

**UTRYKK AV MULTIRESISTANCE-
ASSOCIATED PROTEINER (MRP 4
OG MRP 5) I CELLER FRA CANCER
CERVICIS UTERI**

**5.ÅRS OPPGAVE I STADIUM IV
–medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø**

*Linn Beate Skogholt
Kull-00*

*Veileder: Professor Georg Sager,
farmakologisk avdeling*

Tromsø 15. september 2005

Innholdsfortegnelse:

Resyme` s. 2

Introduksjon..... s. 3

Metoder..... s.4

Resultater..... s. 8

Diskusjon..... s.11

Tabeller s.13

Figurer s.15

Referanser..... s.18

Resyme`:

Proteinene MRP 4, 5 og 8 transporterer cGMP og cAMP ut av celler. Mitt mål for oppgaven ble først og fremst å påvise MRP 4 og 5 i cervix cancer celler og helst også prøve å kvantifisere de. Da det kun eksisterer antistoffer mot MRP 4 og 5, ble det vanskelig å prøve å finne MRP 8 med mine metoder.

Mitt arbeid ble å samle prøver fra flasker eller skåler med forskjellig celletetthet, dra proteinet ut fra cellemembranen og deretter skille proteinene ved hjelp av elektroforese og så visualisere de serologisk.

Da antistoffene ikke var så spesifikke fikk jeg mange bånd på gelene, og dermed ble det vanskelig å kunne si om jeg fikk påvist de aktuelle proteinene eller ikke.

Men med tanke på vekt kunne jeg med ganske stor sikkerhet kunne peke ut band som stemte med samme vekt som MRP 4 og MRP 5.

Introduksjon:

I løpet av de siste ti – femten årene har man karakterisert en gruppe membran transport-proteiner; MRP ("multidrug resistance proteins") som er medlemmer av ABC ("ATP-binding cassette") familien [1-5].

Det blir stadig oppdaget flere MRP som klassifiseres i denne gruppen og nå er man opp i hele 9 forskjellige proteiner.

Det har vært mange studier på disse proteinene for å finne funksjonen i cellene og i hvilke type celler de er uttrykt. Disse pumpene forårsaker en ATP avhengig transport av organiske ioner, enten lipofile forbindelser konjugert med glutathione eller organiske anioner. Innen MRP-familien vil MRP 4, 5 og 8 transporterer cycliske nukleotider (og noen nucleoside monofosfater [6-10]).

Det er i tidligere studier funnet sammenheng mellom cancer vekst og mengde cGMP og cAMP , men det mangler kunnskap om disse transport-molekylene har et forandret uttrykk i cancer celler.

Det er funnet at høye intracellulære konsentrasjoner av cGMP virker veksthemmende [19-21], og at cancer celler kan øke utpumpingen av cGMP. Et økt uttrykk av disse pumpene kan være en av årsakene til at de klarer å komme unna vekstregulerende faktorer.

Man har også funnet ut at høyt innhold av MRP 4 gir liten effekt av antiviral terapi, da cellen transporterer medikamenter ut av cellen igjen [22-23]. Proteinet har visstnok også en rolle i efflux av prostaglandin ut av cellen [24].

Transport av cykliske nukleotider inn og ut over celle-membraner har vært forsket mye på i de senere år uten at man har fått full oversikt over hva det er som transporterer dem ut av cellene. [25-29]

Derfor følte man det kunne bli et gjennombrudd da det ble oppdaget at proteinene MRP 4, 5

og 8 utførte en slik transport. Men til dags dato er det fortsatt et ukjent område med mange spørsmål.

Blant annet strides de lærde om proteinene har en høy eller lav affinitet til cycliske nukleotider [30].

Ikke minst har det vært en stor oppgave å finne ut i hvilke celler som har disse uttrykt, hva som kontrollerer mengde uttrykt og om de har en essensiell rolle i transport til cancer celler. Mesteparten av tidligere forskning har konsentrert seg om å måle cGMP og cAMP inne og utenfor cellene under forskjellige forhold. Og brukt mengden som mål på forandringer i cellens uttrykk av transport proteiner eller endring av enkelt-proteiners transportfunksjon.

Grunnen til at jeg brukte C4-I celler [31], invasive cancer celler fra cervix, er flere. De er lette å jobbe med og har kort doblingstid. Det er også gjort en del forskning tidligere på samme celler der man har funnet høy transport av cGMP og cAMP, men ikke hva som transporterte de ut.

Metoder:

All aktivitet med cellene ble utført i et spesielt celle laboratorium i et sterilt avtrekkskap og steril inkubatorskap for å unngå forurensing av bakterier og sopp.

Jeg unngikk også all kontakt med gjær i denne perioden for å unngå kontaminering.

Cellekultur:

Humane karsinom epitel celler fra cervix. C-4 I celler.

Disse ble dyrket både i sterile celle kultur flasker og på skåler med forskjellig utsåelsestetthet. Veksten foregikk i varmeskap ved 37°C med høy luftfuktighet

og tilsatt 5 % CO₂ som buffer.

