

# Caspase-3-avhengig celledød i PC12-celler og kyllingkornceller

Markus Henriksen Bjørdal



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15.juni 2010

## FORORD

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, i perioden juni 2009-juni 2010, som et ledd i graden Master i farmasi.

Jeg ønsker å rette en stor takk til min hovedveileder Ragnhild E. Paulsen for all god veiledning, inspirasjon, konstruktive kritikk og motivasjon. Dette hadde ikke gått uten deg. En stor takk rettes også til medveileder Karen Boldingh Debernard for god veiledning, innspill og tilbakemeldinger under arbeidet.

Jeg vil i tillegg takke resten av forskningsgruppen, Gulzeb Aziz, Bjørn Oddvar Strøm, Gro Mathisen, Mona Gaarder, og Petra Aden for god hjelp, opplæring og motivasjon i forskning- og labjungelens tidvis forvirrende og frustrerende univers. Her hadde jeg ikke overlevd uten dere alle.

Jeg vil også takke medstudentene Line Kvaale Moe og Julie Eriksen for godt samarbeid på laben, faglige diskusjoner og sosialt samvær på lesesalen.

Til slutt vil jeg takke min familie for all støtte og tålmodighet med en sønn og bror under denne hektiske perioden.

Oslo, juni 2010

Markus Henriksen Bjørdal

## SAMMENDRAG

Menneskekroppen har gjennom evolusjon utviklet genetisk programmerte metoder for å vedlikeholde cellepopulasjonen og opprettholde optimal organfunksjon. Apoptose er en form for programmert celledød som har en essensiell rolle i utviklingen og modningen av nervesystemet. Å være eller ikke være for en celle avgjøres av en kompleks samhandling mellom mange proapoptotiske og antiapoptotiske faktorer og signalveier. Ubalanser i denne reguleringen kan gi abnorm celleproliferasjon eller tap av funksjonelt viktige celler. Mange neurodegenerative sykdommer er et resultat av en slik ubalanse. Bedre kunnskap om mekanismene som regulerer apoptose og de signalveiene som beskytter mot denne typen celledød, kan gjøre det mulig å utvikle legemidler som griper inn i den apoptotiske prosessen.

Apoptose medieres av caspasene, en gruppe proteaser, som gir celledød ved å kløyve en rekke intracellulære substrater. Vekstfaktorene NGF og EGF kan fremme celleoverlevelse gjennom MEK/ERK-signalveien. I dette arbeidet er det brukt PC12-celler og kyllingkornceller, en type neuroner, for å studere celledød og aktiveringen av caspase-3. Molekylet PAC-1 er rapportert som en direkte caspase-3-aktivator og ble brukt for å induserer celledød i PC12-celler og kyllingkornceller.

PAC-1 induserte noe caspase-3-aktivitet i både PC12-celler og kyllingkornceller. NGF, EGF og caspase-3-inhibitor gav delvis og tidsavhengig beskyttelse mot PAC-1-indusert celledød i begge celletypene. Vekstfaktorer og caspase-3-inhibitor tilsatt 2 timer etter PAC-1-eksponering gav beskyttelse i PC12-celler, mens vekstfaktorer beskyttet kyllingkornceller når de tilsattes umiddelbart og 4 timer etter PAC-1-eksponering. I kyllingkorncellene gav caspase-3-inhibitor først beskyttelse tilsatt 4 timer etter PAC-1-eksponering. PAC-1 induserte dermed en svak og forsinket caspase-3-aktivering, og forårsaket celledød kunne delvis reduseres med vekstfaktorer og caspase-3-inhibitor. Westernblott viste at PAC-1 gav en oppregulering av ERK og nedregulering av P-ERK i kyllingkornceller.

Dette viser at PAC-1 også kan drepe celler uavhengig av direkte caspase-3-aktivering, og flere studier er nødvendig for å fastslå PAC-1's egnethet som caspase-3-aktivator i studier av caspase-3-avhengig neuronal celledød.

---

# INNHold

<b>FORORD</b> .....	<b>2</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>3</b>
<b>INNHold</b> .....	<b>4</b>
<b>FORKORTELSER</b> .....	<b>6</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>8</b>
1.1 CELLEDØD .....	8
1.1.1 <i>Nekrose</i> .....	9
1.1.2 <i>Apoptose</i> .....	9
1.1.3 <i>Apoptose i nervesystemet</i> .....	10
1.2 CASPASENE, EKSEKUTØRER AV APOPTOSE .....	10
1.2.1 <i>Apoptotiske caspaser: initiatorer og effektorer</i> .....	11
1.2.2 <i>Den ytre signalveien aktiverer caspase-8</i> .....	11
1.2.3 <i>Den indre signalveien aktiverer caspase-9</i> .....	12
1.2.4 <i>Caspase-3</i> .....	13
1.3 RAS/RAF/MEK/ERK-SIGNALVEIEN .....	13
1.3.1 <i>Crosstalk mellom MEK/ERK-signalveien og caspasekaskaden</i> .....	15
1.4 PAC-1 INDUSERER APOPTOSE .....	16
1.5 CELLEKULTURER TIL STUDIER AV CELLEDØD .....	17
1.5.1 <i>PC12-celler</i> .....	17
1.5.2 <i>Kyllingkornceller</i> .....	18
1.6 MÅL MED OPPGAVEN .....	18
<b>2. MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>19</b>
2.1 KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER .....	19
2.2 UTSTYR.....	22
2.3 PC12-CELLER .....	23
2.3.1 <i>Splitting av PC12-celler</i> .....	23
2.4 KYLLINGKORNCCELLER .....	25
2.4.1 <i>Poly-lysin-behandling av cellekulturskåler</i> .....	25
2.4.2 <i>Preparering av korncellekulturer fra kylling</i> .....	25
2.5 KVANTIFISERING AV CELLEDØD .....	30
2.5.1 <i>Eksponering av PC12-celler til celledødsforsøk</i> .....	31
2.5.2 <i>Eksponering av kyllingkornceller til celledødsforsøk</i> .....	33

---

2.5.3	<i>Kvantifisering av celledød med trypanblå</i> .....	35
2.6	MÅLING AV CASPASEAKTIVITET I PC12-CELLER .....	36
2.7	WESTERNBLOTT .....	39
2.7.1	<i>Eksponering av kyllingkornceller til analyse med westernblott</i> .....	40
2.7.2	<i>Høsting av kyllingkornceller til westernblott</i> .....	42
2.7.3	<i>Proteinmåling av kyllingkorncelleprøver til westernblott</i> .....	43
2.7.4	<i>Prosedyre for westernblott</i> .....	47
2.8	GRAFER OG STATISTIKK .....	55
<b>3.</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>56</b>
3.1	CELLEDØD I PC12-CELLER EKSPONERT FOR PAC-1 .....	56
3.2	CELLEDØD I KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1 .....	64
3.3	ERK OG P-ERK I KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1 .....	72
3.4	CASPASEAKTIVITET I PC12-CELLER .....	83
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>86</b>
4.1	DISKUSJON AV METODER.....	87
4.1.1	<i>Cellemodeller til studier av celledød</i> .....	87
4.1.2	<i>Metoder for kvantifisering av celledød</i> .....	88
4.1.3	<i>Metoder for å studere proteiner involvert i celledød</i> .....	89
4.2	DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN.....	90
4.2.1	<i>PAC-1-indusert celledød i PC12-celler og kyllingkornceller</i> .....	90
4.2.2	<i>NGF og EGF beskytter mot PAC-1-indusert celledød</i> .....	92
4.2.3	<i>NGF, EGF og MEK/ERK-signalveien</i> .....	93
4.2.4	<i>PAC-1 som verktøy i studier av caspase-3-avhengig neuronal død</i> .....	94
<b>5.</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>REFERANSER</b> .....	<b>97</b>

## FORKORTELSER

Ad	Opp til
Apaf-1	Apoptoseaktiverende falktor-1
ATP	Adenosintrifosfat
Caspase	”Cystein-aspartat-spesific-proteases”
DISC	Dødsinduserende signalkompleks
DMEM	”Dulbeccos Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGF	”Epidermal Growth Factor”
EGTA	Etylenglykoltetraetraeddiksyre
ERK	”Ekstracellular signal-regulated kinase”
FADD	Fas-assosiert dødsdomene
FBS	Føtalt kalveserum
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEK	Mitogen-aktivert protein kinase/ERK kinase

---

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
MQ	MilliQ
NGF	”Nerve Growth Factor”
PAC-1	”Procaspase-activating compound-1”
PBS	Fosfat-bufret saltvann
RIPA	”Radioimmunoprecipitation assay”
ROS	”Reactive okxygen species”
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
SMAC/DIABLO	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low PI
SOS	”Son of Sevenless”
TBS	Tris-Bufret saltvann
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TG	Tris-glysin buffer
TGS	Tris-Glysin-SDS-buffer

# 1. INNLEDNING

Hvert sekund dør millioner av celler i kroppen. I en voksen organisme må ofte hver celleduplikasjon føre til destruksjon av en annen celle. Celledød er en funksjon som gjør kroppen istand til å vedlikeholde cellepopulasjonen og opprettholde optimal organfunksjon. Mange patologiske tilstander skyldes ubalanser i forholdet mellom celledød og celleproliferasjon. En overdreven celleproliferasjon kjennetegner kreftsykdommer, mens tap av spesifikke neuroner i sentralnervesystemet gir neurodegenerative sykdommer. Interessen for å avdekke de molekylære mekanismene bak celledød er stor, siden dette kan hjelpe oss til å forstå hvorfor ubalansen i celledødsmaskineriet skjer, slik at vi kan utvikle terapier for å bremse eller stoppe den patologiske prosessen. Denne oppgaven fokuserer på caspaseaktivert celledød, relatert spesielt til neurodegenerasjon og signalveier.

## 1.1 CELLEDØD

Celledød kan klassifiseres etter det morfologiske utseendet på den dødelige prosessen. Man har tradisjonelt delt celledød inn i apoptose, nekrose og autofagi, men denne generaliseringen viser seg ikke alltid å være helt korrekt, da de ulike typene av celledød kan vise overlappende karakteristika (Galluzzi, Maiuri et al. 2007). Apoptose har lenge vært oppfattet som det vi kaller programmert celledød, regulert av genetisk kontrollerte prosesser nødvendig for organismens overlevelse, selv om apoptose også skjer ved en rekke patologiske prosesser. Nyere studier har vist at nekrose som man trodde var en skadelig og tilfeldig celledød, kan være like regulert som apoptose. Det er også vist at et dødsstimulus som ved lavere dose gir apoptose, kan lede til nekrose ved større doser. I noen tilfeller kan apoptose og nekrose foreligge samtidig i samme celle ved et gitt type dødsstimulus (Nicotera and Melino 2004; Zong and Thompson 2006). Det er en klar crosstalk mellom de ulike typene av celledød, og en celledød avgjøres blant annet av typen og graden av toksisk stimuli, ATP-konsentrasjon, og celletypen (Hotchkiss, Strasser et al. 2009).



---

### 1.1.1 Nekrose

Navnet nekrose kommer fra det greske nekros som betyr lik (Hotchkiss, Strasser et al. 2009). Lenge trodde man at nekrose var en uheldig og ukontrollert type av celledød forårsaket av eksterne årsaker cellen ikke har kontroll over, men nyere forskning har vist at nekrose er en molekylært regulert prosess assosiert med fysiokjemisk stress som hypoksi, iskemi, hypoglykemi, ekstreme temperaturendringer og næringsdeprivasjon (Zong and Thompson 2006; Vanlangenakker, Vanden Berghe et al. 2008). Morfologiske kjennetegn på nekrose er en økning i cellevolum og svelling av celleorganeller på grunn av tapt integritet av plasmamembranen. Det ender med at plasmamembranen sprekker og celleinnholdet lekker ut i omgivelsene og gir lokal inflammasjon (Zong and Thompson 2006; Fulda, Gorman et al. 2010). Celledød med apoptotisk morfologi kan endres til en mer nekrotisk morfologi ved å hemme caspaseaktivering farmakologisk eller ved å eliminere essensielle caspaseaktivatorer som Apaf-1 (se 1.2) (Golstein and Kroemer 2005; Vandenabeele, Vanden Berghe et al. 2006).

### 1.1.2 Apoptose

Uttrykket apoptose er gresk og brukes til å beskrive blader som faller av blomster eller trær. Apoptose er i utgangspunktet et genetisk programmert fenomen, men er vist å kunne initieres eller hemmes av ulike fysiologiske og patologiske stimuli (Kerr, Wyllie et al. 1972). Apoptose kjennetegnes ved kromatinkondensering, nukleær fragmentering, og utposninger av plasma-membranen (Hotchkiss, Strasser et al. 2009). Det ender med at cellen kollapser til flere membrankledde fragmenter eller apoptotiske legemer, som fagocytteres uten inflammatorisk respons (Kerr, Wyllie et al. 1972; Hengartner 2000). Apoptose spiller en viktig rolle i embryonal utvikling og aldring, men kan også initieres av patologiske tilstander og stresstimuli som kjemoterapi og oksidativt stress (Lockshin and Zakeri 2007; Fulda, Gorman et al. 2010). Den veldig regulerte funksjonen av apoptose gjør den til et attraktivt mål for terapeutisk intervensjon (Fulda, Gorman et al. 2010). De fleste av de morfologiske prosessene observert i apoptotiske celler initieres av en familie proteaser kalt caspaser (se 1.2), og apoptose er i dag generelt akseptert som caspaseavhengig programmert celledød, selv om det er eksempler på apoptose uten caspaseaktivering (Hengartner 2000; Fulda, Gorman et al. 2010).

### 1.1.3 Apoptose i nervesystemet

Programmert celledød i form av apoptose er en fysiologisk viktig prosess i neurogenesen under modningen av sentralnervesystemet. Forstyrrelser i apoptosereguleringen og/eller prematur apoptose er trolig en av de patologiske årsakene bak neurodegenerasjon. Tap av spesifikke neuroner gir ulike kroniske sykdomstilstander som Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom, amyotrofisk lateral sklerose, spinal muskulær atrofi og diabetisk encefalopati (Oppenheim 1991; Okouchi, Ekshyyan et al. 2007). Hvor viktig den apoptotiske prosessen er for neurodegenerasjon er uklart, siden mye av bevisene baserer seg på den klassiske definisjonen av apoptose, basert på morfologiske kriterier og biologiske assays, som senere har vist seg å ikke være unike for denne typen celledød (Okouchi, Ekshyyan et al. 2007). Vekstfaktordeprivasjon, glutamat, neurotoksiner, modulatorer av proteinfosforylering og kalsiumhomeostase, DNA-toksiner, oksidativt stress, nitrogenoksid og ceramider er eksempler på apoptoseinduserende agenser (Sastry and Rao 2000).

## 1.2 Caspasene, eksekutører av apoptose

Navnet caspase kommer fra cystein-avhengig aspartatspesifikk protease, som definerer deres spesifisitet for proteinsubstrater som inneholder aspartat, og bruken av cysteinsidekjeden til å katalysere kløyving av peptidbånd (Salvesen and Riedl 2008). Den første identifiserte caspasen var caspase-1 (Thornberry, Bull et al. 1992), og den tilhører hovedgruppen av caspaser som aktiverer cytokiner (Kumar 2007). Den andre hovedgruppen er de apoptotiske caspasene som behandler og utfører dødssignaler (Salvesen and Riedl 2008). I pattedyr er det kjent syv ulike caspaser involvert i apoptose (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). Man trodde første at caspasene hovedsakelig var involvert i apoptose, men nyere forskning har vist essensielle roller for caspaser i blant annet proliferasjon og differensiering av celler (Lamkanfi, Festjens et al. 2007). Dette gjør at terapeutisk hemming av caspaser kan ha større konsekvenser enn først antatt, samt at hemming av caspaser er vist å fremme alternative dødsveier som nekrose (Vandenabeele, Vanden Berghe et al. 2006; Lamkanfi, Festjens et al. 2007). En teori er at funksjoner ikke relatert til celledød var caspasenes opprinnelige

---

oppgave, mens deres dødbringende egenskaper er kommet gjennom evolusjon (Abraham and Shaham 2004; Lamkanfi, Festjens et al. 2007).

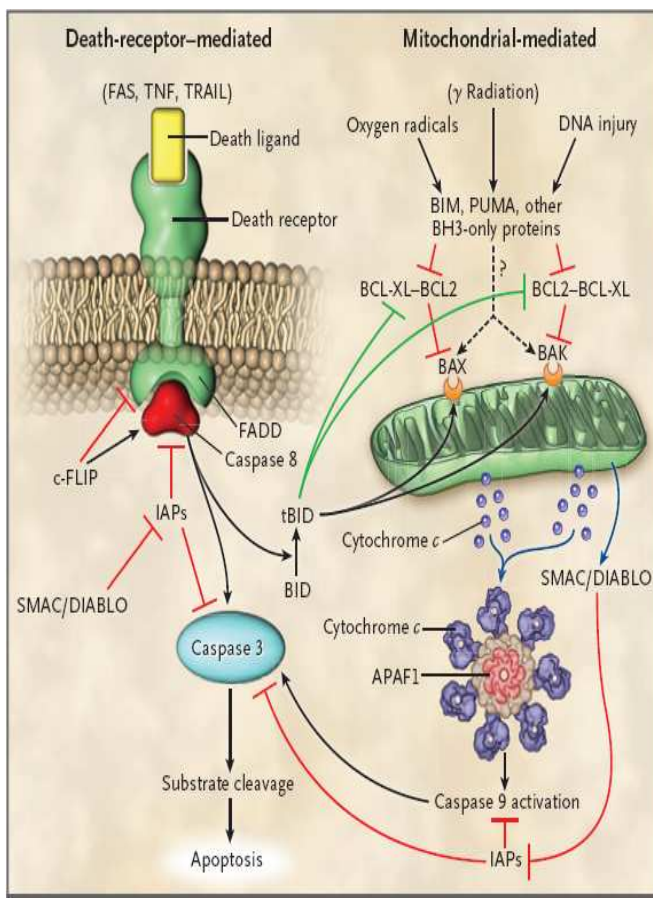
### **1.2.1 Apoptotiske caspaser: initiatorer og effektorer**

De apoptotiske caspasene deles inn i initiatorer og effektorer avhengig av når de aktiveres i den apoptotiske signalveien. Initiatorcaspasene aktiveres av apoptotiske signaler og aktiverer så effektorcaspasene som kløyver intracellulære substrater (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). Det er ikke helt klart hvorfor mennesker og andre avanserte dyr krever to steg for caspaseaktivert apoptose. Antagelig bidrar denne todelingen til ekstra regulering, samt at effektorcaspasene kan ha roller i funksjoner ikke relatert til celledød (Salvesen and Riedl 2008). I de fleste friske celler foreligger caspasene som inaktive forløpere som kalles zymogener eller procaspaser. Et mottatt apoptotisk signal gjør at procaspasene undergår proteolyse og danner to subenheter som utgjør det aktive enzymet. Alle aktiverte caspaser kan detekteres som kløyvde fragmenter i apoptotiske celler. I pattedyr er hovedinitiatorcaspasene caspase-2, -8, -9, og -10. Disse har lange prodomener med spesifikke protein-protein interaksjonsdomener essensielle for aktiveringen av effektorcaspasene. Effektorcaspasene har ingen lange prodomener som tillater selvaktivering, og kan vanligvis kun aktiveres gjennom kløyving av aktiverte initiatorcaspaser. De viktigste effektorcaspasene i mennesker og andre pattedyr er caspase-3, -6, og -7 (Fuentes-Prior and Salvesen 2004; Kumar 2007). Aktiveringen av initiatorcaspasene kan lede til celledød via to konvergerende signalveier, den ytre og den indre (figur 1.1). Det er vist crosstalk mellom disse to signalveiene (Hotchkiss, Strasser et al. 2009).

### **1.2.2 Den ytre signalveien aktiverer caspase-8**

Denne signalveien, også kalt dødsreseptorsignalveien, starter med stimuleringen av transmembrane dødsreseptorer av spesifikke ligander utskilt av andre celler (se figur 1.1). Det er foreløpig kjent seks dødsreseptorer, TNF reseptor-1, Fas, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 og DR6. Ved ligandbinding bindes de intracellulære domenene av reseptoren (DD) til adaptorproteinet Fas-assosiert dødsdomene (FADD) eller TNFR1-assosiert dødsdomene (TRADD), og danner dødsinduserende kompleks (DISC) som rekrutterer og aktiverer initiatorcaspasene procaspase-8 og/eller -10. Procaspase-8 aktiveres proteolytisk og aktiverer

effektorcaspasene 3 og 7, som igangsetter cellulær degradering (se figur 1.1) (Burz, Berindan-Neagoe et al. 2009). Funksjonen til human caspase-10 er ikke klarlagt (Kumar 2007). Flere studier har vist at caspase-8 har en essensiell rolle i proliferasjonen av immunceller, og pasienter med deaktiverte mutasjoner i caspase-8, får immunsvikt grunnet redusert lymfocytproduksjon (Lamkanfi, Festjens et al. 2007). Caspase-8 er med på å etablere en crosstalk mellom den ytre og indre signalveien, ved å kløve og aktivere proteinet bid som tilhører den proapoptotiske bcl2-familien. bid fremmer cytokrom c-frigjøring fra mitokondriene som er med på å aktivere caspase-9 (se avsnitt 1.2.3) (Danial and Korsmeyer 2004).



**Figur 1.1 To veier til cellulær apoptose**

Ligandering av dødsreseptor i den ytre signalveien rekrutterer FADD som så rekrutterer caspase-8 som til sist aktiverer caspase-3. Konsentrasjonen av c-FLIP avgjør om bindingen av FADD og caspase-8 hemmes eller fremmes.

Toksiske stimuli aktiverer proapoptotiske BH3-proteiner som interagerer med og hemmer antiapoptotisk bcl2 og bcl-xl. Bax og Bak induserer mitokondriell permeabilitet som gir frigjøring av cytokrom c som sammen med Apaf-1 danner det caspase-9-bindende apoptosomet. Apoptosombundet caspase-9 aktiverer caspase-3.

Det er en mulig crosstalk mellom de to signalveiene mediert av tBid produsert av caspase-8 mediert Bid-kløvning. tBid hemmer bcl2 og bcl-xl-signalveien og aktiverer Bax og Bak.

Figuren er hentet fra (Hotchkiss, Strasser et al. 2009)

### 1.2.3 Den indre signalveien aktiverer caspase-9

Denne signalveien, også kalt den mitokondrielle signalveien, aktiveres vanligvis ved tap av vekstfaktorsignal eller i respons på dødelige stimuli fra innsiden av cellen. DNA-skade, oksidativt stress, hypoxi eller kjemoterapeutika er eksempler på slikt dødelig stimuli (Burz,

---

Berindan-Neagoe et al. 2009). Signalveien reguleres av proteiner i bcl2-familien. I denne signalveien leder dødssignalene til frigjøring av cytokrom C fra mitokondriene, som binder og fasiliterer dannelsen av et apoptosom, som rekrutterer og aktiverer caspase-9. Når caspase-9 bindes til apoptosomet, kløyver det og aktiverer caspase-3 (se figur 1.1) (Kumar 2007).

#### 1.2.4 Caspase-3

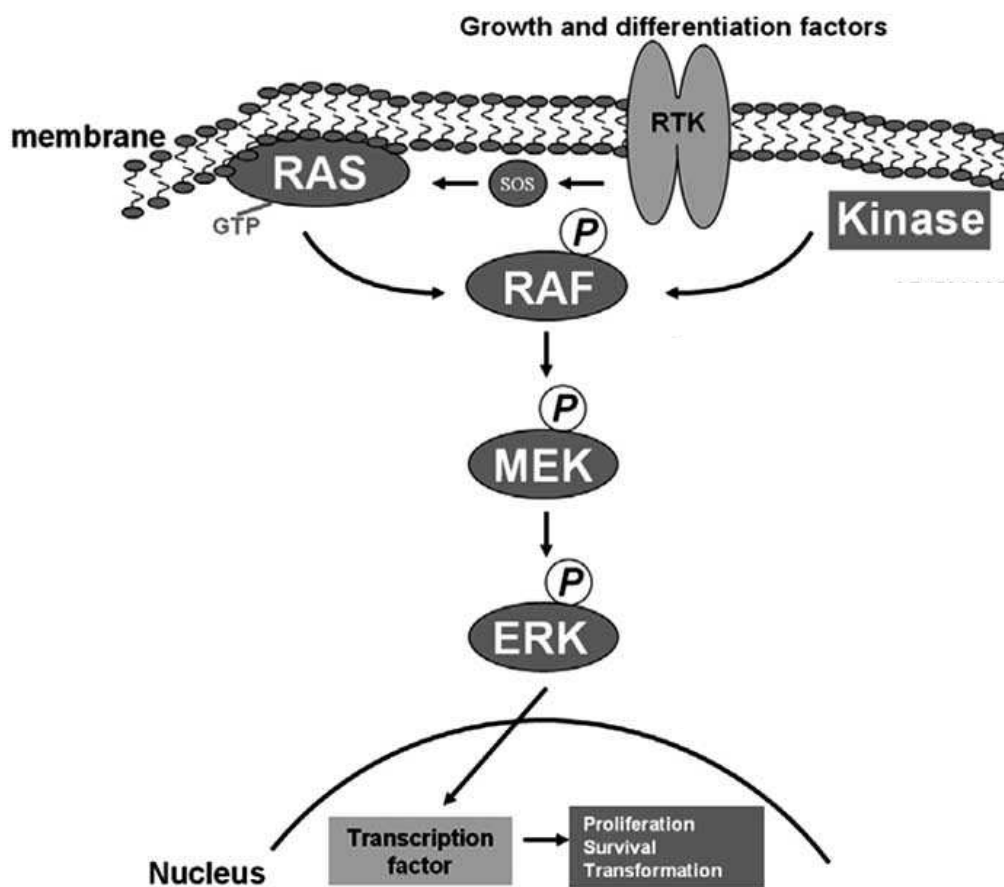
Både den ytre og den indre apoptosesignalveien resulterer i aktivering av caspase-3, som er hovedeffektorcaspasen som kløyver majoriteten av cellulære substrater i apoptotisk celledød. Caspase-3 har en essensiell rolle i utviklingen av sentralnervesystemet, gjennom mediering av neurontallet og konnektiviteten under dets modning. Caspase-3-“knockout”-mus dør tidlig på grunn av abnormal neuronproliferasjon (Porter and Janicke 1999; Kumar 2007).

