



## Forord

Denne masteroppgaven ble utført på IMBV, Universitetet i Oslo i perioden januar 2005 til april 2007.

Jeg vil begynne med å takke min veileder, Kjell Fugelli, en svært tålmodig og kunnskapsrik mann. Jeg vet jeg har vært en stor utfordring, men etter en student som meg kommer du i hvert fall til å sette pris på pensjonistlivet. Jeg vil også sende en stor takk til Stine Lastein, du har vært til en større hjelp enn du tror. Takk for all støtten og alle de gangene du har fått meg til å le. Fortsett å smile! Takk til Trude Hauge, for at du rettet oppgaven min og for å ha roet ned eksamensnervene mine. Jeg vil også takke deg for at du inspirerte meg til å begynne på fysiologien. Jeg vil takke alle professorene på avdelingen. Dere har lært meg mye i løpet av de siste to årene!

Store klemmer sendes til alle mine medstudenter. Takk for at dere har gjort den siste tiden min som student svært så spesiell og minnerik. Stor takk til Gitika Chhabra for å ha hjulpet meg med oppgave-layouten og for å ha gitt meg gode råd, både studierelaterte og ikke fullt så studierelaterte. Spesiell takk sendes til en spesiell venn Frazia Fida for å ha holdt følge hele veien. Du er snart i mål, du også ;)

Jeg vil også benytte anledningen til å takke Gud for å ha gitt meg svært tålmodige foreldre som har støttet meg moralsk (og ikke minst økonomisk) hele veien. Det er helt uten tvil på grunn av dem jeg har kommet så langt som jeg har. Jeg takker også mine kjære søsken Sobia, Wasim og spesielt Naeem Zahid for å ha vært der hver gang jeg har trengt dem!

Oslo, April 2007

Rabia Zahid

## Sammendrag

Taurin er den vanligste organiske osmolytten i de fleste dyrearter som er engasjert i volumregulering av celler. Tidligere studier har vist at både cellesvelling og TSH-stimulering øker taurineffluksen fra FRTL-5-celler. Begge stimuleringsformene aktiverer to intracellulære signalsystemer, henholdsvis via fosfolipase C (PLC) og adenylyl syklase (AC). FRTL-5-celler som er dyrket på filtre, danner et epitel og frisetter taurin både fra den apikale og den basolaterale siden. Med disse forholdene som grunnlag, var det ønskelig å undersøke hvilke av epitelsidene hvert av disse signalsystemene aktiverer taurineffluksen fra. Det var også aktuelt å få undersøkt om aktivering, eventuelt modulering av taurineffluks kunne skje via stimulering av purinerge reseptorer, P2Y og A<sub>1</sub> adenosin reseptor, som FRTL-5-cellene besitter. Disse reseptorene har vist seg å aktivere signalsystemet som medieres via PLC og ikke via AC.

Cellene ble dyrket henholdsvis i skåler og på Falcon-filtre, og akkumulerte [<sup>3</sup>H]-taurin dagen før forsøket. Skålene ble utstyrt med et lokk, og filtrene ble montert i en beholder slik at [<sup>3</sup>H]-taurin fra henholdsvis den apikale og den basolaterale siden kunne frisettes til hvert sitt kammer. Cellene ble utsatt for forskjellige typer stimuli og [<sup>3</sup>H]-taurin ble samlet opp i ettminuttsintervaller.

Resultatene mine viste at adenosinanalogen PIA, sammen med TSH, aktiverte adenosin A<sub>1</sub>-reseptorer. PIA og TSH hadde en hemmende effekt på AC og stimulerte PLC, som resulterte i en forsterkning av TSH-stimulert taurineffluksaktivitet. Toxinet PTX hemmet den stimulerende effekten via PLC og opphevet den hemmende effekten på AC, og førte til forsterket aktivering. PIA-stimulering av adenosin A<sub>1</sub>-reseptor forsterket signifikant svellingsaktivert taurineffluks også. Denne effekten ble fullstendig blokkert av PTX, og indikerer at PIA-stimuleringen ble formidlet via PLC.

ATP stimulerte taurineffluksaktiviteten via P2Y-purinerge reseptorer og PLC. Noe av den ATP-induserte effluksaktiveringen ble uventet hemmet av PTX. Dette kunne indikere at noe av ATP var metabolisert til adenosin som ga en PTX-inhibitorisk effekt, men andre forklaringer på denne effekten er også mulig. Svellingen ser ut for å effektivisere signalsystemet som starter via PLC og leder til taurineffluks. Stimulering med ATP via P2Y purinerge reseptorer, aktiverte taurineffluksen bare fra den apikale siden av celleepitelet.

# Innhold

<b>FORORD</b> .....	<b>2</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>3</b>
<b>INNHOOLD</b> .....	<b>4</b>
<b>1 INNLEDNING</b> .....	<b>5</b>
1.1 INTRODUKSJON .....	5
1.2 OSMOLYTTER OG KANALER.....	6
1.2.1 Uorganiske og organiske osmolytter .....	6
1.2.2 Taurin.....	7
1.2.3 Aktivering av svellingsensitive kanaler.....	7
1.3 TYREOIDEA CELLER .....	8
1.3.1 Struktur og funksjon .....	8
1.4 FRTL-5-CELLER .....	10
1.4.1 FRTL-5-cellelinjen .....	10
1.4.2 TSH-reseptoren og signalveiene i FRTL-5.....	11
1.5 PROBLEMSTILLING.....	13
<b>2 MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>14</b>
2.1 KJEMIKALIER OG UTSTYR .....	14
2.2 FORSØKSMEDIER .....	14
2.3 DYRKNING AV FRTL-5 CELLER.....	15
2.4 FORSØKSOPPSETT.....	16
2.4.1 Celler i skåler.....	16
2.4.2 Celler på falcon-filtre .....	17
2.5 BEREGNINGER .....	17
2.6 HASTIGHETSKOEFFISIENTEN FOR DIFFUSJON AV TAURIN GJENNOM FILTERET.....	19
2.7 STATISTISK ANALYSE .....	20
<b>3 RESULTATER</b> .....	<b>21</b>
3.1 EFFEKT AV HYPOOSMOLALITET OG TSH PÅ HASTIGHETSKOEFFISIENTEN TIL [ <sup>3</sup> H]-TAURINEFFLUKS .....	21
3.2 EFFEKT AV PIA OG PTX PÅ TSH-AKTIVERT [ <sup>3</sup> H]-TAURINEFFLUKS .....	22
3.3 EFFEKT AV PIA OG PTX PÅ SVELLINGSAKTIVERT [ <sup>3</sup> H]-TAURINEFFLUKS .....	23
3.4 EFFEKT AV ATP, PIA OG PTX PÅ [ <sup>3</sup> H]-TAURINEFFLUKS.....	24
3.5 EFFEKT AV ATP PÅ [ <sup>3</sup> H]-TAURINEFFLUKS FRA CELLER PÅ FILTER .....	26
<b>4 DISKUSJON</b> .....	<b>28</b>
4.1 STIMULERING MED TSH OG HYPOOSMOTISK MEDIUM. ....	28
4.2 STIMULERING AV PURINERGE RESEPTORER .....	28
4.2.1 Stimulering med PIA .....	29
4.2.2 Stimulering med ATP .....	30
4.3 ENDRING I ATP- OG PIA-SENSITIVITET.....	31
4.4 LOKALISERING AV DEN ATP-INDUSERTE TAURINEFFLUKSEN .....	32
4.5 TAURINETS FUNKSJONER I TYROCYTTER .....	34
4.6 KONKLUSJON .....	34
<b>REFERANSER</b> .....	<b>36</b>

# Innledning

## 1.1 Introduksjon

En sentral egenskap hos både vertebrater og evertebrater, er evnen til å regulere cellevolumet. Plasmamembranen i animalske celler har en betydelig høyere permeabilitet for vann enn for osmolytter og kan ikke motstå et intracellulært hydrostatisk trykk (Macknight, 1988). En forskjell i osmolaliteten mellom cytosol og den ekstracellulære væsken, vil derfor raskt generere netto diffusjon av vann over plasmamembranen. Cellevolumet vil enten øke eller minke avhengig av osmolalitätsgradientens retning, og diffusjonen vil vedvare helt til gradienten ikke lenger foreligger. Under normale fysiologiske forhold hos pattedyr, blir plasmaosmolaliteten holdt innenfor snevre grenser ved hjelp av tørstemekanismen og nyrefunksjonen. Volumendringer i pattedyrceller kommer derfor sjelden av endringer i plasmaosmolaliteten, men oftere av endringer i mengden intracellulære osmolytter. Volumendring er imidlertid ikke alltid et forstyrrende fenomen, da de motvirkes kontinuerlig. Flere fysiologiske funksjoner er forbundet med volumendringer som følge av endring i den intracellulære osmolyttmengden. Eksempler på dette er dokumentert i forbindelse med sekresjon av væske og elektrolytter (Greger et al., 1999; Hoffmann et al., 2002), natriumavhengig sukker- og aminosyreopptak, stimulering av  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$ -utveksler og stimulering av  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -transportør sammen med insulin, vekstfaktorer og mitogene faktorer (se Hoffmann og Ussing, 1992; Hoffmann og Dunham, 1995). Regulering av cellevekst og celledeling så vel som celledød ved apoptose, er også nært knyttet til en regulert endring i cellevolum (Lang et al., 1998).

Økning i cellevolumet kan sette i gang en serie aktiviteter som fører til reetablering av normalt volum. Denne prosessen er kjent under begrepet «regulatory volume decrease» (RVD), og innebærer frisetting av  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  og organiske osmolytter, etterfulgt av vann (se Hoffmann og Dunham, 1995). Cellekrymping kan føre til akkumulering av organiske og uorganiske osmolytter sammen med vann, slik at

normalvolum reetableres. Denne prosessen er kjent under begrepet «regulatory volume increase» (RVI). Denne prosessen blir ikke nærmere beskrevet i oppgaven.

RVD er et resultat av aktiviteten til en eller flere refleksmekanismer. Disse kan i prinsippet bestå av en reseptor som registrerer en cellevolumendring, signalveier som ved sine ulike elementer leder til aktivering av kanaler eller transportører, og osmolyttfrisetting. Blant de organiske molekyler er taurin ( $\beta$ -aminoetan sulfonsyre) en kvantitativ dominerende osmolytt som finnes blant annet i tyrocytter (Jhiang et al., 1993). I rottetyrocytter, FRTL-5-celler (Fischer Rat Thyroid Line), frisettes taurin ved cellesvelling og ved stimulering med TSH (Tyreoidea Stimulerende Hormon) (Lastein, 2004; Fugelli, 2006).

Kunnskap om cellevolumreseptorer er svært begrenset, men ulike kanaler og transportører som deltar i RVD er identifisert (se Stutzin og Hoffmann, 2006). Forskjellige signalelementer som deltar i frisetting av osmolytter er også påvist, men en fullstendig forståelse av hvordan slike signalsystemer fungerer, er fortsatt mangelfull. Målet med denne oppgaven er derfor å belyse deler av signaltransduksjonssystemene som er involvert i aktiveringen av taurinfrisetting i FRTL-5-celler.

## **1.2 Osmolytter og kanaler**

### *1.2.1 Uorganiske og organiske osmolytter*

Under en RVD deltar de uorganiske osmolyttene, først og fremst  $K^+$  og  $Cl^-$ , med 40-60 % av den totale mengden som forlater cellene ved reetablering av normalvolum (Lang et al., 1988). Dette blir sett på som en gunstig tilpasning siden større endringer i konsentrasjon av uorganiske osmolytter har negative effekter på en rekke cellulære prosesser, som for eksempel forandringer i intracellulær pH-verdi (Lang et al., 1998), endret enzymaktivitet (Combes et al., 1988) og denaturering av makromolekyler (McManus, 1995). Organiske osmolytter, som er involvert i volumregulering for de fleste dyreartene, er ikke kjent for å ha slike effekter (Lang et al., 1998). De kan deles inn i tre grupper; aminosyrer (alanin, prolin og taurin), polyoler (sorbitol og myo-inositol) og metylaminer (betain og glyserofosforylcholin) (Lang et al., 1998). Disse forbindelsene

blir syntetisert i cellen og/eller tatt opp fra den ekstracellulære væsken via  $\text{Na}^+$ -koblet aktiv transport (Huxtable, 1992; Han et al., 2006).

### *1.2.2 Taurin*

Taurin er en organiske intracellulær aminosyre og har en viktig funksjon i volumreguleringen i dyreceller. Taurin er også involvert i en rekke andre biologiske funksjoner, som for eksempel produksjon av gallsalter, apoptose, detoksifisering og celledifferensiering. Cellene akkumulerer taurin med  $\text{Na}^+$ -drevet sekundær aktiv transport (Han et al., 2006). Taurinkonsentrasjonen i cellene er flere ganger høyere enn konsentrasjonen i plasma. For eksempel er forholdet i HeLa celler 7000:1 (Piez et al., 1958). Den intracellulære konsentrasjonen er spesielt høyere i organer som hjerne, hjerte, lever, nyrer og muskler (Huxtable, 1982). I tillegg til den aktive akkumuleringen av taurin, bidrar egenskaper som lav lipidløselighet til at cellene kan opprettholde den høye konsentrasjonsgradienten.

