

HOVEDFAGSOPPGAVE FOR GRADEN
Candidatus pharmaciae

**Celledød, aktivering av caspase 3, og NGFI-
B-forflytning i cellelinjene PC12 og CV1**



Gunnar Fløan Rimul

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

November 2007

FORORD

Denne oppgaven har blitt utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt i perioden november 2006 til november 2007, som et ledd i graden cand.pharm. ved Universitetet i Oslo.

Jeg vil takke min hovedveileder professor Ragnhild E. Paulsen for engasjerende og inspirerende veiledning. Jeg har satt svært stor pris på hennes positive holdning og store faglige kunnskap, som har hjulpet meg gjennom hovedfagsarbeidet.

Jeg vil rette en stor takk til min medveileder Karen Boldingh Debernard for god veiledning og mye hjelp til det praktiske labarbeidet.

Jeg ønsker også å takke Gro Mathiesen, Mona Gaarder, Bjørn Oddvar Strøm og Petra Aden for god hjelp og støtte på laben.

Takk til alle på ZEB for å ha skapt et godt og positivt miljø som har gitt meg et fint år med mange gode opplevelser.

Videre vil jeg takke førsteamanuensis Trond Vidar Hansen ved avdeling for farmasøytisk kjemi for å ha donert aliquoter av PAC-1 til bruk i denne hovedfagsoppgaven. Jeg vil også rette en takk til Øyvind Akselsen ved avdeling for farmasøytisk kjemi for gode diskusjoner vedrørende PAC-1-prosjektet.

Takk til min søster og mine foreldre som har vært en stor støtte gjennom hele utdanningen. Deres støtte har vært avgjørende for at jeg har kommet meg gjennom farmasistudiet.

En spesiell takk til min forlovede Therese, som gjennom det siste året har bidratt med oppmuntrende ord i de tunge stundene, alltid godt humør og faglige innspill. Uten din hjelp og tilstedeværelse på laben hadde ikke dette året blitt like minnerikt som det ble.

Oslo, november 2007

Gunnar Fløan Rimul

SAMMENDRAG

Celledød deles ofte inn i nekrose og apoptose. Apoptose er en velregulert celledødsprosess involvert i mange viktige funksjoner, blant annet utviklingen av nervesystemet. Ubalanse i forholdet mellom apoptosestimulerende og apoptosehemmende signaler kan føre til alvorlige sykdomstilstander som kreft, autoimmune og neurodegenerative sykdommer.

Som respons på et apoptotisk stimulus kan caspasene, en gruppe proteaser, aktiveres i en kaskadereaksjon. Aktiverte effektorcaspaser kløyver cellulære proteiner og er ansvarlige for mange av de morfologiske og biokjemiske endringene som kjennetegner apoptose.

Transkripsjonsfaktoren NGFI-B kan fremme både celleoverlevelse og celledød. Ved å translokalisere fra kjernen til mitokondriene kan NGFI-B indusere apoptose ved caspaseaktivering. NGFI-B er et substrat for den vekstfaktoraktiverede MAP kinasen ERK2. ERK2 kan fosforylere aminosyren thr 142 på NGFI-B, og hindre translokalisering av NGFI-B fra kjernen til mitokondriene.

Cellelinjene PC12 og CV1 ble i denne oppgaven vurdert som potensielle modeller for å studere NGFI-B-forflytning fra kjernen til cytosol, aktivering av caspase 3, og celledød.

Vekstfaktorene EGF og NGF førte til en reduksjon i kjernelokaliseringen av NGFI-B. Samtidig serumdeprivasjon (celledødssignal) førte til en reversering av denne effekten. Serumdeprivasjon, men ikke calcium ionophore, viste seg å være en sterk aktivator av caspase 3 i PC12-celler, en aktivering som ble motvirket av vekstfaktorene EGF og NGF. Den nye caspaseaktivatoren PAC-1 aktiverte caspase 3 i noe mindre grad enn serumdeprivasjon i PC12-celler. EGF og NGF beskyttet mot PAC-1-indusert caspase 3-aktivering, et overraskende funn som kan indikere en mulig "crosstalk" tilbake til andre apoptoseveier. Både serumdeprivasjon og PAC-1 førte til økt celledød i PC12-celler. Vekstfaktoren NGF hadde en tendens til beskyttelse mot begge behandlingene.

Det kan konkluderes med at serumdeprivasjon og calcium ionophore induserte celledødsveier som ikke syntes å involvere NGFI-B-forflytning til mitokondriene.

PC12 derimot, var godt egnet for studier av caspase 3-aktivering og celledød, mens CV1 ikke egnet seg som modell for disse studiene, med de valgte metodene. CV1 kan likevel være en robust celletype hvor det vil være mulig å studere proteiner involvert i apoptose uten at cellene dør. PAC-1 er et interessant molekyl som kan brukes til å studere caspase 3-funksjon.

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	1
SAMMENDRAG	2
INNHALDSFORTEGNELSE	3
1. INNLEDNING	6
1.1 CELLEDØD.....	6
1.1.1 Nekrose.....	7
1.1.2 Apoptose.....	7
1.1.3 Caspaser.....	8
1.1.4 Caspaser klassifiseres etter substratspesifisitet.....	9
1.1.5 Caspase 8 aktiveres av dødsreseptor.....	9
1.1.6 Mitokondriene er involvert i aktiveringen av caspase 9.....	11
1.1.7 Effektor caspase 3.....	12
1.2 NERVE GROWTH FACTOR INDUCIBLE CLONE B (NGFI-B).....	14
1.2.1 NGFI-B er bygd opp som andre kjernereseptorer.....	14
1.2.2 Regulering av NGFI-B.....	15
1.2.3 NGFI-B kan fremme både celleoverlevelse og celledød.....	15
1.3 MAPK/ERK REAKSJONSVEIEN.....	16
1.4 MÅL MED OPPGAVEN.....	18
2. MATERIALER OG METODER	19
2.1 KJEMIKALIER OG REAGENSER.....	19
2.2 UTSTYR.....	20
2.3 PC12-CELLER.....	20
2.3.1 Splitting av PC12-celler.....	21
2.3.2 Transfeksjon av PC12-celler.....	21
2.4 CV1-CELLER.....	23
2.4.1 Splitting av CV1-celler.....	23
2.4.2 Transfeksjon av CV1-celler.....	24
2.5 MÅLING AV NUKLEÆR NGFI-B-LOKALISERING.....	25
2.5.1 PC12-celler.....	25
2.5.2 CV1-celler.....	26
2.6 MÅLING AV CASPASE 3.....	26

2.7	DETEKSJON AV CELLEDØD.....	29
2.7.1	Farging av PC12-celler med trypanblå.....	29
2.7.2	Farging med propidiumiodid og fluorescein diacetat.....	30
2.8	PROTEINMÅLING.....	32
2.9	STATISTIKK.....	33
3.	RESULTATER.....	34
3.1	NUKLEÆR LOKALISERING AV NGFI-B I PC12-CELLER.....	34
3.1.1	Effekt av vekstfaktorene EGF og NGF.....	34
3.1.2	Effekt av serumdeprivasjon.....	36
3.1.3	Effekt av calcium ionophore.....	39
3.1.4	Kontroller.....	41
3.2	NUKLEÆR LOKALISERING AV KOTRANSFEKTERTE NGFI-B I PC12-CELLER.....	42
3.2.1	Effekt av serumdeprivasjon på NGFI-B + CMV.....	43
3.2.2	Effekt av fosforyleringer på NGFI-B.....	44
3.2.3	Effekt av aktivert ERK2.....	48
3.3	NUKLEÆR LOKALISERING AV NGFI-B I CV1-CELLER.....	50
3.4	MÅLING AV CASPASE 3.....	50
3.4.1	Måling av caspase 3 i PC12-celler.....	50
3.4.2	Effekt av serumdeprivasjon.....	51
3.4.3	Effekt av calcium ionophore.....	52
3.4.4	Effekt av PAC-1.....	54
3.4.5	Måling av caspase 3 i CV1-celler.....	55
3.5	DETEKSJON AV CELLEDØD.....	58
3.5.1	Deteksjon av celledød i PC12-celler.....	58
3.5.2	Effekt av serumdeprivasjon.....	58
3.5.3	Effekt av calcium ionophore.....	59
3.5.4	Effekt av PAC-1.....	61
3.5.5	Deteksjon av celledød i CV1-celler.....	63
4.	DISKUSJON.....	64
4.1	CELLELINJER SOM MODELL.....	64
4.2	NUKLEÆR LOKALISERING AV NGFI-B.....	65
4.2.1	Vekstfaktorene EGF og NGF fører til nukleær eksport av NGFI-B i PC12-celler.....	65

4.2.2	Serumdeprivasjon endrer ikke kjernelokaliseringen av NGFI-B i PC12-celler.....	66
4.2.3	Calcium ionophore fører til nedgang i kjernelokaliseringen av NGFI-B i PC12-celler, men ikke i CV1-celler og ingen caspase 3-aktivitet.....	67
4.2.4	Mockdepriverte og ubehandlede PC12-celler hadde uendret kjernelokalisering av NGFI-B...	68
4.2.5	Serumdeprivasjon endrer ikke kjernelokaliseringen av NGFI-B ved kotransfeksjon med CMV i PC12-celler....	68
4.2.6	Konstitutiv fosforylering av NGFI-B, blokkering av fosforylering på NGFI-B og aktivert ERK2 påvirker ikke kjernelokaliseringen av NGFI-B i PC12-celler.....	69
4.2.7	CV1 og PC12-celler egner seg dårlig som modeller for studier av NGFI-B translokalisering til mitokondriene.....	69
4.3	AKTIVERING AV CASPASE 3 OG CELLEDØD I CV1 OG PC12-CELLER.....	70
4.3.1	Serumdeprivasjon og PAC-1 aktiverer caspase 3 i PC12-celler og fører til celledød	70
4.3.2	Vekstfaktorer beskytter mot caspaseaktivering og celledød induert av serumdeprivasjon og PAC-1.....	71
4.3.3	Calcium ionophore fører til celledød i PC12-celler.....	72
4.4	KONKLUSJON.....	73
	5. FORKORTELSER.....	74
	6. REFERANSER.....	76

1. INNLEDNING

1.1 CELLEDØD

I en klassisk modell deles celledød ofte inn i nekrose og apoptose (fig 1.1, tabell 1.1). Nekrose regnes som en tilfeldig og ukontrollert form for celledød, mens apoptose er en velregulert celledødsvei. Nyere studier som viser at nekrose i likhet med apoptose kan være en regulert og fysiologisk naturlig celledødsvei, har ført til en endring av den klassiske modellen. De gamle definisjonene regnes nå for å være ytterpunkter. I den nye modellen er mange av mekanismene som fører til apoptose og nekrose like, og begge celledødsveiene har vist seg å kunne inntreffe i samme celle samtidig (Proskuryakov, Konoplyannikov et al. 2003).

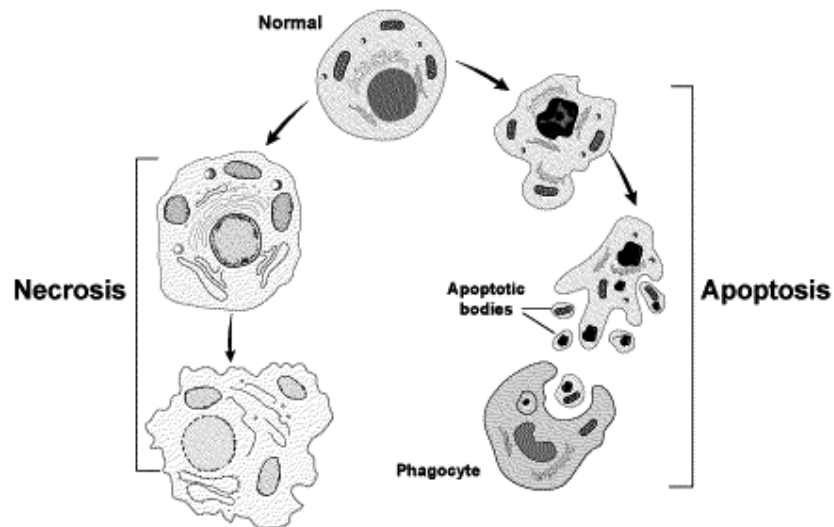


Fig 1.1: Forskjeller i morfologi mellom nekrose og apoptose. Nekrotiske celler og deres organeller sveller. Plasmamembranen ødelegges tidlig og fører til at cytoplasma lekker ut i det ekstracellulære området. Apoptotiske celler krymper og danner ”blebber” med høy tetthet av cytoplasma. Membranødeleggelse skjer sent i prosessen, etter at cellen er død. Apoptotiske celler fagocyteres etter celledød. Figuren er hentet fra (Saikumar, Dong et al. 1999).

APOPTOSE	NEKROSE
Energi-avhengig og organisert	Bioenergetisk forstyrrelse – uorganisert
Opprettholdt plasmamembranintegritet	Tap av plasmamembranintegritet
Ordnet DNA-degradering	Tilfeldig DNA-degradering
Eliminering av celler	Initiering av cellevekst og vevsreparasjon

Tabell 1.1: Forskjeller på nekrose og apoptose. Tabellen er modifisert fra (Zong and Thompson 2006).

1.1.1 Nekrose

De fleste former for nekrose skiller seg fra apoptose ved et raskt fall i cellemembranpotensialet. Dette fører til cytoplasmisk svelling og ødeleggelse av plasmamembranen (Zong and Thompson 2006). Ødeleggelsen av plasmamembranen fører til frisetting av intracellulære komponenter ut i det nærliggende vevet, og setter i gang en inflammatorisk immunrespons (Nelson and White 2004).

Nekrose har tidligere blitt sett på som en ukontrollert og tilfeldig form for celledød, hvor ekstreme påkjenninger og påfølgende disintegrasjon av cellemembranen har vært det vanlige mønsteret. Dette har vist seg å være en forenkling. Nekrose kan induseres av cytokiner, varme, iskemi og patogener, mange av de samme stimuli som forårsaker apoptose (Proskuryakov, Konoplyannikov et al. 2003). Svært høye nivåer av intracellulært kalsium kan forårsake nekrose. Dette kan induseres eksperimentelt ved å bruke calcium ionophore (Martina, Kili et al. 1994). Calcium ionophore kan indusere apoptose ved lave konsentrasjoner, og nekrose ved høye konsentrasjoner (McConkey, Hartzell et al. 1989).

1.1.2 Apoptose

Apoptose er en velregulert form for celledød som bidrar til å opprettholde homøostase i vev og organer (Bohm and Schild 2003). Utviklingen av vitale funksjoner i kroppen er avhengig av velfungerende apoptosemekanismer. Et eksempel på dette er utviklingen av immunforsvaret hvor det skjer en negativ seleksjon av autoreaktive eller ikke-reaktive lymfocytter (Zornig, Hueber et al. 2001). Apoptose er også viktig i utviklingen av nervesystemet, ved å fjerne overskudd av nevroner slik at det dannes nøyaktige pre- og postsynaptiske koblinger (Yuan, Lipinski et al. 2003). Dette skjer ved at et overskudd av nevroner kjemper om begrenset tilførsel av overlevelsessignal i form av vekstfaktoren NGF (Nerve growth factor). Nevronene som ikke binder NGF dør ved apoptose (Jacobson, Weil et al. 1997). Vekstfaktordeprivasjon er en metode som kan brukes eksperimentelt for å indusere apoptose i blant annet PC12-celler (Greene 1978). Sårheling, terminering av inflammasjonsreaksjoner, fornyelse av vev og fjerning av celler med irreversible DNA-skader, er noen av de andre funksjonene hvor apoptose spiller en viktig rolle (Bohm and Schild 2003).

Apoptose kan grovt sett deles inn i tre stadier:

1. Ekstracellulært/intracellulært signal om å sette i gang dødsprosessen;
2. Iverksettelse av celledødsprosessen gjennom aktivering av intracellulære proteaser (caspaseaktivering);
3. Fjerning av den døde cellen ved fagocytose og lysosomal nedbryting (Saikumar, Dong et al. 1999).

De fleste morfologiske og biokjemiske forandringer forårsaket av apoptose skyldes caspasene, som er en gruppe proteaser (se avsnitt 1.1.3) (Bohm and Schild 2003). Caspasenes aktivitet er avhengig av å bindes til adaptorproteiner, som kontrolleres av regulatoriske proteiner fra blant annet Bcl2-familien (se avsnitt 1.1.6) (Vaux and Korsmeyer 1999).

Apoptose spiller en stor rolle i mange vitale funksjoner. Det er derfor svært viktig at den riktige balansen mellom apoptoseinduserende og apoptosehemmende mekanismer opprettholdes. En ubalanse i dette systemet kan føre til alvorlige sykdomstilstander. En mutasjon i genet som koder for det apoptosehemmende proteinet Bcl2 i immunforsvarets B-celler er implisert i flere former for kreft, som storcellet lymfom og kronisk lymfocytisk leukemi. Mutasjonen fører til undertrykkelse av normal apoptotisk funksjon på grunn av overuttrykk av Bcl2 (Strasser, Huang et al. 1997). Sykdommer i nervesystemet er ofte assosiert med celledød. I akutte sykdomstilstander, som for eksempel hjerneslag, er mekanismen bak celledød hovedsakelig nekrose, men apoptose kan i noen tilfeller inntreffe i form av en forsinket sekundær celledød. Apoptose spiller trolig en større rolle i kroniske sykdommer i nervesystemet som ALS, Alzheimers, Parkinsons' og Huntingtons sykdom (Honig and Rosenberg 2000). Ubalanse i apoptotiske systemer er også involvert i utviklingen av autoimmune sykdommer. Et eksempel på dette er den apoptotiske ødeleggelsen av pankreatiske β -celler, som regnes for å være den viktigste mekanismen bak utviklingen av autoimmun diabetes (Chervonsky, Wang et al. 1997).

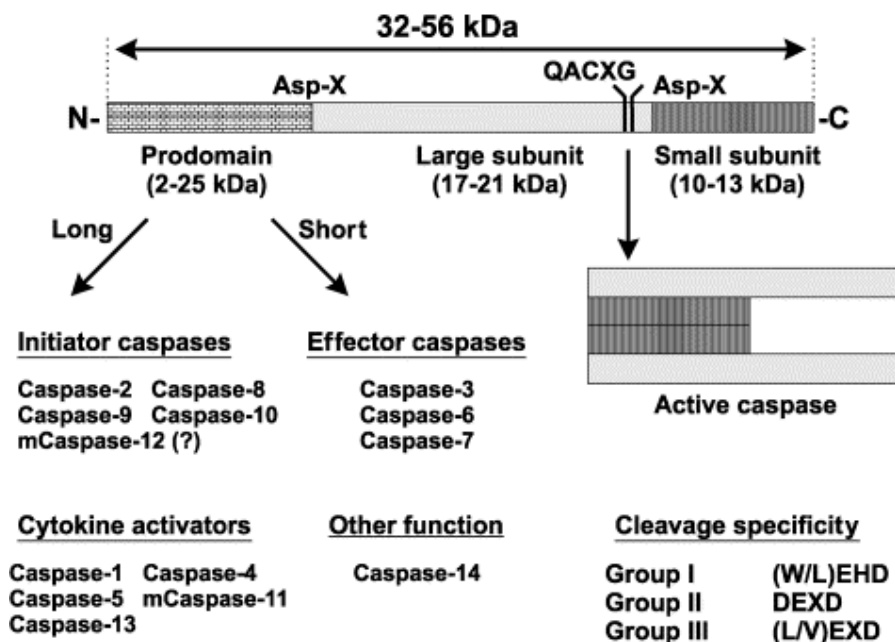
1.1.3 Caspaser

Caspasene er en gruppe cystein-avhengige aspartat-spesifikke proteaser (Cysteine-aspartate-specific-proteases). Caspasene syntetiseres som inaktive proenzymer (zymogener), bestående av et N-terminalt prodomene etterfulgt av en sekvens som koder for én stor subenhet og én liten subenhet. Størrelsen på prodomenet er med på å bestemme om procaspasen danner en

initiator-caspase (stort prodomene), eller effektor-caspase (lite prodomene) (Earnshaw, Martins et al. 1999; Bilsland, Harper et al. 2002).

1.1.4 Caspaser klassifiseres etter substratspesifisitet

Caspasene kan deles inn i tre grupper etter deres substratspesifisitet (figur 1.2). Caspasene 2,8,9,10 og 12 er initiatorcaspaser som befinner seg øverst i caspasekaskaden. Caspase 3,6 og 7 er effektorcaspaser som kløyver cellulære proteiner og forårsaker mange av de biokjemiske og morfologiske endringene som sees ved apoptose. Den siste gruppen består av caspase 1,4,5,11 og 13, som aktiveres ved inflammasjonsreaksjoner (Bilsland, Harper et al. 2002; Kohler, Orrenius et al. 2002).



Figur 1.2: Figuren viser oppbyggingen og funksjonene til de ulike caspasene.

Figuren er hentet fra (Kohler, Orrenius et al. 2002).

