

HEMMING AV CELLULÆR EKSPORT AV SYKLISK GUANOSINE MONOFOSFAT- SELEKTIVITET OG MEKANISMER

5. Årsoppgave

Lvert av Jorun Slettli, MK-00
Veileder: Georg Sager, Professor Overlege
Farmakologisk avdeling, IMB
Universitetet i Tromsø
Lvert: 20.09.2005

SAMMENDRAG

De siste tiårs forskning på cGMP har vist forhøyede ekstracellulære konsentrasjoner av cGMP ved flere tilstander. cGMP er derfor foreslått som markør for både malign sykdom og kardiovaskulær sykdom, men i tillegg er den foreslått brukt som markør på recidiv og behandlingseffekt. I prosessen med utviklingen av disse metoden er mye gjort for å øke kunnskapen om nukleotidet selv, syntese, degradering, transportmekanismer og hemming av disse.

I denne studien er det benyttet unsealed ghosts fra humane erythrocytter for å se nærmere på hvordan temperatur og konsentrasjon av nukleotiden påvirker transporten over membranen. Ghost er erythrocytt- membraner preparert slik at de er relativt fri for cytoplasma. De er "right side out". Det er gjort et bevisst valg på bruk av humane erythrocytter fordi de er lett tilgjengelig, det er forbundet lave kostnader ved fremskaffelsen, de lar seg enkelt preparere til ghost, og sist men ikke minst er det snakk om et enkelt system hvor man lettere kan kontrollere og redusere påvirkningen fra intracellulære faktorer.

Resultatene fra denne studien viser/ bekrefter tidligere studier som har vist at transporten av cGMP er temperaturavhengig. Hoved målet med studien var å etablere et assay for cGMP ATPasen som kunne benyttes i det videre arbeidet med kartlegging av cGMP transporten. Det viste seg at dette ikke ble så lett. Vi gjorde forsøk basert på tid hvor fritt fosfat skulle akkumuleres og dermed gi en positiv stigningsgrad på kurvene. Dette skjedde ikke, og årsaken så langt er ikke klarlagt. Videre gjorde vi forsøk med forskjellige konsentrasjoner cGMP inkubert ved samme temperatur. Heller ikke disse forsøkene ga de ønskede resultater. Alt i alt fungerte ikke assayet etter planen. Det er ingenting i resultatene som peker på noen forklaring på fenomenet. Vi kan bare konkludere med at det enda ikke er funnet et assay som kan brukes i den videre utforskningen av cGMP- transporten i unsealed ghosts.

Innholdsfortegnelse

1.0	INNLEDNING	1
1.1	Bakgrunn og problemstillinger	1
1.2	Syklisk guanosine monofosfat (cGMP)	2
1.2.1	Biokinetikk- syklisk guanosine monofosfat	2
1.2.2	Effekter av cGMP	4
1.3	Ekstracellulær cGMP	4
2.0	MATERIALE OG METODE	5
2.1	Reagenser og løsninger	5
2.1.1	Kjemikalier	5
2.1.2	Reagenser	5
2.1.3	Løsninger	5
2.2	Preparering av humane erytrocytt unsealed ghost	7
2.2.1	Utvikling av metoden	7
2.2.2	Tapping av blod	7
2.2.3	Fremgangsmåte for preparering av unsealed ghost	7
2.3	Preparering av homogeniserte ghost	8
2.4	ATPase assayet	8
2.4.1	Temperaturforsøk	9
2.4.2	Tidsforsøk	10
2.4.3	Konsentrasjonsforsøk	10
2.5	Scintillasjonstelling	11
2.6	Proteinbestemmelse	11
3.0	RESULTATER	13
3.1	Temperaturforsøk	13
3.1.1	Forsøk ved 22 °C	13
3.1.2	Forsøk ved 27 °C	13
3.1.3	Forsøk ved 31,9 °C	14
3.2	Tidsforsøk	15

1.0 INNLEDNING

1.1 Bakgrunn og problemstillinger

Det har gått mer enn 40 år siden cGMP ble oppdaget for første gang i naturen. I 1963 påviste Ashman et al cGMP i rotteurin (Ashman et al, 1963). Noen år senere, i 1969, gjorde Goldberg et al et forsøk hvor de injiserte cGMP intravenøst for så å påvise at det ble skilt ut i urinen (Goldberg et al, 1969). Det samme året viste de at cGMP var en naturlig bestanddel i kroppen i alle vev de undersøkte, blant annet i hjernen og nyren. Man visste allerede mye om cAMP, noe som førte til at metodene kunne brukes til å kartlegge både enzymer i syntese og degradering av cGMP så vel som enkelte funksjoner. Mye forskning er gjort siden dette, og de siste tiårene er det vist forhøyede konsentrasjoner av cGMP ekstracellulært ved flere patologiske tilstander. Genari et al publiserte en artikkel hvor de viste at pasienter som hadde tumorer av epithelialt opphav skilte ut høyere nivåer av cGMP enn friske individer (Genari et al, 1978). En rekke kliniske studier har vist at pasienter med ulike kreftformer har økende ekstracellulær konsentrasjon av cGMP (Peracchi et al 1980, Peracchi et al, 1983, Peracchi et al, 1984 , Peracchi et al 1987), at ratio mellom ekstracellulære nivåer av cGMP og cAMP øker (Duttagupta et al 1982, Turner et al, 1982), og det er ogsp vist at ekstracellulært cAMP nivå faller (Gennari et al, 1978). På bakgrunn av dette er cGMP foreslått brukt som tumormarkør. Observasjonene "in vitro" er reproduisert "in vivo". Syklisk GMP viste en celletetthets- avhengig økning i ekstracellulær nivå for flere cellelinjer fra livmorhals karsinomer (Ørbo et al, 1993 og 1994). Dette etterligner den voksende tumormassen in vivo. Vår hypotese er at kreftceller pumper ut cGMP for å unnsnippe molekylets veksthemmende effekter. På bakgrunn av dette blir det viktig å få kunnskap om de hva som kan hemme cGMP transporten. I beste fall vil man på den måten kunne utvikle legemidler som gjenoppretter vekstregulering fra naturlige signalmolekyler.

De siste ti årene har fokuset dreid over til at mye forskning er gjort i forhold til transportmekanismer og spesifisitet for transporterne for cGMP. Fysiologiske studier har vist at cGMP transporteres ut av ulike vev og typer celler slik som pancreas (Kapoor et al, 1977), lever og leverceller (Tjørhammar et al, 1983, Billiar et al, 1992), ulike celler fra nyre (Ardaillou et al, 1993, Patel et al, 1995, Millul et al, 1996,

Stoos et al, 1996), endoteliale celler (Schini et al, 1998, Hamet et al, 1989), fibroblaster (Patel et al, 1995), glatte muskelceller (Hamet et al, 1989, Coste et Grondin, 1995), celler relatert eller utgående fra neuralt vev (O`Dea et al, 1978, Fiscus et al, 1987, Tjørhammar et al, 1986, Luo et al, 1994, Pedraza et al, 2001), humane erythrocytter (Flo et al, 1995, Sager et al, 1996), og humane blodplater (Wu et al, 1993). Syklisk GMP transporteres ut av cellene mot en konsentrasjonsgradient (Hamet et al, 1989) og transporten krever ATP. Hemmere av ATPase synes ikke å være selektive. Man har funnet at cGMP-ATPasen (Vaskinn et al, 1999) er av m-type (Pedersen, 1995) som gir energi til P- glykoprotein (p-Gp) og multiresistance-associated proteins (MRPs). MRP er en familie ABC-pumper (ATP-binding cassette) som fungerer som "multiorganic anion" transportere, såkalte MOATs. Disse har varierende grad av spesifisitet. Boadu og Sager (Boadu et Sager, 2000) fant en lineær sammenheng mellom ATP-hydrolyse, med frigjøring av inorganisk fosfat, og cGMP transport ved å benytte en modell hvor cGMP transportmolekylet var rekonstruert i proteoliposomer. Det er også vanskelig og tenke seg en selektiv interaksjon under selve translokasjonen eller under frigjøring. Dette betyr at man kan klargjøre interaksjoner ved å studere binding og ATPase aktivitet. I bindingsstudiene vil man kunne påvise interaksjoner mellom to substrater og mellom substrat og blokker. I ATPase studiene vil man kunne påvise om stoffet er et substrat eller er en blokker. Et substrat vil gi påvisbar ATPase aktivitet. En blokker vil ikke gi påvisbar ATPase aktivitet.

1.2 Syklisk guanosine monofosfat (cGMP)

1.2.1 Biokinetikk- syklisk guanosine monofosfat.

Nivået av cGMP intracellulært reguleres av tre prosesser; syntese, degradering og cellulær eksport. Nivået intracellulært reguleres ved en fin balansegang mellom disse. Det ekstracellulære nivået er kun avhengig av cGMP-transporten over cellemembranen. Transporthastighete bestemmes av både den intracellulære konsentrasjonen og aktiviteten i transporterne.

Syklisk guanosine monofosfat syntetiseres fra guanosine trifosfat i flere trinn ved en gruppe katalytiske enzymer kalt guanylat sykklaser. Prosessen er en hydrolyse, og som biprodukt spaltes det av fritt fosfat, Pi. Det fins to typer guanylat sykklaser, membranbundne og løselige som fins i cytosol. De membranbundne aktiveres av

peptidhormoner. Det fins flere ulike isoenzymer i denne gruppen. Fellestrekk i struktur er beskrevet av Yang et al. Strukturelt har alle et ligandbindende domene ekstracellulært, en transmembran del og en intracellulær del med et proteinkinase-liknende domene samt et syklase domene som er katalyttisk (Yang et al, 1995). Utbredelsen av de enkelte subtypene varierer fra vev til vev. Den løselige formen er heterodimere strukturer med alfa- og betasubunitser bundet sammen av en disulfidbro (Wong et Garbers, 1992). Det fins to former av hver av subunitene, og også for disse er det variasjon fra vev til vev med tanke på uttrykk (Schulz et al, 1991). Guanylat cyclaser påvirkes av både ekstra- og intracellulære forbindelser som peptidhormoner, frie radikaler og bakterielle toxiner. Nitrogenoksyd-derivater og andre hydroksyl radikaler og enkelte hormoner aktiverer enzymet (Garbers, 1990).

Degraderingen intracellulært skjer ved hjelp av en gruppe katalytiske enzymer kalt fosfodiesteraser som gjør at cGMP brytes ned til en inaktiv metabolitt, guanosin monofosfat (GMP). Ved hjelp av enzymene er det en feedback-regulering av det intracellulære cGMP- nivået. Det fins et ukjent antall fosfodiesterase isoenzymer i humant vev. Også disse enzymene fins både i løselig og membranbundet form, distribusjonen av de ulike isoenzymene varierer. I tillegg til den metabolske nedbrytningen vil det også være en viss grad av eliminasjon via cellulær efflux. Effluks er sett i så godt som alle vev, inkludert celler med opphav i hjernen.

cGMP skilles ut uforandret over membraner ved hjelp av transportmolekyler i cellemembranene. Transporten ut av cellene skjer ved hjelp av ATP avhengige transportmolekyler. Sentralt for organiseringen av membraner er at det er asymmetri i distribusjon av molekyler på inn- og utsiden og dermed er det også asymmetri i funksjon (Steck et Kant, 1974). Transportprosesser er sammensatt av flere trinn. Trinn 1 som er gjenkjenning av substrat på innsiden av cellemembranen ("recognition binding site") beror både på et bindingssete som har høy affinitet og høy selektivitet for substratet. På dette nivået kan man tenke seg både en konkurranse mellom stoffer som begge transporteres, men også mellom et stoff som ikke transporteres men kun blokkerer bindingssetet og et annet stoff som transporteres. Trinn 2 er aktivering av ATPase. Det er sannsynlig at et "godkjent" substrat fører til en konformasjonsendring av "recognition binding site" til "activation site" som aktiverer ATPasen. Den kjemiske energi som frigjøres fører da til neste trinn. Trinn 3 er translokasjon av

substratet fra innsiden til utsiden av cellemembranen. Her må man tenke seg at bindingssetet endrer karakter og "drar" substratet med seg gjennom cellemembranen. Det siste trinnet i prosessen, trinn 4, er frigjøring av substratet på utsiden av cellemembranen. "Transportbindesetet" må da endre karakter til et "frigjøringssete". Siden konsentrasjonen av substrat på utsiden kan være mye høyere enn på innsiden må "frigjøringen" innebære et dramatisk fall i affinitet. Hvis så ikke skjedde ville også bindesetet dra med seg substrat tilbake inn i cellen.

1.2.2 Effekter av cGMP.

Syklisk guanosine monofosfat er en regulator for flere komplekse kaskadesystemer, blant annet cGMP-avhengige protein kinaser, de regulerer ionekanaler og fosfodiesteraser. Molekylet er derfor viktig i reguleringen av mange fysiologiske prosesser. Ett eksempel på dette er fototransduksjon i retina.