Taurin er viktig for normal utvikling av organismer. Mangel på taurin kan ha negative effekter på blant annet hjertets normalfunksjon (Kyoko et al., 2000). De fleste dyrearter får taurin via nysyntese og føde, men enkelte arter, som for eksempel katter og New World aper, kan ikke produsere taurin selv og er derfor helt avhengig av å få det via maten (Knopf, 1978).

### *1.2.3 Aktivering av svellingssensitive kanaler*

Cellesvelling kan aktivere flere typer  $\text{K}^+$ -kanaler. Disse deles gjerne inn i følgende grupper: 1) Strekkaktiverte kanaler 2) Spenningsaktiverte kanaler 3)  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiverte kanaler 4) Kanaler med to poreregioner og fire transmembran segmenter (Stutzin & Hoffmann, 2006). Svelling kan også aktivere ulike  $\text{Cl}^-$ -kanaler som frisetter intracellulært  $\text{Cl}^-$  (Stutzin & Hoffmann, 2006). Sannsynligvis består disse kanalene av flere typer anionkanaler som har ulik spesifisitet overfor sitt anionsubstrat. Disse kalles for volum regulerte anionkanaler (VRAC). Noen av dem kan også frisette organiske molekyler som for eksempel taurin, og kalles derfor volumsensitive organisk osmolytt- og anionkanaler (VSOAC). En faktor som ser ut for å være viktig i den initielle fasen av

aktivering av de såkalte volumsensitive kanalene, er den intracellulære ionestyrken (Voets et al., 1999), som reduseres ved blant annet celledvelling. Imidlertid kan de samme kanalene aktiveres uten celledvelling, under isoosmotiske betingelser (Rosso et al., 2003). Det er derfor flere forhold ved reguleringen av aktiviteten til volumsensitive kanaler som står igjen å oppklare. Proteinene som utgjør disse kanalene er heller ikke identifisert. Det samme er tilfelle for de svellingsaktiverede kanalene som frisetter taurin. Støtte for at VSOAC kan frisette taurin kommer fra forsøk ved bruk av ulike hemmende farmaka ved svellingsindusert taurin- og Cl<sup>-</sup>-frisetting (Banderali og Roy; 1992, Jackson og Strange, 1993). Det er også støtte fra måling av strøm fra enkeltkanaler og makroskopisk strøm skapt av taurin ved en alkalisk pH, med taurin i tilstrekkelig høy konsentrasjon med netto negativ ladning, i cellene (Banderali og Roy, 1992; Jackson og Strange, 1993).

Taurin frisettes mest sannsynlig via flere typer volumsensitive kanaler, og flere typer signalsystemer ser ut til å være engasjert i aktiveringen, selv i samme celletype (Fugelli, 2006). Imidlertid er det fortsatt bare noen elementer i disse signalsystemene som er kjent. Disse elementene er intracellulært Ca<sup>2+</sup> (Falktoft & Lambert, 2004), reaktivt oxygen varianter (ROS) som H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lambert, 2003), protein kinase C, proteinkinase A, adenylyl syklase (AC), lipid signalmolekyler (se Lang et al., 1998), tyrosinkinaser (Pasantés-Morales et al., 2002) og Rho-proteiner (Pedersen et al., 2002). I FRTL-5-celler er det støtte for at noen av disse elementene deltar i TSH- og svellingsaktivert taurinfrisetting (Fugelli, 2006; Lastein, 2004). Det er fortsatt uklart hvordan signaltransduksjonsmekanismene påvirker initieringen av osmolyttfrisettingen.

### **1.3 Tyreoidea celler**

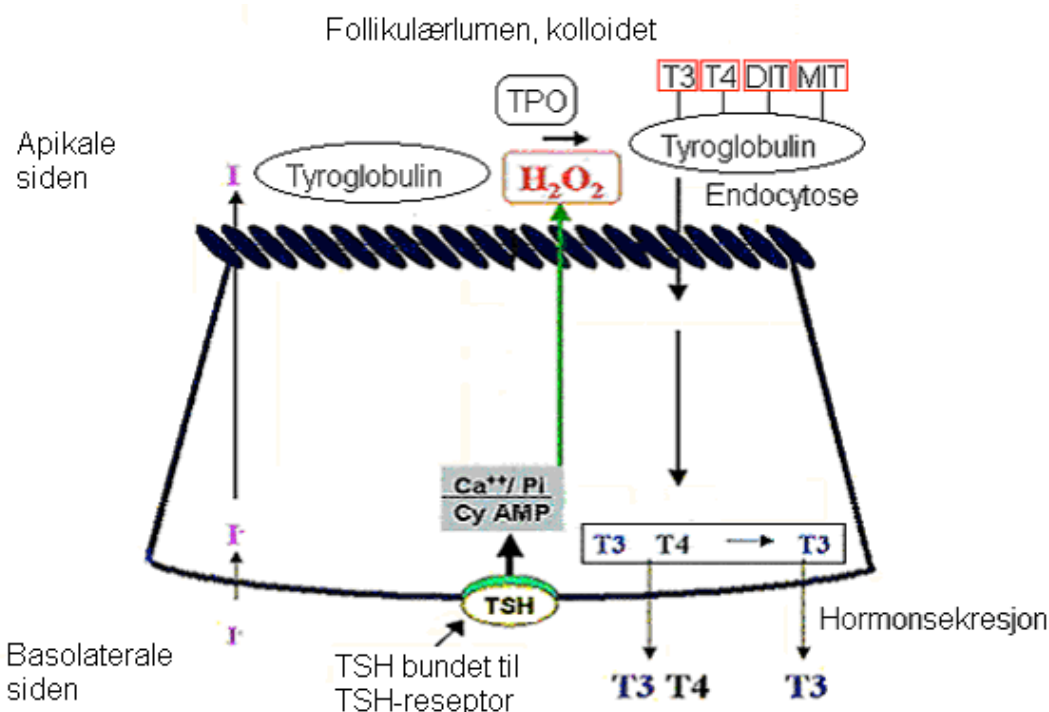
#### *1.3.1 Struktur og funksjon*

Tyreoidea hos pattedyr er bygd opp av follikler av varierende størrelser. Folliklene består av ett lag med epitelceller, som har en basalside mot blodkapillærene og nervefibrene, og en apikalside mot det væskefylte lumen (kolloidet). TSH-reseptoren på tyrocyttene regulerer deres vekst og mange av deres funksjoner (Vassart og Dumont,



1992) og stimulerer toveis transepiteltransport av væske og osmolytter (Yap et al., 1991; Cauvi et al., 2000). I tillegg til tyrocytter har TSH-reseptoren blitt påvist i mange andre celletyper i pattedyr, som for eksempel lymfocytter, adipocytter, binyrekjertel og testikulære celler (se Davies et al., 2002), men den funksjonelle rollen til disse reseptorene er fortsatt uklar.

Tyrocyttenes hovedfunksjon er å akkumulere jodid, syntetisere tyroglobulin, lagre tyreoidhormonene  $T_3$  og  $T_4$  i kolloidet og sekretere de etter behov. Figur 1.1 illustrerer i grove trekk syntese av tyreoidhormonene. Syntesen omfatter oksidering av jod og binding av jodid til tyrosinene på tyroglobulin.



**Figur 1.1: Forenklet modell av en tyrocytt med syntese og sekresjon av tyreoidhormonene.** TSH binder seg til TSH-reseptoren, lokalisert på den basolaterale siden, og aktiverer frigjøring av intracellulær  $Ca^{2+}$  og fosfoinositol (Pi), og produksjon av cAMP og hydrogen peroxid ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  frigjøres på den apikale siden av tyrocyttepitelet. Jodid tas opp ved aktiv transport og bindes til tyroglobulinets tyrosinene. Sammen med tyroid peroxidase (TPO), oksiderer og joderer  $H_2O_2$  tyrosinmolekylene slik at dijodert tyrosin (DIT) og monoiodert tyrosin (MIT) kobles sammen, og tyreoidhormonene dannes. Tyreoidhormonene, sammen med tyroglobulinet, blir deretter endocytet fra den apikale siden. Intracellulære enzymer (ikke vist) splitter hormonene fra tyroglobulinet, og hormonene blir frisatt fra den basolaterale siden, til blodkapillærene (Figuren er fra Beckett og Arthur, 2005, med modifikasjoner).

Enzymet tyroid peroxidase (TPO) står for oksidering og jodering av tyrosinenheter på tyreoglobulinet, ved den apikale siden av epitelet, i samspill med hydrogen peroxid ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  dannes og reguleres ved stimulering av TSH-reseptoren på den basolaterale siden av epitelet. Ved joderingsprosessen dannes monojodert tyrosin (MIT) og diiodert tyrosin (DIT). To DIT-molekyler kobles sammen til å danne et tyroksinhormon ( $T_4$ ), og ett DIT- og ett MIT-molekyl kobles sammen til å danne et trijodotyroninhormon ( $T_3$ ). Jodert tyreoglobulin blir tatt opp i tyrocyttene fra kolloidet ved endocytose.  $T_3$  og  $T_4$  splittes av og sekreses ut i blodkapillærene fra den basolaterale siden. Denne prosessen reguleres også av TSH (Silverthorn, 2007).

## **1.4 FRTL-5-celler**

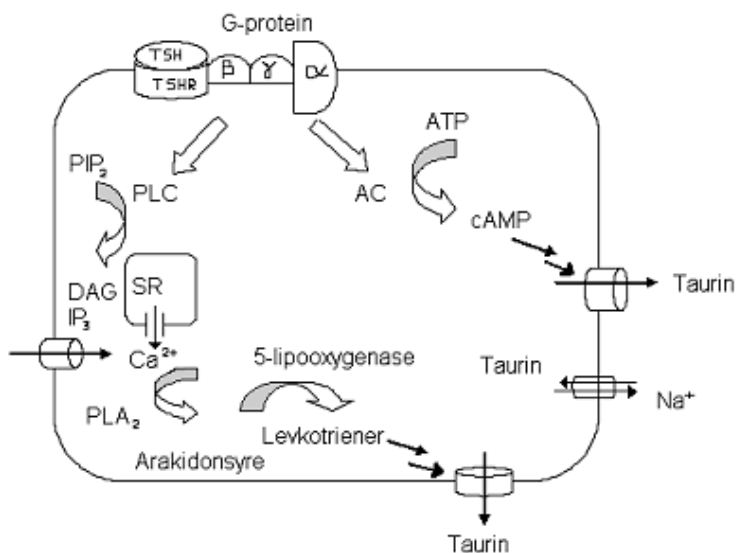
### *1.4.1 FRTL-5-cellelinjen*

FRTL-5-celler (Fischer Rat Thyroid Line ) er modifiserte rottetyrocytter. Cellene har mange av primærttyrocyttenes egenskaper i behold, som for eksempel evnen til å akkumulere jodid og sekreere både tyreoglobulin og  $H_2O_2$  ved stimulering av TSH-reseptoren. Cellene vokser i ett enkelt celledag og danner verken tredimensjonale follikler eller tyreodeahormonene  $T_3$  og  $T_4$  (Bidey et al., 1988). Cellelinjen kan akkumulere taurin (Jhiang et al., 1993) og frisette det ved svelling og TSH-stimulering (Fugelli, 2006). FRTL-5 dyrket på et filter danner et epitel, slik at registrering av taurinfrisetting fra begge sider av epitelet blir muliggjort. Tidligere studier som er utført på slike epiteler har vist at TSH-stimulering på den basolaterale siden fører til kraftig taurinfrisetting først og fremst fra den apikale siden, mens cellesvelling aktiverer frisetting i nesten like stor grad fra begge sider av epitelet (Lastein, 2004). Dette indikerer at det kan være en blandet populasjon av kanaler på både den apikale og den basolaterale siden av epitelet.

### 1.4.2 TSH-reseptoren og signalveiene i FRTL-5

TSH medierer sin effekt gjennom interaksjon med en G-proteinkoblet reseptor (Szkudlinski et al., 2002) lokalisert på den basolaterale siden av tyrocyttene (Chambardet al., 1983). Reseptoren hører til en familie av G-proteinkoblet reseptorer for glykoprotein hormoner, som har en basalaktivitet, uavhengig av binding til sitt hormon (Bockaert, 2001). Denne konstitutive aktiviteten kan moduleres av  $\text{Na}^+$  (Cetani et al., 1996).

TSH-reseptoren aktiverer to forskjellige signalsystemer i FRTL-5 celler (Allgeier et al., 1994; Field et al., 1987). Den ene går via  $\alpha$ -delen til  $G_s$ -proteinet med cAMP-produksjon gjennom enzymet adenylyl syklase (AC), mens den andre går enten via  $G_q$ - eller  $G_{11}$ -proteinets  $\beta\gamma$ -del (Tomura, 1997). Hvilket av disse to G-proteinene som er engasjert, er fortsatt uklart.  $G_q/G_{11}$ -proteinet aktiverer enzymet fosfolipase C (PLC) som degraderer fosfoinositider (Field et al., 1987). Degraderingen resulterer i mobilisering av  $\text{Ca}^{2+}$  fra ekstracellulær væske og SR.  $\text{Ca}^{2+}$  aktiverer fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) til dannelse av arakidonsyre. Enzymet 5-lipooxygenase (5-LO) nedbryter arakidonsyre til blant annet levkotriener (Allgeier, A, 1994). Både AC- og PLC-signalsystemene ser ut til å være involvert i aktivering av taurinfrisetting, men om de aktiverer taurinfrisetting fra hver sin side av tyrocyttepitelet, er ikke klart (se figur 1.2).



