

# Sikkerhetsfarmakologiske studier av lamotrigin og valproat - mulige effekter på nevronkulturer

Sissel Evensen



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultetet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013



Masteroppgave for graden Master i farmasi

# Sikkerhetsfarmakologiske studier av lamotrigin og valproat - mulige effekter på nevronkulturer

Sissel Evensen

Oppgaven er utført ved

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,  
Farmasøytisk institutt,  
Det matematisk-naturvitenskaplige fakultetet  
ved Universitetet i Oslo

Veiledere:

**Ragnhild Elisabeth Paulsen**, Professor, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,  
Universitetet i Oslo

**Gro Haarklou Mathisen**, Post.Doc, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i  
Oslo og Vitenskapskomiteen for mattrygghet

**Lars Peter Engeset Austdal**, Stipendiat, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,  
Universitetet i Oslo

© Sissel Evensen

2013

Sikkerhetsfarmakologiske studier av lamotrigin og valproat – mulige effekter på  
nevronkulturer

Sissel Evensen

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

# Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo. Arbeidet ble startet i mars 2012 og avsluttet i mai 2013.

Først og fremst vil jeg takke mine tre dyktige veiledere Ragnhild Elisabeth Paulsen, Gro Haarklou Mathisen og Lars Peter Engeset Austdal. Ragnhild, tusen takk for din fremragende kunnskap og interesse for faget. Takk for god veiledning og konstruktive tilbakemeldinger. Gro, tusen takk for gode råd og faglige innspill. Du er imponerende effektiv, og har et svar på alt. Lars, tusen takk for all hjelp på laben og faglige tilbakemeldinger. Jeg setter stor pris på ditt gode humør og inspirerende engasjement.

Tusen takk til Mona Gaarder for god opplæring og godt samarbeid på laben.

Takk til Ida Scheel og Eva Skovlund for god veiledning angående statistiske analyser.

Sist, men ikke minst, tusen takk til Marte Rodum for samarbeidet dette året. Du har bidratt til å gjøre tiden på laben morsom, og det har vært lærerikt å diskutere faglige problemstillinger med deg. Tusen takk for at du alltid er så positiv, smilet og latteren din smitter alltid over på meg!

Til slutt vil jeg takke Karl, familie og venner for all støtte, oppmuntring og morsomme episoder gjennom utdanningens siste år!

Oslo, mai 2013

Sissel Evensen



# Sammendrag

Det foreligger som regel lite dokumentasjon på legemidler sin innvirkning på sentralnervesystemet under utvikling, og det er anbefalt at det utvikles nye metoder for å studere dette. I 2001 ble det innført nye internasjonale retningslinjer for ikke-kliniske sikkerhetsfarmakologiske studier, og målet med disse er å fange opp potensielt uønskede effekter av legemidler på et tidlig tidspunkt. Antiepileptika, slik som lamotrigin og valproat, er legemidler det er aktuelt å bruke under svangerskapet. Studier av effekt på sentralnervesystemet under utvikling er av stor interesse for slike legemidler, fordi eksponering kan påvirke flere viktige prosesser. For eksempel er nevruttvekst et kjennetegn på nevronal utvikling, og selv små påvirkninger kan føre til forstyrret funksjon av sentralnervesystemet.

PC12-celler ble benyttet som modell for å studere nevruttvekst. Nervevekstfaktor (NGF) og hjerne-derivert nevroτροφisk faktor (BDNF) ble benyttet som positive kontroller for å undersøke hvilken metode og hvilke endepunkter som er mest robuste for å studere effekt på nevruttvekst ved en morfometrisk analyse. Effekter av lamotrigin og valproat ble studert, og det ble undersøkt om BDNF-antistoff og caspase-3-hemmer påvirker nevruttvekst. Det ble undersøkt om endringene sett i den morfometriske analysen fra PC12-celler kunne reproduseres ved bruk av immunfarging og westernblotting. Effekter av lamotrigin og valproat ble også studert på kornceller fra lillehjerne hos kylling og rotte.

I PC12-celler ble det vist at NGF, BDNF, lamotrigin og valproat har effekt på nevruttvekst. BDNF-antistoff gav en liten reduksjon i nevruttvekst induisert av NGF og valproat, men ikke for BDNF og lamotrigin. Dette kan tyde på at BDNF er involvert i nevruttvekst induisert av NGF og valproat. Caspase-3-hemmer gav en reduksjon i nevruttvekst induisert av NGF, BDNF, lamotrigin og valproat, og caspase-3 ser derfor ut til å spille en rolle for mekanismene bak nevruttvekst. Antistoff mot  $\beta$ -tubulin III og GAP-43 ble benyttet som markører for nevruttvekst ved immunfarging av PC12-celler. Immunfarging er ikke egnet som et alternativ til morfometrisk analyse fordi prosedyren kan endre cellenes morfologi. Til westernblotting ble antistoff mot PCNA og  $\beta$ -spectrin II benyttet som markører for henholdsvis proliferasjon og nevruttvekst. Resultatene viste økt uttrykk av PCNA og  $\beta$ -spectrin II for PC12-celler og kornceller eksponert for NGF og valproat. Dette tyder på at  $\beta$ -spectrin II kan være egnet som markør for nevruttvekst.

# Forkortelser

---

Ad	Opp til
ANOVA	Variansanalyse (analysis of variance)
APS	Ammonium persulfat
BDNF	Hhjernerderivert nevroτροφisk faktor (brain-derived neurotrophic factor)
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Bovint serumalbumin
Caspase	Cystein-aspartat-spesifikk-protease
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DNase	Deoksyribonuklease
ERK	Ekstracellulær signalregulert proteinkinase
FBS	Føtalt kalveserum
GABA	Gamma-amino-smørsyre (gamma amino butyric acid)
GABA-T	GABA-transaminase
GAD	Glutaminsyre dekarboksylase
GAP-43	Vekst-assosiert protein-43 (growth associated protein-43)
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Pepperrot peroksidase
HS	Hesteserum
LTG	Lamotrigin
MAPK	Mitogen-aktivert proteinkinase
MQ	Milli Q
NCAM	Nevronalt celleadhesjonsmolekyl
NGF	Nervevekstfaktor (nerve growth factor)
p75NTR	p75 nevroτροφin-reseptor
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Pentametansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsyre

---



---

SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SE	Standardfeil
TBS	Trisbufret saltvann
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylenediamin
TG	Tris-Glycin-buffer
TGS	Tris-Glycin-SDS-buffer
Tris	Trishydroksymetylaminoetan
Trk	Tropomyosin-reseptor-kinase
Tween	Polyoksyetylen-sorbitan-monolaurat
VPA	Valproat
z-DEVD-cmk	z-aspartat-glutamat-valin-aspartat-klormetylketon

---

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>INNLEDNING</b> .....	1
<b>1.1</b>	<b>Sikkerhetsfarmakologi</b> .....	1
1.1.1	PC12-celler som nevrobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi .....	2
1.1.2	Kornceller fra lillehjernen som nevrobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi .....	2
<b>1.2</b>	<b>Epilepsi og graviditet</b> .....	2
<b>1.3</b>	<b>Antiepileptika</b> .....	3
1.3.1	Lamotrigin .....	3
1.3.2	Valproat .....	4
1.3.3	Antiepileptika og graviditet .....	5
<b>1.4</b>	<b>Sentralnervesystemet under utvikling</b> .....	7
1.4.1	Proliferasjon, differensiering og nevruttutvekst .....	7
1.4.2	Nevrotrofiner og nevrotrofinreseptorer .....	8
1.4.3	Lillehjernen under utvikling .....	9
<b>1.5</b>	<b>Målet med oppgaven</b> .....	11
<b>2</b>	<b>MATERIALER OG METODER</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Oversikt over kjemikalier, biologiske produkter og utstyr</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>PC12-celler</b> .....	15
2.2.1	Splitting av PC12-celler til flaske .....	15
2.2.2	Splitting av PC12-celler til skåler .....	16
2.2.3	Eksposering av PC12-celler .....	17
<b>2.3</b>	<b>Kornceller</b> .....	19
2.3.1	Poly-L-lysin-behandling av kulturskåler .....	19
2.3.2	Preparering av korncellekulturer .....	20
2.3.3	Eksposering av kornceller .....	25
<b>2.4</b>	<b>Morfometrisk analyse i mikroskop</b> .....	25
<b>2.5</b>	<b>Deteksjon av celledød</b> .....	27
2.5.1	Prosedyre for farging med trypanblå .....	27
<b>2.6</b>	<b>Immunfarging</b> .....	28
2.6.1	Immunfarging av PC12-celler og kornceller fra rotte .....	28
2.6.2	Analyse av immunfargede PC12-celler .....	31

<b>2.7</b>	<b>Westernblotting</b> .....	31
2.7.1	Westernblotting av proteiner fra PC12-celler .....	32
2.7.2	Westernblotting av proteiner fra korncellekulturer .....	32
2.7.3	Høsting av celler til westernblotting .....	32
2.7.4	Proteinmåling .....	33
2.7.5	Proteinjustering av prøver .....	34
2.7.6	Støping av gel .....	35
2.7.7	Gelelektroforese .....	37
2.7.8	Blotting av gel .....	38
2.7.9	Ponceausfarging og blokking av membran .....	39
2.7.10	Tilsetting av primære og sekundære antistoff .....	41
2.7.11	Fremkalling .....	42
2.7.12	Stripping av membranen .....	42
2.7.13	Måling av westernbåndstyrke.....	43
<b>2.8</b>	<b>Statistikk</b> .....	43
<b>3</b>	<b>RESULTATER</b> .....	44
<b>3.1</b>	<b>Effekt av NGF på nevruttvekst i PC12-celler – valg av morfometriske endepunkt</b> .....	44
<b>3.2</b>	<b>Effekt av BDNF på nevruttvekst i PC12-celler</b> .....	48
<b>3.3</b>	<b>Effekt av BDNF-antistoff på nevruttvekst i PC12-celler</b> .....	50
<b>3.4</b>	<b>Effekt av caspase-3-hemmer på nevruttvekst i PC12-celler</b> .....	52
<b>3.5</b>	<b>Lamotrigin og nevruttvekst i PC12-celler</b> .....	54
3.5.1	Effekt av lamotrigin på nevruttvekst i PC12-celler .....	54
3.5.2	Effekt av BDNF-antistoff på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin .....	57
3.5.3	Effekt av caspase-3-hemmer på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin .....	58
<b>3.6</b>	<b>Valproat og nevruttvekst i PC12-celler</b> .....	59
3.6.1	Effekt av valproat på nevruttvekst i PC12-celler .....	59
3.6.2	Effekt av BDNF-antistoff på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for valproat.....	62
3.6.3	Effekt av caspase-3-hemmer på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for valproat .....	64
<b>3.7</b>	<b>Celledød</b> .....	65

3.7.1	Effekt av NGF og BDNF på celledød i PC12-celler .....	65
3.7.2	Effekt av lamotrigin på celledød i PC12-celler .....	66
3.7.3	Effekt av valproat på celledød i PC12-celler .....	68
<b>3.8</b>	<b>Nevrittutvekst i kornceller fra lillehjernen .....</b>	<b>69</b>
3.8.1	Nevrittutvekst i kornceller fra kylling .....	69
3.8.2	Nevrittutvekst i kornceller fra rotte .....	72
<b>3.9</b>	<b>Immunfarging ved bruk av nevruttkarakteristiske antistoff .....</b>	<b>74</b>
3.9.1	Immunfarging av PC12-celler med antistoff mot $\beta$ -tubulin III.....	74
3.9.2	Immunfarging av PC12-celler antistoff mot GAP-43 .....	76
<b>3.10</b>	<b>Westernblotting ved bruk av utviklingsmarkører .....</b>	<b>77</b>
3.10.1	Westernblotting med prøver fra PC12-celler .....	77
3.10.2	Westernblotting med prøver fra kyllingornceller .....	81
<b>4</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskusjon av metoder .....</b>	<b>83</b>
4.1.1	Valg av cellemodeller.....	83
4.1.2	Valg av eksponeringer.....	84
4.1.3	Morfometrisk analyse i mikroskop .....	85
4.1.4	Valg av endepunkter til morfometrisk analyse i mikroskop .....	87
4.1.5	Måling av celledød .....	88
4.1.6	Immunfarging ved bruk av nevruttkarakteristiske antistoff.....	89
4.1.7	Westernblotting ved bruk av utviklingsmarkører.....	91
<b>4.2</b>	<b>Diskusjon av biologiske funn .....</b>	<b>92</b>
4.2.1	BDNF påvirker nevrututvekst i PC12-celler.....	92
4.2.2	Lamotrigin og valproat påvirker nevrututvekst i PC12-celler .....	94
4.2.3	BDNF-antistoff og effekt på nevrututvekst i PC12-celler .....	96
4.2.4	Caspase-3-hemmer og effekt på nevrututvekst i PC12-celler.....	97
4.2.5	PCNA som markør for proliferasjon og $\beta$ -spectrin II som markør for nevrututvekst.....	99
<b>4.3</b>	<b>Nytten av sikkerhetsfarmakologiske studier.....</b>	<b>100</b>
<b>5</b>	<b>KONKLUSJON.....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>LITTERATURLISTE.....</b>	<b>102</b>

# 1 Innledning

En av de viktigste grunnene til at legemidler trekkes fra markedet er uønskede effekter, og ofte er disse relatert til sentralnervesystemet. Det foreligger som regel lite dokumentasjon på legemidler sin innvirkning på nervesystemet under utvikling, og det er anbefalt at det utvikles nye metoder for å studere dette (avsnitt 1.1). Epilepsi er en av de vanligste nevrologiske lidelsene, også blant gravide kvinner (avsnitt 1.2). Antiepileptika er legemidler det er aktuelt å bruke under svangerskapet (avsnitt 1.3), da et epileptisk avfall kan få alvorlige konsekvenser for mor og ufødt barn. Studier av effekt på sentralnervesystemet under utvikling er av stor interesse for slike legemidler, fordi eksponering kan påvirke flere viktige prosesser (avsnitt 1.4). For eksempel er nevruttvekst et kjennetegn på nevronal utvikling, og selv små påvirkninger kan føre til forstyrret funksjon av sentralnervesystemet. Legemidler som påvirker nevruttvekst kan potensielt ha utviklingsmessig toksisitet.

## 1.1 Sikkerhetsfarmakologi

Tradisjonelle metoder for å studere legemiddeleffekter og kartlegge risiko er basert på toksisitetstesting *in vivo* i dyremodeller. Sikkerhetsfarmakologi som fagfelt ble etablert på grunn av at uønskede effekter av nye legemidler ikke alltid fanges opp av standard toksikologiske tester (Bass, Kinter et al. 2004). International Conference on Harmonization innførte i 2001 internasjonale retningslinjer (*ICH S7A guidelines: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals*) for ikke-kliniske sikkerhetsfarmakologiske studier (ICH S7A 2001). Ved sikkerhetsfarmakologiske studier ønsker man å undersøke potensielt uønskede farmakodynamiske effekter av et legemiddel på fysiologiske funksjoner ved eksponering i det terapeutiske området og over. Kjernen i disse studiene er effekter på sentralnervesystemet, det kardiovaskulære systemet og respirasjonssystemet. Målet med retningslinjene er å fange opp potensielt uønskede effekter av legemidler på et tidlig tidspunkt, og dermed beskytte kliniske utprøvere og pasienter. Sikkerhetsfarmakologiske studier kan også bidra til å unngå unødvendig bruk av forsøksdyr og andre ressurser. Både europeisk og amerikansk legemiddellovgivning ønsker økt testing av kjemikalier for å kunne forutsi potensielt skadelige effekter (Radio and Mundy 2008). Sentralnervesystemet under utvikling hos barn er i tillegg mer følsomt for ytre påvirkninger sammenlignet med voksne

(Barone, Das et al. 2000), og utvikling av gode *in vitro*-modeller som er rettet mot sentralnervesystemet under utvikling er derfor nødvendig.

### **1.1.1 PC12-celler som neurobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi**

PC12-celler er en klonet nevronal cellelinje med opphav i feokromocytom i binyrene hos rotte (Greene and Tischler 1976). PC12 og andre cellelinjer har vist seg å være nyttige *in vitro*-modeller for å forstå biologiske prosesser involvert i nevronal utvikling (Radio and Mundy 2008), og for å studere effekter av kjemikalier på nevrutvekst (Radio, Freudenrich et al. 2010). Eksposering av PC12-celler for nervevekstfaktoren NGF fører til at cellene differensierer og tilegner seg mange av egenskapene til nevroner. Cellene sender ut nevrerter, syntetiserer neurotransmittere og reseptorer og får elektrisk aktivitet. Disse prosessene kan relateres til nervesystemet under utvikling. Bruk av PC12-celler til sikkerhetsfarmakologiske studier er utprøvd i en tidligere masteroppgave (Bekkevold 2011).

### **1.1.2 Kornceller fra lillehjernen som neurobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi**

Primære nevronale kulturer består av celler som er tatt direkte fra vev i nervesystemet, og dette fører til at cellene beholder mange av de morfologiske, kjemiske og fysiologiske egenskapene til nevroner. Blant annet kan man skille mellom aksoner og dendritter. Primære nevronale kulturer har tidligere blitt brukt til å studere effekter av kjemikalier på nevrutvekst (Radio, Freudenrich et al. 2010). Primære korncellekulturer fra lillehjernen er også en av de mest populære *in vitro*-modellene for å studere nevronal utvikling, funksjon og patologi (gjennomgått i: (Contestabile 2002)). Denne modellen kan brukes til å undersøke cellulære mekanismer bak toksiske effekter på nevronal utvikling. Siden mange av egenskapene til nevroner *in situ* opprettholdes, kan effekter sett *in vivo* også reproduseres *in vitro*.

## **1.2 Epilepsi og graviditet**

Epilepsi er en lidelse som karakteriseres av periodiske og uforutsigbare anfall med høyfrekvent, synkron og rytmisk firing av en gruppe nevroner i hjernen (Jones and McNamara 2012). Symptomene kan variere fra et kort tap av konsentrasjon til kraftige

kramper i hele kroppen, og de bestemmes av funksjonen til den delen av hjernen som er påvirket. De epileptiske anfallene deles grovt inn i to kategorier; generaliserte og fokale (partielle) anfall, som igjen har flere undergrupper. Fokale anfall oppstår i lokale regioner i hjernebarken, mens generaliserte anfall har gjensidig fyring i hjernestammen (thalamus) og hjernebarken. Et epileptisk anfall oppstår trolig på grunn av forstyrret balanse mellom inhibitorisk (GABAerg) og eksitatorisk (glutamaterg) synaptisk transmisjon (Jones and McNamara 2012). Epilepsi er ikke nødvendigvis en statisk tilstand, men kan utvikles videre gjennom livet. Det ser ut til at epilepsi kan føre til endringer i sentralnervesystemet som gir økt eksitabilitet, blant annet gjennom dannelse av nye eksitatoriske synapser (Scharfman 2007). Mekanismene som ligger bak utviklingen av epilepsi ligner på mekanismene som ligger til grunn for normal vekst og plastisitet.

De fleste kvinner med epilepsi gjennomfører normale svangerskap uten fosterskader hos barnet, men graviditet hos kvinner med epilepsi innebærer en større risiko. Graviditet kan føre til fysisk og emosjonelt stress, noe som kan påvirke frekvens og alvorlighet av anfall. I de fleste tilfeller er det tryggere for både mor og barn at tilstanden holdes under kontroll ved bruk av antiepileptika. Over 90 % av kvinner med epilepsi får friske barn, men barna har to til tre ganger så høy risiko for misdannelser (Tauboll, Gjerstad et al. 2003). For kvinner med epilepsi er det vist en større risiko for spontanabort (4 %) sammenlignet med den generelle befolkningen (2 %) (Thomas, Sindhu et al. 2009).

## **1.3 Antiepileptika**

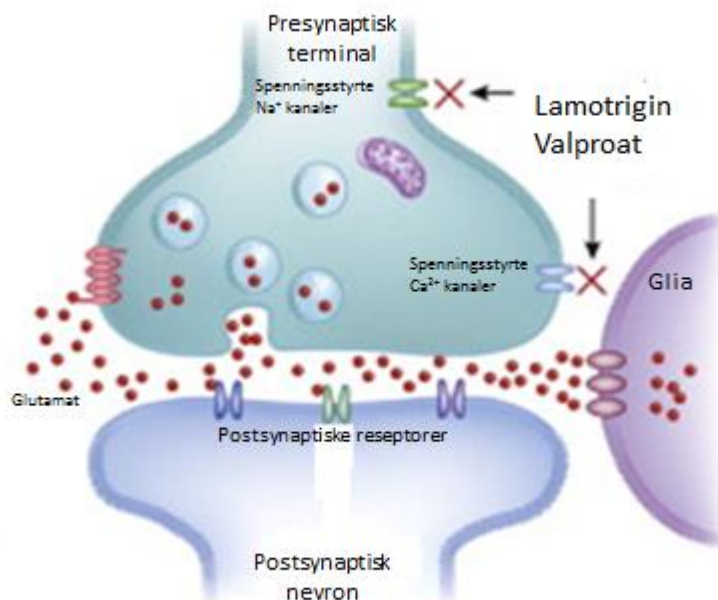
Antiepileptika er preparater som brukes i behandling av epilepsi. Den type antiepileptika som brukes i dag påvirker ikke selve epilepsien og kan ikke hindre utvikling av den. Antiepileptika påvirker nevroners aktivering, og dermed reduseres risikoen for å få et anfall. Tendensen til å få et anfall forsvinner derimot ikke (Gjerstad, Tauboll et al. 2003).

### **1.3.1 Lamotrigin**

Lamotrigin brukes profylaktisk i behandling av epilepsi og bipolar lidelse.

Virkningsmekanismen til lamotrigin er ikke fullstendig klarlagt, men trolig hemmes spenningsstyrte natriumkanaler (figur 1.1). Dette reduserer høyfrekvent fyring av nevroner og spredning av aksjonspotensialer, og stabiliserer dermed presynaptiske nevronale membraner.

En slik hemming kan bremse overaktivering av glutamaterge nevroner og hindre frigjøring av glutamat, den viktigste eksitatoriske neurotransmitteren i sentralnervesystemet (Jones and McNamara 2012). Lamotrigin kan også virke ved å hemme spenningsstyrte kalsiumkanaler, og dermed påvirke vesikulær frigjøring av eksitatoriske neurotransmittere (figur 1.1).



**Figur 1.1 Virkningsmekanismen til lamotrigin og valproat**

Lamotrigin og valproat hemmer spenningsstyrte  $\text{Na}^+$  og  $\text{Ca}^{2+}$  kanaler på presynaptisk terminal, og hindrer dermed høyfrekvent, gjentatt firing av nevroner og frigjøring av den viktigste eksitatoriske neurotransmitteren, glutamat. Figuren er en modifisert utgave, opprinnelig hentet fra (Olive, Cleva et al. 2012).

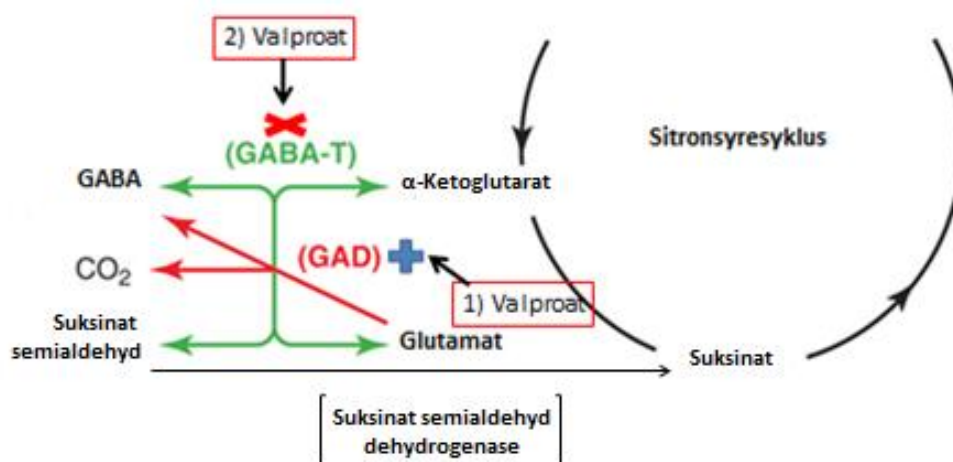
### 1.3.2 Valproat

Valproat brukes profylaktisk i behandling av epilepsi, bipolar lidelse og migrene.

Virkningsmekanismen til valproat er ikke fullstendig klarlagt, men det ser ut til å involvere flere ulike mekanismer og mål molekyler. Dette stemmer overens med at valproat har en bredspektret antiepileptisk effekt. I likhet med lamotrigin, blokkerer valproat spenningsstyrte natriumkanaler og kalsiumkanaler, og hindrer dermed høyfrekvent, gjentatt firing av nevroner og frigjøring av neurotransmittere (Jones and McNamara 2012) (figur 1.1). Valproat øker tilgjengeligheten av GABA, den viktigste inhibitoriske neurotransmitteren i sentralnervesystemet, gjennom to ulike mekanismer (Olsen and Li 2012) (figur 1.2). Valproat kan forsterke effekten til GAD, enzymet som er ansvarlig for dannelse av GABA fra glutamat. Dette skjer trolig ved at enzymet konverteres fra den inaktive til den aktive formen (Johannessen 2000). Ved høye konsentrasjoner av valproat begrenses også aktiviteten til



GABA-T, et enzym som er ansvarlig for nedbrytningen av GABA. Mekanismen er ikke helt klarlagt, men det kan skje via hemmet nedbrytning av suksinatsemialdehyd, som er en potent hemmer av GABA-T (Johannessen 2000). Disse mekanismene fører trolig til at en større mengde GABA er tilgjengelig for frigjøring til synapsen ved depolarisering. Ved terapeutiske doser hemmer valproat histondeacetylaser (HDACs), som er negative regulatorer av genekspressjon. Dette fører til at kromatinstrukturen åpnes for transkripsjon, og genekspressjonen aktiveres (van Bergeijk, Haastert et al. 2006). HDACs spiller viktige roller under utviklingen av embryoet, og det er trolig hemming av HDACs som står bak de teratogene effektene av valproat. Dette støttes av studier som viser at ikke-teratogene analoger av valproat ikke hemmer HDACs (Phiel, Zhang et al. 2001). Valproat stimulerer mitogen-aktivert protein kinase (MAPK)/ekstracellulært signal-regulert kinase (ERK) signalveien som fremmer differensiering og overlevelse av celler. MAP kinaser regulerer mange cellulære prosesser, slik som vekst, proliferasjon, differensiering og apoptose, og ERK er spesielt involvert i nevronal plastisitet (Yuan, Huang et al. 2001).



**Figur 1.2 Virkningsmekanismen til valproat**

Valproat øker tilgjengeligheten til GABA gjennom to ulike mekanismer. 1) Valproat kan forsterke effekten til GAD, enzymet som er ansvarlig for dannelsen av GABA fra glutamat. 2) Valproat kan redusere aktiviteten til GABA-T, enzymet som er ansvarlig for nedbrytning av GABA. Figuren er en modifisert utgave, opprinnelig hentet fra (Olsen and Li 2012).

### 1.3.3 Antiepileptika og graviditet

Forekomsten av medfødte misdannelser er to til tre ganger høyere hos barn av mødre som bruker antiepileptika sammenlignet med den generelle befolkningen (Meador, Reynolds et al. 2008). Antiepileptika virker ved å hemme ionekanaler og påvirke tilgjengeligheten av neurotransmitterne GABA og glutamat i hjernen, prosesser som også er viktig for normal

utvikling av nervesystemet, læring og hukommelse. Teratogene effekter har lenge vært assosiert med valproat, slik som føtalt valproatsyndrom og nevrالرrørdefekter. Den kritiske perioden for utvikling av strukturelle misdannelser er begrenset til første trimester, mens den kognitive utviklingen kan påvirkes gjennom hele svangerskapet (Tomson and Battino 2012). Flere studier har slått fast at eksponering for antiepileptika under svangerskapet kan øke risikoen for redusert kognitiv funksjon senere i livet (gjennomgått i: (Ikonomidou and Turski 2010)). Barn som har vært utsatt for valproat under svangerskapet har signifikant lavere intelligens sammenlignet med barn født av friske kvinner eller kvinner med ubehandlet epilepsi (Banach, Boskovic et al. 2010). Andre studier viser redusert kognitiv funksjon og flere utviklingsmessige problemer for barn som har vært utsatt for valproat under svangerskapet (gjennomgått i: (Tomson and Battino 2012)). I en prospektiv multisenterstudie fra USA og England ble barn av mødre med epilepsi eksponert for antiepileptika i monoterapi under svangerskapet undersøkt (Meador, Baker et al. 2009, Cohen, Meador et al. 2011, Meador, Baker et al. 2011, Meador, Baker et al. 2012, Meador, Baker et al. 2013). Barn som var eksponert for valproat hadde signifikant lavere intelligens enn de som var eksponert for andre antiepileptika. Valproat hadde også en mer negativ effekt på verbale og ikke-verbale evner, hukommelse og sosiale ferdigheter, sammenlignet med bruk av andre antiepileptika. Både valproat og lamotrigin svekket verbale evner mer enn ikke-verbale. I EURAP-studien fra 42 ulike land ble det slått fast at risikoen for misdannelser ikke bare avhenger av type antiepileptika, men at også dosen spiller en rolle (Tomson, Battino et al. 2011). I tillegg ble det vist at det er over tre ganger så høy risiko for medfødte misdannelser ved monoterapi med valproat (10 %) sammenlignet med lamotrigin (3 %). Det faktum at valproat, og ikke lamotrigin, viser teratogene effekter ved terapeutiske doser, er et tegn på at den teratogene effekten ikke kan forutses fra den antiepileptiske virkningen. Teratogene effekter av antiepileptika brukt under svangerskapet kan ikke bekreftes av kliniske studier alene. Det finnes mange ulike behandlingsregimer og flere sammenblandede faktorer som gjør det vanskelig å trekke sikre konklusjoner. Det er spesielt vanskelig for mer diffuse teratogene effekter, slik som påvirkning på kognitiv funksjon. Det er behov for å etablere gode modeller som kan brukes til å studere effekter av antiepileptika, og som kan relateres til effekter på sentralnervesystemet under utvikling. Dette gjelder studier av både morfologiske og kognitive effekter, og av mekanismene som ligger bak.

## 1.4 Sentralnervesystemet under utvikling

Normal utvikling av nervesystemet krever koordinasjon slik at replikasjon, migrasjon, proliferasjon, differensiering, myelinering, synapsedannelse og apoptose skjer på riktig sted og til rett tid (Anthony, Montine et al. 2003). For at nervesystemet skal fungere korrekt, er det nødvendig at ulike celletyper og nettverk mellom dem dannes tidlig i utviklingen, og at de modnes riktig. Første tegn til utvikling av nervesystemet kan ses rundt tre uker inn i svangerskapet. Nevralrøret oppstår først, og så dannes sentralnervesystemet i karakteristiske lag derfra. Hoveddelene av sentralnervesystemet er ferdig utviklet allerede åtte uker inn i svangerskapet (Stiles and Jernigan 2010).

### 1.4.1 Proliferasjon, differensiering og nevruttvekst

Tidlig utvikling karakteriseres av proliferasjon (celledeling) av embryoniske celler, som deretter differensierer til ulike typer spesialiserte celler. Under utviklingen av sentralnervesystemet gir nevrone forløperceller opphav til både nevroner og gliaceller. Nevronale forløperceller replikerer i nevralkjøret og migrerer deretter til ulike destinasjoner i kroppen. For nevroner skjer dette hovedsakelig før fødsel (Stiles and Jernigan 2010). Når celler differensierer, slutter de vanligvis å dele seg og stoppes i  $G_0$  fasen i cellyklus. De fleste celler har mulighet til å dele seg igjen ved tap av celler ved for eksempel skade eller celledød, men ikke nevroner. Modne nevroner er postmitotiske celler, det vil si at de ikke er i stand til å gå inn i mitose og danne nye celler (Stiles and Jernigan 2010).

Ved differensiering av nevroner sender de ut aksoner og dendritter som kan danne funksjonelle forbindelser med andre celler. Aksoner sender vanligvis signaler til andre celler, mens dendrittene mottar signaler. Ved dannelsen av et akson sender nevronet ut en nevrutt med en voksende tupp, som kalles «growth cone». GAP-43 er et protein som er assosiert med vekst av nerver, og har en kjent rolle i dannelsen av «growth cones» (Denny 2006). Når aksonet når sin endelige destinasjon, deles det i flere grener som kan danne synapser med over 1000 andre nevroner, som oftest til dendritter. Nevronene kan da kommunisere med hverandre ved hjelp av neurotransmittere (Kalil 1989). Synapsedannelse med etablering av nevrone nettverk er en dynamisk prosess som fortsetter gjennom hele livet (Anthony, Montine et al. 2003).

## 1.4.2 Nevrotrofiner og nevrotrofinreseptorer

Omtrent halvparten av alle nevroner som dannes i sentralnervesystemet vil under normal utvikling dø ved apoptose (Oppenheim 1991), og hoveddelen av denne celledøden skjer før fødsel (Stiles and Jernigan 2010). Proliferasjon og differensiering er altså i balanse med celledød for å opprettholde et konstant antall celler. For å overleve, må nevronene nå fram til målceller som produserer nevrotrofiner (nervevekstfaktorer). Nevrotrofiner er proteiner som har evne til å fremme overlevelse av nevroner under utvikling. Nevrotrofinene NGF, BDNF, nevrotrofin-3 og nevrotrofin-4 fremmer overlevelse av ulike typer nevroner ved å undertrykke apoptose. Nevrotrofiner finnes bare i en begrenset mengde, og de nevronene som ikke klarer å konkurrere om disse vil dø (Hall 2012). Dette fører til at akkurat riktig antall nevroner overlever. Nevrotrofiner bestemmer cellers skjebne og sørger for at det dannes nødvendige nettverk i nervesystemet. Siden nevrotrofiner fremmer nevronal differensiering og stimulerer nevruttvekst, kan de bidra til læring og hukommelse (Shi, Wang et al. 2010).

### Nervevekstfaktor (NGF)

NGF ble oppdaget i 1949, og var da den første nervevekstfaktoren som ble identifisert (Hamburger and Levi-Montalcini 1949). Det ble observert at NGF hadde evne til å fremme nevruttvekst i kyllingembryo direkte. NGF påvirker overlevelse av perifere sympatiske og sensoriske nevroner, og afferente kolinerge nevroner i sentralnervesystemet. NGF påvirker også differensiering av nevroner ved å regulere utstrekning av aksonale og dendritiske utløpere (Friedman 2012). I sentralnervesystemet er NGF uttrykt i svært små mengder, hovedsakelig i hjernebarken og hippocampus. Det har blitt identifisert en sammenheng mellom NGF og epilepsi, og i en eksperimentell modell av epilepsi («kindling») førte eksponering for NGF til hurtigere utvikling av anfall (Adams, Sazgar et al. 1997).

### Hjerne-derivert nevrotrofisk faktor (BDNF)

BDNF har en mer global effekt i sentralnervesystemet enn NGF. BDNF påvirker overlevelse av perifere sensoriske nevroner, og blant annet motornevroner, dopaminerge nevroner og kolinerge nevroner i sentralnervesystemet. Under utviklingen av nervesystemet spiller BDNF en rolle for differensiering, vekst av dendritter, dannelse av synapser og nevronal overlevelse. BDNF påvirker også interaksjonen mellom nevroner og ikke-nevronale celler, blant annet ved å initiere myelinering av aksoner under utviklingen av nervesystemet (Friedman 2012).

