

eman la zabal zazu



Universidad
del País Vasco

*Departamento
de Fisiología*

Euskal Herriko
Unibertsitatea

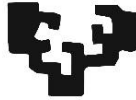
*Fisiologia
Saila*

SND1en gainadierazpenaren eragina hepatoma zeluletan: Lipidoen metabolismoa eta tumoreen garapena

*The effects of SND1 overexpression on hepatoma cells:
Lipid metabolism and tumor development*

Hiart Navarro Imaz
2017

eman la zabal zazu



Universidad
del País Vasco

*Departamento
de Fisiología*

Euskal Herriko
Unibertsitatea

*Fisiologia
Saila*

SND1en gainadierazpenaren eragina hepatoma zeluletan: Lipidoen metabolismoa eta tumoreen garapena

*The effects of SND1 overexpression on hepatoma cells:
Lipid metabolism and tumor development*

Hiart Navarro Imaz
2017

Lan hau burutu ahal izateko Eusko Jaurlaritzako Ikertzaileen Prestakuntza Programako dirulaguntza predoktorala izan dut, 2014eko urtarriletik 2017ko abendura arte.

Tesian zehar hiru hilabeteko egonaldia egin nuen Duke Unibertsitateko Medikuntza Fakultatean Durham-en (AEB). Horretarako Eusko Jaurlaritzako dirulaguntza jaso nuen, Egonaldi Laburrak egiteko Programaren barne.

I would like to thank Prof. Diehl and her research group for their priceless help during my stay at the Duke University Medical Center of Durham.

Indizea

A. Sarrera	1
1. SND1 proteina	3
1.1. SND1en ezaugarri orokorrak	3
1.1.1. Egitura	3
1.1.2. Kokapena	5
1.2. SND1en funtzioak	6
1.2.1. Transkripzio genikoaren erregulazioa	6
1.2.2. RNAREN metabolismoa	7
1.2.3. Lipidoen kudeaketa	9
1.3. SND1en garrantzi fisiopatologikoa	10
2. Metabolismoaren egokitzapenak minbizian	12
2.1. Egokitzapenak metabolismo energetikoan	13
2.2. Lipidoen metabolismoa	15
2.2.1. Egokitzapenak	15
2.2.2. Erregulazioa	18
SREBP	18
LXR	19
PPAR α	20
B. Helburuak	21
C. Materialak eta Metodoak	25
1. Materialak	27
1.1. Erreaktiboak eta material akzesorioak	27
1.2. Entzimak eta <i>kit</i> -ak	28
1.3. Immunoglobulinak	30
1.4. Oligonukleotidoak	30
1.5. Medioak	30
1.6. Tanpoiak eta bestelako disoluzioak	30
1.7. Ekipamendua	33
2. Metodoak	37
2.1. Lerro zelularrak eta tratamenduak	37
2.1.1. siRNA bidezko SND1en azpiadierazpena	37
2.1.2. Permeabilizazio saioak saponinarekin	38
2.1.3. Zelula-taldearen analisia eta itsaskortasun saioak	38
2.2. Animaliak eta xenotumoreen garapena	39
2.2.1. Tratamenduak <i>in vivo</i>	39
2.2.2. Serumen prozesamendua eta analisia	40
2.2.3. Analisi histokimikoa	40
2.3. Zitokimikako teknikak	41
2.3.1. Bideoak	41

2.3.2. NBD-kolesterolaren trazaketa	41
2.3.3. Filipinarekin tindaketa	41
2.3.4. Immunozitokimika	42
2.4. Lerro zelularren aktibitate metabolikoaren neurketa eta BrdU inkorporazio saioa	42
2.5. Zelulen apurketa eta frakzio azpizelularren isolamendua	43
2.5.1. Zelulen uzta eta lisia	43
2.5.2. Zelulen frakzionamendu azpizelularra	43
2.5.3. Xenotumoreen homogeneizazioa eta frakzionamendu azpizelularra	44
2.6. Giza LDLen isolamendua	44
2.7. Zelulen eta tumoreen lipido karakterizazioa	44
2.8. Azetil-CoA-ren neurketa	46
2.9. Zitratoaren neurketa	46
2.10. Glukosa-6-fosfato deshidrogenasa eta entzima malikoaren jardueraren neurketa	46
2.11. Markaketa metabolikoa	46
2.12. Glukosaren barneraketa saioa	47
2.13. <i>Western blotting</i>	47
2.14. Proteina neurketa	48
2.15. Gene adierazpenaren analisisa	48
2.16. Analisi estatistikoa	49

D. Emaitzak **51**

1. Kolesterolaren homeostasiaren asaldurak **53**

1.1. SND1 gainadierazten duten hepatoma lerroak	53
1.2. McA-L eta McA-S lerroen lipido karakterizazioa	54
1.3. McA-S zelulek metatutako kolesterola mobilizatzeko gaitasun handiagoa	55
1.4. McA-S zelulen kolesterol esterren metaketa kolesterogenesiaren gainaktibazio baten eta esterifikazio ahalmen altuago baten ondorio da	57
1.5. McA-S zeluletan kolesterolaren <i>de novo</i> sintesi maila altua esterifikazioarekin akoplatuta dago	60
1.6. McA-S zelulen gehiegizko kolesterogenesia konstitutiboki gainaktibatutako SREBP2 sistemaren ondorio da	61
1.7. McA-S zeluletako SREBP2 sistemaren desregulazioa erretikulu endoplasmatikoko kolesterol eduki baxuaren ondorio da	64

2. Trigliceridoen sorreraren egokitzapenak **65**

2.1. SND1 gainardierazten duten zelulek triglizerido eduki baxuagoa dute	65
2.2. McA-S zelulen gantz-azidoen triglizeridoetarako bideratzea murrizta da	66
2.3. McA-S zelulen gehiegizko kolesterogenesia al da gantz-azidoak triglizeridoetan esterifikatzea mugatzen duena?	71
2.4. McA-S zelulen azetil-CoA zitosolikoa eta NADPH ez dira gantz-azidoen sintesirantz bideratzen	74

3. Zelulen morfologia	79
3.1. SND1 gainadierazten duten zelulak kontrolak baino borobilagoak dira eta beren artean estuki lotuta mantentzen dira	79
3.2. McA-S zelulen arteko lotura estuak Ca ²⁺ -aren menpekoak dira	80
3.3. McA-S zelulen arteko loturek mugikortasuna mugatzen dute	82
3.4. McA-L eta McA-S zelulen mugitzeko modu ezberdina SND1en gainadierazpenak eragindako kolesterolaren metabolismoko alterazioekin erlazionatuta egon daiteke	85
4. SND1 gainadierazten duten hepatoma zelulen xenotumoreen garapena	88
4.1. Xenotumoreek jatorrizko zelulen ezaugarri nagusiak mantentzen dituzte	88
4.2. SND1en gainadierazpenak tumoreen hazkuntza azkartzen du	90
4.3. L eta S tumoreak garatu dituzten saguen serumeko glukosa eta lipido edukiak ezberdinak dira	92
E. Eztabaida	95
1. SND1en gainadierazpenak eragindako kolesterolaren metabolismoaren alterazioen eragina minbizian	97
2. Kolesterolaren metabolismoaren alterazioen mekanismoa	100
3. Azilglizeridoen sorreraren asaldurak	102
F. Ondorioak	105
G. Bibliografia	109
H. Appendix: English version	123
Introduction	125
1. SND1 protein	125
1.1. General characteristics of SND1	125
1.1.1. Structure	125
1.1.2. Location	127
1.2. SND1 functions	128
1.2.1. Transcriptional regulation	128
1.1.1. RNA metabolism	130
1.1.2. Lipid metabolism	132
1.2. Physiopathological relevance of SND1	133
2. Metabolic adaptations in cancer	135
2.1. Adaptations of the energetic metabolism	135
2.2. Lipid metabolism	138
2.2.1. Adaptations	138
2.2.2. Regulation	140
SREBP	140

	LXR	141
	PPAR α	142
Objectives		144
Results		146
1. Alterations of cholesterol metabolism		146
1.1.	SND1-overexpressing hepatoma cell lines	146
1.2.	Lipid characterization of McA-L and McA-S cell lines	147
1.3.	McA-S cells have a higher mobilization capacity of cholesterol stores	148
1.4.	Overaccumulation of cholesteryl esters in McA-S cells is caused by an overactivation of cholesterologenesis and a higher esterifying capacity	150
1.5.	High de novo cholesterol synthesis is coupled to its esterification in McA-S cells	153
1.6.	Overactive cholesterologenesis in McA-S cells is caused by a constitutive overactivation of the SREBP2 system	154
1.7.	Deregulation of the SREBP1 system in McA-S cells is caused by lower cholesterol levels in endoplasmic reticulum membranes	157
2. Adaptations in the synthesis of triglycerides		159
2.1	SND1-overexpressing cells have lower triglyceride content	159
2.2	McA- The channeling of fatty acids towards triglycerides is lower in McA-S cells	160
2.3	Is the overactivated cholesterologenesis the limiting factor for the synthesis of triglycerides?	165
2.4	McA Cytosolic acetyl-CoA and NADPH are not channeled towards fatty acid synthesis in McA-S cells alterazioekin erlazioatuta egon	167
3. Cell morphology		172
3.1.	SND1-overexpressing cells are rounder than control cells and are closely linked to each other	172
3.2.	Cell-cell interactions in McA-S cells are Ca ²⁺ -dependent	173
3.3.	Strong intercellular interactions in McA-S cells are a limitation for cell migration	175
3.4.	Differences in the way McA-L and McA-S cells migrate may be related to the alterations in cholesterol metabolism caused by SND1 overexpression	178
4. Development of xenotumors derived from SND1-overexpressing hepatoma cells		180
4.1.	Xenotumors maintain the main features of the cells	180
4.2.	SND1 overexpression accelerates tumor growth rate	182
4.3.	Mice with L and S tumors show differences in serum lipid and glucose contents	184
Discussion		186
Conclusions		194

Laburdurak

AA	azido azetikoa
Aadac	arilazetamida desazetilasa (<i>arylacetamide deacetylase</i>)
Abc	kasete ATP-lotzaile (<i>ATP-binding cassette</i>)
Acaca	ACC α
ACC	azetil-CoA karboxilasa (<i>acetyl-CoA carboxylase</i>)
ACLY	ATP:zitrato liasa (<i>ATP citrate lyase</i>)
ACOX1	azil-CoA oxidasa (<i>acyl-coenzyme A oxidase</i>)
AcsI	kate luzeko azil-CoA sintetasa (<i>acyl coenzyme A synthetase long chain</i>)
Acss	kate laburreko azil-CoA sintetasa (<i>acyl coenzyme A synthetase short chain</i>)
Agpat	azilglizerol fosfato aziltransferasa (<i>acylglycerol phosphate acyltransferase</i>)
ADRP	adiposoaren desberdintzapenarekin erlazionatutako proteina (<i>adipose differentiation related protein</i>)
AEB	Ameriketako Estatu Batuak
Akt	B proteina kinasa
AMPK	AMPk aktibatutako kinasa (<i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>)
APO	apolipoproteina
APS	amonio persulfatoa
AT1R	angiotensinaren I hartzailea (<i>angiotensin II type I receptor</i>)
Ava	Avasimibe
BCA	azido bizinkoninikoa (<i>bicinchoninic acid</i>)
BD	Bligh and Dyer
BSA	behi-seroalbumina
CAM	zelulen adhesio molekula (<i>cell adhesion molecule</i>)
CBP	CREB proteina lotzailea (<i>CREB-binding protein</i>)
CD	ziklodextrina (<i>cyclodextrin</i>)
Cdh	kadherina (<i>cadherin</i>)
CD36	36 desberdintzapen <i>cluster</i> (<i>cluster of differentiation36</i>)
CE	kolesteril ester (<i>cholesteryl ester</i>)
CEH	CE hidrolasa
Ces	karboxilesterasa (<i>carboxylesterase</i>)
CETP	CE transferentziarako proteina
ChIP	kromatinaren immunojalkipena (<i>chromatin immunoprecipitation</i>)
Chol	kolesterola
Myb	mieloblastosi (<i>myeloblastosis</i>)

CoA	A koentzima (<i>coenzyme A</i>)
COP	estalki proteina (<i>coat protein</i>)
cpm	kontuak minutuko (<i>counts per minute</i>)
CPT	karnitina palmitoiltransferasa (<i>carnitine palmitoyltransferase</i>)
CREB	<i>cAMP</i> erantzun elementua lotzen duen proteina (<i>cAMP response element-binding protein</i>)
Cyp	P450 zitokromo
Dgat	diglizerido aziltransferasa
EDTA	azido etilendiaminotetrazetikoa
EGTA	azido etilenglikol-bis(β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetrazetikoa
DEPC	dietilpirokarbonatoa (<i>diethylpirocarbonate</i>)
DG	diglizeridoa
DMEM	Dulbeco-k moldatutako Eagle media
DMSO	dimetilsulfoxidoa
dNTP	desoxinukleotido trifosfatoen (<i>deoxynucleotide triphosphate</i>)
DPX	poliestireno-trikresilfosfato-xileno (<i>polystyrene-tricresylphosphate-xylene</i>)
DTT	1,4-ditiotreitola
EBNA-2	Epstein-Barr-en 2 antígeno nuklear (<i>Epstein-Barr nuclear antigen 2</i>)
ECL	emendatutako kimioluministzentzia (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EHHADH	enoil-CoA hidratasa/3-hidroxi-azil-CoA deshidrogenasa (<i>enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase</i>)
EMEM	Eagle medio esentzial minimo
EMSA	mugikortasun elektroforetikoa aldaketa saio (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
EMT	epitelio-mesenkima trantsizio
ER	erretikulu endoplasmatiko (<i>endoplasmic reticulum</i>)
FA	gantz-azido (<i>fatty acids</i>)
FAS	FA sintasa
FATP	FAen transferentziarako proteina
FC	kolesterol aske (<i>free cholesterol</i>)
FDPS	farnesil difosfato sintasa (<i>farnesyl diphosphate synthase</i>)
FH	fumarato hidratasa
FPLC	proteinen kromatografia likido azkar (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
G6PDH	glukosa-6-fosfato deshidrogenasa (<i>glucose 6-phosphate dehydrogenase</i>)
GAPDH	glizeraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GCN	aminoazidoen sintesiaren kontrol orokor (<i>general control of amino acid synthesis</i>)
Gel	gelatina
Glu	glukosa
GLUT	glukosa garraiatzaile (<i>glucose transporter</i>)

Gpam	mitokondrioko glizerol fosfato aziltransferasa (<i>glycerol phosphate acyltransferase mitochondrial</i>)
GSK	glukogeno sintasa kinasa
HCC,	kartzinoma hepatozelular (<i>hepatocellular carcinoma</i>)
HG	hidroxiglutarato
Hh	Hedgehog
HIF	hipoxiak induzitutako faktore
HMGCS	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA erreduktasa (<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase</i>)
HNF	hepatozitoetako faktore nuklear (<i>hepatocyte nuclear factor</i>)
IDH	isozitrato deshidrogenasa
IDI	isopentenil difosfato isomerasa
IDL	dentsitate ertaineko lipoproteinak (<i>intermediate density lipoproteins</i>)
IL	interleukina
INSIG	intsulinak induzitutako gene
KG	zetoglutarato (<i>ketoglutarate</i>)
KT	kolesterol totala
LD	lipido tantak (<i>lipid droplets</i>)
LDL	dentsitate baxuko lipoproteinak (<i>low density lipoproteins</i>)
LDLR	LDL hartzaile (<i>LDL receptor</i>)
LPA	azido lisofosfatidiko (<i>lysophosphatidic acid</i>)
LPL	lipoproteina lipasa
LXR	gibelesko X hartzaile (<i>liver X receptor</i>)
MAPK	mitogenoek aktibatutako proteina-kinasa
McA-L	Lac-cDNArekin transfektatutako McA-RH7777 lerro klonal
McA-S	SND1-cDNArekin transfektatutako McA-RH7777 lerro klonal
ME	entzima maliko (<i>malic enzyme</i>)
MET	mesenkima-epitelio trantsizio
MGL	monoglizerido lipasa
miRNA	mikro RNA
MTDH	metadherina
mTORC	errapamizina konplexuaren itu mekanismo (<i>mechanistic target of rapamycin complex</i>)
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol -2-yl)-2,5-difeniiltetrazolio
MTP	mikrosometako garraio proteina (<i>microsomal transfer protein</i>)
Mttp	mikrosometako triglizeridoen garraio proteina (<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>)
NAD(P) ⁺ /H	nikotinamida adenina dinukleotido (fosfato) oxidatua/erreduzitua
NBD	4-kloro-7-nitrobenzofurazan

NF- κ B	B zeluletako κ -kate arinaren gene areagotzailearen faktore nuklear (<i>nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>)
NF	nukleoko faktore
Npc	Nieman-Pick C
NR	nukleoko hartzaile (<i>nuclear receptor</i>)
OA	azido oleiko (<i>oleic acid</i>)
Osbp	oxisterolen lotura proteina (<i>oxysterol binding protein</i>)
Osbpl	Osbp bezalako proteina (<i>Osbp like</i>)
PA	azido fosfatidiko (<i>phosphatidic acid</i>)
PAGE	poliakrilamidazko geleko elektroforesi
PBS	fosfatoz indargetutako gatz disoluzio (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	fosfatidilkolina (<i>phosphatidylcholine</i>)
PC1	1-polizistina (<i>polycystin-1</i>)
PCR	polimerasaren erreakzio kateatu (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	fosfatidiletanolamina (<i>phosphatidylethanolamine</i>)
PI	fosfatidilinositol (<i>phosphatidylinositol</i>)
PI3K	fosfatidilinositol 3-kinasa (<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PKA	A proteina-kinasa (<i>protein kinase A</i>)
PDH	pirubato deshidrogenasa
PDK	pirubato deshidrogenasa kinasa
PKM	pirubato kinasa M
PL	fosfolipido (<i>phospholipid</i>)
PLTP	PLen transferentziarako proteina
PPAR	peroxisomen proliferatzaileek aktibatutako hartzaile (<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
Ppia	peptidilprolilisomerasa A
PS	fosfatidilserina (<i>phosphatidylserine</i>)
PVDF	polibinilideno difluoruro (<i>polyvinylidene difluoride</i>)
PXR	pregnanoaren X hartzaile (<i>pregnane X receptor</i>)
qRT-PCR	RT-PCR kuantitatibo (<i>quantitative reverse-transcription PCR</i>)
RAR	azido erretinoikoaren hartzaile (<i>retinoic acid receptor</i>)
RISC	RNAk induzitutako konplexu isilarazle (<i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNAi	RNAren bidezko adierazpen genikoaren interferentzia
RT	alderantzizko transkripzio (<i>reverse transcription</i>)
RXR	erretinoideen X hartzaile (<i>retinoid X receptor</i>)
S1/2P	1/2 lekuko proteasa (<i>site-1/2 protease</i>)
SDS	sodio dodezilsulfato
SCAP	SREBPren ebaketa aktibatzen duen proteasa (<i>SREBP cleavage-activating protein</i>)

Scarb	SRB1
SR	hartzaile atzemale (<i>scavenger receptor</i>)
SCD	estearoil-CoA desaturasa (<i>stearoyl-CoA desaturase</i>)
SDH	sukzinato deshidrogenasa
siRNA	RNA txiki interferente (<i>small interfering RNA</i>)
Slc	solutoen garraiatzaile (<i>solute carrier</i>)
SM	esfingomielina (<i>sphingomyelin</i>)
SN	estafilokokoen nukleasaren (<i>Staphylococcal nuclease</i>) antzeko domeinu
SND1	SN-dun 1 proteina (<i>SN domain-containing protein 1</i>)
SND p102	102 kDa-eko SN-dun proteina, SND1-en arratoi-homologoa (<i>SN domain containing protein of 102 kDa</i>)
snRNA	RNA txiki nuklear (<i>small nuclear RNA</i>)
snRNP	erribonukleoproteina txiki nuklear (<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>)
SOAT	esterol O-aziltransferasa (<i>sterol O-acyltransferase</i>)
Sp1	espezifikotasun 1 proteina (<i>specificity protein 1</i>)
SQLE	eskualeno epoxidasa (<i>squalene epoxidase</i>)
SRE	esterolen erantzun elementua (<i>sterol response element</i>)
Srebf	SRE lotura faktorea (<i>SRE binding factor</i>)
SREBP	SRE lotura proteina (<i>SRE binding protein</i>)
Stat	seinaleen transduktore eta transkripzioaren aktibatzaile (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TAE	Tris-azetiko-EDTA
TBS	Tris-ez indargetutako gatz disoluzio (<i>Tris buffered saline</i>)
TBS-T	TBS-Tween
TG	triglizerido
TCA	azido trikarboxiliko (<i>tricarboxylic acid</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TF	transkripzio faktore
TGF	hazkuntza faktore eraldatzaile (<i>transforming growth factor</i>)
TLC	geruza fineko kromatografia (<i>thin layer chromatography</i>)
TP53	tumore proteina 53
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
TSN	Tudor eta SN domeinudun proteina
UTR	itzultzen ez den eskualde (<i>untranslated region</i>)
VEGF	endotelio baskularreko hazkuntza faktore (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLDL	oso dentsitate baxuko lipoproteina (<i>very low density lipoproteins</i>)
Vtn	bitronektina (<i>vitronectin</i>)
WB	<i>Western blotting</i>

A. SARRERA

1. SND1 proteina

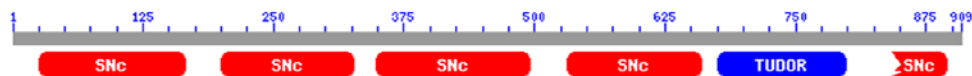
SND1 (*Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1*) proteina, TSN, Snc-Tudor, p100 edo SND p102 (arratoian) bezala ere ezaguna, Tong-ek eta kideek deskribatu zuten lehenengoz gizakiaren B-linfoblastoma zeluletan. EBNA-2 (*Epstein-Barr virus nuclear antigen 2*) transaktibatzaile birikoari lotuta, horrek eragindako adierazpen genikoaren transaktibazioa areagotzen zuela behatu zuten; koaktibatzaile transkripzional bezala sailkatu eta *p100 coactivator* izena eman zioten (Tong et al., 1995). Gizakiarengan eta saguan ez ezik organismo ezberdin askotan dago ere, hala nola protozooetan (Hossain et al., 2008), onddoetan (Porta et al., 1999), landareetan (Sami-Subbu et al., 2001), intsektuetan (Ponting, 1997b), arrainetan (Abe et al., 2005), behietan (Keenan et al., 2000) edo arratoietan (Sakamoto et al., 1999).

1.1. SND1en ezaugarri orokorrak

1.1.1. Egitura

SND1en genea ere oso kontserbatua da; gizakiaren genomak (kokapena 7q32.1 eta GeneID 27044) eta karraskarietan (saguan 6A3.3 eta 56463; arratoian 4q22 eta 64635) luzera ere antzekoa da, 400.000 nukleotido ingurukoa. Exoien kopurua 20tik gorakoa da. Ekoiztutako SND1 proteina 910 aminoazido ingurukoa da eta bere masa molekularra 102 kDa ingurukoa.

Sekuentziaren analisi bioinformatikoaren bidez, Ponting-ek aurrean zuen lehenengoz estafilokoko nukleasen (SNen, *Staphylococcal nuclease*-en; Snc ere deituak) moduko 4 domeinuren segida (SN1-SN4) (Ponting, 1997a) (**A.1 Irudia**). SNak Ca^{2+} -aren menpeko jarduera dauka eta bai DNA baita RNA ere moztu ditzake (Chesneau and el Solh, 1994), baina SND1en sekuentzian SN domeinuen jarduera katalitikoa gauzatzeko eta Ca^{2+} eta substratua lotzeko beharrezkoak diren aminoazidoak ez daukatela deskribatu da lan ezberdinetan (Callebaut and Morion, 1997; Ponting, 1997a; Porta et al., 1999).

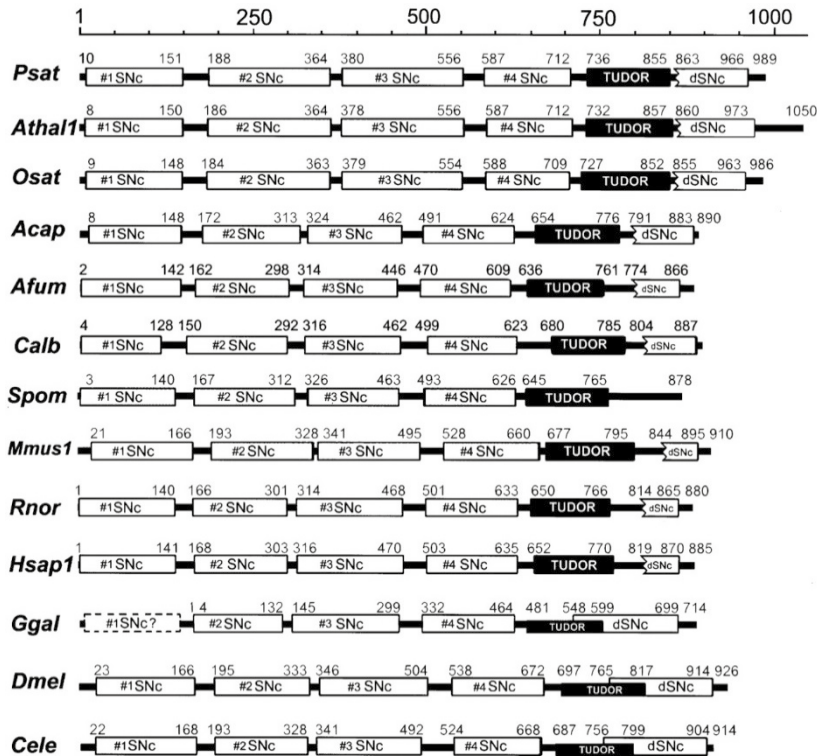


A.1 Irudia: SND1en sekuentzian identifikatutako domeinuen eskema. Proteina sekuentzian estafilokoko-nukleasaren moduko lau domeinu (SN, Snc irudian), Tudor-domeinu bat eta C-muturrean SN ez-osoak aurki daitezke.

Beste domeinu ezberdin baten presentzia ere aurrean zen, *Drosophila melanogaster* euliaren Tudor proteinan errepikatuta dagoena (Tudor domeinua beraz) (Ponting, 1997a). Tudor proteinak *D. melanogaster*-en oogenesisian hartzen du parte, eta Tudor domeinua RNArekin elkarrekintzak dituen zenbait proteinatan topa daiteke (Ponting, 1997a).

Bere funtzioa ez da oraindik guztiz argitu. SND1 proteinak bosgarren SN domeinu bat dauka C-muturrean (SN5) (Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997a) (**A.1 Irudia**). Horren sekuentzia beste SN domeinuena baino laburragoa da, espezie ezberdinetan neurri ezberdinetan (Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997b; Abe et al., 2003) (**A.2 Irudia**). C-muturreko bi domeinu horiek batera aipatu ohi dira, Tudor-SN5 domeinu bikoitz bezala.

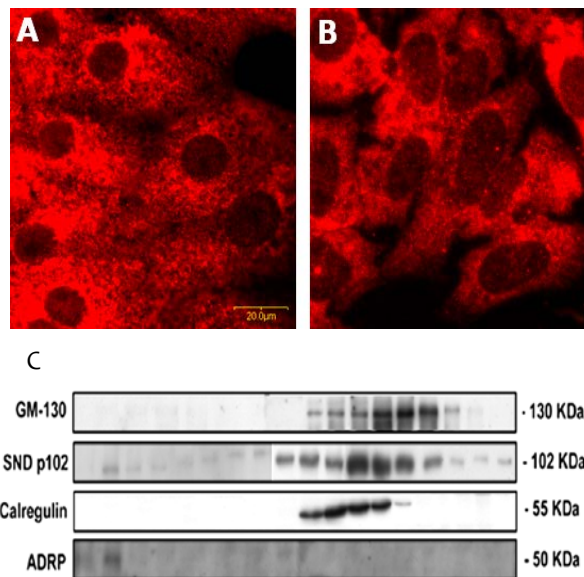
SND1 oso proteina kontserbatua da. Espezie ezberdinetako homologoetan, eta zelula mota ezberdinetan, domeinu patroi hau, SN1-4 + Tudor-SN5, errepikatu egiten da (**A.2 Irudia**) (Porta et al., 1999; Sami-Subbu et al., 2001; Abe et al., 2003; Zhao et al., 2003; Abe et al., 2005; Hossain et al., 2008).



A.2 Irudia: Organismo ezberdinen SND1 proteinen sekuentzian identifikatutako domeinuen eskema. Ikus daitezkeen espezieak: *Pisum sativum* (Psat, ilarra), *Arabidopsis thaliana* (Athal, landarea), *Oryza sativa* (Osat, arroza), *Ajellomyces capsulatum* (Acap, onddoa), *Aspergillus fumigatus* (Afum, onddoa), *Schizosaccharomyces pombe* (Spom, legamia), *Candida albicans* (Calb, legamia), *Mus musculus* (Mmus, sagua), *Rattus norvegicus* (Rnor, arratoia), *Homo sapiens* (Hsap, gizakia), *Gallus gallus* (Ggal, oiloa), *Drosophila melanogaster* (Dmel, ozpin-eulia), *Caenorhabditis elegans* (Cele, nematodoa). (Abe et al., 2003).

Giza genearen eta arratoiarenaren promotoreak (GenBank EF690304 eta AY957585, hurrenez hurren) arratoiaren cDNA-en sekuentziatik (GenBank AAU05374) (Palacios et al., 2006) abiatuta deskribatu ahal izan ziren gure taldean (Rodriguez et al., 2006; Armengol et al., 2013). Promotore horiek ere homologia maila nabarmena erakusten dute; badirudi transkripzio maila basala mantentzeko beharrezko eremuak antzekoak direla: TATA kutxarik gabekoak dira eta CCAAT eta CpG irlak dituzte (Rodriguez et al., 2006; Rodriguez et al., 2007; Armengol et al., 2013). Klonatutako promotoreen azterketetan gene adierazpenaren erregulazioan diharduten zenbait faktoreen elkarketa *in vitro* eta *in vivo* frogatua izan den arren oraindik ez dago horien funtzionaltasunari buruzko informazio gehiegirik. EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) eta ChIP (*chromatin immunoprecipitation*) esperimentuen bitartez Sp1 (*specificity protein 1*), NF-Y (*nuclear factor Y*) eta NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) transkripzio faktoreek SND1en promotorearekin elkartzeko gaitasuna dutela deskribatua izan da (Armengol et al., 2013). Gainera, zuzendutako mutagenesi esperimentuen bidez elementu horien funtzionatasuna baieztatatu ahal izan da SND1en promotorearen erregulazio positiboan.

1.1.2. Kokapena



A.3 Irudia: SND1en zelula barruko kokapenaren inguruko gure taldearen aurkikuntzak. SND1en immunodetekzioa arratoi hepatozito primarioetan (A) eta HepG2 zeluletan (B) egin zen (Palacios et al., 2006). Kokapen nagusia nukleotik kanpoko delako beha daiteke. Bestetik, arratoi gibelaren gainjalkin posnuklearra dentsitate-gradiente batean zentrifugatuz frakzionatu eta Golgiren aparatuen (GM-130), erreteikulu endoplasmikoaren (kalregulina) eta gorputz lipidikoen (ADRP) markatzaileen eta SND1en WB egin zen frakzio ezberdinetan (C) SND1ek zitoplasmako markatzaileekin bat egiten duela beha daiteke (Garcia-Arcos et al., 2010).

Saguan, SND1 proteina eta dagokion mRNA ehun gehienetan adierazten dira. Bereziki nabarmena da zelula epitelialetako adierazpen maila, baita bikoizten diren zeluletakoa, zelula progenitoreetakoa eta organo jariatzaileetakoa (Fashe et al., 2013).

Zelula barruko kokapena anitza izan daitekeela dirudi; zelula motaren eta egoera fisiologikoaren arabera izan litekeela iradokitzen dute argitalpen ezberdinek. Kasu batzuetan bai nukleoan eta bai zitoplasman aurkitu izan da (Broadhurst et al., 2005; Saarikettu et al., 2010) eta bestetan zitoplasmako konpartimentu ezberdinetan soilik (Keenan et al., 2000). Gure taldeak arratoi gibelean eginiko zenbait lanetan SND1 zitoplasman kokatzen dela erakutsi du. Horietan arratoiaren hepatozitoak aztertuta, bai immunozitokimikaz baita frakzionamenduaren eta *Western blotting* (WB) teknikaren bidez ere, SND1en kokapena batez ere zitoplasmikoa dela frogatu dugu (**A.3 Irudia**) (Palacios et al., 2006; Garcia-Arcos et al., 2010).

1.2. SND1en funtzioak

SND1 proteinaren funtzioaren azterketatan oso lerro ezberdinak ari dira jarraitzen ikerkuntza talde ezberdinak. Ziurrenik proteina multifuntzionala da eta espezie, zelula mota edo baldintza ezberdinetan funtzio ezberdinak bete ditzake.

1.2.1. Transkripzio genikoaren erregulazioa

Lan askotan SND1 transkripzio genikoaren erregulazioarekin erlazionatuta dagoela baieztatu da. Tong-en eta kideen lanean EBNA2rekin duen elkarrekintzaz gain TFIIE (*transcription factor IIE*, II RNA polimerasaren hasiera faktorea) ere lotu dezakeela frogatu zen (Tong et al., 1995). Horrez gain, c-Myb (Dash et al., 1996) edo Stat5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) (Paukku et al., 2003) proteinekin elkarrekintzak izan ditzakeela ere erakutsi da. Saguen ugatz epitelioko lerro zelularretan SND1 gainadierazten duten zeluletan Stat5ek eragindako aktibazio transkripzionala 100 aldiz handiagoa da (Paukku et al., 2003).

Lan ugari SND1 eta Stat6 erlazionatu egiten dituzte. 4 interleukina (IL4, *interleukin 4*) zitokinak eragindako erregulazio genikoan Stat6 da transdukzio intrazelularren bitartekari garrantzitsuena. Yang-ek eta kideek COS-7 zeluletan SND1en eta Stat6ren arteko elkarrekintza aurkitu zuten, SND1en SN domeinuen bidezkoa; horretaz gain SND1ek eta II RNA polimerasaren azpiunitate handiak elkarri eragiten diotela eta SND1ek azken horren eta Stat6ren artean zubi-funtzioa duela iradoki zuten (Yang et al., 2002). Valineva-ren eta kideen arabera COS-7 zeluletan Stat6 eta CBP (*CREB-binding protein*) faktoreen arteko zubi da SND1, berriro ere SN domeinuen bidez. Bestalde, HeLa zeluletan Stat6k histona aziltransferasa jarduera errekruta dezan SND1 beharrezkoa dela topatu zuten (Valineva et al., 2005). Beste

lan batean, talde horrek SND1ek Stat6ren eta A RNA helikasaren arteko zubi funtzioa ere betetzen duela argitaratu zuen. Stat6k eragindako aktibazio transkripzionala luziferasa saioarekin neurtuz, helikasa eta SND1 gainadieraztean IL4 tratamenduak aktibazio transkripzional altuagoak eragiten zituen (Valineva et al., 2006).

Low-k eta kideek Stat6 eta PC1 (*polycystin-1*) proteinen arteko elkarrekintzan ere SND1 zubi izan daitekeela adierazi zuten. PC1 giltzurrun epitelioko zelulen zilietako mintz plasmatikoko proteina integrala da, eta kanpoko fluidoaren mugimenduen hartzaile gisa jokatzeko du: mugimendu horrek proteinaren atal zitoplasmatikoaren proteolisia eragiten du, hori nukleora doa eta SND1 eta Stat6rekin elkarrekintzak sortuz Stat6k eragindako transkripzioa areagotu egiten du (Low et al., 2006).

Transkripzio faktoreak ez ezik, topatu izan dira SND1ekin elkarrekintzak dituzten bestelako proteinak ere. Levenson-ek eta kideek Pim1 serina/treonina kinasak SND1 lotu, fosforilatu eta horrekin konplexu egonkorra sor dezakeela deskribatu zuten; gainera, elkarrekintza hori ematean c-Myb transkripzio-faktorearen jardura transkripzionala areagotu egiten da (Levenson et al., 1998).

Lan berriago batek SND1ek TGF β 1 (*transforming growth factor β 1*)-en seinalizazio bidearen erregulazioan parte hartzen duela iradokitzen du, bularreko minbizia sustatuz (Yu et al., 2017). Lan horren arabera, SND1, GCN5 histona azetilasarekin batera, Smad2/3/4-ren promotoreari lotzen zaio eta horren aktibazio transkripzionala areagotzen du.

1.2.2. RNA-ren metabolismoa

2001. urtean argitaratutako lan batean deskribatu zen lehen aldiz SND1en eta RNA molekulen arteko elkarrekintza. Arroz-hazien garapenean prolamina izeneko proteinaren ekoizpen masiboa gertatzen da eta prolamina mRNAri lotuta zenbait proteina agertzen da, horien artean SND1 (Sami-Subbu et al., 2001).

Argitaratutako beste lan batean SND1 eta II angiotentsinaren 1 hartzaile (AT1R, *angiotensin II type 1 receptor*) proteinen arteko eraginak daudela adierazia izan zen. Egileek SND1en gainadierazpena eta azpiadierazpena eraginez eta *in vitro* eginiko saioren bitartez SND1ek odol hodietako muskulu leuneko zeluletan, AT1Rren mRNAren 3'-UTR (*3'-untranslated region*) eskualdearekin elkarrekintza zuzenak sortuz, bere adierazpena positiboki erregulatzen duela iradoki zuten (Pauku et al., 2008).

mRNA molekulekin dauzkan elkarrekintza horiez gain, SND1en inguruan gero eta garrantzi handiagoa ari da hartzen RNAren bidezko adierazpen genikoaren interferentziarekin (RNAi-rekin) lotzen duen ikerkuntza-alorrak, kasu askotan SND1 eta RNA molekulen artean elkarrekintza fisikoa egon daitekeela

erakusten duena. RNAi-an prozesu konplexuak ematen dira, zeintzuetan mRNA molekula batek eta konplexu proteiniko ugari hartzen duen parte. Besteak beste, RISC (*RNA-induced silencing complex*) konplexuak mRNAk espezifikoki ezagutu eta nukleasa jardueraren bidez degrada ditzake.

2003. urtean Caudy-k eta kideek SND1 topatu zuten zelula mota ezberdinen RISCetan (Caudy et al., 2003). Gainera, *D. melanogaster*-en kasuan, SND1ek nukleasa jarduera duela deskribatu zuten, baina RISCko nukleasa jarduerak ez bezala, horrek burututako ebaketak ez-espezifikoak ziren eta RNAz gain DNA ere moztu zezakeen. Horrekin guztiarekin lanaren egileek SND1en zeregina RISCak moztutako mRNA molekulen zatien degradazioan laguntzea izan litekeela iradoki zuten (Caudy et al., 2003).

Nukleasa jarduera hori ez dator bat analisi bioinformatikoei SND1i buruz aurreikusitakoarekin (Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997a). Bestetik, RISC konplexuaren nukleasa jarduerari buruzko beste lan batean siRNA (*small interfering RNA*) molekulek zuzenduriko RNAREN katearen barneko mozketaren erantzule SND1 izan daitekeenik baztertzen dute, jarduera hori Mg^{2+} -aren menpekoa delako eta SNen jarduera Ca^{2+} -aren menpekoa delako. Gainera, SNen inhibitzaileak erabilia RISCaren nukleasa jarduera ez zen inhibititu (Schwarz et al., 2004).

Beste lan batzuk kontraesan horiek argitzen saiatu dira, gizakiaren SND1 proteina bertsio moztuen adierazpena eraginez *E. coli*-n eta horien nukleasa jarduera aztertuz. Horrela, SND1ek DNasa jarduera duela ikusi zuten eta baita SN1 eta SN2 domeinuak ezinbestekoak direla horretarako. Antzera, RNasa jarduera ere detektatu zuten baina ez SN1 domeinurik gabeko bertsioetan; editatutako RNA molekulak erabilia (adenosinen desaminazioagatik inosina daukatenak; RNAi modula dezakeen edizio arrunta da hori), RNasa jarduera jatorrizko RNA molekulekin baino askoz altuagoa zen. RNA lotu dezakeen atal minimoa 2 SN domeinuduna da eta Tudor eta SN5 domeinuek ez dute RNAREN loturan parte hartzen (Li et al., 2008). Hori bat dator gizakiaren eta *D. melanogaster* euliaren SND1 homologoen Tudor domeinuaren karakterizazioarekin: azaleraren izaera azidoak RNA lotzea asko zailtzen du (Li et al., 2008; Friberg et al., 2009). Sundstrom-ek eta kideek argitaratutako lanean ere SND1ek RNasa jarduera duela erakusten da, Tudor eta SN5 domeinuen arteko puntuan proteolisia eragitean desagertzen dena (Sundstrom et al., 2009).

Plasmodium falciparum protozoaren SND1 proteinarekin egindako lanean bi SN domeinu eta Tudor domeinua duten fragmentuak ere Ca^{2+} -aren menpeko nukleasa jarduera daukala eta harizpi bakuneko DNA eta RNA mozteko gai dela ikusi zen. Hala ere, aurreko datuekin kontraesanean, lan horretan gainadierazitako Tudor domeinua RNA lotzeko gai dela ikusi zen (Hossain et al., 2008).

RNAi-an parte hartzeaz gain, Yang-en eta kideen arabera SND1ek esplizeosomaren osagaiekin ere elkarrekintzak sortzen ditu (Yang et al., 2007). Zelula eukariotoetan pre-mRNAREN moztitsasketa (*splicing* ingelesez, eta hortik esplizeosoma) adierazpen genikoaren erregulaziorako funtsezko prozesua da (Schellenberg et al., 2008; Staley and Woolford, 2009; Wahl et al., 2009). Esplizeosoma izeneko konplexuak burutzen du, zeinetan snRNA (*small nuclear RNA*) molekulak, esplizeosomako proteinak (adibidez Sm proteinak) eta oso zehazki definituta ez dauden beste proteina asko aurki daitezkeen; esplizeosomako proteinei snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) ere deitzen zaie. Esplizeosomak pre-mRNAREN sekuentziak definitutako introiak topatu eta moztuko ditu, exoiak beren artean berriro itsatsiz. Moztitsasketa alternatiboaren bidez pre-mRNA molekula berdinetik mRNA ezberdinak lor daitezke, kasu bakoitzean introi ezberdinak moztuz. Horrela proteina berdinen tamaina ezberdinetako bertsioak edo proteina ezberdinak lor daitezke pre-mRNA (eta azken finean gene) berdinetik.