**Figur 1.2: Signalveier og deres kobling til taurinfrisetting i FRTL-5-celler.** Stimulering av TSH-reseptoren aktiverer via  $\alpha$ -delen til G-proteinet, adenylyl syklase (AC) og akkumulering av cAMP. Via  $\beta\gamma$ -delen til G-proteinet, aktiverer TSH fosfolipase C (PLC) til å degradere fosfoinositider ( $\text{PIP}_2$ ) til diacylglycerol (DAG) og  $\text{IP}_3$ . Videre vil PLC stimulere  $\text{Ca}^{2+}$ -frisetting fra intracellulære lagere (SR) og influks av ekstracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  aktiverer fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) og danner arakidonsyre. Enzymet 5-lipooxygenase omdanner arakidonsyre til blant annet levkotriener. Pilene mellom

henholdsvis cAMP og levkotriener og taurinkanalene indikerer at det er flere elementer, som fortsatt ikke er kjent, som er engasjert i taurinfrisetting. Taurin blir akkumulert via  $\text{Na}^+$ -drevet sekundær aktiv transport.

FRTL-5 celler har purinerge reseptorer som stimuleres av agonister som ATP og adenosin. Både PLC- og AC-signalsystemet kan moduleres ved stimulering av purinerge reseptorer. Stimulering av adenosin A<sub>1</sub> reseptorer med adenosinanalogen Phenylisopropyl adenosine (PIA), hemmer TSH-aktivert AC og stimulerer TSH-aktivert PLC. Disse effektene hemmes av pertussis toxin (PTX) (Sho et al., 1991). PTX dannes av bakterien *Bordetella pertussis* og bindes til enkelte grupper G-proteiner og blokkerer signaloverføringen. Stimulering av adenosin A<sub>2</sub> reseptorer aktiverer AC, men krever betydelig høyere ligandkonsentrasjon enn den som stimulerer A<sub>1</sub> reseptorene (Sho et al., 1999). ATP stimulerer P2Y-reseptorer som fører til aktivering av PLC og PLA<sub>2</sub>, frisetting av arakidonsyre (Ekokoski et al., 2000) og frisetting av jodid (Okajima et al., 1988).

Det er ikke kjent om ATP og adenosin påvirker taurinfrisettingen i FRTL-5-celler. Siden ATP og adenosin ved lave konsentrasjoner aktiverer kun det ene signalsystemet via PLC (Ekokoski et al., 2000), kunne disse ligandene gi mulighet for å undersøke taurinfrisetting aktivert bare via ett signalsystem. I denne oppgaven ønsker jeg å studere disse forholdene nærmere.

## **1.5 Problemstilling**

Har adenosinanalogen PIA effekt på taurineffluksen i FRTL-5-celler;

- Alene?
- Sammen med TSH?
- Sammen med hypoosmotisk medium?

Har ATP effekt på taurineffluksen i FRTL-5-celler;

- Alene?
- Sammen med hypoosmotisk medium?

Fra hvilken side av epitelet, henholdsvis den apikale og den basolaterale siden, stimulerer ATP taurinfrisettingsaktiviteten fra celler dyrket på filtre?

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Kjemikalier og utstyr

[<sup>3</sup>H]-taurin (spec.act. 19.0 Ci mmol<sup>-1</sup>) var fra Amersham Bioscience, England. Kollagenløsning type I fra rottehale (3,64mg/ml) var fra BD Bioscience. Coons modifiserte Hams F-12 medium, føtalt kalveserum (5%) var fra BioWittaker. Trypsin EDTA-løsning (500mg/ml Trypsin og 200mg/ml EDTA) var fra Cambrex, Ultima Gold tellervæske for scintillasjonsregistrering av radioaktivitet fra PerkinElmer Life and Analyt. Sci, insulin (1,8 µM), transferrin (6,36 mg/l), bovint tyreoideahormon (TSH) (0,53 mU/ml), TCA (Trichloroacetic acid) (5%), Triton x-100 (0.1%), cholin-klorid, PIA (N(2-phenylisopropyl)-adenosine) (100 nM), ATP (Adenosine 5'-triphosphate) (50 µM) og PTX (Pertussis Toxin) (100nM) var fra Sigma-Aldrich Company Ltd. Andre standard kjemikalier som ble benyttet var av *pro analyse* kvalitet. (Se forsøksmedier).

Falcon-filtre (23 mm i diameter, 8,0 x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> i poretetthet og 3 µm i porediameter) var fra Becon Dickinson. Plastskåler (35 mm i diameter) var fra Nunc.

### 2.2 Forsøksmedier

Cellene ble utsatt for et isoosmotisk medium (335 mOsm) og et hypoosmotisk medium (295 mOsm) i forsøkene. Begge mediene ble laget med utgangspunkt i et basalmedium som hadde følgende sammensetning:

NaCl (110 mM), KCl (4,1 mM), CaCl<sub>2</sub> (1,12 mM), MgSO<sub>4</sub> (0,75 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,45 mM) og HEPES (25 mM). pH ble justert til 7.50 ved å tilsette en NaOH-løsning. Osmolaliteten på basalmediet var 250 mOsm. På forsøksdagen ble basalmediet tilført glukose (10 mM) og osmolaliteten ble justert til ønsket verdi (335 mOsm eller 295 mOsm) med cholin-klorid. Osmolaliteten ble kontrollert med et frysepunktsosmometer (Knauer, Tyskland).

### **2.3 Dyrkning av FRTL-5 celler**

Forsøkene ble utført på en cellelinje fra rottetyreoidea, FRTL-5 (Fischer Rat Thyroid Cell Line-5), som opprinnelig var en gave fra Aker universitetssykehus i Oslo. Cellene ble dyrket i Nunc plastflasker (75 cm<sup>2</sup> dyrkningsoverflate) i Coons modifiserte Hams F-12 medium, som var tilsatt føtalt kalveserum (5 %), insulin (1,8 µM), transferrin (6,36 mg/l) og bovint tyreoideahormon (0,53 mU/ml). Mediet var bufret med bikarbonat og fosfat, hadde pH-verdi på 7,50 ved 20°C og en osmolalitet på 335 mOsm ± 2 mOsm. Cellene ble oppbevart i inkubatorskap ved 37°C i en atmosfære med 5 % CO<sub>2</sub> og 95 % luft, mettet med vanndamp. Mediet ble fornyet dagen etter celleutsåing, deretter hver tredje eller fjerde dag.

Når cellene dekket ca. 90 % av dyrkningsoverflaten, ble de løsnet fra flaskebunnen ved å erstatte dyrkningsmediet med 5 ml Trypsin EDTA-løsning i 2 minutter. Cellene ble resuspendert i dyrkningsmediet og isolert ved sentrifugering (1000 RPM i 5 minutter). Ca. 1/3 av cellene ble overført til en ny 75 cm<sup>2</sup> plastflaske for dyrking til neste forsøk og ca. 1/3 ble fordelt på enten åtte plastskåler med 2 ml medium i hver, eller på åtte Falcon-filtre med 0.5 ml medium på innsiden og 1 ml medium på utsiden av hvert filter i hver filterbrønn. Før cellene ble sådd ut på filtrene, ble de dekket med en kollagenløsning som bestod av 0.2 ml 3.64 mg/ml kollagenløsning og 10 ml 0.02 M eddiksyre. Dette ble fordelt på åtte filtre. Etter en time ved romtemperatur ble kollagenløsningen sugd bort, og filtrene ble vasket fire ganger med PBS-løsning. Filtrene ble deretter oppbevart på sterilbenk over natt, for tørking av kollagenet.

Det første døgnet etter at cellene var sådd ut, sto filtrene i en stor petriskål med dyrkningsmedium. Dette var nødvendig for å unngå at cellene samlet seg i filtersentrum, og for at cellene skulle fordele seg jevnt over hele filterarealet før de festet seg. Neste dag ble filtrene overført til Falcon kassetter, hvor de ble oppbevart for videre vekst, inntil de ble klare for bruk i forsøk.

Skåler og filtre med celler ble oppbevart i inkubatorskap som beskrevet tidligere. 48 timer før forsøk ble mediet skiftet ut med Coons dyrkningsmedium som ikke var tilsatt TSH. Dette stimulerer cellene til å øke antall TSH-reseptorer på celleoverflaten (Akamizu et al., 1990).

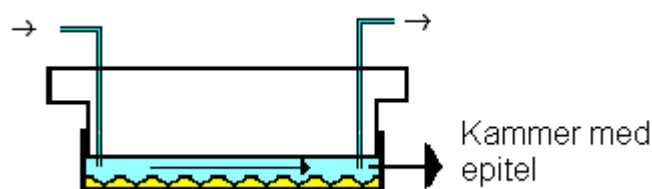
24 timer før forsøk ble det tilsatt 1  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-taurin i hvert filter, eller 0.2  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-taurin i hver skål. Celleepitelet dekket da ca.90 % av skålbunnen/filteret.

All behandling av cellene før forsøkene foregikk på en sterilbenk.

## 2.4 Forsøksoppsett

### 2.4.1 Celler i skåler

Før forsøkene ble mediet med den ekstracellulære radioaktiviteten fjernet, og cellene ble skylt i isoosmotisk medium tre ganger før skålen ble utstyrt med et lokk slik at det ble dannet et kammer med volum på 500  $\mu\text{l}$  og høyde på 0,5 mm. Dette perfusjonskammeret (figur 2.1) ble deretter plassert i et vannbad på 37°C . Mediet ble pumpet (Pump P-1, Pharmacia Biotech) gjennom kammeret via to porter i lokket med en konstant væskeføring på 0,5 ml per minutt. De første 10 minuttene ble kammeret perfundert med isoosmotisk medium for å stabilisere cellene og for å fjerne eventuelle rester av den ekstracellulære radioaktiviteten. I de neste 20 minuttene ble kammeret perfundert med isoosmotisk medium i 5 minutter, og deretter med testmedium i 15 minutter. Perfusatet ble samlet opp i ettminuttsintervaller. Isoosmotisk medium og testmedium inneholdt forskjellige farmaka, avhengig av forsøkstype. Dette blir beskrevet nærmere i resultatkapittelet. Ved forsøkets slutt ble det gjenværende [ $^3\text{H}$ ]-taurin i cellene isolert ved tilsetning av 1 ml 5 % TCA (Trichloroacetic acid) med 0,1 % Triton x-100, etterfulgt av sentrifugering. Supernatanten fra TCA-ekstraktet og perfusatet fra hvert ettminuttsintervall ble analysert for [ $^3\text{H}$ ]-taurin med væskescintillasjonsteller (Packard Instruments).

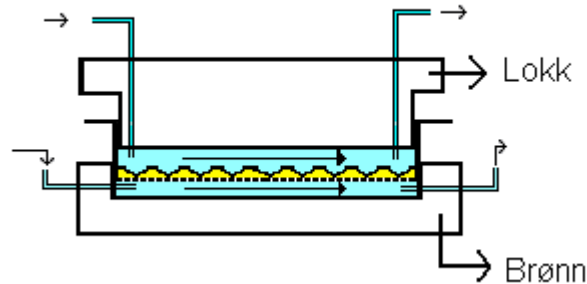


**Figur 2.1: Forsøksoppsettet med celler i skål.** Et lokk med to porter ble montert i en skål med celleepitelet på bunnen av kammeret. Mediet ble pumpet igjennom kammeret som pilene indikerer.



### 2.4.2 Celler på falcon-filtre

Celleepitelet består av en apikal- og en basolateral side. For å muliggjøre observasjon av taurinfrisetting fra begge sidene ble det brukt Falcon-filtre. Filteret med celleepitelet utgjorde bunnen av en plastholder som ble plassert i en spesiellaget ytre plastbrønn. Inne i plastholderen ble det montert et lokk, slik at to like store kamrene (300  $\mu$ l) ble dannet der filter med celleepitelet var skilleveggen. En skjematisk illustrasjon er vist i figur 2.2. Begge kamrene ble perfundert samtidig og med samme væskeføring (0.5ml/minutt). Perfusatet ble samlet i ettminuttsintervaller fra hvert av kamrene. Ved forsøkets slutt ble gjenværende radioaktivitet i cellene og perfusatet analysert som beskrevet for skåler.



**Figur 2.2: Forsøksoppsettet med celleepitel på filter.** Filteret ble montert sammen med en brønn og et lokk slik at det ble dannet to like store kamrene. Kamrene ble adskilt av et filter (stripet) med celleepitel. Begge kamrene ble perfundert samtidig. Mediet ble pumpet gjennom hvert kammer slik pilene indikerer. Den apikale siden av celleepitelet frisatte [<sup>3</sup>H]-taurin i det øvre kammeret, og den basolaterale siden av celleepitelet frisatte [<sup>3</sup>H]-taurin gjennom filteret, i det nedre kammeret.

