

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ana VONČINA

**ŠTUDIJ PROMOTORJEV HOLESTEROGENIH GENOV V  
RAZLIČNIH SESALSKIH CELIČNIH LINIJAH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE STUDY OF HOLESTEROGENIC GENE PROMOTERS IN  
DIFFERENT MAMMALIAN CELL LINES**

GRADUATION THESIS  
University studies

November 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za molekularno biologijo, Inštitutu za biokemijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani ter Centru za funkcijsko genomiko in biočipe, Inštituta za Biokemijo, pod vodstvom prof. dr. Damjane Rozman.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Damjano Rozman.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina Sepčič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Damjana Rozman  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

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

Član: prof. dr. Gregor Anderluh  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo izdelala v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 12.november 2007

Ana Vončina

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 577.2:599(043.2)=163.6  
KG CYP51/COPUFA/ICER/HMGCR  
KK XII, 58 str.,  
AV VONČINA, Ana  
SA ROZMAN, Damjana (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2007  
IN ŠTUDIJ PROMOTORJEV HOLESTEROGENIH GENOV V RAZLIČNIH  
SESALSKIH CELIČNIH LINIJAH  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XII, 60 str., 9 pregl., 21 sl. 55 vir  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Biosinteza holesterola je v telesu natančno uravnavana preko dveh signalnih poti: s steroli-posredovane signalne poti in od cAMP-odvisne signalne pot. Pomembna encima, ki sodelujeta pri biosintezi holesterola, sta HMGCR (3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A reduktaza) in CYP51 (lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaza). Biosinteza holesterola se prilagaja potrebam telesa s pomočjo signaliziranja, ki vključuje uravnavanje z mehanizmom negativne povratne zanke. Namen diplomskega dela je bil izbrati ustrezno metodo za permeabilizacijo membran pri transfekcijah v izbrane celične linije ter preveriti vpliv s steroli- in s cAMP- posredovane signalne poti na izražanje *HMGCR* z bližnjega promotorja. Pokazali smo, da je uporaba CaCl<sub>2</sub> najbolj ustrezna metoda za permeabilizacijo membran pri transfekcijah in da s steroli-posredovana signalna pot prevladuje pri izražanju *HMGCR* v celični liniji JEG3. Preverili smo tudi, ali se *CYP51* v različnih celičnih linijah različno odziva na dva dejavnika, ki inhibirata njegovo izražanje: a) represor ICER, ki sodeluje v od cAMP-odvisni signalni poti in b) gojišče bogato z lipidi, ki onemogoča tvorbe aktivne oblike transkripcijskih faktorjev SREBP in s tem zavira prepisovanje gena. Pokazali smo tudi, da ima gojišče bogato z lipidi najbolj inhibitorni vpliv na izražanje gena *CYP51* v celičnih linijah Y1, HepG2 in JEG3 ter da se poročevalec *CYP51* v celični liniji SH-SY5Y ne odziva na noben inhibitorni dejavnik. Pri celicah Y1 in delno tudi HepG2 pa smo opazili aditivni inhibitorni učinek represorja ICER in z lipidi bogatega gojišča. Rezultati prispevajo k razumevanju od sterolov- in od cAMP-odvisnih signalnih poti v različnih tkivih in sesalskih vrstah, kot tudi k proučevanju izražanja holesterogenih genov v različnih celičnih linijah.

## KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 577.2:599(043.2)=163.6  
CX CYP51/COPUFA/ICER/HMGCR  
CC  
AU VONČINA, Ana  
AA ROZMAN, Damjana (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2007  
TI THE STUDY OF HOLESTEROGENIC GENE PROMOTERS IN DIFFERENT MAMMALIAN CELL LINES  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XII, 60 p., 9 tab., 21 fig. 55 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The biosynthesis of cholesterol is accurately regulated in mammals by two signalling pathways: the sterol-dependent and the cAMP-dependent regulatory pathway. Two important enzymes involved in the biosynthesis of cholesterol are HMGCR (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase) and CYP51 (lanosterol-14  $\alpha$ -demethylase). Using the signalling pathways the biosynthesis of cholesterol can adapt to specific needs of the body. This is regulated by a negative feed-back control loop. The aim of this graduation thesis was to select the appropriate method of plasmid transfection into selected cell lines and to determine the influence of the sterol-dependent and the cAMP-dependent regulatory pathway on the expression of *HMGCR* by its proximal promoter. We show that the most appropriate method for membrane permeabilization during transfections is use of  $\text{CaCl}_2$  and that the expression of *HMGCR* is under the influence of the sterol dependent regulatory pathway. We also examined the expression of *CYP51* in different cell lines after the addition of the inhibitory transcription factor ICER that plays a role in the cAMP-dependent pathway and/or lipid rich media that prevents the transformation of transcription factors SREBP into their active forms and consequently prevents the transcription of the *CYP51* gene. We show that the inhibitory effect of the lipid rich medium on the expression of *CYP51* is most apparent in Y1, HepG2 and JEG3 cell lines and that *CYP51* in SH-SY5Y is not responsive to the inhibition by either ICER or lipid rich media. In Y1 and partly in HepG2 cell line summation of the inhibitory effects of ICER and the lipid rich media was observed. Our findings contribute to understanding of the sterol-dependent and cAMP-dependent signalling pathways in different tissues and species, as well as in research of cholesterol biosynthesis gene expression in different cell lines.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC .....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	IX
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV .....	2
2.1 HOLESTEROL.....	2
2.1.1 Biointeza holesterola.....	3
2.1.2 Uravnavanje biosinteze holesterola .....	4
2.2 OKSISTEROLI.....	4
2.2.1 24-hidroksi-holesterol .....	5
2.2.2 25-hidroksi-holesterol .....	6
2.3 OD cAMP-ODVISNA SIGNALNA POT .....	6
2.4 S STEROLI-URAVNAVANA SIGNALNA POT .....	8
2.5 3-HIDROKSI-3-METIL-GLUTARIL KOENCIM A REDUKTAZA (HMGCR).....	10
2.5.1 Protein HMGCR .....	11
2.5.2 Uravnavanje aktivnosti HMGCR.....	11
2.6 LANOSTEROL-14A-DEMETILAZA (CYP51).....	12
2.6.1 Protein CYP51 .....	12
2.6.2 Gen <i>CYP51</i> .....	13
2.6.3 Promotor <i>CYP51</i> .....	13
2.7 CELIČNE KULTURE .....	14
2.7.1 Mišje celične linije:.....	15
2.7.1.1 Hepa1 .....	15
2.7.1.2 Y1.....	15
2.7.1.3 Mef3.....	16
2.7.2 Človeške celične linije .....	16
2.7.2.1 HepG2.....	16
2.7.2.2 HO 23.....	17
2.7.2.3 JEG3.....	18
2.7.2.4 SH-SY5Y .....	18
2.8 TRANSFEKCIJE.....	19

---

<b>3 NAMEN DELA IN HIPOTEZE</b> .....	<b>21</b>
<b>4 METODE IN MATERIALI</b> .....	<b>22</b>
4.1 DELO Z BAKTERIJAMI.....	22
4.1.1 Priprava tekočega LB (Luria-Bertani) gojišča.....	22
4.1.2 Priprava trdnega LB in LBA (Luria-Bertani z ampicilinom) gojišča.....	22
4.1.3 Priprava prekonočne kulture.....	23
4.1.4 Priprava trajne kulture bakterijskih celic.....	23
4.1.5 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic s plazmidi.....	23
4.1.6 Izolacija plazmidne DNA.....	23
4.2 DELO Z NESMRTNIMI CELIČNIMI KULTURAMI.....	24
4.2.1 Priprava gojišč.....	24
2.2.1.1 Gojišče DMEM.....	24
2.2.1.2 Popolno gojišče.....	24
4.2.2. Priprava PBS (fosfatni pufer).....	24
4.2.3 Priprava 2 x HBS.....	25
4.2.4 Priprava PLB (pasivni lizirajoči pufer).....	25
4.2.5 Odmrzovanje nesmrtnih celic.....	25
4.2.6 Zamrzovanje nesmrtnih celic.....	25
4.2.7 Precepljanje in vzdrževanje nesmrtnih celic.....	26
4.2.8 Transfekcije.....	26
4.2.8.1 Priprava transfekcijske mešanice.....	26
4.2.8.2 Postopek transfekcije.....	28
4.3 ANALIZA TRANSFEKCIJ.....	29
4.3.1 Priprava 10 x Mg raztopine.....	29
4.3.2 Priprava $\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$ .....	29
4.3.3 Priprava 1 x ONPG.....	29
4.3.4 Priprava luciferaznega reagenta.....	29
4.3.5 Priprava substrata za kontrolni plazmid <i>pRSV <math>\beta</math>-gal</i> .....	30
4.3.6 Analiza kontrolnega plazmida <i>pRSV <math>\beta</math>-gal</i> .....	30
4.3.7 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu (Bio-Rad).....	30
4.3.8 Analiza z uporabo luciferaznega poročevalskega sistema.....	31
4.3.9 Normalizacija.....	31
4.4 STATISTIČNA ANALIZA.....	32
4.5 UPORABLJENI PLAZMIDI.....	32
<b>5 REZULTATI</b> .....	<b>34</b>
5.1 IZBIRA METODE TRANSFEKCIJE.....	34
5.2 vpliv s steroli- in s cAMP-POSREDOVANE SIGNALNE POTI NA BLIŽNJI PROMOTOR <i>hMGCR</i> .....	35
5.3 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER (inducibilni od cAMP- odvisni zgodnji represor) na zaviranje izražanja gena <i>CYP51</i> .....	37
5.3.1 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) na zaviranje izražanja gena <i>CYP51</i> .....	37
5.3.2 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER na zaviranje izražanja gena <i>CYP51</i> .....	40

5.3.3 Aditivni vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER na zaviranje izražanja gena <i>CYP51</i> .....	43
5.4 PREVERJANJA PREŽIVELOSTI CELIC .....	46
<b>6 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>47</b>
6.1 IZBIRA METODE TRANSFEKCIJE.....	47
6.1 VPLIV S STEROLI- IN S cAMP-POSREDOVANE SIGNALNE POTI NA BLIŽNJI PROMOTOR <i>HMGCR</i> .....	48
6.3 VPLIV Z LIPIDI BOGATEGA GOJIŠČA (COPUFA) IN REPRESORJA ICER (INDUCIBILNI OD cAMP-ODVISNI ZGODNJI REPRESOR) NA ZAVIRANJE IZRAŽANJA GENA <i>CYP51</i> .....	48
6.3.1 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) na zaviranje izražanja gena <i>CYP51</i> .....	48
6.3.2 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER na zaviranje izražanja gena <i>CYP51</i> .....	50
6.3.3 Aditivni vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER na zaviranje izražanja gena <i>CYP51</i> .....	51
6.4 PREVERJANJE PREŽIVELOSTI CELIC.....	52
6.5 SKLEPI.....	52
<b>7 ZAKLJUČEK.....</b>	<b>54</b>
<b>8 LITERATURA.....</b>	<b>56</b>

## KAZALO SLIK

Sl. 2.1	Struktura holesterola .....	2
Sl. 2.2	Shema biosinteze holesterola z dvema ključnima encimoma .....	3
Sl. 2.3	Tri glavne fiziološke vloge oksisterolov .....	5
Sl. 2.4	Strukture treh oksisterolov .....	5
Sl. 2.5	Od cAMP-odvisna signalna pot .....	7
Sl. 2.6	S steroli-uravnavana signalna pot .....	9
Sl. 2.7	Kristalna struktura proteina CYP51 iz <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	13
Sl. 2.8	Celice Y1 (Rainey, 2004) .....	15
Sl. 2.9	Mišji embrionalni fibroblasti 3T3 .....	16
Sl. 2.10	Celice granulosa obdajajo oocito .....	17
Sl. 2.11	Celice JEG3 (Blanchon, 2002) .....	19
Sl. 2.12	Celice SH-SY5Y (Kölsch, 1999) .....	19
Sl. 5.1	Metode vnosa genskega materiala v sesalske celice .....	35
Sl. 5.2	Izražanje poročevalskega gena <i>HMGCR-luc</i> v odvisnosti od koncentracije vektorjev za prekomerno izražanje transkripcijskih faktorjev ICER, CREM (0,25-1,0 µg/ml) in SREBP-2 (0,05-0,50 g/ml).....	36
Sl. 5.3	Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in navadnega gojišča (NG) na izražanje gena <i>CYP51</i> v mišjih celičnih linijah .....	38
Sl. 5.4	Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in navadnega gojišča (NG) na izražanje gena <i>CYP51</i> v človeških celičnih linijah .....	39
Sl. 5.5	Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER) na izražanje gena <i>CYP51</i> v mišjih celičnih linijah .....	41
Sl. 5.6	Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER) na izražanje gena <i>CYP51</i> v človeških celičnih linijah .....	42
Sl. 5.7	Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA), transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER) in z lipidi bogatega gojišča in transkripcijskega faktorja ICER hkrati (COPUFA/ICER) na izražanje gena <i>CYP51</i> v človeških celičnih linijah ...	44
Sl. 5.8	Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA), transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER) in z lipidi bogatega gojišča in transkripcijskega faktorja ICER hkrati (COPUFA/ICER) na izražanje gena <i>CYP51</i> v človeških celičnih linijah .....	45
Sl. 5.9	Preživetje celic v času transfekcij .....	46



## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 2.1 Uporabljene celične linije .....	14
Pregl. 4.1 Uporabljeni plazmidi, ki so ekspresijski vektorji za posamezne transkripcijske faktorje .....	32
Pregl. 4.2 Uporabljena luciferazna reporterja .....	33
Pregl. 5.1 Vrednosti p za celične linije Hepa1 in Y1 v NG in COPUFA .....	38
Pregl. 5.2 Vrednosti p za celične linije HepG2, JEG3 in SH-SY5Y v NG in COPUFA ..	38
Pregl. 5.3 Vrednosti p za celične linije Hepa1 in Y1 v NG, NG/ICER in COPUFA .....	40
Pregl. 5.4 Vrednosti p za celične linije HepG2, JEG3 in SH-SY5Y v NG, NG/ICER in COPUFA .....	41
Pregl. 5.5 Vrednosti p za celične linije Hepa1 in Y1 v NG, NG/ICER, COPUFA in COPUFA/ICER .....	43
Pregl. 5.6 Vrednosti p za celične linije HepG2, JEG3 in SH-SY5Y v NG, NG/ICER, COPUFA in COPUFA/ICER .....	44

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

**A** ampicilin

**Ac-CoA** acetil-koencim A

**AMP** adenzin-monofosfat

**ATP** adenzin-trifosfat

**BCS** telečji serum (angl. Bovine Calf Serum)

**bHLH področje** DNA-vezavno področje v transkripcijskih faktorjih (bazično področje-vijačnica-zanka-vijačnica)

**β-gal** β-galaktoza

**Bio-Rad reagent** reagent za določanje koncentracije proteinov po Bradford-u

**bp** bazni par

**BSA** goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumine)

**C** citozin

**cAMP** 3', 5'-ciklični adenzin-monofosfat

**CBP** CREB-vezavni protein (angl. CREB-binding protein)

**CoA** koencim A

**COPUFA** z lipidi in nenasičenimi maščobnimi kislinami bogato gojišče

**CpG otok** z GC pari bogat predel na promotorju

**CRE** od cAMP-odvisni regulatorni element (angl. cAMP-response element)

**CREB** CRE-vezavni protein (angl. CRE-binding protein)

**CREM** CRE-modulator (angl. CRE-modulator)

**CYP** citokrom P450

**CYP51** lanosterol-14α-demetilaza

**CYP51-luc** poročevalski gen (gen *CYP51* povezan z genom za luciferazo)

**Da** Dalton

**DMEM** Dulbeccovo spremenjeno Eaglovo gojišče

**DNA** deoksi-ribonukleinska kislina

***E. coli*** *Escherichia coli*

**ER** endoplazemski retikulum

**FAD** flavin-adenin-dinukleotid

**FCS** telečji fetalni serum (ang. Fetal Calf Serum)

**FMN** flavin-mononukleotid

**FSH** folikel-stimulirajoči hormon

**FuGENE** reagent za izvajanje transfekcij (mešanic lipidov v etanolu)

**G** guanin

**GABA**  $\gamma$ -amino-maslena kislina

**GC, GC-blok** z GC bogat DNA-regulatorni element

**Glc** glukoza

**h** human

**HBS** HEPES pufer (angl. HEPES Buffered Saline)

**hCG** človeški horionski gonadotropin

**Hepa1** nesmrtna celična linija mišjih jetrnih celic (hepatom)

**HEPES** (N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-[etansulfonska kislina])

**HepG2** nesmrtna celična linija človeških jetrnih celic (hepatom)

**HMG-CoA** 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA

**HMGCR** 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaza

***HMGCR-luc*** poročevalski gen (gen *HMGCR* povezan z genom za luciferazo)

**HO 23** nesmrtna celična linija človeških celic granulosa

**ICER** inducibilni cAMP zgodnji represor (angl. Inducible cAMP Early Repressor)

**JEG3** nesmrtna celična linija placentnih celic (horiokarcinom)

**jetPEI** reagent za izvajanje transfekcij (linearni polietilenaminski derivat)

**LB** Luria-Bertanijevo gojišče

**LBA** Luria-Bertanijevo gojišče z ampicilinim

**LDL** lipoprotein z nizko gostoto

**LH** luteinizirajoči hormon

**MAS** mejozo aktivirajoči steroli

**Mef3** nesmrtna celična linija mišjih embrionalnih fibroblastov

**NADPH** nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat, red. oblika

**NF-Y** transkripcijski faktor, ki se veže na CCAAT-vezavno mesto (angl. ubiquitous heteromeric CCAAT-binding protein)

**NG** navadno gojišče

**ONPG** o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid

**P450** citokrom P450

**PBS** fosfatni pufer

**pCAT basic** polnilni plazmid (nima luciferazne aktivnosti)

**PKA** protein-kinaza A

**PLB** pasivni lizirajoči pufer

**pRSV** plazmidni vektor

**pRSV  $\beta$ -gal** vektor z vstavljenim genom za  $\beta$ -galaktozidazo

**RNA** ribonukleinska kislina

**rpm** obratov na minuto (angl. revolutions per minute)

**S1P** proteaza mesta 1

**S2P** proteaza mesta 2

**SCAP** SREBP-cepitev aktivirajoči protein (angl. SREBP cleavage activating protein)

**SH-SY5Y** nesmrtna celična linija celic prerifernega živčevja (neuroblastom)

**Sp1** transkripcijski faktor (protein specifičnosti 1)

**SRE** od sterolov-odvisni DNA-regulatorni element (angl. sterol regulatory element)

**SREBP** SRE-vezavni proteini (angl. SRE binding protein)

**SRS** mesti prepoznavanja substrata (angl. substrate recognition site)

**T75** velikost steklenice za gojenje celičnih kultur

**TrypanBlue** barvilo za ugotavljanje preživelosti celic

**Y1** nesmrtna celična linija celic adrenalne žleze

## 1 UVOD

Homeostaza holesterola v telesu je zelo natančno uravnavana. Odkloni od optimalnih količin holesterola lahko povzročijo resne zdravstvene težave. Pomembna encima, ki sodelujeta pri biosintezi holesterola, sta HMGCR (3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A) in CYP51 (lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaza). Aktivnost obeh encimov je regulirana po dveh signalnih poteh: od sterolov-odvisne in od cAMP-odvisne signalne poti. Biosinteza holesterola se prilagaja potrebam telesa s pomočjo signaliziranja, ki vključuje uravnavanje z mehanizmom negativne povratne zanke.