Aktiveringen av caspase-3 ser også ut til å ha en meget viktig rolle i neuronal patologisk apoptose. Aktivitet av caspase-3 er blant annet vist i Alzheimers sykdom (Rohn, Rissman et al. 2002) og Parkinsons sykdom (Hartmann, Hunot et al. 2000). I dyremodeller av hodeskader og slag hindrer caspasehemmere neuronal død. Dette indikerer at aktiveringen av caspaser kan ha en sentral rolle i human neurodegenerativ sykdom, noe som gjør dem til et mål for terapeutisk intervensjon (Charriaut-Marlangue 2004). Caspase-9 aktiverer caspase-3 i den indre apoptotiske signalveien etter binding og aktivering av apoptosomet (Hotchkiss, Strasser et al. 2009).

### 1.3 Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien

I motsetning til de fleste andre celler, deler ikke neuroner seg. Når neuroner ikke byttes ut, tillater dette nervesystemet å oppnå varig funksjon over lange distanser og mulighet til å lagre varige minner. Dermed er det helt naturlig at nervesystemet under evolusjonen har utviklet mekanismer for å forebygge neuronal død, og vi kjenner flere antiapoptotiske signalveier (Mattson 2000). En av disse er Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien, som kobler tyrosinkinasereseporer på celleoverflaten til transkripsjonsfaktorer som regulerer genekspressjon (figur 1.2). Denne signalveien har ulike effekter på cellyklus, apoptose og

differensiering. Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien har stor innvirkning på reguleringen av apoptose via fosforylering av apoptiske regulatoriske molekyler, inkludert caspase-9 (McCubrey, Steelman et al. 2007). Signalveien starter med at vekstfaktorer eller andre mitogener bindes til tyrosinkinasereseptoren og aktiverer membranproteinet Ras som så rekrutterer Raf til plasmamembranen. Raf aktiveres via andre kinaser eller ved autofosforylering. Raf fosforylerer og aktiverer MEK som deretter aktiverer ERK. Aktivert ERK dissosierer fra Ras/Raf/MEK/ERK-komplekset og fosforylerer et antall cytoskeletale proteiner, kinaser og transkripsjonsfaktorer i cellekjernen. Overaktivering av denne signalveien gir resistens mot apoptose, og er ofte sett ved kreftsykdommer (Wong 2009).



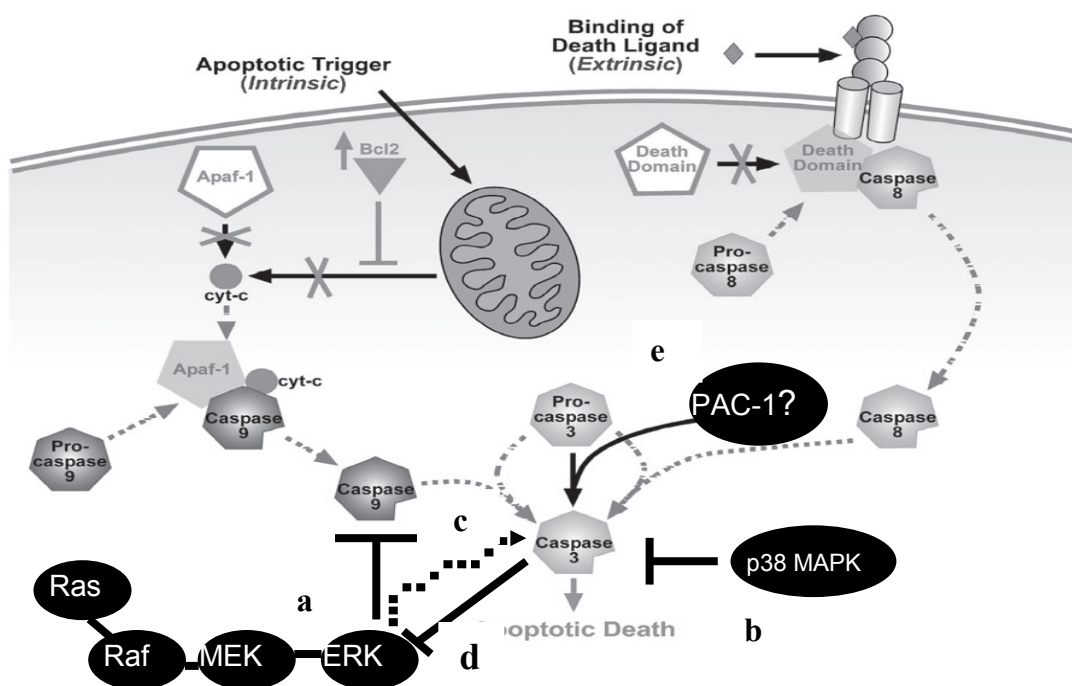
**Figur 1.2 Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien**

Vekstfaktorer eller andre mitogener aktiverer reseptortyrosinkinase (RTK), reseptoren dimeriserer og tyrosindelen autofosforyleres. Dette får SOS ("son of sevenless") til å forflytte seg til celledommen og aktivere Ras. Ras rekrutterer og aktiverer Raf. Raf fosforylerer MEK, som deretter fosforylerer og aktiverer ERK. ERK har mange substrater i cytosol og kan bevege seg inn i cellekjernen for å regulere genekspressjonen ved å fosforylere transkripsjonsfaktorer (McCubrey, Steelman et al. 2007). Figuren er modifisert fra (Wong 2009).

Vekstfaktorer har en viktig rolle i å avgjøre om en celle dør eller ikke, og to av disse er epidermal vekstfaktor (EGF) og nervevekstfaktor (NGF). Begge bindes til tyrosinkinasereseptorer som aktiverer Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien. Dette leder til aktivering eller hemming av transkripsjonsfaktorer som regulerer ekspresjonen av pro- og antiapoptotiske proteiner, og dermed forhindrer apoptose (Vaudry, Stork et al. 2002; Henson and Gibson 2006).

### 1.3.1 Crosstalk mellom MEK/ERK-signalveien og caspasekaskaden

Nyere studier har vist at det er crosstalk mellom kinaser i MEK/ERK-signalveien og caspasekaskaden (se figur 1.3). Både caspaseaktiveringsprosessen og den intrinsiske enzymaktiviteten er kontrollert av ulike modifierende kinaser og fosfataser. Dette tillater cellen å endre terskelen for induksjon av apoptose i respons på endringer i det intracellulære miljøet, som for eksempel etter vekstfaktorstimulering (Kurokawa and Kornbluth 2009).



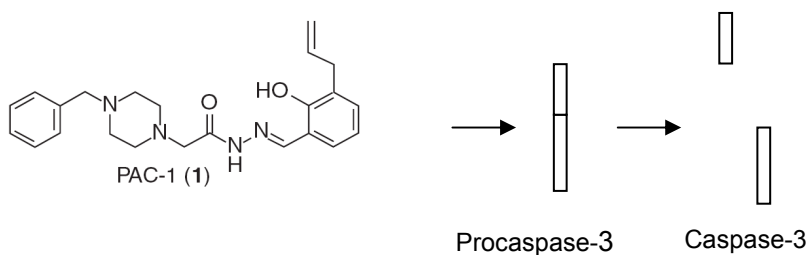
**Figur 1.3 Crosstalk mellom MEK/ERK-signalveien og caspasekaskaden**

a) ERK fosforylerer og hemmer caspase-9 og hindrer caspase-3 aktivering b) p38 MAPK fosforylerer og hemmer caspase-3 direkte. c) ERK aktiverer caspase-3 direkte ved ukjent mekanisme d) Caspase-3 hemmer ERK-aktivering ved kløyving av KSR-1. e) PAC-1, et molekyl rapportert å aktivere caspase-3 direkte. Fullstendig mekanisme ikke helt klarlagt (se avsnitt 1.4). Figuren er modifisert fra (Garber 2006).

ERK kan fosforylere caspase-9 på threonin 125 i enzymets prodomene. Dette fører til en hemming av caspase-9-aktiviteten som igjen hindrer caspase-3-aktivering. Dette bidrar trolig til den apoptotiske resistensen sett ved kreft som involverer oppregulert ERK-signalvei (se figur 1.3) (Allan, Morrice et al. 2003; Kurokawa and Kornbluth 2009). Funksjonen til ERK ser ut til å variere med situasjon og celletype. Det er vist at ERK i visse tilfeller kan aktivere caspase-3 (se figur 1.3) (Choi, Choi et al. 2004; Zhuang, Yan et al. 2007). Videre er det vist at caspase-3 kløyver Kinase suppressor av Ras 1 (KSR1), et protein viktig for ERK-kaskadeaktivering, og dermed indirekte hemmer ERK-aktiviteten (se figur 1.3) (McKay and Morrison 2007). Noen signalveier utøver også direkte kontroll på effektorcaspasene. p38 MAPK fosforylerer og hemmer caspase-3 direkte (se figur 1.3) (Alvarado-Kristensson, Melander et al. 2004).

## 1.4 PAC-1 INDUSERER APOPTOSE

I noen kreftceller er nivåene av procaspase-3 mye større enn i friske celler. Dette åpner for en mer selektiv destruksjon av kreftceller, via aktivering av caspase-3 direkte. Procaspase-activating compound 1 (PAC-1) er det første kjemisk fremstilte molekylet som er rapportert å aktivere caspase-3 direkte og hemme tumorvekst (figur 1.3 og 1.4) (Putt, Chen et al. 2006). Denne egenskapen kan gjøre PAC-1 et nyttig verktøy i studier knyttet til caspase-3-aktivering, celledød og kartlegging av MEK/ERK og andre signalveier som påvirker apoptoseaktiviteten. Ved å slå fast den fulle virkningsmekanismen til PAC-1 kan molekylet bane vei for andre procaspaseaktivatorer (Peterson, Goode et al. 2009).



**Figur 1.4 Kløyvingen av procaspase-3 til caspase-3 av PAC-1.**

Modifisert bilde fra (Putt, Chen et al. 2006).



---

Det er gjort funn som viser at PAC-1 muligens fremmer autoaktiveringen av procaspase-3 ved interaksjon med proteinets sikkerhetskappe (Putt, Chen et al. 2006). Nyere studier har vist at zinkioner hemmer procaspase-3 og caspase-3 in vitro, og at PAC-1 aktiverer disse enzymene ved å binde opp zink (Peterson, Goode et al. 2009). Det er vist at PAC-1 dreper celler som ikke uttrykker procaspase-3. Disse resultatene viser at PAC-1's evne til å drepe celler ikke skyldes en direkte aktivering av caspase-3 alene. Dette gjør det også usikkert hvor stor del av de celledrepende egenskapene til PAC-1 det er som skyldes caspase-3-aktivering (Denault, Drag et al. 2007).

## 1.5 CELLEKULTURER TIL STUDIER AV CELLEDØD

### 1.5.1 PC12-celler

PC12 er en cellelinje fra et rottefeokromocytom, en type tumor som oppstår i kromaffincellene i rottenes adrenale medulla. Cellelinjen er nyttig i studier av celledifferensiering, siden det er få vekstfaktorer og hormoner de ikke responderer på, samt at distinkte responser på differensiering, proliferasjon, og overlevelse kan vurderes uavhengig. Dette gjør dem til et nyttig modellsystem for å studere ulike problemer i nevrobiologi og nevrokjemi, og studier på behandling av visse typer tumorer (Greene and Tischler 1976; Vaudry, Stork et al. 2002). NGF og EGF bindes til reseptortyrosinkinaser og aktiverer ERK som fører til proliferasjon, og differensiering av PC12-celler til neuronale fenotyper (Vaudry, Stork et al. 2002). PC12-celler står på Putts liste over  $IC_{50}$ -verdier for PAC-1-indusert celledød (Putt, Chen et al. 2006). To tidligere masteroppgaver har vist ulike resultater i forhold til PAC-1's evne til å aktivere caspase-3 i PC12-celler. Rimul viste at PAC-1 aktiverer caspase-3 og gir celledød i PC12-celler, og at EGF og NGF beskytter mot PAC-1-indusert celledød i denne celletypen (Rimul 2007). Lindland-Tjønn viste at PAC-1 induserer celledød i PC12-celler via en caspase-3-uavhengig mekanisme, som NGF og EGF ikke beskytter mot (Lindland-Tjønn 2009).

## 1.5.2 Kyllingkornceller

Kornceller (neuroner) fra lillehjernen til kyllinger er et alternativ til kornceller fra rotter i studier av neuronal differensiering og død. Kyllingkulturer er praktiske siden de er billige i vedlikehold og ikke krever tillatelse og utstyr til dyrehold. Kyllingkornceller responderer på glutamatoksisitet tilsvarende rottekulturer, via ROS-produksjon og aktivering av caspase-3 (Jacobs, Aden et al. 2006). Siden kornceller fra kylling uttrykker caspase-3, kan trolig PAC-1 brukes som verktøy i å studere signalveier involvert i neuronal apoptose. En annen viktig egenskap til kyllingkorncellene, er at de som modne neuroner ikke kan deles seg. Siden PAC-1 er rapportert å binde opp zink (Peterson, Goode et al. 2009), gjør kyllingkorncellene det mulig å studere om PAC-1's celledrepende egenskaper skyldes aktivering av caspase-3 direkte via denne zinkbindingen og/eller om disse egenskapene skyldes en direkte effekt på zinks viktige rolle i PC12-cellenes proliferasjon i celledrepende syklus.

## 1.6 MÅL MED OPPGAVEN

Målene med oppgaven var følgende:

- Undersøke om PC12-celler og kornceller fra kylling er egnede modeller for å studere caspaseavhengig celledød induisert av PAC-1.
- Undersøke om caspase-3 og caspase-9 er involvert i celledød induisert av PAC-1 i PC12-celler og kyllingkornceller.
- Undersøke om vekstfaktorene NGF og EGF kan beskytte mot celledød induisert av PAC-1 i PC12-celler og kyllingkornceller.
- Undersøke om PAC-1 er et godt verktøy til studier av caspase-3-avhengig neuronal død.

## 2. MATERIALER OG METODER

### 2.1 KJEMIKALIER OG BIOLOGISKE PRODUKTER

Produkt:	Fabrikant:
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
$\alpha$ - Tubulin (B-7) antistoff: sc-5286	Santa Cruz, California, USA
Basal Medium Eagle (BME)	Invitrogen, California, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Caspase-3-inhibitor	Calbiochem, San Diego, USA
Caspase-3-substrat	Bachem, Bubendorf, Sveits
Caspase-9-inhibitor	Bachem, Bubendorf, Sveits
Caspase-9-substrat	Bachem, Bubendorf, Sveits
Deoksyribonuklease (DNase)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, California, USA
ERK-antistoff	Santa Cruz, California, USA
Etylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

---

Epidermal vekstfaktor (EGF)	Pepro Tech Inc., New Jersey, USA
Fenolrødt	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Føtalt kalveserum	Invitrogen, California, USA
Gentamycinsulfat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glukose	Merck og Co, New Jersey, USA
Glutamin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hesteserum	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Igepal 100%	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kaliumdihydrogenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck og Co, New Jersey, USA
Kaliumklorid (KCl)	Koch-Light laboratories, England
Kalsiumklorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck og Co, New Jersey, USA
Kyllingserum, varmeinaktivert	Invitrogen, California, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck og Co, New Jersey, USA
2-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natrium deoxycholat	Merck og Co, New Jersey, USA
Natriumklorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natrium orthovanadate (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Nerve Growth Factor (NGF)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ponceau S-løsning	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Fenylmetansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Penicillin-streptomycin 10µg/ml	Invitrogen, California, USA
Procaspase activating compound (PAC-1)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Precision Plus Protein All Blue	Bio-Rad, Herkules, USA
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Staurosporin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris/Glycine Buffer (TG) 10x	Bio-Rad, Herkules, USA
Tris/Glycine/SDS Buffer (TGS) 10x	Bio-Rad, Herkules, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsininhibitor 1	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tween 20	Calbiochem, San Diego, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge
P-Erk-antistoff	Santa Cruz, California, USA

Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
--	---------------------------------

## 2.2 UTSTYR

Produkt:	Modell og fabrikant
Brett med 96 brønner (wells)	Nunclon
Cellekulturskåler	Nunclon
Celleskrape	Corning Incorporated
CO <sub>2</sub> -inkubator	Thermo Forma, Steri-Cycle
Finnpipette	Thermo Electron
Gassbrenner	Fireboy Eco, Integra Biosciences
LAF-benk	Holten Safe 2000 Model 1.2
Lysmikroskop	Nikon, TMS type 104
Pipetteboy	Integra Biosciences
Pipetter	Molecular BioProducts
Plateleser	HTS 700 Plus Bio-Assay Reader, Perkin Elmer
Tellekammer	Burker
Vannrenseanlegg	Aquatron A4S

---

## 2.3 PC12-CELLER

PC12-celler stammer fra et feokromocytom i rottebinyre. Disse cellene er godt egnet til neurologiske studier, siden de er mottagelig for de fleste hormoner og vekstfaktorer som NGF og EGF (Greene and Tischler 1976). NGF og EGF bindes til reseptortyrosinkinaser og aktiverer ERK som fører til proliferasjon, og differensiering av PC12-celler til neuronale fenotyper (Vaudry, Stork et al. 2002). PC12-celler er også en av kreftcellelinjene som Hergenrother et al rapporterte at PAC-1 dreper ved aktivering av caspase-3 (Putt, Chen et al. 2006).

### 2.3.1 Splitting av PC12-celler

PC12-cellene splittes når de er konfluente, normalt to dager i uken. Splittingen utføres i LAF-benk på cellelab. Cellene inkuberes ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub>.

#### Prosedyre for splitting av PC12-celler

1. Gammelt medium tømmes av.
2. 10 ml nytt PC12-medium (Tabell 2.1) tilsettes celleflasken. Deretter bankes det godt på sidene av celleflasken for å løsne cellene fra flaskebunnen.
3. Pipetter opp og ned 10 ganger for å løse opp celleaggregater og fordele cellene jevnt i mediet. Gjenta dette med en pasteurpipette der åpningen er innskrenket ved hjelp av gassbrenner.
4. Inspiser cellene i mikroskop for å kontrollere at celleaggregatene er løst opp og at cellene har blitt jevnt fordelt i mediet.
5. 1,5 ml av cellesuspensjonen tilsettes hver nye celleflaske, som deretter tilsettes 20 ml nytt PC12-medium.
6. Ved splitting til brett og skåler må celledettheten i cellesuspensjonen bestemmes. Ønsket celledetthet er  $7,0 \times 10^4$  celler/ml. Mengde cellesuspensjon som skal brukes til skålene beregnes med formelen:

---

$\frac{\text{Antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times 7,0 \times 10^4}{\text{Antall celler i tellekammer} \times 10^4} = \text{antall ml cellesuspensjon}$

$\text{Antall celler i tellekammer} \times 10^4$

7. Den beregnede mengden cellesuspensjon overføres til en kolbe og blandes med nytt PC12-medium. Mengden PC12-medium beregnes med formelen:

$(\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler}) - (\text{antall ml cellesuspensjon}) = \text{antall ml PC12-medium}$

8. Cellesuspensjonen og nytt PC12-medium blandes godt slik at cellene fordeles jevnt. Blandet løsning overføres til sterile cellekulturskåler.
9. Skålene inkuberes ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub>.

**Tabell 2.1 PC12-medium med serum**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Dulbeccos MEM	500 ml
Føtalt kalveserum	50 ml
Hesteserum	25 ml
Natriumpyruvat	5 ml
Penicillin-Streptomycin	5 ml



## 2.4 KYLLINGKORNCCELLER

Kyllingkorncellene prepareres fra 18 dager gamle kyllingfostre. Befruktede egg er levert av Nortura på Våler. Eggene ruges ved 37°C i rugemaskin.

### 2.4.1 Poly-lysin-behandling av cellekulturskåler

For å sikre at korncellene ikke løsner fra cellekulturskålene, behandles skålene med poly-L-lysin dagen før prepareringen av cellekulturen.

#### Prosedyre for poly-lysin-behandling av cellekulturskåler:

1. Fra en flaske med 500 ml sterilt MQ-vann tas det ut 10 ml, som overføres til en liten flaske med 5 mg poly-L-lysin.
2. Løsningen blandes godt og overføres tilbake til den store flasken med MQ-vann.
3. Følgende mengder av løsningen tilsettes de ulike cellekulturskålene:  
  
Små skåler (8,8cm<sup>2</sup>) tilsettes 1 ml av den ferdige løsningen.  
  
Medium skåler (21,5 cm<sup>2</sup>) tilsettes 2 ml av den ferdige løsningen.  
  
Store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) tilsettes 5 ml av den ferdige løsningen
4. Poly-L-lysin-løsningen pipetteres av etter 30-60 min. Skålene tørkes over natt i LAF-benk.

### 2.4.2 Preparering av korncellekulturer fra kylling

Metoden utføres som beskrevet i Jacobs et al (Jacobs, Aden et al. 2006).

#### Prosedyre for preparering av korncellekulturer fra kylling:

1. Utstyr autoklaveres før bruk (tabell 2.2).

2. De 18 dager gamle kyllingeggene legges i isvann i 7 minutter for å bedøve kyllingene. Det brukes normalt 40-60 egg hver gang.
3. Eggene vaskes med 70% sprit og knekkes i 14 cm sterile petriskåler.
4. Halsen til kyllingene skjæres over med en steril skalpell. Lillehjernen tas så ut med saks og pinsett.
5. Lillehjernen legges i en skål med løsning 1 (tabell 2.3).
6. Hjernehindene fjernes ved hjelp av to pinsetter, og lillehjernen legges så i en ny skål med løsning 1 (tabell 2.3).
7. Løsning 1 (tabell 2.3) suges bort, lillehjernen samles i en haug i midten av skålen og kuttes til småbiter i to retninger vinkelrett på hverandre med en skalpell. Skålen tilsettes så 10 ml av løsning 1 (tabell 2.3).
8. Bitene av lillehjernen overføres til et sterilt 50 ml rør med 10 ml løsning 1 (tabell 2.3) og røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt.
9. Supernatanten fjernes.
10. 8 ml av løsning 2 (tabell 2.3) tilsettes og pipetteres forsiktig opp og ned for å løse opp pelleten.
11. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske som så settes i et 37°C vannbad i 15 minutter. Det er viktig å ikke skru korken på flasken helt igjen. Flasken rystes med jevne mellomrom.
12. Innholdet i trypsineringsflasken suges opp og overføres til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 4 (tabell 2.3). Røret fylles så med løsning 4 (tabell 2.3).
13. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter. Er supernatanten uklar, kan en liten mengde løsning 3 (tabell 2.3) tilsettes og sentrifugeringen gjentas.
14. Supernatanten fjernes.

15. Røret tilsettes 3 ml løsning 3 (tabell 2.3). Pelleten løses forsiktig opp ved å pipettere 15-20 ganger opp og ned med en steril pasteurpipette med avrundet spiss. Når celleklumpene har sunket ned i røret, overføres den øverste klumpfrie delen av løsningen til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 5 (tabell 2.3).
16. 2 ml løsning 3 (tabell 2.3) tilsettes røret med celleklumpene. Gjenta som ovenfor til det ikke lengre er synlige celleklumper til stede. Overfør resten av løsningen til røret med løsning 5 (tabell 2.3).
17. Sentrifuger ved 900 rpm i 7 minutter.
18. Supernatanten fjernes.
19. 10 ml cellekulturmedium med kyllingserum og uten KCl tilsettes (tabell 2.5).  
Pelleten løses opp og overføres til en steril flaske med samme medium (inneholder halvparten av den mengden medium som er beregnet ut fra antall skåler som skal prepareres). En liten prøve tas ut for celledelling etter at celledensjonen er blandet godt.
20. Cellene telles i tellekammer. Celledensjonen fortynnes med cellemedium slik at cellene plates ut med en tetthet på  $1,7 \times 10^6$  celler/ml medium i skåler som på forhånd er behandlet med poly-L-lysin (se avsnitt 2.4.1).
21. Skålene inkuberes ved  $37^{\circ}\text{C}$  og 5%  $\text{CO}_2$ .