## 2.5 Beregninger

Hastighetskoeffisienten for frisetting av [<sup>3</sup>H]-taurin fra celler i skåler ble beregnet for hvert minuttintervall etter følgende formel (Caldwell og Keynes, 1969) som viser hastighetskoeffisienten for den siste (n) og den nest siste (n-1) perioden for frisettingen:

$$k_n = M_n ((C + 0.5 M_n)t)^{-1}$$

og

$$k_{n-1} = M_{n-1} ((C + M_n + 0.5 M_{n-1})t)^{-1}$$

hvor  $t$  er tidsintervallet og  $C$  er cellenes totale innhold av [ $^3\text{H}$ ]-taurin ved slutten av siste frisettingsperiode ( $n$ ).  $M_n$  og  $M_{n-1}$  representerer mengden av frisatt [ $^3\text{H}$ ]-taurin i henholdsvis den siste ( $n$ ) og den nest siste ( $n-1$ ) perioden for frisettingen. Benevnningen er 1/minutt og verdiene representerer hastighetskoeffisienten for frisetting ved midtpunktet av hvert intervall.

Hastighetskoeffisienten for frisetting av [ $^3\text{H}$ ]-taurin fra celler på filter til hvert av kamrene, ble beregnet for hvert minuttintervall som beskrevet av Lastein (2004) med følgende formler.

$$k_{na} = M_{na} ((0.5 M_{na} + 0.5 M_{nb} + C)t)^{-1}$$

$$k_{nb} = M_{nb} ((0.5 M_{na} + 0.5 M_{nb} + C)t)^{-1}$$

og

$$k_{n-1a} = M_{n-1a} ((M_{na} + M_{nb} + 0.5M_{n-1a} + 0.5M_{n-1b} + C)t)^{-1}$$

$$k_{n-1b} = M_{n-1b} ((M_{na} + M_{nb} + 0.5M_{n-1a} + 0.5M_{n-1b} + C)t)^{-1}$$

Formlene viser hastighetskoeffisienten for frisetting fra henholdsvis den apikale- ( $k_{na}$ ) og den basolaterale siden ( $k_{nb}$ ), for den siste ( $n$ ) og den nest siste ( $n-1$ ) perioden for frisetting.  $M_{na}$ ,  $M_{n-1a}$ ,  $M_{nb}$  og  $M_{n-1b}$  representerer den totale mengden frisatt [ $^3\text{H}$ ]-taurin fra henholdsvis den apikale- og den basolaterale siden, i den siste og den nest siste perioden. De andre bokstavene representerer de samme enhetene som ble beskrevet for skåler.

Beregningene av hastighetskoeffisientene, middelerverdier og spredningsmål (SD) ble utført i Microsoft Excel regneark.

## 2.6 Hastighetskoeffisienten for diffusjon av taurin gjennom filteret

Det har tidligere blitt utført tester på filtrene som ble brukt i forsøkene mine. De ble testet uten celler tilstede, og begge kamrene ble perfundert slik som i forsøkene med celler (Lastein, 2004). Mediet på den ene siden av filteret inneholdt en kjent konsentrasjon av [<sup>3</sup>H]-taurin, og mediet på den motsatte siden ble samlet opp i ettminuttsintervaller, som beskrevet. Hastighetskoeffisienten ble beregnet til 0,096 minutt<sup>-1</sup>. Det tar dermed ca. 7 minutter før halvparten av radioaktiviteten er diffundert over filteret. Hastighetskoeffisienten for [<sup>3</sup>H]-taurinfrisetting ut av cellene og gjennom filteret ble også målt og viste seg å være på ca. 0,001 min<sup>-1</sup> og dermed en halveringstid på 96 ganger senere enn kun gjennom filteret. Diffusjonsflatene er imidlertid forskjellige. Derfor er sammenligningen kun en indikasjon på at frisetting fra den basolaterale siden av epitelet domineres av hastigheten gjennom den basolaterale cellemembranen og ikke gjennom filteret.

Et annet aspekt er at radioaktiviteten frisatt fra den apikale siden kan ha diffundert over filteret, der det ikke var dekket med celler, og dermed gitt større utslag på den basolaterale siden. Ca. 10 % av filterflaten var ikke dekket med celler. Dette kunne ha ført til at ca. 5 % av innholdet i det apikale kammeret kunne diffundere over til det basolaterale kammeret i løpet av ca. 7 minutter. Imidlertid var den maksimale eksponeringstiden for medium bare ett minutt, og derfor var mengden som eventuelt diffunderte over membranen av liten betydning for resultatene.

Det antas at taurin i cellene befinner seg fritt i cytosolen (Huxtable, 1992), og det [<sup>3</sup>H]-taurinet vil derfor blandes med cellens eget taurin som ikke er radioaktivt. Frisettingsmekanismene skiller sannsynligvis ikke mellom cellens eget taurin og det radioaktive taurinet. Endring i frisatt [<sup>3</sup>H]-taurin vil derfor reflektere endring i total frisatt taurin.

Reopptak av [<sup>3</sup>H]-taurin er ikke målbart ved de forsøksbetingelsene som har blitt benyttet (Fugelli, 2001, ikke publisert). Derfor vil hastighetskoeffisienten for frisatt [<sup>3</sup>H]-taurin tilsvare enveistransport av taurin ut av cellene i den enkelte frisettingsperioden (ett minutt). Denne typen enveistransport kalles *effluks* og har en benevnning som inneholder følgende elementer: antall mol/ celleenhet/ tidsenhet. Holdes antall mol og celleenhet

konstant i det enkelte frisettingsintervallet, kan man beregne hastighetskoeffisienten for effluks av [<sup>3</sup>H]-taurin uten å kjenne størrelsen på de andre elementene (Caldwell og Keynes, 1969).

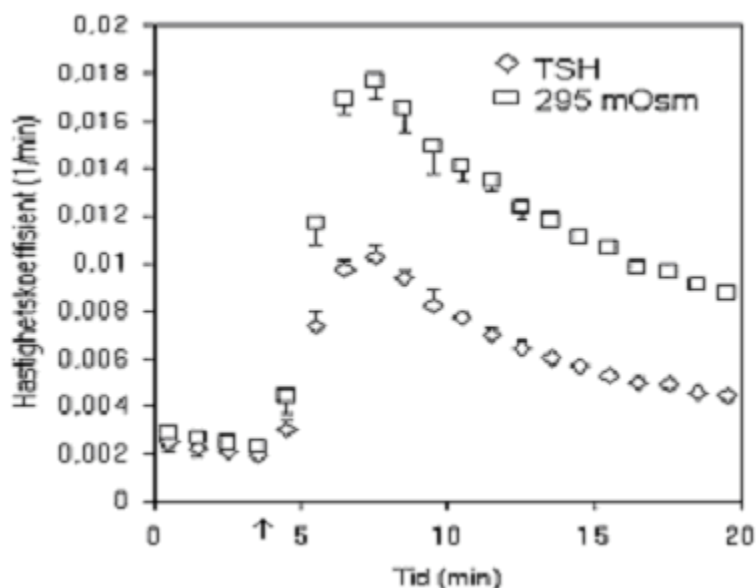
## **2.7 Statistisk analyse**

Resultatene er uttrykt som middelerdier ± SD, fra minimum fire uavhengige forsøk. I hver forsøksserie ble det utført testforsøk og tilhørende kontrollforsøk på celler som var dyrket frem samtidig. Statistisk signifikans ble undersøkt med to-veis uparret (skåler) og parret (filtre) Student t-test der P verdi < 0.05 ble tolket som signifikant forskjell. I noen tilfeller hvor flere enn to middelerdier ble sammenlignet, ble det benyttet ANOVA analyse og en multippel sammenligningspost-test til Tukey for å bestemme om signifikante forskjeller. Analysene ble utført på programvare Prism 4 fra GraphPad Software (San Diego, USA).

### 3 Resultater

#### 3.1 Effekt av hypoosmolalitet og TSH på hastighetskoeffisienten til [<sup>3</sup>H]-taurineffluks.

Dette er resultater fra to uavhengige serier som ble utført på celler dyrket i skåler. I den ene serien ble cellene hormonstimulert, mens i den andre ble cellene svellet.



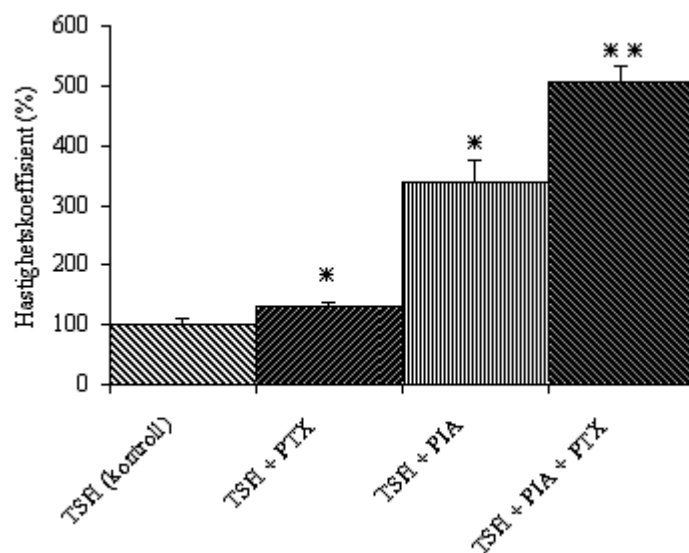
**Figur 3.1:** Effekt av hypoosmolalitet (295 mOsm) og TSH på hastighetskoeffisienten for [<sup>3</sup>H]-taurineffluks fra FRTL-5-celler dyrket i skåler. Cellene ble først utsatt for isoosmotisk medium (335 mOsm), etterfulgt av enten hypoosmotisk medium, eller isoosmotisk medium tilsatt TSH (10mU/ml). Pilen indikerer tidspunktet for medieskifte. Middelerverdier ± SD (n = 4) er vist.

Cellene frisatte [<sup>3</sup>H]-taurin med en lav og stabil hastighetskoeffisient under isoosmotiske betingelser (335 mOsm). Eksponering av cellene for hypoosmotisk medium (295 mOsm) førte til en kraftig økning av hastighetskoeffisienten, som steg til et toppnivå ni ganger større enn basalnivået før stimulering, i løpet av ca. fire minutter (figur 3.1). Toppnivået ble etterfulgt av et fall, som indikerer en inaktivering av [<sup>3</sup>H]-taurineffluks. I løpet av 15 minutter hvor cellene var utsatt for en osmolalitätsreduksjon på 12 % (40

mOsm) ble innholdet av [ $^3\text{H}$ ]-taurin redusert med  $17 \pm 1 \%$  ( $n = 4$ ). Stimulering av cellene med TSH (10 mU/ml) i isoosmotisk medium viste samme aktivitetsmønster som ved stimulering med hypoosmotisk medium. Toppnivået ved TSH-stimulering var fem ganger høyere enn basalnivået (figur 3.1). I løpet av 15 minutter med hormonstimulering ble cellenes innhold av [ $^3\text{H}$ ]-taurin redusert med  $9.8 \pm 0.2 \%$  ( $n = 4$ ).

### 3.2 Effekt av PIA og PTX på TSH-aktivert [ $^3\text{H}$ ]-taurineffluks.

Adenosinanalogen Phenylisopropyl-Adenosine (PIA) ved konsentrasjon på 100 nM binder seg hovedsakelig til  $A_1$  adenosinreseptorer i FRTL-5 celler (Sho et al, 1999).  $A_1$ -reseptoraktivering har en hemmende effekt på TSH-indusert aktivering av adenylyl syklase (AC), og en stimulerende effekt på TSH-indusert aktivering av fosfolipase C (PLC) i cellene (Sho, 1991). Pertussis Toxin (PTX) hemmer disse effektene av PIA (Tomura et al., 1997, Sho et al., 1999). I denne forsøksserien ble det undersøkt om PIA og PTX har effekt på aktiviteten til [ $^3\text{H}$ ]-taurineffluks fra FRTL-5-celler.

