

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Urša KRESAL

**METABOLIZEM IN TRANSPORT MAŠČOBNIH
KISLIN PRI DELOVANJU SEKRETORNIH
FOSFOLIPAZ A₂ V CELICAH RAKA DOJKE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Urša KRESAL

**METABOLIZEM IN TRANSPORT MAŠČOBNIH KISLIN PRI DELOVANJU
SEKRETORNIH FOSFOLIPAZ A₂ V CELICAH RAKA DOJKE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**METABOLISM AND TRANSPORT OF FATTY ACIDS IN THE ACTION OF
SECRETED PHOSPHOLIPASES A₂ IN BREAST CANCER CELLS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija II. bolonjske stopnje Strukturna in funkcionalna biologija na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Institutu »Jožef Stefan«, na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti.

Senat Oddelka za biologijo je na predlog Komisije za študij 1. in 2. stopnje dne 14. 2. 2014 odobril temo magistrske naloge in za mentorja imenoval prof. dr. Jože Pungerčarja, za somentorja doc. dr. Tonija Petana ter za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marko KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Jože PUNGERČAR
Institut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo in molekularno biologijo

Član: doc. dr. Toni PETAN
Institut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo in molekularno biologijo

Član: prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, izključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Urša Kresal

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
DK UDK 577:576(043.2)=163.6
KG sekretorna fosfolipaza A₂/rak dojke/metabolizem lipidov/maščobne kisline/celice MDA-MB-231/kvantitativni PCR
AV KRESAL, Urša, diplomirani biolog (UN)
SA PUNGERČAR, Jože (mentor)/PETAN, Toni (somentor)/MAČEK, Peter (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, II. stopnja – magistrski študijski program Strukturna in funkcionalna biologija
LI 2016
IN METABOLIZEM IN TRANSPORT MAŠČOBNIH KISLIN PRI DELOVANJU SEKRETORNIH FOSFOLIPAZ A₂ V CELICAH RAKA DOJKE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP IX, 59 str., 12 pregl., 29 sl., 53 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Človeška sPLA₂ iz skupine X (hGX) deluje na membrane mirujočih in proliferajočih celic, pri čemer se sproščajo maščobne kisline (MK). Te se vežejo v trigliceride (TAG), shranjene v lipidnih kapljicah (LK) v citosolu celic. Ti učinki hGX so v visoko invazivnih celicah raka dojke MDA-MB-231 povezani s pospešeno proliferacijo celic in s preprečevanjem celične smrti pri gojenju celic brez seruma. Prav tako ima oleinska kislina (OK), eden glavnih produktov delovanja sPLA₂, podobne učinke na proliferacijo in preživetje celic. V tem delu smo s pomočjo metode qPCR analizirali vpliv hGX in OK na izražanje genov, povezanih s prenosom MK v celicah MDA-MB-231, in sicer pri optimalnih pogojih gojenja, ko intenzivno poteka sinteza LK, in pri naknadnem stradanju celic, ko prevladuje lipoliza oz. razgradnja sintetiziranih LK. Ob tem smo vzpostavili metodo qPCR za detekcijo izražanja genov družine *FABP*, ki kodirajo različne prenašalce prostih MK v celici, gena *ABCD1*, pomembnega za transport dolgoverižnih MK v peroksisome, in gena *LDLR*, ključnega za internalizacijo lipoproteinskih delcev nizke gostote (LDL). Rezultati kažejo, da delovanje hGX na proliferajoče celice, ko encim inducira tvorbo novih LK, vpliva na izražanje genov *ABCD1*, *FABP2* in *FABP5*. Analiza izražanja genov v času stradanja celic pa je pokazala spremembe v izražanju genov *ABCD1*, *FABP2* in *FABP3*. Glede na ugotovljeno povišano ali znižano izražanje posameznega gena sklepamo, da sta v spremembe lipidnega metabolizma oz. transport MK pri tvorbi s strani hGX-induciranih LK vpletena proteina ABCD1 in FABP5, pri razgradnji omenjenih LK pa ABCD1, FABP2 in FABP3. Rezultati zahtevajo dodatno potrditev v naslednjih študijah, vsekakor pa prvič povezujejo delovanje genov iz družine *FABP* in gena *ABCD1* z učinki sPLA₂ na sesalske celice.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Du2
- DC UDC 577:576(043.2)=163.6
- CX secreted phospholipase A₂/breast cancer/lipid metabolism/fatty acid/MDA-MB-231 cell line/quantitative PCR
- AU KRESAL, Urša
- AA PUNGERČAR, Jože (supervisor)/PETAN, Toni (co-advisor)/MAČEK, Peter (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Structural and Functional Biology
- PY 2016
- TI METABOLISM AND TRANSPORT OF FATTY ACIDS IN THE ACTION OF SECRETED PHOSPHOLIPASES A₂ IN BREAST CANCER CELLS
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programme)
- NO IX, 59 p., 12 tab., 29 fig., 53 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The human group X secreted phospholipase A₂ (hGX sPLA₂) releases fatty acids (FA) from cell membranes and induces their conversion to triglycerides stored in cytosolic lipid droplets (LD). This effect is most prominent in the highly invasive MDA-MB-231 breast cancer cells, in which hGX-induced changes stimulate proliferation and reduce cell death during starvation. Oleic acid (OA), one of the main products of sPLA₂ activity, has similar effects on cell proliferation and survival. Here, we used quantitative real-time PCR (qPCR) to analyse the effects of hGX and OA on the expression of genes involved in FA transport in MDA-MB-231 cells, both during cell growth under optimal conditions, when intensive LD synthesis occurs, and during subsequent starvation of cells. We first established a validated qPCR method for quantification of the expression of *FABP* genes, which encode different transporters of free FAs in the cell, of the *ABCD1* gene, important for transport of long-chain FAs to peroxisomes, and of the *LDLR* gene, crucial for the internalisation of low-density lipoprotein particles (LDL). The results show that the action of hGX on proliferating cells leads to changes in the expression of the *ABCD1*, *FABP2* and *FABP5* genes. The gene expression analyses during cell starvation show significant alterations in the expression of the *FABP2* and *FABP3* genes. Therefore, our results suggest that the *ABCD1* and *FABP5* proteins are involved in changes of lipid metabolism and transport of FAs during hGX-induced LD formation, whereas *ABCD1*, *FABP2* and *FABP3* proteins are involved in the degradation/lipolysis of hGX-induced LDs. Our results should be confirmed in further studies, but they suggest, for the first time, an association between the activities of the *ABCD1* gene and the *FABP* gene family with the effects of sPLA₂ on mammalian cells.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VIII
1.	UVOD.....	1
1.1.	NAMEN	1
1.2.	HIPOTEZA	1
1.3.	SEKRETORNE FOSFOLIPAZE A ₂ (sPLA ₂)	2
1.3.1.	Delovanje sPLA₂.....	2
1.3.2.	Vloga sPLA₂ in spremembe v lipidnem metabolizmu rakavih celic.....	3
1.4.	LIPIDNI METABOLIZEM RAKAVIH CELIC	4
1.5.	LIPIDNE KAPLJICE – ORGANELI ZA SHRANJEVANJE LIPIDOV	4
1.6.	LIPOLIZA.....	5
1.7.	β-OKSIDACIJA	6
1.8.	LIPOFAGIJA.....	7
1.9.	SPROŠČANJE MK IZ LIPIDNIH KAPLJIC IN NJIHOV TRANSPORT.....	8
1.10.	DRUŽINA CITOPLAZEMSKIH FABP PROTEINOV (FABPc)	9
1.10.1.	Afiniteta do ligandov in struktura FABP.....	10
1.10.2.	Funkcije FABP	10
1.11.	ABCD1	12
1.12.	<i>LDLR</i> («low-density lipoprotein receptor gene family»)	13
2.	MATERIALI.....	14
3.	METODE	15
3.1.	GOJENJE CELIČNIH KULTUR.....	15
3.2.	PRECEPLJANJE CELIC.....	15
3.3.	ŠTETJE CELIC Z NEUBAUERJEVO KOMORO	15
3.4.	DETEKCIJA LK NA PRETOČNEM CITOMETRU.....	15
3.5.	IZOLACIJA RNA.....	16
3.6.	MERJENJE KONCENTRACIJE RNA	16
3.7.	OBRATNO PREPISOVANJE (RT) RNA V cDNA	16

3.8.	KVANTITATIVNI PCR V REALNEM ČASU (qPCR).....	17
3.8.1.	Načrtovanje ustreznih začetnih oligonukleotidov	17
3.8.2.	Uporabljeni oligonukleotidi.....	18
3.8.3.	Določanje učinkovitosti pomnoževanja	19
3.8.4.	Analiza reakcij qPCR	19
4.	REZULTATI.....	21
4.1.	PREVERJANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI VZORCA REKOMBINANTNEGA ENCIMA hGX sPLA ₂	21
4.2.	VALIDACIJA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV.....	21
4.3.	VPLIV hGX IN OK NA IZRAŽANJE GENOV POVEZANIH S TRANSPORTOM MK V CELICAH RAKA DOJKE	36
5.	RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI.....	39
5.1.	DETEKCIJA LIPIDNIH KAPLJIC S PRETOČNO CITOMETRIJO PRI CELIČNI LINIJI MDA-MB-231.....	39
5.2.	IZRAŽANJE GENOV V CELICAH MDA-MB-231	39
6.	SKLEPI.....	43
7.	POVZETEK	44
8.	VIRI	45

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v analizi qPCR.....	18
Pregl. 2: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena ABCD1 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	22
Pregl. 3: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena LDLR v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	24
Pregl. 4: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena FABP1 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	26
Pregl. 5: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena FABP2 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	27
Pregl. 6: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena FABP3 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	29
Pregl. 7: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena FABP5 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	30
Pregl. 8: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena FABP6 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	32
Pregl. 9: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena TOP1 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	33
Pregl. 10: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena SF3A1 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.....	35
Pregl. 11: Učinkovitost reakcij PCR za vsak gen.....	36

KAZALO SLIK

Sl. 1: Morfologija lipidne kapljice.....	5
Sl. 2: Lipoliza in lipidna signalizacija	6
Sl. 3: β -oksidacija MK.....	7
Sl. 4: Proteini FABP ohranjajo lipidno homeostazo in so vključeni v različne procese	11
Sl. 5: Razmere v hipoksiji.	12
Sl. 6: Interakcija celice raka jajčnika z maščobno celico.	12
Sl. 7: Vsebnost lipidnih kapljic v celicah MDA-MB-231	21
Sl. 8: Talilne krivulje za tarčni gen <i>ABCD1</i>	22
Sl. 9: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>ABCD1</i>	23
Sl. 10: Talilne krivulje za tarčni gen <i>LDLR</i>	24
Sl. 11: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>LDLR</i>	25
Sl. 12: Talilne krivulje za tarčni gen <i>FABP1</i>	25
Sl. 13: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>FABP1</i>	26
Sl. 14: Talilne krivulje za tarčni gen <i>FABP2</i>	27
Sl. 15: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>FABP2</i>	28
Sl. 16: Talilne krivulje za tarčni gen <i>FABP3</i>	28
Sl. 17: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>FABP3</i>	29
Sl. 18: Talilne krivulje za tarčni gen <i>FABP5</i>	30
Sl. 19: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>FABP5</i>	31
Sl. 20: Talilne krivulje za tarčni gen <i>FABP6</i>	31
Sl. 21: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>FABP6</i>	32
Sl. 22: Talilne krivulje za referenčni gen <i>TOP1</i>	33
Sl. 23: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>TOP1</i>	34
Sl. 24: Talilne krivulje za referenčni gen <i>SF3A1</i>	34
Sl. 25: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen <i>SF3A1</i>	35
Sl. 26: Vpliv hGX in OK na izražanje izbranih genov v proliferajočih celicah raka dojke. ...	37
Sl. 27: Vpliv s strani hGX in OK sintetiziranih LK na izražanje izbranih genov v celicah raka dojke pri stradanju.	38

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACC	acetil-CoA-karboksilaza
ACS	acil-CoA-sintetaza
AK	arahidonska kislina
AMPK	z AMP aktivirana protein-kinaza
ATP	adenozintrifosfat
ATGL	triacilglicerol-lipaza
cDNA	komplementarna DNA
CPT1	karnitin-palmitoil-transferaza I
DAG	diacilglicerol
FASN	sintaza maščobnih kislin
hGX	človeška sekretorna fosfolipaza A ₂ iz skupine X
HSL	lipaza, občutljiva na hormone
KAT	karnitin-translokaza
LPA	lizofosfatidna kislina
LPC	lizofosfatidilholin
LK	lipidne kapljice
MAG	monoacilglicerol
MAGL	MAG-lipaza
MK	maščobne kisline
mRNA	informacijska RNA
OK	oleinska kislina
PPAR	receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov
PUFA	polinenasičene maščobne kisline
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SCD-1	stearoil-CoA-desaturaza 1
sPLA ₂	sekretorna fosfolipaza A ₂
TAG	trigliceridi, triacilgliceroli
TCA	cikel trikarboksilne kisline
VLCAD	acil-CoA-dehidrogenaze zelo dolgoverižnih maščobnih kislin
VLCFA	zelo dolge maščobne kisline (angl. »very long-chain fatty acids«)

1. UVOD

Število rakavih obolenj v današnjem času vse bolj narašča. Zato vsak prispevek in majhno odkritje lahko predstavlja velik napredek pri odkrivanju sledi, ki bi lahko pomagale pri zgodnjem odkrivanju in diagnosticiranju rakavih sprememb ter preprečevanju tumorigeneze. Pomemben del procesa tumorigeneze predstavljajo spremembe v metabolizmu maščobnih kislin in njihovega transporta, vendar so ti procesi zaenkrat še slabo raziskani. Važno vlogo pri tumorigenezi imajo tudi encimi sekretorne fosfolipaze (sPLA₂), ki iz fosfolipidov v celičnih membranah sproščajo maščobne kisline (MK) in lizofosfolipide. Ugotovili so že, da človeška sPLA₂ iz skupine X (hGX) deluje na membrane mirujočih in proliferajočih celic, pri čemer se sproščajo MK, ki se kopičijo v obliki nevtralnih lipidov, shranjenih v lipidnih kapljicah (LK) v citosolu celic. V visoko invazivnih celicah raka dojke, celične linije MDA-MB-231, encim hGX poveča hitrost proliferacije in v času stradanja celic prepreči celično smrt. Podobne učinke na proliferacijo in preživetje celic ima tudi oleinska kislina (OK), eden glavnih produktov encimskega delovanja sPLA₂. Omenjene spremembe vključujejo kopičenje triagliceridov (TAG), pospešeno oksidacijo MK in spremembe v celični signalizaciji. Molekularni mehanizmi, ki omogočajo transport MK v celici in vodijo do tvorbe s sPLA₂-induciranih LK, oz. sodelujejo pri sproščanju MK iz LK v času njihove razgradnje, niso znani. Pri tem se odpira vprašanje, ali imata hGX in OK vpliv na izražanje genov, ki so udeleženi v transportu MK v celicah raka dojke MDA-MB-231. Odgovor na to vprašanje bi nam lahko pomagal pri razumevanju delovanja lipidnega metabolizma oz. transporta MK pri tvorbi s strani hGX-induciranih LK pri celicah raka dojke.

1.1. NAMEN

V tem delu smo želeli s pomočjo metode qPCR analizirati vpliv hGX in OK na izražanje genov, povezanih s transportom MK v celicah raka dojke MDA-MB-231, in sicer pri optimalnih pogojih rasti, ko intenzivno poteka sinteza LK, in ob naknadnem stradanju celic, ko prevladuje lipoliza oz. razgradnja sintetiziranih LK. Ob tem smo želeli vzpostaviti in validirati metodo qPCR za detekcijo izražanja genov družine *FABP*, ki kodirajo različne prenašalce prostih MK v celici, gena *ABCD1*, pomembnega za transport dolgoverižnih MK v peroksisome, in gena *LDLR*, ključnega za internalizacijo lipoproteinskih delcev nizke gostote (LDL).

1.2. HIPOTEZA

Glede na predhodne študije, ki razkrivajo vpliv hGX na preživetje celic MDA-MB-231 v povezavi s kopičenjem lipidov in β -oksidacijo, sklepamo, da hGX vpliva na izražanje genov, povezanih s transportom lipidov. Naša hipoteza je, da pri delovanju hGX na celice raka dojke sodelujejo vsaj nekateri izmed izbranih proteinov, ki so znani po svoji vlogi v prenosu MK in presnovi lipidov: proteini iz družine *FABP*, proteina *ABCD1* in *LDLR*.

Hipotezo smo preverili s kvantitativno analizo izražanja genov, ki kodirajo omenjene proteine, v celicah raka dojke, ki smo jih izpostavili delovanju hGX oz. OK.

PREGLED OBJAV

1.3. SEKRETORNE FOSFOLIPAZE A₂ (sPLA₂)

Fosfolipaze A₂ so encimi, ki katalizirajo hidrolizo estrskih vezi na mestu *sn-2* v molekulah glicerofosfolipidov. Encimi PLA₂ imajo zaradi produktov svoje aktivnosti pomembno vlogo v številnih fizioloških in patofizioloških procesih. Družino PLA₂ sestavlja šest tipov PLA₂ (Murakami in sod., 2011a): sekretorne PLA₂ (sPLA₂), citosolne PLA₂ (cPLA₂), od kalcija-neodvisne PLA₂ (»calcium-independent PLA₂«, iPLA₂), acetil-hidrolaze aktivacijskega dejavnika za trombocite (»platelet activating factor acetylhydrolase«, PAF-AH), lizosomske PLA₂ (»lysosomal PLA₂«, LPLA₂) in adipozne PLA₂ (»adipose-specific PLA₂«, AdPLA₂). Sekretorne fosfolipaze A₂ so lipolitični encimi, ki sproščajo MK in lizofosfolipide iz fosfolipidov in lipoproteinov na celičnih membranah (Lambeau in Gelb, 2008). Pri človeku obstaja 11 različnih genov sPLA₂, ki so prisotni v različnih tkivih in celicah ter se med seboj razlikujejo po sestavi, kar se odraža pri izločanju, ter encimski aktivnosti in sposobnosti vezave na različne receptorje (Murakami in sod., 2014). Prav tako kažejo različne specifičnosti za vezavo na membranske površine različnih sestav in hidrolizo različnih tipov fosfolipidov. To nakazuje na različne biološke vloge za vsako sPLA₂ (Singer in sod., 2002).