**Tabell 2.2 Sterilt utstyr til preparering av kyllingkornceller**

1 Saks

1 Pinsett

2 Spisse pinsetter

Pasteurpipetter med lang spiss

1 Trypsineringsflaske

4 Glassflasker med kork

1 Skalpell

1 50 ml glassrør

**Autoklaveres ved 120°C i 20 minutter.**

**Tabell 2.3 Løsning 1-5 til preparering av kyllingkornceller****Løsning 1**

Bovint serumalbumin	1,50 g
10 × Krebs-Ringer løsning (tabell 2.4)	50 ml
MgSO <sub>4</sub> (3,82g/100ml)	4,0 ml
Destillert vann	ad 500 ml

**Løsning 2**

Trypsin	12,5 mg
Løsning 1	50 ml

**Løsning 3**

DNase	3,1 mg (eventuelt mer)
Trypsininhibitor 1	13,00 mg
MgSO <sub>4</sub> (3,82g/100ml)	250 µL
Løsning 1	ad 25 ml

**Løsning 4**

Løsning 3	8 ml
Løsning 1	50 ml

**Løsning 5**

MgSO <sub>4</sub> (3,82g/100ml)	320 µL
CaCl <sub>2</sub> (1,20g/100 ml)	320 µL
Løsning 1	40 ml

**Løsning 1 lages i et 500 ml målesylinder som settes på magnetrører. Løsning 2 sterilfiltreres over i trypsineringsflasken. Løsning 3-5 sterilfiltreres.**

**Tabell 2.4 10 x Krebs-Ringer løsning**

<b>Komponent</b>	<b>Til 500 ml løsning</b>
NaCl	35,35 g
KCl	1,80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,83 g
Glukose	12,85 g
NaHCO <sub>3</sub>	10,70 g
Fenolrødt	50 mg
Destillert vann	Ad 500 ml
<b>Oppbevares i kjøleskap</b>	

**Tabell 2.5 Kyllingmedium med serum**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
Varmeinaktivert kyllingserum	50 ml
Gentamycinsulfat	50 mg
Glutamin	146 mg

## 2.5 KVANTIFISERING AV CELLEDØD

Ved hjelp av trypanblå er det mulig å kvantifisere celledød i både PC12-celler og kyllingkornceller. Trypanblå er et veldig hydrofilt stoff som ikke passerer den lipofile cellemembranen til levende celler. Cellemembranen til døde celler er brutt, slik at trypanblå trenger inn i cellen og farger den blå. På denne måten kan døde celler skilles fra levende, og telles i mikroskop (Strober 2001; Aras, Hartnett et al. 2008).

---

### **2.5.1 Eksponering av PC12-celler til celledødsforsøk**

PC12-cellene splittes til medium skåler (3,3 ml) med en celletetthet på  $7,0 \times 10^4$  celler/ml. Eksponeringen av cellene er utføres 24-48 timer etter splitting. NGF, EGF og caspase-3-inhibitor tilsettes 0, 2, 4, og 6 timer etter PAC-1-eksponering (tabell 2.6). Alle stoffer tilsettes direkte i mediet i cellekulturskålene. Etter eksponering inkuberes cellekulturskålene ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub> i 24 timer før farging med trypanblå og telling i mikroskop.

**Tabell 2.6 Eksponering av PC12-celler til celledødsforsøk**

<b>Cellekulturskåler 3,3 ml</b>	<b>Tilsatt:</b>	<b>Vekstfaktor/ Caspase -3- inhibitor tilsatt etter:</b>
Ubehandlet kontroll	Ingen tilsetninger	
PAC100 0	100 µM PAC-1	
PAC100+NGF 0	100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	0 timer
PAC100+EGF 0	100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	0 timer
PAC100+C3I 0	100 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor	0 timer
DMSO 0	3,3 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1 løsning)	
DMSO+NGF 0	3,3 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1 løsning) + 50 ng/ml NGF	0 timer
DMSO+EGF 0	3,3 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1 løsning) + 5 ng/ml EGF	0 timer
DMSO+C3I 0	3,3 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1 løsning) + 1 µM Caspase-3-inhibitor	0 timer
PAC100 2	100 µM PAC-1	
PAC100+NGF 2	100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	2 timer
PAC100+EGF 2	100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	2 timer
PAC100+C3I 2	100 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor	2 timer
PAC100 4	100 µM PAC-1	
PAC100+NGF 4	100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	4 timer
PAC100+EGF 4	100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	4 timer
PAC100+C3I 4	100 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor	4 timer
PAC100 6	100 µM PAC-1	
PAC100+NGF 6	100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	6 timer
PAC100+EGF 6	100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	6 timer
PAC100+C3I 6	100 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor	6 timer



---

### 2.5.2 Eksponering av kyllingkornceller til celledødsforsøk

Kyllingkorncellene plates ut i skåler (3,3 ml) med en tetthet på  $1,7 \times 10^6$  celler/ml og inkuberes i 72 timer. NGF, EGF og caspase 3-inhibitor tilsettes 0, 2, 4, og 6 timer etter PAC-1-eksponering (tabell 2.7). Alle stoffer tilsettes direkte i mediet i cellekulturskålene. Etter eksponering inkuberes cellekulturskålene ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub> i 24 timer før farging med trypanblå og telling i mikroskop.

**Tabell 2.7 Eksponering av kyllingkornceller til celledødsforsøk**

<b>Cellekulturskåler 3,3 ml</b>	<b>Tilsatt:</b>	<b>Vekstfaktor/ Caspase-3- inhibitor tilsatt etter:</b>
Ubehandlet kontroll	Ingen tilsetninger	
PAC50 0	50 $\mu$ M PAC-1	
PAC50+NGF 0	50 $\mu$ M PAC-1 + 50 ng/ml NGF	0 timer
PAC50+EGF 0	50 $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF	0 timer
PAC50+C3I 0	50 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M Caspase-3-inhibitor	0 timer
DMSO 0	1,65 $\mu$ L DMSO (tilsvarende DMSO i 50 $\mu$ M PAC-1 løsning)	
DMSO+NGF 0	1,65 $\mu$ L DMSO (tilsvarende DMSO i 50 $\mu$ M PAC-1 løsning) + 50 ng/ml NGF	0 timer
DMSO+EGF 0	1,65 $\mu$ L DMSO (tilsvarende DMSO i 50 $\mu$ M PAC-1 løsning) + 5 ng/ml EGF	0 timer
DMSO+C3I 0	1,65 $\mu$ L DMSO (tilsvarende DMSO i 50 $\mu$ M PAC-1 løsning) + 1 $\mu$ M Caspase-3-inhibitor	0 timer
PAC50 2	50 $\mu$ M PAC-1	
PAC50+NGF 2	50 $\mu$ M PAC-1 + 50 ng/ml NGF	2 timer
PAC50+EGF 2	50 $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF	2 timer
PAC50+C3I 2	50 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M Caspase-3-inhibitor	2 timer
PAC50 4	50 $\mu$ M PAC-1	
PAC50+NGF 4	50 $\mu$ M PAC-1 + 50 ng/ml NGF	4 timer
PAC50+EGF 4	50 $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF	4 timer
PAC50+C3I 4	50 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M Caspase-3-inhibitor	4 timer
PAC50 6	50 $\mu$ M PAC-1	
PAC50+NGF 6	50 $\mu$ M PAC-1 + 50 ng/ml NGF	6 timer
PAC50+EGF 6	50 $\mu$ M PAC-1 + 5 ng/ml EGF	6 timer
PAC50+C3I 6	50 $\mu$ M PAC-1 + 1 $\mu$ M Caspase-3-inhibitor	6 timer

### 2.5.3 Kvantifisering av celledød med trypanblå

#### Prosedyre for farging med trypanblå:

1. Cellemediet i skålen pipetteres av til det er 1 ml igjen.
2. 250  $\mu$ L trypanblåløsning (tabell 2.8) tilsettes hver skål og blandes lett.
3. Skålene inkuberes ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub> i 30 minutter.
4. Trypanblåløsningen pipetteres av.
5. Døde (blå) og levende celler (ufargede) telles i mikroskop, og prosent døde celler av totalt antall celler beregnes. Prosent celledød baserer seg på gjennomsnittet fra telling av tre ulike synsfelt i mikroskopet.

**Tabell 2.8 Trypanblåløsning**

#### **Trypanblå-stockløsning 2%**

Trypanblå	1 g
Destillert vann	50 ml

Blandes og varmes til kokepunktet under avtrekk. Avkjøles i romtemperatur før den filtreres. Oppbevares i romtemperatur.

#### **NaCl-stockløsning 1,8%**

NaCl	1,8 g
Destillert vann	100 ml

**Løsningen lages ved å blande trypanblå-stockløsning og NaCl-stockløsning i forholdet 1:1 rett før bruk.**

---

## 2.6 MÅLING AV CASPASEAKTIVITET I PC12-CELLER

Dette gjøres med caspaseassays. I caspaseassay detekteres kløyvingsprodukter av bestemte caspasesubstrater som kan detekteres med plateleser. Caspasesubstratet har en rest som kan detekteres fluorometrisk etter proteolyse av caspase (Harwood, Yaqoob et al. 2005). PC12-celler splittes til 96-brønnersplater med svart bunn med en celletetthet  $28 \times 10^4$  celler/ml ( $4 \times 7,0 \times 10^4$  celler/ml). Celletallet er da høyt nok per brønn til å gi reproducerbare målinger. Det splittes også celler til tre medium skåler. To av disse skålene splittes ut med en celletetthet tilsvarende celletettheten i celledødsforsøkene ( $7,0 \times 10^4$  celler/ml), mens en splittes med celletetthet tilsvarende brønnene i caspaseassayet ( $28 \times 10^4$  celler/ml). En skål brukes som blank kontroll mens de to andre skålene tilsettes PAC-1 i samme konsentrasjon som i brønnene for å gi en kontroll på at PAC-1 gir tilsvarende celledød ved fire ganger celletetthet. De splittede brettene inkuberes ved  $37^\circ\text{C}$  og 5%  $\text{CO}_2$  i 24 timer før de eksponeres. Brønnene tilsettes PAC-1, vekstfaktorer og caspaseinhibitor i samme konsentrasjon som i celledødsforsøkene ved telling av celledød. Et brett tilsettes vekstfaktor og caspaseinhibitor umiddelbart (0 timer), mens et brett tilsettes vekstfaktorer og caspaseinhibitorer etter 2 timer (tabell 2.9). En rekke av hvert brett tilsettes staurosporin som en positiv kontroll.

**Tabell 2.9 Eksponering av PC12-celler i 96 brønns brett til caspaseassay**

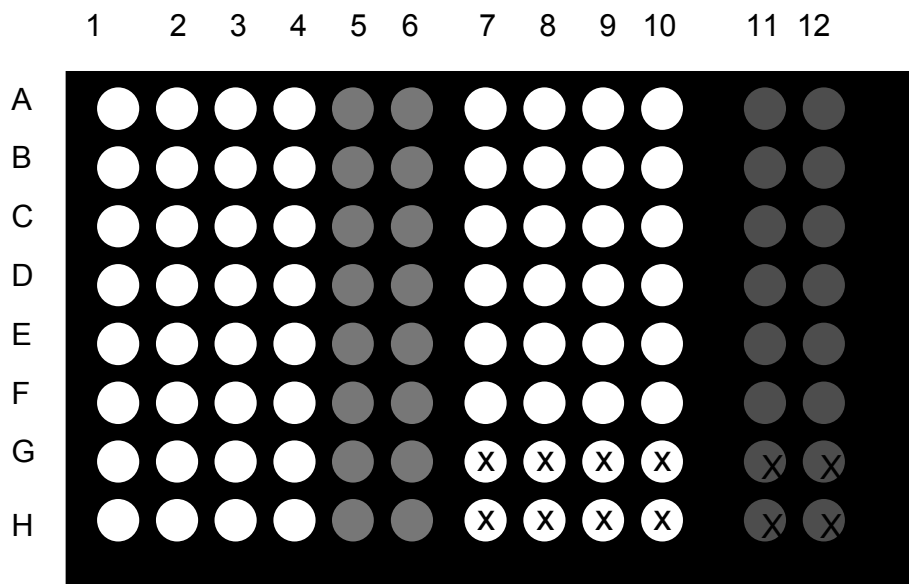
<b>Brønn</b>	<b>Tilsatt per brønn</b>
A1-A6	Ubehandlet kontroll (ingen tilsetninger)
B1-B6	0,2 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1)
C1-C6	0,2 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1) + 50 ng/ml NGF
D1-D6	0,2 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1) + 5 ng/ml EGF
E1-E6	0,2 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1) + 1 µM Caspase-3-inhibitor
F1-F6	0,2 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 100 µM PAC-1) + 20 µM Caspase-9-inhibitor
G1-G6	100 µM PAC-1
H1-H6	100 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF
A7-A12	100 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF
B7-B12	100 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor
C7-C12	100 µM PAC-1 + 20 µM Caspase-9-inhibitor
D7-D12	1 µM Staurosporin
E7-E12	100 µL 2 x RIPA
F7-F12	100 µL 2 x RIPA
G7-G12	Tomme brønner
H7-H12	Tomme brønner

**Prosedyre for måling av caspaseaktivitet:**

1. Cellebrønnene eksponeres (tabell 2.9).
2. Brettene inkuberes ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub> i 4 timer.
3. 50 µL av mediet fjernes fra hver brønn slik at gjenværende volum er 100 µL (omtrent 50 µL har dampet av).

4. Brønnene tilsettes 100  $\mu\text{L}$  2 x RIPA-buffer (tabell 2.10) tilsatt caspasesubstrat (20 $\mu\text{M}$ ) eller 100  $\mu\text{L}$  2 x RIPA-buffer tilsatt caspasesubstrat (20 $\mu\text{M}$ ) og caspaseinhibitor (1 $\mu\text{M}$ ) (Figur 2.1). Det er utført både caspase-3-assay og caspase-9-assay der de respektive substrater og inhibitorer er brukt.

**Figur 2.1: Tilsetninger i caspaseassay**



○ = Tilsettes 100  $\mu\text{L}$  2 x Ripa+ caspasesubstrat (20 $\mu\text{M}$ )

● = Tilsettes 100  $\mu\text{L}$  2 x Ripa+ caspase-substrat (20 $\mu\text{M}$ ) + Caspaseinhibitor (1  $\mu\text{M}$ )

⊗ = Tomme brønner

5. Brettene inkuberes ved 37°C, og fluorescens avleses i plateleser ved 485/535 nm for caspase-3 og 360/465 nm for caspase-9 etter 30 min, 4 timer og 24 timer.
6. Målingene i brønnene tilsatt både caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor brukes som bakgrunn. Gjennomsnittet av disse trekkes fra gjennomsnittet av sine respektive rader tilsatt kun caspase-3-substrat. Eks:  $((B1+B2+B3+B4)/4) - ((B5+B6)/2)$ .

**Tabell 2.10 2 x RIPA-buffer**

<b>Komponent</b>	<b>Til 100 ml buffer</b>
EGTA 1mM	2 ml
Igepal 100%	2 ml
NaCl-løsning 5M (tabell 2.11)	6 ml
Natrium deoxycholat	0,5 g
Tris HCl 1M ph 7,4	10 ml
MQ-vann	Ad 100 ml

**Tabell 2.11 NaCl-løsning 5M**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
NaCl	146,1g
MQ-vann	400 ml

## 2.7 WESTERNBLOTT

Westernblott er en metode for å detektere, identifisere og kvantifisere proteiner ved hjelp av antistoffer som gjenkjenner spesifikke antigener (Tovey, Ford et al. 1987). Proteinene separeres først etter molekylvekt ved elektroforese gjennom en gel. Så overføres de til en nitrocellulosemembran. Uspesifikke bindingssteder blokkeres med tørrmelk før primærantistoffet som detekterer det spesifikke antigenet tilsettes. Sekundærantistoffet som er merket med en fluorogen substans, binder seg til primærantistoffet og gjør det mulig å detektere primærstoffet og dermed den originale antigenet. Proteinene som skal identifiseres og/eller kvantifiseres finnes ved å sammenligne med en proteinstandard som inneholder en blanding proteiner med kjent molekylvekt (Gallagher, Winston et al. 2008).

### **2.7.1 Eksponering av kyllingkornceller til analyse med westernblott**

Kyllingkorncellene plates ut i store skåler (66 cm<sup>2</sup>) (se avsnitt 2.4.2) og inkuberes ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub> i 72 timer før eksponering. PAC-1, DMSO, vekstfaktorer og caspase-3-inhibitor tilsettes direkte i cellekulturskålene i samme konsentrasjoner som ved celledødsforsøkene i kyllingkornceller (tabell 2.12).



**Tabell 2.12 Eksponering av kyllingceller til westernblott**

<b>Cellekulturskål 10,0ml</b>	<b>Tilsatt:</b>	<b>Høstet etter:</b>
Ubehandlet kontroll	Ingen tilsetninger	6 timer
PAC50 4	50 µM PAC-1	4 timer
PAC50+NGF 4	50 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	4 timer
PAC50+EGF 4	50 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	4 timer
PAC50+C3I 4	50 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor	4 timer
DMSO 4	1,65 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 50 µM PAC-1 løsning)	4 timer
DMSO+NGF 4	1,65 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 50 µM PAC-1 løsning) + 50 ng/ml NGF	4 timer
DMSO+EGF 4	1,65 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 50 µM PAC-1 løsning) + 5 ng/ml EGF	4 timer
DMSO+C3I 4	1,65 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 50 µM PAC-1 løsning) + 1 µM Caspase-3-inhibitor	4 timer
PAC50 6	50 µM PAC-1	6 timer
PAC50+NGF 6	50 µM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	6 timer
PAC50+EGF 6	50 µM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	6 timer
PAC50+C3I 6	50 µM PAC-1 + 1 µM Caspase-3-inhibitor	6 timer
DMSO 6	1,65 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 50 µM PAC-1 løsning)	6 timer
DMSO+NGF 6	1,65 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 50 µM PAC-1 løsning) + 50 ng/ml NGF	6 timer
DMSO+EGF 6	1,65 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 50 µM PAC-1 løsning) + 5 ng/ml EGF	6 timer
DMSO+C3I 6	1,65 µL DMSO (tilsvarende DMSO i 50 µM PAC-1 løsning) + 1 µM Caspase-3-inhibitor	6 timer

## 2.7.2 Høsting av kyllingkornceller til westernblott

Hver skål høstes med 100  $\mu\text{L}$  høstebuffer med proteasehemmere (tabell 2.13).

Proteasehemmerne sikrer at proteinene i prøvene ikke brytes ned slik at det blir mulig å detektere dem på westernmembranen.

### Prosedyre for høsting av celler til westernblott:

1. Cellemediet i skålen helles av.
2. Skålen vaskes to ganger med 4 ml PBS (tabell 2.14). PBS-rester fjernes med pipette.
3. 100  $\mu\text{L}$  høstebuffer pipetteres over i skålen.
4. Cellene løsnes ved å skrape godt i begge retninger med en celleskrape.
5. Cellesuspensjonen pipetteres over i et eppendorfrør og settes på is. Fryses senere ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Tabell 2.13 Høstebuffer til westernblott**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
SDS 2%	100 $\mu\text{L}$ /skål
Leupeptin 5 mg/ml	1 $\mu\text{L}$ / ml SDS 2%
$\text{Na}_3\text{VO}_4$ 10 mM	0,5 $\mu\text{L}$ / ml SDS 2%
PMSF 100 mM	3 $\mu\text{L}$ / ml SDS 2%
Pepestatin A 1 mg/ml	5 $\mu\text{L}$ / ml SDS 2%

**Tabell 2.14 PBS**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
KCl	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,08 g
NaCl	32,00 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	7,12 g
Destillert vann	Ad 4000 ml

**Løsningen PH-justeres til 7,4 med HCl. Autoklaveres før bruk.**

### 2.7.3 Proteinmåling av kyllingkorncelleprøver til westernblott

Før man kan kjøre westernblott må man kontrollere at prøvene inneholder noenlunde samme mengde protein. Dette er viktig for sikre at man får resultater som ikke skyldes ulik proteinmengde tilsatt i gelbrønnene. Proteininnholdet i prøvene ble bestemt med BCA protein assay kit.

#### Prosedyre for proteinmåling av westernprøver:

1. Standardløsning og “working reagent” gjøres klar (tabell 2.15).
2. Standardløsningen tilsettes de tolv første brønnene i mengdene vist på plateoppsettet (Figur 2.2).
3. De neste brønnene tilsettes 3 µL celleprøve. Hver prøve tilsettes i tre brønner (Figur 2.2).
4. Alle brønnene tilsettes 200 µL “working reagent” (tabell 2.15).
5. De to blanke brønnene (A1 og B1) og brønnene med standardløsning tilsettes 3 µL av høstebufferen (samme som mengden tilsatt av hver prøve) (tabell 2.13) (figur 2.2).
6. Brettet inkuberes ved 37°C i 1 time.
7. Absorbans måles ved 570 nm i plateleser.

**Tabell 2.15 Løsninger til proteinmåling**

<b><u>Standardløsning</u></b>	
Bovint serumalbumin 2mg/ml	50 µL
PBS (tabell 2.14)	150 µL
<b><u>“Working reagent”</u></b>	
BCA Protein assay reagent A	50 deler
BCA Protein assay reagent B	1 del
<b>Total mengde avgjøres av antallet brønner som skal brukes.</b>	
<b>Volum = 200 µL/brønn × antall brønner</b>	

**Proteinjustering av westernprøver:**

Viser absorbanmålingen store forskjeller i proteininnhold mellom prøvene, bør man proteinjustere prøvene for å sikre at man får pålitelige resultater.


1. Prøven med lavest absorbanmåling skal fortynnes minst.
2. Prøveløsningene klargjøres ved å blande 3 deler celleprøve med 1 del 4× laemmlibuffer (tabell 2.16).
3. 1× laemmlibuffer (tabell 2.16) tilsettes basert på forholdstallet mellom den lavest absorbanmålingen og absorbanmålingen til hver prøve, for å oppnå tilsvarende proteinkonsentrasjon til hver prøve som skal settes på gelen.

Figur 2.2: Plateoppsett for proteinmåling

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	10 $\mu$ L standard	Control	Pac50 +NGF 4	Pac50 +EGF 6	Pac50 +CI 6	DMSO +NGF 4	DMSO +EGF 6	DMSO +CI 6			
B	Blank	10 $\mu$ L standard	Pac50 4	Pac50 +NGF 4	Pac50 +EGF 6	DMSO 4	DMSO +NGF 4	DMSO +EGF 6				
C	1 $\mu$ L standard	20 $\mu$ L standard	Pac50 4	Pac50 +NGF 6	Pac50 +EGF 6	DMSO 4	DMSO +NGF 6	DMSO +EGF 6				
D	1 $\mu$ L standard	20 $\mu$ L standard	Pac50 4	Pac50 +NGF 6	Pac50 +CI 4	DMSO 4	DMSO +NGF 6	DMSO +CI 4				
E	2,5 $\mu$ L standard	40 $\mu$ L standard	Pac50 6	Pac50 +NGF 6	Pac50 +CI 4	DMSO 6	DMSO +NGF 6	DMSO +CI 4				
F	2,5 $\mu$ L standard	40 $\mu$ L standard	Pac50 6	Pac50 +EGF 4	Pac50 +CI 4	DMSO 6	DMSO +EGF 4	DMSO +CI 4				
G	5 $\mu$ L standard	Control	Pac50 6	Pac50 +EGF 4	Pac50 +CI 6	DMSO 6	DMSO +EGF 4	DMSO +CI 6				
H	5 $\mu$ L standard	Control	Pac50 +NGF 4	Pac50 +EGF 4	Pac50 +CI 6	DMSO +NGF 4	DMSO +EGF 4	DMSO +CI 6				

Tabell 2.16 Laemmlibuffere

<b><u>1×Laemmlibuffer</u></b>	
<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Tris-HCl 0,5 M ph 6,8	1,5 ml
SDS 10%	2,0 ml
Glycerol 50%	1,0 ml
MQ-vann	5,0 ml
Bromfenolblått	Noen korn
Mercaptoetanol	0,5 ml
<b><u>4×Laemmlibuffer</u></b>	
<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Tris-HCl 2M ph 6,8	1,5 ml
SDS 20%	1,5 ml
Glycerol 40%	4,0 ml
MQ-vann	1,0 ml
Bromfenolblått	Noen korn
Mercaptoetanol	2,0 ml

 Bromfenolblått og mercaptoetanol tilsettes i avtrekk. Bromfenolblått gjør løsningen mørk blå. Mercaptoetanol tilsettes rett før bufferen skal brukes

---

## 2.7.4 Prosedyre for westernblott


Det støpes 1,5 mm 12 % polyakrylamidgeler. Dette er en passende gelopløsning for å detektere proteiner som er interessante for denne oppgaven. Støpingen av gel utføres i avtrekk.