1.1.5 Caspase 8 aktiveres av dødsreseptor

Konverteringen av en procaspase til en aktiv caspase krever minst to steg: prodomenet må skilles fra den store subenheten, og den store og lille subenhet må separeres fra hverandre (Earnshaw, Martins et al. 1999; Bilsland, Harper et al. 2002). Aktiveringen av initiatorcaspasen caspase 8 fra sitt proenzym styres av såkalte dødsreseptorer på celleoverflaten (figur 1.3). En slik dødsreseptor er FAS, en homotrimerisk reseptor som etter binding av ligand rekrutterer det cytosoliske adaptorproteinnet FADD ("FAS-Associated Death

Domain”). FADD og FAS binder procaspase 8 og danner DISC (”Death Inducing Signaling Complex”), noe som resulterer i oligomerisering av procaspase 8. Procaspase 8-molekylene har svak proteaseaktivitet og aktiverer hverandre autoproteolytisk til den aktive caspase 8. Caspasekaskaden fortsetter ved at caspase 8 aktiverer effektorcaspase 3 enten direkte, eller indirekte, via en mekanisme som involverer aktivering av det proapoptotiske proteinet Bid, et medlem av Bcl2-familien. Etter aktivering translokaliseres Bid fra cytosol til mitokondriene og fører til frisetting av cytochrom c. Frisetting av cytochrom c fører til aktivering av effektorcaspase 3 via mekanismene nærmere beskrevet i avsnitt 1.1.6 (Li, Zhu et al. 1998; Chang and Yang 2000).

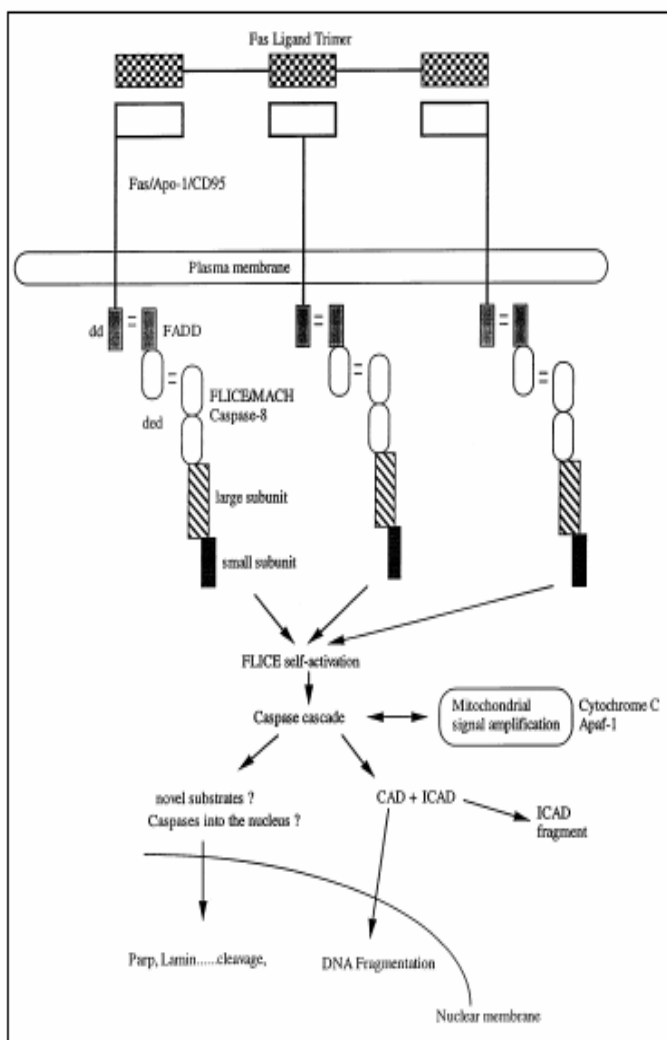


Fig 1.3: Figuren viser aktivering av caspasekaskaden via aktivering av dødsreseptorer. Figuren er hentet fra (Muzio 1998).

1.1.6 Mitokondriene er involvert i aktiveringen av caspase 9

Caspase 9 er i likhet med caspase 8 en initiatorcaspase. Caspase 9 aktiveres ved at procaspase 9 binder til adaptoproteinet Apaf-1 (Apoptose-protease aktiverende faktor-1). Denne bindingen er avhengig av samtidig tilstedeværelse av dATP og cytochrom c frisatt fra mitokondriene. Den proapoptotiske formen av cytochrom c finnes eksklusivt i mitokondriene, og frisettes som respons på apoptotisk stimuli (Li, Nijhawan et al. 1997).

Reguleringen av cytochrom c-frisetting fra mitokondriene styres av Bcl2-proteinfamilien (figur 1.4). Denne familien består av ca 15 apoptosehemmende og apoptoseinduserende proteiner (Adams and Cory 1998). Bcl2 familien kan deles inn i tre undergrupper, Bcl2, Bcl-xl, Bcl-w og Mcl-1 motvirker apoptose, mens Bax, Bak og Bok er apoptoseinduserende. En tredje mer fjernt beslektet gruppe kalt "BH3-only proteins" fremmer også apoptose. Apoptosehemmende Bcl2 og apoptoseinduserende Bak er konstitutivt bundet på mitokondrienes yttermembran, mens Bax er hovedsakelig lokalisert i cytosol, og translokaliseres til mitokondriene ved apoptotisk stimuli, og endrer membranpermeabiliteten til mitokondriet (Sharpe, Arnoult et al. 2004).

Den henholdsvis apoptoseinduserende effekten av Bax, og apoptosehemmende effekten av Bcl2 har blitt knyttet til kontroll av cytochrom c-frisetting (Kluck, Bossy-Wetze et al. 1997; Narita, Shimizu et al. 1998).

Mekanismen bak Bcl2-familiens regulering av mitokondriepermeabiliteten er fortsatt ikke avklart, men tre teorier synes å være dominerende:

- 1) De danner de novo protein-kanaler i membranen
 - 2) De regulerer allerede eksisterende porer i membranen
 - 3) De forandrer membranlipidene og danner lipidporer
- (Sharpe, Arnoult et al. 2004).

Aktiv caspase 9 kan aktivere caspase 3 som kløyver cellulære proteiner (1.1.7) (Earnshaw, Martins et al. 1999).

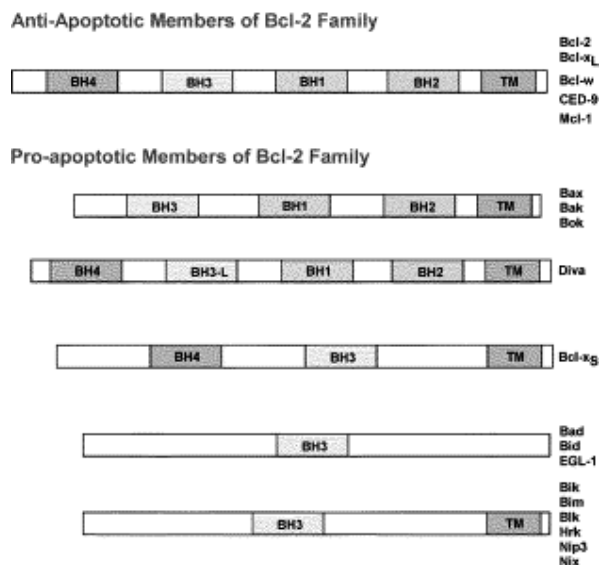


Fig 1.4: Figuren viser homologien mellom de antiapoptotiske og proapoptotiske medlemmene av Bcl2-familien. BH-domener og TM-domener er vist. Opptil 4 konservative BH-domener er identifisert. BH=Bcl2 homology, TM = Transmembran
Figuren er hentet fra (Saikumar, Dong et al. 1999).

1.1.7 Effektor caspase 3

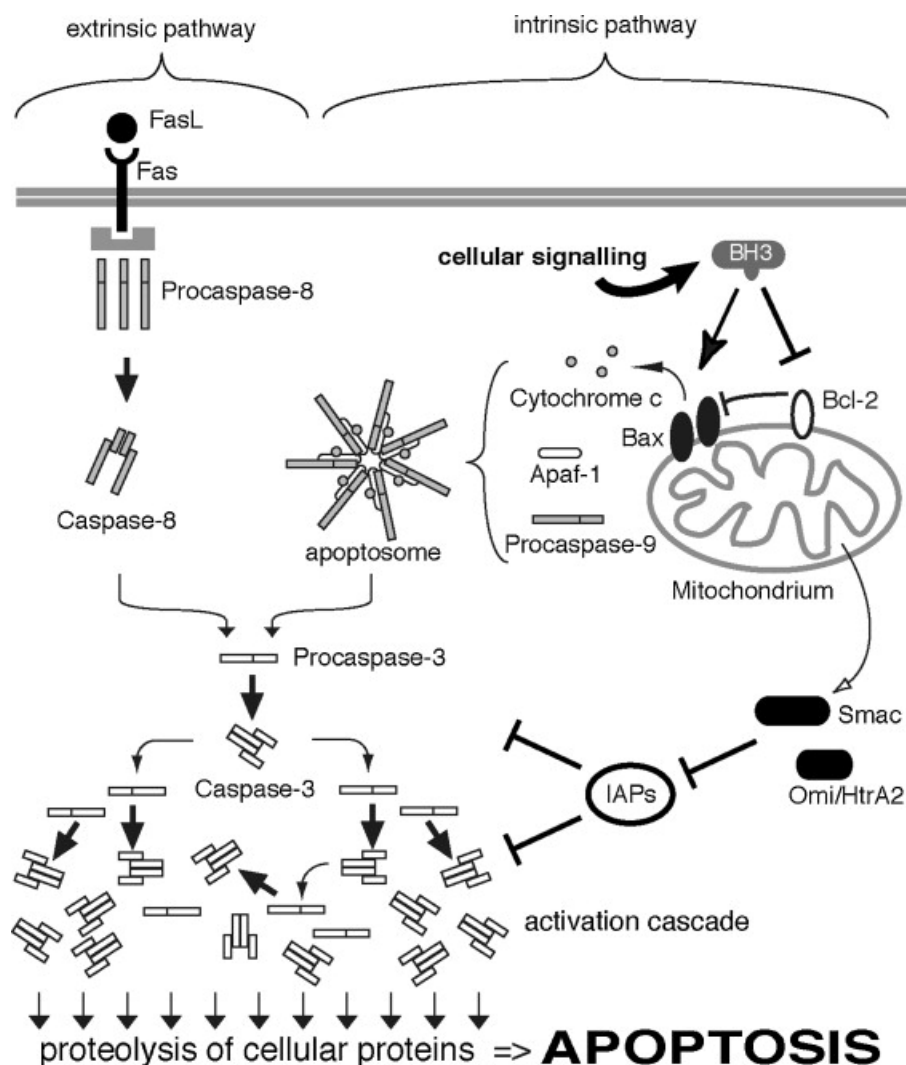
Den best studerte effektorcaspasen er caspase 3 (figur 1.5). Caspase 3 kan aktiveres av både initiatorcaspase 8 og 9. Caspase 3 kløyver cellulære proteiner og er ansvarlig for mange av endringene som kjennetegner apoptotiske celler, blant annet kondensering av kromatin og fraksjonering av DNA i de døende cellenes kjerner (Earnshaw, Martins et al. 1999). Caspase 3 utøver disse effektene på kromatin og DNA via proteinet ”DNA Fragmentation Factor” (DFA) (Liu, Li et al. 1998).

DFA er et heterodimerisk protein bestående av en 40 kDa subenhet og en 45 kDa subenhet. Aktiv caspase 3 kløyver den aktive 45 kDa subenheten, som dissosierer fra 40 kDa og utøver sin aktivitet ved å indusere DNA fragmentering og kondensering av kromatin (Liu, Li et al. 1998).

Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) er et annet substrat for caspase 3. PARP er et enzym som ved stress setter i gang DNA-reparasjon, genomovervåking og kontroll av genomintegritet (Nicholson, Ali et al. 1995; Liu, Zou et al. 1997).

Andre substrater for caspase 3 inkluderer det U1-assosierte 70 kDa-proteinet, D4-GDI, huntingin, Sterol-regulatory element-binding proteins (SREBS) og DNA-avhengig protein kinase (Liu, Zou et al. 1997).

Nylig har en direkte aktivator av caspase 3 blitt identifisert. PAC-1 kan direkte kløyve procaspase 3 slik at aktiv caspase 3 dannes. PAC-1 kan komme til å spille en rolle i kreftbehandling ved å indusere apoptose i kreftceller. PAC-1 har vist seg å være effektiv selv i cellelinjer med feil i de naturlige apoptosemekanismene (Putt, Chen et al. 2006). PAC-1 kan også bli et nyttig verktøy eksperimentelt; direkte aktivering av caspase 3 muliggjør studier av eventuell ”crosstalk” tilbake på andre apoptoseveier.



Figur 1.5: Figuren viser caspasekaskaden.

IAPs = "Inhibitors of Apoptosis"

Smac og Omi/HtrA2 = To proapoptotiske proteiner frisatt fra mitokondriene som inhiberer IAPs

Figuren er hentet fra (Jager 2007).

1.2 NERVE GROWTH FACTOR INDUCIBLE CLONE B (NGFI-B)

Nerve Growth Factor-Inducible Clone B (NGFI-B) er en transkripsjonsfaktor tilhørende steroid thyroide reseptor superfamilien, også kjent som kjernereseptor-superfamilien. NGFI-B ble identifisert etter hurtig induksjon forårsaket av NGF i PC12-celler fra rotter, og av serum vekstfaktorer i mus (Hazel, Nathans et al. 1988; Milbrandt 1988). NGFI-B i rotte er også kjent som Nur 77 i mus og TR3 i humane celler (Moll, Marchenko et al. 2006). NGFI-B regnes som en "orphan receptor" ettersom det ikke finnes noe kjent fysiologisk ligand for NGFI-B (Moll, Marchenko et al. 2006).

1.2.1 NGFI-B er bygd opp som andre kjernereseptorer

Medlemmer av kjernereseptor superfamilien kan beskrives med den generelle skjematisk strukturen vist i figur 1.6. Ved N-terminalen finnes A/B-regionen som består av en liganduavhengig transkripsjonsaktiverende funksjon (AF1), etterfulgt av C-regionen bestående av et DNA-bindende område med to konserverte sinkfinger-regioner. E/F-regionen er lokalisert på reseptorens C-terminal og består av et ligandbindende område og en ligandavhengig aktiveringsfaktor 2 (AF2) (Chawla, Repa et al. 2001).

Medlemmer av steroid-thyroide reseptor superfamilien regulerer vanligvis transkripsjon ved å binde seg til spesifikke DNA-sekvenser kalt hormone response element (HRE) (Meinke and Sigler 1999). De fleste reseptorene binder seg til HRE som homodimere eller heterodimere, men NGFI-B har blitt vist å binde til sitt responselement, "NGFI-B Binding Response Element" (NBRE), som en monomer (Wilson, Fahrner et al. 1991).

Sinkfinger-regionene utgjør en kjerne i det DNA-bindende domenet, som inneholder flere sekvensregioner. I den C-terminale forlengelsen av det DNA-bindende domenet (DBD) finnes to substrukturer som er unike for NGFI-B, en T-Boks og en A-Boks (Meinke and Sigler 1999). A-boksen har blitt vist å være viktig for gjenkjennelse og binding av NGFI-B til sitt responselement, NBRE (Wilson, Paulsen et al. 1992).



Fig 1.6: Figuren viser en generell skjematiske struktur for kjernereseptorer som NGFI-B. Figuren er hentet fra (Moll, Marchenko et al. 2006).

1.2.2 Regulering av NGFI-B

NGFI-B er underlagt kontrollmekanismer som inntreffer både før og etter transkripsjon. Endring av mRNA-nivået har blitt observert etter ulike induserende stimuli som membrandepolarisering og vekstfaktorstimulering (Bartel, Sheng et al. 1989). Posttranskripsjonelle fosforyleringer inntreffer i varierende grad som respons til ulike stimuli. NGF-behandling har vist seg å føre til redusert binding av NGFI-B til NBRE gjennom fosforylering av aminosyren ser 350 lokalisert i A-boksen (se avsnitt 1.2.1) (Hirata, Kiuchi et al. 1993). NGF-indusert fosforylering av ser 105 er også observert å kunne lede til nukleær eksport av NGFI-B i PC12-celler (Fahrner, Carroll et al. 1990; Katagiri, Takeda et al. 2000). Vekstfaktoren EGF ("Epidermal growth factor") fører til fosforylering av thr 142 på NGFI-B-proteinet (Slagsvold, Ostvold et al. 2002). Fosforylering av thr 142 er en av effektene ved ERK2-aktivering. EGF er en ligand for reaksjonsveien som fører til ERK2-aktivering. Denne reaksjonsveien kan være ansvarlig for fosforyleringen av thr 142 indusert av EGF (Slagsvold, Ostvold et al. 2002). Effektene av thr 142 fosforylering og reaksjonsveien som fører til aktivering av ERK2 er nærmere beskrevet i avsnitt 1.3.

1.2.3 NGFI-B kan fremme både celleoverlevelse og celledød

NGFI-B er ofte overuttrykt i forskjellige typer kreftceller (Moll, Marchenko et al. 2006). Blant annet er NGFI-B i lungekreftceller vist å fremme cellesyklusprogresjon og celleprolifisering gjennom transkripsjonell aktivitet (figur 1.7). Uttrykk av NGFI-B stimuleres av en rekke vekstfaktorer, og det kan ikke utelukkes at NGFI-B spiller en rolle i medieringen av de vekststimulerende effektene disse vekstfaktorene har i enkelte kreftceller (Kolluri, Bruey-Sedano et al. 2003).

NGFI-B har også en apoptoseinduserende effekt (figur 1.7). Denne ble først demonstrert i forbindelse med T-Celle-mediert apoptose, hvor NGFI-B var sterkt uttrykt (Liu, Smith et al.

1994). Senere forsøk har vist at NGFI-B induserer apoptose ved å translokalisere fra kjernen til mitokondriene (Li, Kolluri et al. 2000). Translokaliseringen av NGFI-B skjer ved hjelp retinoid X reseptor α (RXR α) som er kolokalisert sammen med NGFI-B i kjernen. RXR α fungerer som et bærerprotein for NGFI-B ved translokalisering til mitokondriene (Lin, Zhao et al. 2004). I mitokondriene fører NGFI-B til frisetting av cytochrom c (Li, Kolluri et al. 2000). Frisetting av cytochrom c fører til aktivering av caspase 3 via mekanismene beskrevet i avsnitt 1.1.6.

Mekanismen bak NGFI-Bs effekt på cytochrom c frisetting synes å være en interaksjon med det apoptosebeskyttende proteinet Bcl2. Interaksjonen mellom NGFI-B og Bcl2 konverterer Bcl2 fra en beskytter til et apoptoseinduserende protein (Lin, Kolluri et al. 2004). Bcl2-familiens apoptoseinduserende funksjon er avhengig av et eksponert BH3-domene (McDonnell, Fushman et al. 1999). Det ligandbindende domenet (LBD) hos NGFI-B binder seg til loop-regionen mellom BH3 og BH4-domenet på Bcl2-proteinet, dette fører til at BH3-domenet som vanligvis er ”gjemt” blir eksponert (Lin, Kolluri et al. 2004).

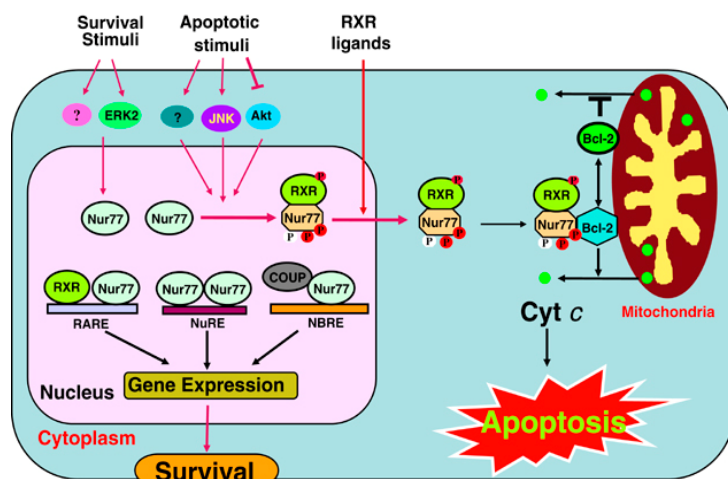


Fig 1.7: NGFI-B kan stimulere både overlevelse og apoptose.

Figuren er hentet fra (Moll, Marchenko et al. 2006).

1.3 MAPK/ERK REAKSJONSVEIEN

MAPK/ERK reaksjonsveien er en kaskadereaksjon som videreformidler et ekstracellulært signal fra en reseptor på celleoverflaten. Dette signalsystemet regulerer fundamentale cellulære prosesser som proliferasjon, differensiering, overlevelse og apoptose (figur 1.8).

Kaskadereaksjonen kan initieres av ligander som for eksempel vekstfaktoren EGF (Kolch 2000). De ulike kinasene som inngår i ERK-reaksjonsveien er isoformer som til slutt aktiverer ERK1/ERK2 (Robinson and Cobb 1997).