1.3 Ekstracellulær cGMP

Det er vist at cGMP skilles ut fra flere celletyper, blant annet erytrocytter (Flo et al, 1995, Sager et al, 1996), blodplater (Wu et al. 1993) leverceller hos rotter (Tjørhammar et al, 1983, Billiar et al, 1992), glatte muskelceller og endotelceller i kar (Hamet et al, 1989) og epiteliale celler og fibroblastceller (Patel et al, 1995). Studier har vist at kreft pasienter har forhøyede ekstracellulære nivåer av cGMP. Gennari et al har derfor foreslått cGMP brukt som tumormarkør (Gennari et al, 1978), noe som er støttet av flere studier siden. Ørbo et al har i tillegg vist at cAMP/cGMP- ratio kan brukes som tumormarkør ved cervixcancer (Ørbo et al, 1993 og 1994). Det er også vist at cGMP kan brukes som mål på remisjon og residiv av akutte og kroniske leukemier (Peracchi et al, 1983).

2.0 MATERIALE OG METODE

2.1 Reagenser og løsninger

2.1.1 Kjemikalier

Kjemikalier av analytisk grad: natriumklorid, Tris-HCl, EGTA, magnesiumklorid, ouabain, magnesium-ATP, cGMP, ammoniummolybdate, Isobutylmethylxanthine (IBMX) fra Sigma Chemicals..

2.1.2 Reagenser

Tabell 2.1 Reagenser

<u>Reagens</u>	<u>Produsent</u>
Ultima Gold Tellevæske	Packard, Meridan, MS, USA
10 ml Vacutainer rør med 0,1 ml (0,47M) EDTA-K3	Becton Dicinson, Meyland Cedex, Frankrike
Sigma Protease Inhibitor Coctail P2714	Sigma- Aldrich Inc, St. Louis, Missouri, USA
[33P]- ATP (>2500 Ci/mmol) denne fortynnes 1:100	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Bovint Serum Albumin	Sigma- Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA

2.1.3 Løsninger

Løsninger til preparering av unsealed erythrocyte ghosts:

Alle buffere er løst i Milli-Q destillert vann. pH er justert ved hjelp av NaOH.

Buffer A Vaskeløsning for erythrocytter

10 mM Tris- HCl

Buffer skal ha pH=7,6 ved 4°C

150 mM NaCl

1mM EGTA

Buffer B Hemolyseringsbuffer

20 mM Tris- HCl

Buffer skal ha pH=7,6 ved 4°C

1 mM EGTA
0,02 vol proteasehemmer cocktail

Buffer C

5 mM Tris- HCl Buffer skal ha pH= 7,6 ved 4°C
0,1 mM EGTA
0,02 vol Protease hemmer cocktail

Basisbuffer til tids- og temperaturkurver:

10 mM Tris- HCl pH=7,4-7,5 ved 4° C
10 mM MgCl₂

Stoppløsninger inkubering:

Ammonium molybdate 5% løst i 2M H₂SO₄.
20 mM Silicotungstensyre

2M H₂SO₄

4mM H₂SO₄

Løsning med ghost i basisbuffer med følgende stoffer i final konsentrasjon til inkubering:

1 mM EGTA 380,4 g/mol
1 mM Oubain 584,7 g/mol
0,1 mM IBMX 222,2 g/mol
1 mM Mg²⁺- ATP 507,2 g/mol
10 mM MgCl₂ 203,3 g/mol
50µM cGMP 367,2 g/mol

EGTA lar seg ikke løse i basisbuffer, er derfor løst ved hjelp av NaOH

2.2. Preparering av humane erythrocytt- unsealed ghosts

2.2.1 Utvikling av metoden.

Metoden er en modifisert versjon av metoden for å preparere inside-out vesikler lansert av Steck og Kant (Steck et al, 1974). Metoden er videreutviklet, blant annet av Kondo og medarbeidere (Kondo et al, 1980). En modifisering av disse to metodene er utviklet ved Farmakologisk avdeling, Universitetet i Tromsø, etter år med forskning på cGMP (Sager et al, 1996). Dette danner utgangspunkt cGMP ATPase-assayet mitt.

2.2.2 Tapping av blod.

I forsøkene er det brukt venøst blod fra friske individer i alderen 20- 40 år, alle av europeisk opprinnelse. Totalt er det 5 forskjellige donorer. Det er innhentet informert samtykke forut for tappingen. Blodet tappes på sterile vacutainer rør med 0,1 ml (0,47 M) EDTA. All tapping gjøres om morgenen, og individene er ikke fastende. Etter tapping vendes glassene et par ganger slik at antikoagulanten blandes med blodet. De blir så umiddelbart brakt til kjølerom hvor temperaturen er ca 4 °C. All videre opparbeiding skjer her. Alle buffere brukt under opparbeidingen er temperert til 4°C. Cellene separeres fra plasma ved sentrifugering på Kubota 5100 kjølesentrifuge ved 600G/1800 rpm i 15 min ved 4°C.

2.2.3 Fremgangsmåte for preparering av unsealed ghost

Hele bearbeidingen av erythrocyttene skjer ved 4 °C. Den første delen av prepareringen er hemolysen. Etter at blodet er tappet sentrifugeres det i de originale tappeglassene i 15 minutter på 1800 rpm i Kubota 5100 bordsentrifuge for å skille plasma og celler. Sentrifugen har en swinging bucket rotor RS-4/6. All plasma og buffycoat suges så forsiktig av. De pakkete cellene tilsettes så buffer A til hematokrit er tilnærmet 50%. For å få optimal vask vendes glassene forsiktig slik at cellene som var pakket i bunnen blir løst i suspensjonen. Deretter sentrifugeres det på 1800 rpm i Kubota sentrifugen i 15 minutter. Membranene vaskes tre ganger med samme buffer. Første gang sentrifugeres det i 15 minutter, deretter kun i 10 minutter. Etter den tredje vasken suges supernatant bort og det tilsettes litt av buffer B til de gjenværende cellene. Glassene vendes et par ganger for å få løst cellene og pipetteres til Sorvall rør. Til sammen tilsettes 20 vol løsning B og 0,02 vol/100 μ l proteasehemmer cocktail. Cellene og løsningen blandes forsiktig og sentrifugeres så i 20 minutter ved

4°C ved 20000G/ 12940 rpm i Sorvall sentrifugen (Sorvall RC 24 Du Pont), rotor 05. Etter sentrifugeringen suges supernatanten av. Supernatanten inneholder nå også endel ghost som ikke er sedimentert. Cellepelleten pipetteres så over i ett nytt Sorvall rør for å unngå å få med "protease- knappen" med forurensende proteaser som setter seg etter første sentrifugering. Dette gjøres ved at røret tippes sidelengs og roteres slik at de løst pakke de ghostene glir bort fra proteaseknappen før de aspireres. Deretter resuspenderes ghostene i 20 vol buffer C og 0,02 vol proteasehemmer cocktail. Cellene sentrifugeres så i nye 20 minutter. Ghostene sedimenteres og resuspenderes til membranene er melkehvite og supernatanten er klar. Dette krever 5-6 vask totalt. Ghostene er nå klare til bruk. Erythrocyttmembranene kalles "ghost" etter at prosessen er utført og cellene er melkehvite. Dersom ghostene ikke skal benyttes samme dag kan de oppbevares over natten i 1 vol buffer C med proteasehemmer cocktail ved 4 °C. Ghostene bør ikke oppbevares utover ett døgn da tidligere studier ved Farmakologisk avdeling har vist dårligere resultater når ghost har blitt oppbevart lengre. Før bruk sentrifugeres ghostene en gang i Sorvall rør i 10 minutter med buffer C og proteasehemmer som over.

2.3 Preparering av homogeniserte ghost.

Ghostene prepareres som over. Deretter overføres de til (hva heter homogenisatoren). Glasset føres tre ganger opp og ned. Hastigheten er rpm. Deretter fortynnes de homogeniserte ghostene 1:10 før de er klare til bruk. Homogeniserte ghost er også unsealed ghost, men homogeniseringen fører til at ghostene fragmenteres slik at membranbiter ligger løst i løsevæsken. Dette gjør ATPasene på begge sider av pumpene mer tilgjengelige. Hypotesen er at vi dermed burde få mer frigjort fosfat som resultat av at ATPasen blir lettere tilgjengelig for substratet.

2.4 ATPase assayet.

ATPase assayet kjøres i to separate deler. Det kjøres først et tidsforsøk hvor ghost og homogeniserte ghost inkuberes med faste konsentrasjoner av cGMP i angitte tidsintervaller. Dette for å se hvilken innvirkning inkubasjonstiden har på reaksjonen. Målt fosfatmengde skal øke proporsjonalt med tiden fordi det frie fosfatet vil akkumuleres. Dernest kjøres et forsøk hvor vi tester ulike konsentrasjoner cGMP inkubert i et gitt tidsintervall. Her forventer vi at økte konsentrasjoner cGMP gir høyere målt fritt fosfat som tegn på at mer tilgjengelig substrat gir økt reaksjon. Både

tids- og konsentrasjonsforsøket kjøres med både unsealed ghost og homogeniserte ghost.

For hvert forsøk må det tas av eksempler på 100 µl av fortynnet og ufortynnet ghost og homogenisert ghost til proteinmål. Det var opprinnelig planlagt i assayet at det skulle være 250 µl inkubasjonsvolum. Fordi kostnadene ved å bruke isotop er forholdsvis høy, har vi valgt å kjøre med inkubasjonsvolum på 100 µl. Dette har vært gjort ved tidligere forsøk ved laboratoriet uten at det har påvirket resultatet.

2.4.1 Temperaturforsøk.

I forsøket benyttes unsealed ghosts preparert som beskrevet over og lagret over natten i TT-rør med 1 vol buffer C og 0,02 vol proteasehemmercocktail. Inkubasjonene er gjort i TT-rør. Inkubasjonen foregår ved tre temperaturer. Temperaturene er basert på erfaringer fra tidligere forsøk ved avdelingen. Vi bruker temperaturene 22,0 °C, 27,0 °C og 31,9 °C. Alle forsøkene kjøres med fire paralleller og gjennomsnittsverdiene brukes i videre arbeid med materialet. Isotopen (³³P-ATP) fortynnes 1:100. Premix til forsøkene inneholder i finale konsentrasjoner 1mM EGTA, 1mM Oubain, 0,1mM IBMX, 1mM Magnesium-ATP, 10mM MgCl₂. I tillegg tilsettes cGMP 5µM eller basisbuffer, fortynnete ghost, isotop og basisbuffer slik at inkubasjonsvolumet totalt utgjør 100 µl. Det tilsettes 10 µl av hver av bestanddelene til premix med unntak av 20 µl basisbuffer. Alle stoffer med unntak av EGTA lar seg løse i basisbuffer. EGTA løses i 2M NaOH.

Ghostene fortynnes 1:10 i basisbuffer slik at ikke proteinkonsentrasjonene skal bli for høye før forsøk. Det vil føre til at scintillasjonstelleren ikke klarer telle. Deretter lages premix med finale konsentrasjoner som beskrevet over. Det lages separat premix til hver temperatur like før forsøket skal kjøres. Denne oppbevares i kjøleskap ved 4°C til bruk. Temperaturforsøkene kjøres med tidsintervallene i minutter: 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 og 30. Målet med dette er å finne den optimale temperaturen for reaksjonen. Merkede TT-rør settes i isbad. For hvert tidsintervall kjøres 4 paralleller med cGMP og 4 paralleller med basisbuffer som sammenlikning for å få et mål for den basale aktiviteten. Deretter pipetteres premix til hvert rør. Nullprøvene overføres direkte til isbad og tilsettes stoppløsningene, 5% ammonium molybdate og 20mM silikotungstensyre. De resterende rørene overføres til vannbad ved 22°C. Prøvene

fjernes fra vannbadet til angitte tidspunkter og tilsettes stoppløsninger. Rørene settes så i kjøleskap ved 4°C i påvente av videre behandling. Prosedyren gjentas for temperaturene 27°C og 31.9°C.

2.4.2 Tidsforsøk.

Alle tidsforsøk er kjørt i TT-rør. Det er gjort forsøk med både unsealed ghost og homogeniserte ghost for å se om det er signifikant forskjell mellom transporten av cGMP hos disse. Alle forsøk er kjørt med 4 paralleller.

Forut for tidskurvene skal prøvene stå i isvann for å hindre at reaksjonen starter. Vi lager derfor først en premix med alle stoffene utenom cGMP. cGMP tilsettes prøvene umiddelbart før forsøket starter. Premix lages like før forsøket kjøres eller den lages uten ghost og oppbevares i kjøleskap ved 4 grader slik at ghost da tilsettes like før premix pipetteres over i TT- rør og forsøket kjøres. For hver serie må det lages egen premix. Hver prøve inneholder 9 vol premix og 1 vol cGMP eller basisbuffer. Premix inneholder 1 vol av hver av EGTA, oubain, IBMX, Magnesium-ATP, MgCl₂, ³³P-ATP, cGMP og ghost/ homogeniserte ghost. Det tilsettes også 2 vol basisbuffer. Alt i alt 100 µl i hver prøve.

Inkubasjonen kjøres ved 27°C med enten cGMP eller basisbuffer i tillegg til premix. Samme fremgangsmåte som for temperaturforsøket. Først kjøres 1 serie med ghost og en serie med homogeniserte ghost for å vurdere hvorvidt det er forskjell i reaksjonsmønster for disse. Følgende tidsintervaller velges: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 og 120 minutter for begge seriene. Etter dette lurer vi på om det er reaksjon tidlig i inkubasjonen vi ikke ser med tidsintervallene vi bruker. Kjører derfor ett forsøk med ghost og homogeniserte ghost som tidligere, men denne gangen inkuberer vi også i 2.5 minutter. I alt kjøres 4 serier med både ghost og homogeniserte ghost. Se resultater del 3.2.