Raziskave aktivnosti in uravnavanja holesterogenih genov so pomembne predvsem s kliničnega vidika. Poznavanje holestrogenih encimov in njihovih genov in regulacije le-teh bi omogočalo razvijanje ustreznih inhibitorjev ali aktivatorjev na nivoju prepisovanja, prevajanja ali aktivnosti holesterogenih encimov. To bi pripomoglo k uravnovešenju biosinteze holesterola in posledično k odpravljanju številnih bolezni, povezanih z nepravilnimi količinami holesterola v telesu, kot so ateroskleroza, neplodnost, depresije in druge.

Tkiva v telesu nimajo enako močno izraženih obeh signalnih poti. V nekaterih prevladuje od sterolov-odvisna, v drugih od cAMP-odvisna signalna pot. Pri študiju aktivnosti in uravnavanju encimov HMGCR in CYP51 pri sesalcih se uporablja tudi tehnologija poročevalskih genov. Te uvedemo v celične linije s transfekcijo. Da bi lahko dobili čim širšo sliko o uravnavanju genov, je zaželena uporaba čim večih različnih celičnih linij.

Cilj diplomske naloge je bil izbrati metodo za izvajanje transfekcij ter ugotoviti vpliv sterolno- in s cAMP-posredovane signalne poti na izražanje *HMGCR* z bližnjega promotorja. V drugem delu pa smo preverili odziv poročevalskega gena *CYP51* v šestih različnih celičnih linijah na inhibitorni represor ICER in z lipidi bogato gojišče COPUFA. Rezultati bi lahko služili kot osnova za študije izražanja holesterogenih genov v različnih tkivih in sesalskih vrstah.

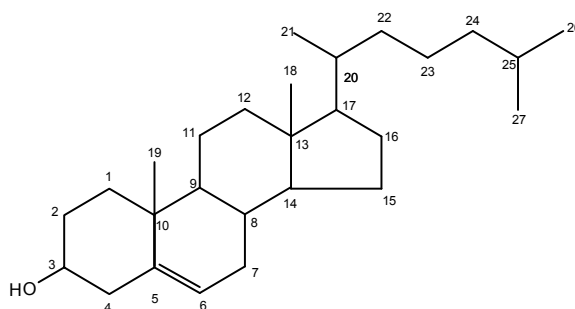
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 HOLESTEROL

Holesterol ali 10,13-dimetil-17-(6-metil-heptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodekahidro-1H-ciklopenta- $\alpha$ -phenantren-3-ol je sterol (steroidni alkohol) s kemijsko formulo  $C_{27}H_{46}O$  gostoto  $1,067 \text{ g/cm}^3$  in molsko maso  $386,65 \text{ g/mol}$ . Najdemo ga v celičnih membranah vseh vrst živalskih tkiv. V membrani se hidroksilna skupina nahaja v bližini fosfatne glave fosfolipidnih molekul, hidrofobni del pa je zasidran v hidrofobni sredici membran. Največ ga je v tkivih, kjer so membrane bolj gosto razporejene: jetrih, hrbtenjači, možganih in arterielnih oblogah. Holesterol se po telesu prenaša po krvnem obtoku z lipoproteini kot so LDL (lipoproteini z nizko gostoto) (Myant, 1981).

Holesterol ni le sestavina celičnih membran, je tudi prekurzor vitamina D, steroidnih hormonov, žolčnih kislin in oksisterolov. Pomemben je pri presnovi vitaminov topnih v maščobah, lahko pa deluje tudi kot antioksidant. Zmanjšuje permeabilnost membran, sodeluje pri tvorbi lipidnih raftov, in embrionalni celični signalizaciji, kjer se veže na proteine hedgehog (Guy, 2000).

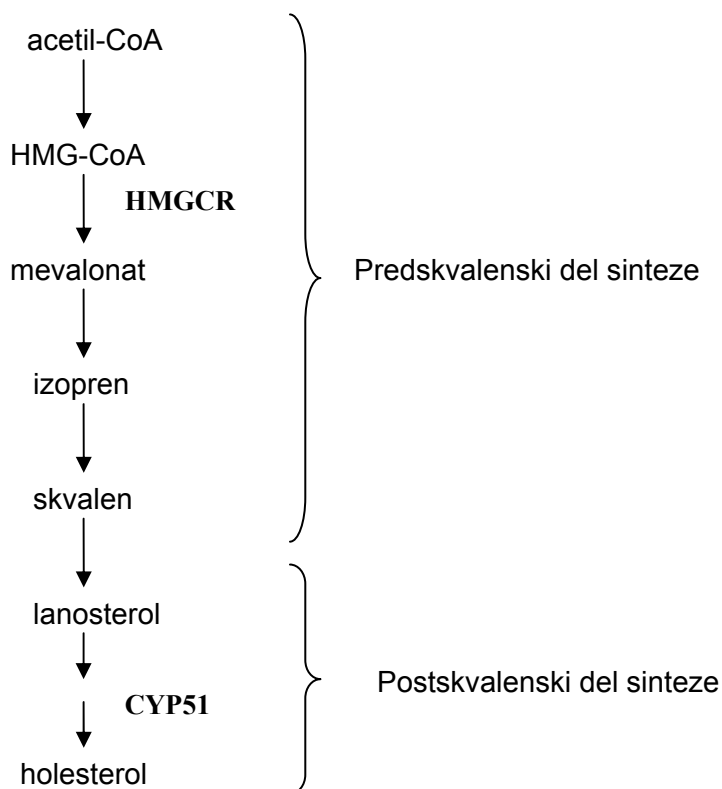
Znano je, da povišane količine holesterola v telesu povzročajo bolezni srca in ožilja (ateroskleroza). Manj znano in tudi slabše raziskano pa je, da so prenizke količine holesterola prav tako škodljive. Povezujejo jih z depresijami, rakavimi obolenji in malformacijami fetusa (Wolf, 1999)



Slika 2.1 Struktura holesterola

### 2.1.1 Biosinteza holesterola

Holesterol se v veliki meri sintetizira v telesu, delno pa ga telo pridobi s hrano. Biosinteza holesterola poteka v ER (endoplazmatski retikulum) (Reinhart, 1987). Največ, približno 20-25%, se ga sintetizira v jetrih. Veliko se ga sintetizira tudi v prebavilih, adrenalnih žlezah, možganih in gonadah (testisi in ovariji). Sinteza holesterola se začne v mitohondriju, kjer se združijo 3 enote acetil-CoA in tvorijo HMG-CoA (3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A). Ta se prenese na membrane ER, kjer ga encim HMGCR (HMG-CoA reduktaza) reducira v mevalonat. Mevalonat se nato dekarboksilira in tvori aktivni izoprenski enoti. Ti sta izhodišče za sintezo zelo različnih snovi: glikoproteini, terpeni, koencin Q, vitamin K, karotenoidi. Šest izoprenskih enot se poveže in tvori skvalen, ki je zadnji produkt predskvalenskega dela sinteze.



**Slika 2.2 Shema biosinteze holesterola z dvema ključnima encimoma;** HMGCR - 3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A reduktaza , CYP51 - lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaza

V postskvalenski fazi se skvalen preuredi v lanosterol, prvi ciklični produkt v sintezi steroidov, ta pa se preuredi v holesterol. Pri tem sodeluje tudi encim CYP51 (lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaza) (Herman, 2003; Gaylor, 2002).

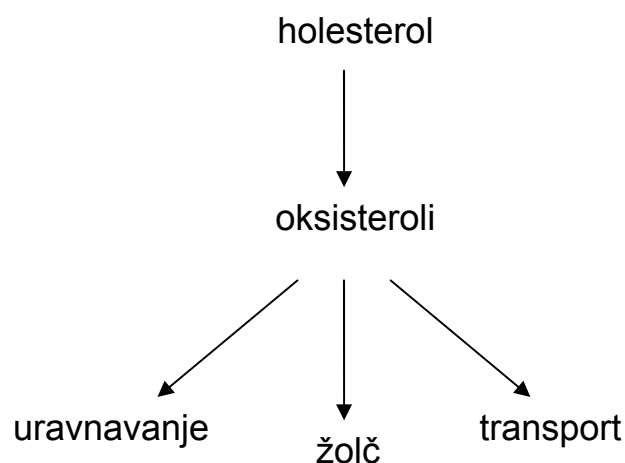
### 2.1.2 Uravnavanje biosinteze holesterola

Biosinteza in homeostaza holesterola sta zelo natančno uravnani z negativno povratno zanko. Več kot je holesterola v telesu, na primer da ga telo dobi s hrano, manj se ga sintetizira *de novo*. Ključni mehanizem za uravnavanje količine holesterola je s proteini iz družine SREBP (angl. Sterol Regulatory Element–Binding Proteins) v ER. HMGCR je encim, ki določa hitrost biosinteze holesterola in je uravnavan na številnih ravneh. Ob velikih količinah holesterola pride do razgradnje encima v proteosomih, ob pomanjkanju holesterola pa do transkripcije gena, ki ga kodira (Bengoechea-Alons, 2007, Engelking, 2005)

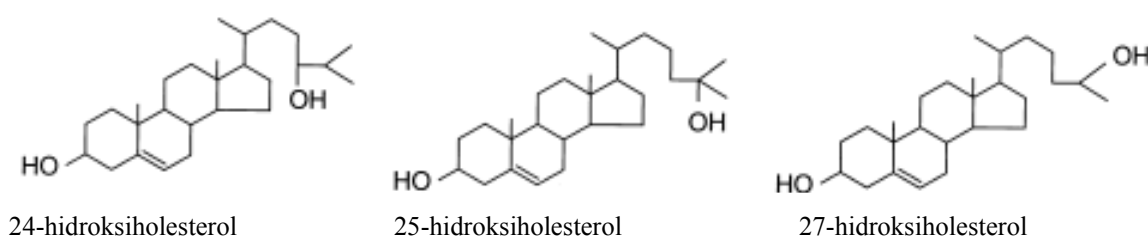
## 2.2 OKSISTEROLI

Oksisteroli so derivati holesterola, ki imajo na stranski verigi vezano hidroksilno skupino. Trije oksisteroli so v telesu še posebej pogosti: 24-hidroksi-holesterol, 25-hidroksi-holesterol in 27-hidroksi-holesterol. Dolgo časa so bili oksisteroli neznanka, leta 1974 pa so dokazali, da oksisteroli zavirajo sintezo sterolov v celičnih kulturah. Substrat za sintezo oksisterolov je holesterol, encimi pa 24-hidroksilaza (mikrosomalni), 25-hidroksilaza oziroma 27-hidroksilaza (mitohondrijski) (Russell, 2000). Potrebno je izpostaviti, da je oksisterolov v tkivih izredno malo in da prevladuje holesterol ( $10^3$ - do  $10^6$ -krat več). Poleg vloge pri uravnavanju homeostaze holesterola imajo oksisteroli vlogo tudi pri aterosklerozi, apoptozi, nekrozi, vnetju, imunosupresiji in nastanku žolčnih kamnov (Björkhem, 2002).





**Slika 2.3 Tri glavne fiziološke vloge oksisterolov;** uravnavanje izražanja genov, prekursor za sintezo žolča, omogočajo transport med tkivi (prirejeno po Russell, 2000)



**Slika 2.4 Strukture treh oksisterolov;** 24-hidroksi-holesterol, 25-hidroksi-holesterol, 27-hidroksi-holesterol (Russell, 2000)

### 2.2.1 24-hidroksi-holesterol

24-hidroksi-holesterol se sintetizira v možganih in se z leti tam tudi kopiči. Zanimivo je, da 24-hidroksilaze ne najdemo v celicah, ki sintetizirajo s holesterolom bogati mielin, kot so celice glie in oligodendrocite. Najdemo jo v nevronih skorje velikih možgan, hipotalamusu, dentatnemu girusu in Purkinjejevih celicah malih možgan. Možgani so obdani s krvno-možgansko pregrado, ki onemogoča prehajanje velikim molekulam po krvnem obtoku v možgane. Holesterol, ki po krvi potuje na lipoproteinih, zato ne more zadovoljevati potreb možgan po holesterolu. Holesterol se zato aktivno sintetizira v možganih samih. Odvečen holesterol se v možganih pretvori v 24-hidroksi-holesterol, ki

lahko prečka krvno-možgansko pregrado in potuje v jetra, kjer se pretvori v žolč. Izločanje oksisterolov v krvni obtok se imenuje reverzni transport holesterola in ga uporabljajo tudi druga periferna tkiva (npr. pljuča). Namen tega transporta je ohranjanje homeostaze holesterola v telesu (Russell, 2000, Kölsch, 1999).

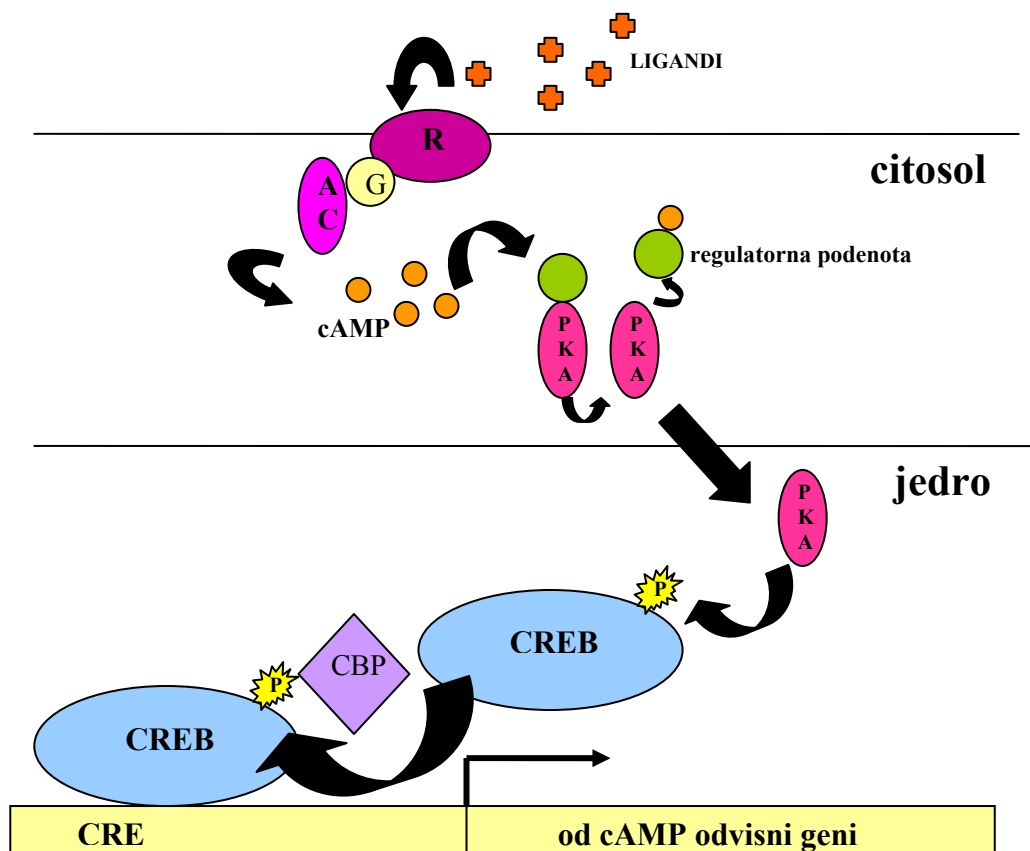
### **2.2.2 25-hidroksi-holesterol**

25-hidroksi-holesterol se pri človeku sintetizira v večini tkiv. Raziskave so potrdile, da zavira sintezo sterolov v celičnih kulturah. Transkripcija od sterolov-odvisnih genov upade in sinteza holesterola je zavirana v nekaj urah. 25-hidroksi-holesterol deluje kot antagonist holesterola pri s steroli-uravnavani signalni poti (Russell, 2000).

## **2.3 OD cAMP-ODVISNA SIGNALNA POT**

Od cAMP-odvisna signalna pot je ena najpomembnejših signalnih poti pri evkariontih. cAMP je sekundarni sporočevalec, ki nastaja iz ATP s pomočjo encima adenilat ciklaze, ki ga posredno, preko proteina G, aktivira receptor na površini membrane, ko se nanj veže ligand.

Povišane celične koncentracije cAMP povzročijo odcepitev regulatorne podenote PKA (protein-kinaze A) in jo s tem aktivirajo. Aktivirana PKA potuje v jedro, kjer fosforilira od cAMP-odvisni transkripcijski faktor CREB (od cAMP-odvisni regulatorni element vezavni protein). Tako aktivirani transkripcijski faktorji homodimerizirajo ali heterodimerizirajo preko motivov leucinske zadrge in se vežejo na elemente CRE (od cAMP-odvisni regulatorni element) v promotorskih delih tarčnih genov. Tako vezan od cAMP-odvisni transkripcijski faktor nato interagira s ko-aktivatorskim proteinom, kot je CBP (CRE vezavni protein), kar omogoča vezavo osnovnega transkripcijskega aparata na promotor (Don, 2002).



**Slika 2.5** Od cAMP-odvisna signalna pot; R - receptor, G - G protein, AC - adenilatna ciklaza, PKA - protein kinaza A, P - fosfatna skupina, CBP - CREB vezavni protein, CRE - od cAMP-odvisni regulatorni element, CREB – CRE vezavni protein

Protein CREM je eden od cAMP-odvisnih transkripcijskih faktorjev. Gen *CREM* vsebuje 10 eksonov (Daniel 2000) in kodira več izooblik, ki lahko delujejo kot represorji ali aktivatorji. Represorji imajo bHLH-Zip (bazična-vijačnica-zanka-vijačnica-levcinska zadrga) motiv in zato z aktivatorji tekmujejo za vezavo na CRE mesta v promotorjih. Nimajo pa področja bogatega z glutaminskimi ostanki, zato ne morejo interagirati s prepisovalnim aparatom. Aktivatorji imajo regijo bogato z glutaminsko kislino in zato lahko interagirajo s transkripcijskim aparatom in tako omogočijo prepisovanje gena za promotorjem (Don, 2002).