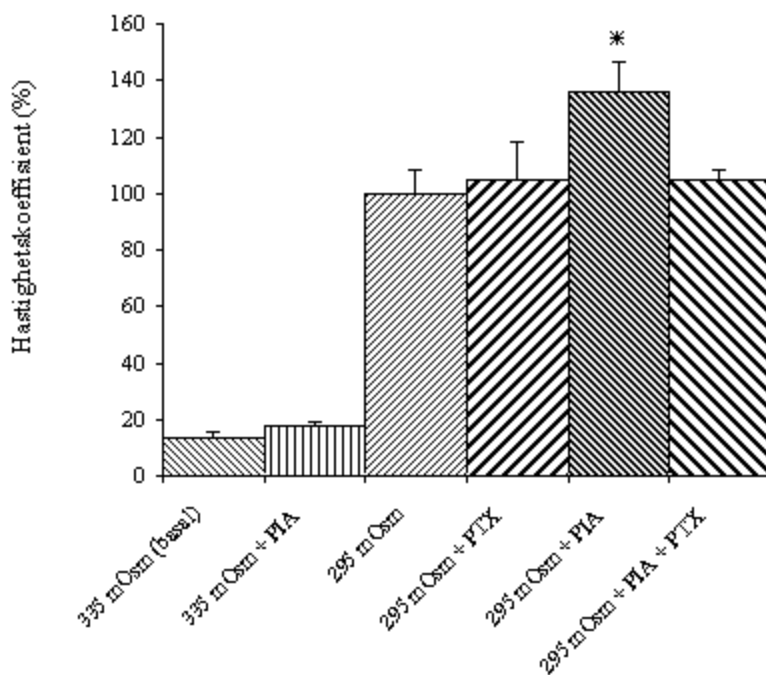


**Figur 3.2:** Effekt av PIA ( $N^6$ -(L-2-phenylisopropyl)-adenosin) på hastighetskoeffisienten til TSH-indusert [ $^3\text{H}$ ]-taurineffluks fra FRTL-5-celler, dyrket i skåler. Cellene ble utsatt for isoosmotisk medium de fem første minuttene, etterfulgt av samme mediet tilsatt TSH (10 mU/ml), eller TSH (10 mU/ml) + PIA (100 nM), eller TSH (10 mU/ml) + PIA (100 nM) + PTX (100 ng/ml) eller TSH (10 mU/ml) + PTX (100 ng/ml). I hver forsøksserie ble kontrollforsøk (100 %,  $n = 4$ ) kjørt samtidig som hver av de tre testforsøkene ( $n = 4$ ). For TSH + PTX og TSH + PIA var kontrollforsøkene utført med TSH

(10 mU/ml). For TSH + PIA + PTX var kontrollforsøkene utført med TSH + PIA (100nM). Disse dataene er normert for tilpasning til figuren. Middelerdi ( $\pm$  SD) av hastighetskoeffisienten er beregnet fra differansen mellom toppnivå og basalnivå i hvert forsøk. En stjerne indikerer signifikant økning i forhold til kontrollverdien TSH, mens to stjerner indikerer signifikant økning i forhold til TSH + PIA.

Samtidig med hvert av de tre testforsøkene (figur 3.2) ble også kontrollforsøk utført, (n=4). For TSH + PIA og TSH + PTX var kontrollforsøk utført med TSH (10 mU/ml), og for TSH + PIA + PTX var kontrollforsøk utført med TSH + PIA. Disse dataene ble deretter normert for å passe inn i samme diagram (figur 3.2). Middelverdi av hastighetskoeffisienten er beregnet fra differansen mellom toppnivået og basalnivået i hvert forsøk. PIA (100 nM) forsterket den TSH-stimulerte [<sup>3</sup>H]-taurineffluksaktiviteten signifikant med  $340 \pm 36 \%$  (n = 4) i forhold til kontrollnivå (TSH,  $100 \pm 10 \%$ , n = 4). Effekten av PIA ble ytterligere signifikant forsterket ( $506 \pm 27 \%$ , n = 4) for celler som var behandlet med PTX (100 ng/ml) i 24 timer før forsøket. PTX uten tilsetning av PIA i mediet hadde en svak, men signifikant stimulerende effekt på effluksaktiviteten induisert av TSH.

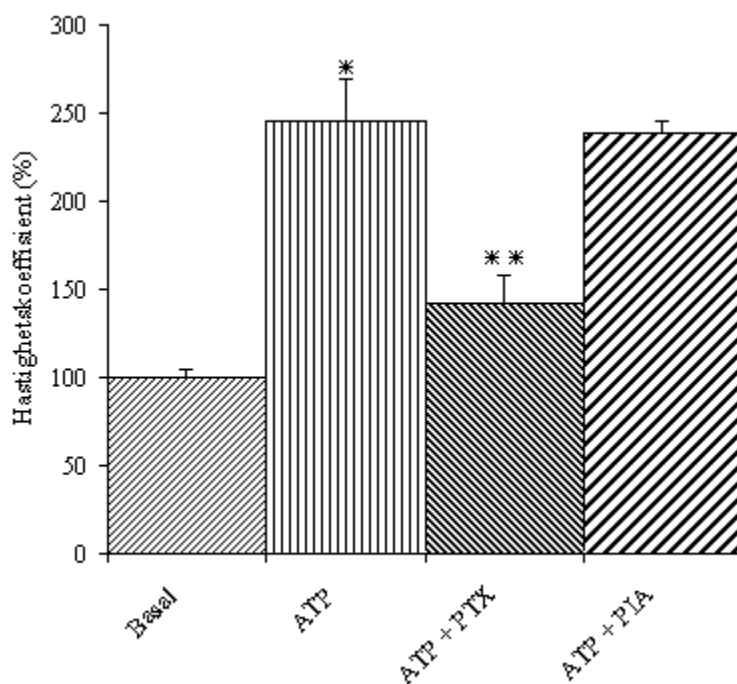
### 3.3 Effekt av PIA og PTX på svellingsaktivert [<sup>3</sup>H]-taurineffluks.



**Figur 3.3:** Effekt av PIA og PTX på hastighetskoeffisienten til [<sup>3</sup>H]-taurineffluks, induisert av hypoosmotisk medium, på FRTL-5-celler dyrket i skåler. Cellene ble utsatt for isoosmotisk medium de fem første minuttene, etterfulgt av hypoosmotisk medium, eller hypoosmotisk medium tilsatt PIA (100 nM), eller tilsatt PIA (100 nM) og PTX (100 ng/ml), eller tilsatt kun PTX (100 ng/ml). Den basale, isoosmotiske effluksaktiviteten, med og uten tilsatt PIA (100 nM, n = 4) er også vist. Middelverdi ( $\pm$  SD) av toppnivå er uttrykket som % av nivået i de respektive kontrollforsøkene ved hypoosmotisk medium (100 %). Stjernen indikerer signifikant økning i forhold til kontrollverdien, 295 mOsm.

PIA (100 nM) forsterket effekten av redusert osmolalitet (295 mOsm) på aktiviteten til [ $^3\text{H}$ ]-taurineffluks (figur 3.3), men hadde ingen signifikant effekt alene ved isoosmotiske betingelser ( $17.5 \pm 1.5 \%$ ,  $n = 4$ ; basal  $13.6 \pm 1.7 \%$ ,  $n = 4$ ). Middelverdien av toppnivået, som beskrevet i kapittel 3.2, økte signifikant til  $135.9 \pm 10.6 \%$  ( $n = 4$ ) sammenlignet med fravær av PIA ( $100 \pm 8 \%$ ,  $n = 4$ ). Denne stimulerende effekten av PIA ble fullstendig blokkert av PTX (100 ng/ml) ( $104.8 \pm 3.4$ ,  $n=4$ ). (Cellene ble behandlet med PTX som beskrevet tidligere). PTX alene hadde ingen signifikant effekt på den effluksaktiviteten induisert av redusert osmolalitet ( $105 \pm 13 \%$ ,  $n = 4$ ; 295 mOsm,  $100 \pm 8 \%$ ,  $n = 4$ ). I hver forsøksserie ble kontrollforsøk ( $100 \%$ ,  $n = 4$ ) ved hypoosmotiske betingelser kjørt samtidig med hvert testforsøk ( $n = 4$ ). For 295 mOsm + PIA og 295 mOsm + PTX var kontrollforsøkene utført med hypoosmotisk medium, og for 295 mOsm + PIA + PTX var kontrollforsøkene utført med 295 mOsm + PTX. Disse datene ble normert for å passe inn i figur 3.3.

### 3.4 Effekt av ATP, PIA og PTX på [ $^3\text{H}$ ]-taurineffluks.



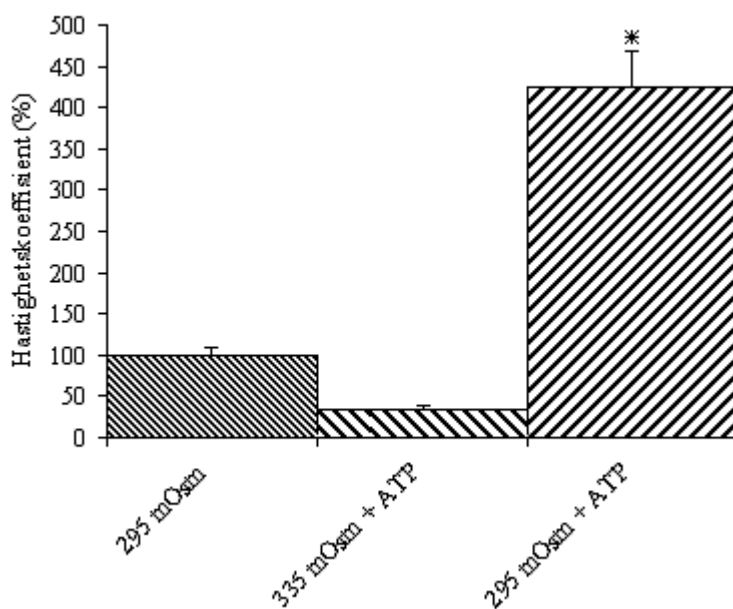
**Figur 3.4:** Effekt av ATP på hastighetskoeffisienten til [ $^3\text{H}$ ]-taurineffluks på FRTL-5-celler dyrket i skåler. Cellene ble utsatt for isoosmotisk medium (335 mOsm) de fem første minuttene (basal aktivitetsnivå, 100 %), etterfulgt av samme medium tilsatt ATP (50  $\mu\text{M}$ ), eller ATP (50  $\mu\text{M}$ ) og PIA (100 nM), eller ATP (50  $\mu\text{M}$ ) og PTX (100 ng/ml). Middelverdi ( $\pm$  SD,  $n = 4$ ) av toppnivå er uttrykt som % av nivået i de respektive forsøkernes basal aktivitetsnivå (100 %). En stjerne indikerer signifikant økning i forhold til kontrollverdien, basalaktivitet, mens to stjerner indikerer signifikant reduksjon i forhold til ATP.



ATP aktiverer P2Y purinerge reseptorer i FRTL-5 celler og påvirker signalveien fra TSH-reseptoren via PLC. Det var derfor interessant å undersøke om ATP kunne påvirke aktiviteten til [<sup>3</sup>H]-taurineffluks.

ATP (50 µM) i isoosmotisk medium stimulerte [<sup>3</sup>H]-taurineffluksaktiviteten signifikant. Den økte til et toppnivå  $246 \pm 23$  % (n = 4) i forhold til basalaktiviteten ( $100 \pm 5$  %, n = 4). PIA (100 nM) hadde ingen signifikant effekt på denne ATP-stimulerte aktiviteten til [<sup>3</sup>H]-taurineffluks, mens PTX (100 nM) hemmet denne effekten signifikant ( $142 \pm 16$  %, n = 4).

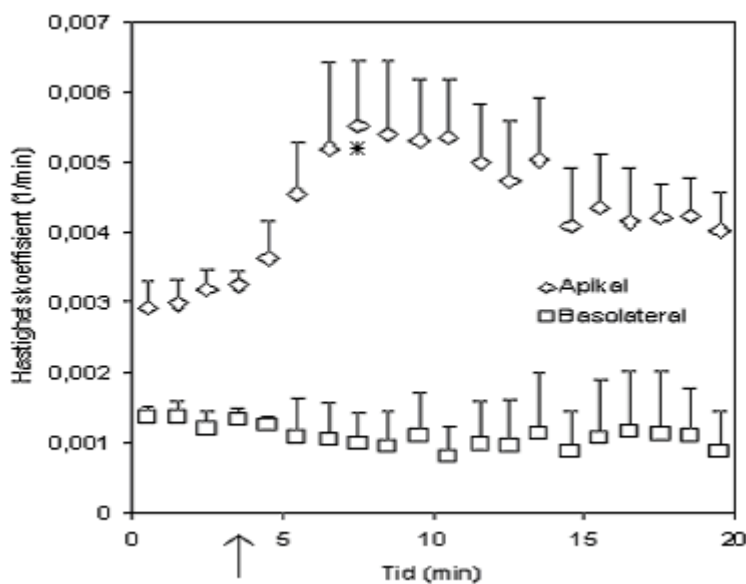
Det var også av interesse å undersøke om hypoosmotisk medium kunne ha effekt på den ATP-stimulerte effluksaktiviteten. Figur 3.5 viser at ATP (50 µM) hadde en betydelig og signifikant forsterkende effekt på aktiviteten til [<sup>3</sup>H]-taurineffluks induisert av hypoosmotisk medium. Effluksaktiviteten økte til et toppnivå på  $424 \pm 44$  % (n = 4) i forhold til nivået ved hypoosmolalitet alene ( $100 \pm 9$  %, n = 4). Sammenlignet med aktiviteten fra ATP (50 µM) ved isoosmotiske betingelser ( $32.8 \pm 6.3$  %, n = 4) og ved hypoosmotisk stimulering alene, ga den kombinerte stimulus en betydelig økt aktivering.



**Figur 3.5:** Effekt av ATP på hastighetskoeffisienten til [<sup>3</sup>H]-taurineffluks på FRTL-5-celler dyrket i skåler. Cellene ble utsatt for isoosmotisk medium de fem første minuttene, etterfulgt av medium med hypoosmolalitet, eller de samme respektive mediene tilsatt ATP (50 µM). Middelverdi (± SD, n = 4) av toppnivå er uttrykt som % av nivået (100 %) ved bare hypoosmotisk stimulering. Stjernen indikerer signifikant økning i forhold til de to andre stimuli.