1.3.1. Delovanje sPLA₂

Učinki sPLA₂ so med drugim povezani s sproščanjem arahidonske kisline (AK) in sintezo njenih metabolitov, avtokrinih in parakrinih lipidnih mediatorjev eikozanoidov, ki z vezavo na specifične receptorje sprožijo signalizacijo v tarčni celici. Prav tako sPLA₂ s svojim delovanjem sprošča druge bioaktivne lipide, kot so mono- in polinenasičene MK (PUFA), vključno z omega-3 PUFA in lizofosfolipidi, kot sta lizofosfatidilholin (LPC) in lizofosfatidna kislina (LPA) (Murakami in sod., 2010). Večina od teh lipidov ima različne vloge pri signalizaciji; obnašajo se lahko kot prekursorji biosinteze ali pa imajo drugačno vlogo pri metabolizmu. Množica vseh teh fosfolipidnih substratov, primarnih in sekundarnih produktov, ki so posledica delovanja sPLA₂, in različni učinki na celico nakazujejo vpletenost sPLA₂ v različne fiziološke procese in bolezni, kot so metabolizem lipidov, akutna in kronična vnetna obolenja, kardiovaskularne bolezni, ter pomembno vlogo pri razmnoževanju ter obrambi pred infekcijami in rakom (Murakami in sod., 2011b).

Delovanje hGX vodi k nastanku lipidnih kapljic v visoko invazivnih celicah raka dojke, poveča hitrost njihove proliferacije *in vitro* in prepreči celično smrt pri rasti celic brez seruma (Pucer in sod., 2013). Encim hGX deluje na membrane zdravih, pritrjenih celic in na membrane celic v pozni apoptozi, pri čemer se sproščajo MK, ki se zaestrijo in kopičijo v obliki nevtralnih lipidov v citosolnih lipidnih kapljicah. Eksogena hGX sPLA₂ ima na

rast in preživetje celic raka dojke stimulativen učinek ali pa ga sploh nima. Iz tega izhaja, da je ekspresija in vloga določene sPLA₂ pri določenem tipu raka pogojena z genetskim ozadjem in fenotipom različnih tumorjev ter podvrst, ki odsevajo heterogenost bolezni. Mehanizmi, odgovorni za različno izražanje sPLA₂ pri različnih tipih raka, še vedno niso znani. Le nekaj študij so namenili dejavnikom, ki sprožijo spremembe v izražanju sPLA₂ pri tumorjih. V nekaterih primerih naj bi vlogo pri tumorigenezi imelo utišanje ekspresije sPLA₂ z epigenetskimi mehanizmi (Brglez in sod., 2014b).

1.3.2. Vloga sPLA₂ in spremembe v lipidnem metabolizmu rakavih celic

Poleg Warburgovega efekta, pri katerem glikoliza pri rakavih celicah v normoksiji poteka hitreje, in reprogramiranja metabolizma glutamina pri raku, je nepravilno uravnan mehanizem lipidov ena od pglavitnih sprememb metabolizma, ki omogoča preživetje rakavih celic, hitro rast in razmnoževanje (Santos in Schulze, 2012). K hitrejši proliferaciji rakavih celic pripomorejo spremembe v sintezi MK, lipolizi, hidrolizi membranskih fosfolipidov in spremembe v poteh ponovne acilacije (Brglez in sod., 2014a). Ena najbolj pogostih MK v fosfolipidih celičnih membran je OK in je hkrati tudi eden glavnih produktov encimskega delovanja hGX na celične membrane. OK in nekatere druge nenasičene MK omogočajo nastanek triagliceridov (TAG) v celicah MDA-MB-231 in pospešijo njihovo rast. hGX preko hidrolize fosfolipidnih substratov sproži nastanek LK v visoko invazivnih celicah raka dojke, kar omogoča preživetje celic in poveča stopnjo proliferacije v času gojenja brez seruma (Pucer in sod., 2013). Apoptozo celic prepreči tako, da modulira lipidni metabolizem. Spremenjen lipidni metabolizem, vključno z lipogenezo, β-oksidacijo in preoblikovanjem fosfolipidov, prispeva k preživetju, rasti in proliferaciji celic. Dosedanje študije poročajo o učinku sPLA₂ na sintezo steroidnih hormonov v nadledvični žlezi (Shridas in sod., 2010), adipogenezo (Li in sod., 2010), presnovo lipidov v črevesju, debelost (Sato in sod., 2011; Sato in sod., 2014) in povečano akumulacijo lipidov v makrofagih (Murakami in sod., 2011). Povezava med sPLA₂, lipidnim metabolizmom in rakom je še dokaj neraziskana.

hGX skozi kaskado mehanizmov, ki vključujejo večje spremembe v lipidnem energetskem metabolizmu, omogoča preživetje visoko metastazirajočih, z Ras-onkogenom vodenih invazivnih celic raka dojke MDA-MB-231 (Pucer in sod., 2013). sPLA₂ s hidrolizo membran sprostijo MK, ki se v obliki TAG shranjujejo v lipidnih kapljicah v citosolu, kar omogoča dolgotrajno zalogo hranil in preživetje v času stradanja. Aktivnost hGX povzroči spremembe v sintezi MK v celici, oksidaciji in shrambi, vključno s povečano ekspresijo encimov, ki sodelujejo pri oksidaciji MK, karnitin-palmitoil-transferaze 1A (CPT1A) in acil-CoA-dehidrogenaze zelo dolgih MK (VLCAD), in proteina perilipin 2, ki obdaja LK. Nastanek LK v celicah raka dojke je povezan z aktivacijo z AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK), osrednjim regulatorjem metabolizma, ki ob pomanjkanju energije omogoči preživetje celic raka *in vivo*, in sicer z inhibicijo sinteze MK, obenem pa pospešuje proces oksidacije MK (Jeon in sod., 2012).

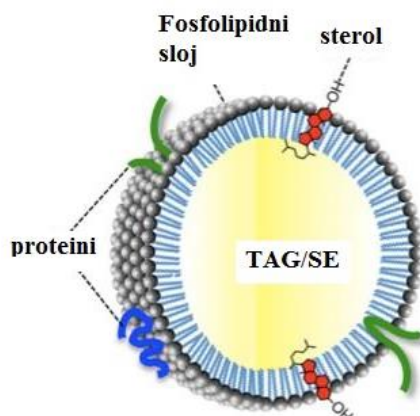
1.4. LIPIDNI METABOLIZEM RAKAVIH CELIC

Membrane celic so zgrajene iz glicerofosfolipidov, sfingolipidov in holesterola. Lipidi igrajo pomembno vlogo pri metabolizmu in zagotavljanju energije. Pri metabolizmu lipidov dobi celica veliko več energije kot pri razgradnji sladkorjev. Za celovitost večine diferenciranih celic je ključna učinkovitost nastajanja ATP z oksidativno fosforilacijo. Posledično te celice v procesu glikolize pretvarjajo glukozo do piruvata, nato pa v mitohondriju piruvat oksidirajo do ogljikovega dioksida v ciklu citronske kisline (ciklu trikarboksilnih kislin, TCA), kjer je kisik glavni prejemnik v verigi za transport elektronov, ki ustvarja elektrokemični gradient in omogoči tvorbo ATP (Ward in sod., 2012). Metabolizem glukoze v visoko invazivnih rakavih celicah pa poteka veliko hitreje kot pri zdravih celicah. Glukoza se namesto preko oksidativne fosforilacije metabolizira v procesu aerobne glikolize in kljub dobri razpoložljivosti kisika proizvede manj ATP, a več laktata (Vander Heiden in sod., 2009, cit. po Bensaad in sod., 2014). Pojav hitrejše glikolize v rakavih celicah pri normoksiji se imenuje Warburgov efekt (Koppenol in sod., 2011, cit. po Bensaad in sod., 2014).

Večja dostopnost MK je potrebna za sintezo membran in signalnih molekul, ki so nujne za hitro rast in delitev rakavih celic, zmanjševanje zaloga MK pa prepreči razmnoževanje celic pri tumorjih (Currie in sod., 2013). Ti mehanizmi, ki temeljijo na transformaciji fosfolipidov in metabolizmu lipidov, predstavljajo potencialno tarčo za preprečevanje rakavih obolenj. Identifikacija dejavnikov, ki vplivajo na modulacijo lipidnega metabolizma, je ključna za razumevanje bolezni. Te spremembe lahko vplivajo na razpoložljivost osnovnih gradnikov za sintezo celičnih membran, ki so ključnega pomena za hitro rast in podvajanje celic, lahko pa vplivajo na sintezo in razgradnjo lipidov, ki so vključeni v energijsko homeostazo celic ali v različne signalne poti. Na ta način pride do sprememb v številnih celičnih procesih, vključno s celično rastjo, proliferacijo, diferenciacijo in gibanjem.

1.5. LIPIDNE KAPLJICE – ORGANELI ZA SHRANJEVANJE LIPIDOV

Preživetje organizma je odvisno od sposobnosti prilagajanja na spremembe v razpoložljivosti hranil. Zelo uspešna strategija, ki jo uporabljajo vsi organizmi, je shranjevanje energije v obliki nevtralnih estrov lipidov v celičnih organelih, lipidnih kapljicah (»lipid droplets«; LK). Lipidne kapljice so znotrajcelični citoplazemski organeli v različnih vrstah celic evkariontov. Vključeni so v procese shranjevanja proteinov in lipidov, zaloge energije ter sinteze specifičnih lipidov in membran (Walther in Farese, 2012).



Slika 1: Morfologija lipidne kapljice. Sestavljena je iz sredice, v kateri se nahajajo sterolni estri (SE) in TAG, in ki jo obdaja fosfolipidni sloj, v katerem so vključeni proteini (Ohsaki, 2014: 87).

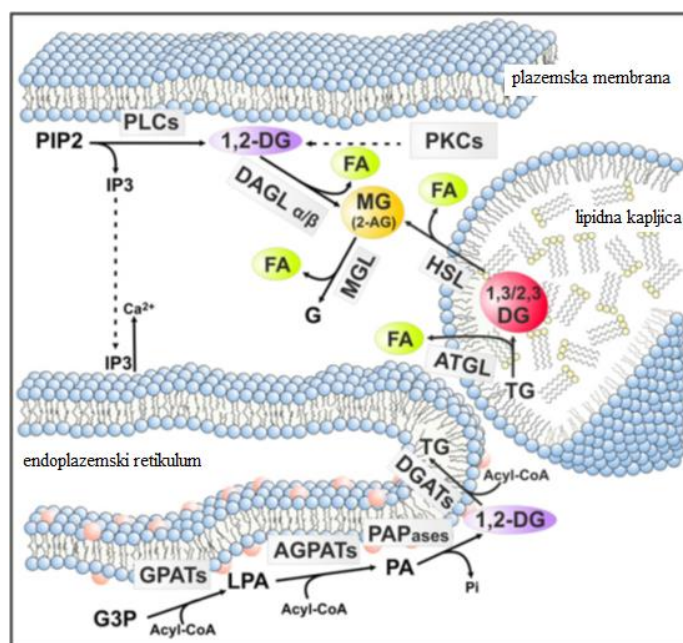
Maščobe iz lipidnih kapljic se mobilizirajo kot vir energije v celici takrat, ko je dostop do zunanjih virov hranil omejen (Finn in Dice, 2006). Ko je celica prikrajšana za hranila, poteče metabolizem MK v mitohondriju. Kako MK, shranjene kot TAG v lipidnih kapljicah, pridejo do mitohondrijev, so pokazali Rambold in sodelavci (2015). Mobilizacija MK je odvisna od lipolize TAG in avtofagije. V času stradanja se MK sprostijo iz lipidnih kapljic z lipolizo in združijo z mitohondrijem, kjer poteče oksidativna respiracija, zato se morajo lipidne kapljice nahajati v bližini mitohondrijev (Wrighton, 2015).

Celice lahko pridobijo MK iz zunajceličnega medija, z razgradnjo TAG iz lipidnih kapljic, ali s sintezo *de novo*. TAG v lipidnih kapljicah razpadejo na proste MK preko dveh različnih procesov; preko kaskade lipaz oz. lipoliz ali preko lipofagije (avtofagije lipidnih kapljic) (Singh in sod., 2009; Zechner in sod., 2012, cit. po Rambold in sod., 2015). Ko so celice izpostavljene akutnem pomanjkanju seruma, glukoze in aminokislin, potečeta tako lipoliza kot avtofagija.

Natančen mehanizem nastanka lipidnih kapljic še ni poznan, predvideva pa se, da naj bi nastale iz ER, v katerem se nahajajo številni encimi za sintezo lipidov (Walther in Farese, 2012).

1.6. LIPOLIZA

MK vplivajo na metabolizem in posredno na signalizacijo, saj se katabolizirane preko mitohondrijske oksidacije MK ali zaestrene v obliki TAG lahko vključijo v membrane fosfolipidov. Shranijo se v obliki lipidnih kapljic v citosolu številnih celic, tudi rakavih (Greenberg in sod., 2011). V nastanek raka so vpleteni številni encimi iz lipogeneze, kot so sintaza MK (FASN), acetil-CoA karboksilaza (ACC) in stearoil-CoA-desaturaza 1 (SCD-1) (Currie in sod., 2013), in iz lipolize, kot npr. monoacilglicerol lipaza (MAGL) (Nomura in sod., 2010, cit. po Zechner in sod., 2012).

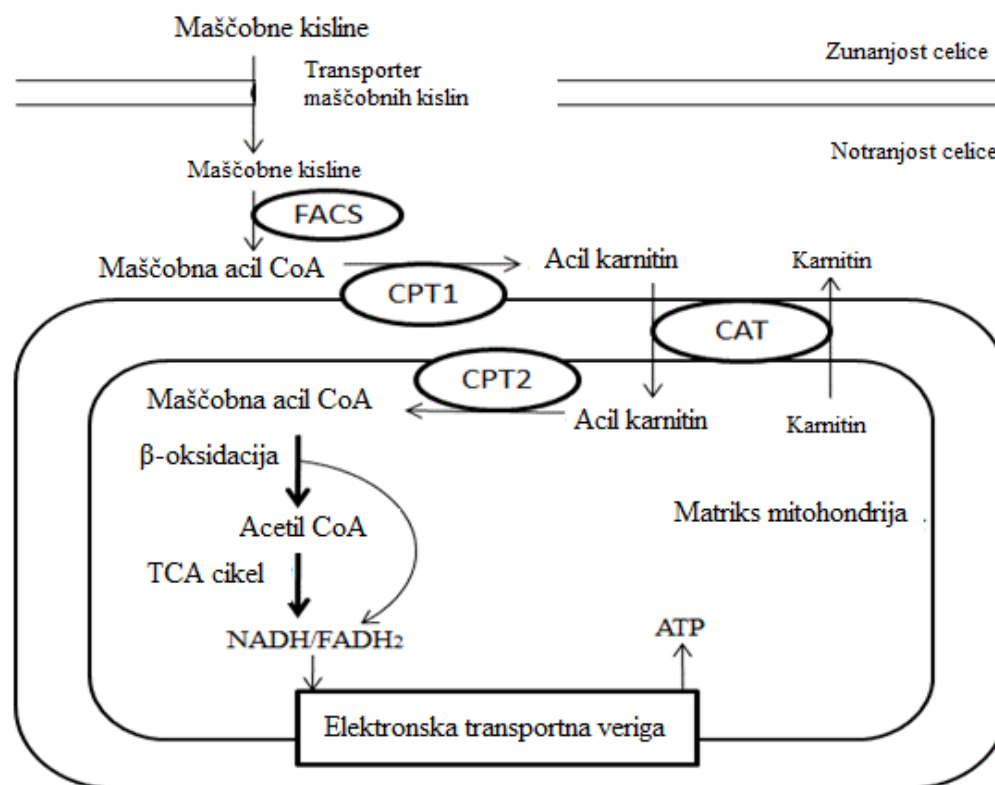


Slika 2: Lipoliza in lipidna signalizacija (Zechner in sod., 2012: 285).

V procesu lipolize pride do razgradnje TAG do MK in glicerola v treh zaporednih procesih, ki vključujejo tri različne encime: triaglicerol-lipaza (ATGL) katalizira osnoven korak lipolize, in sicer pretvori TAG do diacilglicerol (DAG); hormonsko občutljive lipaze (HSL) so večinoma odgovorne za hidrolizo DAG do monoacilglicerolov (MAG); MAG-lipaza (MAGL) pa hidrolizira MAG (Schweiger in sod., 2006, cit. po Zechner in sod., 2012).

1.7. β -OKSIDACIJA

Mitohondrijska oksidacija MK je proces, pri katerem se MK razgradijo do acetil-CoA za potrebe zagotavljanja energije v celici. Pri rakavih celicah je pomemben, ker lahko prepreči celično smrt, saj v času metaboličnega stresa pomaga pri vzdrževanju koncentracije NADPH in zavira kopičenje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) v celici (Pike in sod., 2011; Jeon in sod., 2012).



Slika 3: β -oksidacija MK

<http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=39187> (12. feb. 2016)

MK vstopajo v celico s pomočjo proteinskih prenašalcev, ki se nahajajo na površini celice. Ti prenašalci vključujejo translokaze MK (FAT/CD36), tkivno specifične MK-transportne proteine (FATP) in proteine, ki vežejo MK na plazmalemi (FABPpm) (Lopaschuk in sod., 2010). V celici nato encim acil-CoA-sintetaza (ACS) doda CoA na MK, encim karnitin-palmitoil-transferaza 1 («carnitine palmitoyltransferase 1»; CPT1) pa pretvori acil-CoA v acil-karnitin. Karnitin-translokaza (KAT) omogoči vstop MK skozi notranjo membrano mitohondrija. CPT2 pretvori dolge verige acil-karnitina nazaj v acil-CoA. Te dolge verige potem vstopijo v proces β -oksidacije, kjer nastane v vsakem ciklu po ena molekula acetil-CoA. Acetil-CoA vstopi v TCA. Kofaktorja NADH in FADH₂, ki nastaneta pri β -oksidaciji in ciklu TCA, se vključita v verigo za prenos elektronov, ki vodi k nastanku ATP (Schulz, 2002).