2.4.3 Konsentrasjonsforsøk

Kjører forsøk med ghost preparert som beskrevet i del 2.2. Inkubering ved 27°C som beskrevet tidligere og det benyttes samme konsentrasjoner og bestanddeler i premix som for tids- og temperaturforsøkene. Fordi resultatene ikke ble helt som forventet valgte vi å teste både øvre og nedre fase av inkubatet. Kjørte derfor ett forsøk med ghost og homogenisert ghost, 3 serier med 3 paralleller av hver hvor vi testet både øvre og nedre fase av inkubatet for å eventuelt finne årsak til resultatene (Se

resultatdel). Det ble kjørt et siste forsøk med kun ghost hvor også øvre og nedre fase ble testet for å bekrefte funnene våre.

2.5 Scintillasjonstelling.

Etter inkubering står prøvene på isbad. Prøvene overføres så til Eppendorfrør som inneholder Isobutanol og Toluene i blanding 1:1. Dette gjøres for å skille det organiske laget, som inneholder frigjort [³³Pi], fra det uorganiske laget. Etter at prøvene er tilsatt blandes løsningene ved hjelp av Vortex MS2 Minishaker IKA. Vortexer i noen sekunder for hver prøve. Deretter sentrifugeres prøvene i mikrosentrifuge ved 4 °C med 13000 rpm i 5 minutter. Etter sentrifugeringen er den organiske fasen øverst og den uorganiske vandige fasen nederst. Det pipetteres ut 100µl fra den øvre fasen over i telleglass. Telleglassene inneholder fra før 8 ml Ultima Gold væske. Glassene vortexes så et par sekunder før de er klare til scintillasjonstelling. ATPase aktiviteten ble målt ved å bruke radioisotopmåling med ³³P-ATP som substrat. Frigjøringen av ³³Pi ble målt ved at prøven ble blandet med Ultima Gold Scintillasjonsvæske og radioaktiviteten ble avlest ved væske scintillasjons spektrometri. Tellingen skjer i en Pacard 4430 Beta teller.

2.6 Proteinbestemmelse

Konsentrasjonene av proteiner i løsningene ble bestemt ved hjelp av "Bio Rad Protein Assay". Metoden ble utviklet av Bradford i 1976. Metoden baserer seg på at det kommer et fargeskifte når det skjer en binding til proteiner. Absorbansen for en sur løsning med Coomassie Brilliant blue G- 250 skifter da fra 465 til 595 nanometer. Denne fargeforandringen kan vi måle ved hjelp av spektrofotometri. Konsentrasjonen i løsningen avgjør fargen.

Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved at det ble tatt ut 100 µl ghost og fortynnet ghost fra hver batch. Dette gjøres også for homogeniserte ghost. Reagenser fra Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA) og BSA- fra Sigma Chemicals Co (st. Louis, MO, USA) som standard. Vi lagde en stock løsning med Bovin Serum Albumin (BSA) på 1 mg/ml ved å løse 0,1000g BSA i 100 ml PBS-. Deretter lagde vi fortynningen med følgende konsentrasjoner i µg/ml; 250, 25, 20, 15, 10, 5, 2.5 og 1. Alle løsningen ble fortynnet med PBS-. Deretter ble 800 µl av prøven fra hver

konsentrasjon og 200 μ l Bio- Rad blandet. Det sto i 15 minutter. Deretter ble prøvene lest av på spektrofotometer (Pharmacia LKB- Ultrospec III) ved 595 nanometer . Som blank benyttet vi kun PBS- og Bio- Rad. Resultatene ble plottet i en standardkurve. Standardkurven for BSA kan brukes til å beregne proteinkonsentrasjonene.

3.0 RESULTATER

3.1 Temperaturforsøk.

Man ble tidlig klar over at utskillelsen av cGMP fra celler generelt var temperaturavhengig (Tjørhammar et al, 1983, Hamet et al, 1989, Flo et al, 1995, Sundkvist et al, 2000). Tjørhammar et al foreslo at transporten kunne deles inn i en aktiv og en passiv del ut fra at den ene var probenecid avhengig og den andre ikke (Tjørhammar et al, 1983). Det er også gjort studier på temperatur og forskjellige konsentrasjoner av cGMP ved Farmakologisk avdeling, Institutt for Biologi ved Universitetet i Tromsø. Hensikten med dette forsøket var å finne temperaturen som ga høyest transport av cGMP over cellemembranen i humane unsealed erythrocytt-ghost med de gitte forutsetningene. Bestemmelse av hvilken temperatur som gir høyest transport vil avgjøre hvilken temperatur de øvrige forsøkene skal kjøres ved. Premixen vi benytter her har ikke vært brukt i forsøk tidligere og er et ledd i forsøket på å finne et assay som kan brukes i videre studier av cGMP transporten over erythrocyttmembraner.

Alle verdier brukt i resultatene er middelveier.

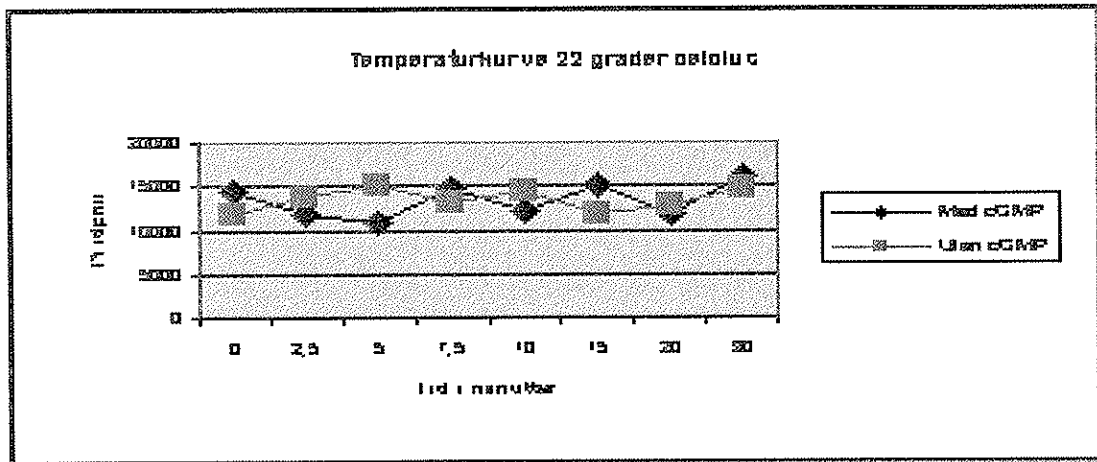
3.1.1 Forsøk ved 22°C

Figur 3.1 viser den totale assosiasjonen mellom transport og tid ved 22 °C for unsealed erythrocytt ghosts. Tendensen er uklar, og tidvis krysser kurvene for den basale aktiviteten og aktiviteten i prøvene tilsatt cGMP hverandre. Verdien for detektert frigjort fosfat er også forholdsvis lav. Man ser en viss økning i opptak mot slutten, men det er uvisst hvorvidt det er et uttrykk for at transporten øker videre da inkuberingen kun er gjort fram til 30 minutter. Det antas at økningen er en tilfeldig måling. Det er som forventet at aktiviteten ikke er så stor ved denne temperaturen, og det bekrefter tidligere studier hvor temperaturavhengighet er undersøkt (Sundkvist et al, 2000).

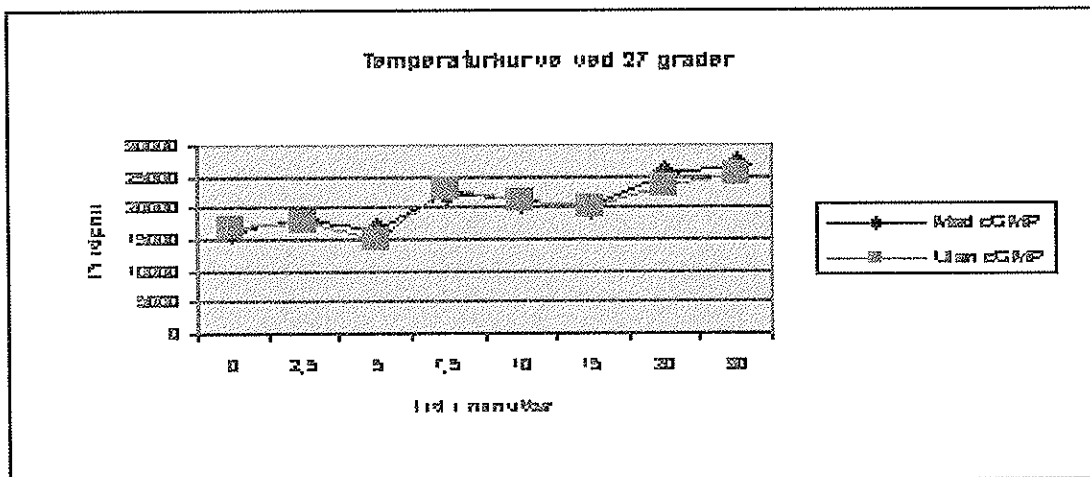
3.1.2 Forsøk ved 27°C

Figur 3.2 viser resultatet av inkubering av unsealed ghost fra humane erythrocytter ved 27 °C i 30 minutter. Som vi ser av figuren kommer det nå frem en klarere tendens. Jo lengre inkuberingstid, jo høyere aktivitet i form av målbart fritt fosfat kan

detekteres. Det måles høyere aktivitet i form av høyere celletall, og prøvene tilsatt cGMP har økt aktivitet i forhold til den basale aktiviteten. Av temperaturforsøkene som kjøres er det dette som gir det mest entydige resultatet. Velger derfor å kjøre videre forsøk for tidskurver og konsentrasjonskurver med inkubering ved 27 grader celcius.



Figur 3.1 Temperaturkurve ved 22°C.

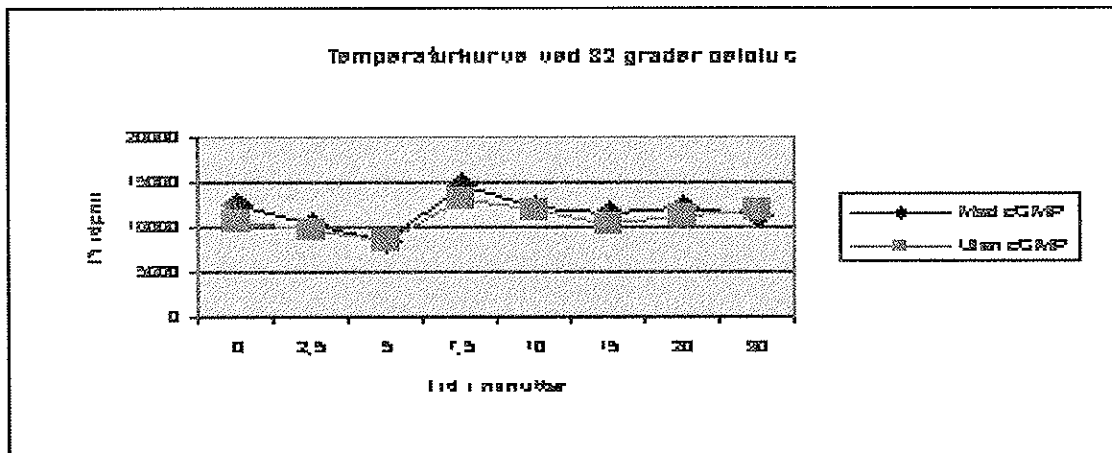


Figur 3.2 Temperaturforsøk ved 27°C.

3.1.3 Forsøk ved 31,9°C

Figur 3.3 viser resultatet av inkubering i 30 minutter ved 31,9 °C. Temperaturen ble valgt fordi det var vanskelig å stille inn vannbad på 32 °C nøyaktig. Kurven er forholdsvis flat, og ved endepunktet er det målt høyere aktivitet for prøvene med kun

basalaktivitet enn for de med cGMP. Tallene for frigjort fosfat er heller ikke så høye som ved forsøk på 27°C.



Figur 3.3 Temperaturforsøk ved 31,9°C.

3.2 Tidsforsøk

Teorien bak forsøkene er at mengden frigjort fosfat skal akkumuleres over tid slik at verdiene vi måler stiger proporsjonalt med tiden. Det vil resultere i en kurve med positiv stigningsgradient. Teorien baserer seg blant annet på resultater fra forsøk gjort av Elisabeth Sundkvist ved Farmakologisk avdeling, IMB, ved Universitetet i Tromsø, som ledd i hennes dokotgradsarbeide (Sundkvist et al, 2000). Alle forsøkene inkuberes ved 27 °C basert på resultatene av temperaturforsøket som viste at det var den optimale temperaturen for enzymreaksjonen under de gitte forutsetningene. Hver serie kjøres med tre paralleller og verdiene i kurvene er gjennomsnittsverdier av disse.