### 3.5 Effekt av ATP på [<sup>3</sup>H]-taurineffluks fra celler på filter

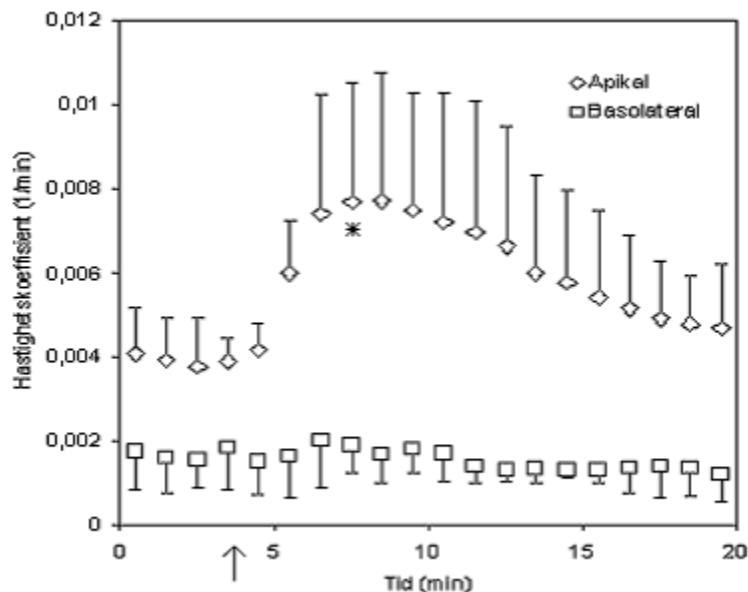
Siden ATP alene stimulerte aktiviteten til [<sup>3</sup>H]-taurineffluks og siden denne effekten muligens kunne være formidlet via PLC- og fosfolipase A<sub>2</sub>-signalsystemet (PLA<sub>2</sub>), var det av interesse å undersøke på hvilken side av epitelet denne effluksen ble stimulert, og på hvilken side ble [<sup>3</sup>H]-taurineffluksen aktivert fra.



**Figur 3.6:** Effekt av ATP (50  $\mu$ M) på hastighetskoeffisienten for [<sup>3</sup>H]-taurineffluks fra FRTL-5 celler dyrket som epitel på et filter. Epitelet ble utsatt for isoosmotisk medium på den basolaterale og den apikale siden. Pilen indikerer tidspunktet for tilført ATP (50  $\mu$ M) kun på den basolaterale siden. Middelerverdi  $\pm$  SD (n = 4) er vist. Stjernen indikerer signifikant økning i forhold til basalnivået.

Det ble utført to forsøksserier hvor cellene ble dyrket på Falcon-filtre. I den ene serien ble epitelet tilført ATP (50  $\mu$ M) fra den basolaterale siden og i den andre ble epitelet tilført ATP (50  $\mu$ M) fra den apikale siden. Epitelet ble initielt utsatt for isoosmotisk medium fra begge sider, før ATP ble tilført fra enten den basolaterale eller den apikale siden. [<sup>3</sup>H]-taurin ble samlet opp som beskrevet, fra begge sider av epitelet. Fig. 3.6 viser taurin effluksaktiviteten til epitel tilsatt ATP fra den basolaterale siden (n = 4). På den apikale siden økte effluksaktiviteten signifikant til det dobbelte av basalnivået

(n = 4). Hastighetskoeffisienten for [ $^3\text{H}$ ]-taurineffluks fra den basolaterale siden økte ikke signifikant i forhold til sitt basalnivå. Basalnivået på den apikale siden var noe høyere enn på den basolaterale siden. Reaksjonsmønsteret indikerer at det var en inaktivering som følger etter toppnivået av effluksaktiviteten, slik som i forsøk utført på skåler.



**Figur 3.7:** Effekt av ATP (50  $\mu\text{M}$ ) på hastighetskoeffisienten for [ $^3\text{H}$ ]-taurineffluks fra FRTL-5-celler dyrket som epitel på et filter. Epitelet ble utsatt for isoosmotisk medium fra den apikale og den basolaterale siden. Pilen indikerer tidspunktet for tilført ATP kun på den apikale siden. Middelerverdi  $\pm$  SD (n = 5) er vist. Stjernen indikerer signifikant økning i forhold til basalnivået.

Figur 3.7 viser at applisering av ATP (50  $\mu\text{M}$ ) på den apikale siden av epitelet førte til nesten en dobbel så høy og signifikant økning av hastighetskoeffisienten fra den apikale siden, mens på den basolaterale siden var det ingen signifikant effekt (n = 4). Mønsteret og nivået for effluksaktiviteten var tilsvarende som vist i figur 3.6.

## 4 Diskusjon

### 4.1 Stimulering med TSH og hypoosmotisk medium.

Effluksaktiviteten av [ $^3\text{H}$ ]-taurin fra FRTL-5-cellene økte kraftig både i hypoosmotisk medium og ved TSH-stimulering. Denne økningen ble etterfulgt av en inaktivering, selv under kontinuerlig stimulering. Mine resultater (figur 3.1) bekrefter tidligere observasjoner av taurineffluksaktivitet fra FRTL-5-celler dyrket i skåler (Roppen, 1998; Kveberg, 1998).

Tilsvarende forløp i aktiviteten til taurineffluks er også observert i mange andre celletyper, som for eksempel i fiskeerytrocytter (Fugelli og Thoroed, 1986) og i ulike pattedyrceller (se Lambert, 2004), der svellingsaktivert taurineffluks er knyttet til volumregulering. Hormonstimulert effluks ser ut til å være knyttet til andre cellulære prosesser enn RVD (Rosso et al, 2003; Ørtenblad, 2003). Den osmotiske bidragsmengden av taurin under RVD i FRTL-5-cellene er ikke kjent; heller ikke om den TSH-stimulerte taurin effluksen blir fulgt av en volumreduksjon.

Studier på FRTL-5-celler indikerer at både adenylyl syklase (AC) og fosfolipase C (PLC) inngår i signalsystemene som aktiverer taurineffluks. Denne effluksen ser ut til å initieres ved TSH-reseptoren (Fugelli, 2006), som vist i figur 1.2. TSH-reseptoren er en av flere G-proteinkoblete reseptorer som aktiveres ikke bare ved binding av sin ligand, men også ved reduksjon i intracellulær  $\text{Na}^+$ -konsentrasjon (Cetani et al., 1996). Sensitiviteten for dette ionet er foreslått å være grunnlaget for TSH-reseptorens aktivering ved cellesvelling (Fugelli, 2006).

### 4.2 Stimulering av purinerge reseptorer.

Mine resultater indikerer at ATP og adenosinanalogen PIA forsterket effekten av signaler fra TSH og cellesvelling på taurineffluksaktiviteten fra FRTL-5-cellene.

#### 4.2.1 Stimulering med PIA

PIA forsterket både den TSH-induserte (figur 3.2) og den svellingsinduserte (figur 3.3) taurineffluksaktiviteten. Kontrollaktiviteten til TSH, uten PIA, besto sannsynligvis hovedsakelig av en  $G_s$ -formidlet AC-aktivert effluksaktivitet, siden mesteparten av denne kan blokkeres av Cholera Toxin (CTX) (Gierschik et al., 1994; Fugelli, 2006). PIA, som alene har ingen effekt på PLC-aktiverte signalelementer (Kimura et al., 1995), hadde heller ingen signifikant effekt på basal taurineffluks (figur 3.3).

PIA, i den konsentrasjonen som ble benyttet i forsøkene, aktiverer hovedsakelig  $A_1$ -adenosinreseptorer og i liten grad  $A_2$ -adenosinreseptorer i FRTL-5-cellene (Sho et al, 1999).  $A_1$ -reseptorene er koblet til PTX-sensitiv  $G_{i/o}$ -proteiner som kan modulere flere signalsystemer. De viktige effektene er hemming av AC (Ralevic og Burstock, 1998) og aktivering av PLC (Sho et al, 1991; Sato et al, 1992). PTX ribosylerer  $\alpha$ -enhetene ( $\alpha_i$ ,  $\alpha_o$ ,  $\alpha_1$ ) i en gruppe G-proteiner ( $G_{i/o}$ ). Ribosyleringen innebærer en spesifikk interaksjon mellom G-protein og reseptor som hemmer reseptorstimulert GTP-hydrolyse og dermed signaldannelse (Gierschik, 1992). Forsøkene med TSH-stimulert og PIA-forsterket taurineffluks indikerer dermed at effluksaktiviteten var avhengig av både AC- og PLC-elementene. Den forsterkende effekten av PIA sammen med TSH (figur 3.2) kan være formidlet via PLC, i tillegg til en hemmet AC-effekt. Samme stimuli i nærvær av PTX forsterket ytterligere effluksaktiviteten. Hvis dette kom av PTX-blokkering av den stimulerende effekten til PIA på PLC, kan den kraftige forsterkede effluksaktiveringen mest sannsynlig ha kommet fra TSH-stimulert AC.

PIA forsterket også taurineffluksaktiviteten indusert av svelling (figur 3.3). Den svellingsinduserte aktiviteten i fravær av PIA, er sannsynligvis et resultat av aktivitet formidlet både via AC og PLC (Fugelli, 2006). Denne effluksaktiviteten var PTX-insensitiv, og er tidligere vist å være CTX-insensitiv (Fugelli, 2006), mens den PIA-induserte tilleggseffekten ble fullstendig blokkert av PTX (figur 3.3). Dette resultatet sammen med tidligere observasjoner, som har vist at den svellingsinduserte effluksaktiviteten blokkeres delvis av inhibitorer av 5-lipooxygenase (5-LO) (Fugelli, 2006), indikerer at PIA forsterket også den svellingsinduserte taurineffluksaktiviteten via  $G_{i/o}$ -proteiner og PLC.

#### 4.2.2 Stimulering med ATP

ATP alene stimulerte taurineffluksaktiviteten signifikant (figur 3.4). Aktiviteten ble delvis blokkert av PTX, men ble ikke ytterligere forsterket ved nærvær av PIA (figur 3.4). ATP, via P2Y-purinerge reseptorer, er generelt i stand til å interagere med to G-proteinfamilier; PTX-insensitive  $G_{q/11}$ -proteiner, som aktiverer PLC, og PTX-sensitive  $G_{i/o}$ -proteiner, koblet til inhibisjon av AC (Ralevic og Burnstock, 1998). I FRTL-5-cellen ser det ut til at det er  $G_{q/11}$ -proteiner som dominerer, med  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -produksjon, frisetting av  $\text{Ca}^{2+}$  fra intracellulære lagere og  $\text{PLA}_2$ -aktivering med syntese av arakidonsyre (Singh et al., 1996; Vainio og Törnquist, 2000). Et overraskende punkt ved mine resultater er derfor forklaringen på at PTX hadde en kraftig hemmende effekt på den ATP-aktiverede effluksaktiviteten (ca 50 %, figur 3.4). Den mest plausible forklaringen på den observerte PTX-effekten kan være at adenosin kan ha vært tilstede i mediet under ATP-stimuleringen. På FRTL-5-cellenes utside finnes det ektonukleotidaser som kan raskt hydrolysere noe av ATP til ADP, AMP og adenosin (Gerwins og Fredholm, 1992). I mine forsøk ble ATP kontinuerlig fornyet ved gjennomstrømmingen av mediet i perfusjonskammeret og eventuelle ATP-metabolitter ble dermed fjernet. Likevel kunne noe av ATP ha blitt omdannet til adenosin og stimulert  $A_1$ -reseptorer, og dermed ha vært årsaken til den observerte PTX-sensitive ATP-indusert taurineffluksaktiviteten. En annen forklaring kan være at PTX kan ha påvirket G-proteiner som regulerer  $\text{PLA}_2$  aktiviteten i FRTL-5 celler (Ekokoski et al., 2000) og dermed et av signalsystemene for taurineffluksregulering. I hvilken grad disse forholdene hadde betydning for resultatene i mine forsøk, står igjen å utrede.

Det er interessant at adenosin som blir frisatt fra FRTL-5-cellen ved TSH-stimulering (Sho et al., 1991; Vainio et al., 2000; Ralevic & Burnstock, 1998), og sammen med ATP ser ut til å ha en autokrin funksjon i FRTL-5-cellen, også modulerer taurineffluksen. Denne type funksjon er ikke påvist i disse cellene før, men er kjent fra studier på andre celletyper hvor celledvelling frisetter ATP som via purinerge reseptorer aktiverer ulike kanaler for frisetting av osmolytter som deltar i RVD (Lang et al., 1998). For eksempel i Veroceller øker ekstracellulært ATP intracellulær  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjon, som videre aktiverer en bestemt type  $\text{K}^+$  kanaler (BK kanaler) som frisetter  $\text{K}^+$  i en RVD-prosess (Hafting, 2000). I Swiss 3T3 fibroblaster forsterker ATP en svellingsaktivert

taurineffluks, men ATP alene har ingen stimulerende effekt (Franco et al., 2004). ATP forsterker også svellingsaktiveringen av Cl<sup>-</sup>-kanaler i humane hepatocytter (Feranchak et al., 2000), og har tilsvarende effekt på anionkanaler i luftsviseepitelceller (Musante et al., 1999). Effekten av ATP og adenosin har kort varighet om ikke frisettingen vedvarer, siden begge molekylerne blir raskt nedbrutt av ekstracellulære enzymer (Gordon, 1986). Tyrocytter *in vivo* er rikt innervert av både sympatiske (Romeo et al., 1986) og parasympatiske nervefibere (Romeo et al., 1988). *In vivo* kunne adenosin være frisatt fra både nervefibere og fra tyrocytter (Okajima et al., 1994; Sho et al., 1991).