1.8. LIPOFAGIJA

Autofagija lipidnih kapljic oz. lipofagija je pomembna predvsem med akutnim stradanjem celic, saj z oskrbo MK poskrbi za ohranitev respiracije v mitohondriju in uravnavanje ravni TAG v lipidnih kapljicah. Do zmanjšanja oksidativnega metabolizma v mitohondriju in povečanja števila lipidnih kapljic v tem času pride zaradi inhibicije lipaze (z utišanjem ATGL), ki blokira tok MK v mitohondrij. V dosedanjih študijah so potrdili, da pomanjkanje seruma v prisotnosti aminokislin in glukoze vodi v povečanje lipofagije

(Ouimet in sod., 2011; Schulze in sod., 2013; Singh in sod., 2009a, cit. po Rambold in sod., 2015). Lipofagija je, kot ostali tipi avtofagosomalne razgradnje, odvisna od proteinov, ki sodelujejo pri avtofagiji. Še vedno pa ostaja neznan, kako pomanjkanje hranil določa specifičnost avtofagosomije. Možno je, da so signalne poti, ki sodelujejo pri avtofagiji, različno občutljive na stres v odvisnosti od različnih nutrientov, kar bi lahko vplivalo na izbiro tarčnega substrata. Poleg tega lahko specializirani tipi celic različno izkoriščajo lipolizo ali lipofagijo kot odziv na stradanje. Sproščanje MK iz lipidnih kapljic z avtofagijo bi lahko imelo pomembno vlogo pri tipih celic, kjer je aktivnost lipaze nizka, npr. pri hepatocitih (Singh in sod., 2009; Walther in Farese, 2012, cit. po Rambold in sod., 2015).

1.9. SPROŠČANJE MK IZ LIPIDNIH KAPLJIC IN NJIHOV TRANSPORT

Stradane sesalske celice za transport MK v mitohondrij raje uporabljajo lipolizo kot lipofagijo, kar dokazuje več dejstev. Eno od teh dejstev se navezuje na izogibanje višku MK in toksičnosti. Toksičnost MK se pojavi ob močno povečani količini le-teh v citoplazmi, kar vodi v prepustnost membran in okvaro mitohondrijev (Unger in sod., 2010, cit. po Rambold in sod., 2015). Prebava lipidnih kapljic z avtofagijo naj bi sprostila shranjene MK iz lizosomov v citoplazmo, za kar je potrebna koordinacija toka MK v mitohondrij in shranba prevelikih količin MK v lipidnih kapljicah. Tok MK v mitohondrij preko lipolize pa je odvisen od uravnavanja delovanja lipaz in proteinov, povezanih z lipidnimi kapljicami (Dalen in sod., 2007; Granneman in sod., 2011; Wolins in sod., 2006; Yamaguchi in sod., 2006, cit. po Rambold in sod., 2015).

Bližina lipidnih kapljic in mitohondrijev bi lahko služila kot mehanizem za prehajanje visokih koncentracij MK direktno iz lipidnih kapljic v mitohondrij in se tako izognila prevelikemu naraščanju koncentracije MK v citosolu. Pri tem transportu sodelujejo proteini FABP, tj. družina majhnih citoplazemskih proteinov, ki z visoko afiniteto reverzibilno vežejo MK. Ko so enkrat v mitohondriju, se lahko razširijo skozi mitohondrijski sistem in prispevajo k visoki stopnji fuzije mitohondrijev v času stradanja celic (Gomes in sod., 2011; Rambold in sod., 2011, cit. po Rambold in sod., 2015).

Transport MK je pri lipolizi lažji zaradi oblik MK, ki nastanejo pri tem. Za delovanje funkcionalno-signalnega kompleksa je potrebna citoplazemska lipaza, ki katalizira hidrolizo znotrajcelične zaloge TAG, in ne MK, katere signalizira od lipidov odvisni peroksisom proliferajoči receptor (PPAR) (Haemmerle in sod., 2011, cit. po Rambold in sod., 2015). Z lipazo-aktivirano signalizacijo PPAR vodi biogenezo mitohondrijev in oksidativno fosforilacijo, sprostitvev MK iz lipidnih kapljic ter prispeva h koordinaciji prenosa MK do mitohondrija in uravnavanja aktivnosti mitohondrija. Avtofagija celičnih membran povzroči sprostitvev MK v citoplazmo, kjer se vključijo v lipidne kapljice. Dokler je število le-teh veliko, inhibicija avtofagije ne prepreči premika MK v mitohondrij in posledične sprožitve β -oksidacije.

Pomembno vlogo pri večji učinkovitosti prenosa MK v mitohondrij pri stradanih celicah igra dinamika fuzije mitohondrijev. Ko je fuzija mitohondrijev zmanjšana, MK ne pripomorejo dovolj učinkovito k mitohondrijskemu delovanju, produkcija energije v mitohondrijih z oksidativno fosforilacijo pa je zmanjšana. V celicah, kjer so mitohondriji razdrobljeni, se v nekatere mitohondrijske elemente MK prekomerno kopičijo, v nekatere pa je vnos zmanjšan, glede na to, da so le nekateri od njih tesno povezani z lipidnimi kapljicami. Spremembe v ultrastrukturi mitohondrijev vplivajo na presežek lipidov v celicah ter na bolezni, povezane z lipidi (Galloway in Yoon, 2012, 2013; Yoon in sod., 2011, cit. po Rambold in sod., 2015).

Funkcionalna povezava fuzije mitohondrijev s transportom MK v celici in med celicami pojasnjuje, da spremembe v strukturi celovitosti mitohondrijev prispevajo k spremembam v lipidni homeostazi celice. Ker igrajo MK in njihovi derivati pomembno vlogo pri uravnavanju signalnih kaskad v celicah in prispevajo k uravnavanju metabolizma, vnetnem odzivu, programiranju celične smrti (Calder, 2013; Wahli in Michalik, 2012; Zechner in sod., 2012, cit. po Rambold in sod., 2015), predstavljajo spremembe v njihovem metabolizmu velika zdravstvena tveganja (Currie in sod., 2013; Kraemer in sod., 2013, cit. po Rambold in sod., 2015). Razumevanje sistema toka MK (vključno z avtofagijo, lipolizo, lipidnimi kapljicami in mitohondriji) ima velik potencial za nadaljnje razumevanje patofiziologije bolezni, povezanih z lipidi, kot so debelost, sladkorna bolezen, rak in vnetne motnje.

Fizična bližina med lipidnimi kapljicami in mitohondriji je pomembna za transport prostih MK, saj lipidne kapljice služijo kot kanal za transport. Povezava med ER in mitohondrijem je potrebna za avtofagosomsko preoblikovanje v zgodnji fazi stradanja. Stik z LK tvori tudi ER, ki tvori povezave med citoplazemsko membrano, Golgijevim aparatom, endosomi, mitohondriji in lipidnimi kapljicami (Rambold in sod., 2015).

1.10. DRUŽINA CITOPLAZEMSKIH FABP PROTEINOV (FABPc)

Poznamo devet članov družine FABP. Najbolj se izražajo v tkivih z aktivnim metabolizmom. Tradicionalna delitev uvršča predstavnike družine FABP glede na tkiva, v katerih naj bi se pretežno izražali, in sicer v jetrih (L-FABP; gen *FABP1*), črevesju (I-FABP; gen *FABP2*), srcu (H-FABP; gen *FABP3*), adipocitih (A-FABP4; gen *FABP4*), epidermisu (E-FABP; gen *FABP5*), genitalijah (IL-FABP; gen *FABP6*), možganih (B-FABP; gen *FABP7*), mielinu (M-FABP; gen *FABP8*) in testisih (T-FABP; gen *FABP9*). Ta razdelitev ni nujno pravilna, saj se posamezni proteini FABP dejansko ne izražajo tkivno ali celično-specifično, hkrati pa v posameznem tkivu najdemo več različnih FABP-jev. Uravnavanje izražanja in funkcija proteinov FABP še ni povsem pojasnjena. Izražanje v določenem celičnem tipu odraža kapaciteto lipidnega metabolizma. V hepatocitih, adipocitih in srčnih miocitih, kjer so MK pomemben substrat za biosintezo, shrambo in

presnovo lipidov, predstavljajo 1–5 % topnih proteinov v citoplazmi (Haunerland in Spener, 2004, cit. po Furuhashi, 2008). Količina le-teh se lahko ob povečanem vnosu lipidov v celico še poveča v večini tipov celic. Pri metaboličnih boleznih, kot je diabetes, se lahko poveča izražanje proteinov FABP v celicah skeletnih mišic (Zanotti, 1999, cit. po Furuhashi, 2008). Podobni učinki se pojavljajo v hepatocitih in adipocitih po kroničnem povišanju ravni lipidov zunaj celice (Veerkamp in van Moerkerk, 1993, cit. po Furuhashi, 2008). Ta opažanja nakazujejo na to, da je v celici vgrajen prilagoditveno-zaznavni sistem, ki se odzove na stanje lipidov v celici in s proteini FABP uravnava lipidno homeostazo.

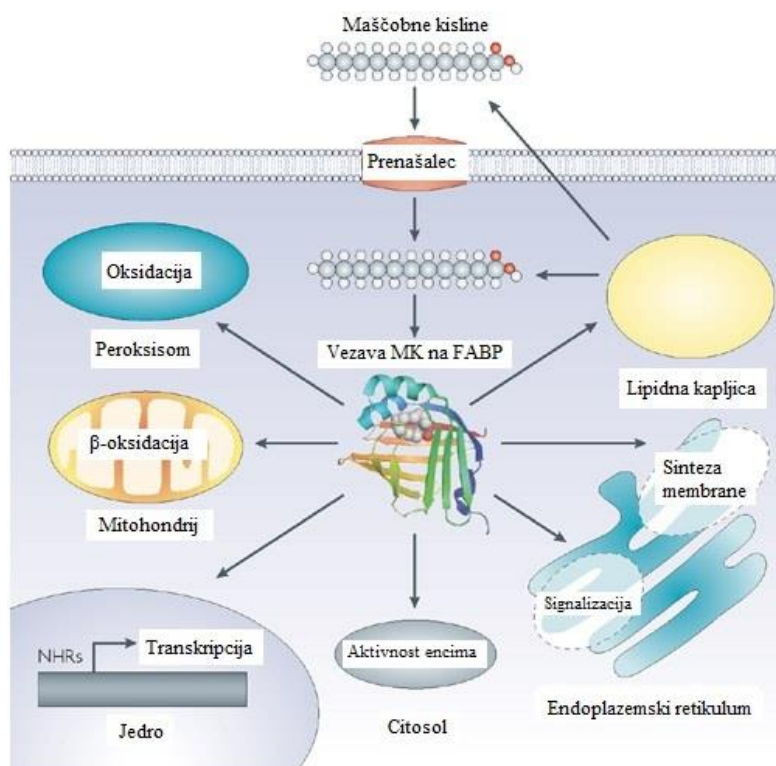
1.10.1. Afiniteta do ligandov in struktura FABP

Izooblike FABP kažejo zaradi majhnih strukturnih razlik različno selektivnost, afiniteto in mehanizem vezave ligandov (Chmurzynska, 2006, cit. po Furuhashi, 2008). Bolj hidrofoben kot je ligand, tesnejša je afiniteta vezave – z izjemo nenasičenih MK. Možno je tudi, da potrebe tarčne celice vplivajo na afiniteto in selektivnost FABP (Balendiran in sod., 2000, cit. po Furuhashi, 2008).

Vsi poznani FABP proteini imajo skoraj enako 3D-strukturo: 10 antiparalelnih β -verig, ki tvorijo dve pravokotni β -plošči, sestavljenih iz petih verig (t. i. β -sodček). Mesto vezave MK se nahaja med obema β -ploščama (Chmurzynska, 2006, cit. po Furuhashi, 2008).

1.10.2. Funkcije FABP

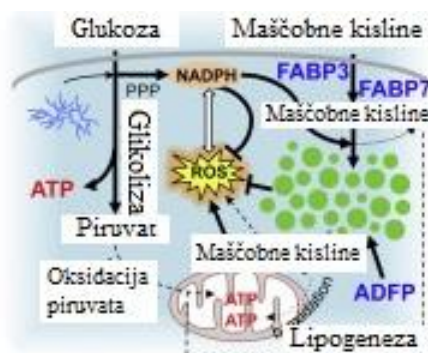
Študije dokazujejo, da imajo posamezni proteini FABP eno ali več funkcij, ki se med seboj prekrivajo. Ker vežejo lipide, olajšajo transport lipidov do specifičnih razdelkov celic, kot npr. do lipidnih kapljic za shrambo, do ER za signalizacijo in sintezo membran, do mitohondrijev ali peroksisomov za oksidacijo, do citosolnih ali drugih encimov za uravnavanje njihove aktivnosti, do jedra za uravnavanje transkripcije preko lipidov ali celo za njihov transport zunaj celice za avtokrino in parakrino signalizacijo.



Slika 4: Proteini FABP ohranjajo lipidno homeostazo in so vključeni v različne procese (povzeto po Furuhashi in Hotamisligil, 2008: 19).

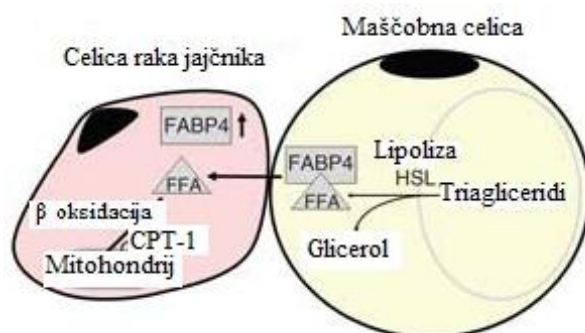
»Jetrni« protein FABP (L-FABP, FABP1) je edini član družine FABP, ki prenese MK do membran s pomočjo vodne difuzije. Na dolge verige nasičenih MK se veže z večjo afiniteto kot ostale MK (Storch in Corsico, 2008, cit. po Li in sod., 2014).

FABP3 in FABP7, člana skupine citoplazemskih FABP, prispevata k akumulaciji lipidnih kapljic v rakavih celicah, izpostavljenih hipoksiji, ko je zmanjšana absorpcija MK. Kopičenje lipidnih kapljic omogoča zaščito pred ROS, s tem pa preživetje rakavih celic. Pri hipoksiji se zmanjša sinteza MK, rakave celice pa hitreje porabljajo glukozo kot normalne (Bensaad in sod., 2014).



Slika 5: Razmere v hipoksiji. Proteina FABP3 in FABP7 sta ključna za nastanek LK v pogojih hipoksije (Bensaad in sod., 2014: 349).

Protein FABP4 je med drugim ključni mediator pri interakciji rakavih celic z adipociti. Uravnava lipolizo in omogoča prenos lipidov iz adipocitov v tumorske celice. Adipociti tako olajšajo metastaziranje celic raka na jajčniku in zagotavljajo energijo, v obliki MK, za hitrejšo rast tumorja (Nieman in sod., 2011).



Slika 6: Interakcija celice raka jajčnika z maščobno celico. FABP4 kot ključni mediator v interakciji med celicami raka jajčnikov in maščobnimi celicami poveča dostopnost lipidov in spodbudi metastaziranje (Nieman in sod., 2011: 1501).

Pri povečanem izražanju epidermalnega proteina FABP5 pride do transporta odvečnih količin MK v jedro, kjer delujejo kot signalne molekule in stimulirajo jedrni receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov gama (PPAR γ). Aktiviran transkripcijski dejavnik PPAR γ spremeni ekspresijo vrste tarčnih regulatornih genov ter pospeši rast in širjenje tumorjev, poveča njihovo agresivnost, spodbuja angiogenezo in prepreči apoptozo (Bao in sod., 2013).

1.11. ABCD1

Družina transportnih proteinov ABC (ATP-vezavni transporterji), poddružina D (ALD), ki nosi zapis za protein ADL, ki se nahaja v membrani peroksisomov in ima pomembno

vlogo v procesu β -oksidacije. Gen *ABCD1* eden od štirih peroksisomskih transporterjev MK in MK- koencima A (acil-CoA) v organel. Peroksisom je z dvoslojno membrano obdan celični organel, ki vsebuje katalazo, peroksidazo in ostale oksidativne encime ter opravlja pomembne metabolne funkcije, med drugim sodeluje pri razpadu MK in vodikovega peroksida (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABCD1>).

Wiesinger in sodelavci (2013) sklepajo, da mutacija gena *ABCD1*, ki kodira peroksisomski transporter (protein ALD), povzroči X-vezano dedno nevrodegenerativno bolezen, adenolevkodistrofijo (X-ALD). Vendar pa molekularni mehanizmi, ki povzročijo klinične znake bolezni, še vedno niso pojasnjeni.

Poleg *ABCD1* so identificirali še dva homologna peroksisomska transporterja *ABCD2* (z adenolevkodistrofijo povezan protein ALDRP (Holzinger in sod., 1997; Lombard-Platet in sod., 1996, cit. po Wiesinger in sod., 2013)) in *ABCD3* (peroksisomski membranski protein 70 kDa (PMP70)) (Kamijo in sod., 1990, cit. po Wiesinger in sod., 2013). Četrty član družine *ABCD*, *ABCD4* (PMP70R), naj bi se nahajal v drugih celičnih organelih (Coelho in sod., 2012; Kashiwayama in sod., 2009, cit. po Wiesinger in sod., 2013). Ektopično povečana ekspresija *ABCD2* in *ABCD3* lahko nadomesti okvarjeno delovanje *ABCD1* v fibroblastih pacientov z X-ALD (Netik in sod., 1999; Kemp in sod., 1998; Braiterman in sod., 1998, cit. po Wiesinger in sod., 2013).

V izoliranih peroksisomih, kjer so s specifičnimi protitelesi blokirali funkcijo *ABCD1* proteina, pride zaradi mutacije gena *ABCD1* do okvare β -oksidacije. Podobni učinki potrjujejo, da *ABCD1* prispeva k β -oksidaciji v peroksisomih. *ABCD1* je tako glavni mediator β -oksidacije dolgoveržnih estrov koencima A (acil-CoA), neodvisno od sintetaz za dodatno re-esterifikacijo (Wiesinger in sod., 2013).

1.12. *LDLR* (»low-density lipoprotein receptor gene family«)

Gen *LDLR* spada v družino genov za membranske receptorje lipoproteinov nizke gostote (LDL-receptorji), ki imajo na površini proteine, vključene v posredovanje endocitoze specifičnih ligandov z receptorji. Receptorji na zunanji površini celic vežejo LDL, ki transportirajo holesterol po krvi v celico. Lipoproteini v celici sprostijo holesterol, katerega celica porabi, shrani ali izloči iz telesa. Receptorji se po končanem transportu vrnejo nazaj na površino celice, kjer ponovno vežejo lipoproteine (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LDLR>).