### Prosedyre for støping av westerngel:

1. Vask glassplatene som utgjør støpeformen med sprit for å fjerne smuss og fett.
2. Glassplatene settes sammen til støpeformen og settes fast i holderen.
3. Hver støpeform fylles med litt vann og settes til side i ca 5 minutter for å kontrollere for lekkasjer. Ved lekkasje må støpeformen settes sammen på nytt og kontrolleres igjen.
4. Nedre-gel-løsningen (tabell 2.17) helles i støpeformen. MQ-vann pipetteres over for å få en rett kant på gelen når den stivner.
5. La nedre gel stivne i 30 minutter.
6. Hell av MQ-vannet i støpeformen.
7. Øvre-gel-løsningen (tabell 2.18) helles over nedre gel.
8. Plastkammen som lager brønner i gelen settes ned i støpeformen.
9. La øvre gel stivne i 30 minutter.
10. Fjern plastkammen forsiktig. Kontroller at veggene i brønnene er intakte.


**Tabell 2.17 Nedre-gel-løsning til western**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde per gel (1,5mm)</b>
MQ-vann	3,3 ml
Nedre gelbuffer (tabell 2.19)	5,2 ml
Akrylamid	8,0 ml
APS 10%	200 $\mu$ L
TEMED	8 $\mu$ L

 Gel lages i avtrekk. TEMED får gelen til å stivne, og tilsettes derfor til slutt.

**Tabell 2.18 Øvre-gel-løsning til western**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde per gel (1,5mm)</b>
MQ-vann	2,4 ml
Øvre gelbuffer (tabell 2.20)	1,0 ml
Akrylamid	0,6 ml
APS 10%	20 $\mu$ L
TEMED	4,0 $\mu$ L

 Gel lages i avtrekk. TEMED får gelen til å stivne, og tilsettes derfor til slutt.



**Tabell 2.19 Nedre gelbuffer til westerngel**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Tris-base	18,170 g
SDS 20%	2,0 ml
MQ-vann	ad 100 ml

HCl og NaOH brukes for å justere løsningen til pH 8,8.

**Tabell 2.20 Øvre gelbuffer til westerngel**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Tris-base	6,06 g
SDS 20%	2,0 ml
MQ-vann	ad 100 ml

HCl og NaOH brukes for å justere løsningen til pH 6,8.

**Prosedyre for kjøring av westerngel:**

1. Støpeformen med gel monteres i kar for gelkjøring.
2. ELFO-buffer (tabell 2.21) helles i karet.
3. Luftbobler fjernes med en bøyd kanyle.
4. Den første brønnen tilsettes 5  $\mu$ L proteinstandard (BioRad Precision Plus Protein All Blue). Westernprøveløsningene pipetteres ned i de andre brønnene. Ønsket proteinmengde per brønn er 25-50  $\mu$ g for å sikre effektiv deteksjon av proteiner. Volumet som tilsettes til hver brønn beregnes fra proteinmålingene av westernprøvene.

5. Gelen kobles til strøm og kjøres på 90 volt de første 15 minuttene for å sikre at prøvene kommer ut på en rett linje i gelen. Deretter økes det til 150 volt til prøvene har vandret gjennom gelen. Dette tar normalt en times tid.

**Tabell 2.21 ELFO-buffer**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
TGS	100 ml
Destillert vann	900 ml


**Prosedyre for blotting av westerngel:**

1. En membran, to filterpapir og to skrubber fuktes i blottebuffer (tabell 2.22).
2. Gelen fjernes forsiktig fra støpeformen med en plastspatel.
3. Gelen klargjøres for blotting ved å legge sammen blottekomponentene i følgende rekkefølge:
  - Svart side på blotteplastrammen
  - Skrubb
  - Filterpapir
  - Gel
  - Membran
  - Filterpapir
  - Skrubb
  - Hvit side på blotteplastrammen

4. Den ferdige blotterammen plasseres i et blottekar. I karet settes en iskasett og en røremagnet. Karet fylles med blottebuffer (tabell 2.22).
5. Gelen kobles til strøm og blottes på kjølerommet ved 50 mA på en magnetrører til neste dag.

**Tabell 2.22 Blottebuffer**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
TG	100 ml
Metanol	200 ml
Destillert vann	700 ml

 Håndteres med metanolsikre hansker.

**Prosedyre for farging av westerngel:**

1. Membranen legges i et kar med Ponceau S-løsning i 1 minutt med proteinsiden opp for å kontrollere at proteinene er overført og at det er tilnærmet lik proteinmengde i hver brønncolonne.
2. Membranen skylles i et kar med destillert vann.
3. La overflødig væske renne av membranen før den legges i en plastlomme. Ta bilde av proteinbåndene på membranen med kopimaskin.
4. Vask Ponceau S-løsningen av membranen med destillert vann.

**Prosedyre for blokking av westerngel:**

1. Membranen overføres til et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten. Pass på at membranen ikke overlapper inne i røret.
2. Til røret tilsettes minst 3 ml 5% tørrmelk i 1×TBS med tween (tabell 2.23).
3. Røret med membran og melkeløsningen legges til blokking på rullebrett i 1 time ved romtemperatur.

**Tabell 2.23 5% tørrmelk i TBS med tween**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Tørrmelk	2,5 g
1×TBS med tween (tabell 2.24)	ad 50 ml

Oppbevares i kjøleskap.

**Tabell 2.24 1×Tris bufret saltvann (TBS) med tween**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Trizma base	1,21 g
NaCl	4,00 g
Tween 20	0,25 ml
Destillert vann	Ad 500 ml

HCl og NaOH brukes for å justere løsningen til pH 7,6.

---

**Prosedyre for tilsetning av antistoff på westernmembran:**

1. Etter blokkering tilsettes primærantistoffet til melkeløsningen i røret.  
Blandingsforholdet er avhengig av hvilket primærantistoff som brukes (tabell 2.25).  
Membranen med primærantistoffløsningen legges til rulling i kjølerom til neste dag.
2. Primærantistoffløsningen helles av og membranen vaskes tre ganger 15 minutter med 5-10 ml 1× TBS tween (tabell 2.24) ved romtemperatur.
3. Sekundærantistoff i minst 3 ml 5 % tørrmelk i 1×TBS med tween (tabell 2.23) tilsettes røret. Blandingsforholdet er avhengig av type sekundærantistoff (tabell 2.25).  
Røret med membran og sekundærantistoffløsningen legges til rulling ved romtemperatur i 1 time.
4. Sekundærantistoffløsningen helles av og membranen vaskes tre ganger i 15 minutter med 1×TBS med tween (tabell 2.24) ved romtemperatur.

**Tabell 2.25 Antistoffer brukt ved westernblott**

Primærantistoff	Lot.nr:	Kons.	Sekundærantistoff	Lot.nr	Kons.
α-tubulin (B-7) sc-5286	J1508	1:500	Anti-mus IgG NA931V	311296	1:15000
P-ERK M8159	108K4837	1:5000	Anti-mus IgG NA931V	311296	1:15000
Erk 2 (C-14) sc-154	F303	1:1000	Anti-mus IgG NA931V	311296	1:10000

**Prosedyre for fremkalling av westernblott:**

1. Membranen tas ut av plastrøret. La overflødig væske renne av membranen på et tørkepapir.

2. De to komponentene av fremkallingsvæsken blandes 1:1 og 1 ml per membran som skal fremkalles pipetteres ut på en glassplate. Membranen legges på glassplaten med proteinsiden ned på fremkallingsvæsken. La membranen ligge i 5 minutter.
3. La overflødig fremkallingsvæske renne av på et tørkepapir. Membranen legges så i en plastlomme og fremkalles i programmet GeneSnap fra SynGene.
4. Membranen lagres i 1×TBS med tween (tabell 2.24) og oppbevares i kjøleskap til eventuell stripping og påføring av nytt antistoff.

**Prosedyre for stripping av westernblott:**

1. Legg membranen i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten. Pass på at membranen ikke overlapper inne i røret.
2. Tilsett 5 ml strippebuffer (Western Blot Stripping Buffer).
3. Røret legges til rulling i 15 minutter ved romtemperatur.
4. Strippebufferen helles av. Membranen vaskes 3 ganger med 5-10 ml 1×TBS med tween (tabell 2.24).
5. Til røret tilsettes minst 3 ml 5% tørrmelk i 1×TBS med tween (tabell 2.23).
6. Røret med membranen og melkeløsningen legges til blokking på rullebrett ved romtemperatur i 3 timer.

## 2.8 GRAFER OG STATISTIKK

Grafisk fremstilling av resultater er utført i Microsoft Office Excel 2002. Statistisk analyse av resultater er utført i programmet Sigma Stat versjon 3.0 fra SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA. Det ble brukt et signifikansnivå på  $p < 0,05$ . Ved sammenligning av flere grupper der dataene var normalfordelt ble det brukt One Way Analysis of Variance (ANOVA) med Dunnet's metode. Når dataene ikke var normalfordelt ble det brukt Kruskal-Wallis One Way ANOVA on ranks, med Dunn's metode.

## 3. RESULTATER

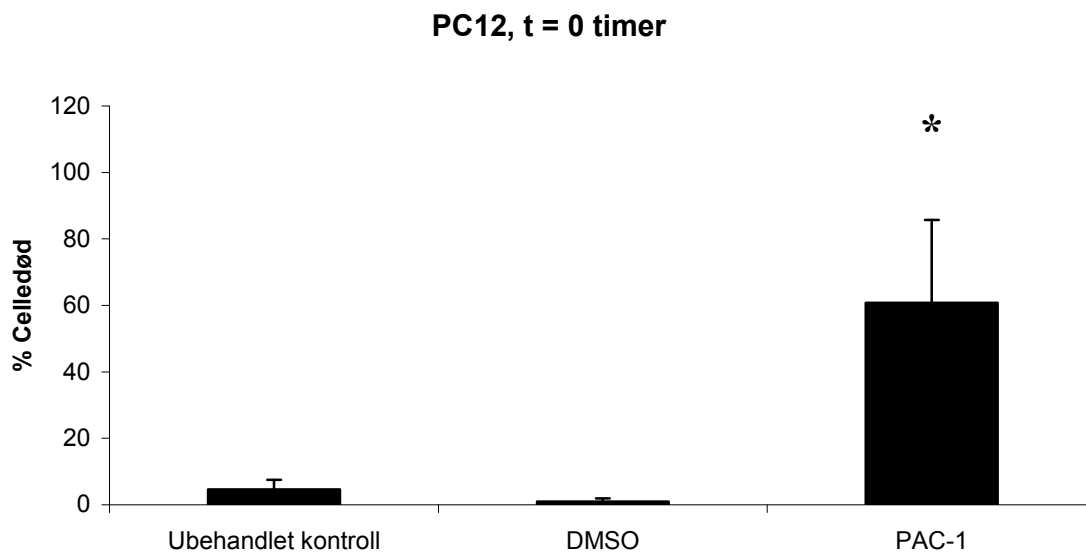
### 3.1 CELLEDØD I PC12-CELLER EKSPONERT FOR PAC-1

PAC-1 dreper celler via en mekanisme som involverer aktivering av caspase-3. Dette gjør PAC-1 til et nyttig verktøy til forskning på apoptotisk celledød (Putt, Chen et al. 2006) og for studier av vekstfaktorens innvirkning på denne prosessen. NGF og EGF kan fremme celleoverlevelse i PC12-celler via aktivering av Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien, som regulerer molekyler involvert i apoptose (Vaudry, Stork et al. 2002).

Først ble det undersøkt om PAC-1 gir en signifikant økning i celledød sammenlignet med kontroller (figur 3.1 og figur 3.2a). Det er så undersøkt om NGF, EGF og caspase-3-inhibitor (C3I) kan beskytte mot PAC-1-indusert celledød i PC12-celler (figur 3.2bc). NGF, EGF og caspase-3-inhibitor (C3I) er tilsatt 0, 2, 4, og 6 timer etter PAC-1-eksponering for å undersøke om aktiveringen av caspase-3 er rask og motvirkes umiddelbart, eller om aktiveringen er tregere og motvirkes på et senere tidspunkt (figur 3.2bc, figur 3.3, figur 3.4 og figur 3.5). PC12-cellene eksponeres for 100  $\mu$ M PAC-1 for å oppnå tilfredstillende celledød. NGF og EGF tilsettes i fysiologiske konsentrasjoner, henholdsvis 50 ng/ml og 5 ng/ml. PAC-1 er løst i DMSO, og PC12-celler tilsatt DMSO alene er brukt som kontroll sammen med ubehandlede celler. Etter 24 timer farges cellene med trypanblå og telles i mikroskop. Prosent celledød beregnes fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler (figur 3.1). På grunn av stor spredning i resultatene ble det valgt å regne celledødstallet som prosent av celledød induert av PAC-1. Ut ifra dette ble gjennomsnittet av de normaliserte dataene beregnet (figur 3.2a).

Resultatene viser at PAC-1 gir signifikant økning i celledød i sammenlignet med DMSO og ubehandlet kontroll (figur 3.2a). Resultatene viser også en signifikant reduksjon i celledød når vekstfaktor og caspase-3-inhibitor tilsettes 2 timer etter PAC-1-eksponering (figur 3.3). For vekstfaktor og caspase-3-inhibitor tilsatt 0, 4 og 6 timer etter PAC-1-eksponering er det en tendens til reduksjon i celledød, men denne reduksjonen er ikke signifikant (figur 3.2bc, figur 3.4, og figur 3.5).



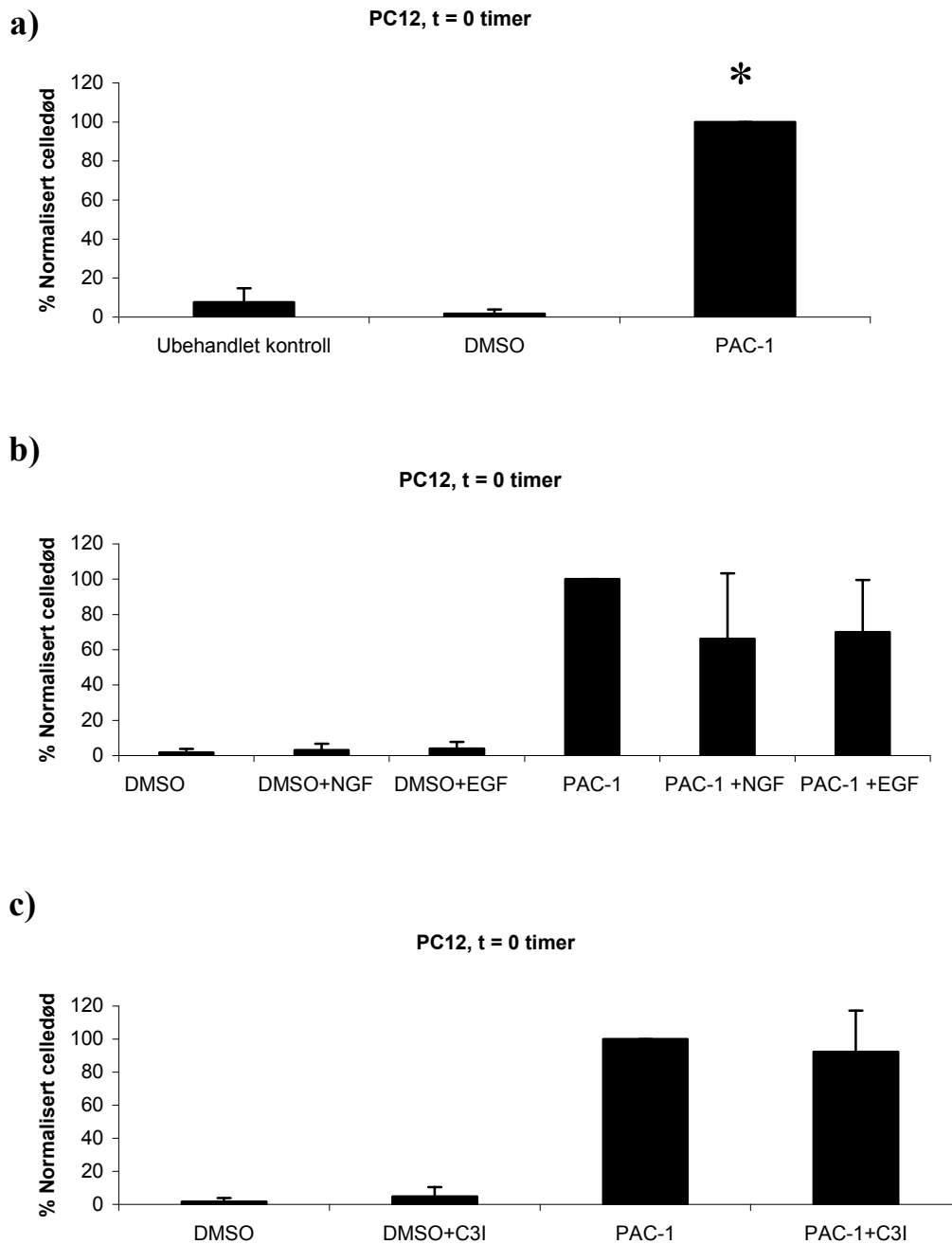


**Figur 3.1 Prosent celledød i PC12-celler eksponert for DMSO eller PAC-1.**

Etter splitting ble PC12-cellene inkubert i 24 timer. Cellene ble så eksponert for 3,3  $\mu\text{L}$  DMSO og 100  $\mu\text{M}$  PAC-1. 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Prosent celledød er beregnet fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatet er fra 6 uavhengige forsøk. \* viser en signifikant økning i celledød i PAC-1-eksponerte PC12-celler sammenlignet med DMSO-eksponerte celler og ubehandlede celler. Stolpediagrammet er basert på rådata (tabell 3.1).

**Tabell 3.1: Tallmateriale til figur 3.1:** Tallene er avrundet til to desimaler.

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig % celledød</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
Ubehandlet	4,62	2,94	6	6
DMSO	0,97	0,93	6	6
PAC-1	60,75	24,99	6	6



**Figur 3.2a-c: NGF, EGF, og C3I tilsatt PC12-celler eksponert for PAC-1.**

Etter splitting ble PC12-cellene inkubert i 24 timer. Cellene tilsettes så 3,3  $\mu$ L DMSO og 100  $\mu$ M PAC-1 (figur a), 3,3  $\mu$ L DMSO og 100  $\mu$ M PAC-1 tilsatt 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF (figur b) eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor (figur c). 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Celledød er oppgitt i prosent av det totale antall celler. Resultatene er fra 6 uavhengige forsøk. \* viser en statistisk signifikant økning i celledød i PAC-1-eksponerte celler sammenlignet ubehandlede celler og celler eksponert med DMSO (figur a). Stolpediagrammene er basert på normaliserte data (tabell 3.2, tabell 3.3, og tabell 3.4).

**Tabell 3.2 Normalisert tallmateriale til figur 3.2a:** Tallene er avrundet til to desimaler.

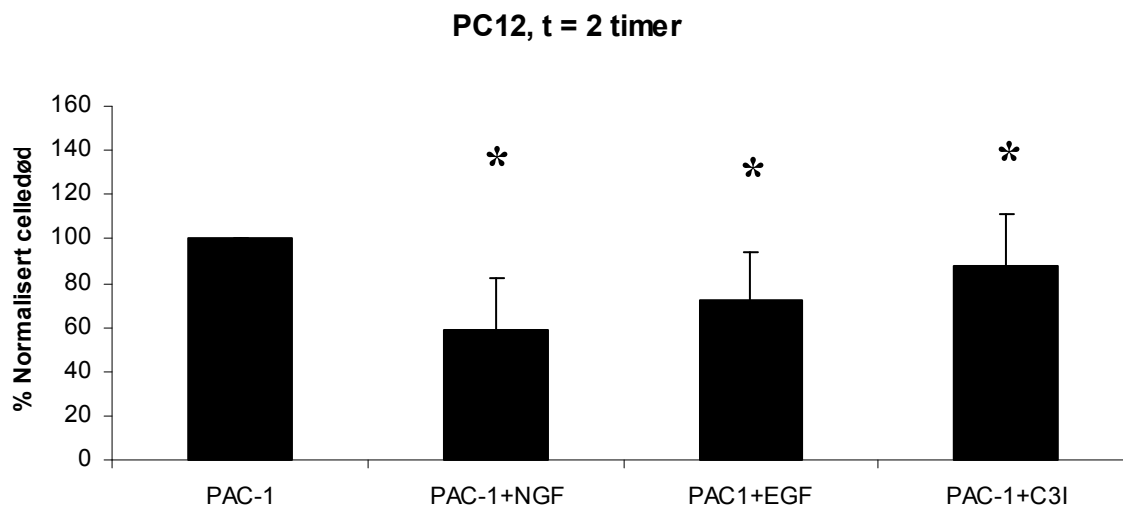
<b>Eksposering</b>	<b>Gjennomsnittlig % celledød</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
Ubehandlet	7,66	7,14	6	6
DMSO	1,69	2,16	6	6
PAC-1	100	0	6	6

**Tabell 3.3 Normalisert tallmateriale til figur 3.2b:** Tallene er avrundet til to desimaler.

<b>Eksposering</b>	<b>Gjennomsnittlig % celledød</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
DMSO	1,69	2,16	6	6
DMSO+NGF	3,16	3,53	6	6
DMSO+EGF	3,99	3,69	6	6
PAC-1	100	0	6	6
PAC-1+NGF	66,18	37,07	6	6
PAC-1+EGF	69,95	29,68	6	6

**Tabell 3.4 Normalisert tallmateriale til figur 3.2c:** Tallene er avrundet til to desimaler.

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig % celledød</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
DMSO	1,69	2,16	6	6
DMSO+C3I	4,80	5,65	6	6
PAC-1	100	0	6	6
PAC-1+C3I	92,34	24,87	6	6

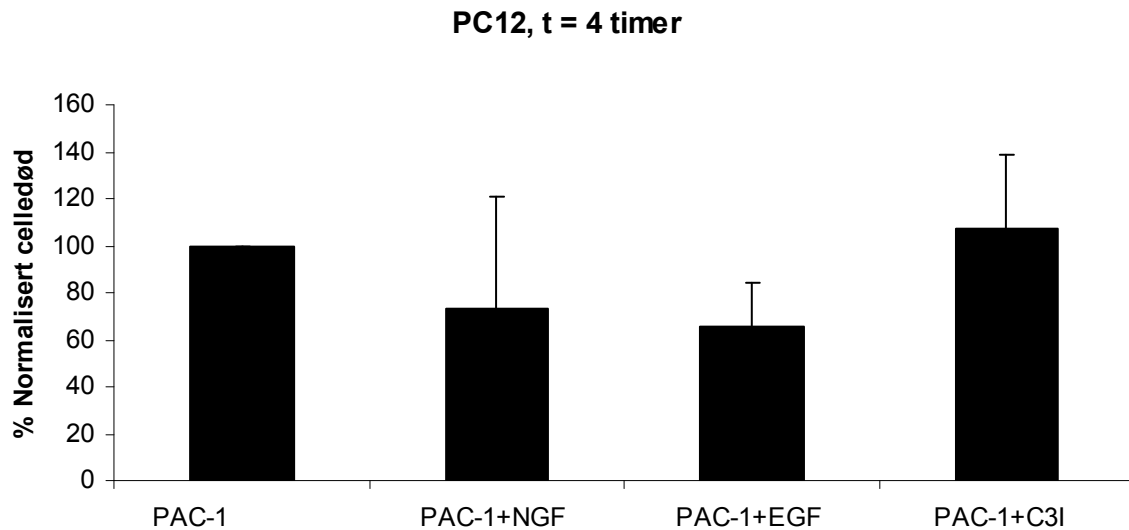


**Figur 3.3: Normalisert celledød i PC12-celler eksponert for PAC-1 og tilsatt NGF, EGF og C3I etter 2 timer.**

Etter splitting ble cellene inkubert i 24 timer. Cellene tilsettes så 100  $\mu$ M PAC-1. Etter 2 timer tilsettes 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Prosent celledød er beregnet fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er fra 4 uavhengige forsøk. \* viser en signifikant reduksjon i celledød i skåler tilsatt vekstfaktor eller caspase-3-inhibitor sammenlignet med skåler tilsatt PAC-1 alene. Stolpediagrammet er basert på normaliserte data (tabell 3.5).

**Tabell 3.5 Normalisert tallmateriale til figur 3.3:** Tallene er avrundet til to desimaler.

Eksponering	Gjennomsnittlig % celledød	Standardavvik	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1	100	0	4	4
PAC-1+NGF 2t	58,37	23,86	4	4
PAC-1+EGF 2t	72,22	22,22	4	4
PAC-1+C3I 2t	88,00	23,09	4	4

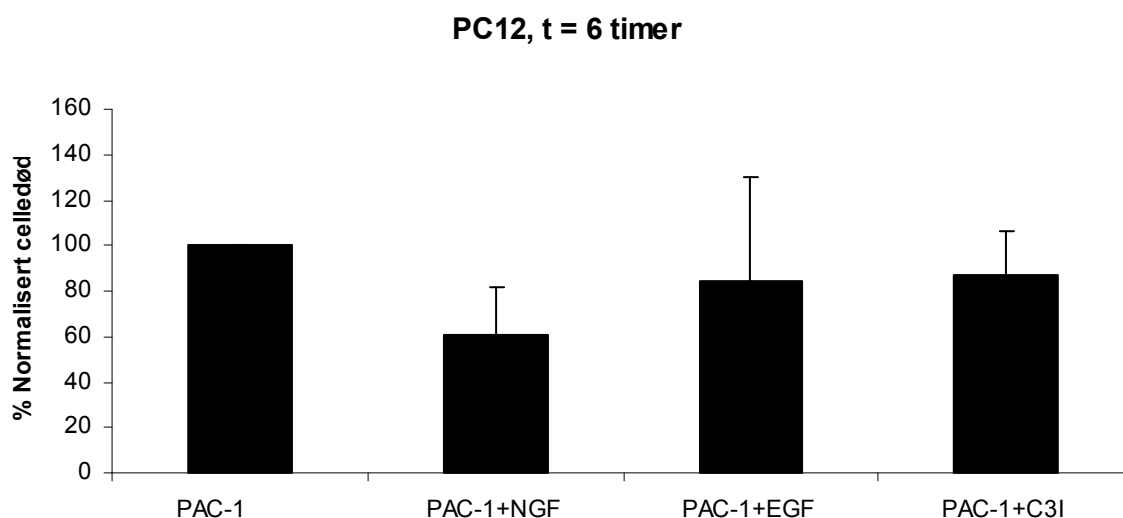


**Figur 3.4: Normalisert celledød i i PC12-celler eksponert for PAC-1 og tilsatt NGF, EGF og C3I etter 4 timer.**

Etter splitting ble cellene inkubert i 24 timer. Cellene tilsettes så 100  $\mu$ M PAC-1. Etter 4 timer tilsettes 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Prosent celledød er beregnet fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er basert på 4 uavhengige forsøk. Det er en tendens til reduksjon i celledød i skåler tilsatt vekstfaktor sammenlignet med skåler tilsatt PAC-1 alene, men reduksjonen er ikke signifikant. Stolpediagrammet er basert på normaliserte data (tabell 3.6).