Iz enega od alternativnih promotorjev gena *CREM* (P2) se prepisuje izooblika ICER (inducibilen od cAMP-odvisni zgodnji represor), ki je močan represor od cAMP-reguliranih genov. V promotorju P2 se nahajajo štirje elementi CRE, zato ga aktivirajo

CREB/CREM transkripcijski faktorji. ICER se veže na elemente CRE, tudi tiste v lastnem promotorju in zavre transkripcijo genov (Don, 2002).

CREB in CREM sta si po strukturi zelo podobna, vendar prvi deluje kot od cAMP-odvisni aktivator, medtem ko drugi v večini tkiv deluje kot represor (Daniel 2000). Zaradi svojih številnih izooblik in alternativnih promotorjev, ki omogočajo prostorsko in časovno specifičnost in odzivnost izooblik, CREB in CREM sodelujeta pri regulaciji številnih in kompleksnih procesov (Don, 2002), kot so spermatogeneza (Rozman, 1999), regeneracija jeter (Servillo, 2002) in spomin (Dash, 2007).

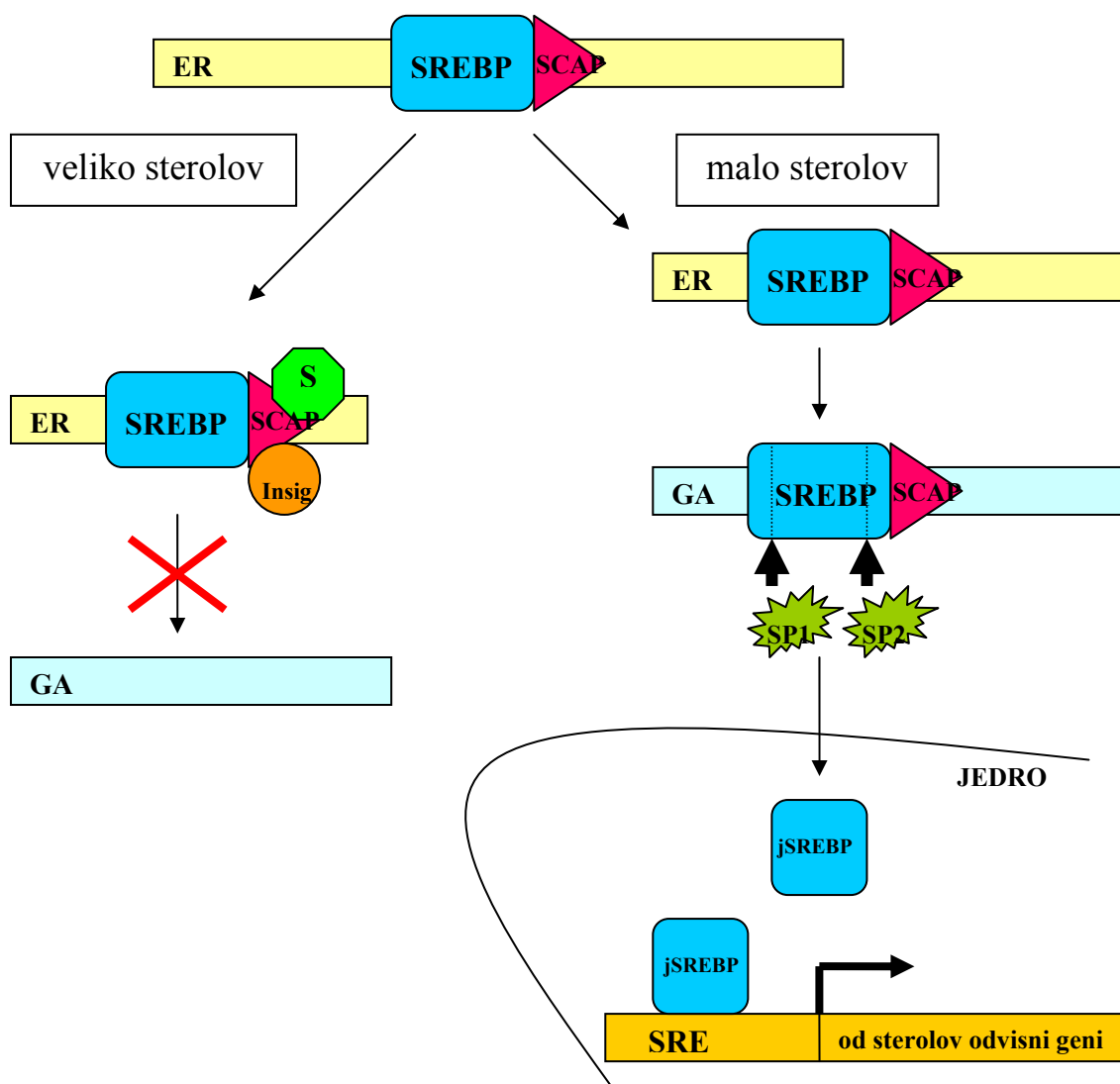
## 2.4 S STEROLI-URAVNAVANA SIGNALNA POT

Količina holesterola in maščobnih kislin je v telesu in posameznih celicah natančno uravnavana. Najpomembnejša pri tem je pot negativne povratne zanke.

Družina transkripcijskih faktorjev SREBP (angl. Sterol Regulatory Element–Binding Proteins) uravnava metabolizem holesterola in ostalih lipidov. Družino sestavlja 5 proteinov SREBP: SREBP-1a in SREBP-1c izhajata iz istega gena, SREBP-2 pa iz drugega. SREBP-1a in 1c prednostno aktivirata gene, ki sodelujejo pri sintezi maščobnih kislin, medtem ko SREBP-2 aktivira gene, ki sodelujejo pri sintezi holesterola. Poleg omenjenih proteinov SREBP obstajata še manj znana SREBP1ac in SREBP2gc. Vsak protein SREBP je sestavljen iz 3 funkcionalnih enot: N-terminalni del s bHLH-Zip deluje kot transkripcijski faktor, C-terminalni del je regulatorna domena, med njima pa sta dve kratki transmembranski domeni, ki sidrata protein v ER ali GA (Golgijev aparat) (Edwards, 2000).

SREBP se sintetizirajo kot veliki prekurzorji, vstavljeni v membrane ER. Takšni proteini so transkripcijsko neaktivni. V ER C-terminalni del proteina interagira s proteinom SCAP (angl. SREBP–Cleavage–Activating Protein), ki deluje kot senzor sterolov

(transmembranski segmenti 2-6). SCAP se s C-terminalnim delom veže na SREBP. Tvori se kompleks SCAP/SREBP (Bengoechea-Alonso, 2007, Espenshade, 2006).



**Slika 2.6 S steroli-uravnavana signalna pot;** SREBP - Sterol Regulatory Element–Binding Proteins, jSREBP–jedrna oblika SREBP, SCAP - SREBP–Cleavage–Activating Protein, S – sterol, Insig – Insulin Induced Gene, SP1 in SP2 – proteazi, ER – membrana endoplazemskega retikuluma, GA – membrana Golgijevega aparata

Ko je v celici dovolj sterolov in sinteza *de novo* ni potrebna, se holesterol veže neposredno na SCAP v kompleksu SCAP/SREBP v ER. To povzroči konformacijsko spremembo

kompleksa SCAP/SREBP in posledično SCAP ne more več interagirati s proteini, ki tvorijo vezikle za prenos kompleksa SCAP/SREBP v GA. Inhibicijo še dodatno ojačajo proteini ER imenovani Insig (angl. Insulin Induced Gene), ki se vežejo na SCAP in onemogočajo prehod kompleksa SCAP/SREBP v GA. SREBP se tako ne pretvori v aktivno jedrno obliko in ne aktivira prepisovanja genov.

Ob pomanjkanju sterolov kompleks SCAP/SREBP potuje v membrane GA. V membranah GA dve proteazi (S1P in S2P) razcepita SREBP in sprostita jSREBP (jedrno obliko proteina SREBP). jSREBP se prenese v jedro, kjer se veže na promotorje tarčnih genov. To so geni za encime, ki sodelujejo pri sintezi in metabolizmu holesterola in maščobnih kislin ter geni, ki kodirajo SREBP in Insig. SREBP torej aktivira prepisovanje lastnega negativnega regulatorja.

Ko jedrna oblika SREBP prispe v jedro, se veže na promotorje tarčnih genov kot dimer in večinoma deluje kot aktivator. SREBP sodijo v družino bHLH-Zip. Zaradi edinstvene DNA vezavne domene se lahko vežejo na klasični E-blok ali elemente SRE (angl. Sterol Regulatory Element) promotorske elemente (Bengoechea-Alonso, 2007, Brown, 1997). Elementi SRE različnih genov se med sabo zelo razlikujejo. Aktivacija genov s SREBP zahteva še dodatne transkripcijske faktorje, kot so NF-Y, Sp1 ali CREB (Edwards, 2000).

## 2.5 3-HIDROKSI-3-METIL-GLUTARIL KOENCIM A REDUKTAZA (HMGCR)

3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A reduktaza (HMGCR) je hitrost določujoči encim v biosintezi izoprenoidov. Katalizira pretvorbo HMGC (3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A) v mevalonat, ki je skupni prekursor holesterola, dolihola in koencima Q (Panda, 2004). Ker je HMGCR pomemben encim pri biosintezi holesterola, je tudi tarča učinkovin za preprečevanje hiperholesterolemije in ostalih bolezni, ki izhajajo iz povišanih količin holesterola v krvi (ateroskleroza). Do zdaj so statini edine učinkovine, ki z inhibicijo HMGCR zmanjšajo biosintezo holesterola v telesu in posledično preprečujejo

hiperholesterolemijo. Ker inhibirajo HMGCR, ki sodeluje na začetku biosinteze holestrola, posledično preprečujejo sintezo tudi številnih drugih sterolnih produktov, ki nastajajo po isti biosintetski poti (steroidni hormoni, MAS, koencim Q in drugi).

### **2.5.1 Protein HMGCR**

Sesalski HMGCR (97 kDa) je integralni membranski glikoprotein v ER. Molekula je sestavljena iz dveh strukturnih domen: 338 aminokislin velika C-terminalna regija, ki je usmerjena v citosol in ima katalitično mesto ter 339 aminokislin velika N-terminalna regija, ki usidra protein v ER in verjetno igra pomembno vlogo pri razgradnji proteina. Regiji povezuje vmesnih 110 aminokislinskih ostankov, ki vsebujejo proteolitična mesta. Citosolna domena proteina se skoraj ne razlikuje med organizmi. Manjše razlike se pojavijo v membranski domeni. Membranska domena pri rastlinah vsebuje dve, pri kvasovkah in sesalcih 7, pri metazojih pa 8 transmembranskih segmentov. Te razlike so razlog za razlike na ravni delovanja encima. V membranski domeni je tudi segment (167 aminokislinskih ostankov), ki zaznava sterole. Takšne in podobne segmente najdemo tudi pri drugih proteinih, ki se ob povišanih koncentracijah holesterola razgradijo (Istvan, 2000, Panda, 2004).

### **2.5.2 Uravnavanje aktivnosti HMGCR**

Uravnavanje HMGCR poteka na večih ravneh: na ravni transkripcije reduktaznega gena (uravnavane s SREBP), translacije reduktazne mRNA, razgradnje proteina in modulacije encimske aktivnosti. Aktivnost encima je uravnavana z negativno povratno zanko sterolnih in nesterolnih produktov mevalonatne sintezne poti; ko je produktov, katerih sintezo katalizira HMGCR, veliko, je aktivnost encima nizka, ko je produktov malo, je aktivnost encima visoka (Panda, 2004).

Uravnavanje aktivnosti HMGCR je lahko tudi neodvisno od negativne povratne zanke holesterola. Aktivnost encima je lahko znižana preko fosforilacije na mestu Ser-871 pri hrčku oz. Ser-872 pri človeku z od AMP-odvisno kinazo. Od AMP-odvisno kinazo

aktivirajo povišane koncentracije AMP v celici. Fosforilacija spremeni kinetične parametre encima. Najverjetneje služi kot odgovor na stres, saj so povišane koncentracije AMP posledica povišane porabe ATP. Takšni pogoji v celici zato ustavijo sintezo holesterola in maščobnih kislin. Takšno uravnavanje je možno tudi pri kvasovkah (Gillespie, 1992).

## 2.6 LANOSTEROL-14 $\alpha$ -DEMETILAZA (CYP51)

Lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaza (CYP51) je encim, ki sodeluje v pozni fazi biosinteze holesterola. Je evolucijsko najbolj ohranjeni gen iz družine citokromov P450. Prisoten je v vseh bioloških kraljestvih in je konstitutivno izražen v vseh tkivih. Največ CYP51 mRNA najdemo v modih, kjer sodeluje pri sintezi MAS (mejozo aktivirajoči steroli) (Rozman, 2000).

Katalizira oksidativno odstranitev 14 $\alpha$ -metilne skupine na lanosterolu na mestu C32. Potrebuje NADPH-citokrom P450 reduktazo kot redoks partnerja, ta pa vsebuje domeno FAD/FMN. CYP51 je eden od ključnih encimov pri pretvorbi lanosterola v holesterol pri živalih, ergosterol pri glivah in fitosterol pri rastlinah ter mejozo aktivirajoče sterole (MAS) v spolnih celicah sesalcev (Rozman, 2000, Debeljek, 2003).

Njegovo proučevanje je pomembno zaradi njegove neposredne vloge pri sintezi MAS in s tem možne vloge pri zdravljenju moške sterilnosti (Tsafiriri, 2002). Gen bi lahko predstavljal tudi tarčo za zdravljenje hiperholesterolemije.

### 2.6.1 Protein CYP51

Sesalski CYP51 je protein s 55 kD. Njegova najbolj ohranjena aminokislinska zaporedja so tista, ki so odgovorna za prepoznavanje substrata (SRS - substrate recognition site). Teh zaporedij je 6. Z usmerjeno mutagenozo je bilo ugotovljeno, da imajo največji vpliv na katalitično aktivnost spremembe v SRS, natančneje v SRS-4. Edina znana kristalna



struktura proteina CYP51 do zdaj pripada *Mycobacterium tuberculosis* in je prikazana na sliki 2.7 (Podust, 2001, Debeljak, 2003)



**Slika 2.7** Kristalna struktura proteina CYP51 iz *Mycobacterium tuberculosis*; rdeče –  $\alpha$ -vijačnice, rumeno –  $\beta$  nagubane ravnine (povzeto po [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

### 2.6.2 Gen *CYP51*

Človeški gen *CYP51* (22kb) leži na kromosomu 7q. Ima 1527 bp dolg bralni okvir in 4 mesta začetka prevajanja. *CYP51* se izraža konstitutivno v vseh tkivih, kar je za P450-proteine nenavadno. Nenavadno je tudi, da se *CYP51* iz različnih kraljestev, razlikujejo v številu intronov in eksonov. Tako poznamo gene brez intronov (bakterijski in glivni) pa gene z 9 introni (sesalski) (Debeljak, 2003).

### 2.6.3 Promotor gena *CYP51*

Bližnji promotor sesalskega *CYP51* leži v GC-bogati regiji in spada v otok CpG. Ker citozinski ostanki tukaj niso metilirani, je dostopnost za transkripcijske faktorje večja. Promotorji *CYP51* so brez TATA-področja, zato se prepisovanje lahko začne na več mestih, kar je značilno za »hišne« gene. En promotor uravnava prepisovanje *CYP51* v vseh tkivih. Do različnega izražanja gena v posameznih tkivih pride zaradi različnih

regulatornih elementov v promotorju in/ali zaradi delovanja različnih kombinacij transkripcijskih faktorjev in ko-aktivatorjev (Debeljak, 2003).

Bližnji promotor *CYP51* vsebuje več evolucijsko dobro ohranjenih vezavnih mest za transkripcijske faktorje. To so od cAMP-odvisni regulatorni elementi (CRE1,2,3), od steroidov-odvisni DNA-regulatorni elementi (SRE1), GC-blok in drugi (Debeljak, 2003).

## 2.7 CELIČNE KULTURE

Vzgoja celičnih kultur sega v 19. stoletje, ko so prvi znanstveniki gojili celice v slanici. Danes se celične kulture vsakodnevno uporabljajo v laboratorijih za *ex vivo* poskuse. Prednost celičnih kultur je predvsem ta, da poskusov ni potrebno izvajati na živalih in da so pogoji poskusov bolj konstantni in zato rezultati bolj primerljivi. Pomanjkljivost celičnih kultur pa je, da le-te več ne posnemajo dejanskega stanja v tkivu, saj so imortalizirane (Nachman, 2004, Butler, 2005).

Celice, ki jih izoliramo neposredno iz tkiva, imenujemo primarne celice. Življenjska doba teh je omejena na nekaj pasaž. Celice je potrebno modificirati (na primer mutacije, izražanje telomeraze), da pridobijo nesmrtnost. Tako dobimo nesmrtnostne celične linije. Nesmrtnostne celične linije, ki smo jih uporabljali, so zbrane v tabeli številka 2.1.