Novejše študije družine *LDLR*, poročajo o povezavi med ekspresijo receptorjev oksidiranih lipoproteinov nizke gostote (ox-LDL) ter višjim stadijem raka prostate in metastazo limfnih vozlov. Prekomerna ekspresija receptorjev je povezana z večjo metastazo limfnih vozlov. Oksidirani lipoproteini nizke gostote (ox-LDL) stimulirajo proliferacijo, migracijo in invazijo celic raka prostate ter ekspresijo *OLR1*. *OLR1* je sposoben prepoznavanja številnih ligandov, vključno z ox-LDL. Prav tako naj bi se *OLR1* obnašal kot onkogen, ki aktivira tarčne gene za NF- κ B, ki so odgovorni za proliferacijo, migracijo in inhibicijo apoptoze (Wan in sod., 2015).

2. MATERIALI

- BSA (goveji serumski albumin, brez maščobnih kislin; Sigma-Aldrich, ZDA)
- Bromfenol modro (Pharmacia, Švedska)
- Celična kultura MDA-MB-231 (ATCC, ZDA)
- DMSO (Merck, Nemčija)
- DPBS (Gibco, ZDA)
- EtOH, 96 % (Carlo Erba, Italija)
- FBS (serum govejega zarodka, Gibco, ZDA)
- Gojišče RPMI-1640 (ATCC, ZDA)
- hGX, rekombinantno pripravljen encim
- Izopropanol (Carl Roth, Nemčija)
- Kloroform (Avantor Performance Materials, ZDA)
- Barvilo nilsko rdeče (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Oleinska kislina (Merck, Nemčija)
- Reagent TRIzol (Life Technologies, ZDA)
- TrypLe Select (Life Technologies, ZDA)
- Trypsin (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Tripkan modro (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Uporabljeni mediji in dodatki za gojenje celičnih kultur

- Dulbeccov fosfatni pufer (DPBS) (Life Technologies, ZDA)
- Serum govejega zarodka (FBS) (Life Technologies, ZDA)
- Goveji inzulin (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Penicilin-streptomycin raztopina (Life Technologies, ZDA)
- Plošče in ostali sterilni material, uporabljen pri gojenju celičnih kultur (TPP, Švica)
- RPMI-1640 (ATCC, ZDA)
- TrypLe Select (Life Technologies, ZDA)

Kompleti reagentov

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, ZDA)

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Applied Science, Nemčija)

3. METODE

3.1. GOJENJE CELIČNIH KULTUR

Pri delu smo uporabljali celično kulturo MDA-MB-231 (American Type Culture Collection, ZDA). Izolirana je bila iz tkiva raka dojke ženske, stare 51 let. Celice so visoko tumorigene, invazivne ter metastazirajoče. Po morfologiji so podolgovate vretenaste oblike, podobne epiteljskim, rastejo pritrjene na podlago.

Celice smo gojili v kompletnem mediju RPMI-1640 (ATCC, ZDA) z dodanim 10 % FBS (Life Technologies, ZDA) v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂, in sicer v platenkah s površino 25 cm² in 75 cm² (T-25 in T-75) ali na ploščah z večjim številom vdolbinic. Medij smo celicam menjali vsake 2-3 dni.

3.2. PRECEPLJANJE CELIC

Celice smo precepljali, ko so dosegle 90-odstotno konfluenco ter jih redčili v razmerju 1 : 4. Medij smo iz platenk ali plošč posesali, nato celice sprali z DPBS, da smo temeljito odstranili ves medij. Dodali smo reagent TrypLE Select, da so se celice odlepili s podlage in jih za 2 min postavili nazaj v inkubator pri temperaturi 37 °C. Nato smo celicam dodali kompletni medij (10 % FBS v RPMI-1640) in jih nežno resuspendirali. V novo platenko smo prenesli suspenzijo celic in dodali svež kompletni medij. Tako pripravljeno suspenzijo smo postavili nazaj v inkubator.

3.3. ŠTETJE CELIC Z NEUBAUERJEVO KOMORO

Štetje celic smo izvedli s hemocitometrom (Neubauerjeva števna komora). Potem ko smo celice sprali z DPBS in jih s površine odlepili z reagentom TrypLE Select, smo odvzeli 10 µl suspenzije celic, jo prenesli v koničasto centrifugirko in dodali 10 µl raztopine barvila tripan modro. Barvilo obarva celice modro, le če so mrtve ali umirajoče, saj membrane živih celic ne prepuščajo barvila. Suspenzij celic smo nanесли na Neubauerjevo števno komoro in pod mikroskopom prešteli celice v vsaj štirih kvadratnih poljih hemocitometra. Za izračun koncentracije živih celic smo uporabili naslednjo enačbo (4.1):

$$\frac{\text{število celic}}{\text{število kvadrantov}} \times 2 \times 10^4 = \text{število} \frac{\text{celic}}{\text{ml}} \quad \dots (4.1)$$

Faktor redčenja je 2, 10⁴ pa predstavlja razmerje med 1 ml in volumnom merilnega polja v hemocitometru.

3.4. DETEKCIJA LK NA PRETOČNEM CITOMETRU

Celice MDA-MB-231 smo nacepili v koncentraciji 3 × 10⁴ celic/vdolbinico (500 µl) na ploščo s 24 vdolbinicami. Gojili smo jih v 500 µl kompletnega medija 10 % FBS v RPMI-

1640. Po 24 h inkubacije smo celicam zamenjali medij ter dodali hGX (1 nM) in OK (100 μ M). Po 48 h smo gojišče posesali, celice sprali z DPBS in jim dodali reagent TrypLE Select, da so se odlepili od podlage. Celice smo nato 10 min centrifugirali pri 300 x g in sobni temperaturi. Medtem smo pripravili raztopino barvila nilsko rdeče (1 μ g/ml v DPBS). Celično usedlino smo resuspendirali v raztopini barvila in jo inkubirali 10 min v temi. Tako pripravljene vzorce smo nato analizirali na pretočnem citometru (laser: 488 nm, kanal: FL-1).

3.5. IZOLACIJA RNA

Celokupno RNA iz celic MDA-MB-231 smo izolirali z reagentom TRIzol. Sledili smo navodilom proizvajalca, z nekaj spremembami: količino TRIzola in ostalih reagentov, ki smo jih dodali, smo prilagodili glede na površino platenke, v kateri smo celice gojili; vzorce smo izolirali takoj ali pa smo homogenizirane vzorce shranili v skrinjo pri -80°C .

Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 min pri 500 x g, odstranili smo medij, nato pa dodali 150 μ l reagenta TRIzol in vzorec homogenizirali s pipetiranjem in vrtinčenjem. Po 5 min inkubaciji smo dodali 30 μ l kloroforma ter nežno premešali. Po 5 min smo centrifugirali na 12.000 x g za 15 min pri 4°C . Pozorno smo odpipetirali zgornjo prozorno vodno fazo, ki vsebuje RNA, v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo 75 μ l izopropanola, ki obori RNA, in vzorec inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Po centrifugiranju pri 12.000 x g za 10 min pri 4°C smo odstranili ves supernatant, dodali 150 μ l 75 % etanola, vzorec zvrtničili in centrifugirali pri 7500 x g za 5 min pri 4°C . Odstranili smo supernatant in oborino sušili na zraku 5 min, da je etanol izhlapel. Oborjeno RNA smo resuspendirali v 20–50 μ l vode brez nukleaz in inkubirali 12 min pri 57°C . RNA smo nato shranili v zamrzovalniku pri -80°C .

3.6. MERJENJE KONCENTRACIJE RNA

Za merjenje koncentracije RNA v vzorcu smo uporabili spektrofotometer NanoDrop (Thermo Scientific, ZDA), ki omogoča merjenje absorbance vzorcev v majhnem volumnu (pomerili smo 2 μ l raztopine izolirane RNA). Iz absorbance vzorcev pri valovni dolžini 260 nm smo določili koncentracijo RNA.

3.7. OBRATNO PREPISOVANJE (RT) RNA V cDNA

Prepis smo izvedli po protokolu iz kompleta reagentov High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit z RNaznim inhibitorjem (Life Technologies, ZDA).

V mikrocentrifugirke smo dodali mešanico reagentov za obratno prepisovanje:

Reagent	Volumen/reakcijo (μl)
10x pufer za reakcijo RT	2
25x mešanica 100 mM dNTP-jev	0,8
10x naključni primerji	2
reverzna transkriptaza MultiScribe	1
inhibitor RNaz	1
voda brez nukleaz	0 1,8 2,6 3,1 3,3 4,4
raztopina RNA (konc ng/μl) / dodan volumen RNA	56,8 ng/μl (13,2 μl) 65,5 ng/μl (11,4 μl) 70,8 ng/μl (10,6 μl) 74,4 ng/μl (10,1 μl) 75,7 ng/μl (9,9 μl) 84,8 ng/μl (8,8 μl)
končni volumen	20

Pripravljene mešanice za reakcijo RT smo postavili v aparaturo za PCR in uporabili sledeči temperaturni program:

- 10 min pri 25 °C,
- 120 min pri 37 °C,
- 5 min pri 85 °C,
- hlajenje do 4 °C.

Prepisana cDNA je bila do uporabe shranjena pri –20 °C.

3.8. KVANTITATIVNI PCR V REALNEM ČASU (qPCR)

Je občutljiva in natančna metoda, ki temelji na merjenju pomnoženih fragmentov DNA s pomočjo fluorescenčnega barvila SYBR Green ob vsakem temperaturnem ciklu reakcije PCR. Z vsakim ciklom pomnoževanja fragmentov intenziteta fluorescence narašča sorazmerno s koncentracijo pomnoženega produkta. S krivulje pomnoževanja, ki se izriše na koncu reakcije, lahko odčitamo bazno linijo, ki predstavlja fluorescenčni signal ozadja. Točko, pri kateri signal pomnoženih fragmentov prestopi vzdražnosti prag fluorescenčnega signala ozadja, imenujemo prazni cikel (Ct). Večja kot je količina tarčne DNA v vzorcu, nižja je vrednost Ct (Roche PCR Application Manual).

3.8.1. Načrtovanje ustreznih začetnih oligonukleotidov

Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov za reakcijo qPCR smo si pomagali z različnimi javno dostopnimi orodji in bazami podatkov, kjer smo iskali in preverjali zaporedja (qPrimerDepot, (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>; RTPrimerDB, <http://medgen.ugent.be/rtpriimerdb/>; NCBI BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; NCBI Primer-Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; OligoAnalyzer, <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Oligonukleotide, katerih zapise smo našli v

literaturi, smo prav tako preverjali z bioinformatičnimi orodji. Pri izboru in načrtovanju oligonukleotidov smo sledili nekaterim splošnim napotkom za optimizacijo oligonukleotidov za reakcijo qPCR: optimalen delež baznih parov GC (40–60 %), primerna temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov (60 °C), dolžina produkta (približno 100 bp), dolžina začetnih oligonukleotidov (18–21 nt), nizka verjetnost tvorbe močnih sekundarnih struktur (npr. lasnic), odsotnost visoke stopnje prileganja na 3'-koncu, nizka verjetnost tvorbe homo- in heterodimerov. S programoma BLAST in Primer-BLAST smo preverjali specifičnost posameznega ali obeh oligonukleotidov skupaj, pri čemer smo njihove tarče iskali po človeških podatkovnih bazah NCBI referenčnih zaporedij RNA in reprezentativnega človeškega genoma. Zelene oligonukleotide smo načrtovali tako, da so pomnoževali območja zapisa za posamezen gen, ki so vključevali introne, ali pa so sami oligonukleotidi nalegali na meje med dvema sosednjima eksonoma. S tem smo minimizirali možnosti, da bi morebitna kontaminacija vzorcev RNA z genomsko DNA (gDNA), privedla do občutnejšega pomnoževanja tarčnega zaporedja z gDNA.

3.8.2. Uporabljeni oligonukleotidi

Oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za ugotavljanje izražanja mRNA genov družine FABP (*FABP1*, *FABP2*, *FABP3*, *FABP4*, *FABP5*, *FABP6*, *FABP7*), *ABCD1*, *LDLR* in dveh referenčnih genov, *TOP1* in *SF3A1*, so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v analizi qPCR

Ime gena	Nukleotidno zaporedje	Vir
<i>ABCD1</i>	GAAGTATGTGTGGAGCGCCT CCTCCTTCTTTTCCAAGGCT	qPrimerDepot (https://primerdepot.nci.nih.gov/)
<i>LDLR</i>	CAAAGTCTGCAACATGGCTAGAGA GTTGTCCAAGCATTCGTTGGTC	Plösch in sod., 2010
<i>FABP1</i>	GGAATGTGAGCTGGAGACAA GTGATTATGTCGCCGTTGAG	GenScript (https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer)
<i>FABP2</i>	TGAAGCTGACAATTACACAAGAAGGA AGGTGACACCAAGTTCAAAAACAAC	Fujie in sod., 2013
<i>FABP3</i>	AGCCTAGCCCAGCATCACTA AACCCACACCGAGTGACTTC	qPrimerDepot (https://primerdepot.nci.nih.gov/)
<i>FABP4</i>	TCAGTGTGAATGGGGATGTGA TCAACGTCCTTGGCTTATGC	Guan in sod., 1999
<i>FABP5</i>	GACGCAGACCCCTCTCTG TTCGCAAAGCTATTCCCACT	qPrimerDepot (https://primerdepot.nci.nih.gov/)
<i>FABP6</i>	TCCCAACTATCACCAGACC TGGTGGGTTTGTAGCTCCCT	qPrimerDepot (https://primerdepot.nci.nih.gov/)
<i>FABP7</i>	CTGGAAGCTGACCAACAGTC CTCATAGTGCGAACAGCAA	Goto in sod., 2006
<i>TOP1</i>	CCCTGTA CTTCATCGACAAGC CCACAGTGTCGCTGTTTC	Mounier in sod., 2008
<i>SF3A1</i>	podatki niso na voljo	Primerdesign Ltd., VB

qPCR smo izvedli po navodilih proizvajalca. V vsako vdolbinico na plošči smo dali 10 ng RNA ustrezne cDNA, univerzalno barvilo FastStart Universal SYBR Green Master (ROX; Roche), 250 nM vsakega para ustreznih začetnih oligonukleotidov in vodo brez nukleaz. Za izvedbo reakcije qPCR smo uporabili instrument StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, ZDA). Reakcijo smo začeli z 10-minutno inkubacijo pri 95 °C, sledilo je 45 ciklov, sestavljenih iz dveh stopenj: 10 s pri 95 °C in 1 min pri 60 °C.

Pri delu smo rutinsko uporabljali pozitivne (kalibratorska cDNA, prepisana iz komercialne mešanice RNA; Quantitative PCR Human Reference Total RNA, Agilent Technologies, ZDA) in negativne kontrole (kontrola brez matrice; angl. »non-template control«, NTC). Negativne kontrole, ki niso vsebovale tarčne cDNA, in reakcije brez RT so nam služile kot kontrola za nespecifično podvajanje in kontaminacijo z gDNA.

3.8.3. Določanje učinkovitosti pomnoževanja

Za določanje učinkovitosti reakcije PCR za vsak par začetnih oligonukleotidov smo uporabili serije 4-kratnih redčitev (4-, 16-, 64- in 256-krat) kalibratorske cDNA (Quantitative PCR Human Reference Total RNA). Kalibrator je visoko kvalitetna referenčna cDNA, ki je prepisana iz RNA desetih različnih celičnih linij in jo uporabljamo kot pozitivno kontrolo reakcij pomnoževanja, za zagotavljanje ponovljivosti in natančnosti pri delu ter za primerjavo (normalizacijo) rezultatov analiz izražanja genov opravljenih na različnih ploščah (v različnih časovnih obdobjih). Iz pridobljenih vrednosti Ct za posamezen gen smo iz grafov (slike 9–25) s pomočjo formule (4.2) izračunali učinkovitost pomnoževanja:

$$E = 10^{(-1/\text{naklon}) - 1} \quad \dots (4.2)$$

Medtem ko je teoretična vrednost učinkovitosti reakcije PCR enaka 2,00, se v praksi sprejemljiva učinkovitost reakcije giblje med 1,8 in 2,1.

Po končani reakciji pomnoževanja smo vsakič preverili tudi vrednosti talilnih krivulj. Talilna krivulja je krivulja, ki preko meritve fluorescence prikazuje stopnjo denaturacije DNA v odvisnosti od temperature. Z merjenjem talilne krivulje ugotavljamo učinkovitost pomnoževanja oz. prisotnost enega ali več produktov v reakcijski mešanici. Vsak od nastalih pomnoženih produktov ima določeno temperaturo taljenja (T_m), ki je odvisna od dolžine produkta in nukleotidne sestave. V primeru kontaminacije ali tvorbe dimerov med začetnima oligonukleotidoma lahko zaznamo prisotnost teh dodatnih produktov, ki se glede na vrednosti T_m razlikujejo od pričakovanega specifičnega produkta reakcije.

3.8.4. Analiza reakcij qPCR

Rezultate reakcij smo analizirali z računalniškim programom StepOne Software v2.2.2. Bazno linijo smo pri tem nastavljali ročno. Za analizo smo upoštevali vzorce, katerih kontrolne vrednosti (kontrola NTC) so se od tarčnih vrednosti Ct razlikovale vsaj za 10 enot. Relativno ekspresijo genov smo izračunali po komparativni metodi Ct glede na

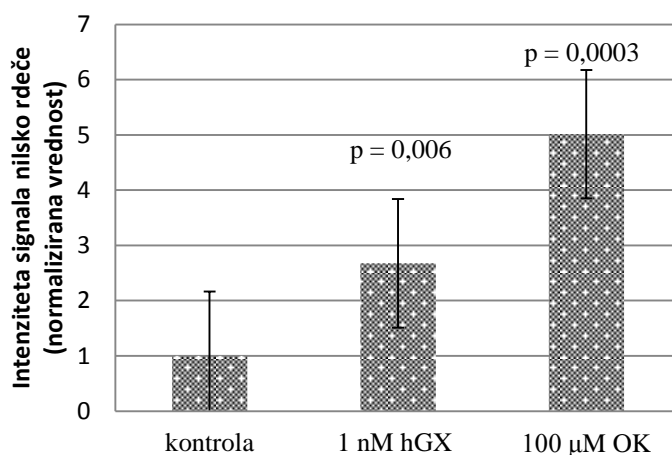
normalizacijo z referenčnima genoma in ob upoštevanju učinkovitosti reakcije (Hellemans in sod., 2007). Vrednosti Ct za vsak posamezen tarčni in referenčna gena smo izrazili s pomočjo komparativne metode Ct: $Q_{n,g} = E_g \times (\min Ct - Ct_n)$, kjer je $Q_{n,g}$ relativna količina brez enot velikosti med 0 in 1, ki odraža nivo izražanja posameznega gena g v posameznem vzorcu n, E_g predstavlja učinkovitost pomnoževanja gena g, $\min Ct$ je najnižja vrednost Ct v skupini vzorcev, Ct_n pa je vrednost Ct posameznega vzorca n. Vrednosti $Q_{n,g}$ za vsak tarčni gen smo delili z vrednostmi Q referenčnih genov ($Q_{n,r}$) (Vandesompele in sod., 2002). S tem smo določili relativno razmerje med izražanjem tarčnega in referenčnih genov za vsak vzorec, vključno s kalibratorjem. Na kalibrator normalizirane vrednosti smo izračunali tako, da smo delili vrednosti razmerja med tarčnim in referenčnima genoma v posameznem vzorcu n z razmerjem med tarčno in referenčno vrednostjo v kalibratorju, kar omogoča popravek za razlike v občutljivosti detekcije med tarčno in referenčno točko ter izniči razlike med posameznimi reakcijami PCR.