Proteina birkonbinanteak erabilia SND1 snRNP ezberdinekin elkartzen dela deskribatu da. Gainera, SND1 proteinak esplizeosomaren mihizatadura bizkortuz moztitsasketaren zinetika arintzen duela frogatu da *in vitro* egindako saioretan (Yang et al., 2007). Are gehiago, beste lan batean ere jarduera hori behatu da, Tudor eta SN5 domeinuen arteko proteolisia eraginez desagertzen dena (Sundstrom et al., 2009). Tudor domeinua da, hain zuzen ere, esplizeosomako osagaien mihizatadura bizkortzen duena *in vitro* (Yang et al., 2007).

1.2.3. Lipidoen kudeaketa

SND1en inguruko bibliografian topa daitezkeen lan gehienek transkripzio genikoarekin eta RNAREN metabolismoarekin dituen erlazioa aztertzen duten arren, badaude lipidoen metabolismoarekin lotuta dagoela erakusten duten ebidentziak, eta hori da izan ere lan honetan jarraitu den lerroa.

Gure ikerkuntza taldeak SND1en inguruan duen jakin-mina arratoi hepatozitoen erretikulu endoplasmatikoko (ERko, *endoplasmic reticulum*-eko) CEH (*cholesteryl ester hydrolase*) bati buruzko azterketatik dator. Gure laborategian mikrosometako CEH jardueraren purifikazio prozedura kromatografiko bat deskribatu zen (Cristobal et al., 1999), lisosometako eta zitosoleko CEHetatik bereizita karakterizatu ahal izateko asmoarekin. Isolatutako lagin horren azterketak ekarri zuen SND1 proteina gure ikerkuntza helburuetara. SND1en azterketarako tresna ezberdin ugari garatu dugu gure laborategian, besteak beste, zelula mota ezberdinetan proteina horren gainadierazpena eragiteko bektore berkonbinante ezberdinak eta antigorputz espezifikoak (Palacios et al., 2006).

Lipidoen kudeaketarekin erlazionatutako lehenengo azterketa funtzionalak arratoi hepatozitoen kultura primarioetan bektore adenobiralen bidezko SND1en adierazpen diferentziala eraginez egin ziren. SND1en gainadierazpenaren ondorioz zelularen mikrosometako kolesterol ester (CE, *cholesteryl ester*) eta triglizerido (TG) mailak jaitsi eta zitosoleko fosfolipidoa (PL, *phospholipid*) lipoproteinetan jariatzeari bultzatzen dela erakutsi genuen, jariatutako oso dentsitate baxuko lipoproteina (VLDL, *very low density lipoproteins*) kopurua aldatu gabe (Palacios et al., 2006).

Beste hainbat lanetan, SND1en eta gorputz lipidikoen arteko erlazioa ikertu da. Esteatosi eredu ezberdinetan SND1 hepatozitoen gorputz lipidikoetara translokatzeko frogatu genuen (Garcia-Arcos et al., 2010). Esteatosiaren eredu bat azido oleikoarekin tratatutako hepatozitoen kultura primarioa zen; azido oleikoa kultura mediotik kentzean, SND1en eta adipofilinaren (gorputz lipidikoen proteina markatzailearen) kokapen erlatiboa aldatu egiten da gorputz lipidikoetatik desagertu gabe, behaketa immunozitokimikoen arabera (Garcia-Arcos, 2008). Azido oleikoak hepatozito primarioetan eragindako SND1en translokazio hori glukosa eta intulina kontzentrazioen menpekota dela ere ikusi zen (Garcia-Arcos, 2008). Guzti horrekin SND1en kokapena faktore esteatogenikoen eta lipogenikoen menpe dagoela iradoki daiteke.

Gure taldekoak ez dira SND1 proteina lipidoen kudeaketarekin erlazionatzen duten lan bakarrak. Keenan-ek eta kideek behiaren zelula esne jariatzaileetako eta saguaren adipozitoetako gorputz lipidikoetan topatu zuten, besteak beste, SND1, baina ez esne globulu jariatuetan (Keenan et al., 2000). Argitalpen horretan TGen biltegitarte organuluetan SND1ek zeregin ez espezifikoren bat eduki lezakeela proposatzen zuten. Funtzio galera motako analisiek iradokitzen dute SND1 adipogenesirako beharrezkoa dela, SND1en delezioak dexametasonak, 3-isobutil-1-metilxantinak eta intulinak induzitutako adipozitoen diferentziazioa baliogabetzen baitu. Gainera, gantz azidoen (FA-en, *fatty acids*-en) eta glukosaren metabolismoaren erregulatzaile den PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*)-ren itu gene diren aP2 eta adipsina geneen adierazpena ere erasaten ditu (Duan et al., 2014). Lan berriago batek SND1en eta monoglizerido lipasaren (MGL) artean elkarrekintza egon daitekeela iradokitzen du. Elkarrekintza horrek MGLren ubikitazioa eta degradazioa bultzatzen du eta ondorioz zelularen FAen eskuragarritasuna erregulatu daiteke (Rajasekaran et al., 2016).

1.3. SND1en garrantzi fisiopatologikoa

SND1en funtzio molekularra guztiz argitu ez den arren, izan dezakeen garrantzi fisiopatologikoari buruzko gero eta ebidentzia gehiago ari da argitaratzen. Bere adierazpenaren jaitsierak hazkuntza

zelularren gelditzearekin eta baita heriotza zelularrekin erlazionatu dira (Tong et al., 1995; Hossain et al., 2008), eta adierazpenaren igoerak egoera patologiko ezberdinekin, beti ere SND1en adierazpen mailaren eta zelulen bikoizketa potentzialaren arteko loturak erakutsiz.

Adibidez, arratoien odol hodietako muskulu leuneko zelulen bikoizketa eragiten duen hidrogeno peroxidoak SND1 gainadieraztea eragiten du (Sakamoto et al., 1999). Bestalde, odol hodietako muskulu leuneko zeluletan ere SND1en gainadierazpenak angiotentsinaren AT1R hartzailearen adierazpena emendatzen du (Pauku et al., 2008); angiotentsinak odol hodien uzkurdua maila erregulatzen du.

Minbizi mota ezberdinetan SND1en adierazpena aldatuta dagoela ezaguna da ere. Bere adierazpena ehun osasuntsuan baino altuagoa da bularreko minbizian (Ho et al., 2009) edo kolonekoan (Tsuchiya et al., 2007). Azken lan horretan, SND1 gainadierazten duen lerro zelular batean zelulek kontaktuarengatiko hazkuntzaren inhibizioa galdu zuten eta zelula-zelula kontaktuguneetan E-kadherinaren seinalea galtzen zen. Horrek iradokitzen du SND1en gainadierazpenak normalean mintz plasmatikokoan lokalizatzen den E-kadherinaren barneraketa bultzatzen duela (Tsuchiya et al., 2007).

Prostata minbizian ere SND1en gainadierazpena behatu da (Kuruma et al., 2009); kasu horretan, SND1en adierazpenaren kontrola proposatua izan da hazkuntza zelular desegokia geldiarazteko tratamendu bezala. Bestalde, SND1ek 3-kaspasarentzako itu sekuentzia dauka, Tudor eta SN5 domeinuen artean zehazki, eta proteolisia ematen denean SND1ek bere funtzioetako batzuk ezin ditu bete. Itu sekuentzia horretan 3-kaspasak eragindako proteolisia ezintzen duen mutazioa eraginez proliferazio zelularren emendioa behatu da, bai eta esperimentalki eragindako apoptosiaren aurrean bideragarritasun zelularrena ere. Eta alderantziz, SND1en degradazioa siRNA espezifikoaren bitartez eraginda, apoptosi esperimentalaren aurreko erantzuna askoz handiagoa da (Sundstrom et al., 2009). Ematen du SND1en funtzioek proliferazio zelularra bultzatzen dutela, eta 3-kaspasaren bidezko degradazioa beharrezkoa dela apoptosia modu zuzenean pizteko. Lan horrek, SND1ek minbizien ezaugarri garrantzitsuenetakoa den kontrol gabeko proliferazioan funtzio garrantzitsua bete dezakeela iradokitzen du.

Yoo-k eta kideek SND1-ek metadherinarekin (MTDHrekin) elkarrekiteko gaitasuna duela deskribatu zuten (Yoo et al., 2011). MTDHren funtzioen artean zera dago, zelulen inbasio eta metastasi ahalmena erregulatzen duten geneen adierazpena modulatzeko. Aipatutako lanean erakutsi zuten SND1en edota MTDHren gainadierazpenak hepatokartzinoma zelular (HCC, *hepatocellular carcinoma*) zelulen bideragarritasuna eta tumorigenizitatea bultzatzen dutela. Gainera, zelula horiek RISC aktibitate altuagoa aurkezten zuten. Emaizta horiekin bat, SND1en nukleasa aktibitatearen inhibizioak HCC zelulen

bideragarritasuna txikitzen du. SND1ek edo MTDHk eragindako RISC aktibitate altuagoak gene tumore supresoreen degradazio altuago bat eragin dezakeela proposatu zuten, horrela tumorigenizitatea sustatuz (Yoo et al., 2011).

Ez da ezagutzen SND1ek tumorigenesian betetzen duen funtzio molekular zehatza, baina beste zenbait lanek ere erlazio horren inguruan hitz egiten du. SND1ek gene metastatikoak eta onkogenikoak erregulatzen dituela deskribatua izan da, saguetan egindako biriketako metastasi saio esperimentaletan metastasia bultzatuz eta biziraupena txikituz. Lan berdinak metastasia izandako bularreko minbizi pazienteengan SND1en adierazpena metastasi gabekoengan baino altuago dela ere erakutsi zuten (Blanco et al., 2011).

SND1ek angiogenesi prozesuan ere parte har dezakeela iradokitzen duten lanak ere badaude. Shantekadur-ek eta kideek SND1ek, NF- κ Bren aktibazio bidezko mir-221-en indukzioaren bitartez, faktore angiogenikoen adierazpena bultzatzen duela deskribatu zuten. Lan horretan SND1en adierazpen maila minbizien fenotipo agresiboekin erlazionatu zuten (Santhekadur et al., 2012). SND1 epitelio-mesenkima trantsizioaren (EMTren) induzitzaile izan daitekeela ere proposatu da. Badirudi SND1ek AT1Rren mRNA egonkortuz eta TGF β seinalizazioaren bidez EMT prozesuan ezinbesteko diren zelulen migrazio eta inbasio ahalmena modulatzeko dituela (Santhekadur et al., 2014).

SND1en promotorearen ikerketetan gure taldeak horren adierazpenaren kontrola zenbait estres egoerarekin erlazionatu du. Zehazkiago, HCC zeluletan estimulu proinflamatorioek (NF- κ Bren bitartez) eta ERko estresak SND1en adierazpena aktibatzen dutela deskribatu dugu (Armengol et al., 2013; Armengol et al., 2014). Horrelako estres zelularrak patologia askotan ager daitezke, minbizia barne (Mantovani et al., 2008; Hazari et al., 2016).

Lan gehienek SND1ek tumorigenesiaren aldeko ekintzak betetzen dituela adierazten duten arren, badira ere tumorigenesiaren gain funtzio babeslea izan lezakeela iradokitzen duten lanak. Aurretik aipatu den bezala, SND1en eta MGLren arteko elkarrekintza dagoela iradoki da (Rajasekaran et al., 2016). Badirudi SND1ek MGLrekin elkarrekiteak MGLren ubikitinazio eta degradazioa bultzatzen duela. MGLk TGen degradazioan betetzen duen funtzioaz gain kannabinoideen hartzaileen ligando endogenoa den 2-arakidonol glizerola ere apurtzen du eta ondorioz endokannabinoideen seinalizazio bidea negatiboki erregulatzen du. Zenbait lanek endokannabinoideek efektu antitumorigenikoa duela proposatzen dute minbizien garapenean ezinbestekoak diren ezaugarriak modulatzeko: apoptosiaren indukzioa, angiogenesiaren inhibizioa eta minbizi zelulen migrazioa (Hermanson and Marnett, 2011).

2. Metabolismoaren egokitzapenak minbizian

Gaur egun metabolismoaren desregulazioa minbiziaren ezaugarri bereizlea dela onartzen da (Hanahan and Weinberg, 2011). Azken urteotan gero eta lan gehiagok erakutsi dute minbizi zelulek beren metabolismoa berrantolatzen dutela biziraupena, hazkuntza eta metastasia faboratzeko (Tennant et al., 2009; Huang and Zong, 2017; Vander Heiden and DeBerardinis, 2017). Zelula normalen eta minbizi zelulen artean profil metaboliko eso heterogeneoak aurki daitezke eta horrek minbizi zelulek erakusten dituzten ezberdintasun asko azal ditzake.

2.1. Egokitzapenak metabolismo energetikoan

Zelula arruntetan, oxigeno nahikoa dagoenean, glikolisiaren amaierako produktuen gehiengoa TCA (*tricarboxylic acid*) ziklorantz bideratzen da eta guztiz oxidatzen da mitokondrioetan CO₂ lortu arte, fosforilazio oxidatiboaren bidez lortuz ATP gehiena. Hipoxian, ordea, glikolisitik eratorritako pirubatoa laktatorantz bideratzen da hartxidura laktikoaren bidez (Tennant et al., 2010). Oxigenoak hartxiduraren gain eragiten duen efektu inhibitzailea Pasteur efektu bezala ezagutzen da.

Hala ere, minbizi zelulak, normoxia egoeran ere, glukosa laktatorantz bideratzeko programatuta daude eta hau Warburg efektu bezala ezagutzen da (Warburg, 1956). Bide hori ez da energetikoki oso efizientea glikolisi aerobikoarekin alderatuz, glukosa unitateko ATP gutxiago sortarazten duelako. Ondorioz, tumorearen hazkuntza bultzatzeko glukosa kontsumoa altua da. Laktato ekoizpen handi horrek gainera, tumorearen mikroingurunearen azidotzea eragiten du, besteak beste, tumorearen hazkuntza eta inbasioa ahalbidetuz (Kraus and Wolf, 1996; Gatenby and Gillies, 2004; Parks et al., 2017)

Warburg-ek tumoreen laktato ekoizpen altua metabolismo oxidatibo ezegoki baten ondorio bezala azaldu zuen baina, ondorengo beste lan askok bezala, ezin izan zuen erakutsi minbizi zeluletan arnasketa mitokondrialean akatsik zegoenik (Vander Heiden et al., 2009; Koppenol et al., 2011). Are gehiago, arnasketa mitokondriala, beste jarduera mitokondrial batzuekin batera, beharrezkoa da tumoreen hazkuntzarako (DeBerardinis and Chandel, 2016).

Glukosaz gain, beste hainbat elikagaik ere ekarpen garrantzitsua izaten du minbizi zelulen oinarritzko funtzio metabolikoetan. Aipatuenen artean glutamina dago (Altman et al., 2016), baina azken urteotan minbizi zelula ezberdinek karbono iturri ezberdinak erabiltzen dituztela ikusi da eta (zelula horiek erabil ditzaketen karbono iturrien zerrenda gero eta zabalagoa da (Vander Heiden et al., 2009). Minbizi zelulak gehienetan hazkuntzarako nutriente gutxi dagoen mikroingurune batean hazten direla kontuan hartuz, nutriente ezberdinak erabiltzeko malgutasuna nolabaiteko abantaila izan daitekeela pentsa daiteke.

Egokitutako jarduera metaboliko guztiek ez dute ekarpen bera minbiziaren garapenean. Gaur egun sailkapena ez da oso argia eta lan ezberdinek irizpide ezberdinak erabiltzen dituzte jarduerak sailkatzeko orduan. Dena den, sailkapen argirik egon ez arren, minbizietan desregulatzen diren jarduerak ondo ezagutzen dira. Jarduera horietako batzuek zelulen transformazioan hartzen dute parte zuzenki. Horiek herentzia genetikoaren edo diren mutazio somatikoaren ondorioz sortutako entzima mutanteek eragindako alterazio metabolikoak dira. Gehien ezagutzen diren mutazioen artean isozitrato deshidrogenasa 1 eta 2 (IDH1 eta IDH2) (Losman and Kaelin, 2013), fumarato hidratasa (FH) eta sukzinato deshidrogenasa (SDH) konplexua osatzen duten proteinetan gertatutakoak aurki daitezke (Laurenti and Tennant, 2016).

IDHek isozitratoaren deskarboxilazioa katalizatzen dute α -zetoglutaratoa (α -KG, α -ketoglutarate) emateko. IDH1 eta IDH2 geneen mutazioak tumore mota ezberdinetan aurki daitezke; entzima mutante hauek α -KG D-2-hidroxioglutarato (D-2HG) bihurtzen dute. D-2HG metatu egiten da eta α -KGren menpeko zenbait dioxigenasaren jarduera inhibitzen du, horien artean, hipoxiak induzitutako faktore (HIF) α azpiunitateen degradazioa zein histona eta DNAREN metilazio egoera erregulatzen dituzten protil hidroxilasak (Losman and Kaelin, 2013; Laurenti and Tennant, 2016).

SDH konplexuak eta FHk TCA zikloan hurrenez hurreneko erreakzioak burutzen dituzte. SDHk sukzinatoaren fumaratorako oxidazioa eta jarraian FHk itzulgarria den fumaratoaren malatorako hidratazioa katalizatzen dituzte. SDH konplexuak gainera elektroien garraio katean hartzen du parte. Entzima horien mutazioen ondorioz, tumoreek sukzinato edota fumarato kantitate handiak metatzen dituzte eta, D-2HGk bezala, dioxigenasa ezberdinen funtzioarekin interferitu dezakete eta HIF proteinen metaketa bultzatu (Laurenti and Tennant, 2016).

Beste hainbat jarduerak, zelulen transformaziorako beharrezkoak izan ez arren, ekarpen garrantzitsua du minbiziaren garapenean. Askotan onkogene eta gene tumore supresoreen bidez erregulatutako jarduerak izaten dira. Adibidez, c-Myc protoonkogenearen ituen artean glukosaren metabolismoko entzimak, zenbait metabolitoren garraiatzaileak edo glutaminolisirako beharrezko entzimak aurki daitezke, besteak beste (Dang, 1999). KRAS (*Kirsten rat sarcoma*) onkogenearen ituen artean nutrienteen eskuragarritasunean parte hartzen duten entzimak, makromolekula ezberdinen sintesi bideetako entzimak eta erredox homeostasian parte hartzen duten entzimak daude. mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) seinalizazio bideak ere proteinen, lipidoen eta azido nukleikoen sintesia erregulatzen ditu. Jarduera metaboliko horien alterazioek tumoreen garapena bultzatu dezakete (Altman et al., 2016; Flier et al., 1987; Howell et al., 2013). Onkogene eta gene tumore supresoreetan ematen diren mutazioez gain, argininaren sintesian inplikaturako geneen mutazioek, adibidez, aspartatoa

nukleotidoen sintesirantz bideratzea ahalbidetzen dute eta horrela zelulen proliferazioa bultzatzen da (Rabinovich et al., 2015)

Badago beste zenbait jarduera tumoreen hazkuntza eta garapenerako beharrezkoa ez dena eta tumore motaren arabera adierazpen maila ezberdinak erakusten dituen. Tumore garapenerako ezinbestekoa ez den jardueraren adibide bezala pirubato kinasa M2 (PKM2) entzima dago. Gainadierazita egon daiteke zenbait minbizi motatan baina ez da beharrezkoa bularreko minbiziaren, gibelesko minbiziaren edo leuzemiaren garapenerako. Bestalde, PKM2ren galerak minbizia sustatzen du zenbait eredutan eta beste kasu batzutan PKM2ren aktibazioak tumoreen hazkuntza inhibituz dezake (Dayton et al., 2016; Israelsen et al., 2013; Israelsen and Vander Heiden, 2015).

Azkenik, minbizi zelulen egokitzapen metaboliko garrantzitsuen artean, hipoxia egoerari aurre egiteko balio dutenak dira aipagarrienetakoak. Tumore solido askok gune hipoxikoak garatzen dituzte neurrigabeko hazkuntzaren ondorioz baskularizazio sistemaren ahalmena gaintzen denean. Oxigenoaren eskuragarritasun baxuak HIF proteinen metaketa eragiten du, horien hidroxilazioaren eta proteasomako degradazioaren inhibizioaren ondorioz. Egonkortutako HIF α -k, nukleora translokatu eta HIF β -rekin heterodimerizatu ondoren, itu geneen adierazpena aktibatzen du. HIF-en aktibazioak angiogenesisia sustatzen du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) faktorearen adierazpena aktibatuz. Gainera, ingurune hipoxikoan hobeto bizirauteko, zelulen metabolismoan hainbat aldaketa gertatzen dira energia bide anaerobikoen bidez lortzeko. HIFek zenbait entzima glikolitikoren eta GLUT1 (*glucose transporter 1*) glukosa garraiatzailearen adierazpena aktibatzen dituzte. Aldi berean, pirubatoaren TCA zikloaren bidezko oxidazioa inhibitzen dute pirubato deshidrogenasa kinasa1 (PDK1) entzimaren adierazpena bultzatuz, zeinek pirubato deshidrogenasa (PDH) inhibitzen duen. Ondorioz, lipidoen sintesirako glukosaren erabilpena inhibitzen da beste karbono iturrien erabilpena bultzatuz. Normoxia egoeran HIFak oxigeno menpeko prolil hidroxilasaren itu bihurtzen dira eta ubikitinizatuak izan ondoren degradatu egiten dira (Tennant et al., 2009; Santos and Schulze, 2012; Eales et al., 2016) Hala ere, tumore asko pseudohipoxia egoeran egoten dira, non oxigeno kontzentrazio normalen aurrean ere, aurretik aipatutako hainbat mutazioen eraginez, HIF-en egonkortzearen ondorioz zelulek metabolismoaren egokitzapenak jasaten dituzten.

2.2 Lipidoen metabolismoa

2.2.1 Egokitzapenak

Hasiera batean garrantzi handirik eman ez bazitzairen ere, gaur egun tumoreen biologia ulertzeko ezinbestekoa da lipidoen metabolismoan gertatzen diren aldaketak ulertzea. Lipidoek tumoreen biologiaren hainbat prozesu garrantzitsutan hartzen dute parte eta zelulen fenotipo tumoralaren garapenerako ezinbestekoak dira. Zelulen hazkuntzan eta proliferazioan oinarritzko funtzioa betetzen dute. Mintz biologikoen ezinbesteko osagai izanik, proliferazio tasa altua duten zeluletan PLen eta kolesterolaren eskuragarritasuna handiak izan behar dira eta, horretarako, lipido exogenoen kaptazioa handitzeaz gain, *de novo* sintesi bideak ere gainaktibatuta egoten dira.

Minbizi zelula eta ehunetan kolesterol edukia zelula eta ehun normaletan baino altuago dela deskribatua izan da eta analisisiek kolesterolaren sintesi bideko entzimen gainadierazpena edo aktibazioa erakutsi dute (Huang and Freter, 2015). Gizakion minbizien %50ean aurki daitezkeen TP53 (*tumour protein 53*) proteinaaren mutazioek ere kolesterolaren sintesi bide nagusia den mebalonatoaren bidea gainaktibatzea eragin dezakete SREBP (*Sterol regulatory element-binding proteins*) proteinen proteolisi mekanismoaren bidez. TP53ren mutaziodun bularreko minbizi pazienteengan adibidez, kolesterolaren sintesian eta esterifikazioan parte hartzen duten SOAT2 (*sterol O-acyltransferase 2*), HMGCS1 (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1*), HMGCR (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase*), ID11 (*isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1*), FDPS (*farnesyl diphosphate synthase*), SQLE (*squalene epoxidase*) eta LSS (*lanosterol synthase*) entzimen gainadierazpena deskribatua izan da (Silvente-Poirot and Poirot, 2012).

Minbizi zeluletan gertatzen diren FAen metabolismoko alterazioei garrantzi gutxiago eman bazaie hasiera batean, gero eta lan gehiagok erakutsi dute minbiziaren garapenean izan dezaketen garrantzia. FAen *de novo* sintesian parte hartzen duten ATP zitrato liasa (ACLY, *ATP citrate lyase*), azetil-A koenzima (CoA, *coenzyme A*) karboxilasa (ACC, *acetyl-CoA carboxylase*) eta gantz azido sintasa (FAS, *fatty acid synthase*) entzimak tumore gehienetan gainedarierazita aurkitzen dira, azetil-CoA zitokolikoaren eskuragarritasuna eta ondoriozko FAen sintesi ahalmena bermatuz (Santos and Schulze, 2012; Baenke et al., 2013; Beloribi-Djefafli et al., 2016). Tumore ezberdinetan fosfatidilkolina (PC, *phosphatidylcholine*) eta fosfatidiletanilamina (PE, *phosphatidylethanolamine*) PLen sintesirako beharrezkoa den kolina kinasaren adierazpen eta aktibitate altua neurtu dira (Ramirez de Molina et al., 2002). FAen oxidazioan inplikaturako zenbait entzimak ere eragin garrantzitsua dauka minbiziaren fenotipoan. Adibidez, FAen

oxidazioan urrats mugatzailea katalizatzen duen karnitina palmitoiltransferasa 1 entzimaren A eta C isoformak (CPT1A eta CPT1C, *carnitine palmitoyltransferase*) gainadierazita daude zenbait tumore motatan. CPT1C gainadierazten duten minbizi zelulek FAen oxidazio maila altuago bat erakusten dutela iradokitzen dute zenbait lanek; ATP ekoizpen altuagoari esker nutriente gutxiko inguruneetan edo ingurune hipoxikoetan heriotzaren aurrean erresistenteagoak egiten ditu. Lan horiek CPT1en adierazpen mailaren eta tumoreen garapenaren arteko erlazioa iradokitzen dute (Zaugg et al., 2011; Balaban et al., 2015).

Gehiegizko lipidoak (besteak beste kolesterola eta FAK) gorputz lipidikoetan (LDetan, *lipid droplets*-etan) gordetzen dira eta gehiegizko LD metaketa minbizien agresibotasunaren neurritzat hartzen da, LD ugaridun tumoreak kimioerresistenteagoak direla ikusi baita (Santos and Schulze, 2012; Beloribi-Djefaffia et al., 2016). Bularreko, birikako, gibealeko, koloneko eta prostatako minbizi zeluletan, besteak beste, LDen tamaina edota kopurua zelula normaletan baino altuago dela deskribatu da. Bularreko minbizi zeluletan gainera, LDetako TG edukia tumoreen agresibotasunarekin eta minbizi zelulen biziraupen altuagoarekin erlazionatu izan da (Balaban et al., 2015).

Minbizi zelulen seinalizazio bide ezberdinetan ere funtzio garrantzitsua betetzen dute lipidoek. Lipido sintesiaren emendio baten ondorioz, kolesterolarena barne, tumorigenesian paper garrantzitsua betetzen duten seinalizazio bideetan parte hartzen duten lipidoen eskuragarritasuna handitzen da. Kolesterola mintz biologikoen osagai garrantzitsua da eta, esfingolipidoekin batera, *lipid raft* izeneko mikrodomeinu batzuk osatzen dituzte. *Raft*-ek mintz plasmaticoaren geometriaren modulatuzaile gisa, molekulen difusio lateralaren erregulatuzaile gisa eta seinale transduktoreen erregulatuzaile gisa jokatzen dute, besteak beste. *Raft*-en lipido eta proteina konposaketa eta inguruko mintz eremuena ezberdina denez, mintz mailako nolabaiteko konpartimentalizazioa ahalbidetzen dute seinale transdukzioarako proteinen kokapen eta jardueraren ardatz bihurtuz. Minbizien garapenean garrantzitsuak diren atxikidura, migrazioa, biziraupena eta proliferazioa bezalako prozesuen seinale transdukzioak lipido baltsen menpekoak dira (Mollinedo and Gajate, 2015). Badirudi kolesteroletan aberastutako *raft* (k-raft) gehiago dituztela minbizi zelulek zelula arruntek baino; kolesterogenesi aktiboagoa eta kolesterol metaketa minbizi zelulen ezaugarria dela kontuan hartuta, ez da harrizkoa lipido baltsen konposaketa ezberdina izatea minbizi zeluletan (Li et al., 2006).

Kolesterola lipido baltsen konposatu nagusia izanik, ziurrenik *k-raft*-ek funtzio garrantzitsuak betetzen dituzte tumorigenesian. Zenbait lanek erakusten du *k-raft*-ek Akt seinalizazio bidearen

bitartekariak direla (Mollinedo and Gajate, 2015). PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) eta urbehera dagoen Akt (B proteina kinasa bezala ere ezagutua), proliferazio eta apoptosiaren erregulazioan inplikaturik daude eta bide horien aktibazio ezegokiak minbiziaren inbasibotasunaren garapenean laguntzen du (Courtney et al., 2010). Biziraupenean inplikaturik dagoen beste seinalizazio batzuk bezala, PI3K/Akt seinalizazio bidea lipido baltsetan konpartimentalizatua dago (Gao et al., 2011) eta beraz mintzeko domeinu horiek minbiziaren garapenean funtzio garrantzitsua betetzen dutela esan daiteke (Li et al., 2006). Kolesterolaz gain, beste lipido batzuek ere seinalizazio bide ezberdinetan bigarren mezulari bezala funtzio garrantzitsua betetzen dute. Horien artean azido lisofosfatidikoa (LPA, *lysophosphatidic acid*), azido fosfatidikoa (PA, *phosphatidic acid*) eta diglizeridoak (DG) dira aipagarrienak. G proteinei akoplatutako hartzaleei lotuz zelulen proliferazioa, migrazioa eta biziraupena modulatu ditzakete, besteak beste (Anliker and Chun, 2004; Baenke et al., 2013; Yung et al., 2014).

Azkenik, lipidoek hainbat proteinaren modifikazio postranskripzionalean hartzen dute parte. Azilo taldeak proteina ezberdinekin elkar daitezke kobalentez. Kolesterolaren sintesi bidean bitartekari diren farnesilo edo geranilgeranilo taldeak ere proteinekin elkar daitezke horiek mintzeko kokapen egokia lor dezaten. Kolesterolak berak eta kolesterolaren eratorriak diren oxisterolek ere funtzio garrantzitsua betetzen du, adibidez, Hh (*Hedgehog*) seinalizazio bideko ligandoen erregulazioan, horiei kobalentez lotuz beren trafiko intrazelularra determinatzen duelako. Lipidoekin elkarrekiten duten proteina horietako askok minbiziaren garapenean funtzio garrantzitsua betetzen dute eta ondorioz, lipidoen metabolismoaren desregulazioek kartzinogenezian inpaktu garrantzitsua izan dezakete (Baenke et al., 2013).

2.2.2 Erregulazioa

SREBP

Funtzio zelular asko lipidoen eskuragarritasunaren menpekoak izanik, lipidoen sintesia estuki erregulatuta egon behar da. FAen eta kolesterolaren biogenesiko entzimak kodetzen dituzten hainbat gene SREBPen itu da (Baenke et al., 2013). Ugaztunen zelulek 3 SREBP isoforma ekoizten ditute; SREBP1a eta SREBP1c gene berak kodetzen ditu eta SREBP2 beste gene batek. Beste transkripzio faktore askok ez bezala, SREBPak ERaren mintzean txertaturik dagoen proteina integral bezala sintetizatzen dira (**A.4 Irudia**). Horien N-muturra gene lipogenikoen promotoreen SRE (*sterol response element*) sekuentzietan lotu eta transkripzioa bultzatzen dute. Hiru isoformen artean, SREBP1a eta SREBP1c aktiboagoak dira FAen

sintesian inplikaturako geneen erregulazioan eta SREBP2 berriz kolesterogenesiko geneen erregulazioan (Ye and DeBose-Boyd, 2011).

SREBPen N-muturrek transkripzio genikoa aktibatu ahal izateko, ERko mintzetik askatu eta Golgi aparatua garraiatu behar dira, non proteasa espezifikoek ekintzaren bidez SREBPen zati aktiboa askatua izango den ondoren nukleora sartzeko (**A.4 Irudia**); prozesu horretan, SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) eta INSIG (*insulin induced gene*) proteinek ezinbesteko funtzioa betetzen dute, esterolen mailaren sentzore gisa funtzionatuz SREBPen Golgirako garraioa ezintzen edo ahalbidetzen dutelako. Zelulako kolesterol maila baxua denean, SCAPen eta INSIGen arteko elkarrekintza apurtu eta proteasomak INSIG degradatzen du; horren ondorioz, SCAP/SREBP konplexua COPII (*coat protein II*) motako besikuletara pasatzen da eta Golgira garraiatua izan daiteke. Bertan, bi mozketak proteolitiko jarrai jasaten ditu. Lehenengo mozketak S1P (*site-1 protease*) proteasak egiten du eta jarraian S2P (*site-2 protease*) proteasak SREBPren N-muturraren askapena eragiten du, nukleoranzko garraioa eta ituen geneen transkripzio genikoaren aktibazioa bultzatuz. Bestalde, kolesterol zelularren maila altua denean hori ERko kolesterol konposaketan islatzen da eta esterolak SCAP proteinarekin lotzen dira. Ondorioz, SCAPen aldaketa konformazional bat gertatzen da eta SCAP eta INSIG lotu egiten dira eta SCAP COPII besikuletara pasatzea ekiditen da. Beraz, SCAP/SREBP konplexua ERan geratzen da eta ez da gene lipogenikoen transkripzioa aktibatzen (**A.4 Irudia**) (Brown and Goldstein, 1997; Ye and DeBose-Boyd, 2011).

Proteolisi bidezko erregulazioaz gain, SREBPen jarduera koaktibatzaile ezberdinen bidez ere erregulatu daiteke, hala nola p300 edo CREB (*cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein*). Bestalde, SREBPak glukogeno sintasa kinasak 3-k (GSK3k) fosforilatu ditzake eta horrek poliubikitinazioa eta proteina helduaren degradazioa sustatzen ditu (Xu et al., 2013).

Itxuraz, SREBP1c isoformaren erregulazio transkripzionala intsulinaren menpekoea da gehien bat (Eberle et al., 2004). Kultibatutako hepatozitoetan intsulinak SREBP1c-ren adierazpena sustatzen PI3K seinalizazio bidearen aktibazioaren bidez (Azzout-Marniche et al., 2000). Gainera, lan berriagoek intsulinak gibeletako SREBP1c-ren prozesamendu proteolitikoa ere sustatzen duela iradokitzen dute nahiz eta mekanismoa ez den ondo ezagutzen (Xu et al., 2013).

LXR

SREBP sistemarekin batera, lipidoen metabolismoaren erregulazioan LXR (*liver X receptor*) hartzaile nuklearrek funtzio garrantzitsua betetzen dute. Gibeletako LXR hartzaileak oxisterolek eta kolesterolaren

eratorri oxidatuek aktibatzen daitezke. Bi isoforma daude, LXR α eta LXR β , eta bien kasuan RXR (*retinoid X receptor*) hartzailearekin heterodimeroak sortu behar dituzte DNARI lotu eta gene adierazpenaren erregulazioa egiteko. Ugaztunetan, LXRk kolesterolaren kanporaketan inplikaturako hainbat generen erregulazio positiboa eragiten du. Horien artean, azido biliarren sintesiaren urrats limitantea katalizatzen duen Cyp7a1 (*cytochrome P450 7a1*) genearena, kolesterolaren alderantzizko garraioan parte hartzen duten ABCA1 (*ATP binding cassette A1*) eta ABCG1 geneena eta hestean kolesterolaren argiranzko jariapenean parte hartzen duten ABCG5 eta ABCG8 geneena. Gainera, dentsitate baxuko lipoproteina (LDL, *low density lipoprotein*) hartzailea (LDLR, *LDL receptor*) degradatzea bultzatuz kolesterolaren kaptazioa negatiboki erregulatzen duela deskribatu da (Currie et al., 2013; Bovenga et al., 2015).

Gainera LXRek FAen metabolismoan inplikaturako hainbat generen erregulazioan funtzio garrantzitsua betetzen dute. Alde batetik, FAen sintesia burutzen duten entzimen edo sustatzen duten transkripzio faktoreen adierazpena aktibatzen du, horien artean SREBP-1c, FAS, estearoil-CoA desaturasa (SCD, *stearoyl-CoA desaturase*) eta ACC, eta beraz programa lipogenikoa ere aktibatzen du; bestetik, TG ugaridun lipoproteinen jariapenean eta metabolismoan inplikaturako geneen transkripzioa ere erregulatzen du, horien artean lipoproteina lipasa (LPL), CEen garraio proteina (CETP, *cholesteryl ester transfer protein*), PLen garraio proteina (PLTP, *phospholipid transfer protein*) eta E apolipoproteina (APOE) (Li and Glass, 2004).

FAen sintesiaren erregulaziorako beste mekanismo bat entzimen fosforilazio bidezko erregulazioa da. AMPK (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*) kinasak ACC entzima, FAen sintesi bidean pausu erregulagarri garrantzitsua katalizatzen duena, fosforilatu eta inaktibatu dezake zelularen energia maila baxua denean. GAen sintesia eta oxidazioa batera gerta ez daitezten, gainera, ACC entzimaren produktuak, malonil-CoA, FAen mitokondriarako garraioa inhibitzen du CPT1 entzima inhibituz (Brownsey et al., 2006).

PPAR α

Gibelesko lipidoen metabolismoaren beste erregulazaitzaile garrantzitsuak PPARak dira. PPAR α ligando bidez aktibatzen den transkripzio faktore bat da, eta PPAR γ -rekin eta PPAR β/δ -rekin batera NR1C (*nuclear receptors 1C*) hartzaile nuklearren subfamilia osatzen du. PPAR α FAen oxidazio jarduera altua duten ehunetan (gibelean, bihotzean, muskulu eskeletikoan, gantz arrear eta giltzurrunean) ugaria da. Zelulako egoera energetikoaren sentzore bezala jokatzeko du eta lipidoen metabolismoko prozesu gehien erregulazioan hartzen du parte. Hala nola, FAen oxidazioan, zetogenesisian, FAen aktibazioan, LDen

eraketan eta plasmako lipoproteinen metabolismoan (Pawlak et al., 2015). PPAR α lipido endogeno eta exogeno ezberdin askok aktibatu dezakete. Horien artean, dietaren bidez hartutako FAK, eikosanoideak, endokanabinoideak eta (liso)PLak. Lipido horien kontzentrazioaren aldaketek PPAR α -ren menpeko geneen erregulazioan eragiten dute (Kersten and Stienstra, 2017). FAen garraioan eta oxidazioan parte hartzen duten FATP1 (*fatty acid transfer protein 1*), FAT/CD36 (*fatty acid transporter/cluster of differentiation36*), ACOX1 (*acyl-coenzyme A oxidase 1*) eta EHHADH (*enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase*) PPAR α -ren itu dira (Kersten and Stienstra, 2017). Barautan, FAen oxidazio maila igotzen denean, azetil-CoA gorputz zetonikoen sintesirako erabilia izaten da eta PPAR α -k prozesu horretan pausu limitantea katalizatzen duen HMGCS mitokondriala erregulatzen du. Lipoproteinen arloan PPAR α -k LPLren adierazpena indutzten du horren promotorean lotuz. PPAR α -ren agonistek SREBP1c-ren itu geneen adierazpena areagotzen dute PPAR α SREBP1c-ren promotorean lotu araziz (Pawlak et al., 2015).

B. HELBURUAK

SND1 organismo eukariotikoetan oso kontserbatuta dagoen proteina bat da. Proteina (Tong et al., 1995; Yang et al., 2002; Yang et al., 2007; Blanco et al., 2011; Su et al., 2015) eta RNA (Paukku et al., 2008; Lei et al., 2011; Gao et al., 2015) ezberdinei lotzeko duen gaitasunarengatik proteina multifuntzional bezala kontsideratua izan da eta zelula edo ehun motaren arabera, baita egoera fisiologikoaren edo patologikoaren arabera, funtzio ezberdinak bete ditzakeela pentsa daiteke.

SND1en funtzio fisiologiko zehatza oraindik ez da ezagutzen. Hala ere, lan gehienek transkripzio genikoaren erregulazioarekin (Tong et al., 1995; Solan et al., 2002; Yang et al., 2002; Paukku et al., 2003; Valineva et al., 2005) eta RNAREN metabolismoarekin (Caudy et al., 2003; Paukku et al., 2008; Gao et al., 2010; Weissbach and Scadden, 2012) erlazionatzen dute.

Lan gutxi dira SND1 lipidoen metabolismoarekin erlazionatzen dutenak. Gure taldeko SND1 proteinaren lehenengo azterketa funtzionalek hepatozito kieszenteetan PLEN jariapenaren alterazioekin erlazionatu zuten (Palacios et al., 2006). SND1ek lipidoen metabolismoan izan lezakeen funtzio posiblearekin bat eginez, hepatozitoetan SND1 ERAN aurkitzen da eta estimulu esteatotikoen aurrean LDETARA translokatu daiteke (Garcia-Arcos et al., 2010). Lan berriagoetan beste zenbait taldek ere SND1ek lipidoen metabolismoan funtzioaren bat izan dezakeela iradoki dute. Adipogenesirako beharrezkoa dela proposatua izan da, eta adipozitoen ezberdintzapenean parte hartuko luke (Duan et al., 2014). SND1ek MGLrekin elkarrekin dezakeela deskribatua izan da, zelulek energia iturri gisa erabil ditzaketan FAen eskuragarritasuna aldatuz (Rajasekaran et al., 2016).

SND1ek izan dezakeen garrantzi fisiopatologikoari buruzko gero eta ebidentzia gehiago ari da argitaratzen. Bere adierazpenaren jaitsierak hazkuntza zelularren gelditzearekin eta baita heriotzarekin erlazionatu dira (Hossain et al., 2008; Tong et al., 1995), eta adierazpenaren igoerak egoera patologiko ezberdinekin, beti ere SND1en adierazpen mailaren eta zelulen bikoizketa potentzialaren arteko loturak erakutsiz.