### 4.3 Endring i ATP- og PIA-sensitivitet

Den PIA- og ATP-aktiverte taurineffluksaktiviteten ble kraftig forsterket ved redusert medieosmolalitet (figur 3.3 og 3.5). Denne effekten ser ut til å henge sammen med økt cellevolum, men hvilke elementer i signalsystemet som påvirkes under slike betingelser er det lite kunnskap om.

Effekten av celledvelling på endret ATP-sensitivitet er kjent fra studier på flere celletyper. I FRTL-5-cellene er den cAMP-stimulerte taurineffluksen sterkt påvirket av cellevolumet (Fugelli, 2006). Celledvellingens forsterkende effekt ser ut til å komme av endret basalaktivitet (konstitutiv aktivitet) til TSH-reseptorene, og på aktivitetsendring til elementer i signalsystemet nedstrøms til AC (Fugelli, 2006). Den kraftigere aktiveringen ved celledvelling samtidig med ATP-stimulering (figur 3.5), kunne skyldes endret aktivitet i TSH-reseptoren. Dette bidraget kunne bero på signalaktivering både via AC og PLC, i tillegg til ATP sin egen effekt på taurin effluks. Figur 3.5 viser at aktiviteten fra hver av de enkelte stimuli (ATP og svelling) var betydelig mindre enn ved kombinert stimuli fra ATP og celledvelling. Dette indikerer at også andre forhold kunne ha innvirket på signaltransduksjonen og endret effekten av ATP-stimuleringen.

Den forsterkede effekten av PIA sammen med svellingsstimulering ble fullstendig blokkert av PTX (figur 3.3). Dette bidraget ser derfor ut for å ha kommet fra PIAs aktivering av A<sub>1</sub> adenosinreseptorer. Siden PIA alene ikke hadde noen signifikant effekt på taurineffluks (figur 3.3), indikerer denne ekstraeffekten at også i dette tilfellet kan det ha vært induert betingelser som økte sensitiviteten for PIA-stimuleringen.

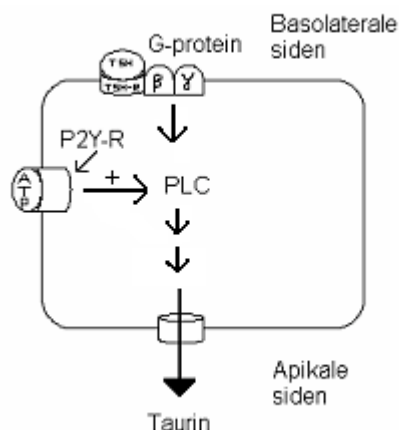
Endret sensitivitet for ATP og PIA har vært foreslått å skyldes redusert ionestyrke i cellene ved svelling (Emma et al., 1997). I forsøk hvor dette har vært undersøkt ser det ut for at man ikke har vært klar over  $\text{Na}^+$ -sensitiviteten til G-proteinkoblede reseptorer og deres rolle i signalgenereringen knyttet til effluks av osmolytter ved RVD-prosesser (Emma et al., 1997). En svellingsredusert ionestyrke ville også innebære en redusert intracellulær  $\text{Na}^+$ -konsentrasjon. De observerte effektene kunne derfor like gjerne ha kommet fra de  $\text{Na}^+$ -sensitive TSH-reseptorene som fra endret ionestyrke på andre elementer i signalsystemet.

#### **4.4 Lokalisering av den ATP-induserte taurineffluksen**

Den ATP-induserte taurineffluksaktiviteten til FRTL-5-celler på filtre (figur 3.6 og 3.7), syntes bare å være lokalisert på den apikale siden av membranepitelet (se figur 4.1). Dette kunne ha kommet av at filteret hindret frisettingen av taurin fra cellene til den basolaterale siden. Imidlertid har Lastein (2004) vist på FRTL-5-celler at ved svellingsaktivering stimuleres taurineffluksen på begge sider av filteret. Det er derfor lite sannsynlig at mine resultater skyldes en mekanisk hindring av taurineffluks fra den basolaterale siden. Resultatene tyder heller på at spesielle apikalt lokaliserte taurineffluksveier aktiveres, induert av ATP. TSH-stimulert taurineffluks skjer også i stor grad fra den apikale siden (Lastein, 2004), selv om TSH-reseptorene befinner seg på det basolaterale membranepitelet (Chambard et al., 1983).

Siden taurineffluksaktiviteten som stimuleres både med TSH og cellesvelling, ser ut for å skje via to ulike signalsystemer (Field et al., 1987; Fugelli, 2006), er det spørsmål om disse aktiverer hver sin type efflukskanal. Begge stimuli skulle ut ifra dette aktivere en blandet populasjon av kanaler på hver side av celleepitelet. ATP via P2Y-reseptorer, skulle forventes å aktivere bare den ene kanaltypen, via PLC og  $\text{PLA}_2$  (Okajima et al., 1989; Ekokoski et al., 2000), på den apikale siden av epitelet.





**Figur 4.1: ATP-indusert taurineffluks fra den apikale siden av celleepitelet.** ATP-stimulering av P2Y-purinerge reseptor aktiverer fosfolipase C (PLC) via  $\beta\gamma$ -delen av G-proteinet og forsterker taurineffluksen fra FRTL-5-celler fra den apikale siden av celleepitelet. Pilene mellom PLC og taurinkanalen indikerer at det er flere elementer involvert i signaltransduksjonen, som ikke er vist i figuren. Disse elementene kan sees i figur 1.2.

De endelige svarene på om taurin frisettes via kanaler og om det er flere typer kanaler involvert, står det igjen å utrede. Det er imidlertid interessant å sammenligne mine resultater med at de samme signalelementene, som nevnt ovenfor, stimulerer jodideffluks og jodering av tyroglobulin også fra den apikale siden av epitelet til FRTL-5-celler (Marcocci et al., 1987; Di Girolamo et al., 1991). Senere studier på FRTL-5-celler og andre tyrocytter har påvist jodidkanalen pendrin (Royaux et al., 2000). Denne aktiveres av de samme signalelementene som aktiverer taurineffluks (Okajima et al., 1988; Marcocci et al., 1987; Fugelli, 2006), bortsett fra at det ikke er undersøkt for aktivering ved celledeling. Pendrin er medlem av en familie aniontransportører (Everett og Green, 1999) hvor andre medlemmer er påvist å kunne frisette taurin (Kirk og Kirk, 1993). Om pendrin kan fungere som taurinkanal, står igjen å vise. Siden taurin kan frisettes fra begge sider av epitelet i FRTL-5-cellene (Lastein, 2004), og pendrin er lokalisert kun på den apikale siden, skulle det forventes at det i tillegg finnes andre taurinkanaler i disse cellene.

#### 4.5 Taurinets funksjoner i tyrocytter

Taurineffluksen syntes å være assosiert, ikke bare med en mulig RVD-prosess i tyrocyttene, men også til prosesser assosiert med  $H_2O_2$  oksidering av jodid og joderingen av tyroglobulin, som lagres i folikkellumen til tyreoida. Taurineffluksen fra den apikale siden er stimulert av de samme signalelementene (Okajima et al., 1989; Ekokoski et al., 2000) som stimulerer produksjonen av  $H_2O_2$  i FRTL-5-cellene (Kimura et al., 1995; Bjorkman & Edholm, 1992). Taurin kunne derfor tenkes å delta som en antioksidant og hindre utviklingen av toksiske skader fra metabolitter fra de  $H_2O_2$ -assosierte prosessene. En slik funksjon av taurin har tidligere blitt foreslått i andre celletyper, men betydningen er kontroversiell (Hansen et al., 2006).

En annen funksjon for taurin kan være som osmolytt i generering av væsketransport fra blodet til folikkellumen og å opprettholde et optimalt væskevolum i kolloidet. Væsketransport over tyrocytteepitel er beskrevet (Bourke et al., 1987, Cauvi et al., 2000). Den ATP-induserte andelen av taurineffluksen over det apikale celleepitelet kunne delta i en slik osmolytt-drevet væsketransport. Betydningen av denne vil være bestemt av det kvantitative bidraget til taurin. Dette er ikke kjent for FRTL-5-cellene eller for andre tyrocytter, men de har imidlertid evne til aktiv  $Na^+$ -drevet akkumulering av taurin (Jhiang et al., 1993).

#### 4.6 Konklusjon

Adenosinanalogen PIA hadde ingen signifikant effekt på aktiviteten til taurineffluks, men forsterket TSH-stimulert taurineffluksaktivitet mer enn tre ganger i forhold til TSH alene. Denne PIA effekten ble ytterligere forsterket i celler som var behandlet med PTX. PIA forsterket også signifikant svellingsaktivert taurineffluks i forhold til svelling alene. Denne effekten ble fullstendig blokkert av PTX.

ATP alene stimulerte taurineffluksaktiviteten signifikant over basalnivå. Redusert osmolalitet økte effekten av ATP betydelig og signifikant i forhold til ATP og svelling

hver for seg.

ATP stimulerte signifikant taurineffluksaktiviteten bare fra den apikale siden av celleepitelet og ikke fra den basolaterale siden av FRTL-5 celler dyrket på filter.

Mine resultater støtter hypotesen om at taurineffluksaktiviteten i FRTL-5 celler stimuleres via et adenylyl syklase-formidlet signalsystem og et fosfolipase C-formidlet signalsystem. Begge signalsystemene ser ut for å kunne bli modulert via adenosin A<sub>1</sub> resptorer. P2Y purinerge reseptorer ser ut for å kunne modulere et fosfolipase C-formidlet signalsystem, som bare aktiverer taurineffluks fra den apikale siden av celleepitelet.

## Referanser

Akamizu, T., Ikuyama, S., Saji, M., Kosugi, S., Kozak, C., McBride, O.W., Kohn, L.D. Cloning, chromosomal assignment, and regulation of the rat thyrotropin receptor: expression of the gene is regulated by thyrotropin, agents that increase cAMP levels, and thyroid autoantibodies.

*Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **87**: 5677-5681 (1990).

Allgeier, A., Offermanns, S., Van Sande, J., Spicher, K., Schultz, G. og Dumont, J.E. The human thyrotropin receptor activates G-proteins G<sub>s</sub> and G<sub>q/11</sub>.

*J. Biol. Chem.* **269**: 13733-13735 (1994).

Banderali, U og Roy, R. Activation of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in MDCK cells during volume regulation in hypotonic media.

*Membr. Biol.* **126**: 219-234 (1992).

Beckett, G.J. and Arthur, J.R. Selenium and endocrine systems.

*Journal of Endocrinology.* **184**: 455-465 (2005).

Bidey, S.P., Lambert, A. og Robertson, W.R. Thyroid cell growth, differentiation and function in the FRTL-5 cell line: a survey.

*J. Endocrin.* **119**: 365-376 (1988).

Bjorkman, U. og Ekholm, R. Hydrogen peroxide generation and its regulation in FRTL-5 and porcine thyroid cells.

*Endocrinology*, **130**: 393-399 (1992).

Bockaert, J. G protein-coupled receptors.

*Encyclopedia of Life Sciences/ NATURE* 2001: 1-9. [www.els.net](http://www.els.net)

Caldwell, P.C. og Keynes, R.D. The exchange of  $^{22}\text{Na}$  between frog sartorius muscle and the bathing medium. I *Laboratory techniques in membrane biophysics*. Ed. Passow, H. og Stämpfi, R. Springer Verlag. (1969).

Cauvi, D., Penel, C., Nlend, M.C., Venot, N., Allasia, C. and Chabaud, O. Regulation of thyroid cell volume and fluid transport: opposite effects of TSH and iodide on cultured cells.

*Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.* **279**: E546-E553 (2000).

Cetani, F., Tonacchera, M., og Vassart G. Differential effects of NaCl concentration on the constitutive activity of the thyrotropin and the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors.

*FEBS Letters.* **378**: 27-31 (1996).

Chambard M., Verrier B., Gabrion J. and Mauchamp J. Polarization of thyroid cells in culture: evidence for the basolateral localization of the 'iodide pump' and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex. *J. Cell. Biol.* **96**: 1172-1177. (1983).

Combes, D., Ye, W.N., Zwick, A. og Monsan, P. Effect of salts on enzyme stability.

*Ann. NY. Acad. Sci.* **542**: 7-10 (1988).

Davies, T., Marians, R. og Latif, R. The TSH receptor reveals itself.

*J. Clinical Invest.* **110**: 161-164 (2002).

Di Girolamo, M., A'Arcangelo, D., Bizzarri, C., og Corda, D. Muscarinic regulation of phospholipase A2 and iodine fluxes in FRTL-5 thyroid cells.

*Acta Endocrinol.(Copenh.)* **125**: 192-200 (1991).