NGFI-B er et substrat for ERK2, som etter aktivering fosforylerer aminosyren thr 142 på NGFI-B (Slagsvold, Ostvold et al. 2002). Effekter av ERK2 på lokalisasjonen av NGFI-B har blitt observert (Jacobs and Paulsen 2005). Aktivering av ERK2 via EGF-stimulering hindrer glutamat-indusert subcellulær translokasjon av NGFI-B, mens overuttrykk av aktivert ERK2 fører til hovedsakelig kjernelokalisering av NGFI-B (Jacobs, Boldingh et al. 2004).

For å studere effekten av vekstfaktoraktivert ERK på NGFI-B-forflytning, caspase 3-aktivitet og celledød er det nødvendig å ha eksperimentelle modeller hvor signalveiene er i bruk og lar seg aktivere. Til dette formålet har ulike eksperimentelle metoder blitt benyttet, som calcium ionophore (se avsnitt 1.1.1), serumdeprivasjon (se avsnitt 1.1.2) og caspase 3-aktivatoren PAC-1 (se avsnitt 1.1.7).

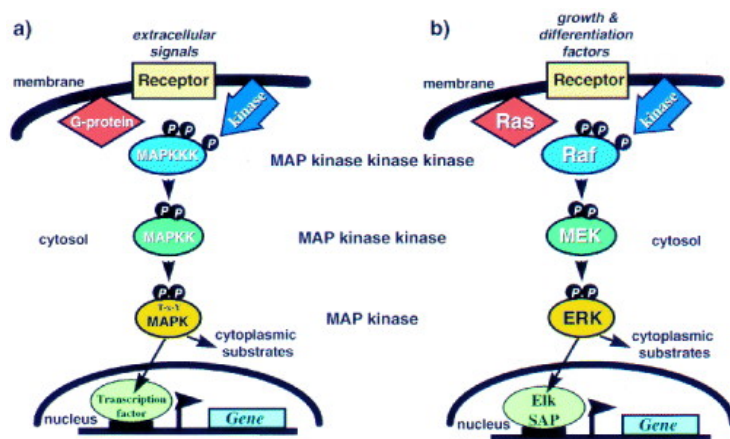


Fig 1.8: a) Generell beskrivelse av MAPK reaksjonsveien: En G-proteinkoblet reseptor som aktiverer MAPK kinase kinase (MAPKKK) som fosforylerer MAPK kinase (MAPKK) som igjen aktiverer MAPK.

b) Beskrivelse av ERK reaksjonsveien: G-protein = RAS, MAPKKK = Raf, MAPKK = MEK, MAPK = ERK.

Figuren er hentet fra (Kolch 2000).

1.4 MÅL MED OPPGAVEN

Målet med oppgaven var å undersøke følgende:

- Om cellelinjene PC12 og CV1 var egnet som modeller for å studere translokalisering av NGFI-B fra kjernen til mitokondriene.
- Om translokalisering av NGFI-B var involvert i apoptose i PC12 og CV1.
- Om cellelinjene PC12 og CV1 var egnet som modeller for å studere aktivering av caspase 3.
- Om cellelinjene PC12 og CV1 var egnet som modeller for å studere celledød.

2. MATERIALER OG METODER

2.1 KJEMIKALIER OG REAGENSER

PRODUKT	PRODUSENT
ac-DEVD-amc	Bachem, Bubendorf, Sveits
ac-DEVD-cmk	Bachem, Bubendorf, Sveits
Alkohol, absolutt prima	Arcus produkter, Oslo, Norge
BCA Assay kit	Pierce, II, USA
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Calcium ionophore A23187	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dinatrium-hydrogenfosfat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstad, Tyskland
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen co, Carlsbad California, USA
Epidermal growth factor (EGF)	Pepro Tech Inc., New Jersey, USA
Fluorescein Diacetat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glukose	Merck, Darmstad, Tyskland
Hepes	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hesteserum	Invitrogen co, Carlsbad California, USA
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kaliumdihydrogenfosfat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstad, Tyskland
Kaliumklorid (KCl)	Merck, Darmstad, Tyskland
Kalsiumklorid (CaCl_2)	Merck, Darmstad, Tyskland
Kalveserum, føtalt	Invitrogen co, Carlsbad California, USA
Metafectene TM Pro	Biontex, Martinsried/Planegg, Tyskland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumklorid (NaCl)	J.T Baker, Deventer, Nederland
Natriumpyruvat ($\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Nerve growth factor (NGF)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PAC-1	Gave fra førsteamanuensis Trond Vidar Hansen ved Avdeling for farmasøytisk kjemi,

	Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
Penicillin-streptomycin (10 000U/ml/10 000 ul/ml)	Invitrogen Co, Carlsbad California, USA
Propidium iodide	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblå, CI 23850; Direct Blue 14	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin-EDTA	Invitrogen Co, Carlsbad California, USA

2.2 UTSTYR

96 wells brett, Nunclon

Cellekulturskåler, Nunclon, Strålesteriliserte

Celleskrape (Cell lifter), Corning Incorporated

CO₂-inkubator, Thermo Forma, Steri-Cycle

Finnpipette, Thermo Electron

Fluorescensmikroskop, Nikon Eclipse TE 300 DV med kamera fra RT Diagnostic Instruments

Gassbrenner, Fireboy Eco, Integra Bioscience

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

Vannbad Techne TE-10A

Vannrenseanlegg, Aquatron A4S

2.3 PC12-CELLER

PC12 er en kreftcellelinje hentet fra feokromocytom i binyremargen hos rotter. PC12-cellene syntetiserer og lagrer neurotransmitterene dopamin og noradrenalin. PC12-celler responderer på behandling med NGF ved å danne utløpere tilsvarende de som dannes av sympatiske nevroner i primære cellekulturer. Disse momentene gjør PC12 til en velegnet cellelinje for neurobiologiske og nevrokjemiske studier (Greene and Tischler 1976).

2.3.1 Splitting av PC12-celler

PC12-cellene ble splittet når de var konfluente, hver 3 eller 4 dag, og inkubert ved 5 % CO₂ og 37 °C.

Tabell 2.1 PC12-medium med serum

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

Splitteprosedyre:

- Gammelt medium tømmes av.
- Celleflasken tilsettes 10 ml nytt PC12-medium (tabell 2.1).
- Cellene løsnes fra flasken ved å banke på siden av celleflasken.
- Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned minimum 10 ganger, slik at celleaggregater løses opp og cellene blir jevnt fordelt i mediet.
- Til en celleflaske inneholdende 20 ml PC12-medium (tabell 2.1) tilsettes 2 ml av cellesuspensjonen.

Ved splitting til skåler tas det ut en liten mengde cellesuspensjon slik at celletettheten i denne kan bestemmes i bürcherkammer i mikroskopet. Deretter splittes cellene ut på skåler med en tetthet på 7×10^4 celler/ml.

2.3.2 Transfeksjon av PC12-celler

PC12-celler som skulle transfekteres ble splittet ut på små celledskåler ($8,8 \text{ cm}^2$) med en tetthet på 7×10^4 celler/ml.

Transfeksjonen ble utført ved hjelp av Metafecten™ Pro.

Transfeksjonen ble utført 1 døgn etter at cellene ble splittet ut på skåler.

Etter transfeksjonen ble skålene inkubert ved 5 % CO₂ og 37 °C i 48 timer før mikroskopering.

På grunn av fare for inaktivering av transfeksjonsreagenset ble det benyttet Dulbeccos MEM som ikke var tilsatt Penicillin/Streptomycin.

Transfeksjonsprosedyre:

- 1 ug/ml DNA (tabell 2.3) blandes i 50 ul serumfritt Dulbeccos MEM.
- 2 ul Metafectene™ Pro fortynnes med 50 ul serumfritt Dulbeccos MEM.
- De to løsningene blandes forsiktig ved å pipettere blandingen 1-2 ganger.
- Inkuber så ved romtemperatur i 15-20 min.
- Transfeksjonsblandingen dryppes ut på skålene, som deretter blir satt til inkubering ved 5 % CO₂ og 37 °C.
- Etter 24 timer fjernes mediet inneholdende transfeksjonsløsningen fra celledskålen, og det tilsettes 1,5 ml nytt PC12-medium (tabell 2.1).

Tabell 2.2 Plasmider brukt til transfeksjoner i PC12-celler

Genprodukt	Plasmid	Kilde	Plasmid bruksnavn
GFP-merket NGFI-B	pNGFI-B-GFP	Jacobs et al (2004)	NGFI-B-GFP
GFP-merket T142A -NGFI-B	pNGFI-B(T142A)- GFP	Produsert i prof. RE Paulsens laboratorium	NGFI-B-T142A-GFP
GFP-merket T142E – NGFI-B	pNGFI-B(T142E)- GFP	Produsert i prof. RE Paulsens laboratorium	NGFI-B-T142E-GFP
ERK2 dominant aktiv	pCMV 5 ERK2-MEK 1R4F	Gave fra Dr M. Cobb, University of Texas	MEKERK2
Tomt ekspressor plasmid	pCMV neo	Wilson et al (1991)	CMV

Tabell 2.3 Plasmidblandinger for transfeksjoner utført i PC12-celler

Plasmidblanding	Konsentrasjoner
NGFI-B-GFP	1 ug/ml
NGFI-B-GFP + CMV	0,4 ug/ml + 0,6 ug/ml
NGFI-B-T142A-GFP + CMV	0,4 ug/ml + 0,6 ug/ml
NGFI-B-T142E-GFP + CMV	0,4 ug/ml + 0,6 ug/ml
NGFI-B-GFP + MEKERK2	0,4 ug/ml + 0,6 ug/ml

2.4 CV1-CELLER

CV1 er en kontinuerlig cellelinje hentet fra apenyreceller (Hopps, Bernheim et al. 1963). CV1-cellene har en velavgrenset kjerne, og stor cytoplasma. Dette gjør celletypen velegnet for mikroskopiforsøk. CV1-cellene lar seg også lett transfektere.

2.4.1 Splitting av CV1-celler

CV1-cellene ble splittet når de var konfluente, hver 3 eller 4 dag, og inkubert ved 5 % CO₂ og 37 °C.

Tabell 2.4 CV1-medium

Komponent	Mengde
Føtalt kalveserum	50 ml
Natriumpyruvat	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Dulbecoos MEM	500 ml

Splitteprosedyre:

- Gammelt medium tømmes av.
- Celleflasken vaskes med 2 ml "trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid" (trypsin-EDTA).
- 2 ml trypsin-EDTA tilsettes og pipetteres av etter 30 sekunder. Celleflasken inkuberes deretter ved 37 °C og 5 % CO₂ i 5-10 minutter.
- Cellene løsnes ved å banke på siden av celleflasken.

- 10 ml nytt CV1-medium (tabell 2.4) settes til celleflasken.
- Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned ca. 10 ganger for å få en jevn fordeling av celler.
- 1,5 ml av cellesuspensjonen tilsettes en ny celleflaske inneholdende 20 ml CV1-medium (tabell 2.4).
- Ved splitting til skåler tas det ut en liten mengde cellesuspensjon slik at celledettheten kan bestemmes i bürcherkammer i mikroskopet. Deretter splittes cellene ut på skåler med en tetthet på $3,5 \times 10^4$ celler/ml.

2.4.2 Transfeksjon av CV1-celler

CV1-cellene ble transfektert ved å benytte kalsium-presipitasjons-metoden (Graham and van der Eb 1973).

Transfeksjonsprosedyre:

- 0,25 M CaCl_2 og “N, N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminosulfonic acid (BES) buffered saline solution (BBS)” (tabell 2.5) blandes i like mengder.
- 10 μg DNA/ml tilsettes (tabell 2.7).
- Løsningen whirlmikses i 5 + 10 sekunder.
- Etter å ha blitt inkubert ved romtemperatur i 20 minutter blir 330 μl av transfeksjonsløsningen dryppet ut på celleskåler (21,5 cm^2).
- Celleskålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO_2 .
- Etter 5 timer tas mediet av og nytt CV1-medium (tabell 2.4) settes på skålen.
- Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO_2 i 2 døgn før eksponering.

Tabell 2.5 BBS

Komponent	Konsentrasjon	Mengde i 500 ml
BES	50 mM	5,333 g
Na_2HPO_4	2 mM	0,134 g
NaCl 5 M	280 mM	28,0 ml
MQ- H_2O		ad 500 ml

Tabell 2.6 Plasmider brukt i transfeksjonsforsøk

Genprodukt	Plasmid	Kilde	Plasmid bruksnavn
GFP-merket NGFI-B	pNGFI-B-GFP	Jacobs et al (2004)	NGFI-B-GFP
Tomt ekspressor plasmid	pCMV neo	Wilson et al (1991)	CMV

Tabell 2.7 Plasmidblandinger for tranfeksjoner utført i CV1-celler

Plasmidblanding	Konsentrasjoner
NGFI-B-GFP + CMV	1 ug/ml + 9 ug/ml
CMV	10 ug/ml

2.5 MÅLING AV NUKLEÆR NGFI-B-LOKALISERING

48 timer etter transfeksjon ble PC12-cellene mikroskopert i fluorescensmikroskop. Mikroskopet (Nikon Eclipse TE 300 DC Fluorescensmikroskop) er utstyrt med kamera fra RT Diagnostic Instruments. Dette ble brukt til å ta bilder av de fluorescerende cellene. Bildene ble tatt med 40X forstørrelse.

Ved hjelp av bildebehandlingsprogrammet ImageJ ble bildene analysert ved å måle Pixelintensiteten på en 8-bits skala fra 0-255 i henholdsvis cytosol og kjerne. For transfekterte CV1-celler ble den nukleære lokaliseringen av NGFI-B bestemt ved visuell vurdering i mikroskopet.

2.5.1 PC12-celler

Forsøksoppsett for mikroskopering av PC12-celler:

- Cellene mikroskoperes i ubehandlet tilstand 48 timer etter transfeksjon.
- Cellene eksponeres ved at gammelt medium suges av og erstattes av 1,5 ml eksponeringsløsning (tabell 2.8).
- De eksponerte cellene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 60-80min.
- Etter 60-80min mikroskoperes cellene på ny. De serumdepriverte og mockdepriverte settes tilbake i 37 °C og 5 % CO₂ i 6-9 timer.
- Serumdepriverte og mockdepriverte celler mikroskoperes etter 6-9 timer.

Tabell 2.8 Eksponeringsløsninger/deprivasjonsløsninger for mikroskopering av PC12-celler

- PC12-medium (tabell 2.1) + 50 ng/ml NGF
- PC12-medium (tabell 2.1) + 5 ng/ml EGF
- PC12-medium (tabell 2.1) + 1 uM calcium ionophore
- PC12-medium (tabell 2.1) (mockdeprivasjon)
- Serumfritt medium (tabell 2.9) (serumdeprivasjon)
- Serumfritt medium (tabell 2.9) + 50 ng/ml NGF
- Serumfritt medium (tabell 2.9) + 5 ng/ml EGF

Tabell 2.9 Serumfritt medium til serumdeprivasjon

Komponent	Mengde
Natriumpyruvat	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Dulbeccos MEM	500 ml

2.5.2 CV1-celler

Forsøksoppsett for mikroskopering av CV1 celler:

- Gammelt medium suges av.
- 2 ml av eksponeringsløsningen (tabell 2.10) settes til skålen.
- De eksponerte cellene mikroskoperes ved 30 minutter og 1 time.

Tabell 2.10 Eksponeringsløsninger for mikroskopering av CV1-celler

- CV1 medium (tabell 2.4) + 1 uM calcium ionophore

2.6 MÅLING AV CASPASE 3

Eksponering og påfølgende caspasemåling ble foretatt 48 timer etter at cellene var splittet ut på skåler for både CV1 og PC12-celler.

Cellene ble eksponert 3,5-4 timer før de ble høstet. Eksponering av cellene ble gjort ved å erstatte det gamle mediet med 2 ml av eksponeringsløsningen (for PC12: tabell 2.11, for CV1: tabell 2.12).

Tabell 2.11 Eksponeringsløsninger/deprivasjonsløsninger for måling av caspase og celledød i PC12-celler

- Serumfritt medium (tabell 2.9) (serumdeprivasjon)
- PC12-medium (tabell 2.1) (mockdeprivasjon)
- PC12-medium (tabell 2.1) + 1 uM calcium ionophore
- PC12-medium (tabell 2.1) + 5 uM calcium ionophore
- PC12-medium (tabell 2.1) + 1 uM calcium ionophore + 5 ng/ml EGF
- PC12-medium (tabell 2.1) + 1 uM calcium ionophore + 50 ng/ml NGF
- PC12-medium (tabell 2.1) + 100 uM PAC-1
- PC12-medium (tabell 2.1) + 100 uM PAC-1 + 5 ng/ml EGF
- PC12-medium (tabell 2.1) + 100 uM PAC-1 + 50 ng/ml NGF
- Serumfritt medium (tabell 2.9) + 5 ng/ml EGF
- Serumfritt medium (tabell 2.9) + 50 ng/ml NGF

Tabell 2.12 Eksponeringsløsninger for måling av caspase i CV1-celler

CV1-medium (tabell 2.4) + 1 uM calcium ionophore

Forsøksoppsett for måling av caspase i PC12 og CV1-celler:

- Cellene eksponeres i 3,5-4 timer.
- Etter eksponering vaskes cellene med PBS (tabell 2.14).
- Deretter inkuberes cellene i 500 ul modifisert RIPA-buffer (tabell 2.15) i 5 minutter ved romtemperatur.
- 100 ul cellelysat tilsettes i 4 forskjellige brønner i et 96-brønnersbrett (tabell 2.13).
- 3 av brønnene blir tilsatt 100 ul av caspase 3-substratet ac-DEVD-amc (40 uM) (tabell 2.13).
- Den 4.brønneren blir tilsatt 100 ul av caspase 3-substratet ac-DEVD-amc (40 uM) + caspasehemmeren ac-DEVD-cmk (2 uM) (tabell 2.13).
- Brettet inkuberes så i 24 timer ved 37 °C, før avlesing i plateleseren ved 360/460 nm.

Tabell 2.13 Prøveoppsett caspasemåling

	1	2
A	Prøve 1 + caspase substrat
B	Prøve 1 + caspase substrat
C	Prøve 1 + caspase substrat
D	Prøve 1 + caspase substrat + caspasehemmer
E	Prøve 2 + caspase substrat
F	Prøve 2 + caspase substrat
G	Prøve 2 + caspase substrat
H	Prøve 2 + caspase substrat + caspasehemmer

Tabell 2.14 PBS

Komponent	Konsentrasjon	Innveid mengde
NaCl	137 mM	8,0 g
Na ₂ HPO ₄	6,5 mM	1,44g
KCl	2,7 mM	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,24 g
Destillert vann		ad 1000 ml
pH justeres til 7,4.		
Autoklaveres og lagres ved 4 °C.		

Tabell 2.15 RIPA-buffer

Komponent	Konsentrasjon	Mengde i 10 ml buffer
Tris-HCl 1M pH = 7,4	50 mM	50 ul
Igepal 100 %	1%	300 ul
Natriumdeoxycholat	0,25 %	25 ul
NaCl	150 mM	300 ul
EGTA 0,1 M	1 mM	100 ul
MQ-vann		ad 10 000 ul

2.7 DETEKSJON AV CELLEDØD

Som metode for deteksjon av celledød i PC12-celler ble farging med trypanblå (tabell 2.16) valgt. For å detektere celledød i CV1-celler ble det valgt å farge med propidiumiodid (PI) (tabell 2.17) og fluorescein diacetat (FdA) (tabell 2.18).

2.7.1 Farging av PC12-celler med trypanblå

Fargingen ble foretatt 24 timer etter eksponering med løsningene i tabell 2.11. Trypanblå passerer cellemembranen når døende celler mister membranintegriteten. Døde celler blir derfor farget blå.

- Cellene eksponeres 24 timer før fargingen foretas (tabell 2.11).

- Cellemediet pipetteres av til det er 1 ml igjen i skålen.
- 250 ul av trypanblåløsningen (tabell 2.16) tilsettes.
- Skålen inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 30 minutter.
- Fargeløsningen fjernes.
- Fargede (døde) og ufargede (levende) celler telles i mikroskop.
- Andel døde celler beregnes.

Tabell 2.16 Løsninger til Trypanblå-farging

2 % Trypanblå stockløsning	
Trypanblå	1 g
Destillert vann	50 ml
Komponentene blandes sammen og varmes opp til kokepunktet. Dette gjøres i avtrekk. Deretter settes løsningen til avkjøling ved romtemperatur før den filtreres.	
NaCl stockløsning	
NaCl	1,8 g
Destillert vann	100 ml
Trypanblåløsning	
Trypanblå stockløsning blandes med NaCl stockløsning i forholdet 1:1 rett før bruk.	