**Tabell 3.6 Normalisert tallmateriale til figur 3.4:** Tallene er avrundet til to desimaler.

Eksponering	Gjennomsnittlig % celledød	Standardavvik	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1	100	0	4	4
PAC-1+NGF 4t	73,15	47,52	4	4
PAC-1+EGF 4t	63,83	18,43	4	4
PAC-1+C3I 4t	107,02	32,07	4	4



**Figur 3.5: Normalisert celledød i i PC12-celler eksponert for PAC-1 og tilsatt NGF, EGF og C3I etter 6 timer.**

Etter splitting ble cellene inkubert i 24 timer. Cellene tilsettes så 100  $\mu$ M PAC-1. Etter 6 timer tilsettes 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Prosent celledød er beregnet fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er basert på 4 uavhengige forsøk. Stolpediagrammet er basert på normaliserte data (tabell 3.7).

**Tabell 3.7 Normalisert tallmateriale til figur 3.5:** Tallene er avrundet til to desimaler.

Eksposering	Gjennomsnittlig % celledød	Standardavvik	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1	100	0	4	4
PAC-1+NGF 6t	61,03	20,39	4	4
PAC-1+EGF 6t	84,61	45,69	4	4
PAC-1+C3I 6t	87,36	19,10	4	4

## 3.2 CELLEDØD I KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1

Kyllingkornceller uttrykker procaspase-3. Aktiveres procaspase-3 til caspase-3, vil cellene dø. I forsøkene med PC12-celler ga vekstfaktorer og caspase-3-inhibitor tilsatt 2 timer etter PAC-1-eksponering en signifikant reduksjon i celledød. Det var derfor ønskelig å gjøre tilsvarende forsøk i kyllingkornceller for å se om vekstfaktorer og caspase-3-inhibitor vil beskytte i en celletype som ikke prolifererer.

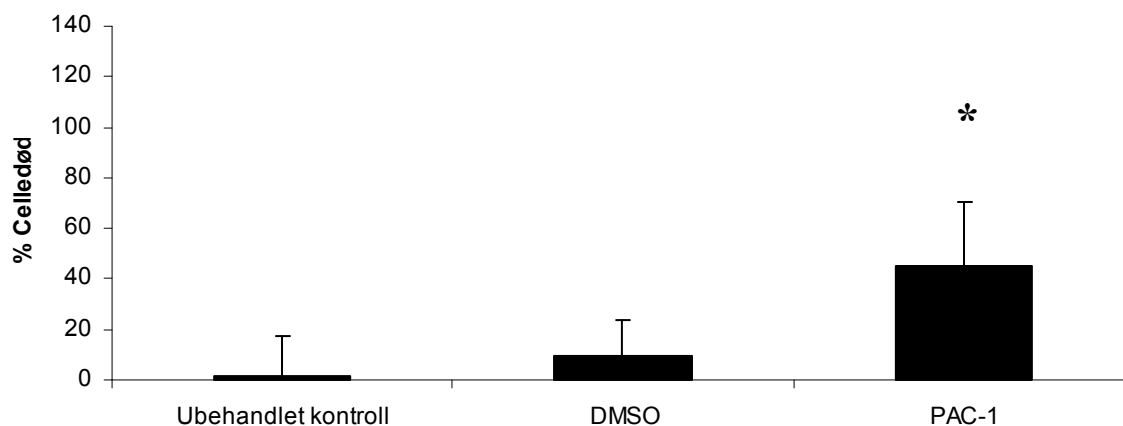
Først ble det undersøkt om PAC-1 gir en signifikant økning i celledød sammenlignet med kontroller. Det ble så undersøkt om NGF, EGF og caspase-3-inhibitor beskytter mot PAC-1-indusert celledød i kyllingkornceller. NGF, EGF og caspase-3-inhibitor er tilsatt 0, 2, 4, og 6 timer etter PAC-1-eksponering for å undersøke om aktiveringen av caspase-3 er rask og motvirkes umiddelbart, eller om aktiveringen er tregere og motvirkes på et senere tidspunkt (figur 3.7bc, figur 3.8, figur 3.9 og figur 3.10).

Kyllingkorncellene eksponeres for 50  $\mu$ M PAC-1 for å oppnå tilfredstillende celledød. NGF og EGF tilsettes i fysiologiske konsentrasjoner, henholdsvis 50 ng/ml og 5 ng/ml. PAC-1 er løst i DMSO, og kyllingkornceller tilsatt DMSO alene brukes som kontroll sammen med ubehandlede celler. Etter 24 timer farges cellene med trypanblå og telles i mikroskop. Prosent celledød beregnes fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler (figur 3.6). På grunn av stor spredning i resultatene ble det valgt å regne celledødstallet som prosent av celledød induert av PAC-1. Ut ifra dette ble gjennomsnittet av de normaliserte dataene beregnet (figur 3.7a).

Resultatene viser at PAC-1 gir signifikant økning i celledød i forhold til DMSO og ubehandlet kontroll (figur 3.7a). Resultatene viser også en signifikant reduksjon i celledød når vekstfaktor tilsettes 0 timer etter PAC-1-eksponering (figur 3.7b) og en signifikant reduksjon i celledød når vekstfaktor og caspase-3-inhibitor tilsettes 4 timer etter PAC-1-eksponering (figur 3.9). For skåler tilsatt vekstfaktor og caspase-3-inhibitor 6 timer etter PAC-1-eksponering er det en tendens til reduksjon i celledød sammenlignet med skåler tilsatt PAC-1 alene, men denne reduksjonen er ikke signifikant.



### Kyllingkornceller, t = 0

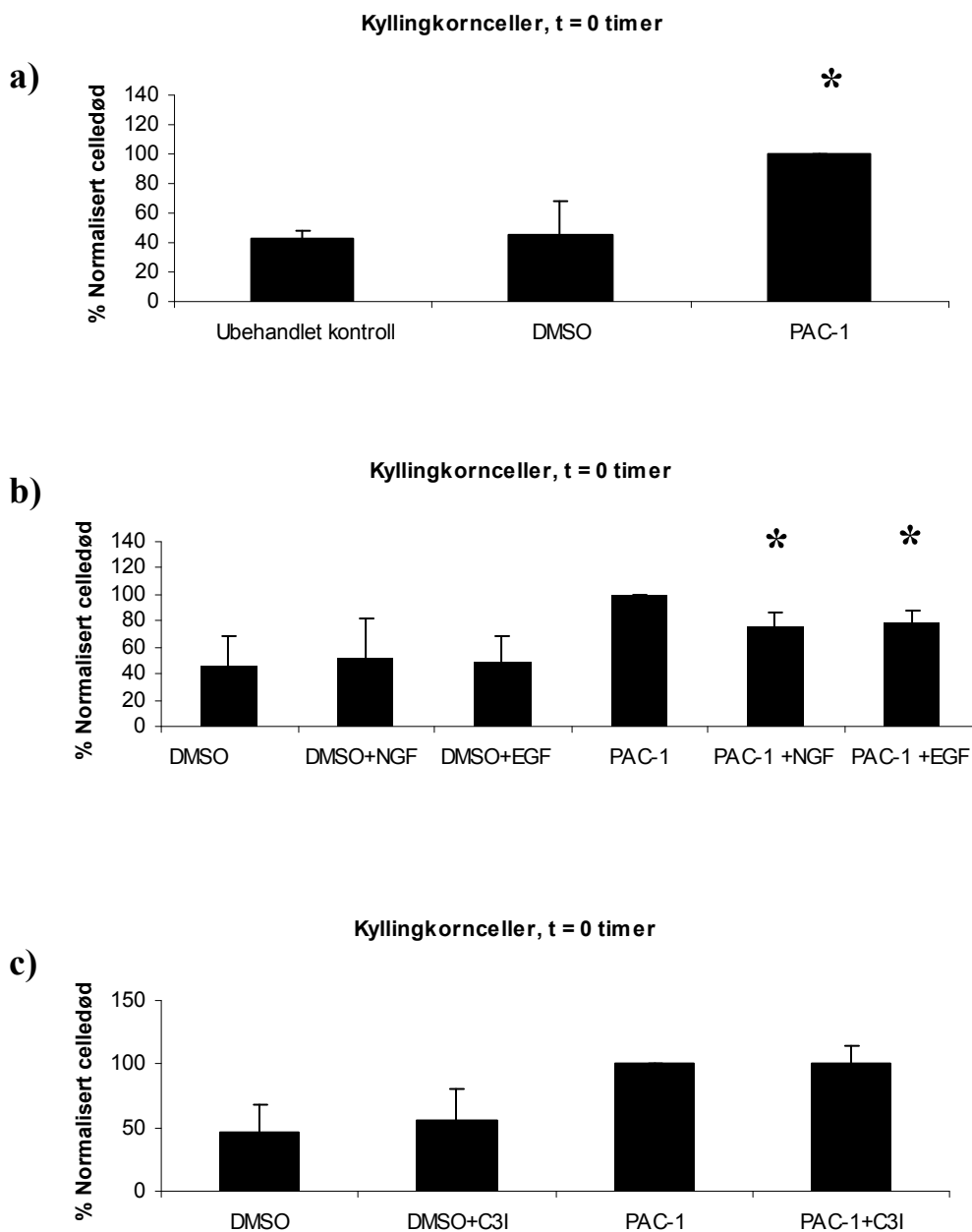


**Figur 3.6: Prosent celledød i kyllingkornceller eksponert for DMSO eller PAC-1.**

Etter utplating ble kyllingkorncellene inkubert i 72 timer. Cellene ble eksponert for 1,65  $\mu\text{L}$  DMSO og 50  $\mu\text{M}$  PAC-1. 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Prosent celledød er beregnet fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatet er fra 5 observasjoner i 4 uavhengige forsøk.\* viser en signifikant økning i celledød i PAC-1-eksponerte kyllingkornceller sammenlignet med DMSO-eksponerte celler og ubehandlede celler. Stolpediagrammet er basert på rådata (tabell 3.8).

**Tabell 3.8: Tallmateriale til figur 3.6:** Tallene er avrundet til to desimaler.

Eksponering	Gjennomsnittlig % celledød	Standardavvik	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	1,98	15,34	5	4
DMSO	9,70	13,67	5	4
PAC-1	45,12	25,43	5	4



**Figur 3.7a-c: NGF, EGF, og C3I tilsatt kyllingkornceller eksponert for PAC-1.**

Etter utplating ble kyllingkorncellene inkubert i 72 timer. Cellene tilsettes så for 1,65  $\mu$ L DMSO og 50  $\mu$ M PAC-1 (figur a), 1,65  $\mu$ L DMSO og 50  $\mu$ M PAC-1 tilsatt 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF (figur b) eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor (figur c). 24 timer etter eksponering, ble cellene farget med trypanblå og levende og døde celler telt i mikroskop. Celledød er oppgitt i prosent av totalt antall celler. Resultatene er fra 5 observasjoner i 4 uavhengige forsøk. \* viser en signifikant reduksjon i celledød i PAC-1-eksponerte celler sammenlignet med ubehandlede celler og celler eksponert med DMSO (figur a). \* viser også en signifikant reduksjon i celledød i PAC-1-eksponerte celler tilsatt vekstfaktor sammenlignet med celler tilsatt PAC-1 alene. Stolpediagrammene er basert på normaliserte data (tabell 3.9, tabell 3.10, og tabell 3.11).

**Tabell 3.9 Normalisert tallmateriale til figur 3.7a:** Tallene er avrundet til to desimaler.

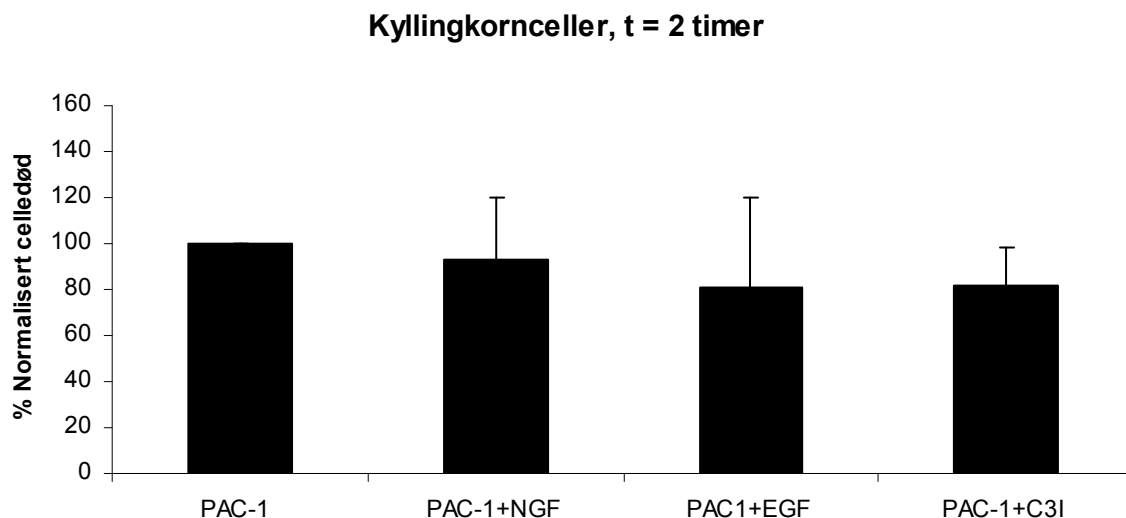
<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig % celledød</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
Ubehandlet	42,97	5,65	5	4
DMSO	45,65	22,75	5	4
PAC-1	100	0	5	4

**Tabell 3.10 Normalisert tallmateriale til figur 3.7b:** Tallene er avrundet til to desimaler.

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig % celledød</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
DMSO	45,65	22,75	5	4
DMSO+C3I	55,60	24,77	5	4
PAC-1	100	0	5	4
PAC-1+C3I	99,98	14,94	5	4

**Tabell 3.11 Normalisert tallmateriale til figur 3.7c:** Tallene er avrundet til to desimaler.

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnittlig % celledød</b>	<b>Standardavvik</b>	<b>Antall observasjoner totalt</b>	<b>Antall uavhengige forsøk</b>
DMSO	45,65	22,75	5	4
DMSO+NGF	51,66	29,82	5	4
DMSO+EGF	48,43	20,24	5	4
PAC-1	100	0	5	4
PAC-1+NGF	76,63	10,35	5	4
PAC-1+EGF	78,72	8,91	5	4

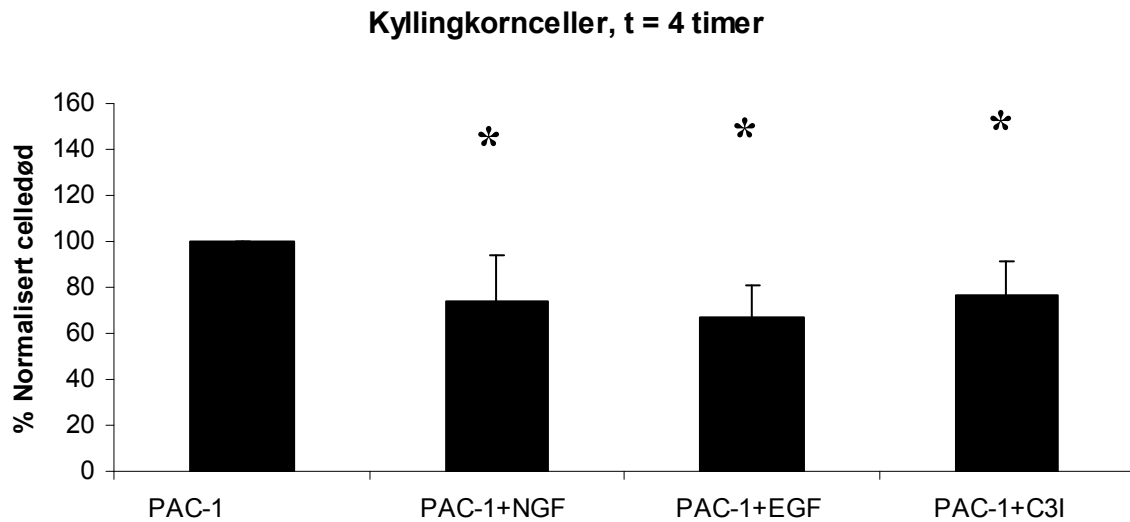


**Figur 3.8:** Normalisert celledød i i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 og tilsatt NGF, EGF og C3I etter 2 timer.

Etter utplating ble kyllingkorncellene inkubert i 72 timer. Cellene tilsettes så 50  $\mu$ M PAC-1. Etter 2 timer tilsettes 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Prosent celledød er beregnet fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er fra 5 observasjoner i 4 uavhengige forsøk. Stolpediagrammet er basert på normaliserte data (tabell 3.12).

**Tabell 3.12** Normalisert tallmateriale til figur 3.8: Tallene er avrundet til to desimaler.

Eksponering	Gjennomsnittlig % celledød	Standardavvik	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1	100	0	5	4
PAC-1+NGF 2t	92,86	26,75	5	4
PAC-1+EGF 2t	81,06	38,73	5	4
PAC1+C3I 2t	82,12	15,93	5	4

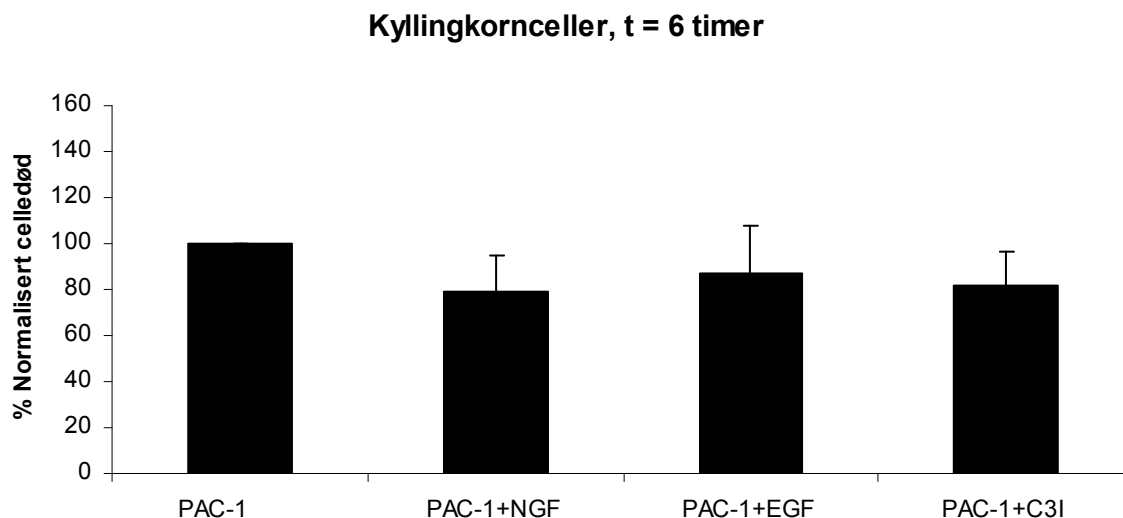


**Figur 3.9: Normalisert celledød i i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 og tilsatt NGF, EGF og C3I etter 4 timer.**

Etter utplating ble kyllingkorncellene inkubert i 72 timer. Cellene tilsettes så 50  $\mu$ M PAC-1. Etter 4 timer tilsettes 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Prosent celledød er beregnet fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er fra 5 observasjoner i 4 uavhengige forsøk. \* viser en signifikant reduksjon i celledød i cellene tilsatt NGF, EGF og caspase-3-inhibitor 4 timer etter PAC-1-eksponering sammenlignet med cellene kun eksponert for PAC-1. Stolpediagrammet er basert på normaliserte data (tabell 3.13).

**Tabell 3.13 Normalisert tallmateriale til figur 3.9:** Tallene er avrundet til to desimaler.

Exponering	Gjennomsnittlig % celledød	Standardavvik	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1	100	0	5	4
PAC-1+NGF 4t	73,54	20,25	5	4
PAC-1+EGF 4t	66,61	14,03	5	4
PAC1+C3I 4t	76,43	14,65	5	4



**Figur 3.10: Normalisert celledød i i kyllingkornceller eksponert for PAC-1 og tilsatt NGF, EGF og C3I etter 6 timer.**

Etter utplating ble kyllingkorncellene inkubert i 72 timer. Cellene tilsettes så 50  $\mu$ M PAC-1. Etter 6 timer tilsettes 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. 24 timer etter eksponering ble cellene farget med trypanblå, og levende og døde celler telt i mikroskop. Prosent celledød er beregnet fra antallet døde celler i forhold til det totale antallet celler. Resultatene er fra 5 observasjoner i 4 uavhengige forsøk. Det er en tendens til reduksjon i celledød i celler tilsatt vekstfaktor og casapase-3-inhibitor, men reduksjonen er ikke signifikant. Stolpediagrammet er basert på normaliserte data (tabell 3.14).

**Tabell 3.14 Normalisert tallmateriale til figur 3.10: Tallene er avrundet til to desimaler.**

Eksposering	Gjennomsnittlig % celledød	Standardavvik	Antall observasjoner totalt	Antall uavhengige forsøk
PAC-1	100	0	5	4
PAC-1+NGF 6t	79,50	15,69	5	4
PAC-1+EGF 6t	87,11	20,44	5	4
PAC1+C3I 6t	81,37	15,11	5	4

### 3.3 ERK OG P-ERK I KYLLINGKORNCCELLER EKSPONERT FOR PAC-1

Det ble gjort forsøk med westernblott for å studere caspase-3's rolle i celledød, og for å avdekke eventuell crosstalk mellom caspasekaskaden og MEK/ERK-signalveien.

Cellekulturskålene ble eksponert for samme konsentrasjoner av PAC-1, vekstfaktorer, og caspase-3-inhibitor som ved celledødsforsøkene utført i kyllingkornceller. PAC-1 er løst i DMSO, og derfor brukes celler eksponert for DMSO uten PAC-1 som kontroller sammen med ubehandlede celler. Cellene ble eksponert og høstet etter 4 eller 6 timer. Det er gjort to forsøk med ERK-antistoff og et forsøk med P-ERK-antistoff. Som kontroll på proteinmengden tilsatt gelen, brukes  $\alpha$ -tubulin som intern standard. Styrken på westernbåndene ble beregnet i programmet ImageJ, ved å dele båndstyrken til de ulike westernbåndene med sine respektive  $\alpha$ -tubulinbånd. En tidligere hovedfagsoppgave har vist at sammenligning av maksimalt antall pixels er det som gir mest lineær sammenheng mellom båndstyrke og konsentrasjon i brønnene (Lindland-Tjønn 2009).

Resultatene tyder på at PAC-1 kan oppregulere ERK (figur 3.14-3.17) nedregulere P-ERK i kyllingkornceller (figur 3.11, figur 3.12 og figur 3.17).