Ekokoski, E., Dugué, B., Vainio, M., Vainio, P.J. og Törnquist, K. Extracellular ATP-mediated phospholipase A2 activation by a Gi/Go protein,  $\text{Ca}^{2+}$ , and mitogen-activated

protein kinase.

*J. Cellular Physiol.* **183**: 155-162 (2000).

Emma, F., McManus, M. og Strange, K. Intracellular electrolytes regulate the volume set point of the organic osmolyte/anion channel VSOAC.

*Am. J. Physiol.* **272**: C1766-C1775 (1997).

Everett, L.A. og Green, E.D. A family of mammalian anion transporters and their involvement in human genetic diseases.

*Hum. Mol. Genet.* **8**: 1883-1891 (1999).

Falktoft, B. og Lambert, I.H. Ca<sup>2+</sup>-mediated potentiation of the swelling-induced taurine efflux from HeLa cells: on the role of calmodulin and novel protein kinase C isoforms.

*J. Membrane Biol.* **210**: 59-75 (2004).

Feranchak, A.P., Fitz, J.G. og Roman, R.M. Volume-sensitive purinergic signalling in human hepatocytes.

*J. Hepatol.* **33**: 174-182 (2000).

Franco, R., Rodríguez, R. and Pasantes-Morales, H. Mechanisms of the ATP potentiation of hyposmotic taurine release in Swiss 3T3 fibroblasts.

*Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.*, **449**: 159-169 (2004).

Field, J.B., Ealey, A., Marshall, N.J. and Cockcroft, S. Thyroid-stimulating hormone stimulates increases in inositol phosphates as well as cyclic AMP in the FRTL-5 rat thyroid cell line.

*Biochem. J.* **247**: 519-524 (1987).

Fugelli, K. og Thoroed, S. Taurine transport associated with cell volume regulation in flounder erythrocytes under anisosmotic conditions.

*J. Physiol.* **374**: 245-261 (1986).

Fugelli, K. G protein-coupled receptor activation of swelling sensitive taurine efflux in rat thyrocytes (FRTL-5 cells). Scandinavian Physiological Society meeting Reykjavik 2006. To be published in *Acta Physiologica*.

Gerwins, P. og Fredholm, B.B. ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilize intracellular calcium via the formation of inositol 1,4,5-triphosphate in a smooth muscle cell line.

*J. Biol. Chem.* **267**: 16081-16087 (1992).

Gierschik, P. ADP-ribosylation of signal-transduction guanine nucleotide-binding proteins by pertussis toxin.

*Current Topics in Microbiology and Immunology.* **175**: 69-96 (1992).

Greger, R., Heitzmann, D., Hug, M.J., Hoffmann, E.K. og Bleich, M. The Na<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup>-K<sup>+</sup> cotransporter in the rectal gland of *Squalus acanthias* is activated by cell shrinkage.

*Pflügers Arch.* **438**: 165-176 (1999).

Gordon, J.L. Extracellular ATP: effects, sources and fate.

*Biochem. J.* **233**: 309-319 (1986).

Hafting, T. Hypotonic stress elevates the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration by activation of purinergic receptors (P2Y1) in clonal kidney cells.

PhD. Thesis. University of Oslo. 2005, pp. 1-8.

Han, X., Patters, A.B., Jones, D.P., Zelikovic, I. og Chesney, R.W. The taurine transporter: mechanisms of regulation.

*Acta Physiol.* **187**: 61-73 (2006).

Hansen, S.H., Andersen, M.L., Birkedal, H., Cornett, C. og Wibrand, F. The important role of taurine in oxidative metabolism.

In *Taurine*, 6. Advances in experimental medicine and biology. Springer Eds. Oja, S.S. og Saransaari P. pp. 129-135 (2006).

Hoffmann, E.K. og Ussing, H.H. Membrane mechanisms in volume regulation in vertebrate cells and epithelia. In: G.H. Giebisch, J.A. Schafer, H.H. Ussing, og P. Kristensen (eds) *Membrane Transport in Biology*, Vol. 5, pp317-399. Springer Verlag, Berlin (1992).

Hoffmann, E.K. og Dunham, P.B. Membrane mechanisms and intracellular signalling in cell volume regulation.

*Int. Rev. Cytol.* **161**: 173-262 (1995).

Hoffmann, E.K., Hoffmann, E., Lang, F. og Zadunaisky, J.A. Control of Cl<sup>-</sup> transport in the operculum epithelium of *Fundulus heteroclitus*: long- and short-term salinity adaptation.

*Biochem. Biophys. Acta* **1566**: 129-139 (2002).

Huxtable, R.J. Physiological actions of taurine.

*Physiol. Rev.* **72**: 101-163 (1992).

Jackson, P.S. og Strange, K. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux.

*Am. J. Physiol.* **265** (*Cell Physiol.* **34**): C1489-C1500 (1993).

Jhiang, S.M., Fithian, L.F., Smanik, P., McGill, J., Tong, Q. and Mazzaferri, E.L. Cloning of the human taurine transporter and characterization of taurine uptake in thyroid cells.

*FEBS*, **318**: 139-144 (1993).

Kimura, K., Okajima, F., Sho, K., Kobayashi, I. og Kondo, Y. Thyrotropin-induced hydrogen peroxide production in FRTL-5 cells is mediated not by adenosine 3,5-



monophosphate, but by Ca<sup>2+</sup> signalling followed by phospholipase-A2 activation and potentiated by an adenosine derivative.

*Endocrinology*, **136**: 116-123 (1995).

Kirk, K. and Kirk, J. Volume-regulatory taurine release from a human lung cancer cell line. Evidence for amino acid transport via a volume-activated chloride channel. *FEBS Lett.* **336**: 153-158 (1993).

Knopf, K., Sturman JA., Armstrong M., Hayes KC. Taurine: an essential nutrient for the cat. *J Nutr.* **108**:773-8. (1978).

Kveberg, L. Osmolalitetssensitiv taurinfrisetting I FRTL-5 celler: Arakidonsyremetabolitters rolle I aktiveringen av transportmekanismen for taurin. Cand. Scient. oppgave. Universitetet i Oslo. 1998.

Kyoko, T., Ohyabu, Y., Schaffer, S.W. og Azuma, J. Taurine prevents ischemia damage in cultured neonatal rat cardiomyocytes. I: Taurine 4. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Eds. Della Corte, L., Huxtable, R.J. , Sgaragli, G. og Tipton, K.F. Plenum Publ. Pp. 109-126 (2000).

Lambert, I.H. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells.

*Neurochemical Research.* **29**: 27-63 (2004).

Lambert, I.H. Reactive oxygen species regulate swelling-induced taurine efflux in NIH3T3 mouse fibroblasts.

*J. Membr. Biol.* **192**: 19-32 (2003).

Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Völkel, H., Waldegger, S., Gulbins, E. og Häussinger, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms.

*Physiol. Rev.* **78**: 247-306 (1998).

Lastein 2004, Swelling- and TSH-stimulated taurine efflux in rat thyroid cells (FRTL-5) grown on permeable membranes. Cand. Scient. oppgave. Universitetet i Oslo. 2004.

Macknight, A.D.C. Principles og cell volume regulation.

*Renal Physiol. Biochem.* **11**: 114-141 (1988).

Marcocci, C., Pinchera, A., og Grollman, E.F. Sodium/proton exchange in FRTL-5 cells: Role in the maintenance of intracellular pH and TSH-stimulated cell growth.

*Acta Endocrinologica Suppl.* **281**: 293-296 (1987).

Musante, L., Zegarra-Moran, O., Montaldo, P.G., Ponzoni, M., og Galietta, L.J.

Autocrine regulation of volume-sensitive anion channels in airway epithelial cells by adenosine.

*J. Biol. Chem.* **274**:11701-11707 (1999).

Okajima, F., Sho, K., og Kondo, Y. Inhibition by islet-activating protein, pertussis toxin, of P2-purinergic receptor-mediated iodine efflux and phosphoinositide turnover in FRTL-5 cells.

*Endocrinology*, **123**: 1035-1043 (1988).

Okajima, F., Sato, K., Nazarea, K., Sho, K. og Kondo, Y. A permissive role of pertussis toxin substrate G-protein in P2-purinergic stimulation of phosphoinositide turnover and arachidonate release in FRTL-5 thyroid cells.

*J. Biol. Chem.* **264**: 13029-13037 (1989).

Ortenblad, N., Young, J.F., Oksbjerg, N., Nielsen, J.H. og Lambert, I.H. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells.

*Am.J. Physiol.* **284**: C1362-C1373.

Pasantes-Morales, H. og Franco, R. Influence of protein tyrosine kinases on cell volume

change-induced taurine release.

*Cerebellum*, **1**: 103-109 (2002).

Pedersen, S.F., Beisner, K.H., Housgaard, C., Willumsen, B.M., Lambert, I.H. og Hoffmann, E.K. Rho family GTP binding proteins are involved in the regulatory volume decrease process in NIH3T3 mouse fibroblasts.

*J. Physiol.* **541**: 779-796 (2002).

Piez, K.A og Eagle, H. The free amino acid pool of cultural human cells. *J. Biol. Chem.* **231**: 533-545 (1958).

Ralevic, V. og Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines.

*Pharmacol. Rev.* **50**: 413-492 (1998).

Romeo, H.E., Diaz, M.C., Ceppi, J., Zaninovich, A.A. og Cardinali, D.P. Effect of inferior laryngeal nerve section on thyroid function in rats.

*Endocrinology*, **122**: 2527-2532 (1988).

Royaux, I.E., Suzuki, K., Mori, A., Katoh, R., Everett, L.A., Kohn, L.D. og Green, E.D. Pendrin, the protein encoded by the pendred syndrome gene (*PDS*), is an apical porter of iodine in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells.

*Endocrinology*, **141**: 839-845 (2000).

Roppen, C. Cellevolumsensitiv taurin effluks fra (FRTL-5) tyreoideaceller fra rotte.

Cand. Scient. oppgave. Universitetet i Oslo. 1998.

Rosso, L., Peteri-Brunbäck, B., Poujeol, P., Hussy, N. og Mienville, J-M. Vasopressin-induced taurine efflux from rat pituicytes: a potensial negative feedback for hormone secretion.

*J. Physiol.* **554**: 731-742 (2003).

Sato, K., Okajima, F. og Kondo, Y. Extracellular ATP stimulates three different receptor-signal transduction systems in FRTL-5 thyroidcells. Activation of phospholipase C, and inhibition and activation of adenylate cyclase.

*Biochem. J.* **283**: 281-287 (1992).

Sho, K., Okajima, F., Abdul Majid, M. og Kondo, Y. Reciprocal modulation of thyrotropin actions by P1-purinerbic agonists in FRTL-5 thyroid cells. Inhibition of cAMP pathway and stimulation of phospholipase C-Ca<sup>2+</sup> pathway.

*J. Biol. Chem.* **266**: 12180-12184 (1991).

Sho, K., Narita, T., Okajima, F. and Kondo, Y. An adenosine receptor agonist-induced modulation of TSH-dependent cell growth in FRTL-5 thyroid cells mediated by inhibitory G protein, G<sub>i</sub>.

*Biochemie.* **81**: 341-346 (1999).

Silverthorn, D.E. Human Physiology. Pearson International Edition. (2007).

Singh, J., Hunt, P., Eggo, M.C., Sheppard, M.C., Kirk, C.J. og Michell, R.H. Thyroid-stimulating hormone rapidly stimulates inositol polyphosphate formation in FRTL-5 thyrocytes without activating phospholipase C.

*Biochem. J.* **316**: 175-182 (1996).

Stutzin, A. and Hoffmann, E.K. Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis.

*Acta Physiol.* **187**: 27-42 (2006).

Szkudlinski, M.W., Fremont, V., Ronin, C., and Weintraub, B.D. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships.

*Physiol. Rev.* **82**: 473-502 (2001).

Tomura, H., Itoh, H., Sho, K., Sato, K., Nagao, M., Ui, M., Kondo, Y. og Okajima, F.

Subunits of pertussis toxin-sensitive G proteins mediate A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist-induced activation of phospholipase C in collaboration with thyrotropin.

*J. Biol. Chem.* **272**: 23130-23137 (1997).

Vainio, M. og Tørnquist, K. The role of adenosine A<sub>1</sub> receptors in the ATP-evoked Ca<sup>2+</sup> response in rat thyroid FRTL-5 cells.

*Eur. J. Pharmacol.* **390**: 43-50 (2000).

Vassart, G. og Dumont, J.E. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth.

*Endocrin. Rev.* **13**: 596-611 (1992).

Voets, T., Droogmans, G., Raskin, G., Eggermont, J. and Nilius, B. Reduced intracellular ionic strength as initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 5298-5303 (1999).

Yap, A.S., Armstrong, J.W., Crago, E.J. Jr., Bourke, J.R., Huxham, G.J. og Manley, S.W. Regulation of thyroid follicular volume by bidirectional transepithelial ion transport.

*Mol. Cell. Endocrinol.* **82**: R1-R5 (1991).

Ørtenblad, N., Young, J.F., Oksbjerg, N., Holm Nilsen, J. and Lambert, I.H. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells.

*Am. J. Physiol.* **284**: C1362-C1373 (2003).