BDNF kan spille en rolle i flere kognitive funksjoner og påvirke synaptisk aktivitet (Scharfman 2005). Et eksempel på det er at glutamatfrigjøring presynaptisk kan regulere syntese og frigjøring av BDNF fra postsynaptiske nevroner. Dette kan igjen indusere fosforylering av glutamatreseptoren og øke den eksitatoriske effekten av neurotransmitteren. BDNF har på grunn av dette blitt koblet til utviklingen av epilepsi.

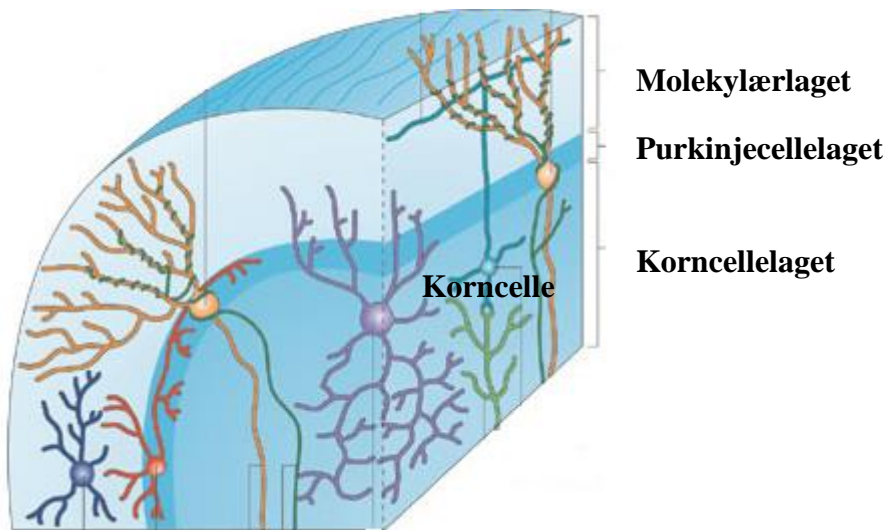
### **Nevrotrofinreseptorer**

Nevrotrofiner interagerer med to ulike typer reseptorer på nevroner (Friedman 2012). Den ene reseptoren binder med høy affinitet til nevtrofiner og tilhører Trk (tropomyosin-kinase) reseptor tyrosinkinasefamilien. Trk reseptorer har iboende kinaseaktivitet og påvirker nevronal overlevelse, differensiering og aktivitet. Det finnes tre ulike Trk reseptorer; TrkA som binder NGF, TrkB som binder BDNF og nevtrofin-4, og TrkC som binder nevtrofin-3. Den andre reseptoren, p75NTR, har ingen kinaseaktivitet, men aktivisering av reseptoren induserer en signaleringskaskade som leder til apoptose. p75NTR kan binde alle nevtrofinene, men med lavere affinitet enn de respektive Trk reseptorene. Paradokset er at nevtrofiner induserer overlevelse gjennom en reseptor og celledød gjennom den andre. Det kan være at de nevtrofinene og reseptorene som er tilstede under utviklingen av nervesystemet primært fremmer overlevelse. Uttrykket av p75NTR øker blant annet ved skader og etter epileptiske anfall (Roux, Colicos et al. 1999), slik at tap av nevroner fremmes ved patologiske tilstander.

### **1.4.3 Lillehjernen under utvikling**

Lillehjernen (cerebellum) ligger i vinkelen mellom storhjernen og ryggmargen. Lillehjernen har som hovedoppgave å koordinere og kontrollere bevegelser, og spiller en viktig rolle i kognitiv funksjon. Over 90 % av nevronene i lillehjernen er kornceller, og dette er den største homogene populasjonen av nevroner i hjernen (Contestabile 2002). Dannelse av korncellene i lillehjernen skjer hovedsakelig etter fødsel i flere karakteristiske steg. Lillehjernebarken deles inn i tre lag – korncellelaget, purkinjecellelaget og molekylærlaget (figur 1.3). Utvikling av korncellene skjer ved proliferasjon i det ytre laget av lillehjernen og migrasjon gjennom molekylærlaget og purkinjecellelaget mot endelig destinasjon i korncellelaget (Apps and Garwicz 2005). Korncellene differensierer deretter til ulike fenotyper med forskjellige nettverk i hjernen. Uttrykket av BDNF øker under utviklingen av lillehjernen, og kornceller

uttrykker også TrkB, som er høyaffinitetsreseptoren for BDNF (Borghesani, Peyrin et al. 2002). Disse reseptorene har trolig en funksjon under utviklingen av kornceller, og BDNF er en av faktorene som kan regulere dette. BDNF stimulerer migrering av kornceller direkte, og er en viktig *in vivo* overlevelsesfaktor for kornceller under utvikling. For NGF er det ikke fastslått en klar rolle som overlevelsesfaktor for kornceller, men det er foreslått av NGF kan spille rolle for utviklingen av kornceller på et tidligere tidspunkt enn BDNF (Contestabile 2002). Det er vist at NGF-reseptorer uttrykkes på purkinjeceller en bestemt periode under utviklingen av lillehjernen, omtrent halvveis inn i svangerskapet. Dette uttrykket reduseres senere i svangerskapet, og lillehjernen hos voksne har nesten totalt fravær av NGF-reseptorer (Schatteman, Gibbs et al. 1988).



**Figur 1.3: Oppbygning av lillehjernebarken**

Lillehjernebarken er bygd opp av tre karakteristiske lag; molekylærlaget, purkinjecellelaget og korncellelaget. Figuren er en modifisert utgave, opprinnelig hentet fra (Apps and Garwicz 2005).

## 1.5 Målet med oppgaven

Hensikten med oppgaven har vært å teste om legemidler potensielt brukt under graviditet kan virke inn på nevronal utvikling. Antiepileptika er legemidler det er aktuelt å bruke under svangerskapet, da et epileptisk anfall kan få alvorlige konsekvenser for både mor og ufødt barn. I oppgaven undersøkes effekter av lamotrigin og valproat på nevronkulturer.

Delmålene har vært:

1. Undersøke effekter på nevruttvekst i PC12-celler, og ved hjelp av positive kontroller som NGF og BDNF, undersøke hvilken metode og hvilke endepunkter som er mest robuste.
2. Undersøke legemiddeleffekter på nevruttvekst i udifferensierte og NGF-differensierende PC12-celler.
3. Undersøke legemiddeleffekter på korncellekulturer fra lillehjerne hos kylling og rotte.
4. Undersøke om endringene sett i morfometrisk undersøkelse fra PC12-celler kan reproduseres ved bruk av andre metoder, for eksempel immunfarging og westernblotting.

# 2 Materialer og metoder

## 2.1 Oversikt over kjemikalier, biologiske produkter og utstyr

Tabell 2.1 Kjemikalier og biologiske produkter

Produkt	Leverandør
Acrylamide/BIS solution, 30 %	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
APS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Basal Medium Eagle (BME)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
BCA™ Protein Assay Kit Pierce®	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
BDNF (B3795)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BDNF IgG-antistoff (AB1513P)	Millipore, California, USA
Bovint serumalbumin (BSA) (A9418)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromfenolblå	Merck KGaA Darmstad, Tyskland
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase1, bovint (D5025)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Eselserum	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Etanol (absolutt alkohol)	Kemetyl Norge AS, Vestby, Norge
Fenolrødt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Føtalt kalveserum (FBS)	Lonza, Walkersville, USA
GAP-43-antistoff	Millipore, Temecula California, USA
Glukose	Merck KGaA Darmstad, Tyskland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glyserol (100%)	VWR International Ltd., England
HCl (hydrogenklorid)	VWR International Ltd., England
Hesteserum (HS)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Hoechst	Thermo Fisher Scientific, USA
Insulin, bovint (I1882)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA



---

Isopropanol	Kemetyl Norge AS, Vestby, Norge
KCl (kaliumklorid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (kaliumdihydrogenfosfat)	Merck KGaA Darmstad, Tyskland
Lamotrigin (2289)	Tocris Bioscience, R&D Systems, Minneapolis, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Luminata™ Forte Western HRP Substrate	Millipore, USA
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MgSO <sub>4</sub> (magnesiumsulfat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl (natriumklorid)	Merck KGaA Darmstad, Tyskland
NaHCO <sub>3</sub> (natriumbikarbonat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (dinatriumfosfat)	Merck KGaA, Darmstad, Tyskland
NaOH (natriumhydroksid)	Merck KGaA, Darmstad, Tyskland
Natriumpyruvat	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (natriumortovanadat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NGF (N6009)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Chemi-teknik AS, Oslo, Norge
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Pepstatin-A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly-L-lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceaus fargeløsning	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fischer Scientific, USA
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fischer Scientific, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris/Glycin, 10X	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Tris/Glycin/SDS, 10X	Bio-Rad Laboratories Inc., USA

---

Triton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin, bovint (T9201)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsinhemmer, soyabønne (T9003)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tørrmelk	Normilk, Levanger, Norge
Valproat (2815)	Tocris Bioscience, R&D Systems, Minneapolis, USA
z-DEVD-cmk (N-1580)	Bachem AG, Bubendorf, Sveits

Forkortelser er brukt i henhold til tidligere oversikt.

**Tabell 2.2 Utstyr**

<b>Utstyr</b>	<b>Leverandør</b>
Brett, 96 brønner	Nunc™, Danmark
Cellekulturflaske 75 cm <sup>2</sup>	Nunc™, Danmark
Cellekulturskåler	Nunc™, Danmark
Celleskrape	Corning Incorporated Corning, USA
CO <sub>2</sub> -inkubatorskap	Thermo Scientific, USA
Elektroforeseapparat	PowerPac 300, Bio Rad, USA
Finnpipette	Thermo Scientific, USA
Fluorescensmikroskop	Eclipse TE300, Nikon Melville, USA
Fremkallingsmaskin	Chemi Genius <sup>2</sup> Bio Imaging System, Syngene Frederick, USA
Gassbrenner	Fireboy eco, Integra Biosciences Zizers, Sveits
Inkubatorskap	Termaks Bergen, Norge
Kamera til fluorescensmikroskop	Digital Sight DS-Qi1Mc, Nikon Melville, USA
Konfokalmikroskop	Eclipse TE2000-E med C1 konfokalenhet, Nikon Melville, USA
LAF-benk	Holten LaminAir, modell 1.2, Eco Holten AS, Danmark
Lysmikroskop	TMS 2.2.1, Nikon Melville, Sveits
MatTek-skåler med glassbunn	MatTek Corporation, Ashland, USA
Minishaker	MS2 Ika® Works Inc., USA

Pipetboy	IBS Integra Biosciences, Sveits
Pipetter (sterile)	Corning Incorporated Corning, USA
Plateleser	HTS 7000 Plus Bio Assay Reader, Perkin-Elmer Massachusetts, USA
Støpeformer til westernblotting	Mini-PROTEAN®, Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Vannbad	Grant-Boekel, Grant Instruments Ltd., England
Vekt	Mettler Toledo, Sveits

## 2.2 PC12-celler

PC12-celler er en klonet nevronal cellelinje med opphav i feokromocytom i binyrene hos rotte (Greene and Tischler 1976). PC12 cellelinjer har vist seg å være nyttige modeller for å forstå biologiske prosesser involvert i nevronal utvikling, og for å studere effekter av kjemikalier på nevruttvekst (Radio and Mundy 2008). Behandling av PC12 celler med nervevekstfaktoren NGF fører til at cellene slutter å dele seg og begynner å differensiere. Cellene endrer fenotype og får mange av egenskapene til sympatiske nevroner, slik som uttrykk av kolinerge reseptorer og neurotransmittere (Fujita, Lazarovici et al. 1989). PC12-celler uttrykker NGF-reseptorene p75NTR og TrkA (Wehrman, He et al. 2007).

### 2.2.1 Splitting av PC12-celler til flaske

1. Undersøk cellekulturflasken i et lysmikroskop for å se at cellene er konfluente.
2. Gammelt PC12-medium helles ut av flasken.
3. 10 ml nytt PC12-medium (tabell 2.3) tilsettes flasken
4. Flasken bankes i sidene slik at cellene løsner fra bunnen.
5. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned et tilstrekkelig antall ganger for å sikre at celleaggregater brytes opp. Undersøk at du har fått en jevn suspensjon i et lysmikroskop.
6. 1,5 ml cellesuspensjon og 20 ml nytt PC12-medium (tabell 2.3) overføres til en ny cellekulturflaske (75 cm<sup>2</sup>) og inkuberes ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Cellene splittes hver tredje eller fjerde dag.

## 2.2.2 Splitting av PC12-celler til skåler

1. Cellene splittes som beskrevet i trinnene 1-5 over.
2. En liten del av cellesuspensjonen overføres til et Bürcher tellekammer. Antall celler telles i et lysmikroskop for å bestemme celletettheten.
3. Gjennomfør telling av to rutenett (4x4 ruter) på hver side av midten, og bruk gjennomsnittet av de to tellingene.
4. Ønsket celletetthet i skålene er  $3,5 \times 10^4$  celler/ml. Følgende formel brukes for å beregne mengde cellesuspensjon som trengs:

$$\begin{aligned} & \text{Mengde cellesuspensjon (ml)} \\ & = \frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{ønsket celletetthet per ml}}{\text{celletetthet i cellesuspensjonen}} \end{aligned}$$

5. Følgende formel brukes for å beregne mengde medium som trengs:

$$\begin{aligned} & \text{Mengde medium (ml)} \\ & = (\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler}) - \text{mengde cellesuspensjon (ml)} \end{aligned}$$

6. Beregnet mengde cellesuspensjon og PC12-medium (tabell 2.3) blandes i en erlenmeyerkolbe og overføres til sterile skåler. Mengde cellesuspensjon per skål er angitt i tabell 2.5. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabell 2.3 PC12-medium med serum**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500 ml	
Føtalt kalveserum (FBS)	50 ml	10 %
Hesteserum (HS)	25 ml	5 %
Natriumpyruvat (P)	5 ml	1 %
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml	100 U/ml-0,1 mg/ml

- Komponentene tilsettes i LAF-benk
- Oppbevares ved 2-8 °C

**Tabell 2.4 Oversikt over serum brukt til PC12-celler**

Serum	Lot.nr.	Katalognr.	Leverandør
Hesteserum	1079274	16050	Gibco, USA
Føtalt kalveserum	0SB017	DE14-801F	Lonza, USA

**Tabell 2.5 Mengde cellesuspensjon per skål**

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

### 2.2.3 Eksponering av PC12-celler

PC12-cellene ble eksponert 24 timer etter splitting og utplating. Medium skåler (21,5 cm<sup>2</sup>) ble brukt til morfometrisk analyse og store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) ble brukt til å høste prøver til westernblotting. MatTek-skåler (8,8 cm<sup>2</sup>) med glassbunn ble brukt til immunfarging. Skålene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 72 timer etter eksponering. Alle eksperimenter ble utført blindet.

**Tabell 2.6 Oppsett for eksponering av PC12-celler til morfometrisk analyse og telling av celledød**

#### Eksponering

- Ubehandlet
- NGF 50 ng/ml
- Lamotrigin 1 µM
- Lamotrigin 10 µM
- Lamotrigin 500 µM
- Lamotrigin 1000 µM
- Lamotrigin 1 µM + NGF 50 ng/ml
- Lamotrigin 10 µM + NGF 50 ng/ml
- Lamotrigin 500 µM + NGF 50 ng/ml
- Lamotrigin 1000 µM + NGF 50 ng/ml

- Valproat 1  $\mu\text{M}$
  - Valproat 500  $\mu\text{M}$
  - Valproat 1000  $\mu\text{M}$
  - Valproat 1500  $\mu\text{M}$
  - Valproat 2000  $\mu\text{M}$
  - Valproat 1  $\mu\text{M}$  + NGF 50 ng/ml
  - Valproat 500  $\mu\text{M}$  + NGF 50 ng/ml
  - Valproat 1000  $\mu\text{M}$  + NGF 50 ng/ml
  - Valproat 1500  $\mu\text{M}$  + NGF 50 ng/ml
  - Valproat 2000  $\mu\text{M}$  + NGF 50 ng/ml
- 

**Tabell 2.7 Oppsett for eksponering av PC12-celler til morfometrisk analyse, telling av celledød og westernblotting**

---

**Eksponering**

- Ubehandlet
  - DMSO
  - z-DEVD-cmk 1  $\mu\text{M}$
  - BDNF-antistoff 3,33  $\mu\text{g/ml}$
  - NGF 50 ng/ml
  - NGF 50 ng/ml + z-DEVD-cmk 1  $\mu\text{M}$
  - NGF 50 ng/ml + BDNF-antistoff 3,33  $\mu\text{g/ml}$
  - BDNF 100 ng/ml
  - BDNF 100 ng/ml + z-DEVD-cmk 1  $\mu\text{M}$
  - BDNF 100 ng/ml + BDNF-antistoff 3,33  $\mu\text{g/ml}$
  - Lamotrigin 1  $\mu\text{M}$
  - Lamotrigin 1  $\mu\text{M}$  + BDNF-antistoff 3,33  $\mu\text{g/ml}$
  - Lamotrigin 1  $\mu\text{M}$  + z-DEVD-cmk 1  $\mu\text{M}$
  - Valproat 1  $\mu\text{M}$
  - Valproat 1  $\mu\text{M}$  + BDNF-antistoff 3,33  $\mu\text{g/ml}$
  - Valproat 1  $\mu\text{M}$  + z-DEVD-cmk 1  $\mu\text{M}$
  - Valproat 500  $\mu\text{M}$
-

- Valproat 500  $\mu\text{M}$  + BDNF-antistoff 3,33  $\mu\text{g/ml}$
  - Valproat 500  $\mu\text{M}$  + z-DEVD-cmk 1  $\mu\text{M}$
- 

**Tabell 2.8 Oppsett for eksponering av PC12-celler til immunfarging**

---

**Eksponering**

- Ubehandlet
  - NGF 50 ng/ml
  - Lamotrigin 1  $\mu\text{M}$
  - Valproat 1  $\mu\text{M}$
  - Valproat 500  $\mu\text{M}$
- 

## 2.3 Kornceller

Kornceller er den vanligste typen nevron i hjernen, og utgjør en svært homogen nevronpopulasjon (Bilimoria and Bonni 2008). I nervesystemet under utvikling modnes kornceller postnatalt, og de kan isoleres og dyrkes i kultur. Kornceller fra lillehjernen brukes ofte for å studere nevronal utvikling, funksjon og patologi *in vitro* (Kramer and Minichiello 2010).

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

Dagen før preparering av korncellekulturer coats skålene med polymeren poly-L-lysin. Dette gjøres for å øke cellenes adhesjon til underlaget og bedre vekst.

1. 5 mg poly-L-lysin løses i 10 ml autoklavert MQ-vann.
2. Løsningen overføres til en steril glasskolbe og fortynnes til 0,01 mg/ml i 500 ml autoklavert MQ-vann.
3. Poly-L-lysin-løsningen tilsettes skålene som følgende: 1 ml i små skåler (8,8  $\text{cm}^2$ ), 2 ml i medium skåler (21,5  $\text{cm}^2$ ) og 5 ml i store skåler (66,5  $\text{cm}^2$ ). Skålene beveges rundt slik at hele overflaten dekkes.

4. Poly-L-lysin-løsningen pipetteres av etter 45-60 minutter. Skålene tørkes over natt i LAF-benk med luftstrøm på maksimal styrke.

### 2.3.2 Preparering av korncellekulturer

Befruktede kyllingegg kjøpes fra Samvirkekylling i Våler. Det brukes egg fra kylling av arten *Gallus gallus*. Eggene oppbevares kjølig i inntil 7 døgn før de legges i en rugemaskin med en konstant temperatur på 37-39 °C. For å opprettholde en tilfredsstillende luftfuktighet, tilsettes vann til et eget kammer i rugemaskinen. Fra dag 4 til dag 18 vendes eggene maskinelt morgen og kveld. På dag 7 gjennomlyses eggene, og ubefruktede egg fjernes. På dag 17-18, tre til fire dager før normal klekkesetid, tas eggene ut av rugemaskinen. Eggene gjennomlyses, og døde kyllingfostre fjernes.

Rottene leveres fra Charles River og oppbevares ved Norsk Folkehelseinstitutt. Det brukes hannrotter av typen Wistar eller Harlan. Rottene avlives ved dekapitering når de er 7 dager gamle, og hodene fraktes til Blindern der prepareringen finner sted.

Preparering av korncellekulturer foregår i LAF-benk med sterilt utstyr (tabell 2.9).

#### Tabell 2.9 Sterilt utstyr til preparering av korncellekulturer

---

Skalpell

Saks og buet pinsett til disseksjon av hjernen

Rette pinsetter til å fjerne hjernehinne

Glassflasker til løsningene 1-5

Trypsineringsflasker

50 ml glassrør

Pipetter

Pasteurpipetter (glass)

Målesylinder

Erlenmeyerkolbe

Petriskåler

---



## Prosedyre for preparering av korncellekulturer fra kylling og rotte

Trinn 1-3 gjelder bare for preparering av korncellekulturer fra kylling.

1. 8 egg av gangen legges i isvann i 7 minutter for å bedøve kyllingfostrene.
2. Eggene vaskes i 70 % etanol.
3. Eggene knekkes i sterile petriskåler og kyllingfostrene dekapiteres med en steril skalpell.
4. Hodene fraktes til LAF-benken og lillehjernene tas ut ved hjelp av saks og pinsett. Lillehjernene legges i en stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.10).
5. Lillehjernene renses for hjernehinne ved hjelp av pinsetter og legges i en ny stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.10).
6. Løsning 1 suges av og lillehjernene samles i en haug på midten. Hjernene kuttes i mindre biter i to retninger vinkelrett på hverandre. 10 ml løsning 1 (tabell 2.10) tilsettes skålen.
7. Løsning 1 og hjernebitene pipetteres over til et sterilt 50 ml rør og tilsettes 10 ml løsning 1 (tabell 2.10). Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt.
8. Supernatanten fjernes og pelleten tilsettes 8 ml løsning 2 (tabell 2.10). Det pipetteres forsiktig opp og ned et tilstrekkelig antall ganger for å løse opp pelleten.
9. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske og settes på vannbad ved 37 °C i 15 minutter. Korkene skrues halvveis på og flasken rystes forsiktig med jevne mellomrom.
10. Bitene fra trypsineringsflasken suges opp og overføres til et sterilt 50 ml rør med 15 ml løsning 4 (tabell 2.10). Røret fylles opp med løsning 4 og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter. Hvis supernatanten etter sentrifugeringen ikke er klar, tilsettes røret en liten mengde løsning 3 (tabell 2.10) og sentrifugeringen gjentas.
11. Supernatanten fjernes og røret tilsettes 3 ml løsning 3 (tabell 2.10).

12. Cellene homogeniseres ved å pipettere pelleten forsiktig opp og ned med en steril pipette. Ved behov kan det brukes en pasteurpipette som er brent av på tuppen for å få en smal og rund åpning. Løsningen pipetteres opp og ned et tilstrekkelig antall ganger til løsningen blir blakket.

13. La røret stå slik at de tyngste klumpene synker til bunnen. Den øverste klumpfrie delen av løsningen overføres til et sterilt 50 ml rør, tilsatt 15 ml løsning 5 (tabell 2.10).

14. 2 ml løsning 3 tilsettes røret med celleklumper. Punkt 12-13 gjentas helt til alle celleklumpene har løst seg og løsningen blir blakket. Løsningen overføres til røret med løsning 5 og sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.

15. Supernatanten fjernes og 10 ml platemedium med serum (tabell 2.12 og tabell 2.13) tilsettes røret.

16. Pelleten løses i mediet og celledensiteten overføres til en steril glassflaske som er tilsatt halvparten av beregnet mengde platemedium med serum (tabell 2.12 og tabell 2.13) ut fra antall preparerte hjerner. Det regnes 15-20 ml platemedium med serum for hver kyllinghjerne, og 10 ml for hver rottehjerne. Løsningen blandes godt.

17. En liten del av celledensiteten overføres til et Bürcher tellekammer. Vanlig celledensitet i skålen er  $1,7 \times 10^6$  celler/ml for kylling og  $1,2 \times 10^6$  celler/ml for rotte. For morfometriske studier bør halv celledensitet benyttes;  $8,5 \times 10^5$  celler/ml for kylling og  $6,0 \times 10^5$  celler/ml for rotte. Følgende formel brukes for å bestemme mengde platemedium med serum (tabell 2.12 og tabell 2.13) som trengs:

$\begin{aligned} \text{Mengde medium (ml)} \\ = \frac{\text{antall ml celledensisjon} \times \text{celletetthet per ml celledensisjon}}{\text{ønsket celledensitet per ml}} \end{aligned}$
--

18. Celledensiteten overføres til sterile skåler, coatet med poly-L-lysin dagen før. Mengde celledensisjon per skål er angitt i tabell 2.5.

19. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabell 2.10 Løsninger til preparering av korncellekulturer**

<b>Løsning</b>	<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>
Løsning 1	Bovint serumalbumin (BSA)	1,50 g
	Krebs-Ringer-løsning, 10X (tabell 2.11)	50 ml
	MgSO <sub>4</sub> (38,2 mg/ml destillert vann)	4,0 ml
	Destillert vann	ad 500 ml
Løsning 2	Trypsin	25 mg
	Løsning 1	100 ml
Løsning 3	Trypsinhemmer	26,0 mg
	DNase1	6,25 mg
	MgSO <sub>4</sub> (38,2 mg/ml destillert vann)	0,5 ml
	Løsning 1	ad 50 ml
Løsning 4	Løsning 1	100 ml
	Løsning 3	16 ml
Løsning 5	Løsning 1	40 ml
	MgSO <sub>4</sub> (38,2 mg/ml destillert vann)	320 µl
	CaCl <sub>2</sub> (12,0 mg/ml destillert vann)	320 µl

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

**Tabell 2.11 10X Krebs-Ringer-løsning**

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

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

**Tabell 2.12 Platemedium med serum til korncellekulturer fra kylling**

<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>	<b>Konsentrasjon</b>
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
Varmeaktivert hesteserum (HS)	50 ml	10 %
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml	100 U/ml-0,1 mg/ml
Insulin (1 mM)	50 µl	100 nM
KCl	825 mg	22 mM
L-Glutamin	146 mg	2 mM
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sterilfiltreres (0,2 µm)</li> <li>• Oppbevares ved 2-8 °C</li> </ul>		

**Tabell 2.13 Platemedium med serum til korncellekulturer fra rotte**

<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>	<b>Konsentrasjon</b>
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
Varmeinaktivert føtalt kalveserum (FBS)	50 ml	10 %
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml	100 U/ml-0,1 mg/ml
KCl	825 mg	22 mM
L-Glutamin	146 mg	2 mM
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sterilfiltreres (0,2 µm)</li> <li>• Oppbevares ved 2-8 °C</li> </ul>		

**Tabell 2.14 Oversikt over serum brukt til korncellekulturer fra kylling og rotte**

<b>Serum</b>	<b>Lot.nr</b>	<b>Katalognr.</b>	<b>Leverandør</b>
Hesteserum	8189719	16050	Gibco, USA
Føtalt kalveserum	9SB029	DE14-801F	Lonza, USA

### 2.3.3 Eksponering av kornceller

Korncellene fra kylling og rotte ble eksponert 2-3 timer etter preparering for å sikre at alle cellene har festet seg til underlaget. Korncellekulturene fra kylling ble platet ut i medium og store skåler med både vanlig ( $1,7 \times 10^6$  celler/ml) og halv ( $8,5 \times 10^5$  celler/ml) tetthet. Korncellekulturene fra rotte ble platet ut i små skåler med halv tetthet ( $6 \times 10^5$  celler/ml). Skålene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 24-48 timer etter eksponering. Alle eksperimenter ble utført blindet.

**Tabell 2.15 Oppsett for eksponering av kornceller til morfologisk analyse og westernblotting**

---

#### **Eksponering**

- Ubehandlet
  - Lamotrigin 1 µM
  - Valproat 1 µM
  - Valproat 500 µM
- 

## 2.4 Morfometrisk analyse i mikroskop

PC12-cellene og korncellene ble platet ut i medium skåler ( $21,5 \text{ m}^2$ ) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer før eksponering. PC12-cellene ble studert etter 72 timer i et Nikon Eclipse TE 300 fluorescensmikroskop og bilder ble tatt med kameraet Nikon Digital Sight DS-Qi1Mc, som er koblet til mikroskopet. Det ble tatt bilder av cellene under fasekontrast med 40x forstørrelse. Bildene ble analysert ved hjelp av programmet NIS-Elements BR fra Nikon. Prinsippet bak fasekontrastmikroskopi er at lysets strålegang endres når det treffer cellene. Dette fører til at lysbølgene forsinkes og det oppstår faseforskjeller som kan sees som endringer i intensitet i ufargede preparater.

Morfometrisk analyse av bildene ble utført på fem endepunkter ved bruk av visuell telling og manuell måling (figur 2.1). Fire ulike synsfelt i hver skål ble analysert, og det ble valgt områder med spredt fordeling av celler for lettere å kunne kvantifisere celler og måle nevritter.

1. Andel celler med nevritter

Totalt antall celler med nevritter telles. En nevrutt må være lengre enn den er bred, og den må være tydelig identifiserbar. Andel celler med nevrutter, av totalt antall celler, bergenes.

2. Antall nevrutter per celle

Totalt antall nevrutter telles. Deretter beregnes gjennomsnittlig antall nevrutter per celle, av totalt antall celler.

3. Andel lange nevrutter

Totalt antall lange nevrutter telles. En nevrutt karakteriseres som lang dersom den er lengre enn diameteren på cellekroppen den har opphav i. Diameter måles ved å finne gjennomsnittet av to målinger vinkelrett på hverandre. Hele cellekroppen og hele nevrutten må være synlig for å kunne måles. Nevruitter som skjules av andre celler utelukkes. Deretter beregnes andel lange nevrutter, av totalt antall nevrutter.

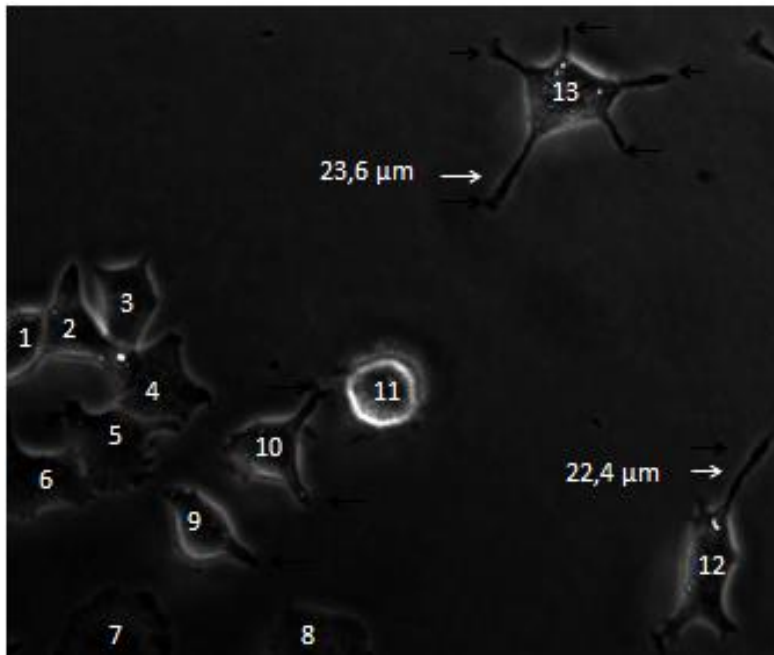
4. Nevruittlengde per celle

Nevruittlengder av nevrutter karakterisert som lange måles manuelt og gjennomsnittet regnes ut. Deretter beregnes gjennomsnittlig nevruttlengde per celle, av totalt antall celler.

5. Nevruittlengde (normalisert til ubehandlet)

Nevruittlengder av nevrutter karakterisert som lange måles manuelt og gjennomsnittet regnes ut. Gjennomsnittlig nevruttlengde divideres på gjennomsnittlig nevruttlengde for ubehandlet kontroll i det samme forsøket. Dette ble gjort for å normalisere data og korrigere for eventuelle forskjeller som opptrer fra dag til dag.

A)



B)

Celletall	Andel celler med nevritter	Antall nevritter per celle	Andel lange nevritter	Nevrittlengde per celle	Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet)
13	4/13	9/13	2/9	$(23,6+22,4/2=23)$ 23 $\mu\text{m}/13$	23 $\mu\text{m}/x \mu\text{m}$

**Figur 2.1 Morfometrisk analyse av PC12-celler**

A) PC12-cellene ble studert i et fluorescensmikroskop 72 timer etter eksponering, og det ble tatt bilder av cellene under fasekontrast med 40x forstørrelse. Cellene er nummerert 1-13. Cellene 9,10,12 og 13 har nevritter, illustrert med sorte piler. Cellene 12 og 13 har lange nevritter, illustrert med hvite piler og lengde i  $\mu\text{m}$ . B) Skjema som illustrerer hvordan morfometrisk analyse av PC12-celler ble utført.

## 2.5 Deteksjon av celledød

For deteksjon av celledød farges det med trypanblå. Metoden baseres på at trypanblå trenger gjennom cellemembranen og farger døde celler, men ikke levende celler med intakt cellemembran. Grad av celledød kan beregnes ved celledøding i et lysmikroskop. Celledød ble detektert 72 timer etter eksponering på forsøksoppsettet i tabell 2.6 og tabell 2.7.

### 2.5.1 Prosedyre for farging med trypanblå

1. 2 % trypanblå stockløsning (tabell 2.16) og 1,8 % NaCl stockløsning (tabell 2.16) lages og blandes i forholdet 1:1. Det lages et tilstrekkelig volum til antall skåler som skal telles.
2. Mengden medium i medium skåler justeres til 1 ml.

3. Hver skål tilsettes 250  $\mu$ l nylaget trypanblå fargeløsning. Skålene beveges forsiktig rundt slik at fargeløsningen fordeles jevnt i mediet.
4. Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 30 minutter.
5. Fargeløsningen pipetteres av og skålene telles i et mikroskop. Antall blå celler (døde) og antall levende celler (hvite) telles hver for seg i fire ulike synsfelt. Deretter beregnes andel døde celler av totalt antall celler.

**Tabell 2.16 Løsninger til farging med trypanblå**

Løsning	Komponent	Mengde
2 % trypanblå	Trypanblå	1 g
stockløsning	MQ-vann	50 ml
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komponentene blandes og varmes opp til kokepunktet under avtrekk. Avkjøles i romtemperatur og filtreres.</li> <li>• Oppbevares i romtemperatur</li> </ul>	
1,8 % NaCl	NaCl	1,8 g
stockløsning	MQ-vann	100 ml
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oppbevares i romtemperatur</li> </ul>	

## 2.6 Immunfarging

Ved immunfarging benyttes det antistoff merket med en reagens som gir en farget fluorescens når det utsettes for ultrafiolett lys. PC12-cellene splittes (avsnitt 2.2.1 og 2.2.2) og plates ut i MatTek-skåler (8,8 cm<sup>2</sup>) med glassbunn. Kornceller fra rotte prepareres (avsnitt 2.3.2) og plates ut i MatTek-skåler (8,8 cm<sup>2</sup>) med glassbunn.