2.7.2 Farging med propidiumiodid og fluorescein diacetat

For CV1-cellene ble dobbeltfarging med propidiumiodid og fluorescein diacetat valgt som deteksjonsmetode for å måle celledød. CV1-celler ble dobbeltfarget med propidiumiodid (PI) og fluorescein diacetat (FdA) 24 timer etter eksponering med løsningene i tabell 2.20.

PI er en kjernefarge som kun farger døde celler, ved å gå inn i kjernen og binde seg til DNA slik at kjernen blir farget sterkt rød. Konsentrasjonen av PI i skålen var 4,6 ug/ml (tabell 2.17).

FdA er upolar og i utgangspunktet ikke fluorescerende. FdA kan derfor passere fritt over membranen og inn i cellen. I levende celler vil FdA-molekylet hydrolyseres til fluorescerende fluorescein og to acetat. Konsentrasjonen av FdA i skålen var 15 ug/ml (tabell 2.18). Fargingen ble foretatt 24 timer etter eksponering med løsningene i tabell 2.20.

Tabell 2.17 Propidiumiodid løsning

Komponent	Mengde
Propidiumiodid	4,6 ug
Lockes løsning uten magnesium (tabell 2.19)	1 ml

Tabell 2.18 Fluorescein diacetat løsning

Komponent	Mengde
Fluorescein diacetat	15 mg
Dimetylsulfoksid	1 ml

Tabell 2.19 Lockes løsning uten magnesium

Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde i 1000 ml
NaCl	154 mM	9,00 g
KCl	5,6 mM	0,42 g
NaHCO ₃	3,6 mM	0,30 g
CaCl ₂	2,3 mM	0,34 g
Glukose	5,6 mM	1,00 g
Hepes	5,0 mM	1,19 g
Destillert vann		ad 1000 ml

Prosedyre for farging med PI/FdA:

- Cellene eksponeres 24 timer før farging (tabell 2.20).
- Mediet tømmes av og vaskes med Lockes løsning (tabell 2.19).
- Til hver skål tilsettes 2 ml Lockes løsning (tabell 2.19).

- 2 ul PI (tabell 2.17) og 2 ul FdA (tabell 2.18) tilsettes.
- Denne blandingen inkuberes ved romtemperatur i 3 minutter.
- Løsningen fjernes, og celledåsen vaskes med Lockes løsning (tabell 2.19) to ganger.
- 2 ml Lockes løsning (tabell 2.19) tilsettes celledåsen.
- Celledød bestemmes ved å telle døde celler (røde kjerner) og levende celler (grønne celler).

Tabell 2.20 Eksponeringsløsninger for måling av celledød i CV1-celler

Plasmid	Eksponeringsløsning
NGFI-B-GFP + CMV	CV1-medium + 1 uM calcium ionophore
Ikke transfekterte CV1-celler	CV1-medium + 1 uM calcium ionophore

2.8 PROTEINMÅLING

Proteininnholdet for alle skålene i caspaseforsøkene (avsnitt 2.6) ble bestemt ved hjelp av BCA protein assay kit (Pierce). Målingen ble gjort på cellysatsen fra caspaseforsøket (avsnitt 2.6) i et 96-brønnersbrett. Prosedyren er lik for PC12 og CV1-celler.

- Standardløsning (tabell 2.21) og ”working reagent” (tabell 2.22) blandes ut.
- Alle brønnene tilsettes 200 ul ”working reagent”.
- Standardløsningen tilsettes etter skjema i tabell 2.23.

Tabell 2.21 Standardløsning til proteinmåling

Komponent	Mengde
Bovint serumalbumin 2mg/ml	50 ul
PBS (tabell 2.14)	150 ul

Tabell 2.22 ”Working reagent”

Komponent	Mengde
BCA assay reagent A	50 deler
BCA assay reagent B	1 del

Tabell 2.23 Tilsetting av standardløsning og prøver

	1	2	3
	Standard	Standard	Prøve
A	-	10 ul	Prøve 1
B	-	10 ul	Prøve 1
C	1 ul	20 ul	Prøve 1
D	1 ul	20 ul	Prøve 2
E	2,5 ul	40 ul	Prøve 2
F	2,5 ul	40 ul	Prøve 2
G	5 ul		Prøve 3
H	5 ul	

- 10 ul av hver prøve tilsettes i 3 forskjellige brønner (tabell 2.23).
- 10 ul RIPA-buffer (tabell 2.15) tilsettes brønnene inneholdende standardløsning.
- Brettet inkuberes ved 37 °C i 1 time 30 minutter, før målingen avleses i plateleseren.

2.9 STATISTIKK

Resultatene ble analysert ved hjelp av statistikkprogrammet Sigma Stat versjon 3.5 fra Systat Software, Inc.

Som metode for parvis sammenligning av data ble Mann-Whitney Rank Sum Test valgt. For sammenligning av flere grupper data ble Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks med Dunn's Method valgt som testmetode. $P < 0,05$ ble sett på som signifikant.

Grafene i denne oppgaven ble laget ved hjelp av SigmaPlot versjon 10.0 fra Systat Software, Inc.

3. RESULTATER

Det var ønskelig å finne cellelinjer hvor apoptoseprosessen startet med translokalisering av NGFI-B til mitokondriene for å studere molekylære mekanismer. Det har blitt brukt transfekterte PC12 og CV1-celler til å studere nukleær lokalisering av NGFI-B (avsnitt 3.1,3.2,3.3), ikke transfekterte PC12-celler til studier av caspase 3-aktivering (avsnitt 3.4.1-3.4.4) og celledød (avsnitt 3.5.1-3.5.4), og NGFI-B-GFP-transfekterte og ikke transfekterte CV1-celler til studier av caspase 3-aktivering (avsnitt 3.4.5) og celledød (avsnitt 3.5.5).

3.1 NUKLEÆR LOKALISERING AV NGFI-B I PC12-CELLER

Forsøket ble utført for å undersøke effekten av ulike behandlinger på nukleær lokalisering av NGFI-B i PC12-celler.

PC12-celler transfektert med GFP(grønt fluorescerende protein)-merket NGFI-B ble mikroskopert og fotografert i fluorescensmikroskop med tilknyttet kamera. Bildene ble deretter analysert i bildebehandlingsprogrammet ImageJ versjon 1.37, og konsentrasjonen av NGFI-B-GFP i henholdsvis kjerne og cytosol ble bestemt (avsnitt 2.5). Ut fra dette ble kjernelokaliseringen av NGFI-B-GFP bestemt som prosentandel NGFI-B-GFP i kjernen delt på total andel NGFI-B-GFP i cellen.

Alle forsøk i avsnitt 3.1 er gjort i PC12-celler transfektert med kun ett plasmid (NGFI-B-GFP) (tabell 2.3)

3.1.1 Effekt av vekstfaktorene EGF og NGF

Translokalisering av NGFI-B fra kjernen til mitokondriene kan indusere apoptose (Li, Kolluri et al. 2000).

Vekstfaktoren EGF kan gjennom å aktivere MAP kinasen ERK2, beskytte cellene mot apoptose, en aktivering som samtidig fører til at aminosyren thr 142 på NGFI-B-proteinet fosforyleres (Slagsvold, Ostvold et al. 2002).

EGF har blitt vist å kunne føre til økt kjerneimport av NGFI-B (Jacobs and Paulsen 2005). NGF-deprivering kan føre til apoptose gjennom nedregulering av ERK (Xia, Dickens et al. 1995).

Med bakgrunn i dette var det interessant å undersøke om EGF og NGF påvirket graden av kjernelokalisert NGFI-B i PC12-celler.

Det var en signifikant nedgang i kjernelokaliseringen ved behandling med både EGF og NGF (fig 3.1,3.2,tabell 3.1).

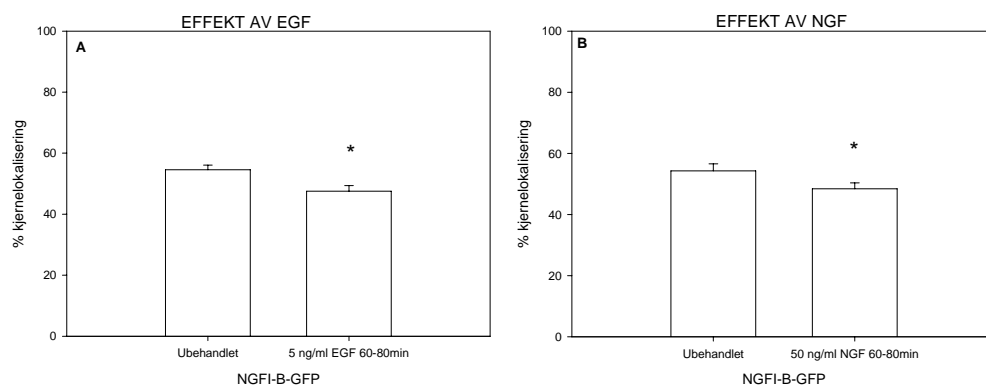


Fig 3.1 Figuren viser gjennomsnittlig % kjernelokalisering \pm SEM av NGFI-B i ubehandlede PC12-celler og i celler eksponert med:

A: 5 ng/ml EGF.

B: 50 ng/ml NGF.

Målingen er foretatt 60-80 minutter etter eksponering.

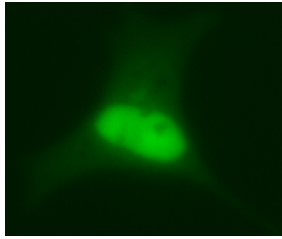
* indikerer signifikans i forhold til den ubehandlede kontrollen.

Tabell 3.1 A Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.1 A

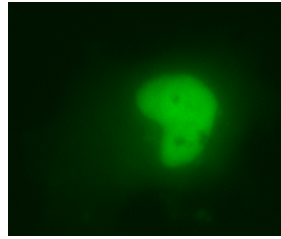
Behandling	% kjernelokal isering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	54,5450	1,5440	3	32
5 ng/ml EGF 60-80min	47,5200	1,8380	3	35

Tabell 3.1 B Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.1 B

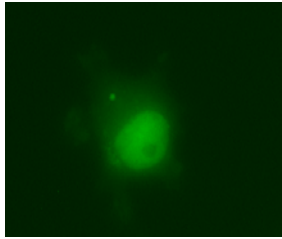
Behandling	% kjernelokal isering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	54,257	2,358	3	31
50 ng/ml NGF 60-80min	48,394	1,957	3	40



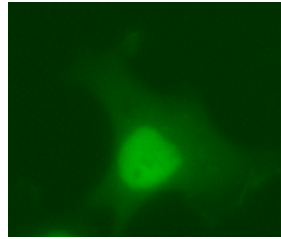
**Fig 3.2 A: NGFI-B-GFP
UB**



**Fig 3.2 B: NGFI-B-GFP
+ EGF
60-80 min**



**Fig 3.2 C NGFI-B-GFP
UB**



**Fig 3.2 D: NGFI-B-GFP
+ NGF
60-80 min**

Figur 3.2: Eksempler på celler fra forsøkene som utgjør grunnlaget for resultatene vist i fig. 3.1.

3.1.2 Effekt av serumdeprivasjon

Serumdeprivasjon er en metode som induserer apoptotisk celledød i PC12-celler (Greene 1978). Ettersom dette var en kjent modell for apoptose i denne cellelinjen, var interessant å studere effektene på lokaliseringen av NGFI-B.

I tillegg ble det gjort forsøk med serumdeprivasjon sammen med vekstfaktorene NGF og EGF.

Ingen av behandlingene ga en signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B (fig 3.3, 3.4, tabell 3.2).

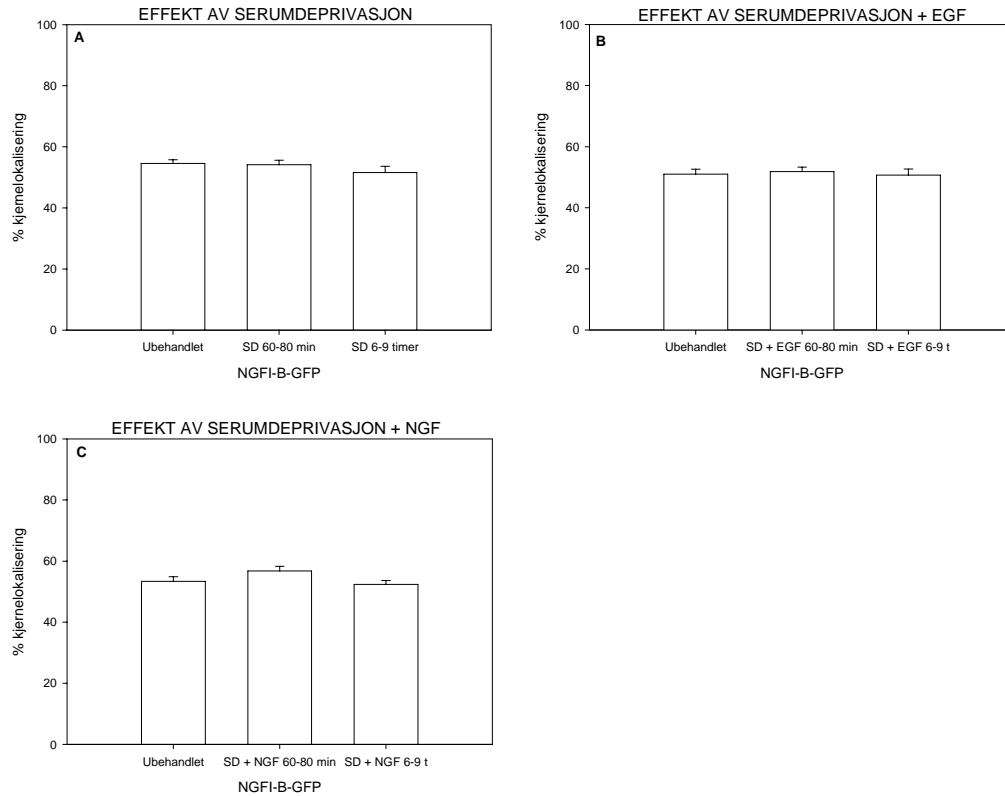


Fig 3.3: Figuren viser gjennomsnittlig % kjernelokalisering av NGFI-B \pm SEM i ubehandlede PC12-celler og i behandlede celler:

A: serumdepriverte celler.

B: serumdepriverte celler + 5 ng/ml EGF

C: serumdepriverte celler + 50 ng/ml NGF

Målingen er foretatt 60-80 minutter etter eksponering, og 6-9 timer etter eksponering.

SD = Serumdeprivert

Tabell 3.2 A Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3 A

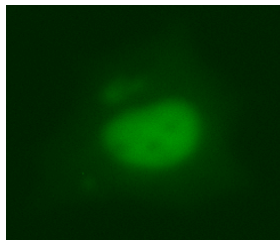
Behandling	% kjernelokalisering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	54,5500	1,2490	3	42
Serumdeprivert 60-80min	54,1490	1,4430	3	36
Serumdeprivert 6-9 timer	51,5710	2,0310	3	38

Tabell 3.2 B Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3 B

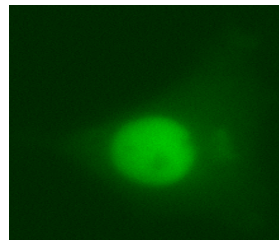
Behandling	% kjernelokal isering	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	50,984	1,6780	3	43
Serumdeprivert + 5 ng/ml EGF 60-80min	51,8570	1,4610	3	39
Serumdeprivert + 5 ng/ml EGF 6-9 timer	50,7190	2,004	3	35

Tabell 3.2 C Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3 C

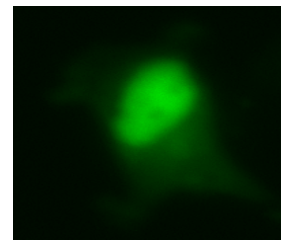
Behandling	% kjernelokal isering	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	53,3700	1,5300	3	40
Serumdeprivert + 50 ng/ml NGF 60-80min	56,7830	1,5240	3	37
Serumdeprivert + 50 ng/ml NGF 6-9 timer	52,3640	1,2900	3	35



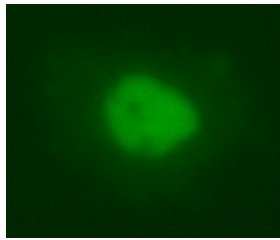
**Fig 3.4 A: NGFI-B-GFP
UB**



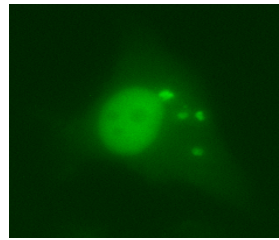
**Fig 3.4 B: NGFI-B-GFP
Serumdeprivert
60-80min**



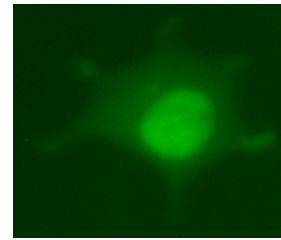
**Fig 3.4 C: NGFI-B-GFP
Serumdeprivert
6-9 timer**



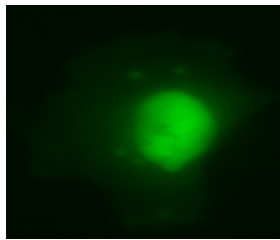
**Fig 3.4 D: NGFI-B-GFP
UB**



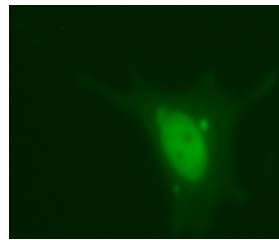
**Fig 3.4 E: NGFI-B-GFP
Serumdeprivert + EGF
60-80 min**



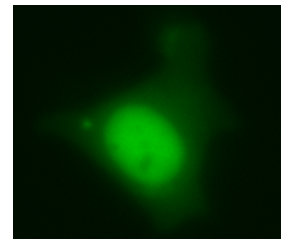
**Fig 3.4 F: NGFI-B-GFP
Serumdeprivert + EGF
6-9 timer**



**Fig 3.4 G: NGFI-B-GFP
UB**



**Fig 3.4 H: NGFI-B-GFP
Serumdeprivert + NGF
60-80 min**



**Fig 3.4 I: NGFI-B-GFP
Serumdeprivert + NGF
6-9 timer**

Figur 3.4: Eksempler på celler fra forsøkene som utgjør grunnlaget for resultatene vist i fig. 3.3.

3.1.3 Effekt av calcium ionophore

Calcium ionophore A23187 er et antibiotikum som fører til økt intracellulær kalsiumkonsentrasjon (Martina, Kili et al. 1994), noe som kan indusere apoptose. Forsøket ble gjort for å undersøke om NGFI-B spiller en rolle i denne apoptose-veien. Behandlingen med calcium ionophore ga ingen signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B-GFP (fig 3.5, 3.6, tabell 3.3).

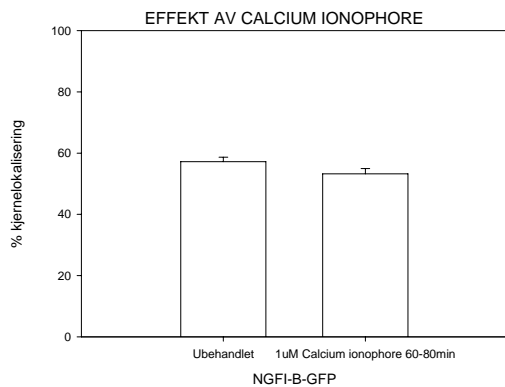


Fig 3.5: Figuren viser gjennomsnittlig % kjernelokalisering av NGFI-B \pm SEM i ubehandlede celler og i celler eksponert med 1uM calcium ionophore. Målingen er foretatt 60-80 minutter etter eksponering.

Tabell 3.3 Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5

Behandling	% kjernelokalisering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	57,229	1,430	3	31
1 uM calcium Ionophore 60-80min	53,222	1,748	3	33

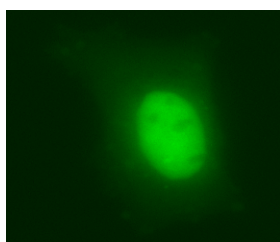


Fig 3.6 A: NGFI-B-GFP
UB

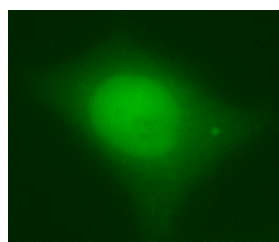


Fig 3.6 B: NGFI-B-GFP
+ 1 uM calcium ionophore
60-80 min

Figur 3.6: Eksempler på celler fra forsøkene som utgjør grunnlaget for resultatene vist i fig. 3.5.

3.1.4 Kontroller

For å eliminere en mulig effekt av forsøksbetingelsene ble det utført to kontroller. En ubehandlet celleskål ble mikroskopert ved tidspunkt 0, satt tilbake ved 5 % CO₂, 37 °C og deretter mikroskopert på nytt etter 60-80 minutter.

En annen celleskål ble mockdeprivert, det vil si at det gamle mediet ble fjernet, og erstattet av nytt PC12-medium. Denne ble mikroskopert før mockdepriveringen, 60-80 minutter etter deprivering, og 6-9 timer etter deprivering.