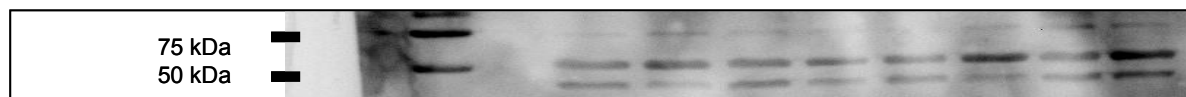
## a) P-ERK

Høstet etter (timer):		6	4	6	4	6	4	6	4	6
PAC-1		-	+	+	+	+	+	+	+	+
NGF		-	-	-	+	+	-	-	-	-
EGF		-	-	-	-	-	+	+	-	-
C3I		-	-	-	-	-	-	-	+	+
	50 kDa									
	37 kDa									

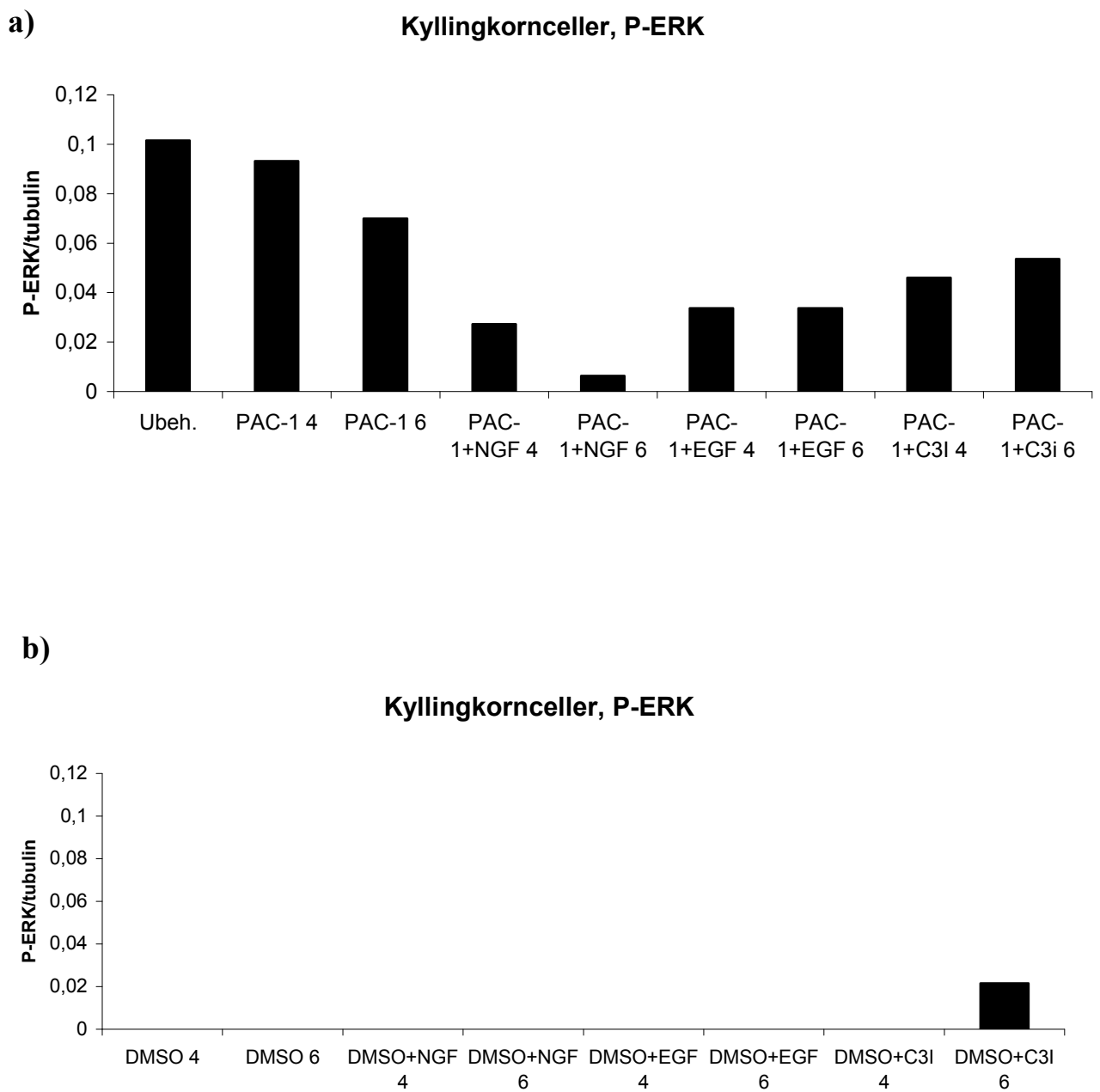
b)  $\alpha$ -tubulin

## c) P-ERK

Høstet etter (timer):		6	4	6	4	6	4	6	4	6
DMSO		-	+	+	+	+	+	+	+	+
NGF		-	-	-	+	+	-	-	-	-
EGF		-	-	-	-	-	+	+	-	-
C3I		-	-	-	-	-	-	-	+	+
	50 kDa									
	37 kDa									

d)  $\alpha$ -tubulin

**Figur 3.11a-d:** Etter utplating ble cellene inkubert i 72 timer. Cellene tilsettes så 50  $\mu$ M PAC-1 eller 1,65  $\mu$ L DMSO og 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. Cellene høstes 4 eller 6 timer etter eksponering. Membranen ble tilsatt P-ERK-antistoff først, deretter strippet og tilsatt  $\alpha$ -tubulin-antistoff. Westernbåndene viser P-ERK med molekylvekt 44/42 kDa (a)(c) og  $\alpha$ -tubulin med molekylvekt 55 kDa (b)(d).



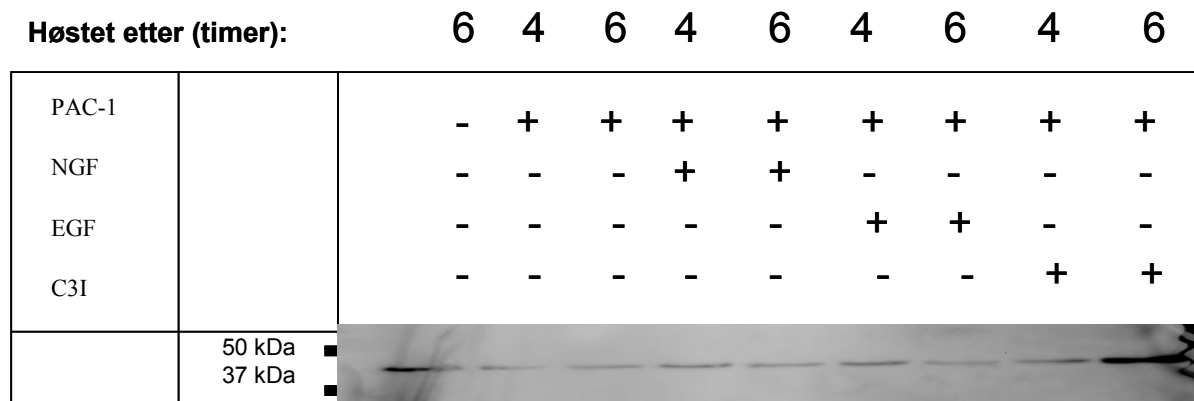
**Figur 3.12ab: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke**

Styrken til westernbåndene i figur 3.11 er målt i antall pixler, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til P-ERK (figur 3.11a og figur 3.11c) og  $\alpha$ -tubulin (figur 3.11b, figur 3.11d og tabell 3.15). Figuren viser P-ERK i ubehandlet kontroll og PAC-1-eksponerte celler tilsatt vekstfaktor eller caspase-3-inhibitor (a), og P-ERK i celler eksponert for DMSO og tilsatt vekstfaktorer eller caspase-3-inhibitor (b).

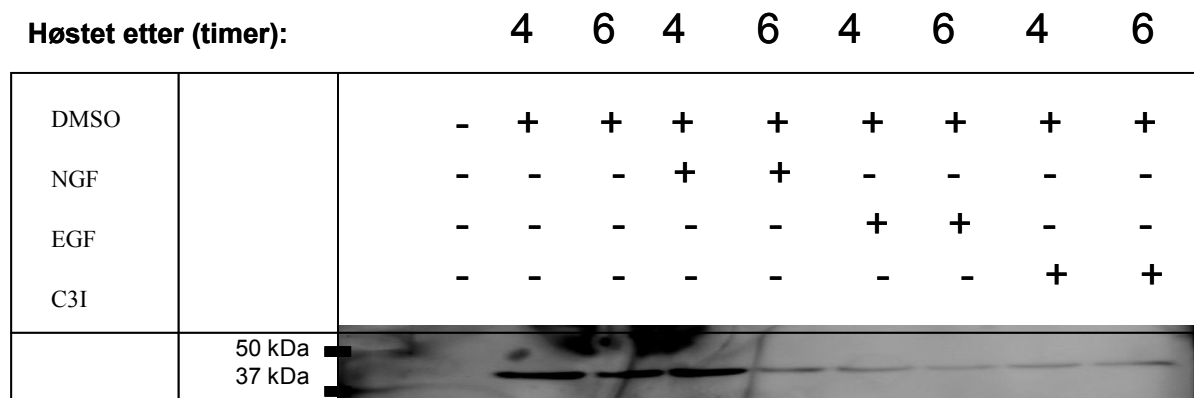
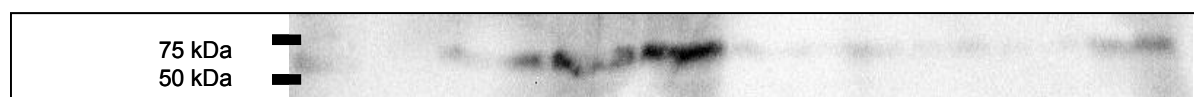
Tabell 3.15 Tallmateriale til figur 3.12ab

<b>Prøve</b>	<b>P-ERK</b>	<b>Bakgrunn</b>	<b><math>\alpha</math>-tubulin</b>	<b>Bakgrunn</b>
Ubehandlet kontroll	158	90	1082	412
PAC-1 4	130	91	676	257,5
PAC-1 6	114	91	566	237
PAC-1+NGF 4	101	90,5	673	288
PAC-1+NGF 6	91	88	775	301,5
PAC-1+EGF 4	105	89	720	244,5
PAC-1+EGF 6	102	88	618	203
PAC-1+C3I 4	118	87	1101	427,5
PAC-1+C3I 6	108	87	921	529
DMSO 4	x	x	x	x
DMSO 6	x	x	x	x
DMSO+NGF 4	x	x	x	x
DMSO+NGF 6	x	x	x	x
DMSO+EGF 4	x	x	x	x
DMSO+EGF 6	x	x	x	x
DMSO+C3I 4	x	x	x	x
DMSO+C3I 6	96	91	620	388,5

## a) ERK

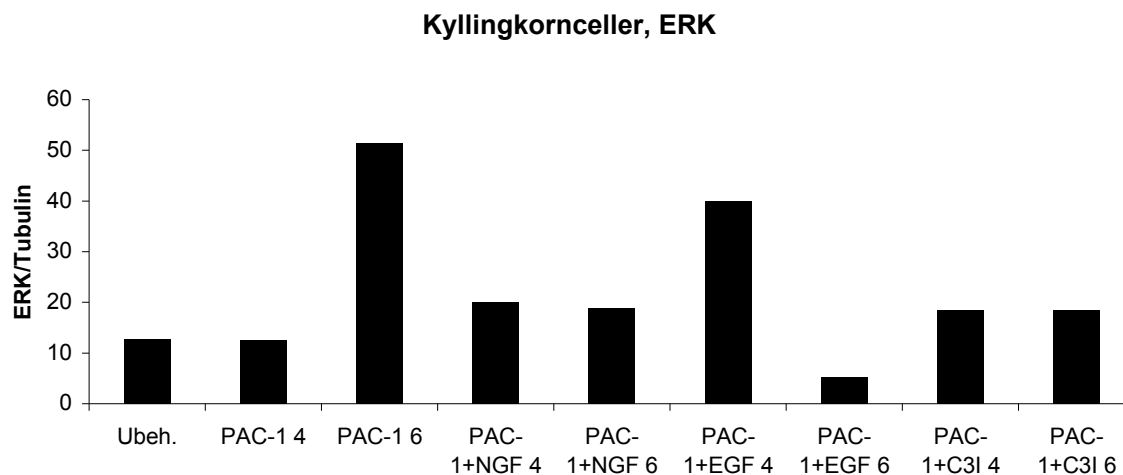
b)  $\alpha$ -tubulin

## c) ERK

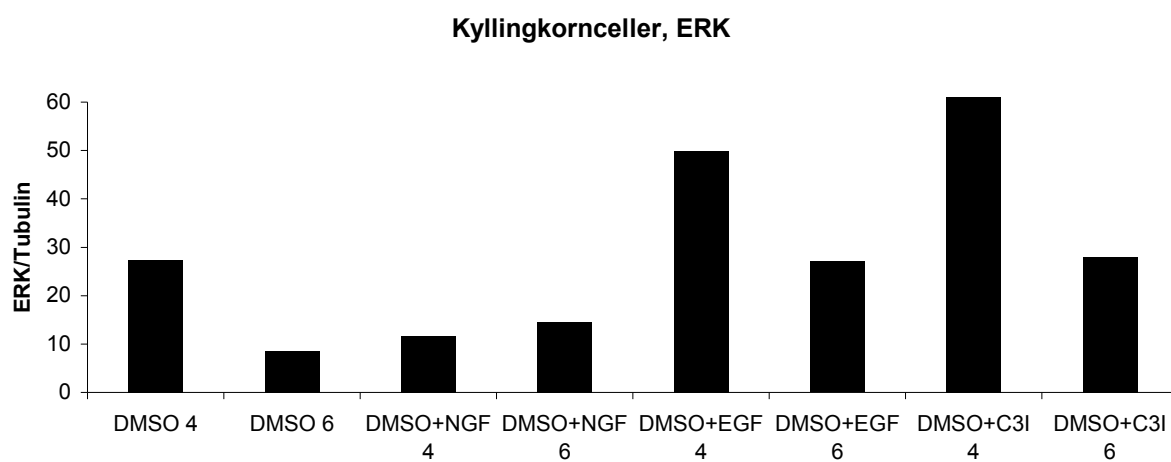
d)  $\alpha$ -tubulin

**Figur 3.13a-d:** Etter utplating ble cellene inkubert i 72 timer. Cellene tilsettes så 50  $\mu$ M PAC-1 eller 1,65  $\mu$ L DMSO og 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. Cellene høstes 4 eller 6 timer etter eksponering. Membranen ble tilsatt ERK-antistoff først, deretter strippet og tilsatt  $\alpha$ -tubulin-antistoff. Westernbåndene viser ERK med molekylvekt 44/42 kDa (a)(c) og  $\alpha$ -tubulin med molekylvekt 55 kDa (b)(d).

a)



b)



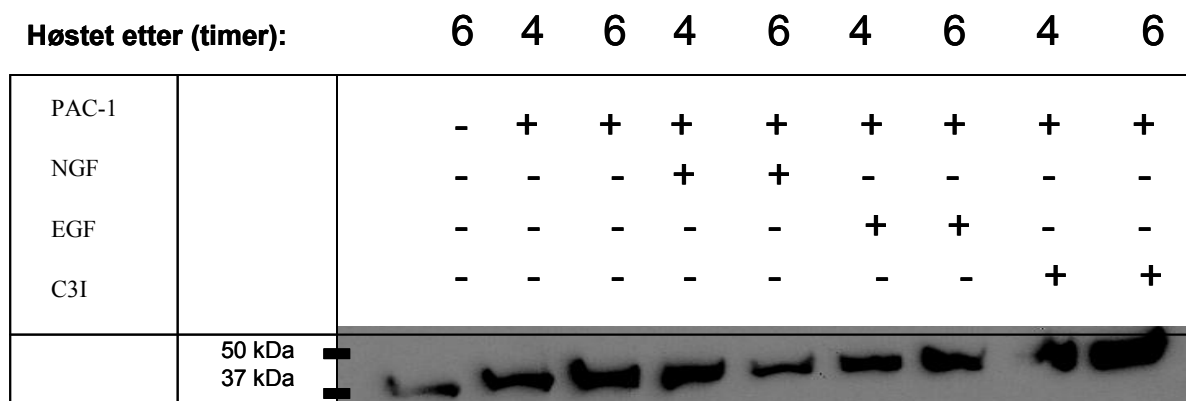
**Figur 3.14ab: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke**

Styrken til westernbåndene i figur 3.13 er målt i antall pixler, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til ERK (figur 3.13a og figur 3.13c) og  $\alpha$ -tubulin (figur 3.13b, figur 3.13d og tabell 3.16). Figuren viser ERK i ubehandlet kontroll og PAC-1-eksponerte celler tilsatt vekstfaktor eller caspase-3-inhibitor (a), og ERK i celler eksponert for DMSO og tilsatt vekstfaktorer eller caspase-3-inhibitor (b).

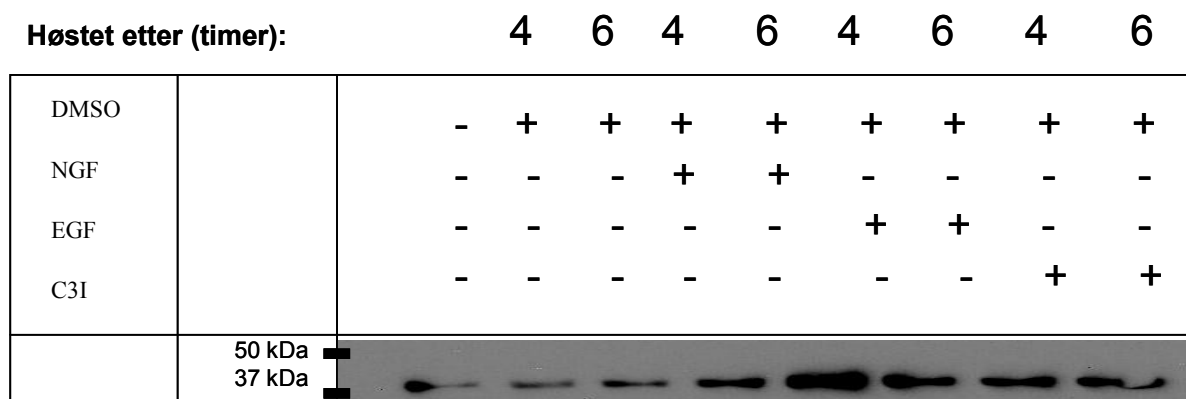
Tabell 3.16 Tallmateriale til figur 3.14ab

Prøve	ERK	Bakgrunn	$\alpha$ -tubulin	Bakgrunn
Ubehandlet kontroll	3737	1972	267	165
PAC-1 4	2036	1119	167	122,5
PAC-1 6	1741	1254,5	124	104,5
PAC-1+NGF 4	2040	1189	156	113,5
PAC-1+NGF 6	1779	1223	138	108,5
PAC-1+EGF 4	2268	1387,5	125	103
PAC-1+EGF 6	1800	1544	165	115,5
PAC-1+C3I 4	2745	1722,5	182	126,5
PAC-1+C3I 6	3739	2555,5	207	143
DMSO 4	3739	2437,5	161	113,5
DMSO 6	3739	3181,5	187	121,5
DMSO+NGF 4	3739	2735,5	205	119,5
DMSO+NGF 6	2728	2304,5	120	91
DMSO+EGF 4	2399	1652	111	96
DMSO+EGF 6	1851	1539,5	104	92,5
DMSO+C3I 4	1969	1458	99	94,5
DMSO+C3I 6	2719	1909	140	111

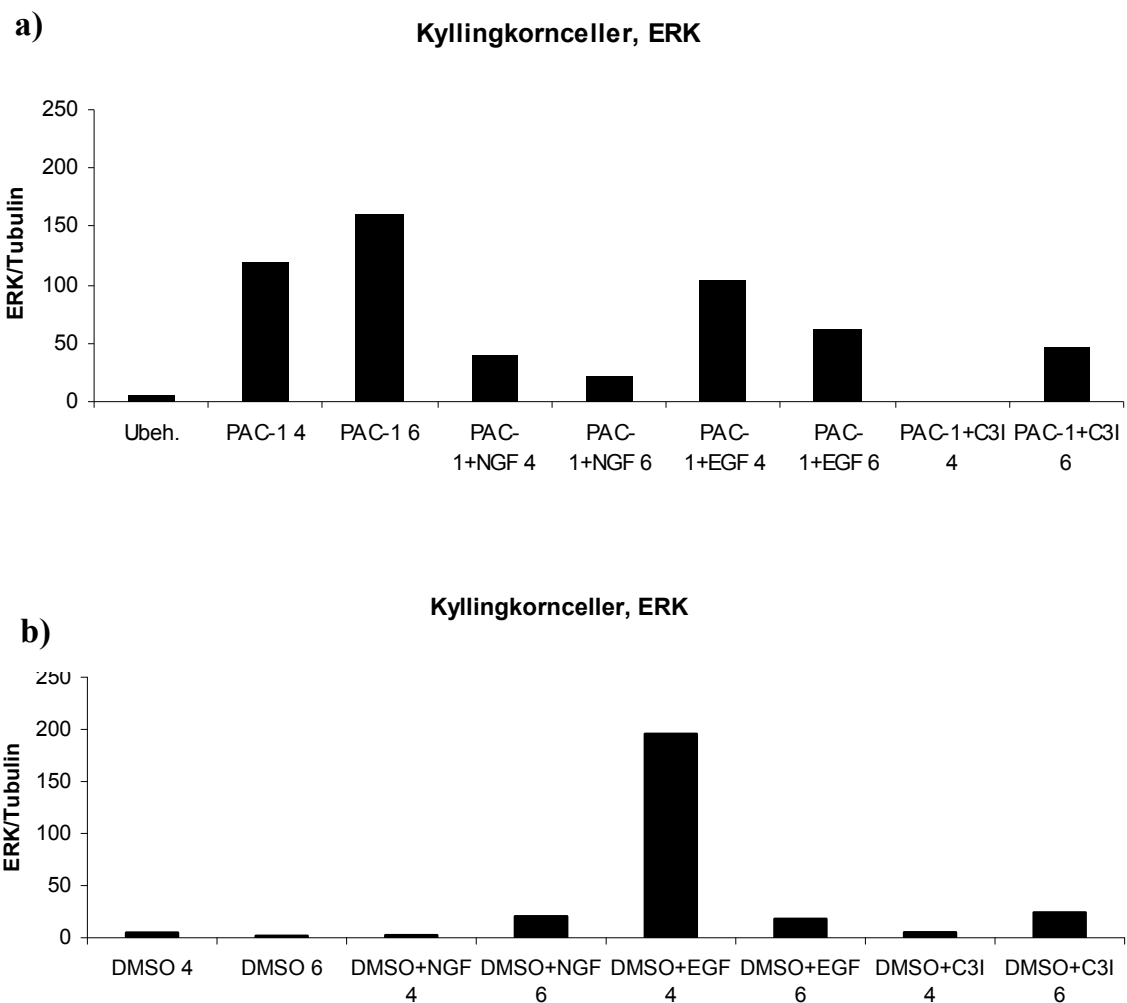
## a) ERK

b)  $\alpha$ -tubulin

## c) ERK

d)  $\alpha$ -tubulin

**Figur 3.15a-d:** Etter utplating ble cellene inkubert i 72 timer. Cellene tilsettes så 50  $\mu$ M PAC-1 eller 1,65  $\mu$ L DMSO og 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor. Cellene høstes 4 eller 6 timer etter eksponering. Membranen ble tilsatt ERK-antistoff først, deretter strippet og tilsatt  $\alpha$ -tubulin-antistoff. Westernbåndene viser ERK med molekylvekt 44/42 kDa (a)(c) og  $\alpha$ -tubulin med molekylvekt 55 kDa (b)(d).



**Figur 3.16ab: Grafisk fremstilling av westernbåndstyrke**

Styrken til westernbåndene i figur 3.15 er målt i antall pixler, og fremstilt som ratioen mellom båndstyrken til ERK (figur 3.15a og figur 3.15c) og  $\alpha$ -tubulin (figur 3.15b, figur 3.15d og tabell 3.17). Figuren viser ERK i ubehandlet kontroll og PAC-1-eksponerte celler tilsatt vekstfaktor eller caspase-3-inhibitor (a), og ERK i celler eksponert for DMSO og tilsatt vekstfaktorer eller caspase-3-inhibitor (b).