Kartzinogenesisian, apoptosiaren mekanismoaren alterazioen, onkogeneen adierazpenaren desregulazioaren eta angiogenesiaren estimulazioaz gain, minbizi zelulek beren metabolismoa berprogramatzen dute gehiegizko hazkuntzak eskatzen duen metabolito eta energia beharra asetzeko. Lan askok iradokitzen dute metabolismoaren alterazioek zelulen gehiegizko hazkuntzan, migrazioan eta metastasi prozesuan, besteak beste, izan dezaketen garrantzia. Kolesterolaren metabolismoaren homeostasiaren desregulazioa, zehazkiago, proliferazio zelularrekin estuki erlazionatuta dago (Clendening et al., 2010; Dang, 2012). Kolesterolak minbiziaren garapenean duen garrantzia zelulan betetzen dituen funtzio ezberdinen ondorio da. Alde batetik, mintz plasmaticoan seinalizazio bide ezberdinetan parte

hartzen duten proteinen kokapenerako ezinbestekoa da, horietako asko lipido baltsetan kokatzen direlako eta mintzeko domeinu horiek kolesteroletan aberatsak direlako. Gainera, kolesterolaren sintesi bideko zenbait bitartekarik proteinen modifikazio postranskripzionalerako erabiltzen dira (farnesilazioa, geranilgeranilazioa) eta kolesterolen eratorri oxigenatuek (oxisterolek) hartzaile nuklearren ligando bezala joka dezakete (Hh seinalizazioa adb) homeostasi metabolikoan eta zelulen diferentziazioan parte hartuz (Olkkonen et al., 2012). Beraz, kolesterolaren edukiak ez ezik, bere kokapen zelularrak ere minbiziaren garapenean funtzio zentrala bete dezake.

Aurrekari guzti horiek kontuan hartuta, proposatu genuen SND1en gainadierazpenarekin lotutako zelulen proliferazio ezaugarrien alterazioak proteina horrek lipidoen metabolismoan betetzen duen funtzioarekin lotuta egon zitezkeela.

Testuinguru horretan, tesi honetan planteatu genituen helburu konkretuak hauek izan ziren:

- SND1ek lipidoen metabolismoan betetzen duen funtzioa argitzea.
- SND1ek lipidoen metabolismoan eragindako aldaketek zelulen proliferazio ezaugarrietan (hazkuntza, adhesioa, migrazioa..) eraginik duten argitzea.

C. MATERIALAK ETA METODOAK

1. Materialak

1.1. Erreaktiboak eta material akzesorioa

2-hidroxiopropil- β -ziklodestrina (hpCD), antibiotiko-nahastea (10.000 U/ml penizilina, 10 mg/ml estreptomizina), atorbastatina, azido etilendiaminotetrazetikoa (EDTA), azido etilenglikol-bis(β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetrazetikoa (EGTA), bromofenol urdina (sodio gatza), dietilpirokarbonatoa (DEPC), dimetilsulfoxidoa (DMSO), Eagle medio esentzial minimoa (EMEM), *Distyrene Plasticizer Xylene* (DPX) muntaia medioa, fibronektina, Igepal CA-630, kolagenoa (arkume-larruzaletikoa, I motakoa), kolesterola, glizina, kultura-plakak (Greiner Cellstar Dish, \varnothing 94 mm), L-glutamina, manitola, metil- β -ziklodestrina (mCD), Sandoz-58035 konposatua, sodio azida (NaN_3), sodio bikarbonatoa (NaHCO_3), sodio dodezilsulfatoa (SDS), tripan urdina, tripsina, Triton X-100, urea eta xilenzianola **Sigma-Aldrich** (AEB) etxeari erosi zitzaizkion. FuGENE HD transfekzio erreaktibo **Promega** (AEB) etxekoa izan zen.

Azido oleikoa, disodio monohidrogeno fosfatoa (Na_2HPO_4), glizerola, glukosa, kaltzio kloruroa (CaCl_2), kobre II sulfatoa (CuSO_4), kristal bioleta, magnesio kloruroa (MgCl_2), magnesio sulfatoa (MgSO_4), potasio dihidrogeno fosfatoa (KH_2PO_4), potasio kloruroa (KCl), sodio dihidrogeno fosfatoa ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sodio kloruroa (NaCl), tris(hidroximetil)-aminometanoa (Tris) eta Tween 20 **Merck** (Alemania) etxeari erosi zitzaizkion.

1,4-ditiotreitola (DTT), behi-seroalbuminaren (BSA) V frakzioa (gantz-azidoduna eta gantz-azidorik gabekoa) eta proteasa-inhibitzaileen nahastea ("Complete EDTA-Free") **Roche** (Suitza) etxeari erosi zitzaizkion. Proteasa- eta fosfatasa-inhibitzaileen nahastea ("Protease and phosphatase inhibitors mini tablets") **Pierce** (AEB) etxeari erosi zitzaion.

Atorbastatina eta saponina **Fluka** (Suitza) etxeari erosi zitzaizkion. Abasimibe **Selleckchem** (AEB) etxeari erosi zitzaion. Bitronektina **StemCell Technologies** (Kanada) etxekoa izan zen.

2-propanola, azetona, azido fosforikoa (H_3PO_4), azido klorhidrikoa (HCl), dietil eterra, etanola, diisopropil eterra, etilazetatoa, isopropanola, izarniadura-likidorea ("Cocktail Biogreen 3"), kloroformoa, metanola, n-heptanoa eta toluenoa **Scharlau Chemie** (Espainia) etxeari erosi zitzaizkion. qRT-PCR-rako plaka eta estalikiak **Applied Biosystems** (AEB) etxekoak izan ziren.

Amonio persulfatoa (APS), argazki-filmak (Hyperfilm ECL) eta luminol erreaktibo (*Enhanced chemiluminescence*, ECL) **GE Healthcare** (Erresuma Batua) etxeari erosi zitzaizkion.

4-kloro-7-nitrobenzofurazan (NBD)-kolesterola, blastizidina, desoxinukleotido trifosfatoen (dNTP) nahastea, Hoechst tindagaia, oligo-desoxitimidina, pcDNA6 plasmidoa, RNAiMAX lipofektamina eta TRIzol **Invitrogen Life Technologies** (AEB) etxeokak izan ziren. siRNAk **Ambion** (AEB) etxeari erosi zitzaizkion.

Akrilamida/bisakrilamida (37,5:1 disoluzioa), Clarity Western ECL sustratua, kromatografiarako “Econo-Pac 10 DG” zutabeak eta N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) **Bio-Rad** (AEB) etxeari erosi zitzaizkion. Erabilitako pisu molekularren markatzaileak (“PageRuler Prestained Protein Ladder Plus”) **Fermentas Life Sciences** (Kanada) etxeari erosi zitzaizkion.

15 ml-ko hodi esterilak eta 96 putzuko plakak **Sarstedt** (Alemania) etxeari erosi zitzaizkion. 35 mm-ko kultura-plakak eta 50 ml-ko hodi esterilak (Primaria Easy Grip, 35 x 10 mm) **Falcon, BD Bioscience** (AEB) etxeari erosi zitzaizkion.

Geruza fineko kromatografiarako lipido-patroiak (fosfatidilkolina, PC; fosfatidilserina, PS; fosfatidilinositol, PI; fosfatidiletanolamina, PE; kardiolipina, Cln; kolesterol askea, triglizeridoa eta kolesterol-esterra) **Avanti Polar Lipids** (AEB) etxeokak ziren. Argazkigintzako likidoak (G150 errebelatzailea eta G354 finkatzailea) **AGFA** (Belgika) etxeokak izan ziren eta agarosa **Pronidasa, Laboratorios CONDA** (Espainia) etxeokak. 6 eta 24 putzuko kultura-plakak eta 75 cm²-ko kultura-flaskoak **Corning** (AEB) etxeokak izan ziren. Konposatu erradioaktiboak eta izarniadura kontagailurako bialak **Perkin Elmer** (AEB) etxeokak izan ziren.

Karbono dioxidoa, nitrogenoa eta oxigenoa **Air Liquide** (Frantzia) etxeari erosi zitzaizkion eta pentotal sodikoa **Abbott Laboratories** (AEB) etxeari. Azido azetikoa, formaldehidoa, potasio bromuroa (KBr), potasio hidroxidoa (KOH) eta sakarosa **Panreac** (Espainia) etxeokak izan ziren; behi-serum fetala **ATCC** (AEB) etxeokak.

0,22 μm-ko porodun iragazkiak (Durapore), polibinilideno fluorurozko (PVDF) mintzak (Immobilon P) eta 10 kDa-eko ultrairagazketarako hodiak **Millipore** (AEB) etxeari erosi zitzaizkion. Kromatografia-papera (3MM CHR) **Whatman** (Erresuma Batua) etxeokak izan zen. Eosina Y alkoholikoa, hematoxilina 7211, immunozitokimikarako estalkiak eta portak eta proteina-kontzentrazioa neurtzeko errektiboak (“BCA protein assay”) **Thermo Scientific** (AEB) etxeokak izan ziren. Ultrazentrifugaziorako polikarbonatozko hodiak **Kontron** (Alemania) eta **Beckman** (AEB) etxeetakoak izan ziren. Mikroskopia-laginenzako Glycergel muntaia medioa **Dako** (AEB) etxeokak izan zen. G25 silize-geldun plakak (20x20 cm) **Macherey-Nagel** (Alemania) etxeari erosi zitzaizkion. Mikroskopiarako (60 μ-Dish) palaka bereziak eta silikonazko intsertoak **Ibidi** (Alemania) etxeokak izan ziren.

1.2 Entzimak eta *kit*-ak

RNA-ren erretrotranskripzioarako “SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” *kit*-a eta “DNase I, Amplification Grade” *kit*-a **Invitrogen Life Technologies** (AEB) etxekoak izan ziren. qRT-PCR-rako “SYBR Green PCR Master Mix” erreaktiboa **Applied Biosystems** (AEB) etxekoa izan zen.

Serumeko kolesterol totalaren, triglizeridoen (TG), eta glukosaren kontzentrazioak neurtzeko *kit*-ak **Menarini** (Italia) etxe komertzialekoak izan ziren. Fosfolipidoena (PL) **Spinreact** etxekoa izan zen

Bgl II eta Mlu I murrizte-entzimak eta horiei zegozkien tanpoiak (M eta H tanpoia, hurrenez hurren), eta zelulen proliferazio tasaren (BrdU inkorporazioaren) neurketarako eta MTT *kit*-ak **Roche** (Suitza) etxekoak izan ziren.

Azetil-CoA zitosolikoa neurtzeko *kit*-a **BioVision** (AEB) etxekoa izan zen eta zitratoaren neurketarako *kit*-a **Sigma** (AEB) etxeari erosi zitzaion.

C1 Taula. Western blotting eta immunozitokimika prozeduretan erabilitako antigorputzak.

<i>Primarioak</i>			
Itua	Immunoglobulina mota	Etxea	Diluzioa
ACC	Untxi-IgG	Cell Signalling	1/1000
E-kadherina	Untxi-IgG	Santa Cruz Biotech	1/1000
GAPDH	Sagu-IgG	AbCam	1/20000
H3 histona	Untxi-IgG	Cell Signalling	1/1000
Kalregulina	Ahuntz-IgG	AbCam	1/1000
SND1 (1)	Untxi-IgG	Biosource Int.	1/3333
SND1 (2)	Untxi-IgG	Biosource Int.	1/3333
P-ACC	Untxi-IgG	Cell signalling	1/1000
SREBP2	Ahuntz-IgG	Santa Cruz Biotech.	1/1000 (WB) 1/50 (IZK)
<i>Sekundarioak</i>			
Itua	Konjokapena	Etxea	Diluzioa
Ahuntz-IgG	HRP	Santa Cruz Biotech.	1/7000
Sagu-IgG	HRP		1/2000
Untxi-IgG	HRP	Sigma	1/2000
Untxi-IgG	Alexa Fluor X	Life Technologies	1/200

WB, *Western blotting*; IZK, immunozitokimika; HRP, *horseradish peroxidase*, errefau minaren peroxidasa.

1.3. Immunoglobulinak

Western blotting (WB) eta prozedura immunoizotimikoetan erabilitako antigorputz guztiak **C1 Taulan** daude jasota. Gehienak komertzialak dira, SND1-en aurkakoak ezik. Untxi-immunoglobulina poliklonal horien ekoizpena **BioSource International** (AEB) enpresari agindu zitzaion, eta SND1-en sekuentzian oinarrituta sintetizatutako 2 peptido erabili zituzten immunogeno bezala²⁰. WBetan SND1 (1) antigorputza eta immunoizotimikan SND1 (2) antigorputza erabili dira, **C1 Taulan** jasotako kontzentrazioak jarritz.

Antigorputz sekundarioei dagokienez, WBerako peroxidasarekin konjokatutakoak eta immunoizotimikarako fluoroforoekin konjokatutakoak erabili ziren.

1.4. Oligonukleotidoak

RT-qPCR-etan hasle gisa erabilitako oligonukleotidoak **Invitrogen Life Technologies** (EAB) etxeak sintetizatuak izan ziren. Guztien sekuentziak **C2 Taulan** azaltzen dira.

1.5. Medioak

-Kultura media. 1,675 mM L-glutamina, %9 (b/b) behi serum fetala, 85 U/ml penizilina, 85 µg/ml estreptomizina eta 2 µg/ml blastizidina EMEM medioan.

-Transfekzio media. Serum gabeko kultura media.

1.6. Tanpoiak eta bestelako disoluzioak

-3 garapeneko TLC-rako disolbatzaile nahasteak. (1) kloroformo:metanol:H₂O (60:40:10); (2) n-heptano:diisopropil eter:azido azetiko (70:30:2) eta (3) n-heptano(100).

-6 garapeneko TLC-rako disolbatzaile nahasteak. (1) kloroformo:metanol:H₂O (60:40:10), (2) kloroformo:metanol:H₂O (65:40:5), (3) metanol:kloroformo:etanol:etil azetato:isopropanol:KCl %0,9 (15:22:20:35:5:9), (4) tolueno:eter dietiliko:etanol (60:40:3), (5) n-heptano: eter dietiliko (94:8) eta (6) n-heptano (100).

C2 Taula. RT-qPCR-etan hasle gisa erabilitako oligonukleotidoak.

Genea	Accession number	Primerrak	
Aadac	NM_020538	f: tgctggtggaaacttaactgcag	r: gcttgacccttgagttgatcttg
Abca1	NM_178095	f: tttcccacattttgctg	r: ccaagagagtgagagacgaagc
Abcg5	NM_053754	f: ccctggaggaaggctcagttac	r: ggttgctgacgctgaaggac
Acaca	NM_133360	f: tggcagaggtaccgaagtg	r: gtcgtagtgccgttctgaaag
Acly	NM_001111095	f: gcttacggacagagaccacac	r: ctctgaaattgacctgctgac
Agpat9	NM_001025670	f: gtagagctcctctccacctg	r: ctccaaggtttccaccagga
Ces1e	NM_031565	f: tgggtttcttgagcattcac	r: tcccaggactttgcttg
Cyp27a1	NM_178847	f: tggagcagtggaaggagcac	r: tgattcaaactatgacgcagatgg
Cyp7a1	NM_012942	f: cttggcggctgagagtcac	r: tcttcccactaatccagtcgctag
Cyp8b1	NM_031241	f: tgcacgtagccagtagcaag	r: ggtcctagcatcaccaagga
Dgat1	NM_053437	f: ttctaccgggatgtcaatc	r: tacagtgcttgggcagcag
Dgat2	NM_001012345	f: gctgctgatagctgctctact	r: tgtgatctctgcccactttct
Fasn	NM_017332	f: gtggacatggtcacagacgatg	r: gtggacccccaaaaggagg
Gapdh	NM_017008	f: gtgccagcctcgtctgatagac	r: aaggcagccttgtaaccag
Gpam	NM_017274	f: actgggtgactgtggcttc	r: cgtgcatgaatgaacacc
Hmgcr	NM_013134	f: ggcagcaggacatctgtcag	r: ctgcctcttggtgcatgttc
Hmgcs1	NM_017268.1	f: ctgtccttcacacagctcttc	r: aagggaacagattcccaca
Ldlr	NM_175762	f: tggaccgcagcagatatacc	r: cacggcgctgtagatcttctc
Npc1	NM_153624	f: gcgaagactcaagaccaac	r: tgccttacattgcgtagctg
Npc2	NM_173118	f: tacttggtgaggtgcttg	r: atttatggggaggctccatc
Nr0b2	NM_057133	f: ctggtaccagtagccaag	r: tcaacatctccgatgacagg
Osbp	NM_001108927	f: caccgttctcctattcca	r: taccattctcctccagctg
Osbpl1a	NM_172023	f: atgtggtcttttgccaagg	r: ctgtacaagcactcggtcca
Scd1	NM_139192	f: gccttaatcatccaagaacctc	r: ttcagcgtgtcctcctgagc
Snd1	AY697864	f: agtcccctgcccaggatgca	r: gaggctgaaggcaggtgtag
Soat1	NM_031118	f: acatgttcattgccctcctc	r: ggaaattggccaaaagcata
Soat2	NM_153728	f: cagcctatactgccaggagtggta	r: tgtcagtggtgaagcctgact
Sreb1	XM_213329	f: cccagccttgaggataacca	r: tgggttgaggtcagacaca
Sreb2	NM_001033694	f: cgcagacaggatcatcca	r: tcacgagccttgactctga
Sqle	NM_017136.2	f: ggaggcctgtcagaatgctc	r: aggacgcctcgtttgtcac

-DEPC-ura. %0,1 (b/b) DEPCrekin tratatutako ur esterila.

-Desnaturalizazio-tanpoia (3x) SDS-PAGE elektroforesirako. 60 mM Tris-HCl (pH 6,8); %17 (b/b) glizerol; %2 (p/b) SDS; 14,4 mM DTT, %0,1 (p/b) bromofenol urdin.

- E tanpoia.** 40 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 2 mM Mg(CH₃COO)₂, % 0,4 Nonidet, 1:50 proteasa inhibitzaileen nahaste.
- Erauzketa nahastea.** (A) Kloroformo:metanol, 2:1 (b/b). (B) Kloroformo:metanol:HCl, 1:2:0,0075 (b/b/b).
- FPLC-aren fase mugikorra.** 50 mM fosfato tanpoi (pH 7,4), 150 mM NaCl.
- H tanpoia.** 10 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 250 mM sakarosa, 5 mM DTT, 0,1 mM leupeptina, 1:50 proteasa inhibitzaileen nahaste.
- Homogeneizazio-tanpoia.** 10 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM KCl, 250 mM sakarosa, 5mM DTT, 1:50 proteasa- eta fosfatasa-inhibitzaileen nahaste.
- Karga-tanpoia (6X) azido nukleikoen elektroforesirako.** %40 sakarosa, %0,25 (p/b) bromofenol urdin, %0,25 (p/b) xilenzianol.
- KMHS tanpoia.** 220 mM manitol, 70 mM sakarosa, 5 mM HEPES, 1 mM DTT (pH 7)
- Kobre sulfatozko disoluzioa.** CuSO₄ %10 (p/b), H₃PO₄ %8 (b/b).
- Lisi-tanpoia.** 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, %1 (b/b) Igepal CA-630, 0,5 mM DTT, eta 1:50 proteasa-inhibitzaileen nahaste.
- M tanpoia.** 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), %15 SDS, 8 M urea, %10 glizerol, 100 mM DTT.
- N tanpoia.** 20 mM HEPES-KOH (pH 7,6), %25 glizerol, 0,42 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1:50 proteasa inhibitzaileen nahaste.
- PBS.** 10 mM fosfato-tanpoi (pH 7,4), 150 mM NaCl.
- Proteinen elektroforesirako tanpoia.** 25 mM Tris, 192 mM glizina, %0,1 (p/b) SDS.
- Serum fisiologikoa.** %0,9 (p/b) NaCl.
- TAE.** 40 mM Tris-azetato (pH 8), 10 mM EDTA.
- TBST.** 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, %0,05 (b/b) Tween 20.
- Transferentzia tanpoiak.** A: elektroforesi-tanpoi:H₂O (1:1). B: %20 (b/b) metanol A transferentzia tanpoitan.
- Tripsina-disoluzioa.** 1340 U/ml tripsina, 1 mM EDTA PBS-tan.

1.7. Ekipamendua

Alderantzizko mikroskopia optikoa	Nikon TMS-F.
Bainu tesmostatizatuak irabiagailuarekin	P Selecta Unitronic 320 OR.
Balantzak	Mettler PJ400 eta Mettler AT261 Delta Range.
Berogailua	P Selecta Theroven (200 °C).
CO ₂ -inkubadoreak	Jouan EG 120 eta Thermo Scientific HeraCell 150.
Dentsitometroak	Bio-Rad GS-800 eta Bio-Rad Molecular Imager FX.
Elektroforesi bertikala	Bio-Rad Mini Protean III elektroforesi bertikalerako ekipoa.
Elektroforesi horizontala	Bio-Rad Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System.
Elektroforesientzako energia-iturria	Bio-Rad Power 1000.
Elektrotransferentziarako kamerak	Bio-Rad Trans-Blot SD eta MiniProtean TransBlot
Espektrofotometroak	Perkin-Elmer 550 SE, NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Spectronic 20 Genesys eta Biotek Synergy™ HT plaka irakurgailua.
Esterilizazioa	UPV/EHU-ko Zelulen Biologia eta Histologia Saileko esterilizazio-zerbitzuko ekipamendua.
Fluxu laminarreko kabinak	Thermo Scientific MSC-Advantage, TELSTAR AV-30/70.
Hodi-irabiagailuak	Velp Scientifica 2x ³ , eta Heidolf
Homogeneizadoreak	Kinematica Polytron PT 1200 C eta B. Braun Biotech International Potter S.
Huts-ponpa (kultura-gelan)	Integra Biosciences Vacusafe Comfort.
Immunohistokimikarako aparatuak	Shandon Citader 1000, Thermo Scientific . Shandon Histocentre 2 Thermo Scientific .
Izarniadura-kontagailua	Packard 2500 TR. LKB Wallac 1214 Rackbeta
Kaiola haizeztatuak	Seal Safe Tecniplast

Kamera hemozitometrikoa	Neubauer , 0,100 mm-ko sakontasuna, 0,0025 mm ² -ko azalera.
Kontzentradore-lurrungailua	Savant A-290. Thermo Scientific Savant SC250 EXP
Kromatografoa	GE Healthcare Acta-FPLC Frac-950 kolektorearekin
Mikroskopia konfokala	UPV/EHU-ko Mikroskopia Analitikoa eta Bereizmen Handikoa Biomedikuntzan zerbitzuko Olympus FV 500 ekipoa eta Zeiss Apotome.2.
Mikroskopia optikoa	Olympus CH.
Mikroskopia dun inkubadorea	Nikon Biostation IMO
Mikrotomoa	Thermo Scientific Shandon Finesse 325.
Mikrozentrifugak	Heraeus Biofuge primoR, Heraeus Biofuge fresco eta Costar model 10.
Noria	SBS AN-2
pHmetroa	Crison 2001.
qRT-PCR-rako ekipoa	Applied Biosystems AbiPrism 7000 Sequence Detection System. System Fluidigm Biomark HD (EHU-ko SGiker-ekoa).
Termozikladorea	Biometra T-Gradient Thermoblock
Tindaketa histologikoak egiteko ekipoa	Thermo Shandon Varistain 24-4
Ultrasoinuen sorgailua	Bandelin Sonoplus HD3200 BB6 zundarekin
Ultraizozgailuak	Sanyo MDF U7 4V eta Thermo Forma 994
Ultrazentrifuga	Beckman Coulter Optima™ L-100 XP
Ultrazentrifuga-errotoreak	Beckman Coulter TLA-110, Sorvall SM-24
Zentrifugak	Sorvall RC6 Plus, Sorvall RT7, Biofuge primoR Heraeus .

2. Metodoak

2.1. Lerro zelularrak eta tratamenduak

Transfektante egonkorak arratoiaren McA-RH7777 (ATCC) hepatoma-lerroa erabiliz eraiki ziren. Arratoiaren SND1-en cDNA-ren sekuentzia identifikatu zen eta hori adierazpen eukariotikorako pcDNA6 plasmidoan (Invitrogen) klonatu (Palacios et al., 2006), plasmido horrek zelula eukariotikoak hiltzen dituen blastizidina antibiotikoaren aurkako erresistentzia-genea dauka. Kontrol gisa erabiltzeko, LacZ gene bakterianoaren cDNA ere klonatu zen pcDNA6 plasmidoan paraleloki. Bi plasmidoak murrizte-entzimen bidez linealizatu ziren, beren sekuentzian behin soilik agertzen ziren eta interesezko sekuentzietatik kanpo zeuden errestrikzio-guneak identifikatu ondoren; pcDNA6-LacZ mozteko Bgl II erabili zen eta pcDNA6-SND1 mozteko Mlu I, etxeak (Roche-k) gomendatutako tanpoiak eta baldintzak aplikatu.

Digestio produktuekin McA-RH7777 zelulak transfektatu ziren, FuGene HD transfekzio erreaktiboa erabiliz (2 μ l FuGene HD/plasmido μ g proportzioan). Plasmidoa genomatik inkorporatutako zelulak bakarrik aukeratzeko transfektatutako zelulak (poliklonalak) 6 μ g/ml blastizidinadun mediotan mantendu ziren. Ondoren hautaketa klonala egin zen, azken puntuko diluzioaren bidez 6 μ g/ml blastizidinaren presentzian. Kontrol-zelulak eraikitzekeo prozesu bera LacZ gene bakterianoa txertatua zeraman pcDNA6 plasmidoarekin errepikatu zen. Lortutako klonen artean, kontrol bat eta SND1 gainadierazten duten bi aukeratu ziren eta McA-L, McA-S1 eta McA-S2 izendatu ziren, hurrenez hurren.

Lerro monoklonalak %0,1 (p/b) gelatinarekin tratatutako flaskoetan mantendu ziren subkonfluentziara heldu arte kultura medioan. Kontrakorik adierazi ezean, esperimentuak zelulak gelatinaz estalitako plakatan erein (13.000 zelula/cm²) eta 72 h-ra egin ziren. Esperimentu ezberdinetan zenbait tratamenduren eragina aztertu nahi zenean, uzta egin baino 4 h lehenago kultibo mediora gehitu ziren. Gehitutakoak eta kontzentrazio finalak hurrengoak izan ziren: 0,1 μ M atorbastatina edo dagokion kontrola (%0,6 DMSO), 10 μ M Sandoz-58035 konposatua edo dagokion kontrola (%0,03 DMSO), 1 mM mebalonato eta LDL (0,1 mg kolesterolo/ml). Esteatosiaren garapenerako tratamendua 2, 4 edo 8 h-koa izan zen esperimentuaren arabera eta kultura medioan BSArekin akonplejatutako 400 μ M azido oleiko edo kontrol bezala BSA gehitu ziren.

2.1.1. siRNA bidezko SND1en azpiadierazpena

Knockdown esperimentuetan aurredeinatutako anti-SND1 edo kontrol negatiboko siRNAk erabili ziren. Lipido eta WB analisisetarako, 60 nM siRNA eta 10 μ l/ml RNAiMAX lipofektaminadun 3 ml OptiMem medio

100 mm-ko plakatan gehitu ziren eta 20 minutuko inkubazio baten ondoren, giro tenperaturan 10^6 McA-L zelula erein ziren blastizidina gabeko 5 ml kultura mediotan. RNA analisisetarako 6 putzuko plakak erabili ziren eta bolumenak eta zelula kantitatea azalerakiko berkalkulatu ziren.

2.1.2. Permeabilizazio saioak saponinarekin

Zelulak %0,1 (p/b) gelatinarekin estalitako 96 putzuko plaketan erein ziren eta 24 h ondoren kultura mediotan disolbatutako 2 mM mCD edo medioa gehitu zitzairen. 15 min-ko inkubazio baten ondoren medioa PBSz ordezkatu eta 0-80 mg/ml saponina eta %0,4 (p/b) tripan urdin gehitu zitzairen. 5 min ondoren likidoa kendu eta zelulak ur distilatuarekin lisatu ziren. Azkenik 607 nm-ko absorbantzia neurtu zen, zeluletan barneratutako tripan urdinaren adierazle dena.

2.1.3. Zelula-taldeen analisisa eta itsaskortasun saioak

Lerro zelularren zelula-zelula loturaren neurketa ez-zuzena egiteko helburuarekin zelula-taldeen analisisa egin zen lerroen errutinazko mantenuan. %0,1 (p/b) gelatinarekin aurre-tratatutako 75 cm²-ko kultura-flaskoetan 10^6 zelula erein eta 72 h beranduago kultura medioa kendu, 2 aldiz garbitzen ziren zelulak eta 2 ml tripsina-disoluziotan inkubatzen ziren zelulak 2 min-z 37 °C-tan. Ondoren zelulak altxatu, 7 ml kultura-medio gehitu eta zentrifugatu egiten ziren (300 xg, 5 min, giro-tenperatura). Zelula-jalkina bolumen berean berreskitzen zen beti eta alikuota bat tripan urdinarekin nahasten zen 1:1 proportzioan, azkenik kamara hemozimetrikoa erabiliz mikroskopia optikoan behatzen ziren suspentsio zelularrak. Behaketa horretan zelula-talde kopurua eta talde bakoitzeko zelula kopurua zenbatu ziren. Kasu batzuetan, kaltzioaren menpeko itsaspen-proteinen efektua ahultzeko, zelulak 2 ml %0,05 EGTA (kultura-mediotan, pH 9) disoluzioarekin tratatu ziren 5 min-z giro tenperaturan tripsina aplikatu baino lehen, eta ondorengo prozedurak adierazi den bezala jarraitu zuen.

Lerro zelularren matrizeari itsasteko abiadura neurtzeko itsaskortasun saioak egin ziren. Horretarako, 96 putzuko plakak %0,1 (p/b) gelatinarekin estali ziren gau osoan zehar eta ondoren putzuetako batzuk bitronektinarekin estali ziren StemCell Technologies etxearen argibideak jarraituz; modu horretan bi matrize-eredu lortzen ziren, gelatina eta gelatina+bitronektina. Ondoren 30.000 zelula erein ziren putzuko; kasu batzuetan zelulak altxatu baino lehen EGTArekin tratatu ziren, aurreko paragrafoan deskribatzen den bezala. 15, 30 edo 45 min-z utzi ziren zelulak itsasten, itsatsi gabeko zelulak kendu, PBS garbiketa bat egin eta itsatsitako zelulak finkatu egin ziren (100 µl %3,7 formaldehido PBStan, 15 min, giro-tenperatura). Finkapen-medioa kendu, 2 PBS garbiketa egin eta zelula kopurua kuantifikatzeko DNARI lotzen zaion kristal bioletarekin

tindatu ziren zelulak (75 μ l %0,25 kristal bioleta, 20 min, giro-tenperatura, argitik babestuta). Plakak 4 aldiz murgildu ziren uretan gehiegizko kristal bioleta kentzeko, lehortzen utzi eta kristal bioleta disolbatu egin zen (150 μ l %33 azido azetiko, 1 h, giro-tenperatura, agitazioan). Kristal bioletaren 590 nm-ko absorbantzia BioTek Synergy HT plaka-irakurgailuan neurtu zen.

2.2. Animaliak eta xenotumoreen garapena

Lan honetan erabilitako animaliak 20-30 g-ko Athymic Nude Foxn1nu sagu eme immunogutxiuak (Harlan) izan ziren. Saguak kondizio esteriletan mantendu ziren EHU-ko SGiker-eko Animaliategian kaiola haizeztatuetan (Seal Safe, Tecniplast) 12 orduko argi-zikloarekin; Harlan etxeko dieta estandarra (Global Diet, 2018S) eta iragazitako ura izan zuten beti eskuragarri. Saguen manei guztiak fluxu laminarreko kabina batean egin ziren beti argi-zikloko lehen orduan. Prozedura guztiek EHU-ko Animalien Ongizaterako Etika Batzordearen eta Bizkaiko Foru Aldundiaren aurretiko onarpena izan zuten.

Animaliak pisatu eta identifikatu ondoren, 2 taldetan banatu ziren, talde bakoitzari McA-L edo McA-S hepatoma zelulak txertatzeko. Animalien sorbaldan, aldakaren gainetik eta alboetarantz, $0,5 \cdot 10^6$ zelula 0,1 ml EMEM mediotan txertatu ziren azalaren azpian. Esperimentu osoan zehar saguak gutxienez 2 egunetan behin pisatu egiten ziren eta garatutako tumoreen hazkuntza kalibre bat erabiliz neurtzen zen. Esperimentua amaitzeko, animaliak pentobarbital dosi hilkor bat (120 mg/kg serum fisiologikotan) intraperitonealki txertatuz sakrifikatu ziren. Ondoren saguen nekropsia burutu zen eta intereseko laginak jaso zitzaizkien. Gibelak eta tumoreak serum fisiologikotan garbitu ondoren, pisatu egin ziren eta zatikatu ondoren, alikuota batzuk nitrogeno likidotan murgildu ziren, -80 °C-tan biltegitatuta gordetzeko, eta beste batzuk formaldehidotan ehuna finkatzeko (2.2.3. atala). Beheko kaba zainetik ateratako odoletik seruma isolatu zen (2.2.2. atala).

2.2.1. Tratamenduak *in vivo*

Atorvastatinaren eta abasimiberen eraginak aztertzeko 2 diseinu esperimental ezberdin erabili ziren. Lehenengoaren kasuan, zelulen txertatzea egin zen eguna izan zen tratamenduaren hasiera zehaztu zuen eguna: atorvastatina (50 mg/kg) edo disolbatzailea (5 ml/kg PBS) 2 egunetan behin intraperitonealki injektatu zitzaien 21 egunetan zehar, lehenengo dosia zelulak txertatu baino 24 h lehenago eta azkeneko dosia sakrifizioa baino 24 h lehenago emanaz. Abasimiberen tratamendua tumorearen tamaina aurrez ezarritako $0,5 \text{ cm}^2$ -ko balorera batera iristean hasi zen. Tamainua determinatzeko egunero tumoreen neurtu ziren kalibre batekin. Tumore borobilentzat neurri bakarra hartu zen eta tamaina estimatzeko karratu bezala

konsideratu ziren; luzangak ziren tumoreentzat ordea bi neurri hartu ziren (luzera eta zabalera) eta laukizuzen bezala kontsideratu ziren. Avasimibe (15 mg/kg) edo disolbatzailea (5 ml/kg PBS) 2 egunero behin txertatu zitzairen intraperitonealki ere 12 egunetan zehar; azkeneko dosia sakrifizioa baino 24 h lehenago eman zitzairen.

2.2.2. Serumen prozesamendua eta analisiak

Seruma lortzeko, xenotumoreak garatutako saguen odola 30 min-z gatzatzen utzi zen giro tenperaturan. Ondoren zentrifugatu egin zen (2000 $\times g$, 30 min, 4 °C). Gainjalkina jaso eta berriro zentrifugatu zen (10.000 $\times g$, 10 min, 4 °C) gera zitezkeen arrasto zelularrak kentzeko. Serumeko kolesterol totalaren (KT), triglizeridoaren (TG) eta glukosaren (Glu) neurketetarako eskuragarri dauden Menarini etxeko *kit* komertzialak erabili ziren, beti etxe komertzialak gomendatutako prozedura jarraituz.

Xenotumoreak garatutako saguen lipoproteina profila aztertzeko banaketa ACTA-FPLC kromatografoa erabiliz burutu zen SuperoseTM 6 10/300 GL zutabeen, fase mugikorra 0,3 ml/min fluxu abiaduran igaroaraziz. Sistema orekatu ondoren aurretik 0,22 μM -ko PVDF iragazki batekin iragazitako 200 μl serum zutabeen injektatu eta 400 μl -ko 40 frakzio jaso ziren. Frakzio horietan KT, TG eta PL neurtu ziren *kit* komertzialekin, beti etxe komertzialak gomendatutako prozedura jarraituz. Frakzio bakoitzean jasotako partikulen tamaina aurretik kalibratuta zegoen (Arisqueta et al., 2013).

2.2.3. Analisi histokimikoa

PBS-tan disolbaturiko %10 formaldehidotan jasotako tumore zatiak bertan mantendu ziren 24 h-z 4 °C-tan, eta ondoren %50 (b/b) etanoletan 48 h-z guztiz deshidratatzeko. Laginak parafinatan murgildu eta parafinazko blokeak prestatu ziren Shandon Histocentre 2 aparatuan. Mikrotomoan 4 μm -ko lodierako xaflak lortu ziren eta mikroskopia-porten gainean kokatu.

Tindatu aurretik, laginak zitrosoletan murgilduz desparafinatu ziren. Jarraian laginak behidratatu ziren etanol kontzentrazio murrizketa mailakatu bat eginez. H₂O-tan garbitu ostean hematoxilina eta eosina tindaketak egin ziren Shandon Varistain (Thermo) ekipoarekin. Ehun tindatuak etanolaren kontzentrazio emendapen mailakatu baten bidez deshidratatu ziren berriro. Bukatzeko, portak etanol:xileno (1:1) nahastean murgildu eta DPX muntaia medioa erabiliz estalkia jarri eta ertzak esmaltez zigitatu ziren.

2.3. Zitokimikako teknikak

2.3.1. Bideoak

Zauri-ixte esperimentuetarako mikroskopiarako plaka bereziak (60 μ -Dish, Ibidi) gelatinarekin aurretratatatu ziren eta silikonazko intserto esterilak jarri ziren; intserto hauek 0,22 cm²-ko bi ganbara dituzte zelulak ereiteko. Intsertoaren putzu bakoitzean 21.000 zelula erein ziren 70 μ L-tan. 12 h-z itsasten utzi eta intsertoa kendu ondoren zelula gabeko 500 μ m-ko hutsune bat lortu zen. Zelulei 2 ml kultura medio gehitu zitzairen bideoak egin aurretik. Hazkuntzaren analisirako esperimentuetan, 35 mm-ko plaketan 300.000 zelula erein ziren eta 12 h-z itsasten utzi ziren bideoak egin aurretik.

Bi esperimentu motetan tratamenduen gehiketa izan zen esperimentuaren hasiera: 0,5 μ g bitronektina/cm² edo 2 mM 2-hidroxiopropil- β -ziklodestrina. Zelulak 24 h-z mantendu ziren 37 °C-tan eta argazkiak 20 minuturo atera ziren Biostation-ean. Iruden prozesamendua ImajeJ programarekin egin zen.

2.3.2. NBD-kolesterolaren trazaketa

NBD-kolesterolaren inkorporazio esperimentuetarako zelulak mikroskopiarako egokiak diren plaketan (60 μ -Dish, Ibidi) erein ziren. Kultura mediaa hpCD-rekin akonplejatutako 5 mM kolesterolekin suplementatu zen, NBD-kolesterol fluoreszentearen 5 μ g/ml-ko traza bat barne. Kolesterol-hpCD konplexuak prestatzeko kolesterola eta hpCD 1:8 proportzio molarrean nahastu ziren eta mugimenduan mantendu ziren 12 h-z 40 °C-tan. Argazkiak EHUko SGiker-eko mikroskopio konfokalean hartu ziren kolesterola gehitu bezain laster hasita eta 2 minuturo 30 min-tan zehar.

2.3.3. Filipinarekin tindaketa

Zelulak 24 orduz kultibatu ziren gelatinarekin estalitako beirazko mikroskopia-estalki borobiletan. 16 mM hpCD edo eramailea (kultura mediaa) gehitu eta 1 min ondoren zelulak PBStan disolbatutako %3,7 formaldehidotan fixatu ziren 15 minutuz giro tenperaturan. Bi aldiz garbitu ziren PBSrekin eta 50 μ g/ml filipinarekin (PBStan) tindatu ziren 1 h-z kamera ilun heze batean giro tenperaturan. Garbitu ostean, estalkiak portetan muntatu ziren Glycergelarekin. Irudiak fluoreszentiako mikroskopio konfokalean egin ziren EHUko SGiker-eko instalazioetan.

2.3.4. Immunozitokimika

6 putzuko plaketan beirazko 4 mikroskopia-estalki borobil jarri ziren putzuko eta gelatinarekin aurretratatu 10^6 zelula erein baino lehen. 24 h ondoren PBSrekin garbitu eta PBS-tan disolbaturiko %3,7 formaldehidotan finkatu ziren 15 min-z giro tenperaturan. Jarraian zelulak permeabilizatzeko PBS-tan disolbaturiko %0,1 (b/b) Triton X-100 disoluzioan inkubatu ziren 5 min-z eta blokeo-disoluzioarekin (%10 behi-serum fetal PBStan) blokeatu ziren 15 min-z. Antigorputz primarioarekin 1,5 h-z inkubatu ziren giro tenperaturan kamera hezean. PBSrekin hainbat garbiketa egin ondoren antigorputz sekundarioarekin inkubatu ziren ordu betez kamera ilun hezean. Azkenik, PBSrekin garbitu ostean zelulak DNA markatzen duen Hoechst tindagaiarekin inkubatu ziren ($10 \mu\text{g/ml}$) 5 min-z. Antigorputzak eta Hoechst tindagaia blokeo-disoluziotan diluituta erabili ziren. Garbiketa egokia egin ostean, estalkiak portetan muntatu ziren Glycergelarekin eta ertzak esmaltez zigilatu ziren. Erabilitako antigorputzak **C1 Taulan** daude adierazita.

Irudiak Apotome.2 mikroskopioan egin ziren EHUko SGlker-eko instalazioetan eta ImageJ *software*-a erabiliz analizatu ziren. Kondizio bakoitzeko gutxienez 3 mikrografia analizatu ziren.

2.4. Lerro zelularren aktibitate metabolikoaren neurketa eta BrdU inkorporazio saioa

Zelulen aktibitate metabolikoaren saioak egiteko Roche etxeko “Cell Proliferation Kit I (MTT)” kit komertziala erabili zen. 96 putzutako plaketan 10^4 zelula erein ziren putzuko eta etxe komertzialak gomendatutako protokoloa jarraituz neurtu zen aktibitate zelularra denbora ezberdinetan. Amaieran espektrofotometrikoki putzu bakoitzeko absorbantzia neurtu zen 570 nm-ko eta 690 nm-ko uhin luzeretan, A_{570} aktibitate metabolikoaren erakusle bezala eta A_{690} erreferentzia modura.