Ingen av kontrollene ga en signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B (fig 3.7,3.8,tabell 3.4).

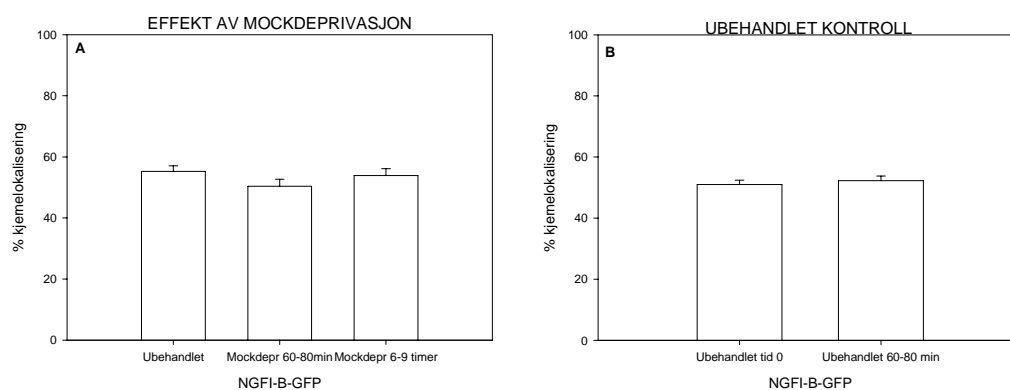


Fig 3.7: Figuren viser gjennomsnittlig % kjernelokalisering av NGFI-B ± SEM i:

A: Ubehandlede og mockdepriverte PC12-celler.

Målingene er foretatt 60-80 minutter etter eksponering, og 6-9 timer etter eksponering.

B: Ubehandlede celler ved to ulike tidspunkt

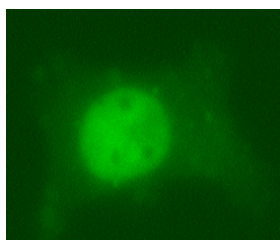
Målingene er foretatt ved tid 0 og 60-80 min etter første måling.

Tabell 3.4 A Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.7 A

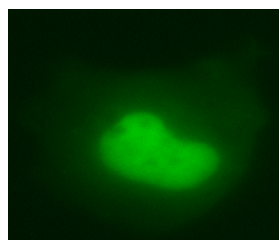
Behandling	% kjernelokalisering	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	55,2420	1,8390	2	29
Mockdeprivert 60-80min	50,3680	2,3430	2	26
Mockdeprivert 6-9 timer	53,8660	2,2530	2	23

Tabell 3.4 B Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.7 B

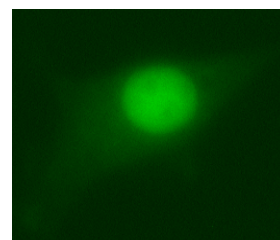
Behandling	% kjernelokal isering	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet tid = 0	50,9840	1,4170	3	39
Ubehandlet 60-80min	52,2720	1,4800	3	40



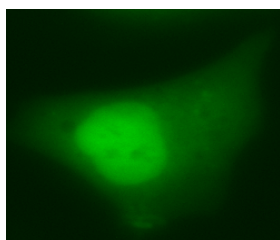
**Fig 3.8 A:NGFI-B-GFP
UB**



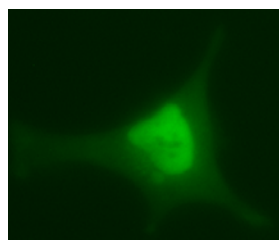
**Fig 3.8 B:NGFI-B-GFP
Mockdeprivert
60-80 min**



**Fig 3.8 C:NGFI-B-GFP
Mockdeprivert
6-9 timer**



**Fig 3.8 D:NGFI-B-GFP
UB
TID 0**



**Fig 3.8 E: NGFI-B-GFP
UB
60-80 min**

Figur 3.8: Eksempler på celler fra forsøkene som utgjør grunnlaget for resultatene vist i fig 3.7

3.2 NUKLEÆR LOKALISERING AV KOTRANSFEKTERT NGFI-B I PC12-CELLER

I denne forsøksserien ønsket en å kotransfekt med andre plasmider (tabell 2.3). Derfor ble NGFI-B-GFP brukt i en lavere konsentrasjon enn i avsnitt 3.1.

Serumdeprivasjon ble brukt som apoptosestimuli i denne forsøksserien.

3.2.1 Effekt av serumdeprivasjon på NGFI-B + CMV

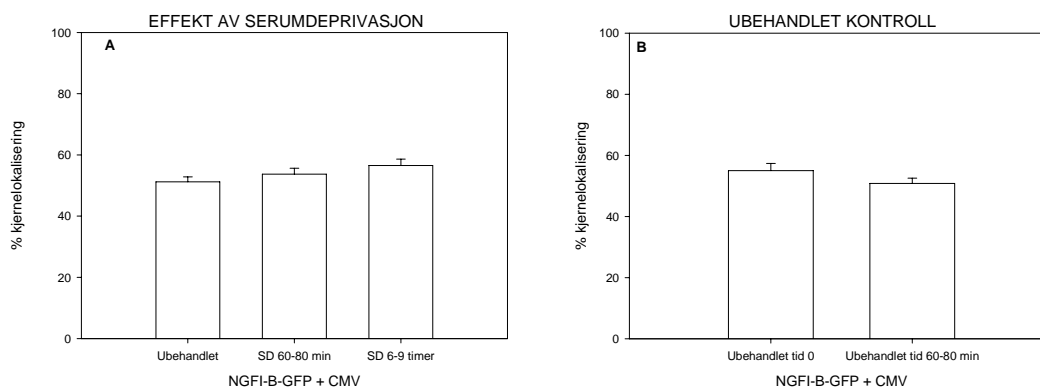
Dette forsøket ble utført i PC12-celler transfektert med NGFI-B-GFP + CMV. Dette ble gjort for å ha like stor mengde NGFI-B i forsøkene utført i avsnitt 3.2, slik at disse kunne sammenlignes innbyrdes.

Cellene ble mikroskopert før behandling, deretter serumdeprivert og mikroskopert etter 60-80 minutter og 6-9 timer etter deprivasjon.

I tillegg ble det utført en kontroll hvor en ubehandlet celledisk ble mikroskopert ved tidspunkt 0, satt tilbake ved 5 % CO₂ og 37 °C, og deretter mikroskopert på nytt etter 60-80 minutter.

Serumdeprivasjon ga ingen signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B.

Kontrollskålen ga heller ingen signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B ved de to ulike tidspunktene (fig 3.9,310, tabell 3.5).



Figur 3.9: Figuren viser gjennomsnittlig % kjernelokalisering av NGFI-B+ CMV ± SEM i:

A: Ubehandlede og serumdepriverte PC12-celler 60-80 min og 6-9 timer etter eksponering.

B: Ubehandlede PC12-celler ved tid 0 og 60-80 min etter første måling.

SD = Serumdeprivert

Tabell 3.5 A Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9 A

Behandling	% kjernelokal isering	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	51,1890	1,6230	3	29
Serumdeprivert 60-80min	53,7060	1,9680	3	34
Serumdeprivert 6-9 timer	56,5250	2,1250	3	30

Tabell 3.5 B Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9 B

Behandling	% kjernelokal isering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet tid = 0	55,0200	2,3750	3	29
Ubehandlet 60-80min	50,8450	1,6960	3	31

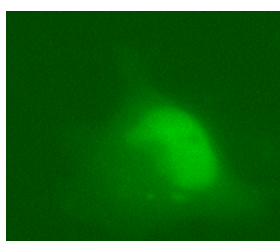


Fig 3.10A:
NGFI-B-GFP + CMV
UB

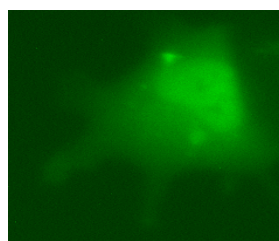


Fig 3.10B:
NGFI-B-GFP + CMV
Serumdeprivert
60-80 min

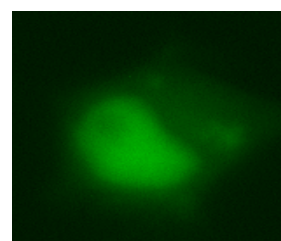


Fig 3.10 C:
NGFI-B-GFP + CMV
Serumdeprivert
6-9 timer

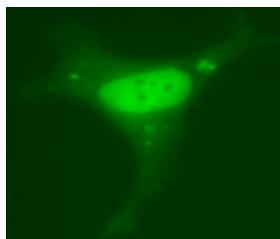


Fig 3.10 D:
NGFI-B-GFP + CMV
UB
TID 0

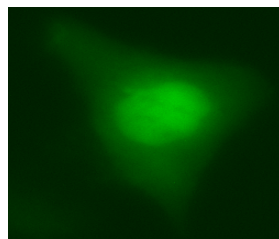


Fig 3.10 E:
NGFI-B-GFP + CMV
UB
60-80 min

Figur 3.10: Eksempler på celler fra forsøkene som utgjør grunnlaget for resultatene vist i fig 3.9.

3.2.2 Effekt av fosforyleringer på NGFI-B

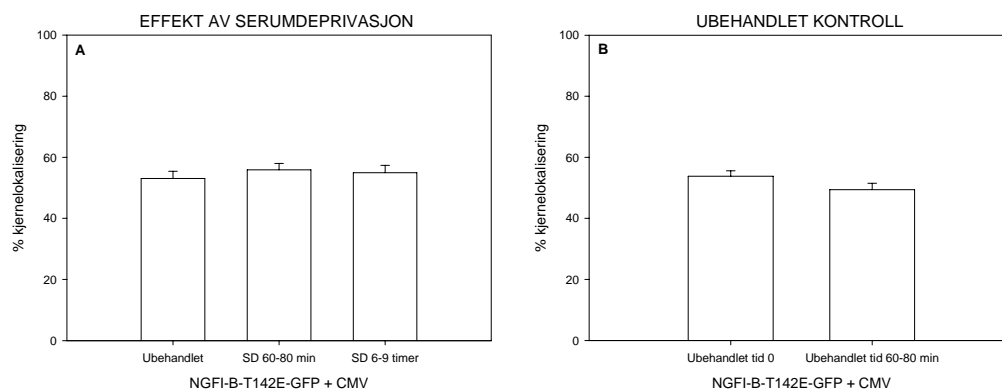
NGFI-B er et substrat for ERK2, og kan fosforyleres på aminosyren thr 142 av aktivert ERK2 (Slagsvold, Ostvold et al. 2002). Forsøk har vist en effekt av aktivert ERK2 på lokalisasjonen av NGFI-B (Jacobs, Boldingh et al. 2004; Jacobs and Paulsen 2005).

For å undersøke om denne fosforyleringen hadde betydning for forflytning av NGFI-B fra kjernen til mitokondriene ved apoptotisk stimuli, ble det utført forsøk med to muterte varianter av NGFI-B. I NGFI-B-142E er threonin erstattet av glutamat for å mimikere en konstitutiv fosforylering. I NGFI-B-142A er threonin erstattet av alanin for å blokkere en mulig fosforylering.

Serumdeprivasjon ble brukt som apoptosestimuli.

I tillegg ble det utført en kontroll hvor en ubehandlet celleskål ble mikroskopert ved tidspunkt 0, satt tilbake ved 5 % CO₂ og 37 °C, og deretter mikroskopert på nytt etter 60-80 minutter.

Ingen av de muterte variantene av NGFI-B ga en signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B. Kontrollskålene ga heller ingen signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B ved de aktuelle tidspunktene (Fig 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, tabell 3.6, 3.7).



Figur 3.11: Figuren viser gjennomsnittlig % kjernelokalisering av NGFI-B-T142E + CMV ± SEM i:

A: Ubehandlede og serumdepriverte PC12-celler 60-80 min og 6—9 timer etter eksponering

B: Ubehandlede PC12-celler ved tid 0 og 60-80 min etter første måling

SD = Serumdeprivert

Tabell 3.6 A Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11 A

Behandling	% kjernelokal isering	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	53,0470	2,3890	3	31
Serumdeprivert 60-80min	55,9010	2,1150	3	25
Serumdeprivert 6-9 timer	54,9340	2,4280	3	26

Tabell 3.6 B Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11 B

Behandling	% kjernelokal isering	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet tid = 0	53,7870	1,7950	3	25
Ubehandlet 60-80min	49,4140	2,1100	3	31

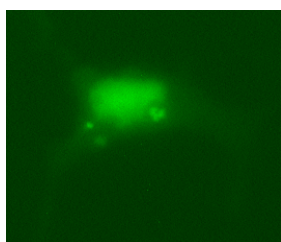


Fig 3.12 A:
NGFI-B-T142E-GFP + CMV
UB

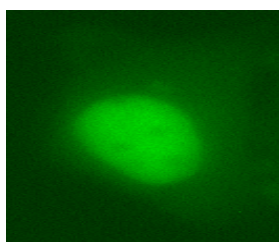


Fig 3.12 B:
NGFI-B-T142E-GFP + CMV
Serumdeprivert
60-80 min

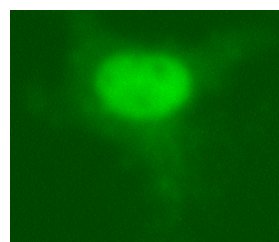


Fig 3.12 C:
NGFI-B-T142E-GFP + CMV
Serumdeprivert
6-9 timer

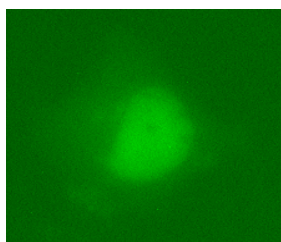


Fig 3.12 D:
NGFI-B-T142E-GFP + CMV
UB
Tid 0

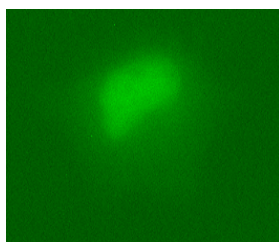
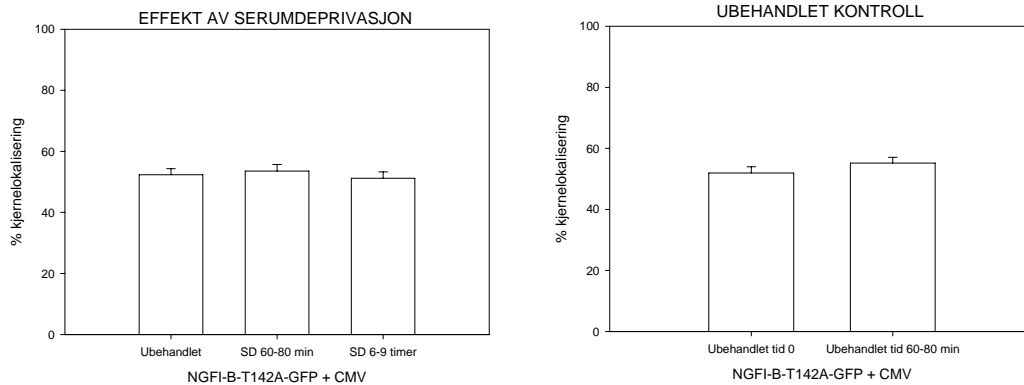


Fig 3.12 E:
NGFI-B-T142E-GFP + CMV
UB
60-80 min

Figur 3.12: Eksempler på celler fra forsøkene som utgjør grunnlaget for resultatene vist i fig 3.11



Figur 3.13: Figuren viser gjennomsnittlig % kjernelokalisering av NGFI-B-T142A + CMV \pm SEM

A: Ubehandlede og serumdepriverte PC12-celler 60-80 min og 6—9 timer etter eksponering

B: Ubehandlede PC12-celler ved tid 0 og 60-80 min etter første måling

SD = Serumdeprivert

Tabell 3.7 A Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13 A

Behandling	% kjernelokalisering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	52,3230	1,9940	3	28
Serumdeprivert 60-80min	53,5440	2,1200	3	28
Serumdeprivert 6-9 timer	51,1750	2,1150	3	24

Tabell 3.7 B Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13 B

Behandling	% kjernelokalisering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet tid = 0	51,9480	2,0430	3	24
Ubehandlet 60-80min	55,2000	1,8820	3	26

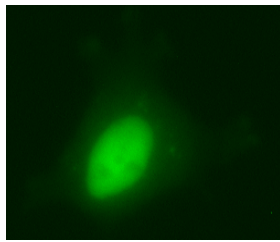


Fig 3.14 A:
NGFI-B-T142A-GFP + CMV
UB

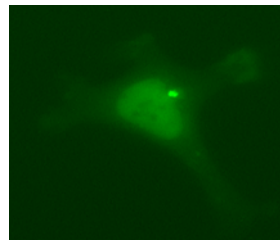


Fig 3.14 B:
NGFI-B-T142A-GFP
Serumdeprivert
60-80 min

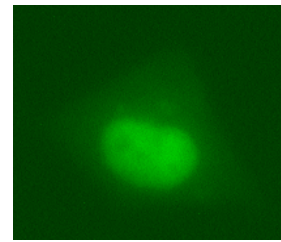


Fig 3.14 C:
NGFI-B-T142A-GFP
Serumdeprivert
6-9 timer

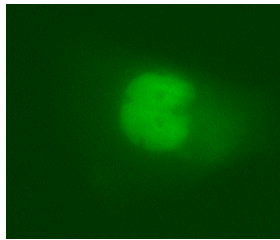


Fig 3.14 D:
NGFI-B-T142A-GFP + CMV
UB
TID 0

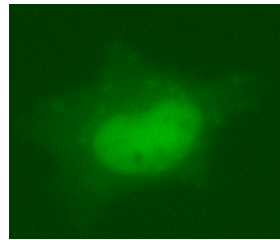


Fig 3.14 E:
NGFI-B-T142A-GFP + CMV
UB
60-80 min

Figur 3.14: Eksempler på celler fra forsøkene som utgjør grunnlaget for resultatene vist i fig 3.13.

3.2.3 Effekt av aktivert ERK2

Forsøket ble utført i PC12-celler transfektert med NGFI-B-GFP og dominant aktiv ERK2 (MEKERK2) (tabell 2.3).

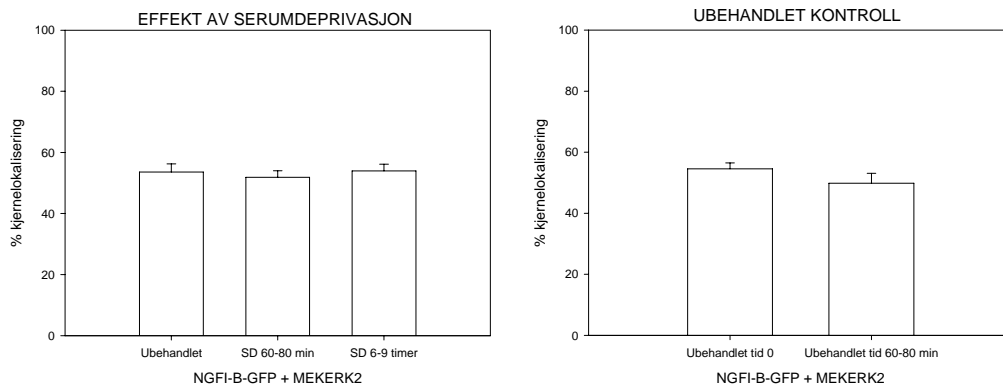
ERK2 kan fosforylere NGFI-B på thr 142. Effekter av ERK2 på lokaliseringen av NGFI-B har blitt observert (Jacobs, Boldingh et al. 2004; Jacobs and Paulsen 2005).

Derfor var det interessant å undersøke hvorvidt overuttrykk av dominant aktiv ERK2 ville føre til sterkere kjernelokalisering av NGFI-B. Som apoptosestimuli ble serumdeprivasjon valgt.

I tillegg ble det utført en kontroll hvor en ubehandlet celskål ble mikroskopert ved tidspunkt 0, satt tilbake ved 5 % CO₂ og 37 °C, og deretter mikroskopert på nytt etter 60-80 minutter.

Det ble ikke målt noen signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B.

Kjernelokaliseringen av NGFI-B endret seg ikke signifikant i kontrollskålene ved de to målte tidspunktene (fig 3.15, 3.16 tabell 3.8).