4. REZULTATI

4.1. PREVERJANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI VZORCA REKOMBINANTNEGA ENCIMA hGX sPLA₂

Za potrditev biološke aktivnosti vzorca rekombinantne sPLA₂, pred kratkim dokazane s strani Pucer in sodelavcev (2013), smo uporabili metodo pretočne citometrije.

Celice MDA-MB-231 smo po 48 h gojenja v kompletnem mediju in tretiranju s hGX in OK obarvali z barvilom nilsko rdeče ter s pretočnim citometrom preverili prisotnost LK.



Slika 7: Vsebnost lipidnih kapljic v celicah MDA-MB-231. Celicam MDA-MB-231 smo po 24 h gojenja v kompletnem mediju le-tega zamenjali s svežim in dodali 1 nM hGX ali 100 µM OK. Po 48 h inkubacije smo celice obarvali z barvilom nilsko rdeče ter analizirali na pretočnem citometru. Prikazane so vrednosti s pripadajočimi standardnimi napakami (S.E.M.) dveh bioloških ponovitev poskusa. Razlike med povprečnimi vrednostmi intenzitete fluorescence nilsko rdečega v celicah, tretiranih s hGX in OK, in v kontrolnih celicah so statistično značilne ($p < 0,01$; Studentov t-test).

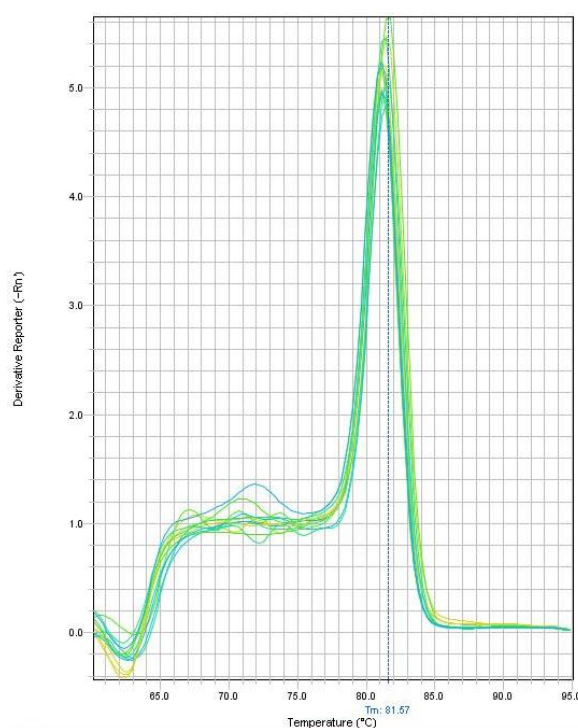
S tem poskusom smo potrdili biološko aktivnost vzorca rekombinantnega encima hGX, ki smo ga uporabljali pri vseh nadaljnjih poskusih. Količina nevtralnih lipidov v celicah, tretiranih s hGX, je skoraj 3-krat večja kot pri kontrolnih celicah, kar se ujema s pričakovanji (Pucer in sod., 2013). Prav tako je učinek OK, ki je povečala količino LK v celicah za kar 5-krat, v skladu z rezultati omenjene študije.

4.2. VALIDACIJA ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Učinkovitost reakcije PCR v posameznem vzorcu ima velik vpliv na pravilnost rezultatov izražanja. Določitev učinkovitosti je ključna za zanesljivo kvantifikacijo izražanja genov. Nespremenjena učinkovitost pomnoževanja pri vseh primerjanih vzorcih je pomemben kriterij za zanesljivo primerjavo med vzorci. Učinkovitost smo izračunali po enačbi (4.2) iz rezultatov analiz izražanja posameznega gena v raztopinah 4-krat serijsko redčene kalibratorske cDNA.

Poleg izračuna učinkovitosti reakcije PCR smo za vsak par začetnih oligonukleotidov ugotavljali specifičnost pomnoževanja z analizo talilnih krivulj DNA. Talilna krivulja DNA nam preko meritve fluorescence v odvisnosti od temperature prikazuje stopnjo denaturacije dvoverižne DNA. S pomočjo talilne krivulje lahko ugotovimo stopnjo homogenosti pomnoženih produktov, saj ima vsak od nastalih pomnoženih produktov pri reakciji svojo temperaturo taljenja (T_m). V primeru kontaminacije, tvorbe nespecifičnih produktov ali dimerov med začetnimi oligonukleotidi se bodo temperature taljenja med seboj razlikovale.

V nadaljevanju so po posameznih genih navedeni rezultati validacije oligonukleotidnih parov.



Slika 8: Talilne krivulje za tarčni gen *ABCD1*

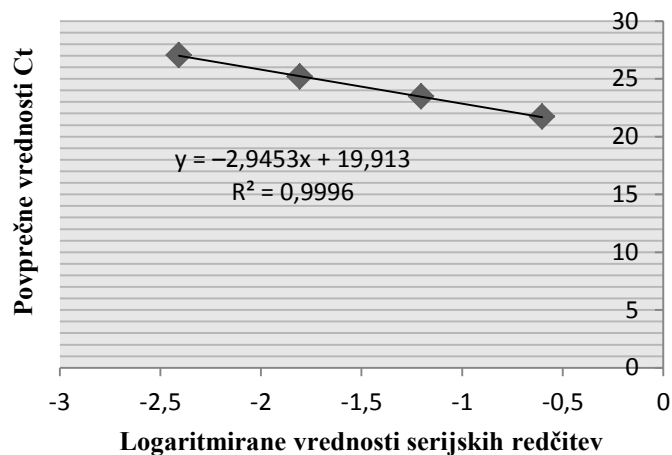
Slika 8 prikazuje talilne krivulje za tarčni gen *ABCD1*, dobljenih s pomnoževanjem cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega odčitamo temperaturo taljenja, $T_m = 81,57$ °C. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *ABCD1*.

Preglednica 2: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena *ABCD1* v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

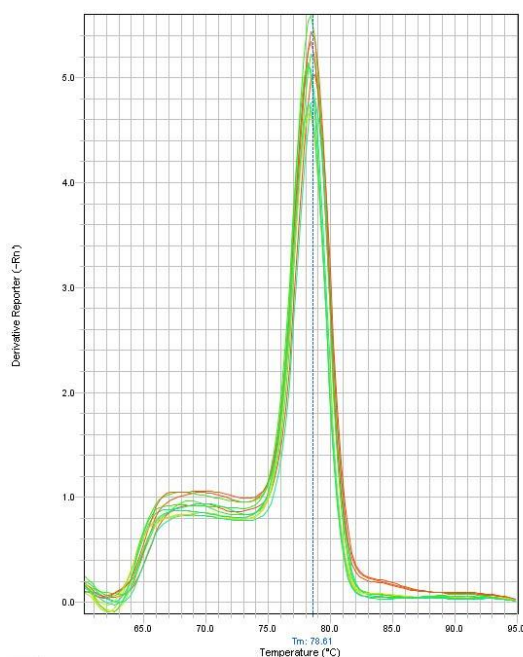
V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *ABCD1* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA.

Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/4	-0,60206	21,71244
1/4	-0,60206	
1/16	-1,20412	23,45206
1/16	-1,20412	
1/64	-1,80618	25,17043
1/64	-1,80618	
1/256	-2,40824	27,05043
1/256	-2,40824	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *ABCD1* smo nanesti na graf (slika 9) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 9: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen *ABCD1*. Fragment gena *ABCD1* smo pomnožili z reakcijo qPCR v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA, in sicer v dveh paralelkah. Po potrditvi učinkovitosti pomnoževanja z analizo talilnih krivulj smo na graf nanesti povprečne vrednosti dobljenih vrednosti Ct v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja redčenja. Naklon premice, ki povezuje točke povprečnih vrednosti Ct, dobljenih pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA, uporabimo za izračun učinkovitosti reakcije PCR.



Slika 10: Talilne krivulje za tarčni gen *LDLR*

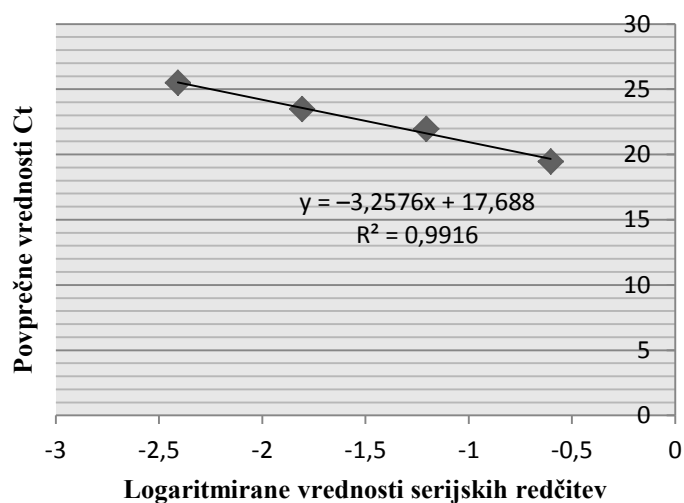
Slika 10 prikazuje talilne krivulje za tarčni gen *LDLR*, dobljenih s pomnoževanjem cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega odčitamo temperaturo taljenja, $T_m = 78,61$ °C. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *LDLR*.

Preglednica 3: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena *LDLR* v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

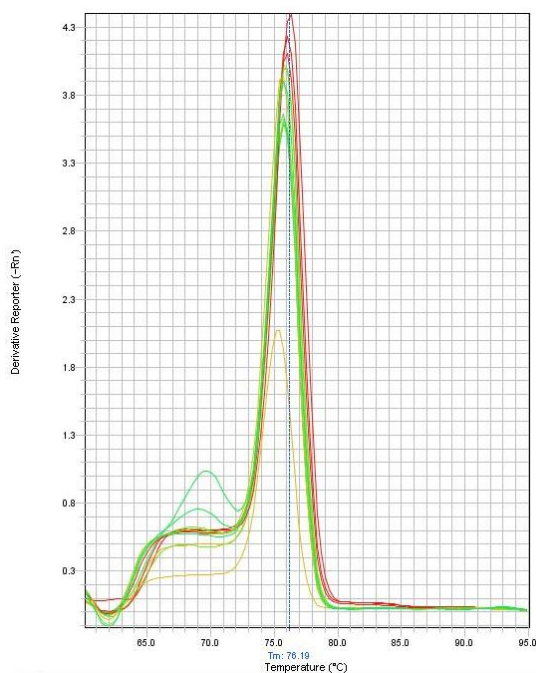
V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *LDLR* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA.

Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/4	-0,60206	19,4528
1/4	-0,60206	
1/16	-1,20412	21,94847
1/16	-1,20412	
1/64	-1,80618	23,48372
1/64	-1,80618	
1/256	-2,40824	25,47856
1/256	-2,40824	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *LDLR* smo nanesli na graf (slika 11) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 11: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen *LDLR*. Fragment gena *LDLR* smo pomnožili z reakcijo qPCR in analizirali učinkovitost pomnoževanja, kot je navedeno pri sliki 9.



Slika 12: Talilne krivulje za tarčni gen *FABPI*

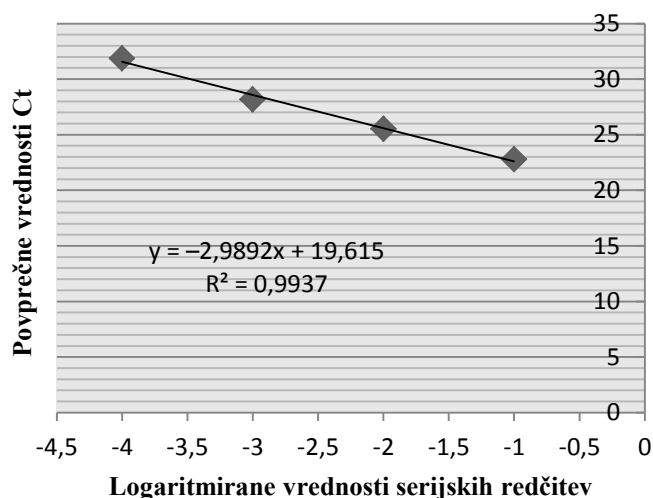
Slika 12 prikazuje talilne krivulje za tarčni gen *FABPI*, dobljenih s pomnoževanjem cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega odčitamo temperaturo taljenja, $T_m = 76,19$ °C. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *FABPI*, saj je prišlo do pomnožitve zelenega produkta.

Preglednica 4: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena FABP1 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

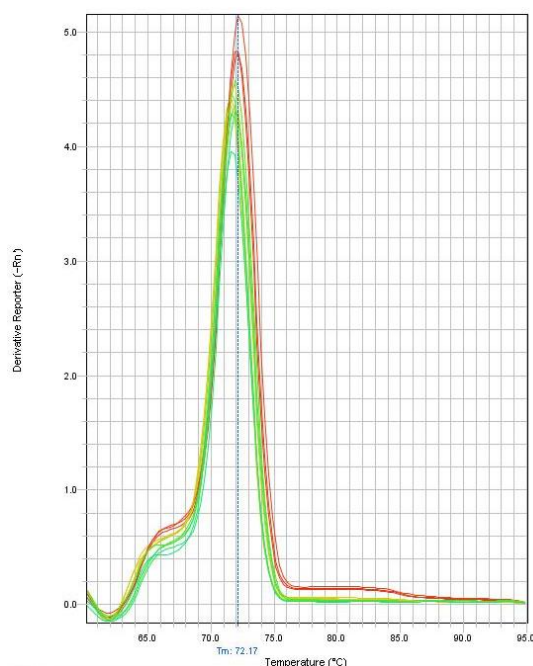
V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP1* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA. Uporabili smo večje redčitve kalibratorja kot pri ostalih, saj so pri 4-kratnih redčitvah vrednosti Ct premajhne razlike med seboj, kar pomeni, da težje izračunamo učinkovitost.

Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/10	-1	22,78203
1/10	-1	
1/100	-2	25,53042
1/100	-2	
1/1000	-3	28,17776
1/1000	-3	
1/10000	-4	31,86352
1/10000	-4	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP1* smo nanegli na graf (slika 13) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 13: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen *FABP1*. Fragment gena *FABP1* smo pomnožili z reakcijo qPCR in analizirali učinkovitost pomnoževanja, kot je navedeno pri sliki 9.



Slika 14: Talilne krivulje za tarčni gen *FABP2*.

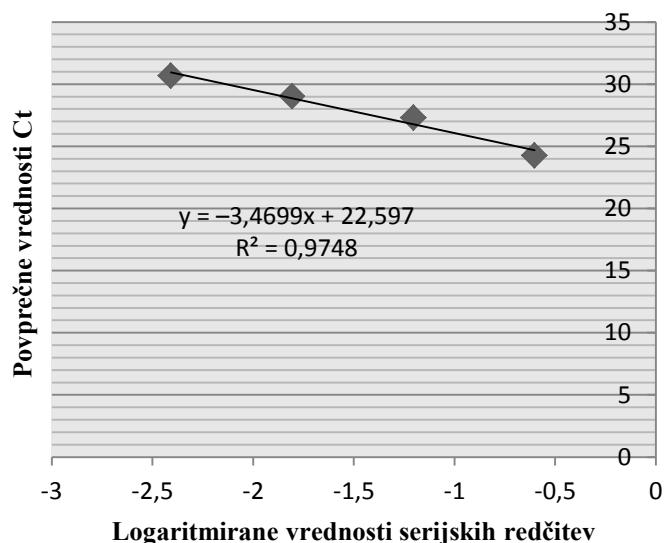
Slika 14 prikazuje talilne krivulje za tarčni gen *FABP2*, dobljenih s pomnoževanjem cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega odčitamo temperaturo taljenja, $T_m = 72,17$ °C. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *FABP2*.

Preglednica 5: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena *FABP2* v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

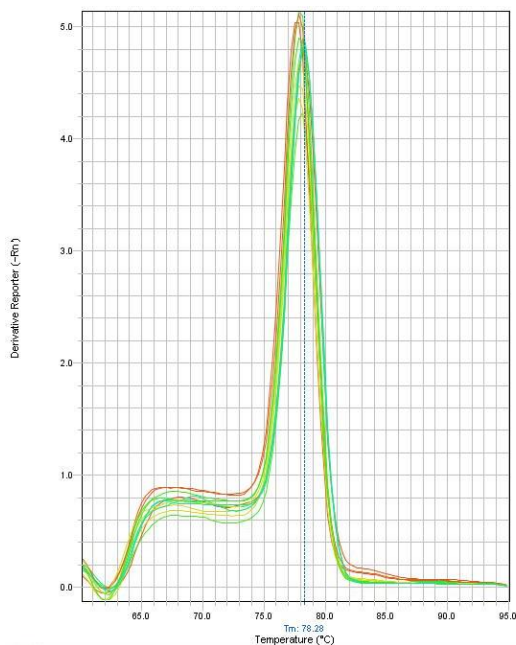
V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP2* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA.

Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/4	-0,60206	24,27472
1/4	-0,60206	
1/16	-1,20412	27,30647
1/16	-1,20412	
1/64	-1,80618	29,03285
1/64	-1,80618	
1/256	-2,40824	30,66281
1/256	-2,40824	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP2* smo nanegli na graf (slika 15) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 15: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen *FABP2*. Fragment gena *FABP2* smo pomnožili z reakcijo qPCR in analizirali učinkovitost pomnoževanja, kot je navedeno pri sliki 9.