4.0 KONKLUSJON

Første del av arbeidet handlet om å lære laboratoriearbeid, ikke minst fordi jeg aldri tidligere har jobbet på denne måten. Neste del av jobben besto i å mestre metoden for preparering av erythrocytter slik at det ble mest mulig ghost. Metoden vi brukte var en modifisert versjon av metoden Steck og Kant lanserte i 1974 [1]. Metoden er modifisert og tilpasset den videre delen av forsøket her ved Farmakologisk avdeling, IMB, ved Universitetet i Tromsø. Det ble kun gjort noen få endringer i forhold til prepareringen av ghost. Sentrifugeringen i Sorvall sentrifugen gjøres initialt i 20 minutter per omgang. Vi forsøkte oss frem, og kom til at det var like god pakking selv om vi ikke sentrifugerte lengre enn 10 minutter. For å holde meg mest mulig til original oppskrift satte jeg sentrifugetiden til 15 minutter videre. Dette ga tilstrekkelig pakking av cellene samtidig som vi tok hensyn til tidsaspektet fordi hele prepareringen skal skje på en dag. Det ble også gjort en liten endring i form av at proteasehemmer- cocktailen ikke ble tilsatt buffer direkte men ble tilsatt til hvert rør like før sentrifugering. Dette for om mulig å spare cocktail. Metoden har vært brukt med godt resultat tidligere, og det var ingen grunn til å gjøre ytterligere endringer.

Selve ATPase assayet har ikke vært brukt tidligere

Resultatene av forsøkene ble ikke helt som forventet. Dette er i og for seg ganske spennende da det åpner for nye felt som trenger utforskning. Det som imidlertid er sikkert er at assayet ikke fungerte slik intensjonen var. Dersom forsøkene hadde gått som planlagt hadde vi sett en gradvis stigning i fritt fosfat målt ved scintillasjonstelling etter inkubering. Dette skjedde ikke. I stedet for ser vi at kurvene har en fallende tendens alle som en. Årsaken er for oss ukjent. Det er mulig vi ser resultatet av en ATPase-prosess vi ikke har tatt med i regningen. Også andre faktorer kan ha spilt inn uten at vi vet hva det er. For eksempel påvirkning av en kalsium ATPase. Det er kjent at kalsium indirekte påvirker konsentrasjonen av syklisk GMP i celler. Dette fordi kalsium påvirker syntesen av cGMP fordi den er en del av syntesen av nitrogen oksyd (NO). NO påvirker igjen de løselige guanylat sykklasen ved å stimulere dem. Kalsium påvirker ikke de membranbundne guanylat sykklasene.

I tidligere studier kjørt ved Farmakologisk avdeling, Universitetet i Tromsø, bl.a. ved Sundkvists doktorgrad, har det vært kjørt undersøkelser på renheten til isotopen for å være sikre på at verdien som står på følgeseddelen er reell. Den radiokjemiske renheter er et tall på hvor stor andel av isotopen som befinner seg i løsningen i den kjemiske form vi ønsker. Teoretisk sett kan det få følger for forsøket dersom det er større avvik. Av tidsmessige årsaker er det ikke gjort slik kontroll i forbindelse med mine forsøk. På samme vis kan man studere om isotopen degraderes under forsøkene. Dette ville gi større andel av uønsket form av isotopen, og vil kunne påvirke resultatet. Det er av samme grunner ikke gjennomført. I ettertid kan man kanskje hevde at det burde vært gjort for å validere funnene i større grad.

Temperaturforsøk: Resultatene kan være påvirket av at vi ikke satte rørene i isbad før inkubasjon. Kan ha ført til at reaksjonen startet før prøvene kom i vannbad.

Første trinn er å sette opp en bindingsassay. Del to består i å sette opp assay for cGMP ATPasen. Begge metodene er godt etablerte på Farmakologisk Avdelings laboratorium fra før.

5.0 TABELLER OG FIGURER

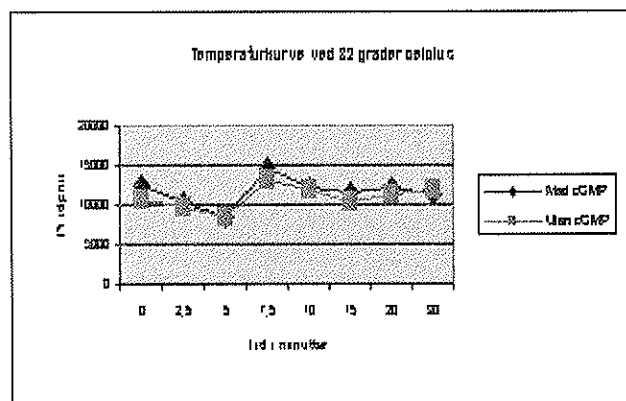
TEMPERATURFORSØK

Forsøk kjørt 23.-24.03.04 **GHOST**

Det er kjørt tre paralleller, verdiene er middelerverdiene av disse.

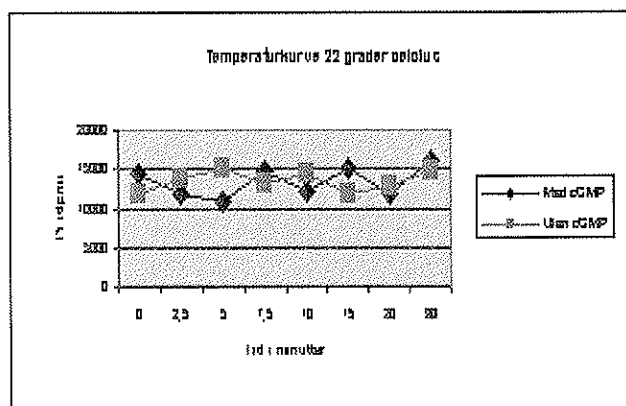
Figur 1.

Tid i minutter	Med cGMP	Uten cGMP
0	12514	10603,6
2,5	10452,7	9568,3
5	8553	8464,4
7,5	14607,8	13242,4
10	12154	11720,1
15	11558,3	10194,1
20	12205,7	11185,3
30	11321,7	12015,5



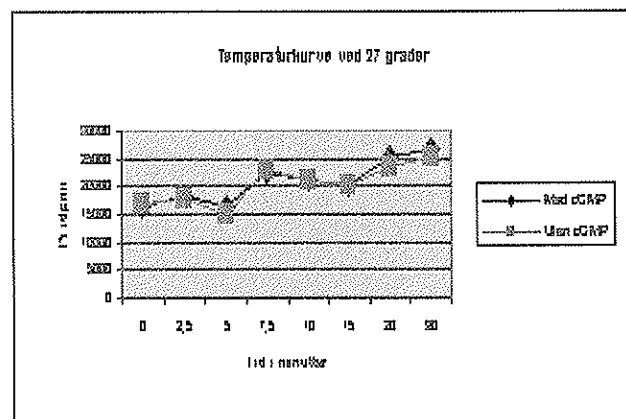
Figur 2.

Tid i minutter	Med cGMP	Uten cGMP
0	14461,4	11863,5
2,5	11772,3	13712,5
5	10921,7	14943,5
7,5	14735,9	13255
10	12205,1	14490,7
15	14974,8	11705,6
20	11685,3	12920
30	15954,5	14749,5



Figur 3.

Tid i minutter	Med cGMP	Uten cGMP
0	16229,5	16719,5
2,5	18279	17592,3
5	16201,4	14783,3
7,5	22371,3	22752,4
10	21069,8	21175
15	19981,1	20287,1
20	25388	23242,8
30	26892,8	25209,2



TIDSFORSØK

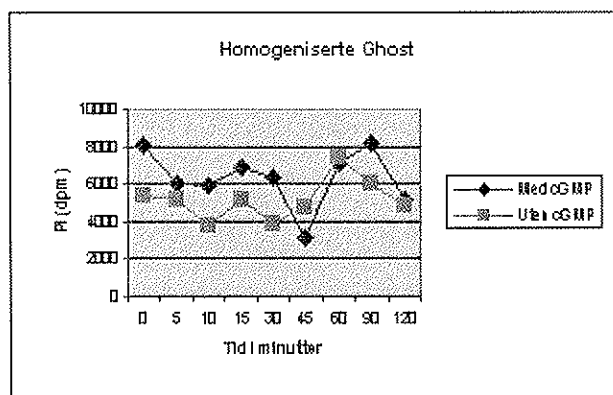
Forsøk ved 27 grader celcius

Det er kjørt 3 paralleller, verdiene er gjennomsnittsverdier.

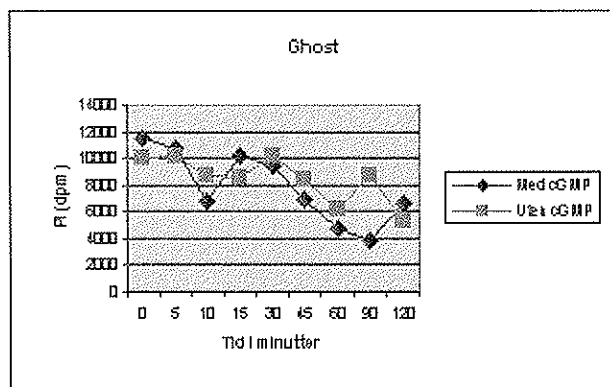
Forsøk 15.06.04

Undersker om det er forskjell på resultatet mellom Unsealed ghosts og homogeniserte ghost.

Tid i minutter	Med cGMP	Uten cGMP
0	8056	5325
5	6006	5138
10	5875	3737
15	6864	5174
30	6359	3908
45	3153	4703
60	7068	7429
90	8223	5989
120	5131	4861

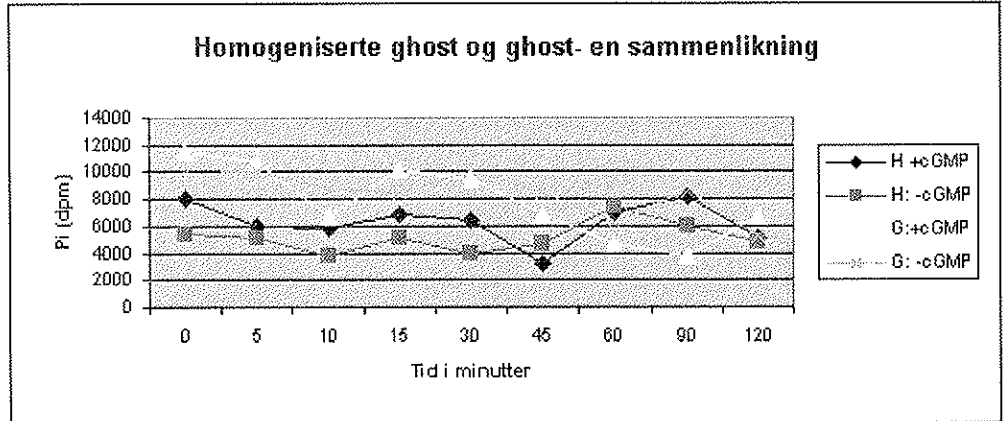


Tid i minutter	Med cGMP	Uten cGMP
0	11495	9984
5	10803	10119
10	6711	8687
15	10215	8489
30	9493	10131
45	6905	8441
60	4704	6206
90	3818	8640
120	6636	5283



Tid i minutter	HOMOGENISERTE GHOST		GHOST	
	H: +cGMP	H: -cGMP	G: +cGMP	G: -cGMP
0	8056	5325	11495	9984
5	6006	5138	10803	10119
10	5875	3737	6711	8687
15	6864	5174	10215	8489

30	6359	3908	9493	10131
45	3153	4703	6905	8441
60	7068	7429	4704	6206
90	8223	5989	3818	8640
120	5131	4861	6636	5283



33P

280886

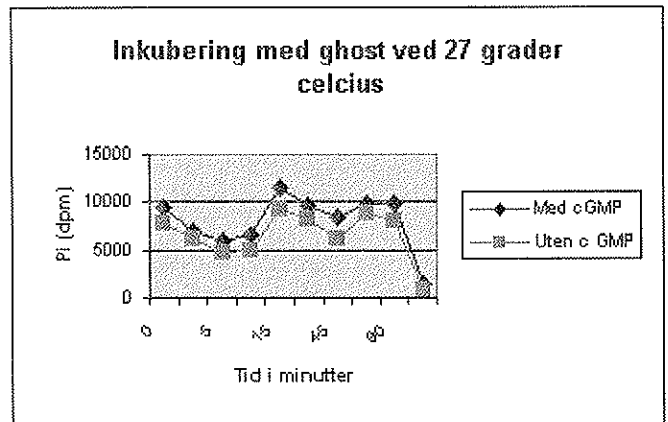
280441

TIDSKURVE- GHOST

24.06.04

Det er kjørt med 3 paralleller, verdiene er gjennomsnittsverdier

Tid i minutter	Med cGMP	Uten c GMP
0	9359	7870
2,5	6922	6254
5	5857	4730
10	6507	4969
15	11568	9178
30	9568	8211
45	8436	6238
60	9836	8919
90	9931	8071
120	1472	898



33P

269052

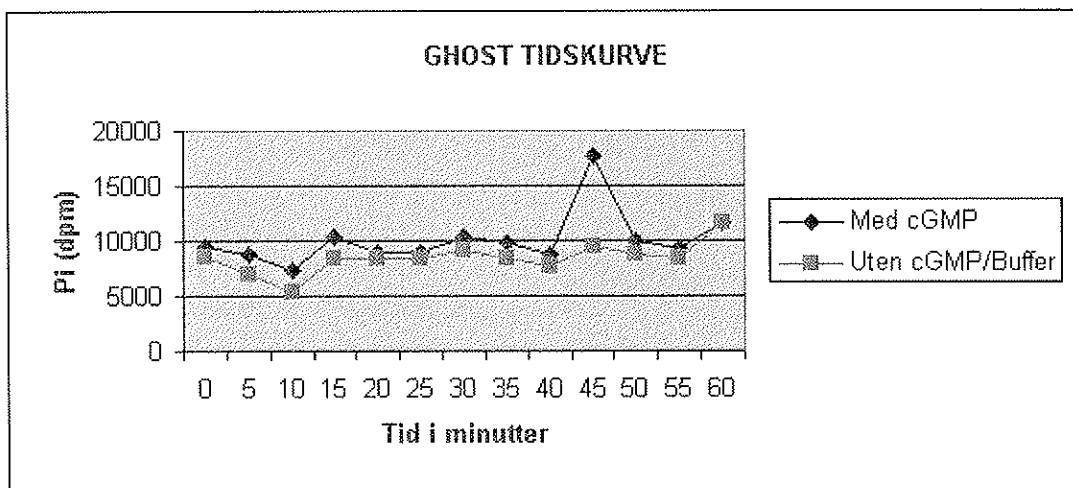
260177

Resultat forsøk 29.06.04**GHOST**

Forsøket er kjørt ved 27 grader celcius, 3 paralleler. Verdiene i tabell er gjennomsnittsverdier.