Utsåing av celler:

Stokk med C4-I celler ble oppbevart i ampuller i flytende nitrogen. En slik ampulle ble tint og innholdet blandet i RPMI 1640 med serum. Deretter sentrifugert. Da lå cellene som en knapp i bunnen av sentrifuge røret. Denne vasken med medium fikk fjernet DMSO som cellene ble frosset i. DMSO brukes for å fortrenge vann fra cellene og forhindrer at de sprekker, men er toksisk for cellene ved 37°C. Deretter ble cellene i medium tilsatt i celle kultur flaske, satt i varmeskap og neste dag hadde cellene festet seg i bunnen. Deretter ble denne flasken brukt som utgangsmateriale ("stock") og det ble ikke tint opp flere ampuller løpet av forsøket.

Ved splitting når celletettheten ble for høy, eller ved oppsett av forsøk, ble det brukt trypsin for å løsne cellene. Trypsinet fikk virke i varmeskap i 10 minutter. Deretter ble virkningen av trypsin stoppet ved hjelp av medium tilsatt serum. Dette var viktig da trypsin er en protease og kan ikke virke for lenge på cellene.

Det ble brukt skåler til forsøket på grunn av høsting ved hjelp av celle skrape. Mens "stock"en vokste i flaske for mest mulig å beskytte den mot forurensing.

Medium:

RPMI 1640 med 10 % nyfødt kalve serum (NCS). Denne inneholder en mengde aminosyrer, vitaminer, glukose som vekstnæring. Den inneholder også fenol rødt som en pH indikator. Serumet gir cellene et miljø som ligner mer in vivo. Dette ved å tilføre cellene komponenter som enzymer, vekst faktorer, gir mer likt fysiskemiske forhold i henhold til viskositet, kolloid osmotisk trykk og lignende. Medium ble skiftet hver 24 time.

Telling av celler:

Cellene ble løsnet med 3 ml trypsin i varmeskap. Deretter tilsatt 7 ml medium. Løsningen ble homogenisert med pipette og prøve blandet med trypanblå i hensiktsmessig fortykning,

avhengig av hvor mange celler det var. Deretter ble cellene telt i Burker tellekammer.

Høsting av celler:

Metode 1: cellene ble vasket to ganger med PBS, deretter ble 200 µl RIPA buffer dryppet over cellene. Denne får cellene til å lysere samtidig som den inneholder protease inhibitor som forhindrer at proteinene MRP 4 og 5 brytes ned..

Cellene ble løsnet med celskrape, samlet i en ampulle, cellerestene ble sentrifugert ned og supernatanten frosset ned 70°celsius.

Prøven og reagensene ble under hele prosessen holdt mest mulig på is for å unngå proteolyse.

Metode 2: Cellene ble behandlet med trypsin i varmeskap i 10 minutter for at de skulle løsne fra skåla/flaska. Deretter tilsatt RPMI 1640 med serum. Prøven ble sentrifugert, supernatanten fjernet og RIPA tilsatt over cellene. Deretter ny sentrifugering, og supernatanten som inneholder proteinene ble frosset ned 70°C.

Under hele høstingen ble det prøvd å holde prøven mest mulig på is for å unngå proteolyse.

Men da trypsin behandlinga foregikk i varmeskap, kunne man ikke utelukke et slikt problem.

Western blot:

Western blot ble kjørt på NuPage 3-8 % Tris acetat gel fra invitrogen. Disse var best å kjøre på med store proteiner som MRP 4 og 5. Disse hadde 12 brønner.

See Blue ble brukt som en visuell kontroll på at proteinene faktisk vandret.

XP Magic Marker ble brukt som referanse for å sammenligne protein størrelse da denne viser bånd helt opp til 220 kDa.

Prøvene ble tilsatt reducing mix som inneholder LDS (sukkerløsning som gjør proteinene så tunge at de faller ned i brønnen) og DTT (reducing agent).

Så ble prøvene varmebehandlet ved 70°C og deretter applisert på elektroforese gelen.

Prøvene ble mellom vært steg holdt på is for å unngå proteolyse. Det ble kjørt med to geler. Elektroforesen gikk i 40 minutter på 200 volt. Deretter ble det utført en blotting fra gelen til en nitrocellulose membran. Dette i en blotte buffer i minst 1 time ved 25 volt. I de siste forsøkene sto den på i 1,5 timer. Etter blottinga ble gelen vasket med TBS og deretter lagt i en blokkebuffer laget av tørrmelk (hindrer uspesifikk binding) og TBS med 0,1 % Tween-20 (TBS-T). Denne sto over natta. Dagen etterpå ble gelen lagt i løsning med primært antistoff. Jeg hadde anti-MRP4 (1:1000), et polyklonalt antistoff laget av kanin, og anti-MRP5 (1:50), et monoklonalt antistoff fra rotte. En gel i vær løsning. Dette ble inkubert i en time. Deretter ble de videre inkubert i 1 time med sekundære antistoff konjugert med horseradish peroxidase (HRP). Anti-rabbit Ig G fra geit (1:2000) og anti-rotte Ig G fra kanin(1:2000).

Bandene ble så fremkalt på film ved hjelp av deteksjonsløsning og deretter kjørt gjennom fremkallingsmaskin på mørkerom.