Slika 16: Talilne krivulje za tarčni gen *FABP3*.

Slika 16 prikazuje talilne krivulje za tarčni gen *FABP3*, dobljenih s pomnoževanjem cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega odčitamo temperaturo

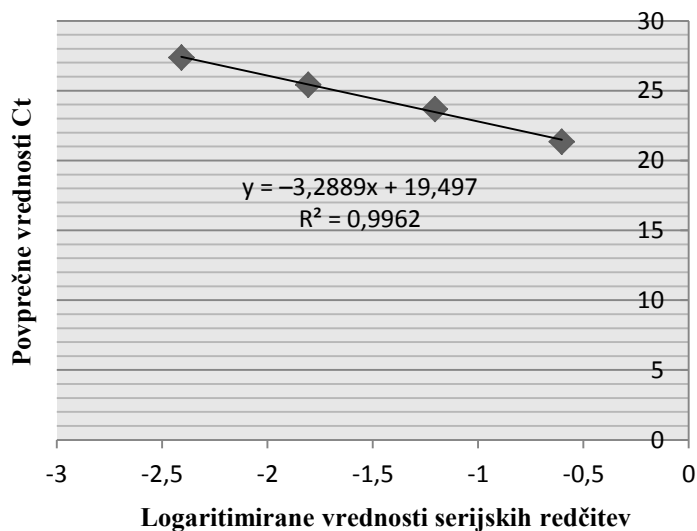
taljenja, T_m = 78,28 °C. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *FABP3*.

Preglednica 6: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena *FABP3* v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP3* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA.

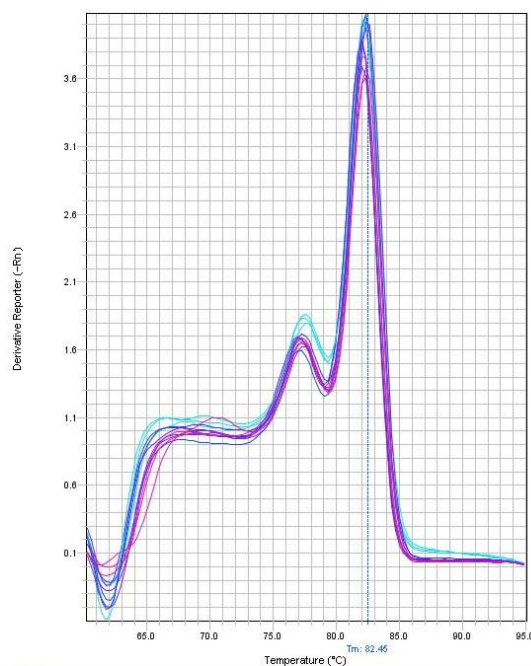
Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/4	-0,60206	21,33332
1/4	-0,60206	
1/16	-1,20412	23,68179
1/16	-1,20412	
1/64	-1,80618	25,42028
1/64	-1,80618	
1/256	-2,40824	27,35415
1/256	-2,40824	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP3* smo nanegli na graf (slika 17) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 17: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen *FABP3*. Fragment gena *FABP3* smo pomnožili z reakcijo qPCR in analizirali učinkovitost pomnoževanja, kot je navedeno pri sliki 9.

Izražanja gena *FABP4* nismo analizirali, saj smo na podlagi predhodnih rezultatov ugotovili, da se ne izraža niti v kalibratorju niti v celični liniji MDA-MB-231.



Slika 18: Talilne krivulje za tarčni gen *FABP5*.

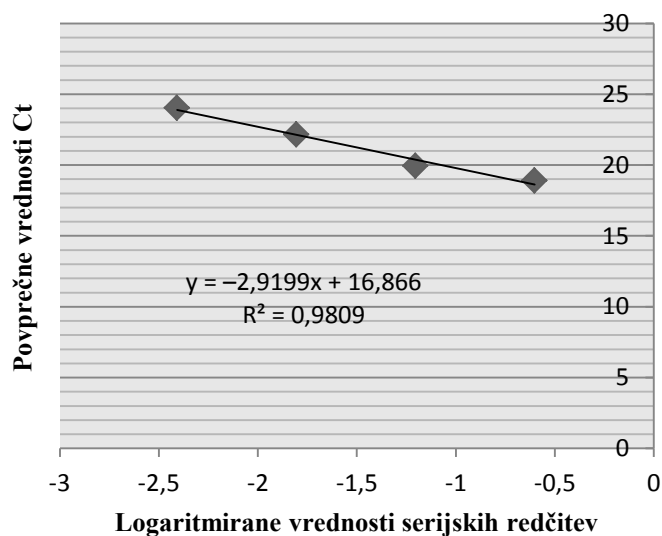
Slika 18 prikazuje talilne krivulje za tarčni gen *FABP5*, dobljenih s pomnoževanjem cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega odčitamo temperaturo taljenja, $T_m = 82,45$ °C. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *FABP5*, saj je prišlo do pomnožitve želenega produkta.

Preglednica 7: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena *FABP5* v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

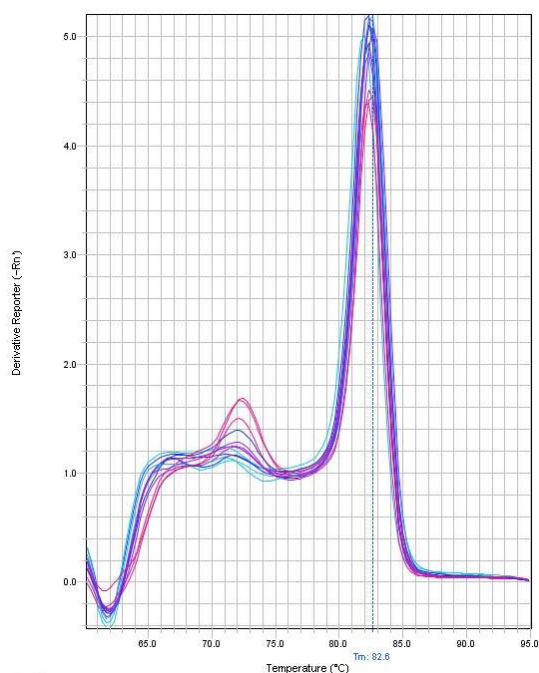
V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP5* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA.

Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/4	-0,60206	18,91369
1/4	-0,60206	
1/16	-1,20412	19,93619
1/16	-1,20412	
1/64	-1,80618	22,16176
1/64	-1,80618	
1/256	-2,40824	24,03169
1/256	-2,40824	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP5* smo nanegli na graf (slika 19) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 19: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen *FABP5*. Fragment gena *FABP5* smo pomnožili z reakcijo qPCR in analizirali učinkovitost pomnoževanja, kot je navedeno pri sliki 9.



Slika 20: Talilne krivulje za tarčni gen *FABP6*.

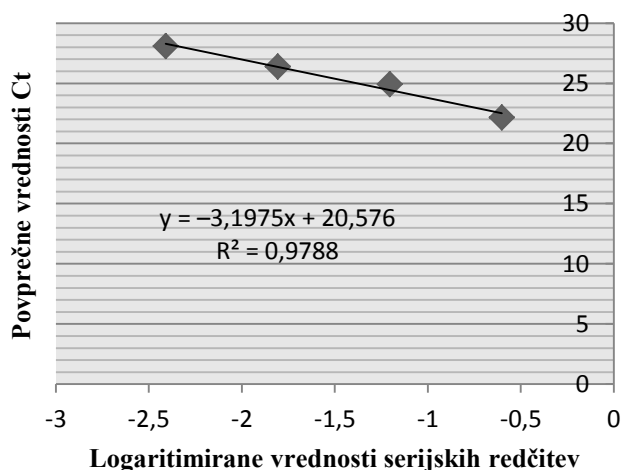
Slika 20 prikazuje talilne krivulje za tarčni gen *FABP6*, dobljenih s pomnoževanjem cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega odčitamo temperaturo taljenja, $T_m = 82,6$ °C. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *FABP6*, saj je prišlo do pomnožitve zelenega produkta.

Preglednica 8: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena FABP6 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP6* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA.

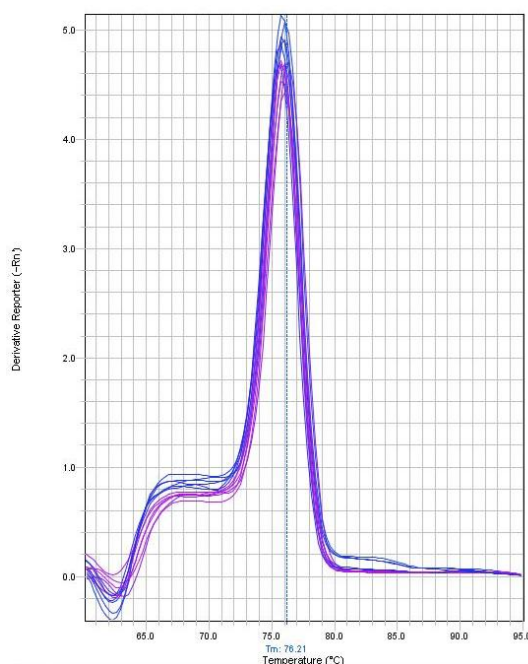
Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/4	-0,60206	22,15919
1/4	-0,60206	
1/16	-1,20412	24,92699
1/16	-1,20412	
1/64	-1,80618	26,37234
1/64	-1,80618	
1/256	-2,40824	28,09432
1/256	-2,40824	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *FABP6* smo nanesli na graf (slika 21) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 21: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen *FABP6*. Fragment gena *FABP6* smo pomnožili z reakcijo qPCR in analizirali učinkovitost pomnoževanja, kot je navedeno pri sliki 9.

Izražanje gena *FABP7* nismo analizirali, saj smo na podlagi predhodnih rezultatov ugotovili, da se ne izraža niti v kalibratorju niti v celični liniji MDA-MB-231.



Slika 22: Talilne krivulje za referenčni gen *TOPI*.

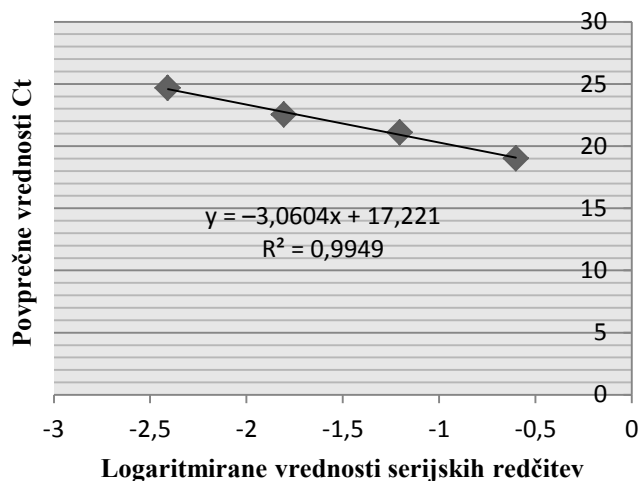
Slika 22 prikazuje talilne krivulje za referenčni gen *TOPI*, dobljenih s pomnoževanjem cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega odčitamo temperaturo taljenja, $T_m = 76,21$ °C. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *TOPI*, saj je prišlo do pomnožitve zelenega produkta.

Preglednica 9: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena *TOPI* v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

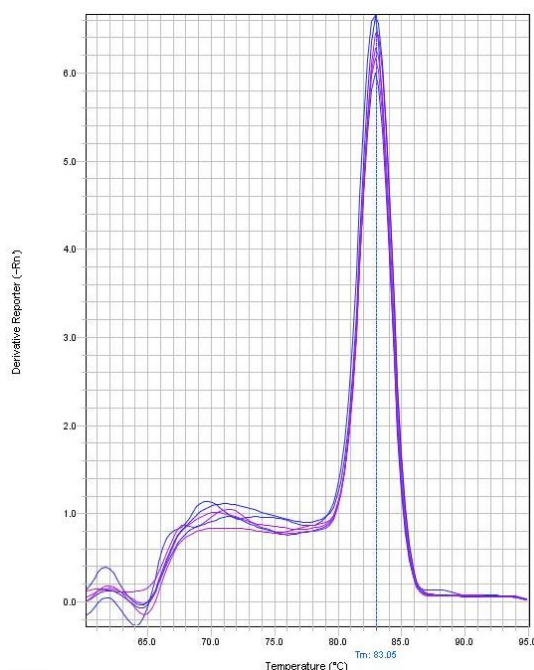
V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *TOPI* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA.

Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/4	-0,60206	19,01544
1/4	-0,60206	
1/16	-1,20412	21,08525
1/16	-1,20412	
1/64	-1,80618	22,53415
1/64	-1,80618	
1/256	-2,40824	24,6743
1/256	-2,40824	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *TOP1* smo nanesli na graf (slika 23) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 23: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen *TOP1*. Fragment gena *TOP1* smo pomnožili z reakcijo qPCR in analizirali učinkovitost pomnoževanja, kot je navedeno pri sliki 9.



Slika 24: Talilne krivulje za referenčni gen *SF3A1*.

Slika 24 prikazuje talilne krivulje za referenčni gen *SF3A1*, dobljenih s pomočjo pomnoževanja cDNA v vzorcih kalibratorske cDNA. Iz slike je razviden en vrh, s katerega

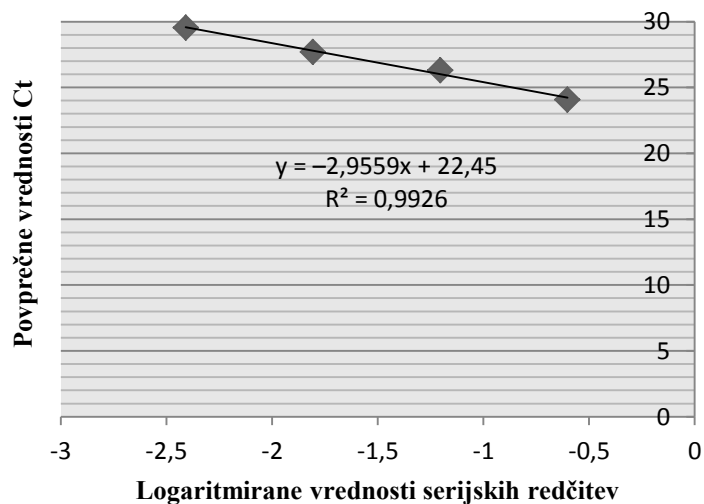
odčitamo temperaturo taljenja, $T_m = 83,05 \text{ }^\circ\text{C}$. Sklepamo lahko, da so začetni oligonukleotidi specifični za tarčni gen *SF3A1*, saj je prišlo do pomnožitve želenega produkta.

Preglednica 10: Povprečne vrednosti Ct, dobljene pri pomnoževanju fragmenta gena SF3A1 v serijsko redčenih raztopinah kalibratorske cDNA.

V preglednici so prikazane dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *SF3A1* v odvisnosti od desetiškega logaritma relativnega razmerja serijsko redčene raztopine kalibratorske cDNA.

Redčitve kalibratorske cDNA	Logaritmirana vrednost redčitve	Povprečne vrednosti Ct
1/4	-0,60206	24,07384
1/4	-0,60206	
1/16	-1,20412	26,29487
1/16	-1,20412	
1/64	-1,80618	27,68351
1/64	-1,80618	
1/256	-2,40824	29,54296
1/256	-2,40824	

Dobljene povprečne vrednosti Ct za gen *SF3A1* smo nanegli na graf (slika 25) in iz naklona premice, ki povezuje točke, izračunali učinkovitost reakcije PCR (pregl. 11).



Slika 25: Povprečne vrednosti Ct pri pomnoževanju serijsko redčenih raztopin kalibratorske cDNA s parom oligonukleotidov, specifičnih za gen SF3A1. Fragment gena SF3A1 smo pomnožili z reakcijo qPCR in analizirali učinkovitost pomnoževanja, kot je navedeno pri sliki 9.

Preglednica 11: Učinkovitost reakcij PCR za uporabljene gene.

Učinkovitost reakcij PCR za vsak gen smo izračunali po enačbi 4.2 na osnovi naklona premic na slikah 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25.

Geni	Učinkovitost reakcij PCR (E)
<i>ABCD1</i>	$10^{(-1/-2,9453)} = \mathbf{2,18}$
<i>LDLR</i>	$10^{(-1/-3,2576)} = \mathbf{2,03}$
<i>FABP1</i>	$10^{(-1/-2,9892)} = \mathbf{2,16}$
<i>FABP2</i>	$10^{(-1/-3,4699)} = \mathbf{1,94}$
<i>FABP3</i>	$10^{(-1/-3,2889)} = \mathbf{2,01}$
<i>FABP4</i>	/
<i>FABP5</i>	$10^{(-1/-2,9199)} = \mathbf{2,20}$
<i>FABP6</i>	$10^{(-1/-3,1975)} = \mathbf{2,05}$
<i>FABP7</i>	/
<i>TOP1</i>	$10^{(-1/-3,0604)} = \mathbf{2,12}$
<i>SF3A1</i>	$10^{(-1/-2,9559)} = \mathbf{2,18}$

Učinkovitosti reakcij PCR, razen v primeru genov *FABP4* in *FABP7*, katerih izražanja nismo zaznali, se gibljejo v območju od 1,9 do 2,2, kar je v mejah sprejemljive učinkovitosti. Talilne krivulje se med seboj prekrivajo, ni večjih odstopanj, pojavlja se en glavni vrh, kar pomeni, da začetni oligonukleotidi ne tvorijo dimerov in pomnožijo le tarčne fragmente.