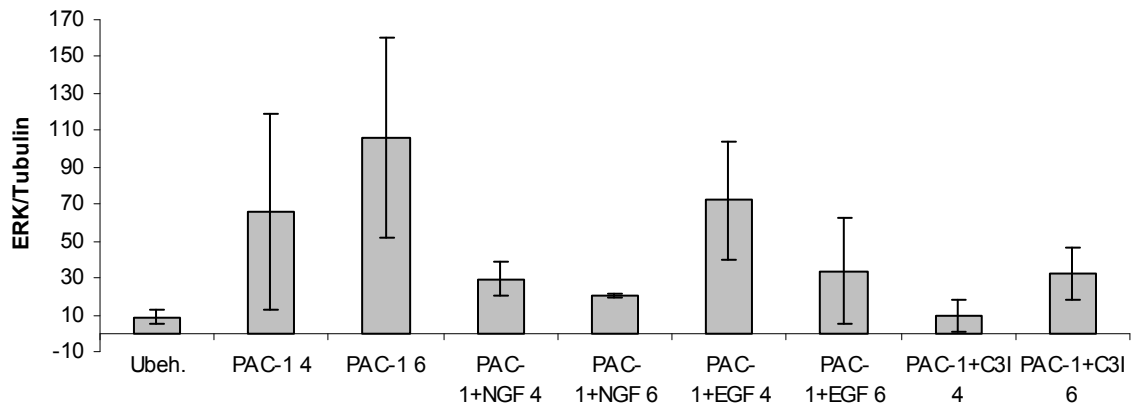
---

**Tabell 3.17 Tallmateriale til figurene 3.16a og 3.16b**

<b>Prøve</b>	<b>ERK</b>	<b>Bakgrunn</b>	<b><math>\alpha</math>-tubulin</b>	<b>Bakgrunn</b>
Ubehandlet kontroll	274	119	167	135,5
PAC-1 4	544	127	131	127,5
PAC-1 6	1086	123,5	131	125
PAC-1+NGF 4	817	117	132	114
PAC-1+NGF 6	324	119	128	118,5
PAC-1+EGF 4	536	119,5	135	131
PAC-1+EGF 6	679	119,5	149	140
PAC-1+C3I 4	858	121	1380	153
PAC-1+C3I 6	1912	136,5	202	164
DMSO 4	746	127,5	287	160,5
DMSO 6	193	136,5	161	130
DMSO+NGF 4	276	122	200	133,5
DMSO+NGF 6	580	119,5	126	103,5
DMSO+EGF 4	1989	131	98	88,5
DMSO+EGF 6	1388	118,5	204	134
DMSO+C3I 4	693	115,5	257	146,5
DMSO+C3I 6	672	125,5	137	114,5

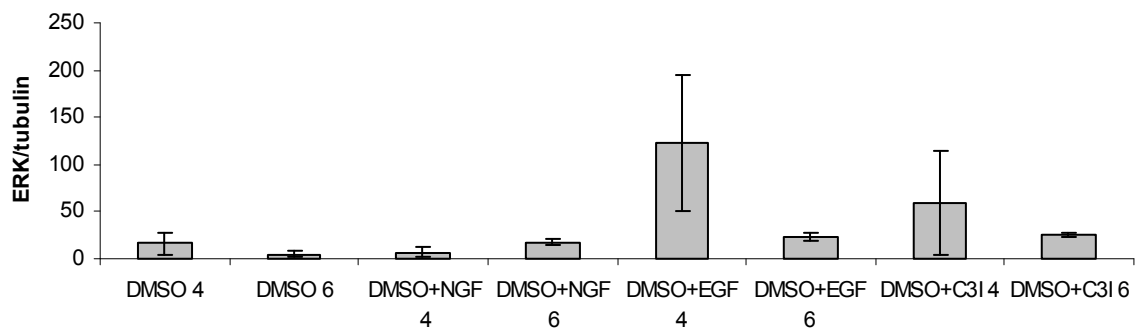
a)

## Kyllingkornceller, ERK



b)

## Kyllingkornceller, ERK



**Figur 3.17ab: Grafisk fremstilling av gjennomsnittlig westernbåndstyrke**

Figuren viser gjennomsnittet av westernbåndstyrken målt for de to westernblottene utført med ERK. Figuren viser gjennomsnittlig ERK i ubehandlet kontroll og PAC-1-eksponerte celler tilsatt vekstfaktor eller caspase-3-inhibitor (a), og ERK i celler eksponert for DMSO og tilsatt vekstfaktorer eller caspase-3-inhibitor (b). Linjene for feilfelt viser høyeste og laveste målte verdi.

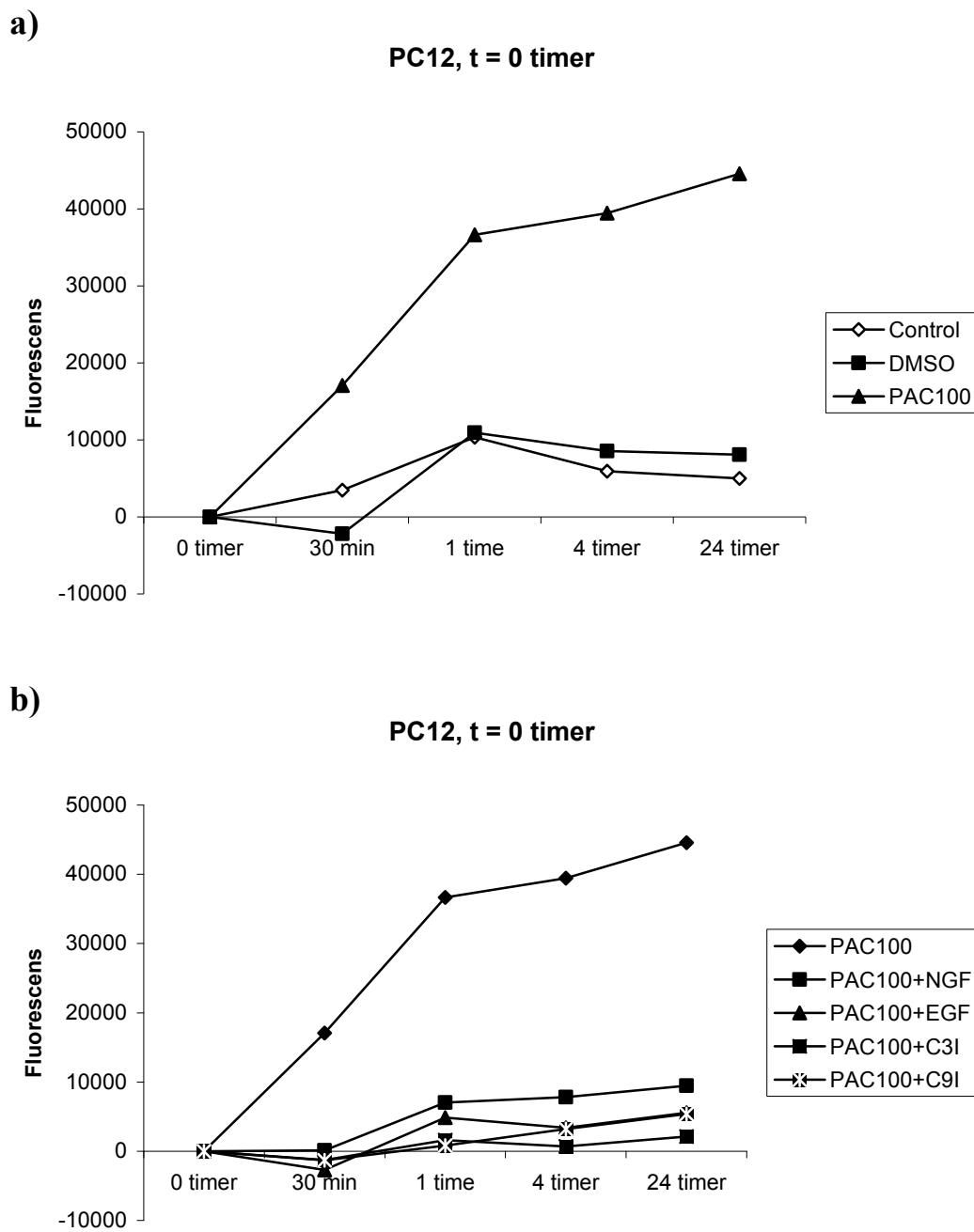
### 3.4 CASPASEAKTIVITET I PC12-CELLER

Det er i avsnitt 3.1 demonstrert at PAC-1 dreper PC12-celler. Derfor var det ønskelig å finne ut i hvilken grad caspase-3 aktiveres og om dette bidrar til PAC-1's evne til å drepe celler. Det var også ønskelig å finne ut om dette skyldes en direkte aktivering av caspase-3, eller om aktiveringen skjer via caspase-9. Det er derfor utført både caspase-3- og caspase-9-assay. Caspase-9-assay var ikke tidligere forsøkt i forskningsgruppen, og det var uvisst om det ville gi resultater. For å studere eventuell crosstalk med MEK/ERK-signalveien er cellene eksponert for vekstfaktorer og caspaseinhibitorer tilsatt 0 timer etter PAC-1/DMSO-eksponering for caspase-9-assay og 0 eller 2 timer etter PAC-1/DMSO-eksponering for caspase-3-assay.

Det gjort to forsøk der caspaseaktiviteten til caspase-3 og caspase-9 er målt etter 30 minutter, 1 time, 4 timer og 24 timer etter tilsetning av caspasesubstrat og caspaseinhibitor. Et caspase-3-assay ble sett bort ifra siden caspase-inhibitoren her ikke så ut til å ha fungert.

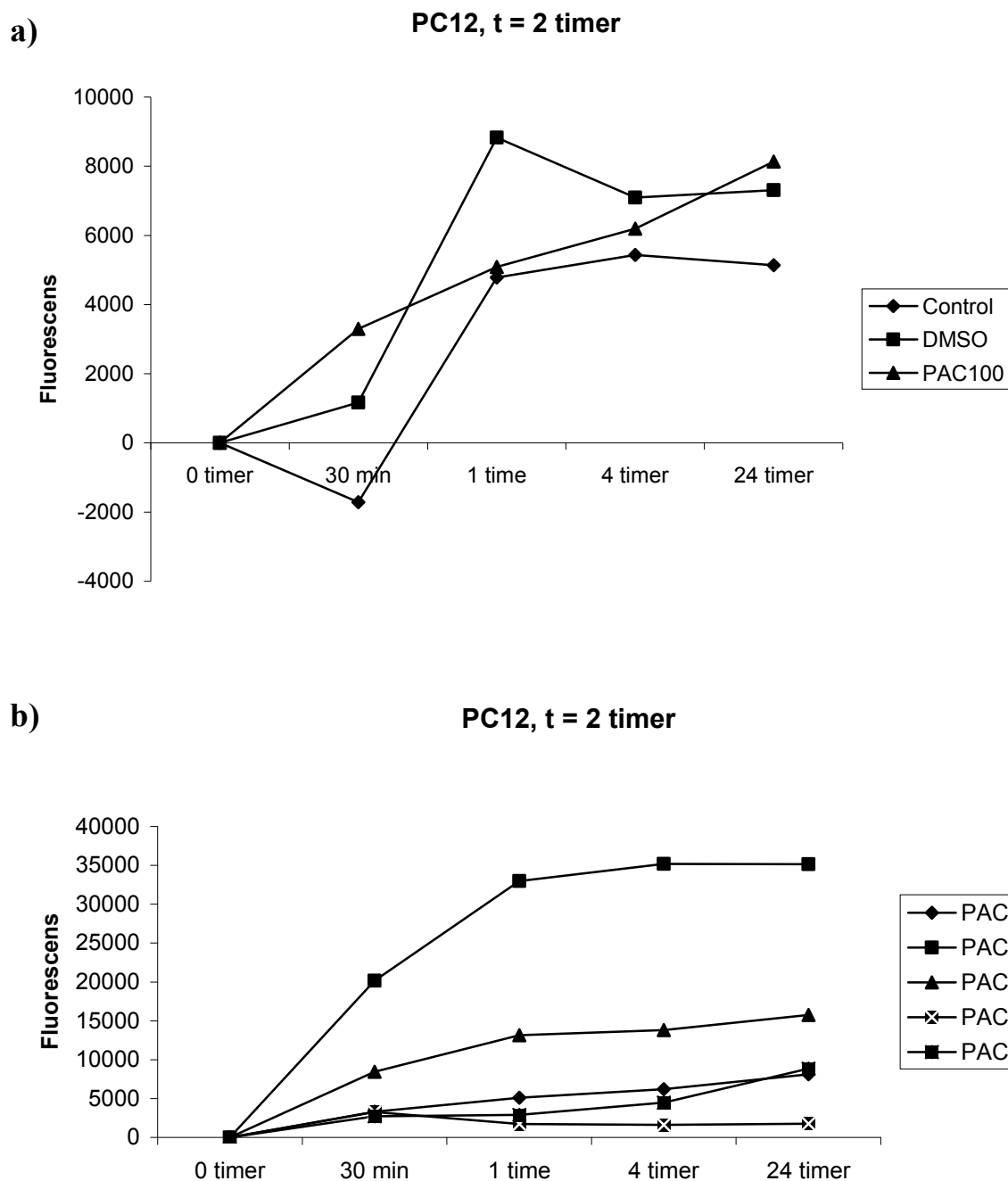
Resultatene viser en mye større caspase-3-aktivitet i brønner tilsatt PAC-1 alene sammenlignet med brønner tilsatt vekstfaktor og caspase-3-inhibitor samtidig og 2 timer etter PAC-1-eksponering (figur 3.18 og 3.19).

Staurosporin ble bruke som positiv kontroll i caspaseassayene. Brønnene tilsatt staurosporin viste vesentlig større caspase-3 og -9-aktivitet etter 4 timer, sammenlignet med ubehandlede celler og celler tilsatt enten DMSO eller PAC-1 (figur 3.20).



**Figur 3.18ab: Grafisk fremstilling av caspase-3-aktivitet over tid**

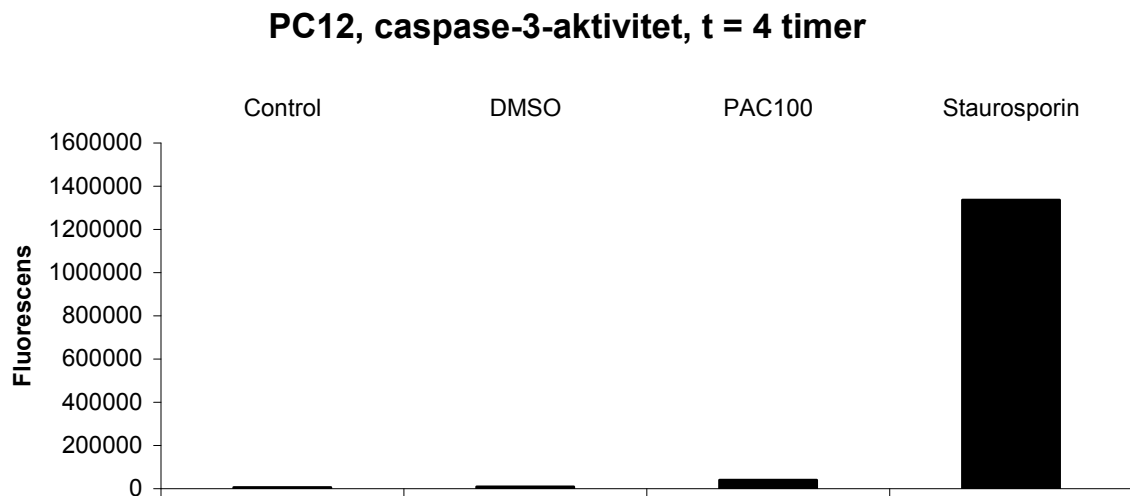
Cellene splittes til 96 brønns Brett og inkuberes i 24 timer før eksponering med 100  $\mu$ M PAC-1 eller 3,3  $\mu$ L DMSO (a) og 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu$ M caspase-3-inhibitor eller 20  $\mu$ M caspase-9-inhibitor (b). 4 timer etter PAC-1/DMSO-eksponering ble det tilsatt RIPA-buffet, caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor. Fluorescens ble målt i plateleser ved 485/535 nm etter 30 minutter, 1 time, 4 timer og 24 timer.



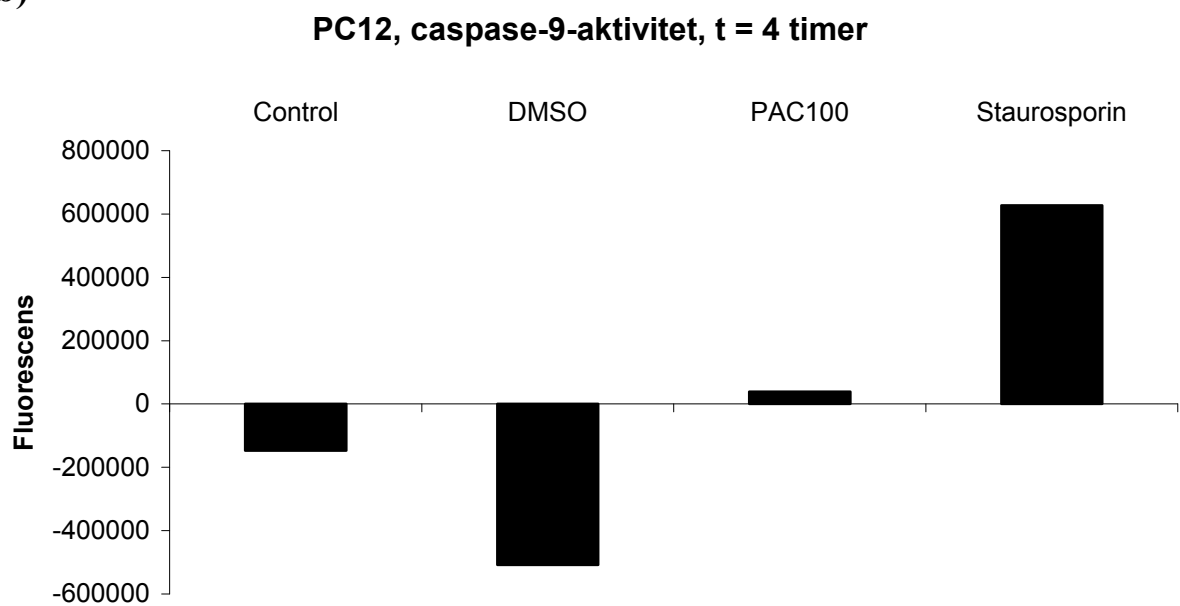
**Figur 3.19ab: Grafisk fremstilling av caspase-3-aktivitet over tid**

Cellene splittes til 96 brønns Brett og inkuberes i 24 timer før eksponering med 100  $\mu\text{M}$  PAC-1 eller 3,3  $\mu\text{L}$  DMSO (a). Etter 2 timer ble cellene tilsatt 50 ng/ml NGF eller 5 ng/ml EGF eller 1  $\mu\text{M}$  caspase-3-inhibitor eller 20  $\mu\text{M}$  caspase-9-inhibitor (b). 4 timer etter PAC-1/DMSO-eksponering ble det tilsatt RIPA-buffert, caspase-3-substrat og caspase-3-inhibitor. Fluorescens ble målt i plateleser ved 485/535 nm etter 30 minutter, 1 time, 4 timer og 24 timer.

a)



b)



**Figur 3.20ab: Grafisk sammenligning av caspase-3- og 9-aktivitet**

Figurene viser caspase-3-aktivitet målt etter 4 timer i ubehandlede PC12-celler, og PC12-celler tilsatt DMSO, PAC-1 eller Staurosporin a), og caspase-9-aktivitet målt etter 4 timer i ubehandlede PC12-celler, og PC12-celler tilsatt DMSO, PAC-1 eller Staurosporin (b).

---

## 4. DISKUSJON

### 4.1 DISKUSJON AV METODER

#### 4.1.1 Cellemodeller til studier av celledød

I denne oppgaven er det benyttet PC12-celler og kyllingkornceller. Disse to celletypene har ulike egenskaper og dette gir både fordeler og ulemper.

PC12-celler stammer fra et feokromocytom i rottebinyre og har ved normale vekstforhold tilsvarende egenskaper som rottenes umodne adrenale kromaffinceller (Adler, Gough et al. 2006). PC12-celler er godt egnet til studier av celledifferensiering siden det er få vekstfaktorer og hormoner de ikke responderer på, og at distinkte responser på differensiering, proliferasjon, og overlevelse kan vurderes uavhengig (Greene and Tischler 1976). Siden PC12-celler differensiert med NGF ligner sympatiske neuroner, kan PC12-celler brukes som en lett dyrkbar eksperimentell modell for sympatiske neuroner. I denne oppgaven er det brukt udifferensierte PC12-celler. Som en cellelinje har PC12-celler tilpasset seg livet i kultur, og kan splittes videre i årevis. På laben erstattes cellelinjen med nye celler fra PC12-stock etter 50 passasjer. I motsetning til primærkulturer som er høstet fra dyr, kan klonale cellelinjer som PC12-celler gi en mer homogen kilde av cellemateriale i mer eller mindre uendelige mengder uten å måtte avlive mange dyr. En ulempe med PC12-celler er at de er tilpasset livet i kultur og kan ha mistet noen av de originale egenskapene knyttet til celledifferensiering som vi finner hos normale celler, og at de nå ligner mer på kreftceller eller transformerte celler. Resultater oppnådd med PC12-celler vil dermed ikke gjenspeile forholdene in vivo i like stor grad som en primærkultur (Adler, Gough et al. 2006). Flere studier viser at apoptose kan medieres av caspase-3 i PC12-celler (Takadera and Ohyashiki 1997; Yoshimura, Banno et al. 1998; Gao, Zhou et al. 2005). PC12-celler er en av cellelinjene der PAC-1 induserer celledød i modeller på kreft (Putt, Chen et al. 2006). Det er vist at PAC-1's celledrepende egenskaper involverer molekylets evne til å binde opp antiapoptotiske zinkioner (Peterson, Goode et al. 2009). Zink har en meget viktig funksjon i cellevekst og differensiering (MacDonald 2000). Dette betyr at den celledrepende effekten til

PAC-1 på PC12-celler også kan skyldes en forstyrrende effekt på cellesyklus og ikke direkte caspase-3-aktivering alene.

Kyllingkornceller som modell for studier av neuronal differensiering og død er et alternativ til rottekornceller som er avhengig av et depolarisert kulturmiljø, kostbar dyrking, og utstyr og tillatelse til dyrehold (Jacobs, Aden et al. 2006). Kyllingkornceller er en primærkultur og vil kunne gjenspeile forhold in vivo i større grad enn PC12-celler og andre cellelinjer.

Ulempen med kyllingkornceller er at de alle kommer fra kyllingembryoer fra ulike mødre og dermed har ulike genetiske egenskaper. Dette kan bidra til variasjoner i resultater fra like forsøk utført med kyllingkornceller fra ulike prepareringer. Kyllingkornceller uttrykker procaspase-3, og aktivering leder til apoptose (Jacobs, Aden et al. 2006). Kyllingkornceller er umodne neuroner. Caspase-3 har en meget viktig rolle i utviklingen av sentralnervesystemet, og umodne neuroner uttrykker procaspase-3 i større grad enn modne neuroner. Dette betyr at resultatene med PAC-1 på kyllingkornceller ikke nødvendigvis gjenspeiler en effekt på modne neuroner (Gulzeb, manuskript). De umodne kyllingkorncellene dyrkes i cytotoksisk Ara-C som hemmer cellesyklus. De gjør det dermed mulig å studere PAC-1's dødelige effekt uavhengig av cellesyklus, og hvor mye av denne effekten som skyldes aktivering av caspase-3.

#### **4.1.2 Metoder for kvantifisering av celledød**

Farging med trypanblå for å kvantifisere celledød er en metode som baserer seg på at celledødsprosessen forårsaker en endring i cellemembranens permeabilitet. Trypanblå er et hydrofilt stoff som ikke passerer den lipofile cellemembranen til levende celler. Derfor vil den brutte cellemembranen til døde celler føre til at trypanblå farger disse blå, mens den intakte cellemembranen til levende celler gjør at disse ikke farges. Manuell celledøds telling etter trypanblåfarging er tidkrevende men gir også viktig morfologisk informasjon om cellene som telles. Dette er spesielt nyttig i forsøk med cellekulturer der det kan være ulike celletyper representert (Aras, Hartnett et al. 2008) som tilfellet er med kyllingkorncellekulturer. Derfor er farging med trypanblå godt egnet til kvantifisering av celledød i denne oppgaven. Telling av trypanblåfargede kyllingkornceller kan tidvis være vanskelig på grunn av cellenes diffuse struktur og at skålene også vil inneholde andre fargede celler. Problemet med



---

trypanblåfarging og telling av fargede celler er at noen celler kan være døende men fortsatt ha en intakt cellemembran. Disse cellene vil ikke farges og blir ikke telt. Telling av fargede celler i mikroskop er dessuten en subjektiv vurdering og små mengder trypanblå som har farget døde celler kan oversees (Strober 2001). En annen metode for å måle celletall er MTT-analyse som bruker et spektrofotometer til å detektere graden av mitokondriell aktivitet i levende celler (Aras, Hartnett et al. 2008). Denne metoden ble valgt bort til fordel for trypanblåfarging siden en tidligere masteroppgave slet med å få reproduerbare resultater med MTT i PC12-celler (Lindland-Tjønn, 2009). Metoden lar seg også lett påvirke av celledeling, og den gir ikke morfologisk informasjon som er viktig i tellingen av kyllingkorncellene. En tredje metode, propidiumiodid, ble valgt bort fordi denne metoden er kostbar, krever fluorescensmikroskop, og fordi propidiumiodid har mutagene egenskaper som gjør at det kreves spesielle forholdsregler (Aras, Hartnett et al. 2008).

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

Westernblott er en metode som gjør det mulig å detektere og kvantifisere individuelle proteiner i en celleprøve. Siden westernmembranen kan strippes og påføres nye antistoffer, kan flere proteiner i samme celleprøve detekteres og kvantifiseres, og gjør denne metoden godt egnet til studier av proteiner involvert i celledøds-signaler (Tovey, Ford et al. 1987). Siden et av fokusene til denne oppgaven er celledøds-signaler, er westernblott dermed en godt egnet metode for denne oppgaven. Westernblott er tidkrevende, trenger mange ulike løsninger og selve prosedyren har mange steg. Dette gjør metoden sårbar for feil under gjennomføring som kan føre til dårlige og/eller varierende resultater.

Med caspaseassay kan caspaser detekteres og kvantifiseres. Siden oppgaven bruker PAC-1, som er rapportert å aktivere caspase-3, er caspaseassay en mulighet til å undersøke om PAC-1 aktiverer caspase-3 direkte. Ved bruk av caspase-9-inhibitor kan det undersøkes om denne aktiveringen skjer via caspase-9. Caspaseassay kan også fortelle om PAC-1's caspaseaktiverende effekt kan blokkeres med vekstfaktor. Det er vist at caspasesubstrater og caspaseinhibitorer for caspase-3 og -9 kan interagere med andre caspaser. Det er vist at caspase-8 kan kløyve caspase-9-, men ikke caspase-3-substratet, og dette kan dermed

feilaktig tolkes som caspase-9-aktivitet. Det er også en viss overlappende effekt mellom caspase-3 og -7-substrater på grunn av enzymenes store likhet (Pereira and Song 2008).