**Preglednica 2.1 Uporabljene celične linije**, organizem in tkivo, iz katerega izhajajo, morfologija, vir in model celice, ki ga predstavlja

Ime celične linije	Organizem	Tkivo	morfologija	vir	model
Hepa1	<i>Mus musculus</i>	jetra	pritrjene epitelne celice	hepatom	jetrne celice
Y1	<i>Mus musculus</i>	adrenalna žleza	epitelne celice	<i>zona fasciculata</i> adrenalna žleza	adrenalne celice
Mef3	<i>Mus musculus</i>	embrijo	fibroblast	14 dni stari embriji	embrionalne celice
HepG2	<i>Homo sapiens</i>	jetra	pritrjene epitelne celice	hepatom	jetrne celice
HO 23	<i>Homo sapiens</i>	ovarij (granulosa)	limfoblastne celice	celice granulosa	ovarijske celice
JEG3	<i>Homo sapiens</i>	placenta	epitelne celice	horiokarcinom	sinciciotrofoblast
SH-SY5Y	<i>Homo sapiens</i>	periferno živčevje	pritrjene in nepritrjene epitelne celice	neuroblastom	neuroblasti

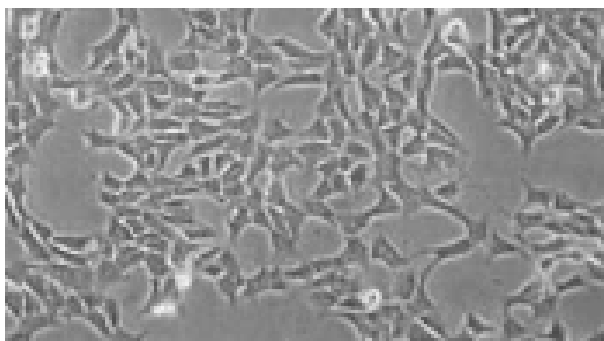
## 2.7.1 Mišje celične linije:

### 2.7.1.1 Hepa1

Celice so bile izolirane iz mišjega hepatoma in služijo kot model jetrnih celic. Izločajo nekatere produkte, ki so značilni za jetrne celice: albumin,  $\alpha$ 1-antitripsin, amilaza in  $\alpha$ -fetoprotein, ki ga ne najdemo v serumu odraslih živali, ga pa povezujejo s hepatocelularnim karcinomom. Kariotip je hipotetraploiden, 6% celic pa je poliploidnih (ATCC, Allen, 1977).

### 2.7.1.2 Y1

Adrenalna žleza je sestavljena iz medule (sredice) in korteksa (skorje). Korteks adrenalne žleze izhaja iz mezoderma dorzalne stene celoma in ima zato podobne lastnosti kot steroidogene celice gonad. Korteks je morfološko in fiziološko deljen v tri regije: *zona glomerulosa*, *zona fasciculata*, od koder izvira celična linija Y1 in *zona reticularis*. Zaradi različne ekspresije steroidogenih encimov v posamezni regiji se regije med sabo razlikujejo tudi po steroidnih produktih, ki jih proizvajajo. Skupno vsem trem regijam pa je, da kot substrat za sintezo steroidnih produktov uporabljajo holesterol. Lahko ga pridobivajo iz endogenih zalog, preko serumskih lipoproteinov ali s sintezo *de novo*. Za hitrost sinteze steroidnih hormonov je odločilen prenos holesterola iz zunanje membrane mitohondrija v notranjost mitohondrija (Rainey, 2004, Berne and Levy, 1998).



Slika 2.8 Celice Y1 (Rainey, 2004)

### 2.7.1.3 Mef3

Celična linija Mef3 so celice mišjih embrionalnih fibroblastov, starih 14 dni. Fibroblasti so celice, ki proizvajajo prekursorje ekstracelularnega matriksa in so najbolj pogoste celice v vezivnem tkivu živali. Embrionalni fibroblasti izhajajo iz mezenhima in zato izločajo vimentin (protein intermediarnih filamentov). Celice Mef se uporabljajo tudi kot celice, ki proizvajajo hrano za izvorne celice. Takšne celice so transformirane s plazmidi, ki onemogočajo deljenje celic po nekaj pasažah (ATCC)



Slika 2.9 Mišji embrionalni fibroblasti 3T3 ([http://en.wikipedia.org/wiki/3T3\\_cells](http://en.wikipedia.org/wiki/3T3_cells))

## 2.7.2 Človeške celične linije

### 2.7.2.1 HepG2

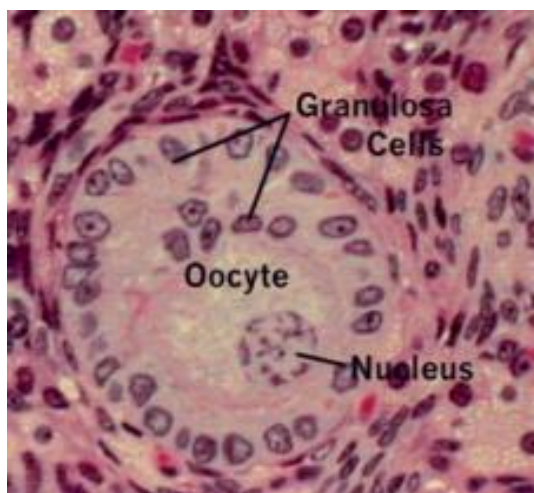
Jetra imajo veliko raznovrstnih funkcij, med ostalim tudi zelo aktivno sintetizirajo holesterol in proizvajajo žolč. Celice HepG2 so bile izolirane iz hepatoma in služijo kot model jetrnih celic. Primarne hepatocite so lahko tetraploidne ali poliploidne. Takšnih je približno 50%. Sekundarne hepatocite so hiperdiploidne in proizvajajo vrsto različnih spojin:  $\alpha$ -fetoprotein,  $\alpha$ 1-antitripsin albumin, transferin, haptoglobin, ceruloplasmin, plasminogen, fibrinogen, glikoproteine, lipoproteine in druge. Izražajo tudi 3-hidroksi-3-

metil-glutaril koencim A reduktazno in triglicerid lipazno aktivnost (ATCC, Berne and Levy, 1998).

### 2.7.2.2 HO 23

Steroidogene celice ovarijev so celice granulosa, ki obdajajo oocito in celice teke. Steroidni hormoni, ki jih te celice proizvajajo, omogočajo zgodnjemu embriju vsidranje v steno maternice in razvoj.

Celice granulosa za vzpostavitev celičnih linij pridobivajo ob oploditvah *in vitro*. Zaradi izpostavljenosti spolnemu hormonu gonadotropinu *in vivo*, so celice granulosa takoj po izolaciji zelo steroidogene, ne odzivajo pa se na nekatere druge spolne hormone, kot so hCG (human horionski gonadotropin), LH (luteinizirajoči hormon) in FSH (folikel-stimulirajoči hormon). Celice HO-23 proizvajajo estradiol in progesteron, ko jih gojimo v gojišču brez gonadotropina (Hosokawa, 1998, Havelock, 2004).

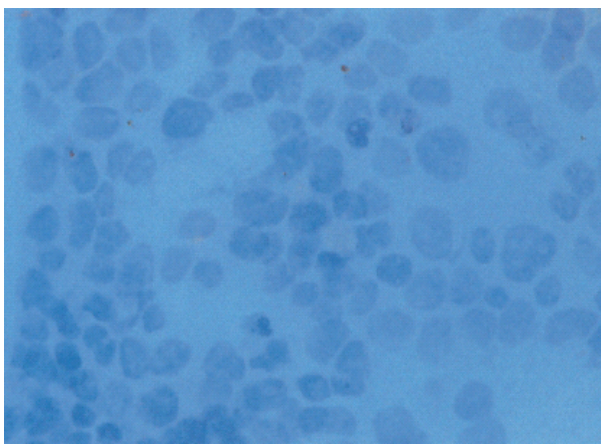


Slika 2.10 Celice granulosa obdajajo oocito (<http://it.stlawu.edu/~mtem/devbiol/36c89bf0.jpg>)

### 2.7.2.3 JEG3

JEG3 so celice placente, izolirane iz horiokarcinoma. Blastocito, oplojeno jajčno celico pred vgnezditevijo, obdaja trofoblast, ki blastocito oskrbuje s hranili in sodeluje pri vgnezditvi blastocite v maternično steno. Trofoblast je sestavljen iz dveh slojev: citotrofoblasta in sinciciotrofoblasta. Sinciciotrofoblast je mnogocelični sloj in celice med sabo niso ločene s celično steno. Celice sinciciotrofoblasta aktivno prodrejo v maternično steno in omogočajo vgnezditev blastociste.

Celična linija JEG3 kaže biološke in biokemijske značilnosti sinciciotrofoblasta. Kljub temu, da so celice enojedrne, celično linijo JEG3 uporabljamo kot model sinciciotrofoblasta. Gojene celice ohranijo sposobnost proizvodnje progesterona, številnih steroidov, placentalnih hormonov (human horionski gonadotropin in humani horionski somatomotropin) in encimov. Steroidne prekurzorje lahko pretvarjajo v estrogena estron in estradiol (Blanchon, 2002, ATCC).



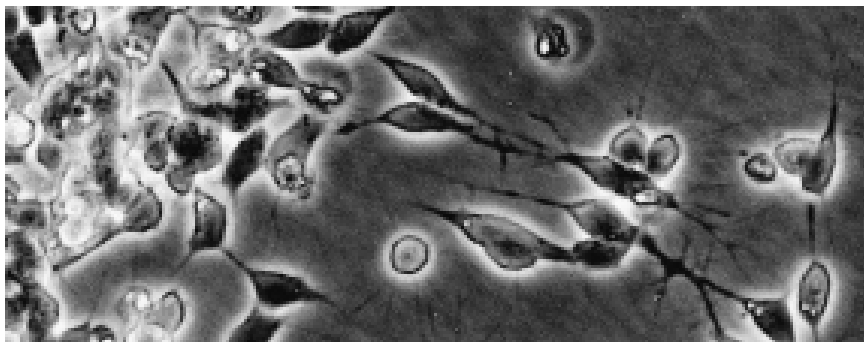
Slika 2.11 Celice JEG3 (Blanchon, 2002)

### 2.7.2.4 SH-SY5Y

Celična linija izvira iz neuroblastoma. To je neuroendokrini tumor, t.j. pojavlja se na stiku živčnega in žleznega tkiva v simpatičnem živčevju. Celična linija SH-SY5Y izvira iz

metastatičnega kostnega mozga. Uporablja se kot model neuroblastov (Maggi, 1998), to so nediferencirane celice, ki se bodo razvile v neurone ali glia celice.

Gojene celice ohranijo dopamin-beta-hidroksilazno aktivnost in lahko pretvarjajo glutamat v neurotransmitter GABA ( $\gamma$  amino-maslena kislina). S ponovljenimi pasažami lahko celice izgubijo lastnosti živčnih celic (ATCC, Kölsch, 1999, wikipedia).



**Slika 2.12** Celice SH-SY5Y (Kölsch, 1999)

## 2.8 TRANSFEKCIJE

Transfekcija je postopek, s katerim v evkariontsko celico vnesemo tuj genski material. DNA gre v celice skozi začasne pore, ki se tvorijo v plazmalemi. Najosnovnejši način transfekcije je ta, da DNA vežemo na substrat, ki se obori na površini celice. Celica sprejme nekaj oborjenega substrata in s tem tudi vezano DNA. Pogost substrat je kalcijev klorid ali kalcijev fosfat. Bolj učinkoviti so dendrimeri (visoko razvejane organske spojine) ali liposomi, kjer se membrana liposoma zlije z membrano celice in DNA, ki je bila v liposomu, preide v notranjost celice. Za izvajanje transfekcij obstajajo tudi komercialni kompleti, na primer: FuGENE (Roche), Lipofectamin (Invitrogen), jetPEI (Polyplus transfection). Za večjo uspešnost lahko transfekcije izvajamo z elektroporacijo ali temperaturnim šokom. Neposredna metoda pa je genska pištola, kjer DNA vežemo na nano delec (zlato) in ga izstrelimo v jedro celice (Mozafari, 2007, Noh, 2007).

Transfekcije so navadno začasne, saj se uvedena DNA ne vgradi v genomsko DNA, ampak se v jedru nahaja kot plazmid. Po nekaj pasažah se plazmid izgubi in s tem tudi lastnost, ki jo je kodiral. Če želimo trajne transfekcije, mora plazmid nositi še lastnost, ki daje takšni celici kompetitivno prednost pred ostalimi, na primer rezistenco na nek antibiotik. Takšen plazmid se ne bo izgubil, temveč se bo vgradil v genom (Naylor. 1999).

Transfekcije uporabljamo pri študiju izražanja genov *ex vivo* in študiju promotorjev.



### 3 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

#### Namen dela:

1. Določiti vpliv inhibicije s steroli (gojišče COPUFA) in z od cAMP-odvisnim inducibilnim represorjem ICER na izražanje z bližnjega promotorja *CYP51* v različnih celičnih linijah.
2. Preveriti vpliv s steroli- in s cAMP-posredovane signalne poti na bližnji promotor *HMGCR*.

#### Hipoteze:

1. Represija bližnjega promotorja *CYP51* s steroli (gojišče COPUFA) je po jakosti močnejša od inhibicije preko cAMP-signalne poti (represor ICER).
2. Raven represije *CYP51* s steroli in preko ICER je odvisna od tipa celic.
3. Bližnji promotor *HMGCR* se odziva na aktivacijo s SREBP-2 ter na cAMP-signalno pot.

## 4 METODE IN MATERIALI

### 4.1 DELO Z BAKTERIJAMI

#### 4.1.1 Priprava tekočega LB (Luria-Bertani) gojišča

Za pripravo LB gojišča smo zatehtali in zmešali:

Bakterijski pepton	1,0 g
Kvasni ekstrakt	0,5 g
NaCl	1,0 g
Deionizirana voda	do 100 ml

Gojišče smo avtoklavirali (121 °C, 20 min, 1,2 atm) in nato hranili v hladilniku pri +4 °C.

#### 4.1.2 Priprava trdnega LB in LBA (Luria-Bertani z ampicilinom) gojišča

Za pripravo LB in LBA trdnega gojišča smo zatehtali in zmešali:

Bakterijski pepton	1,0 g
Kvasni ekstrakt	0,5 g
NaCl	1,0 g
Agar	1,5 g
Deionizirana voda	do 100 ml

Gojišče smo avtoklavirali (121 °C, 20 min, 1,2 atm). Sterilno gojišče smo ohladili na ~ 50 °C (lahko v vodni kopeli). Če smo pripravljali LBA gojišče, smo dodali 100 µl ampicilina ( $c_{amp} = 100 \text{ mg/ml}$ ).

Tako pripravljeno gojišče smo nalili v petrijevke in pustili v laminariju, da se je ohladilo in strdilo. Petrijevke z gojiščem smo prenesli v inkubator (37 °C) preko noči. Naslednji dan smo jih shranili v hladilnik pri +4 °C.

### **4.1.3 Priprava prekonočne kulture**

Prekonočna kultura služi kot starterska kultura. Iz nje si pripravimo nadaljnje kulture bakterijskih celic. V sterilno mikrocentrifugirko smo nalili 10-15 ml LB gojišča ter dodali 1/1000 V ampicilina. Z agarne plošče smo precepili eno osamljeno bakterijsko kolonijo. Preko noči smo inkubirali na stresalniku (37 °C, 200 rpm).

### **4.1.4 Priprava trajne kulture bakterijskih celic**

Trajno kulturo pripravimo zato, da jo lahko zmrznemo in nam služi kot vir transformiranih bakterijskih celic. V sterilno mikrocentrifugirko smo zatehtali 0,3 g glicerola (2-3 kapljice). Dodali do 1 ml prekonočne kulture bakterijskih celic ter premešali. Zmrznili smo jih v tekočem dušiku in shranili pri -70 °C.

### **4.1.5 Transformacija kompetentnih bakterijskih celic s plazmidi**

50 µl kompetentnih celic smo odtalili na ledu in jim dodali 1-4 µl plazmida ( $c = 3 \text{ mg/ml}$ ). Inkubirali smo jih na ledu za 30 min, nato 45 s v termobloku pri 42 °C. Sledila je 2 min inkubacija na ledu. Dodali smo 250 µl LB medija ter 1 h inkubirali na stresalniku (37 °C, 100-150 rpm). Po končani inkubaciji smo kulturo razmazali na LBA ploščo, ki smo jo nato preko noči inkubirali pri 37 °C.

Uporabljali smo kompetentne celice *E. coli* JM109. Pomembno je, da se celice počasi odtalijo in ne segrejejo, saj bi s tem izgubile svojo kompetentnost.

### **4.1.6 Izolacija plazmidne DNA**

Za izolacijo plazmidne DNA iz bakterijskih celic smo uporabili komercialne komplete »Quiagen prep«. Glede na želeno količino izolirane plazmidne DNA smo izbirali med MINI (do 20 µg), MAXI (300-500 µg) in MEGA (1,5-2,5 mg) kompleti. Delali smo po navodilih proizvajalca (QIAGEN 2005).

## 4.2 DELO Z NESMRTNIMI CELIČNIMI KULTURAMI

### 4.2.1 Priprava gojišč

#### 2.2.1.1 Gojišče DMEM

V čašo smo nalili 4 l deionizirane vode. Dodali smo komercialno mešanico DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma-Aldrich) ter 18,5 g NaHCO<sub>3</sub>. Na magnetnem mešalu smo mešali nekaj ur, da se je v raztopino vezal CO<sub>2</sub> iz zraka. Nato smo s HCl uravnavali pH na 7,05-7,15. Dopolnili smo z deionizirano vodo do 5 l. Sterilno smo filtrirali v predhodno sterilizirane steklenice. Gojišče v steklenicah smo hranili v hladilniku pri +4 °C. To je bilo osnovno gojišče, ki še ne zagotavlja rasti celičnih kultur.

#### 2.2.1.2 Popolno gojišče

94 % DMEM

5 % BCS (telečji serum)

1 % L-glutamin

#### 2.2.1.3 Gojišče COPUFA

Popolno gojišče

1 % BSA (goveji serumski albumin)

linolenska kislina (C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>) (0,15 mM)

holesterol (10 µg/ml)

25-hidroksi-holesterol (1 µg/ml)

(linolenska kislina, holesterol in 25-hidroksi-holesterol so raztopljeni v 100 % etanolu)

### 4.2.2. Priprava PBS (fosfatni pufer)

Za pripravo PBS smo uporabljali komercialno mešanico (Phosphate Buffered Saline, Sigma), ki smo jo raztopili v ustreznem volumnu deionizirane vode. Raztopino smo avtoklavirali in hranili v hladilniku pri +4 °C.

#### 4.2.3 Priprava 2 x HBS

280 mM NaCl	28 ml
10 mM KCl	5 ml
1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75 ml
12 mM Glc	6,0 ml
50 mM HEPES	25 ml
Deionizirana voda	do 500 ml

pH raztopine smo uravnavali na 7,05-7,12. Dolili smo deionizirano vodo do 500 ml. Sterilno smo filtrirali in hranili v hladilniku pri +4 °C.

#### 4.2.4 Priprava PLB (pasivni lizirajoči pufer)

Komercialni PLB (Passive Lysis Buffer, Promega) smo zmešali z destilirano vodo v razmerju 1:5.

#### 4.2.5 Odmrzovanje nesmrtnih celic

Fiolo s celicami smo vzeli iz Dewerjeve posode. Fiolo smo čim hitreje odtalili in celice prenesli v steklenice za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm<sup>2</sup> imenovane T75 steklenice ter dopolnili z 10 ml popolnega gojišča. Dodali smo FCS (fetalni telečji serum) ter postavili v inkubator, kjer smo vzdrževali 37 °C, 100% vlažnost in 5% ogljikov dioksid.