Lerro zelularren kulturen BrdU inkorporazio saioetan Roche etxeko “Cell Proliferation ELISA, BrdU” kit komertziala erabili zen. 96 putzutako plaketan 10^4 zelula erein ziren putzuko. Kulturaren denbora puntu ezberdinetan BrdU-arekin inkubatu ziren zelulak 4 orduz etxe komertzialak gomendaturiko argibideak jarraituz inkorporatutako BrdU kantitatea neurtu zen espektrofotometrikoki.

2.5. Zelulen apurketa eta frakzio azpizelularren isolamendua

2.5.1. Zelulen uzta eta lisia

Zelulen uztarako zelulak PBSrekin bi aldiz garbitu eta silikonazko espatula batekin askatu ziren plakatik, PBS bolumen egokian. Esekidura zelular hori zentrifugatu (300 xg, 5 min, giro-tenperatura) eta zelulen jalkina, erabileraren arabera, disoluzio egokian berreseki zen.

RNA erauzi behar zenean (2.15. atala), jalkina TRIzol erreaktiboan berreseki zen zuzenean.

Proteinak WB bidez aztertu nahi zirenean (2.13. atala), jalkina lisi-tanpoitan berreseki zen, zelula kopuruaren araberako bolumen egokian. Esekidura 30 min-z inkubatu zen 4 °C-tan eta bitartean 2-3 aldiz gogor irabiatu zen lisi zelularra bultzatzeko.

Lipidoen analisi kuantitatiboa (2.7. atala) egin behar zenean, zelula kopuruaren araberako PBS bolumen egokian berreseki zen jalkina eta hori A erauzketa nahastearen bolumen egokiarekin nahastu zen.

2.5.2. Zelulen frakzionamendu azpizelularra

Lisatu zelularren frakzionamendua egiteko Gong eta kideek deskribatutako prozeduran oinarritutako protokoloa jarraitu zen (Gong et al., 2006). Prozedura guztia laginak 4 °C-tan mantenduta egin ziren. Zelulen jalkina H tanpoian berreseki zen. Jarraian 25G-ko orratz batetik 30 aldiz pasaraziz apurtu ziren zelulak eta ondoren homogenatua zentrifugatu egin zen (1000 xg, 7 min). Zentrifugazio horren bidez P1 jalkina (nukleoak) eta GJ1 gainjalkina lortu ziren. P1 jalkina N tanpoitan berreseki zen eta noria batean biraraziz irabiatu zen 1 h-z nukleoko proteinak erauzteko. Jarraian 100.000 xg pean 30 min-z zentrifugatu zen. Ultrazentrifugazio horren ondoren lortutako gainjalkina izan zen **nukleo erauzkina**.

GJ1 gainjalkina ultrazentrifugatu egin zen (100.000 xg, 30 min) P2 jalkina eta GJ2 gainjalkina lortuz. P2 jalkina M tanpoian berreseki zen mintzak solubilizatu eta **mintz erauzkina** lortzeko.

GJ2 gainjalkineko proteinak -20 °C-tan mantendutako azetonaren 5 bolumen gehitu ondoren zentrifugatu (10.000 xg, 15 min) prezipitatu ziren P3 jalkina eta GJ3 gainjalkina lortuz. GJ3 gainjalkina bota egin zen eta P3 jalkina H tanpoitan berreseki (**zitosol erauzkina**). Erauzkin guztiak -20 °C-tan gorde ziren erabili arte.

2.5.3. Xenotumoreen homogeneizazioa eta frakzionamendu azpizelularra

Tumore zatiak Potter-Elvehjem bat erabiliz homogeneizatu ziren (10 ziklo 700 rpm-tan) tumore g-ko homogeneizazio tanpoiaren 5 ml-ko proportzioan, izotz bainuan mantenduz, eta proteina neurketa egin zen (2.14. atala). WB bidezko analisisetarako homogenatu totala 3x desnaturalizazio tanpoitan desnaturalizatu zen. Lipidoen analisisetarako homogenatua erauzketa nahastearen 15 bolumenekin nahastu zen.

Zelulen frakzionamendu zelularrean bezala prozedura guztiak laginak 4 °C-tan mantenduta egin ziren. Lagin bakoitzeko 2 ml erabili ziren frakzionamendurako. Lehenengo laginak zentrifugatu ziren (780 xg, 10 min). GJ1 gainjalkina jaso eta P1 jalkina 500 µL H tanpoitan berreseki zen beirazko haga bat erabiliz eta gogoz irabiatuz. Jarraian berriro zentrifugatu ziren (780 xg, 10 min). GJ2 gainjalkina jaso egin zen eta lortutako P2 jalkina 500 µL N tanpoitan berreseki zen nukleoko proteinak erauzteko **(nukleo erauzkina)**.

GJ1 eta GJ2 konbinatu eta ultrazentrifugatu egin ziren (105.000 xg, 2 h). Lortutako GJ3 gainjalkina **zitosolen** frakzioari dagokio. P3 jalkina 500 µL E tanpoitan berreseki zen mintzak solubilizatu eta **mintzen erauzkina** lortzeko.

2.6. Giza LDLen isolamendua

Kultibo zelularretan kolesterol iturri exogeno bezala erabiltzeko LDL-en isolamendua aurretik deskribatuta bezala egin zen (Vieira et al., 1996). Laburki, EHU-ko Medikuntza eta Erizaintzako fakultatean gure ikerketa taldeko borondatezko emaileen odola jaso eta 2.6. atalean deskribatu den bezala seruma lortu ondoren KBr gehitu zitzaion 1,21 gr/ml-ko dentsitatea lortzeko. Zentrifugatu ondoren (180000 xg, 3 ordu, 15 °C-tan) hodiaren erdialdean geratzen den banda horixka jaso zen. Lipoproteinen erauzkierri gatza kentzeko 10 kDa-eko baztertze kromatografiarako zutabeak erabiliziren. Purifikatutako LDLak kontzentratzeko 10 kDa-eko pisu molekularreko mugako ultrairagazpen hodiak erabili ziren, etxe komertzialak gomendatutako kondiziotan zentrifugatuz. LDLen kolesterol edukia 2.2.2 atalean aipatutako kit komertziala erabiliz kuantifikatu zen.

2.7. Zelulen eta tumoreen lipido karakterizazioa

Zelulen eta tumoreen lipidoen edukia analizatzeko, lehenengo lipidoak erauzi egin ziren Bligh-en eta Dyer-en metodoan (BLIGH and DYER, 1959)oinarritutako prozedura bat erabiliz (Ruiz and Ochoa, 1997). Laburki, lagin bakoitza 15 bolumen kloroformo:metanol (1:2, b:b) nahasterekin nahasi eta irabiatu ondoren

12 bolumen H₂O:kloroformo (4:2,5, b:b) gehitu zitzaizkien, irabiatu eta zentrifugatu (2000 *xg*, 15 min 4 °C-tan). Beheko fase kloroformikoa jaso eta gaineko fase metanolikoa berrerauzi zen kloroformo:metanol:H₂O (1:1:1, b:b:b) nahastearen 12 bolumenekin. Fase kloroformikoa jaso eta aurrekoaren konbinatu zen 1,5 mM CaCl₂-ren 4,5 bolumenekin garbitu aurretik. Zentrifugatu ostean fase urtsua bota eta fase kloroformikoa Savant SC250EXP kontzentradore-lurrungailuan lurrundu zen. Lipido erauzkina toluenotan berreseki zen. Analisisirako banaketa geruza fineko kromatografiaren (TLC) bidez egin zen 1 mM EDTA-rekin aurretatutako 20 cm-ko silika gelezko plaketan, aurretik deskribaturiko metodoa erabiliz (Ruiz and Ochoa, 1997). Metodo horrek kolesterol esterrak (CE), triglizeridoak (TG), diglizeridoak (DG), kolesterol askea (FC), kardiolipina (Cln), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidinositola (PI), fosfatidilserina (PS) eta fosfatidilkolina (PC) banatzea ahalbidetzen du elkarren segidako sei garapen kromatografiko eginez BD disolbatzaile nahasteak erabiliz. Lipidoak ikusgarri egiteko, plakak kobre sulfatozko disoluzioan sartu ziren 8 s-z eta 2-3 min-z 200 °C-tan erre ziren; jarraian, erreflexio-bidezko dentsitometria bidimentsionalaren bidez kuantifikatu ziren, Bio-Rad GS-800 dentsitometroan, Quantity One *software*-a erabiliz. Lipido-patroiekin erreferentzia-kurbak egin ziren eta lipido bakoitzaren intentsitatea kurba horretan interpolatuz lipido-kopurua kalkulatu ahal izan zen.

Metabolito erradioaktiboen trazaketa esperimentuetako (2.11. atala) lipidoen analisisirako, lipidoak Folchen metodoa erabiliz erauzi ziren (FOLCH et al., 1957). Laburki, lagin bakoitza 10 bolumen kloroformo:metanol (2:1, b:b) nahasterekin nahasi eta irabiatu zen. Jarraian, zentrifugatu (2000 *xg*, 15 min 4 °C-tan) eta fase kloroformikoa jaso zen. Fase metanolikoa berrerauzi zen 10 bolumen kloroformo:metanol (2:1, b:b) nahastearekin. Fase kloroformikoa jaso eta aurrekoaren konbinatu zen %0,8 (p/b) KCl-ren 4,5 bolumenekin garbitu aurretik. Zentrifugatu ostean fase urtsua bota eta fase kloroformikoa Savant SC250EXP kontzentradore-lurrungailuan lurrundu zen. Lipido erauzkina toluenotan berreseki zen. Jarraian 3 garapen kromatografiko sekuentzialen bidez F disolbatzaile nahasteak erabiliz eta CE, TG, FC, DG, gantz azido askeak eta fosfolipidoak (PL) banatu ziren, aurretik deskribatua izan den metodoa erabiliz (Aspichueta et al., 2005). Banaketaren ostean lipidoak iodo lurrunekin tindatu ziren ikusgarri egin eta espezie ezberdinak identifikatu ahal izateko. Identifikazioan laguntzeko plaketan lipido patrioiak ere kokatu ziren, lipido mota bakoitzaren migrazio-distantzia ezagutzeko. Lipido bakoitzari zegokion banda plakatik jaso zen harraskatuz eta 4 ml izarniadura likidoz beteriko bial batean sartu zen erradioaktibitatea izarniadura kontagailu batean kuantifikatzeko.

2.8. Azetil-CoA-ren neurketa

Azetil-CoA zitostolikoaren neurketarako McA-L eta McA-S lerroetako zelulen zitosten erauzketa egin zen lehenengo. Horretarako, zelulak uztatu ondoren lortutako jalkina behin izoztu/desizoztu zen zelulak lisatzeko. Jarraian KMHS tanpoiaren bolumen egokian berreseki zen eta lisatua zentrifugatu zen (20.000 xg , 10 min, 4 °C). Proteina neurketa 2.14. atalean deskribatzen den bezala egin zen eta laginak KMHS tanpoiarekin diluitu ziren kontzentrazio finala 3-6 mg/ml izan arte. Neurketa beti etxe komertzialak gomendatutako prozedura jarraituz burutu zen.

2.9. Zittratoaren neurketa

Zittrato zitostolikoaren neurketarako McA-L eta McA-S lerroetako zelulen zitosten erauzketa egin zen lehenengo. Horretarako, zelulak uztatu ondoren lortutako jalkina Sigma etxeko erabilitako kiteko tanpoiaren 300 μ l-tan berreseki eta behin izoztu/desizoztu ondoren, ultrasonatu egin ziren 1-2 min, potentziaren %10-20 intentsitatean, 5 segundu on/off. Jarraian laginak zentrifugatu ziren (15000 xg , 10 min). Gainjalkina desproteinizatzeko 10 kDa-eko pisu molekularreko mugako ultrairagazpen hodiak erabili ziren, etxe komertzialak gomendatutako kondiziotan zentrifugatuz eta iragazitako laginaren 10 μ erabili ziren neurketak egiteko.

2.10. Glukosa-6-fosfato deshidrogenasa eta entzima malikoaren jardueraren neurketak

Entzima malikoa (EM) eta glukosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) jarduerak neurtzeko 340 nm-ko uhin luzeeran espektrofotometrikoki NADPHaren sorrera neurtu zen. Entzima malikoaren kasuan saio bakoitzerako 1 ml KMHS tanpoi, 10 μ l zitostol eta 10 μ l 100 mM malato erabili ziren eta G6PDHren jardueraren neurketarako berriz 1 ml KMHS tanpoi, 20 μ l zitostol eta 10 μ l 290 mM glukosa-6-fosfato.

2.11. Markaketa metabolikoa

Inkorporazio esperimentuetan zelulak transfekzio medioan mantendu ziren 2 edo 4 h-z kasu bakoitzean emaitzen atalean azaltzen den bezala metabolito erradioaktibo egokiaren traza baten presentzian. Azido azetikoaren inkorporazio esperimentuetan [3H]azetikoaren 20 μ Ci/plaka gehitu zen jatorrizko *stock*-etik kultura medioan. Azido oleikoaren inkorporazio esperimentuetan %0,025 BSA-rekin akonplejatutako 20 mM azido oleiko gehitu zen mediora, horretan [3H]oleiko traza bat zegoela (15 μ Ci/plaka). Kolesterolaren inkorporazio esperimentuetan 24 mM hpCD-rekin akonplejatutako 5 mM kolesterol gehitu zen mediora, horretan [^{14}C]-kolesterol traza bat zegoela (15 μ Ci/plaka). Glukosaren (D-glukosa 6- 3H (N)) inkorporazio

esperimentuetan 20 μCi /plaka gehitu zen kultura medioan jatorrizko *stock*-etik eta [^{14}C]-glizerolaren kasuan 2 μCi /plaka. Kolesterolaren esterifikazioaren inhibitzailea den Sandoz-58035 erabili zen esperimentuetan, traza erradioaktiboa baino 30 minutu lehenago gehitu zen eta metabolito erradioaktiboaren inkorporazio esperimentuan zehar mantendu zen. Esperimentu horiek, kontrakoa adierazi ezean, 4 h-koak izan ziren.

2.12. Glukosaren barneraketa saioa

Glukosaren barneraketa saioak 35 mm diametroko plakatan 72 h-z mantendutako zelulak erabiliz egin ziren. [^3H]-glukosaren 10 μCi /plaka mediora gehitu eta 1 min ondoren, zelulak PBSz bi aldiz garbitu, uztatu eta barneratutako erradioaktibitatea izarniadura likidoa erabiliz neurtu zen.

2.13. *Western blotting*

2.5. ataletan deskribatu den bezala lortutako kulturatatiko edo tumoreetatiko laginak, Laemmly-k deskribatutakoaren arabera, desnaturalizazio tanpoitan desnaturalizatu ziren 100 °C-tan 5 minutuz inkubatuz. Proteinak elektroforesi bidez banatu ziren SDSdun tanpoian eta poliakrilamidazko geletan (SDS-PAGE) MiniProtean III (BioRad) sistema erabiliz. Jarraian elektroforesian banatutako proteinak getetik PVDFzko mintz batera transferitu ziren Whatman paperak erabilita transferentzia hezeko kamara batean (90 V, 1 h, izotzetan) transferentziako B tanpoiarekin edo transferentzia erdi hezeko kamaran (0,5 mA/cm², 60 min) katodoaren aldean A tanpoia erabiliz eta anodoaren aldean B tanpoia..

Ondoren, mintzak TBST-tan disolbaturiko %3 BSA-rekin (TBST-BSA3) blokeatu ziren (2 h, giro-tenperatura). Antigorputz primarioen inkubazioak TBST-BSA1 disoluzioan egin ziren (12 h, 4 °C), mintzak TBS-rekin garbitu ziren 3 aldiz giro-tenperaturan eta peroxidasadun antigorputz sekundario egokiarekin inkubatu ziren TBST-BSA1 disoluzioan (1 h, giro tenperatura). Erabilitako antigorputzak **C1 Taulan** daude adierazita.

Detektziorako Clarity ECL edo GE Healthcare ECL substratua eta argazki-filmak erabili ziren detektatu beharreko proteina bakoitzarentzat esposizio denbora egokia erabiliz. Filmak errebelatu ondoren digitalizazioa eta kuantifikazioa erreflexio-bidezko dentsitometria bidimentsionalaren bidez egin ziren Bio-Rad GS-800 dentsitometroan, Quantity One *software*-a erabiliz.

2.14. Proteina neurketa

Proteina-kontzentrazioa neurtzeko azido bizinkoninikoaren metodoa erabili zen Thermo Scientific etxeko “BCA Protein Assay” errektiboa erabiliz. Saioak hirukoitzean egin ziren 96 putzuko plaketan laginei %2 (p/b) SDS gehitu ondoren eta erreferentzia kurbak eraikitzeke albumina erabili zen. Etxe komertzialaren argibideak jarraitu ziren. Absorbantzia BioTek Synergy HT plaka-irakurgailuan neurtu zen.

2.15. Gene adierazpenaren analisia

RNA-rekin lan egiteko, esterilizatutako materiala eta DEPC-ura erabili ziren beti. **RNA erauzteko** TRIzol errektiboa erabili zen etxe komertzialak gomendatutako prozedura jarraituz. Amaieran RNA DEPC-uretan disolbatu zen. Erabili aurretik RNA erauzkina berotu egin zen beti (65 °C, 10 min) RNaren egitura sekundarioa desegonkortzeko. **RNAren kuantifikazioa** Nanodrop espektrofotometroan egin zen, 260 nm eta 280 nm-ko absorbantziak neurtuz; A_{260} RNA-kontzentrazioa kalkulatzeko erabili zen eta A_{260}/A_{280} erlazioa proteinen kutsaduraren neurri bezala. Lagina ontzat emateko gutxieneko erlazioa 1,8 izan zen. RNA laginak desizoztu ziren bakoitzean, erabili aurretik elektroforesi azkar bat egin zen %1eko agarosazko gel batean eta TAE tanpoitan, degradaziorik ez zegoela baieztatzeko.

RNA erauzkintan egon zitekeen DNA desagertarazteko DNasa-rekin tratatu ziren laginak. Invitrogen-eko “DNase I, Amplification Grade” *kit*-a erabili zen, eta **cDNA-ren sintesia** egiteko Invitrogen-eko “SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” *kit*-a. Ekoizlearen argibideak jarraitu ziren beti.

Gene adierazpenaren analisia bi metodo ezberdinen bidez egin zen, bietan *real time* PCR kuantitatiboa (qPCR) erabiliz. Lehenengo metodoa ikerkuntza taldeko baliabideekin aplikatu zen, Applied Biosystems etxeko SYBR Green fluoroforoa duen *kit*-a eta Abi Prism 7000 aparatua erabiliz cDNA espezifikoen kuantifikaziorako. **C2 Taulan** adierazitako oligonukleotidoak erabili ziren hasle gisa, bikoteko kide bakoitzaren 100 nM jarrita. Erreakzioak hirukoitzean egin ziren eta erreferentzia zuzenaren eraikuntzarako lagin ezberdinen nahaste baten diluzioak erabili ziren. Datuen normalizaziorako glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh) eta ziklofilina (Ppia) genearen mRNA-kantitatea erabili zen. Datu guzti horiek *geNorm* programarekin tratatu ziren normalizazio-faktore bateratu bat kalkulatzeko (genorm REF).

Bestalde EHU-ko Genomika eta Proteomika zerbitzuan (SGIker) analizatu zen gene adierazpena Biomark HD System (Fluidigm) aparatuan. Aparatu honek laginaren bolumen oso txikiak erabilia gene askoren adierazpena aztertzea ahalbidetzen du Kasu honetan ere neurketak hirukoitzean egin ziren eta erreferentzia

zuzenaren eraikuntzarako lagin ezberdinen nahaste baten diluzioak erabili ziren. Datuen normalizaziorako glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh) genearen mRNA-kantitatea erabili zen MultiD Analyses-eko GenEx *software*-a erabiliz.

2.16 Analisi estatistikoa

Saio esperimentaletan lortutako datuak batezbesteko aritmetiko \pm desbiderapen estandard moduan adierazten dira. Ezberdintasunen analisi estatistikoa egiteko zenbait test erabili ziren, konparatzen ziren taldeen izaeraren arabera.

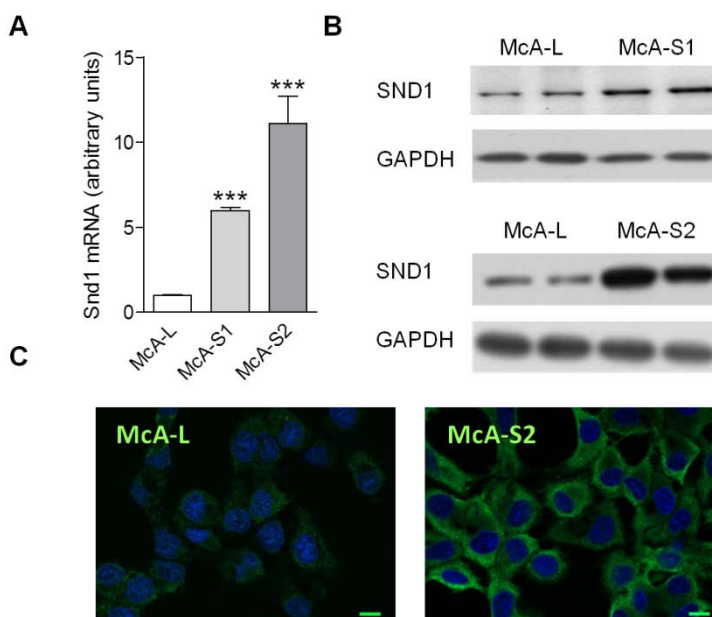
Bi talderen arteko konparaketetan Student-en t-aren testa erabili zen. Bi talde baino gehiago konparatzeko ANOVA analisia burutu zen, bide batekoa edo biko konparazioko aldagai-kopuruaren arabera. Test estatistiko horietan, hipotesi nuluen probabilitatea (P) 0,05 edo txikiagoa zenean ezberdintasunak esanguratsuak zirela kontsideratu zen. Analisi estatistikoak egiteko *GraphPad Prism* programa erabili zen, **GraphPad Software** (AEB) etxekoa.

D. EMAITZAK

1. Kolesterolaren homeostasiaren asaldurak

1.1 SND1 gainadierazten duten hepatoma lerroak

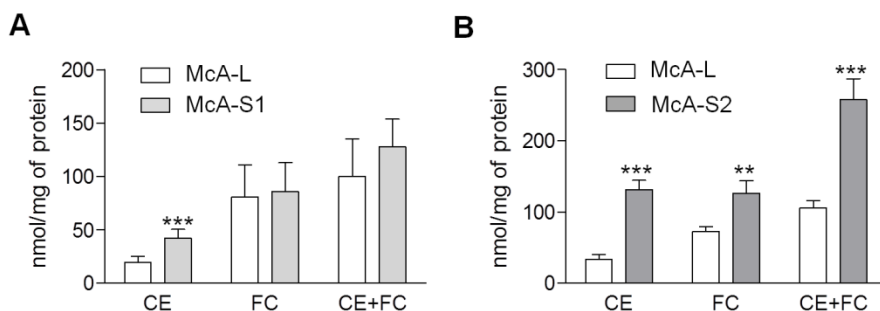
SND1 proteinaren gainadierazpenaren garrantzi funtzionala aztertzeko, McA RH7777 arratoi hepatoma zelulak modu egonkorrean transfektatu ziren bakterioen LacZren edo arratoiaren Snd1en cDNA-rekin McA-L eta McA-S lerroak eraikitzeko. SND1en gainadierazpen maila ezberdineko bi lerro monoklonal aukeratu ziren (McA-S1 eta McA-S2); hauek McA-L zelulek baino 6 eta 12 aldiz Snd1en mRNA gehiago adierazten dutela ikusten da **D1.A Irudian**. mRNA mailako adierazpenaz gain, McA-L, McA-S1 eta McA-S2 lerroen proteina mailako SND1en adierazpena analizatu zen WB bidez. **D1.B Irudian** erakusten den bezala, McA-S lerroek McA-L lerroek baino SND1 gehiago adierazten dute. Gainera immunozitokimika bidezko analisiak ere emaitza horiekin bat datoz, **D1.C Irudian** ikus daitekeen bezala.



D1 Irudia. SND1 gainadierazten duten lerro transfektante egonkorren karakterizazioa. SND1 proteinaren gainadierazpenaren eta kokapen zelularraren analisia egonkorki transfektatutako McA-L eta McA-S hepatoma lerroetan egin ziren. (A) SND1en mRNA mailak RT-qPCR bidez kuantifikatuta. (B) Lerroen SND1 proteina maila *western blot* bidez analizatuta. (C) Fluoreszentzia konfokaleko mikrografia adierazgarriak SND1 (berdez) eta DNA (urdinez) erakutsiz. Bai RT-qPCR zein *western blot* analisisetarako GAPDHren adierazpen maila erabili zen datuen normalizaziorako. Grafikoak 5 daturen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrek adierazten ditu. Student-en t testa: *** $p \leq 0,001$.

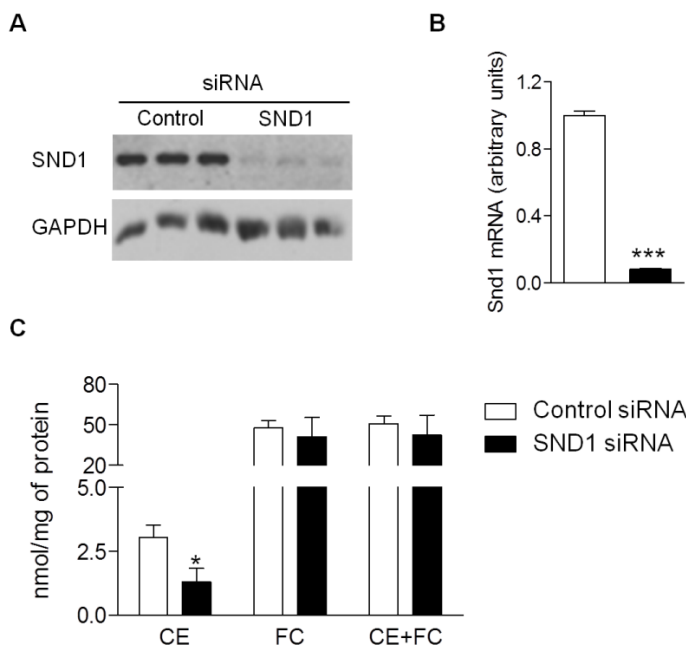
1.2 McA-L eta McA-S lerroen lipido karakterizazioa

Lipidoen gehiegizko *de novo* sintesia minbizi zelulen birprogramazio metabolikoaren ezaugarri ezaguna da. Horregatik, SND1 lipido metabolismoan nolabait inplikatur dagoen aztertzeko lehenengo hurbilketa bezala SND1 gainadierazten duten McA-S lerroen lipido edukiaren karakterizazio kuantitatiboa egin zen TLC bidez. Karakterizazioaren emaitzek zera erakusten dute, McA-S1 eta McA-S2 lerroetako zelulek McA-L kontrol zelulek baino 2 eta 3 aldiz CE gehiago metatzen dutela, hurrenez hurren (**D2 Irudia**).



D2 Irudia. McA-L eta McA-S lerroen kolesterol edukia. McA-L eta McA-S kultiboetako zelulen lipidoak erauzi eta geruza fineko kromatografia bidezko banaketa egin ondoren, kolesterol edukia kuantifikatu zen. (A) McA-L eta McA-S1 lerroen kolesterol ester (CE), kolesterol aske (FC) eta kolesterol totalaren edukia. (B) McA-L eta McA-S2 lerroen edukia. Grafikoek 5 daturen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrek adierazten dituzte. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Zelulen CE edukiaren eta SND1en adierazpen mailaren arteko erlazioari buruz hausnartzen jarraitzeko, McA-L kontrol lerroan SND1en aurkako siRNA erabiliz SND1en azpiadierazpena eragin zen. **D3.A** eta **D3.B Irudietan** ikus daitekeen bezala SND1en aurkako siRNAk SND1en azpiadierazpen nabarmena eragin zuen bai proteina mailan eta baita mRNA mailan ere. Horrekin batera, CE edukiaren jaitziera esanguratsu bat gertatu zela ikus daiteke, FC edukian inolako aldaketarik eragin gabe (**D3.C Irudia**). Esperimentu horrek iradokitzen du McA-S lerroen ezaugarri den CE metaketa (**D2 Irudia**) SND1 proteinaren gainadierazpenaren ondorio dela.



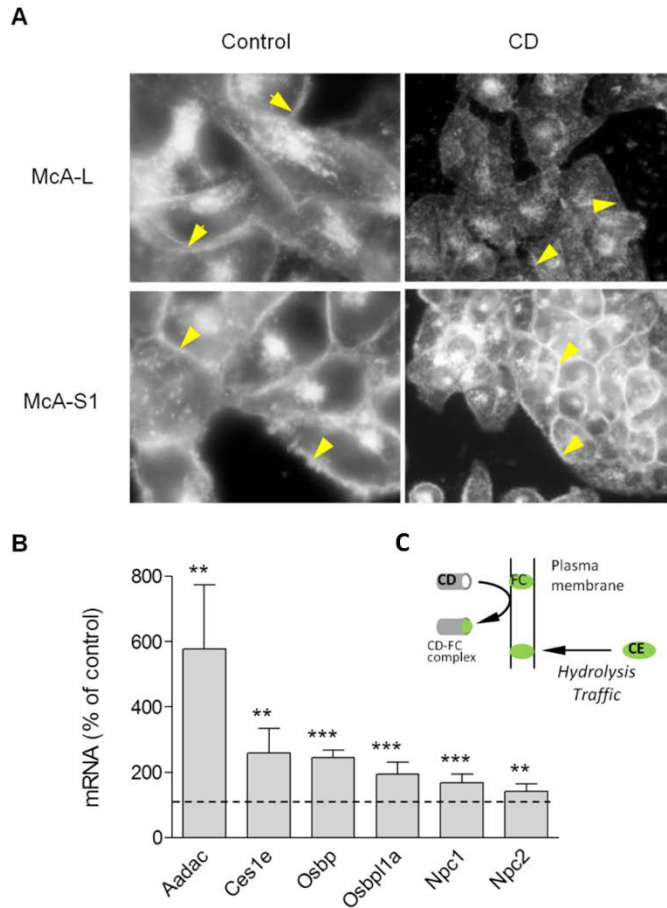
D3 Irudia. SND1en azpiadierazpenaren eragina kolesterol edukiaren gain. McA-L zeluletan siRNA espezifikoak transfektatuz SND1en adierazpenaren jaitsiera eragin zen. Transfektzioaren kontrol bezala kontrol siRNA bat erabili zen. (A) SND1en adierazpenaren analisia *western blot* bidez. (B) mRNA mailako SND1en adierazpena. (C) siRNAekin tratatutako McA-L lerroen kolesterol edukiaren analisia, lipidoak erauzi eta geruza fineko kromatografia bidez banatu ondoren egin zen. CE, kolesterol esterra; FC, kolesterol askea. Grafikoez 5 daturen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak adierazten dituzte. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$.

1.3 McA-S zelulek metatutako kolesterola mobilizatzeko gaitasun handiagoa dute

Zeluletan kolesterol edukia altua denean, FC FA batekin esterifikatu eta LDetan gordetzen da FC maila toxikoaren azpitik mantentzeko. Zelularen beharren arabera LDetako CE mobilizatzen da hidrolisi bidez. McA-L eta McA-S zelulen kolesterolaren banaketa eta mobilizazioa aztertzeko filipina izeneko konposatua erabili zen. Filipina FCren tindatzaile fluoreszente bat da eta horregatik mintz plasmatikoa markatzen du batez ere. Zelulak filipinarekin tindatu eta mikroskopia konfokalaren bidez analizatu ziren.

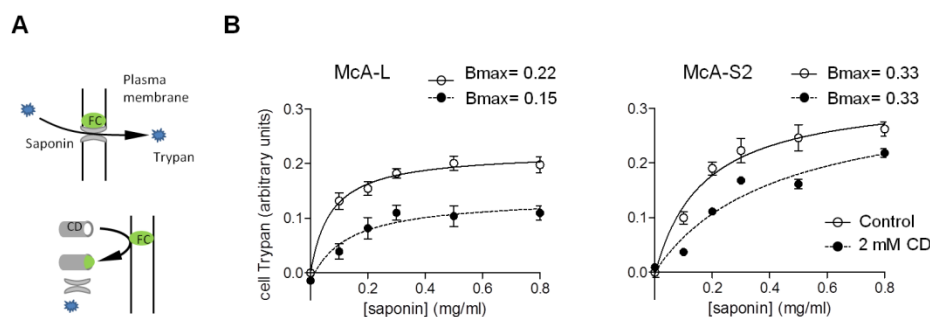
D4.A Irudian erakusten den bezala, ez dago FCren banaketa zelularrean ezberdintasun nabarmenik McA-L eta McA-S lerroen artean. Kolesterolaren mobilizazioa aztertzeko kulturak 16 mM hpCDrekin tratatu ziren 1 min-z. Ziklodestrina mintzetako kolesterol bahitzeko gai den konposatua da (D4.C Irudia) Tratamenduaren ostean McA-L zelulek mintzeko filipina seinalea galtzen dutela ikus daiteke, McA-S1 zeluletan konstante mantentzen den bitartean (**D4.A Irudia**). Horrek iradokitzen du McA-S1 zelulek kontrol zelulek baino gaitasun handiagoa dutela kolesterol erreserbak mobilizatzeko, hori dela eta mintz

plasmatikoko kolesterol edukia mantentzen da. Emaitzak bat datoz kolesterolaren mobilizazioan parte hartzen duten geneen adierazpenaren analisiarekin (**D4.B Irudia**).



D4 Irudia. Kolesterolaren banaketa zelularra eta mobilizazio ahalmena. (A) McA-L eta McA-S lerroen kolesterol askearen (FCaren) banaketa zelularren adierazgarri diren mikrografiak. FC tindatzeko filipina tindatzaile fluoreszentea erabili zen eta mikroskopia konfokalaren bidez bistaratu ziren zelulak. Kolesterol erreserben mobilizazioa aztertzeko 16 mM 2-hidroxiopropil- β -zilkloextrinarekin (CDrekin) tratatamendua jarri zen 1 min-z. (B) Kolesterolaren mobilizazio intrazelularrean parte hartzen duten geneen adierazpenaren analisia RT-qPCR bidez. (C) CDak mintz plasmatikoko kolesterola bahitu ondoren kolesterol esterren hidrolisi eta mobilizazioa ematen da mintzeko kolesterola edukia berritzeko. CD, ziklodestrina; CE, kolesterol esterra; FC, kolesterol askea. GAPDHren mRNA mailak erabili ziren datuak normalizatzeko. Grafikoak 5 daturen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak adierazten ditu. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Emaitzza horiek osatzeko asmoz diseinatu zen hurrengo saioa (**D5.A Irudia**). Horretarako, mintzaren iragazkortasuna areagotzen duen konposatu bat erabili genuen, saponina. Konposatu horrek mintzeko kolesterolarekin elkartuz eta poroak sortuz, kolesterol edukiaren menpeko iragazkortasun aldaketak eragiten ditu. Propietate hori aprobetxatuz, saponinaren presentzia McA-L eta McA-S2 zelulen tripan urdinaren barneraketa analizatu zen egoera basalean eta 2 mM hpCD tratamenduaren ondoren; hpCDk mintz plasmatikoko kolesterola bahituta saponinak efektu txikiagoa izatea esperoko litzateke. **D5.B Irudian** ikusten da saponinak kontzentrazioaren menpeko iragazkortasunaren emendio bat eragiten duen zeluletan. Deduzitutako B_{max} baloreen oinarrituta, esan daiteke McA-S zelulen mintzeko FC edukia McA-L zelulena baino altuagoa dela. Gainera, hpCDk mintzeko kolesterola bahitu ondoren, saponinak permeabilizazio baxuagoa eragin zuen bi lerroetan. Hala ere, McA-S2 zeluletan jaitsiera hau txikiagoa izan zen eta tratatu gabeko zelulen B_{max} balio bera lortu zen (**D5.B Irudia**). Emaitzza horiek aurreko esperimentuko ondorioak baieztatzen dituzte: McA-S zelulen kolesterola mobilizatzeko gaitasuna handiagoa da.



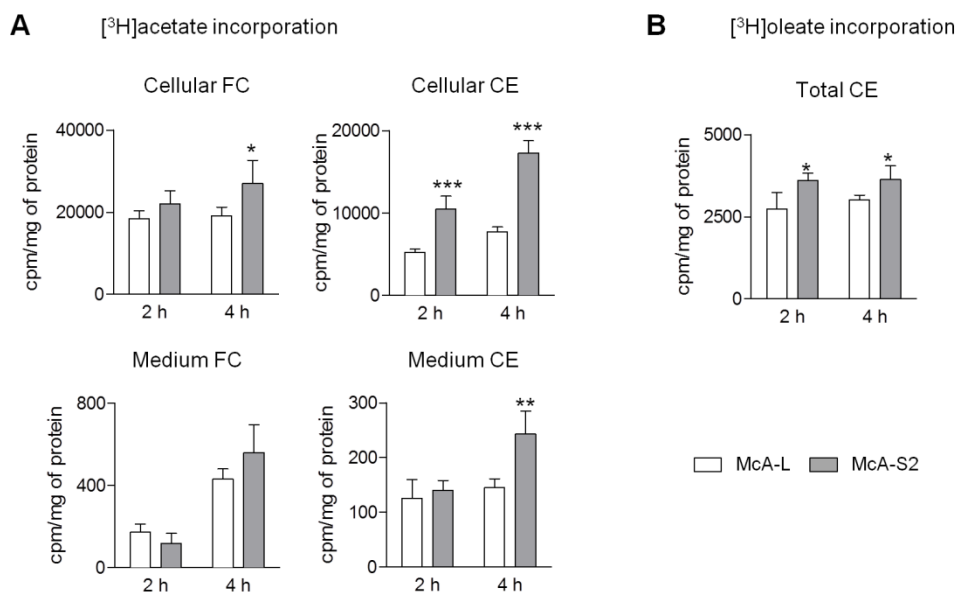
D5 Irudia. Saponinak eragindako mintzen iragazkortasuna. (A) Saio honetan erabilitako saponina konposatuak kolesteroldun eremuetan txertatuz mintzeko poroak sortzen ditu; tripan urdinaren zeluletarako barneraketa mintz plasmatikoko kolesterol edukiaren menpekoa da kasu horretan. 2-hidroxiopropil- β -ziklodextrinak (CDk) mintzeko kolesterola bahituta, saponinak eragindako iragazkortasunaren jaitsiera eragiten du. (B) Tripan urdinaren barneraketa zeluletan saponinaren kontzentrazio ezberdinen presentzia, egoera basalean eta CD gehituta. Gune bakarreko lotura zinetikaren ekuazioa ajustatzen da datuekin. B_{max} balorea mintz plasmatikoko kolesterol edukiaren neurritzat har daiteke. Grafikoek 5 daturen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak adierazten dituzte.

1.4 McA-S zelulen kolesterol esterren metaketa kolesterologenesiaren gainaktibazio baten eta esterifikazio ahalmen altuago baten ondorio da

Hepatozitoek bi kolesterol iturri dituzte: plasmako lipoproteinak eta azetil-CoA-tik abiatutako *de novo* sintesia. McA-S lerroko zeluletan gehiegizko CEen metaketarako kolesterol iturria zein den argitzeko

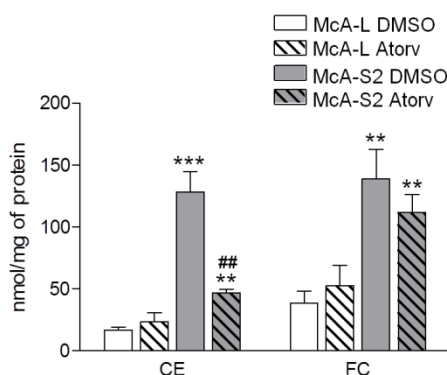
substratu lipogeniko erradioaktiboaren inkorporazioa analizatu zen McA-L eta McA-S lerroetan. Alde batetik azido $[^3\text{H}]$ azetikoaren inkorporazioa aztertu zen lipido zelularretan eta baita mediora askatutako lipidotan ere. **D6.A Irudiak** erakusten du McA-S zelulek kontrolak baino erradioaktibitate gehiago inkorporatzen dutela CEetan, emendioa %100ekoa izanik 4 h-ko inkubazioaren ondoren. Medioko CEetan erradioaktibitate maila altuagoak adierazten du McA-S zeluletan dagoen CE gainmetaketa ez dela kanporaketa txikiago baten ondorio.

Gain aktibatuta dagoen prozesua kolesterogenesia edo sorberriak diren FAen esterifikazioa den bereizteko, McA-S zelulen esterifikazio ahalmena aztertu zen azido oleiko erradioaktiboaren CEetarako inkorporazioa neurtuz. 4 h-ko inkubazio baten ondoren McA-S zelulek %20 erradioaktibitate gehiago zuten CEetan (**D6.B Irudia**), azetikoarekin lortutako emendioa baino askoz proportzio txikiagoa. Horrek adierazten du McA-S zelulek esterifikazio ahalmen altuagoa dutela eta horrek CEen gainmetaketan ekarpen garrantzitsu bat izan dezakeela, baina kolesterolaren *de novo* sintesiaren gainaktibazioa dela CEen gainmetaketaren eragile nagusia.



