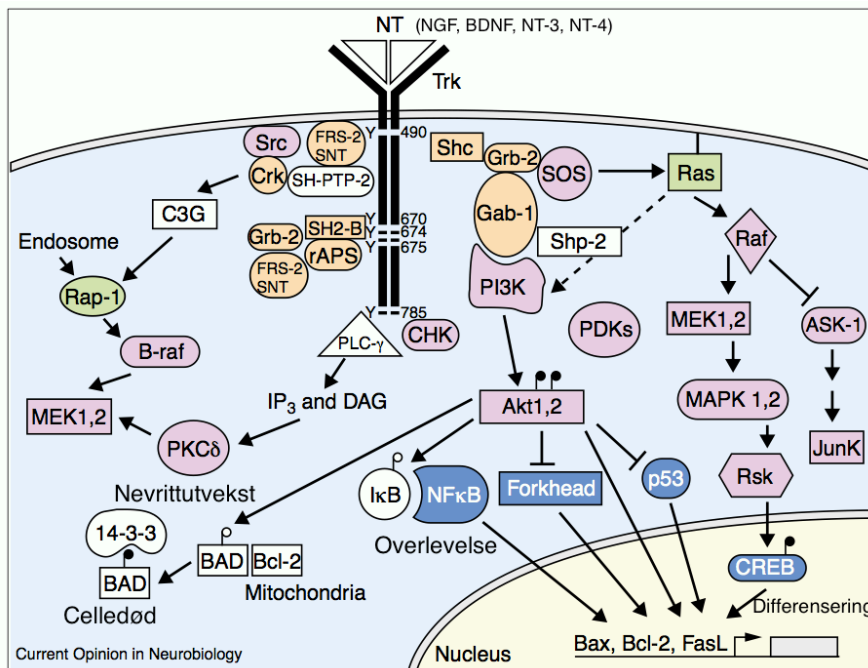
Hjernederivert nevrotrofisk faktor (BDNF) er distribuert i store deler av hjernen, og stimulerer til overlevelse av spesifikke populasjoner av nevroner i CNS. Nyere studier har vist at BDNF også kan påvirke nevronal utvikling og funksjon, inkludert differensiering, dendrittisk vekst, forgrening av nevritter og synaptogenese [27].

Det er interesse for BDNF og dens reseptor TrkB i utviklingen av epilepsi. Studier har vist at ved å påvirke BDNF-signalering kan man forsinke utviklingen av epilepsi. Økte nivåer av BDNF er vist å gi en økt følsomhet for epileptiske anfall. BDNF-uttrykk i hippocampale nevroner antas å indusere morfologiske forandringer, som ligner de morfologiske forandringer sett hos dyr og mennesker med epilepsi. Epileptiske anfall er vist å øke BDNF mRNA og proteinnivå i hippocampus hos voksne mennesker. Det er også observert TrkB reseptoraktivering i mosefibre i hippocampus, etter et epileptisk anfall [32]. BDNF, som andre nevrotrofiner, produseres som pronevrotrofiner (se avsnitt 1.5). ProBDNF kan aktiveres til BDNF av blant annet metallomatriksproteinaser (MMP) og disse er dermed med i reguleringen av aktiveringen av TrkB-reseptor [33].

1.5.3. Signalering mediert via Trk-reseptorer

Biologiske effekter av nevrotrofinene medieres via to distinkte klasser av reseptorer; Tropomyosin reseptor kinase (Trk) familie av tyrosin kinase reseptorer (TrkA, TrkB og TrkC) og p75 nevrotrofin reseptor (p75^{NTR}) fra tumor-nekrosefaktor reseptor familien (TNFr). Nevrotrofinene har spesifikke høyaffinitetsreseptorer i Trk-familien; TrkA er spesifikk for binding av NGF, TrkB har evne til å binde både BDNF og NT-4, og TrkC binder spesifikt til NT-3 (figur 1.4). Trk-reseptorene har en indre kinaseaktivitet, og dimeriserer ved binding av nevrotrofiner. Dimerisering av reseptor tyrosinkinase gir en autofosforylering av spesifikke tyrosinområder [27]. Fosforylering av tyrosiner aktiverer signalering ved å danne bindingssteder for adaptorproteiner. Disse adaptorproteinene kobler Trk-reseptorene til intracellulære signaleringskaskader [34].

Tre adaptorproteinkaskader er godt karakterisert; Ras/ERK (ekstracellulær signaleringsregulert kinase) protein kinase signalvei, PI3K (fosfoinositid 3-kinase) /Akt-kinase signalvei og PLC- γ 1(fosfolipase C- γ 1) signalvei [27, 35] (figur 1.4).



Figur 1.4 Nevrotrofinmediert aktivering av Trk-reseptorer

Figuren viser kompleksiteten av ulike signalveier aktivert ved stimulering av Trk-reseptorer. Gule figurer markerer adaptorproteiner, rosa indikerer kinaser, små G-proteiner er farget grønne og transkripsjonsfaktorer er blå. Figuren er en modifisert utgave av figur fra [35].

Ras er et lite G-protein som aktiverer mitogen aktivert protein kinase (MAPK) signalveien. Dette fører til aktivering av ERK [27], en viktig signalvei aktivert av nevrotofinene, som involverer både differensiering, overlevelse, og strukturell og funksjonell plastisitet av nevrone. Differensieringen reguleres av Ras [35] via aktivering av transkripsjonsfaktorer som CREB, som regulerer uttrykket av en rekke gener [27]. I tillegg viser Ras å fremme nevronal overlevelse via MAPK/ERK, men også PI3K-signalveier. Om nevrotofinaktiveringen resulterer i proliferasjon eller differensiering antas å være regulert av transient versus forlenget aktivering av ERK-signaleringen [35]. Aktivering av Ras er essensielt for normal differensiering av PC12-celler og nevrone [34].

Signalering via PI3K kan aktiveres av Ras eller av lipidprodukter fra membraner (PIP2 fosforyleres til PIP3) generert av PI3K-rekruttering. Dette fører til aktivering av serin-treonin kinase Akt [27, 35].

PLC- γ 1 signalering aktiveres via TrkA-reseptoren. PLC- γ 1 hydrolyserer fosfatidylinositider til å generere diacetylglyserol (DAG) og inositol 1,4,5 trifosfat (IP_3). IP_3 gir frigjøring av Ca^{2+} -lagre og øker konsentrasjonen av Ca^{2+} i cytoplasma. Dette aktiverer en rekke signalveier kontrollert av Ca^{2+} . NGF aktiverer en DAG-regulert proteinkinase, proteinkinase C (PKC)- δ , som er nødvendig for regulering av ERK kaskade og nevruttvekst [34, 35].

1.5.4. Signalering mediert via p75^{NTR}

p75^{NTR} var den første reseptoren det ble identifisert at NGF binder til, og ble opprinnelig karakterisert som en lav-affinitetsreseptor for alle nevrotrofiner [27]. p75^{NTR} er vidt uttrykt gjennom hele utviklingen av CNS, men er kun til stede i få nevronale populasjoner i hjernen hos voksne. p75^{NTR} sin rolle i apoptose er velkjent, men andre cellulære funksjoner av denne reseptoren inkluderer nevruttvekst, cellyklusregulering og myelinering av Schwanns celler (i det perifere nervesystemet), samt regulering av LTD ("long term depression") i hippocampale nevroner [27]. p75^{NTR} har også vist evne til å forsterke NGF-indusert nevruttvekst og cellulær overlevelse. Dette antas å skyldes at p75^{NTR} dimeriserer med og hjelper Trk-reseptorer til å samle eller å øke affiniteten av nevrotrofiner, og da spesielt NGF. Ras/ERK, NF- κ B og Jun N-terminalkinase (JNK) antas å være hoved-nedstrømsfaktorer involvert i p75^{NTR} signalering. Enkelte forskningsgrupper har vist at p75^{NTR} også alene kan aktivere Ras/ERK-signalveien, slik som Trk-reseptorer, og slik regulere nevruttvekst, forlengelse og forgreninger av nevroner [36].

1.6. Markører med effekt på nevruttvekst og differensiering

1.6.1. p53

p53 er en transkripsjonsfaktor først identifisert som et tumor suppressjonsgen. Aktiveringen av denne transkripsjonsfaktoren skjer hovedsakelig etter gentoksisitet og cellulært stress. Gener under kontroll av p53 regulerer responser på skade av DNA, cellyklus, apoptose, angiogenese og cellevekst. I tillegg til sin pro-apoptotiske effekt spiller p53 en viktig rolle i nevronal differensiering, nevruttvekst og aksonal regenerasjon. p53 er vist å regulere både nevronal stamcelleproliferasjon og differensiering under utvikling, og i tillegg regulere cellyklus og transkripsjon involvert i nevrogenesen i nervesystemet hos voksne [26].

Apoptose mediert av p75^{NTR} krever aktivering av p53 gjennom Jun-kinasemediert (JNK) signaleringsveien [34].

Under kontroll av cytoskjelettmodifiseringen i nevroner som følge av nevrotrofiner og andre ekstracellulære signaler, bidrar p53 til å kontrollere nevrifførlengelse og remodellering i umodne og modne nevroner. p53s rolle i nevrifførlengelse og nevronal differensiering har blitt identifisert som nedstrøm for blant annet MAPK-signalveier. Blokkering av p53 transaktiveringskapasitet er vist å blokkere NGF-induserte nevrifførlengelse i PC12-celler. Dette viser et direkte behov for p53 i nevronal differensiering og nevrifførlengelse. Det er vist i luciferaseassay at p53 binder til promotoren og aktiverer transkripsjonen av en rekke cytoskjelett-remodulerende gener, slik som GAP-43, cGKI, Rab13 og Coronin 1b. Uttrykk av det aktinbindende proteinet Coronin 1b, lokalisert i "growth cone", må være til stede og er nødvendig for p53-avhengig nevrifførlengelse [26].

1.6.2. MMP9

Matrix metalloproteinaser (MMPer) er en familie av enzymer som remodellerer det pericellulære miljø, primært ved å kløyve ekstracellulære matriksproteiner. Andre substrater for MMP inkluderer proteiner, vekstfaktorer, cytokiner, celleoverflatereseptorer og celleadhesjonsmolekyler. MMPer viser regional og celledoesifikk uttrykkelse under ulike stadier av hjerneutvikling og bidrar til blant annet synaptisk plastisitet, langtidspotensialet (LTP) og synaptogenese [33, 37]. Gentranskripsjonen av MMP er regulert av en rekke vekstfaktorer, cytokiner og kjemokiner [37]. Kløyvingen av de mange substratene til MMP impliserer regulering av avanserte biologiske prosesser under normale og patologiske tilstander, inkludert embryoutvikling og nevronale sykdommer. Høyere nivå av MMP-uttrykk og enzymatisk aktivitet er observert i flere nevronale sykdommer, og er derfor av interesse innenfor CNS patologi. Hemming av MMP-aktivitet i senere stadier påvirker normal dannelse av lillehjernebarken [33]. Under utvikling er koordinasjonen av nevronal proliferasjon, migrasjon og differensiering regulert av nevron-ekstracellulære matrikskoblinger, og MMPer spiller derfor en viktig rolle under utviklingen både i lillehjernen og resten av sentralnervesystemet [38]. MMPer spiller også en viktig rolle i nevrogenesen relatert til hukommelse og følelser [37].

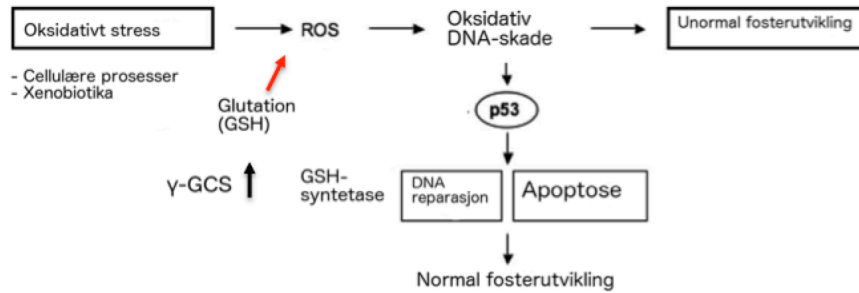
MMP9 (også kjent som gelatinase B) er en av to proteaser som degraderer laminin-spesifikt kollagen i alle vev [38]. MMP9 produseres som et inaktivt proenzym, som blir fullstendig aktivert ved enzymatisk kløyving av et polypeptid. Aktivering av proenzymet er kontrollert av en rekke kaskader. Nevronalt MMP9-nivå er regulert av synaptisk aktivitet [37]. Studier har vist at MMP9 mRNA øker under utvikling av lillehjernen dag 3 og 6 postnalt i rottemodeller, men at den proteolytiske aktiviteten forblir mye lenger. Det er vist at MMP9 har evne til å forsterke NGF-indusert nevrutvekst i PC12-celler [38].

Høye serum- og cerebrospinalvæskeskonsentrasjoner av MMP9 har blitt koblet til epileptiske anfall. Fordi høye nivå av MMP9 er assosiert med nevronal død, forstyrret synaptisk plastisitet og nevronal inflammasjon under epileptogenesen, kan MMP9 være et mulig terapeutisk target i behandling av epilepsi [37].

BDNFs kobling til epileptogenesen kan være regulert av MMP. Høyfrekvent nevronal aktivitet kontrolleres av ekstracellulært proBDNF og moden BDNF via regulering av sekresjonen av ekstracellulære proteaser. Det er vist at neurotrofiner blir kløvet og aktivert av MMPer, og MMP9 er ansvarlig for kløyving av proBDNF til BDNF, og dette resulterer i TrkB-aktivering [33]. Økte BDNF-nivå har som tidligere nevnt vist å øke følsomheten for å utløse et epileptisk anfall i dyreforsøk. Det er også observert morfologiske forandringer i hippocampale nevroner i forsøksdyr, likt de morfologiske endringene som sees hos mennesker og dyr med epilepsi [32].

1.7. Oksidativt stress og glutationsforsvar

Oksidativt stress er en av skademekanismene som kan trigge celledød under utvikling av hjernen. Frie radikaler produseres under normale fysiologiske forhold i cellen. Når det skjer en overproduksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS) og reaktive nitrogenforbindelser (RNS) og kroppen har brukt opp forsvarsmekanismene, fører dette til oksidativt stress [39]. Kjemiske stoffer, f.eks. legemidler, kan også danne frie radikalmolekyler som kan binde seg kovalent til cellulære makromolekyler og forårsake dannelsen av ROS, slik som hydroksylradikaler og superoksider. Oksidativt stress fører til skade av DNA (figur 1.5), proteiner (proteinoksidasjon) og lipider (lipidperoksidasjon). Oksidative makromolekylskader og ROS-mediert forstyrrelse av translasjon kan påvirke fosterutviklingen [40, 41].



Figur 1.5 Oksidativt stress involvert i fosterutvikling

Figuren viser dannelse av oksidativt stress og ROS produksjon forårsaket av cellulære prosesser eller xenobiotika. ROS fører til oksidativ DNA-skade og unormal fosterutvikling. Glutation (GSH) er en av forsvarsmekanismene kroppen har mot oksidativt stress. GSH syntetiseres av γ -GCS og GSH-syntetase. Figuren er en modifisering fra [41].

1.7.1. Glutation og γ -glutamylcystein syntetaser (GCS)

En av kroppens viktigste forsvarsmekanismer mot oksidativt stress er glutation (GSH). GSH reagerer enzymatisk og ikke-enzymatisk med toksiske komponenter og danner glutation-konjugater, og reagerer ikke-enzymatisk med reaktive oksygenforbindelser. GSH syntetiseres intracellulært av γ -glutamylcystein syntetase (GCS, også kjent som glutamatcysteinligase, GCL) og GSH syntetase. Begge enzymene kreves for GSH biosyntese. GSH-nivå styres av en hemmende feedbackmekanisme på GCS, og komponenter som hindrer denne mekanismen er kandidater for å kunne øke cellulære GSH-nivå [42].

1.8. Mål med oppgaven

Hensikten med oppgaven har vært å undersøke om legemidler som potensielt blir benyttet under svangerskap kan påvirke nevruttvekst og nevronal utvikling. Valproat og lamotrigin er to aktuelle antiepileptika til bruk i behandling av epilepsi hos gravide. I oppgaven blir disse legemidlene undersøkt i både PC12-celler (cellelinje for nevroner) og kornceller fra kylling med tanke på nevronal påvirkning.

Delmål:

1. Undersøke effekter på nevruttvekst i PC12-celler forårsaket av antiepileptika og nevrotrofinene NGF og BDNF, og videre se om nevruttveksten er mediert via nevrotrofin-reseptorene TrkA og TrkB.
2. Undersøke om legemiddeleffekten av lamotrigin og valproat kan påvirke aktiviteten og proteinuttrykk av p53 og MMP9, to proteiner koblet til nevruttvekst i nevroner. Dette ble studert ved bruk av metoder som luciferaseassay og westernblotting.
3. Undersøke effekter av MMP9-hemmer på nevruttvekst og nettverksdannelse i kyllingkornceller hentet fra lillehjernen hos kylling.
4. Undersøke om legemidlene kan påvirke antioksidantforsvaret i PC12-celler ved bruk av GCS som markør i luciferaseassay.

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 Co., St. Louis, USA
Akrylamid 30 % BIS solution	Bio-Rad, California, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
ANA-12	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Basal Medium Eagle (BME)	Life Technologies™ Gibco, USA
BCA Protein Assay Kit, Pierce®	Thermo Scientific Rockford, USA
BDNF (hjernerderivert nevroτροφisk faktor)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovint serumalbumin (BSA) (A9418)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromfenolblå	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
CaCl ₂ (kalsiumklorid)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Deoksyribonuklease I (DNase I) (D5015)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	Invitrogen Co., California, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Donkey-anti rabbit (SC2313)	Santa Cruz Biotechnology
Dual-luciferase Reporter Assay system	Promega Corporation, USA
Etanol 96 % (EtOH)	Kemetyl Norge AS
Føtalt kalveserum (FBS)	Lonza Group, Sveits
Glukose	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Glutamin (L-glutamin)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Glyserol	VWR International Ltd., England
GW 441756	Tocris Bioscience, UK
HCl (hydrogenklorid)	VWR International Ltd., England
Hesteserum (HS)	Gibco BRL Life Technologies Ltd Paislet, Skottland

Insulin, fra bovint pancreas (91882)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Isopropanl	Kemetyl Norge AS
KCL (Kaliumklorid)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenfosfat)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Kyllingserum	Life Technologies™ Gibco, USA
Lamotrigin	Tocris Bioscience, R&D Systems, Minneapolis, USA
Leupeptin (LP)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
LM22A-4	Tocris Bioscience, UK
Luciferin (D-luciferin)	Duchefa Biochemistry, Nederland
Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Luminata™ Forte Western HRP Substrate	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
mAb to Lamin A/C	Alexis Biochemicals, Sveits
2-merkapttoetanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
MES (2-(N-morpholino)etansulfonsyre)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Metafectene® Pro	Biontex laboratories, Tyskland
Metanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Mg(CH ₃ COO) ² (Magnesiumacetat)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
MMP9-inhibitor I	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
NaCl (Natriumklorid)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
NaHCO ₃ (Natriumhydrogenkarbonat)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O (Dinatriumhydrogenfosfatdihydrat)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
NaOH (Natriumhydroksid)	J.T. Baker, Nederland
Na ₂ SeO ₃ (Natriumselenitt)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumpyruvat (100 mM)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Na ₃ VO ₄ (Natriumortovanadat)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
NGF (nervevekstfaktor)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Invitrogen Co., California, USA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
PMSF (Phenylmetansulfonmylflourid)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Poly-L-lysin hydrobromid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ponceau S fargeløsning	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Precision Plus Protein™ All Blue Standard	Bio-Rad, California, USA
Putrescin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Rbt X Rat MMP9	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA
SDS (Natrium dodecyl sulfat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TEMED (N,N,N',N'-tetrametylenediamin)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Transferrin (humant)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tri-jodid-L-tyronin-natriumsalt (T ₃)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tris-base (tris[hydroksymetyl]aminometan)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tris/glycin, 10X (buffer)	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Tris/glycin/SDS, 10X (buffer)	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypsin (bovin) (T9201)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypsinhemmer (soyabønne)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tween 20 (polyoksyetylen sorbitan monolaurat)	Calbiochem, California, USA
Tørrmelk	Normilk AS Levanger, Norge
Valproat (2815)	Tocris Bioscience, R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabell 2.2. Utstyr

Produkt	Leverandør
Autoklav (Matachana 350 L-2)	Thune, Norge
Brett, 96-brønner	Nunc™, Thermo Scientific, USA
Cellekulturflasker 75 cm ²	Nunc™, Thermo Scientific, USA
Cellekulturskåler	Nunc™, Thermo Scientific, USA
Celleskrape	Corning Incorporated, USA
CO ₂ -inkubatorskap	Thermo Scientific, Rockford, USA

Elektroforeseapparat (Power Pac 300)	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Finnpipette	Thermo Scientific Rockford, USA
Fluorescensmikroskop (Eclipse TE 300 med SPOT RT)	Nikon, Japan
Fremkallingsmaskin (Chemi Genius2)	Bio Imaging System, Frederick, USA
Gassbrenner (Fireboy)	Integra Bioscience, Sveits
Kamera, mikroskop (Digital Sight DSQi1Mc,)	Nikon Digital Sight DSQi1Mc, 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
Magnetrører	RCT basic, IKA Labortechnik, Tyskland
Nitrocellulosemembran	Bio-Rad, California, USA
pH-meter (Metrohm 744)	Metrohm, Sveits
Pipetboy	Integra Biosciences Zizers, Sveits
Pipetter (sterile)	Corning Incorporated Corning, USA
Pipettespisser	Sartorius Biohit, Finland
Plasmid-kit (Jetstar Maxiprep Kit 105)	Genomed, Tyskland
Plateleser (HTS 7000 Plus Bio-Assay)	Perkin Elmer, USA
Roller mixer SRT9	Stuart, USA
Rugermaskin: Brinsea Ova-Easy Advance	Sandford, UK
Rør til luminometer	Sarstedt, Tyskland
Sentrifuge Kubota 2000 (13000 rpm = 10 000 x g)	Biofuge fresco, Heraeus, England
Sentrifugerør	Corning Incorporated Corning, USA
Sterilfilter 0,2 µm	Whatman, Tyskland
Støpeformer til westernblotting (Mini-PROTEAN®)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Tellekammer	Bürcher
Trysineringsflaske	Bellco, USA
Vannbad (Sub Aqua 12,)	Grant, England
Vekt AB54-S	Mettler Toledo, USA
Wirl-mikser: MS2 Minishaker	Tamro lab AS, Sverige

2.2. PC12-celler

2.2.1. PC12-celler som modell

PC12-cellelinjen ble første gang isolert fra et feokromocytom i binyremargen hos rotte i 1976 [4]. PC12-celler har evne til å lagre og syntetisere både dopamin og noradrenalin som frigjøres under depolarisering ved kalsiumavhengige mekanismer. Under stimulering med nervevekstfaktor (NGF) har cellene evne til å differensiere. De avslutter celledeling og endrer fenotypen til å ligne sympatiske nevroner med lange nevronale fibre [43]. Dette har ført til at PC12-cellelinjer er mye brukt i forskning rundt biologiske prosesser under nevronal utvikling.

2.2.2. Splitting av PC12-celler til flaske

PC12-celler dyrkes i cellekulturflasker som inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO₂ og splittes til nye flasker hver 3. eller 4. dag for vedlikehold, med følgende prosedyre:

1. Cellekulturflasken inspiseres i et mikroskop for å se om cellene er konfluente.
2. Gammelt medium tømmes av.
3. 10 ml nytt PC12-medium tilsettes flasken (tabell 2.3).
4. Flasken bankes hardt på sidene for at cellene skal løsne fra flaskens bunnflate.
5. Flasken inspiseres i mikroskop for å se om cellene har løsnet.
6. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned for å bryte opp celleaggregater (ca. 10 ganger). Cellesuspensjonen kan også etter behov pipetteres med en innsnevret pasteurpipette som er smeltet smalere ved hjelp av gassbrenner. Det er viktig at alle celleaggregater blir brutt opp.
7. Cellene inspiseres i lysmikroskop for å undersøke om det er oppnådd en homogen cellesuspensjon bestående av enkeltceller.
8. 1,5 ml cellesuspensjon og 20 ml PC-12 medium (se tabell 2.3) overføres til en ny flaske og tilbake til gammel flaske. Flaskene settes til inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.2.3. Splitting av PC-12 celler til skåler

1. Trinn 1-7 i Prosedyre for splitting av PC-12 celler til flaske (se avsnitt 2.2.2) utføres.
2. En liten prøve av celleduspensjonen tas ut for telling. Celleduspensjonen kan fortynnes før telling dersom flasken har stått lenge og celledettheten er høy.
3. Fire rutenett (4 x 4 ruter) telles, to på hver side av midten i et Bürcher tellekammer. Gjennomsnittet av disse tellingene brukes.
4. Ønsket celledetthet i skålene varierer ut fra hvilket forsøk som skal utføres (tabell 2.4). Mengden celleduspensjon som skal brukes beregnes med formelen

$$X (ml) = \frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{ønsket celledetthet per ml}}{\text{celledetthet i celleduspensjonen} \times 10^4}$$

Antall milliliter per skål varierer ut fra skålens størrelse/diameter (tabell 2.7).

5. For å beregne mengde medium som skal benyttes brukes formelen:

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

6. Beregnet mengde celleduspensjon og PC12 medium (tabell 2.3) blandes godt i en erlenmeyerkoble og overføres til sterile skåler. Dersom små skåler skal stå lenger enn 48 timer bør 1 ml ekstra PC12-medium (tabell 2.3) tilsettes skålen for å unngå at cellene tørker ut.

Tabell 2.3 PC12 medium

Komponenter	Mengde
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 ml
Føtalt Kalveserum (FBS) (se tabell 2.6)	50 ml
Hesteserum (se tabell 2.6)	25 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
Penicillin-streptomycin (10 000 U/ml – 10 mg/ml)	5 ml

Tabell 2.4 Ønsket celletetthet PC12

Metode	Skålstørrelse	Celletetthet
Mikroskopering (avsnitt 2.4)	Små og medium	1,7 x 10 ⁴ celler/ml
		3,5 x 10 ⁴ celler/ml
		7,0 x 10 ⁴ celler/ml
Luciferase (avsnitt 2.6)	Små	7,0 x 10 ⁴ celler/ml
Western blot (avsnitt 2.8)	Store	7,0 x 10 ⁴ celler/ml

Tabell 2.5 Samlet mengde cellesuspensjon og medium per skål

Skål	Størrelse	Mengde
Liten	8,8 cm ²	1 ml (+ 1 ml ekstra medium)
Medium	21,5 cm ²	3,3 ml
Stor	66,5 cm ²	10 ml

Tabell 2.6 Oversikt over serum brukt til PC12 celler

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

2.2.4. Eksponering av PC12-celler

Eksponering av PC12-cellene ble utført 24 timer etter splitting og utsåing. Små (8,8 cm²) skåler ble brukt til morfometrisk analyse, transfeksjon, deteksjon av celledød og høsting av celler til luciferase. Medium skåler (21,5 cm²) ble brukt til morfometrisk analyse med mikroskop og westernblotting. Store skåler (66,5 cm²) ble brukt til høsting av celler til westernblotting. Skålene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 48 eller 72 timer. Ved morfometrisk analyse ble forsøkene utført blindet ved at skålene fikk tildelt et randomisert tall hentet fra et randomiseringsverktøy (en tilfeldig randomiseringskalkulator fra internett). Blindingen ble gjort i samarbeid med masterstudent Karina Borgund, hvor en hadde ansvar for å markere skåler og den andre hadde ansvar for mikroskoperingen.

Reagenset ble tilsatt forsiktig på kanten av skålen for å unngå at cellene løsnet. Deretter ble skålen vippet forsiktig for å fordele reagenset i ernæringsmediumet (tabell 2.3). TrkA-

hemmeren GW441756 og TrkB-hemmeren ANA-12 ble tilsatt 15 minutter før eksponering med vekstfaktor eller legemiddel i skåler hvor disse ble kombinert. Eksponeringer til de ulike forsøkene er vist i tabeller under (tabell 2.7-2.9).

Tabell 2.7 Eksponering av PC12-celler anvendt til westernblotting, transfeksjon og luciferase (Avsnitt 2.8, 2.5 og 2.6)

Stockløsning	Sluttkonsentrasjon i skål
Ubehandlet	
NGF 20 µg/ml	50 ng/ml
Valproat 50 mM	50 µM
Valproat 0,1 M	500 µM
Valproat 0,1 M	1000 µM
Lamotrigin 50 mM	50 µM
Lamotrigin 0,1 M	500 µM
Lamotrigin 0,1 M	1000 µM
Valproat 50 mM + NGF 20 µg/ml	50 µM + 50 ng/ml
Valproat 0,1 M + NGF 20 µg/ml	500 µM + 50 ng/ml
Valproat 0,1 M + NGF 20 µg/ml	1000 µM + 50 ng/ml
Lamotrigin 50 mM + NGF 20 µg/ml	50 µM + 50 ng/ml
Lamotrigin 0,1 M + NGF 20 µg/ml	500 µM + 50 ng/ml
Lamotrigin 0,1 M + NGF 20 µg/ml	1000 µM + 50 ng/ml

Tabell 2.8 Eksponering av PC12-celler anvendt til deteksjon av celledød (avsnitt 2.7)

Stockløsning	Sluttkonsentrasjon i skål
Ubehandlet	
NGF 20 µg/ml	50 ng/ml
Lamotrigin 50 mM	50 µM
Lamotrigin 0,1 M	500 µM
Lamotrigin 0,1 M	1000 µM
Valproat 0,1 M	1000 µM
Lamotrigin 50 mM + NGF 20 µg/ml	50 µM + 50 ng/ml
Lamotrigin 0,1 M + NGF 20 µg/ml	500 µM + 50 ng/ml
Lamotrigin 0,1 M + NGF 20 µg/ml	1000 µM + 50 ng/ml
Valproat 0,1 M + NGF 20 µg/ml	1000 µM + 50 ng/ml

Tabell 2.9 Eksponering av PC12-celler anvendt til mikroskopering (avsnitt 2.4)

Stockløsning	Sluttkonsentrasjon i skål
Ubehandlet	
NGF 20 µg/ml	50 ng/ml
BDNF 0,1 µg/µl	100 ng/ml eller 300 ng/ml (0,3 ng/µl)
DMSO	1 ‰
Valproat 0,1 M	500 µM
Valproat 0,1 M + BDNF 0,1 µg/µl	500 µM + 100 ng/ml
Valproat 0,1 M + ANA-12 10 mM	500 µM + 10 µM
Valproat 0,1 M + GW441756 10 mM	500 µM + 10 µM
Lamotrigin 1 mM	1 µM
Lamotrigin 0,1M	500 µM
Lamotrigin 0,1M + BDNF 0,1 µg/µl	500 µM + 100 ng/ml
Lamotrigin 0,1M + ANA-12 10 mM	500 µM + 10 µM
Lamotrigin 0,1M + GW441756 10 mM	500 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 μ M
GW441756 0,1 mM	0,1 μ M
GW441756 1,0 mM	1 μ M
GW441756 10 mM	10 μ M
ANA-12 0,1 mM + BDNF 0,1 μ g/ μ l	0,1 μ M + 100 ng/ml
ANA-12 1,0 mM + BDNF 0,1 μ g/ μ l	1 μ M + 100 ng/ml
ANA-12 10 mM + BDNF 0,1 μ g/ μ l	10 μ M + 100 ng/ml
ANA-12 50 mM + BDNF 0,1 μ g/ μ l	100 μ M + 100 ng/ml
GW441756 0,1 mM + BDNF 0,1 μ g/ μ l	0,1 μ M + 100 ng/ml
GW441756 1,0 mM + BDNF 0,1 μ g/ μ l	1 μ M + 100 ng/ml
GW441756 10 mM + BDNF 0,1 μ g/ μ l	10 μ M + 100 ng/ml
ANA-12 0,1 mM + NGF 20 μ g/ml	0,1 μ M + 50 ng/ml
ANA-12 1,0 mM + NGF 20 μ g/ml	1 μ M + 50 ng/ml
ANA-12 10 mM + NGF 20 μ g/ml	10 μ M + 50 ng/ml
ANA-12 50 mM + NGF 20 μ g/ml	100 μ M + 50 ng/ml
GW441756 0,1 mM + NGF 20 μ g/ml	0,1 μ M + 50 ng/ml
GW441756 1,0 mM + NGF 20 μ g/ml	1 μ M + 50 ng/ml
GW441756 10 mM + NGF 20 μ g/ml	10 μ M + 50 ng/ml
LM22A-4 1000 μ M	1000 nM
LM22A-4 100 μ M	100 nM
LM22A-4 10 μ M	10 nM

2.3. Kyllingkornceller

2.3.1. Korncellekulturer

Primærkulturer av kornceller fra lillehjernen hos både rotte, mus og kylling er en god *in vitro* modell for å studere aspekter som utvikling, funksjon og patologisk nevrobiologi. Mer enn 90 % av lillehjernens nevroner er kornceller, noe som gjør denne populasjonen av nevroner meget homogen [22].

Coating av skåler og preparering av kyllingkornceller ble utført av stipendiater, ingeniør og post.doc på instituttet og prosedyrene ble kun observert.

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 veksten av cellene.

Prosedyre for coating av skåler:

1. 5 mg poly-L-lysin løses i 10 ml MQ-vann.
2. Løsningen overføres til en steril erlenmeyerkolbe og fortynnes til en konsentrasjon på 0,01 mg/ml i 500 ml MQ-vann. Sørg for at all poly-L-lysin løsning er blandet godt.
3. 1 ml av poly-L-lysin-løsningen tilsettes små skåler (8,8 cm²), 2 ml tilsettes medium skåler (21,5 cm²) og 5 ml tilsettes store skåler (66,5 cm²). Skålene beveges for at hele overflaten skal dekket 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 Samvirkekylling i Våler. Eggene oppbevares kjølig i inntil 7 døgn før de legges i rugemaskinen. Rugemaskinen har en konstant temperatur på 37-39 °C og 45 % luftfuktighet som opprettholdes med en automatisk vannpumpe. Eggene vendes kontinuerlig fra dag 0. På dag 7 gjennomlyses eggene og ubefruktede egg fjernes. Eggene tas ut av rugemaskinen på dag 17-18. Normal klekketid er 20-24 døgn. Eggene gjennomlyses og døde kyllingfostre fjernes. 10-20 % av eggene er enten ubefruktet eller døde.

Preparering av korncellekulturer foregår i LAF-benk med sterilt utstyr (tabell 2.10).

Tabell 2.10 Sterilt utstyr til preparering av korncellekulturer fra kylling

Skalpell

Saks og buet pinsett til disseksjon av hjernen

Rette pinsetter til å fjerne hjernehinne

Glassflasker til løsningene 1-5 (tabell 2.9)

Trypsineringsflasker

50 ml plastrør

Pipetter

Pasteurpipetter

Målesylinder

Erlenmeyerkolbe

Petriskåler

2.3.4. Prosedyre for preparering av korncellekulturer fra kylling

1. Eggene legges på is i 7 minutter for å bedøve kyllingfostrene i puljer på 6-7 egg.
2. Ett egg av gangen tas av is og vaskes raskt i 70 % etanol.
3. Eggene knuses i store sterile petriskåler, og kyllingfostrene avlives ved 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 2.11).
5. Hjernehinne fjernes fra lillehjernene ved hjelp av pinsetter og lillehjernene legges i en ny stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.11).
6. Løsning 1 (tabell 2.11) suges av. Lillehjernene samles på midten av skålen og kuttes i mindre biter vinkelrett på hverandre. 10 ml av løsning 1 (tabell 2.11) 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 en Kubota 2000 sentrifuge 1 minutt.
8. Supernatant fjernes og pelleten tilsettes 8-15 ml av løsning 2 (tabell 2.11). 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 skrues helt til.

10. Cellebiter fra trypsineringsflasken suges opp og overføres til et sterilt 50 ml rør med 15 ml av løsning 4 (tabell 2.11). 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 2.11) og sentrifugeringen gjentas.
12. Supernatant fjernes og røret tilsettes 3 ml av løsning 3 (tabell 2.11).
13. Pelleten pipetteres opp og ned med en steril pipette et tilstrekkelig antall ganger for å homogenisere cellesuspensjonen. 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 15 ml av løsning 5 (tabell 2.11).
15. 2 ml av løsning 3 (tabell 2.11) 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 2.13) tilsettes røret.
17. Pelleten løses i mediet og cellesuspensjonen 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 (tabell 2.13) for hver kyllinglillehjerne. Løsningen blandes godt.
18. En liten del av cellesuspensjonen overføres til et Bürcher tellekammer.
Cellesuspensjonen fortynnes med cellemedium slik at cellene som plates ut har en tetthet på $1,7 \times 10^6$ - $1,9 \times 10^6$ celler/ml. I små skåler bør celletettheten være $1,9 \times 10^6$ celler/ml da det fra erfaring dør mange celler det første døgnet. Følgende formel benyttes for å bestemme mengde platemedium med serum som trengs:

Mengde medium (ml)

$$= \frac{\text{antall ml cellesuspensjon} \times \text{celletetthet per ml cellesuspensjon}}{1,9 \times 10^6}$$

19. Cellesuspensjonen overføres til sterile skåler coatet med poly-L-lysin nevnt i delkapittel 2.3.2. Mengde cellesuspensjon i liten skål ($8,8 \text{ cm}^2$) er 1 ml.
20. Skålene inkuberes ved 37°C og 5 % CO_2 .

21. Mediumet i skålene erstattes med nytt definert ernæringsmedium uten serum (tabell 2.14) etter 24 timer (DIV1 - dager in vitro 1). Dette har vist seg å gi optimale vekstforhold og bedre resultater.

Tabell 2.11 Løsninger anvendt til preparering av korncellekulturer

Løsning	Komponenter	Mengde
Løsning 1	Bovint serumalbumin (BSA)	1,50 g
	Krebs-Ringer-løsning, 10X (tabell 2.12)	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

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

Tabell 2.12 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 2.13 Platemedium med serum anvendt til korncellekulturer fra kylling

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
Varmeaktivert kyllingserum (tabell 2.15)	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

- Mediumet sterilfiltreres (0,2 µm)
- Oppbevares ved 2-8°C
- *5,4 mg er allerede til stede i mediet

Tabell 2.14 Definert ernæringsmedium til korncellekulturer fra kylling

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
L-glutamin	146 mg	2 mM
KCl	825 mg *	22 mM
Penicillin- Streptomycin (10 000 U/ml- 10mg/ml)	5 ml	100 U/ml-0,1 mg/ml
Humant transferrin	50 mg	100 µg/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

- T₃ og natriumselenitt tilsettes fra stamløsninger
- Sterilfiltreres (0,2 µm) før bruk.
- Oppbevares kjølig
- *5,4 mg er allerede til stede i mediet

Tabell 2.15 Oversikt over serum anvendt til korncellekulturer fra kylling

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

2.3.5. Eksponering av kyllingkornceller

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 morfometrisk analyse i mikroskop. Celler som ble brukt i luciferaseassay ble transfektert 24 timer etter utplating, eksponert 28 timer etter utplating og inkubert i 48 timer etter eksponering før høsting av celler og måling av luciferase. Oppsettet er vist i tabell 2.16 - 2.17.

Tabell 2.16 Oppsett for eksponering av kornceller anvendt til måling av luciferase

Eksponering

- Ubehandlet
- Lamotrigin 1000 μM
- Lamotrigin 500 μM
- Lamotrigin 50 μM
- Valproat 1000 μM
- Valproat 500 μM
- Valproat 50 μM

Tabell 2.17 Oppsett for eksponering anvendt til kvalitativt analyse av kyllingkornceller i mikroskop

Eksponering

- Ubehandlet
- DMSO
- MMP9-hemmer 100 nM
- MMP9-hemmer 10 nM
- MMP9-hemmer 1 nM

2.4. Morfometrisk analyse i mikroskop

PC12-celler ble platet ut i små ($8,8\text{cm}^2$) eller medium ($21,5\text{ cm}^2$) skåler og inkubert ved 37°C og 5% CO_2 i 24 timer før eksponering. PC12-cellene ble studert og tatt bilde av, 72 timer etter eksponering, med et Nikon Eclipse TE 300 fluorescensmikroskop og et Nikon Digital Sight DS-Qi1Mc kamera koblet til mikroskopet. Bilder ble tatt i forstørrelsene 10X, 20X og 40X. Analyseringen ble gjort med programmet NIS-Elements BR fra Nikon.

Morfometrisk analyse er en kvantitativ metode for å beskrive form og størrelse, og morfometriske endepunkt bestemmes på forhånd.

Det ble tatt bilder av Fem ulike synsfelt i skålen. Områdene var tilfeldig utvalgt. Hvis cellene lå for tett, eller det ikke var celler i det tilfeldig utvalgte synsområde, ble et nytt område brukt

til kvantifisering. Morfometrisk analyse ble utført på syv endepunkter på bilder tatt ved 40X forstørrelse.

Endepunkt for morfometrisk analyse (se figur 2.1)

1. Celleantall

Totalt antall celler i synsfeltet. Løse celler ble ikke talt. Cellen ble telt når hele cellekroppen og nevritter var synlig i synsfeltet. Celletallet er anvist med tall i figur 2.1.

2. Andel celler med nevritter

Andel celler med nevritter av totalt antall celler. En nevrutt må være lengre enn den er bred. Nevritter er anvist med hvit pil i figur 2.1.

3. Antall nevrutter per celle med nevrutt – angitt som ”Antall nevrutter per celle” i figurene.

Totalt antall nevrutter delt på antall celler med nevrutt.

4. Andel ”knoppceller ”

Andel knoppceller av totalt antall celler. En ”knoppcelle” er en egendefinert celleform hvor cellen har fem eller flere ”utstikkere”. Disse utstikkene kan ikke klassifiseres som nevrutter da de ikke er lengre enn de er brede, men kan være et tidligere stadium (”budding”, se avsnitt 1.4.3) av en nevrutt. Utstikkere er angitt med sort pil i figur 2.1.

5. Andel celler med lange nevrutter

Andel celler med lange nevrutter av totalt antall celler. En nevrutt ble klassifisert som lang når nevrutten var lengre enn den gjennomsnittlige diameter på cellekroppen.