#### 4.2.6 Zamrzovanje nesmrtnih celic

Ko so celice v T75 steklenicah pokrile 85-100% površine dna, smo gojišče odsesali. Celice smo sprali s PBS ter PBS odsesali. Dodali smo 2-3 ml tripsina ter steklenice postavili v inkubator dokler se celice niso odlepili od podlage. Nato smo jim dodali popolno gojišče in skupke celic s pipetiranjem razbili. Celice, suspendirane v gojišču, smo prenesli v centrifugirke in centrifugirali (sobna temperatura, 5 min, 1000 rpm). Gojišče smo odsesali

ter celicam dodali medij za zmrzovanje (50% FCS, 40 % gojišče, 10 % DMSO). Vzorec smo razdelili po 1ml suspenzije v fiole za zmrzovanje, ki smo jih počasi ohlajali (-20 °C nekaj ur, -70 °C čez noč). Nasednji dan smo prenesli fiole v Dewerjevo posodo (-196 °C).

#### **4.2.7 Precepljanje in vzdrževanje nesmrtnih celic**

Celice so bile pritrjene na dno T75 steklenic. Ko so celice v T75 steklenicah dosegle 85-100% konfluentnost, smo gojišče odsesali. Celice smo sprali s PBS ter PBS odsesali. Dodali smo 2-3 ml tripsina ter steklenice postavili v inkubator, dokler se celice niso odlepile od podlage. Nato smo jim dodali popolno gojišče in skupke celic s pipetiranjem razbili. Suspenzijo celic smo v enakomernih deležih prenesli v nove sterilne T75 steklenice ter jim dodali popolno gojišče do ~10-15 ml skupnega volumna. T75 steklenice smo označili in postavili v inkubator.

Če celice še niso pokrile celega dna steklenice, smo gojišče iz T75 steklenice odsesali ter dodali sveže polno gojišče do ustreznega volumna (~10-15 ml).

#### **4.2.8 Transfekcije**

Transfekcija je postopek, kjer v evkariontske celice vnesemo tuj genski material z namenom študije genskega izražanja *ex vivo*.

##### *4.2.8.1 Priprava transfekcijske mešanice*

V mikrocentrifugirkah smo pripravili mešanico plazmidov, ki smo jih uporabljali pri transfekcijah. Za vsak poskus smo odpipetirali dvakrat deionizirano vodo in 2 x HBS. Nato smo dodali plazmid, ki kodira  $\beta$ -galaktozidazo (*pRSV  $\beta$ -gal*) in služi kot kontrolni plazmid, plazmide s poročevalskimi geni (*CYP51-luc* ali *HMGCR-luc*), plazmide za prekomerno prepisovanje transkripcijskih faktorjev in polnilni plazmid pCAT basic. Predhodno je bilo dokazano, da plazmid pCAT basic nima luciferazne aktivnosti in tako ne vpliva na rezultate transfekcij.

#### 4.2.8.1.1 Transfekcijska mešanica za izbiro metode transfekcij:

Za vsak poskus smo v mikrocentrifugirko odpipetirali:

110 µl	dvakrat deionizirane vode
115 µl	2 x HBS
1.250 ng	<i>pRSV β-gal</i>
1.250 ng	plazmid s <i>CYP51-luc</i>

#### 4.2.8.1.2 Transfekcijska mešanica za študij vpliva s steroli- in s cAMP-posredovane signalne poti na bližnji promotore *HMGCR*:

Za vsak poskus smo v mikrocentrifugirko odpipetirali:

110 µl	dvakrat deionizirane vode
115 µl	2 x HBS
125 mg	<i>pRSV β-gal</i>
500 ng	plazmid s <i>HMGCR-luc</i>
500, 1000, 1500, 2000 ng	plazmida z <i>ICER</i> oz. plazmida s <i>CREM</i> oz. 100, 500, 1000 ng
	plazmida s <i>SREBP-2</i>
do 2000 ng	pCAT basic

#### 4.2.8.1.3 Transfekcijska mešanica za študij vpliva z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja *ICER* na izražanje gena *CYP51-luc*:

Za vsak poskus smo v mikrocentrifugirko odpipetirali:

110 µl	dvakrat deionizirane vode
115 µl	2 x HBS
500 ng	<i>pRSV β-gal</i>
500 ng	<i>CYP51-luc</i>
900 ng	pCATb / plazmid z <i>ICER</i>

Za transfekcije s komercialnim reagentom FuGENE (FuGENE HD Transfection Reagent, Roche) smo se držali priloženega protokola.

Mikrocentrifugirke smo temeljito premešali na krožnem mešalu ter jim, kadar nismo uporabljali metode s FuGENE, po kapljicah dodali 16 µl 2M kalcijevega klorida. Sledila je

30 min inkubacija pri sobni temperaturi. Vsak poskus smo delali dvojno zato smo iz ene mikrocentrifugirke prenesli transfekcijsko mešanico v dve jamici na mikrotitrski plošči.

#### 4.2.8.2 *Postopek transfekcije*

Celice smo precepili na mikrotitrski plošče (vsaka plošča je imela 12 jamic s površino 3,66 cm<sup>2</sup>) tako, da je bilo v vsaki jamici  $2 \cdot 10^6$  celic. V vsak prostorček smo dodali 2 ml ustreznega gojišča ter postavili v inkubator preko noči.

Po 24 h smo gojišče odsesali ter v vsako jamico dodali po 2 ml ustreznega svežega gojišča. V vsako jamico smo dodali 230  $\mu$ l transfekcijske mešanice. Navadno smo naredili 4 poskuse dvojno, tako da smo enako transfekcijsko mešanico dodali v 8 jamic, za posamezno celično linijo. Kadar smo transfekcije izvajali s kalcijevim kloridom, ki mu je sledil glicerolni šok (CaCl<sub>2</sub>/glicerol), smo celicam 6h po transfekciji dodali 15% glicerol v pufru HBS. To smo naredili tako, da smo gojišče odsesali, dodali 2ml glicerola v vsako jamico s celicami, inkubirali 3 minute, odsesali glicerol ter znova dodali gojišče. Plošče smo rahlo potresli ter postavili v inkubator preko noči.

Po 24 h smo odsesali gojišče s transfekcijsko mešanico ter v vsako jamico dodali 2 ml svežega, ustreznega gojišča. Mikrotitrski plošče smo postavili v inkubator preko noči.

Po 24h smo izvedli »žetev« celic. To smo naredili tako, da smo gojišče odsesali ter sprali z 2 ml PBS. PBS smo odsesali in dodali 150  $\mu$ l PLB. Mikrotitrski plošče smo nato stresali na stresalniku pri sobni temperaturi, dokler vse celice niso odstopile od podlage (15-20 min). Celične lizate smo s pipetiranjem prenesli v mikrocentrifugirke ter centrifugirali (2 min, 13000 rpm). Nato smo supernatant s pipetiranjem prenesli v nove mikrocentrifugirke. Tako smo se znebili celičnih ostankov, ki bi lahko motili nadaljnje analize.



## 4.3 ANALIZA TRANSFEKCIJ

### 4.3.1 Priprava 10 x Mg raztopine

0,1 M MgCl <sub>2</sub>	1,0 ml
4,5 M β-merkapt-etanol	3,5 ml
deionizirana voda	5,5 ml

Raztopino smo porazdelili v mikrocentrifugirke in hranili pri -20 °C.

### 4.3.2 Priprava Na<sub>x</sub>H<sub>y</sub>PO<sub>4</sub>

0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	61,5 ml
0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,5 ml
deionizirana voda	do 150 ml

### 4.3.3 Priprava 1 x ONPG

ONPG (o-nitrofenil β-D-galaktopiranozid, Sigma)	100 mg
Na <sub>x</sub> H <sub>y</sub> PO <sub>4</sub>	25 ml

Raztopino smo porazdelili v mikrocentrifugirke in hranili pri -20 °C.

### 4.3.4 Priprava luciferaznega reagenta

Zmešali smo komercialni substrat (Dual Luciferase reporter Assay System, Promega) in 10 ml pufru po protokolu.

Raztopino smo porazdelili v mikrocentrifugirke in hranili pri -70 °C.

#### 4.3.5 Priprava substrata za kontrolni plazmid *pRSV $\beta$ -gal*

Za vsak 30  $\mu$ l vzorec smo zmešali:

100 x Mg raztopina	3 $\mu$ l
1 x ONPG	66 $\mu$ l
Na <sub>x</sub> H <sub>y</sub> PO <sub>4</sub>	201 $\mu$ l

#### 4.3.6 Analiza kontrolnega plazmida *pRSV $\beta$ -gal*

Iz vsakega vzorca smo prenesli po 30  $\mu$ l v 2 novi mikrocentrifugirki. V vsak 30  $\mu$ l vzorec smo dodali 270  $\mu$ l substrata za kontrolni plazmid *pRSV  $\beta$ -gal*, premešali na krožnem mešalu in postavili na led. Pripravili smo tudi 2 slepa vzorca, kamor smo odpipetirali le PLB in substrat za *pRSV  $\beta$ -gal*. Mikrocentrifugirke smo nato inkubirali na 37 °C dokler se ni razvila intenzivno rumena barva (5-45 min). Mikrocentrifugirke smo prenesli na led. V istem vrstnem redu kot smo dodajali substrat za *pRSV  $\beta$ -gal*, smo dodali 500  $\mu$ l 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ki je prekinil encimsko reakcijo  $\beta$ -galaktozidaze. Mikrocentrifugirko smo dobro premešali na krožnem mešalu. Merilo encimske aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze je bila spektrofotometrično izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 420 nm. Izračunali smo povprečne vrednosti dveh vzporednih poskusov. S temi vrednostmi pa smo normalizirali rezultate, ki smo jih dobili z uporabo luciferaznega poročevalskega sistema.

#### 4.3.7 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordu (Bio-Rad)

Reagent Bio-Rad (Bio-Rad protein assay, dye reagent concentrat, Bio-rad Laboratories) smo zmešali z destilirano vodo v razmerju 1:5. V mikrocentrifugirko smo zmešali 50  $\mu$ l tako pripravljenega reagenta in dodali 1  $\mu$ l našega vzorca, premešali na krožnem mešalu in inkubirali na sobni temperaturi od 5 do 20 minut. Nato smo zmerili absorbcijo pri valovni dolžini 595 nm. Vsak vzorec smo merili v dvojniku. Z uporabo umeritvene krivulje in upoštevanjem faktorja redčenja smo določili koncentracijo proteinov v prvotnem vzorcu. Izračunali smo povprečne vrednosti dvojic.

#### 4.3.8 Analiza z uporabo luciferaznega poročevalskega sistema

V mikrocentrifugirko smo dali 25 µl luciferaznega reagenta in dodali 5 µl vzorca. Vsak vzorec smo merili v dvojniku in ga pripravljali sproti. Mikrocentrifugirko smo rahlo premešali in na luminometru Turner design TD 20/20 zmerili luminiscenco posameznega vzorca. Luminometer smo predhodno umerili na 0 s slepim vzorcem (5 µl vode in 25 µl luciferaznega reagenta). Izračunali smo povprečne vrednosti dveh poskusov. To nam je predstavljalo aktivnost luciferaze.

#### 4.3.9 Normalizacija

Vrednost luciferazne aktivnosti reporterskega plazmida vsakega vzorca smo normalizirali na vrednost β-galaktozidazne aktivnosti v posameznem vzorcu in tako dobili normalizirano luciferazno aktivnost (1).

$$\text{Normalizirana luciferazna aktivnost} = \frac{\text{Aktivnost luciferaze}}{\text{Aktivnost } \beta\text{-galaktozidaze}} \dots(1)$$

Nato smo vrednosti normalizirane luciferazne aktivnosti posameznega vzorca delili s povprečjem normaliziranih vrednosti luciferazne aktivnosti slepih poskusov posameznih celičnih linij (celice gojene v osnovnem gojišču, transfekcije izvedene samo s poročevalskim plazmidom, *pRSV β-gal* in pCAT basic) in izračunali povprečje za vsako skupino poskusov (2).

$$\text{Normalizacija} = \frac{\text{Normalizirana aktivnost luciferaze}}{\text{Povprečje normalizirane luciferane aktivnosti slepih poskusov}} \dots(2)$$

#### 4.4 STATISTIČNA ANALIZA

Kadar med sabo primerjamo več rezultatov in opravimo več t-testov, se pojavijo napake zaradi prevelikega števila primerjav. Problem rešimo tako, da uporabimo Bonferronijevo metodo, t.j. pri t-testu ustrezno prilagodimo stopnjo  $\alpha$  (napaka I. vrste), ali pa uporabimo test LSD. Ta nam pove, ali je razlika, med dvema rezultatoma resnična ali samo slučajna (<http://www.turf.uiuc.edu/research/summaries/1994/understanding.pdf>.

<http://www.fsp.uni-lj.si/Methodologija/2005/13Analiza%20poskusov-nSkupin-1dejavnik.pdf>).

Rezultate smo analizirali s programom SPSS s pomočjo Jureta Ačimovič.

#### 4.5 UPORABLJENI PLAZMIDI

Pri transfekcijah smo uporabljali plazmide in luciferazne poročevalce različnih izvorov. Prikazani so v preglednicah 4.1 in 4.2.

##### **Preglednica 4.1 Uporabljeni plazmidi, ki so ekspresijski vektorji za posamezne transkripcijske faktorje.**

1-Department of Molecular Genetics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, ZDA; 2-Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique-Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale-Universite Louis Pasteur, B.P. 10142, 67404 Illkirch-Strasbourg, France.

protein	promotor	organizem	vir-laboratorij
SREBP-2	<i>CMV</i>	človek	Horton (1)
CREM $\tau$	<i>SV40</i>	miš	Sassone-Corsi (2)
$\beta$ -gal	<i>SV40</i>	/	Promega
pCATbasic	/	/	Promega
ICER	<i>CMV</i>	podgana	Sassone-Corsi (2)

**Preglednica 4.2 Uporabljena luciferazna reporterja.**

1-Medical Center for Molecular Biology, Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Slovenia; 2-Dept. of Molecular Biology and Biochemistry, University of California, Irvine, Irvine, CA 92717-3900, ZDA.

promotor	Območje na DNA	Organizem	Vir (laboratorij)
<i>CYP51</i>	-334 / +316	človek	Rozman (1)
<i>HMGCR</i>	-277 / +20	hrček	Osborne (2)

## 5 REZULTATI

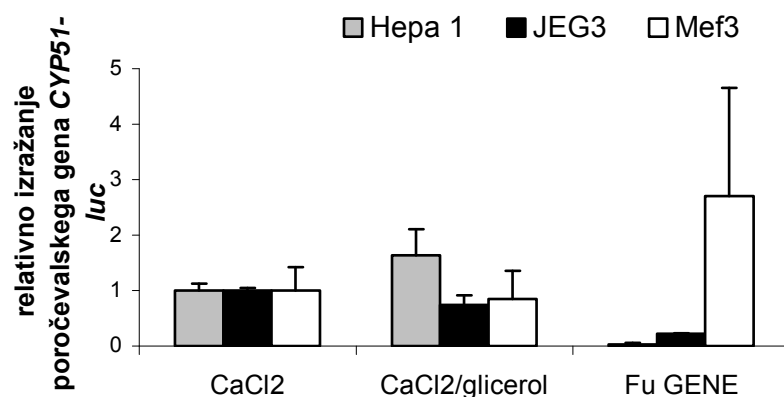
Znano je, da sta za homeostazo holesterola ključni dve poti uravnavanja: od sterolov-odvisna pot in od cAMP-odvisna pot. Pri od cAMP-odvisni poti transkripcijski faktor CREM deluje kot aktivator prepisovanja holesterogenih genov, represor ICER pa je izooblika CREM in deluje kot zaviralec. Namen od sterolov-odvisne poti uravnavanja je ta, da se holesterol ne sintetizira, kadar ga je v sistemu dovolj. Ta pot deluje preko transkripcijskih faktorjev SREBP (Rozman, 2000; Waterman, 1994; Brown, 1997; Lagor, 2005). Zanimal nas je vpliv s steroli- in s cAMP-posredovane signalne poti na bližnji promotor *HMGCR*.

Skušali smo ugotoviti vpliv s steroli- in s cAMP-posredovane signalne poti na bližnji promotor *HMGCR*, za kar smo uporabljali celično linijo JEG3, saj je ta odzivna na obe signalni poti. V drugem delu študije pa smo primerjali odziv od cAMP-odvisne poti in od sterolov-odvisne poti na izražanje gena *CYP51* v različnih celičnih linijah. V ta namen smo uporabljali poročevalski gen *CYP51-luc*.

### 5.1 IZBIRA METODE TRANSFEKCIJE

V okviru začetnih raziskav smo preverili, katera metoda transfekcije je najbolj učinkovita pri različnih celičnih linijah. Izbrali smo tri celične linije: Hepa 1 (mišje jetrne celice), JEG3 (človeške celice placente) in Mef3 (celice mišjih fibroblastov). Testirali smo tri metode transfekcij, ki se pogosto uporabljajo: transfekcije s kalcijevim kloridom ( $\text{CaCl}_2$ ), s kalcijevim kloridom, kjer celicam po 6 urah dodamo glicerol ( $\text{CaCl}_2$ /glicerol) ter s komercialnim reagentom FuGENE (FuGENE). Postopki transfekcij in njihova analiza so opisani pod točko 3.2.8 in 3.3. Merilo za učinkovitost transfekcij je predstavljalo relativno izražanje poročevalskega gena *CYP51-luc*.

Rezultati so predstavljeni na sliki 5.1.