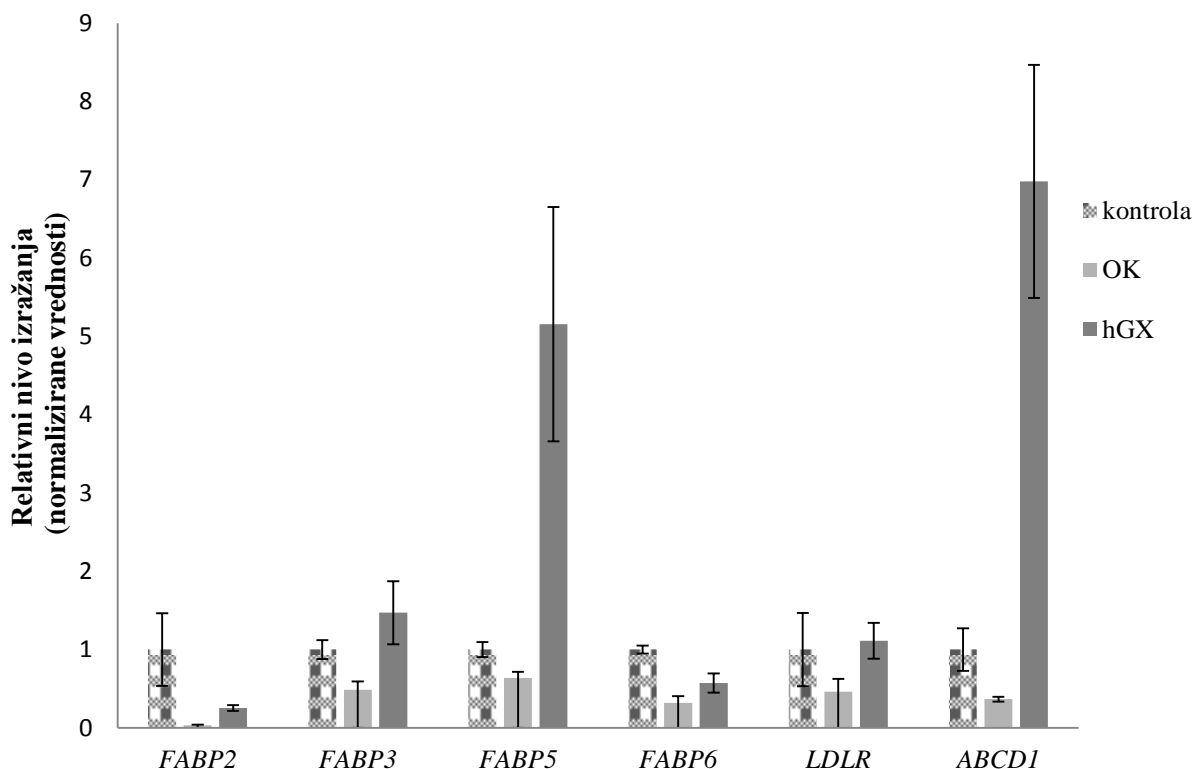
Po opravljeni validaciji oligonukleotidnih parov smo začeli s testiranjem izražanja tarčnih genov v celicah, tretiranih z rekombinantno hGX in OK.

4.3. VPLIV hGX IN OK NA IZRAŽANJE GENOV POVEZANIH S TRANSPORTOM MK V CELICAH RAKA DOJKE

Z metodo kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR) smo primerjali izražanje genov, vpletenih v transport MK pri visoko invazivni celični liniji raka dojke MDA-MB-231. Na spodnjih dveh grafih (sliki 26 in 27) so prikazani rezultati poskusa, pri katerem smo celice MDA-MB-231 gojili 48 h v popolnem mediju ob dodatku hGX ali OK (slika 26), ter rezultati poskusa, pri katerem smo celice po 48 h gojenja v popolnem mediju ob dodatku hGX ali OK gojili še 24 h v mediju brez seruma (slika 27).

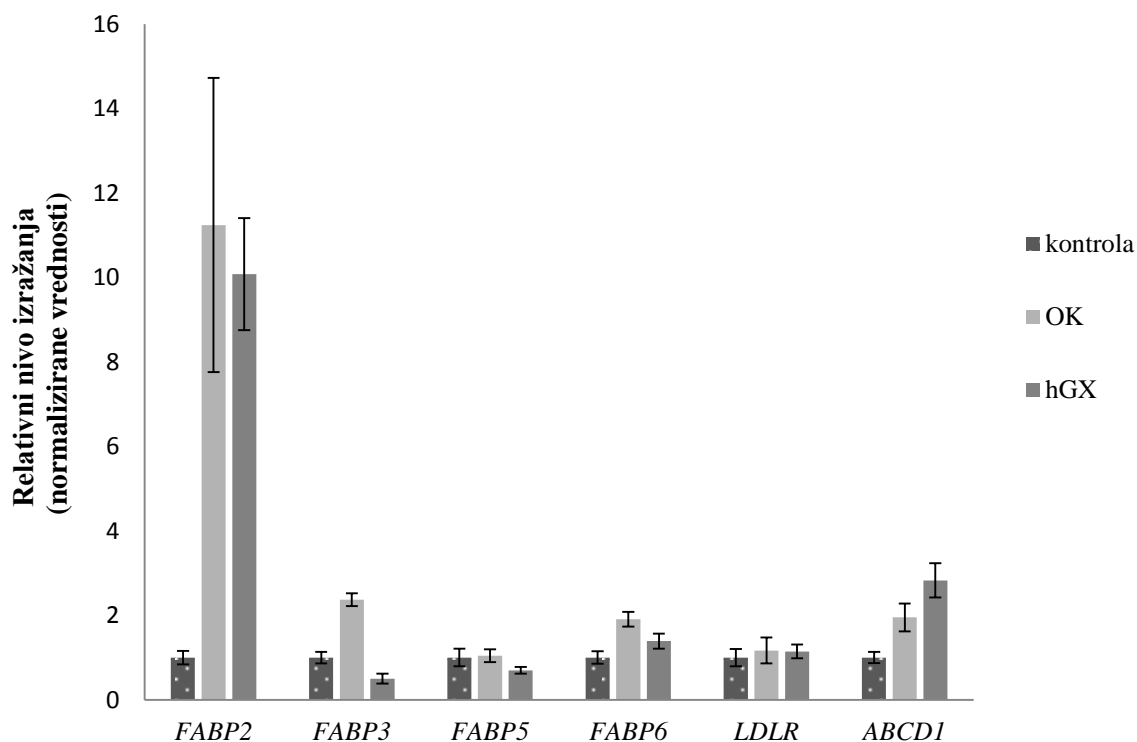
Rezultati na slikah 27 in 28 kažejo na relativno visoke napake, ki smo jih dobili pri končnem izračunu izražanja (po normalizaciji na dva referenčna gena in ob propagaciji napak v vsaki stopnji izračuna), ki bi jih lahko znižali le z dodatnimi ponovitvami poskusov in analiz qPCR. Statističnih testov zato v tem primeru nismo opravili (le-ti bi nam ob zanesljivejših rezultatih omogočili primerjavo tudi zelo majhnih razlik v izražanju,

npr. 1,5-kratne razlike), temveč smo pri interpretaciji rezultatov kot bistvene spremembe sprejeli le tiste z vsaj 2-kratno razliko v izražanju.



Slika 26: Vpliv hGX in OK na izražanje izbranih genov v proliferajočih celicah raka dojke. Celice raka dojke MDA-MB-231 smo gojili 48 h v popolnem mediju ob dodatku hGX ali OK, nato izolirali RNA in jo prepisali v cDNA. S pomočjo metode qPCR smo analizirali izražanje genov družine FABP ter genov *LDLR* in *ABCD1*. Na grafu so prikazane vrednosti s pripadajočimi standardnimi napakami (S.E.M.) dveh bioloških ponovitev poskusa.

Slika 26 kaže, da delovanje hGX na celice MDA-MB-231, ki smo jih gojili v optimalnih pogojih, ko intenzivno poteka sinteza novih LK, bistveno vpliva na izražanje genov *ABCD1*, *FABP2* in *FABP5*. Število zapisov mRNA za gen *ABCD1* v celicah MDA-MB-231 po tretiranju s hGX se je povečalo 7-krat. Podobno je delovanje hGX na celice MDA-MB-231 bistveno vplivalo na izražanje gena *FABP5*, in sicer se je število zapisov mRNA povišalo 5-krat. Prav nasprotno, delovanje hGX je negativno vplivalo na izražanje gena *FABP2*, saj se je število zapisov mRNA po tretiranju s hGX 4-krat manjše. Zanimivo je, da OK pri tem poskusu ni povzročila bistvenih sprememb v izražanju omenjenih ali drugih genov.



Slika 27: Vpliv LK na izražanje izbranih genov v celicah raka dojke pri stradanju. V tem poskusu smo celice raka dojke MDA-MB-231 gojili 48 h v kompletnem mediju ob dodatku hGX ali OK (faza povišane sinteze LK), jih nato izpostavili mediju brez seruma za 24 h (stradanje celic, pri katerem se med drugim inducira razgradnja oz. lipoliza LK), izolirali RNA in jo prepisali v cDNA. S pomočjo metode qPCR smo analizirali izražanje izbranih genov. Prikazane so vrednosti s pripadajočimi standardnimi napakami (S.E.M.) dveh bioloških ponovitev poskusa.

Iz slike 27 je razvidno, da delovanje hGX na celice MDA-MB-231, v katerih smo inducirali tvorbo LK v obdobju 48 h gojenja v kompletnem mediju v prisotnosti encima, nato pa sprožili njihovo razgradnjo pri gojenju v mediju brez seruma in brez hGX, privede do sprememb v izražanju genov *ABCD1*, *FABP2* in *FABP3*. Delovanje hGX je pozitivno vplivalo na izražanje genov *FABP2* in *ABCD1*, saj se je nivo njihovega izražanja povečal 10-krat oz. 3-krat, medtem ko se je število zapisov mRNA za gen *FABP3* znižalo 2-krat. Dodatek OK k celicam MDA-MB-231 pa je povečal izražanje genov *FABP2* in *FABP3* 12-krat oz. 2,4-krat.

5. RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

5.1. DETEKCIJA LIPIDNIH KAPLJIC S PRETOČNO CITOMETRIJO PRI CELIČNI LINIJI MDA-MB-231

S pomočjo metode pretočne citometrije smo dokazali biološko aktivnost encima hGX in potrdili hipotezo, da število LK v celicah raka dojke MDA-MB-231 naraste, ko so izpostavljene hGX. OK nam je služila kot pozitivna kontrola, saj spada med najbolj pogoste MK, ki se nahajajo v celični membrani in je hkrati eden glavnih produktov encimskega delovanja hGX na celične membrane (Murakami in sod., 2011). Glede na predhodne rezultate in rezultate naših poskusov lahko sklepamo, da tako OK kot encimsko delovanje hGX izzoveta nastanek LK v visoko invazivnih celicah raka dojke linije MDA-MB-231.

5.2. IZRAŽANJE GENOV V CELICAH MDA-MB-231

S pomočjo metode qPCR smo analizirali izražanje genov družine FABP ter genov *ABCD1* in *LDLR*. Pri tem smo izbrali ali načrtali ustrezne oligonukleotidne pare, jih validirali z določanjem specifičnosti in ugotavljanjem učinkovitosti reakcij qPCR. Validacijo so uspešno prestali oligonukleotidni pari za detekcijo genov *ABCD1*, *FABP1*, *FABP2*, *FABP3*, *FABP5*, *FABP6* in *LDLR*. Zapisov cDNA za gena *FABP4* in *FABP7* nismo mogli zaznati niti v celicah MDA-MB-231 niti v kalibratorski cDNA, tako da je ustreznost oligonukleotidnih parov za omenjena gena vprašljiva. Z uporabo validiranih oligonukleotidnih parov smo ugotovili, da bi lahko bili v delovanje hGX na celice raka dojke vpleteni geni *ABCD1*, *FABP2*, *FABP3* in *FABP5*. Slednji rezultati zahtevajo dodatno potrditev v nadaljnjih študijah, so pa vsekakor izredno zanimivi in prvič povezujejo delovanje genov iz družine *FABP* in gena *ABCD1* z učinki sPLA₂ na sesalske celice.

Sesalski FABP vežejo dolge verige MK, med katerimi je »jetrni« FABP (*L-FABP*, *FABP1*) edini član družine FABP, ki prenese MK do membran s pomočjo difuzije. Na dolge verige nasičenih MK se veže z večjo afiniteto kot na ostale MK. Prejšnje študije so pokazale, da je ekspresija *L-FABP* bistveno povečana v neoplastičnih celicah karcinoma ledvičnih celic (Storch in Corsico, 2008, cit. po Li in sod., 2014). Li J in sodelavci (2014) so potrdili povišano ekspresijo gena *FABP1* pri celicah raka dojke, celične linije MCF-7-MEK5. Pri ugotavljanju izražanja gena *FABP1* smo pri obeh poskusih, tako na celicah MDA-MB-231, gojenih v serumu, kot na stradanih celicah, dobili zelo visoke vrednosti Ct, kar nakazuje na to, da se gen v tej celični liniji ne izraža. Pred tem smo potrdili njegovo izražanje v kalibratorski cDNA ter ustrezno specifičnost in učinkovitost oligonukleotidnega para.

Za gen *FABP2*, ki se najbolj izraža v epitelijskih celicah črevesja, je značilen polimorfizem, ki ga povezujejo s povečano oksidacijo MK in inzulinsko rezistenco (IR) (Baier LJ in sod., 1995). Menijo, da je *FABP2* vpleten v znotrajcelični metabolizem in transport dolgih MK (Albala in sod., 2006; cit. po Hu X in sod., 2013). Različne variacije gena *FABP2* lahko vplivajo na količino prostih MK (»free fatty acids«; FFA), kar lahko

privede do spodbuditve sinteze TAG. Povečanje količine TAG privede do inhibicije izločanja adiponektina (von Eynatten M in sod., 2006; cit. po Hu X in sod., 2013). Povečanje sinteze TAG stimulira izločanje TNF- α , kar prav tako lahko negativno vpliva na nivo adiponektina (Park M in sod., 2011; cit. po Hu X in sod., 2013). Chamberlain in sodelavci (2009; cit. po Hu X in sod., 2013) so ugotovili, da se z variacijami *FABP2* v celicah človeške celične linije raka debelega črevesja poveča izločanje TAG *in vitro*. Prav tako so ugotovili, da lahko variacije *FABP2* vplivajo na okvare v kopičenju lipidov in so povezane z rezistenco na insulin. Weiss in sodelavci (2002; cit. po Hu X in sod., 2013) so ugotovili, da približno polovica študij kaže na povezavo med alelom *FABP2* Thr54 in visoko toleranco na glukozo ali IR. V treh od štirih študij na Japonskem so našli povezavo med IR in alelom *FABP2* Thr54. Sinteza TAG vpliva na inhibicijo izločanja hormona adiponektina, ki ga izločajo adipociti, ki se nahajajo v maščobnem tkivu, med drugim v tkivu dojke. Adiponektin pa uravnava količino glukoze v krvi in vpliva na oksidacijo MK (Qiao in sod., 2008). Rezultati naše analize v celicah raka dojke kažejo, da je izražanje gena *FABP2* relativno nizko (vrednosti Ct so znašale približno 30). Tekom s strani hGX in OK inducirane sinteze LK v proliferajočih celicah je bil opazen trend dodatnega nižanja izražanja *FABP2*. Presenetljivo pa je dejstvo, da v času gojenja celic brez seruma, v katerih smo predhodno s hGX in OK inducirali tvorbo LK, pride do bistvenega povišanega izražanja gena *FABP2* v primerjavi s kontrolnimi celicami. Iz tega lahko sklepamo, da je protein FABP2 vpleten predvsem v transport MK pri lipolizi oz. sproščanju MK iz že tvorjenih LK ter da najverjetneje ne sodeluje pri sintezi TAG in tvorbi LK v celicah raka dojke.

Člana družine citoplazemskih FABP, FABP3 in FABP7, sta vpletena v absorpcijo MK. FABP3 deluje predvsem v srčnih miocitih, medtem ko je FABP7 dejaven predvsem pri proliferajočih in invazivnih celicah melanoma (Slipicevic in sod., 2008, cit. po Bensaad in sod., 2014), povišano ekspresijo pa so ugotovili tudi pri glioblastomu (Kaloshi in sod., 2007, cit. po Bensaad in sod., 2014). Pri hipoksiji, ko je zmanjšana absorpcija MK, je delovanje FABP3 in FABP7 povezano s kopičenjem LK, ki omogoča zaščito pred ROS, s tem pa preživetje rakavih celic. Hipoksija igra pomembno vlogo pri reprogramiranju metabolizma v celicah tumorja, saj jo povezujejo z zmanjšano sintezo MK, rakave celice pa hitreje porabljajo glukozo v primerjavi z normalnimi (Hanan in Weinberg, 2011, cit. po Bensaad in sod., 2014). Na podlagi naših rezultatov smo se odločili, da začetne oligonukleotide za tarčni gen *FABP7* ne bomo uporabili za analizo, saj smo pri preverjanju ugotovili, da se ne izraža v kalibratorski cDNA in celični liniji MDA-MB-231. Obstaja pa možnost, da začetni oligonukleotidi niso bili dovolj specifični, vendar tega pri našem delu nismo dodatno raziskali. Rezultati analize izražanja *FABP3* v celicah MDA-MB-231 pa kažejo, da hGX in OK bistveno ne vplivata na njegovo izražanje, ko celice gojimo v kompletnem mediju. Ob stradanju celic, ko prevladuje lipoliza predhodno tvorjenih LK, pa smo ugotovili, da delovanje hGX vodi k znižanju izražanja gena *FABP3*, OK pa k

povišanju le-tega. Ti rezultati so zelo zanimivi in nakazujejo na različno vlogo *FABP3* pri transportu OK ali drugih MK (npr. polinenasičenih MK), ki jih sprosti hGX.

Na podlagi preučevanja interakcij rakavih celic in adipocitov so proteinu *FABP4* pripisali vlogo ključnega mediatorja pri uravnavanju lipolize in mediaciji prenosa lipidov iz adipocitov v tumorske celice. Pokazali so namreč, da adipociti pospešijo metastaziranje raka na jajčniku in zagotavljajo energijo, v obliki MK, za hitrejšo rast tumorja (Nieman in sod., 2011). Pri našem poskusu nismo uporabili začetnih oligonukleotidov za tarčni gen *FABP4*, saj smo na podlagi rezultatov ugotovili, da se ne izraža v kalibratorski cDNA in celični liniji MDA-MB-231. Obstaja verjetnost, da uporabljeni začetni oligonukleotidi niso dovolj specifični, česar pa pri tem delu nismo mogli potrditi ali ovreči.