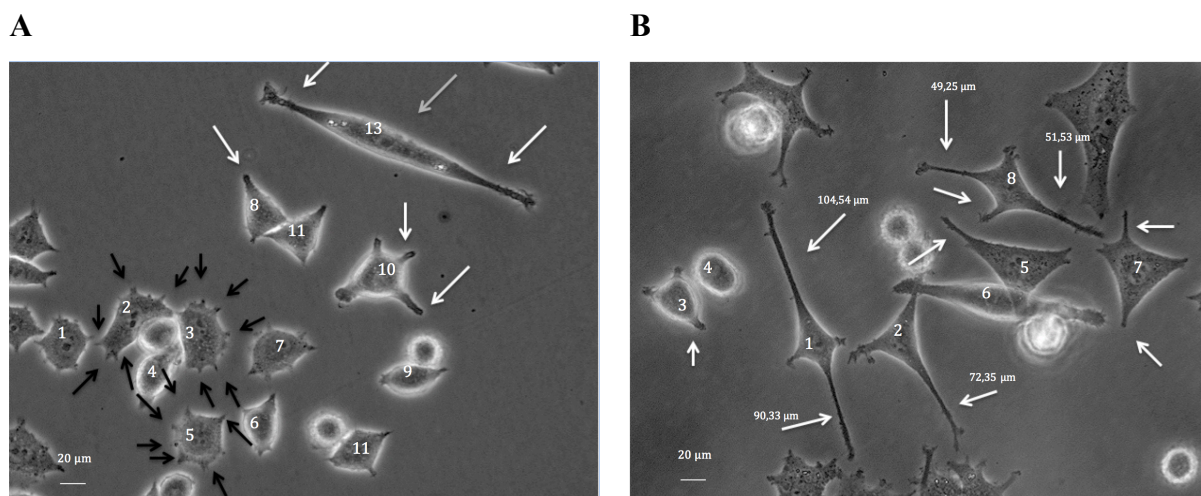
6. Nevrittlengde per celle

Totalt nevruttlengde delt på totalt antall celler. Det ble kun målt nevruttlengde på de nevruttene som ble ansett som lange.

7. Andel ”spydliggende celler”

Andel spydceller av totalt antall celler. En ”spydcelle” er en egendefinert beskrivelse

av PC12-celler når cellene hadde avlang form med to karakteristiske spisser 180° på hverandre. “Spydceller” er anvist med grå pil i figur 2.1.



Figur 2.1	Antall celler	Andel celler med nevrutt	Antall nevrutter per celle med nevrutt	Andel “knoppceller”	Andel celler med lange nevrutter	Nevritt lengde per celle målt i µm	Andel “spydceller”
A	13	3/13	5/3	3/13	0/13	-	1/13
B	8	6/8	10/6	0/8	3/8	(90,33+104,54+72,35+51,53+49,25 µm)/8	0/8

Figur 2.1 Eksempler hentet fra morfometrisk analyse av PC12-celler

PC12-celler eksponert og tatt bilde av 72 timer etter eksponering med et fluorescensmikroskop. Bildene er tatt under fasekontrast med 40X forstørrelse og er hentet fra NGF-eksponerte PC12-celler. A) Cellene er nummerert fra 1-13. Celle 13 er definert som en ”spydcelle” og er merket med grå pil. Celle 2, 4 og 5 er ”knoppceller” og sort pil markerer utstikkere. Nevritter er markert med hvite piler, og celle 8, 10 og 13 har nevrutter. B) Cellene er nummerert fra 1-8. Celle 1, 2, 3, 5, 7 og 8 har nevrutter, og celle 1,2 og 8 har lange nevrutter. Lengden på nevritten er angitt ved pilen.

Kyllingkorncellene ble platet ut på små skåler (8,8 cm²). Korncellene ble ikke analysert etter samme endepunkter som PC12-celler da denne celletypen er mindre egnet til morfometrisk analyse. Et helhetlig inntrykk av nettverksdannelse og celletetthet ble kvalitativt vurdert. Kyllingkorncellene ble studert og tatt bilde av etter 48 timer etter eksponering ved hjelp av Nikon Eclipse TE 300 fluorescensmikroskop og Nikon Digital Sight DS-Qi1Mc kamera som er koblet til mikroskopet. Det ble tatt bilder i forstørrelsene 10X og 20X.

2.5. Transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller

Transfeksjon er en prosess hvor genetisk materiale blir introdusert inn i celler via ikke-virale eller virale metoder. Introduksjon av plasmid, inneholdende en promotor for ønsket protein koblet til et reporter-gen, gjør det mulig å måle endringer i transkripsjon og proteinuttrykk i cellen (forårsaket av for eksempel ulike stimuli).

Transfeksjonen ble utført ved hjelp av transfeksjonsreagenset Metafectene® Pro, 24 timer etter at cellene ble splittet ut på skåler. Dette er en form for ikke-viral transfeksjon. Metafectene® Pro er et polykationsk liposomalt transfeksjonsreagens bestående av polyaminlipid som kationgruppe i kombinasjon med hjelpelipider [44]. Kationske transfeksjonsreagenser har vist seg å ha høy transfeksjonseffektivitet og har evne til å transfektere alle typer nukleinsyrer. I kontakt med nukleinsyrer vil det dannes komplekser, kalt lipoplekser, bestående av de kationiske liposomene fra Metafectene® Pro og nukleinsyrene i DNA fra plasmidløsningen. Lipopleksene har en positivt ladet overflate og binder seg dermed til den negativt ladede celleoverflaten via ikke-spesifikke, elektrostatiske interaksjoner. Komplekset tas opp i cellen via endocytose eller endocytose-lignende mekanismer. Inne i cytosol vil lipopleksene gå i oppløsning og frigjøre plasmidet. Plasmidet går inn i cellekjernen hvor det blir tilgjengelig for transkripsjon [45].

DNA-mengden i transfeksjonsløsningen bestod av 0,8 µg/ml plasmid og 0,2 µg/ml renilluciferaseplasmid som internkontroll per milliliter celleduspensjon (tabell 2.18 og tabell 2.19).

På grunn av fare for inaktivering av transfeksjonsreagenset, celledød og destabilisering av liposom-DNA-komplekset må det benyttes DMEM som er fritt for penicillin/streptomycin og serum. Kyllingkorncellemedium (Tabell 2.13 og tabell 2.14) må varmes opp til 37° C før bytting av medium etter transfeksjon, da cellene er svært sensitive for temperaturendring. Alt arbeid ble utført i LAF-benk.

2.5.1. Protokoll for transfeksjon av PC12-celler og kyllingkornceller

1. Beregnet mengde DNA fra ønsket plasmid og renillaluciferaseplasmid blandes i et eppendorfrør. DNA-mengden tilsvarer 1 µg/ml celleduspensjonsløsning i skål.
2. DNA-løsningen blandes i 50 µl serumfritt DMEM ved hjelp av wirlmikser i noen sekunder, og inkuberes i 5 minutter i romtemperatur.
3. 2 µl Metafectene® Pro per milliliter celleduspensjonsløsning fortynnes med 50 µl serumfritt DMEM. Dette blandes forsiktig ved å pipettere opp og ned et par ganger og settes til inkubering i 5 minutter i romtemperatur.
4. DNA-løsningen og metafecteneløsningen blandes forsiktig ved å pipettere blandingen opp og ned noen ganger. Kraftig blanding kan føre til ødeleggelse av DNA-lipid-komplekset.
5. Transfeksjonsløsningen (DNA-løsning og metafecteneløsningen) inkuberes i romtemperatur i 20 minutter.
6. Transfeksjonsløsningen dryppes i skålene, 100 µl per liten skål, eller 330 µl per medium skål. Deretter blir skålene satt til inkubering ved 5 % CO₂ og 37 °C i 4 timer.
7. Transfeksjonsløsningen fjernes etter 4 timer og erstattes med nytt definert vekstmedium (Tabell 2.3 og Tabell 2.13).

Etter at transfeksjonsløsningen er fjernet og nytt vekstmedium (punkt 7) er tilsatt, eksponeres skålene med ønsket behandling (avsnitt 2.2.4 og 2.3.5)

Tabell 2.18 Plasmider brukt ved transfeksjon av PC12-celler

Genprodukt	Plasmidets forkortelse	Konsentrasjon per ml cellesuspensjon i skål
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	r1-CMV	0,2 µg
Renillaluciferase	r1-Tk	0,2 µg

Tabell 2.19 Plasmid brukt ved transfeksjon av kyllingkornceller

Genprodukt	Plasmidets forkortelse	Konsentrasjon per ml cellesuspensjon i skål
Ildflueluciferase under kontroll av MMP9 promotor	MMP9-luc	0,8 µg
Renillaluciferase	r1-CMV	0,2 µg

2.6. Luciferaser Reporter Assay

2.6.1. Ildflueluciferase

Luciferase er et enzym som i interaksjon med luminescens-substratet luciferin produserer lys. Denne kjemiske reaksjonen kalles bioluminescens og luciferaseanalyse baserer seg på dette fenomenet. Luciferaser fra ildflue (*Photinus pyralis*) og *Renilla reniformis* har blitt karakterisert i detalj og benyttes i dag i Luciferase Reporter Assay. Metoden er utviklet av Promega Corporation. Når et plasmid med ønsket promotor koblet til luciferasereporter gen transfekteres inn i cellen, vil det dannes ildflueluciferase hvis promotoren er aktiv. Luciferin tilsettes prøven ved hjelp av et luminometer og lysintensiteten måles [46]. Endringer i lysintensiteten reflekterer endringer av promotoraktivitet.

2.6.2. Høsting av celler til luciferasemåling

Prosedyre for høsting av celler til luciferasemåling fra små skåler:

1. Høstebuffer bestående av 0,1 % LUC med 1,0 mM DTT (tabell 2.20) lages. Et passende volum av høstebuffer beregnes ut fra følgende formel:

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

2. Mediet pipetteres av skålene.
3. Skålene vaskes to ganger med 0,5 ml iskald PBS (tabell 2.21) og skålene beveges forsiktig slik at hele skålen skylles.
4. PBS fjernes med pipette.
5. 135 μl 0,1 % LUC med 1 mM DTT (tabell 2.20) tilsettes til midten av hver skål.
6. Skålene inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
7. Cellene skrapes løs med en celleskrape i én retning, deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skrapning.
8. Cellesuspensjonen overføres til et eppendorfrør og settes på is. Disse sentrifugeres i en kjølesentrifuge ved 4 °C i 5 minutter ved 13000 rpm.

Tabell 2.20 Løsninger benyttet til høsting av luciferase

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 2.21 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
	Na ₂ HPO ₄ x 2H 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. Prøvene holdes på is før måling. Resultatet måles ved hjelp av et luminometer som kvantitativt måler lysintensiteten i prøven over en bestemt periode.

Prosedyre for måling av ildflueluciferaseaktivitet:

1. Luminometeret tømmes for vann og vaskes med luciferin før bruk.
2. 1mM luciferinløsning (tabell 2.22) plasseres i dispenserens på luminometeret.
3. 50 µl av supernatanten fra cellehøstingen blandes med 150 µl LUC-coctail (tabell 2.22) i et plastrør

4. Røret med prøveblandingen settes i luminometeret. Maskinen innstilles slik at 100 µl luciferin tilsettes automatisk og lysintensiteten måles i 2 sekunder.
5. Etter at alle prøvene er målt tømmes luminometeret for luciferin og vaskes med MQ-vann.

Tabell 2.22 Løsninger benyttet for måling av ildflueluciferase

Løsning	Innholdsstoffer	Mengde
1 mM luciferin	D- luciferin	11 mg
	MQ-vann	36,7 ml
	• Oppbevares kjølig og beskyttet mot lys	
LUC-coctail	Adenosin-5-trifosfat (ATP)	240 mg
	Magnesiumacetat 1 M	2 ml
	1M Tris/1 M MES pH 7,8	8,3ml
	MQ-vann	Ad 100 ml
	• Oppbevares ved -20 °C	

2.6.4. Renillaluciferase

Renillaluciferase fra sjøkorallen *Renilla reniformis* er et enzym som katalyserer en kjemiske reaksjon som er ansvarlig for frigjøring av lys, kalt bioluminescens. Oksidativ dekarboksylering av Renilla luciferin (koelenterasin) avgir lys som kan måles med et luminometer. Renillaluciferase benyttes som en internkontroll i ildflueluciferase-baserte analyser for å normalisere verdier av reportergenene man ønsker å undersøke, og dermed redusere variabilitet forårsaket av transfeksjonseffektivitet, celleproliferasjon, apoptose og prøvebehandling. Kontrollen påvirker ikke ildflueluciferaseaktiviteten, da de katalyserer oksidasjonen av ulike luciferinsubstrater og gir dermed ingen kryssaktivisering.

Enzymaktiviteten av Renillaluciferase antas å forbli konstant i transfekterte celler og skal ikke påvirkes av eksponeringer, vekstbetingelser eller andre forhold. Likevel har det den siste tiden blitt spekulert på om de ulike plasmider kan påvirkes av ulike faktorer [47]. Ulike plasmider, med ulike promotorkonfigurasjoner, er tilgjengelige og koder for renillaluciferase. Disse inneholder alle renilla DNA klonet fra *Renilla reniformis*. Det ble i denne oppgaven benyttet Renillaluciferase med promotor fra cytomegalovirus (r1-CMV) og Renillaluciferase

med promotor fra herpes simplex virus tymidin kinase (rl-tk). Stop&Glo®-reagenset (Tabell 2.23) tilsettes for å slukke ildflueluciferaseaktivitet og aktivere Renillaluciferaseaktivitet.

2.6.5. Måling av renillaluciferaseaktivitet

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

Prosedyre for måling av renillaluciferaseaktivitet:

1. Stop&Glo®-reagens (tabell 2.23) fortynnes 100 ganger med MQ-vann i et rør og beskyttes mot lys.
2. Luminometeret innstilles til egnet program for renillamåling, og lysintensitet måles i 10 sekunder.
3. 100 µl fortynnet Stop&Glo®-løsning overføres til et plastrør og blandes med supernatant fra cellehøsting. Volumet som tilsettes av supernatanten ligger mellom 0,5 µl og 20 µl. Passende volum bestemmes ved at man undersøker hvilket volum som befinner seg i det lineære området. Dette gjøres ved å teste ut ulike volum, og man ser om verdien dobles ved dobbelt volum, femdobles ved femdoblet volum osv. Verdiene bør ligge godt over bakgrunn.
4. Det måles flere ganger av hver høstet prøve til man har tre verdier som ikke avviker mer enn 10 %, og median av disse tre parallellene benyttes som resultat.

Tabell 2.23 Løsning benyttet til måling av renillaluciferaseaktivitet

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

- Oppbevares ved -20 °C

2.7. Deteksjon av celledød med trypanblå

Trypanblåfarging benyttes for deteksjon av celledød. Farging av cellekulturer gjør det mulig å skille døde celler fra levende celler. Trypanblå vil kunne penetrere cellemembranen til døde celler og gi dem en blå farge. Levende celler med intakt cellemembran vil ikke ta opp trypanblå og forblir ufarget. Dermed vil det være mulig å visuelt telle antall døde celler og antall levende celler ved hjelp av et lysmikroskop.

PC12-celler ble splittet og platet ut på små skåler (8,8 cm²). Skålene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før eksponering. Cellene ble farget og kvantifisert i lysmikroskop 72 timer etter eksponering.

1. Et tilstrekkelig volum av trypanblåløsning lages (tabell 2.24). Løsningen består av 2 % trypanblå stockløsning og 1,8 % NaCl stockløsning i forhold 1:1.
2. Mengden medium i skålene justeres til 1 ml.
3. 250 µl trypanblåløsning tilsettes hver skål. Skålen vippes forsiktig for å fordele fargeløsningen jevnt i mediet. Seks skåler farges av gangen.
4. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 30 minutter.
5. Trypanblåløsningen pipetteres av og cellene telles i et lysmikroskop. Blå celler (døde) og levende celler (hvite) telles hver for seg i fire ulike synsfelt. Andel døde celler av totalt antall celler beregnes.

Tabell 2.24 Løsninger til farging med trypanblå

Løsning	Komponent	Mengde
2 % trypanblå stockløsning	Trypanblå	1 g
	MQ-vann	50 ml
1,8 % NaCl	NaCl	1,8 g
	MQ-vann	100 ml

- Oppbevares i romtemperatur

2.8. Westernblotting

Westernblotting benyttes for å separere og identifisere proteiner. Teknikken baserer seg på å separere proteiner med forskjellig molekylvekt ved hjelp av gelelektroforese. De separerte proteinene kan dermed overføres til en membran som merkes med primære og sekundære antistoff for å synliggjøre spesifikke proteiner. Dette gir en semi-kvantitativt beskrivelse av proteinnivå i prøven [48].

2.8.1. Høsting av celler til westernblotting

PC12-celler splittes ut i store skåler (66,5 cm²) eller medium skåler (21,5 cm²) med celledetthet $7,0 \times 10^4$ celler/ml. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer før eksponering. Cellene høstes 72 timer etter eksponering.

1. En tilstrekkelig mengde 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere lages (tabell 2.25).
2. Mediet helles av skålene og rester pipetteres av.
3. Skålene vaskes forsiktig to ganger med 3 ml (i store skåler) eller 2 ml (i medium skåler) kald PBS (tabell 2.21). Rester etter siste vasking pipetteres av.
4. 70 µl (medium skåler) eller 100µl (store skåler) 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere (tabell 2.25) tilsettes skålen og fordeles rundt ved å vippe forsiktig på skålen. Cellene skrapes løs med en celleskrape i to retninger vinkelrett på hverandre.
5. Cellesuspensjonen overføres til eppendorfrør og settes på is.
6. Prøvene kokes ved 95°C i 5 minutter og fryses ved -20°C frem til bruk.

Tabell 2.25 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere

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

2.8.2. Proteinmåling

For å kunne kjøre westernblotting må proteinkonsentrasjonen i hver celleprøve bestemmes og korrigeres for. Mengde protein bestemmes ved hjelp av Pierce® BCA™ Protein Assay Kit.

Kittet består av reagens A, reagens B og bovint serumalbumin-standard (2mg/ml).

Proteinkonsentrasjonen måles ved hjelp av et spektrofotometer.

Prosedyre for måling av proteinmengde:

1. Working reagent og fortynnet standardløsning lages (tabell 2.26).
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 under (Figur 2.2).
3. Celleprøver hentes fra fryseren (-20°C) og tines. Prøvene blandes godt på vortex før bruk. Dersom prøvene er svært seige kan de kokes 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.
5. 200µl working reagent 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. Absolutt proteinmengde i hver celleprøve beregnes.

Tabell 2.26 Løsninger for måling av proteinmengde

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

	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										

Figur 2.2 Plateoppsett for proteinmåling

Figuren viser plateoppsettet for proteinmåling til westernblotting.

2.8.3. Proteinjustering av prøver

For å kunne måle endringer av et protein må prøvene proteinjusteres slik at alle brønnene får like mye samlet protein.

1. Det skal settes på 45 µl prøve med 50 µg protein på 1,5 mm geler med 10 brønner og 15 µl prøve med 15 µg protein på geler med 15 brønner. Dette er bestemt ut fra erfaringer fra laben. Det ble kun brukt 10 brønners kam i disse forsøkene. 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 2.27) må derfor tilsettes prøven i forhold 1:3. Det resterende volumet fylles opp av MQ-vann.
3. Prøvene kokes på varmeblokk ved 95°C i 5 minutter og avkjøles før de påsettes gelen.

Tabell 2.27 4X Laemmlibuffer

Komponenter	Mengde	Sluttkonsentrasjon i den ferdige prøven
SDS (20 %)	4,0 ml	2 %
Glyserol (85 %)	2,35 ml	5 %
2-mercaptoetanol	2,0 ml	5 %
MQ-vann	0,9 ml	
Tris-HCL (4M) pH 6,8	0,75 ml	75mM
Noen korn bromfenolblått		

1. 2-mercaptoetanol og bromfenolblått tilsettes løsningen i avtrekk
2. 2-mercaptoetanol tilsettes løsningen rett før bruk. Før dette kan løsningen stå oppbevart i romtemperatur på lab-benken.

2.8.4. Støping av gel

Westernblot bruker to ulike typer geler; en øvre gel (stacking gel) og en separerende gel. Proteinene blir først separert i den separerende gelen, som har en høyere konsentrasjon av polyakrylamid. Polyakrylamiden gjør porene i gelen små. Proteiner med stor molekylvekt vil vandre kort og proteiner med liten molekylvekt vil vandre lenger ned gjennom gelen [48].

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 kontrolleres for lekkasje ved å helle MQ-vann i spalten mellom glassplatene.

1. Komponenter til separerende gel av ønsket polyakrylamidkonsentrasjon blandes og helles i spalten mellom glassplatene. Polyakrylamidgelens konsentrasjon bestemmes av molekylvekten til proteinene som skal detekteres. Proteinene av interesse ligger i størrelsesorden 15-100 kDa og det ble derfor benyttet polyakrylamidgel på 10 % (tabell 2.28).
2. 1 ml isopropanol pipetteres på toppen av separerende gel for å sikre at gelen får en jevn overflate.

3. La stå i 40 minutter for at akrylamiden i gelen skal polymerisere.
4. Isopropanol helles av og rester suges av med et cellepapir.
5. Komponenter til øvre gel blandes og helles over separerende gel.
6. En kam med tagger som er tilpasset antall prøver som skal påsettes; settes forsiktig ned i gelen straks. Det ble kun brukt 10-brønners kam i forsøkene.
7. La stå i 30 minutter for at gelen skal polymerisere.

Tabell 2.28 Gelløsninger

Geltype	Komponenter	Mengde
Separerende gel (polyakrylamidgel 10 % 2 geler á 1,5mm)	MQ-vann	6,0 ml
	Nedre gelbuffer (tabell 2.29)	3,6 ml
Øvre gel	Akrylamid (30 %)	4,8 ml
	TEMED	7,2 µl
	APS	72µl
	MQ-vann	4,8ml
	Øvre gelbuffer (tabell 2.29)	2,0ml
	Akrylamid (30 %)	1,2ml
	TEMED	8,0µl
	APS	40µl

- Gelstøping utføres i avtrekk med vernebriller, nitril-hansker og laboratoriefrakk
- APS tilsettes løsningen nest sist og TEMED tilsettes helt til slutt

Tabell 2.29 Løsninger til bruk i gelstøping

Løsning	Komponenter	Mengde
Nedre gelbuffer	Tris-base	18,17 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	• Justeres til pH 8,8 med HCl/NaOH	
Øvre gelbuffer	Tris-base	6,057 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	• Justeres til pH 6,8 med HCl/NaOH	

2.8.5. Gelelektroforese

Proteinene har fått en negativ ladning etter denaturering av varme og tilsatt SDS (avsnitt 2.8.3), og vil derfor vandre mot den positive elektroden når karet kobles på strøm [48].

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 2.30), og det ytre rommet fylles til elektrodene er dekket med elfobuffer. Eventuelle luftbobler fjernes ved hjelp av en pipettespiss.
3. En påføringsapplikator plasseres over gelen og 5 µl standard (Precision Plus Protein™ All Blue Standards) 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 nabobrønnen.
5. Strøm kobles til karet. Prøvene kjøres først gjennom stacking gel på 90 V i 15 minutter, og deretter gjennom separerende gel på 150 V i ca. 60 minutter. Strømmen bør stoppes før den blå bromfenollinjen når bunnen av gelen, men heller ikke for tidlig da dette gir dårligere separasjon av proteinbåndene.

Tabell 2.30 Elfobuffer (1X TGS)

Komponenter	Mengde
10X TGS (tabell 2.31)	100 ml
Destillert vann	900 ml

Tabell 2.31 10X TGS

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

2.8.6. Blotting av gel

Når proteinene er separert overføres de til en membran ved hjelp av et elektrisk felt. Proteinene beveger seg gjennom gelen og over på en membran. Sammensetning av blottesystemet og plassering av membranen er svært viktig for å unngå at proteinene forsvinner ut i blotteløsningen [48].

1. Én membran, to filterpapir og to skrubber fuktes i blottebuffer (tabell 2.32).
2. Gelen løsnes forsiktig fra den tykke glassplaten ved hjelp av en plastspatel. Øvre gel kuttet 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
 - Skrubber
 - Filterpapir
 - Gel
 - Membran
 - Filterpapir
 - Skrubber
 - 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 blottekar 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 (tabell 2.32) slik at gelen dekkes.
8. Blotteoppsatsen settes på en magnetrører ved 2-8 °C og blottes ved 50mA over natt eller 400mA i 1 ½ time.

Tabell 2.32 Blottebuffer

Komponenter	Mengde
10X TG (tabell 2.33)	100 ml
Metanol	200 ml
Destillert vann	700 ml

Tabell 2.33 10X TG

Komponenter	Konsentrasjon
Tris	25mM
Glycin	192mM

- pH 8,3
- Bruk nitrilhansker, frakk og briller ved håndtering av metanol og jobb i avtrekkskap

2.8.7. Ponceausfarging og blokking av membran

For å sikre at proteinene ble akseptabelt overført etter blotting, farges membranen med Ponceaufarge. Ponceaus binder proteinene og gir røde proteinbånd [49].

1. Membranen pakkes forsiktig ut av gelbeholderen og legges i et kar med Ponceaus 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

fremkallingsmaskin Chemi Genius² Bio Imaging system med programmet Genesnap fra SynGene.

4. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten.
5. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.34) tilsettes røret og det legges til rulling i romtemperatur i 1 ½ time eller ved 2-8 °C over natt.

Tabell 2.34 Blokkeløsning

Komponenter	Mengde
Tørrmelk	2,5 g
1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.36)	50 ml

- Oppbevares ved 2-8 °C

Tabell 2.35 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

- Justeres til pH 7,6 med HCl/NaOH
- Oppbevares 2-8 °C

Tabell 2.36 Fortynnet trisbufret saltvann med Tween

Løsning	Komponenter	Mengde
1X TBS med 0,1 % Tween	10X TBS med 1 % Tween (tabell 2.35)	1 del
	Destillert vann	9 deler

- Oppbevares ved 2-8 °C

2.8.8. Tilsetning av primære og sekundære antistoff

For å kunne detektere proteinet av interesse behandles membranen med et primærantistoff som binder selektivt til ønsket proteinet. Sekundærantistoffet binder til primærantistoffet som forsterker signalet og gjør det lettere å detektere.

1. Blokkeløsningen helles av og 5 ml ny blokkeløsning (tabell 2.34) tilsettes røret med membranen.
2. Primærantistoff (tabell 2.37) tilsettes røret i riktig blandingsforhold avhengig av type antistoff. Røret med primærantistoffløsningen legges til rulling ved 2-8 °C over natt.
3. Primærantistoffløsningen helles av og spares på til bruk for neste membran innen én uke. Membranen vaskes tre ganger i 15 minutter med rulling i romtemperatur med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.36).
4. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.34) tilsettes røret
5. Sekundærantistoff (tabell 2.38) 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 helles av og membranen vaskes tre ganger i 10 minutter med rulling i romtemperatur med 5 ml 1X TBS med 0,1% Tween (tabell 2.36).

Tabell 2.37 Primærantistoff til bruk i westernblotting

Primærantistoff	Fortynning	Lot.nr	Katalognr.	Leverandør
MMP9, Catalytic domain	1:500	2279495	AB19016	Merck KGaA Damstadt, Tyskland
Lamin A/C	1:1000	22914	804-672-C200	Alexis Biochemicals, Sveits

Tabell 2.38 Sekundærantistoff til bruk i westernblotting

Sekundærantistoff	Fortynning	Lot.nr	Katalognr.	Leverandør
Donkey anti-rabbit	1:10000	C1212	Sc-2313	Santa Cruz Biotechnology, USA
Donkey anti-mouse	1:10000	LS1706516	107-6516	Bio-Rad, USA

2.8.9. Fremkalling

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 plasseres 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.
6. Etter fremkalling kan membranen vaskes med 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.36) i 3 x 10 minutter under rulling og deretter oppbevares i 1X TBS med 0,1 % Tween ved 2-8 °C frem til eventuell stripping og påføring av nytt antistoff.

2.8.10. Stripping av membranen

Om det er ønskelig å teste den samme membranen for flere proteiner med molekylvekt i samme området, bør påsatte antistoff fjernes ved hjelp av en stripebuffer mellom hver tilsetning av antistoff og fremkalling.

1. Løsningen i røret med membranen helles av og membranen vaskes tre ganger i 5 minutter under rulling i romtemperatur med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.36).
2. 1X TBS med 0,1 % Tween helles av og røret tilsettes 5 ml Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer. Røret legges til rulling i romtemperatur i 15 minutter.
3. Stripebufferen helles av og membranen vaskes tre ganger i 15 minutter under rulling i romtemperatur med 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.36).
4. Membranen bør ponceausfarges (avsnitt 2.8.7) for å se at proteinene fortsatt er intakt etter stripping.
5. 5 ml blokkeløsning tilsettes røret og det legges til rulling i 2 timer i romtemperatur eller over natt ved 2-8 °C.
6. Deretter følges prosedyren under avsnitt 2.8.8.

2.9. Statistikk og grafisk fremstilling

Alle grafer er fremstilt ved hjelp av Microsoft Excel 2011 for Mac. Figurene er basert på gjennomsnittet fra flere uavhengige forsøk og påsatt standardfeil (SE). Dersom det kun ble utført to forsøk er variansen vist med "range". Statistisk analyse ble utført med SigmaStat versjon 3.5 og SigmaPlot versjon 12.5.

Sammenligning av to variable av normalfordelte data ble utført ved hjelp av t-test. Mann-Whitney Rank Sum Test ble benyttet dersom data ikke var normalfordelte. One Way Analysis of Variance (ANOVA) med Holm-Sidak post hoc metode ble benyttet ved normalfordelte data og analyse av ikke-normalfordelte data ble utført med Kruskal-Wallis One Way ANOVA med Ranks Dunn's metode. Det ble alltid benyttet den funksjonen som tillater å sammenligne flere variabler mot en kontrollgruppe, som oftest ubehandlet, med mindre annet er spesifisert i figurteksten. P-verdi på $<0,05$ er merket med "*" og ble ansett som signifikant. "#" (p-verdi på $<0,05$) markerer resultater som er signifikant forskjellig fra annen behandling enn ubehandlede celler.

3. Resultater

Effekter av NGF i PC12-celler på nevruttvekst ble analysert med syv ulike endepunkter. Videre ble PC12-celler eksponert for BDNF og det ble undersøkt om dette kunne påvirke nevruttveksten. En TrkB-agonist ble benyttet for å se om denne kunne erstatte bruken av BDNF (avsnitt 3.1). Lamotrigin og valproat ble undersøkt for effekter på nevruttvekst i PC12-celler. For å studere om effekter på nevruttvekst forårsaket av lamotrigin og valproat var mediert via de samme signalveiene som NGF eller BDNF, ble PC12-celler eksponert for legemiddel og TrkA- eller TrkB-antagonist (avsnitt 3.2 og 3.3).

Aktiviteten av to differensierings- og nevruttvekstmarkører, MMP9 og p53, ble undersøkt ved hjelp av luciferaseassay. Renillaluciferase ble benyttet som internkontroll. PC12-celler ble eksponert for både valproat og lamotrigin, men også kombinasjoner av legemidler med NGF. NGF-eksponering ble gjort for å etterligne nevroner under utvikling. Kyllingkornceller ble transfektert med MMP9-LUC og eksponert for valproat og lamotrigin. Prøvene ble målt ved hjelp av et luminometer (avsnitt 3.4 og 3.5).

Som et sideprosjekt ble PC12-celler undersøkt for endringer i GCS-aktivitet ved eksponering av lamotrigin og valproat (avsnitt 3.6). Deteksjon av celledød ble undersøkt ved trypanblåfarging av PC12-celler eksponert for lamotrigin eller valproat med og uten NGF-eksponering (avsnitt 3.7).

Westernblotting-analyser med MMP9-antistoff som markør ble utført for å studere effekter av valproat og lamotrigin på MMP9-proteinuttrykk (avsnitt 3.8). I et pilotforsøk ble en MMP9-hemmer studert i korncellekulturer fra kylling, for å se om denne påvirket nevruttvekst og nettverksdannelse (avsnitt 3.9).

Tallmateriale for figurer ligger i vedlegg / appendiks.

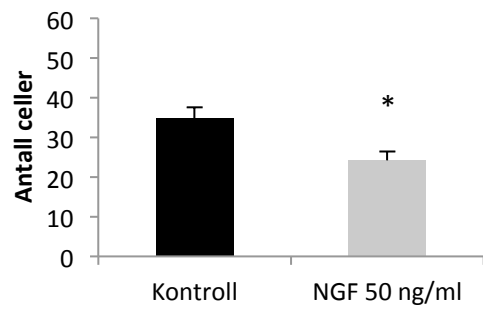
3.1. Effekter på nevruttvekst i PC12-celler

Alle konsentrasjoner angitt under søylene er sluttkonsentrasjoner i skål. Alle eksponeringer er oppgitt i tabell 2.9. Et utvalg av resultater er vist i figurer under. Der hvor det er valgt å ikke fremstille alle datamateriale i form av en graf, er det likevel analysert statistisk der dette var mulig. Signifikante forskjeller er alltid vist med figur.

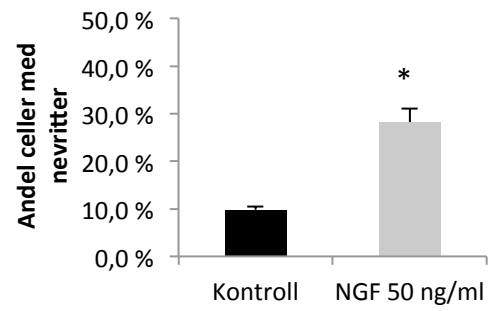
3.1.1. Effekter av NGF på nevruttvekst i PC12-celler

Basert på tidligere erfaringer ble NGF benyttet som positiv kontroll i forsøk med PC12-celler. NGF er vist å få cellene til å avslutte celledeling og igangsette differensiering til å ligne sympatiske nevroner [4]. Dersom NGF-effekt ikke var til stede i forsøket, ble forsøket forkastet. NGF-effekter ble undersøkt på alle syv endepunkter (avsnitt 2.4) og ga signifikante forskjeller fra ubehandlede PC12-celler på fem av disse (figur 3.1). NGF reduserte celleantallet, økte andel celler med nevritter samt antall nevritter per celle med nevrutt, økte andel celler med lange nevritter og økte andel "spydceller". Det ble ikke vist signifikant forskjell mellom nevruttlengde hos celler med lange nevritter, men det er viktig å merke seg den store forskjellen mellom andel celler med lange nevritter. Kun tre forsøk ga lange nevritter hos PC12-celler som var ubehandlet, men alle 11 forsøk ga lange nevritter hos celler eksponert med NGF. Statistisk analyse ble utført med t-test mellom kontroll (behandlede PC12-celler) og NGF-eksponerte PC12-celler.

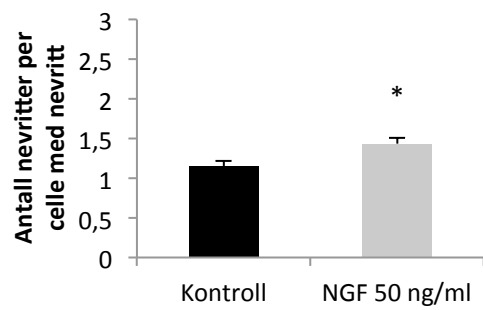
A



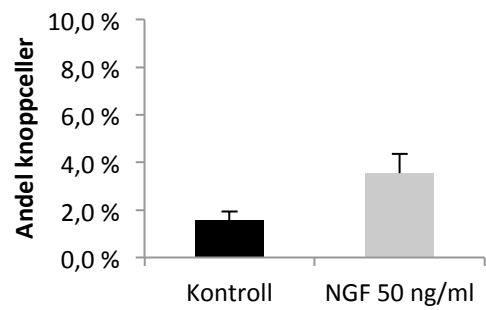
B



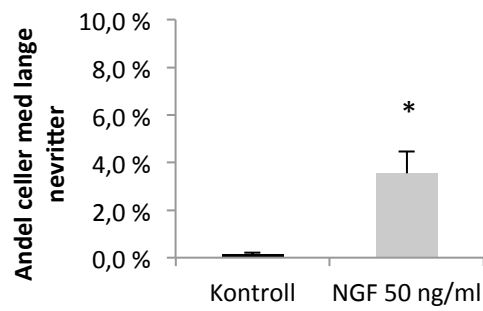
C



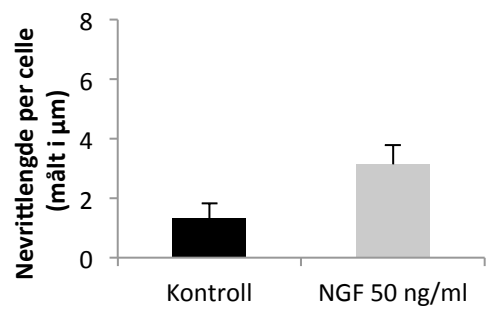
D



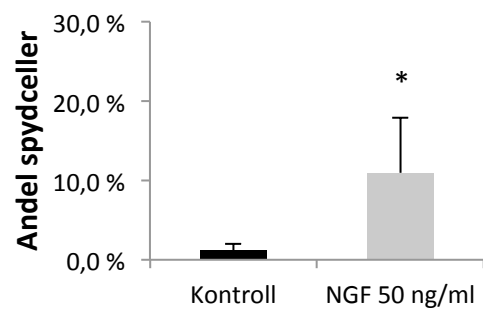
E



F



G



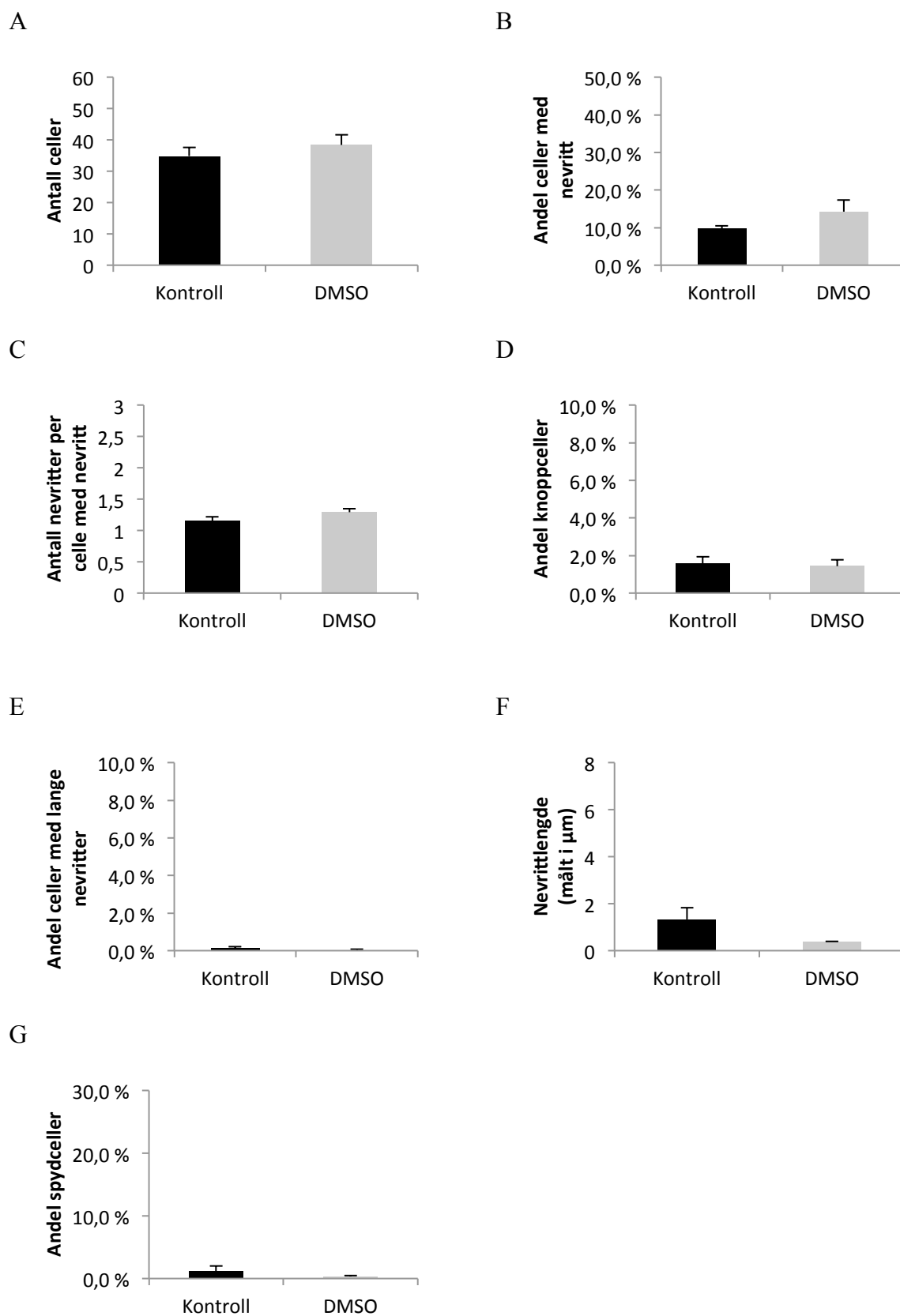
Figur 3.1 NGF har effekt på nevruttvekst i PC12-celler

A-G: PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF 24 timer etter utplating. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistisk analyser ble utført med t-test. A) Antall celler. B) Andel celler med nevrutter. C) Antall nevrutter per celle med nevrutt. D) Andel ”knoppceller” (avsnitt 2.4). E) Andel celler med lange nevrutter. F) Nevrittlengde per celle mål i μm . G) Andel ”spydceller” (avsnitt 2.4). NGF ga signifikant endring i PC12-celler på fem av syv endepunkt. * indikerer en p-verdi $<0,05$ (n=11). Datamaterialet er felles med Karina Borgund.