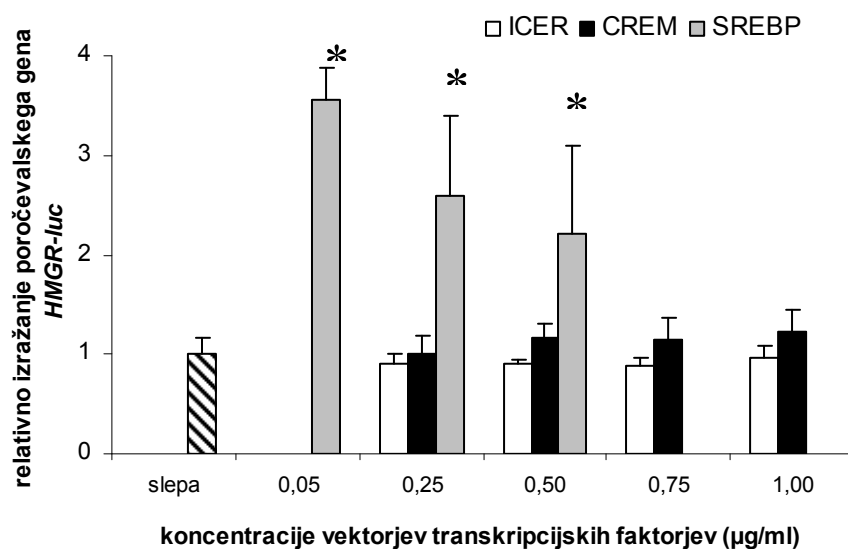
**Slika 5.1 Metode vnosa genskega materiala v sesalske celice;** CaCl<sub>2</sub> - metoda transfekcije s kalcijevim kloridom, CaCl<sub>2</sub>/glicerol - metoda transfekcije s kalcijevim kloridom, celicam po 6h dodamo 15% glicerol, FuGENE - metoda transfekcije s komercialnim reagentom FuGENE. Celična linija Hepa 1 – jetrne celice, mišjega izvora, JEG3 – celice človeške placente, Mef3 – celice mišjih fibroblastov.

Metoda s kalcijevim kloridom (CaCl<sub>2</sub>) je običajna metoda transfekcije, zato smo drugi dve metodi normalizirali glede na prvo. To je predstavljalo vrednost 1, ki je prikazana v prvem stolpcu. Z izjemo celične linije Hepa 1, glicerolni šok (CaCl<sub>2</sub>/glicerol) ni pokazal izboljšane uspešnosti transfekcije v primerjavi s samim kalcijevim kloridom. Iz izkušenj vemo, da pri celicah Mef3 večkrat ne pride do transfekcije, kar se je pokazalo tudi pri tokratnih poskusih, saj je bila uspešnost transfekcij s kalcijevim kloridom in kalcijevim kloridom, ki mu je sladil glicerolni šok, izjemno majhna. Višjo uspešnost transfekcij v Mef3 celice pa smo dosegli z uporabo reagenta FuGENE.

## 5.2 VPLIV S STEROLI- IN S cAMP-POSREDOVANE SIGNALNE POTI NA BLIŽNJI PROMOTOR *HMGCR*

V predhodnih poskusih je bilo potrjeno, da se gen *HMGCR* odziva na transkripcijska faktorja ICER in CREM, ki sodelujeta v od cAMP-odvisni poti uravnavanja izražanja holesterogenih genov (Lagor, 2005, Don, 2002). Poleg od cAMP-odvisnega odziva imajo celice JEG3 tudi od sterolov-odvisni odziv, kjer sodeluje transkripcijski faktor SREBP-2. Zato smo izvedli titracijo s tremi transkripcijskimi faktorji: ICER, CREM in SREBP-2. Zanimal nas je vpliv s steroli- in s cAMP-posredovane signalne poti na bližnji promotor

*HMGCR*. Merilo odziva proučevanega holesterogenega gena na prekomerno izražanje posameznega transkripcijskega faktorja je predstavljalo relativno izražanje poročevalskega gena *HMGCR-luc*. Preverili smo vpliv s steroli- in s cAMP-posredovane signalne poti na bližnji promotor *HMGCR*.



**Slika 5.2** Izražanje poročevalskega gena *HMGCR-luc* v odvisnosti od koncentracije vektorjev za prekomerno izražanje transkripcijskih faktorjev ICER, CREM (0,25-1,0 µg/ml) in SREBP-2 (0,05-0,50 µg/ml); ICER - inducibilen od cAMP-odvisen zgodnji represor, CREM – CRE modulator, SREBP-2 - Sterol Regulatory Element Binding Protein. \*  $p < 0,05$  v primerjavi s CREM in ICER

Iz literature je razvidno, da ima ICER inhibitorni učinek na izražanje holesterogenih genov, medtem ko imata CREM in SREBP-2 aktivacijski učinek (Don, 2002, Lagor, 2005, Brown, 1997). Naša študija je pokazala, da je SREBP-2 aktivator in poveča izražanje poročevalca *HMGCR* za skoraj 4 krat. Prekomerno izražanje CREM in ICER pa ne vpliva na izražanje z bližnjega promotorja *HMGCR*.



### 5.3 VPLIV Z LIPIDI BOGATEGA GOJIŠČA (COPUFA) IN REPRESORJA ICER (INDUCIBILNI OD cAMP-ODVISNI ZGODNJI REPRESOR) NA IZRAŽANJE GENA *CYP51*

Raziskavo smo razširili na dodatne celične linije iz različnih tkiv in različnih izvorov. Uporabljali smo dve mišji celični liniji: Hepa 1 (jetrne celice) in Y1 (celice skorje nadledvične žleze). Ostale celične linije so bile človeškega izvora; HepG2 (jetrne celice), SH-SY5Y (možganske celice), HO 23 (ovarijske celice) in JEG3 (placentalne celice).

#### 5.3.1 Vpliv z lipidi-bogatega gojišča (COPUFA) na zaviranje izražanja gena *CYP51*

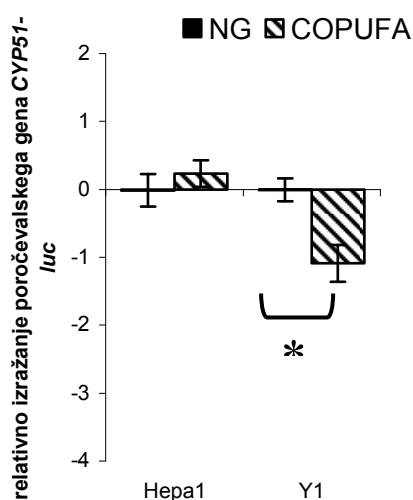
Iz literature je razvidno, da ima z lipidi-bogato gojišče (COPUFA) inhibitorni učinek na izražanje gena *CYP51* (Worgall, 1998), zato smo v prvem delu tega sklopa poskusov primerjali vpliv gojišča COPUFA (COPUFA) in navadnega popolnega gojišča (NG). To smo naredili tako, da smo celice vseh izbranih celičnih linij gojili vzporedno v gojišču COPUFA in NG ter izvedli transfekcijo samo s kontrolnim plazmidom *pRSV β-gal* in poročevalskim plazmidom *CYP51-luc*. Gojišče COPUFA vpliva na aktivnost endogenih transkripcijskih faktorjev v celicah. To so transkripcijski faktoriji SREBP, ki vplivajo na izražanje holesterogenega *CYP51*. Z lipidi bogato gojišče onemogoči pretvorbo SREBP v aktivno jedrno obliko in tako prepreči izražanje *CYP51*.

Namen tega dela poskusov je bil potrditi hipotezo, da je raven inhibicije *CYP51* v z lipidi bogatem gojišču COPUFA, v različnih celičnih linijah različno.

Rezultate smo, zaradi večje preglednosti, pretvorili v logaritemske vrednosti. Slika 5.3 prikazuje vpliv gojišča na izražanje *CYP51* v mišjih celičnih linijah, slika 5.4 pa v človeških celičnih linijah.

**Preglednica 5.1** Vrednosti p za celične linije Hepa1 in Y1 v NG in COPUFA; Hepa1 – jetrne celice, Y1 – celice skorje nadledvične žleze, NG – navadno gojišče, COPUFA – z lipidi bogato gojišče.

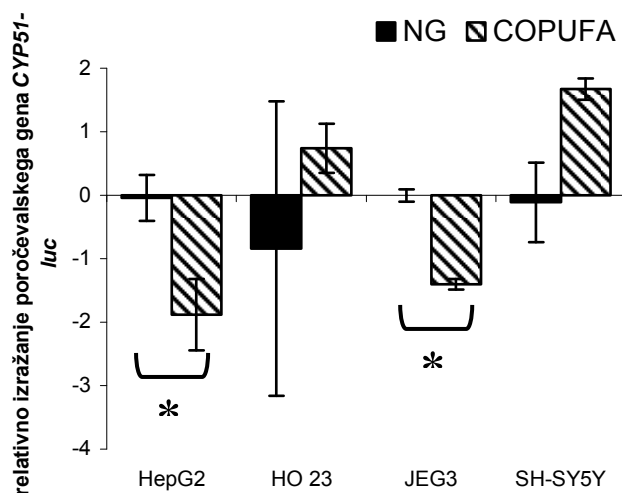
Celična linija	Transfekcija I	Transfekcija II	p
Hepa1	NG	COPUFA	0,415
Y1	NG	COPUFA	0,001



**Slika 5.3** Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in navadnega gojišča (NG) na izražanje gena *CYP51*, v mišjih celičnih linijah; Hepa-1 – jetrne celice, Y1 – celice skorje nadledvične žleze, NG – navadno gojišče, COPUFA – z lipidi bogato gojišče. \*  $p < 0,005$ .

**Preglednica 5.2** Vrednosti p za celične linije HepG2, JEG3 in SH-SY5Y v NG in COPUFA; HepG2 – jetrne celice, JEG3 – placentalne celice, SH-SY5Y – možganske celice, NG – navadno gojišče, COPUFA – z lipidi bogato gojišče.

Celična linija	Transfekcija I	Transfekcija II	p
HepG2	NG	COPUFA	0,003
JEG3	NG	COPUFA	0,000
SH-SY5Y	NG	COPUFA	0,016



**Slika 5.4** Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in navadnega gojišča (NG) na izražanje gena *CYP51*, v človeških celičnih linijah; HepG2 – jetrne celice, HO 23 – ovarijske celice, JEG3 – placentalne celice, SH-SY5Y – možganske celice, NG – navadno gojišče, COPUFA – z lipidi bogato gojišče. \*  $p < 0,005$ .

*CYP51* se v mišji celični liniji Hepa1 ne odziva statistično značilno na gojišče COPUFA v primerjavi z NG. Medtem ko COPUFA deluje inhibitorno na izražanje gena *CYP51* v celični liniji Y1. Odziv poročevalca na gojišče COPUFA je statistično značilen glede na vrsto tkiva, iz katerega celični liniji izvirata ( $p < 0,005$ ).

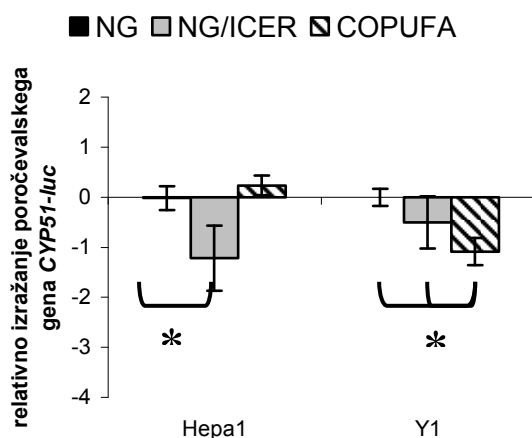
V celičnih linijah HepG2 in JEG3 se *CYP51* statistično značilno odziva na gojišče COPUFA v primerjavi z NG ( $p < 0,005$ ), COPUFA deluje inhibitorno. Pri celični liniji HO 23 ni prišlo do transfekcije poročevalca *CYP51-luc*, zato ti rezultati niso relevantni. Pri celični liniji SH-SY5Y smo zaznali 3,2-kratno povišanje v izražanju gena *CYP51* v gojišču COPUFA v primerjavi z NG ( $p < 0,005$ ). Odziv poročevalca *CYP51* na gojišče COPUFA je v celičnih linijah HepG2, JEG3 in SH-SY5Y različen.

### 5.3.2 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER na zaviranje izražanja gena *CYP51*

V drugem delu tega sklopa poskusov smo primerjali vpliv gojišča COPUFA in transkripcijskega faktorja ICER na izražanje z bližnjega promotorja holesterogenega gena *CYP51*, v izbranih celičnih linijah. Transkripcijski faktor ICER je inhibitorna izooblika transkripcijskega faktorja CREM (angl. CRE modulator), ki sodeluje v od cAMP-odvisnem uravnavanju holesterogenih genov. Zanimalo nas je, ali sta si inhibitorna učinka gojišča COPUFA in transkripcijskega faktorja ICER po jakosti podobna in ali različno vplivata na izražanje *CYP51* znotraj različnih celičnih linij. Celice vseh izbranih celičnih linij smo gojili vzporedno v gojišču COPUFA (COPUFA) in navadnem gojišču, ki smo mu v transfekcijski mešanici dodali vektor za prekomerno izražanje transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER). Rezultate smo, zaradi večje preglednosti, pretvorili v logaritemske vrednosti. Slika 5.5 prikazuje vpliv inhibitornega dejavnika (gojišče COPUFA in represor ICER) na izražanje *CYP51* v mišjih celičnih linijah, slika 5.6 pa v človeških celičnih linijah.

**Preglednica 5.3 Vrednosti p za celične linije Hepa1 in Y1 v NG, NG/ICER in COPUFA** Hepa1 – jetrne celice, Y1 – celice skorje nadledvične žleze, NG – navadno gojišče, NG/ICER – ICER v navadnem gojišču, COPUFA – z lipidi bogato gojišče.

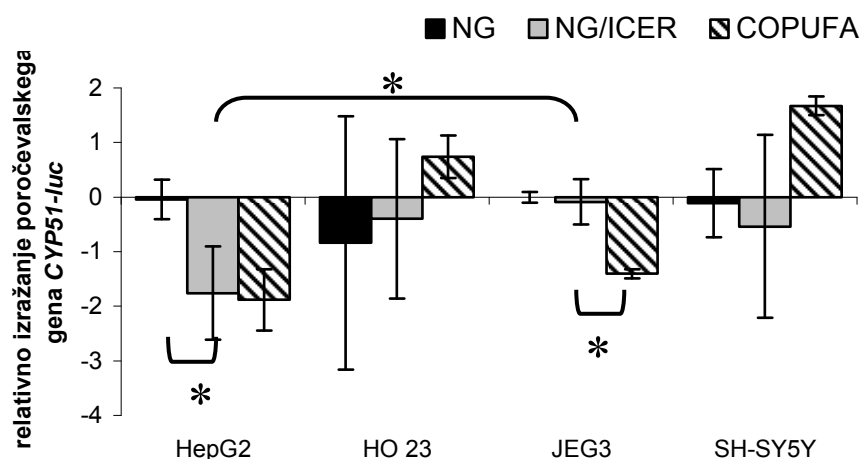
Celična linija	Transfekcija I	Transfekcija II	p
Hepa1	NG	COPUFA	0,415
	NG	NG/ICER	0,001
	NG/ICER	COPUFA	0,000
Y1	NG	COPUFA	0,001
	NG	NG/ICER	0,076
	NG/ICER	COPUFA	0,032



**Slika 5.5 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER) na izražanje gena *CYP51* v mišjih celičnih linijah;** Hepa1 – jetrne celice, Y1 – celice skorje nadledvične žleze, NG – navadno gojišče, NG/ICER – ICER v navadnem gojišču, COPUFA – z lipidi bogato gojišče.\*  $p < 0,05$

**Preglednica 5.4 Vrednosti p za celične linije HepG2, JEG3 in SH-SY5Y v NG, NG/ICER in COPUFA;** HepG2 – jetrne celice, JEG3 – placentalne celice, SH-SY5Y – možganske celice, NG – navadno gojišče, NG/ICER – ICER v navadnem gojišču, COPUFA – z lipidi bogato gojišče.

Celična linija	Transfekcija I	Transfekcija II	p
HepG2	NG	COPUFA	0,003
	NG	NG/ICER	0,005
	NG/ICER	COPUFA	0,796
JEG3	NG	COPUFA	0,000
	NG	NG/ICER	0,671
	NG/ICER	COPUFA	0,000
SH-SY5Y	NG	COPUFA	0,016
	NG	NG/ICER	0,814
	NG/ICER	COPUFA	0,242



**Slika 5.6 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER) na izražanje gena *CYP51*, v človeških celičnih linijah;** HepG2 – jetrne celice, HO 23 – ovarijske celice, JEG3 – placentalne celice, SH-SY5S – možganske celice, NG – navadno gojišče, NG/ICER – ICER v navadnem gojišču, COPUFA – z lipidi bogato gojišče. \*  $p < 0,05$

Iz slike 5.5 lahko razberemo, da se poročevalec *CYP51* v celični liniji Hepa1, za razliko od Y1, statistično značilno odziva na prekomerno izražen represor ICER ( $p < 0,005$ ) v primerjavi s celicami gojenimi v NG brez transkripcijskega faktorja. Primerjava odziva v celični liniji Hepa1 pa je pokazala, da ICER statistično značilno močnejše inhibira izražanje gena *CYP51* kot COPUFA ( $p < 0,005$ ). Pri celični liniji Y1 represor ICER nima velikega vpliva na izražanje poročevalca in prevladuje vpliv gojišča COPUFA, kot smo dokazali že v predhodnem poskusu.

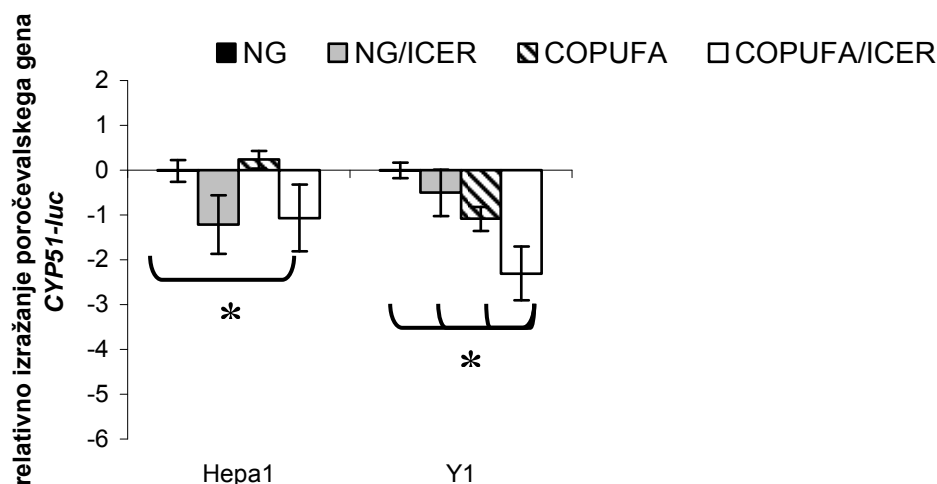
Med človeškimi celičnimi linijami se na prekomerno izražanje transkripcijskega faktorja ICER poročevalec *CYP51* odziva statistično značilno samo v celični liniji HepG2 ( $p < 0,005$ ) v primerjavi s celicami gojenimi v NG brez dodatka represorja. Iz slike 5.6 je tudi razvidno, da se inhibični učinek ICER na izražanje poročevalca *CYP51* razlikuje le med celičnima linijama HepG2 in JEG3. Pri celičnih linijah JEG3 ( $p < 0,005$ ) in SH-SY5Y ( $p < 0,05$ ) opazimo statistično značilno razliko med inhibičnim vplivom ICER in gojiščem COPUFA na izražanje gena *CYP51*.