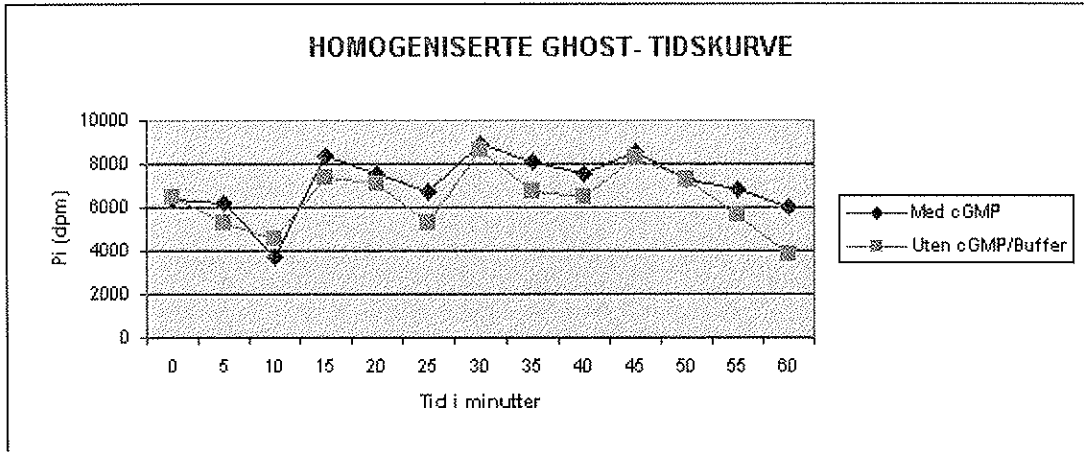
TIDSFORSØK

Tid i minutter	Med cGMP	Uten cGMP/Buffer
0	9455	8652
5	8695	7044
10	7332	5315
15	10334	8474
20	8957	8437
25	8860	8377
30	10285	9151
35	9844	8403
40	8693	7767
45	17643	9456
50	9970	8768
55	9265	8334
60	11625	11556

**HOMOGENISERTE GHOST**

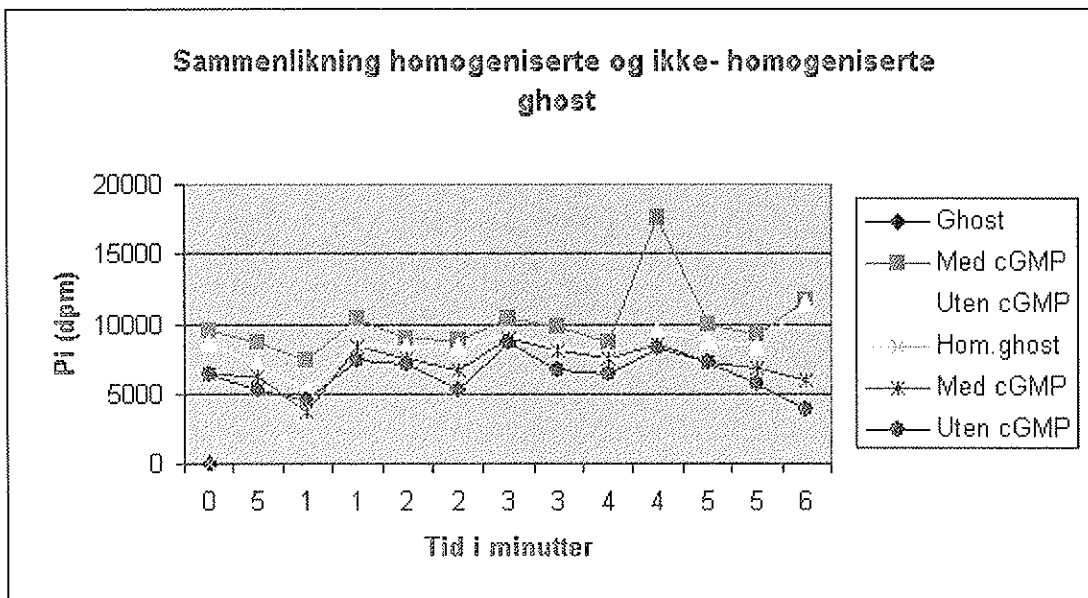
Tid i minutter	Med cGMP	Uten cGMP/Buffer
0	6354	6435
5	6209	5238
10	3709	4580
15	8365	7325
20	7565	7077
25	6711	5245
30	8932	8603
35	8107	6709
40	7507	6412
45	8569	8259

50	7290	7300
55	6789	5677
60	6013	3827



Sammenlikning homogeniserte og ikke-homogeniserte ghost

Ghost	Hom.ghost	
	Med cGMP	Uten cGMP
0	9455	8652
5	8695	7044
10	7332	5315
15	10334	8474
20	8957	8437
25	8860	8377
30	10285	9151
35	9844	8403
40	8693	7767
45	17643	9456
50	9970	8768
55	9265	8334
60	11625	11556



TIDSKURVE

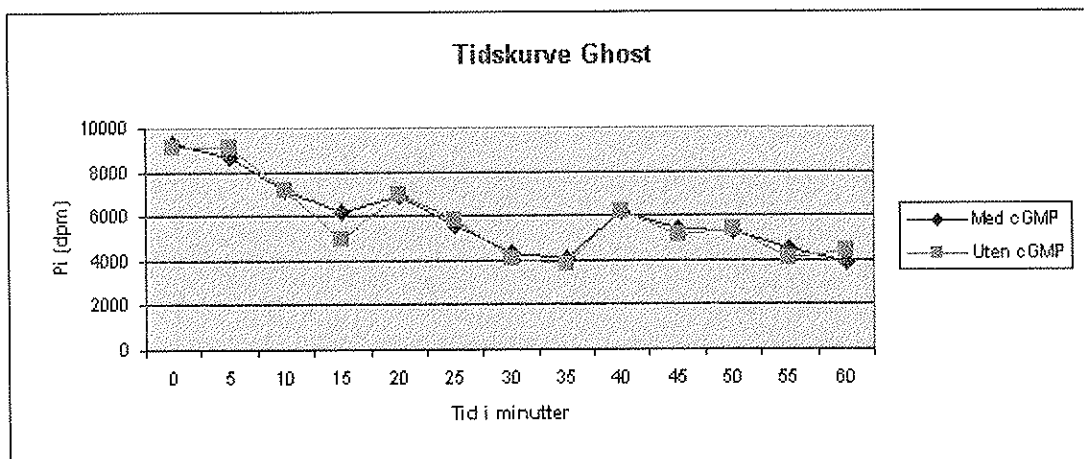
Resultat av forsøk 06.07.04.

Det er kjørt med 3 paralleller. Verdiene i tabellene er gjennomsnittsverdier av de 3 parallellene.
Forsøk ved 27 grader celcius.

GHOST

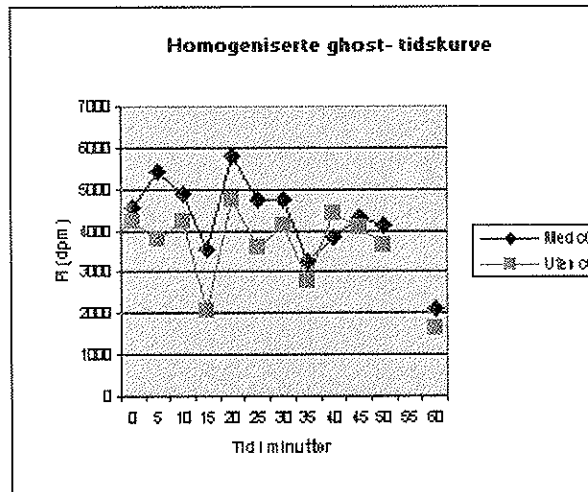
Tid iminutter	Med cGMP	Uten cGMP	
0		9292	9158
5		8630	9096
10		7185	7173
15		6191	4937
20		6926	6977
25		5580	5807
30		4308	4093
35		4084	3787
40		6166	6234
45		5407	5147
50		5348	5358
55		4513	4099
60		3891	4420

33P



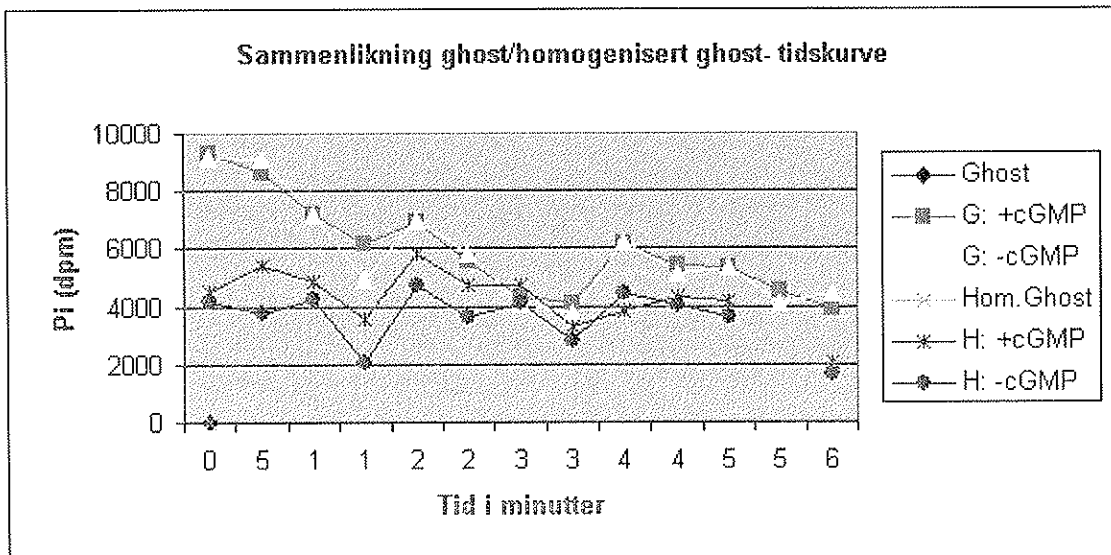
Homogeniserte Ghost

Tid i minutter	Med cGMP	Uten cGMP	
0		4550	4200
5		5434	3775
10		4881	4232
15		3530	2071
20		5824	4733
25		4725	3618
30		4724	4113
35		3259	2804
40		3845	4430
45		4338	4061
50		4146	3650
55			
60		2087	1650



Sammenlikning ghost og homogeniserte ghost

Tid i minutter	Ghost		Hom.Ghost		
	G: +cGMP	G: -cGMP	H: +cGMP	H: -cGMP	
0		9292	9158	4550	4200
5		8630	9096	5434	3775
10		7185	7173	4881	4232
15		6191	4937	3530	2071
20		6926	6977	5824	4733
25		5580	5807	4725	3618
30		4308	4093	4724	4113
35		4084	3787	3259	2804
40		6166	6234	3845	4430
45		5407	5147	4338	4061
50		5348	5358	4146	3650
55		4513	4099		
60		3891	4420	2087	1650