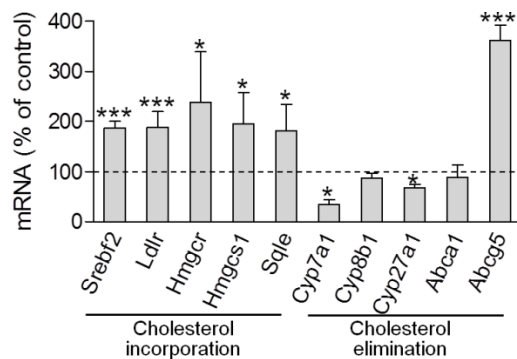
D6 Irudia. Substratu erradioaktiboaren inkorporazioa zeluletako eta mediora askatutako kolesterol askean (FCan) eta esterifikatuan (CEan). (A) Azido $[^3\text{H}]$ azetikoaren inkorporazioaren analisia McA-L eta McA-S2 zeluletan. (B) Azido $[^3\text{H}]$ oleikoaren inkorporazioa. Bi kasuetan 4 h-ko inkorporazioaren ondoren lisatutako zeluletako eta medioetako lipidoen erazketa burutu zen eta geruza fineko kromatografiaren bidez banatu ondoren CEari eta FCari zegozkien bandak jaso ziren horien erradioaktibitatea neurtzeko. Grafikoez 5 datuen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak adierazten dituzte. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Saio horien esanahia hobeto interpretatzeko kolesterolaren sintesiko pausu mugatzaile nagusia katalizatzen duen HMGCRCR entzimaren atorbastatina inhibitzailearekin tratatu ziren kulturak, horrek CEen metaketan eraginik ote duen aztertzeke. **D7 Irudian** ikus daitekeenez atorbastatinaren presentzian McA-S zelulen CE edukia esanguratsuki jaitsi zen McA-L kontrol zelulekin parekatuta.



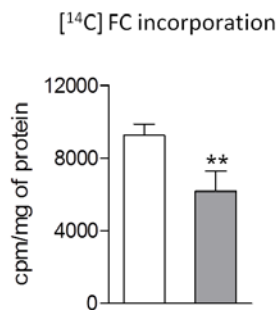
D7 Irudia. McA-L eta McA-S zelulen kolesterol edukia atorbastatina (Atorv) kolesterolaren sintesiaren inhibitzailearen presentzian. McA-L eta McA-S zelulak 0,1 μ M atorbastatinarekin edo disolbatzailearekin (DMSO % 0,6) inkubatu ziren 4 h-z, lipidoak erauzi ziren eta geruza fineko kromatografia bidez banatu eta kuantifikatu. Grafikoak 5 daturen batzbestekoak eta desbiderapen estandarrek adierazten ditu. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, McA-L eta McA-S lerroen arteko konparaketarako; ## $P \leq 0,01$ tratamenduaren eragina aztertzeke.

Emaizta guzti horiek kolesterolaren sintesi eta kanporaketa prozesuetan inplikaturako geneen adierazpenaren analisiarekin bat datoz. Izan ere, kolesterolaren sintesi prozesuan mugatzaile den Hmgcr genearen eta sintesi horretan zein prozesuaren erregulazioan inplikaturako hainbat entzimaren adierazpena analizatuta, kasu guztietan McA-S zeluletan mRNA mailak altuagoak direla ikusten da (**D8 Irudia**). Nahiz eta behazun azidoen sintesian inplikaturako Cyp7a1 eta Cyp27a1 geneen azpiadierazpena behatu den, kolesterolaren garraio apikalean inplikaturako Abcg5-en mRNA maila altuagoa da McA-S lerroan; horrekin batera kolesterolaren garraio basolateralean parte hartzen duen Abca1 genearen adierazpena ez aldatzeak iradokitzen du kolesterolaren kanporaketa prozesuetan ez dela aldaketa garrantzitsurik ematen SND1en gainadierazpenaren ondorioz. Horrez gain, **D6.A Irudian** aurretik erakutsi da McA-S zelulek ez dutela kolesterol gutxiago kanporatzen.



D8 Irudia. McA-L eta McA-S zelulen kolesterol sintesi eta kanporaketa prozesuetan inplikaturako zenbait generen adierazpena. mRNA mailak RT-qPCR bidez kuantifikatu ziren GAPDHren adierazpen maila erabiliz datuen normalizaziorako. Grafikoak 5 datuen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrek adierazten ditu. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$.

McA-S zelulak kolesterol gehiago kanporatzeko gai direla frogatzeaz gain, kolesterol exogeno gutxiago inkorporatzen dutela erakusten da **D9 Irudian**; CEen gainmetaketa kolesterogenesi aktiboago baten ondorioz gertatzen dela konfirmatzen da horrela.



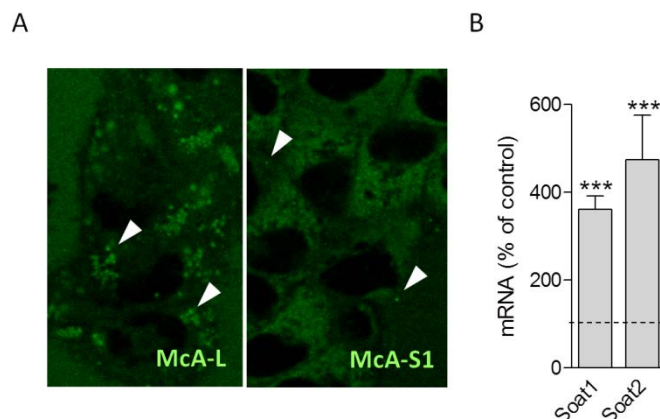
D9 Irudia. Kolesterol erradiaktiboaren inkorporazioa. 68 h-z hazitako McA-L eta McA-S zelulak 4 h-z inkubatu ziren $[^{14}\text{C}]$ kolesterolarekin eta lisatu zelularretan inkorporatutako erradiaktibitatea neurtu zen izarniadura likidoaren bidez. Baloreak 5 lagini dagozkien batezbestekoak eta desbiderapen estandarra dira. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$.

1.5 McA-S zeluletan kolesterolaren *de novo* sintesi maila altua esterifikazioarekin akoplatuta dago

1.3 atalean aipatu den bezala, kolesterol hornikuntza handi baten ostean zelulek FC esterifikatzen dute maila toxikoaren azpitik mantendu ahal izateko. CEak LDetan gordetzen dira zelularen beharren arabera hidrolizatuak izan arte. McA-S zeluletan kolesterogenesi aktiboagoa izanda hipotetizatu genuen zelula

horiek kanpotik gehitutako kolesterola esterifikatzeko ahalmen txikiagoa izango zutela. Hori analizatzeko NBD konposatu fluoreszentea lotuta duen kolesterolaren inkorporazioa aztertu zen. **D10.A Irudian** ikusten den bezala, NBD-kolesterola gehitu eta 30 min ondoren McA-L zeluletan LDak markatu ziren; horretarako NBD-kolesterol exogenoaren esterifikazioa egin behar da. McA-S zelulen kasuan ez zen ia fluoreszentiarik ikusi denbora berean LDetan.

McA-S zelulen esterifikatzeko ahalmen txikiago bat baztertzeko hepatozitoetan adierazten diren Soat1 eta Soat2 azil-CoA:kolesterol aziltransferasen mRNA mailako adierazpena aztertu zen RT-qPCR bidez. **D10.B Irudiak** erakusten du McA-S zeluletan bien adierazpena McA-L zelulena baino ia 4 aldiz altuagoa dela. Emaizta guzti horiek iradokitzen dute SND1en gainadierazpenak *de novo* kolesterol sintesi maila altuak esterifikazioarekin akoplatzea faboratzen duela.

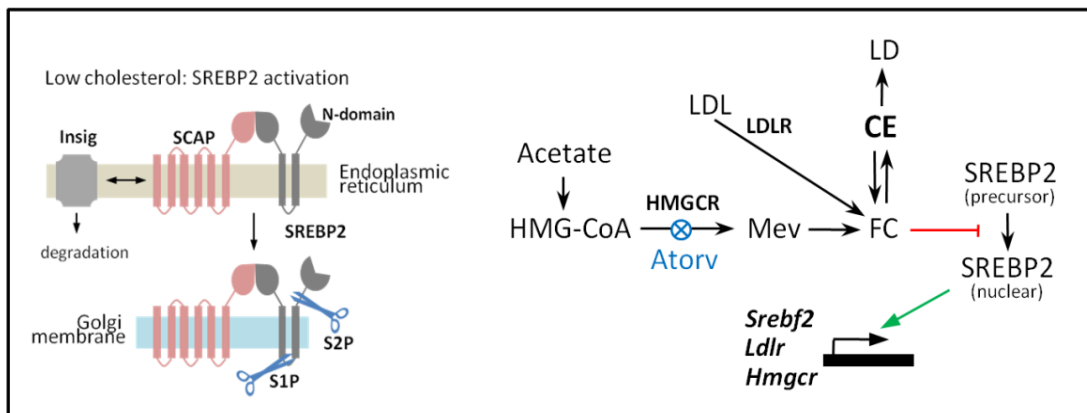


D10 Irudia. NBD-kolesterol exogenoaren inkorporazioa eta kolesterola esterifikatzen duten entzimen gene-adierazpena. (A) NBD-kolesterolarekin (berdea) 30 min-z inkubatutako zelulen mikroskopia konfokaleko mikrografia adierazgarriak. Gezi txuriek tanta lipidikoak erakusten dituzte, non esterifikatutako NBD-kolesterola kontzentratzen den. (B) Kolesterolaren esterifikazioan inplikatutako Soat1en eta Soat2ren mRNA mailak McA-S zeluletan (McA-L kontrol lerroarekiko) RT-qPCR bidez neurtuta. Normalizatzeko GAPDH erabili zen. Grafikoak 5 daturen batzbestekoak eta desbiderapen estandarrak adierazten ditu. Student-en t testa: *** $P \leq 0,001$.

1.6 McA-S zelulen gehiegizko kolesterogenesisia konstitutiboki gainaktibatutako SREBP2 sistemaren ondorio da

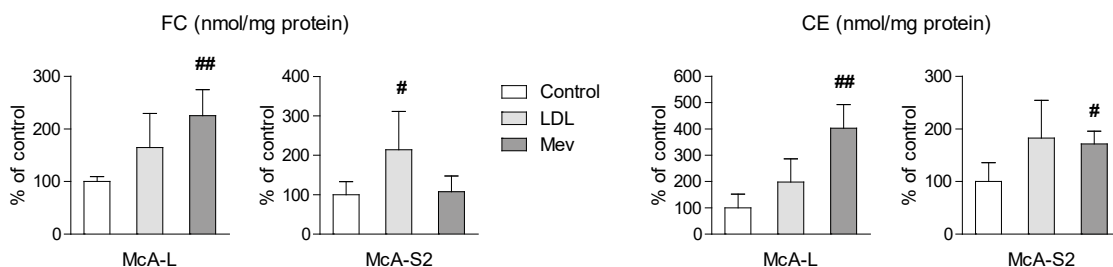
SREBP2 proteina ERko mintzeko kolesterol mailaren sentsorea da. Mintzeko kolesterol edukia baxuegia denean aktibatu egiten da (**D11 Irudia**) eta Hmcgr-ren eta Ldlr-ren adierazpena areagotzen du.

ERko mintzean kolesterol maila altua denean kolesterola SCAP proteinarekin lotzen da eta azken hori ERko INSIG proteinarekin elkartzen da.



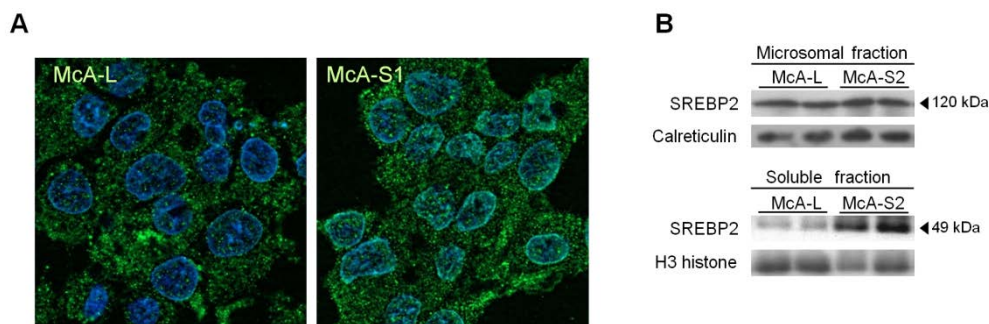
D11 Irudia. SREBP2 faktorearen aktibazioa. Ezkerrean: Kolesterol maila baxuek SCAPren eta INSIGren arteko loturen askapena bultzatzen dute, SREBP2 Golgi sistemara garraiatzea ahalbidetuz. Bertan bi proteasen mozketa sekuentzialen ondorioz SREBP2ren N-muturreko domeinu aktiboa (transkripzio faktorea) askatzen da nukleora sartu eta kolesterolaren sintesiko geneen adierazpena erregulatzen duena. Eskuinean: kolesterol iturri nagusien diagrama: mebalonatoaren (Mev) bidea (*de novo* sintesia) eta dentsitate baxuko lipoproteinen (LDL) barneraketa. Gehiegizko kolesterol askeak (FC) SREBP2ren aktibazioa blokeatzen du eta esterifikatua izan ohi da kolesterol ester (CE) bezala gorputz lipidikoetan (LD) metatua izateko. FC maila baxuek SREBPren aktibazio proteolitikoa bultzatzen dute Ldlr, Hmgcr and Srebf2 geneen adierazpena erregulatuz. Atorv, atorbastatina.

MCA-S lerroak kolesterol eduki altua izan arren (**D1 Irudia**) bere sintesian eta inkorporazioan inplikaturako geneen adierazpen maila altua erakusten dute (**D8 Irudia**). SREBP2 faktorearen bidezko erregulazio sistemak MCA-S zeluletan ondo funtzionatzen duen aztertzeko, zelulei kolesterola gehitu zitzaizen LDLekin inkubatuz 4 h-z. **D11 Irudian** erakusten den bezala, SREBP2 kolesterol maila baxuen aurrean aktibatzen da, beraz, kolesterolaren gehikuntzaren aurrean SREBP2ren aktibazioa inhibitzea esperoko litzateke, kolesterolaren sintesi bideko proteinen adierazpena jaitsi eta kolesterol maila zelularrak konstante mantentzeko. MCA-S zeluletan, LDLekin inkubatu ondoren, kolesterola jatorrizko maila altuaren gainera gainera metatzen da (**D12 Irudia**). Espero zen bezala, MCA-L zeluletan kolesterol exogenoaren gehikuntzak SREBP2ren proteolisia inhibitzen du eta ondorioz kolesterol mailak konstante mantentzen dira (**D12 Irudia**). Bestalde, kolesterolaren sintesi bideko bitartekari den mebalonatoa (ikus **D11 Irudia**) gehitu eta HMGCRren menpeko fluxuaren erregulazioa gaituz MCA-S lerroaz gain MCA-L lerroko zelulek ere CE metatzen dute (**D12 Irudia**).



D12 Irudia. LDLen eta mebalonatoaren eragina kolesterol edukiaren gain. McA-L eta McA-S zelulen kultura medioan 1 mM mebalonato (Meb) edo LDLak (0,1 mg kolesterol/ml) gehitu ziren. 48 h-ko tratamenduaren ondoren lipidoak erauzi eta geruza fineko kromatografia bidez banatu ziren kuantifikazioa egiteko. FC, kolesterol askea; CE, kolesterol esterrak. Grafikoek 5 daturen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrak adierazten dituzte. Student-en t testa: # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$ tratamenduaren efektua adierazteko.

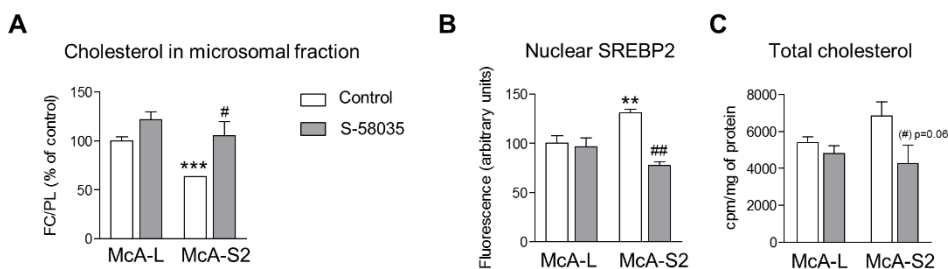
Emaitza horiek indartzeko, nukleoko SREBP2ren immunozitokimika bidezko analisia egin zen. **D13.A Irudian** erakusten diren mikrofotetan ikus daiteke McA-S zelulek SREBP2 nuklear gehiago dutela, proteina horri dagokion fluoreszentiaren eta Hoechst DNAREN tindatzaileari dagokionaren kolokalizazio maila altuagoa dutelako. Gainera, frakzio azpizelularretan SREBP2ren proteina mailak aztertu ziren WB bidez. **D13.B Irudian** ikus daiteke ez dagoela ezberdintasunik ERan kokatutako SREBP2 proteina aitzindariaren (120 kDa) mailan. Hala ere, forma aktiboaren (49 kDa) adierazpen altuagoa ikusten da McA-S zeluletan (**D13.B Irudia**).



D13 Irudia. SREBP2ren analisia. (A) Fixatutako McA-L eta McA-S1 zelulen fluoreszentiako mikroskopia konfokalaren bidezko analisia: urdinez Hoechst tindagaiarekin markatutako DNA eta berdez immunomarkatutako SREBP2. McA-S1 zeluletan bi fluoroforoen kolokalizazio maila altuagoa ikusten da. (B) Zeluletatik purifikatutako zatiki mikrosomal eta disolbagarriko SREBP2 proteinaren mailak *western blot* bidez analizatuta. Mintzeko forma aitzindariaren (120 kDa) eta forma aktiboaren (49 kDa) mailen normalizaziorako kalretikulina eta H3 histonak erabili ziren, hurrenez hurren.

1.7 McA-S zeluletako SREBP2 sistemaren desregulazioa erretikulu endoplasmatikoko kolesterol eduki baxuaren ondorio da

SND1 batez ere ERan kokatuta dagoenez, hipotetizatu genuen kolesterolaren homeostasian eragindako desregulazioa ERko mintzeko kolesterol *pool*-en alterazio baten bidezkoa izan zitekeela. Hori argitzeko, lehenengo, zatiki mikrosomaleko kolesterol mailak neurtu ziren McA-L eta McA-S zeluletan. McA-S zelulek kontrol zelulek baino proteina pixka bat gehiago zuten mikrosometan, kolesterol askearen neurria mintzeko fosfolipido totalarekiko adierazi da **D14.A Irudian**. Bertan, McA-S zelulen kolesterol edukia esanguratsuki baxuagoa dela ikus daiteke.



D14 Irudia. Erretikulu endoplasmatikoko kolesterol edukiaren eragina SREBP2ren aktibazioan. (A) 10 μ M Sandoz-58035 (S-58035) konposatuarekin edo disolbatzailearekin (%0,03 DMSO) 4 h-z tratatutako McA-L eta McA-S zelulen zatiki mikrosomaletako lipidoak erazi ziren eta kolesterol askea (FC) eta fosfolipido totalak (PL) kuantifikatu ziren geruza fineko kromatografia bidez banatu ondoren. FC edukia McA-L kontrol zelulen portzentaje bezala adierazi da. (B) Immunotindaketa egin ondoren fluoreszentiako mikroskopia konfokalaren bidez lortutako irudiak analizatuz SREBP2 nuklearraren fluoreszentiaren kuantifikazioa. (C) Kolesterol totalen inkorporatutako [3 H]azetikoaren kuantifikazioa. Grafikoez 5 daturen batezbestekoak eta desbiderapen estandarrek adierazten dituzte. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ McA-L eta McA-S erroren arteko konparaketarako; # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$ tratamenduaren efektua adierazteko.

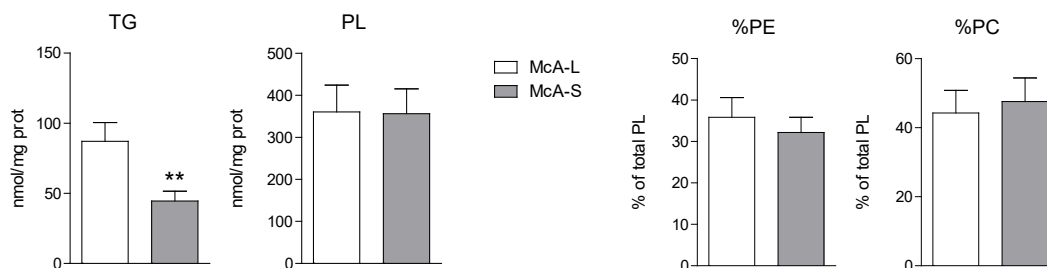
Lerroak kolesterolaren esterifikazioaren inhibitzaile den Sandoz-58035 konposatuarekin tratatuz, McA-S zelulen frakzio mikrosomaleko kolesterol edukia igo egiten dela baieztatu genuen (**D14.A Irudia**). Ondorioz SREBP2 nuklearraren mailak jaitsi egin ziren %130etik (McA-L zelula kontrolerikiko) % 75era. McA-L zeluletan ez da aldaketarik ikusten (**D14.B Irudia**). [3 H]azetikoaren inkorporazioa kolesterol totalen bat dator SREBP2ren aktibazio mailaren beherapenarekin (**D14.C Irudia**).

Emaitzek erakusten dute McA-S zeluletako gehiegizko kolesterogenesisia ERko kolesterolaren *pool* erregulatzailerik baten menpe dagoela: kolesterol eduki hori SREBP2ren inaktibazioarako beharrezkoa den mailaren azpitik dagoela dirudi. McA-S zelulek, kolesterol eduki altuagoa izan arren, ERan kontrol zelulek baino kolesterol maila baxuagoa dute eta ez da nahikoa SREBP2 inaktibatzen. Ondorioz, kolesterol eduki altua izan arren, kolesterolaren sintesia aktibo mantentzen da zelula horietan.

2. Trigliceridoen sorreraren egokitzapenak

2.1. SND1 gainadierazten duten zelulek triglizerido eduki baxuagoa dute

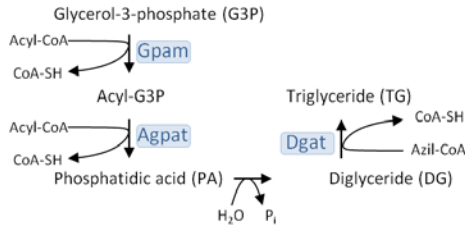
Emaitzen kapituluko lehenengo atalean deskribatutako kolesterogenesiaren desregulazioaz gain, SND1 proteinaren gainadierazpenak gainerako lipidoen metabolismoan eraginik izan dezakeen aztertu zen. McA-L eta McA-S lerroen lipido edukiaren analisisetan zelulen TGen eta PL ezberdinen edukia kuantifikatu zen, FAK dituzten lipidoen metabolismoan gehiago sakontzeko asmoz. PC, PE, PS, PI eta SM edukiak batuta kalkulatu zen PLen eduki totala. Plen eduki totalean ez zen ezberdintasun esanguratsurik aurkitu bi lerroen artean, ez eta PL ugarienak diren PC eta PE portzentajeetan ere; baina TGen kasuan McA-S zelulen edukia kontrol zelulena baino %49 baxuagoa dela ikusi zen (**D15 Irudia**).



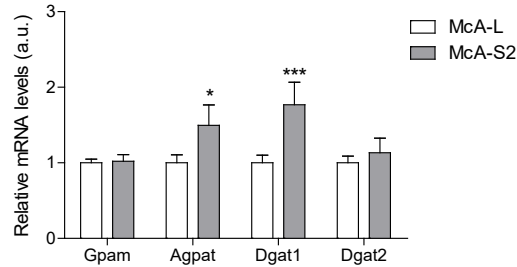
D15 Irudia. Azilglizeridoen edukia. 72 h-ko kultibotako McA-L eta McA-S zelulen lipidoak erauzi eta geruza fineko kromatografia bidezko banaketa egin ondoren azilglizerido ezberdinen edukia kuantifikatu zen: triglizeridoak (TG), fosfatidilkolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina, fosfatidilinositol eta esfingomielina. Azken 5 horien batura eginez kalkulatu zen fosfolipidoen (PLen) edukia. Adierazitako balioak 6 saio independentetan eginiko 26 lagini dagozkien batezbestekoak \pm SD dira. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$.

TG eduki baxuago hori beren sintesirako ahalmen baxuago baten ondorioz izan zitekeen aztertzekeo, sintesi-bidean inplikaturako entzima espezifiko nagusien (**D16.A Irudia**) geneen adierazpena analizatu zen mRNAk kuantifikatuz. **D16.B Irudian** ikusten den bezala McA-S zelulen Agpat eta Dgat1 geneen adierazpena kontrol zelulena baino %50 eta %75 altuagoa da, hurrenez hurren. Horrek iradokitzen du McA-S zelulek berez badutela FAK esterifikatzeko eta TGak sintetizatzekeo gaitasuna eta, beraz, badirudi TGen urritasuna bestelako muga metaboliko baten edo FAen kontsumo altuago baten ondorio izan daitekeela.

A



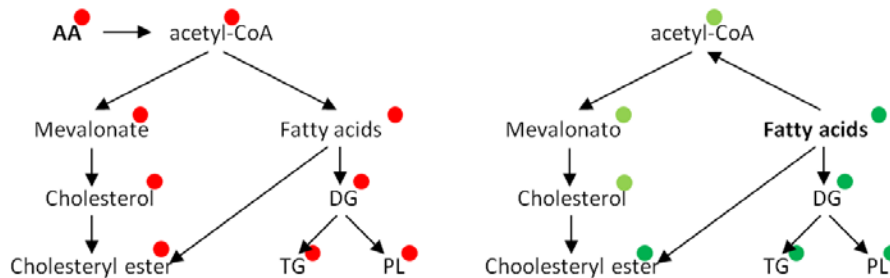
B



D16 Irudia. Trigliceridoen sintesian parte hartzen duten gene garrantzitsuen adierazpena. (A) Trigliceridoen sintesi bidearen eskema. (B) Adierazitako geneen mRNA maila erlatiboak RT-qPCR bidez neurtu ziren, normalizatzaile bezala Gapdh-ren mRNA mailak erabiliz. Grafikoak 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten ditu. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$.

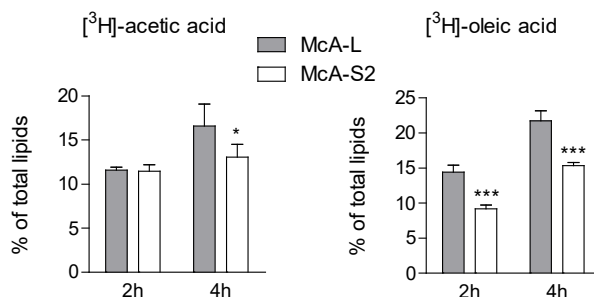
2.2. McA-S zelulen gantz-azidoen triglizeridoetarako bideratzea murrizta da

McA-S zelulen TG eduki baxuaren arrazoa aztertzeko asmoz, metabolitoen fluxu eta erabilpenaren inguruan gehiago sakontzeko, aitzindari metaboliko erradioaktibo ezberdinen lipido zelularretarako bideratzea (inkorporazioa) aztertu zen (**D17 Irudia**). Erabilitako tritiodun aitzindariak azido azetiko (AA) eta azido oleikoa (OA, *oleic acid*) izan ziren.



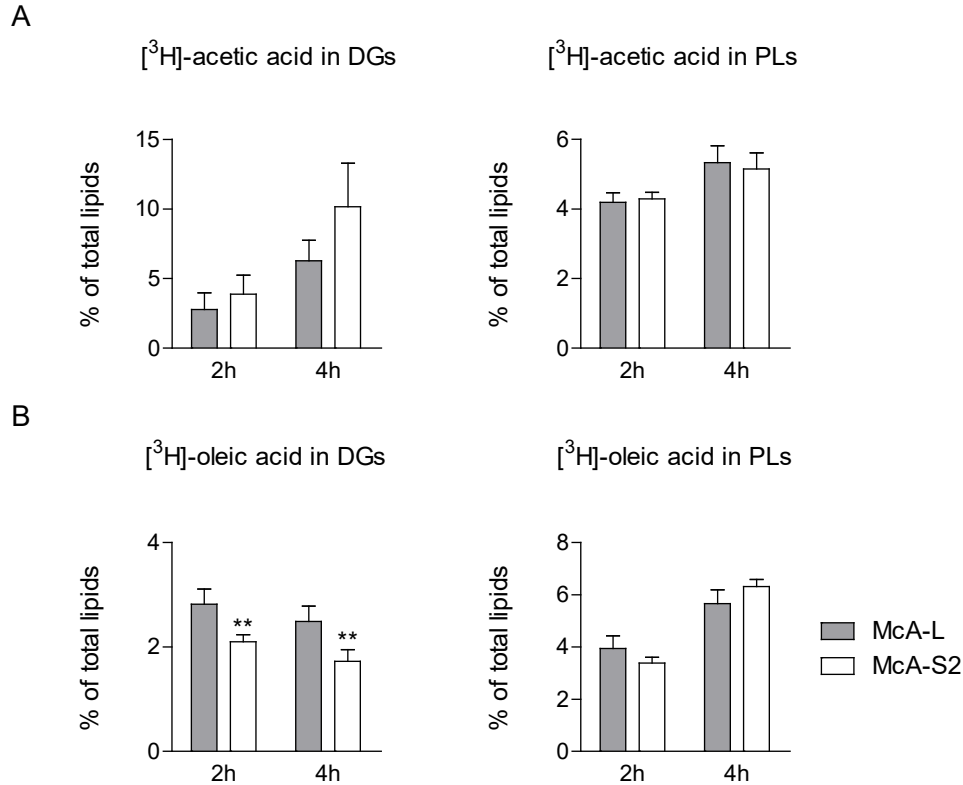
D17 Irudia. Azido azetiko eta azido oleiko (gantz-azidoa) erradioaktiboa kulturen medioan gehitu ondorengo lipido zelularretarako erradioaktibitatearen bideratzea. Zelulan sartu bezain laster azido azetiko (AA, marka gorria) aktibatu egiten da A koentzima (CoA) elkartuta. Hori lipidoen bi biosintesi bide nagusitan erabil daiteke: mebalonatoaren bidean kolesterola ekoizteko edo gantz-azidoen sorreran (lipogenesis) azilglizeridoak ekoizteko. Gantz-azidoak kolesterol esterretan (kolesterolaren metaketarako aldaera) ere inkorporatzen dira. Medioan gehitutako gantz-azido erradioaktiboa (marka berde iluna) ere CoA-rekin aktibatu eta modu primarioan azilglizeridoetan eta kolesteril esterretan inkorporatzen da. Gantz-azidoetatiko erradioaktibitatea kolesterol askean inkorporatu ahal izateko lehenengo oxidazioa jasan behar dute azetil-CoA ekoizteko (marka berde argia). DG, diglizerido, TG, triglizerido, PL, fosfolipido.

Bai AAtik sintetizatu berriak diren FAen zein exogenoki kultibo medioan gehitutako OA erradioaktiboaren inkorporazio saioetan, McA-S zelulek TGen sintesira FA gutxiago bideratzen dutela ikus daiteke (**D18 Irudia**). Emaizta horiek bat datoz lipido edukia karakterizazioan aurkitutakoarekin, aurretik **D15 Irudian** erakutsi den bezala, McA-S zelulen TG edukia McA-L kontrol zelulena baino %49 baxuagoa baita.



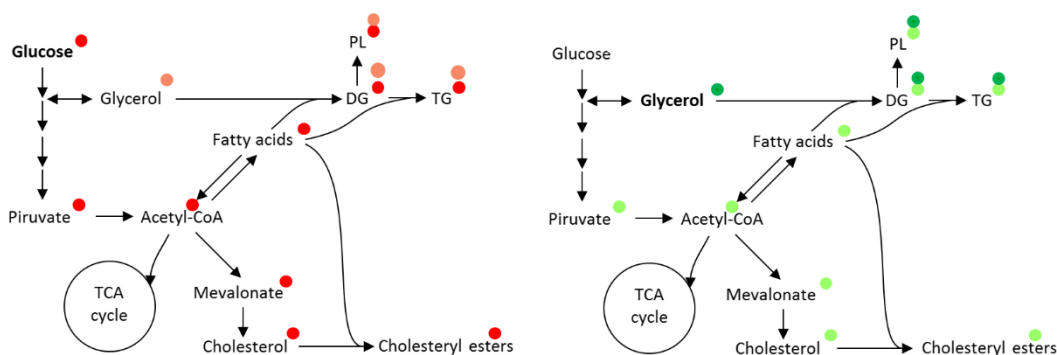
D18 Irudia. Aitzindari metaboliko erradioaktiboaren inkorporazioa triglizeridoetan. 68 h-z 96 mm diametroko plakatan hazitako zelulei 20 μCi [³H]-azido azetiko (AA) edo 15 μCi [³H]-azido oleiko (OA) gehitu zitzaizkien eta 2 edo 4 h ondoren uzatu ziren. Lipidoen erauzketa egin ondoren, geruza fineko kromatografia bidez banatu eta lipido ezberdinen esparruak jaso ziren erradioaktibitatea izarniadura likidoaren bidez kuantifikatzeko. Datuak fosfolipidoetan, diglizeridoetan, kolesterolean, triglizeridoetan eta kolesteril esterretan inkorporatutako erradioaktibitatearen baturarekiko portzentaje bezala adierazi dira. Grafikoei 5 datuen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$.

Are gehiago, badirudi TGen sintesirako beharrezkoa den esterifikazioan egon daitekeela McA-S zelulen muga metabolikoa. Izan ere, zelula horietan TGen sintesi bideko bitartekari diren DGetan eta horiek bitartekari bezala erabiliz sintetizatzen diren PLetan (**D19 Irudia**) AAtik eratorritako FAen esterifikazioa kontrol zelulen maila berekoa da. Exogenoki gehitutako OA erradioaktiboaren esterifikazioan ere ez dirudi mugarik dutenik, mintzen ezinbesteko osagai diren PLetarako erradioaktibitatearen inkorporazioa McA-L kontrol zelulen antzekoa baita ere (**D19 Irudia**).



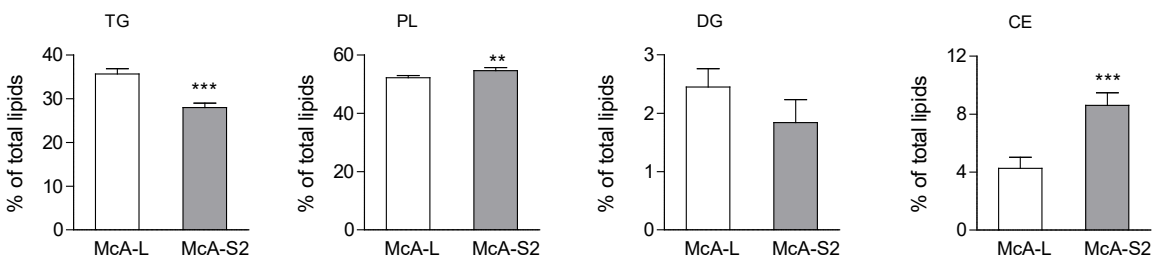
D19 Irudia. Aitzindari metaboliko erradioaktiboen inkorporazioa diglizeridoetan eta fosfolipidoetan. Inkorporazio saioak D18 irudian adierazi den bezala egin ziren (A) [³H]azido azetikoa (AA) edo (B) [³H]azido oleikoa (OA) erabiliz. Datuak fosfolipidoetan (PLetan), diglizeridoetan (DGetan), kolesterolean, triglizeridoetan eta kolesteril esterretan inkorporatutako erradioaktibitatearen baturarekiko portzentaje bezala adierazi dira. Grafikoek 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: ** P ≤ 0,01.

Zelula proliferanteek, bai *in vivo* eta bai kulturaren mantenduta ere, kultura baldintza normaletan, karbono iturri bezala nagusiki erabiltzen duten konposatua glukosa da. Azetil-CoA intrazelularren jatorri metabolikoa elikagai hori izaten da, bai eta azilglizeridoen enbor bezala jokatzen duen glizerolarena ere (**D20 Irudia**). AAtiko eta OAtiko erradioaktibitatearen TGetarako inkorporazio murriztaren testuinguru metabolikoa hobeto ulertzeko, eta karbono iturrien erabilpenaren asaldura orokor bat den ala ez zehazteko, glukosa eta glizerol erradioaktiboen lipidoetako inkorporazioak McA-L eta McA-S lerroetan ezberdinak diren aztertu zen.



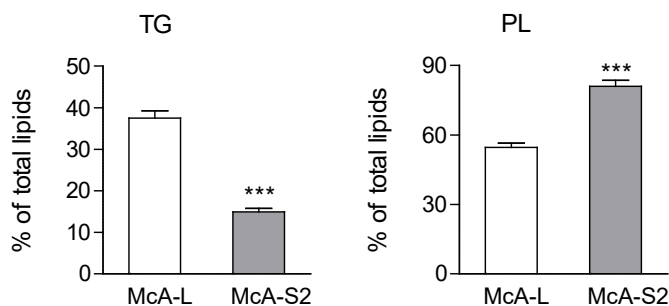
D20 Irudia. Glukosa eta glizerol erradioaktiboak kulturen medioan gehitu ondoren lipido zelularretarako erradioaktibitatearen bideratzea. Zelulan sartu bezain laster glukosa (marka gorri iluna) fosforilatu eta glikolisiaren bidez pirubatorantz eta azetil-A koentzima (CoA)-rantz bideratzen da. Bitartekari glikolitikoen ondorioz azilglizeridoen enborra osatzen duen glizerola ere ekoizten da (marka gorri argia). Markatutako metabolitoa glizerola izanez gero (marka berde iluna), modu primarioan azilglizeridoetan inkorporatzen da. Glizeroletiko erradioaktibitatea lipidoetan azetil-CoA bidez ere inkorporatu daiteke (marka berde argia). DG, diglizeridoa; PL, fosfolipidoa; TCA, azido trikarboxilikoa; TG triglizeridoa.

Gainerako metabolito erradioaktiboaren inkorporazioarekin bezala, McA-S zelulek kontrol zelulek baino glukosaren erradioaktibitate gutxiago inkorporatzen dute TGetan (**D21 Irudia**) baina ez zen ezberdintasunik topatu ez PLetan ez DGetan inkorporatutako erradioaktibitatean. Areago, McA-S2 zelulek erradioaktibitate gehiago inkorporatu zuten PLetan, aurreko datuek bezala, muga TGen sintesiko azken pausuan dagoela iradokitzen duena.



D21 Irudia. Glukosa erradioaktiboaren inkorporazioa lipidoetan. 68 h-z 96 mm diametroko plakatan hazitako zelulei 20 μCi [^{14}C]-glukosa gehitu zitzairen eta 4 h ondoren uztatu ziren. Lipidoen erauzketa egin ondoren, geruza fineko kromatografia bidez banatu eta lipido ezberdinen esparruak jaso ziren erradioaktibitatea izarniadura likidoaren bidez kuantifikatzeko. Datuak fosfolipidoetan (PLetan), diglizeridoetan (DGetan), kolesterolean, triglizeridoetan (TGetan) eta kolesteril esterretan (KEetan) inkorporatutako erradioaktibitatearen baturarekiko portzentaje bezala adierazi dira. Grafikoei 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

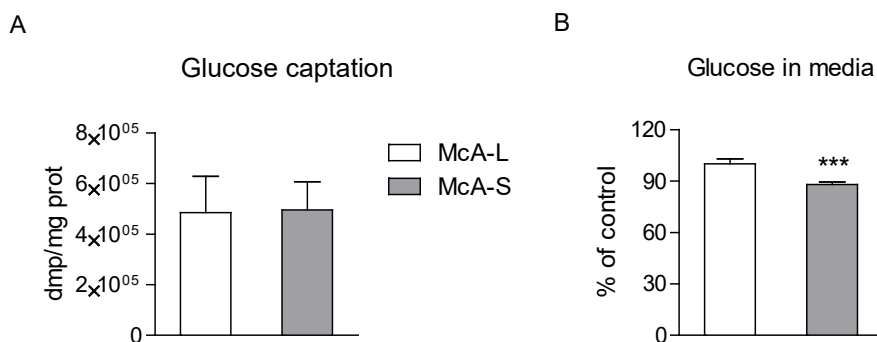
AA eta glukosa erradioaktiboaren lipidoetarako bideratze saioak parekatuz, oso nabarmenak dira azilglizeridoetan inkorporatutako erradioaktibitatearen portzentajeetan dauden ezberdintasunak. 4 h-ko saioetan, AAren kasuan, %20-30 tartean dagoen bitartean (**D18** eta **D19 Irudiak**), glukosaren kasuan %80-85 ingurukoa da (**D21 Irudia**). Pentsa liteke bi substratu mota ezberdinen kudeaketa lipidoen inkorporaziora arte erabat ezberdina izan daitekeela. Ezberdintasun bat glukosa erradioaktibotik TGetara traza erradioaktiboa glizeroletik edota FAetatik bideratu daitekeela da (**D20 Irudia**). Horregatik, glizerol erradioaktiboaren inkorporazioa ere analizatu zen fluxu metabolikoak sakonago aztertzeko asmoz. Glizerolaren traza erradioaktiboa TGen FAetan ere ager daiteke. Izan ere, glizerola glikolisia sar daiteke eta ondorioz azetil-CoA erradioaktiboa sortu FAen sintesian erabiltzeko (**D20 Irudia**). Hala ere, azilglizeridoetako glizerolaren inkorporazio zuzena oso azkar gertatzen denez, FAen bidez TGetan inkorporatu daitekeen erradioaktibitatearekiko bereizteko, glizerol erradioaktiboaren esperimentuan denbora laburretan TGtan agertzen den erradioaktibitatea aztertu zen ere, glizeroletik etorriko litzatekeena gehienbat.



D22 Irudia. Glizerol erradioaktiboaren inkorporazioa triglizeridoetan eta fosfolipidoetan. 72 h-z 96 mm diametroko plakatan hazitako zelulei 2 μCi [^{14}C]-glizerol gehitu zitzairen eta 10 min ondoren uztatu ziren. Lipidoen erauzketa egin ondoren, geruza fineko kromatografia bidez banatu eta lipido ezberdinen esparruak jaso ziren erradioaktibitatea izarniadura likidoaren bidez kuantifikatzeko. Datuak fosfolipidoetan (PLetan), diglizeridoetan, kolesterolean, triglizeridoetan (TGetan) eta kolesteril esterretan inkorporatutako erradioaktibitatearen baturarekiko portzentaje bezala adierazi dira. Grafikoei 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: *** $P \leq 0,001$.

D22 Irudian ikus daiteke McA-S zelulek glizeroletik ere McA-L zelulek baino erradioaktibitate gutxiago inkorporatzen dutela TGetan. Saioa oso laburra (10 min-ko inkorporazioa) izan zen glizerolaren inkorporazio zuzena aztertzeko; azilglizeridoen glizerol enborrean egongo litzateke erradioaktibitatearen gehiengoa. Argi ikus daiteke azilglizeridoen sorrera bideen artean PLena primatuta dagoela TGen ekoizpenarekin parekatuz.