### 2.6.1 Immunfarging av PC12-celler og kornceller fra rotte

1. Mediet pipetteres av skålene.
2. Skålene vaskes to ganger med 1 ml PBS (tabell 2.17).
3. 2 ml 4 % PFA i PBS (tabell 2.18) pipetteres over i skålene. La stå i romtemperatur i 4 minutter.



4. Løsningen pipetteres av, og skålene vaskes tre ganger med 1 ml PBS (tabell 2.17).
5. 2 ml 0,1 % triton i PBS (tabell 2.18) pipetteres over i skålene. La stå i romtemperatur i 4 minutter.
6. Løsningen pipetteres av, og skålene vaskes to ganger med 1 ml PBS (tabell 2.17).
7. 2 ml 5 % serum og 0,02 % Tween i PBS (tabell 2.18) pipetteres over i skålene. La stå i romtemperatur i 1 time.
8. Løsningen pipetteres av, og 2 ml 5 % serum og 0,02 % Tween i PBS (tabell 2.18) pipetteres over i skålene. Primærantistoff tilsettes skålene i ulikt forhold avhengig av type antistoff (tabell 2.20). Skålene oppbevares ved 2-8 °C i et kammer med vått papir og dekket med aluminiumsfolie til neste dag.
9. Løsningen pipetteres av, og skålene vaskes tre ganger i 15 minutter med 1 ml PBS (tabell 2.17) på ristebord.
10. 2 ml 5 % serum og 0,02 % Tween i PBS (tabell 2.18) pipetteres over i skålene. Fluorescerende sekundærantistoff tilsettes skålene (tabell 2.21). Dekk til skålene med aluminiumsfolie straks sekundærantistoffet er tilsatt. La stå på ristebord i romtemperatur i 1 time i et kammer dekket med aluminiumsfolie.
11. Løsningen pipetteres av, og skålene vaskes tre ganger i 15 minutter med 1 ml PBS (tabell 2.17) på ristebord og dekket med aluminiumsfolie. Eventuelt kan kjernene farges med Hoechst i 30 minutter i den første vaskeløsningen, og deretter vaske to ganger i 15 minutter med 1 ml PBS (tabell 2.17) på ristebord. Hoechst brukes i fortyningen 1:1000.
12. 2 ml PBS (tabell 2.17) pipetteres over i skålene, og de oppbevares ved 2-8 °C frem til mikroskopering.

**Tabell 2.17 Fosfatbufret saltvann (PBS)**

<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>	<b>Konsentrasjon</b>
NaCl	32,0 g	137 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	7,12 g	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,08 g	2,0 mM
KCl	0,8 g	2,7 mM
MQ-vann	ad 4000 ml	

- pH justeres til 7,4 med HCl/NaOH
- Autoklaveres
- Oppbevares ved 2-8 °C

**Tabell 2.18 Løsninger til immunfarging av PC12-celler**

<b>Løsning</b>	<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>	<b>Konsentrasjon</b>
4 % PFA i PBS	Paraformaldehyd	10 ml	4 %
	PBS (tabell 2.17)	30 ml	
0,1 % triton i PBS	Triton	40 µl	0,1 %
	PBS (tabell 2.17)	ad 40 ml	
5 % serum og 0,02 % Tween i PBS	Tween 20	24 µl	0,02 %
	Eselerum (tabell2.19)	6 ml	5 %
	PBS (tabell 2.17)	ad 60 ml	

- Løsningene oppbevares ved 2-8 °C

**Tabell 2.19 Serum brukt til immunfarging**

<b>Serum</b>	<b>Lot.nr.</b>	<b>Katalognr.</b>	<b>Leverandør</b>
Eselerum	109168	017-000-121	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA

**Tabell 2.20 Primærantistoff brukt til immunfarging**

Primærantistoff	Kilde	Fortynning	Lot.nr.	Katalognr.	Leverandør
$\beta$ -tubulin III	Rabbit	1:1000	T2200		Sigma-Aldrich, USA
Anti-GAP-43	Rabbit	1:1000	2048775	AB5220	Millipore, USA

**Tabell 2.21 Fluorescerende sekundærantistoff brukt til immunfarging**

Sekundærantistoff	Fortynning	Lot.nr.	Katalognr.	Leverandør
Cy3 mouse anti-rabbit	1:800	50583	211-165-109	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA

## 2.6.2 Analyse av immunfargede PC12-celler

For analyse av immunfargede PC12-celler ble det benyttet konfokal-mikroskop utstyrt med laser. Det ble tatt bilder av cellene med 40x forstørrelse ved hjelp av programmet EZ-C1. Det ble benyttet en metningsindikator for å sikre at ingen piksler mettes, og dermed forhindre at informasjon går tapt.

Prinsippet bak konfokal-mikroskopi er at bidrag fra lys utenfor fokus reduseres. Det er kun fokus som belyses med høy intensitet, mens lysintensiteten utenfor fokus reduseres. En slik blokkering vil øke kontrastene i bildet og dermed også bedre bildets kvalitet. Ved bruk av konfokal-mikroskopi har man mulighet til optisk snitting av celler, slik at man kan avbilde tynne plan i ulike dybder. Dette gjør at man kan visualisere celler tredimensjonalt. Ved fluorescensmikroskopi kan man benytte antistoff merket med fluorescerende fargestoff (fluorokromer). Disse absorberer UV-lys, og avgir energien ved å sende ut fluorescerende lys ved en lengre bølglengde. Dette lyset er synlig og man kan dermed få informasjon om sammensetningen i preparatet, eller identifisere bestemte cellebestanddeler.

## 2.7 Westernblotting

Hensikten med westernblotting er å separere proteiner og detektere dem ved hjelp av antistoffbinding. Proteinene separeres etter størrelse ved hjelp av SDS-polyakrylamidgel elektroforese (SDS-PAGE) (avsnitt 2.7.7), og blottes deretter over til membranen i et elektrisk

felt (avsnitt 2.7.8). Membranen blokkes med tørrmelk for å hindre uspesifikk binding av antistoff til overflaten (avsnitt 2.7.9). Et primærantistoff som gjenkjenner et bestemt protein påsettes membranen. Dette antistoffet er det ikke mulig å detektere, og det brukes et sekundærantistoff som gjenkjenner primærantistoffet (avsnitt 2.7.10). Sekundærantistoffet er bundet til et enzym som avgir lys når det oksideres, og dette kan fanges opp som et bånd på membranen ved hjelp av en fremkallingsmaskin (Chemi Genius<sup>2</sup> Bio Imaging System) (avsnitt 2.7.11). Båndet kan kvantifiseres ved at mengde lys er proporsjonal med mengde protein bundet til membranen.

### **2.7.1 Westernblotting av proteiner fra PC12-celler**

PC12-celler ble splittet ut i store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer før eksponering. Cellene ble høstet 72 timer etter eksponering. Westernblotting ble utført på forsøksoppsettet vist i tabell 2.4.

### **2.7.2 Westernblotting av proteiner fra korncellekulturer**

Korncellekulturer ble platet ut i store skåler (66,5 cm<sup>2</sup>) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Cellene ble eksponert 2-3 timer etter utplating og høstet 24 timer etter eksponering. Westernblotting ble utført på forsøksoppsettet vist i tabell 2.5.

### **2.7.3 Høsting av celler til westernblotting**

1. En tilstrekkelig mengde 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere lages (tabell 2.22).
2. Mediet helles av skålene og rester pipetteres av.
3. Skålene vaskes forsiktig to ganger med 3 ml kald PBS (tabell 2.17). Rester etter siste vasking pipetteres av.
4. 50-100 µl 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere (tabell 2.22) tilsettes skålen og fordeles rundt ved å holde skålen på skrå. Cellene skrapes løs med en celleskrape. Først skrapes det over hele skålen i en retning, og deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skraping.

5. Cellesuspensjonen overføres til eppendorfrør og settes på is.
6. Prøvene kokes ved 95 °C i 2 minutter og fryses ved -20 °C frem til bruk.

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

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Leupeptin (5 mg/ml)	1 µl	5 µg/ml
PMSF (100 mM)	3 µl	0,3 mM
Pepstatin A (1 mg/ml)	5 µl	5 µg/ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (10 mM)	10 µl	0,1 mM
20 % SDS	100 µl	2 %
PBS (tabell 2.17)	ad 1 ml	

## 2.7.4 Proteinmåling

Proteinkonsentrasjonen i hver celleprøve må bestemmes og justeres for før westernblotting kan utføres. Proteininnholdet bestemmes ved hjelp av BCA™ Protein Assay Kit. Utstyret består av reagens A, reagens B og bovint serumalbumin-standard (2 mg/ml).

### Prosedyre for måling av relativ proteinmengde

1. Working reagent (tabell 2.23) og fortynnet standardløsning (tabell 2.23) lages.
2. Fortynnet standardløsning tilsettes 14 brønner i et blankt 96-brønners brett til sluttmengder på 0, 0,83, 1,66, 3,33, 6,66, 9,99, 13,33 og 26,66 µg. Mengde fortynnet standard per brønn er vist i plateoppsettet (tabell 2.24).
3. Celleprøver hentes fra fryseren (-20 °C) og tines. Prøvene blandes godt på vortex mikser før bruk.
4. 5 µl (for celler platet ut med hel tetthet) eller 10 µl (for celler platet ut med halv tetthet) celleprøve tilsettes i tre vannrette rader etter standardløsningen på 96-brønners brettet.
5. 200 µl working reagent tilsettes til slutt alle brønnene som skal brukes.

6. 96-brønners brettet inkuberes ved 37 °C i 60 minutter.
7. Absorbansen måles ved 590 nm i en plateleser.
8. Relativ proteinmengde i hver celleprøve regnes ut.

**Tabell 2.23 Løsninger til proteinmåling**

Løsning	Komponenter	Mengde
Standardløsning	Bovint serumalbumin (BSA) 2mg/ml	50 µl
	PBS (tabell 2.17)	100 µl
Working reagent	Reagent A	50 deler
	Reagent B	1 del

**Tabell 2.24 Plateoppsett for proteinmåling**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blank	Blank	Prøve 1	Prøve 1	Prøve 1							
<b>B</b>	1,25 µl	1,25 µl	Prøve 2	Prøve 2	Prøve 2							
<b>C</b>	2,5 µl	2,5 µl	osv.									
<b>D</b>	5 µl	5 µl										
<b>E</b>	10 µl	10 µl										
<b>F</b>	15 µl	15 µl										
<b>G</b>	20 µl	20 µl										
<b>H</b>	40 µl	40 µl										

### 2.7.5 Proteinjustering av prøver

1. Det skal settes på 45 µl prøve med 50 µg protein på geler med 10 brønner og 15 µl prøve med 15 µg protein på geler med 15 brønner. Dette er bestemt ut fra erfaringer fra laben. Ved påsetting av for store mengder, kan deler av prøven flyte ut av brønnen. Prøvene proteinjusteres for å få lik mengde protein i hver prøve som påsettes gelen.

2. Sluttkonsentrasjonen i den ferdige prøven skal være 1X Laemmlibuffer (Laemmli 1970), og 4X Laemmlibuffer (tabell 2.25) må derfor tilsettes prøven i forholdet 1:3. Det resterende volumet fylles opp av MQ-vann.

3. Prøvene kokes på vannbad ved 95 °C i 5 minutter og avkjøles før de påsettes gelen.

**Tabell 2.25 4X Laemmlibuffer**

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

Noen korn bromfenolblått

- 2-mercaptoetanol og bromfenolblått tilsettes løsningen i avtrekk
- 2-mercaptoetanol tilsettes løsningen rett før bruk

### 2.7.6 Støping av gel

1. Gelene støpes med utstyr fra Mini-PROTEAN® fra Bio-Rad. Ytterglass og dekkglass vaskes med 70 % etanol for å fjerne rester av fett og protein, og tørkes med cellepapir.

Støpeformen settes sammen (tykk + tynn glassplate og grønt stativ + gummilist).

Glassplatene plasseres i støpeformen. Sjekk at oppsatsen er tett ved å helle MQ-vann i spalten mellom glassplatene.

2. Komponenter til separerende gel (tabell 2.26) av ønsket polyakrylamidkonsentrasjon blandes og helles i spalten mellom glassplatene. Polyakrylamidgelens konsentrasjon bestemmes av molekylvekten til proteinene som blir forsøkt detektert (tabell 2.28).

3. 1 ml isopropanol pipetteres på toppen av separerende gel for å sikre at gelen får en jevn overflate.

4. La stå i 40 minutter for at akrylamiden i gelen skal polymerisere.

5. Isopropanol helles av og rester suges av med et cellepapir.
6. Komponenter til stacking gel (tabell 2.26) blandes og helles over separerende gel.
7. En kam med tagger som er tilpasset antall prøver som skal påsettes; settes forsiktig ned i gelen.
8. La stå i 30 minutter for at gelen skal polymerisere.

**Tabell 2.26 Gelløsninger**

<b>Gelløsning</b>	<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>
Separerende gel	MQ-vann	4,6 ml
Polyakrylamidgel 8 %, 2 geler á 1,5 mm	Nedre gelbuffer (tabell 2.27)	2,5 ml
	Akrylamid (30 %)	2,7 ml
	APS (10 %)	100 µl
	TEMED	6 µl
Separerende gel	MQ-vann	3 ml
Polyakrylamidgel 10 %, 2 geler á 1,5 mm	Nedre gelbuffer (tabell 2.27)	1,8 ml
	Akrylamid (30 %)	2,4 ml
	APS (10 %)	36 µl
	TEMED	3,6 µl
Separerende gel	MQ-vann	3,3 ml
Polyakrylamidgel 12 %, 2 geler á 1,5 mm	Nedre gelbuffer (tabell 2.27)	2,6 ml
	Akrylamid (30 %)	4 ml
	APS (10 %)	100 µl
	TEMED	4 µl
Stacking gel	MQ-vann	2,4 ml
	Øvre gelbuffer (tabell 2.27)	1,0 ml
	Akrylamid (30 %)	0,6 ml
	APS (10 %)	20 µl
	TEMED	4 µl

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



**Tabell 2.27 Løsninger til bruk i gelstøping**

Løsning	Komponenter	Mengde
Øvre gelbuffer	Tris-base	18,17 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Justeres til pH 6,8 med HCl/NaOH</li></ul>	
Nedre gelbuffer	Tris-base	6,06 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Justeres til pH 8,8 med HCl/NaOH</li></ul>	

**Tabell 2.28 Valg av konsentrasjon på polyakrylamidgel**

Proteinets størrelse (kDa)	% polyakrylamidgel
4-40	20
12-45	15
10-70	12,5
15-100	10
25-200	8

Tabellen er hentet fra nettsiden [abcam.com](http://abcam.com)

### 2.7.7 Gelelektroforese

1. Glassplatene fjernes fra støpeformen og vaskes på utsiden med vann for å fjerne eventuelt søl. Kammen tas forsiktig ut av gelen.
2. Glassplatene plasseres i et kar for gelelektroforese, med den tynne glassplaten vendt inn mot midten. Karet består av et indre rom som fylles helt opp med elfobuffer (tabell 2.29) og et ytre rom som fylles nesten opp med elfobuffer. Eventuelle luftbobler fjernes ved hjelp av en bøyd kanyle.

3. En påføringsapplikator settes over gelen og 5 µl standard (Precision Plus Protein™ All Blue Standards) påsettes forsiktig første brønn.
4. De proteinjusterte prøvene påsettes forsiktig i hver brønn. Det brukes 45 µl prøve for geler med 10 brønner og 15 µl prøve for geler med 15 brønner.
5. Strøm kobles til karet. Prøvene kjøres først gjennom stacking gel på 90 V i 15 minutter, og deretter gjennom separerende gel på 150 V i ca. 60 minutter.

**Tabell 2.29 Elfobuffer**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjoner
10X TGS	100 ml	Tris 25 mM
Destillert vann	900 ml	Glycin 192 mM
• pH 8,3		SDS 0,1 % (v/v)

### 2.7.8 Blotting av gel

1. Én membran, to filterpapir og to skrubber fuktes i blottebuffer (tabell 2.30)
2. Gelen løsnes forsiktig fra den tykke glassplaten ved hjelp av en plastspatel. Stacking gel kuttes av og kastes.
3. Et fuktet filterpapir legges oppå gelen på den tynne glassplata. Sørg for at det ikke er noen luftbobler mellom gel og filterpapir.
4. Gelen pakkes i følgende rekkefølge:
  - Gelbeholderens sorte side
  - Skrubb
  - Filterpapir som legges mellom skrubb og gel
  - Membran
  - Filterpapir

- Skrubb
  - Gelbeholderens hvite side
5. Luftbobler mellom gel og membran fjernes ved hjelp av en stor plastspiss som rulles fra midten av membranen og i alle retninger.
  6. Gelbeholderen lukkes og settes i et blottekar med den sorte siden vendt mot den sorte siden av karet.
  7. Magnetrorer og iskassett plasseres i blottekaret, og karet fylles opp med blottebuffer (tabell 2.30) slik at gelene dekkes.
  8. Blotteoppsatsen settes på en magnetrorer ved 2-8 °C og blottes ved 50 mA over natt eller 400 mA i 1 ½ time.

**Tabell 2.30 Blottebuffer**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjoner	
10X TG	100 ml	Tris	25 mM
Metanol	200 ml	Glycin	192 mM
Destillert vann	700 ml	Metanol	20 %

- pH 8,3
- Bruk nitrilhansker ved håndtering av metanol

### 2.7.9 Ponceausfarging og blokkering av membran

Etter blotting må man sikre at proteinene er overført fra gelen til membranen på en tilfredsstillende måte.

1. Membranen farges med Ponceaus fargeløsning i 1 minutt, slik at proteinbåndene farges.
2. Fargeløsningen fjernes ved å vaske membranen tre ganger i destillert vann.

3. Overflødig væske får renne av og membranen legges i en plastlomme. Det tas bilde av proteinbåndene på membranen i fremkallingsmaskinen Chemi Genius<sup>2</sup> fra Bio Imaging System med programmet Genesnap fra SynGene.
4. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten.
5. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.31) tilsettes røret, og det legges til rulling i romtemperatur i 1 ½ time eller ved 2-8 °C over natt.

**Tabell 2.31 Blokkeløsning**

Komponenter	Mengde
Tørrmelk	2,5 g
1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.32)	50 ml

- Oppbevares ved 2-8 °C

**Tabell 2.32 Trisbufret saltvann med Tween**

Løsning	Komponenter	Mengde
10X TBS med 1 % Tween	Tris-base	24,2 g
	NaCl	80 g
	Tween 20	10 ml
	MQ-vann	ad 1000 ml

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

1X TBS med 0,1 % Tween	10X TBS med 1 % Tween	1 del
	Destillert vann	9 deler

- Oppbevares ved 2-8 °C

## 2.7.10 Tilsetting av primære og sekundære antistoff

1. Blokkeløsningen helles av og 3 ml ny blokkeløsning (tabell 2.31) tilsettes røret.
2. Primærantistoff tilsettes røret i riktig blandingsforhold avhengig av type antistoff (tabell 2.33). Røret legges til rulling ved 2-8 °C over natt.
3. Primærantistoffløsningen helles av og kan brukes om igjen til neste membran innen én uke. Membranen vaskes 3 ganger i 15 minutter med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.32). Røret legges til rulling i romtemperatur.
4. 3 ml blokkeløsning (tabell 2.31) tilsettes røret.
5. Sekundærantistoff tilsettes røret i riktig blandingsforhold avhengig av type antistoff (tabell 2.34). Røret legges til rulling i romtemperatur i 2 timer eller ved 2-8 °C over natt.
6. Sekundærantistoffløsningen helles av og membranen vaskes 3 ganger i 10 minutter med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.32). Røret legges til rulling i romtemperatur.

**Tabell 2.33 Primærantistoff brukt til westernblotting**

Primærantistoff	Kilde	Fortynning	Lot.nr.	Katalognr.	Leverandør
Lamin A/C	Mouse	1:2000	L22914	804-672	Alexis Biochemicals, USA
$\beta$ -tubulin III	Rabbit	1:5000	090M4775	T2200	Sigma-Aldrich, USA
PCNA	Mouse	1:200	59333	M0879	Dako, Danmark
$\beta$ -spectrin II	Mouse	1:1000	91528	612562	BD Transduction Laboratories, USA
GAP-43	Rabbit	1:500	2048775	AB5220	Millipore, USA

**Tabell 2.34 Sekundærantistoff brukt til westernblotting**

Sekundærantistoff	Fortynning	Lot.nr.	Katalognr.	Leverandør
Goat anti-mouse	1:5000	310007185	170-6515	BioRad, USA
Donkey anti-rabbit	1:10000	H0712	sc-2313	Santa Cruz Biotechnology, USA

### 2.7.11 Fremkalling

1. Til fremkalling brukes SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate til forsøk med  $\beta$ -tubulin og  $\beta$ -spectrin, og Luminata™ Forte Western HRP Substrate til forsøk med lamin og PCNA. SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate består av to reagenser som blandes i forholdet 1:1. Luminata™ Forte Western HRP Substrate er klar til bruk.
2. Membranen tas ut av plastrøret og overflødig væske får renne av.
3. Membranen legges med proteinsiden opp på en glassplate og 1 ml fremkallingsvæske pipetteres over. Undersøk at hele membranen er dekket av væsken og la stå i 5 minutter.
4. Overflødig fremkallingsvæske får renne av og membranen legges i en plastlomme. Luftbobler fjernes ved å gni forsiktig på plastlommen.
5. Membranen fremkalles i fremkallingsmaskinen Chemi Genius<sup>2</sup> fra Bio Imaging System med programmet Genesnap fra SynGene.
6. Etter fremkalling oppbevares membranene i 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.32) ved 2-8 °C frem til eventuell stripping og påføring av nytt antistoff.

### 2.7.12 Stripping av membranene

Dersom det skal testes for flere proteiner som detekteres på samme sted, må påsatte antistoff først fjernes ved hjelp av strippebuffer.

1. TBS med Tween helles av og membranene vaskes 3 ganger i 5 minutter med 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.32). Røret legges til rulling i romtemperatur.
2. TBS med Tween helles av og røret tilsettes 5 ml Restore™ Western Blot Stripping Buffer. Røret legges til rulling i romtemperatur i 15 minutter.
3. Strippebufferen helles av og membranene vaskes 3 ganger i 15 minutter med 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.32). Røret legges til rulling i romtemperatur.
4. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.31) tilsettes røret, og det legges til rulling i romtemperatur i 2 timer eller ved 2-8 °C over natt.

5. Videre prosedyre for tilsetning av nytt primærantistoff utføres som beskrevet under avsnitt 2.7.10.

### **2.7.13 Måling av westernbåndstyrke**

Etter at membranen er fremkalt, måles styrken til proteinbåndene i antall piksler med bildebehandlingsprogrammet ImageJ. Det tegnes en rektangulær boks rundt hvert bånd, og størrelsen på denne holdes konstant. Først måles gjennomsnittlig antall piksler i hvert bånd, og deretter måles gjennomsnittlig antall piksler i bakgrunnen. Antall piksler i båndet trekkes fra antall piksler i bakgrunnen. Det brukes en intern standard som hvert bånd skal relateres til. Man finner ratio mellom de ulike eksponeringene for en markør og den interne standarden. Intern standard brukes for å verifisere at det er satt på lik mengde protein i hver brønn, eller for å normalisere mengden detektert protein.

## **2.8 Statistikk**

Figurene er laget i Microsoft Excel 2010. Resultatene er fremstilt som gjennomsnittet av flere uavhengige forsøk med standardfeil (SE). Ved to uavhengige forsøk er resultatene fremstilt som gjennomsnittet med spredning (høyeste verdi med gjennomsnittet trukket fra). Antall gjeldende siffer er valgt for at tallene skal kunne brukes av andre ved ønske om dette.

Statistiske analyser er gjort ved hjelp av SigmaPlot 12.5. Det ble benyttet t-test ved sammenligning av to normalfordelte datasett, og ved sammeligning av to ikke-normalfordelte datasett ble Mann-Whitney Rank Sum Test benyttet. Ved sammenligning av flere normalfordelte datasett ble det benyttet One Way Analysis of Variance (ANOVA), og Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks for flere ikke-normalfordelte datasett. Dunnet's *post hoc* test ble benyttet for å analysere flere datasett mot en felles kontroll. En p-verdi på  $<0,05$  ble ansett som signifikant, og merket med \*.

## 3 Resultater

Effekter av NGF på nevruttvekst i PC12-celler ble undersøkt på fem ulike endepunkter, og de mest robuste endepunktene ble identifisert (avsnitt 3.1). Deretter ble effekter av BDNF (avsnitt 3.2), BDNF-antistoff (avsnitt 3.3), caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk (avsnitt 3.4), lamotrigin (avsnitt 3.5) og valproat (avsnitt 3.6) undersøkt på de to mest robuste endepunktene. Grad av celledød ble beregnet ved farging med trypanblå for de ulike eksponeringene (avsnitt 3.7)

Effekter av lamotrigin og valproat på nevruttvekst i kornceller fra kylling og rotte ble undersøkt morfologisk (avsnitt 3.8).

Immunfarging ble utført på PC12-celler eksponert for NGF, lamotrigin og valproat, og på ubehandlede kornceller fra rotte (avsnitt 3.9).

Westernblotting ble utført på prøver fra PC12-celler eksponert for NGF, lamotrigin og valproat og på kornceller fra kylling eksponert for lamotrigin og valproat (avsnitt 3.10).

### 3.1 Effekt av NGF på nevruttvekst i PC12-celler – valg av morfometriske endepunkt

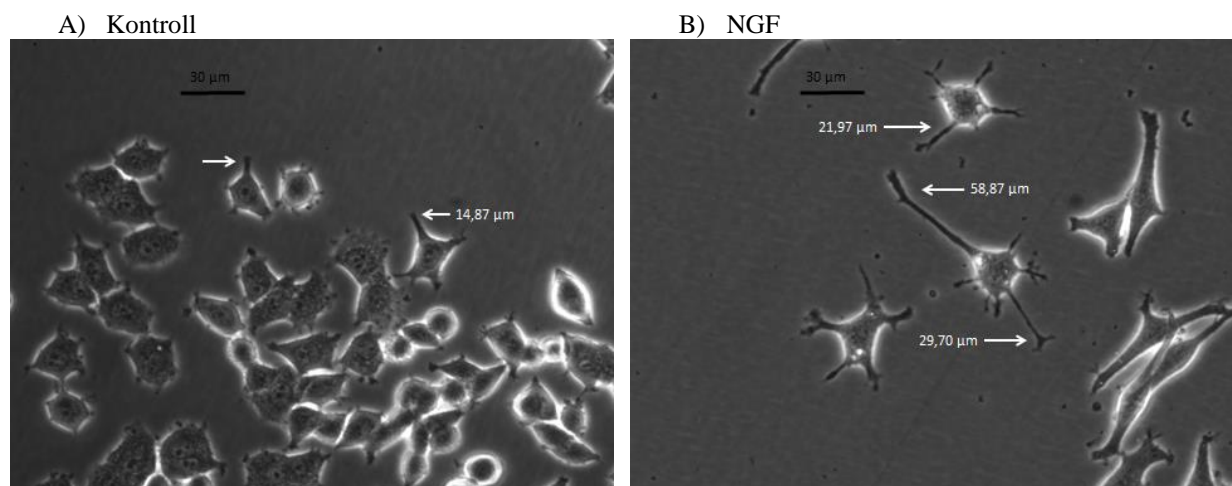
Eksponering av PC12-celler med nervevekstfaktoren NGF fører til at cellene begynner å differensiere og sender ut nevritter. NGF-eksponerte celler ble derfor brukt som positiv kontroll. Da man er avhengig av å ha en positiv kontroll som fungerer, var det ønskelig å undersøke hvilke endepunkter som er mest robuste for å studere effekter av NGF på nevruttvekst i PC12-celler. Et optimalt robust endepunkt vil vise økt respons for positiv kontroll i forhold til ubehandlet kontroll i alle tilfeller.

PC12-cellene ble eksponert for 50 ng/ml NGF, og ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Cellene ble studert i et fluorescensmikroskop 72 timer etter eksponering, og det ble tatt bilder av cellene under fasekontrast med 40x forstørrelse (figur 3.1). Morfometrisk analyse (avsnitt 2.4) av bildene ble utført på fem endepunkter ved bruk av visuell telling og manuell måling. Nevritter er kvantifisert når de er lengre enn de er brede, og tydelig identifiserbare. En nevrutt karakteriseres som lang dersom den er lengre enn diameteren på cellen den har opphav i.



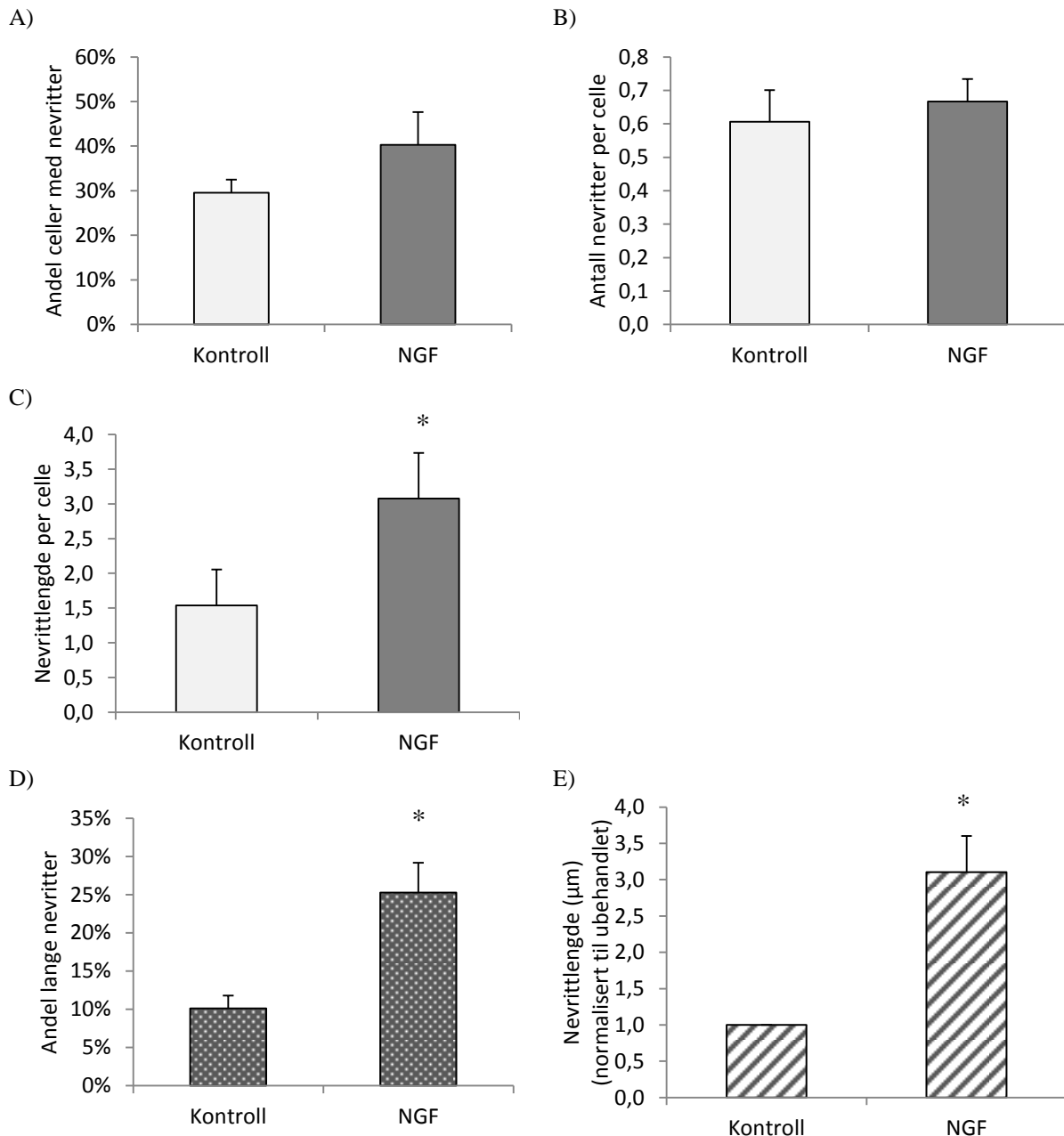
Cellene som var eksponert for NGF gav en tendens til økning i alle endepunktene i forhold til ubehandlet kontroll. For endepunktene nevrittelengde per celle, andel lange nevritter og nevrittelengde (normalisert til ubehandlet) (figur 3.2 C, D og E) var det en signifikant økning for NGF sammenlignet med ubehandlet kontroll. For endepunktene andel celler med nevritter og antall nevritter per celle (figur 3.2 A og B) var det en ikke-signifikant økning.

Endepunktet nevrittelengde (normalisert til ubehandlet) hadde NGF-respons i forhold til ubehandlet kontroll i alle tilfellene (tabell 3.1). Endepunktet andel lange nevritter hadde NGF-respons i forhold til ubehandlet kontroll i 16 av 19 tilfeller (tabell 3.1), og det var svært lite spredning i dataene. Disse to endepunktene hadde i tillegg størst prosentvis endring for NGF sammenlignet med ubehandlet kontroll. På bakgrunn av dette kan endepunktene andel lange nevritter og nevrittelengde (normalisert til ubehandlet) karakteriseres som robuste endepunkter for å studere effekter på nevrittutvekst i PC12-celler. De resterende resultatene baseres derfor på disse to endepunktene.



**Figur 3.1 PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF, og ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Cellene ble studert 72 timer etter eksponering, og det ble tatt bilder av cellene under fasekontrast på 40x forstørrelse. A) Ubehandlete PC12-celler ble brukt som kontroll. B) PC12-celler eksponert for 50 ng/ml NGF.



**Figur 3.2 Effekt av NGF på fem ulike endepunkter i PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF, og ubehandlede celler ble brukt som kontroll. A) Andel celler med nevritter av totalt antall celler, n=19. B) Antall nevritter per celle, n=19. C) Nevrittlengde per celle av totalt antall celler, n=19. \*p<0,005 sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme tidspunkt, Mann-Whitney Rank Sum Test. D) Andel lange nevritter av totalt antall nevritter, n=19. \*p<0,001 sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme tidspunkt, Mann-Whitney Rank Sum Test. E) Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet), n=18. \*p<0,001 sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme tidspunkt, Mann-Whitney Rank Sum Test. Prikkete (andel lange nevritter) og stripete (nevrittlengde) søyler blir brukt videre i oppgaven for å illustrere disse endepunktene. Deler av datamaterialet er felles med masterstudent Marte Rodum.

### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 A: Andel celler med nevritter

Eksponering	Gjennomsnitt (%)	SE	Antall forsøk
Kontroll	30	0,03	19
NGF 50 ng/ml	40	0,07	19

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 B: Antall nevritter per celle**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Kontroll	0,61	0,09	19
NGF 50 ng/ml	0,67	0,07	19

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 C: Nevrittlengde per celle**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Kontroll	1,54	0,52	19
NGF 50 ng/ml	3,08	0,66	19

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 D: Andel lange nevritter**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (%)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Kontroll	10	0,02	19
NGF 50 ng/ml	25	0,04	19

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2 E: Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet)**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk *</b>
Kontroll	1,0	0,00	18
NGF 50 ng/ml	3,10	0,50	18

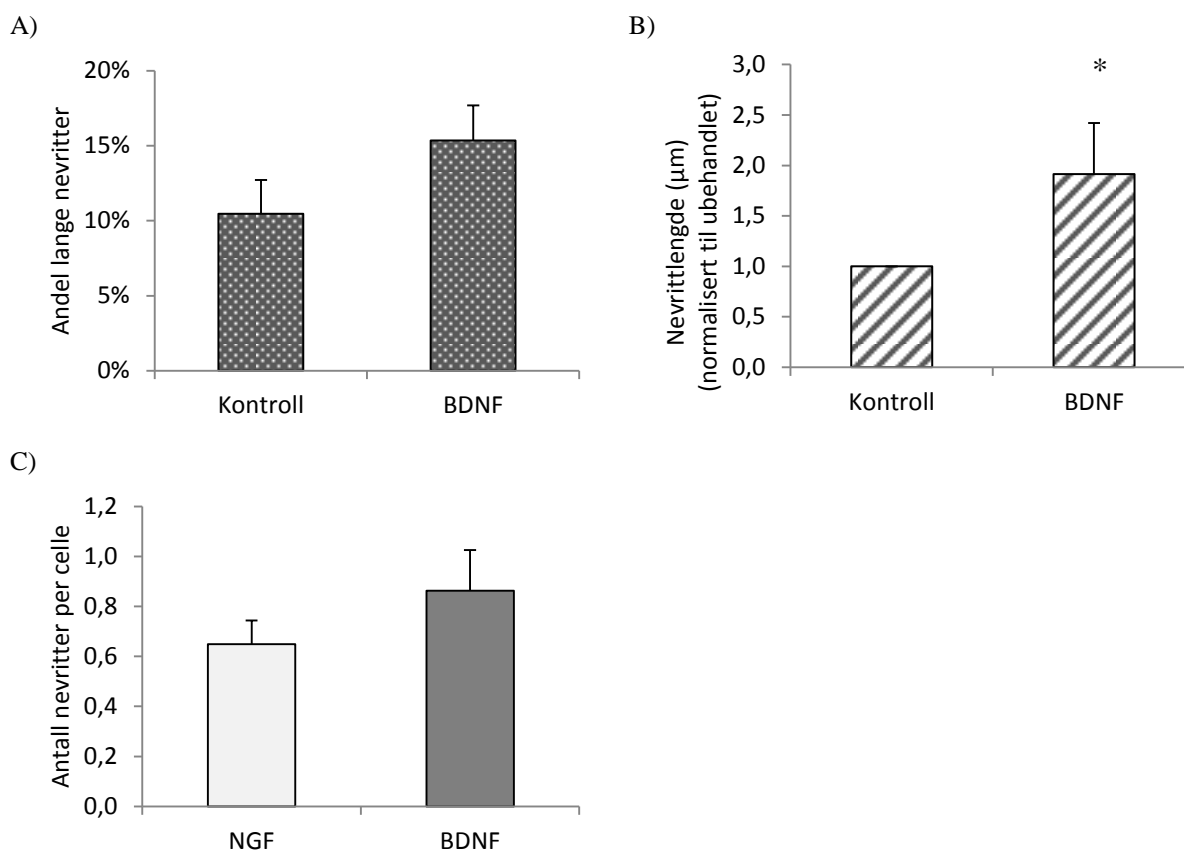
\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.

**Tabell 3.1 NGF > kontroll for de ulike endepunktene**

<b>Endepunkt</b>	<b>NGF &gt; kontroll</b>
Andel celler med nevritter	11/19 tilfeller
Antall nevritter per celle	9/19 tilfeller
Nevrittlengde per celle	17/19 tilfeller
Andel lange nevritter	16/19 tilfeller
Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet)	18/18 tilfeller

## 3.2 Effekt av BDNF på nevruttvekst i PC12-celler

Videre var det ønskelig å undersøke om en annen nevrotrofisk faktor, BDNF, kunne gi liknende effekt som NGF på nevruttvekst i PC12-celler. Endepunktet nevruttlengde hadde BDNF-respons i forhold til ubehandlet kontroll i alle tilfellene (tabell 3.2), og det var en signifikant økning i nevruttlengde (figur 3.3 B). Det var en ikke-signifikant økning i andel lange nevrutter for celler eksponert for BDNF (figur 3.3 A). Det kan se ut til at eksponering for BDNF fører til at det sendes ut flere og kortere nevrutter (Namekata, Watanabe et al. 2012), sammenlignet med nevruttvekst induisert av NGF. Det var derfor ønskelig å undersøke effekt av BDNF og NGF på endepunktet antall nevrutter per celle. BDNF hadde en ikke-signifikant økning i antall nevrutter per celle i forhold til NGF (figur 3.3 C). Det er tidligere vist at NGF ikke påvirker antall nevrutter per celle i forhold til ubehandlet kontroll (figur 3.2 B)



**Figur 3.3 Effekt av BDNF på nevruttvekst i PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 100 ng/ml BDNF eller 50 ng/ml NGF. Ubehandlede og NGF-eksponerte celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevrutter, n=9. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller. B) Nevritt lengde (normalisert til ubehandlet), n=8. \* $p < 0,001$  sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme

tidspunkt, Mann-Whitney Rank Sum Test..C) Antall nevritter per celle, n=9. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller. Deler av datamaterialet er felles med masterstudent Marte Rodum.

#### **Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3 A**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (%)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Kontroll	10	0,03	9
BDNF 100 ng/ml	15	0,02	9

#### **Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3 B**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk *</b>
Kontroll	1,00	0,00	8
BDNF 100 ng/ml	1,91	0,51	8

#### **Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3 C**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
NGF 50 ng/ml	0,65	0,10	9
BDNF 100 ng/ml	0,86	0,16	9

\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.

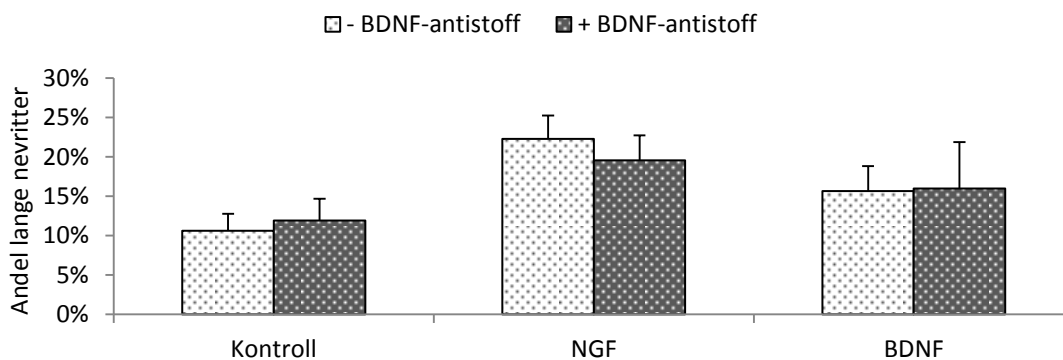
#### **Tabell 3.2 BDNF > kontroll for de ulike endepunktene**

<b>Endepunkt</b>	<b>BDNF &gt; kontroll</b>
Andel lange nevritter	7/9 tilfeller
Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet)	8/8 tilfeller
Antall nevritter per celle	5/9 tilfeller

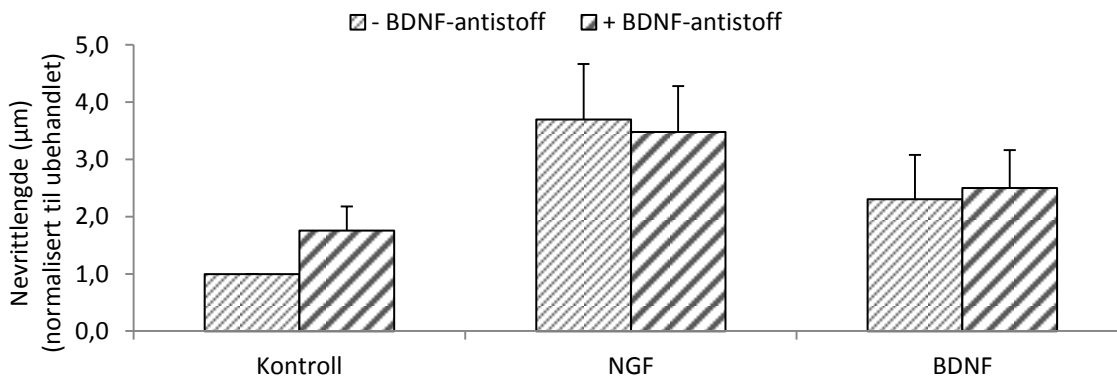
### 3.3 Effekt av BDNF-antistoff på nevruttvekst i PC12-celler

Videre ble det undersøkt om BDNF-antistoff påvirker nevruttvekst induisert av NGF og BDNF. Dette ble gjort for å vurdere om BDNF spiller en rolle for mekanismene bak nevruttvekst. BDNF-antistoff gav en liten ikke-signifikant reduksjon i andel lange nevritter og nevrittelengde for nevruttvekst induisert av NGF. BDNF-antistoff påvirket ikke nevruttvekst induisert av BDNF (figur 3.4).

A)



B)



**Figur 3.4 BDNF-antistoff påvirker i liten grad nevruttvekst induisert av NGF og BDNF**

PC12-cellene ble eksponert for 50 ng/ml NGF eller 100 ng/ml BDNF med og uten 3,33 µg/ml BDNF-antistoff. Ubehandlete, NGF-eksponerte og BDNF-eksponerte celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevritter, n=6-10. B) Nevritt lengde (normalisert til ubehandlet), n=5-9. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller. Deler av datamaterialet er felles med masterstudent Marte Rodum.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.4 A**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (%)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Kontroll	11	0,02	10
BDNF-antistoff 3,33 µg/ml	12	0,03	10
NGF 50 ng/ml	22	0,03	7
NGF 50 ng/ml + BDNF-antistoff 3,33 µg/ml	20	0,03	7
BDNF 100 ng/ml	16	0,03	6
BDNF 100 ng/ml + BDNF-antistoff 3,33 µg/ml	16	0,06	6

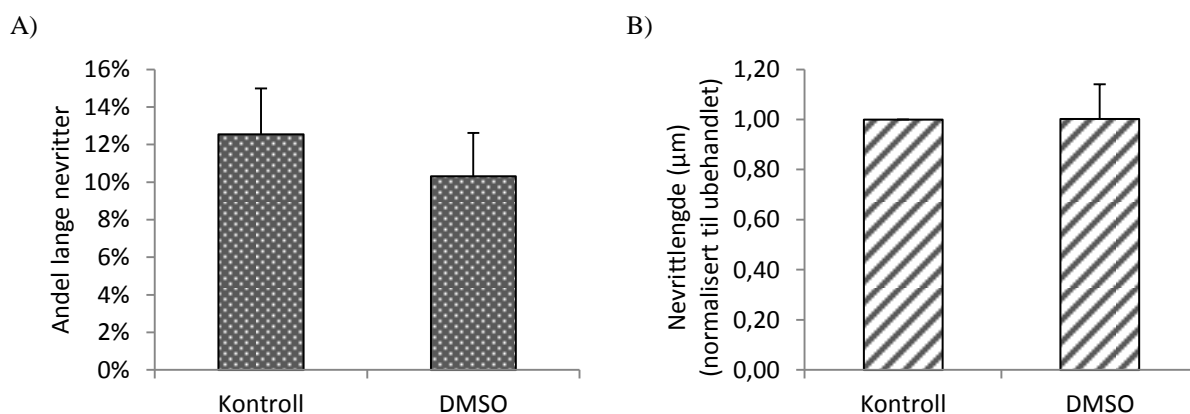
**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.4 B**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (µm)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk*</b>
Kontroll	1,0	0,0	9
BDNF-antistoff 3,33 µg/ml	1,76	0,42	9
NGF 50 ng/ml	3,70	0,97	6
NGF 50 ng/ml + BDNF-antistoff 3,33 µg/ml	3,48	0,80	6
BDNF 100 ng/ml	2,30	0,77	5
BDNF 100 ng/ml + BDNF-antistoff 3,33 µg/ml	2,50	0,66	5

\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.

### 3.4 Effekt av caspase-3-hemmer på nevruttvekst i PC12-celler

Det var ønskelig å undersøke om caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk påvirker nevruttvekst induert av NGF og BDNF. Dette ble gjort for å vurdere om caspase-3 spiller en rolle for mekanismene bak nevruttvekst. Caspase-3-hemmeren er løst i DMSO, og eksponeringen har en konsentrasjon på 0,1 % DMSO. DMSO i denne konsentrasjonen påvirker ikke nevruttvekst i PC12-celler (figur 3.5). Caspase-3-hemmeren gav en ikke-signifikant reduksjon i andel lange nevritter for både NGF- og BDNF-eksponerte celler (figur 3.6 A). Caspase-3-hemmeren gav også en ikke-signifikant reduksjon i nevrittelengde for NGF-eksponerte celler, men ikke for BDNF-eksponerte celler (figur 3.6 B).



**Figur 3.5 DMSO påvirker ikke nevruttvekst i PC12-celler**

PC12-cellene ble eksponert for 0,1 % DMSO og ubehandlede celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevritter, n=11. B) Nevritt lengde (normalisert til ubehandlet), n=10. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller. Et forsøk er utelatt på grunn av en avvikende verdi. Deler av datamaterialet er felles med masterstudent Marte Rodum.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5 A

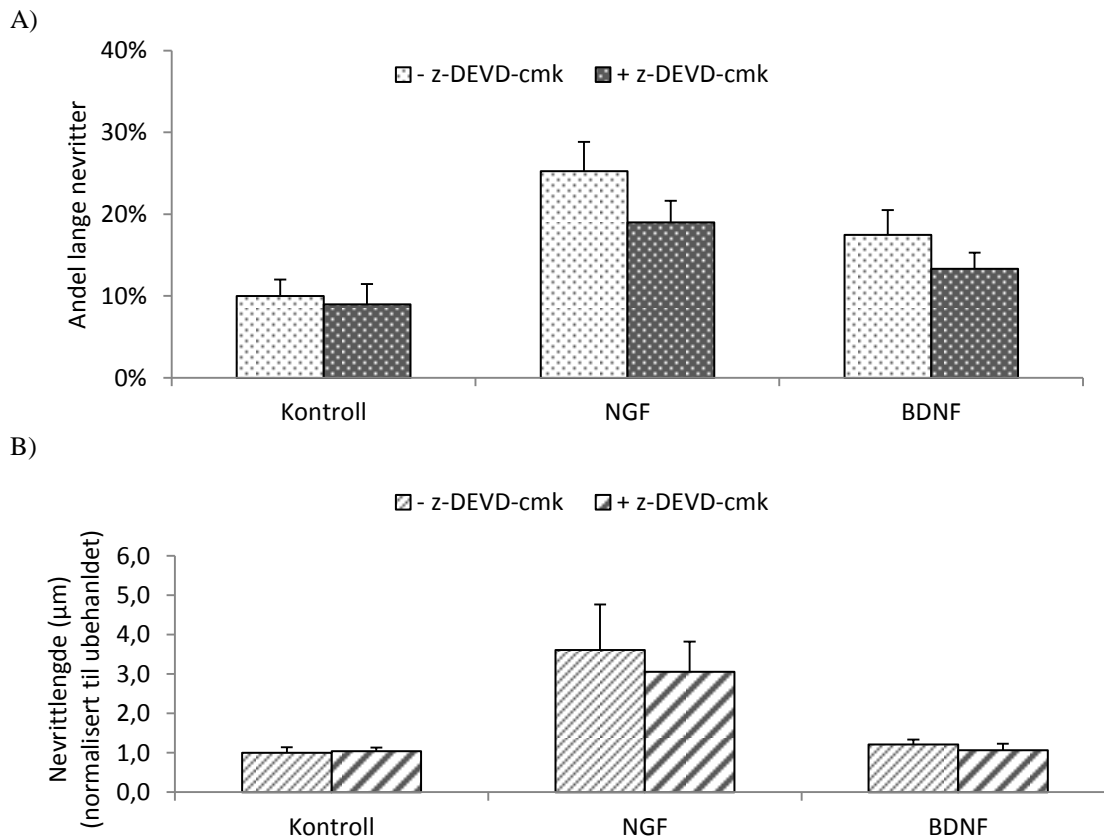
Eksponering	Gjennomsnitt (%)	SE	Antall forsøk
Kontroll	13	0,02	11
DMSO 0,1 %	10	0,02	11

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5 B

Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk *
Kontroll	1,00	0,00	10
DMSO 0,1 %	1,00	0,14	10

\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.





**Figur 3.6 Caspase-3-hemmer påvirker i noen grad nevrutvekst induisert av NGF og BDNF**

PC12-celler ble eksponert for 0,1 % DMSO, 50 ng/ml NGF eller 100 ng/ml BDNF med og uten 1 µM z-DEVD-cmk.

DMSO-eksponerte, NGF-eksponerte og BDNF-eksponerte celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevritter, n=5-11.

B) Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet), n=5-10. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller. Et forsøk er utelatt på grunn av en avvikende verdi. Deler av datamaterialet er felles med masterstudent Marte Rodum.

### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.6 A

Eksponering	Gjennomsnitt (%)	SE	Antall forsøk
DMSO 0,1 %	10	0,02	11
z-DEVD-cmk 1 µM	9	0,02	11
NGF 50 ng/ml	25	0,04	6
NGF 50 ng/ml + z-DEVD-cmk 1 µM	19	0,03	6
BDNF 100 ng/ml	18	0,03	5
BDNF 100 ng/ml + z-DEVD-cmk 1 µM	13	0,02	5

### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.6 B

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk *</b>
DMSO 0,1 %	1,00	0,14	10
z-DEVD-cmk 1 $\mu\text{M}$	1,04	0,09	10
NGF 50 ng/ml	3,61	1,16	5
NGF 50 ng/ml + z-DEVD-cmk 1 $\mu\text{M}$	3,06	0,76	5
BDNF 100 ng/ml	1,22	0,12	5
BDNF 100 ng/ml + z-DEVD-cmk 1 $\mu\text{M}$	1,07	0,16	5

\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.

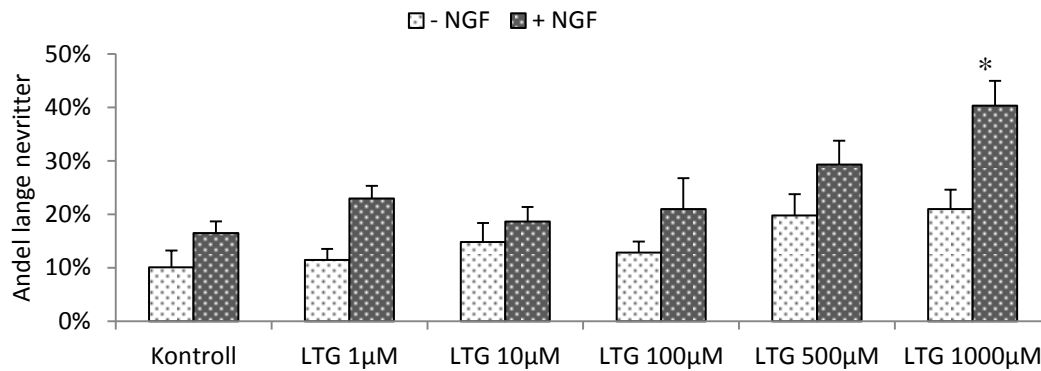
## 3.5 Lamotrigin og nevruttvekst i PC12-celler

### 3.5.1 Effekt av lamotrigin på nevruttvekst i PC12-celler

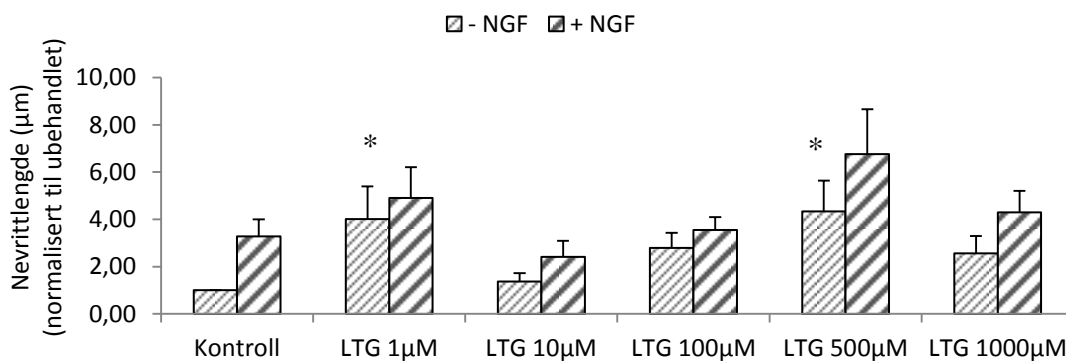
Det var ønskelig å undersøke effekt av ulike konsentrasjoner lamotrigin på nevruttvekst i både udifferensierte og differensierende PC12-celler. Cellene ble eksponert for 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  og 1000  $\mu\text{M}$  lamotrigin, og differensierende celler ble i tillegg eksponert for 50 ng/ml NGF. Både udifferensierte og differensierende PC12-celler viste en doseavhengig økning i andel lange nevritter, og en lignende tendens ble sett i grafene for begge systemene (figur 3.7 A). For nevrittelengde ble det vist en dose-respons kurve med topper på 1  $\mu\text{M}$  og 500  $\mu\text{M}$  lamotrigin, og en lignende tendens ble sett i grafene til både udifferensierte og differensierende PC12-celler (figur 3.7 B).

Terapeutisk område for lamotrigin er en serumkonsentrasjon som ligger på 10-50  $\mu\text{M}$ , og konsentrasjonen er vist å være noe lavere i hjernen sammenlignet med plasma (Castel-Branco, Lebre et al. 2003). Videre analyser ble derfor gjort på konsentrasjonen 1  $\mu\text{M}$ , da denne ligger nærmest konsentrasjonen i hjernen ved terapeutisk bruk av lamotrigin. Det er også vist effekt på nevrittelengde i forhold til ubehandlet kontroll for denne konsentrasjonen.

A)



B)



**Figur 3.7 Effekt av lamotrigin på nevrutvekst i udifferensierte og differensierende PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 1 µM, 10 µM, 100 µM, 500 µM eller 1000 µM lamotrigin med og uten 50 ng/ml NGF. Ubehandlede og NGF-eksponerte celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevrer, n=6-8. Lamotrigin gir en doseavhengig økning i andel lange nevrer for både udifferensierte og differensierende PC12-celler. \*p<0,05 sammenlignet med NGF-eksponert kontroll ved samme tidspunkt, One Way Analysis of Variance. B) Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet), n=6-9. Lamotrigin i konsentrasjonene 1 µM og 1000 µM gir økte nevrtilengder i forhold til ubehandlet kontroll i både udifferensierte og differensierende PC12-celler. \*p<0,05 sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme tidspunkt, One Way Analysis of Variance.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.7 A**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (%)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Ubehandlet	10	0,09	8
NGF 50 ng/ml	17	0,02	8
Lamotrigin 1 $\mu$ M	12	0,05	6
Lamotrigin 1 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	23	0,02	6
Lamotrigin 10 $\mu$ M	15	0,09	6
Lamotrigin 10 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	19	0,03	6
Lamotrigin 100 $\mu$ M	13	0,05	6
Lamotrigin 100 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	21	0,06	6
Lamotrigin 500 $\mu$ M	20	0,10	6
Lamotrigin 500 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	29	0,04	6
Lamotrigin 1000 $\mu$ M	21	0,09	6
Lamotrigin 1000 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	40	0,05	6

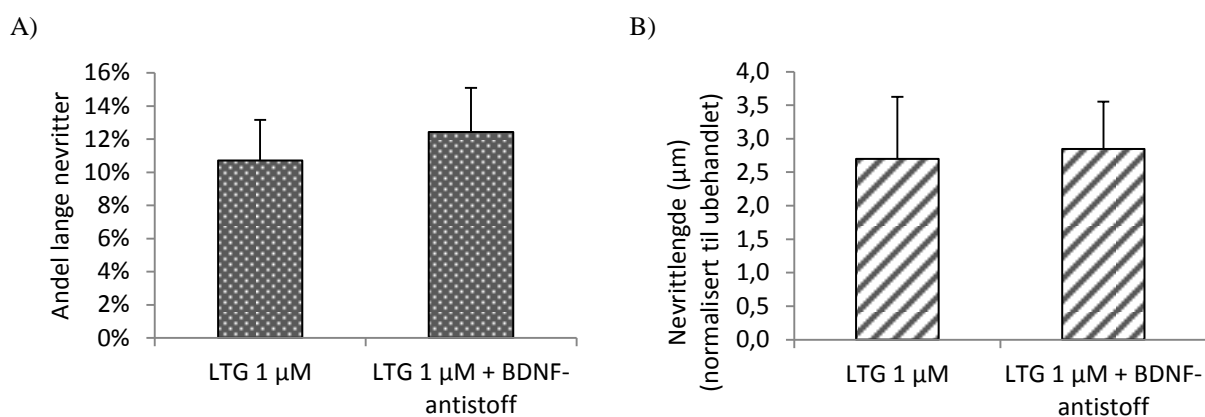
**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.7 B**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (<math>\mu</math>m)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Ubehandlet	1,0	0,0	9 *
NGF 50 ng/ml	3,28	0,72	9 *
Lamotrigin 1 $\mu$ M	4,02	1,38	6
Lamotrigin 1 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	4,91	1,29	6
Lamotrigin 10 $\mu$ M	1,37	0,35	6
Lamotrigin 10 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	2,41	0,68	6
Lamotrigin 100 $\mu$ M	2,79	0,63	6
Lamotrigin 100 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	3,55	0,54	6
Lamotrigin 500 $\mu$ M	4,33	1,30	6
Lamotrigin 500 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	6,76	1,91	6
Lamotrigin 1000 $\mu$ M	2,57	0,73	6
Lamotrigin 1000 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	4,30	0,90	6

\*Et forsøk ekstra fordi forsøkene var spredt over flere dager.

### 3.5.2 Effekt av BDNF-antistoff på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin

Det var ønskelig å undersøke om BDNF spiller en rolle for mekanismene bak nevruttvekst induisert av lamotrigin. Det er tidligere vist at administrasjon av lamotrigin øker uttrykket av BDNF i hippocampus og frontal cortex hos rotte (Li, He et al. 2010) (Chang, Rapoport et al. 2009). BDNF-antistoff gav ingen signifikante endringer i nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin (figur 3.8)



**Figur 3.8 BDNF-antistoff påvirker i liten grad nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin**

PC12-celler ble eksponert for 1 µM lamotrigin med og uten 3,33 µg/ml BDNF-antistoff. Lamotrigin-eksponerte celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevritter, n=7. B) Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet), n=6. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8 A

Eksponering	Gjennomsnitt (%)	SE	Antall forsøk
Lamotrigin 1 µM	11	0,02	7
Lamotrigin 1 µM + BDNF-antistoff 3,33 µg/ml	12	0,03	7

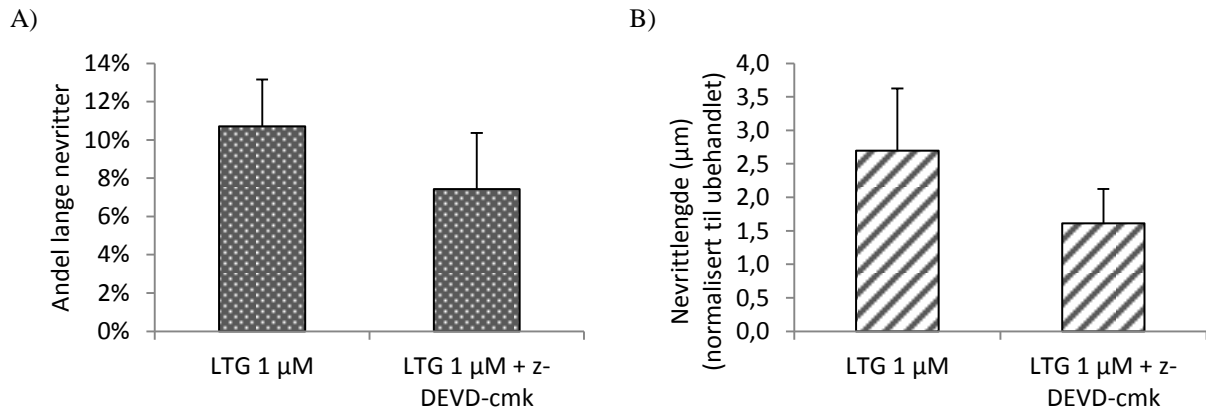
#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.8 B

Eksponering	Gjennomsnitt (µm)	SE	Antall forsøk*
Lamotrigin 1 µM	2,70	0,93	6
Lamotrigin 1 µM + BDNF-antistoff 3,33 µg/ml	2,85	0,70	6

\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.

### 3.5.3 Effekt av caspase-3-hemmer på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin

Det var ønskelig å undersøke om caspase-3 spiller en rolle for mekanismene bak nevruttvekst induisert av lamotrigin. Caspase-3-hemmeren førte til en ikke-signifikant reduksjon i andel lange nevritter og nevrittelengde i PC12-celler eksponert for lamotrigin (figur 3.9)



**Figur 3.9: Caspase-3-hemmer påvirker nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin**

PC12-celler ble eksponert for 1 μM lamotrigin med og uten 1 μM z-DEVD-cmk. Lamotrigin-eksponerte celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevritter, n=7. B) Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet), n=6. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9 A

Eksponering	Gjennomsnitt (%)	SE	Antall forsøk
Lamotrigin 1 μM	11	0,02	7
Lamotrigin 1 μM + z-DEVD-cmk 1 μM	7	0,03	7

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9 B

Eksponering	Gjennomsnitt (μm)	SE	Antall forsøk *
Lamotrigin 1 μM	2,70	0,93	6
Lamotrigin 1 μM + z-DEVD-cmk 1 μM	1,61	0,51	6

\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.

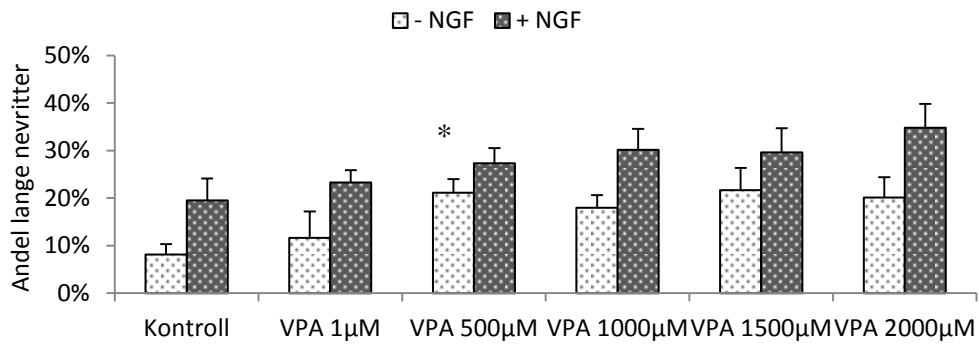
## **3.6 Valproat og nevruttvekst i PC12-celler**

### **3.6.1 Effekt av valproat på nevruttvekst i PC12-celler**

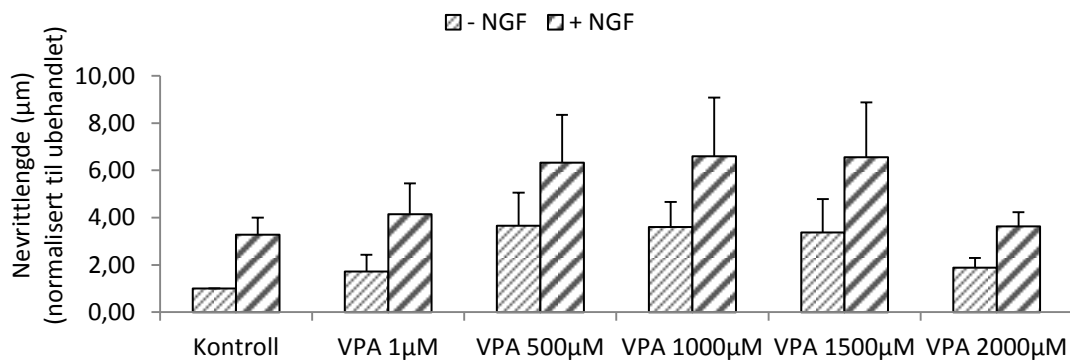
Det var ønskelig å undersøke effekt av ulike konsentrasjoner valproat på nevruttvekst i både udifferensierte og differensierende PC12-celler. Cellene ble eksponert for 1  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 1500  $\mu\text{M}$  og 2000  $\mu\text{M}$  valproat, og differensierende celler ble i tillegg eksponert for 50 ng/ml NGF. Både udifferensierte og differensierende PC12-celler viste tendens til økt andel lange nevritter og økt nevrittelengde for alle konsentrasjoner av valproat i forhold til ubehandlet og NGF-eksponert kontroll (figur 3.10). Nevrittlengden når en terskel ved eksponering for 500-1000  $\mu\text{M}$  valproat, og reduseres ved eksponering for 2000  $\mu\text{M}$  valproat.

Terapeutisk område for valproat er en serumkonsentrasjon som ligger på 300-600  $\mu\text{M}$ , og konsentrasjonen er noe høyere i hjernen sammenlignet med plasma (Wieser 1994). Videre analyser ble gjort på konsentrasjonene 1  $\mu\text{M}$  og 500  $\mu\text{M}$ . 500  $\mu\text{M}$  ligger i det terapeutiske området, og det er vist en signifikant effekt på andel lange nevritter for denne konsentrasjonen i forhold til ubehandlet kontroll. 1  $\mu\text{M}$  ligger under det terapeutiske området, men ble valgt for videre analyser da det ble observert en liten effekt på nevruttvekst for denne konsentrasjonen.

A)



B)



**Figur 3.10 Effekt av valproat på nevruttvekst i udifferensierte og differensierende PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 1 µM, 500 µM, 1000 µM, 1500 µM eller 2000 µM valproat med og uten 50 ng/ml NGF. Ubehandlete og NGF-eksponerte PC12-celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevritter, n=6-7. Valproat gir en tendens til økning i andel lange nevritter for udifferensierte og differensierende PC12-celler. \*p<0,05 sammenlignet med ubehandlet kontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. B) Nevritt lengde (normalisert til ubehandlet), n=6-7. Valproat i konsentrasjonene 500-1500 µM når en terskelverdi i nevrittlengde for udifferensierte og differensierende PC12-celler.