### 5.3.3 Aditivni vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER na zaviranje izražanja gena *CYP51*

V tretjem delu tega sklopa poskusov smo ugotavljali, ali imata represor ICER in gojišče COPUFA aditivni inhibitorni vpliv na izražanje gena *CYP51*. Celice smo gojili v NG in gojišču COPUFA. Polovici celic iz vsakega gojišča smo v transfekcijsko mešanico dodali plazmid za prekomerno izražanje transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER oz. COPUFA/ICER), transfekcijska mešanica ostalih celic pa je vsebovala le kontrolni plazmid *pRSV β-gal* in poročevalski plazmid *CYP51-luc* (NG oz. COPUFA).

**Preglednica 5.5 Vrednosti p za celične linije Hepa1 in Y1 v NG, NG/ICER, COPUFA in COPUFA/ICER;** Hepa1 – jetrne celice, Y1 – celice skorje nadledvične žleze, NG – navadno gojišče, NG/ICER – ICER v navadnem gojišču, COPUFA – z lipidi bogato gojišče, COPUFA/ICER – ICER v z lipidi bogatem gojišču.

Celična linija	Transfekcija I	Transfekcija II	p
Hepa1	NG	COPUFA	0,415
	NG	NG/ICER	0,001
	NG/ICER	COPUFA	0,000
	NG	COPUFA/ICER	0,002
	COPUFA/ICER	ICER	0,626
	COPUFA/ICER	COPUFA	0,000
Y1	NG	COPUFA	0,001
	NG	NG/ICER	0,076
	NG/ICER	COPUFA	0,032
	NG	COPUFA/ICER	0,000
	COPUFA/ICER	ICER	0,000
	COPUFA/ICER	COPUFA	0,000

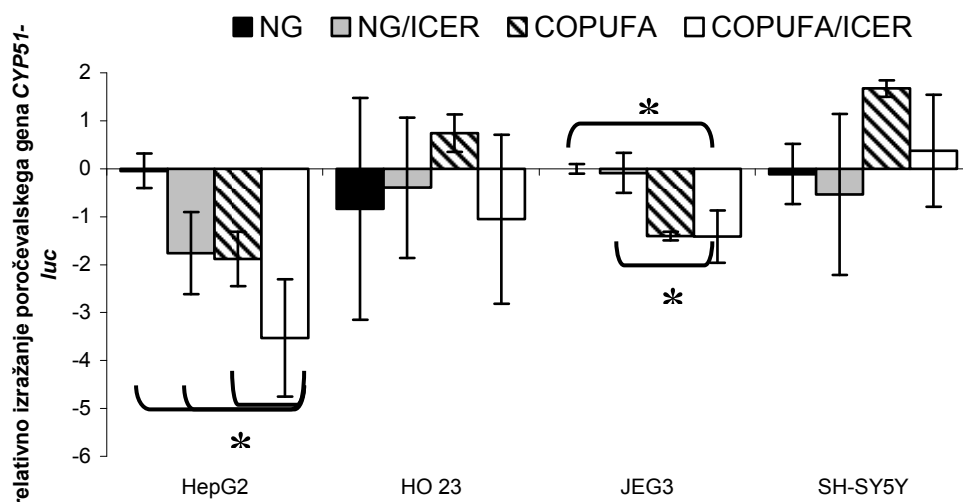


**Slika 5.7** Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA), transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER) in z lipidi bogatega gojišča in transkripcijskega faktorja ICER hkrati (COPUFA/ICER) na izražanje gena *CYP51*, v človeških celičnih linijah; Hepa1 – jetrne celice, Y1 – celice skorje nadledvične žleze, NG – navadno gojišče, NG/ICER – ICER v navadnem gojišču, COPUFA – z lipidi bogato gojišče, COPUFA/ICER – ICER v z lipidi bogatem gojišču. \*  $p < 0,005$

**Preglednica 5.6** Vrednosti  $p$  za celične linije HepG2, JEG3 in SH-SY5Y v NG, NG/ICER, COPUFA in COPUFA/ICER; HepG2 – jetrne celice, JEG3 – placentalne celice, SH-SY5Y – možganske celice, NG – navadno gojišče, NG/ICER – ICER v navadnem gojišču, COPUFA – z lipidi bogato gojišče, COPUFA/ICER – ICER v z lipidi bogatem gojišču.

Celična linija	Transfekcija I	Transfekcija II	p
HepG2	NG	COPUFA	0,003
	NG	NG/ICER	0,005
	NG/ICER	COPUFA	0,796
	NG	COPUFA/ICER	0,000
	COPUFA/ICER	ICER	0,001
JEG3	COPUFA/ICER	COPUFA	0,003
	NG	COPUFA	0,000
	NG	NG/ICER	0,671
	NG/ICER	COPUFA	0,000
	NG	COPUFA/ICER	0,000
SH-SY5Y	COPUFA/ICER	ICER	0,000
	COPUFA/ICER	COPUFA	0,954
	NG	COPUFA	0,016
	NG	NG/ICER	0,814
	NG/ICER	COPUFA	0,242
	NG	COPUFA/ICER	0,181
	COPUFA/ICER	ICER	0,242
	COPUFA/ICER	COPUFA	0,209





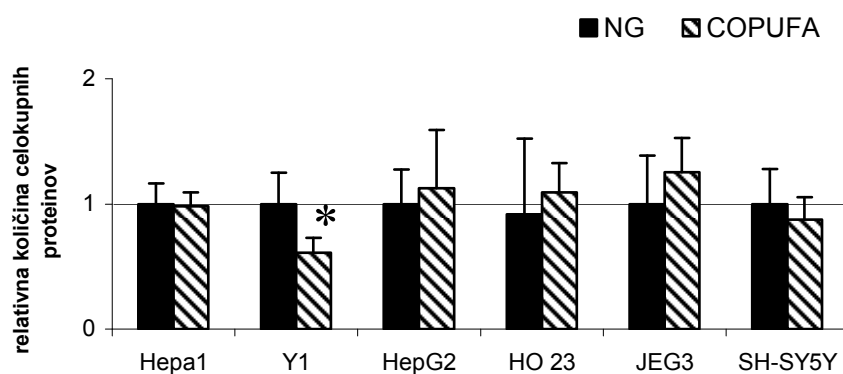
**Slika 5.8** Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA), transkripcijskega faktorja ICER (NG/ICER) in z lipidi bogatega gojišča in transkripcijskega faktorja ICER hkrati (COPUFA/ICER) na izražanje gena *CYP51* v človeških celičnih linijah; HepG2 – jetrne celice, HO 23 –ovarijske celice, JEG3 – placentalne celice, SH-SY5S – možganske celice, NG – navadno gojišče, NG/ICER – ICER v navadnem gojišču, COPUFA – z lipidi bogato gojišče, COPUFA/ICER – ICER v z lipidi bogatem gojišču. \*  $p < 0,005$

Poročevalec *CYP51* se v celični liniji Hepa1 na inhibitorni učinek COPUFA/ICER odziva podobno kot na sam inhibitorni represor ICER, vendar statistično značilno različno kot na gojišče COPUFA in na NG ( $p < 0,005$ ). V celični liniji Y1 COPUFA/ICER aditivno inhibirata izražanje gena *CYP51*. Iz grafa je razvidno, da imata represor ICER in gojišče COPUFA manjši vpliv na zaviranje izražanja *CYP51*, ko delujeta vsak posamič.

Pri celični liniji HepG2 sicer ne opazimo aditivnega inhibitornega učinka COPUFA/ICER na izražanje *CYP51*, vendar je iz grafa 5.8 razvidno, da imata ICER in COPUFA močnejši učinek na inhibicijo gena *CYP51*, kadar delujeta skupaj ( $p < 0,05$ ). V celicah JEG3 se *CYP51* na COPUFA/ICER odziva zelo podobno kot na samo gojišče COPUFA. Razlika med inhibitornim vplivom transkripcijskega faktorja ICER in COPUFA/ICER je statistično značilna ( $p < 0,005$ ).

## 5.4 PREVERJANJA PREŽIVELOSTI CELIC

Iz literature je razvidno, da imajo lahko oksisteroli, ki smo jih uporabljali tudi mi v gojišču COPUFA, citotoksične učinke na celice v kulturah. Med ostalim lahko povzročajo apoptozo in nekrozo (Kölsch, 1999). Zato smo tekom poskusov preverjali preživetje celic. Merilo zmanjšane preživetja nam je predstavljal padec koncentracije celokupnih proteinov v celičnih lizatih. Zato smo po določitvi ostalih parametrov izmerili tudi količino proteinov v vzorcu.



**Slika 5.9 Preživetje celic v času transfekcij;** relativna količina proteinov v posamezni celični kulturi. \*  $p < 0,005$  v primerjavi z NG

Primerjali smo količino celokupnih proteinov celic gojenih v NG in COPUFA. V večini celičnih linij je bila količina celokupnih proteinov podobna. Le celice iz celične linije Y1 so v gojišču COPUFA sintetizirale manj proteinov kot v navadnem gojišču ( $p < 0,005$ ).

## 6. RAZPRAVA IN SKLEPI

### 6.1 IZBIRA METODE TRANSFEKCIJE

V okviru preliminarnih raziskav smo za posamezne celične linije preverili učinkovitost transfekcijskih metod. Izbrali smo tri celične linije. Za model jetrnih celic smo izbrali celično linijo Hepa 1, saj je delo s celicami mišjega izvora bolj preprosto kot s človeškimi jetrnimi celicami. Celično linijo JEG3 (človeške celice placente) smo izbrali, ker je pogosto uporabljena in v našem laboratoriju dobro poznana. Ima elemente od sterolov-odvisnega in od cAMP-odvisnega odgovora. Služila je kot pozitivna kontrola. Kot model nesomatskih celic smo izbrali celično linijo Mef3 (celice mišjih fibroblastov). Zanje velja, da je transfekcija zelo težavna ali pa sploh nemogoča. Testirali smo tri metode transfekcije. Prva je bila metoda s kalcijevim kloridom ( $\text{CaCl}_2$ ), ki je najbolj običajna metoda in v večini primerov tudi zadovoljivo učinkovita. V primeru, ko sam kalcijev klorid ne da želenega učinka, literatura priporoča dodajanje glicerola 6 ur po transfekciji celic (Ausubel, 2003). S tem povzročimo glicerolni šok. Celice pri tem bolj intenzivno sprejemajo genski material, ki je vezan na kalcijev klorid. Kot tretjo možno metodo transfekcije smo testirali komercialni reagent FuGENE, ki naj bi v nekaterih primerih bistveno izboljšal učinkovitost transfekcij.

Kot pospeševalec transfekcij skupaj s kalcijevim kloridom se je glicerol izkazal za manj učinkovitega, kot smo predvidevali. Povišana uspešnost transfekcij se je pokazala le pri celični liniji Hepa1. FuGENE se je izkazal kot popolnoma neučinkovit pri transfekcijah v celične linije JEG3 in Hepa1, vendar zelo učinkovit pri transfekcijah v celično linijo Mef3. Kalcijev klorid se je izkazal kot najboljši za transfekcije izbranih celičnih linij, zato smo se v nadaljnjih poskusih omejili na transfekcije s kalcijevim kloridom. Celične linije Mef3 v nadaljevanju nismo več uporabljali, ker transfekcije z izbrano metodo niso bile dovolj učinkovite. Nadalje smo uporabljali samo popolnoma diferencirane somatske celične linije.

## 6.2 VPLIV S STEROLI- IN S cAMP-POSREDOVANE SIGNALNE POTI NA BLIŽNJI PROMOTOR *HMGCR*

Zanimalo nas je, ali količina posameznega vektorja za prekomerno izražanje transkripcijskih faktorjev vpliva na izražanje holesterogenega gena *HMGCR*. Potrdili smo podatke iz literature, ki pravijo, da je transkripcijski faktor SREBP-2 pospeševalec izražanja *HMGCR* (Lagor, 2005).

Odziv poročevalca na transkripcijski faktor SREBP-2 je bil vselej večji (~4 krat) od odziva na transkripcijska faktorja ICER in CREM. Transkripcijski faktor SREBP-2 je ključni element pri od sterolov-posredovanem uravnavanju holesterogenih genov, ICER in CREM pa sodelujeta pri od cAMP-posredovanem uravnavanju. Zato lahko sklepamo, da je sterolna pot uravnavanja ekspresije gena z bližnjega promotorja *HMGCR* prevladujoča nad od cAMP-posredovano potjo celicah JEG3.

Pri uporabi različnih količin vektorjev za prekomerno izražanje transkripcijskih faktorjev nismo zasledili statistično pomembne razlike med posameznimi uporabljenimi količinami. Pokazali pa smo, da za od bazalnega različno izražanje gena *HMGCR* zadostuje 0,25 µg/ml vektorja za prekomerno izražanje transkripcijskih faktorjev ICER in CREM ter 0,05 µg/ml za SREBP-2.

## 6.3 VPLIV Z LIPIDI BOGATEGA GOJIŠČA (COPUFA) IN REPRESORJA ICER (INDUCIBILNI OD cAMP-ODVISNI ZGODNJI REPRESOR) NA IZRAŽANJE GENA *CYP51*

### 6.3.1 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) na zaviranje izražanja gena *CYP51*

V prvem delu tega sklopa poskusov smo proučevali vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) na izražanje gena *CYP51* v različnih celičnih linijah. Gojišče COPUFA smo uporabljali kot model z lipidi nasičenega sistema. Gojišče je sestavljeno iz navadnega

gojišča, ki smo mu dodali holesterol (10 µg/ml), 25-hidroksi-holesterol (1 µg/ml) in linolensko kislino (0,15 mM). Iz literature je znano, da sesalske celice uravnavajo intenziteto sinteze holesterola z od sterolov-odvisno signalno potjo. Pri tem sodelujejo transkripcijski faktorji SREBP, ki s pomočjo dodatne domene zaznavajo količino sterolov v okolju. Ob previsokih koncentracijah se sinteza holesterola preko negativne povratne zanke zavre. To se zgodi zaradi inhibicije izražanja genov holesterogenih encimov, kot je *CYP51* (Brown, 1997, Worgall, 1998). Holesterol smo uporabljali, ker ga najdemo v telesu kot naraven dejavnik, ki inhibira izražanje holesterogenih genov. 25-hidroksi-holesterol je antagonist holesterola v telesu in se pojavlja v bistveno manjših koncentracijah kot holesterol (Russell, 2000). Je bolj topen in zato bolj uporaben v poskusih na celičnih kulturah, saj bolje prehaja skozi celično membrano. Njegov učinek na zaviranje izražanja holesterogenih genov je močnejši kot holesterolov. Deluje preko vplivanja na izražanje in aktivnost transkripcijskega faktorja SREBP-2. Linolenska kislina (C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>) je trikrat nenasičena maščobna kislina, ki deluje inhibitorno na izražanje holesterogenih genov preko vplivanja na transkripcijske faktorje SREBP-1a in SREBP-1c. Z lipidi bogato gojišče torej zavre izražanje gena *CYP51* zaradi odsotnosti aktivne oblike transkripcijskih faktorjev SREBP.

Pri mišji celični liniji Hepa1 izražanje gena *CYP51*, kot posledica delovanja gojišča z lipidi bogatega gojišča, proti pričakovanju ni bilo inhibirano. Celična linija Y1 pa se je statistično značilno odzivala na gojenje v gojišču COPUFA. Izražanje gena *CYP51* je bilo inhibirano.

Celice HepG2 in JEG3 se odzivajo na gojišče COPUFA in sicer je pri teh dveh celičnih linijah izražanje gena *CYP51* inhibirano, podobno kot pri mišji celični liniji Y1. Ta rezultat se ujema z rezultati, ki govorijo, da gojišče z nenasičenimi maščobnimi kislinami zavira izražanje genov, ki v svojih promotorjih vsebujejo regulatorne elemente SRE (Worgall, 1998). Takšna gena sta tudi *CYP51* in *HMGCR*. Komponente gojišča COPUFA potujejo v celice in napolnijo celične zaloge sterolov in maščobnih kislin. Polne zaloge sterolov zaznava protein SCAP, ki posledično zavre pretvorbo transkripcijskih faktorjev SREBP v aktivno, jedrno obliko SREBP in kot takšni ne morejo potovati v jedro, kjer bi omogočili prepisovanje genov z regulatornimi elementi SRE (Brown, 1997).

Pri celični liniji SH-SY5Y je v gojišču COPUFA prišlo do 3,2-kratnega povečanja odziva gena *CYP51* v primerjavi z NG. Zaradi krvno-možganske pregrade, ki ločuje centralni živčni sistem od ostalega telesa, je steroidogena aktivnost možganskih celic zelo visoka, saj holesterol iz krvi ne prehaja čez pregrado. Skoraj ves holesterol, ki ga potrebujejo za razvoj in delovanje, sintetizirajo *de novo*. Zato tudi ni presenetljivo, da se metabolizem holesterola v možganih precej razlikuje od ostalih tkiv (Vance, 2005). Tekom zgodnjega razvoja možganov (nekaj tednov po rojstvu) se v možganih sintetizira veliko holesterola. Spremembe, kot so na primer izguba aktivnosti receptorjev za sprejem LDL iz krvi, ne vplivajo na homeostazo holesterola v možganih (Quan, 2003). Odvečni holesterol zapusti možgane tako, da se pretvori v 24-hidroksi-holesterol in kot tak lahko prehaja čez krvno-možgansko pregrado (Björkhem, 1997). Pri sintezi 24-hidroksi-holesterola sodeluje 24-hidroksilaza, ki pa v možganih ne doseže viška sinteze, dokler se mielinizacija ne zaključi (Russell, 2000), to je do 12 let po rojstvu. Ker smo delali s celicami, ki so model neuroblastov, smo sklepali, da je neodzivnost na gojišče COPUFA posledica njihove nediferenciranosti in nezrelosti.

### **6.3.2 Vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER na zaviranje izražanja gena *CYP51***

V drugem delu tega sklopa poskusov smo primerjali vpliv gojišča COPUFA in transkripcijskega faktorja ICER na izražanje z bližnjega promotorja *CYP51*. Gojišče COPUFA vpliva na od sterolov-odvisno signalno pot uravnavanja izražanja holesterogenih genov, saj naj bi zaviralo aktivacijo transkripcijskih faktorjev SREBP, medtem ko represor ICER sodeluje pri od cAMP-odvisni signalni poti uravnavanja holesterogenih genov. Tako smo lahko primerjali jakost dveh zaviralnih signalnih poti uravnavanja biosinteze holesterola, to je od sterolov- in od cAMP-odvisno pot.