3.1.2. Effekt av DMSO og BDNF på nevruttvekst i PC12-celler

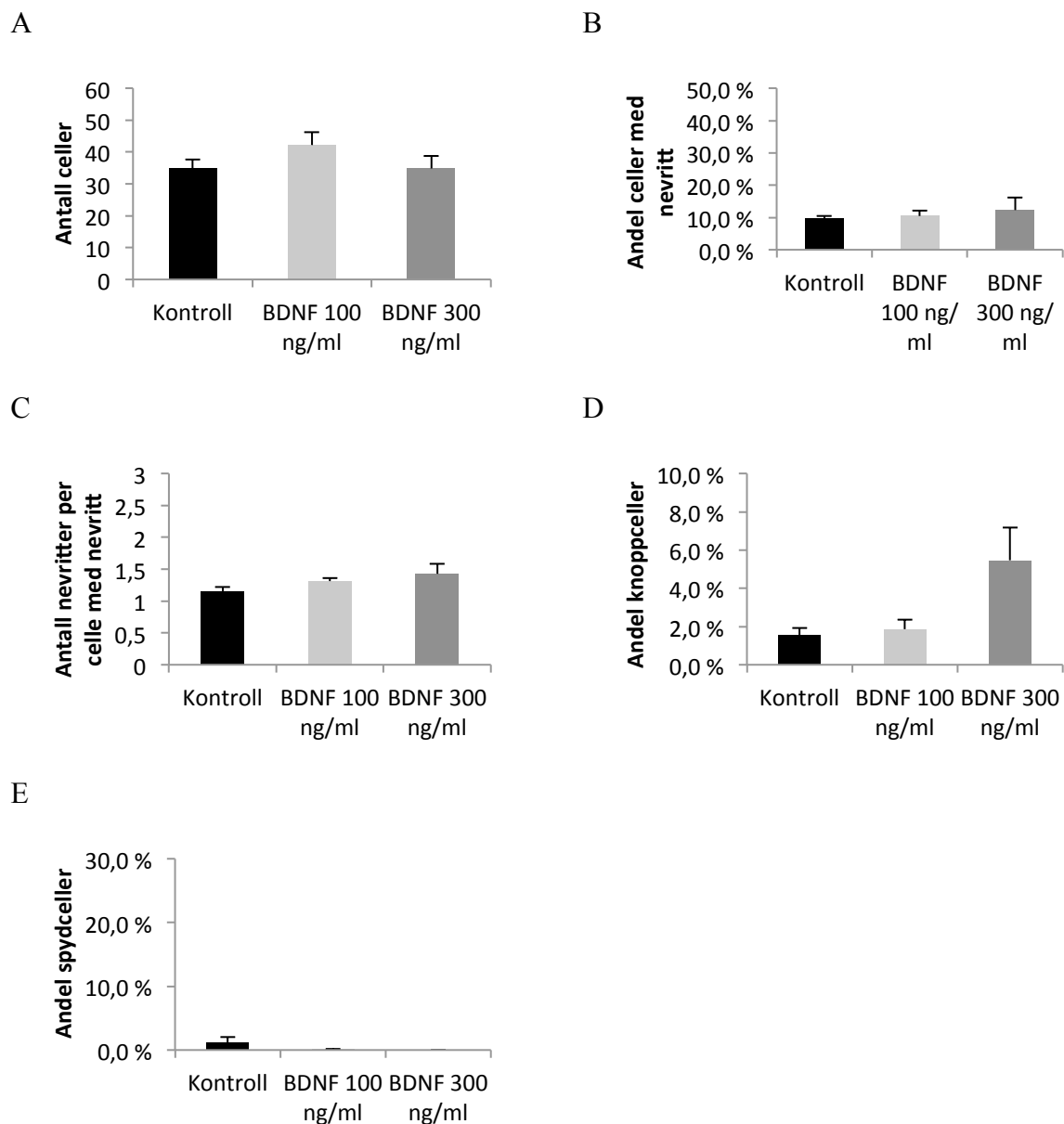
BDNF er kjent for å ha effekt på nevruttvekst [27]. For å undersøke om legemidler kunne utøve effekt via TrkB-reseptor ble det først undersøkt hvordan BDNF påvirker PC12-celler og deres nevruttvekst. Det var også interessant å få bekreftet om vår cellelinje uttrykker en aktiv TrkB-reseptor og man antar at BDNF-effekten går via TrkB. BDNF er løst i DMSO og det var derfor nødvendig å ha med DMSO-kontroll slik at endringer som skjer ikke skyldes eksponeringen med DMSO, men heller effekt av BDNF. Ingen statistisk signifikant forskjell ble observert mellom ubehandlede PC12-celler og PC12-celler behandlet med DMSO 1 % (figur 3.2). Eventuelle effekter av BDNF skyldes derfor ikke DMSO.

Det er ikke kjent om vår cellelinje med PC12-celler har TrkB-reseptorer, eller om disse er aktive i cellene. Tidligere masteroppgaver fra forskningsgruppen har vist at BDNF har en tendens til, men ikke signifikant, påvirkning på nevruttvekst i PC12-celler. Det lyktes ikke å reproducere disse resultatene (figur 3.3) [50]. Ingen lange nevrutter ble observert i PC12-celler eksponert for BDNF. I oppstarten av forsøkene syntes det at PC12-celler eksponert for BDNF utviste en karakteristisk form som fikk navnet ”knoppcelle” (avsnitt 2.4). Disse cellene hadde små utstikkere som ikke kunne karakteriseres som nevrutter, da de ikke var lengre enn de var brede. I tillegg var antallet ofte over fem utstikkere per celle, noe som skilte seg ut fra ubehandlede celler. Dette ble dermed brukt som et endepunkt på BDNF-effekt. PC12-celler eksponert for BDNF 300 ng/ml så ut til å øke andel ”knoppceller”, men det ble utført for få forsøk til å analysere dette statistisk.



Figur 3.2 DMSO har ingen effekt på nevrittutvekst i PC12-celler sammenlignet med ubehandlede celler.
 A-G: PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. 1 % DMSO ble tilsatt skåler for å kontrollere om løsemidlet kunne forårsake en effekt på PC12-cellene. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter

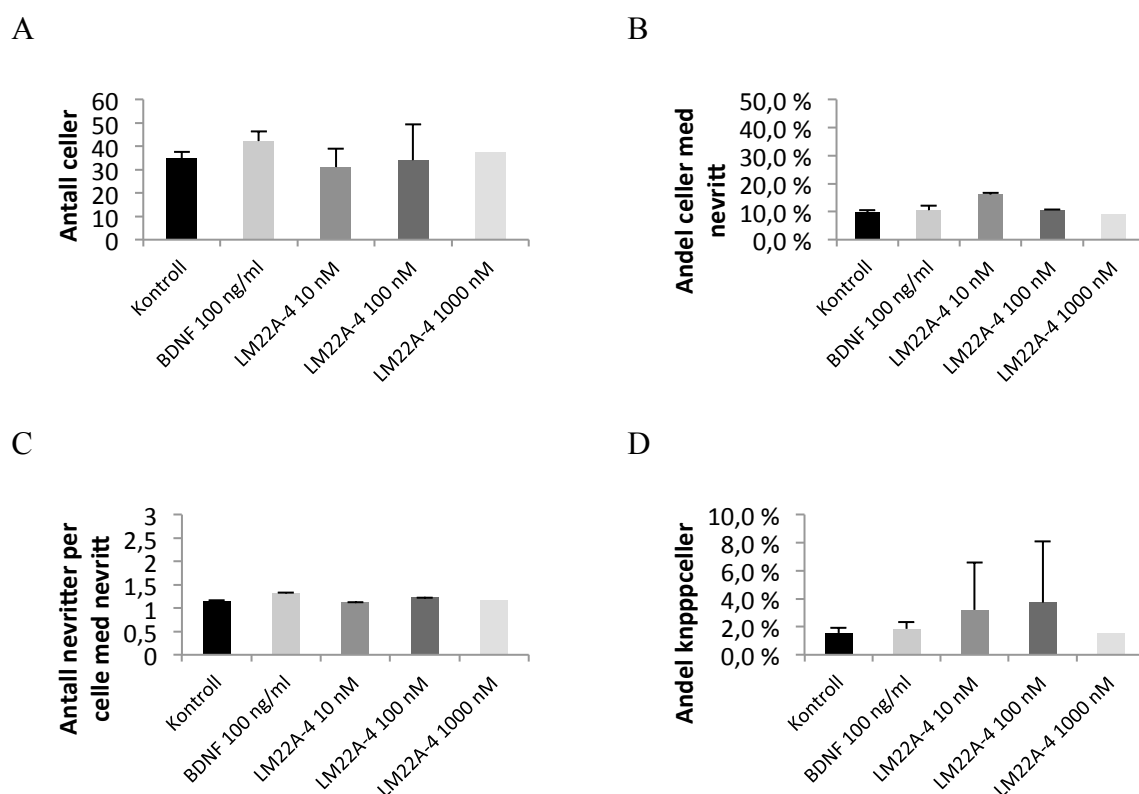
eksponering. Statistisk analyse ble utført med t-test A) Antall celler. B) Andel celler med nevritter. C) Antall nevritter per celle med nevritt. D) Andel ”knoppceller”. E) Andel celler med lange nevritter. F) Nevrittlengde per celle målt i μm . G) Andel ”spydceller”. Ingen statistisk signifikant forskjell ble observert sammenlignet med ubehandlede celler. DMSO påvirker ikke nevruttvekst i PC12-celler i konsentrasjon på 1 ‰ (n=7-11). Datamaterialet er felles med Karina Borgund.



Figur 3.3 BDNF har liten påvirkning på nevruttvekst i PC12-celler, men høy konsentrasjon viser en tendens til å øke andel ”knoppceller”

A-E: PC12-celler ble eksponert for BDNF i konsentrasjoner på 100 ng/ml eller 300 ng/ml 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistisk analyser ble utført med t-test. Ingen statistisk analyse ble utført for BDNF 300 ng/ml da n=2. A) Antall celler. B) Andel celler med nevritter. C) Antall nevritter per celle med nevritt. D) Andel ”knoppceller”. E) Andel ”spydceller”. Spredningen for forsøk n=2 er vist som ”range”. Datamaterialet er felles med Karina Borgund.

BDNF er en relativt kostbar eksponering og krevde opp til 300 ng/ml for å gi endring i nevruttvekst i PC12-celler. TrkB-agonist LM22A-4 ble derfor benyttet i PC12-celler for å se om denne kunne være egnet til å erstatte bruken av BDNF i videre forsøk. LM22A-4 er en selektiv TrkB-agonist (figur 3.4) [51]. LM22A-4 ga ingen lange nevritter i konsentrasjoner på 10 nM og 1000 nM, og kun en lang nevrutt i et av forsøkene på konsentrasjon 100 nM og dette var ikke signifikant forskjellig fra ubehandlede PC12-celler. Det samme ble observert for andel ”spydceller”. Disse endepunktene er derfor ikke vist i figur. LM22A-4 er løst i DMSO, og DMSO er tidligere i oppgaven ikke vist å ha effekt i PC12-celler (avsnitt 3.1.2).

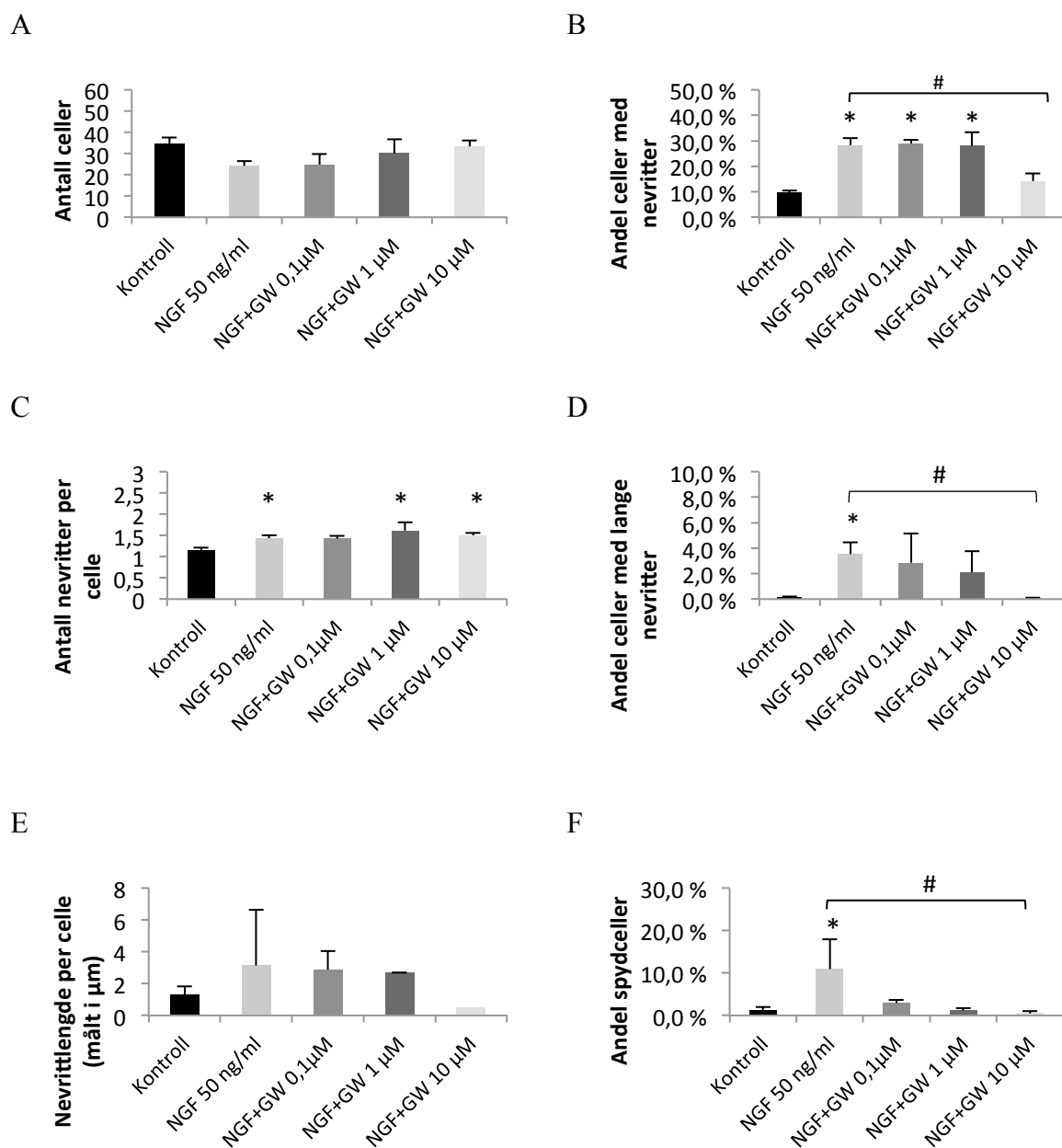


Figur 3.4 LM22A-4 har ikke tydeligere effekt på nevruttvekst i PC12-celler enn BDNF.

A-D: PC12-cellene ble eksponert 24 timer etter utplating. TrkB-agonisten LM22A-4 ble tilsatt i tre ulike konsentrasjoner for å undersøke om denne kunne erstatte BDNF i senere forsøk. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistisk analyser ble ikke utført da n=1-2. A) Antall celler, B) Andel celler med nevrutt C) Antall nevrutter per celle med nevrutt, D) Andel ”knoppceller”. LM22A-4 så ikke ut til å ha effekt på nevruttvekst i PC12-celler i større grad enn hva BDNF gjorde og er ikke egnet til å erstatte BDNF i denne cellelinjen (n=1-11). Spredningen for forsøk n=2 er vist som ”range”. Datamaterialet er felles med Karina Borgund.

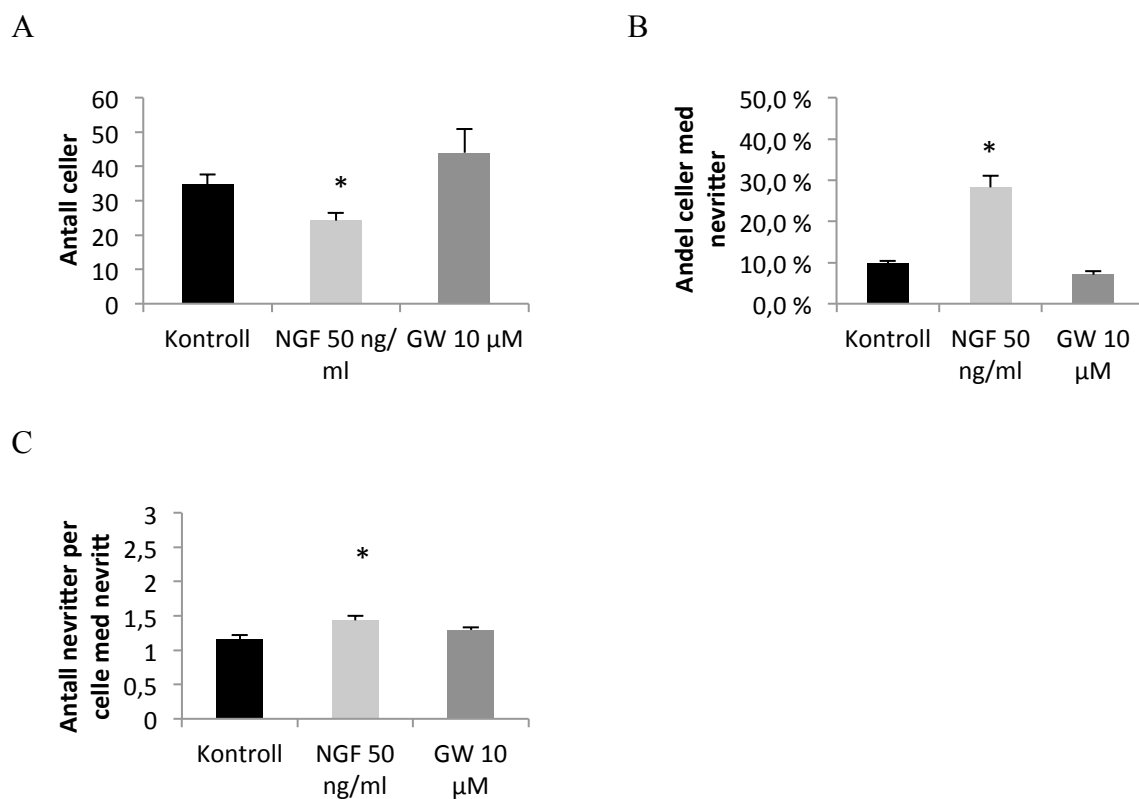
3.1.3. Valg av konsentrasjon av TrkA-hemmeren GW 441756

Det var ønskelig å undersøke om legemidlene utøver sin effekt og påvirkning av PC12-celler via NGFs høyaffinitetsreseptor TrkA. GW 441756 ble valgt ut som TrkA-hemmer, da dette er en spesifikk TrkA tyrosin kinase hemmer [52]. En studie har benyttet GW 441756 i PC12-celler [53], uten å utføre dose-responsforsøk. Det ble vurdert at det var nødvendig med dose-responsforsøk for å finne egnet konsentrasjon til videre bruk i forsøk med legemidlene. Tre ulike konsentrasjoner av GW 441756 ble undersøkt, en konsentrasjon som var 10 ganger så lav og en konsentrasjon som var 10 ganger så høy, i tillegg til konsentrasjonen (1 μM) som ble brukt i den tidligere studien [53]. 10 μM hemmet NGF-effekten på nevrutvekst (avsnitt 3.1.1) til tilnærmet nivå sett i ubehandlede celler (figur 3.5). GW 441756 10 μM alene (figur 3.6) påvirket ikke PC12-celler på noen av endepunktene. Det ble ikke observert noen lange nevrer i celler eksponert for GW 441756 og andel "knoppceller" (avsnitt 2.4) og "spydceller" (avsnitt 2.4) lå under, men ikke signifikant forskjellig fra, hva som ble observert hos ubehandlede PC12-celler. GW 441756 forkortes til "GW" i figur og sluttkonsentrasjon er angitt under søylen. Cellene ble eksponert for NGF 15 minutter etter eksponering med GW 441756 i skåler hvor disse eksponeringene ble kombinert.



Figur 3.5 GW 441756 tilsatt i konsentrasjon på 10 μM gir signifikant hemming av NGF-effekter i PC12-celler

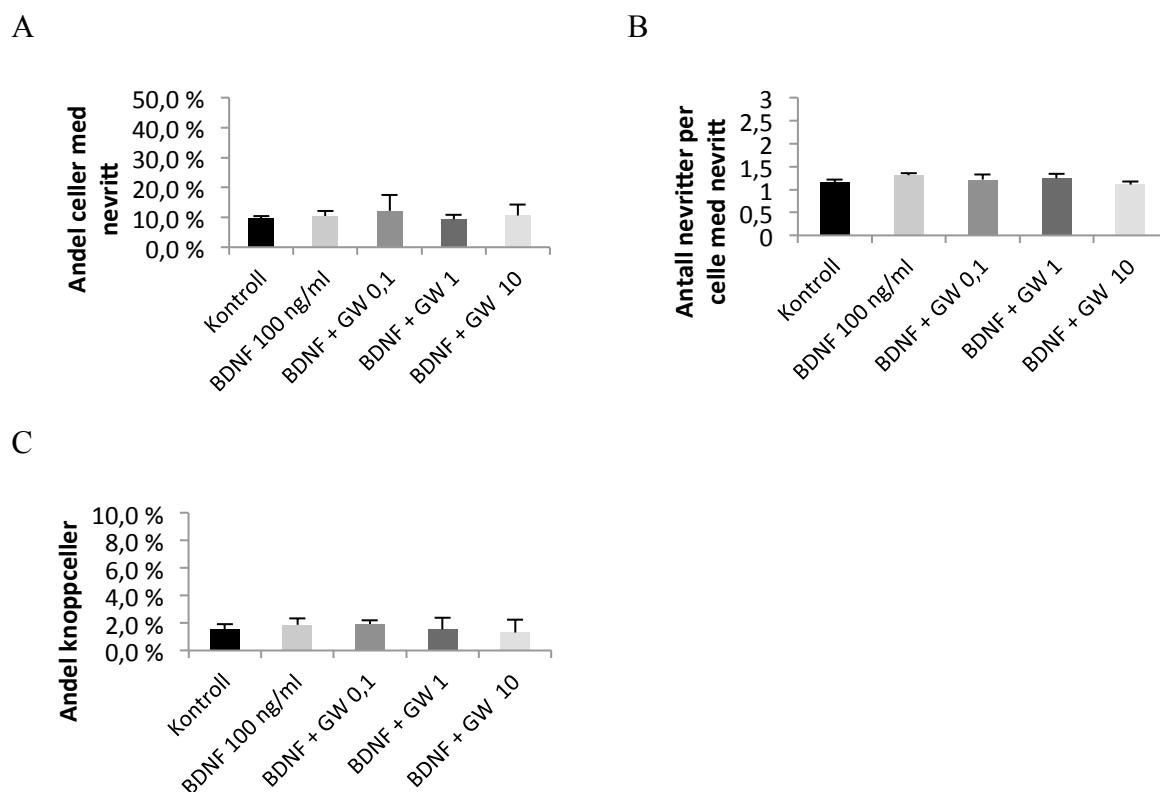
A-F: PC12-celler ble eksponert med TrkA-hemmeren GW 441756, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistisk analyse ble utført med enveis ANOVA. 10 μM GW 441756 var mest effektiv til å hemme effekter på nevruttvekst forårsaket av NGF A) Antall celler. B) Andel celler med nevritter. GW 441756 10 μM ga en reduksjon på dette endepunktet sammenlignet med NGF (# p-verdi=0,05). C) Antall nevritter per celle (D) Andel lange nevritter E) Nevrittlengde per celle målt i μm. Spredningen for forsøk n=2 er vist som "range". F) Andel "spydceller". Statistiske analyser ble utført med ANOVA for å sammenligne alle eksponeringene mot ubehandlede celler og mot NGF-behandlede celler. * indikerer p-verdi < 0,05 sammenlignet med ubehandlede celler. # indikerer p-verdi < 0,05 sammenlignet med NGF (n=3-11). Datamaterialet er felles med Karina Borgund.



Figur 3.6 GW 441756 10 μM gir ingen effekter på nevrittutvekst i PC12-celler sammenlignet med ubehandlede celler. A-C: PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating, og studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA. GW 441756 ble undersøkt i PC12-celler med den høyeste konsentrasjonen (10 μM) for å ekskludere eventuelle effekter GW 441756 kunne utøve på PC12-celler i seg selv. A) Antall celler, B) Andel celler med nevritt, C) Antall nevritter per celle med nevritt. Ingen statistisk signifikant endring ble sett i celler eksponert med denne konsentrasjonen av GW 441756 sammenlignet med ubehandlede PC12-celler (n=3-11). Datamaterialet er felles med Karina Borgund.

3.1.4. Selektivitet av TrkA-hemmeren GW 441756

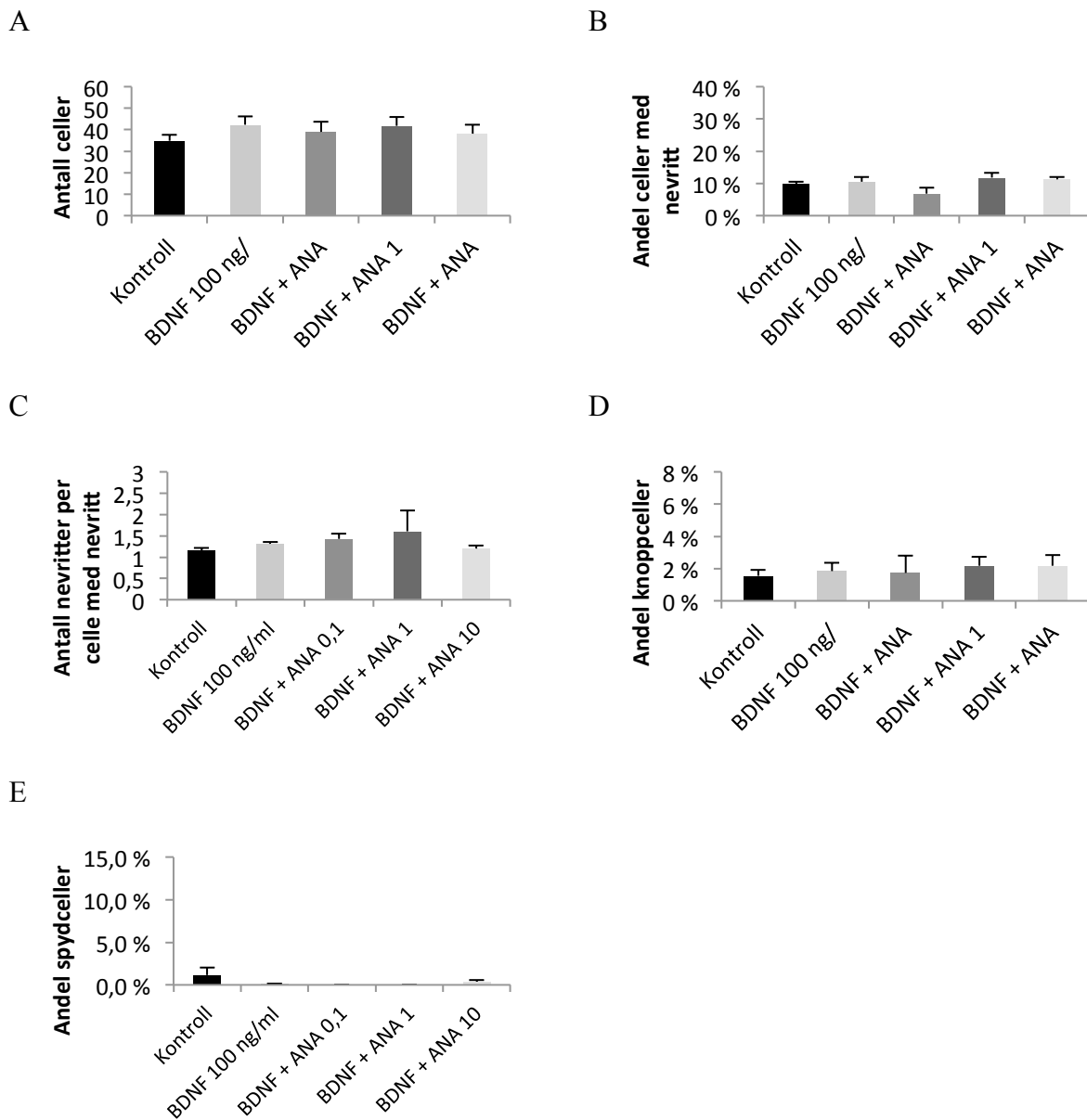
Det var ønskelig å undersøke selektiviteten til TrkA-hemmer og se om BDNF/TrkB-signaleringsveien var involvert. Et utvalg av resultatene vises i figur 3.7. Det ble ikke observert synergistisk effekt når PC12-celler ble eksponert for BDNF i kombinasjon med GW 441756-eksponering. Eksponering med GW 441756 ble utført 15 minutter før eksponering med BDNF.



Figur 3.7 GW 441756 gir ingen endring i effekter på nevruttvekst når PC12-celler ble eksponert for BDNF. A-C: PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. GW 441756 ble tilsatt skåler eksponert for BDNF. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA. A) Andel celler med nevrutt, B) Antall nevrutter per celle med nevrutt, C) Andel "knoppceller". Ingen statistisk signifikant forskjell ble sett mellom BDNF og BDNF kombinert med GW 441756 eller ubehandlede PC12-celler (n=3-11). Datamaterialet er felles med Karina Borgund.

3.1.5. Valg av konsentrasjon av TrkB-hemmeren ANA-12

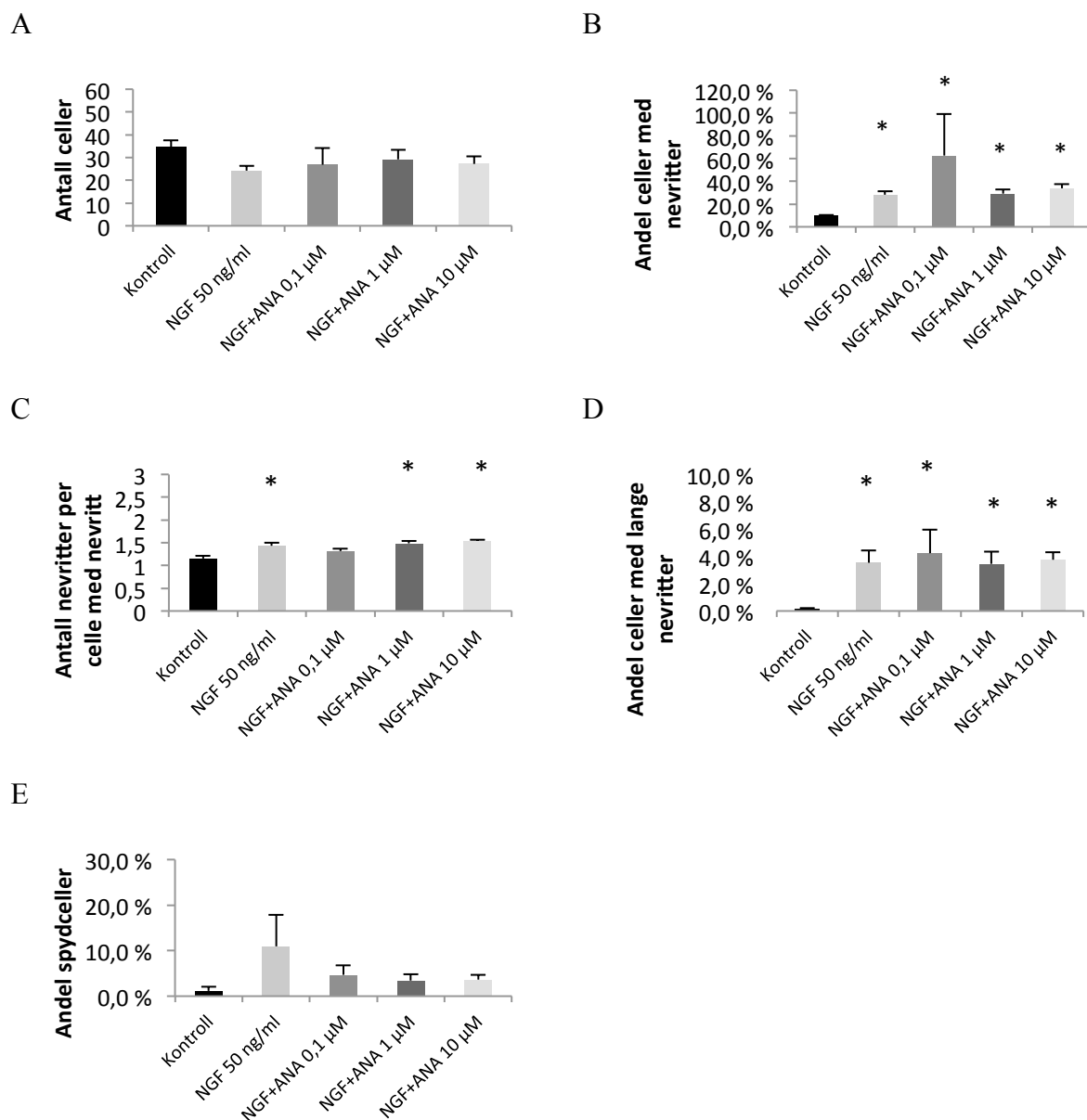
For å undersøke om legemidlene kunne utøve sin effekt på nevruttvekst i PC12 via TrkB-signalveier var det ønskelig å finne egnet TrkB-hemmer. Siden BDNF ikke påvirket nevruttvekst i PC12-cellenes var valg av konsentrasjon på TrkB-hemmeren en utfordring. ANA-12 er en lav-molekylær selektiv TrkB-antagonist [54]. Cellene ble eksponert for BDNF 15 minutter etter eksponering med ANA-12 når disse ble kombinert i samme skål. PC12-celler ble eksponert med ANA-12 i fire ulike konsentrasjoner 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M og 100 μ M (figur 3.8). 100 μ M var toksisk, og resulterte i kraftig celledød. ANA-12 forkortes til "ANA" i figurer 3.8-3.10. ANA-12 selv påvirket ikke nevruttvekst i PC12-celler (avsnitt 3.1.6 og figur 3.10).



Figur 3.8 Verken BDNF eller BDNF kombinert med ANA-12 gir effekter på nevritutvekst i PC12-celler
 A-E: PC12-celler ble eksponert for ANA-12 i fire ulike konsentrasjoner, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. 100 μ M var toksisk for PC12-cellene og ble ikke benyttet videre i forsøk. Statistiske analyser ble utført med enveis ANOVA. A) Antall celler, B) Andel celler med nevritt, C) Antall nevritter per celle med nevritt, D) Andel "knoppceller" (avsnitt 2.4), E) Andel "spyceller" (avsnitt 2.4). Det ble ikke observert signifikant forskjell i PC12-celler eksponert med BDNF og ANA-12 sammenlignet med ubehandlede celler eller celler eksponert for BDNF 100 ng/ml alene (n=3.11). Datamaterialet er felles med Karina Borgund.

3.1.6. Selektiviteten av TrkB-hemmeren ANA-12

ANA-12 ga ingen signifikante endringer på NGF-effekt (figur 3.9). Alle statistiske analyser er utført med ANOVA. Resultater fra t-test utført mellom ubehandlede PC12-celler og NGF-eksponerte PC12-celler er ikke vist i denne figuren, men gjennomgått i avsnitt 3.1.1. Cellene ble eksponert for ANA-12 15 minutter før eksponering med NGF.

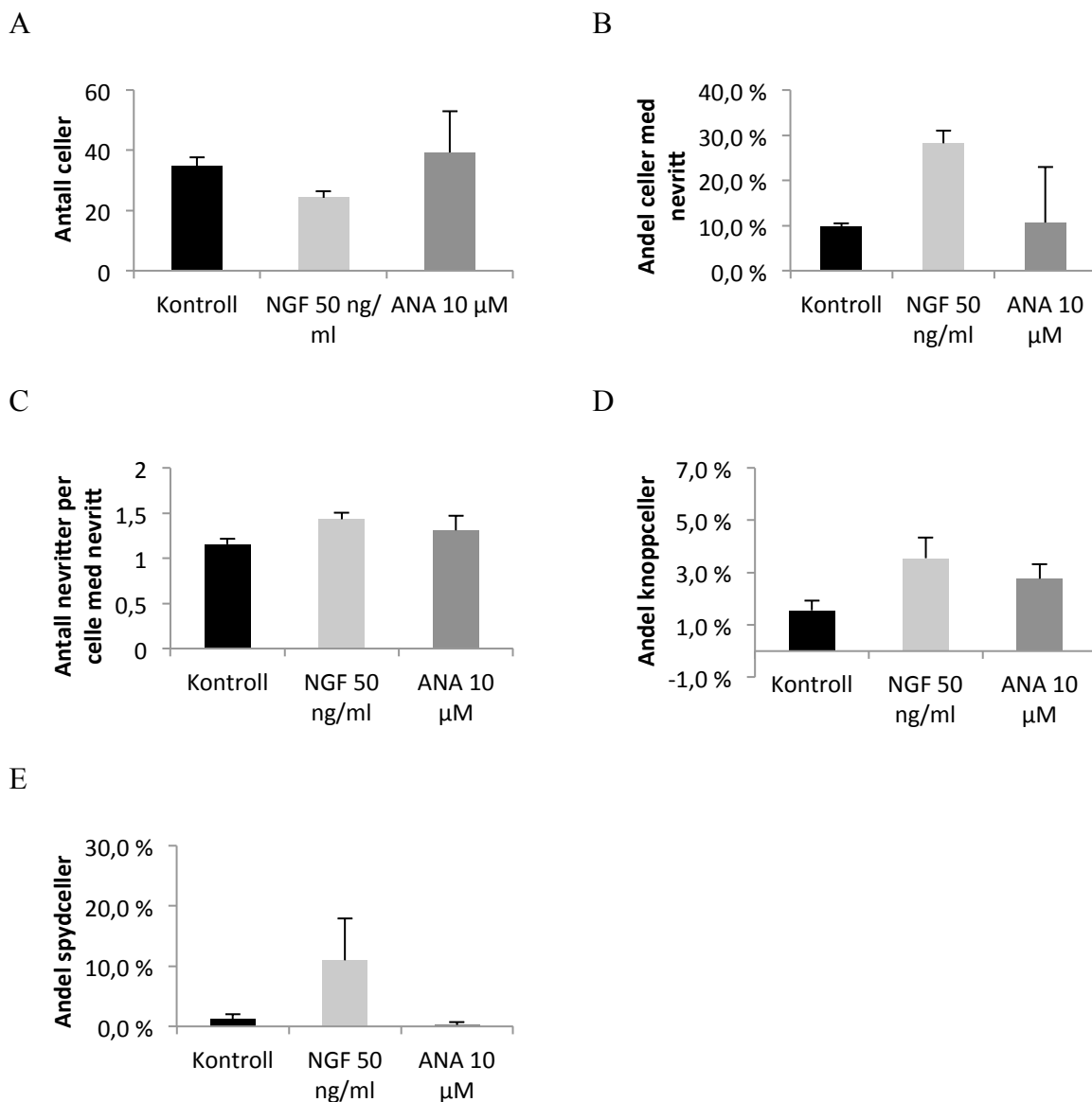


Figur 3.9 ANA-12 påvirker ikke NGF-effekten på nevrittutvekst i PC12-celler

A-E: PC12-celler ble eksponert med ANA-12 i fire ulike konsentrasjoner, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM og 100 μM, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. 100 μM var toksisk for PC12-celler og resulterte i celledød (ikke vist i figur). Statistiske analyser ble utført med ANOVA. A) Antall celler. B) Andel celler med nevritter. Her er aksens forskjellig fra andre figurer. C) Antall nevritter per celle med nevritt. D) Andel celler med lange nevritter. E) Andel "spydceller". * indikerer statistisk signifikans mellom behandling

og ubehandlede PC12-celler. Ingen signifikant forskjell mellom celler eksponert for både NGF og ANA-12 sammenlignet med celler eksponert for NGF alene (n=3-11). Datamaterialet er felles med Karina Borgund.

PC12-celler ble også eksponert for ANA-12 10 μ M for å undersøke at eventuelle effekter ikke kan skyldes ANA-12 i seg selv (figur 3.10). ANA-12 ga ingen signifikant endring på noen av endepunktene sammenlignet med ubehandlede PC12-celler.



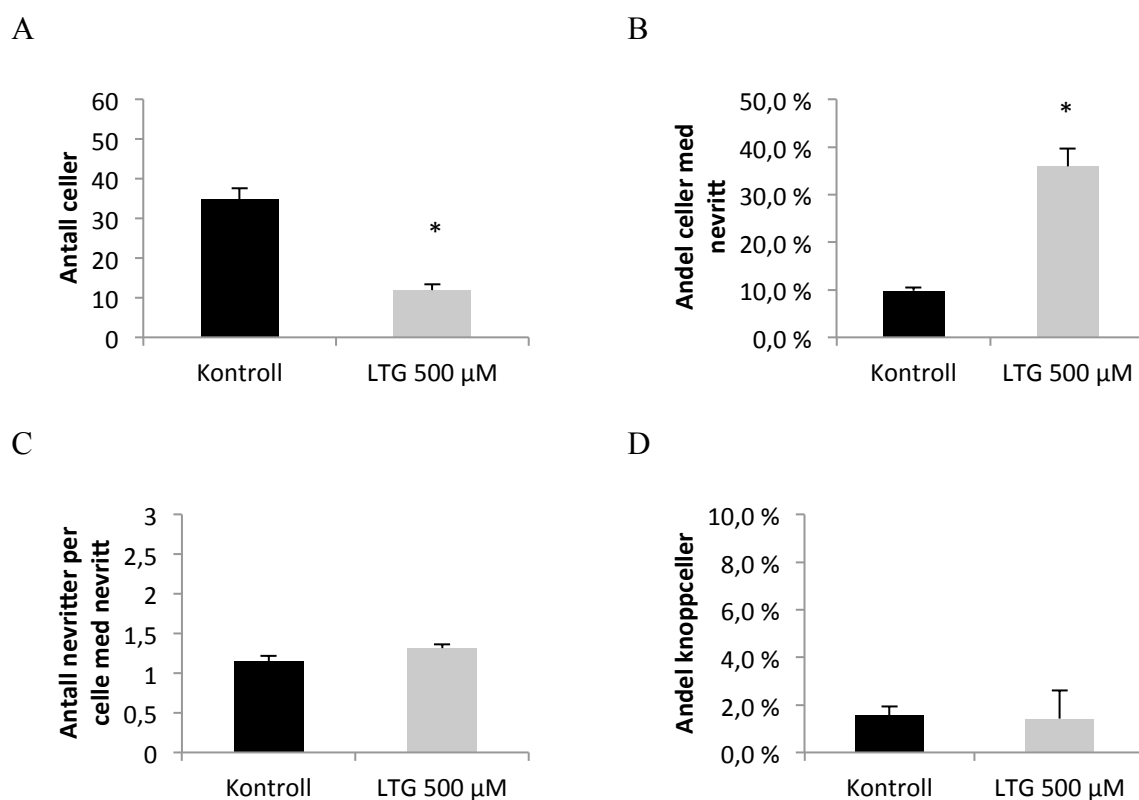
Figur 3.10 ANA-12 gir ingen endringer i PC12-celler sammenlignet med ubehandlede celler

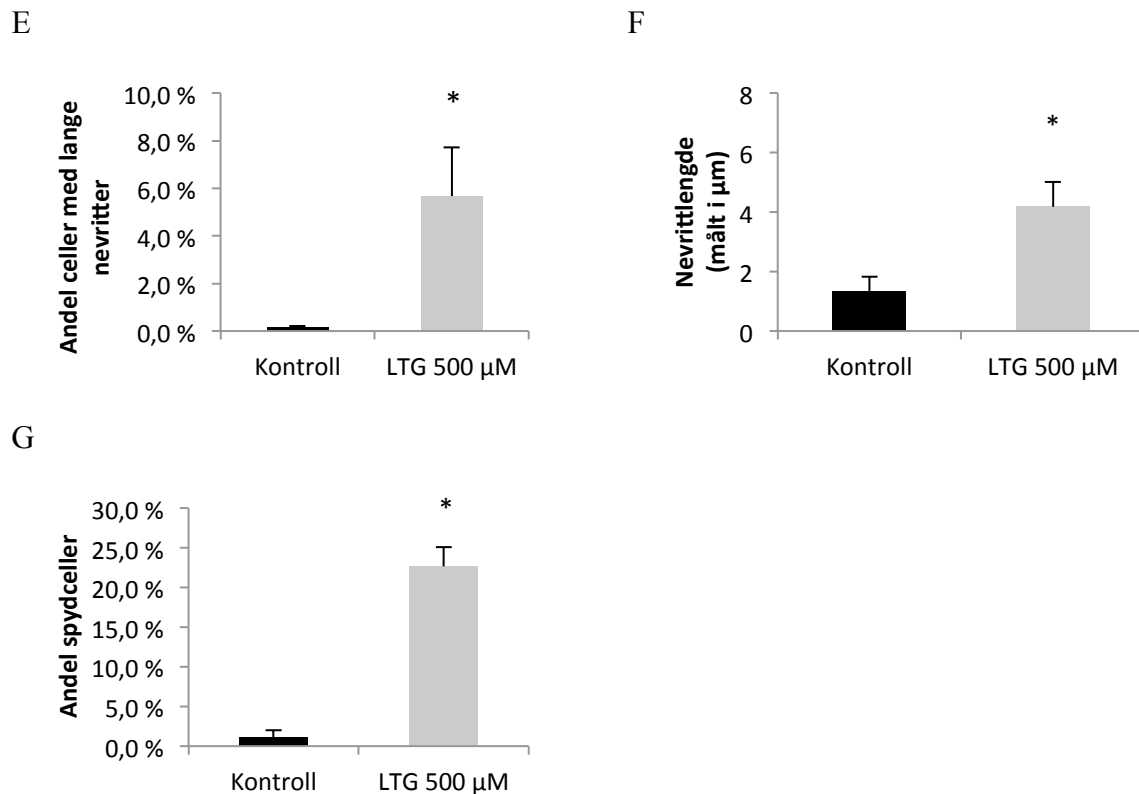
A-E: PC12-celler ble eksponert for NGF 50ng/ml eller ANA-12 10 μ M 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistiske analyser ble ikke utført da n=2. A) Antall celler, B) Andel celler med nevrutt, C) Antall nevrutter per celle med nevrutt, D) Andel "knoppceller" (avsnitt 2.4), E) Andel "spydceller" (avsnitt 2.4). Ingen tydelig forskjell ble observert hos PC12-celler eksponert med ANA-12 (n=2-11). Signifikant forskjell mellom NGF og ubehandlede PC12-celler er vist i figur 3.1. Spredningen for forsøk n=2 er vist som "range". Datamaterialet er felles med Karina Borgund.