**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10 A**

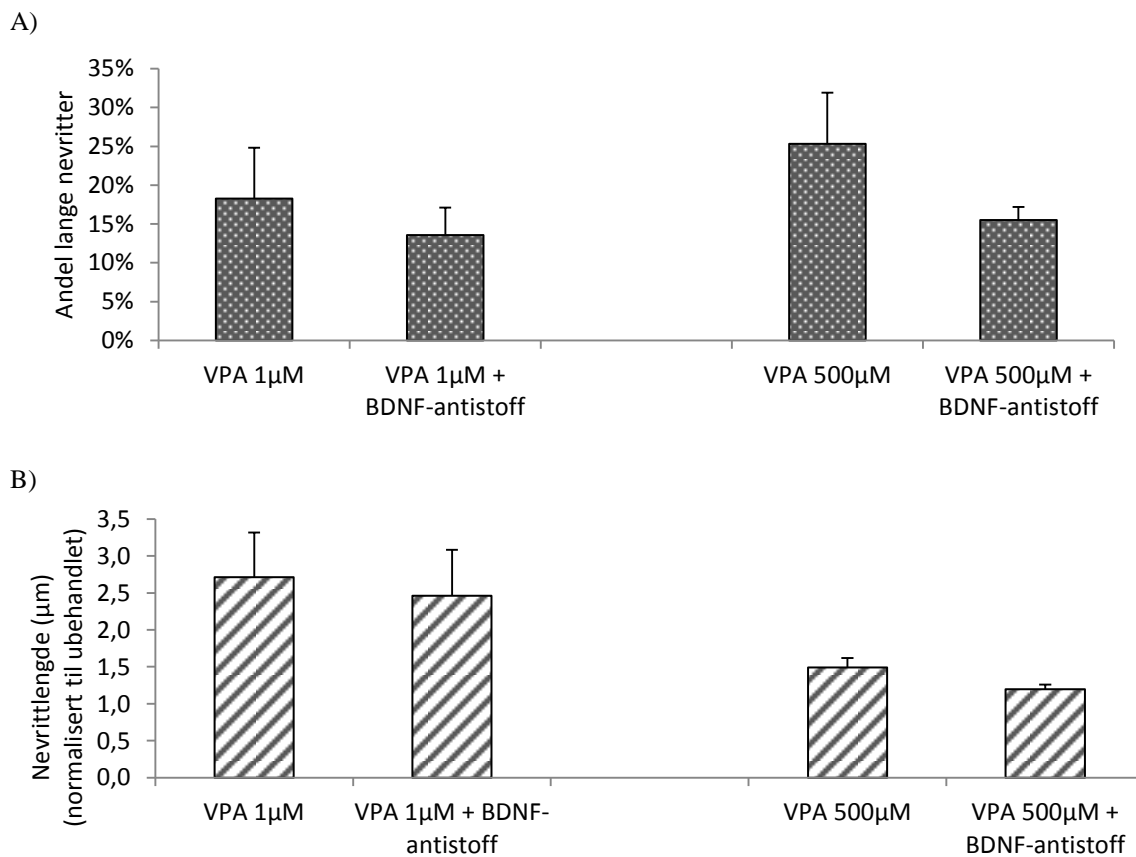
<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (%)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Ubehandlet	8	0,02	7
NGF 50 ng/ml	20	0,05	7
Valproat 1 $\mu$ M	12	0,06	6
Valproat 1 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	23	0,03	6
Valproat 500 $\mu$ M	21	0,03	6
Valproat 500 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	27	0,03	6
Valproat 1000 $\mu$ M	18	0,03	6
Valproat 1000 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	30	0,04	6
Valproat 1500 $\mu$ M	22	0,05	6
Valproat 1500 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	30	0,05	6
Valproat 2000 $\mu$ M	20	0,04	6
Valproat 2000 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	35	0,05	6

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10 B**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (<math>\mu</math>m)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Ubehandlet	1,0	0,00	7
NGF 50 ng/ml	3,28	0,72	7
Valproat 1 $\mu$ M	1,72	0,71	6
Valproat 1 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	4,15	1,31	6
Valproat 500 $\mu$ M	3,66	1,40	6
Valproat 500 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	6,33	2,02	6
Valproat 1000 $\mu$ M	3,61	1,06	6
Valproat 1000 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	6,60	2,48	6
Valproat 1500 $\mu$ M	3,37	1,41	6
Valproat 1500 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	6,56	2,32	6
Valproat 2000 $\mu$ M	1,88	0,41	6
Valproat 2000 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	3,63	0,60	6

### 3.6.2 Effekt av BDNF-antistoff på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for valproat

Det var ønskelig å undersøke om BDNF spiller en rolle for nevruttvekst induisert av valproat. BDNF-antistoff gav en ikke-signifikant reduksjon i andel lange nevrutter og nevruttlengde for PC12-celler eksponert for valproat (figur 3.11).



**Figur 3.11 BDNF-antistoff påvirker i liten grad nevruttvekst i PC12-celler eksponert for valproat**

PC12-celler ble eksponert for 1 µM valproat eller 500 µM valproat med og uten 3,33 µg/ml BDNF-antistoff. Valproat-eksponerte celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevrutter, n=6-7. B) Nevritt lengde (normalisert til ubehandlet), n=5-6. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11 A**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (%)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Valproat 1 $\mu$ M	18	0,07	7
Valproat 1 $\mu$ M + BDNF-antistoff 3,33 $\mu$ g/ml	14	0,04	7
Valproat 500 $\mu$ M	25	0,07	6
Valproat 500 $\mu$ M + BDNF-antistoff 3,33 $\mu$ g/ml	16	0,02	6

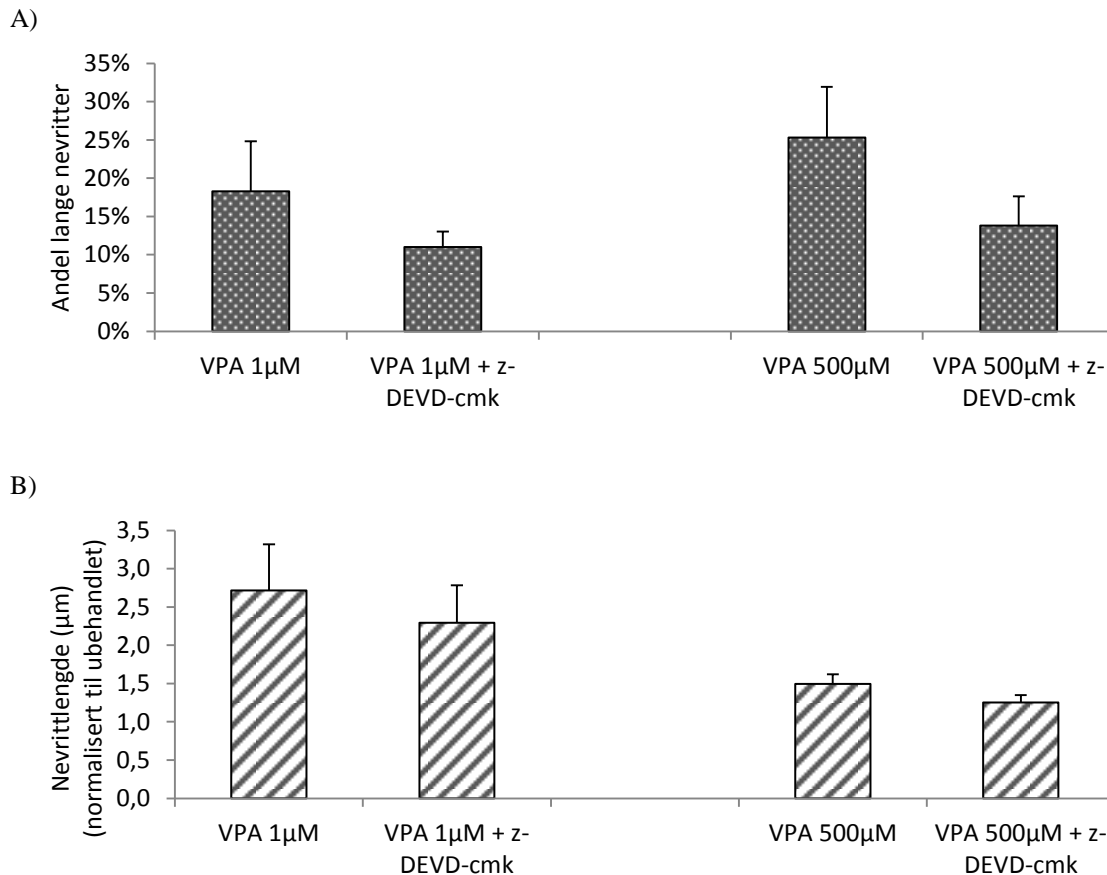
**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11 B**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (<math>\mu</math>m)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk*</b>
Valproat 1 $\mu$ M	2,72	0,60	6
Valproat 1 $\mu$ M + BDNF-antistoff 3,33 $\mu$ g/ml	2,37	0,62	6
Valproat 500 $\mu$ M	1,49	0,13	5
Valproat 500 $\mu$ M + BDNF-antistoff 3,33 $\mu$ g/ml	1,20	0,06	5

\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.

### 3.6.3 Effekt av caspase-3-hemmer på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for valproat

Det var ønskelig å undersøke om caspase-3 spiller en rolle for mekanismene bak nevruttvekst induisert av valproat. Caspase-3-hemmeren førte til en ikke-signifikant reduksjon i andel lange nevritter og nevrittlengde for PC12-celler eksponert for valproat (figur 3.12).



**Figur 3.12 Caspase-3-hemmer påvirker i noen grad nevruttvekst i PC12-celler eksponert for valproat**  
PC-12 celler ble eksponert for 1 µM valproat eller 500 µM valproat med og uten 1 µM z-DEVD-cmk. Valproat-eksponerte celler ble brukt som kontroll. A) Andel lange nevritter, n=6-7. B) Nevrittlengde (normalisert til ubehandlet), n=5-6. T-test ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.12 A

Eksponering	Gjennomsnitt (%)	SE	Antall forsøk
Valproat 1 µM	18	0,07	7
Valproat 1 µM + z-DEVD-cmk 1 µM	11	0,02	7
Valproat 500 µM	25	0,07	6
Valproat 500 µM + z-DEVD-cmk 1 µM	14	0,04	6

## Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.12 B

Eksponering	Gjennomsnitt ( $\mu\text{M}$ )	SE	Antall forsøk *
Valproat 1 $\mu\text{M}$	2,72	0,60	6
Valproat 1 $\mu\text{M}$ + z-DEVD-cmk 1 $\mu\text{M}$	2,30	0,49	6
Valproat 500 $\mu\text{M}$	1,49	0,13	5
Valproat 500 $\mu\text{M}$ + z-DEVD-cmk 1 $\mu\text{M}$	1,25	0,10	5

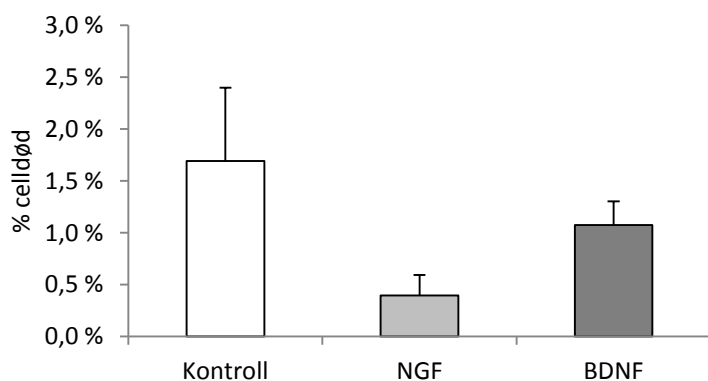
\*Et forsøk er utelatt for dette endepunktet fordi det ikke ble målt noen lange nevritter i den ubehandlede kontrollen.

## 3.7 Celledød

For å undersøke om eksponeringene gav celledød, ble cellene farget med trypanblå 72 timer etter eksponering, og grad av celledød (andel døde celler av totalt antall celler) ble beregnet.

### 3.7.1 Effekt av NGF og BDNF på celledød i PC12-celler

Det var ønskelig å undersøke om nevrotrofinene NGF og BDNF påvirker celledød i PC12-celler. Resultatene viser at NGF og BDNF ikke påvirker celledød i PC12-celler (figur 3.13). Celledød ble også beregnet for resten av oppsettet i tabell 2.7, men de ulike eksponeringene hadde ingen effekt på celledød i forhold til kontroll (resultater ikke vist).



**Figur 3.13 NGF og BDNF påvirker ikke celledød i PC12-celler**

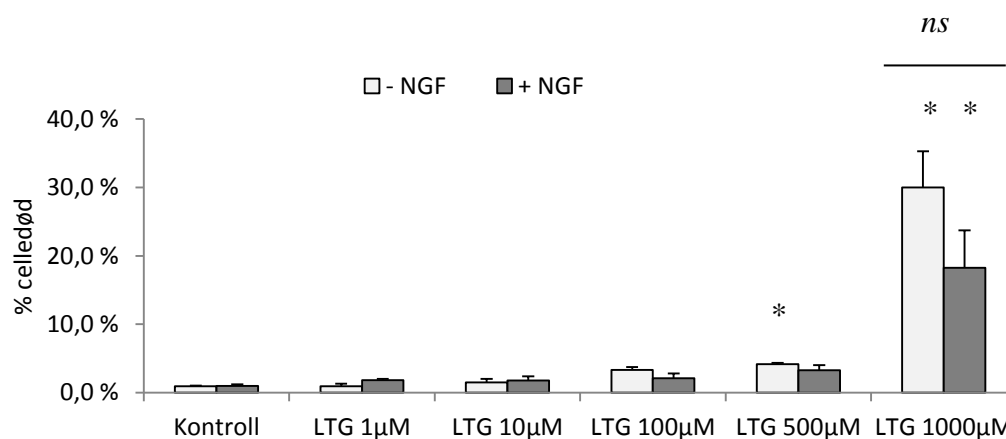
PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF eller 100 ng/ml BDNF. Ubehandlete celler ble brukt som kontroll. ANOVA ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller. Deler av datamaterialet er felles med masterstudent Marte Rodum.

### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13

Eksponering	Gjennomsnitt (%)	SE	Antall forsøk
Kontroll	1,7	0,01	3
NGF 50 ng/ml	0,4	0,00	3
BDNF 100 ng/ml	1,1	0,00	3

### 3.7.2 Effekt av lamotrigin på celledød i PC12-celler

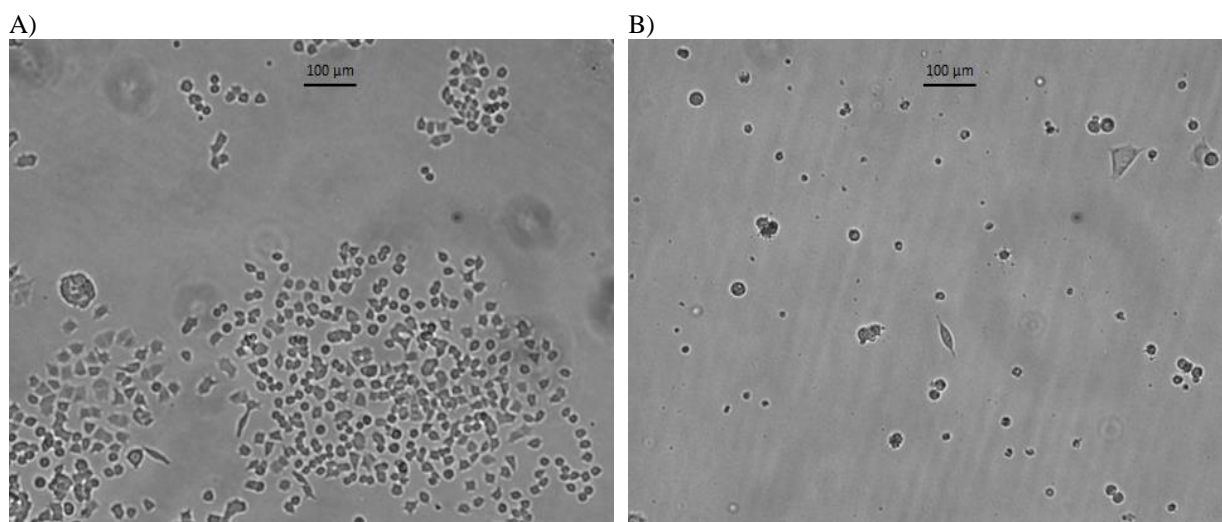
Det var ønskelig å undersøke effekt av ulike konsentrasjoner lamotrigin på celledød i udifferensierte og differensierende PC12-celler. Telling av celledød ved hjelp av farging med trypanblå viste at lamotrigin i høye doser påvirker celledød i PC12-celler (figur 3.14). Dette vises i tillegg tydelig på mikroskopbilder av cellene tatt under fasekontrast med 10x forstørrelse (figur 3.15)



**Figur 3.14 Lamotrigin i høye konsentrasjoner påvirker celledød i udifferensierte og differensierende PC12-celler**  
PC12-celler ble eksponert for 1 µM, 10 µM, 100 µM, 500 µM og 1000 µM lamotrigin med og uten 50 ng/ml NGF. Ubehandlete og NGF-eksponerte PC12-celler ble brukt som kontroller, n=3. \*p<0,05 sammenlignet med ubehandlet og NGF-eksponert kontroll ved samme tidspunkt, Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. ns=ikke-signifikant, statistisk analyse gjort ved hjelp av t-test.

### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.14

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt (%)</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Ubehandlet	1,0	0,00	3
NGF 50 ng/ml	1,0	0,00	3
Lamotrigin 1 $\mu$ M	1,0	0,00	3
Lamotrigin 1 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	1,8	0,00	3
Lamotrigin 10 $\mu$ M	1,5	0,01	3
Lamotrigin 10 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	1,8	0,01	3
Lamotrigin 100 $\mu$ M	3,3	0,00	3
Lamotrigin 100 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	2,1	0,01	3
Lamotrigin 500 $\mu$ M	4,2	0,00	3
Lamotrigin 500 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	3,3	0,01	3
Lamotrigin 1000 $\mu$ M	30,0	0,05	3
Lamotrigin 1000 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	18,3	0,05	3



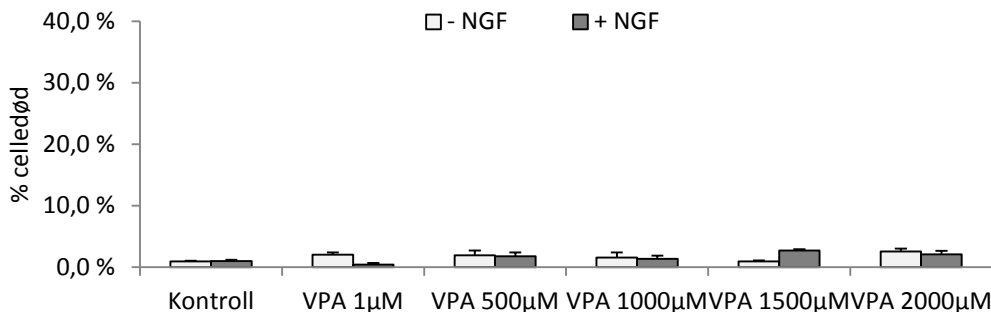
**Figur 3.15 Effekt av 1000  $\mu$ M lamotrigin på celledød i PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 1000  $\mu$ M lamotrigin og ubehandlede celler ble brukt som kontroll. PC12-cellene ble studert 72 timer etter eksponering, og bilder ble tatt under fasekontrast med 10x forstørrelse. A) Ubehandlede PC12-celler ble brukt som kontroll. B) PC12-celler eksponert for 1000  $\mu$ M lamotrigin.

### 3.7.3 Effekt av valproat på celledød i PC12-celler

Det var ønskelig å undersøke effekt av ulike konsentrasjoner valproat på celledød i udifferensierte og differensierende PC12-celler. Telling av celledød ved hjelp av farging med trypanblå viste at valproat i liten grad påvirker celledød i PC12-celler (figur 3.16).

Mikroskopbilder av cellene tatt under fasekontrast med 10x forstørrelse viste imidlertid en endring ved eksponering for 2000  $\mu\text{M}$  valproat. Det var færre celler i synsfeltet og det så ut til at cellenes morfologi var noe endret. Cellene var blant annet større i diameter, og det så ut som de var tettere klistret til underlaget (figur 3.17).

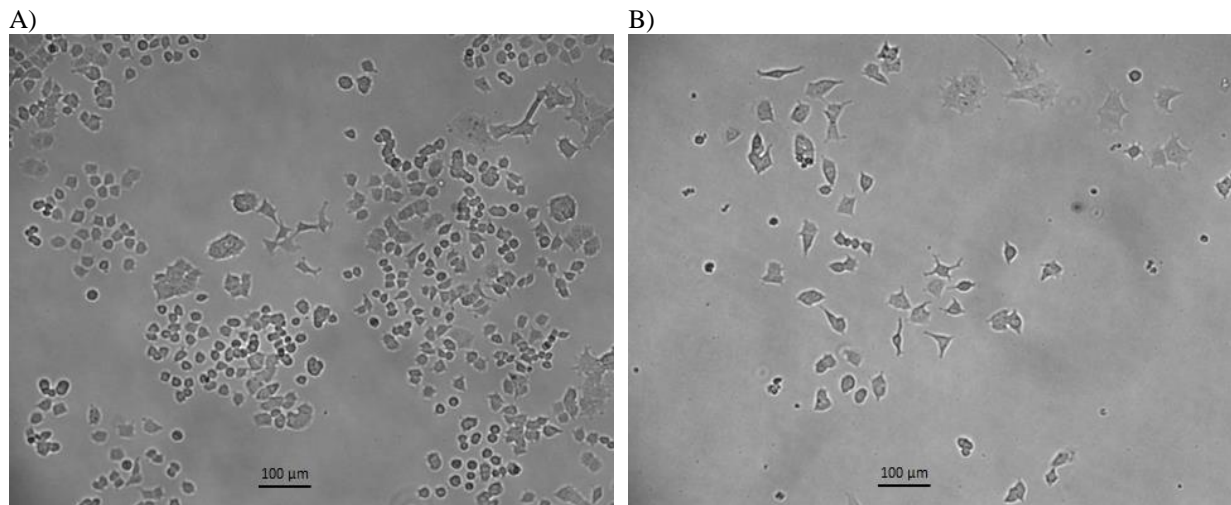


**Figur 3.16 Valproat påvirker i liten grad celledøden i udifferensierte og differensierende PC12-celler**  
 PC12-celler ble eksponert for 1  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 1500  $\mu\text{M}$  og 2000  $\mu\text{M}$  valproat med og uten 50 ng/ml NGF. Ubehandlete og NGF-eksponerte PC12-celler ble brukt som kontroller, n=3. ANOVA ble benyttet til statistiske analyser, men det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.16

Eksponering	Gjennomsnitt (%)	SE	Antall forsøk
Ubehandlet	1,0	0,00	3
NGF 50 ng/ml	1,0	0,00	3
Valproat 1 $\mu\text{M}$	2,0	0,00	3
Valproat 1 $\mu\text{M}$ + NGF 50 ng/ml	0,4	0,00	3
Valproat 500 $\mu\text{M}$	1,9	0,01	3
Valproat 500 $\mu\text{M}$ + NGF 50 ng/ml	1,8	0,01	3
Valproat 1000 $\mu\text{M}$	1,6	0,01	3
Valproat 1000 $\mu\text{M}$ + NGF 50 ng/ml	1,4	0,01	3
Valproat 1500 $\mu\text{M}$	0,9	0,00	3
Valproat 1500 $\mu\text{M}$ + NGF 50 ng/ml	2,7	0,00	3
Valproat 2000 $\mu\text{M}$	2,6	0,00	3
Valproat 2000 $\mu\text{M}$ + NGF 50 ng/ml	2,1	0,01	3





**Figur 3.17 Effekt av 2000  $\mu\text{M}$  valproat på celledød i PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 2000  $\mu\text{M}$  valproat og ubehandlede celler ble brukt som kontroll. PC12-cellene ble studert 72 timer etter eksponering, og bilder ble tatt under fasekontrast med 10x forstørrelse. A) Ubehandlede PC12-celler ble brukt som kontroll. B) PC12-celler eksponert for 2000  $\mu\text{M}$  valproat.

## 3.8 Nevrittutvekst i kornceller fra lillehjernen

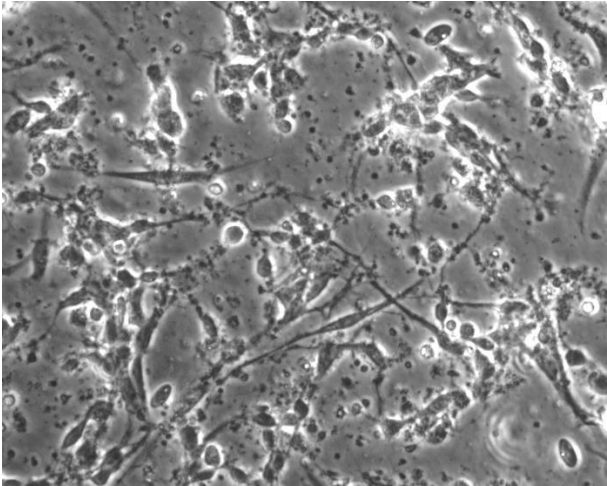
### 3.8.1 Nevrittutvekst i kornceller fra kylling

Kyllingkorncellene ble platet ut med vanlig ( $1,7 \times 10^6$  celler/ml) og halv ( $8,5 \times 10^5$  celler/ml) tetthet. Ved vanlig tetthet (figur 3.18 A) var det svært mye celler i synsfeltet og en morfologisk analyse kunne ikke utføres med tilstrekkelig nøyaktighet. Ved halv tetthet (figur 3.18 B) var cellene såpass spredt at det var mulig å skille ut utløpere fra enkeltceller.

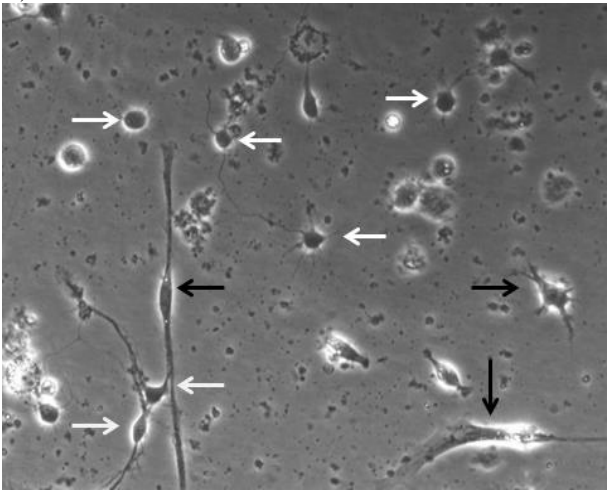
Utplating med halv tetthet ble derfor benyttet resten av studien.

Kyllingkorncellene ble studert i et fluorescensmikroskop 24 og 48 timer etter utplating og eksponering, og det ble tatt bilder av cellene under fasekontrast med 40x forstørrelse. Etter 48 timer (figur 3.18 C) var det flere ikke-nevronale celler som dekket bunnen og mange av dem hadde dannet kontakt med andre celler. Det så ut som det var flere ikke-nevronale celler tilstede, og at korncellene var i ferd med å dø. Etter 24 timer (figur 3.18 B) var det enklere å skille ut korncellene, og identifikasjon av nevritter fra enkeltceller kunne utføres mer nøyaktig. Morfologisk analyse ble derfor gjort etter 24 timer for resten av studien.

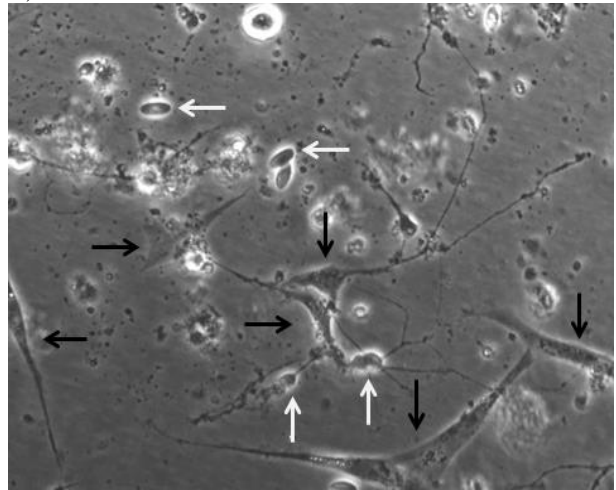
A)



B)



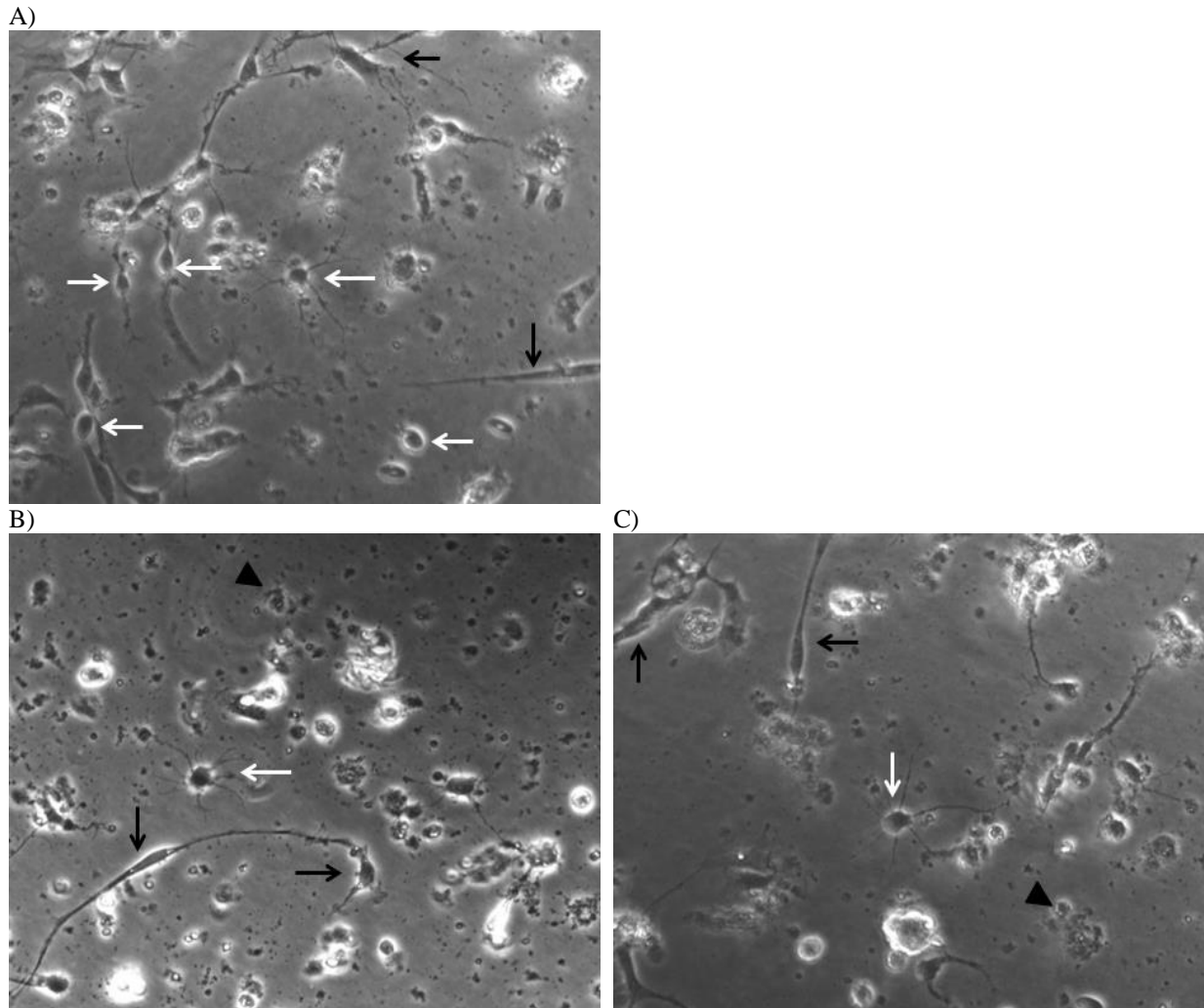
C)



**Figur 3.18 Kornceller fra kylling – valg av tetthet og tidspunkt for morfologisk analyse**

Bilder ble tatt under fasekontrast på 40x forstørrelse. Hvite piler indikerer kornceller. Sorte piler indikerer ikke-neuronale celler. A) Ubehandlede kornceller fra kylling ble platet ut med vanlig tetthet og bilder ble tatt under fasekontrast 24 timer etter utplating. B) Ubehandlede kornceller fra kylling ble platet ut med halv tetthet og bilder ble tatt 24 timer etter utplating. C) Ubehandlede kornceller fra kylling ble platet ut med halv tetthet og bilder ble tatt 48 timer etter utplating.

Korncellene fra kylling ble eksponert for 1  $\mu\text{M}$  lamotrigin, 1  $\mu\text{M}$  valproat og 500  $\mu\text{M}$  valproat. Det kan se ut som lamotrigin har effekt på nevrutvekst, fordi korncellene har mange, lange og lett identifiserbare utløpere (figur 3.19 A). Det var ikke mulig å se noen overbevisende effekt på nevrutvekst mellom ubehandlede celler og celler eksponert for valproat. Det kan se ut som det er færre celler i synsfeltet og flere cellefragmenter hos cellene eksponert for valproat (figur 3.19 B og C).

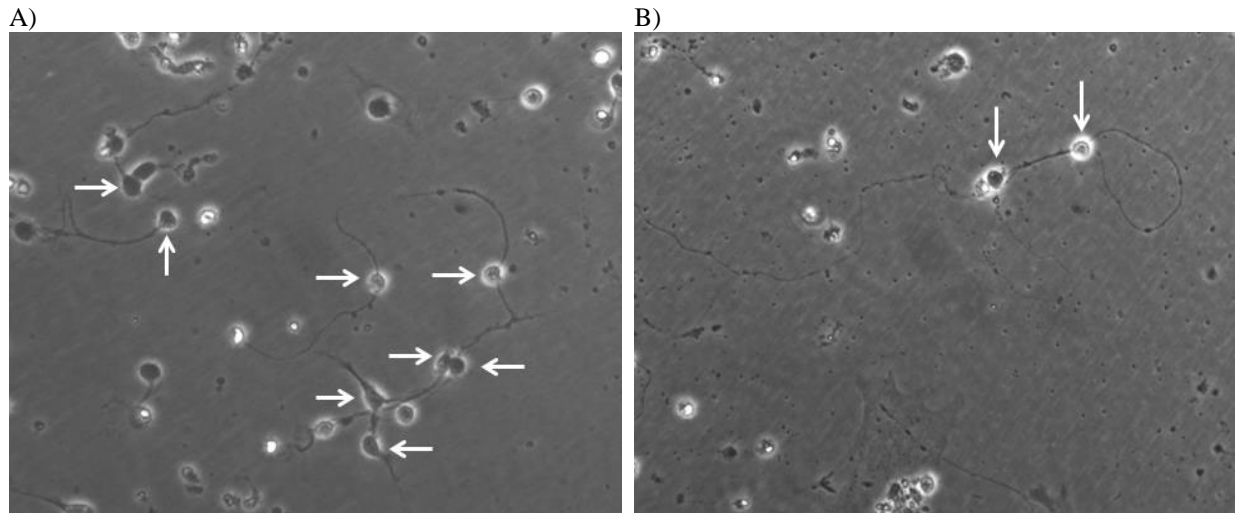


**Figur 3.19 Kornceller fra kylling eksponert for lamotrigin og valproat**

Bilder ble tatt 24 timer etter eksponering under fasekontrast på 40x forstørrelse. Hvite piler indikerer kornceller. Sorte piler indikerer ikke-neuronale celler. Sorte trekanter indikerer cellefragmenter. A) Kornceller fra kylling eksponert for 1  $\mu\text{M}$  lamotrigin. B) Kornceller fra kylling eksponert for 1  $\mu\text{M}$  valproat. C) Kornceller fra kylling eksponert for 500  $\mu\text{M}$  valproat.