Izražanje gena *CYP51* je bilo v celični liniji Hepa1 zmanjšano, če smo ji v transfekcijsko mešanico dodali plazmid za prekomerno izražanje transkripcijskega faktorja ICER, kar nakazuje, da bi lahko bila od cAMP-odvisna signalna pot v Hepa1 celicah pomembna. Literatura kaže, da je od cAMP-odvisna represija v jetrnih celicah močno izražena tudi pri drugih procesih, kot je na primer proliferacija celic (Servillo, 2002). ICER tudi v teh

procesih sodeluje kot močan represor izražanja genov, ki v promotorski regiji vsebujejo regulatorne elemente CRE. Pri celični liniji Y1 gen *CYP51* ni bil statistično značilno inhibiran v gojišču s transkripcijskim faktorjem ICER.

Jetrni celični liniji, mišja Hepa1 in človeška HepG2, se podobno odzivata na prekomerno izražanje transkripcijskega faktorja ICER in sicer ICER inhibira izražanje gena *CYP51*.

Med človeškimi celičnimi linijami se HepG2 edina odziva na inhibitorni učinek transkripcijskega faktorja ICER. Ta vpliv je primerljiv s tistim, ki ga povzroči gojišče COPUFA, kar nakazuje, da sta od cAMP- in od sterolov-odvisna zaviralna pot enako pomembni pri uravnavanju izražanja gena *CYP51*. ICER v naših poskusih ni zaviral izražanja gena *CYP51* v celični liniji JEG3, kar je v nasprotju z nekaterimi obstoječimi rezultati (Fink, 2005)

Izražanje gena *CYP51* v celični liniji SH-SY5Y zaradi delovanja transkripcijskega faktorja ICER ni bilo zavrto. Prav tako ni bilo zavrto zaradi gojenja v gojišču COPUFA in s tem odsotnosti aktivne oblike transkripcijskih faktorjev SREBP. Neodzivnost možganskih celic na inhibitorna vpliva lahko razlagamo s tem, da so te celice model neuroblastov in le-ti sintetizirajo holesterol v velikih količinah, saj se mora centralni živčni sistem po rojstvu mielinizirati. Za mielinizacijo pa je potreben holesterol.

### **6.3.3 Aditivni vpliv z lipidi bogatega gojišča (COPUFA) in represorja ICER na zaviranje izražanja gena *CYP51***

V tretjem delu tega sklopa poskusov smo ugotavljali ali imata represor ICER in gojišče COPUFA, ki povzroči odsotnost aktivne oblike transkripcijskih faktorjev SREBP, aditivni vpliv na represijo gena *CYP51*. Celične linije smo gojili v gojišču COPUFA in jim dodali plazmid za prekomerno izražanje transkripcijskega faktorja ICER (COPUFA/ICER).

V celični liniji Hepa1 je bil inhibitorni vpliv COPUFA/ICER zelo podoben inhibitornemu vplivu transkripcijskega faktorja ICER brez gojišča COPUFA. Ta rezultat nam je še enkrat potrdil že zgoraj navedeno opažanje, da je od cAMP-odvisna signalna pot uravnavanja gena *CYP51* v celicah Hepa1 pomembna. Pri celični liniji Y1 je bil inhibitorni učinek

COPUFA/ICER večji, kot je seštevek jakosti inhibitornega učinka transkripcijskega faktorja ICER in gojišča COPUFA posamič. To je kazalo na aditiven učinek obeh zaviralnih poti v celicah Y1.

V celični liniji HepG2 COPUFA/ICER nista imela pravega aditivnega učinka, vendar pa je bila inhibicija s COPUFA/ICER statistično značilno različna od inhibicije z represorjem ICER ( $p < 0,05$ ) in gojiščem COPUFA ( $p < 0,05$ ). V celični liniji JEG3 sta imela COPUFA/ICER podoben učinek na izražanje gena *CYP51*, kot gojišče COPUFA samo. To nakazuje, da je bila pri celični liniji JEG3, od sterolov-odvisna represija pomembna pri uravnavanju izražanja gena *CYP51*. COPUFA/ICER nista imela vpliva na izražanje gena *CYP51* v celicah SH-SY5Y.

## 6.4 PREVERJANJE PREŽIVELOSTI CELIC

Ker smo imeli velike težave s transfekcijami smo se odločili, da preverimo preživelost celic v navadnem in gojišču COPUFA. Iz literature je razvidno, da lahko oksisteroli povzročijo apoptozo celic (Kölsch, 1999). Največjo občutljivost na oksisterole smo pričakovali pri celični liniji SH-SY5Y. Vendar se je izkazalo, da na uporabljeno koncentracijo oksisterolov ni bila tako občutljiva, kot smo predvidevali. Presenetilo pa nas je, da je gojišče COPUFA povzročilo padec preživelosti celic Y1 na samo 60%.

Za določitev preživelosti celic bi bilo potrebno uporabiti še druge metode določevanja celične življenske sposobnosti, kot so barvanje s Trypan Blue ali določevanje koncentracij kaspaz v gojišču, kar nakazuje na apoptozo celic (Chang, 1998, Kölsch, 1999).

## 6.5 SKLEPI

1. Najbolj učinkovita metoda za izvajanje transfekcij v izbrane celične linije je permeabilizacija celičnih membran s kalcijevim kloridom, razen za mišje embrionalne fibroblaste, kjer je boljši FuGENE.



2. SREBP-2 je aktivator prepisovanja z bližnjega promotorja *HMGCR*, medtem ko CREM in ICER nimata vpliva.
3. Z lipidi bogato gojišče ima največji vpliv na represijo bližnjega promotorja *CYP51* v celičnih linijah Y1, HepG2 in JEG3.
4. Pri Y1 je odziv na COPUFA in ICER aditiven.
5. Pri HepG2 odziv na COPUFA in ICER ni aditiven, vendar je odziv na COPUFA/ICER večji kot na COPUFA ali ICER.

## 7 ZAKLJUČEK

Homeostaza holesterola v telesu je zelo natančno uravnavana. Odkloni od optimalnih količin holesterola lahko vodijo do resnih zdravstvenih težav. Dva pomembna encima, ki sodelujeta pri biosintezi holesterola sta HMGCR (3-hidroksi-3-metil-glutaril koencim A) in CYP51 (lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaza). Aktivnost obeh encimov je regulirana preko dveh signalnih poti, od sterolov-odvisne in od cAMP-odvisne signalne poti. Preko signalnih poti se lahko biosinteza holesterola prilagodi potrebam telesa. To je uravnavano preko negativne povratne zanke.

Raziskave aktivnosti in uravnavanja holesterogenih genov so pomembne predvsem s kliničnega vidika. Poznavanje holesterogenih encimov in njihovih genov in regulacije letih bi omogočalo razvijanje ustreznih inhibitorjev ali aktivatorjev na nivoju prepisovanja, prevajanja ali aktivnosti holesterogenih encimov. To bi pripomoglo k uravnovešenju biosinteze holesterola in posledično k odpravljanju številnih bolezni, povezanih z nepravilnimi količinami holesterola v telesu, kot so ateroskleroza, neplodnost, depresije in druge.

Vsa tkiva v telesu nimajo enako močno izraženih obeh signalnih poti. V nekaterih prevladuje od sterolov-odvisna, v drugih od cAMP-odvisna signalna pot. Pri študiju aktivnosti in uravnavanju encimov HMGCR in CYP51 pri sesalcih se uporablja tudi tehnologija poročevalskih genov. Te uvedemo v celične linije v procesu transfekcije. Da bi lahko dobili čim širšo sliko o uravnavanju genov je zaželena uporaba čim večjih različnih celičnih linij.

Cilj diplomske naloge je bil izbrati metodo za izvajanje transfekcij ter ugotoviti, ali količina posameznih transkripcijskih faktorjev, ki sodelujejo pri uravnavanju holesterogenih genov dveh različnih signalnih poteh, vpliva na izražanje poročevalskega plazmida. S transfekcijami smo v celične linije uvedli plazmide s poročevalskimi geni (*HMGCR-luc* in *CYP51-luc*) ter plazmide za prekomerno izražanje transkripcijskih faktorjev (ICER, CREM in SREBP-2). Za izvajanje transfekcij smo sprva testirali tri

metode (CaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ki mu sledi glicerolni šok ter komercialni reagent FuGENE). Odločili smo se za delo s CaCl<sub>2</sub>, ker je dal najboljše rezultate.

Rezultati so tudi pokazali, da je vpliv s steroli-posredovane signalne poti pomembnejši od s cAMP-posredovane signalne poti pri izražanju *HMGCR* z bližnjega promotorja v celični liniji JEG3.

V drugem delu smo preverili odziv poročevalskega gena *CYP51* v šestih različnih celičnih linijah na represor ICER in z lipidi bogato gojišče COPUFA. Oba sta inhibitorja izražanja gena *CYP51*. Prvi deluje kot inhibitorni transkripcijski faktor v od cAMP-odvisni signalni poti, medtem ko drugi onemogoča pretvorbo transkripcijskih faktorjev SREBP v aktivno, jedrno obliko, ki bi sicer omogočali prepisovanje gena *CYP51*. V celično linijo HO 23 nismo uspeli vnesti plazmidov. Rezultati so pokazali, da se *CYP51* v celičnih linijah Y1, HepG2 in JEG3 najbolj odziva na z lipidi bogato gojišče, saj je bilo izražanje poročevalca tam najbolj zavrto. *CYP51* v celični liniji SH-SY5Y se ne odziva niti na ICER niti na z lipidi bogato gojišče, v Y1 in HepG2 pa se odziva na oba inhibitorna dejavnika s podobno jakostjo. Pri celični liniji Y1 so naši rezultati pokazali aditiven inhibitorni vpliv transkripcijskega faktorja ICER in z lipidi bogatega gojišča na prepisovanje *CYP51*. Pri celicah HepG2 pa se je raven zaviranja *CYP51* pri tretiranju celic s transkripcijskim faktorjem ICER in z lipidi bogatim gojiščem, bolj povečala, kot pri tretiranju samo z ICER ali samo z lipidi bogatim gojiščem. S tem smo potrdili hipotezo, da je odziv bližnjega promotorja *CYP51* odvisen od vrste celične linije.

Rezultati bi lahko služili kot osnova za študij od sterolov- in od cAMP-odvisnih signalnih poti v različnih tkivih in sesalskih vrstah, kot tudi za proučevanje izražanja holesterogenih genov v različnih celičnih linijah.

## 8 LITERATURA

- Allen R.P., Ledford B.E. 1977. The influence of antisera specific for  $\alpha$ -fetoprotein and mouse serum albumin on the viability and protein synthesis of cultured mouse hepatoma cells. *Cancer Research*, 37, 696-701
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- ATCC, The American Type Culture Collection  
<http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm> (28.3.2007)
- Bengoechea-Alons M.T. 2007. SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Current Opinion in Cell Biology*, 19:215–222
- Berne R.M., Levy M.N. 1998. *Physiology*. 4<sup>th</sup> edition. St. Louis, Mosby, Inc. Chapter 38
- Butler M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*.68: 283-291
- Björkhem I., Lütjohann D., Breuer O., Sakinis A. 1997. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 48: 30178-30184
- Björkhem I., Diczfalusy U. 2002. Oxysterols Friends, Foes, or Just Fellow Passengers? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22:734-742
- Blanchon L., Sauvant P., Bavik C., Gallot D., Charbonne F., Alexandre-Gouabau M-C., Lemery D., Jacquetin B., Dastugue B., Ward S., Sapin V. 2002. Human choriocarcinoma cell line JEG3 produces and secretes retinoids from retinol. *Molecular Human Reproduction*, 8, 5: 485-493
- Brown M.S., Goldstein J.L. 1997. The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell*, 89: 331-340
- Chang J.Y., Liu L-Z. 1998. Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochemistry international*, 32: 317-323
- Daniel P.B., Rohrbach L., Habener J.F. 2000. Novel Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate (cAMP) Response Element Modulator Isoforms Expressed by Two Newly Identified cAMP-Responsive Promoters Active in the Testis. *Endocrinology*, 141: 3923-3930

- Dash P.K., Moore A.N., Kobori N., Runyan J.D. 2007. Molecular activity underlying working memory. *Learning and Memory*, 14, 8: 554-563
- Debeljak N., Fink M., Rozman D. 2003. Many facets of mammalian lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409: 159–171
- Don J., Stelzer G. 2002. The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 115-124
- Edwards P.A., Tabor D., Kast H.R., Venkateswaran A. 2000. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochimica et Biophysica Acta* 1529: 103-113
- Engelking L.J., Liang G., Hammer R.E., Takaishi K., Kuriyama H., Evers B.M., Li W-P, Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. 2005. Schoenheimer effect explained — feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 9: 2489-2498
- Espenshade P.J. 2006. SREBP's: sterol regulated transcription factors. *Journal of Cell Science*, 119: 973-976
- Fink M., Ačimovič J., Režen T., Tanšek N., Rozman D. 2005. Cholesterogenic lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (*CYP51*) is an immediate early response gene. *Endocrinology*, 146, 12: 5321-5331
- Gaylor J.L. 2002. Membrane-Bound Enzymes of Cholesterol Synthesis from Lanosterol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292, 1139–1146
- Gillespie J.G., Hardie D.G. 1992. Phosphorylation and inactivation of HMG-CoA reductase at the AMP-activated protein kinase site in response to fructose treatment of isolated rat hepatocytes. *FEBS letters*, 306, 1: 59-62
- Guy R.K., 2000. Inhibition of sonic hedgehog autoprocessing in cultured mammalian cells by sterol deprivation. *PNAS*, 97, 13: 7307-7312
- Havelock J.C., Rainey W.E., Carr B.R. 2004. Ovarian granulosa cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 228: 67-78
- Herman G.E. 2003. Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Human Molecular Genetics*, 12, 1: R75-R88
- Hosokawa K., Dantes A., Schere-Levy C., Barash A., Yoshida Y., Kotsuji F., Vlodavsky I., Amsterdam A. 1998. Induction of Ad4BP/SF-1, steroidogenic acute regulatory protein, and cytochrome P450scc enzyme system expression in newly established human granulosa cell lines, *Endocrinology* 139, 11: 4679-4687

- Istvan E.S., Palnitkar M., Buchanan S.K., Deisenhofer J. 2000, Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *The EMBO Journal*, 19, 5: 819-839
- Kölsch H., Lütjohann D., Tulke A., Björkhem I., Rao M.L. 1999. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Research* 818: 171-175
- Lagor W.R., Groh E.D., Ness G.C. 2005. Diabetes alters the occupancy of the hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CaA reductase promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 44: 36601-36608
- Maggi A., Poletti A., Casulari L.A., Pimpinelli F., Piva F., Zanisi M.R., Martini L., 1998. Effects and metabolism of steroid hormones in human neuroblastoma cells. *Steroids*, 63: 257-262
- Mozafari M.R., Omari A. 2007. Importance of divalent cations in nanolipoplex gene delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96: 1955-1966
- Myant N.B. 1981. The Biology of Cholesterol and Related Steroids, William Heinemann Medical Books Ltd: Chapter 1, Chapter 7
- Nachman R.L, Jaffe E.A. 2004. Endothelial cell cultures: beginnings of modern vascular biology. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 8: 1037-1040
- Naylor L.H. 1999. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical Pharmacology*, 58: 749-757
- Noh S.M., Kim W-K., Kim S.J., Kim J.M., Baek K-H., Oh Y-K. 2007. Enhanced cellular delivery and transfection efficiency of plasmid DNA using positively charged biocompatible colloidal gold nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 5: 747-752
- Panda T., Devi V.A. 2004. Regulation and degradation of HMGCo-A reductase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 143-152
- Podust L.M., Poulos T.L., Waterman M.R. 2001. Crystal structure of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 3068-3073
- Quan G., Xie C., Dietschy J.M., Turley S. 2003. Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Developmental Brain research*, 146, 1-2: 87-98
- QIAGEN 2005. QIAGEN® Plasmid Purification Handbook, 3rd edition

- Rainey W.E., Saner K., Schimmer B.P. 2004. Adrenocortical cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 228: 23-38
- Reinhart M.P., Billheimer J.T., Faust J.R., Gaylor J.L. 1987. Subcellular localization of the enzymes of cholesterol biosynthesis and metabolism in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 20: 9649-9655
- Rozman D., Fink M., Fimia G.M., Sassone-Corsi P., Waterman M.R. 1999. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)/cAMP-responsive element modulator (CREM)-dependent regulation of cholesterologenic lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) in spermatids. *Molecular Endocrinology*, 13, 11: 1951-1962
- Rozman D. 2000. Lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51)-a cholesterol biosynthetic enzyme involved in production of meiosis activating sterols in oocytes and testis – a mini review. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*.439: R56-R57
- Russell D.W. 2000. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1529: 126-135
- Servillo G., Fazia M.A.D., Sassone-Corsi P. 2002. Coupling cAMP signalling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM. *Experimental Cell Research*, 275: 143-154
- Tsafri A., Cao X., Vaknin K.M., Popliker M. 2002. Is meiosis activating sterol (MAS) an obligatory mediator of meiotic resumption in mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187: 197-204
- Vance J.E., Hayashi H., Karten B. 2005. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16: 193-212
- Waterman M.R. 1994. Biochemical diversity of cAMP-dependent transcription of steroid hydroxylase genes in the adrenal cortex. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 45: 17783-17786
- Wolf G., 1999. The function of cholesterol in embryogenesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10: 188-192
- Worgall T.S., Sturley S.L., Seo T., Osborne T.F., Deckelbaum R.J. 1998. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 40: 25537-25540
- 3T3 cells, Wikipedia, the free encyclopedia, 2.8.2007.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/3T3\\_cells](http://en.wikipedia.org/wiki/3T3_cells). (28.8.2007)

Developmental biology – 312; gonads, gametes, and meiosis.

<http://it.stlawu.edu/~mtem/devbiol/36c89bf0.jpg> (28.8.2007)

Understanding the data.

<http://www.turf.uiuc.edu/research/summaries/1994/understanding.pdf> (28.10.2007)

Leskošek B., Metodologija v kineziologiji, 2005, Fakulteta za šport. <http://www.fsp.uni-lj.si/Metodologija/2005/13Analiza%20poskusov-nSkupin-1dejavnik.pdf>  
(28.10.2007)