## 4.2 DISKUSJON AV BIOLOGISKE FUNN

### 4.2.1 PAC-1-indusert celledød i PC12-celler og kyllingkornceller

Resultatene viser at PAC-1 gir en signifikant økning i celledød i både PC12-celler og kyllingkornceller. At PAC-1 dreper PC12-celler er i tråd med den originale rapporten om PAC-1's celledøpende egenskaper (Putt, Chen et al. 2006) og resultater fra en tidligere masteroppgave (Rimul, 2007). PAC-1 ble lansert som en direkte caspase-3-aktivator, og PAC-1's evne til å drepe celler er vist å øke i takt med konsentrasjonen av procaspase-3 i de eksponerte cellene (Putt, Chen et al. 2006). En studie utført på MCF7-celler, en celletype som ikke uttrykker procaspase-3, har vist at PAC-1 dreper disse cellene med en tilsvarende effektivitet som procaspase-3-uttrykkende celler (Denault, Drag et al. 2007). Dette sammen med forskning som har vist at PAC-1 kan aktivere caspase-3 ved å binde opp antiapoptotiske zinkioner (Peterson, Goode et al. 2009), viser at PAC-1's fulle virkningsmekanisme ikke er helt kartlagt.

Resultatene viser at aktivering av caspase-3 kan være en del av PAC-1's virkningsmekanisme siden caspase-3-inhibitor (1 $\mu$ M) tilsatt 2 timer etter PAC-1-eksponering gir signifikant reduksjon i celledød i PC12-celler. Det er også en signifikant reduksjon i celledød i kyllingkorncellene eksponert for PAC-1 og tilsatt caspase-3-inhibitor 4 timer senere. Denne beskyttende effekten er større i kyllingkornceller i forhold til PC12-celler med henholdsvis 24 mot 12 % gjennomsnittlig reduksjon av celledød. Et av caspase-3-assayene i PC12-cellene viste en vesentlig reduksjon i caspase-3-aktivitet i brønner tilsatt caspase-3-inhibitor (1 $\mu$ M) etter 0 og 2 timer. Både assays utført for caspase-3 og -9 viser at PAC-1 gir vesentlig dårligere caspaseaktivitet enn den uspesifikke caspasehemmeren staurosporin, noe som tilsier at PAC-1 ikke er en effektiv aktivator av både caspase-3 og -9. Hemming av apoptose med caspaseinhibitorer kan få celler til å undergå nekrose (Vandenabeele, Vanden Berghe et al. 2006), noe som kan ha påvirket resultatene i celledødsforsøkene med caspase-3-inhibitor. Det er vist at mange caspasesubstrater og caspaseinhibitorer ikke er helt selektive for sine respektive caspaser noe som gir en viss usikkerhet i resultatene der disse er brukt.

---

Det er blandt annet kjent at substrater og inhibitorer av caspase-3 kan ha problemer med å skille mellom caspase-3 og caspase-7 (Pereira and Song 2008). Det er også vist at PAC-1 til en viss grad aktiverer caspase-7 (Putt, Chen et al. 2006). Dermed kan det kan ikke utelukkes at noe celledød kan være forårsaket av caspase-7-aktivering.

Når caspase-3-inhibitor gir en signifikant reduksjon i celledød tilsatt på ulike tidspunkter etter PAC-1-eksponering i PC12-celler og kyllingkornceller, kan dette tyde på at celledødsmechanismene i disse to celletypene ikke er helt like. Resultatene fra celledødsforsøkene viser at PAC-1 gir nesten samme gjennomsnittlige celledød i kyllingkornceller som for PC12-celler, selv om konsentrasjonen av PAC-1 i kyllingkorncellene er halvparten av konsentrasjonen i PC12-cellene. En tidligere hovedfagsoppgave har vist samme resultat i rottekornceller (Lindland-Tjønn 2009). Dette kan tyde på at neuroner er mer sensitive for PAC-1 enn ikkeneuronal celler. Dette gir ikke en god forklaring på hvorfor caspase-3-inhibitor først gir en signifikant reduksjon i celledød tilsatt 4 timer etter PAC-1-eksponering i kyllingkornceller. Samme resultat ble rapportert av Lindland-Tjønn for rottekornceller (Lindland-Tjønn 2009). En studie har vist at caspase-3-inhibitor reduserer caspase-3-aktivitet og celledød i iskemiutsatte neuroner i inntil 7 dager senere, noe som viser at caspase-3-aktivitet kan bidra til forsinket neuronal død (Chen, Nagayama et al. 1998). En sen caspase-3-aktivering kan også skyldes en “feedback-mekanisme” fra caspase-3 til mitokondriene, som aktiverer caspase-9, og dermed resulterer i ytterligere caspase-3-aktivering (Marzo, Susin et al. 1998). Dette kan forklare hvorfor caspasehemming gir effekt flere timer etter PAC-1-eksponering i både PC12-celler og kyllingkornceller.

Det er vist at virkningsmekanismen til PAC-1 involverer molekylets evne til å binde opp zinkioner. Ved å binde opp zink fører PAC-1 til en autoaktivering av procaspase-3 til caspase-3 (Peterson, Goode et al. 2009). At PAC-1 kan binde opp zinkioner åpner for at PAC-1 kan påvirke andre molekyler og prosesser i cellen. Zink er blant annet en nødvendig komponent i mange enzymer som er viktige for celleproliferasjon (Wu and Wu 1987). I denne sammenheng blir en forskjell mellom PC12-celler og kyllingkornceller spesielt viktig. PC12-celler er en prolifererende cellelinje, mens kyllingkornceller (neuroner) ikke deler seg. Dermed kan det tenkes at PAC-1's evne til å binde opp zink gir en hemming av normal celleproliferasjon i PC12-celler og fører til apoptose uavhengig av direkte caspase-3-aktivering. Flere studier har vist at zinkmangel kan føre til apoptose i en rekke celletyper

(Fraker 2005). I neuroner kan reduksjon i intracellulært zink gi stans i cellesyklus og inducere apoptose via den indre (mitokondrielle) signalveien (Adamo and Oteiza 2010). Den indre signalveien aktiverer caspase-9 som igjen aktiverer caspase-3. Dette kan tyde på at PAC-1's celledrepende egenskaper i PC12-celler i tillegg til caspase-3-aktivering, kan skyldes oppbinding av zink som gir stans i normal celleprolifisering. Aktivering av den indre apoptotiske signalveien kan være den primære årsaken til celledød i kyllingkorncellene. Dette kan være med på å forklare hvorfor caspase-3-inhibitor ser ut til å gi en bedre beskyttelse mot PAC-1-indusert celledød i kyllingkornceller enn i PC12-celler.

#### **4.2.2 NGF og EGF beskytter mot PAC-1-indusert celledød**

Resultatene fra celledødsforsøkene viser at NGF, EGF og caspase-3-inhibitor tilsatt 2 timer etter PAC-1-eksponering beskytter mot PAC-1-indusert celledød i PC12-celler. I kyllingkorncellene beskytter NGF og EGF tilsatt samtidig med PAC-1, og tilsatt 4 timer etter PAC-1-eksponering viser både NGF, EGF og caspase-3-inhibitor en beskyttende effekt. Vekstfaktorene gir rask beskyttelse mot PAC-1-indusert celledød i kyllingkorncellene, og som med caspase-3-inhibitor, ser vi også en beskyttende effekt når vekstfaktorene tilsettes flere timer etter PAC-1-eksponering. NGF stimulerer PC12-celler til å differensiere til en mer neuronal fenotype, mens EGF stimulerer til cellevekst (Greene and Tischler 1976). NGF er en meget viktig mediator for neuroners utvikling, differensiering og overlevelse (Piiper, Dikic et al. 2002). Vekstfaktorer kan aktivere ulike signalveier som fremmer celleoverlevelse ved å undertrykke apoptose. Mutasjoner som gir overaktivering av disse signalveiene kan medføre resistens mot apoptose og utvikling av kreft (Henson and Gibson 2006).

Neuroner og PC12-celler differensiert med NGF, er avhengige av vekstfaktoren, og dør ved apoptose hvis de utsettes for NGF-deprivasjon. Dette tyder på at NGF utøver en effekt på mekanismer som kontrollerer apoptose i disse celletypene (Rong, Bennie et al. 1999). Deprivasjon av vekstfaktorer er en stressfaktor for mitokondriene som aktiverer den indre (mitokondrielle) apoptotiske signalveien, som aktiverer caspase-9 og dermed caspase-3 (Vaghefi, Hughes et al. 2004). Det er vist at NGF kan beskytte PC12-celler og neuroner mot apoptose mediert av caspase-3 (Takadera and Ohyashiki 1997; Hirata, Meguro et al. 2006).

---

EGF er en nøkkelfaktor i reguleringen av celleoverlevelse i veldig mange celler, inkludert neuroner. Via sine reseptorer kan EGF aktivere signalveier som leder til interaksjoner med apoptotiske molekyler som forhindrer apoptose (Henson and Gibson 2006). Effekten av EGF på celledød er ikke like godt studert som NGF, men det er vist at EGF også kan beskytte mot apoptose (Ramljak, Coticchia et al. 2003; Jacobs, Aden et al. 2006).

Resultatene fra celledødsforsøkene viser at både NGF og EGF beskytter PC12-celler og kyllingkornceller mot PAC-1-indusert celledød. Hvis PAC-1 virkelig er en direkte caspase-3-aktivator, vil det si at NGF og EGF utøver en direkte effekt på caspase-3 som ikke involverer initiatorcaspasene. Dette kan tyde på at det er en crosstalk mellom de antiapoptotiske signalveiene mediert av NGF og EGF, som direkte kan påvirke aktiveringen av caspase-3. Hvis PAC-1's evne til å drepe celler skyldes molekylets evne til å binde opp zinkioner blir dette bildet mer komplisert. Hvis PAC-1 aktiverer caspase-3 direkte ved å fjerne zinkioner som forhindrer autoaktivering av enzymet (Peterson, Goode et al. 2009), er teorien om en crosstalk direkte på caspase-3 via signalveier aktivert av NGF og EGF lovende. Hvis PAC-1's evne til å drepe celler skyldes zinkdeprivasjon som aktiverer den indre apoptotiske signalveien og caspase-9 (Adamo and Oteiza 2010), blir det uklart om NGF og EGFs effekt skyldes en direkte effekt på caspase-3 eller om effekten sitter mer oppstrøms. Det er mulig PAC-1 gir celledød via begge disse mekanismene, og at konsentrasjonen av PAC-1 bestemmer hvilken mekanisme som dominerer. Eksponering for ulike konsentrasjoner av PAC-1 og påfølgende tilsetning av vekstfaktor ville gitt mer informasjon om dette, men dette er ikke utført i denne oppgaven.

### **4.2.3 NGF, EGF og MEK/ERK-signalveien**

NGF og EGF aktiverer Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien som kan ha stor innvirkning på apoptose ved å fosforylere apoptotiske regulatoriske molekyler (McCubrey, Steelman et al. 2007). En av disse regulatoriske molekyler er caspase-9, som kan inaktiveres av ERK ved direkte fosforylering, og dermed blokkere caspase-3-aktivering (Allan, Morrice et al. 2003). Hvis PAC-1 er en direkte caspase-3-aktivator betyr dette at ERK aktivert av NGF og EGF gjennom Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien, ikke skal ha en beskyttende effekt mot den indusert celledøden i PC12-cellene og kyllingkorncellene. Flere studier har vist at caspase-3

kan inaktiverer antiapoptotiske signalveier, inkludert MEK/ERK-veien, ved å kløyve spesifikke proteiner (Widmann, Gibson et al. 1998). Dette betyr at interaksjonen med MEK/ERK-signalveien og caspasekaskaden er mer komplisert enn først antatt, siden dette kan tyde på en utstrakt crosstalk som i samspill avgjør en celledøds skjebne. Resultatene fra westernblottene viser at PAC-1 ser ut til å oppregulere ERK i kyllingkornceller, noe som kan tyde på en effekt mer oppstrøms i signalveien. PAC-1 ser ut til å nedregulere P-ERK, noe som samsvarer med resultater fra en tidligere masteroppgave (Lindland-Tjønn, 2009). Disse resultatene er selvfølgelig usikre siden westernblott kun er utført to ganger med ERK, og en gang med P-ERK. Kan disse resultatene tyde på at PAC-1 kan regulere ERK og P-ERK? Caspase-3 kan hemme aktiviteten av ERK ved å kløyve KSR1, et scaffoldprotein viktig for ERK-signalering (McKay and Morrison 2007). Samtidig er det vist at caspase-3 kan redusere nivået av P-ERK ved å kløyve Raf1 (Widmann, Gibson et al. 1998). Caspase-3 kan også øke aktiviteten av ERK gjennom en mekanisme som ikke involverer proteaseaktivitet (Cheng, Lee et al. 2008). Det er dermed mulig at økt ERK og redusert P-ERK i kyllingkorncellene skyldes PAC-1-aktivert caspase-3 som utøver en effekt på ERK. Flere modeller av neuronal død har vist at ERK kan fremme celledød i neuroner (Bhat and Zhang 1999; Stanciu, Wang et al. 2000) og i visse tilfeller uavhengig av caspase-3 (Subramaniam, Zirrgiebel et al. 2004). I celledødsforsøkene i kyllingkorncellene gir caspase-3-inhibitor beskyttende effekt når den tilsettes 4 timer etter PAC-1-eksponering, noe som tyder på at caspase-3 er involvert. NGF og EGF gir også en beskyttende effekt tilsatt samtidig og 4 timer etter PAC-1. Det er mulig at NGF og EGF beskytter kyllingkorncellene via en annen signalvei enn MEK/ERK-signalveien. Resultatene fra celledødsforsøkene og westernblottene i denne oppgaven gir ikke nok informasjon til å gi noen sikker konklusjon på dette. Forsøk med en MEK-inhibitor vil trolig kunne gi mer informasjon om ERK aktiveres uavhengig av Ras/Raf/MEK/ERK-signalveien, og om den beskyttende effekten av NGF og EGF på PAC-1-indusert celledød i kyllingkorncellene kan skyldes en annen antiapoptotisk signalvei.

#### **4.2.4 PAC-1 som verktøy i studier av caspase-3-avhengig neuronal død**

Som en direkte caspase-3-aktivator var PAC-1 lansert som en mulig krefterapi, siden visse typer tumorer har økt ekspresjon av procaspase-3 (Putt, Chen et al. 2006). En direkte

---

caspase-3-aktivator vil imidlertid også kunne være et meget godt verktøy for å studere signalveier involvert i apoptose. Resultatene presentert i denne oppgaven kan tyde på at PAC-1 ikke er en god aktivator av caspase-3 i kyllingkornceller. Westernblottene viser at PAC-1 kan aktivere signalveier oppstrøms for ERK og regulere ERK og P-ERK. Celledødsforsøkene viser at NGF og EGF kan beskytte både PC12-celler og kyllingkornceller mot PAC-1-indusert celledød. Disse resultatene sammen med den kjente effekten PAC-1 har på intracellulært zink, sår tvil om PAC-1's evner som spesifikk caspase-3-aktivator. PAC-1 ser ut til å kunne påvirke mange molekyler og signalveier, og som verktøy til studier av neurobiologi, neurodegenerasjon og caspase-3 blir PAC-1 selektiv nok. Oppdagelsen av en mer selektiv og effektiv caspase-3-aktivator enn PAC-1 er dermed nødvendig. En studie har nylig presentert et nytt molekyl, compound 1541, som har vist større og mer selektiv aktivering av caspase-3 sammenlignet med PAC-1 (Wolan, Zorn et al. 2009). Tiden vil vise om dette moleylet kan bli et godt verktøy i neurobiologiske studier.

## 5. KONKLUSJON

- PC12-celler og kyllingkornceller er gode modeller for å studere PAC-1-indusert celledød.
- PAC-1 gir celledød i PC12-celler og kyllingkornceller ved delvis å aktivere caspase-3. Det er uklart om denne effekten skyldes en direkte eller indirekte aktivering av caspase-3.
- NGF, EGF og caspase-3-inhibitor beskytter mot PAC-1-indusert celledød i PC12-celler og kyllingkornceller. Tiden disse tilsettes etter PAC-1-eksponering er av vesentlig betydning for den beskyttende effekten.
- PAC-1 er ingen god spesifikk og god aktivator av hverken caspase-3 eller -9, siden molekylet gir lav caspase-3 og 9-aktivitet og kan påvirke andre prosesser i cellen.
- Siden PAC-1 har vist å ha flere egenskaper enn først antatt, trengs det flere studier for å avgjøre PAC-1's egnethet som caspase-3-aktivator i studier av caspase-3-avhengig neuronal celledød.



---

## 6. REFERANSER

- Abraham, M.C. and S. Shaham, *Death without caspases, caspases without death*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(4): p. 184-93.
- Adamo, A.M. and P.I. Oteiza, *Zinc deficiency and neurodevelopment: the case of neurons*. Biofactors, 2010. **36**(2): p. 117-24.
- Adler, E.M., N.R. Gough, and J.A. Blundon, *Differentiation of PC12 cells*. Sci STKE, 2006. **2006**(351): p. tr9.
- Allan, L.A., et al., *Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(7): p. 647-54.
- Alvarado-Kristensson, M., et al., *p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils*. J Exp Med, 2004. **199**(4): p. 449-58.
- Aras, M.A., K.A. Hartnett, and E. Aizenman, *Assessment of cell viability in primary neuronal cultures*. Curr Protoc Neurosci, 2008. **Chapter 7**: p. Unit 7 18.
- Bhat, N.R. and P. Zhang, *Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death*. J Neurochem, 1999. **72**(1): p. 112-9.
- Burz, C., et al., *Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets*. Acta Oncologica, 2009. **48**: 811-821.
- Charriaut-Marlangue, C., *Apoptosis: a target for neuroprotection*. Therapie, 2004. **59**(2): p. 185-90.
- Chen, J., et al., *Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia*. J Neurosci, 1998. **18**(13): p. 4914-28.
- Cheng, Y.J., et al., *Caspase-3 enhances lung metastasis and cell migration in a protease-independent mechanism through the ERK pathway*. Int J Cancer, 2008. **123**(6): p. 1278-85.
- Choi, B.K., et al., *Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in A172 human glioma cells*. Neurotoxicology, 2004. **25**(6): p. 915-24.
- Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
- Denault, J.B., et al., *Small molecules not direct activators of caspases*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(9): p. 519; author reply 520.

- 
- Fraker, P.J., *Roles for cell death in zinc deficiency*. J Nutr, 2005. **135**(3): p. 359-62.
  - Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, *The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. Biochem J, 2004. **384**(Pt 2): p. 201-32.
  - Fulda, S., et al., *Cellular stress responses: cell survival and cell death*. Int J Cell Biol, 2010. **2010**: p. 214074.
  - Gallagher, S., et al., *Immunoblotting and immunodetection*. Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 8**: p. Unit 8 10.
  - Galluzzi, L., et al., *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications*. Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1237-43.
  - Gao, J.X., et al., [*Caspase-3 plays a required role in PC12 cell apoptotic death induced by roscovitine*]. Sheng Li Xue Bao, 2005. **57**(6): p. 755-60.
  - Garber, K., *New method found to trigger cancer cell suicide*. Journal of the National Cancer Institute, 2006. **98**(23): p. 1680-1681.
  - Golstein, P. and G. Kroemer, *Redundant cell death mechanisms as relics and backups*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1490-6.
  - Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
  - Hartmann, A., et al., *Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2875-80.
  - Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
  - Henson, E.S. and S.B. Gibson, *Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy*. Cell Signal, 2006. **18**(12): p. 2089-97.
  - Hirata, Y., T. Meguro, and K. Kiuchi, *Differential effect of nerve growth factor on dopaminergic neurotoxin-induced apoptosis*. J Neurochem, 2006. **99**(2): p. 416-25.
  - Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. N Engl J Med, 2009. **361**(16): p. 1570-83.
  - Jacobs, C.M., et al., *Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture*. J Neurosci Methods, 2006. **156**(1-2): p. 129-35.
  - Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.

- 
- Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
  - Kurokawa, M. and S. Kornbluth, *Caspases and kinases in a death grip*. Cell, 2009. **138**(5): p. 838-54.
  - Lamkanfi, M., et al., *Caspases in cell survival, proliferation and differentiation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 44-55.
  - Lindland-Tjønn (2009). "Vekstfaktorers interaksjoner med caspaser i PC12-cellelinjen og kornceller fra rotte." Hovedfagsoppgave for graden Candidatus pharmaciae. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
  - MacDonald, R.S., *The role of zinc in growth and cell proliferation*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1500S-8S.
  - Marzo, I., et al., *Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function*. FEBS Lett, 1998. **427**(2): p. 198-202.
  - Mattson, M.P., *Apoptosis in neurodegenerative disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(2): p. 120-9.
  - McKay, M.M. and D.K. Morrison, *Caspase-dependent cleavage disrupts the ERK cascade scaffolding function of KSR1*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26225-34.
  - McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1263-84.
  - Nicotera, P. and G. Melino, *Regulation of the apoptosis-necrosis switch*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2757-65.
  - Okouchi, M., et al., *Neuronal apoptosis in neurodegeneration*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(8): p. 1059-96.
  - Oppenheim, R.W., *Cell death during development of the nervous system*. Annu Rev Neurosci, 1991. **14**: p. 453-501.
  - Pereira, N.A. and Z. Song, *Some commonly used caspase substrates and inhibitors lack the specificity required to monitor individual caspase activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(3): p. 873-7.
  - Peterson, Q.P., et al., *PAC-1 activates procaspase-3 in vitro through relief of zinc-mediated inhibition*. J Mol Biol, 2009. **388**(1): p. 144-58.

- 
- Piiper, A., et al., *Cyclic AMP induces transactivation of the receptors for epidermal growth factor and nerve growth factor, thereby modulating activation of MAP kinase, Akt, and neurite outgrowth in PC12 cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(46): p. 43623-30.
  - Porter, A.G. and R.U. Janicke, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis.* Cell Death Differ, 1999. **6**(2): p. 99-104.
  - Putt, K.S., et al., *Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy.* Nat Chem Biol, 2006. **2**(10): p. 543-50.
  - Ramljak, D., et al., *Epidermal growth factor inhibition of c-Myc-mediated apoptosis through Akt and Erk involves Bcl-xL upregulation in mammary epithelial cells.* Exp Cell Res, 2003. **287**(2): p. 397-410.
  - Rimul, G.F. (2007). "Celledød, aktivering av caspase-3, og NGFI- $\beta$ -forflytning i cellelinjene PC12 og CV1." Hovedfagsoppgave for graden Candidatus pharmaciae. Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
  - Rohn, T.T., et al., *Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain.* Neurobiol Dis, 2002. **11**(2): p. 341-54.
  - Rong, P., et al., *Nerve growth factor determines survival and death of PC12 cells by regulation of the bcl-x, bax, and caspase-3 genes.* J Neurochem, 1999. **72**(6): p. 2294-300.
  - Stanciu, M., et al., *Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures.* J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12200-6.
  - Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability.* Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
  - Subramaniam, S., et al., *ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3.* J Cell Biol, 2004. **165**(3): p. 357-69.
  - Takadera, T. and T. Ohyashiki, *Apoptotic cell death and caspase 3 (CPP32) activation induced by calcium ionophore at low concentrations and their prevention by nerve growth factor in PC12 cells.* Eur J Biochem, 1997. **249**(1): p. 8-12.
  - Thornberry, N.A., et al., *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.* Nature, 1992. **356**(6372): p. 768-74.
  - Tovey, E.R., S.A. Ford, and B.A. Baldo, *Protein blotting on nitrocellulose: some important aspects of the resolution and detection of antigens in complex extracts.* J Biochem Biophys Methods, 1987. **14**(1): p. 1-17.

- 
- Vaghefi, H., A.L. Hughes, and K.E. Neet, *Nerve growth factor withdrawal-mediated apoptosis in naive and differentiated PC12 cells through p53/caspase-3-dependent and -independent pathways*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15604-14.
  - Vandenabeele, P., T. Vanden Berghe, and N. Festjens, *Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways*. Sci STKE, 2006. **2006**(358): p. pe44.
  - Vanlangenakker, N., et al., *Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death*. Curr Mol Med, 2008. **8**(3): p. 207-20.
  - Vaudry, D., et al., *Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1648-9.
  - Widmann, C., S. Gibson, and G.L. Johnson, *Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 7141-7.
  - Wolan, D.W., et al., *Small-molecule activators of a proenzyme*. Science, 2009. **326**(5954): p. 853-8.
  - Wong, K.K., *Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/MEK/ERK pathway*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2009. **4**(1): p. 28-35.
  - Wu, F.Y. and C.W. Wu, *Zinc in DNA replication and transcription*. Annu Rev Nutr, 1987. **7**: p. 251-72.
  - Yoshimura, S., et al., *Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. Inhibitory effects of Bcl-2 on ceramide formation and caspase-3 activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6921-7.
  - Zong, W.X. and C.B. Thompson, *Necrotic death as a cell fate*. Genes & Development, 2006. **20**(1): p. 1-15.
  - Zhuang, S., et al., *ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(1): p. F440-7.