### 3.8.2 Nevrittutvekst i kornceller fra rotte

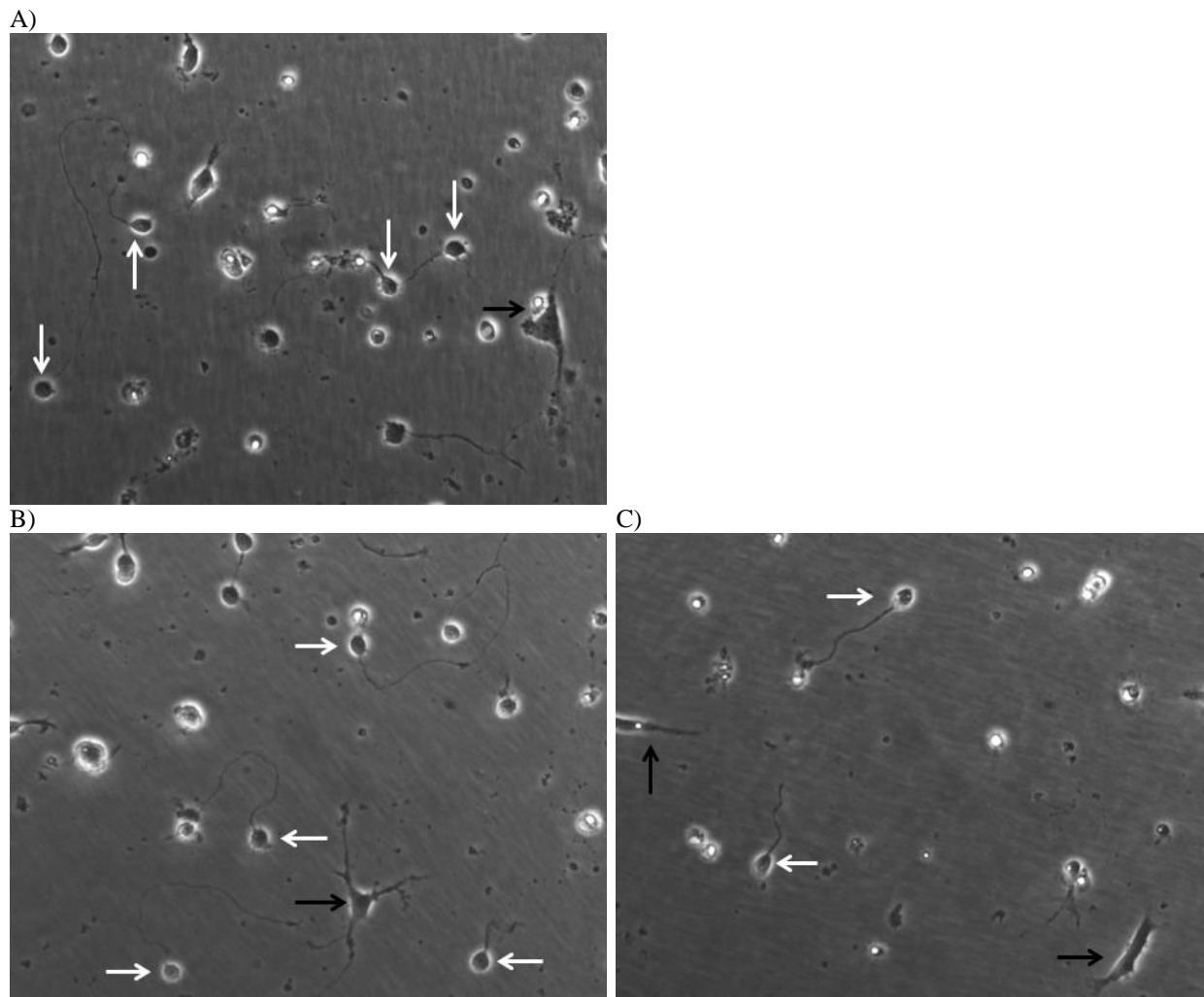
Rottekorncellene ble studert i et fluorescensmikroskop 24 og 96 timer etter eksponering, og det ble tatt bilder av cellene under fasekontrast med 40x forstørrelse. Det ser ut til at cellene er i ferd med å dø etter 96 timer (figur 3.20 B). Cellene ble platet ut med halv tetthet, og da overlever de vanligvis ikke like lenge som på vanlig tetthet; og vil dø etter en viss tid. Morfologisk analyse ble derfor gjort etter 24 timer for resten av studien.



**Figur 3.20 Kornceller fra rotte – valg av tidspunkt for morfologisk analyse**

Bilder ble tatt under fasekontrast på 40x forstørrelse. Hvite piler indikerer kornceller. A) Ubehandlede kornceller fra rotte 24 timer etter utplating. B) Ubehandlede kornceller fra rotte 96 timer etter utplating.

Korncellene fra rotte ble eksponert for 1  $\mu\text{M}$  lamotrigin, 1  $\mu\text{M}$  valproat og 500  $\mu\text{M}$  valproat. Det var ikke mulig å se noen overbevisende effekt på nevruttvekst for celler eksponert for 1  $\mu\text{M}$  lamotrigin og 1  $\mu\text{M}$  valproat sammenlignet med ubehandlede celler (figur 3.21 A og B). Det kan se ut som 500  $\mu\text{M}$  valproat påvirker cellene i større grad, ved færre celler i synsfeltet og mindre nevruttvekst (figur 3.21 C).



**Figur 3.21 Kornceller fra rotte eksponert for lamotrigin og valproat**

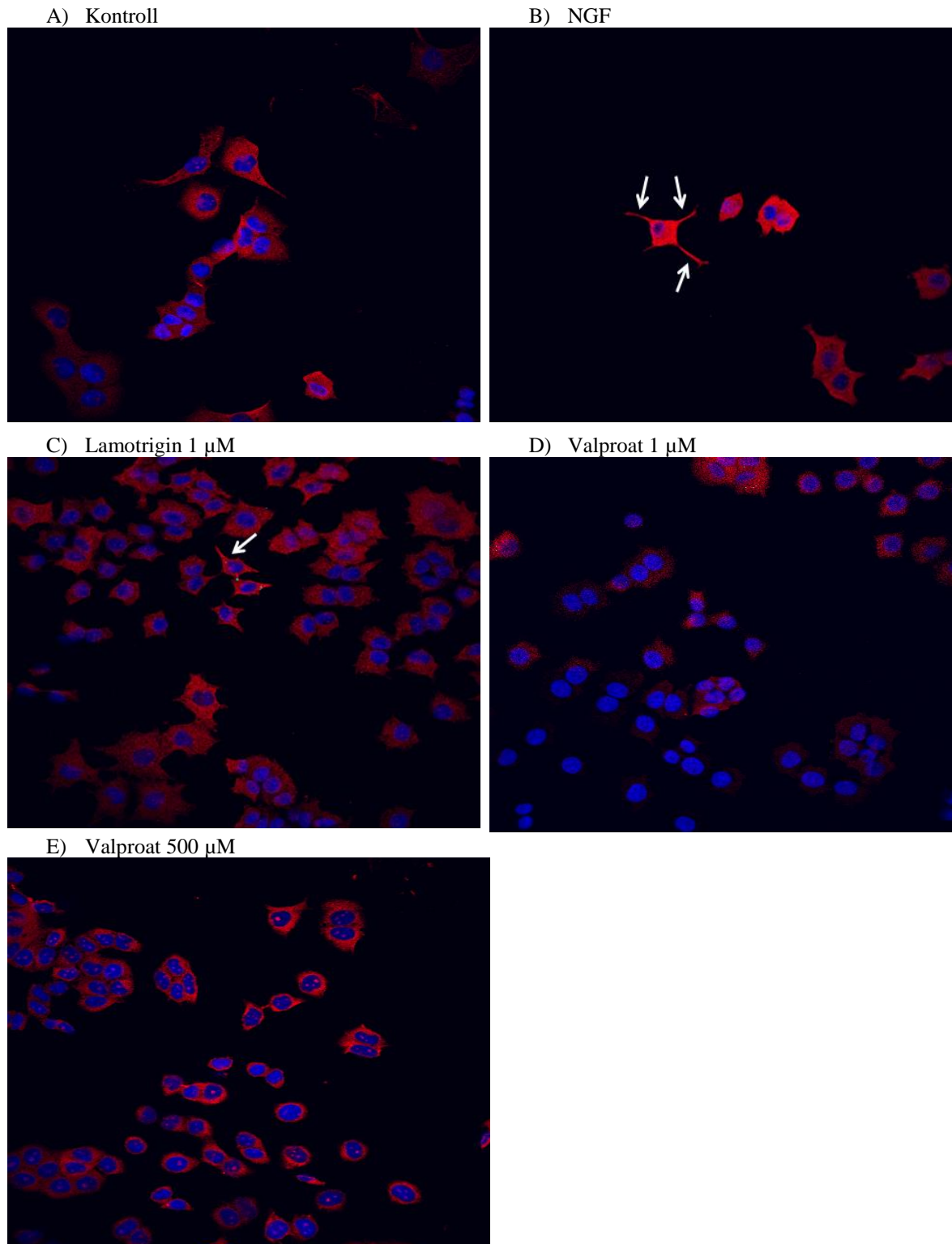
Bilder ble tatt 24 timer etter eksponering under fasekontrast med 40x forstørrelse. Hvite piler indikerer kornceller. Sorte piler indikerer ikke-neuronale celler. A) Kornceller fra rotte eksponert for 1  $\mu\text{M}$  lamotrigin. B) Kornceller fra rotte eksponert for 1  $\mu\text{M}$  valproat. C) Kornceller fra rotte eksponert for 500  $\mu\text{M}$  valproat.

## **3.9 Immunfarging ved bruk av nevrितtkarakteristiske antistoff**

Det var ønskelig å undersøke om immunfarging er en metode som kan brukes for å studere effekter på nevrितtutvekst. PC12-celler ble immunfarget 72 timer etter eksponering. Det ble farget med antistoff mot  $\beta$ -tubulin III og GAP-43, og kjernene ble farget med Hoechst. Cellene ble studert i konfokalmikroskop og det ble tatt bilder med 40x forstørrelse. Rottekornceller ble immunfarget 7 dager etter preparering og utplating. Disse cellene tålte ikke prosedyren for immunfarging, da alle cellene løsnet fra skålen og ble vasket bort (resultater ikke vist).

### **3.9.1 Immunfarging av PC12-celler med antistoff mot $\beta$ -tubulin III**

$\beta$ -tubulin III-antistoff farger cytoskjelettet i PC12-celler. På bildene av de immunfargede PC12-celler kan det se ut som cellene har endret morfologi og har kortere utløpere sammenlignet med bilder tatt under fasekontrast (figur 3.22).

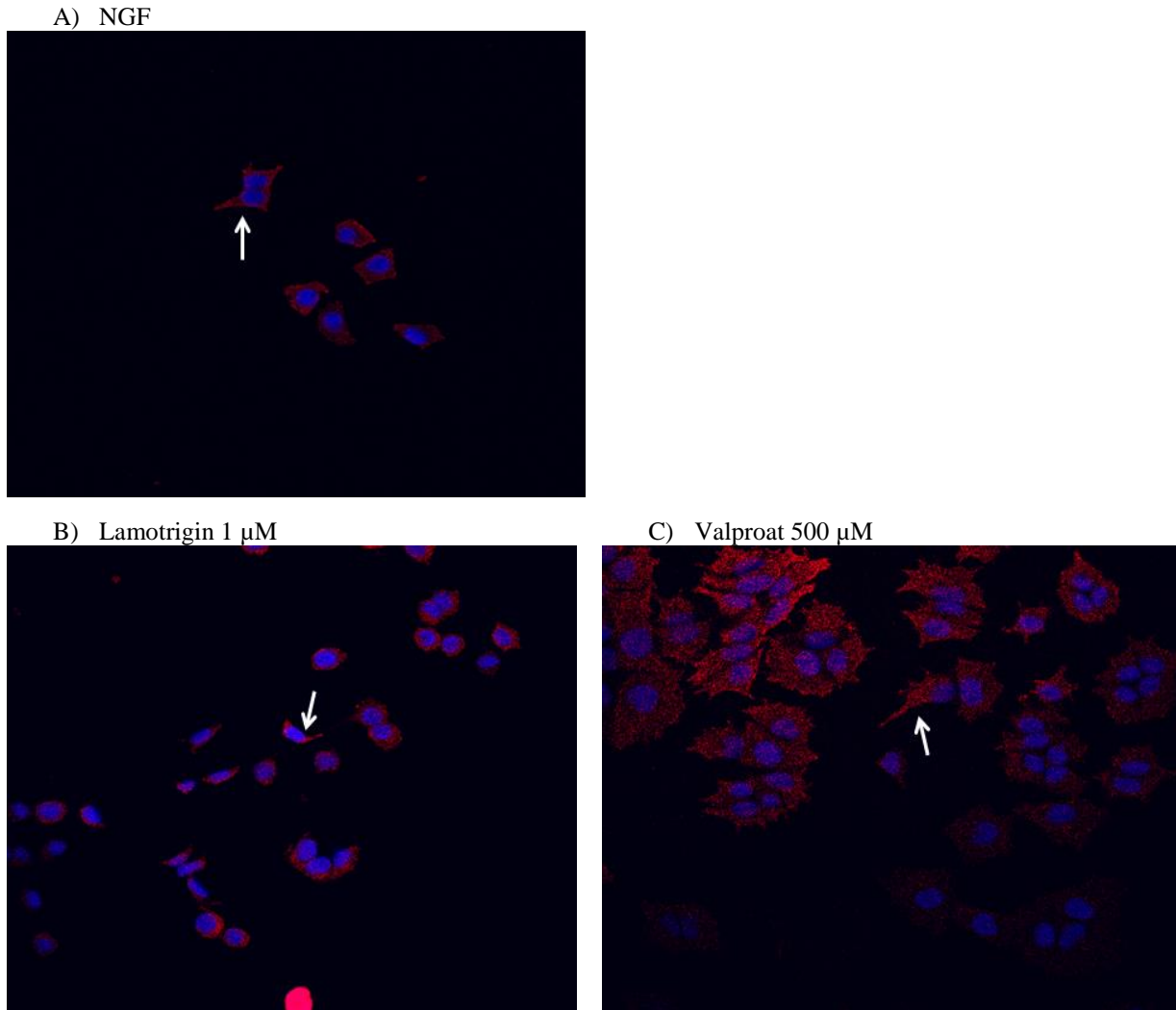


**Figur 3.22 Immunfarging av PC12-celler med  $\beta$ -tubulin III-antistoff**

PC12-celler ble immunfarget 72 timer etter eksponering og bilder ble tatt i konfokalmikroskop med 40x forstørrelse. Det ble farget med antistoff mot  $\beta$ -tubulin III og benyttet Cy3 sekundærantistoff (rødt). Kjernene ble farget med Hoechst (blått). Hvite piler indikerer celler med nevrer. A) Ubehandlede PC12-celler brukt som kontroll. B) PC12-celler eksponert for 50 ng/ml NGF. C) PC12-celler eksponert for 1  $\mu\text{M}$  lamotrigin. D) PC12-celler eksponert for 1  $\mu\text{M}$  valproat. E) PC12-celler eksponert for 500  $\mu\text{M}$  valproat.

### 3.9.2 Immunfarging av PC12-celler antistoff mot GAP-43

Immunfarging med GAP-43-antistoff viste liknende resultater som farging med  $\beta$ -tubulin III-antistoff (figur 3.23). Også i dette forsøket kan det se ut som de immunfargede cellene har kortere utløpere sammenlignet med celler som ikke har blitt immunfarget.



**Figur 3.23 Immunfarging av PC12-celler med GAP-43-antistoff**

PC12-celler ble immunfarget 72 timer etter eksponering og bilder ble tatt i konfokalmikroskop med 40x forstørrelse. Det ble farget med antistoff mot GAP-43 og benyttet Cy3 sekundærantistoff (rødt). Kjernene ble farget med Hoechst (blått). Hvide piler indikerer celler med nevritter. A) Ubehandlete PC12-celler brukt som kontroll. B) PC12-celler eksponert for 50 ng/ml NGF. C) PC12-celler eksponert for 1  $\mu$ M lamotrigin. D) PC12-celler eksponert for 1  $\mu$ M valproat. E) PC12-celler eksponert for 500  $\mu$ M valproat.



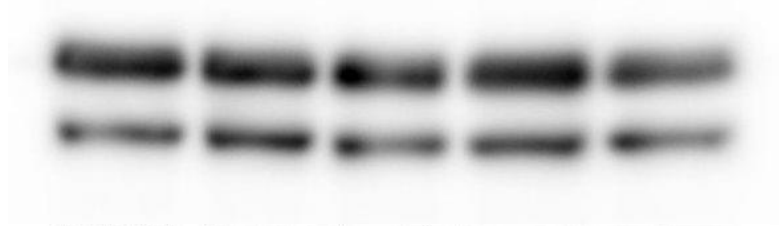
## 3.10 Westernblotting ved bruk av utviklingsmarkører

PC12-celler ble høstet til westernblotting 72 timer etter eksponering, og det ble tilsatt antistoff mot lamin A/C,  $\beta$ -III tubulin, PCNA,  $\beta$ -II spectrin og GAP-43. Kornceller fra kylling ble høstet 24 timer etter eksponering, og det ble tilsatt antistoff mot lamin A/C,  $\beta$ -III tubulin og PCNA. Lamin er et kjerneprotein som finnes i alle celler, og ble benyttet som intern standard. Westernblotting må anses som en pilot grunnet få forsøk, og resultatene må tolkes med forsiktighet.

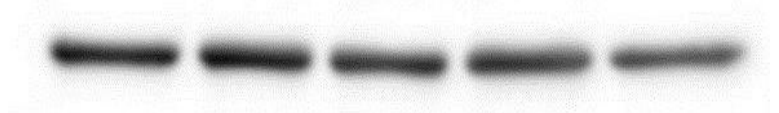
### 3.10.1 Westernblotting med prøver fra PC12-celler

Westernblotting med prøver fra PC12-celler gav spesifikke og tydelige bånd ved bruk av antistoff mot lamin A/C,  $\beta$ -tubulin III og PCNA (figur 3.24). Antistoff mot  $\beta$ -spectrin II gav spesifikke, men svake bånd (figur 3.25). Uttrykket av  $\beta$ -tubulin III ser ikke ut til å endres for noen av eksponeringene sammenlignet med ubehandlet kontroll, bortsett fra 500  $\mu$ M valproat som trolig skyldes redusert uttrykk av intern standard (figur 3.26). Uttrykket av PCNA øker for alle eksponeringene sammenlignet med ubehandlet kontroll (figur 3.27). Uttrykket av  $\beta$ -spectrin II øker for PC12-celler eksponert for NGF og valproat, men ikke for lamotrigin (figur 3.28). GAP-43 er et svært lite protein (23,6 kDa), og det var vanskelig å detektere ved bruk av westernblotting (resultater ikke vist).

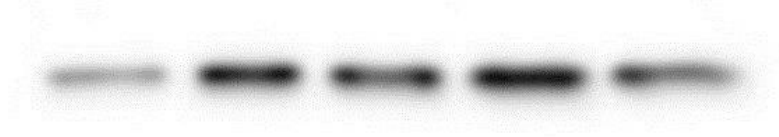
Lamin A/C  
75 kDa →  
70 kDa →



β-tubulin III  
55 kDa →



PCNA  
36 kDa →



Kontroll      NGF      LTG 1 μM      VPA 1 μM      VPA 500 μM

**Figur 3.24 Westernblotting av proteiner fra PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF, 1 μM lamotrigin, 1 μM valproat og 500 μM valproat i 72 timer før høsting. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Figuren viser proteinbånd for lamin A/C (intern standard), β-tubulin III og PCNA.

Lamin A/C  
75 kDa →  
70 kDa →



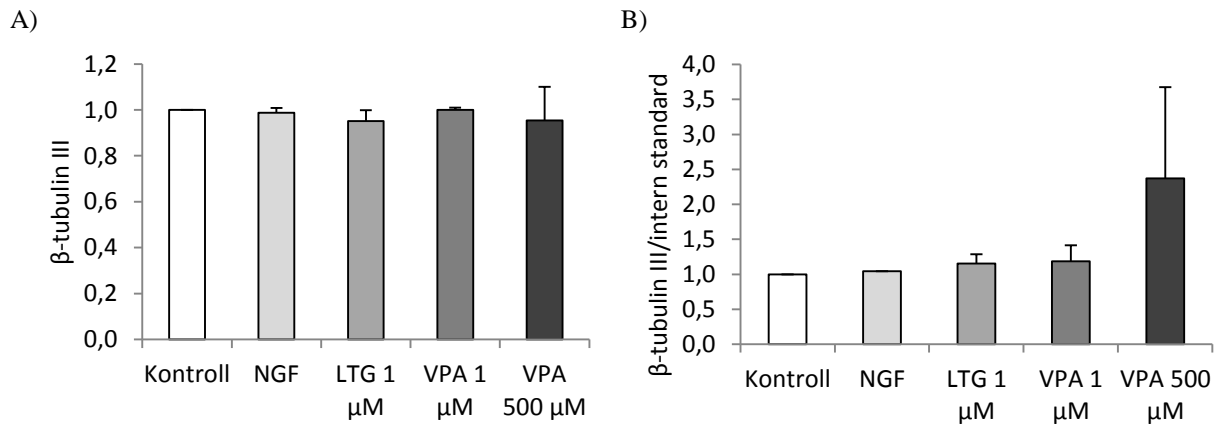
β-spectrin II  
280 kDa →



Kontroll      NGF      LTG 1 μM      VPA 1 μM      VPA 500 μM

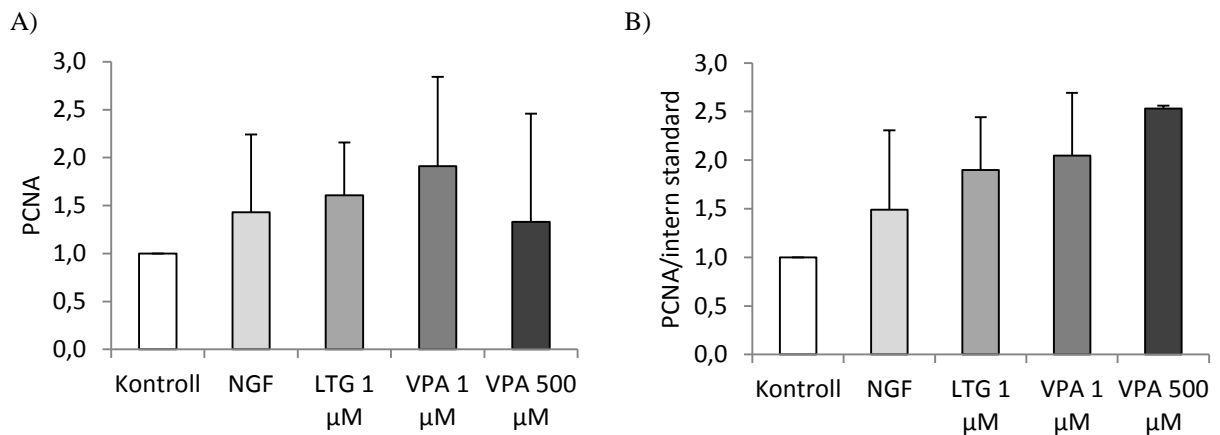
**Figur 3.25 Westernblotting av proteiner fra PC12-celler**

PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF, 1 μM lamotrigin, 1 μM valproat og 500 μM valproat i 72 timer før høsting. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Figuren viser proteinbånd for lamin A/C (intern standard) og β-pectrin II.



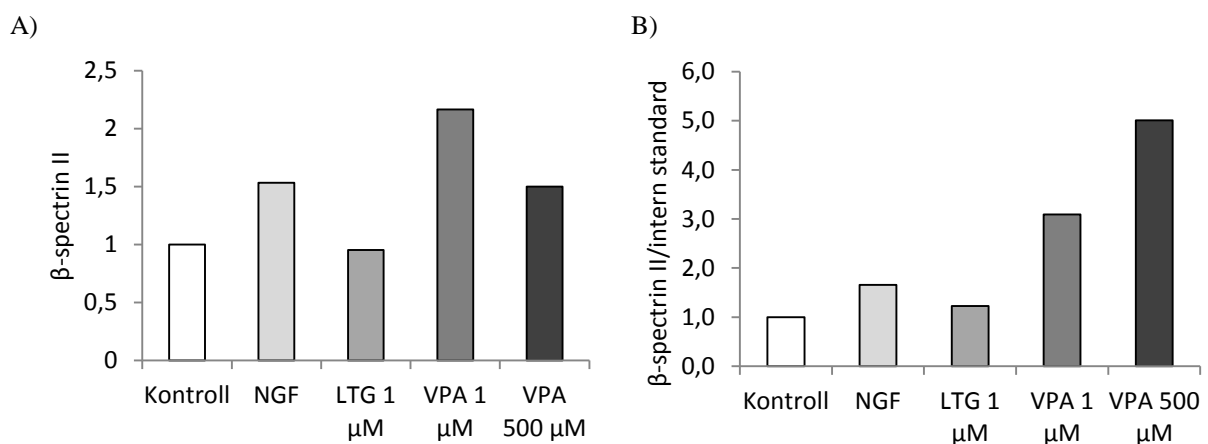
**Figur 3.26 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til  $\beta$ -tubulin III**

A) Båndstyrken til proteinbåndet til  $\beta$ -tubulin III etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler med spredning,  $n=2$ . B) Forholdet mellom båndstyrken til  $\beta$ -tubulin III og intern standard (lamin A/C) etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler med spredning,  $n=2$ . Figuren viser normaliserte gjennomsnittsverdier og spredning fra to uavhengige forsøk.



**Figur 3.27 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til PCNA**

A) Båndstyrken til proteinbåndet til PCNA etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler med spredning,  $n=2$ . B) Forholdet mellom båndstyrken til PCNA og intern standard (lamin A/C) etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler med spredning,  $n=2$ . Figuren viser normaliserte gjennomsnittsverdier og spredning fra to uavhengige forsøk.



**Figur 3.28 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til  $\beta$ -spectrin II**

A) Båndstyrken til proteinbåndet til  $\beta$ -spectrin II etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler,  $n=1$ . B) Forholdet mellom båndstyrken til  $\beta$ -spectrin II og intern standard (lamin A/C) etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler,  $n=1$ . Figuren viser normaliserte verdier fra ett forsøk.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.26 A og B**

<b>Eksponering</b>	<b>Bånd- bakgrunn <math>\beta</math>-tubulin III</b>	<b>Spredning*</b>	<b>Bånd- bakgrunn intern standard</b>	<b>Spredning*</b>	<b>Antall forsøk</b>
Kontroll	3314852	307706	2057617	1251414	2
NGF 50 ng/ml	3265167	231243	1978288	1233240	2
Lamotrigin 1 $\mu$ M	3167261	449635	1775638	1150021	2
Valproat 1 $\mu$ m	3311878	277308	2027742	1463359	2
Valproat 500 $\mu$ M	3207503	778848	1373982	1132526	2

\*Spredning måles ved å trekke gjennomsnittsverdien fra den høyeste verdien.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.27 A og B**

<b>Eksponering</b>	<b>Bånd- bakgrunn PCNA</b>	<b>Spredning*</b>	<b>Bånd- bakgrunn intern standard</b>	<b>Spredning*</b>	<b>Antall forsøk</b>
Kontroll	1330074	166409	2057617	1251414	2
NGF 50 ng/ml	1768532	838285	1978288	1233240	2
Lamotrigin 1 $\mu$ M	2043830	467102	1775638	1150021	2
Valproat 1 $\mu$ m	2387614	919594	2027742	1463359	2
Valproat 500 $\mu$ M	1675766	528261	1373982	1132526	2

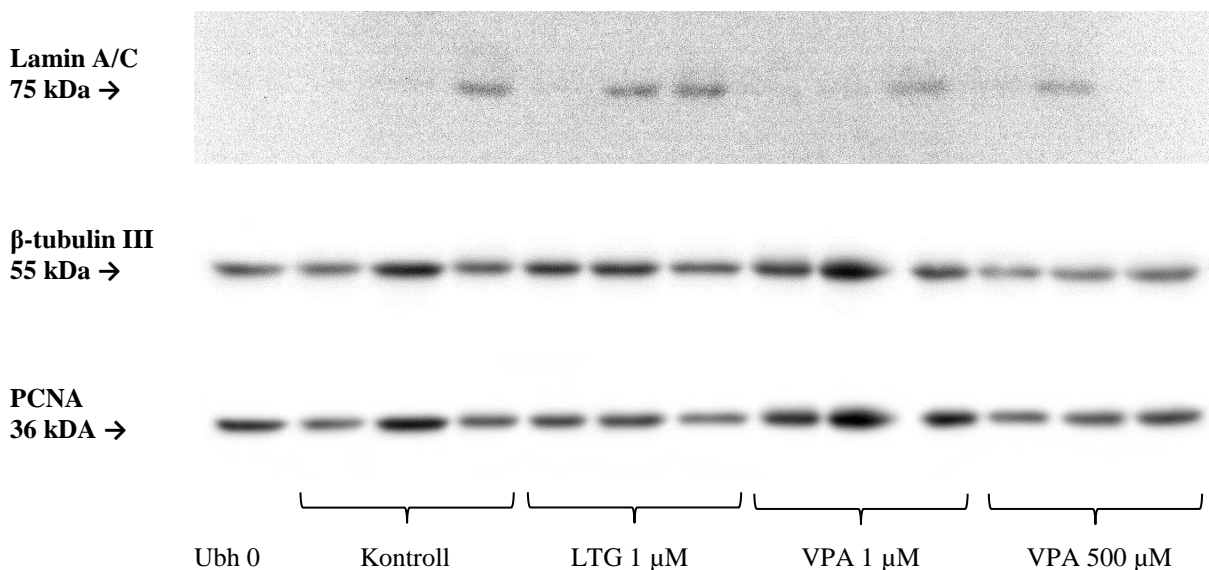
\*Spredning måles ved å trekke gjennomsnittsverdien fra den høyeste verdien.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.28 A og B**

<b>Eksponering</b>	<b>Bånd-bakgrunn <math>\beta</math>-spectrin II</b>	<b>Bånd-bakgrunn intern standard</b>	<b>Antall forsøk</b>
Kontroll	82774	806203	1
NGF 50 ng/ml	126943	745048	1
Lamotrigin 1 $\mu$ M	78899	625617	1
Valproat 1 $\mu$ m	179200	564383	1
Valproat 500 $\mu$ M	124153	241456	1

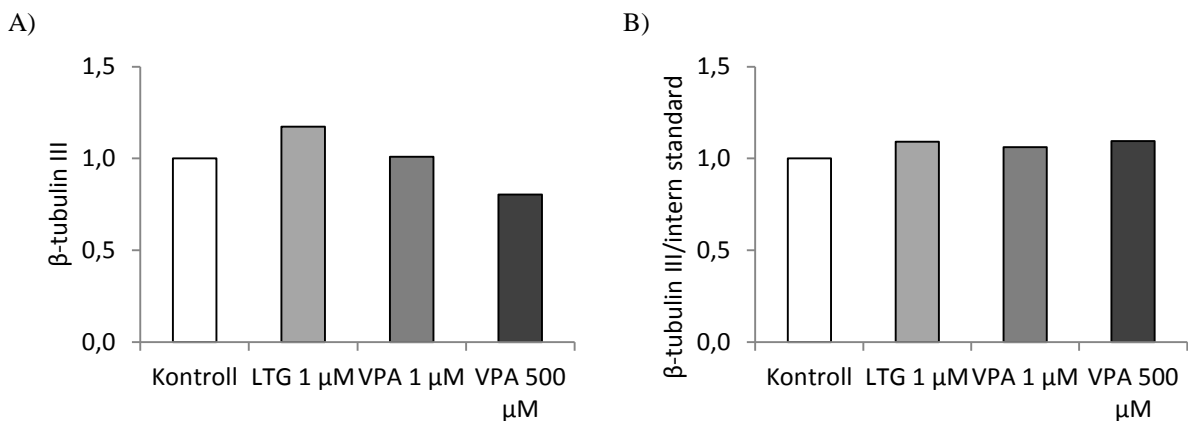
### 3.10.2 Westernblotting med prøver fra kyllingkornceller

Ved westernblotting med prøver fra kyllingkornceller ble det spesifikke og tydelige bånd ved bruk av antistoff mot  $\beta$ -III tubulin, og antistoff mot PCNA gav spesifikke, men svake bånd (figur 3.29). Antistoff mot lamin A/C gav spesifikke, men svært svake bånd, og det ble ikke detektert proteinbånd for alle eksponeringene. Det var ikke mulig å detektere noen forskjell mellom de ulike eksponeringene ved bruk av antistoff mot  $\beta$ -tubulin III (figur 3.30). Det var en liten økning i uttrykket av PCNA for celler eksponert for valproat sammenlignet med ubehandlet kontroll (figur 3.31).



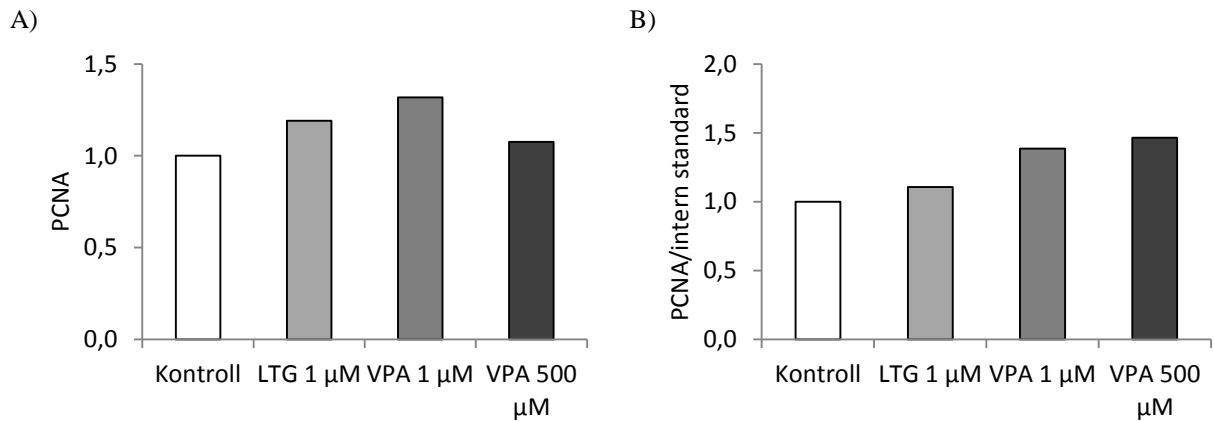
**Figur 3.29 Westernblotting av proteiner fra kyllingkornceller**

Kyllingkornceller ble eksponert for 1  $\mu$ M lamotrigin, 1  $\mu$ M valproat og 500  $\mu$ M valproat i 24 timer før høsting. Ubehandlete celler ble brukt som kontroll, og det ble tatt en ubehandlet nullprøve 2 timer etter utplating (Ubh 0). Figuren viser proteinbånd for lamin A/C (intern standard),  $\beta$ -tubulin III og PCNA.



**Figur 3.30 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til  $\beta$ -tubulin III**

A) Båndstyrken til proteinbåndet til  $\beta$ -tubulin III etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler,  $n=1$ . B) Forholdet mellom båndstyrken til  $\beta$ -tubulin III og intern standard (lamin A/C) etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i piksler,  $n=1$ . Figuren viser normaliserte verdier fra ett forsøk, for båndene som viste intern standard. Det vises normaliserte gjennomsnittsverdier for de to båndene som viste 1  $\mu$ M lamotrigin.



**Figur 3.31 Grafisk fremstilling av westernbåndstyrken til PCNA**

A) Båndstyrken til proteinbåndet til PCNA etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i pikslers, n=1. B) Forholdet mellom båndstyrken til PCNA og intern standard (lamin A/C) etter at bakgrunnen er trukket fra, målt i pikslers, n=1. Figuren viser normaliserte verdier fra ett forsøk, for båndene som viste intern standard. Det vises normaliserte gjennomsnittsverdier for de to båndene som viste 1 µM lamotrigin.

### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.30 A og B

Eksponering	Bånd-bakgrunn	Spredning*	Bånd-bakgrunn	Spredning*	Antall forsøk
	$\beta$ -tubulin III		intern standard		
Kontroll	833985		17602		1
Lamotrigin 1 µM	978509	134228	19079	868	1
Valproat 1 µM	842390		16748		1
Valproat 500 µM	670842		12936		1

\*Spredning måles ved å trekke gjennomsnittsverdien fra den høyeste verdien.

### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.31 A og B

Eksponering	Bånd-bakgrunn	Spredning*	Bånd-bakgrunn	Spredning*	Antall forsøk
	PCNA		intern standard		
Kontroll	233186		17602		1
Lamotrigin 1 µM	277774	27859	19079	868	1
Valproat 1 µM	307402		16748		1
Valproat 500 µM	250820		12936		1

\*Spredning måles ved å trekke gjennomsnittsverdien fra den høyeste verdien.

# 4 Diskusjon

## 4.1 Diskusjon av metoder

### 4.1.1 Valg av cellemodeller

I denne oppgaven ble det benyttet PC12-celler og kornceller fra lillehjernen hos kylling og rotte som modeller for å studere nevronal utvikling. PC12-celler er en klonet nevronal cellelinje med opphav i feokromocytom i binyrene hos rotte (Greene and Tischler 1976). En cellelinje er et generelt begrep som brukes om populasjoner av celler i kultur som kan opprettholdes over lengre tid (Radio and Mundy 2008). PC12-celler er i utgangspunktet kreftceller, og fenotypen vil ikke helt presist kunne etterligne nevroners fysiologiske egenskaper. Nevrittene kan for eksempel ikke karakteriseres som dendritter og aksoner, og cellene har ikke funksjonelle synapser (Radio, Freudenrich et al. 2010). Effekter i cellelinjer er derfor ikke nødvendigvis de samme som i primære nevroner eller *in vivo*. Det er mulig å kontrollere differensiering av PC12-celler med NGF, uten at denne kreves for at cellelinjen skal opprettholdes eller overleve (Fujita, Lazarovici et al. 1989). Differensierende PC12-celler uttrykker NGF-reseptorene TrkA og p75NRT, og har natrium-, kalium- og kalsiumkanaler (Shafer and Atchison 1991). Dette gjør at PC12-celler er en egnet modell for å studere effekter av NGF, lamotrigin og valproat.

Primære nevronale cellekulturer består av celler som kommer fra vev i nervesystemet, og det gjør at slike celler opprettholder mange av egenskapene til nevroner, inkludert funksjonelle dendritter og aksoner (Radio, Freudenrich et al. 2010). Dette gjør at man har mulighet til å undersøke og sammenligne dendrittisk og aksonal nevrutvekst. Siden denne modellen er mer lik nevroner *in vivo*, kan effekter sett i kornceller lettere relateres til mennesker.

Kornceller fra lillehjernen har natrium- (Diwakar, Magistretti et al. 2009) og kalsiumkanaler (Moran, Lin et al. 1991), og er derfor godt egnet for å studere effekter av lamotrigin og valproat.

## 4.1.2 Valg av eksponeringer

NGF er en kjent initiator av differensiering i PC12-celler (Fujita, Lazarovici et al. 1989) og ble benyttet som positiv kontroll. BDNF induserer blant annet nevruttvekst i kornceller (Segal, Pomeroy et al. 1995), så det ble undersøkt om denne også kunne fungere som positiv kontroll i PC12-celler. Lamotrigin og valproat ble valgt fordi det er to av de mest brukte antiepileptika, og som derfor ofte administreres til gravide kvinner. Det er tidligere vist at tilsats av antistoff mot BDNF hindrer nevruttvekst i kornceller (Segal, Pomeroy et al. 1995), noe som tyder på at BDNF har betydning for mekanismene bak nevruttvekst. Caspaser sin rolle i nevronal differensiering har tidligere blitt undersøkt ved bruk av PC12-celler, der det ble observert en forbigående økning i aktivitet av caspase-3 etter utplating av cellene (Rohn, Cusack et al. 2004). Det har blitt foreslått at caspaser spiller en viktig rolle i reorganisering av cytoskjelettet, noe som kreves for at nevruttvekst skal kunne finne sted (Westphal, Sytnyk et al. 2010). Effekt av BDNF-antistoff og caspase-3-hemmer på nevruttvekst induert av NGF, BDNF, lamotrigin og valproat ble derfor undersøkt.

I PC12-celler ble det først valgt å gjøre undersøkelser med konsentrasjoner under, over og i det terapeutiske området. Det ble valgt å gjøre ytterligere analyser i PC12-celler og kornceller fra kylling og rotte med én konsentrasjon av lamotrigin og to konsentrasjoner av valproat. Konsentrasjonene ble valgt i henhold til terapeutisk konsentrasjon i hjernen og observert effekt på nevruttvekst i PC12-celler. Terapeutisk område for lamotrigin er en serumkonsentrasjon som ligger på 10-50  $\mu\text{M}$ , og konsentrasjonen er vist å være noe lavere i hjernen (Castel-Branco, Lebre et al. 2003). 1  $\mu\text{M}$  lamotrigin ligger nærmest konsentrasjonen i hjernen ved terapeutisk bruk, og det ble observert effekt på andel lange nevrutter ved bruk av denne konsentrasjonen. Terapeutisk område for valproat er en serumkonsentrasjon som ligger på 300-600  $\mu\text{M}$ , og konsentrasjonen er noe høyere i hjernen (Wieser 1994). 500  $\mu\text{M}$  valproat ligger i det terapeutiske området, og det ble observert effekt på andel lange nevrutter og nevruttlengde ved bruk av denne konsentrasjonen. Det ble i tillegg valgt å gå videre med en konsentrasjon av valproat som ligger under det terapeutiske området, da det ble observert effekt på nevruttvekst også ved bruk av denne konsentrasjonen. Siden valproat er en kjent teratogen, var det interessant å undersøke effekt av den laveste konsentrasjonen som var benyttet. En PC12-cellelinje (NS-1) har tidligere blitt brukt til å studere effekter av valproat på nevruttvekst, uten at noen effekter ble observert (Radio, Freudenrich et al. 2010). Det ble da benyttet sluttkonsentrasjoner opp til 100  $\mu\text{M}$ . PC12-celler er trolig mer robuste og hardføre



enn nevroner *in vivo*, og det kan tenkes at de krever høyere konsentrasjoner for at man skal kunne se en effekt på nevruttvekst. En studie har for eksempel vist at PC12-celler fanger opp effekter på nevruttvekst i færre tilfeller enn kornceller (Radio, Freudenrich et al. 2010). Det er tidligere vist en signifikant økning i nevruttvekst for 500  $\mu\text{M}$  og 1000  $\mu\text{M}$  valproat sammenlignet med kontroll for NGF-differensierende PC12-celler (van Bergeijk, Haastert et al. 2006). Dette kan tyde på at det kreves høyere konsentrasjoner av valproat for at en respons skal kunne observeres i PC12-celler. I denne oppgaven benyttes det sluttkonsentrasjoner mellom 1-2000  $\mu\text{M}$  valproat, noe som kan gi en større mulighet for å se respons. Kornceller fra lillehjernen har tidligere blitt brukt til å studere effekter av valproat på nevruttvekst, men det ble ikke observert noen endringer (Radio, Freudenrich et al. 2010). Det ble da benyttet sluttkonsentrasjoner opp til 100  $\mu\text{M}$  valproat. I denne oppgaven benyttes det sluttkonsentrasjoner på 1  $\mu\text{M}$  og 500  $\mu\text{M}$  valproat, noe som kan gi en større mulighet for å se respons.

En vanlig protokoll er å undersøke effekter av kjemikalier samtidig som differensiering induseres. På denne måten kan man få informasjon om effekt på både initiering av nevruttvekst og senere påvirkninger (Radio and Mundy 2008). Effekt av lamotrigin og valproat ble derfor undersøkt på både udifferensierte og på NGF-differensierende PC12-celler. Det er tidligere vist økt nevruttvekst for valproat i NGF-differensierende PC12-celler (van Bergeijk, Haastert et al. 2006), men det er ikke utført tilsvarende studier for lamotrigin.

### **4.1.3 Morfometrisk analyse i mikroskop**

Morfometrisk analyse i mikroskop er en metode som kan benyttes uten at man trenger mye avansert utstyr. Analysene kan gjøres på levende celler direkte fra mikroskopet eller på digitaliserte bilder av levende celler, uten behov for fiksering eller farging. Dette gjør at en morfometrisk analyse er relativt enkel å utføre. Metodene for bildetagnings og måling er imidlertid manuelle og vil derfor være tidkrevende å utføre. En slik analyse er i tillegg subjektiv, og det kan utgjøre en feilkilde hvis det registreres effekter man ønsker eller forventer å se. Faren for dette kan reduseres ved å blinde alle eksperimenter, noe som ble gjort i denne oppgaven. Blinding ble opprettholdt helt til alle analyser var utført, og dermed ble muligheten til å observere ønskede eller forventede funn nesten eliminert.

Til den morfometriske analysen av PC12-celler ble det valgt områder med spredt fordeling av celler. Dette ble gjort for lettere å kunne identifisere enkeltceller og måle deres nevrutter.

PC12-celler deler seg og blir mer tallrike etter hvert, og områdene som skulle analyseres måtte velges med omhu. Det kan være at celler som ligger alene har bedre plass til å differensiere enn celler som ligger tett. Dette kan utgjøre en feilkilde da det bevisst ble valgt områder med spredt fordeling av celler som skulle kunne analyseres nøyaktig. Sannsynligvis vil det ikke utgjøre en stor forskjell siden områder med spredt fordeling av celler ble valgt for alle de ulike eksponeringene.

Det var enklere å studere nevruttvekst i PC12-celler, sammenlignet med kornceller fra lillehjernen hos kylling. En ulempe ved bruk av primærceller, er at slike kulturer ofte består av en blandet nevronal populasjon (Radio, Freudrich et al. 2010). I tillegg til kornceller finnes det ikke-nevronale celler, slik som gliaceller. Gliaceller sender også ut utløpere, og det kan derfor være vanskelig å skille disse cellene fra kornceller. Utløpere og nevritter danner ofte kontakt med andre celler, og det kan oppstå kompliserte nettverk. En kvantitativ morfometrisk analyse med måling av nevrittelengder kan da bli svært utfordrende å utføre, men erfarne analytikere vil kunne skille de ulike celletypene fra hverandre. Proliferasjon av gliaceller kan unngås ved bruk av definert medium som hindrer vekst av glia, eller ved tilsetning av anti-mitotiske stoffer (Radio, Freudrich et al. 2010). Gliaceller har imidlertid en viktig funksjon, blant annet ved å regulere differensiering av nevroner (Blondel, Collin et al. 2000). Hindret proliferasjon av gliaceller kan derfor påvirke nevruttvekst i kornceller. I denne oppgaven ble det ikke tilsatt anti-mitotiske stoffer til korncellekulturene fra kylling og rotte, og kulturene bestod derfor av ulike celletyper.

Kornceller fra kylling ble platet ut ved vanlig og halv tetthet. Ved vanlig tetthet ( $1,7 \times 10^6$  celler/ml) var det svært mange celler i synsfeltet, og det var ikke mulig å skille de ulike cellene fra hverandre. Ved halv tetthet var cellene såpass spredt at det var mulig å skille ut enkeltceller og nevritter. Problemet med dette kan være at celletettheten er for lav, slik at korncellene ikke får dannet kontakt med andre celler. Da vil cellene dø etter kort tid, og de vil ikke kunne studeres over flere dager (Radio, Freudrich et al. 2010). Det ser ut til at andelen avlange og runde kornceller endrer seg over tid, ved at det er flere avlange kornceller tilstede etter 48 timer i forhold til 24 timer. De avlange cellene kan representere kornceller i et annet utviklingstrinn, eller kornceller som er i ferd med å dø. En morfologisk analyse av kornceller uten tilsetning av antimitotiske stoffer vil trolig være best å utføre 24 timer etter utplating ved halv tetthet. Det ser ut til at ikke-nevronale celler overlever bedre enn kornceller ved halv

tetthet, og slike celler vil dekke store deler av bunnen dersom en morfologisk analyse skal utføres 48 timer etter utplating.

Korncellekulturer fra lillehjernen hos rotte er renere enn den kulturen vi får fra kylling, noe som vil si at en større andel av cellene er nevronale. Tidligere protokoller har anslått at korncellekulturer fra rotte har en renhet på over 90 %, sammenlignet med kylling på rundt 80 % (Jacobs, Aden et al. 2006). Siden det ikke ble tilsatt noen anti-mitotiske stoffer til korncellekulturen fra kylling, er det anslått at denne vil ha en renhet på 45 % (Jacobs, Aden et al. 2006), noe som stemmer godt overens med resultatene fra mikroskopering i denne oppgaven. Korncellene fra rotte var enklere å undersøke morfologisk, og analysen ble mer nøyaktig. Det kan se ut til at kornceller fra rotte overlever bedre på halv tetthet enn kornceller fra kylling, og det vil trolig være mulig å studere cellene utover 24 timer. Grunnet rottekorncellekulturenes høye renhet, vil det trolig være mulig å utføre en morfometrisk analyse med flere ulike endepunkter slik som det har blitt gjort med PC12-celler. Jeg har ikke funnet noen studier hvor dette har blitt gjort, men automatiserte metoder for måling av total nevrittelengde har tidligere blitt benyttet (Radio, Freudenschuh et al. 2010).

Nevrittutvekst kontrolleres av flere ulike faktorer. Nevronet klargjør seg for nevruttvekst blant annet ved aktivering av transkripsjonsfaktorer (Goldberg 2004). Ytre faktorer, slik som nevrotrofiner og ekstracellulære molekyler, kan aktivere signaleringskaskader som fører til nevruttvekst (gjennomgått i: (Radio and Mundy 2008)). Elektrisk aktivitet ser ut til å spille en avgjørende rolle i nevruttvekst induisert av nevrotrofiner (Goldberg 2004). Regulering av nevruttvekst er komplisert, og det er derfor mange ulike prosesser som kan påvirkes. Effekter på genekspressjon, membranreseptorer, ionekanaler og intracellulær signalering kan føre til endret nevruttvekst (Radio and Mundy 2008). En morfometrisk analyse kan gi informasjon om ulike eksponeringer har effekt på nevruttvekst, men kan ikke gi svar på hvilke prosesser som påvirkes.

#### **4.1.4 Valg av endepunkter til morfometrisk analyse i mikroskop**

I denne oppgaven ble det valgt ut fem endepunkter som skulle analyseres ved bruk av PC12-celler. Legemidler kan påvirke nevruttvekst på ulike måter, og ved bruk av flere endepunkter er det større sjanse for å oppdage eventuelle effekter. Utgangshypotesen var at ulike endepunkter kan gi informasjon om effekter på celler som befinner seg i ulike utviklingstrinn.

Andel celler med nevritter og antall nevritter per celle ble estimert ved manuell telling, mens en kalibrert målemetode ble benyttet for å estimere andel lange nevritter og nevrittelengder. Endringer i andel celler med nevritter, andel nevritter per celle og nevrittelengder er endepunkter som tidligere er beskrevet i litteraturen (gjennomgått i: (Ramm, Alexandrov et al. 2003, Radio and Mundy 2008)).

For endepunktene nevrittelengde per celle og nevrittelengde normalisert til ubehandlet ble det regnet ut et gjennomsnitt av alle nevrittelengdene for celler som har mottatt samme eksponering. Ulempen med å regne ut et gjennomsnitt er at noe informasjon kan gå tapt. For eksempel vil én veldig lang nevrutt drukne i et gjennomsnitt som også består av kortere nevritter. Måling av total nevrittelengde i stedet for gjennomsnittet kan muligens føre til at store forskjeller kommer bedre fram. Både gjennomsnittlig nevrittelengde per celle og total nevrittelengde per celle er tidligere benyttet for å måle effekter på nevruttvekst (gjennomgått i: (Ramm, Alexandrov et al. 2003, Radio and Mundy 2008)). I denne oppgaven ble det valgt å normalisere nevrittelengden for ulike eksponeringer til ubehandlet kontroll. Fordelen med dette er at man kan korrigere for eventuelle forskjeller som oppstår fra dag til dag. En slik normalisering viste seg også å gi et robust endepunkt med respons for den positive kontrollen NGF i alle tilfeller. Endepunktet andel lange nevritter gir informasjon om hvor stor del av nevruttene som kan defineres som lange. Begge disse endepunktene hadde en signifikant effekt av NGF i forhold til ubehandlet kontroll, og ble derfor benyttet videre i oppgaven..

#### **4.1.5 Måling av celledød**

Farging med trypanblå er en metode som er mye brukt for å måle celledød, og har tidligere blitt brukt til å estimere celledød i PC12-celler (Das, McElroy et al. 2001, Slotkin, MacKillop et al. 2007). Døde celler har ikke intakte og funksjonelle membraner og vil ta til seg farge fra omgivelsene, mens levende celler med intakte membraner forblir ufarget (Louis and Siegel 2011). Det er dermed enkelt å skille mellom døde (blå) og levende (ufargede) celler i et lysmikroskop. Metoden skiller ikke mellom nekrotiske og apoptotiske celler, men erfarne analytikere kan se forskjell ut fra cellenes morfologi. En ulempe ved bruk av denne metoden er at cellene farges og telles manuelt, og at det dermed er tidkrevende og kan utgjøre en feilkilde. I denne oppgaven ble cellene talt direkte fra skålen de var sådd ut i, og man har derfor ikke kontroll på tettheten. Celler som løsner fra underlaget vil ikke bli talt, og det kan føre til at celledøden underestimeres. Dette kan for eksempel være tilfelle ved telling av

celledød fra 1000  $\mu\text{M}$  lamotrigin og 2000  $\mu\text{M}$  valproat, der det tydelig var færre celler i skålen. I en tidligere masteroppgave (Moe 2010) ble grad av celledød sammenlignet for celler som hadde løsnet og celler som satt fast i bunnen etter eksponering for en caspaseaktivator. Det ble da vist lik grad av celledød for de to målingene, til tross for at mange celler hadde løsnet. En slik metode for måling av celledød kan likevel være aktuell for eksponeringer som fører til at mange celler løsner fra bunnen. Farging med propidium jodid (PI-farging) er en annen metode som ofte brukes for å måle celledød (Aras, Hartnett et al. 2008). Propidium jodid er et fargestoff som kun trenger gjennom membranen hos døde celler, og fluorescerer ved binding av DNA. Etter dobbelfarging med Hoechst, for å få et tall på totalt antall celler, kan fluorescerende celler (døde) telles og apoptotiske kjerner identifiseres i et fluorescensmikroskop. Celledød kan også kvantifiseres ved bruk av raskere og enklere metoder, slik som 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT) assay. Denne metoden er avhengig av reduktaseenzymer fra aktive mitokondrier, som bare finnes hos levende celler (Giordano, Hong et al. 2011). En feilkilde er at celledeling gir flere aktive mitokondrier, noe som kan føre til at celledøden overestimeres ved proliferasjon av celler. Farging med trypanblå ble valgt som metode fordi det er mulig å undersøke cellenes morfologi og identifisere ulike celletyper. Metoden er enkel å utføre og krever lite utstyr. Grad av celledød kan estimeres i et lysmikroskop, og krever ikke dyrt og avansert utstyr som fluorescensmikroskop eller plateleser.

#### **4.1.6 Immunfarging ved bruk av nevrितtkarakteristiske antistoff**

Immunfarging ble utført for å undersøke om det kan brukes som en alternativ metode til morfometrisk analyse i mikroskop. Cellene ble fiksert og farget med antistoff mot  $\beta$ -tubulin III og GAP-43, fordi disse proteinene er karakteristiske for nevrितter.  $\beta$ -tubulin er et av to proteiner som danner mikrotubuli i cytoskjelettet til celler, og uttrykket kan dermed tenkes å øke ved nevrितtutvekst. Det er tidligere vist at nivået av mikrotubuli korrelerer med økende nevrितtlengder i PC12-celler (Drubin, Feinstein et al. 1985), og det var derfor interessant å undersøke om dette kunne visualiseres ved bruk av immunfarging.  $\beta$ -tubulin III uttrykkes hovedsakelig i nervesystemet, og blir ansett som nevron-spesifikt. GAP-43 er et membranprotein som finnes på aksonale «growth cones» (Denny 2006). Det var derfor interessant å undersøke om GAP-43 i større grad uttrykkes ved nevrितtutvekst, og om uttrykket øker ved eksponeringer som gir lange nevrितter. Det er tidligere vist at uttrykket av GAP-43 øker ved utvikling eller regenerering av nevrितter, og ved nevrितtutvekst i PC12-celler

og primære kornceller fra lillehjernen (Denny 2006, Radio and Mundy 2008). Immunfarging av PC12-celler ved bruk av antistoff mot  $\beta$ -tubulin III og GAP-43 viste lignende resultater. Det ser ut til at antigenene som disse antistoffene reagerer med uttrykkes jevnt i hele cytoskjelettet, og det ble ikke observert økt uttrykk i nevrittene. Disse observasjonene er rent kvalitative, og det har ikke blitt gjort forsøk på å kvantifisere uttrykkene. Ved hjelp av bildebehandlingsprogrammer vil det være mulig å kvantifisere antall piksler, og sammenligne uttrykket i nevrittene med uttrykket i cellekroppen. Dette kan vise forskjeller som det ikke er mulig å se med det blotte øyet.

Immunfarging av celler fører til at nevrittene lettere kan skilles fra bakgrunnen slik at man kan bruke en automatisert metode for å måle nevrittutvekst (Radio and Mundy 2008). Det er tidligere vist at en automatisert metode for måling av nevrittutvekst viser samme biologi og gir like god presisjon som bruk av en manuell metode (Ramm, Alexandrov et al. 2003). Automatiserte metoder reduserer tidsbruk og eliminerer faren for systematiske skjevheter ved bruk av manuelle målemetoder. Fikseringen og alle vasketrinnene assosiert med prosedyren kan imidlertid føre til tap av celler (Radio and Mundy 2008). Korncellene fra rotte tålte ikke prosedyren for immunfarging, og alle cellene løsnet fra bunnen og ble vasket bort. Det er mulig at prosedyren må optimaliseres når det skal benyttes celler som ikke adhererer godt nok til underlaget. Tidligere erfaringer fra laben tilsier at korncellenes adhesjon til underlaget også kan være avhengig av batchnummeret til MatTek-skålene. PC12-cellen tålte prosedyren for immunfarging bedre, og alle cellene satt fortsatt festet til bunnen. Det så imidlertid ut til at cellenes morfologi var noe endret, og at cellenes utløpere var kortere sammenlignet med ikke-immunfargede celler. Det kan være at nevritter ikke sitter like godt fast i underlaget som selve cellekroppen, og at disse slites av under prosedyren. Det ser ut til at immunfarging av PC12-celler ikke er et godt alternativ til morfometrisk analyse av levende celler dersom det skal måles effekt på nevrittutvekst. Selve analysen kan bli lettere å gjennomføre ved bruk av en automatisert metode, men informasjon kan gå tapt. Et annet alternativ kan være benytte fluorescerende trackere som farger cellen uten behov for fiksering. Det er mulig å farge cytoskjelettet med for eksempel TubulinTracker™ (Life Technologies), ta fluorescensbilder og analysere disse ved hjelp av en automatisert metode. På den måten unngår man at cellenes morfologi endres, og man sparer tid på selve prosedyren for immunfarging. Ved immunfarging av PC12-celler var det også et problem at fargen raskt ble svekket ved mikroskopering, til tross for at prøvene ble håndtert mørkt etter tilsetning av sekundærantistoff. Dette problemet kan trolig unngås ved å bruke reagenser som forhindrer at

fluorescensen svekkes (ProLong®Antifade, Life Technologies). Slike reagenser vil i tillegg gjøre det mulig å lagre prøvene over lengre tid, med opprettholdt fluorescens.

#### **4.1.7 Westernblotting ved bruk av utviklingsmarkører**

Westernblotting er en etablert metode for å detektere og karakterisere proteiner (Kurien and Scofield 2006), og ble utført for å undersøke om funnene fra den morfometriske analysen av PC12-cellen kunne reproduseres. Antistoff mot lamin,  $\beta$ -tubulin III,  $\beta$ -spectrin II, PCNA og GAP-43 ble benyttet. Lamin er en komponent i membranen rundt kjernen til alle celler, og ble derfor benyttet som en intern standard. Intern standard brukes for å verifisere at det er satt på lik mengde protein i hver brønn, eller for å normalisere mengden detektert protein.

Båndstyrken til lamin kan påvirkes av for eksempel celledeltall i den høstede prøven, men skal i utgangspunktet ikke endres etter type behandling.  $\beta$ -tubulin er et cytoskjelettprotein som finnes i nevroner. Det er tidligere vist at det totale nivået av tubulin øker ved NGF-indusert nevrutvekst (Drubin, Feinstein et al. 1985), og det var derfor interessant å undersøke om dette kunne visualiseres ved bruk av westernblotting.  $\beta$ -spectrin er et cytoskjelettprotein som er lokalisert på innsiden av plasmamembranen til celler.  $\beta$ -spectrin er med på å bestemme blant annet formen på cellen, motstandsdyktigheten til membranen, og er viktig for lokalisering av transmembrane proteiner, organisering av organeller og proteintrafikk (Hayes, Scott et al. 2000). Det kan tenkes at uttrykket av  $\beta$ -tubulin III og  $\beta$ -spectrin II øker ved nevrutvekst, og spesielt ved økt andel lange nevrer. PCNA er et protein som kontrollerer replikasjon av DNA ved å forankre den katalytiske delen av DNA polymerase til DNA-tråden (Kelman 1997). Uttrykk av PCNA indikerer celledeling, og ble benyttet som markør for å studere cellenes proliferasjon. GAP-43 ble benyttet som en markør for differensierende nevroner, siden det tidligere er vist at uttrykket av GAP-43 øker ved nevrutvekst (Denny 2006, Radio and Mundy 2008).

Deteksjon av proteiner som er veldig små eller veldig store, slik som GAP-43 (23,6 kDa) og  $\beta$ -spectrin II (280 kDa), ved hjelp av westernblotting kan være problematisk. Små proteiner binder dårlig og har en tendens til å gå rett gjennom membranen og kan gi dårlige resultater (Kurien and Scofield 2006). Faren for dette kan imidlertid reduseres ved bruk av gradientgeler eller membraner med mindre porer. Retensjon av proteiner med høy molekylvekt er en annen begrensning ved westernblotting. Dette var trolig tilfelle ved bruk av antistoff mot  $\beta$ -spectrin II, der resultatet viste tykkere, u-formede bånd.  $\beta$ -spectrin II skal i tillegg gi to proteinbånd,

fullengde ved 280 kDa og kløyvet ved 190 kDa, men westernblottingen viste bare ett samlet bånd. I denne oppgaven ble det benyttet nitrocellulosemembraner, men PVDF-membraner ville trolig vært bedre egnet til deteksjon av GAP-43 og  $\beta$ -spectrin II (Kurien and Scofield 2006).

Westernblotting er en tidkrevende prosess, og et enklere og raskere alternativ kan være ELISA. ELISA er, i likhet med westernblotting, basert på antistoffbinding, men resultatene fra ELISA kan kvantifiseres mer nøyaktig. ELISA er i tillegg mer egnet til å detektere små og store proteiner. I denne oppgaven har westernblotting blitt utført på helcellelysat fra PC12-celler og kornceller fra lillehjernen. Helcellesysat består av en blanding av alle proteinene som finnes i celler. Cytoskjelettmarkører benyttes ofte til westernblotting for å detektere effekter på nevrutvekst. Små endringer i uttrykket av cytoskjelettproteiner som følge av nevrutvekst kan være av stor betydning lokalt. Ved bruk av helcellelysat kan slike endringer drukne i den totale mengden av proteinet. Den prosentvise endringen i uttrykket av et protein kan bli liten totalt sett, og vil kanskje ikke komme tydelig fram ved bruk av en lite sensitiv metode som westernblotting. Det er tidligere vist at det er mulig å isolere ulike fraksjoner av cellen, for eksempel membraner og «growth cones» (Westphal, Sytnyk et al. 2010). Ved bruk av isolerte «growth cones», vil cellekroppens bidrag til cytoskjelettproteinene elimineres. Dette kan føre til at effekter på nevrutvekst kommer tydeligere fram ved bruk av westernblotting.

## **4.2 Diskusjon av biologiske funn**

### **4.2.1 BDNF påvirker nevrutvekst i PC12-celler**

Det er tidligere vist at PC12-celler ikke uttrykker TrkB (Kaplan, Martin-Zanca et al. 1991), som er høyaffinitetsreseptoren for BDNF. Imidlertid er en avkortet isoform av denne reseptoren (TrkB.T1) detektert i PC12-celler (Kondo, Saruta et al. 2010). Denne reseptoren har ikke kinaseaktivitet, men ser ut til å regulere signalering gjennom TrkB (Carim-Todd, Bath et al. 2009). BDNF er i tillegg ligand for lavaffinitetsreseptoren p75NTR, som uttrykkes i PC12-celler (Wehrman, He et al. 2007). I litteraturen finnes det ulike teorier om BDNF-reseptorer i PC12-celler og det var derfor interessant å undersøke dette videre. BDNF gav en tendens til økning i andel lange nevrer og en signifikant økning i nevrerlengde i PC12-celler sammenlignet med ubehandlet kontroll. Økningen var imidlertid ikke like stor som for NGF-



eksponerte celler. Dette kan tyde på at PC12-celler har reseptorer som BDNF kan virke gjennom. Det kan være interessant å undersøke om PC12-celler uttrykker TrkB og BDNF ved å benytte antistoff mot TrkB og BDNF til westernblotting eller ELISA. En annen mulighet kan være å teste mRNA-nivået av TrkB og BDNF ved hjelp av *in situ*-hybridisering.

Det kan virke som eksponering for BDNF fører til at det sendes ut flere og kortere nevritter (Namekata, Watanabe et al. 2012), sammenlignet med eksponering for NGF. Det ble derfor undersøkt effekt av BDNF og NGF på antall nevritter per celle. Det ble observert at BDNF gir et høyere antall nevritter per celle sammenlignet med NGF. Det er interessant at BDNF ikke gir like lange nevritter som NGF, men at det dannes flere korte. Dette kan tyde på at BDNF påvirker initiering av nevruttvekst, mens NGF er viktigere for selve modningen av nevronene. PC12-celler kan også transfekteres med TrkB, og dette øker effekten av BDNF på nevruttvekst (Namekata, Watanabe et al. 2012). Nevrittene blir da lengre og tykkere, og cellekroppen øker i størrelse (Iwasaki, Ishikawa et al. 1997).

Når nevrotrofiner binder til Trk reseptorer fører det til dimerisering av reseptorer og kinaseaktivering. Signalering kan skje gjennom ulike veier, men signaler gjennom MAPK/ERK fremmer nevronal differensiering og overlevelse (Patapoutian and Reichardt 2001). Det er trolig gjennom denne signalveien at BDNF induserer nevruttvekst. Det er vist at kornceller under utvikling responderer på BDNF, mens modne nevroner svarer bedre på andre nevrotrofiner (Segal, Pomeroy et al. 1995). Det kan derfor være interessant å undersøke effekt av BDNF i kornceller fra lillehjernen hos kylling, da disse cellene fortsatt er under utvikling. En annen mulighet kan være å teste hvilken effekt TrkB-hemmere eller antistoff mot BDNF vil ha i kornceller.

BDNF signaler er knyttet til økt nevronal eksitabilitet, trolig gjennom en positiv feedback mekanisme (Murray and Holmes 2011). BDNF øker blant annet eksitatorisk (glutamaterg) synaptisk transmisjon, og reduserer inhibitorisk (GABAerg) synaptisk transmisjon (Binder 2004). På grunn av dette har BDNF blitt assosiert med utvikling av epilepsi. Uttrykket av BDNF øker i hippocampus etter epileptiske anfall og BDNF knockout mus har vist redusert tendens til epileptiske anfall (Murray and Holmes 2011). Eksogen tilførsel av BDNF er vist å ha anti-epileptiske egenskaper, trolig på grunn av nedregulering av TrkB og redusert følsomhet for TrkB (Pezet and Malcangio 2004). Det ser ut til at endogent BDNF kan føre til utvikling av epilepsi, mens eksogen tilførsel av BDNF kan ha motsatt effekt. TrkB partielle agonister er tidligere foreslått som en potensiell behandling av epilepsi (Tsai 2006). En partiell TrkB

agonist vil fungere som en antagonist ved overfløydige mengder av agonisten BDNF. Dette vil dermed redusere endogen BDNF signalering gjennom TrkB. Hemming av TrkB har også vært foreslått i behandling av sykdommer assosiert med økt TrkB aktivering, slik som epilepsi (Boulle, Kenis et al. 2012). I denne oppgaven benyttes det cellemodeller for å studere effekter av antiepileptika på nevronal utvikling. BDNF spiller en viktig rolle i utviklingen av nervesystemet og har i tillegg blitt assosiert med utviklingen av epilepsi. Det var derfor interessant å inkludere BDNF i denne oppgaven, for å studere effekter på nevruttvekst.

#### **4.2.2 Lamotrigin og valproat påvirker nevruttvekst i PC12-celler**

Det er ikke gjort så mange studier på effekt av lamotrigin på nevruttvekst, men eksponering for lamotrigin har tidligere ikke vist noen effekt på nevruttvekst i en nevroblastom cellelinje fra mennesker (Di Daniel, Mudge et al. 2005). Resultatene fra denne oppgaven viser imidlertid at lamotrigin kan ha effekt på nevruttvekst i PC12-celler. Det ser ikke ut til at lamotrigin alene har noen effekt på nevruttvekst i PC12-celler før konsentrasjonen kommer langt over terapeutisk område. På differensierende celler er det imidlertid vist effekt på nevruttlengde allerede ved 1  $\mu\text{M}$  lamotrigin. Ved tilsats av NGF blir det nesten en fordobling av andel lange nevrutter for celler eksponert for 1  $\mu\text{M}$  og 1000  $\mu\text{M}$  lamotrigin, men tendensen er lavere for de andre konsentrasjonene. Påvirkningen på andel lange nevrutter og på nevruttlengde ser ut til å være kvalitativt forskjellig. På nevruttlengde er det ingen åpenbar synergistisk effekt mellom lamotrigin og NGF, og det er mindre tilleggseffekt av lamotrigin. 1  $\mu\text{M}$  og 500  $\mu\text{M}$  lamotrigin er imidlertid signifikant forskjellig fra ubehandlet kontroll, og det dannes en bifasisk form i dose-respons-forløpet. Lamotrigin har en kompleks virkningsmekanisme og det kan hende at det er ulike mekanismer som slår til ved ulike konsentrasjoner. Det kan også være at ulike konsentrasjoner av lamotrigin har ulike affiniteter for eksempelvis ionekanaler. Det er imidlertid disse to konsentrasjonene som har mest spredning på dette endepunktet, og det kan være noen målinger som trekker opp gjennomsnittet. Lamotrigin gir en tendens til økning i nevruttlengde til og med doser på 500  $\mu\text{M}$ , men ved 1000  $\mu\text{M}$  reduseres nevruttlengden. Det er trolig fordi denne konsentrasjonen er toksisk, noe som også ble observert ved telling av celledød.