Figur 3.15: Figuren viser gjennomsnittlig % kjernelokalisering av NGFI-B-GFP + MEKERK2 \pm SEM i:
A: Ubehandlede og serumdepriverte PC12-celler 60-80 min og 6—9 timer etter eksponering
B: Ubehandlede PC12-celler ved tid 0 og 60-80 min etter første måling
SD = Serumdeprivert

Tabell 3.8 A Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.15 A

Behandling	% kjernelokalisering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet	53,5440	2,7100	3	23
Serumdeprivert 60-80min	51,8390	2,1600	3	20
Serumdeprivert 6-9 timer	53,9300	2,2310	3	18

Tabell 3.8 B Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.15 B

Behandling	% kjernelokalisering	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk	N = totalt antall celler analysert
Ubehandlet tid = 0	54,5820	1,9280	3	24
Ubehandlet 60-80min	49,8410	3,2690	3	14

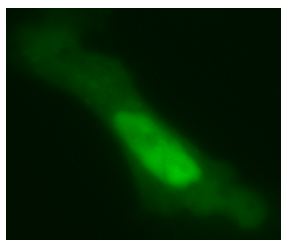


Fig 3.16 A:
NGFI-B-GFP + MEKERK2
UB

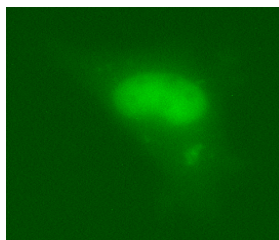


Fig 3.16 B:
NGFI-B-GFP + MEKERK2
Serumdeprivert
60-80 min

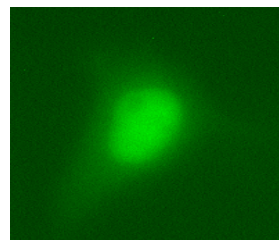


Fig 3.16 C:
NGFI-B-GFP + MEKERK2
Serumdeprivert
6-9 timer

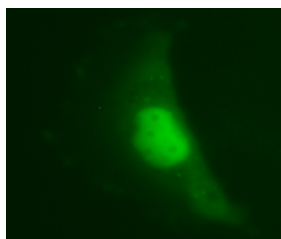


Fig 3.16 D:
NGFI-B-GFP + MEKERK2
UB
TID 0

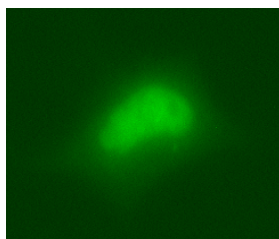


Fig 3.16 E:
NGFI-B-GFP + MEKERK2
UB
60-80 min

Figur 3.16: Eksempler på celler som utgjør grunnlaget for resultatene vist i figur 3.15.

3.3 NUKLEÆR LOKALISERING AV NGFI-B I CV1-CELLER

Det ble N = 7 uavhengige forsøk i CV1-celler transfektert med NGFI-B-GFP + CMV (tabell 2.7).

Ingen endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B ble observert etter eksponering med 1 uM calcium ionophore (data ikke vist).

3.4 MÅLING AV CASPASE 3

3.4.1 Måling av caspase 3 i PC12-celler

PC12-cellene ble eksponert i 3,5-4 timer (tabell 2.11) og caspase målt 24 timer etter at cellene ble høstet.

Dataene i avsnitt 3.4 har blitt normalisert. Dette ble gjort ved at den høyeste enkeltverdien oppnådd med behandlingen serumdeprivasjon i hvert forsøk ble satt til å være 100 % aktivitet. Deretter ble den prosentvise aktiviteten av de andre behandlingene beregnet ut fra dette.

3.4.2 Effekt av serumdeprivasjon

Serumdeprivasjon er et kjent apoptosestimuli i PC12-celler (Greene 1978). Det var derfor interessant å se i hvilken grad serumdeprivasjon aktiverte caspase 3.

I tillegg ble det gjort forsøk med vekstfaktorene NGF og EGF gitt samtidig med serumdeprivasjon for å undersøke om disse beskyttet mot caspase 3 aktivert ved serumdeprivasjon.

Serumdeprivasjon ga en signifikant høyere caspaseaktivitet sammenlignet med en ubehandlet kontroll. NGF og EGF reduserte caspaseaktiviteten signifikant i forhold til serumdepriverte celler alene. Det var ingen signifikant innbyrdes forskjell i aktivitetsreduksjonen mellom NGF og EGF (fig 3.17, tabell 3.9).

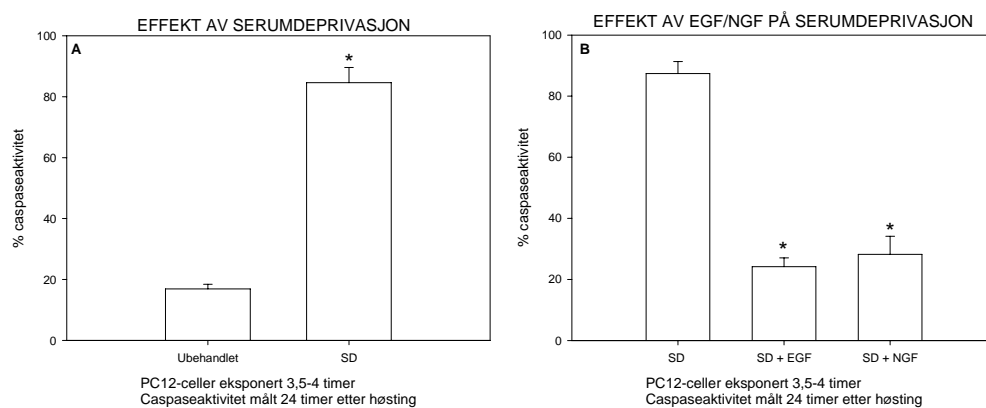


Fig. 3.17: Figuren viser % caspaseaktivitet målt i PC12-celler ved ulike behandlinger.

A: Serumdepriverte celler målt mot ubehandlet kontroll.

* Indikerer signifikans i forhold til den ubehandlede kontrollen

B: Serumdepriverte celler + 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF målt mot serumdepriverte celler.

* Indikerer signifikans i forhold til SD = Serumdeprivert

SD = Serumdeprivert

Tabell 3.9 A Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.17 A

Behandling	% caspaseaktivitet	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	16,9080	1,5170	9
Serumdeprivert	84,6210	4,9720	9

Tabell 3.9 B Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.17 B

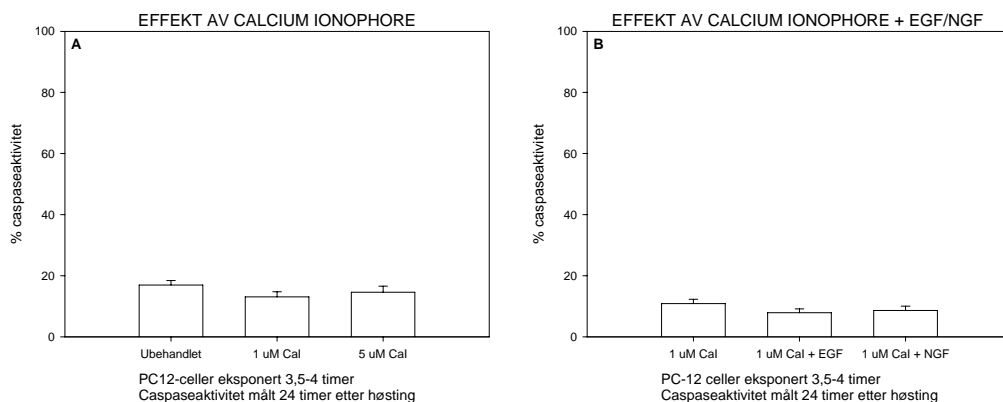
Behandling	% caspaseaktivitet	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk
Serumdeprivert	87,3740	3,9130	8
Serumdeprivert + 5 ng/ml EGF	24,1540	2,8720	8
Serumdeprivert + 50 ng/ml NGF	28,1970	5,9000	8

3.4.3 Effekt av calcium ionophore

Calcium ionophore A23187 er et antibiotikum som fører til økt intracellulær kalsiumkonsentrasjon (Martina, Kili et al. 1994), noe som kan indusere apoptose. Det var derfor av interesse å se om calcium ionophore aktiverte caspase 3. Det ble utført forsøk med to ulike konsentrasjoner, 1 uM og 5 uM. Disse konsentrasjonene ble valgt etter at forsøk med høyere konsentrasjoner førte til at cellene løsnet fra celledisken.

I tillegg ble det undersøkt om NGF og EGF beskyttet mot en eventuell caspaseaktivisering forårsaket av calcium ionophore. Effekten av NGF og EGF ble testet sammen med 1 uM calcium ionophore.

Verken 1 uM eller 5 uM calcium ionophore ga caspaseaktivering som var signifikant forskjellig fra den ubehandlede kontrollen. Det ble heller ingen signifikant forskjell i aktiviteten ved tillegg av NGF og EGF (fig 3.18, 3.10).



Figur 3.18: Figuren viser PC12-celler eksponert med

A: 1 uM calcium ionophore, 5 uM calcium ionophore målt mot ubehandlet kontroll

B: 1 uM calcium ionophore + 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF målt mot 1 uM calcium ionophore

CaI = calcium ionophore

Tabell 3.10 A Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.18 A

Behandling	% caspaseaktivitet	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	16,8560	1,4920	9
1 uM calcium ionophore	13,0540	1,6350	9
5 uM calcium ionophore	14,5750	2,0050	9

Tabell 3.10 B Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.18 B

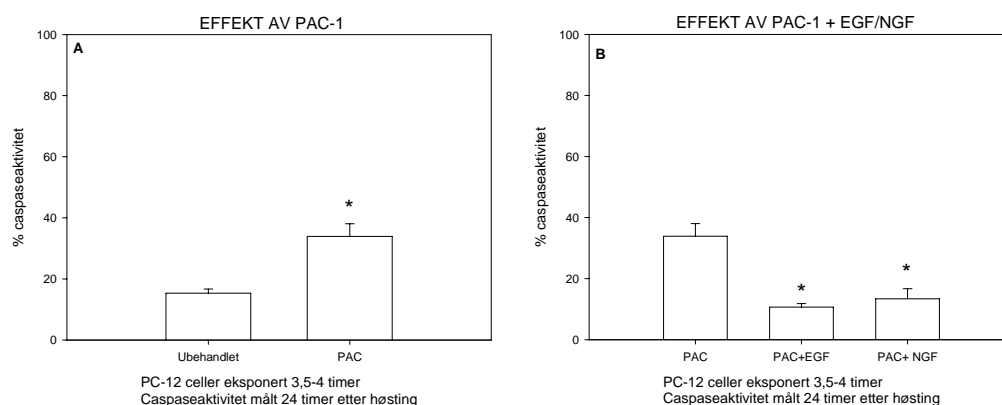
Behandling	% caspaseaktivitet	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk
1 uM calcium ionophore	10,8710	1,4030	6
1 uM calcium ionophore + 5 ng/ml EGF	7,8840	1,2550	6
1 uM calcium ionophore + 50 ng/ml NGF	8,6230	1,3820	6

3.4.4 Effekt av PAC-1

PAC-1 er et nytt molekyl som aktiverer caspase 3 (Putt, Chen et al. 2006), og det var derfor ønskelig å bruke denne som en positiv kontroll på caspaseaktivering i PC12-celler og for å studere mulig ”crosstalk” tilbake til andre apoptoseveier.

Det ble gjort forsøk med NGF og EGF gitt sammen med PAC-1, for å undersøke om vekstfaktorene kunne ha en beskyttende effekt etter en direkte aktivering av caspase 3.

PAC-1 ga en signifikant økt caspaseaktivitet sammenlignet med den ubehandlede kontrollen. EGF og NGF gitt sammen med PAC-1 ga en signifikant lavere caspaseaktivitet enn PAC-1 gitt alene (fig 3.19, tabell 3.11).



Figur 3.19: Figuren viser PC12-celler eksponert 3,5-4 timer med:

A: PAC-1

* indikerer signifikans i forhold til ubehandlet kontroll

B: PAC-1 + 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF sammenlignet med PAC-1

* indikerer signifikans i forhold til PAC-1

Tabell 3.11 A Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.19 A

Behandling	% caspaseaktivitet	SEM ±	N = antall uavhengige forsøk
Ubehandlet	15,3220	1,3500	7
100 uM PAC-1	33,8970	4,1440	7

Tabell 3.11 B Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.19 B

Behandling	% caspaseaktivitet	SEM \pm	N = antall uavhengige forsøk
100 uM PAC-1	33,897	4,144	7
100 uM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	10,647	1,170	7
100 uM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	13,359	3,330	7

3.4.5 Måling av caspase 3 i CV1-celler

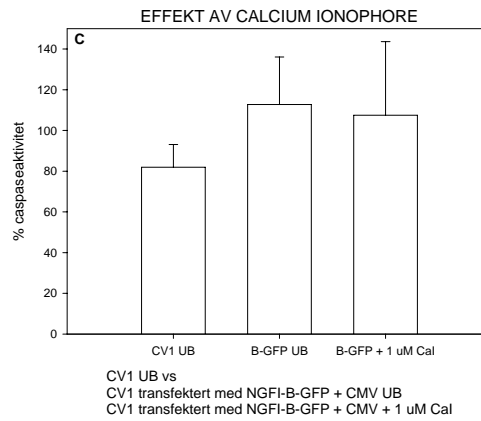
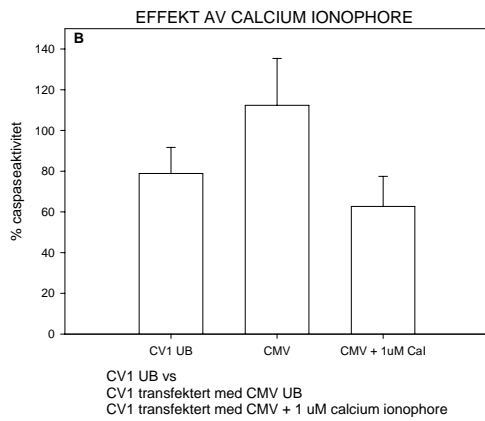
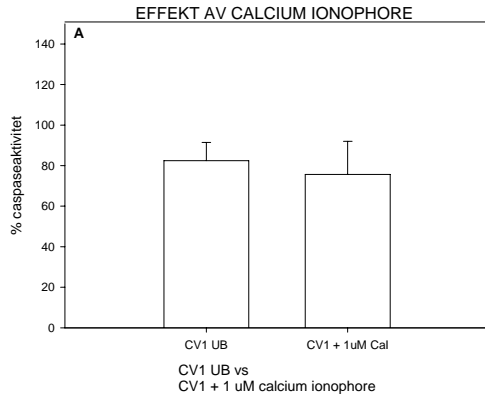
I CV1-celler ble caspase målt i både transfekterte (tabell 2.7) og ikke transfekterte celler.

1 uM calcium ionophore ble brukt som apoptosestimuli. Dataene ble normalisert ved at den høyeste enkeltverdien av ubehandlet, ikke transfekterte CV1-celler ble satt til 100 % i hvert forsøk. Verdien av de andre behandlingene ble beregnet ut fra dette.

Calcium ionophore A23187 er et antibiotikum som fører til økt intracellulær

kalsiumkonsentrasjon (Martina, Kili et al. 1994), noe som kan indusere apoptose.

Calcium ionophore førte ikke til signifikante endringer i caspaseaktiviteten i ikke transfekterte CV1-celler, CV1-celler transfektert med NGFI-B-GFP + CMV, eller i CV1-celler transfektert med CMV (fig 3.20, tabell 3.12).



Figur 3.20: Figuren viser effekten av calcium ionophore målt mot ubehandlet kontroll i CV1-celler transfektert med ulike plasmider

A: Ikke transfekterte CV1-celler ubehandlet, Ikke transfekterte CV1-celler eksponert med 1 uM calcium ionophore

B: Ikke transfekterte CV1-celler, CV1-celler transfektert med CMV ubehandlet, CV1-celler transfektert med CMV eksponert med 1 uM calcium ionophore

C: Ikke transfekterte CV1-celler, CV1-celler transfektert med NGFI-B-GFP + CMV ubehandlet, CV1-celler transfektert med NGFI-B-GFP + CMV eksponert med 1 uM calcium ionophore

B-gfp = NGFI-B-GFP

UB = Ubehandlet

CaI = Calcium ionophore

Tabell 3.12 A: Tabellen viser tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.20 A

Plasmid	Behandling	% caspaseaktivitet	SEM ±	N = Antall uavhengige forsøk
Ikke transfekterte CV1-celler	Ubehandlet	82,5050	8,9500	5
Ikke transfekterte CV1-celler	1 uM calcium ionophore	75,6330	16,3800	5

Tabell 3.12 B: Tabellen viser tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.20 B

Plasmid	Behandling	% caspaseaktivitet	SEM ±	N = Antall uavhengige forsøk
Ikke transfekterte CV1-celler	Ubehandlet	78,8830	12,7820	3
CMV	Ubehandlet	112,3790	22,9900	3
CMV	1 uM calcium ionophore	62,7000	14,7830	3

Tabell 3.12 C: Tabellen viser tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.20 C

Plasmid	Behandling	% caspaseaktivitet	SEM ±	N = Antall uavhengige forsøk
Ikke transfekterte CV1-celler	Ubehandlet	81,9000	11,2160	4
NGFI-B-GFP + CMV	Ubehandlet	112,7650	23,2800	4
NGFI-B-GFP + CMV	1 uM calcium ionophore	107,5240	36,1070	4

3.5 DETEKSJON AV CELLEDØD

3.5.1 Deteksjon av celledød i PC12-celler

PC12-cellene ble eksponert 24 timer før celledødstelling. For å detektere celledøden ble cellene farget med trypanblå (se avsnitt 2.7.1).

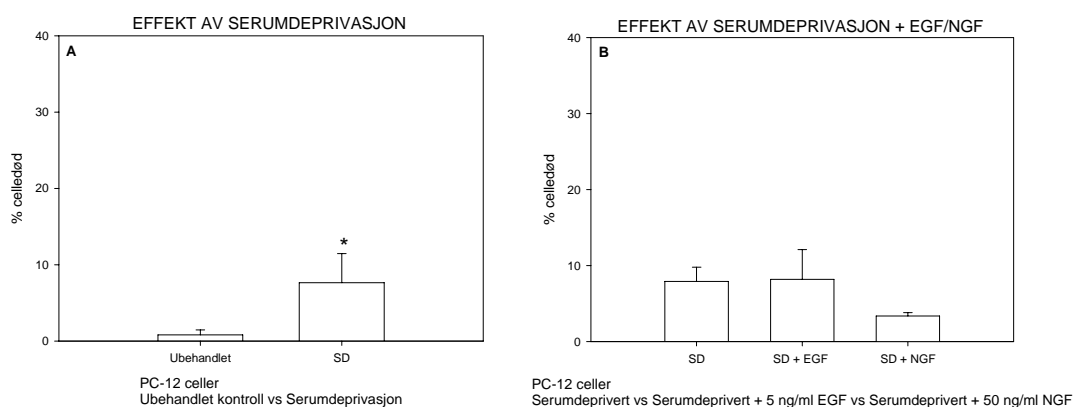
Celledøden for behandlingene med calcium ionophore og PAC-1 var trolig høyere enn det resultatene viser. Behandlingene førte til at mange celler løsnet fra skålen før de ble talt opp.

3.5.2 Effekt av serumdeprivasjon

Serumdeprivasjon fører til apoptose i PC12-celler (Greene 1978). I tillegg viste serumdeprivasjon seg å være en effektiv aktivator av caspase (se avsnitt 3.4.2).

Derfor var det naturlig å undersøke om serumdeprivasjon også førte til forhøyet celledød. Det ble også gjort forsøk med NGF og EGF gitt samtidig med serumdeprivasjon, for å se om disse beskyttet mot celledød.

Serumdeprivasjon ga en signifikant høyere celledød enn den ubehandlede kontrollen. NGF og EGF gitt i tillegg til serumdeprivasjonen ga ikke en signifikant forskjellig celledød sammenlignet med serumdeprivasjon alene (fig 3.21, tabell 3.13).



Figur 3.21:

A: Figuren viser effekten av serumdeprivasjon på celledød i PC12-celler sammenlignet med en ubehandlet kontroll

* indikerer signifikans i forhold til ubehandlet kontroll

B: Figuren viser effekten av serumdeprivasjon på celledød i PC12-celler sammenlignet med serumdepriverte PC12-celler tilsatt 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF

SD = Serumdeprivert

Tabell 3.13 A: Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.21 A

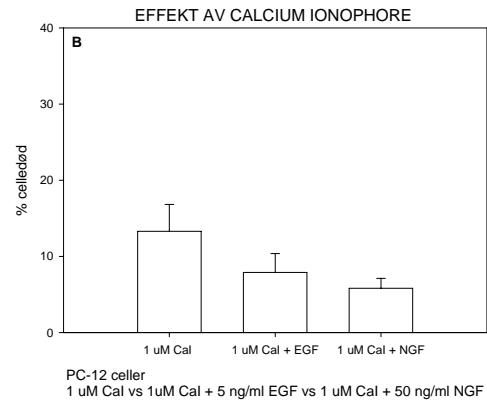
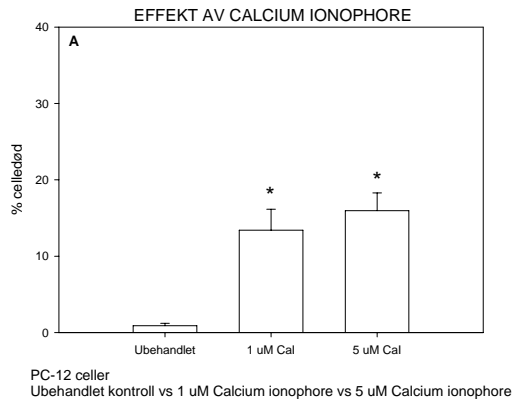
Behandling	% Celledød	SEM ±	N = Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet kontroll	0,8120	0,6540	6
Serumdeprivert	7,6470	3,8090	6

Tabell 3.13 B: Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.21 B

Behandling	% Celledød	SEM ±	N = Antall uavhengige forsøk
Serumdeprivert	7,9040	1,8780	5
Serumdeprivert + 5 ng/ml EGF	8,1970	3,8950	5
Serumdeprivert + 50 ng/ml NGF	3,3860	0,4410	5

3.5.3 Effekt av calcium ionophore

Calcium ionophore A23187 er et antibiotikum som fører til økt intracellulær kalsiumkonsentrasjon (Martina, Kili et al. 1994), noe som kan indusere apoptose. I dette forsøket ble det undersøkt om konsentrasjoner på 1 uM og 5 uM calcium ionophore ga høyere celledød enn en ubehandlet kontroll. I tillegg ble det gitt NGF og EGF sammen med 1 uM calcium ionophore, for å se om disse beskyttet mot celledød induert av calcium ionophore. Både 1 uM og 5 uM calcium ionophore ga en signifikant høyere celledød enn den ubehandlede kontrollen. NGF og EGF endret ikke celledøden signifikant i forhold til 1 uM calcium ionophore alene (fig 3.22, tabell 3.14).