3.2. Lamotrigins effekter på nevruttvekst i PC12-celler

For å undersøke om LTG hadde effekt på nevruttvekst i udifferensierte PC12-celler, ble cellene eksponert for LTG 500 μM 24 timer etter utsåing.

Det ble observert en reduksjon i antall celler for LTG 500 μM (figur 3.11). Mest karakteristisk for LTG var den spydlignende formen som ble observert. Cellene strekte seg ut, fikk lange cellekropper og ble ofte sett med en lang nevrutt på hver ende av cellekroppen. Dette ga utslag i økt andel celler med nevrutter og lange nevrutter, lengre nevruttlengde og økt andel “spydceller”.





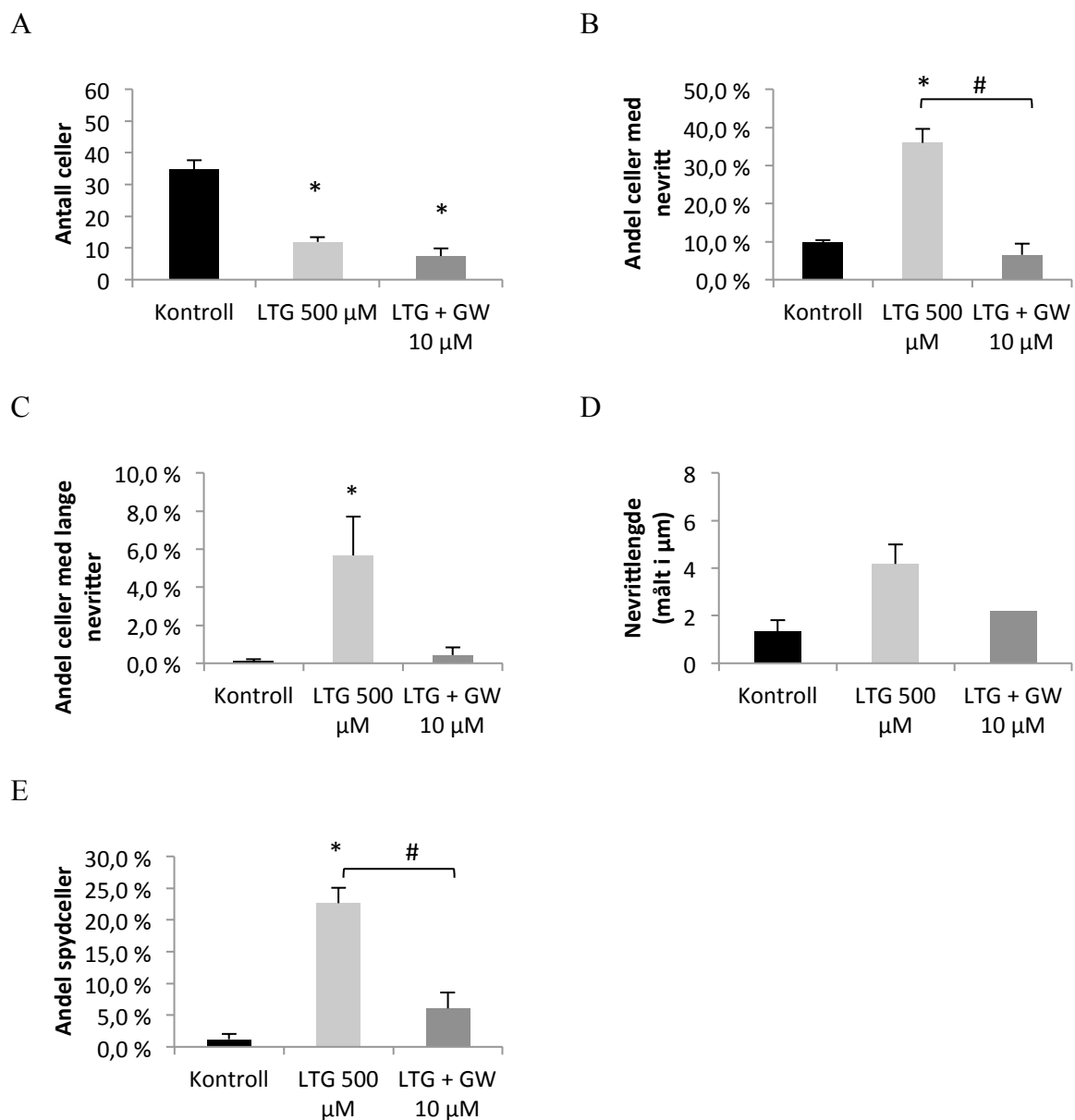
Figur 3.11 Lamotrigin gir signifikant endring i nevrittutvekst målt på fire endepunkter
 A-G: PC12-celler ble eksponert for LTG 500 µM 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. * indikerer p-verdi <0,05 og statistiske analyser ble utført med t-test. A) Antall celler. B) Andel celler med nevritter. C) Antall nevritter per celle. D) Andel ”knoppceller”. E) Andel celler med lange nevritter. F) Nevrittlengde per celle målt i µm. G) Andel ”spydceller”. LTG gir endring i nevrittutveksten i PC12-celler på flere endepunkt (n=4-11).

3.2.1. Lamotrigins effekter på nevrittutvekst via TrkA-signalvei

Det var ønskelig å undersøke om LTG kunne utøve noe av effekten på nevrittutvekst i PC12-celler via TrkA-signalveier. GW 441756 i konsentrasjon 10 µM ble benyttet som TrkA-antagonist for å se om det ble en endring i nevrittutvekst i forhold til PC12-celler eksponert for LTG alene (figur 3.12). Antagonisten ble tilsatt skålene 15 minutter før legemiddel. Videre resultater av LTG baserer seg på de endepunktene hvor LTG alene ga signifikant forskjell fra ubehandlede PC12-celler. Alle endepunkter ble undersøkt, men det ble ikke sett noen endring i effekter på de andre endepunktene.

LTG ga signifikant forskjell fra ubehandlede PC12-celler på fem av endepunktene (figur 3.11). Celler eksponert for GW 441756 15 minutter før eksponering med LTG (kombinasjonsbehandling) ga en signifikant reduksjon av antall celler med nevritt

sammenlignet med LTG alene. Andel celler med lange nevritter ble også redusert, men var ikke statistisk signifikant. T-test mellom celler eksponert for LTG alene og celler eksponert for kombinasjonsbehandling med GW 441756 og LTG ga likevel en p-verdi på 0,076, noe som må anses som lavt, men ikke signifikant. Lange nevritter ble kun observert i et av forsøkene i kombinasjonsbehandlingen med GW 441756 og LTG. GW 441756 reduserte LTGs ”spydcelle”-effekt (avsnitt 3.2), og langt færre ”spydceller” (avsnitt 2.4) ble observert sammenlignet med LTG alene. LTGs effekter på nevitutvekst ble redusert av TrkA-hemmeren.



Figur 3.12 TrkA-hemmeren GW 441756 reduserte effekter av lamotrigin på nevitutvekst i PC12-celler. A-E: PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter

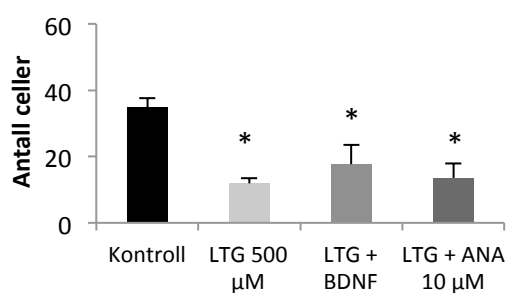
eksponering. Statistisk analyser ble utført med enveis ANOVA. A) Antall celler. B) Andel celler med nevrutt. Celler eksponert for LTG og GW 441756 var signifikant forskjellig fra hverandre (#) C) Andel celler med lange nevrutter. D) Nevritt lengde per celle med lang nevrutt målt i μm . Det ble kun observert lange nevrutter i et forsøk og SE er derfor ikke angitt i figur. E) Andel "spydceller. Det ble sett signifikant forskjell mellom celler eksponert for denne kombinasjonen og celler eksponert for LTG alene (merket med #). GW 441756 ser ut til å påvirke effekter LTG har vist å ha i PC12-celler (n=4-11).

3.2.2. Lamotrigins effekt på nevruttvekst via TrkB-signalvei

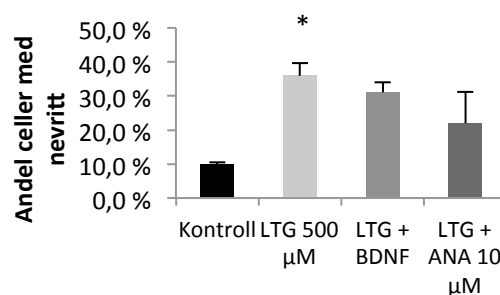
For å undersøke om LTG kunne utøve sin effekt på nevruttvekst via TrkB-signalveier, ble PC12-celler eksponert for ANA-12 og BDNF også eksponert med LTG (figur 3.13).

LTGs effekter på nevruttvekst så ikke ut til å bli påvirket i kombinasjon med BDNF eller TrkB-hemmeren ANA-12. Celler ble eksponert for LTG 15 minutter etter eksponering med ANA-12.

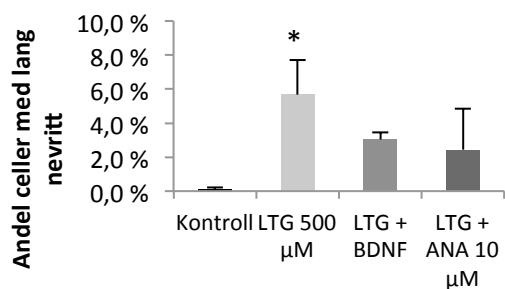
A



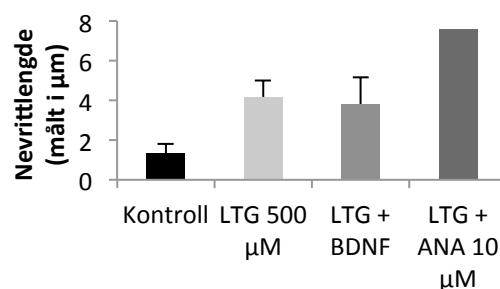
B



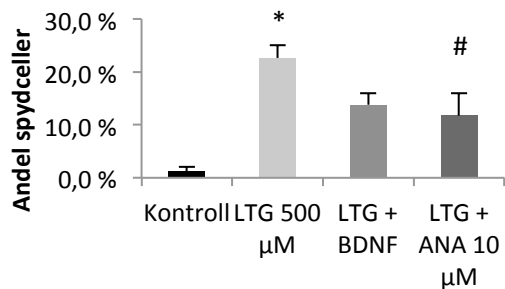
C



D



E



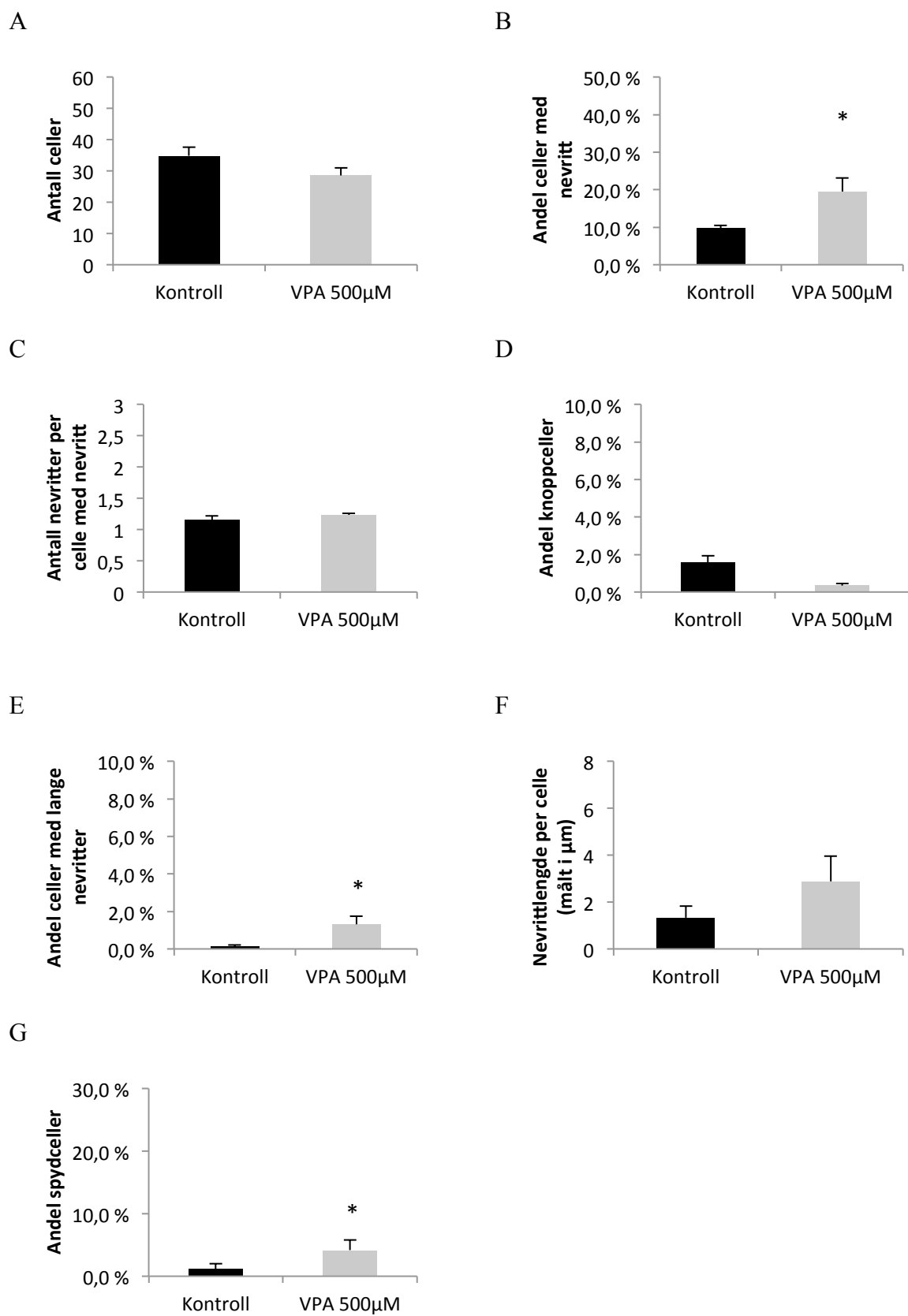
Figur 3.13 Lamotrigins effekt på nevruttvekst i PC12-celler endres ikke signifikant ved samtidig eksponering med BDNF eller TrkB-antagonist ANA-12. A-E: PC12-celler ble eksponert for kombinasjonsbehandlinger av LTG og BDNF eller ANA-12 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistisk analyser ble utført med enveis ANOVA og t-test. A) Antall celler B) Andel celler med nevrutt. C) Andel celler med lange nevrutter. D) Nevrittlengde per celle målt i µm. E) Andel “spydceller”. T-test viser signifikant forskjell mellom celler eksponert for LTG alene og LTG i kombinasjon med ANA-12 merket med #. Ingen signifikant forskjell ble vist med kombinasjonsbehandling sammenlignet med ubehandlede celler (n=3-11).

3.3. Valproats effekt på nevruttvekst i PC12-celler

For å undersøke hvilken effekt VPA hadde på nevruttvekst i PC12-celler, ble cellene eksponert for 500 µM VPA 24 timer etter utplating (figur 3.14).

VPA ga ingen effekt på celleproliferasjonen og celledetallet forble tilnærmet likt som for ubehandlede PC12-celler. Det ble observert økt andel celler med nevrutt, men VPA økte ikke nevruttantallet hos cellene med nevrutt. Andel celler med lange nevrutter økte også, men VPA så ikke ut til å ha noen effekt på nevruttlengden til de lange nevruttene. Det så ut til å være en prosentvis reduksjon i andel “knoppceller”, men dette var ikke signifikant. VPA ga en prosentvis økning i andel “spydceller”.

Resultatene tyder på at VPA, slik som LTG også påvirker nevruttvekst i PC12-celler, men forskjellene var mindre og nevruttene var ikke like lange.



Figur 3.14 Valproat har effekt på nevrittutvekst i PC12-celler

A-G: PC12-celler ble eksponert for VPA 500 μM 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistisk analyser ble utført med t-test. A) Antall celler. B) Andel celler med nevritter. C)

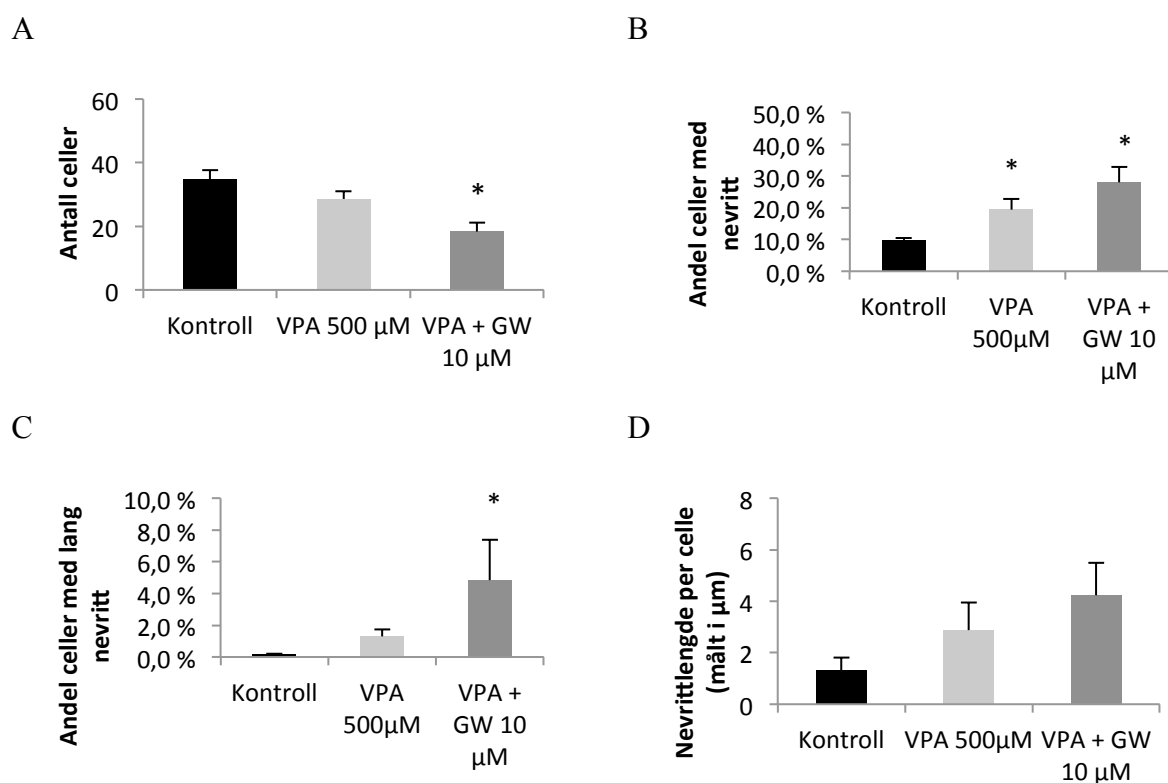
Antall nevritter per celle med nevritt. D) Andel “knoppceller”. E) Andel celler med lange nevritter. F) Nevrittlengde per celle målt i μm . G) Andel “spydceller”. VPA har effekt på nevritutvekst i PC12-celler (n=4-11).

3.3.1. Valproats effekter på nevritutvekst og TrkA-signalveier

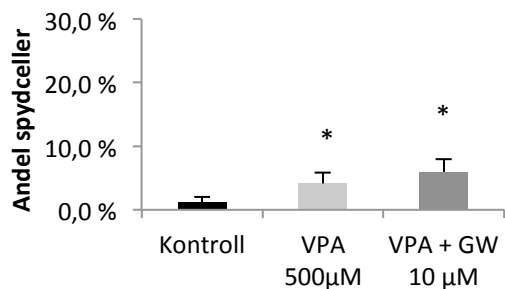
For å undersøke om VPA kunne utøve sin effekt i PC12-celler via TrkA-signalveier, ble PC12-celler eksponert for en kombinasjon av VPA og TrkA-antagonist GW 441756 (figur 3.15). Cellene ble eksponert for VPA 15 minutter etter eksponering med GW 441756.

TrkA-hemmeren ga ikke den samme reverseringen av nevritutvekst forårsaket av VPA slik som det ble observert hos LTG-eksponerte PC12-celler.

Statistiske analyser er utført med ANOVA. Resultater fra VPAs effekter i PC12-celler ble utført med t-test er vist i avsnitt 3.3 (figur 3.14) og er ikke vist i figur 3.15.



E



Figur 3.15 TrkA-hemmeren reverserer ikke valproats effekter på nevruttvekst.

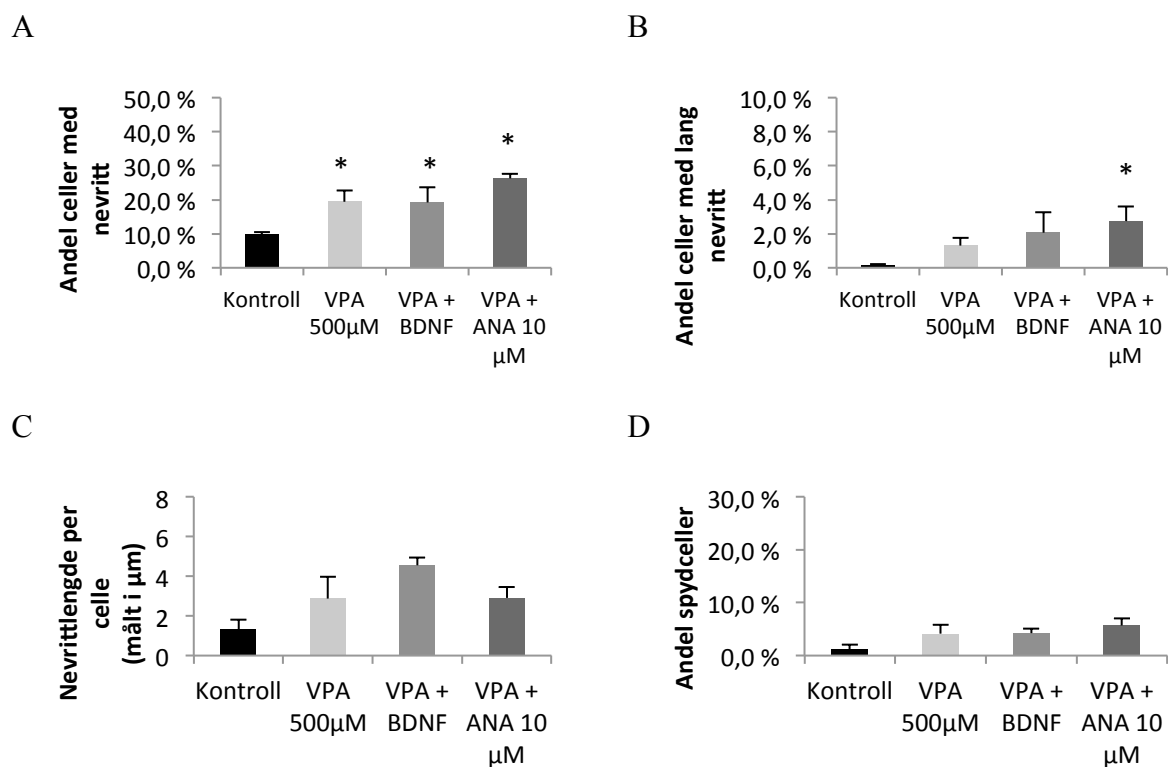
A-E: PC12-celler ble eksponert for VPA og VPA kombinert med GW 441756 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistisk analyser ble utført med enveis ANOVA. A) Antall celler. B) Andel celler med nevrutt. C) Andel celler med lange nevrutter. D) Nevrittlengde per celle målt i µm. E) Andel "spyceller". TrkA-hemmeren reduserte ikke nevruttveksten til VPA slik den gjorde hos LTG. (n=4-11).

3.3.2. Valproat og TrkB-signalveier

For å undersøke om VPAs effekter på nevruttvekst i PC12-celler kunne gå via TrkB-signalveier, ble celler eksponert for en kombinasjon av enten VPA og BDNF eller VPA og ANA-12 (figur 3.16).

Statistiske analyser viste at det var ingen signifikant forskjell i antall celler ved behandling med VPA ble kombinert med BDNF eller TrkB-antagonisten ANA-12 (ikke vist i figur). Kombinasjonsbehandlingene økte andel celler med nevrutter, men hadde ingen effekt på antall nevrutter per celle. Det kan se ut som om det er en additiv effekt på andel celler med lange nevrutter når VPA kombineres med TrkB-hemmeren ANA-12.

Statistiske analyser er utført med enveis ANOVA. Resultater fra VPAs effekter utført med t-test er vist i avsnitt 3.1.8 og er ikke vist i figur 3.16.



Figur 3.16 Valproats effekter på nevruttvekst i PC12-celler ble ikke endret ved samtidig eksponering med BDNF og den ble ikke reversert med TrkB-antagonisten ANA-12

A-D: PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Statistisk analyse ble utført med enveis ANOVA. A) Andel celler med nevritt. B) Andel celler med lange nevritter. C) Nevritt lengde per celle målt i µm. D) Andel "spydceller". VPAs effekter på nevruttvekst i PC12-celler går trolig ikke via TrkB-signalveier (n=3-11).

3.4. Renillaluciferaseaktivitet i PC12-celler

Renillaluciferase benyttes som internkontroll i ildflueluciferaseanalyser. Enzymaktiviteten av renillaluciferase antas å forbli konstant i transfekterte celler og skal ikke påvirkes av eksponeringer, vekstbetingelser eller andre forhold. Likevel har det den siste tiden blitt spekulert på om denne internstandard kan påvirkes av ulike faktorer [47]. Det var derfor ønskelig å undersøke om kotransfeksjon eller eksponering kunne påvirke enzymaktiviteten. rl-CMV ble kotransfektet med MMP9-LUC, p53-LUC og GCS-LUC og rl-tk ble kotransfektet med GCS-LUC. Resultater fra alle forsøk ble sammenlignet. Prosedyren for transfeksjon av celler er gjennomgått i avsnitt 2.5. Videre ble det undersøkt om selve eksponeringen kunne påvirke renillaluciferaseaktiviteten.

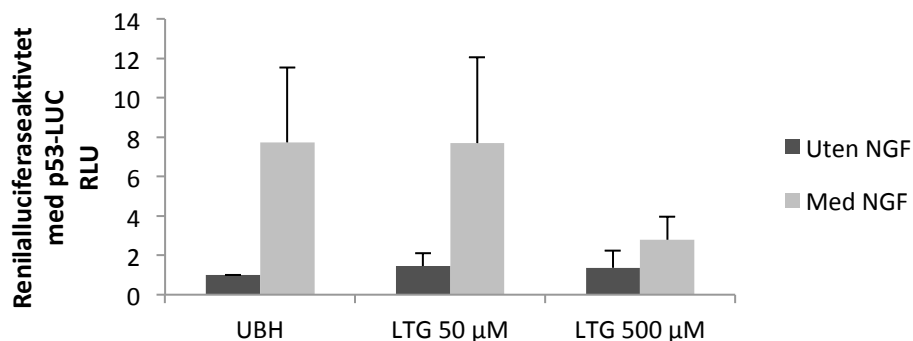
Alle y-akser angir RLU (relativ luminescensenhet). Renillaluciferaseaktiviteten varierte betraktelig fra forsøk til forsøk og figurene viser derfor datamateriale som er normalisert mot transfekterte og ubehandlede celler i sitt forsøk, slik at disse resultatene kan sammenlignes. I alle forsøk er cellene transfektet, inkludert de ubehandlede PC12-cellene. Resultatene er korrigert for bakgrunn (stop&glo-løsning) i luminescensmålingen. Statistiske analyser ble kjørt på de resultatene det så ut til å være størst forskjell mellom, men de var ikke signifikante.

3.4.1. Påvirkning av kotransfeksjon og behandling på enzymaktiviteten til renillaluciferase

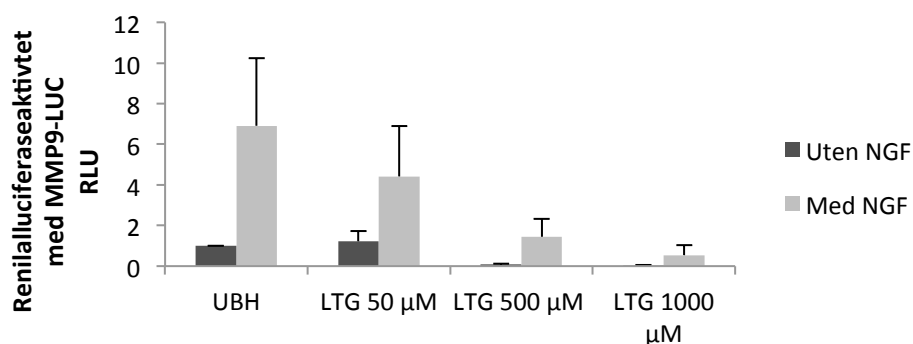
Det kan virke som om kotransfeksjon har liten påvirkning på enzymaktiviteten. Resultatene er vist i de tre figurene 3.17, 3.18 og 3.19. Kotransfeksjon med GCS-LUC ga i alle forsøkene langt lavere RLU enn hva MMP9-LUC og p53-LUC ga. Likevel gir resultatene en antydning til samme trend. NGF økte i alle tilfeller RLU i forhold til celler som ikke ble eksponert for NGF. LTG så ut til å redusere RLU ved økende konsentrasjon. Svært lav renillaluciferaseaktivitet ble sett ved LTG 1000 μM og skyldes muligens celledød (avsnitt 3.5).

Renillaluciferaseaktiviteten ved kotransfeksjon med p53-LUC ga økt respons i alle eksponeringer med NGF. Den gjennomsnittlige renillaluciferaseaktivitet ved kotransfeksjon med MMP9-LUC viser en reduksjon ved økende konsentrasjon av LTG. Kotransfeksjon med GCS-LUC ser ut til å gi minst variasjon mellom behandlingene.

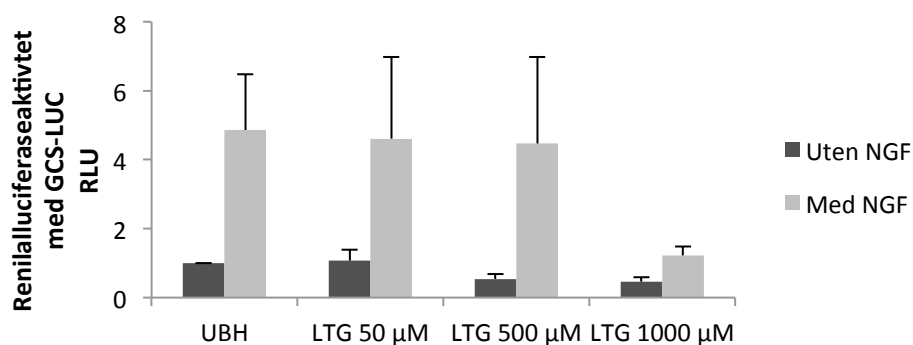
A



B



C

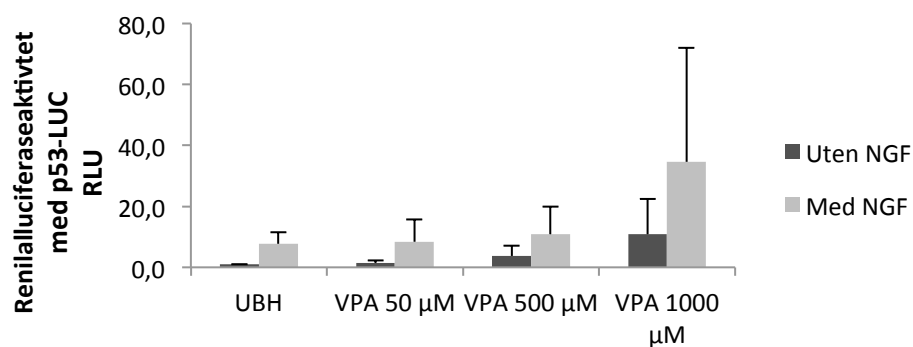


Figur 3.17 Effekter av kotransfeksjon på renilluciferaseaktivitet med behandling av lamotrigin alene gir liten effekt på promotoraktivitet, men aktiviteten øker i kombinasjon med NGF.

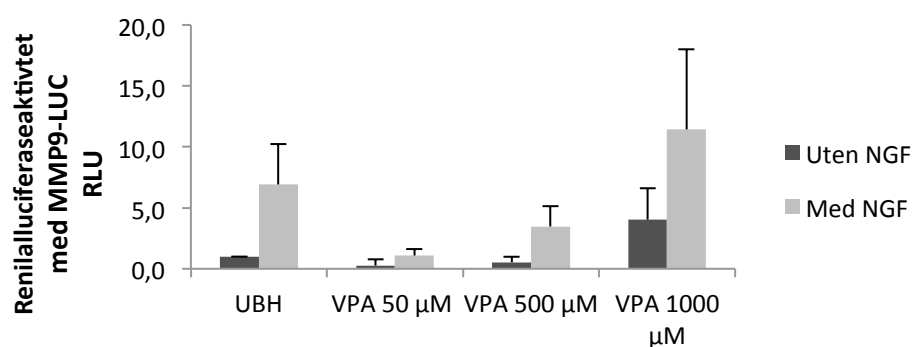
A-C: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating. Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlet celler (UBH). A) Renilluciferaseaktivitet ved kotransfeksjon med p53-LUC viser økt respons i alle eksponeringer med NGF (n=3) B) Gjennomsnittlig renilluciferaseaktivitet ved kotransfeksjon med MMP9-LUC viser en reduksjon ved økende konsentrasjon av LTG (n=3). C) Den gjennomsnittlige renilluciferaseaktiviteten ser ut til å vise minst variasjon når kotransfektet med GCS-LUC sammenlignet med de andre kotransfeksjonene (n=3-4)

VPA 1000 μM økte renilluciferaseaktiviteten i større grad enn de andre konsentrasjonene i alle plasmidene. Dette gjelder også spesielt de NGF-differensierte cellene som ble eksponert for VPA. Den samme trenden ble sett i alle kotransfeksjonene. Kotransfeksjon med GCS-LUC ga generelt lavere RLU enn kotransfeksjon med p53-LUC og MMP9-LUC.

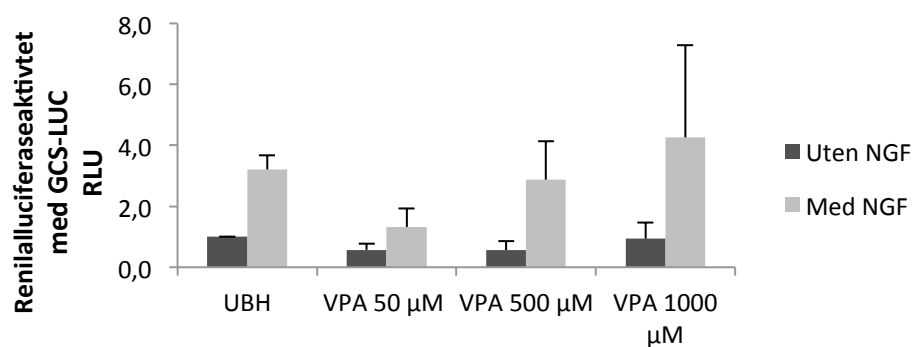
A



B



C



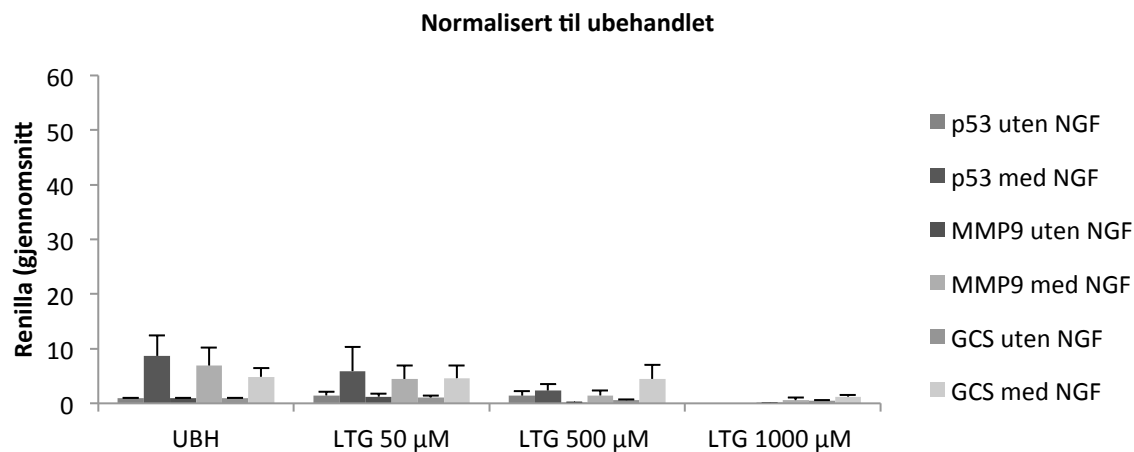
Figur 3.18 Effekter av kotransfeksjon på renilluciferaseaktivitet med behandling av valproat viser liten effekt ved eksponering av valproat alene, unntatt for 1000 μM .

A-C: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating.

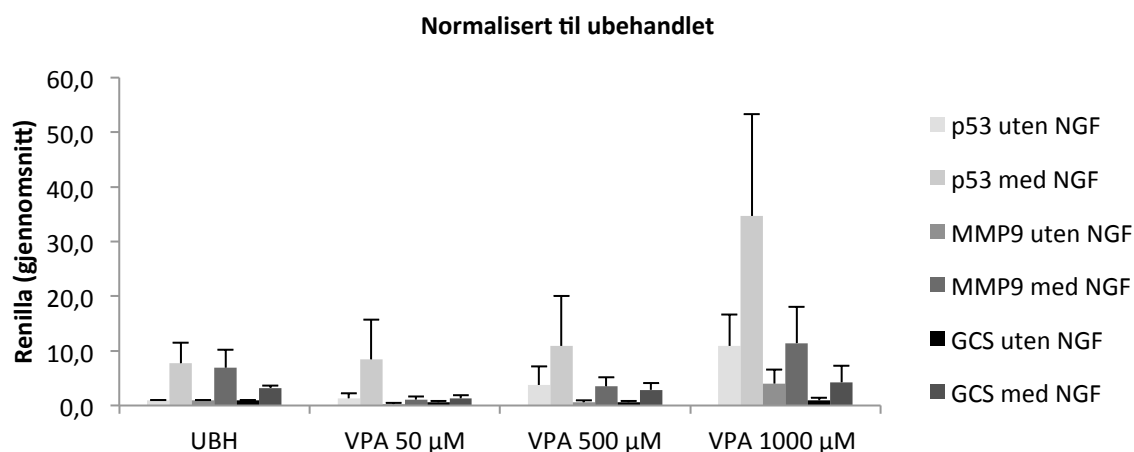
Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlet celler (UBH). A) Renilluciferaseaktivitet ved kotransfeksjon med p53-LUC ga størst aktivitet på VPA 1000 μM (n=2-3). Avvik for n=2 er vist med "range". B) Renilluciferaseaktivitet ved

kotransfeksjon med MMP9-LUC (n=3). C) Renillaluciferaseaktivitet ved kotransfeksjon med GCS-LUC (n=2-3). Avvik for n=2 er vist med "range".

A



B



Figur 3.19 Samlet resultater fra figur 3.17 og 3.18

A-B: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating.

Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU

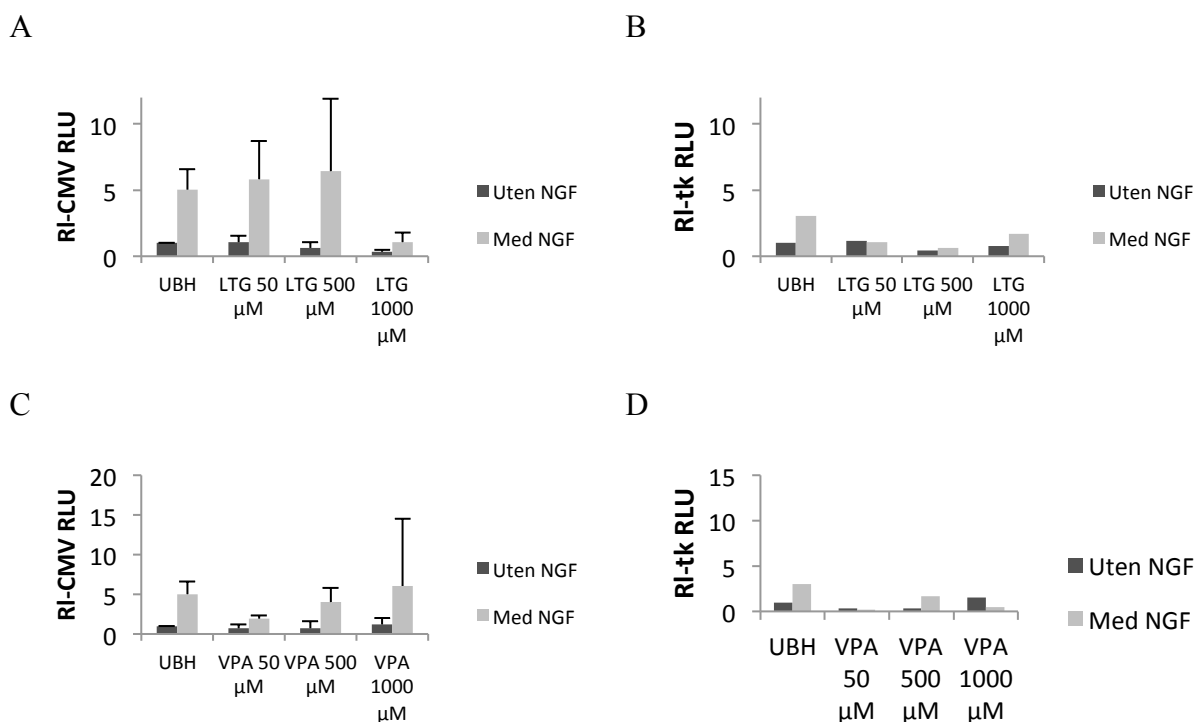
normalisert til ubehandlet. A) Gjennomsnittlig renillaluciferaseaktivitet for kotransfeksjon med alle plasmider

med behandling av LTG og NGF (n=3-4). B) Gjennomsnittlig renillaluciferaseaktivitet for kotransfeksjon med alle plasmider med behandling av VPA og NGF (n=2-3). Avvik for n=2 er vist med "range".

3.4.2. Forskjeller mellom reporter-genene rl-CMV og rl-tk

Valg av reporter-gen kan være en utfordring. rl-CMV består av gen som koder for renillaluciferase drevet av en sterk promotor fra cytomegalovirus (CMV). Renillaluciferase uttrykkes i alle transfekterte celler, og aktiviteten er proporsjonal med antall celler som er transfektet. I denne oppgaven ble det brukt to reporter-gener rl-CMV og rl-tk (figur 3.20 og figur 3.21).

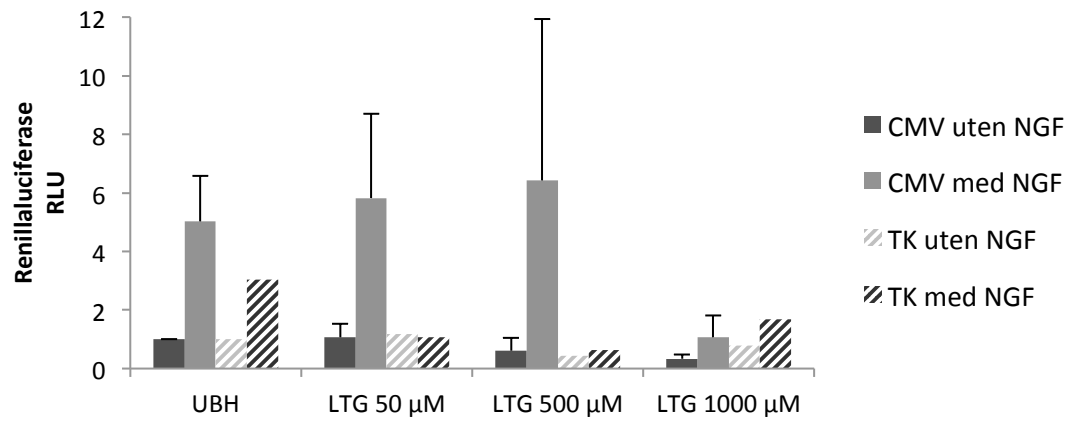
rl-CMV så ut til å gi høyere RLU enn rl-tk, mens rl-tk ser ut til å være mindre følsom for eksponeringer og prøvebehandling, og kan derfor være en bedre egnet interkontroll. Ulempen med rl-tk er at den drives av en svakere promotor, noe som gir lavere RLU. Kun et forsøk ble utført med rl-tk, og ingen standardfeil er angitt i figur 3.20. rl-CMV antydes å bli påvirket i langt større grad av NGF enn hva rl-tk gjorde.



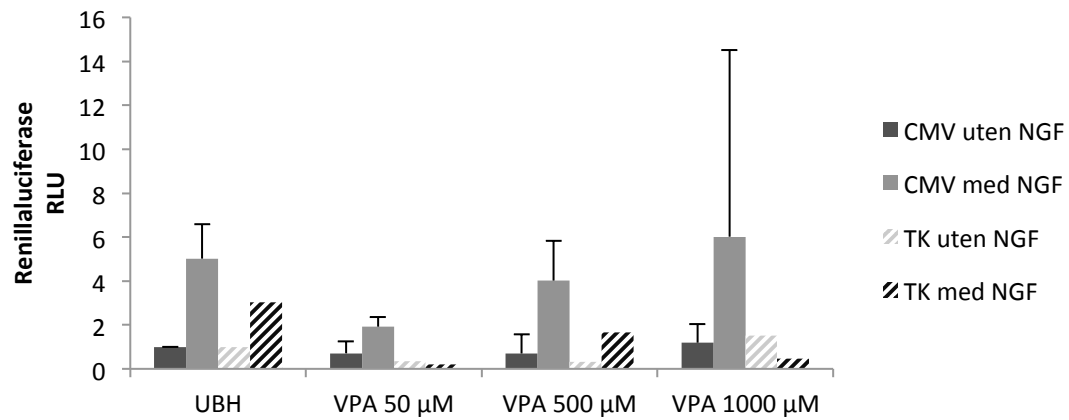
Figur 3.20 rl-tk ser ut til å være mindre påvirket av både behandlingene med spesielt NGF-behandling, sammenlignet med rl-CMV

A-D: PC12-celler ble transfektet 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating. Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlede PC12-celler. A) Renillaluciferaseaktivitet av rl-CMV for celler eksponert for LTG. B) Renillaluciferaseaktivitet ser ut til å være lavere for rl-tk for celler eksponert for LTG. C) Renillaluciferaseaktivitet av rl-CMV for celler eksponert for VPA. D) Renillaluciferaseaktivitet av rl-tk for celler eksponert for VPA ser ut til å gi mindre variasjon (n=1-4). Avvik for n=2 er vist med "range".

A



B



Figur 3.21 Samlet resultater fra figur 3.20

A-B: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating.

Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlede PC12-celler (n=1-4). Avvik for n=2 er vist med "range". A) Samlet sammenligning av rl-CMV og rl-tk-aktivitet i PC12-celler eksponert for LTG. B) En samlet sammenligning av rl-CMV og rl-tk-aktivitet i PC12-celler eksponert for VPA.

3.5. Ildflueluciferaseaktivitet i PC12-celler og kyllingkornceller

Celler ble transfektert med plasmider som inneholdt promotorer eller bindingsete koblet til et ildflueluciferase reportergen (LUC). Endring i aktiviteten til reportergenuttrykk svarer til biologiske endringer i proteinuttrykk. Prosedyren for transfeksjon av celler er gjennomgått i avsnitt 2.5.

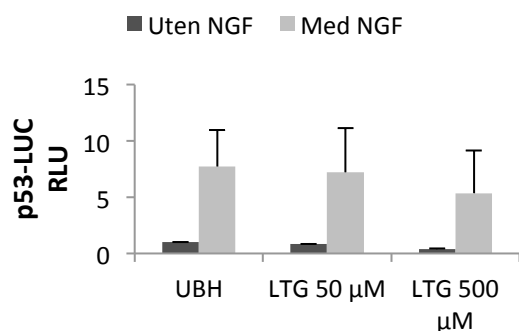
Alle y-akser angir RLU (relativ luminescens enhet). Resultatene varierte betraktelig fra forsøk til forsøk og figurene viser derfor datamateriale som er normalisert til transfekterte, ubehandlede celler i sitt forsøk, slik at disse resultatene kan sammenlignes. Resultatene er korrigeret for bakgrunn (stop&glo-løsning) i luminescensmålingen. Statistiske analyser ble kjørt for resultatene, men de var ikke signifikante.

3.5.1. Lamotrigins effekter på p53-aktivitet i PC12-celler

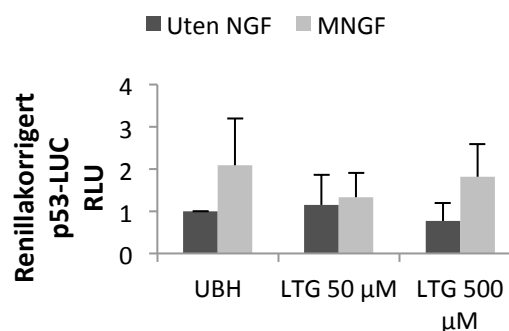
PC12-celler ble transfektert (avsnitt 2.5) med p53-plasmid under kontroll av ildflueluciferase, 24 timer etter utsåing (figur 3.22). rl-CMV ble brukt som internkontroll. Cellene ble eksponert for LTG i konsentrasjoner på 50 μM og 500 μM med og uten NGF 50 ng/ml rett etter transfeksjon.

LTG alene så ikke ut til å påvirke p53-LUC-aktivitet, men LTG så ut til å redusere NGF-effekten på p53 eller p53-LUC-aktivitet. NGF viser en tendens til å øke RLU til både p53-LUC og renillakorrigeret p53-LUC alene eller i kombinasjon med LTG.

A



B



Figur 3.22 Lamotrigin ser ikke ut til å endre aktiviteten av p53

A-B: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating.

Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU

normalisert til ubehandlede PC12-celler. A) Ildflueaktivitet målt med p53-LUC. B) Gjennomsnittlig

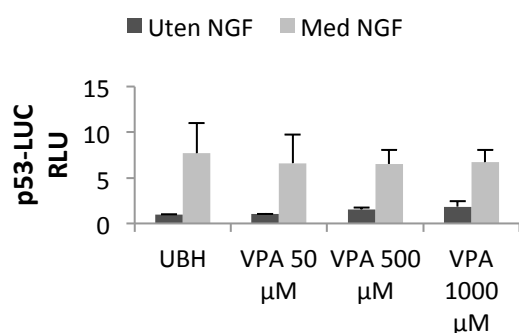
renillakorrigert p53-LUC-aktivitet. LTG ser ikke ut til å påvirke p53-uttrykk, men NGF alene og i kombinasjon ga en økning i RLU (n=3).

3.5.2. Valproats effekter på p53-aktivitet i PC12-celler

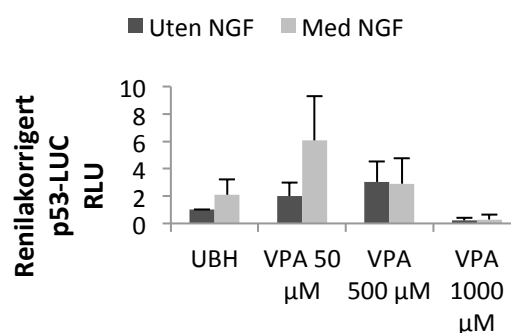
PC12-celler ble transfektert med p53-plasmid under kontroll av ildflueluciferase, 24 timer etter utplating. rl-CMV ble brukt som internkontroll. Cellene ble eksponert for VPA i konsentrasjoner på 50 μ M, 500 μ M og 1000 μ M med og uten NGF 50 ng/ml rett etter transfeksjon (figur 3.23).

VPA så ut til å øke p53-aktivitet, med størst effekt i konsentrasjonen 500 μ M. Celler eksponert for VPA 1000 μ M så ut til å redusere p53-aktiviteten. Resultatene er hentet fra tre forsøk, men VPA 1000 μ M ble kun benyttet i to av disse.

A



B



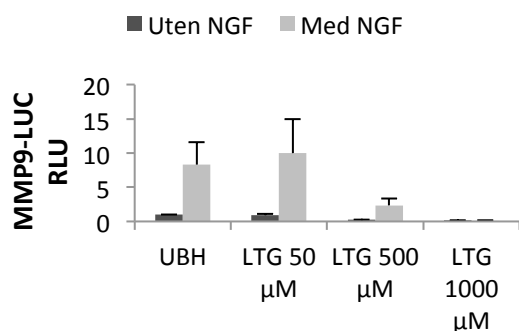
Figur 3.23 Valproat ser ut til å øke p53-aktivitet ved 500 μM men redusere aktiviteten ved 1000 μM. A-B: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating. Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlede PC12-celler. A) Ildflueaktivitet hos PC12-celler eksponert for VPA i tre konsentrasjoner. B) Renilakkorrigerte p53-LUC-aktivitet, VPA så ut til å øke p53-aktivitet, men størst effekt i konsentrasjonen 500 μM. Celler eksponert for VPA 1000 μM så ut til å redusere p53-aktiviteten. Resultatene er hentet fra tre forsøk, men VPA 1000 μM ble kun benyttet i to av disse (n=2-3). Avvik for n=2 er vist med "range".

3.5.3. Lamotrigins effekter på MMP9-promotoraktivitet i PC12-celler

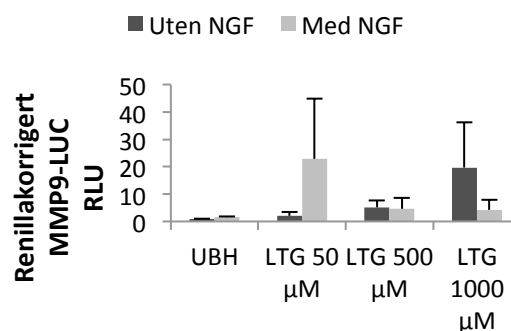
PC12-celler ble transfektert med promotor for MMP9 koblet til reportergen for ildflueluciferase (MMP9-LUC), 24 timer etter utplating. rl-CMV ble brukt som internkontroll. Cellene ble eksponert for LTG i konsentrasjoner 50 μM, 500 μM og 1000 μM, med og uten NGF 50 ng/ml.

LTG så ut til å øke aktivitet av MMP9-promotoren med varierende resultater i forsøkene. Da aktiviteten til MMP9-LUC var lav på 1000 μM LTG, men ble høy ved renilakkorrigering, kan det tyde på celledød. Det kan se ut til at lamotrigin har en doserelatert økning av MMP9-promotoraktivitet (figur 3.24). Et forsøk med PC12-celler eksponert for LTG 1000 μM og NGF ble ekskludert da RLU var lavere enn bakgrunn.

A



B



Figur 3.24 Lamotrigin gir en antydning til å øke MMP9-promotoraktivitet i PC12-celler

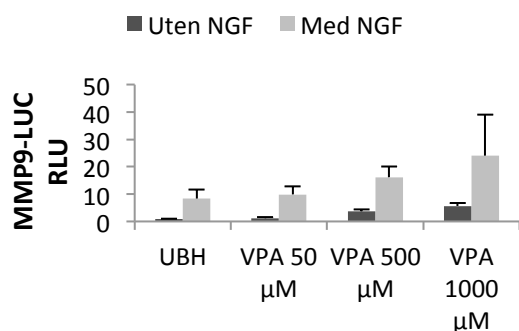
A-C: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating.

Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlede PC12-celler. A) Gjennomsnittlig MMP9-LUC aktivitet for PC12-celler eksponert for lamotrigin (n=2-3). B) Renillakorrigertluciferaseaktivitet av MMP9-LUC (n=2/3) hvor et forsøk med LTG 1000 μM med NGF er sett bort fra, da RLU var lavere enn bakgrunn.

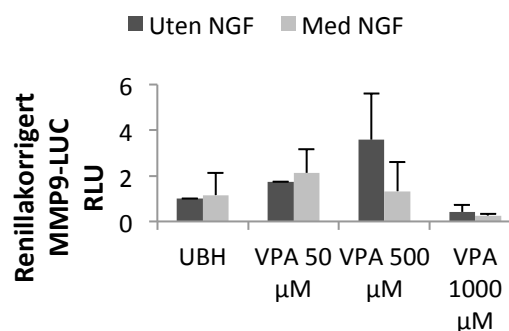
3.5.4. Valproats effekter på MMP9-promotoraktivitet i PC12-celler

PC12-celler ble transfektert (avsnitt 2.5) med promotor for MMP9 koblet til reporter gen for ildflueluciferase (MMP9-LUC), 24 timer etter utplating (figur 3.25). r1-CMV ble brukt som internkontroll. Etter at transfeksjonsløsningen ble fjernet ble cellene eksponert for VPA i konsentrasjoner 50 μM, 500 μM og 1000 μM. Cellene ble høstet til luciferaseassay 48 timer etter VPA eksponering. Resultatene kan tyde på at VPA øker aktiviteten til MMP9-promotoren med størst effekt for VPA i konsentrasjoner på 500 μM. Ved 1000 μM ble imidlertid MMP9-promotoraktiviteten redusert. Resultatene er vist i figur 3.25.

A



B



Figur 3.25 Valproat ser ut til å øke aktiviteten av MMP9-promotoren i PC12-celler

A-C: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating.

Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU

normalisert til ubehandlede PC12-celler. A) Luciferaseaktiviteten av MMP9-promotoren som viser en

doserelatert økning i RLU (n=3) B) Renillakorrigert luciferaseaktivitet av MMP9-LUC viser en økning av

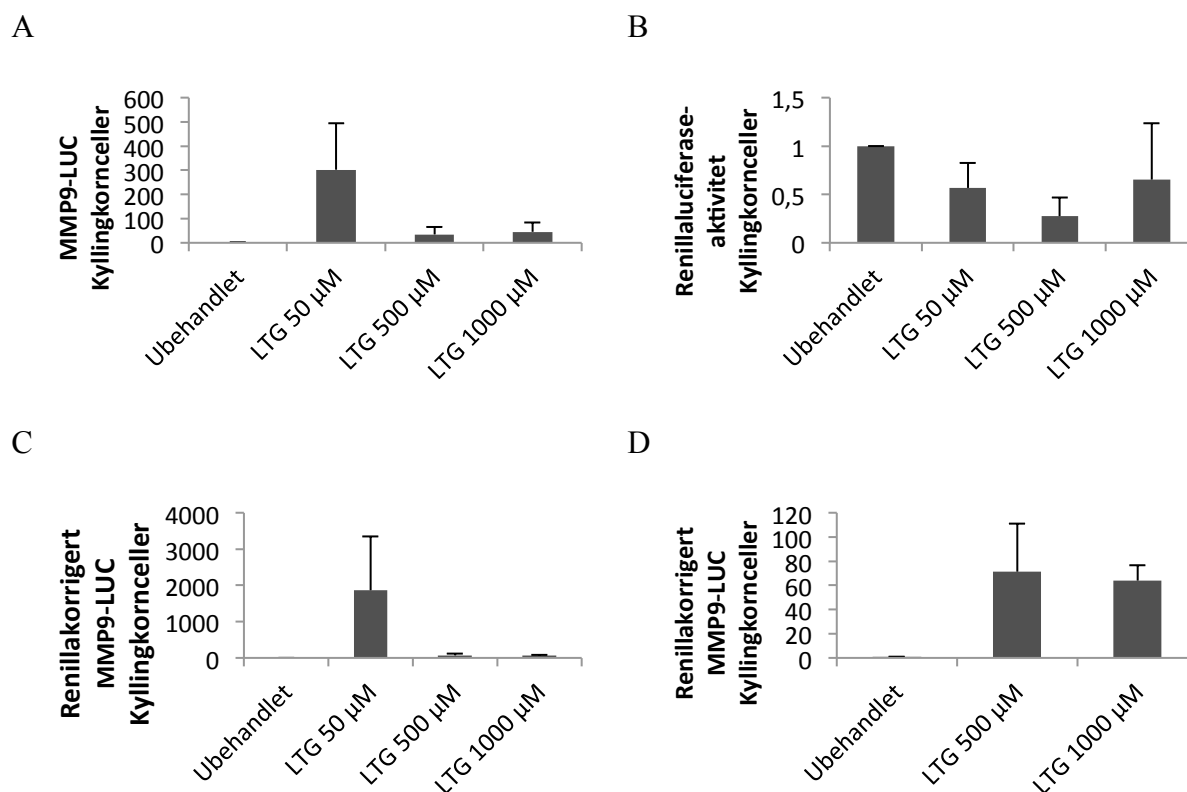
aktiviteten til MMP9-promotor, men hvor VPA 500 μM ga størst økning. VPA 1000 μM ga lavere aktivitet enn

både VPA 50 μM og VPA 500 μM Figuren viser renillakorrigert luciferaseaktivitet hvor et av forsøksdatoene er

fjernet, da denne datoen avvike svært mye fra de andre forsøkene (n=1-2). Varians ved n=2 er angitt i "range".

3.5.1. Effekter av lamotrigin på MMP9-promotoraktivitet i kyllingkornceller

Kyllingkornceller ble transfektert med MMP9-LUC 24 timer etter høsting. r1-CMV ble brukt som internkontroll. Deretter ble korncellene eksponert for LTG i konsentrasjonene 50 μM, 500 μM og 1000 μM (figur 3.26). Korncellene er en primærkultur hentet fra lillehjernen til kylling, og det var ikke nødvendig med eksponering med NGF, da disse allerede har nevronale egenskaper. Resultatene kan sammenlignes med hva som ble observert i PC12-celler. LTG ser ut til å øke aktiviteten til MMP9-promotoren i begge celledmodellene. Variasjonen mellom forsøkene var større i kyllingkorncellene enn i PC12-cellene.



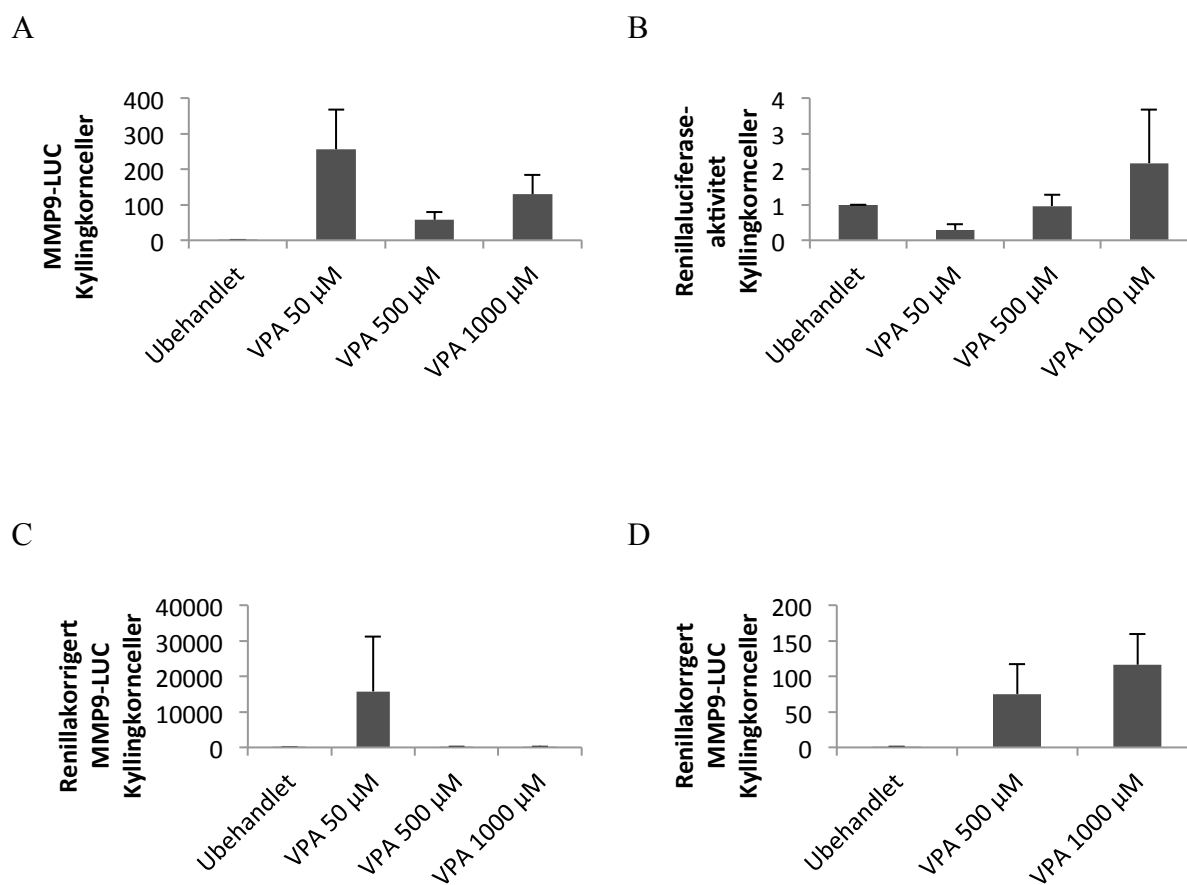
Figur 3.26 Lamotrigin viser tendenser til å øke promotoraktiviteten for MMP9 i kyllingkornceller
 A-D: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating. Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlede kornceller. A) Luciferaseaktivitet av MMP9-LUC. B) Renilla-luciferaseaktivitet av r1-CMV. C) Renilla-korrigert luciferaseaktivitet for alle eksponeringer av LTG. D) Renilla-korrigert luciferaseaktivitet uten LTG 50 µM. LTG ser ut til å øke MMP9-promotoraktivitet (n=3).

3.5.2. Effekter av valproat på MMP9-promotoraktivitet i kyllingkornceller

Kyllingkornceller ble transfektert med MMP9-LUC 24 timer etter høsting. r1-CMV ble brukt som internkontroll. Deretter ble korncellene eksponert for VPA i konsentrasjonene 50 µM, 500 µM og 1000 µM (figur 3.27). Korncellene er en primærkultur hentet fra lillehjernen til kylling og det var ikke nødvendig med eksponering med NGF, da disse allerede har nevronale egenskaper.

Det kan se ut til at VPA også i kornceller øker MMP9-LUC-aktiviteten, slik den gjorde i PC12-celler. Etter renilla-luciferasekorrigeringer ser det ut til at VPA 50 µM har størst innflytelse på MMP9-promotoren, men det er stor variasjon i et av de tre forsøkene. Det er

derfor valgt å lage to figurer av renillaluciferasekorrigerte resultater for å få frem effekten av de to andre konsentrasjonene.



Figur 3.27 VPA ser ut til å øke aktiviteten av MMP9-promotoren i kyllingkornceller

A-D: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating. Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlede kornceller. A) luciferaseaktivitet øker ved behandling med VPA. B) Renillaluciferaseaktivitet av rI-CMV ser ut til å øke med økende konsentrasjon av VPA. C) Renillakorrigert luciferaseaktivitet som viser alle eksponeringer. D) Renillakorrigert luciferaseaktivitet uten VPA 50 μ M. VPA ser ut til å øke MMP9-promotoraktivitet (n=3).

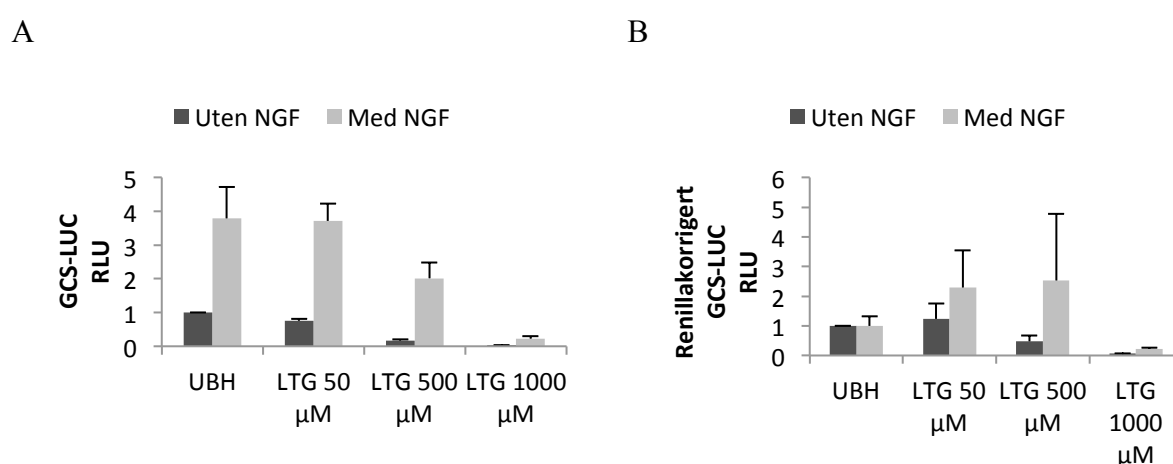
3.6. Lamotrigin og valproats effekter på GCS-promotor målt ved luciferaseassay

Som et sideforsøk til nevruttutvekst var det interessant å se hvilken effekt legemidlene kunne ha på forsvarsmekanismer mot oksidativt stress.

γ -glutamylcystein syntetaser (GCS, også kjent som glutamatcysteinligase GCL) er en av to enzymer ansvarlig for produksjon av glutation. Den maksimale konsentrasjonen av glutation i kroppen styres av en inhiberende feedbackmekanisme på GCS. Komponenter som hindrer denne mekanismen er kandidater for å kunne øke cellulære GSH-nivå [42].

3.6.1. Lamotrigins effekter på GCS-promotoraktivitet i PC12-celler

PC12-celler ble transfektert med GCS-LUC og kotransfektet med rl-CMV eller rl-tk 24 timer etter utsåing. For å undersøke om LTG kunne øke eller redusere aktiviteten av GCS-promotoraktivitet, ble transfektete PC12-celler eksponert med LTG i konsentrasjonene 50 μ M, 500 μ M og 1000 μ M rett etter fjerning av transfeksjonsløsning (figur 3.28). Resultatene viser en svak reduksjon av GCS-promotoraktivitet i PC12-celler eksponert med LTG, men en økning med NGF til stede.

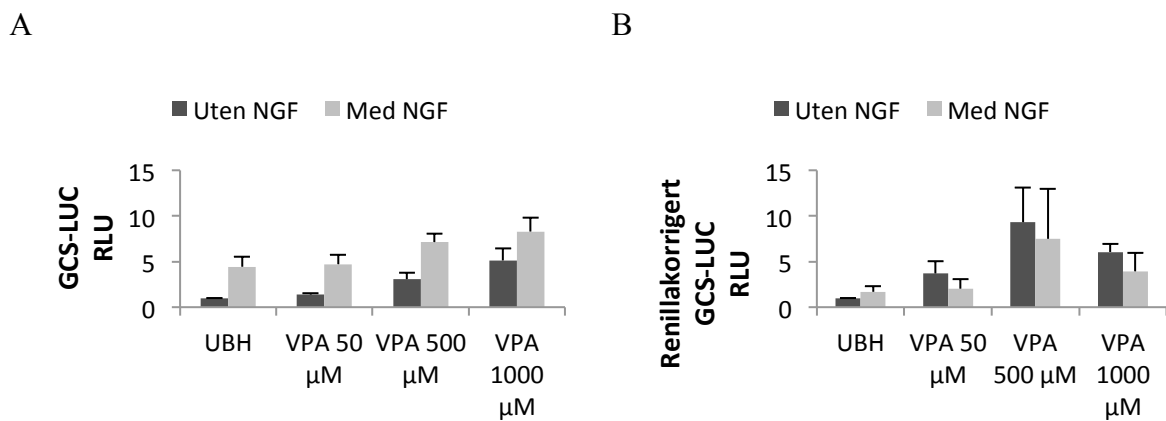


Figur 3.28 Lamotrigin ser ut til å redusere GCS-promotoraktivitet i udifferensierte PC12-celler, men øke i NGF-differensierende celler

A-B: PC12-celler ble transfektet 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating. Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlede PC12-celler. A) Luciferaseaktivitet hos PC12-celler transfektet med GCS-LUC. B) Renillakorrigert luciferaseaktivitet viser NGFs økning i GCS-promotoraktivitet i to av konsentrasjonene av LTG (n=3).

3.6.2. Valproats effekter på GCS-promotoraktivitet i PC12-celler

PC12-celler ble transfektert GCS-LUC og kotransfektet med rl-CMV eller rl-tk 24 timer etter utplating. GCS-promotoraktivitet kan tyde på å øke ved alle konsentrasjoner av VPA. Eksponeringer med VPA 500 μM ser ut til å gi den høyeste toppen, og eksponering med VPA 1000 μM gir lavere uttrykk enn 500 μM (figur 3.29).



Figur 3.29 Valproat ser ut til å øke GCS-promotoraktivitet i PC12-celler

A-C: PC12-celler ble transfektert 24 timer etter utplating og eksponert 28 timer etter utplating. Luciferaseaktivitet ble målt 48 timer etter eksponering. Resultatene baserer seg på gjennomsnittlig RLU normalisert til ubehandlede PC12-celler A) Gjennomsnittlig luciferaseaktivitet. B) Gjennomsnittlig renillakorrigert luciferaseaktivitet (n=2/3). Et forsøk for VPA 50 μM med NGF er sett bort fra pga stor variasjon fra de to andre forsøkene. Avvik ved n=2 er angitt som "range".

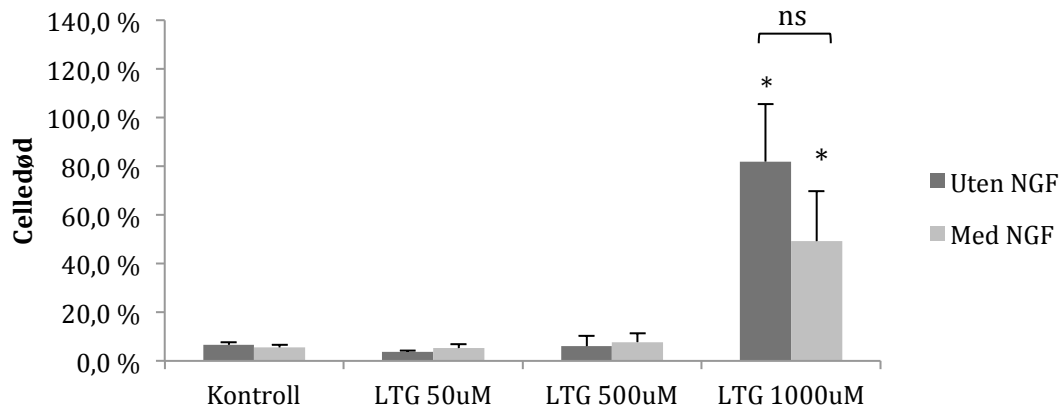
3.7. Celledød i PC12-celler etter behandling med lamotrigin og valproat

Celler ble eksponert for ulike konsentrasjoner av legemidler, og det var derfor ønskelig å undersøke hvor toksisk de ulike behandlingene var. Trypanblå ble benyttet for å farge døde celler og prosentandel døde celler ble beregnet. Basert på tidligere resultater fra andre masteroppgaver, ble det valgt ut et utvalg av eksponeringer og da de med høy konsentrasjon. Hele konsentrasjonsspekteret av LTG ble undersøkt, da denne er vist å ha større toksisitet enn VPA i samme konsentrasjon under mikroskoperingen. Celledød ble talt i fire ulike synsområder på skålen og gjennomsnittlig celledød per skål ble beregnet. Grafene baserer seg på gjennomsnittlige tall fra tre uavhengige forsøk med to paralleller i hvert forsøk.

3.7.1. Effekter av Lamotrigin på celledød i PC12-celler

LTG har ved tidligere forsøk vist å være toksisk i høyere konsentrasjoner. Det ble ikke observert betydelig celledød under mikroskopering av PC12-celler ved konsentrasjon på 500 μM . Ved proteinmåling til westernblotting og luciferaseassay ble det imidlertid oppdaget celledød på lamotriginkonsentrasjoner på 1000 μM . Det ble derfor utført celledødsmåling på alle konsentrasjonene av LTG. Ved å bekrefte celledød i ulike behandlinger kan det blant annet utelukkes at effekter målt i luciferaseassay ikke kan skyldes en sterk reduksjon av levende celler men behandlingen selv. Tre forsøk ble utført, med paralleller i hvert forsøk.

PC12-celler som ble eksponert med LTG 1000 μM , med og uten NGF 50 ng/ml, ga en større prosentandel celledød sammenlignet med ubehandlet kontroll og NGF 50 ng/ml alene. Resultatene er hentet fra $n=6$ i tre forsøk. Her ble det observert signifikant økning i celledød for PC12-celler eksponert for LTG 1000 μM både med og uten NGF (figur 3.30).

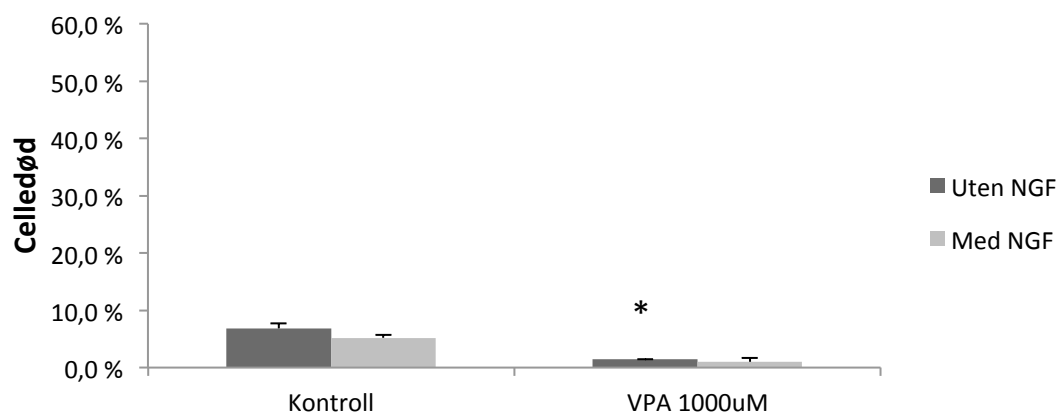


Figur 3.30 Lamotrigin 1000 μ M med NGF ga signifikant høyere celledød i PC12-celler

PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble farget med trypanblå og celledød ble kvantifisert i lysmikroskop 72 timer etter eksponering. Celledød ble talt i fire ulike synsfelt på skålen i to paralleller per forsøk. Resultatet i figuren viser gjennomsnittlig verdi når paralleller ble sett på som individuelle forsøk. PC12-celler eksponert med LTG 1000 μ M med og uten NGF 50 ng/ml ga signifikant økning i celledød sammenlignet med ubehandlet kontroll. Det ble ikke observert forskjell mellom celler eksponert for kombinasjon av LTG 1000 μ M med NGF 50 ng/ml og celler kun eksponert for LTG 1000 μ M. Statistisk analyse ble utført med t-test. * $p < 0,05$ parvist sammenlignet med ubehandlet kontroll (n=6).

3.7.2. Effekter av valproat på celledød i PC12-celler

Eksponering med VPA med konsentrasjon 1000 μM ga ikke økt celledød sammenlignet med ubehandlet kontroll. Celledød ble talt i tre forsøk. Det ble vist signifikant prosentvis reduksjon i celledød ved eksponering av PC12-celler med denne konsentrasjonen sammenlignet med ubehandlede celler. Resultatet er vist i figur 3.31.



Figur 3.31 Valproat reduserer celledød i PC12-celler

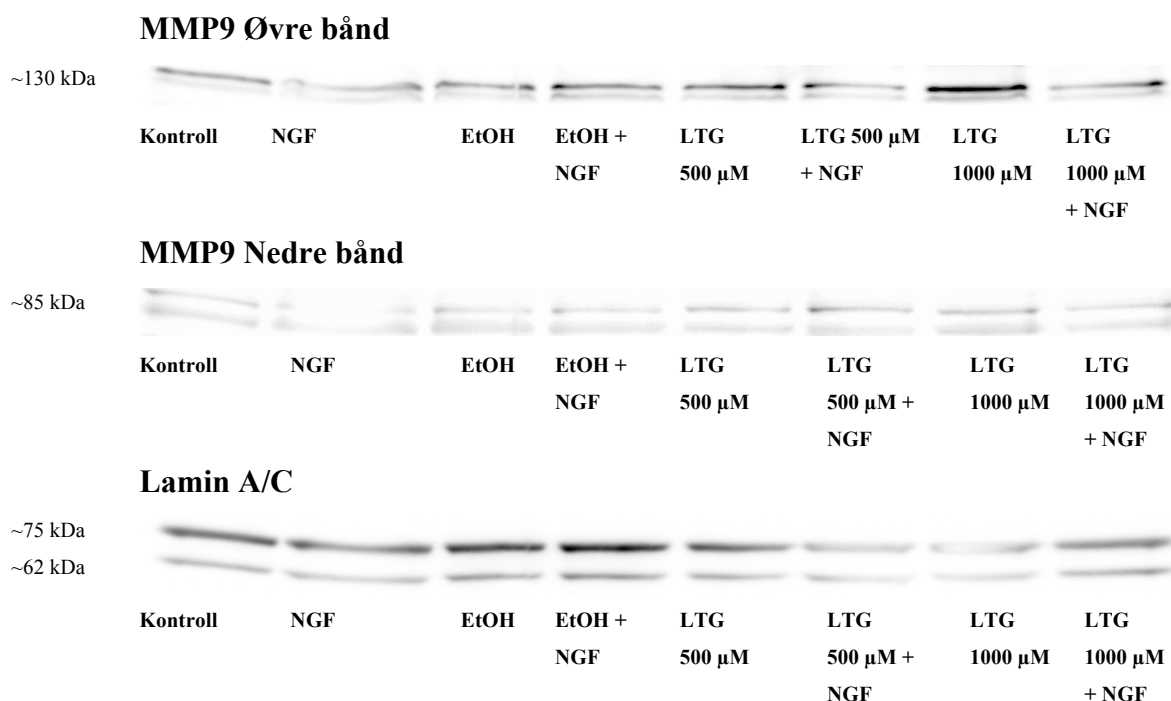
PC12-celler ble eksponert for VPA 1000 μM med og uten NGF 50 ng/ml 24 timer etter utplating. Cellene ble farget med trypanblå og celledød ble kvantifisert i lysmikroskop 72 timer etter eksponering. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. * $p < 0,05$ parvis sammenlignet med ubehandlet kontroll ved hjelp av t-test ($n=3$).