Preparering av ghost:

Blod ble tappet på EDTA glass, sentrifugert og plasma med buffy coaten ble sugd av. Deretter ble blodlegemene vasket tre ganger med en løsning som inneholder Tris-HCl, NaCl og EDTA. For å fjerne hemoglobinet ble erytrocyttene hemolysert i en hypoton løsning som inneholdt Tris-HCl, EDTA og protease hemmer cocktail. Blodlegemene ble resuspendert i denne løsningen, sentrifugert og supernatanten sugd av. Dette ble repetert til ghostene var hvite og supernatanten fargeløs. Etterpå ble det brukt RIPA buffer for å trekke ut proteinene fra ghosten, sentrifugerte og frøs supernatanten ned ved 70°C.

Man fikk to prøver med proteiner fra erytrocytter, A og B.

Resultater:

Cellevekst

Celle-veksten kan deles inn i tre forskjellige faser. I lag fasen fester de seg på underlaget, i log fasen er det en logaritmisk vekst og deretter går de inn i en vekststopp, eventuelt de dør.

Forsøkene på cellene skulle kjøres i den logaritmiske fasen.

Celle-veksten avhenger av flere ting, og som andre humane organismer er det umulig å forutse eksakt oppførsel.

For eksempel trives cellene mye bedre når det er en viss kontakt mellom cellene, der de kan påvirke hverandre. Men ved for tett kontakt vokser de dårligere igjen.

Det ble først litt problematisk å få cellene til å doble seg. Grunnen var at det ved første utsåing ble brukte for stor flaske, og det ble for liten kontakt mellom cellene. Derfor tok det 16 dager før det ble nok celler til å sette opp vekstkurve. Vekstkurven ble satt opp med 10 ml skåler.

Vekstkurve ble satt opp for å finne doblingstid og dermed se om cellene hadde forandret egenskaper i forhold til tidligere. For å være sikker ble det kjørt tre skåler for hver 24. time i 168 timer. Altså i 7 dager. Dette gjorde ble gjort i tre forskjellige omganger.

Ved utsåing skulle det være en celletetthet på mellom $4.0 - 5.0 \times 10^4$ celler/ml.

Se tabell 1, 2, 3 og 4 og figur 1 for resultat.

Som man ser ut fra de grafiske framstillinger var det raskere vekst i den siste vekstkurven (mean 3) jeg kjørte enn den første (mean 1). Forskjellen var fra ca. 70 timer til celle dobling på første kurve til 50 timer på den siste.

Det har sikkert sin årsak i som tidligere beskrevet at cellene trenger tid for å finne optimal vekst. Dette så man også på stokken som måtte splittes mye oftere ut i forsøket.

Western blot

Ettersom det ble begynt med å sette opp forsøk-skåler for å samle prøver til western blot etter at vekstkurvene var ferdig, ble det regnet med at celledobling på ca. 102 timer er den mest korrekte. Det ble lagde mange forskjellige prøver med forskjellig antall dager med cellevekst. Oversikt over prøver se tabell 5. Først ble det sådd ut på 10 ml skåler der jeg lagde en med lite vekst og en med mye vekst. Western blot viste flere band, men ingen som stemte helt med molekylvekten. Deretter ble det laget to nye prøver der den første hadde vekst på 80-90 % av skåla mens den neste ble høstet etter at skåla var dekket 100 % av celler.

Etter å ha kjørt western blot ble det ikke funnet noe utslag på antistoff mot MRP 5. Men ved bruk av antistoff mot MRP 4 kom det fram tydelig band (se figur 2) Der kunne man også se at det var forskjellig styrke på bandene til prøver med lite vekst og prøver med mye vekst.

En annen metode ble også brukt til å høste cellene. Det ble spekulert om den første metoden med celleskarpe kunne gi for stort tap av celler med denne behandlingen.

Den andre metoden besto i å løsne alle cellene med trypsin. Faren her var om det ble proteolyse av proteinene. For å sammenligne ble to skåler høstet ved hjelp av hver sin metode. Denne gangen ble det brukt dobbelt så store skåler for å være sikker på at det ble nok celler til å få nok proteiner i prøven. En feilkilde i skåla hvor det ble brukt celleskraper på var at all PBS som det ble vasket med, ikke ble sugd av slik at prøven kan ha blitt fortynnet.

Western blot ble kjørt to ganger, men resultatet var negativt begge gangene. Mest trolig feilkilde var for gammel deteksjonsvæske, så det ble bestilt ny.

Imens ble membranene fra siste runde i TBS-T beholdt til det kom ny deteksjons løsning.

Da ble det positivt resultat på både MRP 4 og 5 (se figur 3 og 4). Spesielt framkom det klare band på MRP 4. Man kunne også se at det var tydeligst band på prøve 4 fra skåler med fullpakket vekst, og prøve 6, stor skål som var høstet ved hjelp av trypsin.

Ikke overraskende ble det dårlige band på prøve 5; prøve fra stor skål høstet med celleskraper.

Dette på grunn av feilkilde tidligere nevnt. Årsaken til svakere band med MRP 5 kan være bruk av ferdig blandet antistoff mot MRP 5 som hadde blitt frosset ned.