Pri povečanem izražanju epidermalnega proteina *FABP5* pride do transporta odvečnih količin MK v jedro, kjer delujejo kot signalne molekule in stimulirajo receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov γ ($\text{PPAR}\gamma$). Aktiviran $\text{PPAR}\gamma$ spremeni izražanje tarčnih regulatornih genov, kar vodi k povečani agresivnosti in rasti tumorjev, nižjem nivoju apoptoze in povečani angiogenezi (Bao in sod., 2013). Pri analizi rezultatov naših poskusov smo ugotovili, da delovanje hGX bistveno poveča izražanje gena *FABP5* v proliferajočih celicah MDA-MB-231, medtem ko OK nanj bistveno ne vpliva. Ob stradanju celic pa smo ugotovili, da hGX ne vpliva na izražanje gena *FABP5*, kar kaže na odsotnost povezave med lipolizo in genom *FABP5*. Iz tega lahko sklepamo, da je povečano izražanje gena *FABP5* povezano z vlogo proteina *FABP5* pri transportu MK, ki jih sprošča hGX in so pomembne bodisi pri sintezi TAG in tvorbi LK bodisi pri oksidaciji MK (Pucer in sod., 2013) v proliferajočih celicah raka dojke.

Gen *FABP6* sodeluje pri znotrajceličnem transportu žolčnih kislin v epiteliju tankega črevesja in je potencialni biomarker pri raku na debelem črevesju (Ohmachi in sod., 2006). Glede na rezultate poskusov pri proliferajočih in stradanih celicah, tretiranih s hGX in OK, nismo ugotovili bistvenih sprememb v izražanju gena *FABP6*.

Protein *ABCD1*, ki ga kodira gen *ABCD1*, uvrščamo v družino transportnih proteinov ABC (ATP-vezavni transporterji), poddružino D (ALD). Protein *ABCD1* (imenovan tudi ALD) se nahaja v membrani peroksisomov in ima pomembno vlogo v procesu β -oksidacije. Njegovo pomanjkanje povzroči kopičenje VLCFA. Je eden od štirih peroksisomskih transporterjev MK in acil-CoA v organele. Dosedanje študije kažejo na to, da mutacija gena *ABCD1*, ki kodira peroksisomski transporter ALD, povzroči na X-vezano dedno nevrodegenerativno bolezen, adenolevkodistrofijo. Molekularni mehanizmi, ki povzročijo klinične znake bolezni še vedno niso pojasnjeni (Wiesinger in sod., 2013). Ugotovili smo, da delovanje hGX na celice MDA-MB-231 v fazi pospešene rasti in sinteze LK privede do bistvenega povišanja izražanja gena *ABCD1*, ob naknadnem stradanju celic v odsotnosti hGX pa je to povišanje nekoliko nižje. Ti rezultati prvič razkrivajo povezavo med hGX in peroksisomsko oksidacijo MK ter kažejo na pomen procesa pri delovanju hGX še posebej pri proliferajočih celicah oz. ob intenzivni sintezi LK. Nadaljnje študije

bodo pokazale, ali je učinek povezan le z morebitnim preprečevanjem lipotoksičnosti sproščenih MK ali pa z tudi učinki na biosintezne poti.

Gen *LDLR* kodira protein iz družine membranskih receptorjev za lipoproteine nizke gostote (receptorji LDL). Receptorji na zunanji površini celic vežejo delce LDL, ki prenašajo holesterol po krvi, in omogočajo njegov vnos v celice. Lipoproteini se skupaj z receptorjem internalizirajo z endocitozo in v celici sprostijo holesterol, ki ga celica porabi, shrani ali izloči. Po končanem transportu se receptorji vrnejo nazaj na površino, kjer lahko ponovno vežejo lipoproteine (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LDLR>). Dosedanje študije, narejene na družini LDLR, kažejo na povezavo med izražanjem receptorjev oksidiranih lipoproteinov (Ox-LDL) nizke gostote (OLR1) in višjim stadijem raka prostate in metastaz v limfnih vozlih. Prekomerno izražanje OLR1 je povezano z večjim številom metastaz. Ox-LDL pospešuje proliferacijo, migracijo in invazivnost celic raka prostate ter stimulirajo izražanje OLR1 celic raka prostate (Wan in sod., 2015). Naši rezultati, tako v proliferajočih kot v stradanih celicah MDA-MB-231, kažejo, da hGX ali OK nimata bistvenega vpliva na izražanje gena *LDLR*.

6. SKLEPI

S pretočno citometrijo smo na podlagi barvanja celic dokazali biološko aktivnost encima hGX in potrdili predhodno pridobljene rezultate, da OK in encimsko delovanje hGX vplivata na nastanek LK pri visoko invazivnih celicah raka dojke linije MDA-MB-231.

S pomočjo metode qPCR smo analizirali vpliv hGX in OK na izražanje genov družine *FABP*, gena *ABCD1* in gena *LDLR* v celicah MDA-MB-231 pri optimalnih pogojih gojenja, ko intenzivno poteka sinteza LK, in ob naknadnem stradanju celic, ko prevladuje lipoliza oz. razgradnja sintetiziranih LK. Ugotovili smo:

- Geni *FABP1*, *FABP4* in *FABP7* se v celični liniji MDA-MB-231 ne izražajo.
- Do povišanega izražanja gena *FABP2* pride predvsem pri pogojih razgradnje LK, kar kaže na vlogo encima pri lipolizi oz. sproščanju in transportu MK iz že tvorjenih LK.
- hGX in OK ne vplivata na izražanje gena *FABP3* ob sintezi LK, vplivata pa različno na njegovo izražanje ob razgradnji LK.
- Delovanje hGX bistveno poveča izražanje gena *FABP5* v proliferajočih celicah MDA-MB-231, ne pa tudi ob stradanju celic, kar kaže na vlogo proteina FABP5 pri transportu MK, ki jih sprošča hGX, in da so le-te pomembne bodisi pri sintezi TAG in tvorbi LK bodisi pri oksidaciji MK v proliferajočih celicah raka dojke.
- hGX ali OK ne vplivata bistveno na izražanje gena *LDLR*.
- Delovanje hGX vodi do povišanega izražanja gena *ABCD1*, tako pri gojenju celic v optimalnih pogojih kot pri naknadnem stradanju celic, kar prvič razkriva morebitno povezavo med hGX in peroksisomsko oksidacijo MK.

Naši rezultati torej kažejo, da so v spremembe lipidnega metabolizma oz. transport MK ob tvorbi s strani hGX-induciranih LK vpletena proteina ABCD1 in FABP5, pri razgradnji takšnih LK pa proteini ABCD1, FABP2 in FABP3.

7. POVZETEK

Človeška sPLA₂ iz skupine X (hGX) deluje na membrane mirujočih in proliferajočih celic, pri čemer se sproščajo maščobne kisline (MK), ki se kopičijo v trigliceridih, shranjenih v lipidnih kapljicah (LK) v citosolu celic. Ti učinki hGX so v visoko invazivnih celicah raka dojke MDA-MB-231 povezani s pospešeno proliferacijo celic in s preprečevanjem celične smrti ob gojenju celic v odsotnosti seruma. Prav tako ima oleinska kislina, eden glavnih produktov encimskega delovanja sPLA₂, podobne učinke na proliferacijo in preživetje celic. Molekularni mehanizmi, ki omogočajo transport MK v celici in vodijo do tvorbe s sPLA₂-induciranih LK, oz. sodelujejo pri sproščanju MK iz LK ob njihovi razgradnji, niso znani. V tem delu smo s pomočjo metode qPCR analizirali vpliv hGX in OK na izražanje genov, povezanih s prenosom MK v celicah MDA-MB-231, in sicer pri optimalnih pogojih gojenja, ko intenzivno poteka sinteza LK, in ob naknadnem stradanju celic, ko prevladuje lipoliza, tj. razgradnja sintetiziranih LK. Ob tem smo vzpostavili metodo qPCR za detekcijo izražanja genov družine *FABP*, ki kodirajo različne prenašalce prostih MK v celici, gena *ABCD1*, pomembnega za transport dolgoverižnih MK v peroksisome, in gena *LDLR*, ključnega za internalizacijo lipoproteinskih delcev nizke gostote (LDL). Rezultati kažejo, da delovanje hGX na proliferajoče celice MDA-MB-231, ko encim inducira tvorbo novih LK, vpliva na izražanje genov *ABCD1*, *FABP2* in *FABP5*. Analiza izražanja genov pri stradanju celic (oz. razgradnji LK) pa je pokazala na spremembe v izražanju genov *ABCD1*, *FABP2* in *FABP3*. Glede na ugotovljeno povišano ali znižano izražanje posameznega gena sklepamo, da sta v spremembe lipidnega metabolizma oz. transport MK pri tvorbi s strani hGX-induciranih LK vpletena proteina *ABCD1* in *FABP5*, pri razgradnji takšnih LK pa *ABCD1*, *FABP2* in *FABP3*. Naši rezultati zahtevajo dodatno potrditev v naslednjih študijah, vendar pa prvič povezujejo delovanje genov iz družine *FABP* in gena *ABCD1* z učinki sPLA₂ na sesalske celice.

8. VIRI

- Baier L.J., Sacchettini J.C., Knowler W.C., Eads J., Paolisso G., Tataranni P.A., Mochizuki H., Bennett P.H., Bogardus C., Prochazka M. 1995. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 95, 3: 1281–1287
- Balendiran G.K., Schnutgen F., Scapin G., Borchers T., Xhong N., Lim K., Godbout R., Spener F., Sacchettini J.C. 2000. Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 35: 27045–27054
- Bensaad K., Favaro E., Schulze A., Harris L.A. 2014. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Reports*, 9, 1: 349–365
- Bao Z., Malki I.M., Forootan S.S., Adamson J., Forootan S.F., Chen D., Foster S.C., Rudland S.P., Ke Y. 2013. A novel cutaneous fatty acid-binding protein-related signaling pathway leading to malignant progression in prostate cancer cells. *Genes Cancer*, 4, 7-8: 297–314
- Brglez V., Lambeau G., Petan T. 2014a. Secreted phospholipases A₂ in cancer: Diverse mechanisms of action. *Biochimie*, 107, part A: 114–123
- Brglez V., Pucer A., Pungercar J., Lambeau G., Petan T. 2014b. Secreted phospholipases A₂ are differentially expressed and epigenetically silenced in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445, 1: 230–235
- Chmurzynska A. 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics*, 47, 1: 39–48
- Currie E., Schulze A., Zechner R., Walther T.C., Farese R.V. 2013. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metabolism*, 18, 2: 153–161
- Finn P.F., Dice J.F. 2006. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition*, 22, 7-8: 830–844
- Fujie S., Iemitsu M., Murakami H., Sanada K., Kawano H., Gando Y., Kawakami R., Miyachi M. 2013. Higher cardiorespiratory fitness attenuates arterial stiffening associated with the Ala54Thr polymorphism in FABP2. *Physiological Genomics*, 45, 6: 237–242

- Furuhashi M., Hotamisligil S.G. 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 6: 489–503
- Genetics Home Reference 2015
<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABCD1> (12. nov. 2015)
- Greenberg A.S., Coleman R.A., Kraemer F.B., McManaman J.L., Obin M.S., Puri V., Yan Q.W., Miyoshi H., Mashek D.G. 2011. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 121, 6: 2102–2110
- Goto Y., Matsuzaki Y., Kurihara S., Shimizu A., Okada T., Yamamoto K., Murata H., Takata M., Aburatani H., Hoon D.S.B., Saida T., Kawakami Y. 2006. A new melanoma antigen fatty acid-binding protein 7, involved in proliferation and invasion, is a potential target for immunotherapy and molecular target therapy. *Cancer Research*, 66, 8: 4443
- Guan Y.F., Zhang Y.H., Breyer R.M., Davis L., Breyer M.D. 1999. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia*, 1, 4: 330–339
- Hauerland N.H., Spener F. 2004. Fatty acid-binding proteins - insights from genetic manipulations. *Progress In Lipid Research*, 43, 4: 328–349
- Hellems J., Mortier G., De Paepe A., Speleman F., Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8: R19
- Hu X., Yuan P., Yan J., Feng F., Li X. in sod. 2013. Gene polymorphisms of ADIPOQ +45T.G, UCP2 -866G.A, and FABP2 Ala54Thr on the risk of colorectal cancer: A matched case-control study. *PLoS One*, 8, 6: e67275
- Jeon S.M, Chandel N.S, Hay N. 2012. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*, 485: 661–665
- Lambeau G., Gelb M.H. 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂. *Annual Review of Biochemistry*, 77: 495–520
- Li J., Dong L., Wei D., Wang X., Zhang S., Li H. 2014. Fatty acid synthase mediates the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. *International Journal of Biological Sciences*, 10, 2: 171–180

- Li X., Shridas P., Forrest K., Bailey W., Webb N.R. 2010. Group X secretory phospholipase A₂ negatively regulates adipogenesis in murine models. *The FASEB Journal*, 24, 11: 4313–4324
- Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D., Jaswal J.S., Stanley W.C. 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological Reviews*, 90, 1: 207–258
- Mounier C.M., Wendum D., Greenspan E., Fléjou J.F., Rosenberg D.W., Lambeau G. 2008. Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A₂ in human colorectal adenocarcinomas: sPLA₂-III as a biomarker candidate. *British Journal of Cancer*, 98, 3: 587–595
- Murakami M., Taketomi Y., Miki Y., Sato H., Yamamoto K., Lambeau G. 2014. Emerging roles of secreted phospholipases A₂ enzymes: the 3rd edition. *Biochimie*, 107, Part A: 105–113
- Murakami M., Taketomi Y., Girard C., Yamamoto K., Lambeau G. 2010. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie*, 92, 6: 561–582
- Murakami M., Lambeau G. 2013. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: An update. *Biochimie*, 95, 1: 43–50
- Murakami M., Taketomi Y., Sato H., Yamamoto K. 2011a. Secreted phospholipase A₂ revisited. *The Journal of Biochemistry*, 150, 3:233–255
- Murakami M., Taketomi Y., Miki Y., Sato H., Hirabayashi T., Yamamoto K. 2011b. Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans. *Progress In Lipid Research*, 50, 2: 152–192
- Nieman M. K., Kenny A.H., Penicka V.C., Ladanyi A., BuellGutbrod R., Zillhardt R.M., Romero L.I., Carey S.M., Mills B.G., Hotamisligil S.G., Yamada D.S., Peter E.M., Gwin K., Lengyel E. 2011. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature Medicine*, 17: 1498–1503
- Ohsaki Y., Suzuki M., Fujimoto T. 2014. Open questions in lipid droplet biology. *Chemistry & Biology*, 21, 1: 86–96
- Ohmachi T., Inoue H., Mimori K., Tanaka F., Sasaki A., Kanda T., Fujii H., Yanaga K., Mori M. 2006. Fatty acid binding protein 6 is overexpressed in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 12, 17: 5090–5095
- Pike S.L., Smift L.A., Croteau J.N., Ferrick A.D., Wu M. 2011. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen

- species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1807, 6: 726–734
- Plösch T., Gellhaus A., van Straten E.M.E., Wolf N., Huijkman N.C.A., Schmidt M., Dunk C.E., Kuipers F., Winterhager E. 2010. The liver X receptor (LXR) and its target gene ABCA1 are regulated upon low oxygen in human trophoblast cells: A reason for alterations in preeclampsia? *Placenta*, 31, 10: 910–918
- Pucer A., Brglez V., Payré C., Pungerčar J., Lambeau G., Petan T. 2013. Group X secreted phospholipase A(2) induces lipid droplet formation and prolongs breast cancer cell survival. *Molecular Cancer*, 12, 1: 111
- Qiao L., Zou C., Van der Westhuyzen D.R., Shao J., 2008. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes*, 57, 7: 1824–1833
- Rambold S.A., Cohen S., Lippincott-Schwartz J. 2015. Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Developmental Cell*, 32, 6: 678–692
- Santos C.R., Schulze A. 2012. Lipid metabolism in cancer. *FEBS Journal*, 279, 15: 2610–2623
- Sato H., Isogai Y., Masuda S., Taketomi Y., Miki Y., Kamei D., Hara S., Kobayashi T., Ishikawa Y., Ishii T., Ikeda K., Taguchi R., Ishimoto Y., Suzuki N., Yokota Y., Hanasaki K., Suzuki-Yamamoto T., Yamamoto K., Murakami M. 2011. Physiological roles of group X-secreted phospholipase A₂ in reproduction, gastrointestinal phospholipid digestion, and neuronal function. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 11632–11648
- Sato H., Taketomi Y., Ushida A., Isogai Y., Kojima T., Hirabayashi T., Miki Y., Yamamoto K., Nishito Y., Kobayashi T., Ikeda K., Taguchi R., Hara S., Ida S., Miyamoto Y., Watanabe M., Baba H., Miyata K., Oike Y., Gelb M.H., Murakami M. 2014. The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell Metabolism*, 20, 1: 119–132
- Schulz H. 2002. Chapter 5 Oxidation of fatty acids in eukaryotes. 4th ed. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 36: 127–150
- Shridas P., Bailey W.M., Boyanovsky B.B., Oslund R.C., Gelb M.H., Webb N.R. 2010. Group X secretory phospholipase A₂ regulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in mouse adrenal glands. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 26: 20031–20039

- Singer G.A., Ghomashchi F., Le Calvez C., Bollinger J., Bezzine S., Rouault M., Sadilek M., Nguyen E., Lazdunski M., Lambeau G., Gelb M.H. 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 50: 48535–48549
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: 34.1–34.11
- Veerkamp J.H., van Moerkerk H.T. 1993. Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 123, 1: 101–106
- Walther T.C., Farese R.V. 2012. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 1: 687–714
- Wan F., Qin X., Zhang G., Lu X., Zhu Yao., Zhang H., Dai B., Shi G., Ye D. 2015. Oxidized low-density lipoprotein is associated with advanced-stage prostate cancer. *Tumor Biology*, 36, 5: 3573–3582
- Ward P.S., Thompson C.B. 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, 21, 3: 297–308
- Weiss P.E., Brown D.M., Shuldiner R.A., Hagberg M.J. 2002. Fatty acid binding protein-2 gene variants and insulin resistance: gene and gene-environment interaction effects. *Physiological Genomics*, 10, 3: 145–157
- Wiesinger C., Kunze M., Regelsberger G., Forss-Petter S., Berger J. 2013. Impaired very long-chain acyl-CoA β -oxidation in human X-linked adrenoleukodystrophy fibroblasts is a direct consequence of ABCD1 transporter dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 26: 19269–19279
- Wrighton K.H. 2015. Fatty acids on move. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16: 204–205
- Zanotti G. 1999. Muscle fatty acid-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441, 2–3: 94–105
- Zechner R., Zimmermann R., Eichmann T.O., Kohlwein S.D., Haemmerle G., Lass A., Madeo F. 2012. FAT SIGNALS—Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metabolism*, 15, 3: 279–291