3.8. MMP9-protein målt ved westernblotting

PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating og høstet til westernblotting 48 timer etter eksponering. Prøvene ble kjørt i 10-brønners gel og membranen ble merket med anti-MMP9. I følge databladet skal dette primærantistoffet merke proteiner med ca 98-92 kDa og ca 70 kDa i PC12-celler [55]. Det ble observert to/fire tydelige bånd på alle membranene, to (noen gang sett som ett) tettliggende bånd på ca 130 kDa og to bånd på mellom 100 og 80 kDa. Dette kan være komplekser eller kløyvede former av MMP9. Primærantistoffet ga også flere uspesifikke bånd. Lamin A/C ble benyttet som internstandard. Dette ga tydelige bånd, men bånd kun på en (LTG) og to (VPA) membraner, og korrigeringen er basert på den eller de membranene som fikk lamin A/C bånd.

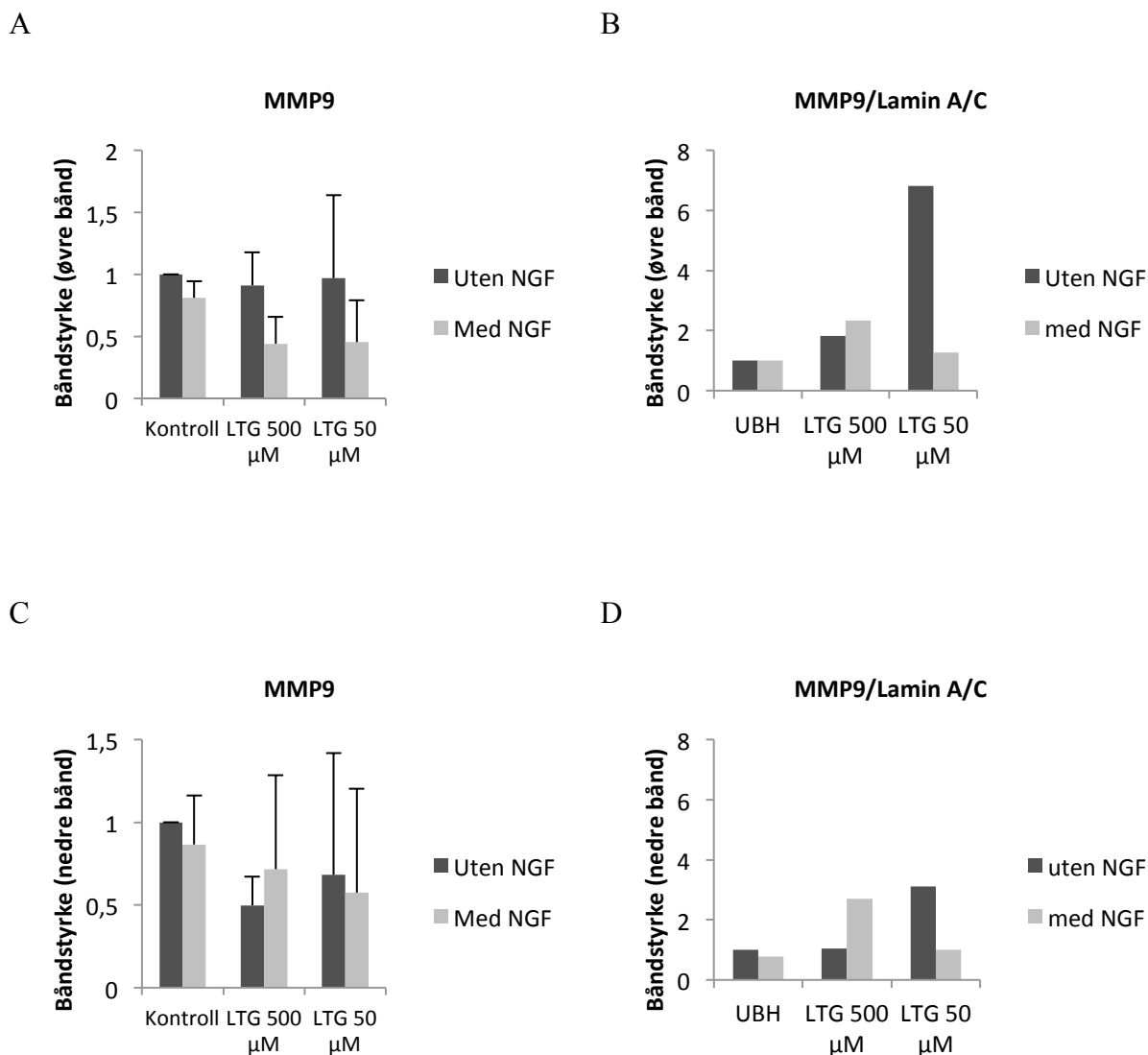
3.8.1. Lamotrigins effekter på MMP9-proteinuttrykk

Det ble observert celledød hos PC12-celler eksponert for LTG 1000 μM med og uten NGF. Disse prøvene ble derfor ikke kjørt videre i gelelektroforsesen (avsnitt 2.8.5). Resultatene tyder på at lamotrigin øker proteinuttrykk av MMP9 (figur 3.32 og 3.33).



Figur 3.32 Westernblotting for PC12-celler eksponert med lamotrigin

PC12-celler eksponert med NGF 50 ng/ml, lamotrigin 500 μM og lamotrigin 50 μM med og uten NGF. Ubehandlete celler ble brukt som kontroll.

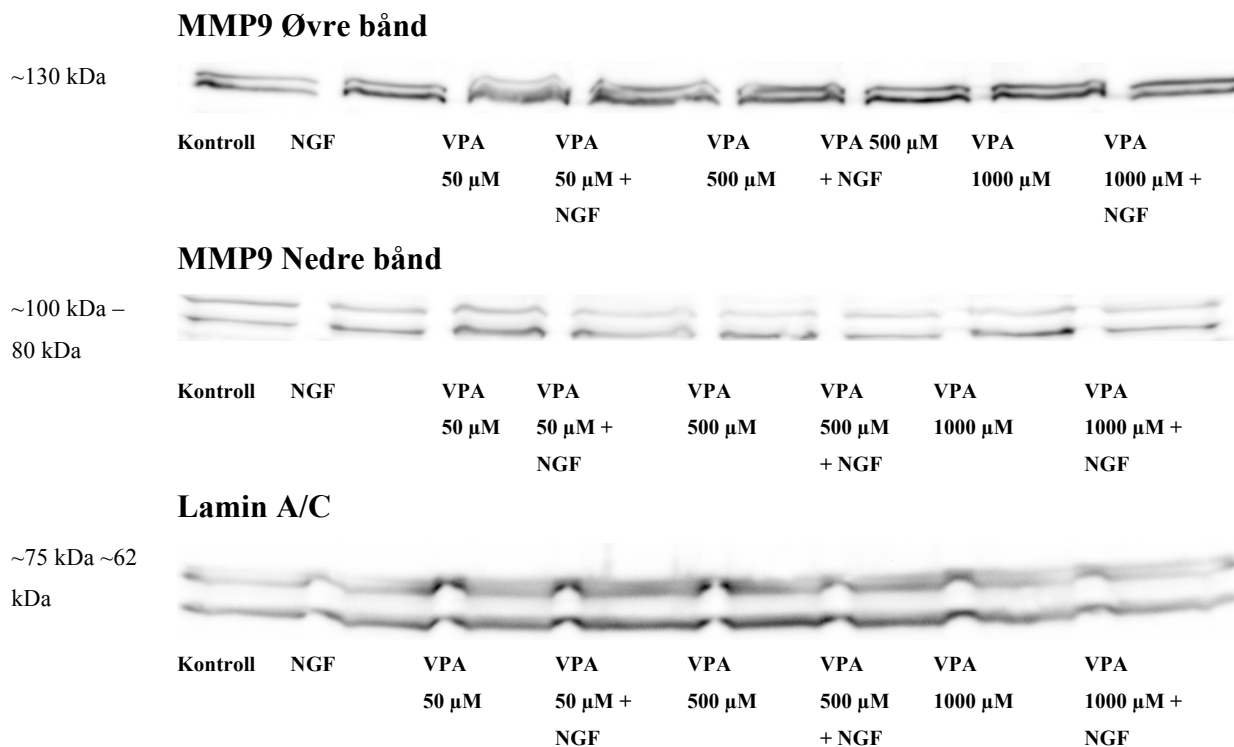


Figur 3.33 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke av MMP9

A-D: PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble høstet 72 timer etter eksponering. Datamaterialet er normalisert mot ubehandlet kontroll med bakgrunnen trukket fra. Båndstyrke er målt i pixler. PC12-celler ble eksponert for LTG 50 μM , 500 μM og 1000 μM med og uten NGF 50 ng/ml. LTG 1000 μM var toksisk for cellene (ikke vist i figur). Det kan tyde på at proteinuttrykket av MMP9 øker ved økende konsentrasjon av LTG. Kun en membran ga laminbånd og figuren er basert på denne membranen. A) Båndstyrke til proteinbånd for øvre bånd MMP9 (n=3). B) Laminkorrigert båndstyrke for øvre bånd MMP9 (n=1). C) Båndstyrke til proteinbånd for nedre bånd MMP9 (n=2-3). Avvik for n=2 er angitt med "range". D) Laminkorrigert båndstyrke for nedre bånd MMP9 (n=1).

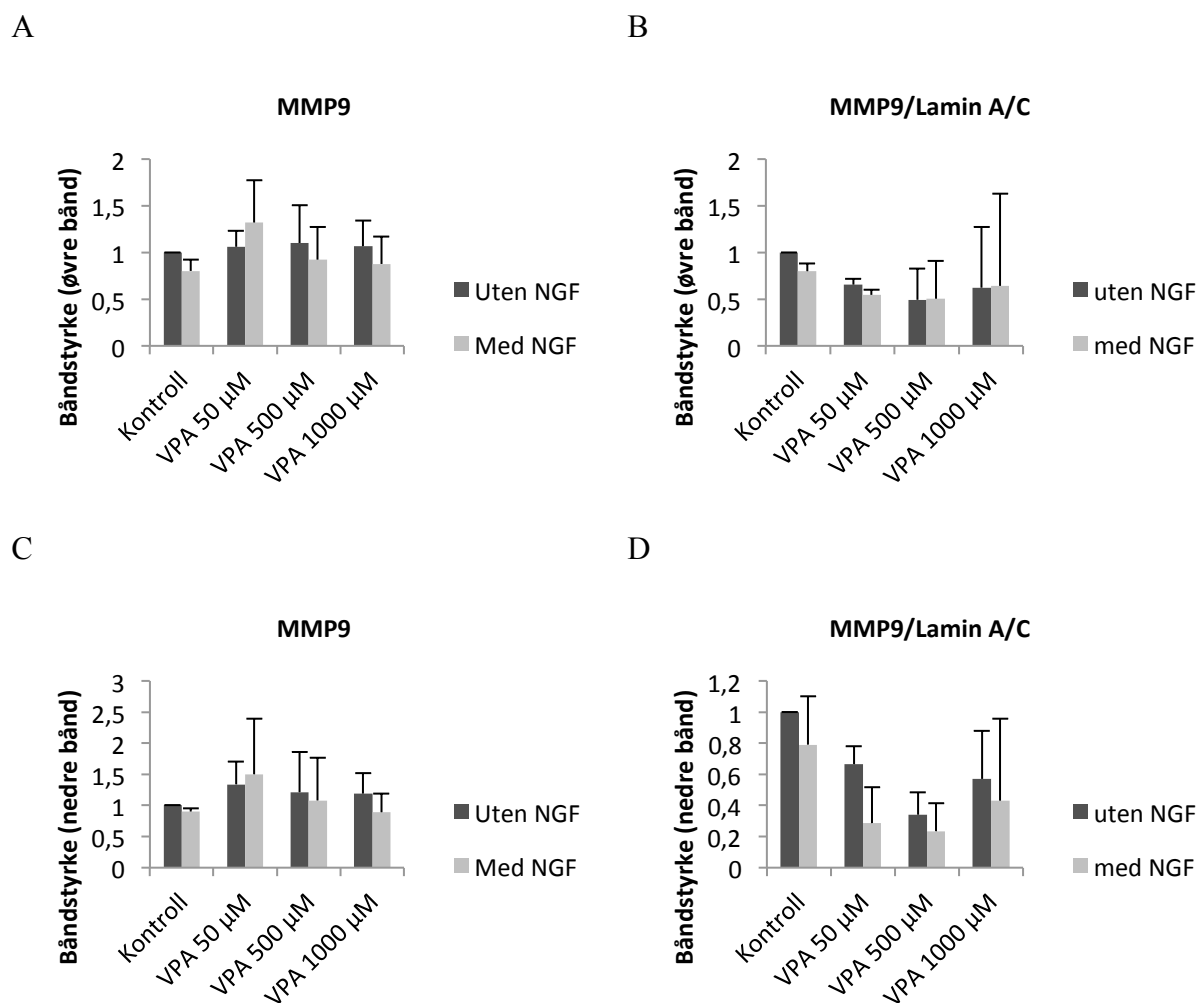
3.8.2. Valproats effekter på MMP9-proteinuttrykk

PC12-celler ble eksponert for VPA 50 μ M, VPA 500 μ M og VPA 1000 μ M med og uten NGF 50 ng/ml. VPA så ut til å redusere MMP9-proteinnivå i cellen



Figur 3.34 Westernblotting for PC12-celler eksponert med valproat

PC12-celler eksponert med NGF 50 ng/ml, VPA 50 μ M, VPA 500 μ M og VPA 1000 μ M med og uten NGF. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll.



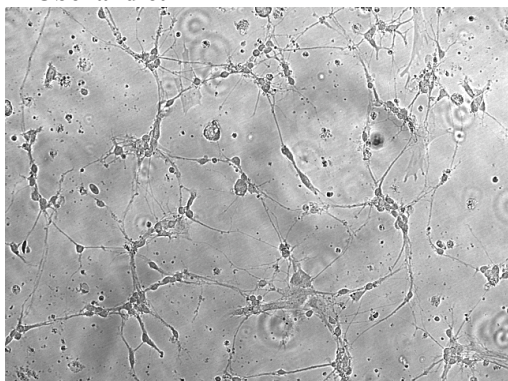
Figur 3.35 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke av MMP9

A-D: PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble høstet 72 timer etter eksponering. Datamaterialet er normalisert mot ubehandlet kontroll med bakgrunnen trukket fra. Båndstyrke er målt i pixler. PC12-celler ble eksponert for VPA 50 μ M, 500 μ M og 1000 μ M med og uten NGF 50 ng/ml. Det kan tyde på at proteinuttrykket av MMP9 får en svak reduksjon med eksponering av VPA. Kun to membran ga laminbånd og figuren er basert på disse membranene. A) Båndstyrke til proteinbånd for øvre MMP9-bånd (n=3). B) Laminkorrigert båndstyrke for øvre MMP9-bånd (n=2). C) Båndstyrke til proteinbånd for nedre MMP9-bånd. D) Laminkorrigert båndstyrke for nedre MMP9-bånd (n=2). Varians ved n=2 er angitt som "range".

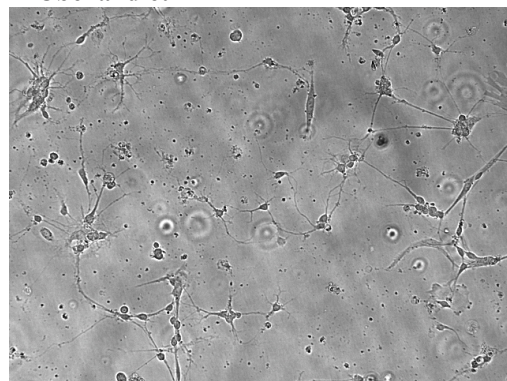
3.9. Mikroskopering av kyllingkornceller eksponert for MMP9-hemmer

Eksperimentet med MMP9-hemmer og kvalitativ vurdering med mikroskopering var et pilotforsøk og ble kun utført én gang. Kyllingkornceller ble eksponert for MMP9-hemmer 24 timer etter utplating. Mikroskoperingen ble utført 48 timer etter eksponering med et Nikon Digital Sight DS kamera koblet til Nikon Eclipse TE 300 fluorescensmikroskop. MMP9-hemmeren er løst i DMSO og DMSO-kontroll ble utført. DMSO 1 % så ut til å ha liten innvirkning på kyllingkorncellene. MMP9-hemmeren ble tilsatt tre ulike konsentrasjoner, 1 nM, 10 nM og 100 nM. 100 nM kan tyde på å være toksisk for kyllingkorncellene fordi celledødeligheten er lavere. Både 1 nM og 10 nM av MMP9-hemmeren ser ut til å redusere nevraltutveksten i kyllingkornceller.

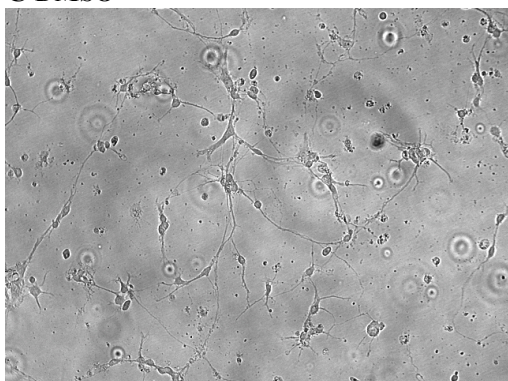
A Ubehandlet



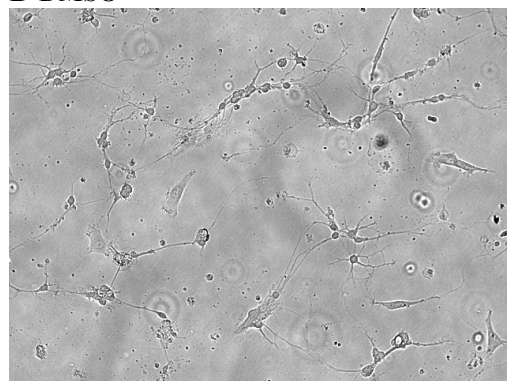
B Ubehandlet



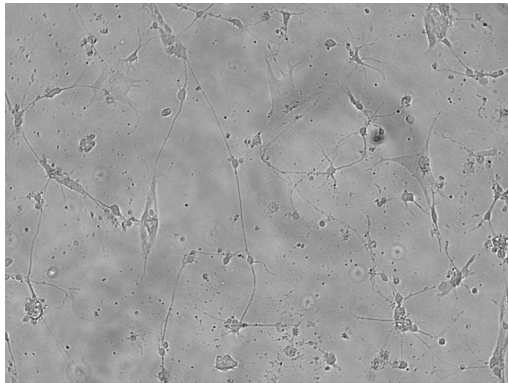
C DMSO



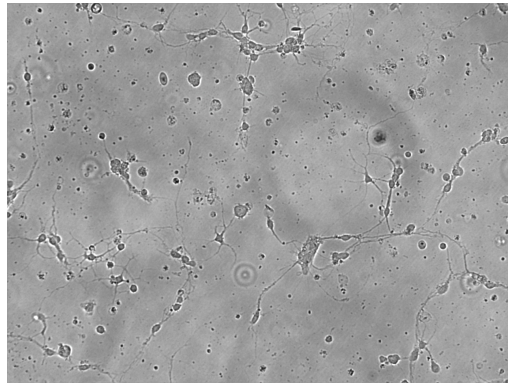
D DMSO



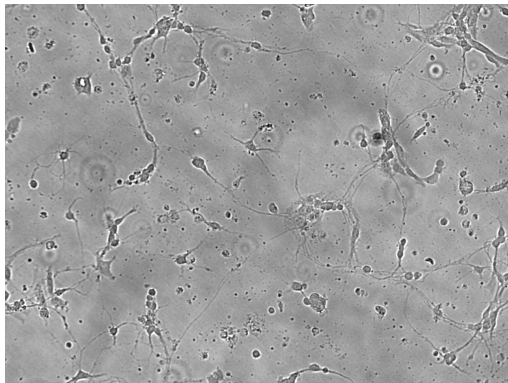
E MMP9-hemmer 1 nM



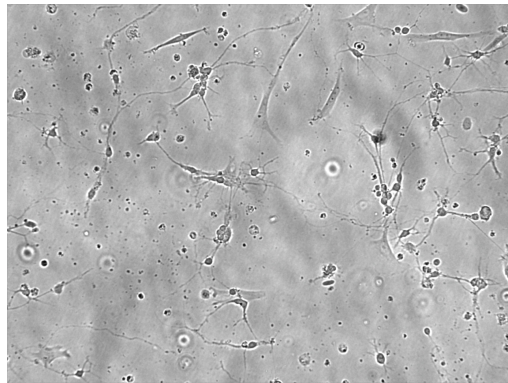
F MMP9-hemmer 1 nM



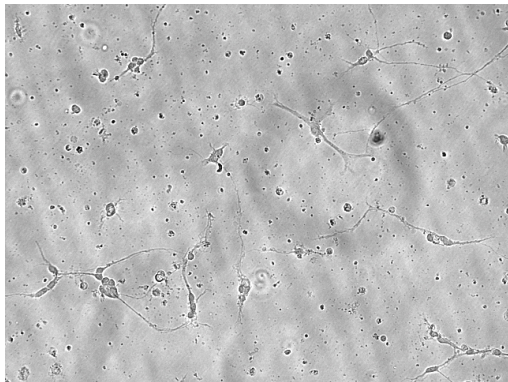
G MMP9-hemmer 10 nM



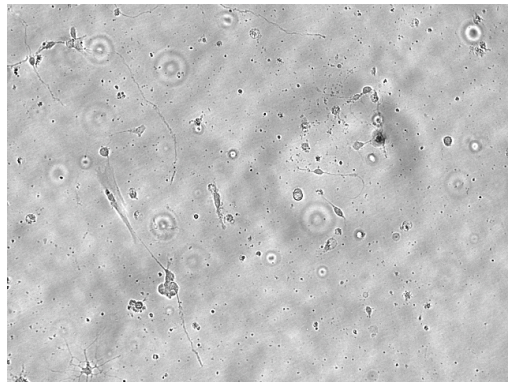
H MMP9-hemmer 10 nM



I MMP9-hemmer 100 nM



J MMP9-hemmer 100 nM



Figur 3.37 MMP9-hemmeren ser ut til å redusere nevruttvekst

A-J: Korncellene ble eksponert 24 timer etter utplating og analysert i mikroskop 48 timer etter eksponering. Kvalitativ analysing av effekter av MMP9-hemmer på nevruttvekst i korncellekulurer fra kylling. A-B) Ubehandlede kornceller viser dannelse av nettverk. C-D) DMSO ser ikke ut til å påvirke nettverket til korncellene. E-F) MMP9-hemmer 1 nM ser ut til å gi en reduksjon av nettverket til korncellene. G-H) 10 nM MMP9-hemmer ser ut til å gi en dårligere hemming av nettverksdannelse sammenlignet med 1 nM MMP9-hemmer. I-J) 100 nM var toksisk for korncellene, og det ble observert celledød.

4. Diskusjon

4.1. Diskusjon av valg av metode

4.1.1. Valg av cellemodeller

I denne masteroppgaven har det blitt brukt to cellemodeller, PC12-celler og nevronale primærkulturer fra kylling. PC12-cellelinjen ble benyttet for å undersøke lamotrigin og valproats påvirkning på nevruttvekst og mulige mekanismer bak denne effekten. Dette ble studert ved hjelp av luciferaseassay og westernblotting med aktuelle differensieringsmarkører. Kornceller fra kyllinglillehjerne ble benyttet for å se på MMP9-effekter og uttrykk, både ved mikroskopering med MMP9-hemmer og i luciferaseassay med MMP9-plasmid.

PC12-celler er en klonet nevronal cellelinje som stammer fra et feokromocytom i binyremargen hos rotte [4]. Da dette er en kreftcellelinje beholder de egenskaper typisk for kreftceller. Cellelinjen har en hurtig celleproliferasjon, de er robuste for miljøforandringer og fordi de stammer fra en stamcelle, er dette en modell som gir færre variasjoner fra forsøk til forsøk. Reproduerbarheten er dermed god. Når PC12-celler stimuleres med NGF har de evne til å differensiere til å ligne sympatiske nevroner. De sender ut nevritter innen 24-48 timer, syntetiserer neurotransmittere og reseptorer, og blir elektrisk aktive. Dette gjør modellen egnet i forsøk for å studere utvikling av nervesystemet fordi nevruttvekst er en av hovedprosessene under utvikling [2, 3]. Ved å stimulere PC12-celler med NGF er det mulig å se på overgangen fra udifferensierte til differensierte celler, noe som etterligner utviklingen, og ikke det modne nervesystemet. Dersom det er ønskelig å se på effekter på nevruttvekst i det ferdigutviklede nervesystemet kan PC12-cellelinjene eksponeres med NGF for en lengre periode (ca. en uke) slik at de danner et nettverk av nevritter [2]. Både udifferensierte og differensierte PC12-celler uttrykker både NGFs høyaffinitetsreseptor TrkA og lavaffinitetsreseptor p75^{NTR} [56], og har spenningsstyrte Na⁺-, K⁺- og Ca²⁺-kanaler [57]. Antiepileptika kan derfor studeres i denne modellen fordi mange av virkningsmekanismene går via disse kanalene. Cellelinjer er godt egnet til "screening" av kjemikalier, siden bruk av cellelinjer er mindre ressurskrevende enn dyretesting. PC12-celler er vist å være mindre sensitive for noen nevrotoksiske kjemikalier enn hva primære nevronkulturer er [3], men mer sensitive for andre kjemikalier enn primærkulturer. Det kan derfor være lurt å undersøke

begge modellene slik at uønskede effekter lettere kan fanges opp. Ulempen ved bruk av PC12-cellelinjen er at fenotypen ikke kan bli identisk med det man ser i primærnevroner. Nevrittene som sendes ut kan ikke skilles som aksoner eller dendritter, og har ikke funksjonelle synapser. Cellene kan også endre seg etter mange passasjer [3], men dette blir holdt i sjakk ved at cellelinjen kun splittes ut i ca. 50 passasjer før en ny batch med celler tas opp fra fryseren. *In vitro*-cellekultursystemet mangler ofte metabolsk kapasitet, og vil kunne miste kommunikasjon/kontakt med andre celler og dermed ikke ligne *in vivo* nevrotoksisitet [2].

Primære nevronkulturer består av celler som er hentet fra nevronale vev fra enten det perifere eller sentrale nervesystem. Nevronale primærkulturer vil beholde de nevronale egenskapene til voksne nevroner og spontant utvikle nevritter. Nevrittene kan skilles som aksoner eller dendritter og de er funksjonelt aktive [2]. Dette er en bedre modell for å kunne ekstrapolere resultatene til mennesker fordi dette er nevroner som er mer lik våre nevroner enn det PC12-celler er. Nevrogenesen av kornceller skjer postnatalt i rotte [22] men prenatalt hos kylling. Det er derfor mulig å studere de sensitive prosessene under migrering av kornceller som en del av utviklingen i det tidsintervallet cellene høstes. Celler kan hentes ut fra egget og eksponeres i ettertid eller man kan eksponere embryoene på forhånd av høstingen og observere endringer. Siden kyllingfostrene er utenfor kroppen til moren er det heller ingen krav til eller behov for dyrestall. Ulempen med primærkulturer er at de må hentes fra forsøksdyr, er mer kostbare, krever flere ressurser og har større grad av variasjon mellom forsøk. Dette skyldes at cellene blir hentet fra forskjellige dyr, og at cellene ikke har opphav fra en enkelt stamcelle.

Valg av modell som er best egnet til et enkelt forsøk må baseres på forskning. Ofte kan man gjøre studier i begge celletypene og sammenligne resultatene. Dersom PC12-modellen gir lignende effekter på nevruttvekst som blir observert i primærnevronkulturen kan man ofte erstatte forsøkene med PC12-forsøk. Dette er både tids- og økonomibesparende, i tillegg til at det ikke går utover dyreliv.

4.1.2. Valg av eksponering med vekstfaktor

På grunn av at NGF gir differensiering av PC12-celler og fremmer nevruttvekst, ble NGF benyttet som positiv kontroll. Litteraturen beskriver at PC12-celler mangler BDNFs høyaffinitetsreseptor TrkB [58], men tidligere masterstudenter har vist at BDNF har hatt noe

effekt i vår cellelinje [50, 59]. PC12-celler kan variere fra forskningsgruppe til forskningsgruppe, da eksponeringer, oppbevaringsbetingelser og antall passasjer kan endre kreftcellenes morfologiske og genetiske egenskaper. Det var derfor interessant å bekrefte om TrkB-reseptoren kunne være involvert i nevruttvekst i PC12-celler. Fokuset på nevruttvekst via nevrotrofinreseptorer lå på effekter via TrkB-reseptor. Årsaken til dette er at BDNF og TrkB antas å være involvert i epilepsi via flere mulige mekanismer [60]. Dette gjelder både utvikling av epilepsi (epileptogenesen), men også at epileptiske anfall øker uttrykket av BDNF og TrkB, og involvering av dette kan være en av virkningsmekanismene til antiepileptika eller fremtidige antiepileptika. Vekststimulerende effekter av BDNF bidrar i epileptogenesen ved å gi endringer i aksoner og fremme nevrogenesen i hjernen hos voksne gnagere. Koblinger mellom BDNF og epilepsi er gjennomgått i [60]. LM22A-4 ble valgt som en selektiv TrkB-agonist [51] og er et rimeligere alternativ til BDNF. Konsentrasjoner av NGF og BDNF er basert på erfaringer fra laboratoriet og tilgjengelig litteratur [4, 51, 61] (se avsnitt 4.3.1).

TrkA- og TrkB-antagonister, selektiv for sin reseptor, ble benyttet for å undersøke mulige legemiddeleffekter via signalveier koblet til disse nevrotrofinreseptorene. Det var lite tilgjengelig litteratur for TrkA-antagonisten GW 441756, og det var derfor nødvendig med dose-responsforsøk for å finne egnet konsentrasjon (avsnitt 3.1.3-3.1.4). ANA-12 har i TrkB-transfektete PC12-celler vist seg å være en selektiv TrkB-antagonist, uten virkning på TrkA- eller TrkC-reseptorer (avsnitt 3.1.5-3.1.6) [54]. Konsentrasjoner fra 10 nM og oppover er vist å blokkere BDNF-indusert nevruttvekst, og ANA-12 er en potent TrkB-antagonist [54]. Det ble valgt å benytte reseptor-antagonister i stedet for alternativet, nevrotrofin-antistoff, da tidligere masterstudenter opplevde uønskede og uforutsette effekter på nevruttveksten i PC12-celler [50].

4.1.3. Valg av eksponering med legemidler

Lamotrigin (LTG) og valproat (VPA) er to av de tre (den tredje er karbamazepin) mest brukte antiepileptika i Norge [10] og er aktuelle å bruke under graviditet. Det er derfor interessant å tilegne seg kunnskap om mekanismer bak mulige toksiske effekter forårsaket av disse legemidlene. Dose-responsforsøk av LTG og VPA i PC12-celler er utført i en tidligere masteroppgave [50], og det ble valgt ut en av konsentrasjonene av legemidlene til videre forsøk med morfometrisk analyse. PC12-celler ble eksponert for 500 μ M LTG i forsøk for

morfometrisk analyse. Dette er en konsentrasjon som er en del høyere enn den antatte terapeutiske konsentrasjonen, som ligger på 10 – 50 μM i serum [62]. Den ble valgt fordi det var ønskelig å se på mekanismer bak effekten av LTG på nevruttvekst, og høyere doser kan fange opp effekter lave doser ikke kan. Det er mulig å bruke høyere konsentrasjoner fordi PC12-cellene er robuste og tåler mer. Konsentrasjonen ga god respons på nevruttvekst (figur 3.11) [50] og akseptabel grad av celledød. Dette ble dermed ansett som en egnet konsentrasjon.

Basert på tilgjengelig litteraturen [63] og tidligere arbeid av masterstudenter [50] ble VPA 500 μM valgt som egnet konsentrasjon fordi denne er vist å ha størst effekt på nevrutter og nevruttlengde. Denne konsentrasjonen ligger i det terapeutiske området (300-600 μM) for VPA i serum [64]. VPA er generelt lite toksisk for PC12-celler [50] og det var ikke et problem med celledød på denne konsentrasjonen. Studier av effekter av legemidlene i differensierte PC12-celler har blitt gjort tidligere og analysert via morfometrisk analyse. I denne oppgaven var det mer interessant å se på mekanismer, og det ble ikke vurdert som nødvendig å gjenta disse forsøkene.

Analysering av VPA og LTGs effekter på valgte promotorer ved hjelp av luciferaseassay er ikke funnet til å ha blitt gjort tidligere i litteraturen. Luciferaseassay er en enkel screeningmetode, som er mindre tidkrevende enn morfometriske analyser. I denne metoden ble det derfor brukt flere konsentrasjoner av legemidlene. Effekten ble undersøkt i både udifferensierte og differensierende (eksponert for NGF) PC12-celler. Ved å la cellene gå i differensiering er det mulig å etterligne nevronal utvikling.

4.1.4. Valg av endepunkt til morfometrisk analyse

Valg av endepunkt i morfometrisk analyse baserer seg på analysering fra tidligere masteroppgaver [50] og litteratur [2, 3]. Syv endepunkt ble brukt i analyseringen av PC12-celler i et mikroskop med 40 X forstørrelse. Antall celler ble manuelt talt i hele synsfeltet, og reflekterer endringer i celleproliferasjon. Celler som ikke var festet i skålens bunn ble ikke talt, da dette sannsynligvis indikerer at cellen er død. NGF lar PC12-celler gå ut av celledeling og inn i differensiering [4], og celleantallet kan derfor også si noe om cellen kan være i et tidlig stadium av differensiering. Å se på nevruttvekst er et godt endepunkt i PC12-celler, fordi den positive kontrollen NGF ga respons på dette endepunktet i alle forsøk, og

nevrittutvekst er en essensiell prosess i utviklingen [65]. Nevrittutvekst er et endepunkt som er mer følsomt for toksisitet enn hva celledød/overlevelse er [3]. Andel celler med nevritter, antall nevritter per celle og nevrittelengde er endepunkter som tidligere er beskrevet i litteraturen [2, 66]. Disse ga gode utgangspunkt i valg av endepunkt på nevrittutvekst. Endepunktene ble alltid korrigert til celleantallet for å unngå store variasjoner.

Antall nevritter og nevrittelengde kan være ikke-robuste endepunkt når de måles manuelt. Observatøren må vurdere hva som skal kvalifiseres som nevritter, og hvor man skal begynne målingen av nevritten. Her ble en nevritt klassifisert hvis den var lengre enn den var bred og lange nevritter ble klassifisert når nevritten var lengre enn cellens gjennomsnittlige diameter. Det var ikke alltid lett å vurdere hvor nevritten begynte, da noen eksponeringer fikk cellen til å strekke seg ut. En nevritt på 10 μm , og en nevritt på 40 μm , kunne falle i samme klassifisering, som enten en nevritt eller en lang nevritt, fordi celleformen endret seg. Et bedre endepunkt kunne ha vært å måle de nevrittene som var lengre enn en bestemt lengde, uavhengig av cellediameter. At nevrittene var lengre enn kjernediameter kan også benyttes, men det er ikke alltid like lett å se hele kjernen. Det er imidlertid mulig å måle de cellekjernene man ser og finne en gjennomsnittlig lengde.

Total nevrittelengde delt på antall celler ble vurdert til å være et dårlig egnet endepunkt. Her ble kun forsøk som ga lange nevritter sammenlignet. Det ble observert lange nevritter i alle forsøk for PC12-celler eksponert for NGF, og kun tre forsøk for ubehandlede PC12-celler. I de tre forsøkene var nevrittelengdene relativt lange noe som medførte at det ikke var signifikant forskjell på nevrittelengde mellom ubehandlede og NGF-eksponerte PC12-celler. Det var helt klart at celler eksponert for NGF fikk flere og lengre nevritter, noe som kommer frem i endepunktet andel celler med lange nevritter. Et bedre endepunkt ville vært å måle lengden av den lengste nevritten i forsøket eller gjennomsnittlig nevrittelengde for alle paralleller. Total lengde av nevritter kan også benyttes som egnet endepunkt, men dette hadde ikke vært gjennomførbart da dette er for tidkrevende. Dette kan være et godt egnet endepunkt dersom man har tilgang til et automatisert målingsprogram, som har evnen til å måle nevritter dersom de merkes med for eksempel fluorescens [2].

To egendefinerte endepunkter ble valgt ut fra de første forsøkene. Typisk for PC12-celler eksponert for LTG og NGF var at de fikk en spydlignende form. Cellen strakk seg ut, og fikk en lang nevritt på hver side av cellen. Da dette også ble observert i NGF-eksponerte celler ble

andel ”spyceller” brukt videre som et endepunkt. Enkelte PC12-celler eksponert for BDNF så ut til å få et økt antall begynnende nevritter, utspring som ligner på knopper (”bud”) (”budding” se avsnitt 1.4.3). Dette karakteristiske utseende ble kalt ”knoppceller”.

Celletettheten i forsøk for morfometrisk analyse var $1,7 \times 10^4$ celler/ml, en lavere tetthet enn i andre metoder (vanlig tetthet er $7,0 \times 10^4$ celler/ml). Det var nødvendig å redusere celletettheten da høyere celletetthet fører til klumping av cellene, og reduserer andel celler med nevritter [67]. Manuell kvantifisering er tidkrevende og subjektive vurderinger hos operatøren gir større usikkerhet. Blinding av forsøk og etablerte endepunkter reduserer feilkilder. Blinding ble utført sammen med masterstudent Karina Borgund. Blindingen var begrenset til skålene. Skålene ble merket med tall hentet fra en randomisert kalkulator fra internett, og kun en av oss hadde innsyn i hvilke tall som hørte til hvilken behandling. Den andre fikk ansvar for mikroskoperingen og valg av synsfelt i skålen. Valg av område på skålen er umulig å blinde ved manuell analyse.

For å spare tid kan man benytte automatiserte programmer for deteksjon av nevritter [68]. Dette gjør det lettere å detektere nevritter, men fungerer best for lange nevritter. I disse forsøkene ble nevritter målt 72 timer etter eksponering, og de var sjeldent så lange at det var problematisk å måle.

Morfologiske studier gir gode utgangspunkt for effekter av behandlinger, men det kan være vanskelig å optimalisere metoden og finne robuste endepunkt. Å supplere med andre metoder er gunstig, og det ble her benyttet luciferaseassay, westernblot og celledødsdeteksjon.

4.1.5. Luciferaseassay som metode

Luciferaseassay er en metode som baserer seg på bioluminescens [69]. Å benytte en luciferasereporter gir et raskt og enkelt mål på transkripsjonsaktivitet til tilkoblet promotor. Transfeksjon av et plasmid med ønsket promotor koblet til et luciferasereporter-gen gjør det mulig å se på aktiveringen av promotoren ved å måle lysintensitet med et luminometer. En ytre stimulering av transfekterte celler kan føre til en aktivering av en reseptor, som setter i gang nedstrømssignalveier som aktiverer transkripsjonsfaktorer. Transkripsjonsfaktorer kan dermed aktivere promotoren og det dannes luciferase [46]. Luciferaseassay er en egnet metode til bruk i screening av legemidler, da det er en enkel og følsom metode, og har blitt brukt for å identifisere signalveier av interesse [70]. Resultater fra denne metoden viser

endringer i reporter-genuttrykk, som kan reflektere endringer i biologisk proteinuttrykk. Det vil ikke kunne bekrefte hvilke mekanismer/transkripsjonsfaktorer som forårsaker denne endringen. Relativ proteinmengde i cellen kan heller ikke bekreftes. Ulempen med metoden er den store variasjonen mellom målinger fra prøver med samme behandling. Metoden er temperaturavhengig, og endringer i temperatur kan endre luciferaseaktiviteten. Luciferase er ustabil ved høye temperaturer og det er viktig å oppbevare prøver og reagenser på is. Det ble observert at selv små endringer i temperatur kunne gi store variasjoner. Luminometer finnes både som semiautomatisk og fullautomatisk og bruk av fullautomatiske måleapparat reduserer tidsperioden, og da også temperaturvariasjoner mellom prøvene. For å redusere variasjoner benyttes en internkontroll.

Renillaluciferase ble benyttet som internkontroll i denne oppgaven. Det er nødvendig med en internkontroll for å normalisere og eliminere variasjoner innad i forsøket og mellom forsøkene forårsaket av prøvebehandling. Ulempen med denne metoden er at det ofte krever gjentatte målinger per prøve for å få representative resultater. Renillaluciferase er tilgjengelig i flere plasmider, og kan være koblet til ulike promotorer. I denne oppgaven ble det benyttet to renilla-plasmider, rl-CMV, renillaluciferase reporter-gen drevet av en sterk promotor fra cytomegalovirus, og rl-tk, renillaluciferase reporter-gen styrt av den svakere promotoren fra herpes simplex virus tymidin kinase.

Når det ble utført forsøk med rl-CMV som internkontroll ble det observert store variasjoner mellom behandlingene, og det var vanskelig å få reproducerbare resultater. Det ble derfor undersøkt i litteraturen om det var mistanke om at renillaluciferaseaktiviteten kunne bli påvirket av behandlinger og at renillaluciferase ikke er konstitutiv aktiv under forsøkene. For å kunne bruke renillaluciferase som internkontroll kan ikke behandling av cellene påvirke internkontrollen. I litteraturen beskrives det at ulike promotorene er vist å bli påvirket av ulike behandlinger [47]. Det var derfor ønskelig å se om kotransfeksjon eller eksponering kunne endre renillaluciferaseaktiviteten, noe som ville gjøre den uegnet som internkontroll.

NGF så ut til å stimulere renillaluciferaseaktiviteten i alle forsøk transfektert med rl-CMV. NGF aktiverer TrkA-reseptorer som fører til aktivering av Ras. Det er tidligere vist at aktivert Ras inducerer uttrykket av rl-CMV i CV-1 celler. Studier har vist at aktivert Ras ikke påvirker uttrykket av renillaluciferase ved bruk av et pRI-null plasmid, og det er vurdert til å være en akseptabel kontroll i forsøk hvor Ras er aktivert [47]. Dette plasmidet kan derfor

være et bedre alternativ til forsøk med nevrotrofiner, og nevrutvekst stimulert av Trk-aktivisering. LTG så ikke ut til å påvirke renillaluciferaseaktiviteten uavhengig av kotransfeksjon. Det ble observert tendenser til en svak reduksjon av aktiviteten i celler eksponert for 1000 μM , og det skyldes nok at dette er en toksisk konsentrasjon.