Figur 3.22:

A: Figuren viser effekten av 1 uM, 5uM calcium ionophore sammenlignet med ubehandlet kontroll på celledød i PC12-celler

* indikerer signifikans i forhold til ubehandlet kontroll

B: Figuren viser effekten av 1 uM calcium ionophore sammenlignet med 1 uM calcium ionophore + 5 ng/ml EGF eller 50 ng/ml NGF på celledød i PC12-celler.

CaI = Calcium ionophore

Tabell 3.14 A: Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.22 A

Behandling	% Celledød	SEM ±	N = Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet kontroll	0,9030	0,3070	5
1 uM calcium ionophore	13,4070	2,7440	5
5 uM calcium ionophore	15,965	2,3290	5

Tabell 3.14 B: Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.22 B

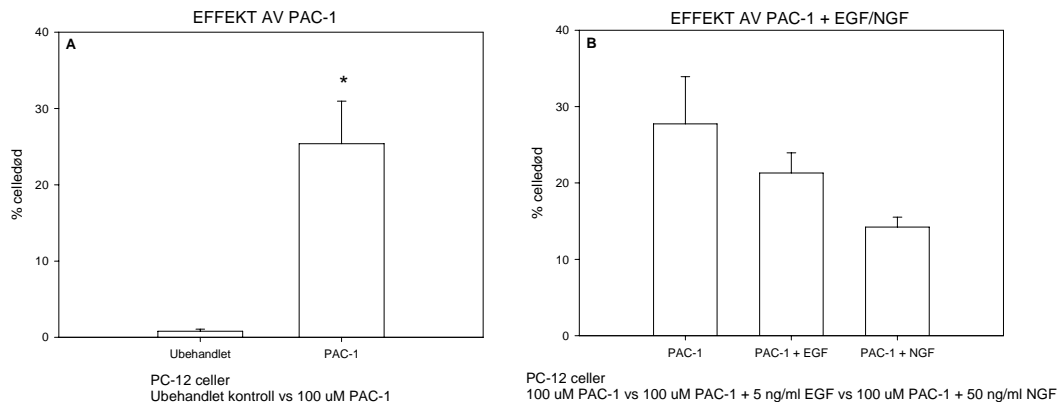
Behandling	% Celledød	SEM \pm	N = Antall uavhengige forsøk
1 uM calcium ionophore	13,2780	3,5390	5
1 uM calcium ionophore + 5 ng/ml EGF	7,8870	2,4790	4
1 uM calcium ionophore + 50 ng/ml NGF	5,8060	1,2970	4

3.5.4 Effekt av PAC-1

PAC-1 er en caspaseaktivator. PAC-1 ga en signifikant økning i caspaseaktivitet sammenlignet med en ubehandlet kontroll (avsnitt 3.4.4). Det var derfor interessant å se om denne aktiveringen førte til økt celledød. I tillegg ble det gjort forsøk med NGF og EGF i tillegg til PAC-1, for å se om disse beskyttet mot celledød.

PAC-1 ga en signifikant økning i celledøden sammenlignet med en ubehandlet kontroll.

Tillegg av NGF og EGF endret ikke celledøden signifikant i forhold til PAC-1 alene (fig 3.23, tabell 3.15).



Figur 3.23:

A: Figuren viser effekten av 100 uM PAC-1 på celledød i PC12-celler, sammenlignet med ubehandlet kontroll

* indikerer signifikans i forhold til ubehandlet kontroll

B: Figuren viser effekten av 100 uM PAC-1 på celledød i PC12-celler sammenlignet med 100 uM PAC-1 + 5 ng/ml EGF og 100 uM PAC-1 + 50 ng/ml NGF.

Tabell 3.15 A: Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.23 A

Behandling	% Celledød	SEM ±	N = Antall uavhengige forsøk
Ubehandlet kontroll	0,8120	0,2670	6
100 uM PAC-1	25,3850	5,5670	6

Tabell 3.15 B: Tallmaterialet som ligger til grunn for figur 3.23 B

Behandling	% Celledød	SEM ±	N = Antall uavhengige forsøk
100 uM PAC-1	27,7420	6,1770	5
100 uM PAC-1 + 5 ng/ml EGF	21,3110	2,6450	5
100 uM PAC-1 + 50 ng/ml NGF	14,2340	1,2890	5

3.5.5 Deteksjon av celledød i CV1-celler

I CV1-cellene ble dobbeltfarging med PI og FDA brukt som deteksjonsmetode for celledød (se avsnitt 2.7.2).

Celledød ble målt etter eksponering med 1 uM calcium ionophore i N = 3 uavhengige forsøk.

Celledøden i calcium ionophore-eksponerte CV1-celler var ikke høyere enn i ubehandlede CV1-celler (Data ikke vist).

4. DISKUSJON

4.1 CELLELINJER SOM MODELL

Cellekulturer kan deles inn i primærkulturer og cellelinjer. Cellelinjene kan videre deles inn i cellelinjer og kontinuerlige cellelinjer. Cellelinjene hentes ut fra normalt vev og benyttes gjennom et begrenset antall celledelinger. Kontinuerlige cellelinjer hentes vanligvis fra kreftceller og kan fortsette å dele seg i en mye lengre periode. Primære cellekulturer lages ved å høste celler fra dyr. Deretter sås de ut på en kulturskål. Disse cellene har langt kortere levetid enn cellelinjene (Adler 2006).

Et av temaene i denne oppgaven, forflytning av NGFI-B som respons på apoptotisk stimuli, har blitt demonstrert i primære nevronkulturer (Jacobs, Boldingh et al. 2004). Primære nevronkulturer er mer representative for forholdene som finnes *in vivo* enn cellelinjer, likevel er det fordeler ved bruk av cellelinjer som gjør det ønskelig å finne en velegnet modell for å studere NGFI-B-forflytning, celledød og caspaseaktivering i en cellelinje.

I en cellelinje har alle cellene felles opprinnelse. Dette gjør at cellepopulasjonen er mer homogen enn i en primærkultur. Cellene i en primærkultur vil kunne variere fra forsøk til forsøk, ettersom cellene ved hvert forsøk kommer fra nye dyr. Dette gjør at forsøk i cellelinjer har bedre reproducerbarhet enn forsøk utført i primærkultur. Cellelinjene er ofte mer robuste enn primære cellekulturer, og krever ikke like omfattende dyrkingsbetingelser.

De valgte cellelinjene i denne oppgaven hadde ulike egenskaper som i utgangspunktet gjorde dem interessante som modeller for denne type studier. Cellelinjen PC12 er hentet fra feokromocytom i binyremargen hos rotter. Dyrket i nærvær av NGF danner PC12-cellene utløpere lignende de som dannes i primære nevronkulturer. PC12-celler syntetiserer neurotransmitterene dopamin og noradrenalin, og er en velegnet cellelinje for neurobiologiske og nevrokjemiske studier (Greene and Tischler 1976). Cellelinjen CV1 fra apenyreceller (Hopps, Bernheim et al. 1963) har en velavgrenset kjerne og stor cytoplasma. Dette gjør celletypen velegnet for studier i mikroskop. CV1-cellene lar seg også lett transfektere.

4.2 NUKLEÆR LOKALISERING AV NGFI-B

NGFI-B induserer apoptose ved å translokalisere fra kjernen til mitokondriene (Li, Kolluri et al. 2000) (se avsnitt 1.2.4). Det var ønskelig å se på om de to valgte cellelinjene var egnet for å studere dette fenomenet. For å studere forflytningen av NGFI-B fra kjernen til mitokondriene ble nedgang i kjernelokalisasjonen av NGFI-B valgt som parameter. Dette forutsatte at en forflytning fra kjernen til mitokondriene førte til en nedgang i kjernelokaliseringen av NGFI-B.

I PC12-cellene ble serumdeprivasjon (se avsnitt 4.2.2), og 1 uM calcium ionophore (se avsnitt 4.2.3) valgt som metode for å indusere apoptose. I tillegg ble det gjort forsøk med vekstfaktorene EGF og NGF alene og sammen med apoptosestimuli.

I CV1-cellene ble 1 uM calcium ionophore brukt som metode for å indusere apoptose.

4.2.1 Vekstfaktorene EGF og NGF fører til nukleær eksport av NGFI-B i PC12-celler

Gjennom å aktivere MAP kinasen ERK beskytter vekstfaktorene EGF og NGF cellene mot apoptose (Xia, Dickens et al. 1995; Slagsvold, Ostvold et al. 2002). NGFI-B kan indusere apoptose ved å translokaliseres fra kjernen til mitokondriene (Li, Kolluri et al. 2000). Jacobs *et al* (2004) har vist at EGF beskytter mot glutamatindusert subcellulær translokalisasjon av NGFI-B (Jacobs, Boldingh et al. 2004).

I denne oppgaven førte EGF-stimulering til en signifikant reduksjon i kjernelokalisering av NGFI-B. Dette resultatet står i motsetning til funnet gjort av Jacobs *et al* (2004), og var derfor noe overraskende. Tilsvarende effekt av EGF som funnet i denne oppgaven ble også gjort av Movig (2007) (Movig 2007). Forsøkene utført av Jacobs *et al* (2004) og Movig (2007) ble utført i samme laboratorium, i cellelinjen CV1. Forsøket utført i denne oppgaven ble også gjennomført i samme laboratorium, men i cellelinjen PC12.

Bruk av ulike cellelinjer kan være en forklaring på de resultatmessige variasjonene. Effektene av EGF kan variere mellom ulike celletyper; i noen celler fremmer EGF celleproliferasjon (Laurie G. Hudson 1998), i andre celletyper kan EGF hemme celleproliferasjon og indusere apoptose (Kottke, Blajeski et al. 1999). I enkelte cellelinjer kan begge disse effektene av EGF oppstå avhengig av EGF-konsentrasjonen (Zhao, Dai et al. 2006).

En annen mulig forklaring på de observerte forskjellene kan være et bytte av serumbatch brukt i dyrkingsmediet, som fant sted mellom forsøkene utført av Jacobs *et al* (2004) og Movig (2007). Serumet benyttet av Movig (2007) er det samme som er brukt i denne oppgaven. I perioden mellom Jacobs *et al* (2004) og Movig (2007) har det også blitt observert en endring i den subcellulære lokalisasjonen av NGFI-B. CV1-cellene i forsøket til Jacobs *et al* (2004) hadde en jevn fordeling av NGFI-B i cellen, mens CV1-cellene brukt av Movig (2007), og PC12-cellene benyttet i denne oppgaven, hovedsakelig hadde NGFI-B lokalisert til kjernen. En hypotese kan være at de forskjellige serumbatchene inneholder ulike faktorer som har ført til endringen i NGFI-B-lokalisasjonen.

NGF førte til en signifikant nedgang i kjernelokaliseringen av NGFI-B. Denne nedgangen var forventet, og har blitt demonstrert i tidligere forsøk (Fahrner, Carroll et al. 1990). NGF fører til kjerneeksport av NGFI-B gjennom aktivering av TrkA/Ras/MAP kinase reaksjonsveien, og påfølgende fosforylering av ser 105 på NGFI-B (Katagiri, Takeda et al. 2000).

4.2.2 Serumdeprivasjon endrer ikke kjernelokaliseringen av NGFI-B i PC12-celler

Serumdeprivasjon er en velkjent metode for å indusere apoptose i PC12-celler (Greene 1978). Det var derfor interessant å se om forflytning av NGFI-B var involvert i denne apoptoseveien. Forsøket viste ingen forflytning av NGFI-B fra kjernen til cytosol ved serumdeprivasjon. Dette kan enten bety at NGFI-B ikke er involvert i denne celledødsveien, eller at målemetoden ikke fanger opp forflytningen (se avsnitt 4.2.7)

Tilsetning av vekstfaktorene NGF og EGF i serumfritt medium førte heller ikke til noen endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B. Dermed kan det synes som om bruk av serumfritt medium har ført til en reversering av effektene EGF og NGF hadde i medium med serum. Mekanismen bak denne observasjonen er vanskelig å forklare. Både NGF og EGF utøver sin effekt på lokaliseringen av NGFI-B gjennom aktivering av ERK2 (Katagiri, Takeda et al. 2000; Jacobs, Boldingh et al. 2004). Lokaliseringen av ERK2 er en faktor som spiller stor rolle for funksjonen ERK2 har i cellen (Whitehurst, Wilsbacher et al. 2002). Lokaliseringen av ERK2 kan reguleres gjennom ulike mekanismer. PEA-15 (Phosphoprotein Enriched in Astrocytes) er et antiapoptotisk protein identifisert som en regulator av ERK-lokalisering. PEA-15 hindrer translokalisasjon av ERK til kjernen, uten å hemme ERKs evne til å fosforylere cytosoliske substrater (Renault, Formstecher et al. 2003). En oppregulering av

PEA-15 har blitt vist å inntreffe i enkelte sykdomstilstander som brystkreft og diabetes (Condorelli, Vigliotta et al. 1998; Tsukamoto, Yoo et al. 2000). Hvilke mekanismer som styrer ERK-lokaliseringen i PC12-celler er ukjent. I dette forsøket befant NGFI-B seg hovedsakelig i kjernen. Det kan tenkes at en tilbakeholdelse av ERK2 i cytoplasma vil gi liten grad av fosforylering og forflytning av NGFI-B. For å undersøke en slik hypotese nærmere, må man følge lokaliseringen av ERK2 under de samme forsøksbetingelsene. Dette kan gjøres ved å GFP-merke ERK2.

4.2.3 Calcium ionophore fører til nedgang i kjernelokaliseringen av NGFI-B i PC12-celler, men ikke i CV1-celler og ingen caspase 3-aktivitet

Calcium ionophore, A23187, er et antibiotikum som kan indusere apoptose i enkelte celletyper ved å indusere økt intracellulær kalsiumkonsentrasjon (Martina, Kili et al. 1994). Gjennom NMDA-reseptorer fører glutamat til økt kalsiuminfluks som induserer apoptose i primære nevronkulturer (Jacobs, Boldingh et al. 2004). Ettersom NMDA-reseptorer ikke finnes i PC12 og CV1-celler ble calcium ionophore valgt som metode for å indusere kalsiuminfluks.

Calcium ionophore har blitt vist å indusere apoptotisk celledød i PC12-celler ved lave konsentrasjoner (0,1 uM), og nekrotisk celledød ved høye konsentrasjoner (2 uM) (Takadera and Ohyashiki 1997). I dette forsøket ble det benyttet en konsentrasjon på 1 uM calcium ionophore. Denne konsentrasjonen førte ikke til en signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B i PC12-celler, men en svak tendens til forflytning av NGFI-B ut av kjernen. Dette er i overensstemmelse med litteraturen hvor slik forflytning av NGFI-B som respons på apoptosesignal har blitt vist (Li, Kolluri et al. 2000; Jacobs, Boldingh et al. 2004). Det ble ikke målt noen caspase 3-aktivitet men økt celledød ved samme konsentrasjon av calcium ionophore. Dette kan tyde på at den høye kalsiuminfluksen har ført til at celledød har inntruffet via andre mekanismer før caspase 3 har blitt aktivert. For å eliminere en slik forstyrrende effekt av høy kalsiuminfluks kan det være gunstig å bruke en lavere konsentrasjon av calcium ionophore.

Det ble utført forsøk for å se på NGFI-B-forflytning i CV1-celler. Disse cellene ble eksponert med 1 uM calcium ionophore. Det ble ikke observert noen endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B, heller ikke caspase 3-aktivering eller celledød. Cellegiften Ara-C, en pyrimidin

antimetabolitt, har blitt vist å indukere apoptose i CV1-celler gjennom en relativt lav caspase 3-aktivering (Manakova, Puttonen et al. 2003), mens nevrotoksinet 6-hydroxydopamin ikke aktiverte caspase 3 i denne celletypen (Manakova, Puttonen et al. 2004). Dette kan tyde på at CV1 er en robust celletype, eller at caspase 3 ikke er en viktig celledøds mekanisme i CV1-celler. For å få et endelig svar på om CV1-celler egner seg som modell for å studere apoptoseindusert forflytning av NGFI-B bør flere apoptosestimuli, som for eksempel Ara-C testes ut.

4.2.4 Mockdepriverte og ubehandlede PC12-celler hadde uendret kjernelokalisering av NGFI-B

Mockdeprivasjon ga en liten, men ikke signifikant nedgang i kjernelokaliseringen av NGFI-B etter 60-80 minutter. Dette ble etterfulgt av en oppgang etter 6-9 timer. Disse endringene har ingen åpenbar forklaring. Dette var et pilotforsøk, og derfor utført kun 2 ganger. Det kan tenkes at variasjonene er tilfeldige, og at de ville jevnet seg ut etter flere forsøk.

Forsøksbetingelsene kan ha påvirket. Temperaturendringer ved forflytning av celledåsen fra 37 °C og 5 % CO₂ kan ha bidratt til de observerte variasjonene. Resultatene fra de helt ubehandlede skålene viste en variasjon på henholdsvis 1,29 % oppgang (se tabell 3.4 B) for PC12-celler transfektert med NGFI-B alene og 4,18 % nedgang (se tabell 3.5 B) for PC12-celler kotransfektet med NGFI-B og CMV. Dette illustrerer den naturlige variasjonen som kan oppstå. Denne naturlige variasjonen kan skyldes forsøksbetingelsene, hvor lang tid hver celledåse var ute av inkubatorskapet, eller påvirkning av fluorescenslys fra mikroskopering. En annen mulig variabel er presisjonen i analysemetoden. Disse resultatene understreker betydningen av ulike kontroller som utføres samtidig med dødsstimuli.

4.2.5 Serumdeprivasjon endrer ikke kjernelokaliseringen av NGFI-B ved kotransfeksjon med CMV i PC12-celler

PC12-celler kotransfektet med NGFI-B-GFP og CMV ble serumdeprivert og mikroskopert før deprivasjon, 60-80 min og 6-9 timer etter deprivasjon. Serumdeprivasjonen ga en svak oppgang i kjernelokaliseringen av NGFI-B. Fra de ubehandlede cellene til målingen gjort 6-9 timer etter deprivasjonen ble det målt en oppgang på 5,34 %. En tilsvarende endring forekommer også i ubehandlede skåler etter 60-80 minutter (se tabell 3.4 B og 3.5 B), og forklaringen på endringen i dette forsøket er trolig de samme som diskutert i avsnitt 4.2.4.

Forsøket bekreftet funnet i avsnitt 3.1.2, hvor serumdeprivasjon av PC12-celler transfektert med NGFI-B-GFP alene ikke ga en signifikant endring i kjernelokaliseringen av NGFI-B.

4.2.6 Konstitutiv fosforylering av NGFI-B, blokkering av fosforylering på NGFI-B og aktivert ERK2 påvirker ikke kjernelokaliseringen av NGFI-B i PC12-celler

Aktivering av ERK2 beskytter mot apoptose og fører samtidig til en fosforylering av NGFI-B på aminosyren thr 142 (Slagsvold, Ostvold et al. 2002). I denne oppgaven var det ønskelig å undersøke om fosforylering av thr 142 hadde betydning for forflytning av NGFI-B ved apoptose. Det ble gjort ved å kotransfekte PC12-celler med NGFI-B sammen med aktivert ERK2 (MEKERK). Det ble også gjort forsøk med kotransfeksjoner hvor muterte varianter av NGFI-B ble brukt sammen med CMV. Mutasjonen var på thr 142, som enten var byttet ut med glutamat for å mimikere en konstitutiv fosforylering, eller med alanin for å blokkere fosforylering.

Det ble ikke observert noen forflytning av NGFI-B. Det var ikke overraskende, ettersom serumdeprivasjon var valgt som apoptosestimuli. Serumdeprivasjon viste seg å ikke påvirke lokaliseringen av NGFI-B (avsnitt 3.1.2 og 3.2.1). Det var derfor umulig å trekke noen konklusjon om virkningen av fosforylering på thr 142 og forflytning av NGFI-B. For å undersøke virkningen av denne fosforyleringen er det nødvendig å finne en apoptosemodell som fører til forflytning av NGFI-B.