McA-L eta McA-S lerroen arteko ezberdintasun horiek SND1 gainadierazteagatik glukosaren erabilpenean mugaren baten ondorio izan zitezkeen argitzeko, glukosaren erabilera ezberdintasunen bat dagoen aztertu zen. **D23 Irudiak** erakusten du bi lerroek glukosa barneratzeko ahalmen bera izan arren (**D23.A Irudia**), 72 h-z kultibatutako McA-S lerroko zelulen medioan glukosa gutxiago gelditzen dela McA-L kontrol lerroarekin alderatuta eta honek iradokitzen du McA-S lerroaren glukosaren erabilpena altuagoa metabolismo altuago baten ondorio dela.



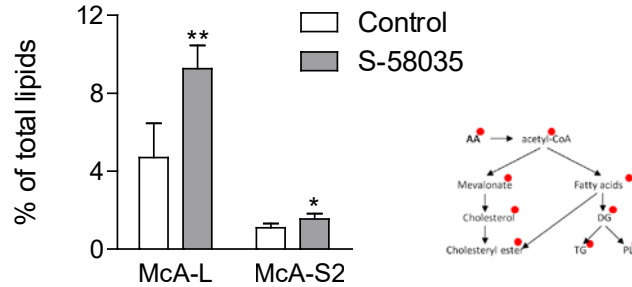
D23 Irudia. McA-L eta McA-S zelulen glukosaren erabilpena. (A) 120.000 McA-L eta McA-S zelula erein ziren 35 mm-ko diametroko plaketan eta $10 \mu\text{Ci}$ $[^{14}\text{C}]$ -glukosa gehitu zen plakako. 2 minutu ondoren zelulak jaso eta berneratutako erradiaktibitate totala neurtu zen. (B) McA-L eta McA-S lerroak 72 h-z kultibatu ziren 96 mm-ko diametroko plaketan esperimenduak egiteko erabilgaitako kondizio berean eta jarraian medioko glukosa kontzentrazioa neurtu zen kit komertzial bat erabiliz. Grafikoeak 4 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: *** $P \leq 0,001$.

2.3. McA-S zelulen gehiegizko kolesterogenesia al da gantz-azidoak triglizeridoetan esterifikatzea mugatzen duena?

SND1 gainadierazten duten zelulen ezaugarri nagusienetako bat kolesterol esterren gain-metaketa izanik, McA-S zelulen TG eduki baxuagoak SND1ek kolesterolaren metabolismoan eragindako alterazioekin nolabaiteko erlazioa izan dezakeen aztertu nahi izan zen. Lehenengo hurbilketa bezala, metabolito erradioaktiboaren inkorporazio esperimenduak kolesterolaren esterifikazioaren inhibitzailea den S-58035 konposatuaren presentzian egin ziren.

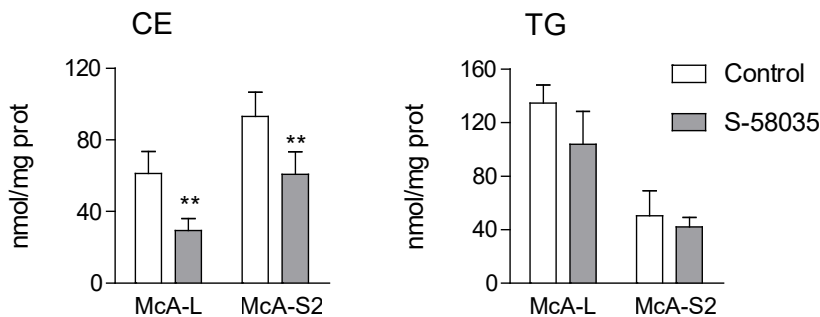
AA erradioaktiboaren inkorporazioaren esperimenduko datuak aztertuz ikus daiteke S-58035 inhibitzailearen presentzian erradioaktibitate gehiago inkorporatzen dela TGetan bi lerroetan (**D24 Irudia**).

Hala ere, McA-S zelulek erakusten duten gehikuntza %30 ingurukoa bada ere, aldaketa horren ekarpena netoki oso xumea da.

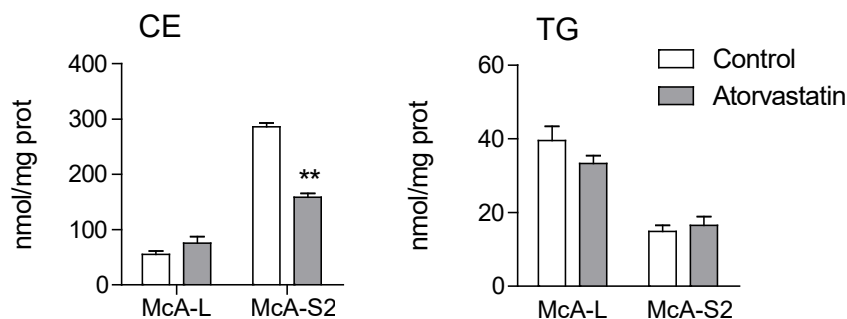


D24 Irudia. Kolesterolaren esterifikazioaren inhibizioaren eragina azido azetiko erradioaktiboaren triglizeridoetarako inkorporazioaren gain. Zelulak 67,5 h-z 96 mm diametroko plakatan hazi ondoren S-58035 konposatua (kolesterol-esterifikazioaren inhibitzaila) gehitu zen mediora eta 30 min azido $[^3\text{H}]$ -azetikoaren 20 μCi -tako traza bat gehitu zen. 4 h geroago zelulak uztatu eta lipidoen erauzketa egin zen, beren edukiaren karakterizazioa geruza fineko kromatografiaren bidez egiteko. Datuak fosfolipidoetan (PLEtan), diglizeridoetan (DGetan), kolesterolean, triglizeridoetan (TGetan) eta kolesteril esterretan inkorporatutako erradioaktibitatearen baturarekiko portzentaje bezala adierazi dira. Grafikoak 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten ditu. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ lerro bakoitzean S-58035 konposatuaren eragina adierazteko.

AA ren inkorporazio esperimentuan behatutakoarekin bat datoz lipido edukiaren analisiaren emaitzak (**D25 Irudia**): S-58035 konposatuarekin tratatutako zeluletan esperotako CE edukiaren jaitsiera behatu zen arren (% 55-ekoa eta %35-ekoa McA-L eta McA-S zeluletan, hurrenez hurren) ez da TG edukian igoerarik ikusten.



D25 Irudia. Kolesterolaren esterifikazioaren inhibizioaren eragina zelulen kolesteril ester (CE) eta triglizerido (TG) edukiaren gain. Zelulak 67,5 h-z 96 mm diametroko plakatan hazi ondoren S-58035 konposatua (kolesterol-esterifikazioaren inhibitzaila) gehitu zen mediora. 4 h geroago zelulak uztatu eta lipidoen erauzketa egin zen, beren edukiaren karakterizazioa geruza fineko kromatografiaren bidez egiteko. Grafikoek 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$ lerro bakoitzean S-58035 konposatuaren eragina adierazteko.



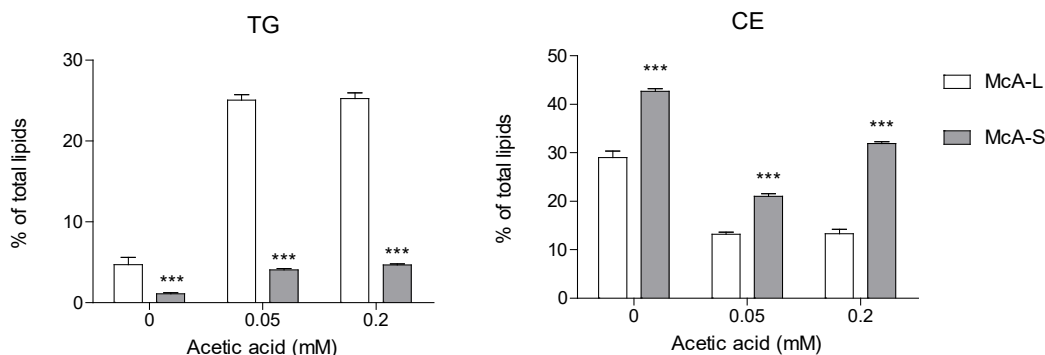
D26 Irudia. Kolesterolaren sintesiaren inhibizioaren eragina zelulen kolesteril ester (CE) eta triglicerido (TG) edukiaren gain. Zelulak 68 h-z 96 mm diametroko plakatan hazi ondoren atorbastatina konposatua (HMGCRen inhibitzailea) gehitu zen mediora. 4 h geroago zelulak uztatu eta lipidoen erauzketa egin zen, beren edukiaren karakterizazioa geruza fineko kromatografiaren bidez egiteko. Grafikoek 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$ lerro bakoitzean atorbastatina konposatuaren eragina adierazteko.

Kolesterolaren esterifikazioa inhibitzea ez da nahikoa McA-S lerroaren AAren TGetarako bideraketa nabarmenki handitzeko (**D24 Irudia**) ez eta TG edukian aldaketarik eragiteko ere (**D25 Irudia**). Jarraian, kolesterolaren sintesiko pausu erregulagarri nagusia burutzen duen HMGCRCR entzimaren inhibitzaile den atorbastatina konposatuarekin inkubatutako kultiboen TG edukia analizatu zen. **D26 Irudian** ikus daiteke kolesterolaren sintesiaren inhibitzeak ez duela eraginik ez McA-L ez McA-S zelulen TG edukian.

Inhibitzaileen presentzian egindako saio horiek McA-S zeluletan aitzindari lipogenikoak CEen sintesira bideratzeak TGen sintesia neurri txiki batean besterik ez duela mugatzen frogatzen dute. Hemen erakusten ez den arren, kolesterol exogenoaren (LDLen) gehikuntzarekin egindako saioen emaitzek hori baieztatzen dute. Analisi guzti horiek iradokitzen dute McA-S zelulen gehiegizko kolesterogenesiak ez duela substratu (azetil-CoA) mailako mugarik suposatzen TGen ekoizpenerako.

Modu zuzenagoan erakusteko ideiarekin, exogenoki AA gehitu zen azetil-CoA-ren eskuragarritasuna igotzeko eta egoera horretan AA erradioaktiboaren inkorporazioa analizatu zen. **D27 Irudian** ikusten da, AAren kontzentrazio ezberdinak gehituz azetil-CoA zitosolikoaren eskuragarritasuna handitzen denean McA-

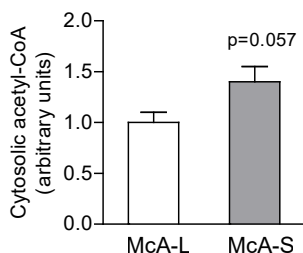
S zeluletan TG edukiaren igoera oso txiki bat ikusten dela. McA-L lerroan ikusten den igoerarekin alderatuta, McA-S zeluletan ematen denak ekarpen minimoa suposatzen du zelulako lipido eduki totallean.



D27 Irudia. Azido [³H]azetikoaren inkorporazioa triglizeridoetan (TGetan) eta kolesteril esterretan (CEetan) azido azetikoaren kontzentrazio ezberdinetan. Zelulak 68 h-z 96 mm diametroko plakatan hazi ondoren azido azetikoaren 0,05 edo 0,2 mM gehitu zen kultura medioan [³H]azetikoaren 20 µCi-ko traza batekin batera. 4 h geroago zelulak uztatu eta lipidoen erauzketa eta analisisia egin ziren. Grafikoek 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: *** P ≤ 0,001.

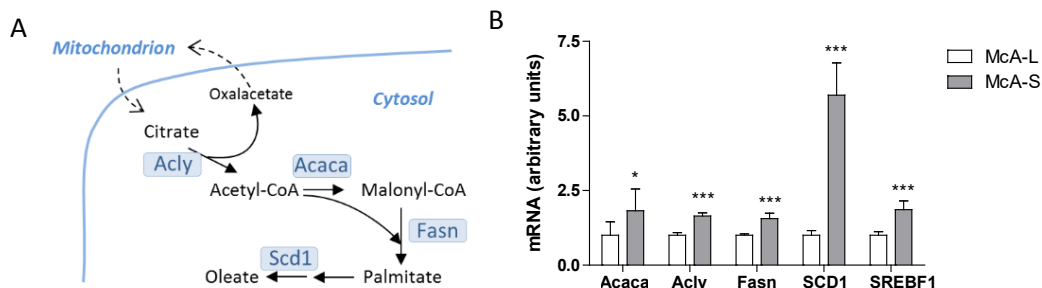
2.4. McA-S zelulen azetil-CoA zitosolikoa eta NADPH ez dira gantz-azidoen sintesirantz bideratzen

Azetil-CoA zelulako metabolito bitartekari zentrala da eta horren kontzentrazioak bide anaboliko eta katabolikoaren arteko orekan eragin zuzena du. Bi lerroen zitosoleko azetil-CoA (lipidoen sintesirako erabilgarria dena) neurtu zen, horren eskuragarritasunean ezberdintasunak dauden aztertzeko. Analisisiek erakusten dute McA-S zelulek ez dutela azetil-CoA zitosolikoaren eskuragarritasun baxuagoa (**D28 Irudia**).



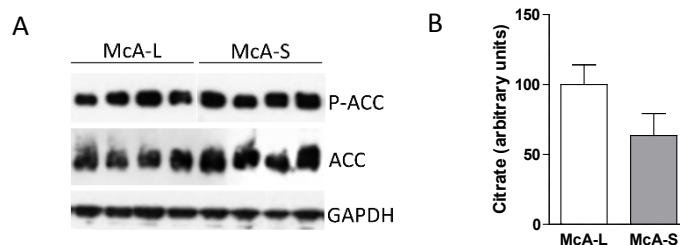
D28 Irudia. Zitsoleko azetil-A koentzima edukia. McA-L eta McA-S zelulen zitosola isolatu eta ultrairagazketaz desproteinizatu ondoren, kit komertzial bat erabiliz neurtu zen azetil-A koentzima (CoA). Grafikoak 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten ditu. Student-en t testa: P balioa grafikoan adierazten da.

Azetil-CoA-ren eskuragarritasuna mugatzailea ez dela baieztatu ondoren, FAen sintesirako entzima garrantzitsuen eta lipogenesi prozesuan parte hartzen duten (**D29.A Irudia**) beste proteina batzuren adierazpena aztertu genuen.



D29 Irudia. Gantz-azidoen sintesian parte hartzen duten gene garrantzitsuen adierazpena. (A) Gantz-azidoen sintesi bidearen eskema eta programa lipogenikoan garrantzitsuak diren beste prozesuak. (B) Adierazitako geneen mRNA maila erlatiboak RT-qPCR bidez neurtu ziren, normalizatzaile bezala Gapdh-ren mRNA mailak erabiliz. Grafikoak 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten ditu. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$.

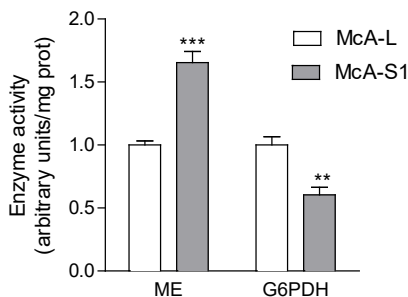
D29.B Irudian ikus daiteke programa lipogeniko osoaren adierazpena handituta dagoela SND1 gainadierazten duten zeluletan. Oso nabarmena da estearoil-CoA desaturasaren (SCD1en) gainadierazpena; proteina horrek OA bezalako FAen 9. karbonoko lotura bikoitzaren ezarketan joketzen du. Testuinguru honetan, aipatzekoa da OA preferenteki erabiltzen dela kolesterolaren esterifikazioan (Chang et al., 1997). Proteina horien artean, lipogenesiaren fluxuaren mugatzaile nagusia ACC (Acaca geneari dagokiona) da.



D30 Irudia. Azetil-A koentzima karboxilasaren erregulazioa. (A) Azetil-A koentzima karboxilasaren (ACC-ren) 79 serinaren fosforilazioa (P-ACC) *western blot* bidez analizatu zen. Erreferentzia gisa ACCren maila totala eta GAPDH detektatu ziren, kale bakoitzean 15 μ g proteina aplikatuz. (B) Zitosoleko zitrato edukia. Grafikoak 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten ditu.

Bere adierazpenaz gain, ACCren jarduera entzimatikoa erregulagarria da; horretan azetil-CoA-ren emaile zitosolikoa den (**D29.A Irudia**) zitrato kontzentrazioa eta, bereziki, fosforilazio egoera dira garrantzitsuak. **D30.A Irudian** ikus daitekeenez ez dago ezberdintasunik ez adierazitako ACC proteina kantitatean eta ez bere fosforilazio egoeran ere bi lerroen artean. Gauzak horrela, jardueraren erregulazioan espero litekeen mekanismorik garrantzitsuena modulazio alosterikoa da, zitrato kontzentrazioaren eta azil-CoA-en kontzentrazioen menpekoa. Zittratoaren kontzentrazioa McA-S zeluletan McA-L zeluletan baino txikiagoa den arren, ezberdintasuna ez da esanguratsua (**D29.B Irudia**), ACC jardueraren erregulazioa bi lerroetan antzekoa dela iradokitzen duena.

Azetil-CoA-ren erabilpenaz gain, kolesterolaren sintesiak eta FAenak komunean daukate NADPHaren erabilpena elektroien emaile gisa. NADP⁺ aldaera oxidatuaren erredukzioan bi erreakzio dira nagusi: glukosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, *glucose 6-phosphate dehydrogenase*) eta entzima malikoa (ME, *malic enzyme*) entzimek katalizatutakoak. Horien jarduerak mugaren bat suposatzen duen aztertzeko zitostol erauzkien NADPH ekoizpena espektrofotometrikoki neurtu zen entzima bakoitzaren substratu espezifikoak erabiliz.



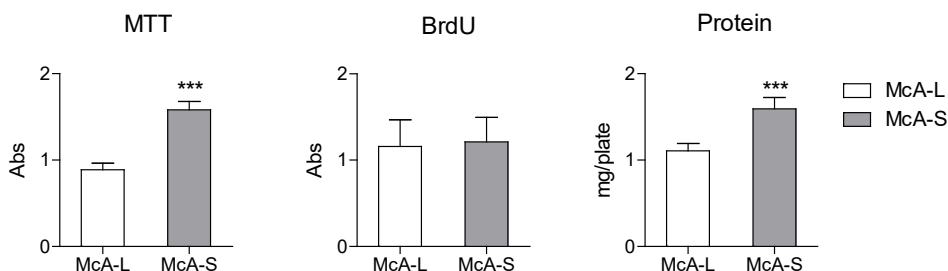
D31 Irudia. NADP⁺ zitostolikoaren entzima erreduzitzaileen aktibitatea. 72 h-ko kultibotako McA-L eta McA-S zelulen zitostola isolatu eta entzima maliko (ME) eta glukosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) jardueren neurketa egin zen NADPH-aren neurketa espektrofotometrikoaren bidez. Grafikoak 3 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten ditu. Student-en t testa: ** P < 0,01, *** P < 0,001.

D31 Irudian ikus daiteke ME zitostolikoaren jarduera %65 altuagoa zela McA-S zeluletan McA-L zeluletan baino. Pentosa fosfatoen bidezko G6PDH entzimaren jarduera ordea %40 baxuagoa zen McA-S zelulen erauzkietan.

Horago komentatu den bezala aitzindari erradioaktiboen lipidoetarako bideratze saioetan glukosaren kasuan %80-85 inguru bideratzen da azilglizeridoetara (**D21 Irudia**), AAaren parte handi bat kolesterolerantz bideratzen den bitartean (**D6 Irudia**). Horrekin batera, G6PDHren bidez ekoiztutako NADPH erabiliko balitz

nagusiki TGen sintesirako, **D31 Irudiko** emaitzak ikusita pentsa liteke glukosaren erabilpenean egon daitekeela TGen ekoizpenaren muga.

Minbizi zeluletan glukosaren erabilera garrantzitsuetako bat biomolekulen ekoizpenerako beharrezko energiaren lorpenerako da. McA-S zeluletan, nahiz eta bikoizte abiadura (BrdU-ren inkorporazio bezala neurtua) McA-L zelulen berdina izan (**D32 Irudia**), tasa metabolikoa (MTT saioaren bidez neurtua) altuagoa da, zelulen proteina eduki altuagoarekin bat datorrena.

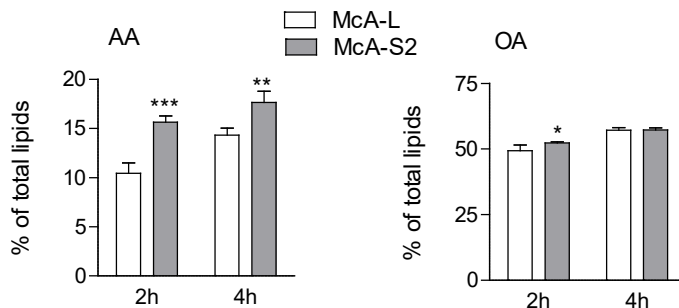


D32 Irudia. McA-L eta McA-S zelulen tasa metabolikoaren eta proteina kantitatearen neurketa. 72 h-ko kultibotako McA-L eta McA-S zelulen (A) tasa metabolikoa (MTT saioaren bidez), (B) bikoizte tasa (BrdU-ren inkorporazioaren bidez) eta (C) proteinaren eduki totala (BCA metodoaren bidez) neurtu ziren. Grafikoeak 48 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte MTT saioaren kasuan, 24 daturenak BrdU-ren kasuan eta 5 daturenak proteina kantitatearen neurketan. Student-en t testa: *** P < 0,001.

Emaitza horiek McA-S zelulek energia behar altuagoa dutela iradokitzen dute, ziurrenik bai aurretik deskribatutako kolesterogenesi altuagoa, bai proteina sintesi altuagoa mantentzeko. Horrek azal lezake McA-S zelulen glukosaren erabilpena altuagoa izatea (**D23 Irudia**), G6PDHren bitartez NADPH ekoizteko eskuragarritasunaren murrizketaren arrazoia izan litekeena.

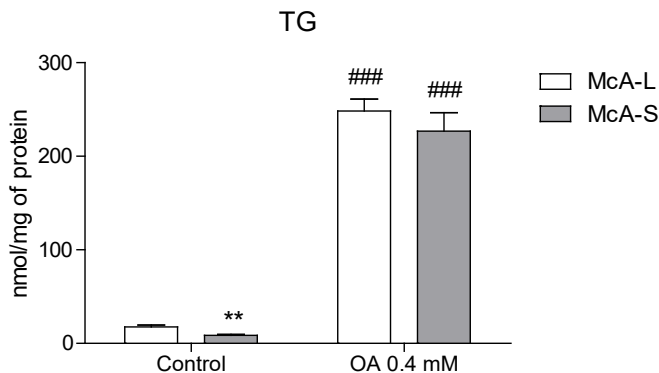
Badirudi, beraz, McA-S zelulen TG eduki baxuaren mugatzailea beren behar energetiko altuaren ondorioz TGen sintesirako erabiltzen den G6PDH bidezko NADPHaren ekoizpena izan daitekeela. Zelulen egoera energetikoa aldatuta TGen sintesian aldaketak dauden ikusteko, jarraian FA exogenoen eskuragarritasuna handituz Aaren zein Oaren inkorporazioa TGetan aztertu genuen. FAK mitokondrioan sartuko lirarteke eta energia iturri gisa erabil litezke glukosaren erabilpen hori murriztuz eta horrela, glukosa G6PDHren bitartez NADPH ekoizteko erabil liteke, McA-S zelulen fenotipoa errebertitzeko. **D33 Irudian** ikus daiteke 400 μ M Oaren presentzian AA erradioaktiboaren inkorporazioa TGetan igo egiten dela McA-S zeluletan, McA-L

kontrol zelulen mailatik gora gainera. Bestalde, Oaren inkorporazioa esteatosi egoeran kontrol zelulen maila berekoa izatera pasatzen da.



D33 Irudia. Aitzindari metaboliko erradioaktiboaren inkorporazioa triglizeridoetan kondizio proesteatotikoan. Saioa D18 irudian adierazitakoaren arabera egin zen, aitzindari erradioaktiboekin batera 400 μ M azido oleiko (OA) gehituta. Datuak fosfolipidoetan, diglizeridoetan, kolesterolean, triglizeridoetan eta kolesteril esterretan inkorporatutako erradioaktibitatearen baturarekiko portzentaje bezala adierazi dira. AA, azido azetiko. Balioek 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

Fluxu metabolikoak aztertzeaz gain, horien aldaketek benetan zelulako TG edukian eraginik zuten aztertu ahal izateko, FAK exogenoki gehitu eta lipido karakterizazio bat egin zen. **D34 Irudian** ikus daiteke FA exogenoak gehitzean McA-S zelulen TG edukia kontrol zelulen mailarekin parekatzen dela.



D34 Irudia. McA-L eta McA-S zelulen triglizerido edukia azido oleiko exogenoaren presentzian. 64 h-tan kultibatutako McA-L eta McA-S zelulei albuminarekin akonplejatutako 0,4 mM azido oleiko (OA) edo albumina gehitu zitzairen eta 8 h-ko tratamenduaren ostean lipido erauzketa egin eta triglizeridoa neurtu zen geruza fineko kromatografiaren bidez. Grafikoak 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten ditu. Student-en t testa: ** $P \leq 0,01$ lerroen arteko konparaketarako, ### $P \leq 0,001$ lerro bakoitzean esteatosiaren eragina aztertzeko.

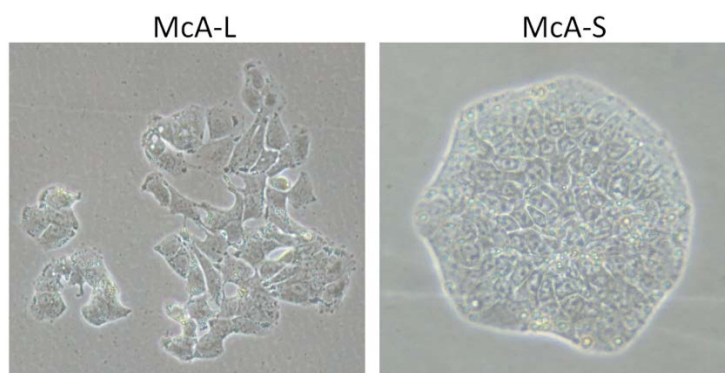
3. Zelulen morfologia

Emaizten kapituluko 1 eta 2 ataletan SND1en gainadierazpenak lipidoen metabolismoan eragiten dituen alterazioak deskribatzen dira; horien artean, 1.2 azpiatalean McA-S zelulen CEen gainmetaketa eta 1.3 azpiatalean McA-S zelulen mintzeko kolesterol eduki altuagoa. Aski ezaguna da mintzetako kolesterol edukiaren garrantzia horien fluidotasuna, zurruntasuna eta elastikotasuna bezalako propietateetan. Gainera mintzeko proteinen kokapenean eta erregulazioan funtzio garrantzitsua betetzen du.

Gainera, behaketa hutsarekin ikus daiteke McA-L eta McA-S lerroen artean ezberdintasun argiak daudela ezaugarri morfologikoetan. Testuinguru horretan, aldaketa morfologiko horiek SND1en gainadierazpenaren ondoriozko kolesterolaren metaketak eragindakoak diren aztertu nahi izan zen.

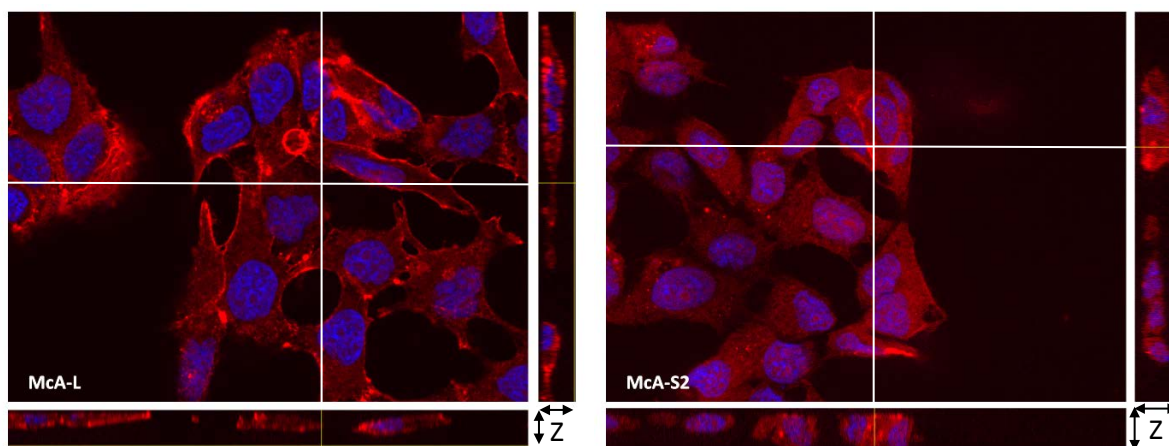
3.1 SND1 gainadierazten duten zelulak kontrolak baino borobilagoak dira eta beren artean estuki lotuta mantentzen dira

Zelulen morfologia karakterizatzeko lehenengo gerturatze bezala **D35 Irudia** bi lerroen mikrografiak aurkezten dira. McA-L lerroko zelulek morfologia zapalagoa dute eta McA-S zelulek baino luzakin gehiago izaten dituzte. Bestalde, McA-S lerroko zelulen morfologia borobilagoa da, ez hain zapala eta luzakin gutxiagorekin (**D35 Irudia**). Gainera, McA-L zelulek sortzen dituzten koloniak nahiko laxoak dira, beti ere zelulen arteko hutsune guztiak bete gabe. McA-S zelulek eratutako koloniak ordea, konpaktuagoak dira, zelula askoz osaturikoak, eta zelulen artean hutsunerik utzi gabe.



D35 Irudia. McA-L eta McA-S zelulen fase kontrasteko mikrografiak. Zelulak gelatinaz estalitako plakatan hazi ondoren, argazkiak alderantzizko mikroskopia optiko batekin egin ziren x10 objektiboarekin.

Zelulen barne egitura aztertzeko zitoeskeletoko osagai nagusia den aktina proteinaren aurkako antigorputzak eta horien aurkako antigorputz fluoreszenteak erabili ziren. Egituratutako argiztapenaren bidez, planu fokalen fluoreszentsia Apotome II mikroskopioan Z ardatzeko argazki seriatutan jaso zen, 3 dimentsioetako egitura azertu ahal izateko. **D36 Irudian** erakusten den bezala, McA-S zelulak altuagoak dira (Z ardatzean) McA-L kontrol zelulen aldean. Irudi honetan ez da **D35 Irudian** erakutsitako kolonien morfologia hain argi ikusten, izan ere, fluoreszentsiako mikroskopiako erabilitako soportea beirazkoa izan ohi da eta bertan lerroen itsaskortasuna mugatua da. Hala ere, zelulen eta soportearen arteko kontaktuari dagokionez, argi ikusten da McA-L zelulek kontaktu zabalagoa dutela McA-S zelulek baino.



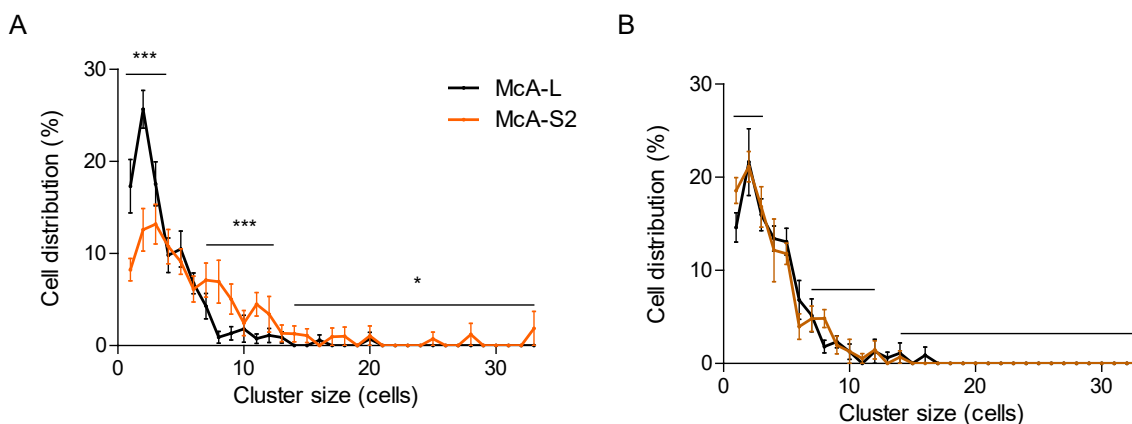
D36 Irudia. Zelulen aktinaren hiru dimentsioetako banaketa. DNA Hoechst tindagai urdinarekin eta aktina antigorputz fluoreszente gorriarekin tindatu ziren planu fokalen argazkiak jasotzeko Apotome II erabiliz. Jasotako Z ardatzeko argazkiekin, marra zurien luzeran, Z-X eta Z-Y planuetako irudiak eraiki ziren.

3.2 McA-S zelulen arteko lotura estuak Ca^{2+} -aren menpekoak dira

McA-L eta McA-S lerroetako kolonien irudiak (**D35 Irudia**) konparatuz pentsa daiteke McA-S lerroak zelula-zelula arteko lotura sendoagoak dituela eta horregatik zelula horiek kolonia trinkoagoak osatzen dituztela. Zelulen adhesio molekula (CAM, *cell adhesion molecule*) talde ezberdinak daude eta talde bakoitza lotura mota espezifiko batzuen arduraduna da. Bost talde nagusi bereizten dira: immunoglobulin superfamilia, kadherinak, selektinak, muzinak eta integrinak. Horien artean kadherinekin eta selektinekin Ca^{2+} menpeko loturak sortzen dituzte eta bien artean kadherinak dira nagusiki zelula-zelula loturen arduradunak

McA-S zelulen arteko lotura tinkoak Ca^{2+} -aren menpekoak diren aztertzeo asmoarekin, hazkuntza ontzitik tripsinarekin askatzean lortutako kolonien analisi kuantitatibo bat burutu zen hemozitometro bat erabiliz; mikrokopioan tamaina ezberdinetako zelula taldeetan banatutako zelula kopurua zenbatu zen. Analisia bi modutan egin zen: alde batetik kulturak tripsinizatu eta zuzenean mikroskopia behatuz eta bestetik tripsinizatu aurretik EGTArekin inkubazio labur bat egin. EGTA Ca^{2+} ioiekiko nahiko selektiboa den agente kelante bat izanik, tratamendu horren helburua kadherinekin eta selektinekin eraturako Ca^{2+} menpeko loturak desegonkortzea eta zelulen arteko loturen gain eraginik zegoen ikustea izan zen.

EGTArekin tratatu gabeko McA-L eta McA-S zelulen behaketa eta zenbaketa (**D37.A Irudia**) ikus daiteke McA-L zelula gehienak aske daudela edo 2-3 zelulatako taldeak sortzen dituztela gehienez. Gainera, 7 zelula baino gehiagoz osaturako taldeak oso gutxi dira. McA-S zeluletan ordea, 2-7 zelulaz osaturako talde asko dagoen arren, McA-L lerroaren kasuan baino zelulen portzentai altuago bat aurkitu zen talde handiagoetan. Talde horiek batez ere 7-12 zelulaz zeuden osatuta baina kasu batzuetan 14-33 zelulaz osaturiko taldeak behatu ziren.

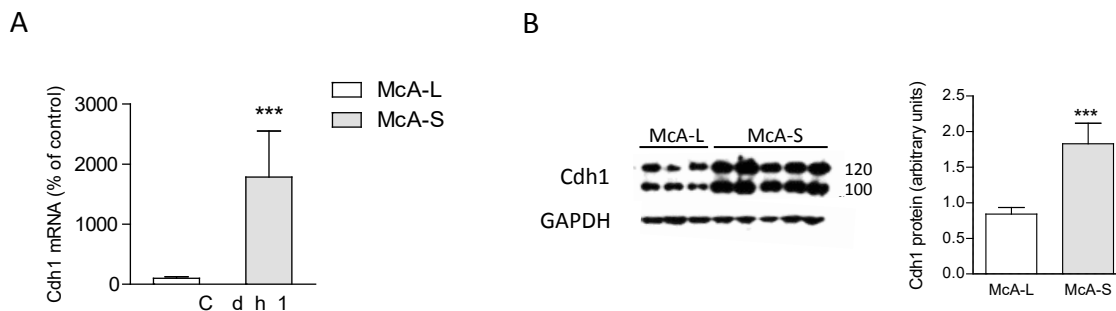


D37 Irudia. McA-L eta McA-S lerroen taldeen zelula kopuruaren azterketa. 72 h-z kultibatutako zelulak tripsinarekin altxatu ondoren tamaina ezberdinetako taldeen zelula kopurua hemozitometro bat erabiliz mikroskopia optiko batean behatuz zenbatu ziren. Zenbaketa bakoitzean zelula kopuru totala eta zelula horiek taldeetan duten banaketa kuantifikatu ziren. Tripsinarekin tratatu aurretik inolako tratamendurik gabe (A) eginiko saioan lerro bakoitzaren 10 kultura hirukoitzean analizatu ziren eta %0,05 EGTArekin 5 min-z tratatuz (B) egindakoetan 5 kultura analizatu ziren hirukoitzean ere. Balioek batezbestekoak eta desbiderapen estandarrek adierazten dituzte. Bi bideko ANOVA lerro horizontalekin adierazitako tarteeetan egin zen: * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$.

Zenbaketa aurretik zelulak EGTArekin tratatu zirenean, bi lerroen arteko ezberdintasunak desagertu ziren eta bi lerroetan zelula gehienak aske edo 2-5 zelula arteko kolonietan behatu ziren (**D37.B Irudia**).

Ezberdintasuna bereziki nabaria da McA-S lerroan, non EGTaren tratamenduaren ondoren 7-12 zelulako kolonia kopurua esanguratsuki jeitsi zen eta ez zen 15 zelula baino gehiagoko koloniarik behatu.

Datuek iradokitzen dute McA-S lerroan zelula-zelula lotura sendoagoak eta kolonia konpaktoagoak sortzearen arduradunak Ca^{2+} -aren menpeko CAMak direla. Horien artean, zelula-zelula arteko loturen arduradun nagusiak kadherinak dira eta kadherinen familiaren barruan, hepatozitoak bezalako polarizatutako zelula epitelialen arteko loturak E-kadherina (Cdh1 geneari dagokiona) bidezkoak dira nagusiki. Beraz, jarraian McA-L eta McA-S lerroetan E-kadherinaren adierazpena analizatu zen gene eta proteina mailan. **D38 Irudian** erakusten da McA-S zelulek kadherina gehiago adierazten dutela bai mRNA mailan eta baita proteina mailan ere.



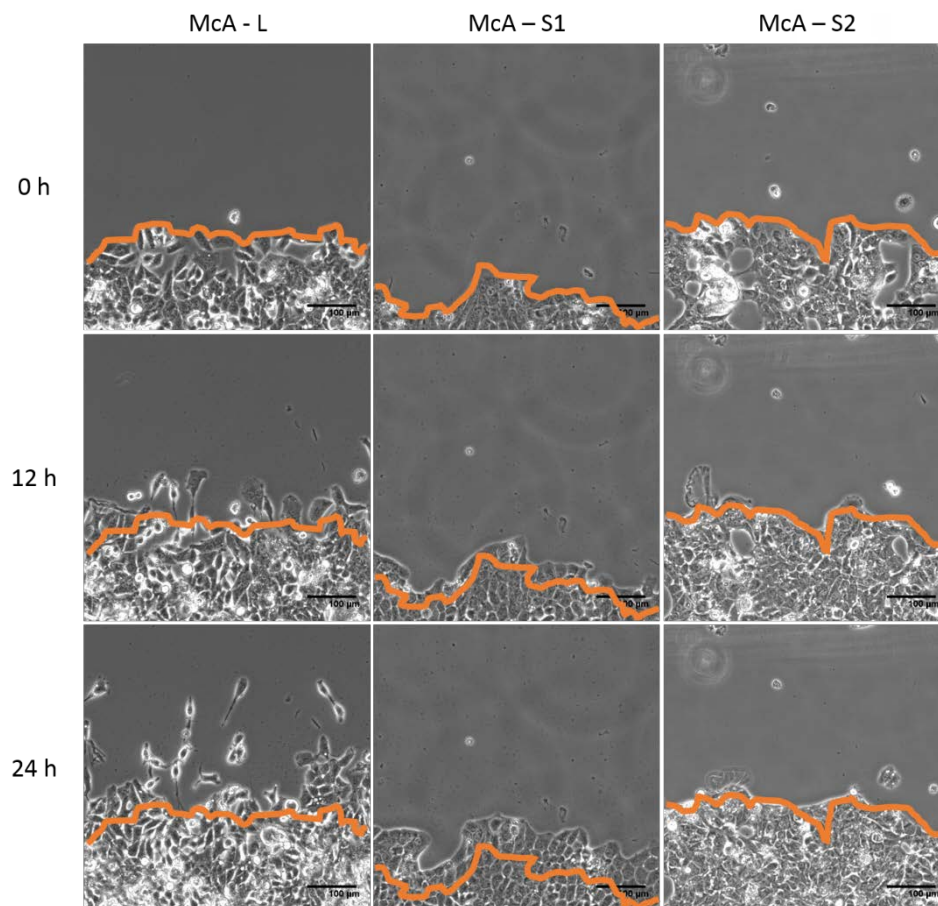
D38 Irudia. E-kadherinaren adierazpena. (A) Cdh1 genearen mRNA maila erlatiboak RT-qPCR bidez neurtu ziren, normalizatuzile bezala Gapdh-ren mRNA mailak erabiliz. (B) E-kadherinaren proteina mailako adierazpena *western blot* bidez analizatu zen GAPDHren adierazpena erabiliz normalizaziorako. Balioek 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: *** $P \leq 0,001$.