Men en annen mulighet kan også være at det er mindre MRP 5 i cellemembranen enn MRP 4.

Det ble bestilt nytt antistoff mot MRP 5. Da det var mange uspesifikke band på membranene var det ønskelig med en ren kontroll med proteinene for å kunne sammenligne bandenes plassering. Dette var det ingen firma som hadde for salg.

Ettersom erythrocytter hadde fått påvist MRP 4 og 5 i membranen tidligere ble det forsøkt å lage en kontroll med disse cellene. Ghost ble framstilt, deretter ble proteinene trukket ut med hjelp av RIPA buffer. I neste runde med western blot ble det brukt 4 brønner til kontroll.

Resultatet ble et veldig urolig bilde. Spesielt på membranene med antistoff mot MRP 5. En av årsakene kan være at begge gelene ble lagt i samme deteksjonsløsning. Og da den med anti-MRP 5 lå nedover vendt i skålen kan den ha fått for lite deteksjons løsning. En annen feilkilde kan være at plastikken som ble lagt over membranen ved framkalling ikke var strukket helt glatt ut. En ny western blotting ble satt opp. Det ble ikke noe bra resultat, men fikk påvist band i en av prøvene fra erythrocyttene på membranen behandlet med antistoff mot MRP 4 (se figur 5). Overraskende ble det resultat på prøve A og ikke B. Dette til tross for at mengde ghost var dobbelt så høy i prøve B. Problemet var at bandet ikke lå på samme plass som hos cervix cellene. Forklaringen kan være glykolysering på proteinet er forskjellig i de ulike celle-typene, og det blir dermed ulik tyngde. Skulle man bruke erythrocyttene som kontroll burde man konsekvent deglykolyisert prøvene [33].

Det ble altså funnet band som kan stemme med riktig protein vekt både for MRP 4 og 5 i cervix celler. Men ideelt skulle man også hatt en annen metode som støttet opp om disse resultatene.

Diskusjon:

Arbeidet på celle laboratoriet gikk veldig fint. Selv om cellene vokste litt tregt i starten kom de seg veldig og gikk inn i en veldig stabil vekst uten infeksjoner.

Når det gjelder høstinga var det interessant å se at metode 2 med trypsin gikk så bra. Dette var en ny metode på laboratoriet, og vil mest trolig kunne gi bedre prøver der man får med flere celler.

Grunnen til å bare jobbe med native celler, og ikke transfekterte er at det finnes holdepunkter for at de har ulike egenskaper (upublisert data). Da det var mest interessant å se hvordan cellene virker i naturen ble det valgt å ikke jobbe med transfekterte.

Western blot viste seg å være vanskeligere enn antatt i utgangspunktet. Men med en prosedyre med så mange trinn, er det lett å få feilkilder som ødelegger for hele forsøket.

Blant annet for gamle løsninger og urolig bilde ved fremkalling på grunn av krøllete plast over membranene. De fleste gangene ble det ikke påvist noen eksakt feilkilde.

Til tross for antall mislykket western blot, ble det et relativt bra resultat. Tross alt ble det påvist band tilsvarende vekt til både MRP 4 og 5 i prøvene. Det som var skuffende var at antistoffene var så uspesifikke og ga så mange ekstra band. Blant annet kunne man mistenke ekstra band på plate for MRP 4 kan være en kryss-reaksjon med MRP 5. Og da får man et veldig uspesifikt resultat.

Strukturen til MRP 4 og 5 er ganske lik, og det gjør faren for kryssreaksjoner med antistoffene høy. Det kan også bli dannet splitt produkter av proteinet som binder antistoff, noe som gir uspesifikke band på gelen. Blant annet finnes det en "gen-spleis variant" av MRP 5 (sMRP = short MRP 5) som også er en potensiell transporter for cGMP [32]

Et annet problem er at det ikke er noen kontroller med MRP 4 og 5 i salg, noe som ville gjort det lettere å kunne påvise hvilke band som passet på gelen. Dette problemet ble forsøkt å løse med å lage prøve av erytrocytt-membraner der hemoglobinet og proteaser er dratt ut; ghost.

Disse har nemlig fått påvist aktuelle proteiner cellemembranen tidligere.

Derfor var det litt skuffende at ideen om å bruke erytrocytter som kontroll gikk i vasken. På grunn av ulik glykolysering hadde de forskjellig vekt og la seg slett ikke i samme nivå. Det finnes muligheter for deglykolysering som skulle vært vurdert før start. Ellers kunne problemet vært at erytrocytt proteinene har aggregert og dermed fått en høyere vekt.

Andre metoder skulle også vært prøvd for å prøve å finne samme resultat. Spesielt hadde det vært interessant å bruke immunhistokjemi der man også påviser proteinene direkte. Forskjellen er da å la cellene vokse på et objekt glass og påvise de direkte på det. Da slipper man trinn som høsting og elektroforese.

En annen løsning kan være å bruke PCR enten direkte på DNA eller på mRNA. Det som taler i mot å bruke denne metoden er at selv om man får positivt resultat, kan man ikke være helt sikker på at proteinene faktisk blir uttrykt i membranen.