4.2.7 CV1 og PC12-celler egner seg dårlig som modeller for studier av NGFI-B translokalisering til mitokondriene

Basert på resultatene i denne oppgaven egner CV1 og PC12-celler seg dårlig som modell for studier av NGFI-B translokalisering til mitokondriene etter visse apoptosesignal. Det kan likevel tenkes at endringer i forsøksoppsettet ville kunne gi et annet resultat.

Apoptosestimuliene brukt i disse forsøkene har ikke ført til forflytning av NGFI-B, men det kan ikke utelukkes at andre apoptosestimuli kan involvere NGFI-B-forflytning.

For å se på translokalisering av NGFI-B fra kjernen til mitokondriene har det i disse forsøkene blitt sett på graden av kjernelokalisering. Hvis kjernen inneholder et stort overskudd av NGFI-

B, vil det være vanskelig å detektere en endring i kjernelokalisering om en liten mengde NGFI-B translokaliserer til mitokondriene. En forbedring av forsøksmodellen kan derfor være å farge mitokondriene og se på mitokondrielokaliseringen av NGFI-B istedenfor kjernelokaliseringen.

Translokalisering av NGFI-B til mitokondriene har blitt demonstrert for villtype NGFI-B (Jacobs, Boldingh et al. 2004). I forsøkene gjort i denne oppgaven har NGFI-B vært overuttrykt. Det er usikkert om overuttrykk av dette proteinet påvirker dets funksjon, men man bør også undersøke translokaliseringen av villtype NGFI-B for å kunne utelukke dette.

I dette forsøket har kjernelokaliseringen blitt beregnet ut fra gjennomsnittet av flere celler. Det kan være til dels store variasjoner i kjernelokaliseringen i individuelle celler i samme skål. Dette gjør det vanskelig å oppdage en eventuell endring i kjernelokaliseringen. For denne type studier vil det trolig være gunstig å benytte et mikroskop med muligheter for såkalt "Live imaging", slik at man kan følge de samme cellene over lengre tidsperioder.

4.3 AKTIVERING AV CASPASE 3 OG CELLEDØD I CV1 OG PC12-CELLER

Til tross for at det ikke ble påvist endret lokalisering av NGFI-B i PC12- og CV1-celler, kunne de brukes til studier av celledøds mekanismer nedstrøms for mitokondriene.

4.3.1 Serumdeprivasjon og PAC-1 aktiverer caspase 3 i PC12-celler og fører til celledød

Serumdeprivasjon viste seg å gi høyere caspaseaktivering enn caspase 3-aktivatoren PAC-1, et noe overraskende funn. PAC-1 aktiverer caspase gjennom kløyving av procaspase 3 til aktiv caspase 3 (Putt, Chen et al. 2006), mens serumdeprivasjon fører til aktivering av caspase 3 gjennom frisetting av cytochrom c fra mitokondriene, "intrinsic pathway", som vist i figur 1.5 (Kim, Chung et al. 1999). Som en forklaring på den høye caspaseaktiviteten induisert av serumdeprivasjon, kan man tenke seg at serumdeprivasjon fører til aktivering av andre effektorcaspaser i tillegg til caspase 3. Kandidater som kan detekteres av caspase 3-substratet ac-DEVD-amc er caspase 6 og 7, hvor caspase 6 trolig er den beste kandidaten. Caspase 7 mRNA er ikke uttrykt i hjernen hos mennesker og mus (Juan, McNiece et al. 1997), og det kan derfor være grunn til å mistenke at caspase 7 heller ikke er uttrykt i den nervecellelignende cellelinjen PC12 fra rotte.

PAC-1 førte til en signifikant økning i celledød i forhold til ubehandlet kontroll. Celledøden var høyere enn for serumdeprivasjon, i kontrast til caspaseaktivering hvor det motsatte forhold var tilfellet. Det kan tenkes at høy aktivitet av caspase 3 ikke nødvendigvis korrelerer med høy celledød, som vist i primære nevronkulturer (Slagsvold, Rosseland et al. 2003).

4.3.2 Vekstfaktorer beskytter mot caspaseaktivering og celledød induert av serumdeprivasjon og PAC-1

Som tillegg til de caspaseaktiverende stimuliene PAC-1 og serumdeprivasjon ble det gitt beskyttende vekstfaktorer i form av EGF og NGF. Caspaseaktivering induert av både PAC-1 og serumdeprivasjon ble redusert av begge vekstfaktorene. NGF har blitt vist å være et effektivt overlevelsessignal ved serumdeprivasjon i PC12-celler (Greene 1978), dette var derfor ikke et overraskende resultat. EGF har ikke en like veldokumentert effekt som apoptosehemmende stimuli i PC12-celler. EGF reduserer i liten grad celledød i serumdepriverte PC12-celler, men har blitt vist å forsinke celledødsprosessen (Rukenstein, Rydel et al. 1991). Denne tidlige hemmende effekten på apoptoseprosessen kan forklare EGFs beskyttende effekt mot deprivasjonsindusert caspase.

Forskjellen i grad av caspase 3-hemming mellom EGF og NGF var ikke signifikant, men det var likevel en tendens til at EGF beskyttet bedre enn NGF. Dette var et noe overraskende funn. Mange effekter av NGF og EGF i cellen formidles gjennom aktivering av ERK. Selv om både NGF og EGF aktiverer ERK skjer denne aktiveringen på en måte som fører til ulike effekter. NGF-stimulering gir en langvarig aktivering av ERK, mens EGF gir en kortere aktivering av ERK (Heasley and Johnson 1992). EGFs tendens til sterkere hemming av caspaseaktivitet enn NGF kan kanskje forklares med noen av disse mekanismene. Caspaseaktiviteten i dette forsøket er målt etter 3,5-4 timer. For å virkelig kunne si at EGF beskytter bedre mot caspase enn NGF bør forsøket gjøres ved ulike eksponeringstider.

Den beskyttende effekten av EGF mot PAC-1 er overraskende. PAC-1 aktiverer caspase 3 direkte (Putt, Chen et al. 2006), og det er vanskelig å tenke seg hvordan EGF gjennom aktivering av ERK skal kunne direkte interagere med caspase 3. En forklaring på dette kan være at aktivering av caspase 3 fører til "crosstalk" tilbake på andre apoptoseveier, og at det er her EGF-aktivert ERK utøver sin effekt. En effekt av ERK på caspase 9 har blitt vist. ERK kan fosforylere caspase 9 på thr 125 slik at caspase 9 inaktiveres (Allan, Morrice et al. 2003).

”Crosstalk” mellom ERK2 og caspase 3 har også blitt påvist ved at ERK2 er et substrat for caspase 3. Slik ”crosstalk” må tas med i betraktningen når man ser på rollen PAC-1 kan spille i kreftterapi.

Verken EGF eller NGF førte til en signifikant beskyttelse mot celledød ved serumdeprivasjon eller behandling med PAC-1. Det var likevel en tendens til at særlig NGF beskyttet mot celledød ved apoptosesignalene. Denne tendensen ville trolig blitt tydeligere ved å øke eksponeringstiden fra 24 til 48 timer.

Ettersom 1 uM calcium ionophore ikke ga aktivering av caspase 3 i PC12-celler, førte heller ikke tilsetning av EGF og NGF til signifikant endring i caspaseaktiveringen. Det var likevel en tendens til at vekstfaktorene reduserte caspaseaktiveringen. Dette kan trolig forklares med en reduksjon av de naturlige apoptoseprosesser i ubehandlede PC12-celler.

4.3.3 Calcium ionophore fører til celledød i PC12-celler

Både 1 uM og 5 uM calcium ionophore ga en signifikant økning i celledød i PC12-celler. Det var ikke signifikant forskjell på graden av celledød ved de to ulike konsentrasjonene. Disse konsentrasjonene av calcium ionophore ga ingen aktivering av caspase 3. Dette kan derfor utelukkes som mekanismen bak den observerte celledøden. Det kan også tenkes at celledøden skyldes andre apoptotiske celledøds mekanismer enn aktivering av caspase 3.

Det var ingen signifikant endring i celledød ved 1 uM calcium ionophore gitt sammen med henholdsvis NGF og EGF. Begge vekstfaktorene viste en tendens til redusert celledød, en tendens som var spesielt tydelig for celler tilsatt NGF.

4.4 KONKLUSJON

Basert på de foregående resultater og diskusjon kan det konkluderes med følgende

- Translokalisering av NGFI-B fra kjernen til mitokondriene er ikke involvert i de apoptoseveiene som ble studert i denne oppgaven. Cellelinjene PC12 og CV1 er kanskje ikke egnet som modeller for studier av translokalisering av NGFI-B med de metoder som ble benyttet i denne oppgaven.
- Cellelinjen PC12 var godt egnet til å studere aktivering av caspase 3. CV1 hadde ikke aktivert caspase 3 med de metodene som ble benyttet i denne oppgaven.
- Cellelinjen PC12 var godt egnet til å studere celledød. Det viste seg vanskelig å inducere celledød i CV1, noe som kan gjøre CV1 til en egnet cellelinje for studier av transfekterte apoptotiske proteiner uten at cellene dør.

5. FORKORTELSER

Ad	Opp til
AF	Aktiverende funksjon
ALS	Amyotrofisk lateral sklerose
Apaf-1	Apoptose-protease aktiverende faktor-1
Ara-C	Cytosin β -D-arabino-Furanoside
BBS	"BES buffered Saline Solution"
Bcl2	"B-cell lymphoma protein 2"
BES	N,N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminosulfonic acid
BH	"Bcl2 homology"
BSA	"Bovine Serum Albumin"
CaI	Calcium ionophore
Caspase	Cystein-aspartate-specific-proteases
DBD	DNA-bindende domene
DFA	"DNA Fragmentation Factor"
DISC	"Death Inducing Signaling Complex"
DMEM	"Dulbecco's modified eagle medium"
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoxyribonukleinsyre
EGF	"Epidermal growth factor"
ERK	"Extracellular signal-regulated kinase"
FADD	Fas-assosiert dødsdomene
FdA	Fluorescein diacetat
GFP	Grønt fluorescerende protein
HRE	Hormon responselement
IAP	"Inhibitors of Apoptosis"
LBD	Ligandbindende domene
MAP	Mitogen-aktivert protein
MAPK	Mitogen-aktivert protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
mRNA	"messenger"-ribonukleinsyre

NBRE	NGFI-B responselement
NGF	Nerve growth factor
NGFI-B	Nerve growth factor inducible clone B
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase-1
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium iodid
RXR α	Retinoid X reseptor α
Ser	Serin
Thr	Treonin
Trypsin-EDTA	”Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid”
UB	Ubehandlet

6. REFERANSER

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. **281**: 1322-1326.
- Adler, E. M. (2006). Cell Culture as a Model System for Teaching: Using PC12 Cells. **2006**: tr5-.
- Allan, L. A., N. Morrice, et al. (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." Nat Cell Biol **5**(7): 647-654.
- Bartel, D. P., M. Sheng, et al. (1989). Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. **3**: 304-313.
- Bilsland, J., S. Harper, et al. (2002). "Caspases and neuroprotection." Current Opinion in Investigational Drugs **3**(12): 1745-52.
- Bohm, I. and H. Schild (2003). "Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death." Molecular Imaging & Biology **5**(1): 2-14.
- Chang, H. Y. and X. Yang (2000). "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 821-46.
- Chawla, A., J. J. Repa, et al. (2001). Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. **294**: 1866-1870.
- Chervonsky, A. V., Y. Wang, et al. (1997). "The Role of Fas in Autoimmune Diabetes." Cell **89**(1): 17-24.
- Condorelli, G., G. Vigliotta, et al. (1998). "PED/PEA-15 gene controls glucose transport and is overexpressed in type 2 diabetes mellitus." Embo J **17**(14): 3858-66.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999). MAMMALIAN CASPASES: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. **68**: 383-424.
- Fahrner, T. J., S. L. Carroll, et al. (1990). The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. **10**: 6454-6459.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-467.
- Greene, L. A. (1978). Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. **78**: 747-755.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). Establishment of a Noradrenergic Clonal Line of Rat Adrenal Pheochromocytoma Cells which Respond to Nerve Growth Factor. **73**: 2424-2428.
- Hazel, T. G., D. Nathans, et al. (1988). A Gene Inducible by Serum Growth Factors Encodes a Member of the Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. **85**: 8444-8448.
- Heasley, L. E. and G. L. Johnson (1992). "The beta-PDGF receptor induces neuronal differentiation of PC12 cells." Molecular biology of the cell **3**(5): 545-553.
- Hirata, Y., K. Kiuchi, et al. (1993). The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. **268**: 24808-24812.
- Honig, L. S. and R. N. Rosenberg (2000). "Apoptosis and neurologic disease." The American Journal of Medicine **108**(4): 317-330.
- Hopps, H. E., B. C. Bernheim, et al. (1963). Biologic Characteristics of a Continuous Kidney Cell Line Derived from the African Green Monkey. **91**: 416-424.
- Jacobs, C. M., K. A. Boldingh, et al. (2004). ERK2 Prohibits Apoptosis-induced Subcellular Translocation of Orphan Nuclear Receptor NGFI-B/TR3. **279**: 50097-50101.

- Jacobs, C. M. and R. E. Paulsen (2005). "Crosstalk between ERK2 and RXR regulates nuclear import of transcription factor NGFI-B." Biochemical and Biophysical Research Communications **336**(2): 646-652.
- Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). "Programmed Cell Death in Animal Development." Cell **88**(3): 347-354.
- Jager, R. (2007). "Targeting the death machinery in mammary epithelial cells: Implications for breast cancer from transgenic and tissue culture experiments." Critical Reviews in Oncology/Hematology **63**(3): 231-240.
- Juan, T. S. C., I. K. McNiece, et al. (1997). "Identification and Mapping of Casp7, a Cysteine Protease Resembling CPP32[beta], Interleukin-1[beta] Converting Enzyme, and CED-3." Genomics **40**(1): 86-93.
- Katagiri, Y., K. Takeda, et al. (2000). "Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B." Nat Cell Biol **2**(7): 435-440.
- Kim, Y.-M., H.-T. Chung, et al. (1999). Nitric Oxide Protects PC12 Cells from Serum Deprivation-Induced Apoptosis by cGMP-Dependent Inhibition of Caspase Signaling. **19**: 6740-6747.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetze, et al. (1997). "The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis." Science **275** 1132-1136
- Kohler, C., S. Orrenius, et al. (2002). "Evaluation of caspase activity in apoptotic cells." Journal of Immunological Methods **265**(1-2): 97-110.
- Kolch, W. (2000). "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions." Biochemical Journal(351): 289-305.
- Kolluri, S. K., N. Bruey-Sedano, et al. (2003). Mitogenic Effect of Orphan Receptor TR3 and Its Regulation by MEKK1 in Lung Cancer Cells. **23**: 8651-8667.
- Kottke, T. J., A. L. Blajeski, et al. (1999). Comparison of Paclitaxel-, 5-Fluoro-2'-deoxyuridine-, and Epidermal Growth Factor (EGF)-induced Apoptosis. EVIDENCE FOR EGF-INDUCED ANOIKIS. **274**: 15927-15936.
- Laurie G. Hudson, L. J. M. (1998). Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. **43**: 444-455.
- Li, H., S. K. Kolluri, et al. (2000). "Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3." Science **289**(5482): 1159-64.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade." Cell **91**(4): 479-489.
- Lin, B., S. K. Kolluri, et al. (2004). "Conversion of Bcl-2 from Protector to Killer by Interaction with Nuclear Orphan Receptor Nur77/TR3." Cell **116**(4): 527-540.
- Lin, X.-F., B.-X. Zhao, et al. (2004). RXR{alpha} acts as a carrier for TR3 nuclear export in a 9-cis retinoic acid-dependent manner in gastric cancer cells. **117**: 5609-5621.
- Liu, X., P. Li, et al. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. **95**: 8461-8466.
- Liu, X., H. Zou, et al. (1997). "DFP, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis." Cell **89**(2): 175-184.
- Liu, Z.-G., S. W. Smith, et al. (1994). "Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77." Nature **367**(6460): 281-284.

- Manakova, S., K. A. Puttonen, et al. (2003). "Ara-C induces apoptosis in monkey fibroblast cells." Toxicology in Vitro **17**(3): 367-373.
- Manakova, S., K. A. Puttonen, et al. (2004). "The roles of dopamine transporter and Bcl-2 protein in the protection of CV1-P cells from 6-OHDA-induced toxicity." Toxicology Letters **154**(1-2): 117-123.
- Martina, M., G. Kili, et al. (1994). "The effect of intracellular Ca²⁺ on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture." Journal of Membrane Biology **142**(2): 209-16.
- McConkey, D. J., P. Hartzell, et al. (1989). Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. **3**: 1843-1849.
- McDonnell, J. M., D. Fushman, et al. (1999). "Solution Structure of the Proapoptotic Molecule BID: A Structural Basis for Apoptotic Agonists and Antagonists." Cell **96**(5): 625-634.
- Meinke, G. and P. B. Sigler (1999). "DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B." Nat Struct Mol Biol **6**(5): 471-477.
- Milbrandt, J. (1988). "Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene." Neuron **1**(3): 183-188.
- Moll, U. M., N. Marchenko, et al. (2006). "p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction." Oncogene **25**(34): 4725-4743.
- Movig, T. (2007). "Subcellular Localization of Apoptosis Initiator NGFI-B is Regulated By MAP Kinase ERK and Apoptosis Signals." Master's thesis, Department of Biology, University of Oslo.
- Muzio, M. (1998). "Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis " International Journal of Clinical & Laboratory Research **28**(Number 3/ september, 1998): 141-147.
- Narita, M., S. Shimizu, et al. (1998). "Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14681-6.
- Nelson, D. A. and E. White (2004). Exploiting different ways to die. **18**: 1223-1226.
- Nicholson, D. W., A. Ali, et al. (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis." Nature **376**(6535): 37-43.
- Proskuryakov, S. Y. a., A. G. Konoplyannikov, et al. (2003). "Necrosis: a specific form of programmed cell death?" Experimental Cell Research **283**(1): 1-16.
- Putt, K. S., G. W. Chen, et al. (2006). "Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy." Nat Chem Biol **2**(10): 543-550.
- Renault, F., E. Formstecher, et al. (2003). "The multifunctional protein PEA-15 is involved in the control of apoptosis and cell cycle in astrocytes." Biochemical Pharmacology **66**(8): 1581-1588.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." Current Opinion in Cell Biology **9**(2): 180-186.
- Rukenstein, A., R. E. Rydel, et al. (1991). Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms. **11**: 2552-2563.
- Saikumar, P., Z. Dong, et al. (1999). "Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease." The American Journal of Medicine **107**(5): 489-506.
- Sharpe, J. C., D. Arnoult, et al. (2004). "Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1644**(2-3): 107-113.
- Slagsvold, H. H., A.-C. Ostvold, et al. (2002). "Nuclear Receptor and Apoptosis Initiator NGFI-B Is a Substrate for Kinase ERK2." Biochemical and Biophysical Research Communications **291**(5): 1146-1150.

- Slagsvold, H. H., C. M. Rosseland, et al. (2003). "High molecular weight DNA fragments are processed by caspase sensitive or caspase independent pathways in cultures of cerebellar granule neurons." Brain Research **984**(1-2): 111-121.
- Strasser, A., D. C. S. Huang, et al. (1997). "The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1333**(2): F151-F178.
- Takadera, T. and T. Ohyashiki (1997). 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. **249**: 8-12.
- Tsakamoto, T., J. Yoo, et al. (2000). "Expression of MAT1/PEA-15 mRNA isoforms during physiological and neoplastic changes in the mouse mammary gland." Cancer Lett **149**(1-2): 105-13.
- Vaux, D. L. and S. J. Korsmeyer (1999). "Cell Death in Development." Cell **96**(2): 245-254.
- Whitehurst, A. W., J. L. Wilsbacher, et al. (2002). "ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(11): 7496-501.
- Wilson, T. E., T. J. Fahrner, et al. (1991). Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. **252**: 1296-1300.
- Wilson, T. E., R. E. Paulsen, et al. (1992). "Participation of Non-Zinc Finger Residues in DNA Binding by Two Nuclear Orphan Receptors." Science **256**(no. 5053): 107-110.
- Xia, Z., M. Dickens, et al. (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-31.
- Yuan, J., M. Lipinski, et al. (2003). "Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death." Neuron **40**(2): 401-413.
- Zhao, X., W. Dai, et al. (2006). "Epidermal growth factor (EGF) induces apoptosis in a transfected cell line expressing EGF receptor on its membrane." Cell Biology International **30**(8): 653-658.
- Zong, W.-X. and C. B. Thompson (2006). Necrotic death as a cell fate. **20**: 1-15.
- Zornig, M., A.-O. Hueber, et al. (2001). "Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1551**(2): F1-F37.