3.3 McA-S zelulen arteko loturek mugikortasuna mugatzen dute

SND1 gainadierazten duten zelulen eta kontrolen arteko zelulen morfologian eta beren arteko loturetan ezberdintasunak daudela kontuan hartuz, pentsa liteke mugikortasunean ere ezberdintasunak izan ditzaketela. Hori aztertzeke lehenengo gerturapen bezala McA-L, McA-S1 eta McA-S2 lerroak konfluentziara heldu arte hazi ziren silikonazko intsertodun mikroskopiarako plaka berezietan, intsertoa kendu ondoren monogeruzaren alboan zelularik gabeko tarte (zauri) bat sortzeko. Intsertoa kendu zen momentutik zelulen hazkuntza analizatu zen 24 h-z zelularik gabeko hutsunea nola betetzen zen aztertzeke.

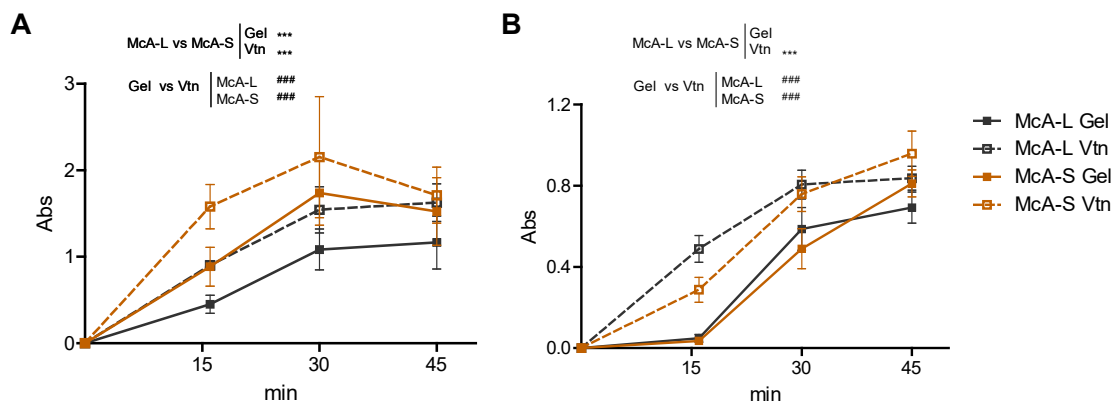
D39 Irudian ikusten den bezala, McA-L zelulek eta SND1 gainadierazten duten McA-S1 eta McA-S2 lerroek espazioa betetzeko modu ezberdina erakusten dute. McA-L zelulen artean hutsuneak egon arren, zelula solteak frontetik askatu eta zelula gabeko hutsunerantz mugitzen dira norabide ezberdinetan bata

bestearengandik aldeniduz. McA-S lerroetako kulturetan ordea ez da horrelakorik ikusten. McA-S1 lerroko zeluletan ikus daiteke zelulak bloke bat bezala mugitzen direla, beren arteko loturak askatu gabe guztiak noranzko berean. McA-S2 zelulen kasuan gainera ikus daiteke zelulen arteko hutsuneak guztiz bete arte ez dela frontea mugitzen. Beraz, esan daiteke SND1en gainadierazpenak mugikortasunean nolabaiteko eragina duela, ziurrenik, 3.2 atalean deskribatutako kadherina bidezko zelula-zelula arteko lotura sendoagoengatik.



D39 Irudia. McA-L, McA-S1 eta McA-S2 zelulen zauriaren osatze (*wound-healing*) saioak. Mikroskopiarako plaka bereziak gelatinarekin tratatu ondoren silikonazko intserto esterilak jarri zitzaizkien; intsertoaren putzu bakoitzean 21.000 zelula eroin ziren. 12 h-z itsasten utzi eta intsertoa kendu ondoren zelula gabeko 0,5 mm zabalerakoko hutsune bat sortu zen. Zelulak 24 h-z mantendu ziren 37 °C-tan eta mikrografiak 20 min-ro jaso ziren Biostation mikroskopioan. Hasieran eta 12 eta 24 h-tan lortutako mikrografia adierazgarriak erakusten dira.

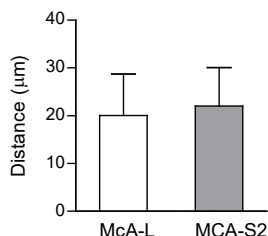
McA-S lerroko zelulek beren artean kohesibotasun maila altuagoa erakusten dute eta horrek gainazalarekin duten adhesio mailan edota mugikortasunaren abiadura eraginik duen aztertu nahi izan zen. Alde batetik itsaskortasun saioak egin ziren lerro zelularren zelulaz kanpoko matrizeari itsasteko abiadura aztertzeko. Saio horietarako plakak bi modutan estali ziren, errutinaz lerroen kulturarako erabilitako gelatinarekin (1 kolagenoa nagusiki) eta gelatinarekin batera adhesioa sustatzen duen bitronektina (Vtn, *vitronectin*) gehituta. **D40.A** Irudian ikus daiteke McA-S zelula gehiago itsasten direla plaka estalira eta gainera bi lerroek Vtn-dun matrizean itsaskortasun handiagoa erakusten dutela. Dena den, McA-S lerroko datuen desbiderapenak ikusita eta 3.2 atalean deskribatutako kolonia handiak eratzeko joera kontuan hartuz, itsaskortasun saioak EGTarekin aurretratatutako zelulekin errepikatu ziren, kolonia handiak eratzeko ekidin eta zelula askeen itsaste gaitasuna aztertu ahal izateko. Datuak **D40.B Irudian** ikus daitezke. EGTarekin aurretratatutako zeluletan ez zen ezberdintasunik aurkitu McA-L eta McA-S zelulen artean itsaskortasunari dagokionez. EGTarekin aurretratu gabeko saioen kasuan bezala, bi lerroek itsaskortasun maila altuagoa erakutsi zuten Vtn-dun matrizean.



D40 Irudia. McA-L eta McA-S2 zelulen itsaskortasun saioak. 96 putzuko plakak gelatinarekin (Gel) edo gelatinarekin eta bitronektinarekin (Vtn) estali ziren gau osoan zehar eta 30.000 zelula erein ziren putzuko. 15, 30 eta 45 min-z utzi ziren zelulak itsasten. Itsatsi gabeko zelulak kendu, itsatsitakoak finkatu eta zelula kopurua kuantifikatzeko DNari lotzen zaion kristal bioletarekin tindatu ziren 590 nm-ko absorbantzia neurtzeko. (A) EGTarekin aurretratu gabeko zelulak eta (B) aurretratatutakoak. Balioek 5 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Bi bideko ANOVA *** $P \leq 0,001$ lerroen arteko konparaketarako eta #### $P \leq 0,001$ lerro bakoitzean Vtn-ren eragina aztertzeko.

Bestalde, zelulen mugikortasun ahalmena kuantifikatzeko, 35 mm-ko plaketan 300.000 zelula erein eta 12 h-z itsasten utzi ondoren eremu ezberdinetan mikrografiak hartu ziren BioStation batean 24 h-z. Argazkiekin *time-lapse* bideoak eraiki ziren. Lerro bakoitzeko zoriz zelula ezberdinak aukeratu eta beren ibilbidearen jarraipena egin zen ImageJ erabiliz. Aurretik **D39 Irudian** bi lerroek konfluentzian daudenean mugitzeko

modu ezberdina dutela erakusten den arren, saio honetan, konfluentziaren %40-50 inguruan egin zenean, ez zen ezberdintasunik aurkitu 24 h-tan mugitutako distantzian (**D41 Irudia**) .



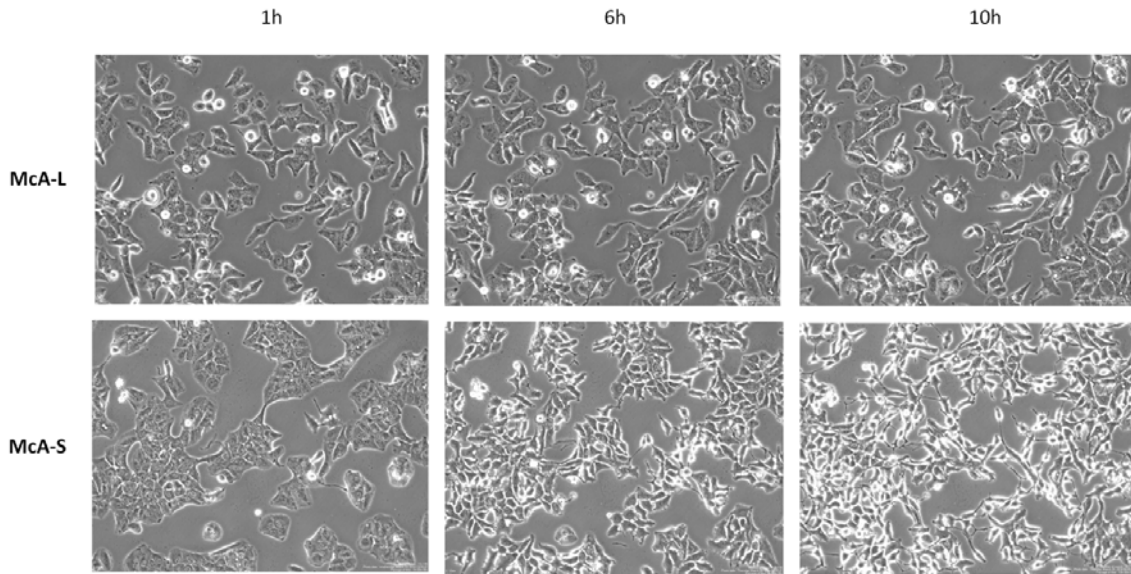
D41 Irudia. McA-L eta McA-S2 zelulen mugikortasunaren analisia. 35 mm-ko plaketan 300.000 zelula erain eta 12 h-z itsasten utzi ondoren 24 h-z 20 min-ro mikrografiak jaso ziren BioStation-aren kameran. Argazkiak ImageJ-rekin prozesatu, lerro bakoitzeko zelula ezberdinak zoriz aukeratu eta horien ibilbidearen jarraipena egin zen distantzia osoa kalkulatzeko. Balioek 12 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte.

Badirudi McA-S zelulek ez dutela arazorik matrizearekin itsasteko ez eta horren gainean mugitzeko ere, baina kolonia handiagoak sortu eta zelulen arteko kohesibotasun altuagoarengatik ziurrenik mugitzeko modu ezberdina erakusten dute.

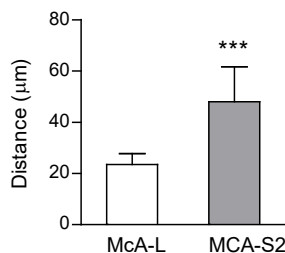
3.4 McA-L eta McA-S zelulen mugitzeko modu ezberdina SND1en gainadierazpenak eragindako kolesterolaren metabolismoko alterazioekin erlazionatuta egon daiteke

Hurrengo helburua lerroen arteko morfologiaren eta mugikortasunaren ezberdintasunak eta emaitzen kapituluko lehenengo atalean deskribatutako alterazio metabolikoen artean nolabaiteko erlaziorik dagoen ikustea izan zen. Aurretik sakonki aztertu eta azaldu den bezela, McA-L eta McA-S zelulen arteko ezberdintasun nagusietako bat kolesterolaren metabolismoaren alterazioen ondorioz McA-S zelulek aurkezten duten kolesterolaren gainmetaketa da. Gainera, 1.3 atalean zehazki, McA-S zelulek mintzean kolesterol eduki altuagoa dutela deskribatzen da eta kapitulu hontako 3.2 atalean Cdh1en adierazpen altuagoa dutela. Kadherinak kolesteroletan aberatsak diren mintzeko *raft*-etan kokatzen direla deskribatua izan da (Marquez et al., 2012) eta, beraz, pentsa liteke kolesterol edukiaren ezberdintasuna E-kadherinaren adierazpen mailarekin zuzenki erlazionatuta egon daitekeela, adhesioa eta mugikortasuna aldaraziz.

Hori aztertzeko, mugikortasunaren analisirako saioak errepikatu ziren kolesterola bahitzen duen ziklodestrinaren presentzian. **D42 Irudian** erakusten den bezala, aldaketa argi bat ikusten da McA-S zelulen morfologia eta mugikortasunean hpCD tratamenduaren ondoren. hpCD tratamenduaren ondorioz, McA-S zelulen morfologiak McA-L zelularen antza hartzen du, zelulak zapalagoak bilakatzen dira eta luzakinak zein zelulen arteko hutsuneak agertzen dira.



D42 Irudia. McA-L eta McA-S2 zelulen morfologiaren eta mugikortasunaren analisia ziklodestrinaren tratamenduaren ondoren. 35 mm-ko plaketan 300.000 zelula erein eta 12 h-z itsasten utzi ondoren 2 mM 2-hidroxipropil- β -ziklodestrina gehitu eta 24 h-z 37 °C-tan mantendu ziren Biostation-ean. Mikrografia 20 min-ro jaso ziren; 1, 6 eta 10 h-tan lortutako mikrografia adierazgarriak erakusten dira



D43 Irudia. McA-L eta McA-S2 zelulen mugikortasunaren analisia ziklodestrina tratamenduaren ondoren. Aurreko irudian aipatutako argazkiak ImageJ-rekin prozesatu, lerro bakoitzeko zelula ezberdinak zoriz aukeratu eta hauen ibilbidearen jarraipena egin zen 24 h-tan egindako distantzia osoa kalkulatzeko. Baliaok 12 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t test-a: *** P ≤ 0,001.

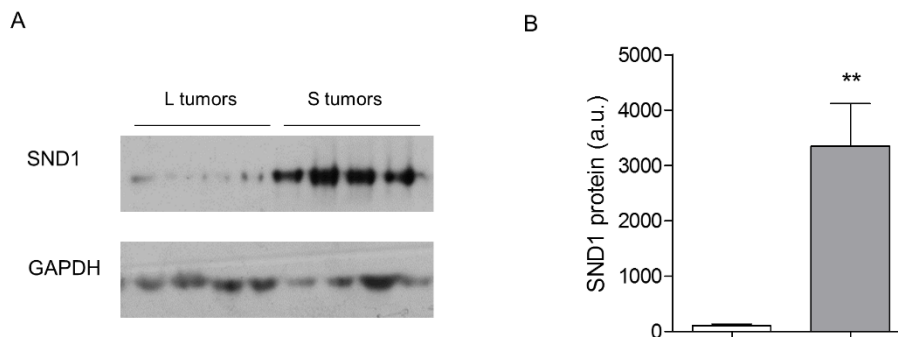
Zelulek erakusten duten morfologia aldaketaz gain, hpCD tratamenduaren ondoren McA-S zelulen mugikortasun mailan aldaketa esanguratsu bat behatu zen. Egoera basalean McA-L eta McA-S zelulek mugikortasun maila bera erakusten bazuten ere (**D41 Irudia**), tratamenduaren ostean 24 h-tan McA-S zelulak mugitutako distantzia bikoiztu egin zen (**D43 Irudia**).

4. SND1 gainadierazten duten hepatoma zelulen xenotumoreen garapena

SND1en gainadierazpenak tumoreen garapenean *in vivo* izan ditzakeen ondorioak aztertzeko asmoz, McA-L eta McA-S zelulak *nude* saguei injektatu zitzaizen subkutaneoki. Tumoreak gutxienez 3 astez garatzen utzi ziren, beren histologia, konposaketa eta tratamenduaren amaieran jasotako odoletik isolatutako serumeko parametro biokimikoak aztertzeko.

4.1 Xenotumoreek jatorrizko zelulen ezaugarri nagusiak mantentzen dituzte

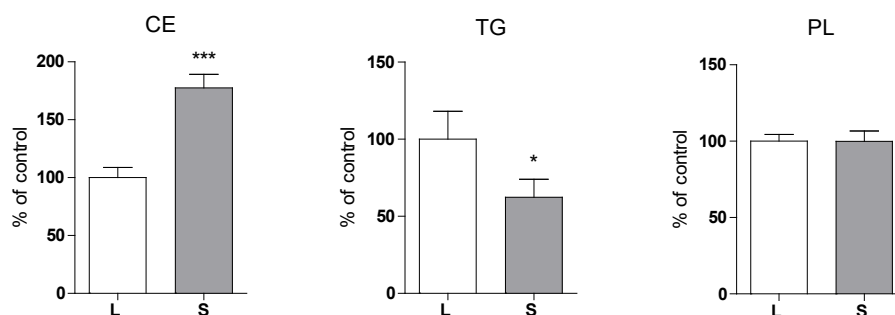
Lehenengo pausua garatutako tumoreetan SND1en adierazpen diferentziala mantentzen den aztertzea izan zen. Horretarako McA-L eta McA-S zelulen xenotransplantearen ondoren garatutako tumoreak (L eta S tumoreak) homogeneizatu eta SND1 proteinaren adierazpena analizatu zen WB bidez. **D44 Irudiak** erakusten duen bezela, L eta S tumoreek SND1en adierazpen diferentziala mantentzen dute, S tumoreetan SND1en adierazpena L tumoreetan baino 200 aldiz altuagoa izanik.



D44 Irudia. SND1en adierazpena xenotumoreetan. (A) SND1 proteinaren adierazpenaren analisia *western blot* bidez egin zen McA-L eta McA-S tumoreak homogeneizatu ondoren. (B) A Irudiko emaitzen kuantifikazioa. Normalizatorako GAPDH erabili zen. Balioek 5 datu adierazgarriren batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: ** $p < 0,01$.

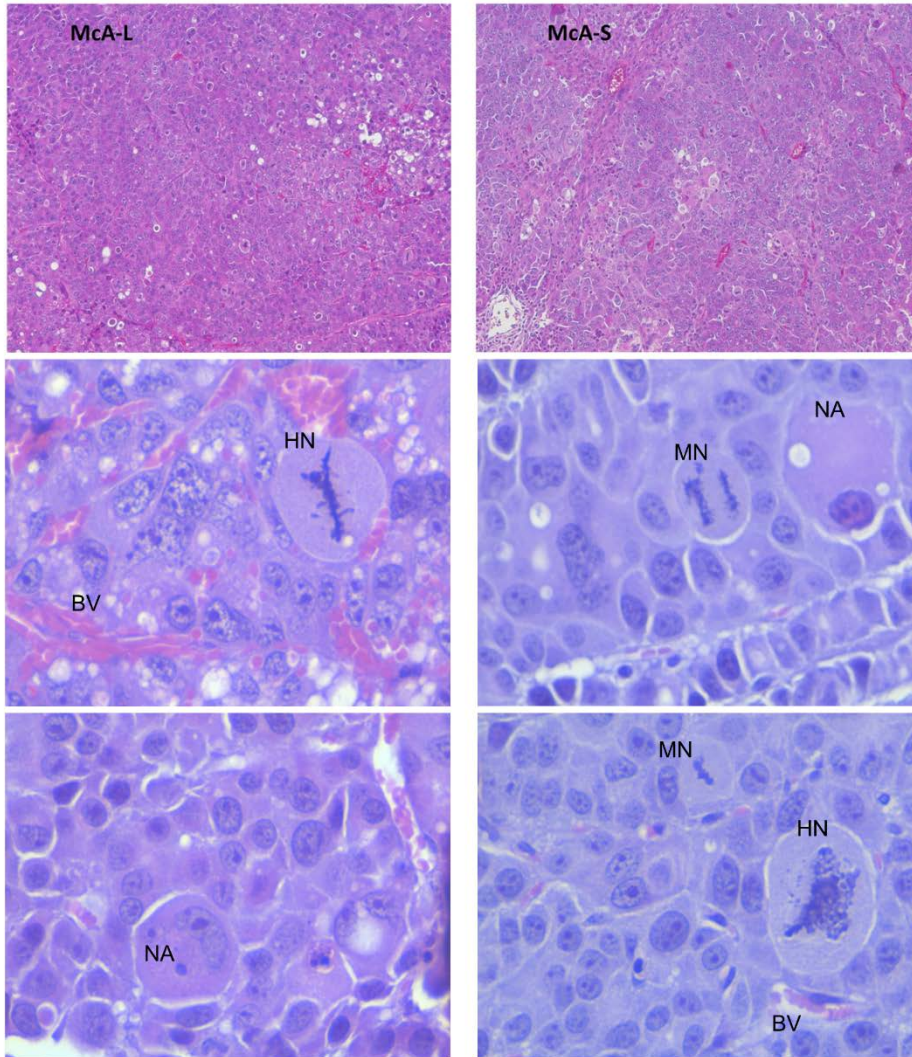
Emaitzen kapituluko lehenengo atalean deskribatzen den bezala, SND1 gainadierazten duten hepatoma lerroen ezaugarri nagusia lipidoen edukiari dagokionez CE moduan gertatzen den kolesterolaren gainmetaketa da. Bestalde, kolesterolaren metabolismoaren alterazioekin erlazionatuta ez badago ere, McA-

S lerroek TG eduki baxuagoa erakusten dute kontrol zelulekin konparatuta. McA-L eta McA-S lerroen eta L eta S tumoreen arteko SND1en adierazpen diferentzialak konparagarriak direnez, jarraian L eta S tumoreen lipido karakterizazioa burutu nahi izan zen lerroetan deskribatutako ezaugarriak tumoreetan agertzen diren analizatzeko. Horretarako L eta S tumoreak homogeneizatu eta lipidoak erauzi eta kuantifikatu ziren TLC bidez. Lortutako emaitzak **D45 Irudian** aurkezten dira. Emaitzek erakusten dute S tumoreek L tumoreek baino %50 CE gehiago dutela, McA-L eta McA-S lerroetan lortutako datuekin bat datorrena. Gainera, S tumoreen TG edukia %40 baxuagoa dela ikusten da. Azkenik, PL totalen edukia kuantifikatu zen eta ez zen ezberdintasunik aurkitu bi tumore moten artean.



D45 Irudia. L eta S tumoreen lipido karakterizazioa. Tumoreen lipido karakterizazioa burutzeko tumoreak homogeneizatu ondoren lipido erauzketa egin zen. Jarraian geruza fineko kromatografia bidez banatu ziren tindatu ondoren kuantifikatzeko. Balioek 2 saio independentetako 10-12 daturen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t testa: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

L eta S tumoreek lipido konposaketan ezberdintasunik izan arren ez zen ezberdintasun histologiko esanguratsurik aurkitu bi tumore moten artean, tumore mota bietan garatu baitziren antzeko ezaugarriak (**D46 Irudia**). Eremu nekrotikoak ugariak dira bi tumoreetan bai eta angiogenesi prozesuaren zantzuak; odol hodiak topatu ziren lagin guztietan. Bestetik, minbizien ezaugarri den zelulen bikoizketa azkarra ikus daiteke ere, nukleo mitotikoen presentzia nabarmenarekin bi tumore motetan. Horiekin batera, bai L zein S tumoreetako prestakinetan hipertrofiatutako zenbait nukleo behatu daitezke ere.

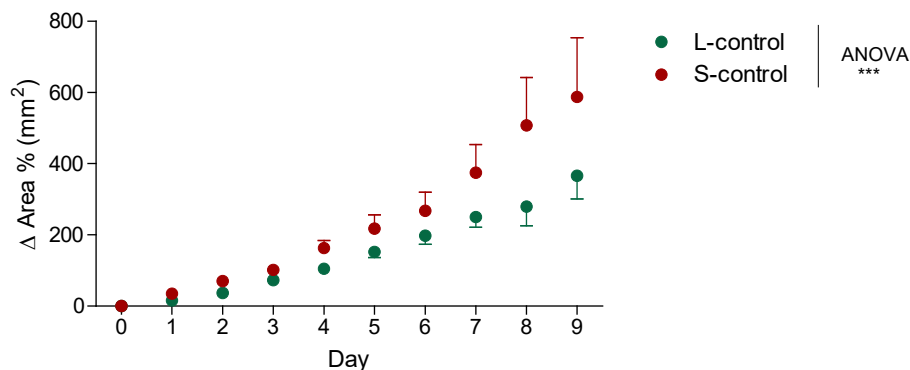


D46 Irudia. Hematoxiliniz eta eosinaz tindatutako L eta S tumoreen ebaketa histologikoen mikrografiak. 40x objetiboarekin ikusgarriak diren egitura bereizgarrietako batzuk: NH, nukleo hipertrofiatuak; OH, odol hodiak, odol zelulak; NM, nukleo mitotikoak; EN, eremu nekrotikoak.

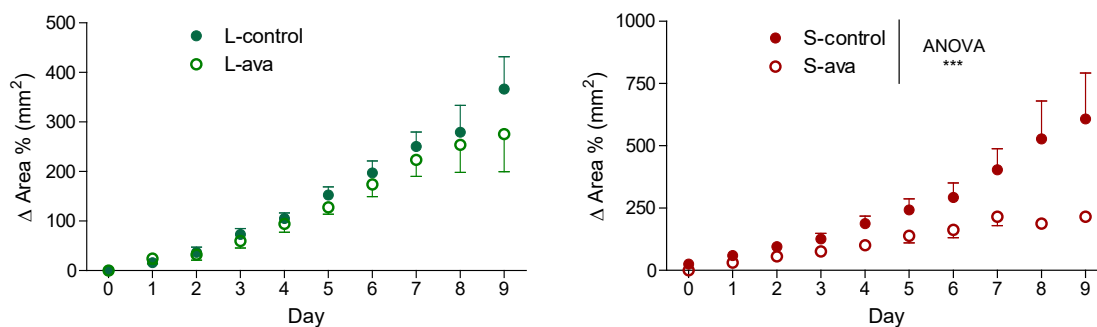
4.2 SND1en gainadierazpenak tumoreen hazkuntza azkartzen du

SND1en gainadierazpenak eta horren ondorioz S tumoreek erakusten duten kolesterolaren gainmetaketak tumoreen hazkuntzan eraginik duen aztertzeke, *nude* saguei McA-L edo McA-S zelulen injekzio subkutanea egin zitzaizen eta ondorioz garatutako tumoreen hazkuntza aztertu. Kolesterolaren

gainmetaketa ahalmenak tumoreen hazkuntzan eraginen bat izan zezakeen aztertzeko, kolesterol esterifikazioaren inhibitzailea den Avasimibe konposatuarekin tratatu ziren saguak. Esperimentuan zehar tumoreen azaleraren neurketak burutu ziren egunero tumoreak kalibre batekin neurtuz.



D47 Irudia. L eta S tumoreen hazkuntzaren analisisa. McA-L eta McA-S zelulak *nude* saguetan subkutaneoki injektatu eta garatutako L eta S tumoreen hazkuntza analizatu zen. Egunero tumoreen neurriak kalibre batekin hartu ziren azalera kalkulatzeko. Hazkuntza tumoreen tratamenduaren hasiera eguneko azalarekiko (0,5 cm²) gehikuntza bezala adierazten da portzentaitan. Balioek 6 animalari dagozkien datuen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Bi bideko ANOVA: *** P ≤ 0,001.

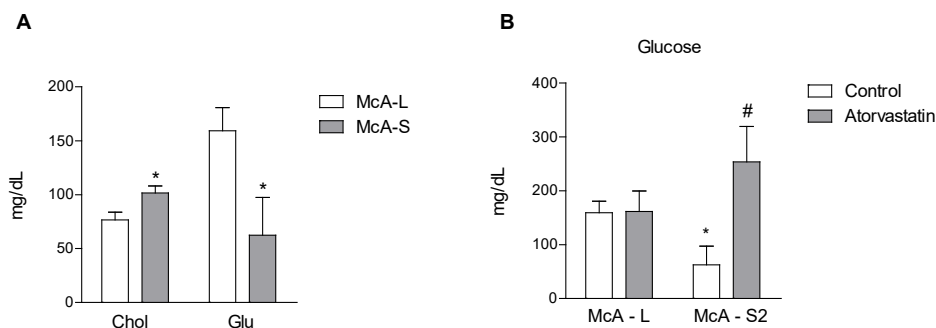


D48 Irudia. Kolesterolaren esterifikazioaren inhibitzailearen (Avasimibe-ren) eragina L eta S tumoreen hazkuntzaren gain. McA-L eta McA-S zelulak *nude* saguetan subkutaneoki injektatu eta garatutako L eta S tumoreen hazkuntza analizatu zen. Egunero tumoreen neurriak kalibre batekin hartu ziren azalera kalkulatzeko. Tumoreak 0,5 cm²-ra iristean Avasimibe (ava) tratamendua hasi zen bi egunetan behin, 15 mg/kg edo disolbatzailea (5 ml/kg PBS) injektatuz. Hazkuntza tumoreen tratamenduaren hasiera eguneko azalarekiko (0,5 cm²) gehikuntza bezala adierazten da portzentaitan. Balioek 6 animalari dagozkien datuen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Bi bideko ANOVA: *** P ≤ 0,001.

D47 Irudian erakusten den bezala, S tumoreen tamainaren hazkuntza L tumoreena baino handiagoa izan zen. L edo S tumoreen azalera 0,5 cm²-ra iritsi ondoren Avasimiberen tratamendua hasi zen bi egunetan behin intraperitonealki injektatuz PBStan disolbatuta. Kolesterolaren inhibitzailearekin eginiko tratamenduaren eraginez S tumoreen hazkuntza moteldu zen baina ez zen efektu esanguratsurik aurkitu L tumoreen garapenean (**D48 Irudia**). Horrek iradokitzen du SND1ek McA-S zeluletan eta S tumoreetan eragindako kolesterol gainmetaketak tumorigenesian nolabaiteko efektua izan dezakeela, tumoreen hazkuntzan aldaketak eraginez.

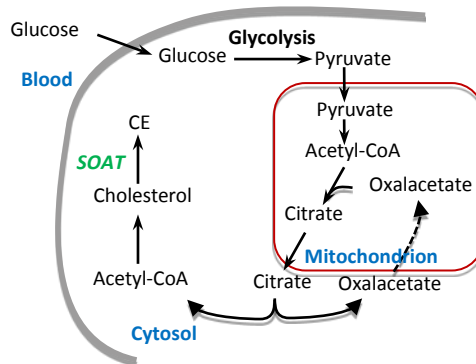
4.2 L eta S tumoreak garatu dituzten saguen serumeko glukosa eta lipido edukiak ezberdinak dira

L eta S tumoreetan aurkitutako ezberdintasunek animalietan efekturik izan zezaketen aztertzeko, serumeko zenbait parametro neurtu zen. Serumeko TG edukiaren kasuan ez zen ezberdintasun esanguratsurik aurkitu L eta S tumoredun animalietan (erakutsi gabeko datuak) baina bai kolesterol eta glukosaren edukian (**D49.A Irudia**). S tumoredun animaliek serumean glukosa maila baxuagoa zutela aurkitu zen eta kolesterol edukia berriz altuagoa. Gainera, kolesterolaren sintesiaren inhibitzaile den atorvastatinarekin *in vivo* eginiko tratamenduak S tumoreak garatutako saguen hipogluzemia errebertitzen zuela ikus daiteke (**D49.B Irudia**).



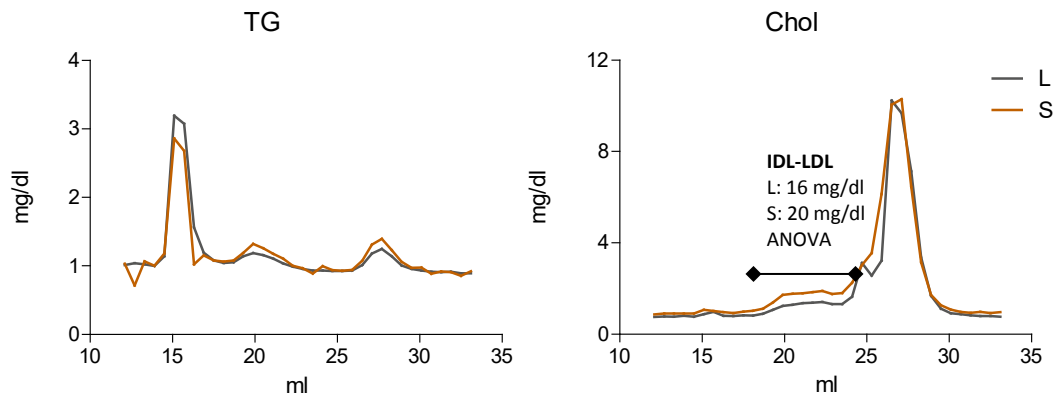
D49 Irudia. L eta S tumoreak garatu zituzten saguen serumeko parametroak. McA-L eta McA-S zelulak *nude* saguetan subkutaneoki injektatu eta 3 astez xenotumoreak hazi ondoren, animaliak sakrifikatu eta odola jaso zen bertatik seruma isolatzeko. Kolesterol eta glukosa neurketak kit komertzialak erabiliz egin ziren. Zelulen txertatzearekin batera intraperitonealki atorvastatinaren tratamendua (bi egunetan behin, 50 mg/kg edo disolbatzailea (5 ml/kg PBS)) hasi zen; kontrol animaliei PBS injektatu zitzaizkien. Glu, glukosa; Chol, kolesterol. Balioek 5 animaliarik dagozkien datuen batezbestekoa eta desbiderapen estandarra adierazten dituzte. Student-en t test-a: * $P \leq 0,05$ lerroen arteko konparaketetarako eta # $P \leq 0,05$ atorvastatinaren eragina adierazteko.

Eraitza horiei begira pentsa daiteke S tumoreek glukosa gehiago kontsumitzen dutela eta gainera glukosa hori kolesterol sintesira bideratzen dela (**D50 Irudia**).

Metabolic flux

D50 Irudia. Glukosaren erabilpenaren eskema metabolikoa. Zelulan sartu bezain laster glukosa fosforilatu eta glikolisiaren bidez pirubatorantz eta mitokondriara azetil-A koentzimarantz bideratzen da. Jarraian hori zitosolera bideratu daiteke kolesterolaren sintesirako. CE, kolesteril ester; CoA, A koentzima; SOAT, esterol O-aziltransferasa.

Kolesterola odolean lipoproteina forman garraiatzen da. Lipoproteinetan kolesterola eta gainerako lipidoak nola banatzen diren aztertuta, tumoreek lipidoen fisiologian eragiten duten aldaketetan sakondu daiteke. Horregatik, serumeko lipoproteinak FPLC bidez banatu eta frakzio ezberdinetan TG eta kolesterola neurtu ziren. Lipoproteina ezberdinetako TGaren banaketan ez zen ezberdintasunik aurkitu baina bai kolesterolaren kasuan. Badirudi S tumoreek eragiten duten serumeko kolesterol igoera (**D49 Irudia**) IDL/LDL frakzioei asoziatutako kolesterolaren igoeraren ondorio dela (**D51 Irudia**).



D51 Irudia. Serumeko lipoproteinen triglizerido eta kolesterol edukia. Lipoproteinak FPLC kromatografia bidez banatu ziren, Superose™ 6 10/300 GL zutabean, fase mugikorra 0,3 ml/min fluxu abiaduran igaroaraziz. Sistema orekatu ondoren aurretik 0,22 μ M-ko PVDF iragazki batekin iragazitako 200 μ l serum zutabean injektatu eta 400 μ l-ko 40 frakzio jaso ziren. Frakzio horietan kolesterol eta triglizerido edukia neurtu zen kit komertzialekin. Chol, kolesterola; TG, triglizeridoak, IDL, dentsitate ertaineko lipoproteinak; LDL, dentsitate baxuko lipoproteinak.

E. EZTABAIDA

1. SND1en gainadierazpenak eragindako kolesterolaren metabolismoaren alterazioen eragina minbizian

Hazkuntza eta proliferazio zelularra mantentzeko ezinbestekoa den lipidoen *de novo* sintesiaren gainaktibazioa, ehun neoplasikoetan gertatzen den birprogramazio metabolikoaren parte garrantzitsua da (Santos and Schulze, 2012). Zehazki, CEen gainmetaketa eta mebalonatoaren bidearen desregulazioak deskribatuak izan dira minbizi zelula mota ezberdinetan (Rao et al., 1999; Clendening et al., 2010) eta tumoreen agresibitatearekin positiboki korrelazionatzen dira (Yue et al., 2014; de Gonzalo-Calvo et al., 2015). Eraitzen lehenengo atalean erakusten da SND1 proteina gainadierazten duten McA-S1 eta McA-S2 hepatoma lerroek CE gainmetatzen dutela (**D2 Irudia**). Gainmetaketa gainera, SND1en gainadierazpen mailarekin areagotzen da eta SND1en azpiadierazpenak beherarazi egiten du (**D3 Irudia**). Horrez gain, SND1 gainadierazten duten hepatoma zelulen xenotransplantearen ondorioz *nude* saguetan garatutako tumoreek ere CEen gainmetaketa erakusten dute (**D45 Irudia**).

SND1 gainadierazten duten McA-S lerroetako zelulek gainera mintz plasmatikoko kolesterol eduki altuagoa dute (**D5 Irudia**) eta metatutako CEak erabiliz kolesterola mintzera mobilizatzeko gaitasun handiagoa erakusten dute (**D4 Irudia**). Mintzeko kolesterol edukiak besteak beste, mintzeko proteina askoren kokapenean aldaketak eragin ditzake. Izan ere, zelularen hainbat seinalizazio bidetan parte hartzen duten proteinak mintz plasmatikoko *raft* izeneko eremuetan kokatzen dira. Mintzeko domeinu horiek kolesteroletan eta esfingomielinatan aberastuta egoten dira. Badirudi zelula bereko lipido *raft* guztien konposaketa ez dela berdina; konposaketak baltsek seinalizazioan betetzen duten funtzioan inplikazio garrantzitsuak izan ditzake proteina ezberdinen kokapenaren erregulazioaren bidez. Domeinu horietan kokatzen diren proteinen artean G proteina ezberdinak, adenilato ziklasa edo tirosina kinasa ezberdinak deskribatuak izan dira. Gainera, mintzeko domeinu horiek zitoeskeletoko aktinarekin ere elkarrekiten dutela ezagutzen da proteina bitartekari ezberdinen bidez (Simons and Ikonen, 1997; Pike, 2003; Staubach and Hanisch, 2011). Gai horren inguruan eztabaida dagoen arren, hainbat lanek erlazionatu dituzte mintz plasmatikoko *raft*-ak eta *adherens* motako zelulen arteko loturetan nagusiki aurkitzen den E-kadherina (Seveau et al., 2004; Chartier et al., 2011; Marquez et al., 2012; Yap et al., 2015).

E-kadherina kadherina klasikoen taldean sailkatzen da eta zelula epitelialetan zelulen arteko loturen arduradun nagusia da. Zelulen arteko loturak askatzea beharrezkoa denean endozitatu egiten da eta

lisosoman degradatua izaten da (Kowalczyk and Nanes, 2012). Lan honen emaitzen kapituluko 3. atalean erakusten da SND1 gainadierazten duten zelulen morfologia kontrol zelulenarekiko guztiz ezberdina dela (**D35** eta **D36 Irudiak**). Gainera, ezberdintasun horiek E-kadherinaren adierazpen diferentzialaren ondorio izan daitezkeela erakusten da. SND1en gainadierazpenak McA-S lerroetan mintzeko kolesterol edukiaren igoera bat eragiten badu eta E-kadherina mintzeko kolesteroletan aberatsak diren baltsetan kokatzen bada, ez da harritzekoa SND1 gainadierazten duten zelulek kadherinaren egonkortze altuagoa izatea. Aurretik Tsuchiya-k eta kideek SND1en gainadierazpenak mintz plasmatikoko E-kadherinaren barneraketa bultzatzen duela deskribatu bazuten ere (Tsuchiya et al., 2007), lan horretan erabilitako baliabideak guztiz ezberdinak ziren. E-kadherinaren lokalizazioa beiran fixatutako zelulen immunozitokimika bidez erakutsi zuten baina **D36 Irudian** ikus daitekeen bezala, SND1 gainadierazten duten zelulen beira gaineko itsaskortasuna mugatua izan daiteke. Bestalde, hainbat lanetan azpimarratu izan da mintzeko lipidoen konposaketak *adherens* motako loturen egituraren eta kadherinen mintzeko lokalizazioaren duen garrantzia (Taufel et al., 2009; Baumgartner et al., 2014; Yap et al., 2015). Marquez-ek eta kideek gainera, zelulako kolesterol edukiaren eta E-kadherinaren adierazpenaren eta lokalizazioaren arteko erlazioa erakutsi zuten (Marquez et al., 2012). Tsuchiya-ren eta kideen lanean SND1en gainadierazpena trantsitorioa izan zen eta ez da zehazten horren eraginez kolesterolaren homeostasiaren aldaketarik dagoen (Tsuchiya et al., 2007). Lan honetan erabilitako McA-S zeluletan E-kadherinaren adierazpena SND1en gainadierazpenak eragindako kolesterolaren kudeaketa zelularren eraginez handitzen dela dirudi.

Horrek, besteak beste, zelulen kolonien eraketan eragiten du. E-kadherinaren adierazpen altuak zelulen arteko kontaktu sendoak eratzea ahalbidetzen du, **D38 Irudian** erakusten den bezala. Bestalde, McA-S lerroek matrize ezberdinetan itsasteko inolako mugarik ez dutela badirudien arren (**D40.B Irudia**), kolonia handietan mantentzeak eta beren morfologia borobilak gainazalarekin duten kontaktu azalera mugatu eta matrizearekin lotura ahulagoak eratzea eragiten dute (**D40.A Irudia**). EGTarekin tratatu eta Ca^{2+} menpeko loturak oztopatzen direnean, hala nola E-kadherinak eratzen dituenak, bi lerroek matrizearekiko erakusten duten itsaskortasuna berdina da (**D40.B Irudia**).

Morfologiaren gain eragiteaz gain, zelula-zelula lotura sendoek mugikortasunean ere eragiten dute. McA-S zelulen mugikortasuna kontrol zelularen parekoa izan arren (**D37 Irudia**), mugitzeko modua erabat ezberdina da. SND1 gainadierazten duten zelulak kontrol zelulak baino modu koordinatuagoan mugitzen dira. *Wound-healing* saioretan, fronteko zelula guztiak batera mugitzen dira norantza berean eta zelulen

arteko loturak apurtu gabe (**D39 Irudia**). Ezaugarri hori gainera galdu egiten da mintzeko kolesterola bahitzen duen hpCD konposatuaren presentzian (**D42 Irudia**), ezberdintasunak SND1en gainadierazpenak eragindako mintzeko kolesterol eduki altuagoaren ondorio direla iradokitzen duena.