I korncellene ble renillaluciferaseaktivitet kun svakt redusert i alle konsentrasjonene, noe som kan tyde på at LTG er mindre toksisk i kyllingkornceller enn i PC12-celler. VPA ga den samme trenden for alle plasmidene, med størst effekt på 1000 μM i NGF-differensierende PC12-celler. Dersom man trekker fra effekten av VPA, kan det tyde på at dette skyldes NGF alene. NGF kan stimulere cellen til å øke den generelle proteinproduksjonen da PC12-cellene ofte blir større. Etter korrigering av ildflueluciferaseaktivitet var variasjonen mindre. rl-tk ble ikke påvirket i like stor grad av verken NGF eller noen av de andre eksponeringene, noe som kan tyde på at dette er en mer egnet promotor for disse eksponeringene. Ulempen med rl-tk er at promotoren er svakere, og responsen blir dårligere. Dersom luciferaseaktiviteten er lav, kan det være vanskelig å detektere, og eventuelle endringer kan bli vanskelig å fange opp på målingen. Det kreves flere forsøk for å kunne si noe konkret om legemidlenes effekter på promotoraktiviteten til de ulike markørene. Det anbefales å benytte rl-tk eller et rl-nullplasmid [47] til videre forsøk, da disse ser ut til å være mindre påvirkelig av disse eksponeringene. Statistiske analyser ble kjørt på de resultatene det så ut til å være størst forskjell mellom, men de var ikke signifikante. Når det ble lagt til en fiktiv parallell til i utregningen ble det vist signifikante forskjeller. Å utføre flere paralleller bidrar til å både redusere variasjonen mellom forsøkene og kan også gjøre det mulig å si noe bestemt ut fra resultatene.

4.1.6. Westernblotting som metode

Westernblotting er en metode for å separere og identifisere proteiner basert på molekylvekt, ved hjelp av gelelektroforese. I tillegg til deteksjon av proteiner er det også mulig å kvantifisere proteinuttrykk [48], og westernblotting kan dermed benyttes som en tilleggsmetode i verifisering og reproduisering av resultater fra screeninganalyser, slik som luciferaseassay. Westernblotting er en alternativ metode til å analysere nevrutvekst, da det er mulig å se på proteinuttrykk av differenseringsmarkører koblet til nevrutvekst. Ved å kombinere luciferaseassay som måler transkripsjonsaktivitet av en promotor for et protein, og westernblotting som måler proteinmengde, styrker dette de biologiske funnene. Det ble i denne oppgaven sett på proteinuttrykk av MMP9, ved bruk av et antistoff spesifikt for det

katalytiske domenet for MMP9. Hypotesen var at antistoff for MMP9 kunne være et alternativ til screening for kjemisk påvirkning av nevruttvekst, dersom MMP9 er essensiell for nevruttvekst. Et alternativ er GAP-43, et vekstassosiert protein med kjent effekt på ”growth cone”-dannelse, aksonal vekst og synaptisk plastisitet, og er en allerede kjent markør for nevruttvekst under screening [2].

Optimalisering av konsentrasjonen for primærantistoffet anti-MMP9 var nødvendig da det ikke tidligere er brukt av forskningsgruppen. En av ulempene med westernblotting er utfordringen med å finne gode antistoff som gir spesifikke bånd det er mulig å kvantifisere. Lamin A/C ble benyttet som internkontroll for å normalisere proteinmengden, og for å kunne sammenligne resultatene mellom ulike membraner. Laminer er intermediatfilamenter lokalisert i cellekjernen av eukaryote celler. Laminer spiller en viktig rolle i regulering av kjernefunksjoner slik som transkripsjon, DNA-replikasjon og DNA-reparasjon, og er med i regulering av celleproliferasjon og differensiering [71]. Anti-Lamin A/C er en derfor en kjernemarkør og gir en kvantifisering av kjerneproteininnhold. Proteinuttrykk av Lamin A/C reflekterer antall celler. Alternative internstandarder er α -tubulin og β -aktin [72]. Dette er proteiner fra cellens cytoskjelett og cellens størrelse påvirker proteinuttrykk av disse internstandardene. α -tubulin er et strukturelt mikrotubulimolekyl distribuert i aksoner, og kan benyttes som en markør for nevruttforlengelse [38]. Forslag til andre antistoffer som det hadde vært interessant å se på er fosfo-varianter av p53 og GAP-43 for nevruttvekst og PCNA for å se på celleproliferasjon.

4.1.7. Trypanblå som metode for deteksjon av celledød

Celledød kan detekteres ved hjelp av flere kvantifiseringsverktøy basert på endringer i cellen slik som DNA-fragmentering, endringer av cellemembran og/eller tap av cellemembran-integritet. I denne oppgaven ble det benyttet trypanblåfarging, en metode som baserer seg på at levende celler har intakte cellemembraner. Fordelen ved bruk av trypanblå er at dette er en rask, enkel og rimelig måte å detektere celledød. Ved manuell mikroskopering er det nyttig at operatøren kan observere hvordan cellemorfologien har forandret seg i de blå cellene. Dette gjelder spesielt ved primærkulturer, hvor det ikke er en homogen cellekultur, og det er mulig å skille mellom ulike celletyper og slik kun telle de man er interessert i. Ulempen ved bruk av denne metoden er at trypanblåløsningen må fjernes før mikroskopering. Dette medfører at døde celler også følger med, og prosentvis celledød blir mindre enn hva det i realiteten er.

Vurdering av fargeintensitet faller også på observatøren og dette medfører variasjon i klassifiseringen av døde celler. Trypanblå ble vurdert til å være en egnet metode for deteksjon av celledød i PC12-celler i mine forsøk, spesielt med tanke på nevruttvekst som endepunkt. Dette ga mulighet for å observere morfologien av cellene som hadde dødd.

Alternative visuelle deteksjonsmetoder er for eksempel dobbelfarging med akridin oransje og etidiumbromid (AO/EB) som detekteres med et fluorescensmikroskop. Denne metoden kan skille mellom apoptotiske og nekrotiske celler. En mer effektiv metode er ”flow cytometry” hvor en benytter en laser for å detektere celler som er farget med fluorescens-farging. Denne metoden kan detektere et langt høyere antall celler, gir færre variasjoner og er mindre tidkrevende [73], men krever en homogen cellekultur.

4.2. Relevans av biologiske endepunkt

For å finne proteiner som er kritiske for nevruttvekst, ble det søkt i litteraturen etter mulige markører som kunne benyttes i denne oppgaven. Ved å finne gode markører kan man bidra til å belyse prosesser og proteiner som er viktige eller kritiske for nevruttvekst. To differensieringsmarkører som har fått mye oppmerksomhet i ny forskning på nevruttvekst er p53 og MMP9. Disse ble valgt til bruk i luciferaseassay.

4.2.1. MMP9 som differensierings- og nevruttvekstsmarkører

Matrix-metalloproteinaser (MMPer) er en gruppe ekstracellulære proteaser som spiller en viktig rolle i morfogenese og remodelering under utvikling. I CNS *in vitro*-studier er det vist at MMPer (MMP-2, MMP-7 og MMP-9) regulerer nevruttforlengelse og aksonal veiledning. Spesielt MMP9 er vist å ha en fysiologisk rolle i korncellemigrasjon og apoptose. Mus som mangler MMP9 har et tykkere germinallag på et senere stadium enn mus med MMP9, noe som tyder på en forsinket korncellemigrasjon [74]. MMP9 er også vist å gi en forlengelse av nevrutter og øke forgreiningen av nevruttene induert av NGF i PC12-celler. Ved å blokkere MMP9 med nøytraliserende antistoff, forsvinner den NGF-aktiverede nevruttveksten [38], og dette skyldes trolig MMP9s regulering av distribusjonen av α -tubulin, et viktig mikrotubuli-molekyl. MMP9 ble derfor vurdert som en egnet nevruttvekstmarkør. MMP9 er også knyttet til epilepsi [37], og det er interessant om legemidlene kan påvirke denne markøren som en mulig mekanisme for farmakologiske effekter.

MMP9-LUC-plasmid var tilgjengelig for forskningsgruppen for bruk i luciferaseassay. Dette plasmidet består av en metallo matrixproteinsase-9-promotor koblet til et luciferase-reportergen. Denne promotoren inneholder mange responselementer, noe som betyr at flere transkripsjonsfaktorer kan aktivere promotoren. Det er ikke mulig å si hvilke(n) transkripsjonsfaktor(er) som aktiverer promotoren, og den brukes derfor som et mål på generell MMP9-aktivitet.

Til westernblotting ble det benyttet et MMP9-antistoff som binder til det katalytiske domenet til MMP9 [55]. Ved westernblotting ble det observert flere bånd for anti-MMP9. MMP9 har en molekylvekt på ~98 kDa, og skulle gi bånd på 98 kDa og 70 kDa i PC12-celler i følge produsenten [55]. Det ble i stedet observert fire sterke bånd (to på ca. 130 kDa og to på ca. 80-98 kDa), og med flere uspesifikke bånd med lavere molekylvekt. Årsaken til dette kan være at antistoffet detekterer inaktive proformer, komplekser eller spaltningsprodukter av MMP9. MMP9 produseres som et inaktivt proenzym (pro-MMP9) [37] med en molekylvekt på henholdsvis 97-110 kDa [75, 76], og spaltes til aktivt MMP9 på 86-92 kDa. Det er noe variasjoner i litteraturen om molekylvekt, og dette kan skyldes artsforskjeller. MMP9 har mulighet til å danne en rekke komplekser. Aktiviteten av MMP styres av interaksjoner med endogene hemmere. Vevshemmere av MMPer (TIMPs) binder proMMP og hemmer den proteolytiske aktiviteten [33]. TIMP er små proteiner (22-22kDa) [23] og danner komplekser med MMP på omtrentlig 120-130 kDa. MMP9 har også evne til å danne kompleks med neutrofil gelatinaseassosiert lipokalin (NGAL) [76] som gir et kompleks på 125-130 kDa. Jeg antar likevel at de båndene som detekteres ikke er MMP9/TIMP eller MMP9/NGAL-komplekser fordi dette er gjort med SDS-basert westernblotting. SDS bryter opp de svake bindingene mellom kompleksene. Det antas derfor at de uspesifikke båndene er bånd fra andre MMPer spesielt MMP-2, det andre medlemmet av gelatinase-proteinene [33]. Dette primærantistoffet gjorde det vanskelig å kvantifisere båndene, og det burde vurderes å finne en erstatning.

Det er viktig å bemerke at MMP9 er et ekstracellulært protein. Det kan hende at proteinet blir vasket bort når cellene vaskes med PBS under høsting til westernblottet. Et alternativ er derfor å måle protein i ernæringsmediumet.

For å avkrefte eller bekrefte at MMP9 er involvert i nevruttvekst induisert av legemidler er det nødvendig å knytte endret proteinuttrykk til funksjonelle endringer. Et pilotforsøk med MMP9-hemmer ble utført i kyllingkornceller ved kvalitativ analyse i mikroskop. Det ser ut til at MMP9-hemmer gir en reduksjon av nevritter ved konsentrasjonen 1 nM, men en svakere reduksjon på konsentrasjonen 10 nM. 100 nM MMP9-hemmer så ut til å være toksisk for kyllingkorncellene. Dette kan tyde på at MMP9 er involvert i nevruttvekst. Det bør merkes at korncellene ble eksponert 24 timer etter utplating, og de nevrittene som er til stede kan ha blitt dannet i dette tidsrommet. Det burde derfor undersøkes om denne hemmeren kan påvirke nevruttvekst ved å eksponere rett etter utplating, men dette kan være utfordrende da cellene ikke har fått festet seg i skålen. Et alternativ er derfor å injisere egget med MMP9-hemmer og se om dette kan gi færre utløpere. Det hadde vært interessant å undersøke MMP9-hemmeren i kombinasjon med legemidlene, for å se om nevruttveksten ble endret i PC12-celler. Det er lettere å kvantifisere nevrittene i denne cellelinjen enn det er i kornceller.

4.2.2. p53 som differensierings- og nevruttvekstmarkør

p53 er en tumor suppressor med en veletablert pro-apoptotisk rolle som en forsvarsmekanisme mot DNA-skade og regulering av cellyklus. Nylig har p53 sin rolle i nevronal differensiering kommet i fokus, med tilknytning til nevrotrofinreseptorer og NGF-aktivert differensiering. p53 er nødvendig for NGF-mediert differensiering av PC12-celler. p53 tar cellen ut av cellyklus, og låser cellen slik at den kan differensiere [77]. p53-LUC var et tilgjengelig plasmid for å se på p53-uttrykket i cellen. Dette plasmidet er konstruert med bindingssete for p53 selv [78], og ikke en promotor for p53. Ved å bruke et slikt plasmid gir det mer informasjon om proteinuttrykk av p53 fordi p53 må til for å aktivere promotoren. Dermed vil økt aktivering av promotoren reflektere økte mengder p53 i cellen. p53 fosforyleres og aktiveres til en rekke fosfo-varianter [26]. Det hadde vært spennende å undersøke om de ulike formene av p53 har ulike effekter på nevruttvekst og eventuelt celleproliferasjon. Dette kunne blitt utført med ulike antistoff mot de ulike variantene av p53 og analysert med for eksempel westernblotting. Å tilegne seg mer kunnskap om p53s rolle i både cellyklusregulering og nevronal differensiering, kan være interessant både innen sikkerhetsfarmakologiske studier på nevronal utvikling, men også innenfor kreftforskning.

4.2.3. GCS som markør på cellens antioksidantforsvar

Under utvikling er hjernen spesielt utsatt for skader mediert av reaktive oksygen- og reaktive nitrogenforbindelser (ROS/RNS), da den har en tett populasjon av umodne celler. De er spesielt følsomme på grunn av et høyt forbruk av umettete fettsyrer, høyt oksygenforbruk, lave konsentrasjoner av antioksidanter og høye nivåer av katalyserende metallioner som danner frie radikaler [39]. Når det blir en ubalanse mellom produksjon av ROS/RNS (en naturlig reaksjon i cellulære prosesser) og mangel på antioksidanter, forårsakes det oksidativt stress.

Oksidativt stress er involvert i patogenesen når hjernen skades (for eksempel av legemidler) under utviklingen [39]. Glutation (GSH) er den viktigste lavmolekylære antioksidanten som produseres i cellene. GSH produseres av γ -glutamylcystein syntetase (γ -GCS, også kjent som glutamatcysteiniligase GCL) og GSH-syntetase. Fordi GCS er det hastighetsbestemmende trinnet i syntesen [79] er dette en egnet markør for å se på oksidativt stress i cellen. Det ble derfor benyttet promotoren GCS-LUC i luciferaseassay for å undersøke om legemidlene kunne påvirke cellens forsvarsmekanismer mot oksidativt stress. Denne promotoren inneholder flere responselementer. De kjente er AP-1 sete, ett NF- κ B sete, et xenobiotika-responselement (XRE) og fire antioksidant-responselement (ARE/EpRE). Nrf1 og Nrf2 er transkripsjonfaktorer for ARE/EpRE [80]. Promotoren aktiveres derfor av en rekke faktorer, og det er ikke mulig å vite hvilke(t) som har aktivert promotoren i mine forsøk. Da oksidativt stress kan påvirke hjerneutviklingen ble dette ansett som et interessant endepunkt.

4.3. Diskusjon av biologiske funn

4.3.1. BDNF og effekter på nevruttvekst i PC12-celler

Det lyktes ikke å fange opp noen effekter av BDNF på endepunkter valgt for å undersøke nevruttvekst, og det oppsto tvil om TrkB-reseptoren er til stede i PC12-cellenlinjen. Hypotesen om at PC12-celler ikke uttrykker TrkB bekreftes også i litteraturen [81]. PC12-celler eksponert for 300 ng/ml ga en tendens til å øke andel ”knoppceller”, men på grunn av lavt antall forsøk var det ikke mulig å regne statistisk på dette. Det var derfor interessant å se om en TrkB-agonist kunne erstatte bruken av BDNF, og om denne kunne utløse nevruttvekst i PC12-celler. Når BDNF ble erstattet med TrkB-agonist LM22A-4, ble det, som forventet, heller ikke observert endringer i nevruttvekst. Agonisten var derfor ikke

egnet til å erstatte BDNF i forsøk i denne modellen. Det antas derfor at våre PC12-celler ikke uttrykker TrkB.

Da flere forskningsgrupper har konkludert med at PC12-celler ikke uttrykker TrkB, utføres heller BDNF-forsøk i TrkB-transfektete celler. I TrkB-transfektete PC12-celler stimulerer BDNF cellene til å sende ut lengre, og tykkere nevritter enn NGF-stimulering [82]. ERK-signalerer ser også ut til å være nødvendig for TrkB-mediert nevruttvekst og nevronal differensiering i PC12-celler transfektet med TrkB [83]. Kornceller uttrykker BDNFs høyaffinitetsreseptor TrkB, og mangel på BDNF er vist å hemme migreringen av korncellene. Akutt eksponering av kornceller med BDNF gir raskt migrering, noe som indikerer at BDNF er motogenisk faktor (gir bevegelse) i korncellene [25]. Primærkultur er derfor bedre egnet til å studere BDNF-effekt på nevruttvekst enn utransfektete PC12-celler. Da legemidlene påvirket PC12-cellers nevruttvekst, uten TrkB til stede, betyr det at den farmakologiske effekten går via andre signalveier enn TrkB-reseptoren. Det hadde likevel vært interessant å se på ”off-target”-effekter. Kanskje ser man en helt annen type nevritter, dersom TrkB er til stede?

Et alternativ for å bekrefte om TrkB-reseptoren faktisk er til stede i cellene er å benytte et TrkB-spesifikt-antistoff som detekteres med westernblotting eller ELISA. Selv om dette vil kunne bekrefte tilstedeværelsen, vil det ikke bekrefte om reseptoren er aktiv. Det kan være en feil i nedstrømssignaleren (ERK) som er spesielt viktige for differensiering og nevruttvekst. Alternativer for å se på BDNF-effekt i PC12-celler er, som nevnt tidligere, å transfektete cellene med TrkB-reseptor. Ved å kotransfektete cellene med et grønt fluorescensprotein (GFP), eller benytte et GFP-TrkB-plasmid, vil man også begrense analyseringen til kun de cellene som tar opp dette plasmidet. Dersom cellene har tatt opp GFP-plasmidet vil cellene være grønne i et fluorescensmikroskop. Da antar man at de cellene som har blitt transfektet med GFP, også har blitt transfektet med TrkB. Dermed kan nevruttvekst (eller annet ønsket endepunkt) undersøkes på kun et utvalg av cellene.

4.3.2. Valproats effekter på nevruttvekst og nevronale markører

VPA er tidligere vist å fremme nevruttvekst i PC12-celler i konsentrasjoner på 500 μ M [50, 63] og i nevroblastomcellelinjen SH-SY5Y [84]. Dette ble bekreftet i denne oppgaven, og VPA ga en prosentvis økning i andel celler med nevritter, andel celler med lange nevritter og

en økning i andel spydlignende celler. Da VPA ble kombinert med en TrkA-antagonist, så det ut til at VPAs effekt på nevruttvekst ble sterkere. Celleproliferasjonen gikk ned, andel celler med nevrutter økte og det ble observert en prosentvis økning i andel celler med lange nevrutter. Dette betyr at VPA ikke stimulerer nevruttvekst via TrkA, men det kan være at en hemming av TrkA-reseptor fører til en oppregulering av andre vekstfaktorreseptorer. Ved samtidig eksponering av VPA og TrkB-antagonisten ANA-12 ble det observert en økning i andel celler med lange nevrutter. Dette var ikke signifikant forskjellig fra VPA alene, men tendensen var tydelig. Ut i fra disse forsøkene kan dette ikke forklares. Daniel, E.D. og A.W. Mudge konkluderte i studien med SH-SY5Y at VPA aktiverte ERK [84], den samme signalveien NGF aktiverer under differensering av PC12-celler, men ikke via aktivering av PKC. Det kan dermed antas at VPA aktiverer de samme kaskadene som NGF, men via en annen vekstfaktorreseptor.

Som forventet ga VPA ingen store endringer i nevruttvekst da den ble kombinert med BDNF eller TrkB-antagonist, og det antas at VPA ikke gir nevruttvekst via TrkB-aktivering. PC12-celler har et høyt uttrykk av epidermal vekstfaktor (EGF)-reseptorer [85] og aktivering av EGF stimulerer også celledifferensering via ERK [86, 87]. Fibroblast vekstfaktorer (FGF) spiller også en viktig rolle i cellevekst, celledifferensering og nevrogenese. VPA er vist å aktivere promotor for FGF og oppregulere mRNA for FGF [88]. Denne aktiveringen er koblet til VPAs HDAC-hemmende effekt, og en økt acetylering av histoner på FGF-1B-promotor [88]. Aktivering av FGF-reseptor 1 øker nevruttvekst via aktivering av ERK- og Akt-signalering [89]. For å teste denne hypotesen kan man benytte en FGFR-antagonist eller en EGFR-antagonist og kombinere med VPA, for å se om det blir en endring i nevruttvekst. Det ser ut til at ERK-signalering aktivert via Ras og ikke PKC kan ligge bak VPAs effekt på nevruttvekst i PC12-celler. Det hadde vært interessant å se på nedstrømssignalering og transkripsjonsfaktoraktivering fra ERK, og finne hvilken transkripsjonsfaktor som aktiveres. En interessant transkripsjonsfaktor er c-jun, da denne er vist å være involvert i NGF-indusert nevruttvekst [90]. Ved å benytte et c-jun-plasmid koblet til et luciferasereporter gen kunne det være mulig å måle aktiviteten av denne transkripsjonsfaktoren med luciferase assay. Proteinmåling med westernblotting kan bekrefte resultatene.

VPA ga en tendens til å øke MMP9-aktivitet med størst effekt på 500 μ M, men redusere MMP9-aktiviteten når konsentrasjonen kom opp i 1000 μ M (figur 3.25). I kyllingkorncellene førte VPA-eksponering også til å øke MMP9-promotoraktiveringen (figur 3.27). Dette var

interessant da litteraturen beskriver en nedgang i MMP9-nivå ved eksponering for VPA etter hjerneslag, en mekanisme trolig mediert via HDAC-hemming [91]. Dette kan bety at dette er både artsspesifikk og en doserelatert effekt. Westernblottet viste en svak reduksjon av MMP9-nivå i konsentrasjonene 50 μM og 500 μM (figur 3.34) men med en svak økning igjen av proteinnivået på 1000 μM . Det må bemerkes at laminkorrigert båndstyrke kun er basert på to forsøk, og det kreves flere paralleller for å kunne si noe klart. Dersom det viser seg at MMP9 blir hemmet av VPA, gir dette et utgangspunkt for mulig farmakologisk effekt. Hemming av MMP9 kan være gunstig med tanke på epileptogenesen, da det er observert høye konsentrasjoner av MMP9 etter epileptiske anfall [37]. Men MMP9 er også involvert i nevrutvekst, og hemming kan derfor ha alvorlige konsekvenser for nevronal utvikling [74].

p53-aktiviteten så ut til å øke med konsentrasjoner av VPA på 50 μM og 500 μM , men også her ble det observert en kraftig reduksjon på 1000 μM (figur 3.23). Studier har vist at MMP9 er nødvendig for p53-aktivering, trolig via Notch1-aktivering [92]. Under inflammasjon fungerer MMP-9 som en tumorsupressor. Når MMP9-nivået øker aktiveres Notch1, som går inn til cellekjernen og aktiverer p53. Dette gir en aktivering av p21, som tar cellen ut av celledødsyklus, aktiverer caspasekaskader og gir apoptose [92]. Dette er interessant, da det kan tyde på at VPA 1000 μM kan hemme MMP9-aktivitet og dermed gi en reduksjon av p53-nivå og celledød i apoptose. VPA ga en signifikant reduksjon i celledød når PC12-celler ble eksponert for 1000 μM kontra ubehandlede PC12-celler. Denne konsentrasjonen av VPA var derfor ikke toksisk, men så ut til å heller ha en beskyttende effekt. Det kan være at dette er en av mekanismene som ligger til grunn for reduksjon av celledød (figur 3.31).

En annen mulig mekanisme for VPAs beskyttende effekt kan være påvirkning av cellens antioksidantforsvar. Studier har vist at kronisk behandling med VPA i terapeutiske konsentrasjoner utøver nevrobeskyttende effekter etter hjerneslag [93, 94] og det kan skyldes at VPA øker cellens antioksidantforsvar, og dermed beskytter mot celledød. VPA økte GCS-aktiviteten i luciferaseassay, med størst effekt på 500 μM .

GSH-nivå i cellen styres av en negativ feedback på γ -GCS, og dersom det hadde vært mulig å påvirke denne feedbacken, kan man også bidra til å styrke kroppens naturlige forsvar. Dersom GCS-aktiviteten i cellen går opp ved eksponering av et legemiddel, kan dette tyde på at cellen enten er utsatt for oksidativt stress, eller at legemiddelet styrker kroppens antioksidantforsvar. Et forslag til videre studier for å bekrefte dette er å måle GSH-nivå i

cellen ved hjelp av for eksempel "flow cytometry" [95]. Et høyt/normalt nivå av GSH og GCS vil indikere at eksponeringen har styrket antioksidantforsvaret. Hvis GSH-nivået i cellen er redusert, tyder dette på at cellen har vært utsatt for oksidativt stress, og GCS-aktiviteten er satt i gang for å produsere mer GSH. VPA ser ut til å ha motsatt effekt på oksidativt stress enn andre antiepileptika slik som fenytoin, som har vist å øke oksidativt stress [41]. Det er rapportert at behandlingen inhiberer glutamat-indusert Ca^{2+} influks og DNA-fragmentering og beskytter mot glutamatindusert celledød. I tillegg er det vist i primærkulturer at behandling med VPA hemmer lipidperoksidasjon og proteinoksidasjon, noe som indikerer en nevrobeskyttende effekt på oksidativt stress [93]. VPAs beskyttende evne mot oksidativt stress kan derfor også forklare hvorfor VPA ga en signifikant reduksjon i celledød.

4.3.3. Lamotrigins effekter på nevruttvekst og nevrone markører

LTG erstatter ofte VPA i behandling av kvinner med epilepsi under svangerskapet, fordi den er antatt å ha en lavere risiko for misdannelser [18]. Lite er kjent om intracellulære signaleringsveier aktivert av LTG [84], og økende forskrivning og bruk både innenfor epilepsi og andre terapiområder [18] gjør det nødvendig å utføre studier for å tilegne seg denne kunnskapen. Det er ikke funnet tidligere litteratur på LTGs effekter på nevruttvekst i PC12-celler, men LTG har i en studie vist å ikke påvirke nevruttvekst i nevroblastom-cellelinjen SH-SY5Y [84]. Sissel Evensen viste imidlertid at LTG påvirker nevruttvekst i PC12-celler [50], og dette ble bekreftet i denne oppgaven.

LTG 500 μ M ga signifikante endringer i PC12-celler på fem av syv endepunkt. Det ble observert en reduksjon i celleantall og en større andel celler differensierte til å uttrykke nevritter. PC12-cellene endret den morfologiske formen, strakk seg ut og fikk en spydlignende form. Dette økte andel celler med lange nevritter, da spydcellene fikk to lange nevritter på hver side av cellen. Nevrittlengden ble lengre sammenlignet med ubehandlede PC12-celler. Effekter av LTG på nevruttvekst var som forventet, da dette er vist tidligere [50]. Det interessante var at når PC12-celler ble eksponert for LTG etter å ha blitt eksponert for en TrkA-antagonist, ble det observert en reduksjon av både antall celler (ikke signifikant), andel celler med nevritter, andel lange nevritter (ikke signifikant) og andel "spydceller" sammenlignet med celler eksponert for LTG alene. Dette betyr at LTGs effekter på nevruttvekst kan være mediert via TrkA-signalering. De spydlignende formene på

cellekroppen ble observert i størst grad hos PC12-celler eksponert for LTG, men det ble også observert en del spydlignende celler i celler eksponert for NGF. Eldre litteratur har beskrevet en "flattening" eller en utflatning av cellekroppen på et tidlig stadium av NGF-differensieringen i PC12-celler og hos PC12-celler eksponert for EGF [96, 97], og det er mulig at denne spydlignende formen ligner dette tidlige stadiet av NGF-differensiering.

Da LTG ble kombinert med TrkB-antagonisten ANA-12, kunne det også se ut til å bli en reduksjon i nevrutteffekt. Andel "spyceller" ble redusert, noe som var uventet da det tidligere er konkludert med at TrkB-reseptoren ikke er til stede i cellen. Ut i fra forsøk utført i denne oppgaven kan dette ikke forklares og flere forsøk bør utføres. ANA-12 hadde i seg selv heller ingen påvirkning på PC12-cellene. LTG blir, i tillegg til behandling av epilepsi, benyttet til behandling av bipolare lidelser, og spesielt de depressive periodene. Lave nivåer av BDNF i noen områder i hjernen er assosiert med depresjon [98] og det er spekulert i om LTG er godt egnet i behandling av depresjon, fordi den normaliserer de lave nivåene av BDNF [99]. Det er derfor interessant å se om LTG har andre effekter i PC12-celler som er transfektert med TrkB-reseptor. Dette kan gjøres i fremtidige studier.

Da det var problemer med proteinmåling til westernblotting, og lav luciferaseaktivitet på konsentrasjonen 1000 μ M LTG i både udifferensierte og i NGF-differensierende PC12-celler, ble det vurdert til at dette kunne skyldes celledød. Da LTG hadde vist en større reduksjon i andel celler ble alle konsentrasjoner av LTG, benyttet i oppgaven, undersøkt med celledødsdeteksjon. LTG var toksisk for PC12-celler på konsentrasjonen 1000 μ M. Dette ble observert både i kombinasjon med NGF 50 ng/ml eller alene. Det ble imidlertid observert en svak reduksjon i celledød når PC12-celler ble eksponert for kombinasjonsbehandling med LTG og NGF sammenlignet med LTG alene, og det mistenkes at NGF kan ha en beskyttende effekt mot lamotrigintoksisitet. Det er imidlertid ikke funnet noen litteratur på dette. p53-aktiviteten så ikke ut til å endre seg ved eksponering med LTG. Nevrittutveksten ser ikke ut til å være p53-mediert. I tillegg er det interessant for LTGs toksiske effekt. Det ser ut som at den ikke er mediert via p75^{NTR}, da p75^{NTR} krever aktivering av p53 via Jun-kinasemedierte (JNK) signalveier for å mediere apoptose [100]. Det interessante var at LTG reduserte aktiviteten av GCS-promotoren. Dette er svært unaturlig, og kan forklare hvorfor LTG er toksisk. Dersom GCS-aktiviteten går ned, kan man anta at det produseres mindre GSH. Dermed vil cellen være mer utsatt for oksidativt stress og være uten et godt antioksidantforsvar.

LTG så ut til å øke MMP9-uttrykket både i PC12-celler og i kyllingkornceller, men det var også store variasjoner mellom forsøkene. Det er derfor nødvendig med flere paralleller. Den samme trenden ble observert ved westernblotting, med størst økning på 50 μ M. Det er spennende at LTG øker MMP9-uttrykket, fordi dette kan forklare hvorfor LTG har antidepressiv effekt, ved å regulere de lave nivåer av BDNF [99]. Det hadde vært interessant om nivå av pro-BDNF endrer seg ved eksponering med LTG. Siden MMP9 er kjent for å aktivere pro-BDNF til aktiv BDNF [37], kan en oppregulering av MMP9 øke konverteringen fra pro-BDNF til BDNF. Det er tilgjengelig pro-BDNF ELISA-kit, slik at det er mulig å måle endringer i proteinuttrykk.

Dette ser ut til å være gunstig ved manisk depresjon med lave nivå av BDNF, men å øke BDNF-nivå kan være ugunstig med tanke på epilepsi. Det hadde dermed vært interessant å se om LTG fungerer forskjellig i ulike hjernestrukturer.

4.3.4. Hva vil fremtiden bringe?

Det foreligger lite litteratur om intracellulære signalveier for VPA og spesielt for LTG. Det er nødvendig å utføre sikkerhetsfarmakologiske studier for å tilegne seg denne kunnskapen. MMP9 og p53 er interessante markører for å studere nevruttvekst i både PC12-celler og (fremtidig) i kyllingkornceller, men det kreves flere studier for å kunne bekrefte det som ble observert i denne oppgaven. Det er i denne oppgaven fokusert på sekundære mekanismer, men det hadde vært interessant å se om dette også kan skyldes den primære farmakologiske effekten til legemidlene. Det blir spennende å følge med på hva videre forskning vil bringe frem og arbeidet i denne oppgaven kan være første steg for å finne relevante intracellulære mekanismer.

5. Konklusjon

- PC12-celler er en egnet modell for å studere nevruttvekst induisert av NGF, lamotrigin og valproat.
- PC12-celler er ikke egnet til å studere nevruttvekst induisert av BDNF eller effekter induisert via TrkB-reseptoren, da det kan tyde på at cellelinjen mangler denne reseptoren.
- Lamotrigin og valproat påvirker nevruttvekst i PC12-celler. LTG, men ikke VPA, ser ut til å påvirke nevruttvekst via TrkA-avhengige signalveier.
- Valproat økte MMP9-aktivitet og MMP9-uttrykk i PC12-celler og kyllingkornceller, men dette var doseavhengig. p53-aktivering så ut til å være doseavhengig, og aktiviteten økte ved 50 μM og 500 μM , men ble redusert ved 1000 μM sammenlignet med ubehandlet PC12-celler. GCS-aktiviteten økte ved alle konsentrasjonene av valproat sammenlignet med ubehandlet PC12-celler. Dette kan forklare hvorfor valproat ga en reduksjon i celledød.
- Lamotrigin så ut til å øke MMP9-aktivitet og MMP9-uttrykk i PC12-celler og i kyllingkornceller, men hadde ingen effekt på p53-uttrykket. Det kan se ut som at lamotrigin reduserer GCS-aktiviteten og gjøre cellen mindre forsvarsdyktig mot oksidativt stress.
- MMP9 ser ut til å være involvert i nevruttvekst i kyllingkornceller.
- Antiepileptika som lamotrigin og valproat er aktuelle å bruke under svangerskapet. Disse kan påvirke nevruttvekst, en prosess som er viktig under utviklingen av nervesystemet. Ved å utføre flere sikkerhetsfarmakologiske studier kan man tilegne seg kunnskap om mulige mekanismer bak uønskede effekter induert av legemidler.

Litteraturliste

1. ICH, S7A - *Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals*, FDA, Editor. 2001, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Federal Register. p. 36791-92.
2. Radio, N.M. and W.R. Mundy, *Developmental neurotoxicity testing < i> in vitro</i>: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology*, 2008. **29**(3): p. 361-376.*
3. Radio, N.M., et al., *Comparison of PC12 and cerebellar granule cell cultures for evaluating neurite outgrowth using high content analysis*. *Neurotoxicology and teratology*, 2010. **32**(1): p. 25-35.
4. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1976. **73**(7): p. 2424-2428.
5. Fisher, R.S., et al., *Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. *Epilepsia*, 2005. **46**(4): p. 470-472.
6. McCormick, D.A. and D. Contreras, *On the cellular and network bases of epileptic seizures*. *Annual Review of Physiology*, 2001. **63**(1): p. 815-846.
7. Daniel L. Jones, J.O.M., *The Epilepsies: Phenotypes and Mechanisms*, in *Basic Neurochemistry Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology*, G.J.S. Scott T. Brady, R Wayne Albers, Donald L. Price, Editor. 2012, Academic Press. p. 705-718.
8. Moser, V., et al., *Toxic responses of the nervous system*. Casarett and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Klaassen CD Ed.), 2010(Second Edition): p. 217-232.
9. Gaitatzis, A. and J.W. Sander, *The long-term safety of antiepileptic drugs*. *CNS drugs*, 2013. **27**(6): p. 435-455.
10. Johannessen Landmark, C., et al., *Antiepileptic drugs in epilepsy and other disorders—A population-based study of prescriptions*. *Epilepsy research*, 2009. **87**(1): p. 31-39.
11. Adab, N., et al., *The longer term outcome of children born to mothers with epilepsy*. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2004. **75**(11): p. 1575-1583.
12. Morrow, J., et al., *Malformation risks of antiepileptic drugs in pregnancy: a prospective study from the UK Epilepsy and Pregnancy Register*. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2006. **77**(2): p. 193-198.
13. Lasoñ, W.a.a., et al., *Basic mechanisms of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions: an update*. *Pharmacol Rep*, 2011. **63**(2): p. 271-292.
14. H.P. Rang, M.M.D., J.M. Ritter, R.J. Flower, *Antiepileptic drugs*, in *Rang and Dale's Pharmacology*. 2007, Churchill Livingstone. p. 575-587.
15. Menegola, E., et al., *Inhibition of histone deacetylase as a new mechanism of teratogenesis*. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 2006. **78**(4): p. 345-353.
16. Einat, H., et al., *The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation*. *The Journal of neuroscience*, 2003. **23**(19): p. 7311-7316.

17. K.O Nakken, K.H., K. Alfstad, E. Taubøll, *Hvordan virker antiepileptika?* Tidsskrift for Den norske legeforening, 2014. **134**(1): p. 42-46.
18. Vajda, F., et al., *Is lamotrigine a significant human teratogen? Observations from the Australian Pregnancy Register.* Seizure, 2010. **19**(9): p. 558-561.
19. Da Silva, J.S. and C.G. Dotti, *Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis.* Nature Reviews Neuroscience, 2002. **3**(9): p. 694-704.
20. Wechsler-Reya, R.J. and M.P. Scott, *Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog.* Neuron, 1999. **22**(1): p. 103-114.
21. Miller, F., C. Pozniak, and G. Walsh, *Neuronal life and death: an essential role for the p53 family.* Cell Death & Differentiation, 2000. **7**(10).
22. Contestabile, A., *Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro.* The cerebellum, 2002. **1**(1): p. 41-55.
23. Luo, J., *The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex.* The Cerebellum, 2005. **4**(4): p. 239-245.
24. Apps, R. and M. Garwicz, *Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing.* Nature Reviews Neuroscience, 2005. **6**(4): p. 297-311.
25. Borghesani, P.R., et al., *BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells.* Development, 2002. **129**(6): p. 1435-1442.
26. Di Giovanni, S. and K. Rathore, *p53-dependent pathways in neurite outgrowth and axonal regeneration.* Cell and tissue research, 2012. **349**(1): p. 87-95.
27. Friedman, W., *Growth Factors*, in *Basic Neurochemistry Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*, G.J.S. Scott T. Brady, R. Wayne Albers, Donald L. Price, Editor. 2012, Academic Press. p. 546-557.
28. Bartkowska, K., K. Turlejski, and R.L. Djavadian, *Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system.* Acta Neurobiol Exp (Wars), 2010. **70**(4): p. 454-467.
29. Ginty, D.D. and R.A. Segal, *Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon.* Current opinion in neurobiology, 2002. **12**(3): p. 268-274.
30. Lee, R., et al., *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.* Science, 2001. **294**(5548): p. 1945-1948.
31. Levi-Montalcini, R., *The nerve growth factor: thirty-five years later.* Bioscience reports, 1987. **7**(9): p. 681-699.
32. Danzer, S.C., X. He, and J.O. McNamara, *Ontogeny of seizure - induced increases in BDNF immunoreactivity and TrkB receptor activation in rat hippocampus.* Hippocampus, 2004. **14**(3): p. 345-355.
33. Ethell, I.M. and D.W. Ethell, *Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets.* Journal of neuroscience research, 2007. **85**(13): p. 2813-2823.
34. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function.* Annual review of neuroscience, 2001. **24**: p. 677.
35. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, *Trk receptors: mediators of neurotrophin action.* Current opinion in neurobiology, 2001. **11**(3): p. 272-280.
36. Chen, Y., et al., *Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system.* Journal of International Medical Research, 2009. **37**(2): p. 281-288.
37. Mizoguchi, H. and K. Yamada, *Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Targets in Epileptogenesis and Seizures.* Clinical Psychopharmacology and Neuroscience, 2013. **11**(2): p. 45-52.

38. Shubayev, V.I. and R.R. Myers, *Matrix metalloproteinase - 9 promotes nerve growth factor - induced neurite elongation but not new sprout formation in vitro*. Journal of neuroscience research, 2004. **77**(2): p. 229-239.
39. Ikonomidou, C. and A.M. Kaindl, *Neuronal death and oxidative stress in the developing brain*. Antioxidants & redox signaling, 2011. **14**(8): p. 1535-1550.
40. Parman, T., G. Chen, and P.G. Wells, *Free Radical Intermediates of Phenytoin and Related Teratogens PROSTAGLANDIN H SYNTHASE-CATALYZED BIOACTIVATION, ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROMETRY, AND PHOTOCHEMICAL PRODUCT ANALYSIS*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(39): p. 25079-25088.
41. Wells, P.G., et al., *Oxidative DNA damage and repair in teratogenesis and neurodevelopmental deficits*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2010. **90**(2): p. 103-109.
42. Forman, H.J., H. Zhang, and A. Rinna, *Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. Molecular aspects of medicine, 2009. **30**(1): p. 1-12.
43. Greene, L.A. and G. Rein, *Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells*. Brain research, 1977. **129**(2): p. 247-263.
44. Alatorre-Meda, M., A. González-Pérez, and J.R. Rodríguez, *DNA-METAFECTENE™ PRO complexation: a physical chemistry study*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(27): p. 7464-7472.
45. Tros de Ilarduya, C., Y. Sun, and N. Düzgüneş, *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*. European journal of pharmaceutical sciences, 2010. **40**(3): p. 159-170.
46. Simon T.M. Allard, K.K., Promega Corporation, *Luciferase Reporter Assay: Powerful, Adaptable Tools for Cell Biology Research*. Cell Notes, 2008(21): p. 24-26.
47. Shifera, A.S. and J.A. Hardin, *Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays*. Analytical biochemistry, 2010. **396**(2): p. 167.
48. Mahmood, T. and P.-C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. North American journal of medical sciences, 2012. **4**(9): p. 429-434.
49. Harper, S. and D.W. Speicher, *Detection of proteins on blot membranes*. Current protocols in protein science, 1995: p. 10.8. 1-10.8. 7.
50. Evensen, S., *Sikkerhetsfarmakologiske studier av lamotrigin og valproat - mulige effekter på nevronkulturer*, in *Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt*. 2013, Universitetet i Oslo.
51. Massa, S.M., et al., *Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents*. The Journal of clinical investigation, 2010. **120**(5): p. 1774.
52. Wood, E.R., et al., *Discovery and in vitro evaluation of potent TrkA kinase inhibitors: oxindole and aza-oxindoles*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2004. **14**(4): p. 953-957.
53. Kudo, T.a., et al., *Dorsomorphin stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of a protein kinase A - dependent MEK - ERK1/2 signaling pathway*. Genes to Cells, 2011. **16**(11): p. 1121-1132.