Eksponering for valproat er tidligere vist å fremme nevruttvekst i en nevroblastom cellelinje (Yuan, Huang et al. 2001) og i PC12-celler (van Bergeijk, Haastert et al. 2006). I denne

oppgaven er det vist lignende resultater i PC12-celler. Alle konsentrasjonene av valproat gav tendens til økt andel lange nevritter og økt nevrittelengde i forhold til ubehandlet og NGF-eksponert kontroll. Dette tyder på at valproat alene kan påvirke nevruttvekst, men at også NGF-indusert nevruttvekst forsterkes av valproat. Det ser ut til at effekten på andel lange nevritter og nevrittelengde når en metning ved doser opp til 500  $\mu\text{M}$  valproat. Nevritt lengden reduseres til samme nivå som kontroll ved eksponering for 2000  $\mu\text{M}$  valproat. Det er trolig fordi denne konsentrasjonen er toksisk, noe som mikroskopibilder viste en tendens til. Differansen mellom udifferensierte og differensierende PC12-celler er ganske jevn mellom de ulike konsentrasjonene av valproat med tanke på nevrittelengde. For andel lange nevritter varierer den mer, til tross for at det er mindre spredning i dataene på dette endepunktet. For 500  $\mu\text{M}$  valproat er differansen mellom udifferensierte og differensierende celler mye mindre enn differansen mellom kontrollene. 500  $\mu\text{M}$  gir en signifikant økning i andel lange nevritter for udifferensierte celler. Dette tyder på at 500  $\mu\text{M}$  valproat alene har større effekt på nevruttvekst sammenlignet med de andre konsentrasjonene. Tilsats av NGF har tendens til additiv effekt på nevrittelengde for alle konsentrasjoner av valproat, og på andel lange nevritter for 1  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  og 2000  $\mu\text{M}$  valproat.

PC12-celler uttrykker TrkA, som er høyaffinitetsreseptoren for NGF, og har natrium-, kalium- og kalsiumkanaler (Shafer and Atchison 1991). Udifferensierte PC12-celler er ikke elektrisk eksitabile fordi uttrykket av natrium- og kalsiumkanaler er relativt lavt. Ved tilsats av NGF til PC12-celler øker uttrykket av spenningsstyrte ionekanaler og cellene blir elektrisk eksitabile (Bouron, Becker et al. 1999). Natriumkanaler er blant annet involvert i nevronal signalering og kan påvirke nevronal utvikling og synapsedannelse (Catterall 2000). Kalsiumkanaler er involvert i mange cellulære funksjoner, for eksempel proliferasjon, differensiering, nevruttvekst, synapsedannelse og genekspresjon (Burgess and Noebels 1999). Både lamotrigin og valproat har effekt på spenningsstyrte natrium- og kalsiumkanaler (Jones and McNamara 2012). Disse ionekanalene kan derfor være involvert i mekanismene bak observert effekt på nevruttvekst i denne oppgaven.

Funnene i denne oppgaven tyder på at valproat og NGF kan ha en additiv effekt på nevruttvekst. Det kan kanskje forklares av at de delvis deler signalvei for induksjon av nevruttvekst. MAPK/ERK signalveien er tidligere vist å være involvert i nevronal differensiering mediert av NGF og BDNF (Di Daniel, Mudge et al. 2005), og det er også via denne veien valproat virker (Yuan, Huang et al. 2001). Nyere studier har foreslått en

nevroprotektiv rolle for valproat, som oppregulerer uttrykket av BDNF i rottehjerne (Castro, Gallant et al. 2005). Rotter eksponert for lamotrigin har økt uttrykk av BDNF i frontal cortex og hippocampus (Chang, Rapoport et al. 2009, Li, He et al. 2010). Hvis det er slik at valproat og lamotrigin øker uttrykket av BDNF, kan dette være en av veiene de induserer nevruttvekst gjennom. Det kan være interessant å undersøke legemidlene sammen med en TrkB-hemmer, for å se om dette reduserer nevruttveksten. Ved studier på rottehjerner under utvikling er det vist at langtidsbehandling med lamotrigin i høye doser og valproat i terapeutiske doser reduserer mRNA nivået av BDNF (Shi, Wang et al. 2010). Dette kan tyde på at lamotrigin og valproat har ulik påvirkning på uttrykket av BDNF i voksne hjerner og hjerner under utvikling. Det er tidligere vist at BDNF er viktig for kornceller under utvikling (Segal, Pomeroy et al. 1995). Hvis lamotrigin og valproat interfererer med BDNF, kan det være av betydning for nevronal utvikling. På bakgrunn av dette kan det være interessant å studere effekt av legemidlene med og uten BDNF i kornceller under utvikling og i PC12-celler.

For valproat ble det observert ulik effekt på nevruttlengde i to ulike eksperimenter. I dose-respons-eksperimentet med valproat var nevruttlengden lengre for 500  $\mu\text{M}$  valproat sammenlignet med 1  $\mu\text{M}$  valproat. For forsøk med BDNF-antistoff og caspase-3-hemmer, var resultatet motsatt. For dose-respons-eksperimentet nådde nevruttlengden en terskel fra 500  $\mu\text{M}$  til 1500  $\mu\text{M}$ , før den igjen ble redusert ved 2000  $\mu\text{M}$ . Spennet fra 1  $\mu\text{M}$  valproat til 500  $\mu\text{M}$  valproat er svært stort i forhold til spennet mellom 500  $\mu\text{M}$  og 2000  $\mu\text{M}$ , der intervallet øker med en eller en halv gang. Man ville fått en mer sann dose-respons kurve ved å for eksempel ha inkludert 100  $\mu\text{M}$  valproat. Grunnen til et motsatt resultat kan også være at PC12-cellers respons varierer mellom ulike batcher. Resultater som skal sammenlignes bør derfor fortrinnsvis gjøres på de samme PC12-cellene, som ikke avviker fra hverandre med mer enn 10-15 passasjer.

### **4.2.3 BDNF-antistoff og effekt på nevruttvekst i PC12-celler**

BDNF-antistoff gav ingen endring i nevruttvekst sammenlignet med ubehandlede PC12-celler, noe som tyder på at cellene kan regulere nevruttvekst gjennom andre signalveier. Antistoffet hadde ingen signifikant effekt på nevruttvekst induert av NGF eller BDNF. Det ble imidlertid observert størst reduksjon i nevruttvekst induert av NGF, noe som tilsynelatende kan tyde på at antistoffet ikke er spesifikt for BDNF. Det har imidlertid blitt

foreslått at nevrotrofiner kan påvirke hverandres aktivitet under nevronal utvikling (Thoenen 1995). Det er derfor mulig at uttrykket av BDNF kan reguleres av andre nevrotrofiske faktorer (Xiong, Futamura et al. 2002), muligens gjennom en feedback-mekanisme. Dersom NGF induserer BDNF, kan det være en av grunnene til antistoff mot BDNF gav størst reduksjon i nevruttvekst for NGF-eksponerte celler.

Grunnen til at BDNF-antistoff ikke påvirket nevruttvekst i PC12-celler eksponert for BDNF kan være fordi BDNF ble tilsatt i så høy konsentrasjon at effekten av antistoffet ble nøytralisert. BDNF ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 100 ng/ml, en konsentrasjon som tidligere er benyttet i litteraturen (Kondo, Saruta et al. 2010). BDNF-antistoff ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 3,33 µg/ml, en konsentrasjon som er vist å hemme biologisk aktivitet *in vitro*. Det ble tilsatt flere mol BDNF-antistoff enn BDNF, så antistoffet skulle kunne påvirke nevruttvekst induisert av BDNF. Selv om dette ikke ble observert, var det likevel ønskelig å undersøke om antistoffet kunne ha en effekt på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin og valproat. Dersom lamotrigin og valproat har virkningsmekanismer som fører til at det frigis mindre mengder BDNF lokalt, kan det hende at BDNF-antistoff vil påvirke dette.

Det ser ikke ut til at BDNF-antistoff har noen effekt på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for lamotrigin (avsnitt 3.5.2), men det ble observert en ikke-signifikant reduksjon i andel lange nevrutter og nevruttlengde for celler eksponert for valproat. Reduksjonen var størst for 500 µM valproat, og for andel lange nevrutter. Valproat fremmer MAPK/ERK signalveien (Yuan, Huang et al. 2001), som også fremmes av BDNF (Di Daniel, Mudge et al. 2005). Det kan derfor tenkes at antistoff mot BDNF kan hemme signalveien, og at det vil føre til redusert nevruttvekst i PC12-celler eksponert for valproat.

#### **4.2.4 Caspase-3-hemmer og effekt på nevruttvekst i PC12-celler**

Caspaser er proteolytiske enzymer som er mest kjent for sin rolle i apoptose. Det ser imidlertid ut til at caspaser kan ha viktige ikke-apoptotiske effekter, og de er blant annet involvert i proliferasjon og differensiering (Westphal, Sytnyk et al. 2010). Regulatorer av cellesyklus, slik som PCNA, er for eksempel substrater for caspase-3. Caspase-3 hemmer proliferasjon ved å hindre interaksjon mellom PCNA og DNA polymerase (Kuranaga and Miura 2007). Caspase-3 er også involvert i nevronal differensiering, noe som demonstreres

ved en midlertidig økning i caspase-3-aktivitet ved differensiering av PC12-celler (Rohn, Cusack et al. 2004).

I denne oppgaven ble det vist at caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk førte til en liten reduksjon i andel lange nevritter og nevrittelengde sammenlignet med ubehandlede PC12-celler, noe som tyder på at caspase-3 spiller en rolle for mekanismene bak nevrittutvekst i PC12-celler. Tilsats av caspase-3-hemmeren førte til en ikke-signifikant reduksjon i andel lange nevritter og nevrittelengde induisert av NGF, lamotrigin og valproat. Reduksjonen var størst for andel lange nevritter i celler eksponert for lamotrigin og valproat. Til tross for at resultatene ikke var signifikante kan dette tyde på at caspase-3 også kan være involvert i mekanismene som ligger bak nevrittutvekst induisert av NGF, lamotrigin og valproat. I en tidligere masteroppgave er det vist at caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk gav en forsinket nevrittutvekst i PC12-celler, med færre og kortere nevritter 24 og 48 timer etter eksponering for NGF (Bekkevold 2011). Det ble imidlertid ikke vist noen effekt av caspase-3-hemmeren på nevrittutvekst 72 timer etter eksponering. Resultatet fra denne oppgaven viser en ikke-signifikant reduksjon i nevrittutvekst 72 timer etter eksponering, men trolig kunne effekten vært større hvis analysene hadde blitt gjort på et tidligere tidspunkt.

Resultatene viser imidlertid at caspaser kan være involvert i andre fysiologiske funksjoner enn celledød. Caspase-3 er blant annet viktig for de morfologiske endringene som følger med differensiering av nevronale stamceller, og for dannelsen av aksonale «growth cones». For at nevrittutvekst skal kunne finne sted, kreves det at det skjer endringer i cytoskjelettet, som også omfatter nedbrytning. Nevronale celleadhesjonsmolekyler (NCAM) regulerer differensiering og synapsedannelse i sentralnervesystemet under utvikling, og synaptisk plastisitet hos voksne. I nevroner under utvikling akkumuleres NCAM i «growth cones» og induserer nevrittutvekst ved å fremme intracellulære signaleringskaskader, som blant annet involverer GAP-43. Akkumulering av NCAM fører i tillegg til aktivering av caspase-8 og caspase-3 og påfølgende kløyving av spektrin-nettverket som ligger på innsiden av membranen. En slik kløyving er nødvendig for remodelering av cytoskjelettet og initiering av NCAM-mediert nevrittutvekst (Westphal, Sytnyk et al. 2010). Det er vist at «growth cones» som mangler NCAM har redusert kløyving av  $\beta$ -spectrin II, og at kløyving av  $\beta$ -spectrin II hindres ved tilsats av caspase-8- eller caspase-3-hemmere. Dette styrker oppfatningen av at NCAM og caspaser spiller en viktig rolle i nevrittutvekst, og det kan være interessant å følge videre, for eksempel ved bruk av antistoff mot  $\beta$ -spectrin II.

#### 4.2.5 PCNA som markør for proliferasjon og $\beta$ -spectrin II som markør for nevruttvekst

PCNA er, som tidligere nevnt, involvert i celledeling, og ble derfor brukt som markør for prolifererende celler. Ved westernblotting av prøver fra PC12-celler ser det ut til at uttrykket av PCNA øker ved eksponering for NGF, lamotrigin og valproat sammenlignet med ubehandlet kontroll. Uttrykket av PCNA i kornceller øker ikke i betydelig grad ved eksponering for lamotrigin, men øker for NGF og begge konsentrasjonene av valproat. Kornceller utvikler seg i kultur til post-mitotiske celler som ikke kan dele seg (Stiles and Jernigan 2010). Siden PCNA er en markør for prolifererende celler, kan et økt uttrykk av PCNA bety at det er gliaceller som deler seg. Det er imidlertid vist at omtrent 15 % av nevronene i kyllingkorncellekulturer er prolifererende fem dager etter utplating (Aden, Paulsen et al. 2011). Det er rimelig å anta at en større andel av korncellene vil være prolifererende 24 timer etter utplating, noe som har blitt benyttet i denne oppgaven. Resultatene fra denne oppgaven kan tyde på at NGF, lamotrigin og valproat gir en økning i proliferasjon av PC12-celler og kornceller fra lillehjernen, men det er nødvendig å utføre flere forsøk. Ved bruk av westernblotting vil det være vanskelig å se om bidraget kommer fra kornceller eller astrocytter. Immunfarging med PCNA og NeuN kan være en mer egnet metode for å studere effekter på proliferasjon av kornceller.

Uttrykket av membranskjelettproteinene  $\beta$ -spectrin II ser ut til å øke for PC12-celler eksponert for NGF og valproat, men ikke for lamotrigin.  $\beta$ -tubulin III er også et cytoskjelettprotein, men uttrykket ser ikke ut til endres med ulike eksponeringer verken i PC12-celler eller kornceller fra kylling. Den høye søylen som viser økt uttrykk av  $\beta$ -tubulin III for PC12-celler eksponert for 500  $\mu$ M valproat skyldes trolig redusert uttrykk av intern standard.  $\beta$ -spectrin II er, i motsetning til  $\beta$ -tubulin III, mer assosiert med membranskjelettet (Westphal, Sytnyk et al. 2010), og uttrykket kan derfor tenkes å kunne endres mer ved flere og lengre nevrutter. Ved bruk av kornceller fra lillehjernen er det tidligere vist at fullengde  $\beta$ -spectrin II hovedsakelig uttrykkes i nevrutter, mens kløyvet  $\beta$ -spectrin II er mer assosiert med cellekroppen (Hayes, Scott et al. 2000). Dette tyder på at antistoff mot  $\beta$ -spectrin II kan være godt egnet som markør for nevruttvekst, både ved bruk av kornceller og PC12-celler. I denne oppgaven har det blitt gjort få forsøk med westernblotting, og resultatene må derfor tolkes med forsiktighet. Det ble imidlertid gjort interessante observasjoner, som det vil være aktuelt å forfølge videre.

### **4.3 Nytten av sikkerhetsfarmakologiske studier**

PC12-celler og kornceller fra lillehjernen hos kylling og rotte kan brukes som modeller i sikkerhetsfarmakologiske studier. Disse modellene kan benyttes for å avdekke uønskede effekter av legemidler som kan være av betydning for nevronal utvikling. Differensierende PC12-celler og kornceller i kultur etterligner nevroner under utvikling, og slike modeller kan derfor relateres til utviklingen av sentralnervesystemet hos mennesker. Legemidler kan påvirke prosesser som er viktige under utviklingen av sentralnervesystemet, slik som nevrutvekst og uttrykk av nevrotrifiner. Sikkerhetsfarmakologiske studier kan bidra til å identifisere antiepileptiske legemidler som i minst mulig grad påvirker prosesser som er viktige for nevronal utvikling, slik at disse legemidlene i større grad kan benyttes under svangerskapet.



## 5 Konklusjon

- PC12-celler er en egnet modell for å studere effekter av NGF, BDNF, lamotrigin og valproat på nevruttvekst. Andel lange nevritter og nevrittelengde er de mest robuste endepunktene for å måle disse effektene.
- Lamotrigin i terapeutiske konsentrasjoner gir økte nevrittelengder i PC12-celler, men endrer ikke andel lange nevritter i forhold til ubehandlet kontroll. I NGF-differensierende celler påvirker lamotrigin andel lange nevritter i større grad enn nevrittelengde.
- Valproat i terapeutiske konsentrasjoner gir økt andel lange nevritter og økte nevrittelengder i PC12-celler i forhold til ubehandlet kontroll. I NGF-differensierende celler påvirker valproat nevrittelengde i større grad enn andel lange nevritter.
- Kornceller fra lillehjerne hos kylling og rotte kan benyttes til å studere effekter av lamotrigin og valproat på nevruttvekst. På grunn av at korncellekulturer fra rotte har høyere renhet enn kylling, vil rottekornceller være foretrukket ved en morfometrisk analyse.
- Proteiner som kan tenkes å øke ved nevruttvekst, slik som  $\beta$ -spectrin II, kan brukes som markører for nevruttvekst ved bruk westernblotting eller immunfarging.
- Legemidler kan påvirke prosesser som er viktige under utviklingen av sentralnervesystemet. Sikkerhetsfarmakologiske studier som undersøker effekt på nevronal utvikling er et nødvendig bidrag for å hindre uønskede effekter av legemidler potensielt brukt under svangerskapet.

## 6 Litteraturliste

. "abcam.com." Retrieved 30.april, 2013, from

<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11403#B1>.

Adams, B., M. Sazgar, P. Osehobo, C. E. Van der Zee, J. Diamond, M. Fahnstock and R. J. Racine (1997). "Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy." The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience **17**(14): 5288-5296.

Aden, P., R. E. Paulsen, J. Mæhlen, E. M. Løberg, I. L. Goverud, K. Liestøl and J. Lømo (2011). "Glucocorticoids dexamethasone and hydrocortisone inhibit proliferation and accelerate maturation of chicken cerebellar granule neurons." Brain Research **1418**(0): 32-41.

Anthony, D. C., T. J. Montine, W. M. Valentine and D. G. Graham (2003). Toxic responses of the nervous system. Casarett and Doull's Essentials of Toxicology. C. D. Klaasen and J. B. Watkins. New York, McGraw-Hill: 233-251.

Apps, R. and M. Garwicz (2005). "Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing." Nature Reviews Neuroscience **6**(4): 297-311.

Aras, M. A., K. A. Hartnett and E. Aizenman (2008). "Assessment of cell viability in primary neuronal cultures." Current Protocols in Neuroscience **Chapter 7**: Unit 7 18.

Banach, R., R. Boskovic, T. Einarson and G. Koren (2010). "Long-term developmental outcome of children of women with epilepsy, unexposed or exposed prenatally to antiepileptic drugs: a meta-analysis of cohort studies." Drug Safety **33**(1): 73-79.

Barone, S., Jr., K. P. Das, T. L. Lassiter and L. D. White (2000). "Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods." Neurotoxicology **21**(1-2): 15-36.

- Bass, A., L. Kinter and P. Williams (2004). "Origins, practices and future of safety pharmacology." Journal of Pharmacological and Toxicological Methods **49**(3): 145-151.
- Bekkevold, R.-M. S. (2011). Sikkerhetsfarmakologi og nevronal utvikling: PC12-celler og kyllingkornceller som modeller. Master, Universitetet i Oslo.
- Bilimoria, P. M. and A. Bonni (2008). "Cultures of cerebellar granule neurons." CSH Protocols **2008**: pdb prot5107.
- Binder, D. K. (2004). "The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system." Advances in Experimental Medicine and Biology **548**: 34-56.
- Blondel, O., C. Collin, W. J. McCarran, S. Zhu, R. Zamostiano, I. Gozes, D. E. Brenneman and R. D. McKay (2000). "A glia-derived signal regulating neuronal differentiation." The Journal of Neuroscience **20**(21): 8012-8020.
- Borghesani, P. R., J. M. Peyrin, R. Klein, J. Rubin, A. R. Carter, P. M. Schwartz, A. Luster, G. Corfas and R. A. Segal (2002). "BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells." Development **129**(6): 1435-1442.
- Boulle, F., G. Kenis, M. Cazorla, M. Hamon, H. W. Steinbusch, L. Lanfumey and D. L. van den Hove (2012). "TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders." Progress in Neurobiology **98**(2): 197-206.
- Bouron, A., C. Becker and H. Porzig (1999). "Functional expression of voltage-gated Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels during neuronal differentiation of PC12 cells with nerve growth factor or forskolin." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **359**(5): 370-377.
- Burgess, D. L. and J. L. Noebels (1999). "Single gene defects in mice: the role of voltage-dependent calcium channels in absence models." Epilepsy Research **36**(2-3): 111-122.
- Carim-Todd, L., K. G. Bath, G. Fulgenzi, S. Yanpallewar, D. Jing, C. A. Barrick, J. Becker, H. Buckley, S. G. Dorsey, F. S. Lee and L. Tessarollo (2009). "Endogenous truncated

TrkB.T1 receptor regulates neuronal complexity and TrkB kinase receptor function in vivo." The Journal of Neuroscience **29**(3): 678-685.

Castel-Branco, M., V. Lebre, A. Falcao, I. Figueiredo and M. Caramona (2003). "Relationship between plasma and brain levels and the anticonvulsant effect of lamotrigine in rats." European Journal of Pharmacology **482**(1-3): 163-168.

Castro, L. M., M. Gallant and L. P. Niles (2005). "Novel targets for valproic acid: up-regulation of melatonin receptors and neurotrophic factors in C6 glioma cells." Journal of Neurochemistry **95**(5): 1227-1236.

Catterall, W. A. (2000). "From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels." Neuron **26**(1): 13-25.

Chang, Y. C., S. I. Rapoport and J. S. Rao (2009). "Chronic administration of mood stabilizers upregulates BDNF and bcl-2 expression levels in rat frontal cortex." Neurochemical Research **34**(3): 536-541.

Cohen, M. J., K. J. Meador, N. Browning, G. A. Baker, J. Clayton-Smith, L. A. Kalayjian, A. Kanner, J. D. Liporace, P. B. Pennell, M. Privitera and D. W. Loring (2011). "Fetal antiepileptic drug exposure: motor, adaptive, and emotional/behavioral functioning at age 3 years." Epilepsy & Behavior **22**(2): 240-246.

Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." Cerebellum **1**(1): 41-55.

Das, P. C., W. K. McElroy and R. L. Cooper (2001). "Alteration of catecholamines in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro by the metabolites of chlorotriazine herbicide." Toxicological Sciences **59**(1): 127-137.

Denny, J. B. (2006). "Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43." Current Neuropharmacology **4**(4): 293-304.

Di Daniel, E., A. W. Mudge and P. R. Maycox (2005). "Comparative analysis of the effects of four mood stabilizers in SH-SY5Y cells and in primary neurons." Bipolar Disorders **7**(1): 33-41.

Diwakar, S., J. Magistretti, M. Goldfarb, G. Naldi and E. D'Angelo (2009). "Axonal Na<sup>+</sup> channels ensure fast spike activation and back-propagation in cerebellar granule cells." Journal of Neurophysiology **101**(2): 519-532.

Drubin, D. G., S. C. Feinstein, E. M. Shooter and M. W. Kirschner (1985). "Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors." The Journal of Cell Biology **101**(5 Pt 1): 1799-1807.

Friedman, W. (2012). Growth Factors. Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular and Medicinal Neurobiology. S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Alberts and D. L. Price. Amsterdam, Academic Press: 546-557.

Fujita, K., P. Lazarovici and G. Gordon (1989). "Regulation of the Differentiation of PC12 Pheochromocytoma Cells." Environmental Health Perspectives **80**: 127-142.

Giordano, G., S. Hong, E. M. Faustman and L. G. Costa (2011). "Measurements of cell death in neuronal and glial cells." Methods in Molecular Biology **758**: 171-178.

Gjerstad, L., E. Tauboll and G. K. Roste (2003). "[Treating epilepsy]." Tidsskrift for den Norske laegeforening **123**(13-14): 1864-1868.

Goldberg, J. L. (2004). "Intrinsic neuronal regulation of axon and dendrite growth." Current Opinion in Neurobiology **14**(5): 551-557.

Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**(7): 2424-2428.

Hall, A. K. (2012). Development of the Nervous System. Basic Neurochemistry. Principles of Molecular, Cellular and Medicinal Neurobiology. S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Alberts and D. L. Price. Amsterdam, Academic Press: 533-545.

Hamburger, V. and R. Levi-Montalcini (1949). "Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions." The Journal of Experimental Zoology **111**(3): 457-501.

Hayes, N. V., C. Scott, E. Heerkens, V. Ohanian, A. M. Maggs, J. C. Pinder, E. Kordeli and A. J. Baines (2000). "Identification of a novel C-terminal variant of beta II spectrin: two isoforms of beta II spectrin have distinct intracellular locations and activities." Journal of Cell Science **113 ( Pt 11)**: 2023-2034.

ICHS7A (2001). "International Conference on Harmonisation; guidance on S7A safety pharmacology studies for human pharmaceuticals; availability. Notice." Federal Register **66**(135): 36791-36792.

Ikonomidou, C. and L. Turski (2010). "Antiepileptic drugs and brain development." Epilepsy Research **88**(1): 11-22.

Iwasaki, Y., M. Ishikawa, N. Okada and S. Koizumi (1997). "Induction of a distinct morphology and signal transduction in TrkB/PC12 cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor." J Neurochem **68**(3): 927-934.

Jacobs, C. M., P. Aden, G. H. Mathisen, E. Khuong, M. Gaarder, E. M. Løberg, J. Lømo, J. Mæhlen and R. E. Paulsen (2006). "Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture." Journal of Neuroscience Methods **156**(1-2): 129-135.

Johannessen, C. U. (2000). "Mechanisms of action of valproate: a commentary." Neurochemistry International **37**(2-3): 103-110.

Jones, D. L. and J. O. McNamara (2012). The Epilepsies: Phenotypes and Mechanisms. Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology. S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Alberts et al. Amsterdam, Academic Press: 705-718.

- Kalil, R. E. (1989). "Synapse formation in the developing brain." Scientific American **261**(6): 76-79, 82.
- Kaplan, D. R., D. Martin-Zanca and L. F. Parada (1991). "Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF." Nature **350**(6314): 158-160.
- Kelman, Z. (1997). "PCNA: structure, functions and interactions." Oncogene **14**(6): 629-640.
- Kondo, Y., J. Saruta, M. To, N. Shiiki, C. Sato and K. Tsukinoki (2010). "Expression and Role of the BDNF Receptor-TrkB in Rat Adrenal Gland under Acute Immobilization Stress." Acta Histochemica et Cytochemica **43**(6): 139-147.
- Kramer, D. and L. Minichiello (2010). "Cell culture of primary cerebellar granule cells." Methods in molecular biology **633**: 233-239.
- Kuranaga, E. and M. Miura (2007). "Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination." Trends in Cell Biology **17**(3): 135-144.
- Kurien, B. T. and R. H. Scofield (2006). "Western blotting." Methods **38**(4): 283-293.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Li, N., X. He, X. Qi, Y. Zhang and S. He (2010). "The mood stabilizer lamotrigine produces antidepressant behavioral effects in rats: role of brain-derived neurotrophic factor." Journal of psychopharmacology **24**(12): 1772-1778.
- Louis, K. S. and A. C. Siegel (2011). "Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods." Methods in Molecular Biology **740**: 7-12.
- Meador, K., M. W. Reynolds, S. Crean, K. Fahrbach and C. Probst (2008). "Pregnancy outcomes in women with epilepsy: a systematic review and meta-analysis of published pregnancy registries and cohorts." Epilepsy Research **81**(1): 1-13.

Meador, K. J., G. A. Baker, N. Browning, J. Clayton-Smith, D. T. Combs-Cantrell, M. Cohen, L. A. Kalayjian, A. Kanner, J. D. Liporace, P. B. Pennell, M. Privitera and D. W. Loring (2009). "Cognitive function at 3 years of age after fetal exposure to antiepileptic drugs." The New England journal of medicine **360**(16): 1597-1605.

Meador, K. J., G. A. Baker, N. Browning, M. J. Cohen, R. L. Bromley, J. Clayton-Smith, L. A. Kalayjian, A. Kanner, J. D. Liporace, P. B. Pennell, M. Privitera and D. W. Loring (2012). "Effects of fetal antiepileptic drug exposure: outcomes at age 4.5 years." Neurology **78**(16): 1207-1214.

Meador, K. J., G. A. Baker, N. Browning, M. J. Cohen, R. L. Bromley, J. Clayton-Smith, L. A. Kalayjian, A. Kanner, J. D. Liporace, P. B. Pennell, M. Privitera and D. W. Loring (2013). "Fetal antiepileptic drug exposure and cognitive outcomes at age 6 years (NEAD study): a prospective observational study." The Lancet Neurology **12**(3): 244-252.

Meador, K. J., G. A. Baker, N. Browning, M. J. Cohen, J. Clayton-Smith, L. A. Kalayjian, A. Kanner, J. D. Liporace, P. B. Pennell, M. Privitera and D. W. Loring (2011). "Foetal antiepileptic drug exposure and verbal versus non-verbal abilities at three years of age." Brain **134**(Pt 2): 396-404.

Moe, L. K. (2010). Procaspase-Activating Compound-1 (PAC-1) : Effekter på celledød og caspaseaktivitet i cellelinjen PC12 og kyllingkornceller. Master, Universitetet i Oslo.

Moran, O., F. Lin, O. Zegarra-Moran and M. Sciancalepore (1991). "Voltage dependent calcium channels in cerebellar granule cell primary cultures." European Biophysics Journal **20**(3): 157-164.

Murray, P. S. and P. V. Holmes (2011). "An overview of brain-derived neurotrophic factor and implications for excitotoxic vulnerability in the hippocampus." International Journal of Peptides **2011**: 654085.

Namekata, K., H. Watanabe, X. Guo, D. Kittaka, K. Kawamura, A. Kimura, C. Harada and T. Harada (2012). "Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG." Genes to Cells **17**(8): 688-697.



Olive, M. F., R. M. Cleva, P. W. Kalivas and R. J. Malcolm (2012). "Glutamatergic medications for the treatment of drug and behavioral addictions." Pharmacology Biochemistry and Behavior **100**(4): 801-810.

Olsen, R. W. and G.-D. Li (2012). GABA. Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medicinal Neurobiology. S. T. Brady, G. J. Siegel, R. W. Alberts et al. Amsterdam, Academic Press: 367-376.

Oppenheim, R. (1991). "Cell death during development of the nervous system." Annual review of neuroscience **14**(1): 453-501.

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

Pezet, S. and M. Malcangio (2004). "Brain-derived neurotrophic factor as a drug target for CNS disorders." Expert Opinion on Therapeutic Targets **8**(5): 391-399.

Phiel, C. J., F. Zhang, E. Y. Huang, M. G. Guenther, M. A. Lazar and P. S. Klein (2001). "Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen." The Journal of Biological Chemistry **276**(39): 36734-36741.

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

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

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

Rohn, T. T., S. M. Cusack, S. R. Kessinger and J. T. Oxford (2004). "Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells." Experimental Cell Research **295**(1): 215-225.

Roux, P. P., M. A. Colicos, P. A. Barker and T. E. Kennedy (1999). "p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure." The Journal of Neuroscience **19**(16): 6887-6896.

Scharfman, H. E. (2005). "Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy - a missing link?" Epilepsy Currents **5**(3): 83-88.

Scharfman, H. E. (2007). "The neurobiology of epilepsy." Current Neurology and Neuroscience Reports **7**(4): 348-354.

Schatteman, G. C., L. Gibbs, A. A. Lanahan, P. Claude and M. Bothwell (1988). "Expression of NGF receptor in the developing and adult primate central nervous system." The Journal of Neuroscience **8**(3): 860-873.

Segal, R. A., S. L. Pomeroy and C. D. Stiles (1995). "Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells." The Journal of Neuroscience **15**(7 Pt 1): 4970-4981.

Shafer, T. J. and W. D. Atchison (1991). "Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies." Neurotoxicology **12**(3): 473-492.

Shi, X. Y., J. W. Wang, H. Cui, B. M. Li, G. F. Lei and R. P. Sun (2010). "Effects of antiepileptic drugs on mRNA levels of BDNF and NT-3 and cell neogenesis in the developing rat brain." Brain & Development **32**(3): 229-235.

Slotkin, T. A., E. A. MacKillop, I. T. Ryde, C. A. Tate and F. J. Seidler (2007). "Screening for developmental neurotoxicity using PC12 cells: comparisons of organophosphates with a carbamate, an organochlorine, and divalent nickel." Environmental Health Perspectives **115**(1): 93-101.

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

Tauboll, E., L. Gjerstad, T. Henriksen and H. Husby (2003). "[Pregnancy and birth in women with epilepsy]." Tidsskr Nor Laegeforen **123**(12): 1695-1697.

Thoenen, H. (1995). "Neurotrophins and neuronal plasticity." Science **270**(5236): 593-598.

Thomas, S. V., K. Sindhu, B. Ajaykumar, P. B. Sulekha Devi and J. Sujamol (2009). "Maternal and obstetric outcome of women with epilepsy." Seizure **18**(3): 163-166.

Tomson, T. and D. Battino (2012). "Teratogenic effects of antiepileptic drugs." The Lancet Neurology **11**(9): 803-813.

Tomson, T., D. Battino, E. Bonizzoni, J. Craig, D. Lindhout, A. Sabers, E. Perucca and F. Vajda (2011). "Dose-dependent risk of malformations with antiepileptic drugs: an analysis of data from the EURAP epilepsy and pregnancy registry." The Lancet Neurology **10**(7): 609-617.

Tsai, S. J. (2006). "TrkB partial agonists: potential treatment strategy for epilepsy, mania, and autism." Medical Hypotheses **66**(1): 173-175.

van Bergeijk, J., K. Haastert, C. Grothe and P. Claus (2006). "Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein." Chemical Biology & Drug Design **67**(3): 244-247.

Wehrman, T., X. He, B. Raab, A. Dukipatti, H. Blau and K. C. Garcia (2007). "Structural and Mechanistic Insights into Nerve Growth Factor Interactions with the TrkA and p75 Receptors." Neuron **53**(1): 25-38.

Westphal, D., V. Sytnyk, M. Schachner and I. Leshchyn'ska (2010). "Clustering of the neural cell adhesion molecule (NCAM) at the neuronal cell surface induces caspase-8- and -3-dependent changes of the spectrin meshwork required for NCAM-mediated neurite outgrowth." The Journal of Biological Chemistry **285**(53): 42046-42057.

Wieser, H. G. (1994). "[Comparison of valproate level in human plasma, cerebrospinal fluid and brain tissue following administration of various preparations of valproate and valpromide]." Praxis (Bern 1994) **83**(40): 1111-1116.

Xiong, H., T. Futamura, H. Jourdi, H. Zhou, N. Takei, M. Diverse-Pierluissi, S. Plevy and H. Nawa (2002). "Neurotrophins induce BDNF expression through the glutamate receptor pathway in neocortical neurons." Neuropharmacology **42**(7): 903-912.

Yuan, P. X., L. D. Huang, Y. M. Jiang, J. S. Gutkind, H. K. Manji and G. Chen (2001). "The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth." The Journal of Biological Chemistry **276**(34): 31674-31683.