KONSENTRASJONSFORSØK cGMP

13.07.2004

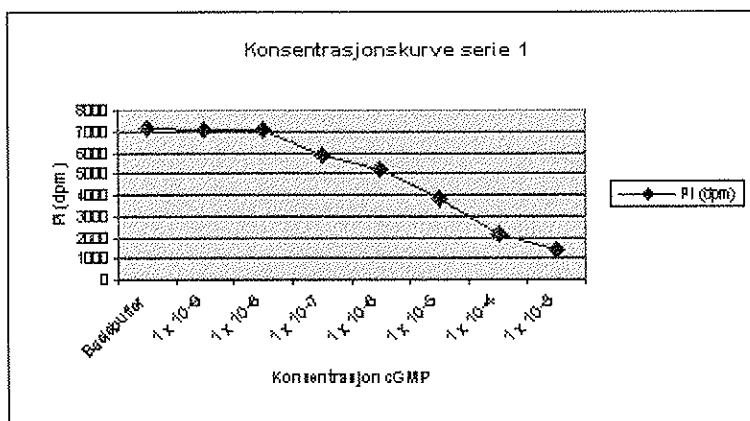
Forsøk kjørt ved 27 graser celcius

Inkubasjon 30 minutter

3 Paralleller, verdiene er gjennomsnittsverdier.

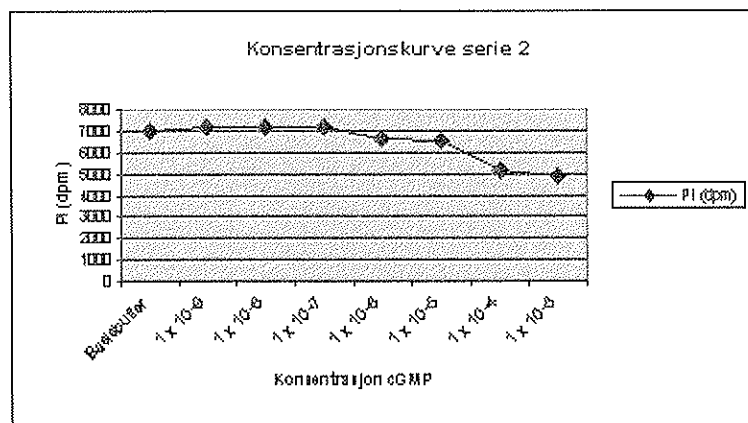
Serie 1

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	7177
1 x 10 ⁻⁹	7114
1 x 10 ⁻⁸	7049
1 x 10 ⁻⁷	5842
1 x 10 ⁻⁶	5168
1 x 10 ⁻⁵	3838
1 x 10 ⁻⁴	2175
1 x 10 ⁻³	1352



Serie 2

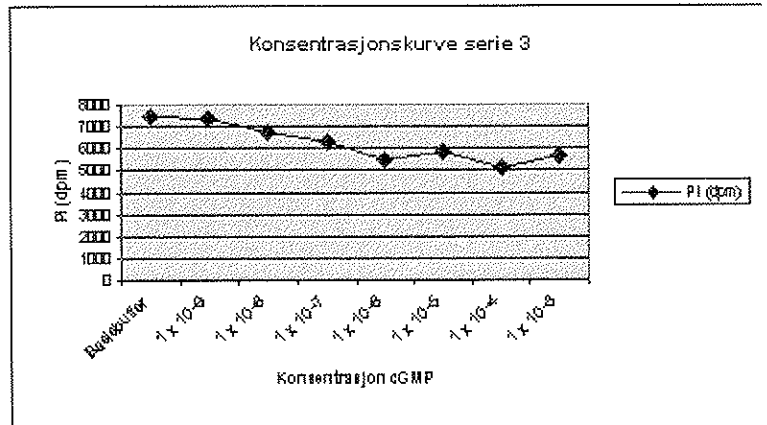
Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	6959
1 x 10 ⁻⁹	7213
1 x 10 ⁻⁸	7186
1 x 10 ⁻⁷	7133
1 x 10 ⁻⁶	6665
1 x 10 ⁻⁵	6511
1 x 10 ⁻⁴	5150
1 x 10 ⁻³	4908



Serie 3

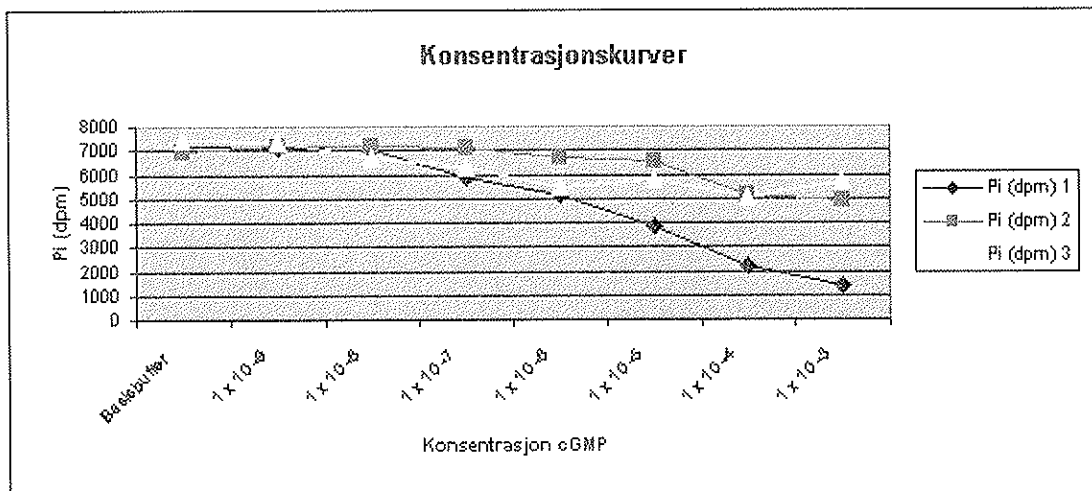
Kons. cGMP
 Basisbuffer
 1 x 10⁻⁹
 1 x 10⁻⁸
 1 x 10⁻⁷
 1 x 10⁻⁶
 1 x 10⁻⁵
 1 x 10⁻⁴
 1 x 10⁻³

Pi (dpm)
 7422
 7339
 6700
 6268
 5489
 5827
 5097
 5706



Sammenlikning 3 serier

Kons. cGMP	Serie 1	Serie 2	Serie 3
	Pi (dpm) 1	Pi (dpm) 2	Pi (dpm) 3
Basisbuffer	7177	6959	7422
1 x 10 ⁻⁹	7114	7213	7339
1 x 10 ⁻⁸	7049	7186	6700
1 x 10 ⁻⁷	5842	7133	6268
1 x 10 ⁻⁶	5168	6665	5489
1 x 10 ⁻⁵	3838	6511	5827
1 x 10 ⁻⁴	2175	5150	5097
1 x 10 ⁻³	1352	4908	5706



KONSENTRASJONSFORSØK

20.07.2004 Alle forsøk kjørt med 3 paralleller.

Verdiene i tabellene er gjennomsnittsverdier fra de tre parallellene.

33P

161267

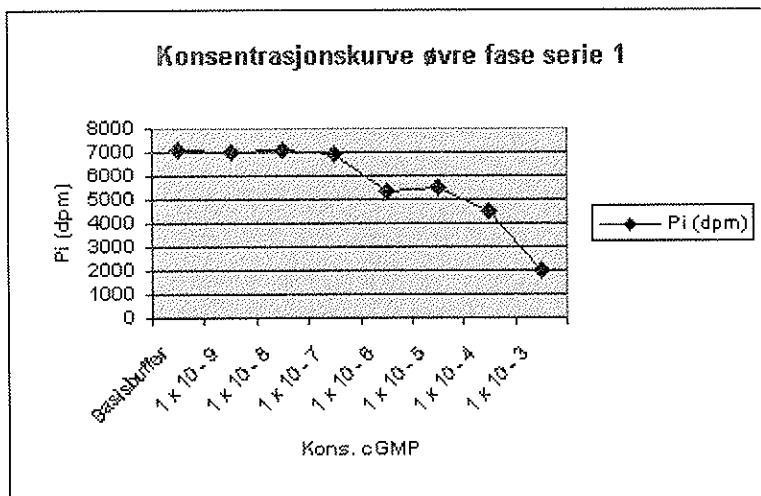
152766

GHOST

Sort serie 1

Øvre fase

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	7052
1 x 10 ⁻⁹	7040
1 x 10 ⁻⁸	7047
1 x 10 ⁻⁷	6949
1 x 10 ⁻⁶	5322
1 x 10 ⁻⁵	5497
1 x 10 ⁻⁴	4473
1 x 10 ⁻³	1997

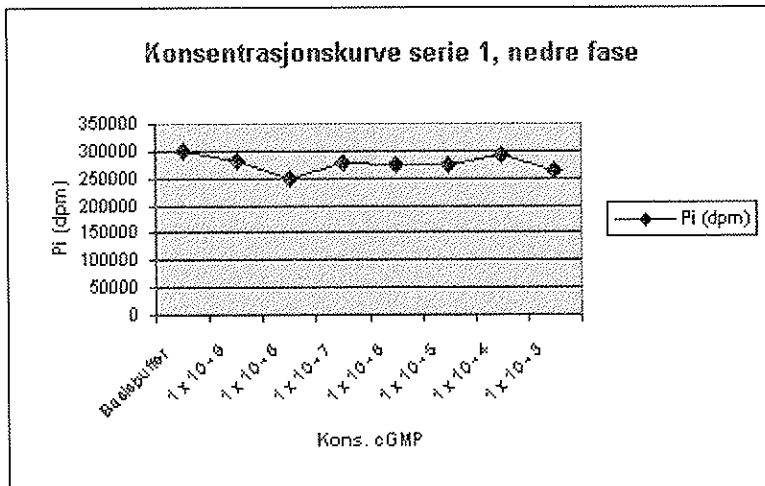


GHOST

Sort Serie 1

Nedre fase

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	298886
1 x 10 ⁻⁹	282950
1 x 10 ⁻⁸	248595
1 x 10 ⁻⁷	277731
1 x 10 ⁻⁶	275980
1 x 10 ⁻⁵	275816
1 x 10 ⁻⁴	293431
1 x 10 ⁻³	262662

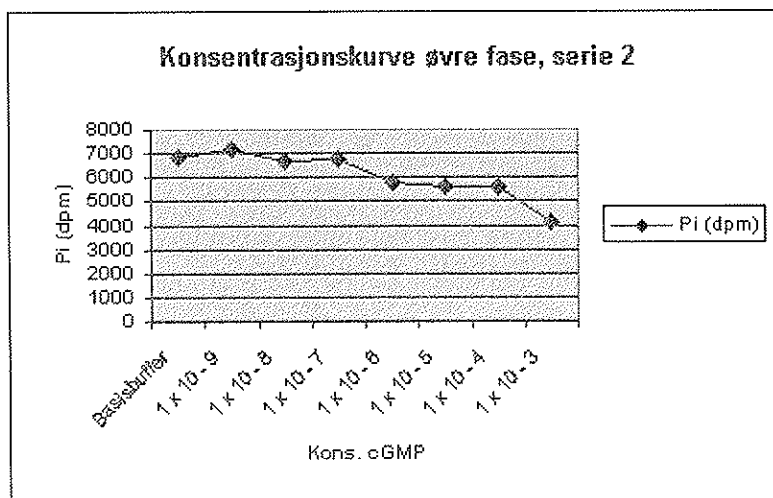


GHOST

Rød serie 2

Øvre Fase

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	6817
1 x 10 ⁻⁹	7195
1 x 10 ⁻⁸	6676
1 x 10 ⁻⁷	6753
1 x 10 ⁻⁶	5733
1 x 10 ⁻⁵	5649

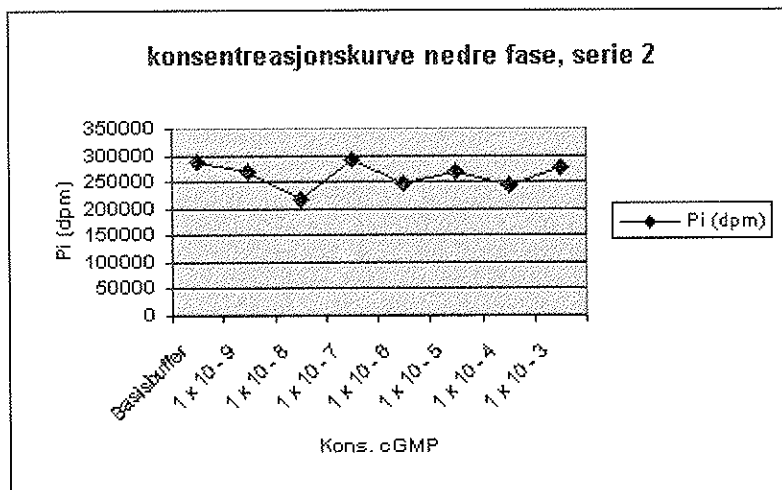


1 x 10 ⁻⁴	5609
1 x 10 ⁻³	4119

GHOST

Rød serie 2 Nedre fase

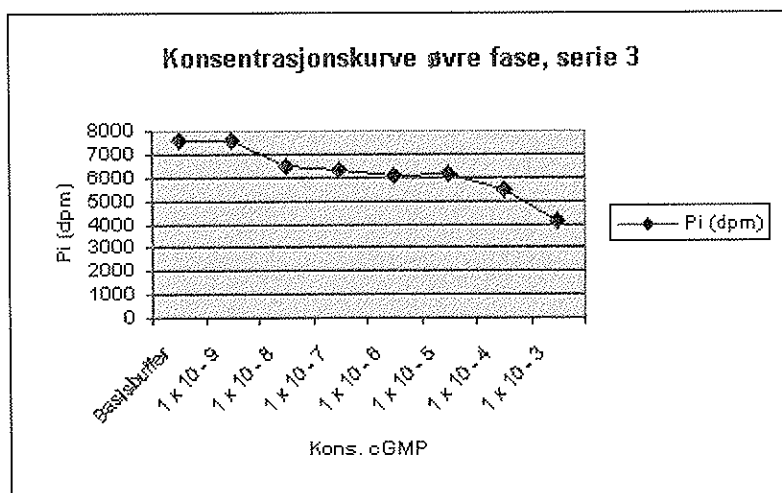
Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	287519
1 x 10 ⁻⁹	270190
1 x 10 ⁻⁸	216699
1 x 10 ⁻⁷	289869
1 x 10 ⁻⁶	247694
1 x 10 ⁻⁵	269876
1 x 10 ⁻⁴	244937
1 x 10 ⁻³	276364