En del av oppgaven skulle også være å kvantifisere proteinene. Men bare det å påvise de var såpass ressurs krevende og tok lang tid. Dessuten var det vanskelig å finne metode for dette. Spesielt da det ikke hadde vært gjort på laboratoriet tidligere.

Man skulle ha gjort immunohistokjemi som også ville ha kvantifisert proteinene. Men da dette måtte ha blitt gjort på et annet laboratoriet var det ikke tid til det. Uansett har jeg fått et innblikk i hvordan man jobber med forskning. Og ikke minst at det meste man planlegger tar mye lengre tid enn man trodde.

Tabeller:

Resultat fra celleproliferasjon av C4-I celler dyrket i RPMI 1640 m/ant + 10% NCS på petriedisker.

Tabell 1

Vekstkurve 1. 23.02.04

Celletetthet ved oppstart: $5,2 \cdot 10^4$ celler/ml

Timer:	# ruter regnet	fortynning	Celletall registrert			Celletall utregnet			Mean
			1	2	3	1	2	3	
24	9	2	11	9	12	2,4	2,0	2,7	2,4
48	9	2	22	12	24	4,9	2,7	5,3	4,3
72	9	2	31	29	28	6,9	6,4	6,2	6,5
96	9	2	49	23	25	10,9	5,1	5,6	7,2
120	9	2	45	45	57	10,0	10,0	12,7	10,9
144	9	2	87	81	100	19,3	18,0	22,2	19,9
168	9	2	99	115	123	22,0	25,6	27,3	25,0

Tabell 2

Vekstkurve 2. 25.02.04

Celletetthet ved oppstart: $4,5 \cdot 10^4$ celler/ml.

Timer:	# ruter regnet	Fortynning	Celletall registrert			Celletall utregnet			Mean
			1	2	3	1	2	3	
24	9	2	14	21	18	3,1	4,7	4,0	3,9
48	9	2	22	18	29	4,9	4,0	6,4	5,1
72	9	2	29	40	39	6,4	8,9	8,7	8,0
96	9	2	38	42	48	8,4	9,3	10,7	9,5
120	9	2	72	64	89	16,0	14,2	19,8	16,7
144	9	2	73	110	116	16,2	24,4	25,8	22,1
168	9	4	66	82	69	29,3	36,4	30,7	32,1

Tabell 3

Vekstkurve 3. 26.02.04

Celletetthet ved oppstart: $5,5 \cdot 10^4$ celler/ml

Timer:	# ruter regnet	Fortynning	Celletall registrert			Celletall utregnet			Mean
			1	2	3	1	2	3	
24	9	2	28	30	26	6,2	6,7	5,8	6,2
48	9	2	36	49	37	8,0	10,9	8,2	9,0
72	9	2	64	63	58	14,2	14,0	12,9	13,7
96	9	2	89	73	83	19,8	16,2	18,4	18,1
120	3	2	37	41	36	24,7	27,3	24,0	25,3
144	9	4	58	69	59	25,8	30,7	26,2	27,6
168	9	4	91	84	92	40,4	37,3	40,9	39,6

Tabell 4:

Samlet resultat for de tre vekstkurvene:

Tid	Mean 1	Mean 2	Mean 3	Mean 1-3	STDV	SEM
24	2,4	3,9	6,2	4,2	1,91	0,64
48	4,3	5,1	9	6,1	2,51	0,84
72	6,5	8,0	13,7	9,4	3,80	1,27
96	7,2	9,5	18,1	11,6	5,75	1,92
120	10,9	16,7	25,3	17,6	7,25	2,42
144	19,9	22,1	27,6	23,2	3,97	1,32
168	25,0	32,1	39,6	32,2	7,30	2,43

Tabell 5:

Oversikt over prøver:

Type celler	Prøve	
Cervix	1	Utsådd med $4.5 \cdot 10^4$ celler/ml. Høstet på 6. dag.
Cervix	2	Utsådd med $5.5 \cdot 10^4$ celler/ml. Høstet på 7. dag.
Cervix	3	Utsådd med $8.0 \cdot 10^4$ celler/ml. Høstet etter 8 døgn. 80-90% vekst.
Cervix	4	Utsådd med $8.0 \cdot 10^4$ celler/ml. Høstet etter 10 dager. 100% vekst
Cervix	5	Høstet med celle skaper. Sådd tett på store skåler og høstet da de var 80-90 %
Cervix	6	Høstet med trypsin. Sådd tett på store skåler og høstet da de var 80-90%
Erytrocytter	A	100 μ l ghost + 200 μ l RIPA buffer
Erytrocytter	B	200 μ l ghost + 200 μ l RIPA buffer