54. Cazorla, M., et al., *Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(5): p. 1846.
55. Millipore, M., *Anti-MMP-9 Antibody, Catalytic domain*. 2014.
56. Greene, L.A. and D.R. Kaplan, *Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors*. Current opinion in neurobiology, 1995. **5**(5): p. 579-587.
57. Bouron, A., C. Becker, and H. Porzig, *Functional expression of voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels during neuronal differentiation of PC12 cells with nerve growth factor or forskolin*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 1999. **359**(5): p. 370-377.
58. Rabin, S.J., V. Cleghon, and D. Kaplan, *SNT, a differentiation-specific target of neurotrophic factor-induced tyrosine kinase activity in neurons and PC12 cells*. Molecular and cellular biology, 1993. **13**(4): p. 2203-2213.
59. Rodum, M., *Sikkerhetsfarmakologiske studier av SSRI-er-mulige effekter på nevronkulturer*. 2013.
60. Scharfman, H.E., *Brain - derived Neurotrophic Factor and Epilepsy—A Missing Link?* Epilepsy Currents, 2005. **5**(3): p. 83-88.
61. Azad Bonni, A.B., Anne E. West, Sandeep Robert Datta, Mari A. Takasu, Michael E. Greenberg, *Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and - Independent Mechanisms*. Science, 1999. **286**: p. 1358-1362.
62. Fürst, *S-Lamotrigin*.
63. Bergeijk, J., et al., *Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein*. Chemical biology & drug design, 2006. **67**(3): p. 244-247.
64. Fürst, *S-Valproat*.
65. Wang, X., et al., *Essential role of ERK activation in neurite outgrowth induced by α -lipoic acid*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2011. **1813**(5): p. 827-838.
66. Harrill, J.A. and W.R. Mundy, *Quantitative assessment of neurite outgrowth in PC12 cells*, in *In Vitro Neurotoxicology*. 2011, Springer. p. 331-348.
67. Drubin, D.G., et al., *Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors*. The Journal of cell biology, 1985. **101**(5): p. 1799-1807.
68. Meijering, E., *Neuron tracing in perspective*. Cytometry Part A, 2010. **77**(7): p. 693-704.
69. Marques, S.M. and J.C. Esteves da Silva, *Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions*. IUBMB life, 2009. **61**(1): p. 6-17.
70. Inglese, J., et al., *High-throughput screening assays for the identification of chemical probes*. Nature chemical biology, 2007. **3**(8): p. 466-479.
71. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin*. Genes & development, 2008. **22**(7): p. 832-853.
72. Nai-Kui Liu, X.-M.X., *-Tubulin is a more suitable internal control than β -actin in Western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury*. Journal of neurotrauma, 2006. **23**(12): p. 1794-1801.
73. Leite, M., et al., *Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death—study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60*. Analytical Cellular Pathology, 1999. **19**(3): p. 139-151.

74. Vaillant, C., et al., *MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2003. **24**(2): p. 395-408.
75. Park, K.-P., et al., *Plasma and brain matrix metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats*. *Stroke*, 2009. **40**(8): p. 2836-2842.
76. Kim, Y., et al., *The MMP-9/TIMP-1 axis controls the status of differentiation and function of myelin-forming Schwann cells in nerve regeneration*. *PloS one*, 2012. **7**(3): p. e33664.
77. Zhang, J., W. Yan, and X. Chen, *p53 is required for nerve growth factor-mediated differentiation of PC12 cells via regulation of TrkA levels*. *Cell Death & Differentiation*, 2006. **13**(12): p. 2118-2128.
78. Plasmids, B.V.L., *Plasmid 16442: PG13-luc (wt p53 binding sites)*, Addgene, Editor.
79. Griffith, O.W., *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. **27**(9): p. 922-935.
80. Myhrstad, M.C., et al., *Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002. **32**(5): p. 386-393.
81. Kelly-Spratt, K.S., et al., *A TrkB/insulin receptor-related receptor chimeric receptor induces PC12 cell differentiation and exhibits prolonged activation of mitogen-activated protein kinase*. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 1999. **10**(12): p. 805-812.
82. Iwasaki, Y., et al., *Induction of a Distinct Morphology and Signal Transduction in TrkB/PC12 Cells by Nerve Growth Factor and Brain - Derived Neurotrophic Factor*. *Journal of neurochemistry*, 1997. **68**(3): p. 927-934.
83. Shih, C., C. Chen, and L. Chen, *New Function of the Adaptor Protein SH2B1 in Brain-Derived Neurotrophic Factor-Induced Neurite Outgrowth*. *PloS one*, 2013. **8**(11): p. e79619.
84. Daniel, E.D., A.W. Mudge, and P.R. Maycox, *Comparative analysis of the effects of four mood stabilizers in SH - SY5Y cells and in primary neurons*. *Bipolar disorders*, 2005. **7**(1): p. 33-41.
85. Tyson, D.R., et al., *PC12 cell activation by epidermal growth factor receptor: role of autophosphorylation sites*. *International journal of developmental neuroscience*, 2003. **21**(2): p. 63-74.
86. Brodie, C., et al., *Protein kinase C-epsilon plays a role in neurite outgrowth in response to epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells*. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 1999. **10**(3): p. 183-191.
87. GOTOH, Y., et al., *Microtubule - associated - protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells*. *European journal of biochemistry*, 1990. **193**(3): p. 661-669.
88. Kao, C.Y., et al., *The mood stabilizer valproate activates human FGF1 gene promoter through inhibiting HDAC and GSK - 3 activities*. *Journal of neurochemistry*, 2013. **126**(1): p. 4-18.
89. Hausott, B., et al., *Promotion of neurite outgrowth by fibroblast growth factor receptor 1 overexpression and lysosomal inhibition of receptor degradation in pheochromocytoma cells and adult sensory neurons*. *Neuroscience*, 2008. **153**(2): p. 461-473.

90. Dragunow, M., et al., *c-Jun promotes neurite outgrowth and survival in PC12 cells*. Molecular brain research, 2000. **83**(1): p. 20-33.
91. Wang, Z., et al., *Valproic acid attenuates blood–brain barrier disruption in a rat model of transient focal cerebral ischemia: the roles of HDAC and MMP-9 inhibition*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2011. **31**(1): p. 52-57.
92. Garg, P., et al., *Notch1 regulates the effects of matrix metalloproteinase-9 on colitis-associated cancer in mice*. Gastroenterology, 2011. **141**(4): p. 1381-1392.
93. Cui, J., et al., *Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate*. Neuroscience, 2007. **144**(4): p. 1447-1453.
94. Chen, P.S., et al., *Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes*. Molecular psychiatry, 2006. **11**(12): p. 1116-1125.
95. Hedley, D.W. and S. Chow, *Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry*. Cytometry, 1994. **15**(4): p. 349-358.
96. Huff, K., D. End, and G. Guroff, *Nerve growth factor-induced alteration in the response of PC12 pheochromocytoma cells to epidermal growth factor*. The Journal of cell biology, 1981. **88**(1): p. 189-198.
97. Mark, M.D., et al., *Stimulation of neurite outgrowth in PC12 cells by EGF and KCl depolarization: a Ca (2+)-independent phenomenon*. The Journal of cell biology, 1995. **130**(3): p. 701-710.
98. Karege, F., et al., *Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients*. Psychiatry research, 2002. **109**(2): p. 143-148.
99. Abelaira, H.M., et al., *Lamotrigine treatment reverses depressive-like behavior and alters BDNF levels in the brains of maternally deprived adult rats*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2012. **101**(3): p. 348-353.
100. Aloyz, R.S., et al., *p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors*. The Journal of cell biology, 1998. **143**(6): p. 1691-1703.

Vedlegg / Appendiks

- Tallmateriale for figurer

Tallmaterialet for figur 3.1

Figur	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.1 A	Kontroll	34,77	2,880	11
	NGF 50 ng/ml	24,22	2,168	11
3.1 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	NGF 50 ng/ml	28,2 %	2,8 %	11
3.1 C	Kontroll	1,15	0,062	11
	NGF 50 ng/ml	1,43	0,072	11
3.1 D	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	NGF 50 ng/ml	3,5 %	0,8 %	11
3.1 E	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	NGF 50 ng/ml	3,5 %	0,9 %	11
3.1 F	Kontroll	1,32	0,492	3
	NGF 50 ng/ml	3,13	0,640	11
3.1 G	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	NGF 50 ng/ml	10,9 %	7,0 %	11

Tallmaterialet for figur 3.2

Figur	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.2 A	Kontroll	34,77	2,880	11
	DMSO	38,37	3,293	7
3.2 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	DMSO	14,2 %	3,1 %	7
3.2 C	Kontroll	1,15	0,062	11
	DMSO	1,29	0,052	7
3.2 D	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	DMSO	1,4 %	0,3 %	7
3.2 E	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	DMSO	0,0 %	0,0 %	7
3.2 F	Kontroll	1,32	0,492	3
	DMSO	0,39	-	1
3.2 G	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	DMSO	0,3 %	0,1 %	7

Tallmateriale for figur 3.3

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.3 A	Kontroll	34,77	2,88	11
	BDNF 100 ng/ml	42,21	4,07	7
	BDNF 300 ng/ml	34,8	4 (range)	2
3.3 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	BDNF 100 ng/ml	10,4 %	1,6 %	7
	BDNF 300 ng/ml	12,3 %	3,9 % (range)	2
3.3 C	Kontroll	1,15	0,06	11
	BDNF 100 ng/ml	1,31	0,04	7
	BDNF 300 ng/ml	1,42	0,15 (range)	2
3.3 D	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	BDNF 100 ng/ml	1,9 %	0,5 %	7
	BDNF 300 ng/ml	5,5 %	3,5 % (range)	2
3.3 E	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	BDNF 100 ng/ml	0,1 %	0,1 %	7
	BDNF 300 ng/ml	0,0 %	0,0 % (range)	2

Tallmateriale for figur 3.4

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.4 A	Kontroll	34,77	2,88	11
	BDNF 100 ng/ml	42,21	4,07	7
	LM22A-4 10 nM	31,1	7,8 (range)	2
	LM22A-4 100 nM	34,05	15,3 (range)	2
	LM22A-4 1000 nM	37,5	-	1
3.4 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	BDNF 100 ng/ml	10,4 %	1,6 %	7
	LM22A-4 10 nM	16,1 %	0,5 % (range)	2
	LM22A-4 100 nM	10,6 %	0,2 % (range)	2
	LM22A-4 1000 nM	9,2 %	-	1
3.4 C	Kontroll	1,153	0,06	11
	BDNF 100 ng/ml	1,31	0,04	7
	LM22A-4 10 nM	1,12	0,09 (range)	2
	LM22A-4 100 nM	1,22	0,010 (range)	2
	LM22A-4 1000 nM	1,16	-	1
3.4 D	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	BDNF 100 ng/ml	1,9 %	0,5 %	7
	LM22A-4 10 nM	3,2 %	3,3 % (range)	2
	LM22A-4 100 nM	3,7 %	4,3 % (range)	2
	LM22A-4 1000 nM	1,6 %	-	1

Tallmateriale for figur 3.5

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.5 A	Kontroll	34,77	2,880	11
	NGF 50 ng/ml	24,22	2,168	11
	NGF+GW 0,1µM	24,76	5,071	3
	NGF+GW 1 µM	30,13	6,537	3
	NGF+GW 10 µM	33,4	2,807	4
3.5 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	NGF 50 ng/ml	28,2 %	2,8 %	11
	NGF+GW 0,1µM	29,0 %	1,3 %	3
	NGF+GW 1 µM	28,1 %	5,2 %	3
	NGF+GW 10 µM	14,1 %	3,0 %	4
3.5 C	Kontroll	1,15	0,062	11
	NGF 50 ng/ml	1,43	0,072	11
	NGF+GW 0,1µM	1,42	0,060	3
	NGF+GW 1 µM	1,61	0,202	3
	NGF+GW 10 µM	1,50	0,057	4
3.5 D	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	NGF 50 ng/ml	3,5 %	0,9 %	11
	NGF+GW 0,1µM	2,9 %	2,3 %	3
	NGF+GW 1 µM	2,1 %	1,6 %	3
	NGF+GW 10 µM	0,1 %	0,1 %	4
3.5 E	Kontroll	1,32	0,492	3
	NGF 50 ng/ml	3,13	0,640	11
	NGF+GW 0,1µM	2,87	3,489 (range)	2
	NGF+GW 1 µM	2,69	1,182	3
	NGF+GW 10 µM	0,467	-	1
3.5 F	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	NGF 50 ng/ml	10,9 %	7,0 %	11
	NGF+GW 0,1µM	2,9 %	0,7 %	3
	NGF+GW 1 µM	1,1 %	0,6 %	3
	NGF+GW 10 µM	0,5 %	0,5 %	4

Tallmateriale for figur 3.6

Figur 3.6	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.6 A	Kontroll	34,77	2,880	11
	NGF 50 ng/ml	24,22	2,168	11
	GW 10 µM	43,9	7,0216	3
3.6 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	NGF 50 ng/ml	28,2 %	2,8 %	11
	GW 10 µM	7,0 %	0,8 %	3
3.6 C	Kontroll	1,153	0,0629	11
	NGF 50 ng/ml	1,431	0,0723	11
	GW 10 µM	1,291	0,0404	3

Tallmateriale for figur 3.7

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.7 A	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	BDNF 100 ng/ml	10,4 %	1,6 %	7
	BDNF + GW 0,1 µM	12,2 %	5,4 %	3
	BDNF + GW 1 µM	9,3 %	1,4 %	3
	BDNF + GW 10 µM	10,6 %	3,7 %	3
3.7 B	Kontroll	1,153904139	0,062990612	11
	BDNF 100 ng/ml	1,313378685	0,042774468	7
	BDNF + GW 0,1 µM	1,212354497	0,113309936	3
	BDNF + GW 1 µM	1,23912037	0,105329813	3
	BDNF + GW 10 µM	1,107531913	0,068901259	3
3.7 C	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	BDNF 100 ng/ml	1,9 %	0,5 %	7
	BDNF + GW 0,1 µM	1,9 %	0,3 %	3
	BDNF + GW 1 µM	1,5 %	0,8 %	3
	BDNF + GW 10 µM	1,3 %	0,9 %	3

Tallmateriale for figur 3.8

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.8 A	Kontroll	34,77	2,880	11
	BDNF 100 ng/ml	42,21	4,073	7
	BDNF + ANA 0,1 μ M	38,96	4,718	3
	BDNF + ANA 1 μ M	41,82	3,988	5
	BDNF + ANA 10 μ M	38,18	4,144	5
3.8 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	BDNF 100 ng/ml	10,4 %	1,6 %	7
	BDNF + ANA 0,1 μ M	6,8 %	1,9 %	3
	BDNF + ANA 1 μ M	11,7 %	1,6 %	5
	BDNF + ANA 10 μ M	11,3 %	0,8 %	5
3.8 C	Kontroll	1,15	0,062	11
	BDNF 100 ng/ml	1,31	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
3.8 D	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	BDNF 100 ng/ml	1,9 %	0,5 %	7
	BDNF + ANA 0,1 μ M	1,7 %	1,1 %	3
	BDNF + ANA 1 μ M	2,2 %	0,6 %	5
	BDNF + ANA 10 μ M	2,2 %	0,7 %	5
3.8 E	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	BDNF 100 ng/ml	0,1 %	0,1 %	7
	BDNF + ANA 0,1 μ M	0,0 %	0,0 %	3
	BDNF + ANA 1 μ M	0,0 %	0,0 %	5
	BDNF + ANA 10 μ M	0,4 %	0,2 %	5

Tallmateriale for figur 3.9

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.9 A	Kontroll	34,77	2,88	11
	NGF 50 ng/ml	24,22	2,16	11
	NGF+ANA 0,1 μ M	26,85	7,281	3
	NGF+ANA 1 μ M	29,2	4,099	5
	NGF+ANA 10 μ M	27,22	3,307	5
3.9 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	NGF 50 ng/ml	28,2 %	2,8 %	11
	NGF+ANA 0,1 μ M	62,7 %	36,6 %	3
	NGF+ANA 1 μ M	29,2 %	3,6 %	5

	NGF+ANA 10 µM	33,8 %	3,9 %	5
3.9 C	Kontroll	1,153	0,0629	11
	NGF 50 ng/ml	1,431	0,0723	11
	NGF+ANA 0,1 µM	1,315	0,0482	3
	NGF+ANA 1 µM	1,485	0,0513	5
	NGF+ANA 10 µM	1,534	0,0361	5
3.9 D	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	NGF 50 ng/ml	3,5 %	0,9 %	11
	NGF+ANA 0,1 µM	4,2 %	1,7 %	3
	NGF+ANA 1 µM	3,5 %	0,9 %	5
	NGF+ANA 10 µM	3,8 %	0,5 %	5
3.9 E	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	NGF 50 ng/ml	10,9 %	7,0 %	11
	NGF+ANA 0,1 µM	4,7 %	2,2 %	3
	NGF+ANA 1 µM	3,4 %	1,4 %	5
	NGF+ANA 10 µM	3,6 %	1,1 %	5

Tallmateriale for figur 3.10

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.10 A	Kontroll	34,77	2,880	11
	NGF 50 ng/ml	24,22	2,168	11
	ANA 10 µM	39,25	3.17 (range)	2
3.10 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	NGF 50 ng/ml	28,2 %	2,8 %	11
	ANA 10 µM	10,7 %	12.2 % (range)	2
3.10 C	Kontroll	1,153	0,062	11
	NGF 50 ng/ml	1,431	0,072	11
	ANA 10 µM	1,309	0,158 (range)	2
3.10 D	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	NGF 50 ng/ml	3,5 %	0,8 %	11
	ANA 10 µM	2,8 %	0,6 % (range)	2
3.10 E	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	NGF 50 ng/ml	10,9 %	7,0 %	11
	ANA 10 µM	0,2 %	0,5 % (range)	2

Tallmateriale for figur 3.11

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.11 A	Kontroll	34,77	2,88	11
	LTG 500 µM	11,85	1,584	6
3.11 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	LTG 500 µM	35,9 %	3,7 %	6
3.11 C	Kontroll	1,153	0,062	11
	LTG 500 µM	1,316	0,043	6
3.11 D	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	LTG 500 µM	1,4 %	1,2 %	6
3.11 E	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	LTG 500 µM	5,7 %	2,0 %	6
3.11 F	Kontroll	1,323	0,492	3
	LTG 500 µM	4,177	0,825	5
3.11 G	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	LTG 500 µM	22,7 %	2,4 %	6

Tallmateriale for figur 3.12

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.12 A	Kontroll	34,772	2,880	11
	LTG 500 µM	11,854	1,584	6
	LTG + GW 10 µM	7,45	2,354	4
3.12 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	LTG 500 µM	35,9 %	3,7 %	6
	LTG + GW 10 µM	6,5 %	3,0 %	4
3.12 C	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	LTG 500 µM	5,7 %	2,0 %	6
	LTG + GW 10 µM	0,4 %	0,4 %	4
3.12 D	Kontroll	1,3236	0,4922	3
	LTG 500 µM	4,1776	0,8257	5
	LTG + GW 10 µM	2,2091	-	1
3.12 E	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	LTG 500 µM	22,7 %	2,4 %	6
	LTG + GW 10 µM	6,1 %	2,5 %	4

Tallmateriale for figur 3.13

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.13 A	Kontroll	34,77	2,880	11
	LTG 500 µM	11,85	1,584	6
	LTG + BDNF	17,7	5,776	3
	LTG + ANA 10 µM	13,56	4,298	3
3.13 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	LTG 500 µM	35,9 %	3,7 %	6
	LTG + BDNF	31,1 %	2,9 %	3
	LTG + ANA 10 µM	22,0 %	9,2 %	3
3.13 C	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	LTG 500 µM	1,3 %	2,0 %	6
	LTG + BDNF	3,0 %	0,4 %	3
	LTG + ANA 10 µM	2,4 %	2,4 %	3
3.13 D	Kontroll	1,323	0,492	3
	LTG 500 µM	4,177	0,825	5
	LTG + BDNF	3,823	1,349	3
	LTG + ANA 10 µM	7,581	-	1
3.13 E	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	LTG 500 µM	22,7 %	2,4 %	6
	LTG + BDNF	13,8 %	2,1 %	3
	LTG + ANA 10 µM	11,7 %	4,2 %	3

Tallmateriale for figur 3.14

Figur	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.14 A	Kontroll	34,77	2,880	11
	VPA 500 μ M	28,55	2,486	4
3.14 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	VPA 500 μ M	19,4 %	3,4 %	4
3.14 C	Kontroll	1,153	0,062	11
	VPA 500 μ M	1,231	0,028	4
3.14 D	Kontroll	1,6 %	0,4 %	11
	VPA 500 μ M	0,3 %	0,1 %	4
3.14 E	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	VPA 500 μ M	1,3 %	0,5 %	4
3.14 F	Kontroll	1,323	0,492	3
	VPA 500 μ M	2,875	1,080	4
3.14 G	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	VPA 500 μ M	4,2 %	1,7 %	4

Tallmateriale for figur 3.15

Figur	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.15 A	Kontroll	34,77	2,88	11
	VPA 500 μ M	28,55	2,48	4
	VPA + GW 10 μ M	18,35	2,73	4
3.15 B	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	VPA 500 μ M	19,4 %	3,4 %	4
	VPA + GW 10 μ M	28,0 %	4,8 %	4
3.15 C	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	VPA 500 μ M	1,3 %	0,5 %	4
	VPA + GW 10 μ M	4,8 %	2,5 %	4
3.15 D	Kontroll	1,32	0,49	3
	VPA 500 μ M	2,87	1,08	4
	VPA + GW 10 μ M	4,23	1,26	4
3.15 E	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	VPA 500 μ M	4,2 %	1,7 %	4
	VPA + GW 10 μ M	6,0 %	2,0 %	4

Tallmateriale for figur 3.16

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.16 A	Kontroll	9,8 %	0,7 %	11
	VPA 500 µM	19,4 %	3,4 %	4
	VPA + BDNF	19,2 %	4,5 %	3
	VPA + ANA 10 µM	26,3 %	1,3 %	3
3.16 B	Kontroll	0,1 %	0,1 %	11
	VPA 500 µM	1,3 %	0,5 %	4
	VPA + BDNF	2,1 %	1,2 %	3
	VPA + ANA 10 µM	2,7 %	0,9 %	3
3.16 C	Kontroll	1,3236	0,4922	3
	VPA 500 µM	2,8758	1,0809	4
	VPA + BDNF	4,5379	0,4117	3
	VPA + ANA 10 µM	2,8911	0,5524	3
3.16 D	Kontroll	1,2 %	0,9 %	11
	VPA 500 µM	4,2 %	1,7 %	4
	VPA + BDNF	4,3 %	0,8 %	3
	VPA + ANA 10 µM	5,7 %	1,4 %	3

Tallmateriale for figur 3.17

Figur 3.17	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.17 A	UBH	1,00	0,00000	3
	NGF	7,73	3,78617	3
	LTG 50 µM	1,45	0,63822	3
	LTG 50 µM + NGF	7,70	4,36271	3
	LTG 500 µM	1,36	0,87865	3
	LTG 500 µM + NGF	2,78	1,17620	3
3.17 B	UBH	1,00	0,00000	3
	NGF	6,91	3,31317	3
	LTG 50 µM	1,22	0,51180	3
	LTG 50 µM + NGF	4,41	2,48626	3
	LTG 500 µM	0,079	0,03629	3
	LTG 500 µM + NGF	1,44	0,86918	3
	LTG 1000 µM	0,03	0,02606	3
	LTG 1000 µM + NGF	0,54	0,49028	3
3.17 C	UBH	1,00	0,00000	4
	NGF	4,85	1,61151	4
	LTG 50 µM	1,06	0,32733	4
	LTG 50 µM + NGF	4,61	2,36436	4
	LTG 500 µM	0,53	0,14534	3
	LTG 500 µM + NGF	4,47	2,51314	3
	LTG 1000 µM	0,46	0,13369	3
	LTG 10000 µM + NGF	1,22	0,26398	3

Tallmateriale for figur 3.18

Figur 3.18	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.18 A	UBH	1,00000	0,00000	3
	NGF	7,73444	3,78617	3
	VPA 50 μ M	1,32584	0,93512	3
	VPA 50 μ M + NGF	8,39865	7,29677	3
	VPA 500 μ M	3,74307	3,41426	3
	VPA 500 μ M + NGF	10,86712	9,14922	3
	VPA 1000 μ M	10,86524	11,5 (range)	2
	VPA 1000 μ M + NGF	34,63518	37,3 (range)	2
3.18 B	UBH	1,00000	0,00000	3
	NGF	6,91142	3,31317	3
	VPA 50 μ M	0,26745	0,5 (range)	2
	VPA 50 μ M + NGF	1,08419	0,52935	3
	VPA 500 μ M	0,53967	0,45979	3
	VPA 500 μ M + NGF	3,47699	1,67086	3
	VPA 1000 μ M	4,01447	2,58459	3
	VPA 1000 μ M + NGF	11,42119	6,61288	3
3.18 C	UBH	1,00000	0,00000	3
	NGF	3,20965	0,45511	3
	VPA 50 μ M	0,57009	0,20862	3
	VPA 50 μ M + NGF	1,32423	0,60097	3
	VPA 500 μ M	0,56611	0,28678	3
	VPA 500 μ M + NGF	2,86901	1,26296	3
	VPA 1000 μ M	0,93408	0,54029	3
	VPA 1000 μ M + NGF	4,26147	3,01962	3

Tallmateriale for figur 3.19

Figur	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.19 A	UBH	1,00000	0,00000	3
	NGF	7,734443068	3,78617	3
	UBH	1,00000	0,00000	3
	NGF	6,911419901	3,31317	3
	UBH	1,00000	0,00000	4
	NGF	4,859146563	1,61151	4
	LTG 50 μ M	1,453901824	0,63822	3
	LTG 50 μ M + NGF	7,700731496	4,36271	3
	LTG 50 μ M	1,226390657	0,51180	3
	LTG 50 μ M + NGF	4,418968233	2,48626	3
	LTG 50 μ M	1,068211207	0,32733	4
	LTG 50 μ M + NGF	4,611868432	2,36436	4
	LTG 500 μ M	1,365743387	0,87865	3
	LTG 500 μ M + NGF	2,782080741	1,17620	3
	LTG 500 μ M	0,07927788	0,03629	3
	LTG 500 μ M + NGF	1,446284814	0,86918	3
	LTG 500 μ M	0,539985085	0,14534	3
	LTG 500 μ M + NGF	4,474047963	2,51314	3
	LTG 1000 μ M	0,034883891	0,02606	3
	LTG 1000 μ M + NGF	0,543406181	0,49028	3
LTG 1000 μ M	0,462803019	0,13369	3	
LTG 10000 μ M + NGF	1,225538453	0,26398	3	
3.19 B	UBH	1,00000	0,00000	3
	NGF	7,73444	3,78617	3
	UBH	1,00000	0,00000	3
	NGF	6,91142	3,31317	3
	UBH	1,00000	0,00000	3
	NGF	3,20965	0,45511	3
	VPA 50 μ M	1,32584	0,93512	3
	VPA 50 μ M + NGF	8,39865	7,29677	3
	VPA 50 μ M	0,26745	0,5 (range)	2
	VPA 50 μ M + NGF	1,08419	0,52935	3
	VPA 50 μ M	0,57009	0,20862	3
	VPA 50 μ M + NGF	1,32423	0,60097	3
	VPA 500 μ M	3,74307	3,41426	3
	VPA 500 μ M + NGF	10,86712	9,14922	3
	VPA 500 μ M	0,53967	0,45979	3

VPA 500 μ M + NGF	3,47699	1,67086	3
VPA 500 μ M	0,56611	0,28678	3
VPA 500 μ M + NGF	2,86901	1,26296	3
VPA 1000 μ M	10,86524	11,5 (range)	2
VPA 1000 μ M + NGF	34,63518	37,5 (range)	2
VPA 1000 μ M	4,01447	2,58459	3
VPA 1000 μ M + NGF	11,42119	6,61288	3
VPA 1000 μ M	0,93408	0,54029	3
VPA 1000 μ M + NGF	4,26147	3,01962	3

Tallmateriale for figur 3.20

Figur 3.20	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.20 A	UBH	1	0	4
	NGF	5,02098047	1,56685647	4
	LTG 50 µM	1,06448446	0,46288358	3
	LTG 50 µM + NGF	5,82531001	2,86975925	3
	LTG 500 µM	0,60981952	0,4415 (range)	2
	LTG 500 µM + NGF	6,41997442	5,509 (range)	2
	LTG 1000 µM	0,33593065	0,1459 (range)	2
	LTG 1000 µM + NGF	1,06966399	0,738024 (range)	2
3.20 B	UBH	1	-	1
	NGF	3,040442338	-	1
	LTG 50 µM	1,179657186	-	1
	LTG 50 µM + NGF	1,061791354	-	1
	LTG 500 µM	0,437501988	-	1
	LTG 500 µM + NGF	0,640271174	-	1
	LTG 1000 µM	0,783108581	-	1
	LTG 1000 µM + NGF	1,680087542	-	1
3.20 C	UBH	1	0	4
	NGF	5,02098047	1,56685647	4
	VPA 50 µM	0,70986575	0,5365 (range)	2
	VPA 50 µM + NGF	1,91154424	0,44139 (range)	2
	VPA 500 µM	0,702829	0,87326 (range)	2
	VPA 500 µM + NGF	4,01697247	1,82402 (range)	2
	VPA 1000 µM	1,19270191	0,8500 (range)	2
	VPA 1000 µM + NGF	6,01781724	8,5088 (range)	2
3.20 D	UBH	1	-	1
	NGF	3,040442338	-	1
	VPA 50 µM	0,33364929	-	1
	VPA 50 µM + NGF	0,18878357	-	1
	VPA 500 µM	0,32983009	-	1
	VPA 500 µM + NGF	1,67161456	-	1
	VPA 1000 µM	1,51311783	-	1
	VPA 1000 µM + NGF	0,46425814	-	1

Tallmateriale for figur 3.21

Figur 3.21	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.21 A	UBH	1	0	4
	NGF	5,02098047	1,56685647	4
	UBH	1	-	1
	NGF	3,040442338	-	1
	LTG 50 µM	1,06448446	0,46288358	3
	LTG 50 µM + NGF	5,82531001	2,86975925	3
	LTG 50 µM	1,179657186	-	1
	LTG 50 µM + NGF	1,061791354	-	1
	LTG 500 µM	0,60981952	0,4415 (range)	2
	LTG 500 µM + NGF	6,41997442	5,509 (range)	2
	LTG 500 µM	0,437501988	-	1
	LTG 500 µM + NGF	0,640271174	-	1
	LTG 1000 µM	0,33593065	0,1459 (range)	2
	LTG 1000 µM + NGF	1,06966399	0,738024 (range)	2
	LTG 1000 µM	0,783108581	-	1
	LTG 1000 µM + NGF	1,680087542	-	1
3.21 B	UBH	1	0	4
	NGF	5,02098047	1,56685647	4
	UBH	1	-	1
	NGF	3,040442338	-	1
	VPA 50 µM	0,70986575	0,5365 (range)	2
	VPA 50 µM + NGF	1,91154424	0,44139 (range)	2
	VPA 50 µM	0,33364929	-	1
	VPA 50 µM + NGF	0,18878357	-	1
	VPA 500 µM	0,702829	0,87326 (range)	2
	VPA 500 µM + NGF	4,01697247	1,82402 (range)	2
	VPA 500 µM	0,32983009	-	1
	VPA 500 µM + NGF	1,67161456	-	1
	VPA 1000 µM	1,19270191	0,8500 (range)	2
	VPA 1000 µM + NGF	6,01781724	8,5088 (range)	2
	VPA 1000 µM	1,51311783	-	1
	VPA 1000 µM + NGF	0,46425814	-	1

Tallmateriale for figur 3.22

Figur 3.22	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.22 A	UBH	1	0	3
	NGF	7,69969991	3,29840733	3
	LTG 50uM	0,81736605	0,01714876	3
	LTG 50uM + NGF	7,1953157	3,97202182	3
	LTG 500uM	0,38659477	0,0804033	3
	LTG 500uM + NGF	5,35772499	3,76741618	3
	3.22 B	UBH	1	0
NGF		2,08681671	1,11849376	3
LTG 50uM		1,14552876	0,71234758	3
LTG 50uM + NGF		1,33496902	0,57511785	3
LTG 500uM		0,76383247	0,43011053	3
LTG 500uM + NGF		1,81074835	0,77409733	3

Tallmateriale for figur 3.23

Figur 3.23	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.23 A	UBH	1	0	3
	NGF	7,69969991	3,29840733	3
	VPA 50uM	1,01162004	0,02055787	3
	VPA 50uM + NGF	6,61675314	3,14463127	3
	VPA 500uM	1,52174733	0,22090687	3
	VPA 500uM + NGF	6,52479223	1,5302247	3
	VPA 1000uM	1,84614395	0,6804 (range)	2
	VPA 1000uM + NGF	6,72371887	01,3242 (range)	2
3.23 B	UBH	1	0	3
	NGF	2,08681671	1,11849376	3
	VPA 50uM	1,99877084	0,96501762	3
	VPA 50uM + NGF	6,05481202	3,249694	3
	VPA 500uM	3,03635884	1,48465549	3
	VPA 500uM + NGF	2,90611204	1,87509484	3
	VPA 1000uM	0,21591876	0,1732 (range)	2
	VPA 1000uM + NGF	0,28796471	0,3484 (range)	2

Tallmateriale for tabell 3.24

Figur 3.24	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.24 A	UBH	1	0	3
	NGF	8,26821874	3,31573633	3
	LTG 50 µM	0,87414124	0,23281614	3
	LTG 50 µM + NGF	9,97864826	4,9578689	3
	LTG 500 µM	0,23871218	0,05115209	3
	LTG 500 µM + NGF	2,35693453	1,01253074	3
	LTG 1000 µM	0,13992796	0,04630705	3
	LTG 1000 µM + NGF	0,1204594	0,00934829	2
3.24 B	UBH	1	0	3
	NGF	1,49393178	0,43886503	3
	LTG 50 µM	1,98526034	1,57160815	3
	LTG 50 µM + NGF	22,8240267	21,9976657	3
	LTG 500 µM	5,17687145	2,52582568	3
	LTG 500 µM + NGF	4,62420533	3,91106326	3
	LTG 1000 µM	19,706087	16,6421562	3
	LTG 1000 µM + NGF	6,35492398	5,19165274	2

Tallmateriale for tabell 2.25

Figur 3.25	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.25 A	UBH	1	0	3
	NGF	8,26821874	3,31573633	3
	VPA 50 µM	1,20442272	0,32330026	3
	VPA 50 µM + NGF	9,89697384	2,9978023	3
	VPA 500 µM	3,718821	0,59622875	3
	VPA 500 µM + NGF	16,1894046	3,9425199	3
	VPA 1000 µM	5,65650132	1,19033229	3
	VPA 1000 µM + NGF	23,9780239	14,9943423	3
3.25 B	UBH	1	0	2
	NGF	1,15817293	0,97899 (range)	2
	VPA 50 µM	1,74384534	0	1
	VPA 50 µM + NGF	2,13192752	1,0326 (range)	2
	VPA 500 µM	3,5841735	2,0248 (range)	2
	VPA 500 µM + NGF	1,32860263	1,2715 (range)	2
	VPA 1000 µM	0,41782801	0,300 (range)	2
	VPA 1000 µM + NGF	0,25767813	0,0859 (range)	2

Tallmateriale for figur 3.26

Figur 3.26	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.26 A	Ubehandlet	1	0	3
	LTG 50 µM	302,3922928	191,510799	3
	LTG 500 µM	34,75780345	31,4152425	3
	LTG 1000 µM	45,47365829	39,4300836	3
3.26 B	Ubehandlet	1	0	3
	LTG 50 µM	0,566664509	0,257546998	3
	LTG 500 µM	0,27557181	0,191968418	3
	LTG 1000 µM	0,65419016	0,580392345	3
3.26 C	Ubehandlet	1	0	3
	LTG 50 µM	1867,213783	1491,139576	3
	LTG 500 µM	71,33084496	39,4998393	3
	LTG 1000 µM	63,98212973	12,47358463	3
3.26 D	Ubehandlet	1	0	3
	LTG 500 µM	71,33084496	39,4998393	3
	LTG 1000 µM	63,98212973	12,4735846	3

Tallmateriale for figur 3.27

Figur 3.27	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.27 A	Ubehandlet	1	0	3
	VPA 50 µM	256,6527203	110,886853	3
	VPA 500 µM	57,51094294	21,344609	3
	VPA 1000 µM	129,854551	54,1310769	3
3.27 B	Ubehandlet	1	0	3
	VPA 50 µM	0,291984463	0,159816076	3
	VPA 500 µM	0,964953386	0,320621714	3
	VPA 1000 µM	2,172742009	1,499189488	3
3.27 C	Ubehandlet	1	0	3
	VPA 50 µM	15774,55123	15440,4575	3
	VPA 500 µM	75,27529305	42,1312799	3
	VPA 1000 µM	116,4803117	43,4495606	3
3.27 D	Ubehandlet	1	0	3
	VPA 500 µM	75,27529305	42,1312799	3
	VPA 1000 µM	116,4803117	43,4495606	3

Tallmateriale for figur 3.28				
Figur 3.28	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.28 A	UBH	1	0	3
	NGF	3,78949185	0,9379571	3
	LTG 50 µM	0,7516122	0,06221896	3
	LTG 50 µM + NGF	3,71021313	0,50988455	3
	LTG 500 µM	0,17373411	0,03016857	3
	LTG 500 µM + NGF	2,01501261	0,47264384	3
	LTG 1000 µM	0,02598747	0,00357226	3
	LTG 1000 µM + NGF	0,22485075	0,06771086	3
3.28 B	UBH	1	0	3
	NGF	0,98619693	0,34211447	3
	LTG 50 µM	1,22396629	0,5356443	3
	LTG 50 µM + NGF	2,28159046	1,25618058	3
	LTG 500 µM	0,47782179	0,19207129	3
	LTG 500 µM + NGF	2,52749802	2,25528396	3
	LTG 1000 µM	0,06972573	0,00864041	3
	LTG 1000 µM + NGF	0,20957891	0,05413445	3

Tallmateriale for figur 3.29				
Figur 3.29	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.29 A	UBH	1	0	3
	NGF	4,43349328	1,09711262	3
	VPA 50 µM	1,3999665	0,11643755	3
	VPA 50 µM + NGF	4,71785685	0,99727551	3
	VPA 500 µM	3,06570565	0,70055068	3
	VPA 500 µM + NGF	7,12557029	0,96037843	3
	VPA 1000 µM	5,13054794	1,30462778	3
	VPA 1000 µM + NGF	8,29842867	1,52336999	3
3.29 B	UBH	1	0	3
	NGF	1,68710887	0,59394089	3
	VPA 50 µM	3,67934505	1,38178823	3
	VPA 50 µM + NGF	2,03013732	1,02014 (range)	2
	VPA 500 µM	9,30044068	3,78538253	3
	VPA 500 µM + NGF	7,48052037	5,52802276	3
	VPA 1000 µM	6,05430684	0,90906017	3
	VPA 1000 µM + NGF	3,9354113	2,0517352	3

Tallmateriale for figur 3.30

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Kontroll	72	6,6 %	0,986952458	6
NGF	72	5,5 %	1,114120012	6
LTG 50 μ M	72	3,7 %	0,559814326	6
LTG 50 μ M + NGF	72	5,2 %	1,571858708	6
LTG 500 μ M	72	6,1 %	4,160426774	6
LTG 500 μ M + NGF	72	7,7 %	3,516404977	6
LTG 1000 μ M	72	81,9 %	23,59310608	6
LTG 1000 μ M + NGF	72	49,1 %	20,66501413	6

Tallmateriale for figur 3.31

Eksponering	Eksponerings- tid (t)	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Kontroll	72	6,6 %	0,986952458	3
NGF	72	5,5 %	1,114120012	3
VPA 1000 μ M	72	1,5 %	0,288303201	3
VPA 1000 μ M + NGF	72	1,0 %	0,465738669	3

Tallmateriale for figur 3.33

Figur 3.33	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.33 A	Kontroll	1	0	3
	NGF	0,81027046	0,136350074	3
	LTG 500 μ M	0,911656845	0,2654838	3
	LTG 500 μ M + NGF	0,441197066	0,217614717	3
	LTG 50 μ M	0,967596508	0,670554291	3
	LTG 50 μ M + NGF	0,454419609	0,338990414	3
3.33 B	Kontroll	1	-	1
	NGF	1,004619488	-	1
	LTG 500 μ M	1,82470263	-	1
	LTG 500 μ M + NGF	2,336765777	-	1
	LTG 50 μ M	6,809138287	-	1
	LTG 50 μ M + NGF	1,268304129	-	1
3.33 C	Kontroll	1	0	3
	NGF	0,866008859	0,297645598	3
	LTG 500 μ M	0,498002758	0,173858588	3
	LTG 500 μ M + NGF	0,716583835	0,56193 (range)	2
	LTG 50 μ M	0,682430382	0,73742 (range)	2
	LTG 50 μ M + NGF	0,574367119	0,6301 (range)	2
3.33 D	Kontroll	1	-	1
	NGF	0,773592934	-	1
	LTG 500 μ M	1,038037241	-	1
	LTG 500 μ M + NGF	2,708627979	-	1
	LTG 50 μ M	3,107193963	-	1
	LTG 50 μ M + NGF	0,997730471	-	1

Tallmateriale for figur 3.35

Figur 3.35	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.35 A	Kontroll	1	0	4
	NGF	0,802357686	0,122147013	4
	VPA 50 µM	1,061137082	0,169533204	3
	VPA 50 µM + NGF	1,320564921	0,454228471	3
	VPA 500 µM	1,100236956	0,407502926	3
	VPA 500 µM + NGF	0,921830118	0,349778194	3
	VPA 1000 µM	1,067788154	0,27473828	4
	VPA 1000uM + NGF	0,877168893	0,296104198	4
3.35 B	Kontroll	1	0 (range)	2
	NGF	0,799290892	0,0848 (range)	2
	VPA 50 µM	0,655699645	0,0597 (range)	2
	VPA 50 µM + NGF	0,54466824	0,05914 (range)	2
	VPA 500 µM	0,49345912	0,3339 (range)	2
	VPA 500 µM + NGF	0,503783701	0,4079 (range)	2
	VPA 1000 µM	0,623220041	0,6519 (range)	2
	VPA 1000uM + NGF	0,642521625	0,9896 (range)	2
3.35 C	Kontroll	1	0	4
	NGF	0,902773988	0,048031652	4
	VPA 50 µM	1,338818133	0,370061145	3
	VPA 50 µM + NGF	1,500825516	0,890407011	3
	VPA 500 µM	1,212886178	0,649998464	3
	VPA 500 µM + NGF	1,080220756	0,68567531	3
	VPA 1000 µM	1,190382122	0,327004292	4
	VPA 1000uM + NGF	0,890080211	0,302230226	4
3.35 D	Kontroll	1	0 (range)	2
	NGF	0,790616208	0,31220 (range)	2
	VPA 50 µM	0,6655478	0,113952 (range)	2
	VPA 50 µM + NGF	0,285149319	0,229976 (range)	2
	VPA 500 µM	0,340497629	0,144050 (range)	2
	VPA 500 µM + NGF	0,234628065	0,17956(range)	2
	VPA 1000 µM	0,569745452	0,30809 (range)	2
	VPA 1000uM + NGF	0,43006799	0,525603 (range)	2