GHOST

Blå serie 3 (mix av 1+2) Øvre fase

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	7551
1 x 10 ⁻⁹	7545
1 x 10 ⁻⁸	6460
1 x 10 ⁻⁷	6329
1 x 10 ⁻⁶	6045
1 x 10 ⁻⁵	6174
1 x 10 ⁻⁴	5462
1 x 10 ⁻³	4096

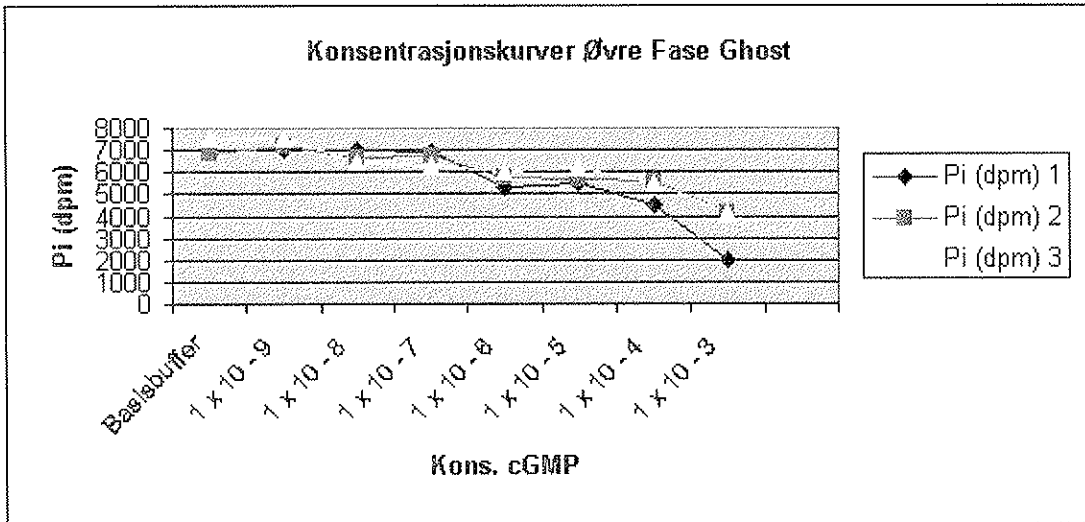


GHOST

Kons. cGMP Øvre fase Alle 3 serier

Kons. cGMP	Pi (dpm) 1	Pi (dpm) 2	Pi (dpm) 3
Basisbuffer	7052	6817	7551
1 x 10 ⁻⁹	7040	7195	7545
1 x 10 ⁻⁸	7047	6676	6460
1 x 10 ⁻⁷	6949	6753	6329
1 x 10 ⁻⁶	5322	5733	6045
1 x 10 ⁻⁵	5497	5649	6174

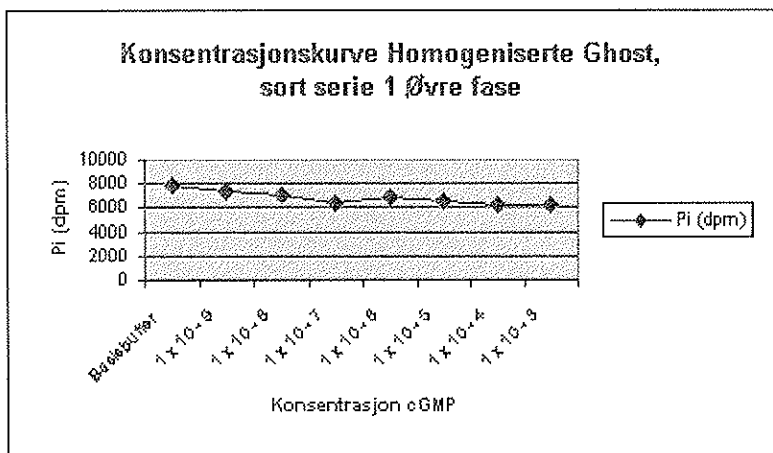
1 x 10 ⁻⁴	4473	5609	5462
1 x 10 ⁻³	1997	4119	4096



KONSENTRASJONSKURVE HOMOGENISERTE GHOST

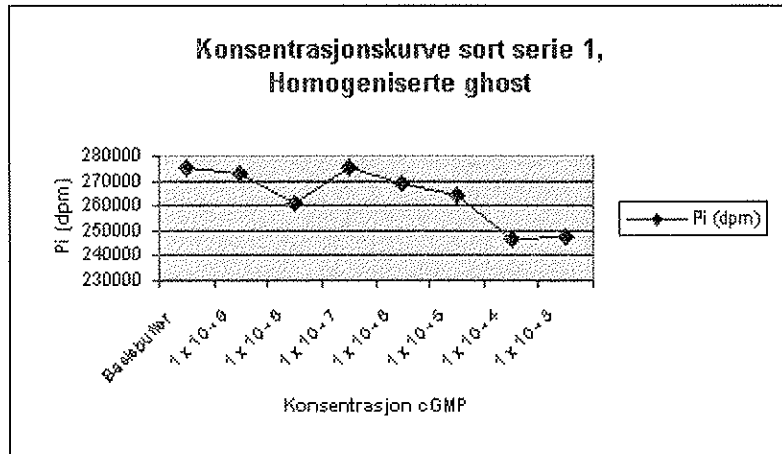
Sort serie 1 Øvre fase

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	7853
1 x 10 ⁻⁹	7417
1 x 10 ⁻⁸	6990
1 x 10 ⁻⁷	6442
1 x 10 ⁻⁶	6814
1 x 10 ⁻⁵	6569
1 x 10 ⁻⁴	6301
1 x 10 ⁻³	6230



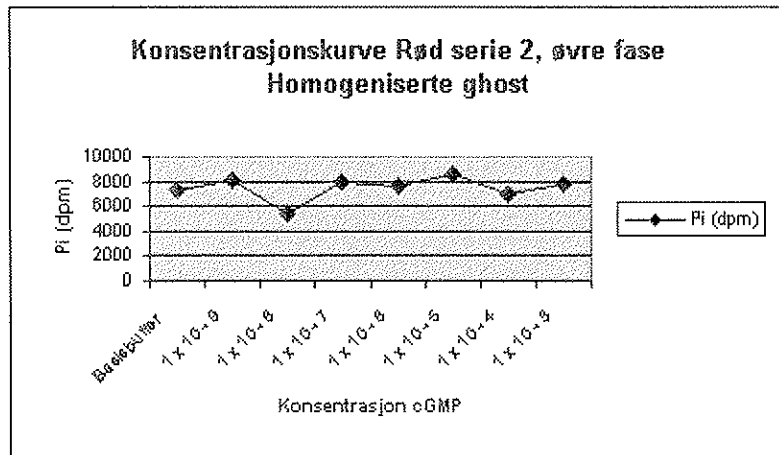
Sort serie 1 Nedre fase Estimerte tall

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	275000
1 x 10 ⁻⁹	272500
1 x 10 ⁻⁸	261250
1 x 10 ⁻⁷	275500
1 x 10 ⁻⁶	269000
1 x 10 ⁻⁵	264000
1 x 10 ⁻⁴	247000
1 x 10 ⁻³	247500



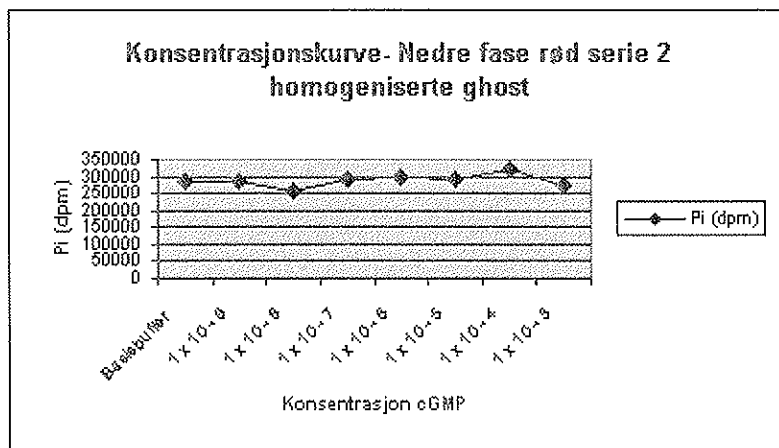
Rød serie 2 Øvre fase

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	7275
1 x 10 ⁻⁹	8063
1 x 10 ⁻⁸	5425
1 x 10 ⁻⁷	7989
1 x 10 ⁻⁶	7680
1 x 10 ⁻⁵	8618
1 x 10 ⁻⁴	6972
1 x 10 ⁻³	7712



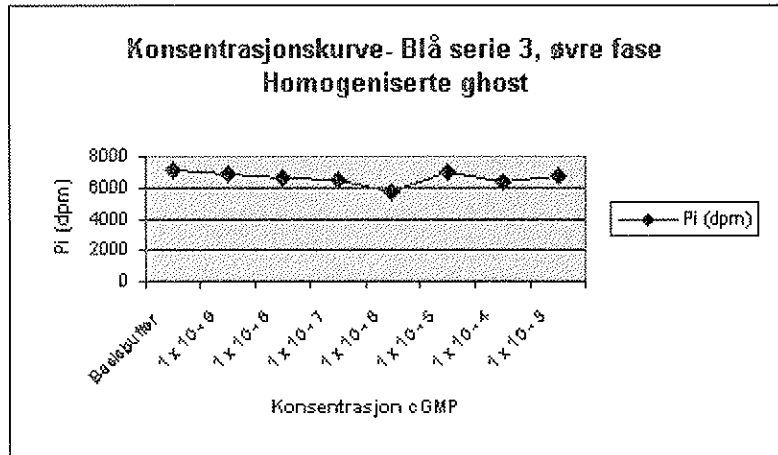
Rød serie 2 Nedre fase

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	286497
1 x 10 ⁻⁹	284424
1 x 10 ⁻⁸	257772
1 x 10 ⁻⁷	290456
1 x 10 ⁻⁶	297498
1 x 10 ⁻⁵	294249
1 x 10 ⁻⁴	318178
1 x 10 ⁻³	276060



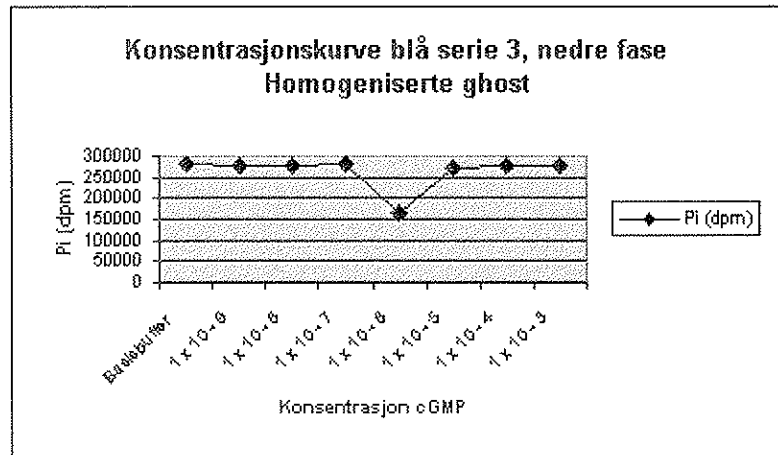
Blå serie 3 Øvre fase

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	7160
1 x 10 ⁻⁹	6872
1 x 10 ⁻⁸	6579
1 x 10 ⁻⁷	6472
1 x 10 ⁻⁶	5709
1 x 10 ⁻⁵	6963
1 x 10 ⁻⁴	6388
1 x 10 ⁻³	6685