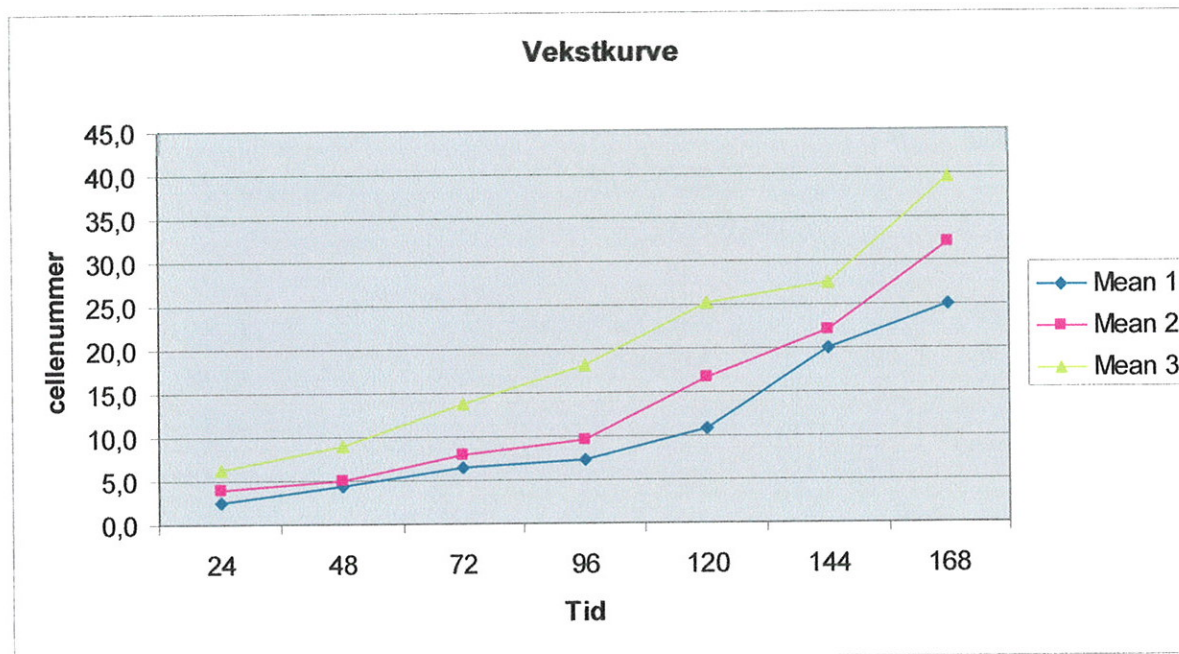
Formel for å regne ut celledtall:

$$\frac{\text{Antall celler talt}}{\text{Antall ruter talt}} \cdot \text{fortynning med trypan blå} = \# \text{ celler} \cdot 10^4$$

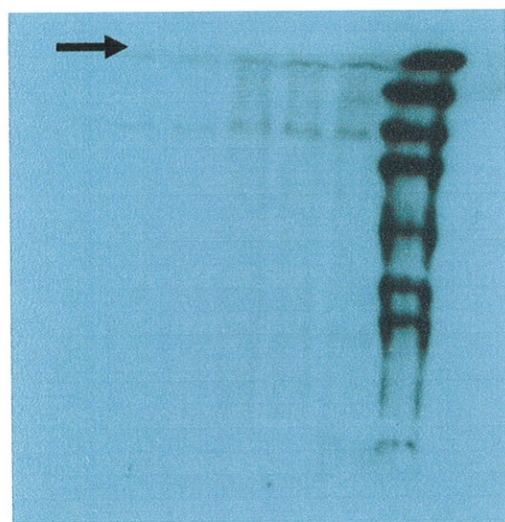
Figurer:

Figur 1:

Antall celler i skåler telt vær 24. time. Tre paralleller.



Figur 2.



MRP 4

Prøver:

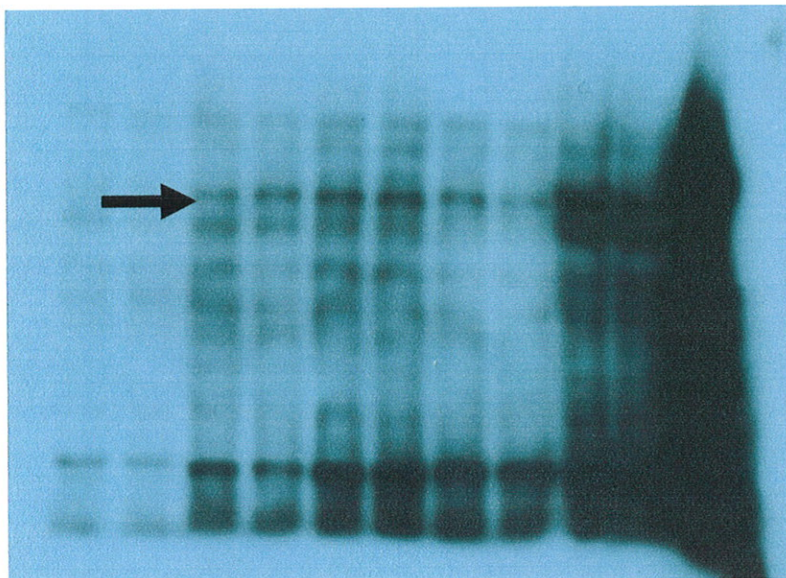
- 1: Prøve 1
- 2: Prøve 2
- 3: Prøve 2
- 4: Prøve 3
- 5: Prøve 3
- 6: Prøve 4
- 7: XP-Magic Marker