Blå serie 3 Nedre fase

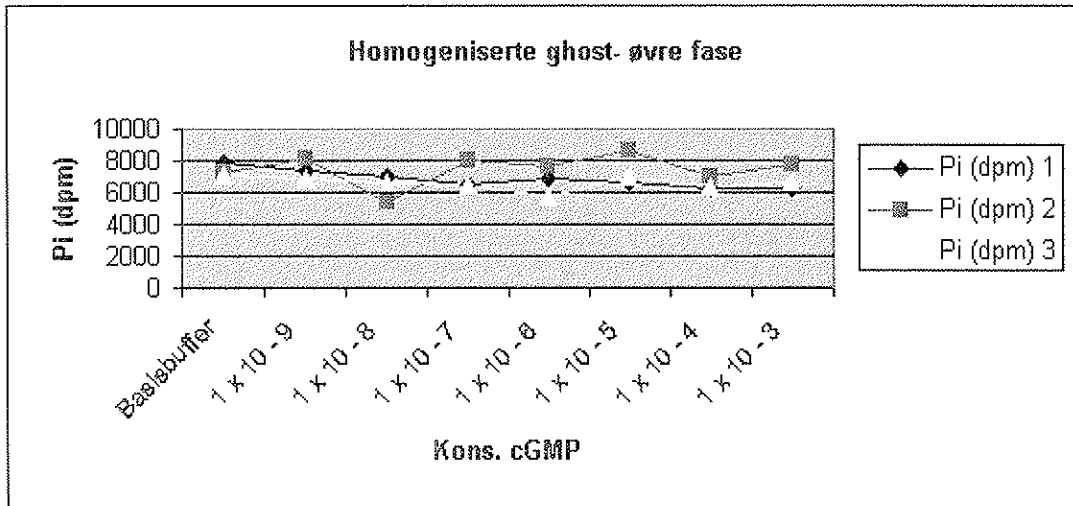
Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	281527
1 x 10 ⁻⁹	277585
1 x 10 ⁻⁸	278557
1 x 10 ⁻⁷	279123
1 x 10 ⁻⁶	165626
1 x 10 ⁻⁵	271026
1 x 10 ⁻⁴	276748
1 x 10 ⁻³	275164



SAMMENLIKNING- HOMOGENISERTE GHOST

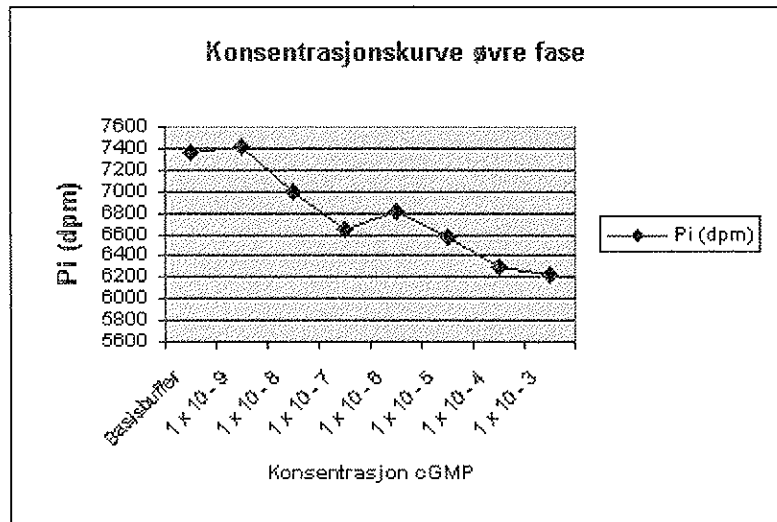
ØVRE FASE

Kons. Cgmp	Pi (dpm) 1	Pi (dpm) 2	Pi (dpm) 3
Basisbuffer	7853	7275	7160
1 x 10 ⁻⁹	7417	8063	6872
1 x 10 ⁻⁸	6990	5425	6579
1 x 10 ⁻⁷	6442	7989	6472
1 x 10 ⁻⁶	6814	7680	5709
1 x 10 ⁻⁵	6569	8618	6963
1 x 10 ⁻⁴	6301	6972	6388
1 x 10 ⁻³	6230	7712	6685

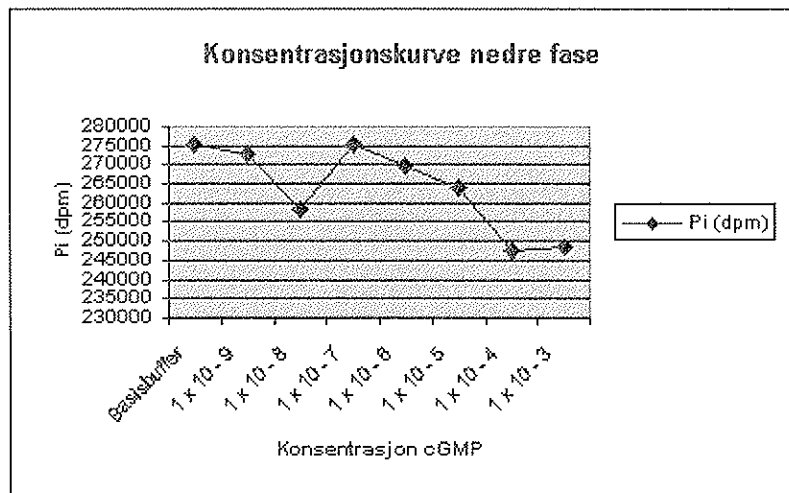


GHOST 26.07.2004

Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	7353
1 x 10 ⁻⁹	7417
1 x 10 ⁻⁸	6990
1 x 10 ⁻⁷	6642
1 x 10 ⁻⁶	6814
1 x 10 ⁻⁵	6569
1 x 10 ⁻⁴	6301
1 x 10 ⁻³	6230



Kons. cGMP	Pi (dpm)
Basisbuffer	275524
1 x 10 ⁻⁹	272948
1 x 10 ⁻⁸	258327
1 x 10 ⁻⁷	275276
1 x 10 ⁻⁶	269497
1 x 10 ⁻⁵	264184
1 x 10 ⁻⁴	247649
1 x 10 ⁻³	248598



6.0 REFERANSER

Ardailou N, Placier S, Ronco P og Ardailou R; Rerlease of cyclic nucleotides from the apical and basolateral poles of cultured human glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol* 1: 253-260, 1993.

Ashman, D.F, Lipton, R., Melicow, M.M., Price, T.D.; Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 11;330-334, 1963.

Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stadler J, Williams DL; ochoa JB, Di Silvio M, Simmons RL og Murray SA; Association between synthesis and release og cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes. *Am J Physiol* 262: C1077-C1082, 1992.

Boadu, E og Sager, G; ATPase activity and transport by cGMP transporter in human erythrocyte ghosts and proteoliposome reconstituted membrane ecstracts. *Biochem Biophys Acta* 1509: 467-474, 2000.

Coste H og Grondin P; Characterization of a novel potent and specific inhibitor of type V phosphodiesterase. *Biochem Pharmacol* 50: 1577-1585, 1995.

Duttagupta C, Romney SL, Palan PR og Slagle NS; Urinary cyclic nucleotides and the cytopaathology of human uterine cervial dysplasias. *Cancer Res* 42: 2938-2943, 1982.

Fiscus RR, Robles BT, Waldman SA og Murad F; Atrial natriuretic factors stimulate accumulation and efflux of cyclic GMP in C6-2B rat glioma and PC12 rat pheochromocytoma cell cultures. *J Neurochem* 48: 522-528, 1987.

Flo K, Hansen M, Ørbo A, Kjørstad KE, Maltau JM og Sager G; Effect of probenecid, verapamil and progesterone on the concentration- dependent and

- temperature- sensitive human erythrocyte uptake and export of guanosine 3`5`cyclic monophosphate (cGMP). *Scand J Clin Lab Invest* 55: 715- 721, 1995.
- Garbers DL; The guanylyl cyclase receptor family. *The new Biologist* 2: 499-504, 1990.
- Gennari C, Francini G, Galli M og Lore F; Urinary excretion of cyclic adenosine 3`5`- monophosphate and cyclic guanosine 3`5`- monophosphate in malignancy. *Journal of Clinical Pathology* 31: 735- 741, 1978.
- Goldberg, N.D., Dietz, S.B., and O`Toole, A.G.; Cyclic guanosine 3',5'- monophosphate in mammalian tissues and urine. *Journal of Biological Chemistry* 244:4458- 4466, 1969.
- Hamet P, Pang SC og Tremblay J; Atrial natriuretic factor- induced egression of cyclic guanosine 3`5`-monophosphate in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Biol Chem* 264: 12364- 12369, 1989.
- Kondo T, Dale GL and Beutler E; Glutathione transport by inside- out vesicles from human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6359-6362, 1980.
- Kapoor CL og Krishna G; Hormone- induced cyclic guanosine monophosphate secretion from guinea pig pancreatic lobules. *Science* 196: 1003-1005, 1977.
- Luo DS, Leung E og Vincendt SR; Nitric oxide- dependent efflux of cGMP in rat cerebellar cortex- an in- vivo microdialysis study. *Thrombosis Research* 14: 263- 271, 1994.
- Millul V, Prie D, GeniteauLegendre M, Verpont MC, Baudouin B og Ronco PM; ANP- stimulated cGMP egression in renal principal cells: Abrogation of polarity by SV40 large T. *Am J Physiol* 39:C1051-1060, 1996.

- O`Dea RF, Gagnon C og Zatz M; Regulation of guanosine 3`5`cyclic monophosphate in the rat pineal and posterior pituitary glands. *J Neurochem* 31: 733-738, 1978.
- Patel MJ, Wypij DM, Rose DA, Rimele TJ og Wiseman JS; Secretion of cyclic GMP by cultured epithelial and fibroblast cell lines in response to nitric oxide. *Journal of Farmacology and experimental Therapeutics* 273:16-25, 1995.
- Pedersen PL; Multidrug resistance- a fascinating, clinically relevant problem in bioenergetics. *J Bioenerg. Biomembr.* 27: 3-5, 1995.
- Pedraza CE, Baltrons MA og Garcia A; Interleukin- 1 beta stimulates cyclic GMP efflux in brain astrocytes. *FEBS Letters* 507: 303- 306, 2001.
- Peracchi M, Maiolo AT, Lombardi L, Catena FB og Polli EE; Patterns of cyclic nucleotides in normal and leukaemic human leucocytes. *Br J Cancer* 41: 360- 371, 1980.
- Peracchi M, Lombardi L, Maiolo AT, Baumonti- Catena F, Toschi V, Chiorboli O, Mozzana R og Polli EE; Plasma and urine cyclic nucleotide elvels in patients with acute and chronic leukemia. *Blood* 61: 429- 434, 1983.
- Peracchi M, Lombardi L, Toschi V, Bamonti- Catena F, Mandelli V, Maiolo AT, Baldini L og Polli EE; Plasma and urine cyclic nucleotide levels in patients with neoplastic diseases. *Cancer* 54: 3028- 3034, 1984.
- Peracchi M, Toschi V, Bamonti- Catena F, Lombardi L, Bareggi B, Cortelezzi A, Colombi M, Maiolo AT og Polli EE; Plasma cyclic nucleotide levels in acute leukemia patients. *Blood* 69: 1613- 1616, 1987.
- Sager G, Ørbo A, Pettersen RH og Kjørstad KE; Export of guanosine 3`5`- cyclic monophosphate (cGMP) from human erythrocytes characterized by inside- out membrane vesicles. *Scand J Clin Lab Invest* 56; 289- 293, 1996.

Schini V, Grant NJ, Miller RC og Takeda K; Morphological characterization of cultured bovine aortic endothelial cells and the effects of atriopeptin II and sodium nitroprusside on cellular and extracellular accumulation of cyclic GMP. *European Journal of Cell Biology* 47: 53-61, 1998.

Schulz S, Yuen PST and Garbers DL; The expanding family of guanylyl cyclases. *Trends Pharmacol. Sci* 12: 116.120, 1991.

Steck TL og Kant JA; *Methods emzymol* 31A: 172-180, 1974.

Stoos BA og Garvin JL; Vectorial efflux of cGMP and its dependence on sodium in the cortical collecting duct. *Am J Physiol* 40: R1676-R1681, 1996.

Tjørhammar ML, Lazaridis G og Bartfal T; Cyclic GMP efflux from liver slices. *J Biol Chem* 258: 6882-6886, 1983.

Tjørhammar ML, Lazaridis G og Bartfal T; Efflux of cyclic guanosine 3`5`-monophosphate from cerebellar slices stimulated by L- glutamate or high K⁺ or N- methyl-N`- nitro- N- nitrosguanidine. *Neuroscience Letters* 68: 95-99, 1986.

Turner GA, Ellis RD, Guthrie D, Latner AL, Monaghan JM, Ross WM, Skillen AW og Wilson RG; Urine cyclic nucleotide concentrations in cancer and other conditions; cyclic GMP: a potential marker for cancer treatment. *Journal of Clinical Pathology* 35: 800- 806, 1982.

Vaskinn S, Sundkvist E, Jaeger R og Sager G; The effect of Mg²⁺, nucleotides and ATPase inhibitors on the uptake of [3H]-cGMP to inside- out vesicles from human erythrocytes. *Mol Membr Biol* 16: 181- 188, 1999.

Wong SKF and Garbers DL; Receptor guanylyl cyclases. *J. Clin. Invest.* 90: 299-305, 1992.

Wu XB, Bryne B, von Appen F og Ulrich V; Efflux of cyclic GMP from activated human platelets. *Molecular Pharmacology* 43: 564- 568, 1993.

Yang RB, Foster DC, Garbers DL og Fülle HJ; Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl acad Sci USA*. 92: 602- 606, 1995.

Ørbo A, Jaeger R og Sager G; Effect of serum and cell density on transmembrane distribution of cAMP and cGMP in transformed (C4-I) and non- transformed (WI-38) human cells. *Int J Cancer* 55: 957- 962, 1993.

Ørbo A, Jaeger R og Sager G; Cell density- dependence of cAMP and cGMP levels in four human cell lines derived from carcinomas of the uterine cervix. *Gynecologic Oncology* 52: 320- 325, 1994.