XP magic marker: de to øverste bånd er på 220 og 120 kD

MRP 4 har en vekt på 170 kD

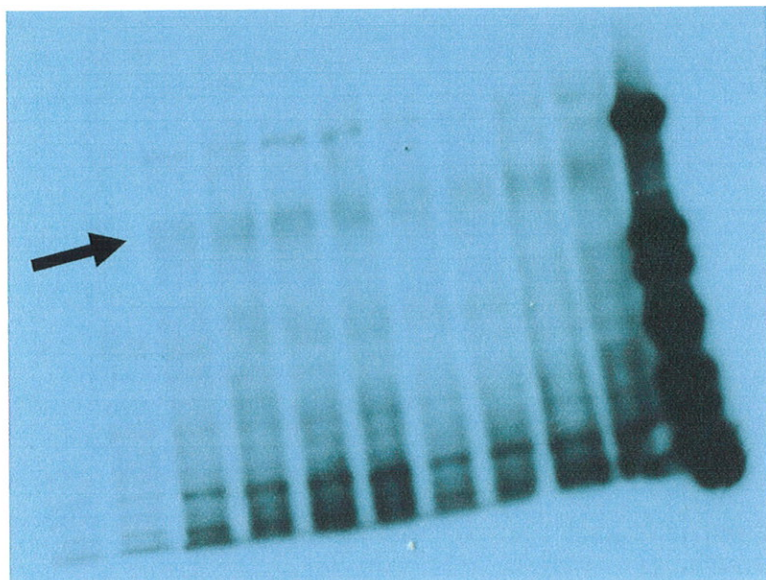
MRP 5 har en vekt på 185 kD

Figur 3.



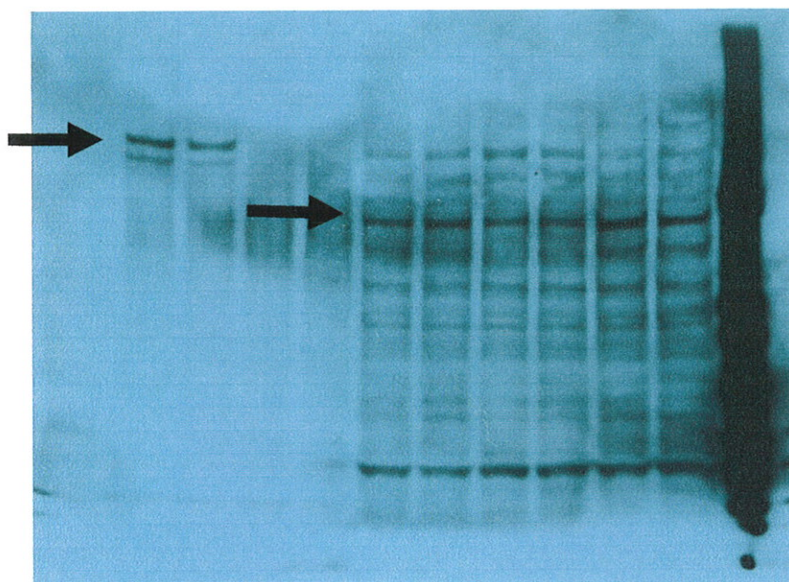
MRP4
Prøver:
1: Prøve 2
2: Prøve 2
3: Prøve 3
4: Prøve 3
5: Prøve 4
6: Prøve 4
7: Prøve 5
8: Prøve 5
9: Prøve 6
10: Prøve 6
11: XP-Magic Marker

Figur 4.



MRP5
Prøver:
1: Prøve 2
2: Prøve 2
3: Prøve 3
4: Prøve 3
5: Prøve 4
6: Prøve 4
7: Prøve 5
8: Prøve 5
9: Prøve 6
10: Prøve 6
11: XP-Magic Marker

Figur 5.



MRP4

Prøver:

- 1: Prøve A
- 2: Prøve A
- 3: Prøve B
- 4: Prøve B
- 5: Prøve 3
- 6: Prøve 3
- 7: Prøve 5
- 8: Prøve 5
- 9: Prøve 6
- 10: Prøve 6
- 11: XP-Magic Marker

Referanser:

1. Cole SP and Deeley RG, Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays*. 20: 931-940, 1998.
2. Borst P, Evers R, Kool M, and Wijnholds J, A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins. *J Natl Cancer Inst* 92: 1295-1302, 2000.
3. Borst P and Elferink RO, Mammalian abc transporters in health and disease. *Annu.Rev.Biochem* 71:537-92.: 537-592, 2002.
4. Schinkel AH and Jonker JW, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 55: 3-29, 2003.
5. Keppler D, Kamisako T, Leier I, Cui Y, Nies AT, Tsujii H, Konig J. Localization, substrate specificity, and drug resistance conferred by conjugate export pumps of the MRP family. *Adv Enzyme Regul.* 2000;40:339-49.
6. Jedlitschky G, Burchell B, and Keppler D, The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 275: 30069-30074, 2000.
7. Chen ZS, Lee K, and Kruh GD, Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta -d-glucuronide by multidrug resistance protein 4. resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276: 33747-33754, 2001.
8. van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, and Russel FG, The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J.Am.Soc.Nephrol.* 13: 595-603, 2002.
9. Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky MG, and Kruh GD, MRP8 (ABCC11) is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines, 2'3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)-adenine. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):29509-14.
10. Wielinga PR, van dH, I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J, and Borst P, Characterization of the MRP4-and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J.Biol.Chem.* 278: 17664-17671, 2003.
11. Peracchi M, Lombardi L, Maiolo AT, Bamonti-Catena F, Toschi V, Chiorboli O, Mozzana R, and Polli EE, Plasma and urine cyclic nucleotide levels in patients with acute and chronic leukemia. *Blood* 61: 429-434, 1983.
12. Peracchi M, Bamonti-Catena F, Lombardi L, Toschi V, Bareggi B, Cortelezzi A, Maiolo AT, and Polli EE, Plasma cyclic nucleotide levels in monitoring acute leukemia patients. *Cancer Detect.Prev.* 8: 291-295, 1985.
13. Peracchi M, Toschi V, Bamonti-Catena F, Lombardi L, Bareggi B, Cortelezzi A, Colombi M, Maiolo AT, and Polli EE, Plasma cyclic nucleotide levels in acute leukemia patients. *Blood* 69: 1613-1616, 1987.

14. Scavennec J, Carcassonne Y, Gastaut JA, Blanc A, and Cailla HL, Relationship between the levels of cyclic cytidine 3':5'-monophosphate, cyclic guanosine 3':5'-monophosphate, and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in urines and leukocytes and the type of human leukemias. *Cancer Res.* 1981 Aug;41(8):3222-7
15. Luesley DM, Chan KK, Newton JR, and Blackledge GR, Serial urinary cyclic guanosine monophosphate measurements in the assessment of response to treatment in epithelial ovarian cancer. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 94: 461-466, 1987.
16. Turner GA, Greggi S, Guthrie D, Benedetti PP, Ellis RD, Scambia G, and Mancuso S, Monitoring ovarian cancer using urine cyclic GMP. A two-centre study. *Eur.J.Gynaecol.Oncol.* 11: 421-427, 1990.
17. Ørbo A, Jaeger R, and 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.
18. Ørbo A, Jaeger R, and Sager G, Urinary levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in patients with cancer of the uterine cervix: a valuable prognostic factor of clinical outcome? *European Journal of Cancer* 34: 1460-1462, 1998.
19. Suhasini M, Li H, Lohmann SM, Boss GR, and Pilz RB, Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell.Biol.* 18: 6983-6994, 1998.
20. Hamad AM, Johnson SR, and Knox AJ, Antiproliferative effects of NO and ANP in cultured human airway smooth muscle. *Am J Physiol* 277: L910-L918, 1999.
21. Kronemann N, Nockher WA, Busse R, and Schini-Kerth VB, Growth-inhibitory effect of cyclic GMP- and cyclic AMP-dependent vasodilators on rat vascular smooth muscle cells: effect on cell cycle and cyclin expression. *Br.J.Pharmacol.* 126: 349-357, 1999.
22. Borst P, Balzarini J, Ono N, Reid G, de Vries H, Wielinga P, Wijnholds J, Zelcer N. The potential impact of drug transporters on nucleoside-analog-based antiviral chemotherapy. *Antiviral Res.* 2004 Apr;62(1):1-7
23. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, Wijnholds J, Balzarini J, Borst P. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol.* 2003 May ;63(5): 1094-103.
24. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van der Heijden I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J, Borst P. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 5;100(16):9244-9
25. Ørbo A, Jaeger R, and 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.

26. Ørbo A, Kjørstad KE, Jaeger R, and Sager G, Rapid non-genomic and concentration-dependent effects of progesterone in C4-I cells on the proposed tumor marker: Ratio between extracellular cGMP and cAMP levels. *Int J Oncol* 6: 1279-1282, 1995.
27. Sager G, Ørbo A, Pettersen RH, and 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.
28. Schultz C, Vaskinn S, Kildalsen H, and Sager G, Cyclic AMP stimulates the cyclic GMP egression pump in human erythrocytes: Effects of probenecid, verapamil, progesterone, theophylline, IBMX, forskolin, and cyclic AMP on cyclic GMP uptake and association to inside-out vesicles. *Biochemistry* 37: 1161-1166, 1998.
29. Sager G. Cyclic GMP transporters. *Neurochem Int.* 2004 Nov;45(6):865-73
30. Klokouzas A, Wu CP, van Veen HW, Barrand MA, Hladky SB. cGMP and glutathione-conjugate transport in human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 2003 Sep;270(18):3696-708.
31. Auersperg N, Hawryluk AP. Chromosome observations on three epithelial-cell cultures derived from carcinomas of the human cervix. *J Natl Cancer Inst.* 1962 Mar;28:605-27
32. Young LC, Campling BG, Cole SP, Deeley RG, Gerlach JH. Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1798-804.
33. Suzuki T, Sasaki H, Kuh HJ, Agui M, Tatsumi Y, Tanabe S, Terada M, Saijo N, and Nishio K, Detailed structural analysis on both human MRP5 and mouse mrp5 transcripts. *Gene.* 242: 167-173, 2000.