Ez litzateke harrizkoa guzti horrek tumoreen garapenean nolabaiteko eragina izatea, batez ere tumore sekundarioen garapenean. Minbizien metastasiak minbiziarekin erlazionatutako heriotzen gehiengoaren erantzuleak dira. Gainera, gizakietan, zelula epitelialetatik eratorritako kartzinomak dira prebalenteenak (Thiery, 2002). Ondo deskribatua izan da azken urteotan metastasi prozesuan jarraian gertatzen diren pausuak gertatzen direla: (i) zelulak tumore primarioko gunetik askatu eta migratu egiten dute, (ii) inguruko ehunak inbaditzen dituzte, (iii) odol hodietan edo hodi linfatikoetan sartzen dira, (iv) *anoikis* egoerari aurre egiten diote zelulaz kanpoko matrizeari lotuta ez dauden bitartean, (v) urruneko organo batean odol hoditik edo hodi linfatikotik ihes egiten dute ehunetarantz, (vi) mikronodulu metastatikoak eratzen dute eta (vii) ingurune berriaren aurrean moldaketak eta birprogramazioa jasaten dituzte makrometastasiak eratzeko (Thiery, 2002; Yao et al., 2011).

Izaera epitelialetik mesenkimalerako aldaketa fenotipikoak metastasietan gertatzen diren ezinbesteko prozesu bezala ezagutzen dira non zelula epitelialek zelularteko loturen sendotasuna galdu eta mugikortasun altuagoa lortzen duten. EMT beharrezkoa da metastasien eraketarako, baina zenbait lanek frogatu du tumore sekundario askok, HCC barne, izaera epiteliala erakusten dutela, tumore primarioko zelulek baino desdiferentziazio maila baxuagoarekin (Yao et al., 2011). Horrek, mesenkima-epitelio trantsizioa tumore metastatikoaren garapenean garrantzitsua izan daitekeela iradokitzen du, zelulek foko sekundarioan jatorrizko tumore primarioaren fenotipoa berreskuratzea ahalbidetzen duelako. Prozesu horren ezaugarri adierazle bezala E-kadherinaren gainadierazpena proposatua izan da (Hugo et al., 2007). Badirudi E-kadherinaren adierazpena berreskuratzeak ingurune berrian jasan beharreko birprogramazioan laguntzen duela tumore primariotik askatzerakoan galdutako seinalizazio bideak berraktibatuz (Wells et al., 2008). Horrek nolabait azal dezake subkutaneoki injektatzean, SND1 gainadierazten duten zelulek garatutako tumoreek hazkuntza azkarragoa erakustea (**D47 Irudia**), aurretik azaldutakoarekin bat, McA-S zelulen fenotipo epitelialak tumore berriak sortzeko abantaila bat suposatuko lukeelako. Animaliak kolesterolaren esterifikazioaren inhibitzaile batekin tratatzean (avasimiberekin), S tumoreen hazkuntza abiadura kontrol zelulek garatutako tumoreen hazkuntza abiadurarekin berdintzen da (**D48 Irudia**), SND1ek eragindako kolesterolaren metabolismoko asaldurak tumorigenesian benetan funtzio garrantzitsua bete dezakeela iradokiz.

2. Kolesterolaren metabolismoaren alterazioen mekanismoa

Hepatozitoetan bi kolesterol iturri daude: plasmako lipoproteinak eta azetil-CoA-tik abiatutako *de novo* sintesia. McA-S lerroko zeluletan gehiegizko CEen metaketarako kolesterol iturria zein den argitzeko substratu lipogeniko erradioaktibo ezberdinen inkorporazioa analizatu zen McA-L eta McA-S lerroetan eta McA-S zelulek kolesterogenesi aktiboagoa dutela ikusi zen (**D6 Irudia**). McA-S zelulek ere kolesterol askea FAekin esterifikatzeko ahalmen handiagoa duten arren (**D6 eta D10 Irudiak**), kolesterolaren sintesi bidearen atorvastatinaren bidezko inhibizioak eragindako CEen edukiaren jaitsierak iradokitzen du McA-S zelulen CEen gainmetaketa kolesterolaren *de novo* sintesiaren gainaktibazio baten ondorioz ematen dela nagusiki (**D7 Irudia**). Substratu lipogenikoen inkorporazio esperimenduetan erakusten da ere McA-S zelulek CE gehiago jariatzen dutela mediora, gainmetaketa jariapen baxuago baten ondorio dela baztertzea dakarrena (**D6.A Irudia**). Gainera, McA-S zeluletan kolesterolaren sintesi bideko entzima erregulatuak nagusiak gainadierazita daude (**D8 Irudia**). Beraz, badirudi SND1 gainadierazten duten zelulen CE metaketa kolesterogenesi aktiboago baten ondorio dela.

Kolesterolaren zelulen oinarrizko funtzio askotan ezinbestekoa da. Besteak beste, mintz plasmatikoen ezinbesteko osagaia da, besikulen bidezko garraio prozesuetan parte hartzen du eta bere sintesi bideko bitartekari diren farnesil edo geranil-geranil taldeak proteinek elkar daitezke horien mintzeko kokapen egokia lortzeko. Ondorioz, kolesterolaren sintesia estuki erregulatutako prozesua da. Erregulazio sistema nagusia SREBPren bidezkoa da; izan ere, kolesterolaren biogenesiko entzimak kodetzen dituzten hainbat gene SREBP2ren itua da. Zelula barruko kolesterol maila baxuak ERan lokalizatutako SREBP2 aitzindari inaktiboaren aktibazio proteolitikoa indusitzen du eta, ondorioz, amino muturreko domeinua nukleora translokatzeko da, non, kolesterogenesian inplikatutako hainbat generen adierazpena aktibatzen duen (Brown and Goldstein, 1997; Horton et al., 2003). McA-S lerroko zeluletan aurkitutako Hmgcr-ren edota Srebp2 beraren adierazpen maila altuek (**D8 Irudia**) eta SREBP2ren nukleorako translokazioak (**D13 Irudia**) iradokitzen dute, zelula horiek kolesterol gainmetatzen duten arren, SREBP2ren aktibazio maila altuagoa dela, sistemaren desregulazio bat dagoela iradokitzen duena. Izan ere, modu egokian funtzionatzen duenean, homeostasi sistemak kolesterolaren hornikuntza baten aurrean, Hmgcr-ren eta Ldlr-ren adierazpena inhibituz erantzuten du, *de novo* sintesia eta zelulaz kanpoko kolesterolaren inkorporazioa murrizteko. LDLen bidezko kolesterol exogenoaren gehikuntzaren aurrean McA-L zeluletan sistemak ondo funtzionatzen duen arren, McA-S zeluletan ez da Hmgcr-ren adierazpenaren gutxipena ematen; egoera basalean CEen

gainmetaketa duten arren, zeluletako kolesterol maila igo egiten da (**D12 Irudia**). Mebalonatoaren gehikuntzaren bidez Hmgcr-ren gaineko kontrola ekiditen denean, bai McA-L eta bai McA-S zelulek metatzen dute CE (**D12 Irudia**). Badirudi McA-S zeluletan SREBP2 konstitutiboki aktibatuta dagoela zelularen kolesterolaren mailarekiko modu independentean (**D13 Irudia**).

SREBP2 proteinaren aldaera inaktiboa ERan lokalizatzen da eta bertan kokatzen dira ere homeostasi sistemako beste bi proteina erregulatzaile nagusi, SCAP eta INSIG. SND1 proteinaren lokalizazio nagusia ere ER izanik, hipotetizatu genuen kolesterolaren homeostiaren desregulazioa ERko mintzeko kolesterol mailaren alterazioak eragin dezakeela. McA-L eta McA-S lerroen frakzio mikrosomaleko kolesterol mailen neurketak erakusten du SND1 gainadierazten duten zelulen ERko mintzek kolesterol eduki baxuagoa dutela (**D14.A Irudia**), SREBP2ren forma inaktiboaren proteolisia eta nukleorako translokazioa bultzatuko lukeena (**D14.B Irudia**). Gainera, kolesterolaren esterifikazioaren inhibizioak McA-S zelulen ERko mintzetako kolesterol maila normalizatzen du eta ondorioz SREBP2 nuklearraren maila kontrol zelulen mailarekin parekatzen da (**D14.A eta D14.B Irudiak**).

Emaitzok iradokitzen dute McA-S zeluletako gehiegizko kolesterogenesisia paper erregulatzailea duen ERko kolesterolaren frakzioaren menpe dagoela: kolesterol eduki hori SREBP2ren inaktibaziorako beharrezkoa den mailaren azpitik dagoela dirudi eta ondorioz zelulek kolesterola sintetizatzekeo mezua jasotzen dute. Aurretik deskribatua izan da SREBP2ren erregulazioa ERko kolesterol edukiarekin estuki erregulatuta dagoela eta sistemak kolesterol kontzentrazioaren aldaketa txikiei erantzun diezaiekela, baina ez da ezagutzen nola erregulatzen diren mintz plasmaticoaren eta ERren kolesterol edukiak (Brown et al., 2017).

Beraz, badirudi SND1en gainadierazpenak eragindako kolesterolaren metabolismoko alterazioak proteina honek ERan betetzen duen funtzioaren batekin erlazionatuta egon daitezkeela. Nahiz eta orain arte ez den erabat argitu kolesterolak nola eragiten duen SCAP proteinaren konformazio aldaketa, badirudi elkarrekintza zuzenaren bidez gertatzen dela (Radhakrishnan et al., 2004). Gainera, Golgi sistemaranzko translokazioa gertatzeko SCAP konformazio zehatz batean egon behar da, eta hori lortzeko SCAP proteinaren bi domeinu lotuta egon behar dira. Elkarrekintza hori ezinezkoa gertatzen da bi domeinuetako batek beste molekula batekin elkarrekiten badu (Gao et al., 2017). Gaur egun ezagutzen direnen artean, kolesterolaren homeostasi sistemako mekanismo horrek azal lezake SND1en eraginaren oinarri molekularra. SND1ek

eragindako ERko kolesterol eduki baxuaren ondorioz mintzaren propietateak aldatu eta horrek bertako proteinen egitura eragina izan dezake.

3. Azilglizeridoen sorreraren asaldurak

Kolesterogenesiaren desregulazioaz gain, SND1 proteinaren gainadierazpenak hepatoma zelulen gainerako lipidoen metabolismoan aldaketarik eragiten duen aztertu zenean, McA-S zelulek kontrol zelulek baino TG eduki baxuagoa dutela ikusi genuen (**D15 irudia**). Edukiaren azterketaz gain, fluxu metabolikoen analisia ere egin zen; erabilitako aitzindari lipogeniko guztien kasuan, McA-S zelulen TGen sintesirako bideraketa txikiagoa izan zen (**D19, D21 eta D22 Irudiak**).

Gene adierazpenaren analisiaren bidez McA-S zelulek TG sintesirako ahalmenean mugarik ez dutela baieztatu ondoren (**D16.B Irudia**), SND1ek eragindako gehiegizko kolesterogenesiaren ondorio zuzena izan zitekeen aztertu nahi izan genuen. Horretarako analisi ezberdinak egin ziren zelularen kolesterol sintesia edo esterifikazioa mugatuz edota kanpotiko kolesterola gehituz, zelula asetu eta sintesia mugatzeko helburuarekin. Saio horien emaitzetan oinarrituta (**D24, D25 eta D26 Irudiak**), badirudi TGen eduki baxua ez dagoela gehiegizko kolesterogenesiarekin erlaxionatuta, fluxu metabolikoetan aldaketa txikiak behatu baziren ere, horiek ez baitzuten TG edukian aldaketa garrantzitsurik eragin; ez dirudi substratu lipogenikoen (azetil-CoA-ren) eskuragarritasun txikiago batekin zuzenki erlaxionatuta dagoenik. Azetil-CoA zitostolikoaren neurketa ere egin zen eta **D28 Irudian** ikus daitekeen bezala, McA-S zelulek ez daukate McA-L zelulek baino azetil-CoA-ren eskuragarritasun baxuagoa. Argiago erakusteko, McA-L eta McA-S zelulen hazkuntza medioan azetatoaren kontzentrazio ezberdinak gehitu ziren azetil-CoA zitostolikoaren eskuragarritasuna igotzeko. Hala eta guztiz ere ez zen McA-S zelulen TG edukian aldaketa garrantzitsurik behatu (**D27 Irudia**). Horren arabera, substratu lipogenikoen urritasuna baztertu daiteke McA-S zelulen TG sintesi baxuaren azalpenean.

Azetil-CoA-ren eskuragarritasuna TG sorrerarako mugatzailea ez dela baieztatu ondoren, FAen sintesirako entzima garrantzitsuen eta lipogenesi prozesuan parte hartzen duten beste proteina batzuen adierazpena aztertu zen eta SND1 gainadierazten duten zeluletan programa lipogeniko osoaren adierazpena handituta dagoela ikusi (**D29.B Irudia**). Lipogenesiaren fluxuaren mugatzaile nagusia den ACCren adierazpen mailaz gain, bere jarduera entzimatiakoaren erregulatzaile diren zitrato kontzentrazioa (azetil-CoA-ren

zitosoleko emaile da zitratoa, **D29.A Irudian** ikusten den bezala) eta, bereziki, fosforilazio egoera dira garrantzitsuak. Ez genuen ezberdintasun esanguratsurik aurkitu faktore horietan ere (**D30 Irudia**).

Azetil-CoA-ren erabilpenaz gain, kolesterolaren eta FAen sintesi bideek komunean daukate NADPHaren erabilpena elektroien emaile gisa. NADP⁺ aldaera oxidatuaren erreduktzioarako bi erreazio dira nagusi: G6PDH eta ME entzimek katalizatutakoak. ME zitostolikoaren jarduera %65 altuagoa zen McA-S zeluletan McA-L zeluletan baino (**D31 Irudian**); pentosa fosfatoen bideko fluxua mugatzen duen G6PDH entzimaren jarduera ordea %40 baxuagoa zen McA-S zelulen erazki zitostolikoetan. McA-S zelulen pentosa fosfatoen fase oxidatiboaren bidezko glukosa kontsumoa murriztagoa den arren, glukosaren erabilpen altuagoa daukate (**D23.B Irudia**). Halaber, beren tasa metabolikoa eta proteina edukia altuagoak dira kontrol zelulekin alderatzean. Badirudi McA-S zeluletan glukosaren erabilpena handituta dagoela zelulen energia behar handiago bat asetzeko, bai kolesterogenesirako eta baita proteinen sintesirako ere, besteak beste. Ondorioz, glukosaren beste erabilpenak murriztuta egon daitezke, G6PDH barne; jarduera hori murriztuta egonda NADPHren ekoizpena murrizten da eta gainera kolesterol sintesi handituak NADPH gehiago kontsumituko lukeenez FAen sintesirako NADPH eskuragarritasuna murriztu egingo litzateke, McA-S zelulen TG eduki baxuagoa azalduko lukeena.

FAen, kolesterolaren eta proteinen sintesia burutzeko beharrezko energia glukosaren metabolizaziotik lortzen da batez ere. Lehenengo pirubato bilakatu behar da glikolisiaren bidez; pirubatoa mitokondriora garraiatu eta azetil-CoA bihurtzen da, ondoren TCA zikloan sartzeko. Azetil-CoA mitokondrialaren iturri alternatibo bat FAen β -oxidazioa da. Aurreko paragrafoan proposatutakoa egia izango balitz, McA-S zelulen kultura medioan FA exogenoak gehituz zelulen glukosarekiko menpekotasuna jaitsi eta, ondorioz, pentosa fosfatoen bideko erabilpenarekin NADPHaren ekoizpena handitu egingo litzateke, TGen sintesi altuagoa ahalbidetuz. **D33** eta **D34 Irudietan** ikus daiteke mitokondrioko energia iturri bezala erabil daitekeen metabolito bat (FAk kasu honetan) gehitzean, McA-S zelulen FAen ekoizpena eta TG edukia kontrolen mailarekin parekatzen dela.

Eraitza guzti horiek iradokitzen dute McA-S zeluletan TGen sintesirako faktore mugatzailea glukosaren erabilpenean dagoela, zehazki bere oxidazioarekin akoplatutako NADPHaren ekoizpenean. Nahiz eta lan askok pentosa fosfatoen bidearen gainaktibazio bat deskribatzen duten minbizi mota ezberdinetan, badaude bide horren erregulazioaren inguruan oraindik ondo ezagutzen ez diren mekanismoak. Minbizi mota

ezberdinetan pentosa fosfatoen bidearen aktibazio maila ezberdinak deskribatu dira eta ziurrenik zelula motaren eta metastasi gunearen menpekoak dira (Patra and Hay, 2014). Zelula batzuetan badirudi cAMPk G6PDHren jarduera inhibititu dezakeela bi modu ezberdinetan, A proteina kinasa (PKA, *protein kinase A*) entzimaren bidezko fosforilazioaren bitartez eta zuzenean G6PDHren adierazpena murriztaraziz promotoreko cAMPren erantzun elementu bati lotuz (Patra and Hay, 2014). Bestalde, TP53 tumore supresoreak ere pentosa fosfatoen bidearen erregulazioan parte har dezakeela deskribatua izan da. TP53 proteinak, G6PDHri lotuz, forma aktiboa den dimeroaren eraketa oztopatzen du. Badirudi minbiziei asoziatutako TP53ren mutazioek ahalmen hori galdu arazten dutela (Jiang et al., 2011). Kasu batzuetan KRAS onkogeneak glikolisiaren estimulazioa eragiten duela deskribatu da, bitartekariak pentosa fosfatoen bideko erreakzio ez oxidatiboetara bideratzeko erribosaren sintesirako (Ying et al., 2012). Zelula metastatikoek egokitzapen ahalmen handia behar dute migrazioaren ostean hazkuntza foko berrian tumoreak sortzeko. Aldaketa horietako batzuk metabolikoak dira, pentosa fosfatoen bide oxidatiboa eta ez oxidatiboa barne (Patra and Hay, 2014).

F. ONDORIOAK

i. SND1en gainadierazpenak kolesterol esterren gainmetaketa eragiten du hepatoma lerroetan. Gehiegizko metaketa hau SREBP2ren aktibazio konstitutibo baten ondorioz gertatzen da, besteak beste SND1ek erretikulu endoplasmatikoko kolesterolaren frakzio erregulatzailaren maila baxuen mantenuan duen eraginarengatik.

ii. SND1en gainadierazpenaren ondoriozko kolesterolaren gainmetaketak aldaketa morfologiko garrantzitsuak eragiten ditu hepatoma lerroetan. Badirudi aldaketa horiek mintz plasmatikoko kolesterol eduki altuagoaren ondorioz gertatzen direla, lotura interzelularretan parte hartzen duen E-kadherinaren adierazpenaren igoerarekin batera.

iii. SND1en gainadierazpenak, zelulen arteko loturak sendotuz eragindako aldaketa morfologikoen bitartez, zelulen mugikortasunean eragiten du.

iv. SND1en gainadierazpenak xenotumoreen hazkuntza tasaren igoera bat eragiten du eta igoera hori SND1ek eragindako gehiegizko kolesterogenesiaren ondorio dela dirudi. Ziurrenik, zelulen arteko lotura sendoagoek tumore berrien ezarpena erraztu egiten dute.

v. SND1 gainadierazten duten hepatoma zelulek triglizerido maila baxuak dituzte. Kolesterolaren *de novo* sintesirako azetil-CoA erabilerak ez du substratu eskuragarritasunaren bitartez TGen sorrera mugatzen. Badirudi TGen sintesirako mugatzaile nagusia zelula hauen pentosa fosfatoen bideko NADPH ekoizpen murrizta dela, zeina behar energetiko altuago baten ondorio den.

G. BIBLIOGRAFIA

- Abe, S., Sakai, M., Yagi, K., Hagino, T., Ochi, K., Shibata, K., and Davies, E. (2003). A Tudor protein with multiple SNc domains from pea seedlings: cellular localization, partial characterization, sequence analysis, and phylogenetic relationships. *J. Exp. Bot.* *54*, 971-983.
- Abe, S., Wang, P.L., Takahashi, F., and Sasaki, E. (2005). Structural analysis of cDNAs coding for 4SNc-Tudor domain protein from fish and their expression in yellowtail organs. *Mar. Biotechnol. (NY)* *7*, 677-686.
- Altman, B.J., Stine, Z.E., and Dang, C.V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* *16*, 749.
- Anliker, B., and Chun, J. (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* *279*, 20555-20558.
- Arisqueta, L., Nunez-Garcia, M., Ogando, J., Garcia-Arcos, I., Ochoa, B., Aspichueta, P., Fresnedo, O., and Rueda, Y. (2013). Involvement of lipid droplets in hepatic responses to lipopolysaccharide treatment in mice. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 1357-1367.
- Armengol, S., Arretxe, E., Enzunza, L., Mula, S., Ochoa, B., Chico, Y., and Martinez, M.J. (2014). The promoter of cell growth- and RNA protection-associated SND1 gene is activated by endoplasmic reticulum stress in human hepatoma cells. *BMC Biochem.* *15*, 25-014-0025-2.
- Armengol, S., Arretxe, E., Rodriguez, L., Ochoa, B., Chico, Y., and Martinez, M.J. (2013). NF-kappaB, Sp1 and NF-Y as transcriptional regulators of human SND1 gene. *Biochimie* *95*, 735-742.
- Aspichueta, P., Perez, S., Ochoa, B., and Fresnedo, O. (2005). Endotoxin promotes preferential periportal upregulation of VLDL secretion in the rat liver. *J. Lipid Res.* *46*, 1017-1026.
- Azzout-Marniche, D., Becard, D., Guichard, C., Foretz, M., Ferre, P., and Foufelle, F. (2000). Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* *350 Pt 2*, 389-393.
- Baenke, F., Peck, B., Miess, H., and Schulze, A. (2013). Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Dis. Model. Mech.* *6*, 1353-1363.
- Balaban, S., Lee, L.S., Schreuder, M., and Hoy, A.J. (2015). Obesity and cancer progression: is there a role of fatty acid metabolism? *Biomed. Res. Int.* *2015*, 274585.
- Baumgartner, W., Weth, A., Gutberlet, J., Harms, G., and Groschner, K. (2014). Localization of VE-cadherin in plasmalemmal cholesterol rich microdomains and the effects of cholesterol depletion on VE-cadherin mediated cell-cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* *1841*, 1725-1732.
- Beloribi-Djefafli, S., Vasseur, S., and Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* *5*, e189.

Blanco, M.A., Aleckovic, M., Hua, Y., Li, T., Wei, Y., Xu, Z., Cristea, I.M., and Kang, Y. (2011). Identification of staphylococcal nuclease domain-containing 1 (SND1) as a Metadherin-interacting protein with metastasis-promoting functions. *J. Biol. Chem.* *286*, 19982-19992.

BLIGH, E.G., and DYER, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* *37*, 911-917.

Bovenga, F., Sabba, C., and Moschetta, A. (2015). Uncoupling nuclear receptor LXR and cholesterol metabolism in cancer. *Cell. Metab.* *21*, 517-526.

Broadhurst, M.K., Lee, R.S., Hawkins, S., and Wheeler, T.T. (2005). The p100 EBNA-2 coactivator: a highly conserved protein found in a range of exocrine and endocrine cells and tissues in cattle. *Biochim. Biophys. Acta* *1681*, 126-133.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* *89*, 331-340.

Brown, M.S., Radhakrishnan, A., and Goldstein, J.L. (2017). Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. *Annu. Rev. Biochem.*

Brownsey, R.W., Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa, J.E., and Lee, W.M. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 223-227.

Callebaut, I., and Mornon, J.P. (1997). The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development. *Biochem. J.* *321 (Pt 1)*, 125-132.

Caudy, A.A., Ketting, R.F., Hammond, S.M., Denli, A.M., Bathoorn, A.M., Tops, B.B., Silva, J.M., Myers, M.M., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2003). A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* *425*, 411-414.

Chang, T.Y., Chang, C.C., and Cheng, D. (1997). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 613-638.

Chartier, N.T., Laine, M.G., Ducarouge, B., Oddou, C., Bonaz, B., Albiges-Rizo, C., and Jacquier-Sarlin, M.R. (2011). Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. *Exp. Cell Res.* *317*, 1422-1436.

Chesneau, O., and el Solh, N. (1994). Primary structure and biological features of a thermostable nuclease isolated from *Staphylococcus hyicus*. *Gene* *145*, 41-47.

Clendening, J.W., Pandyra, A., Boutros, P.C., El Ghamrasni, S., Khosravi, F., Trentin, G.A., Martirosyan, A., Hakem, A., Hakem, R., Jurisica, I., and Penn, L.Z. (2010). Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15051-15056.

Courtney, K.D., Corcoran, R.B., and Engelman, J.A. (2010). The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J. Clin. Oncol.* *28*, 1075-1083.

Cristobal, S., Ochoa, B., and Fresnedo, O. (1999). Purification and properties of a cholesteryl ester hydrolase from rat liver microsomes. *J. Lipid Res.* *40*, 715-725.

Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T.C., and Farese, R.V., Jr. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell. Metab.* *18*, 153-161.

Dang, C.V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* *26*, 877-890.

Dang, C.V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1-11.

Dash, A.B., Orrico, F.C., and Ness, S.A. (1996). The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes Dev.* *10*, 1858-1869.

Dayton, T.L., Gocheva, V., Miller, K.M., Israelsen, W.J., Bhutkar, A., Clish, C.B., Davidson, S.M., Luengo, A., Bronson, R.T., Jacks, T., and Vander Heiden, M.G. (2016). Germline loss of PKM2 promotes metabolic distress and hepatocellular carcinoma. *Genes Dev.* *30*, 1020-1033.

de Gonzalo-Calvo, D., Lopez-Vilaro, L., Nasarre, L., Perez-Olabarria, M., Vazquez, T., Escuin, D., Badimon, L., Barnadas, A., Lerma, E., and Llorente-Cortes, V. (2015). Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer* *15*, 460-015-1469-5.

DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* *2*, e1600200.

Duan, Z., Zhao, X., Fu, X., Su, C., Xin, L., Saarikettu, J., Yang, X., Yao, Z., Silvennoinen, O., Wei, M., and Yang, J. (2014). Tudor-SN, a novel coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma protein, is essential for adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *289*, 8364-8374.

Eales, K.L., Hollinshead, K.E., and Tennant, D.A. (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* *5*, e190.

Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., and Foulfelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* *86*, 839-848.

Fashe, T., Saarikettu, J., Isomaki, P., Yang, J., and Silvennoinen, O. (2013). Expression analysis of Tudor-SN protein in mouse tissues. *Tissue Cell* *45*, 21-31.

Flier, J.S., Mueckler, M.M., Usher, P., and Lodish, H.F. (1987). Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* *235*, 1492-1495.

FOLCH, J., LEES, M., and SLOANE STANLEY, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* *226*, 497-509.

Friberg, A., Corsini, L., Mourao, A., and Sattler, M. (2009). Structure and ligand binding of the extended Tudor domain of *D. melanogaster* Tudor-SN. *J. Mol. Biol.* *387*, 921-934.

Gao, X., Fu, X., Song, J., Zhang, Y., Cui, X., Su, C., Ge, L., Shao, J., Xin, L., Saarikettu, J., *et al.* (2015). Poly(A)(+) mRNA-binding protein Tudor-SN regulates stress granules aggregation dynamics. *Febs j.* *282*, 874-890.

Gao, X., Ge, L., Shao, J., Su, C., Zhao, H., Saarikettu, J., Yao, X., Yao, Z., Silvennoinen, O., and Yang, J. (2010). Tudor-SN interacts with and co-localizes with G3BP in stress granules under stress conditions. *FEBS Lett.* *584*, 3525-3532.

Gao, X., Lowry, P.R., Zhou, X., Depry, C., Wei, Z., Wong, G.W., and Zhang, J. (2011). PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 14509-14514.

Gao, Y., Zhou, Y., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Radhakrishnan, A. (2017). Cholesterol-induced conformational changes in the sterol-sensing domain of the Scap protein suggest feedback mechanism to control cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* *292*, 8729-8737.

Garcia-Arcos, I. (2008). Estudio de la asociación de SND p102 (*Rattus norvegicus*) a cuerpos lipídicos del parénquima hepático.

Garcia-Arcos, I., Rueda, Y., Gonzalez-Kother, P., Palacios, L., Ochoa, B., and Fresnedo, O. (2010). Association of SND1 protein to low density lipid droplets in liver steatosis. *J. Physiol. Biochem.* *66*, 73-83.

Gatenby, R.A., and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer.* *4*, 891-899.

Gong, Y., Lee, J.N., Lee, P.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Ye, J. (2006). Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell. Metab.* *3*, 15-24.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Hazari, Y.M., Bashir, A., Haq, E.U., and Fazili, K.M. (2016). Emerging tale of UPR and cancer: an essentiality for malignancy. *Tumour Biol.* *37*, 14381-14390.

Hermanson, D.J., and Marnett, L.J. (2011). Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *30*, 599-612.

Ho, J., Kong, J.W., Choong, L.Y., Loh, M.C., Toy, W., Chong, P.K., Wong, C.H., Wong, C.Y., Shah, N., and Lim, Y.P. (2009). Novel breast cancer metastasis-associated proteins. *J. Proteome Res.* *8*, 583-594.

- Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12027-12032.
- Hossain, M.J., Korde, R., Singh, S., Mohammed, A., Dasaradhi, P.V., Chauhan, V.S., and Malhotra, P. (2008). Tudor domain proteins in protozoan parasites and characterization of *Plasmodium falciparum* tudor staphylococcal nuclease. *Int. J. Parasitol.* *38*, 513-526.
- Howell, J.J., Ricoult, S.J., Ben-Sahra, I., and Manning, B.D. (2013). A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 906-912.
- Huang, C., and Freter, C. (2015). Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 924-949.
- Huang, R., and Zong, X. (2017). Aberrant cancer metabolism in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis: Mechanisms in cancer progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *115*, 13-22.
- Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., and Thompson, E.W. (2007). Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.* *213*, 374-383.
- Israelsen, W.J., Dayton, T.L., Davidson, S.M., Fiske, B.P., Hosios, A.M., Bellinger, G., Li, J., Yu, Y., Sasaki, M., Horner, J.W., *et al.* (2013). PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell* *155*, 397-409.
- Israelsen, W.J., and Vander Heiden, M.G. (2015). Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* *43*, 43-51.
- Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., and Yang, X. (2011). P53 Regulates Biosynthesis through Direct Inactivation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Nat. Cell Biol.* *13*, 310-316.
- Keenan, T.W., Winter, S., Rackwitz, H.R., and Heid, H.W. (2000). Nuclear coactivator protein p100 is present in endoplasmic reticulum and lipid droplets of milk secreting cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1523*, 84-90.
- Kersten, S., and Stienstra, R. (2017). The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* *136*, 75-84.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., and Dang, C.V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* *11*, 325-337.
- Kowalczyk, A.P., and Nanes, B.A. (2012). Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Subcell. Biochem.* *60*, 197-222.
- Kraus, M., and Wolf, B. (1996). Implications of acidic tumor microenvironment for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis. *Tumour Biol.* *17*, 133-154.

Kuruma, H., Kamata, Y., Takahashi, H., Igarashi, K., Kimura, T., Miki, K., Miki, J., Sasaki, H., Hayashi, N., and Egawa, S. (2009). Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 as a potential tissue marker for prostate cancer. *Am. J. Pathol.* *174*, 2044-2050.

Laurenti, G., and Tennant, D.A. (2016). Isocitrate dehydrogenase (IDH), succinate dehydrogenase (SDH), fumarate hydratase (FH): three players for one phenotype in cancer? *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 1111-1116.

Lei, Y., Huang, Y., Zhang, H., Yu, L., Zhang, M., and Dayton, A. (2011). Functional interaction between cellular p100 and the dengue virus 3' UTR. *J. Gen. Virol.* *92*, 796-806.

Levenson, J.D., Koskinen, P.J., Orrico, F.C., Rainio, E.M., Jalkanen, K.J., Dash, A.B., Eisenman, R.N., and Ness, S.A. (1998). Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol. Cell* *2*, 417-425.

Li, A.C., and Glass, C.K. (2004). PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J. Lipid Res.* *45*, 2161-2173.

Li, C.L., Yang, W.Z., Chen, Y.P., and Yuan, H.S. (2008). Structural and functional insights into human Tudor-SN, a key component linking RNA interference and editing. *Nucleic Acids Res.* *36*, 3579-3589.

Li, Y.C., Park, M.J., Ye, S.K., Kim, C.W., and Kim, Y.N. (2006). Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am. J. Pathol.* *168*, 1107-18; quiz 1404-5.

Losman, J.A., and Kaelin, W.G., Jr. (2013). What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* *27*, 836-852.

Low, S.H., Vasanth, S., Larson, C.H., Mukherjee, S., Sharma, N., Kinter, M.T., Kane, M.E., Obara, T., and Weimbs, T. (2006). Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Dev. Cell.* *10*, 57-69.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.

Marquez, M.G., Favale, N.O., Leocata Nieto, F., Pescio, L.G., and Sterin-Speziale, N. (2012). Changes in membrane lipid composition cause alterations in epithelial cell-cell adhesion structures in renal papillary collecting duct cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 491-501.

Mollinedo, F., and Gajate, C. (2015). Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv. Biol. Regul.* *57*, 130-146.

Olkkonen, V.M., Beaslas, O., and Nissila, E. (2012). Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules* *2*, 76-103.

- Palacios, L., Ochoa, B., Gomez-Lechon, M.J., Castell, J.V., and Fresnedo, O. (2006). Overexpression of SND p102, a rat homologue of p100 coactivator, promotes the secretion of lipoprotein phospholipids in primary hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *1761*, 698-708.
- Parks, S.K., Cormerais, Y., and Pouyssegur, J. (2017). Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology. *J. Physiol.* *595*, 2439-2450.
- Patra, K.C., and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 347-354.
- Paukku, K., Kalkkinen, N., Silvennoinen, O., Kontula, K.K., and Lehtonen, J.Y. (2008). p100 increases AT1R expression through interaction with AT1R 3'-UTR. *Nucleic Acids Res.* *36*, 4474-4487.
- Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2015). Molecular mechanism of PPARalpha action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *62*, 720-733.
- Pike, L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* *44*, 655-667.
- Ponting, C.P. (1997). P100, a transcriptional coactivator, is a human homologue of staphylococcal nuclease. *Protein Sci.* *6*, 459-463.
- Ponting, C.P. (1997). Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 51-52.
- Porta, A., Colonna-Romano, S., Callebaut, I., Franco, A., Marzullo, L., Kobayashi, G.S., and Maresca, B. (1999). An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *254*, 605-613.
- Rabinovich, S., Adler, L., Yizhak, K., Sarver, A., Silberman, A., Agron, S., Stettner, N., Sun, Q., Brandis, A., Helbling, D., *et al.* (2015). Diversion of aspartate in ASS1-deficient tumours fosters de novo pyrimidine synthesis. *Nature* *527*, 379-383.
- Radhakrishnan, A., Sun, L.P., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2004). Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol. Cell* *15*, 259-268.
- Rajasekaran, D., Jariwala, N., Mendoza, R.G., Robertson, C.L., Akiel, M.A., Dozmorov, M., Fisher, P.B., and Sarkar, D. (2016). Staphylococcal Nuclease and Tudor Domain Containing 1 (SND1 Protein) Promotes Hepatocarcinogenesis by Inhibiting Monoglyceride Lipase (MGLL). *J. Biol. Chem.* *291*, 10736-10746.
- Ramirez de Molina, A., Rodriguez-Gonzalez, A., Gutierrez, R., Martinez-Pineiro, L., Sanchez, J., Bonilla, F., Rosell, R., and Lacal, J. (2002). Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 580-583.

Rao, S., Porter, D.C., Chen, X., Herliczek, T., Lowe, M., and Keyomarsi, K. (1999). Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7797-7802.

Rodriguez, L., Bartolome, N., Ochoa, B., and Martinez, M.J. (2006). Isolation and characterization of the rat SND p102 gene promoter: putative role for nuclear factor-Y in regulation of transcription. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1091*, 282-295.

Rodriguez, L., Ochoa, B., and Martinez, M.J. (2007). NF-Y and Sp1 are involved in transcriptional regulation of rat SND p102 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *356*, 226-232.

Ruiz, J.I., and Ochoa, B. (1997). Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *J. Lipid Res.* *38*, 1482-1489.

Saarikettu, J., Ovod, V., Vuoksio, M., Gronholm, J., Yang, J., and Silvennoinen, O. (2010). Monoclonal antibodies against human Tudor-SN. *Hybridoma (Larchmt)* *29*, 231-236.

Sakamoto, K., Yamasaki, Y., Kaneto, H., Fujitani, Y., Matsuoka, T., Yoshioka, R., Tagawa, T., Matsuhisa, M., Kajimoto, Y., and Hori, M. (1999). Identification of oxidative stress-regulated genes in rat aortic smooth muscle cells by suppression subtractive hybridization. *FEBS Lett.* *461*, 47-51.

Sami-Subbu, R., Choi, S.B., Wu, Y., Wang, C., and Okita, T.W. (2001). Identification of a cytoskeleton-associated 120 kDa RNA-binding protein in developing rice seeds. *Plant Mol. Biol.* *46*, 79-88.

Santhekadur, P.K., Akiel, M., Emdad, L., Gredler, R., Srivastava, J., Rajasekaran, D., Robertson, C.L., Mukhopadhyay, N.D., Fisher, P.B., and Sarkar, D. (2014). Staphylococcal nuclease domain containing-1 (SND1) promotes migration and invasion via angiotensin II type 1 receptor (AT1R) and TGFbeta signaling. *FEBS Open Bio* *4*, 353-361.

Santhekadur, P.K., Das, S.K., Gredler, R., Chen, D., Srivastava, J., Robertson, C., Baldwin, A.S., Jr, Fisher, P.B., and Sarkar, D. (2012). Multifunction protein staphylococcal nuclease domain containing 1 (SND1) promotes tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma through novel pathway that involves nuclear factor kappaB and miR-221. *J. Biol. Chem.* *287*, 13952-13958.

Santos, C.R., and Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *Febs j.* *279*, 2610-2623.

Schellenberg, M.J., Ritchie, D.B., and MacMillan, A.M. (2008). Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem. Sci.* *33*, 243-246.

Schwarz, D.S., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr. Biol.* *14*, 787-791.

Seveau, S., Bierne, H., Giroux, S., Prevost, M.C., and Cossart, P. (2004). Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J. Cell Biol.* *166*, 743-753.

- Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2012). Cholesterol metabolism and cancer: the good, the bad and the ugly. *Curr. Opin. Pharmacol.* *12*, 673-676.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569-572.
- Solan, N.J., Miyoshi, H., Carmona, E.M., Bren, G.D., and Paya, C.V. (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J. Biol. Chem.* *277*, 1405-1418.
- Staley, J.P., and Woolford, J.L., Jr. (2009). Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 109-118.
- Staubach, S., and Hanisch, F.G. (2011). Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert Rev. Proteomics* *8*, 263-277.
- Su, C., Zhang, C., Tecle, A., Fu, X., He, J., Song, J., Zhang, W., Sun, X., Ren, Y., Silvennoinen, O., *et al.* (2015). Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN), a novel regulator facilitating G1/S phase transition, acting as a co-activator of E2F-1 in cell cycle regulation. *J. Biol. Chem.* *290*, 7208-7220.
- Sundstrom, J.F., Vaculova, A., Smertenko, A.P., Savenkov, E.I., Golovko, A., Minina, E., Tiwari, B.S., Rodriguez-Nieto, S., Zamyatnin, A.A., Jr, Valineva, T., *et al.* (2009). Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1347-1354.
- Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., Charrasse, S., Bodin, S., and Gauthier-Rouviere, C. (2009). N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis. *J. Biol. Chem.* *284*, 23137-23145.
- Tennant, D.A., Duran, R.V., Boulahbel, H., and Gottlieb, E. (2009). Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis* *30*, 1269-1280.
- Tennant, D.A., Duran, R.V., and Gottlieb, E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* *10*, 267-277.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* *2*, 442-454.
- Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4735-4744.
- Tsuchiya, N., Ochiai, M., Nakashima, K., Ubagai, T., Sugimura, T., and Nakagama, H. (2007). SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. *Cancer Res.* *67*, 9568-9576.

Valineva, T., Yang, J., Palovuori, R., and Silvennoinen, O. (2005). The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6. *J. Biol. Chem.* *280*, 14989-14996.

Valineva, T., Yang, J., and Silvennoinen, O. (2006). Characterization of RNA helicase A as component of STAT6-dependent enhanceosome. *Nucleic Acids Res.* *34*, 3938-3946.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* *324*, 1029-1033.

Vander Heiden, M.G., and DeBerardinis, R.J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* *168*, 657-669.

Vieira, O.V., Laranjinha, J.A., Madeira, V.M., and Almeida, L.M. (1996). Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants. *J. Lipid Res.* *37*, 2715-2721.

Wahl, M.C., Will, C.L., and Luhrmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* *136*, 701-718.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* *123*, 309-314.

Weissbach, R., and Scadden, A.D. (2012). Tudor-SN and ADAR1 are components of cytoplasmic stress granules. *Rna* *18*, 462-471.

Wells, A., Yates, C., and Shepard, C.R. (2008). E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis* *25*, 621-628.

Xu, X., So, J.S., Park, J.G., and Lee, A.H. (2013). Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin. Liver Dis.* *33*, 301-311.

Yang, J., Aittomaki, S., Pesu, M., Carter, K., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Kieff, E., and Silvennoinen, O. (2002). Identification of p100 as a coactivator for STAT6 that bridges STAT6 with RNA polymerase II. *Embo j.* *21*, 4950-4958.

Yang, J., Valineva, T., Hong, J., Bu, T., Yao, Z., Jensen, O.N., Frilander, M.J., and Silvennoinen, O. (2007). Transcriptional co-activator protein p100 interacts with snRNP proteins and facilitates the assembly of the spliceosome. *Nucleic Acids Res.* *35*, 4485-4494.

Yao, D., Dai, C., and Peng, S. (2011). Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol. Cancer Res.* *9*, 1608-1620.

Yap, A.S., Gomez, G.A., and Parton, R.G. (2015). Adherens Junctions Revisualized: Organizing Cadherins as Nanoassemblies. *Dev. Cell.* *35*, 12-20.

- Ye, J., and DeBose-Boyd, R.A. (2011). Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* *3*, 10.1101/cshperspect.a004754.
- Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., *et al.* (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* *149*, 656-670.
- Yoo, B.K., Santhekadur, P.K., Gredler, R., Chen, D., Emdad, L., Bhutia, S., Pannell, L., Fisher, P.B., and Sarkar, D. (2011). Increased RNA-induced silencing complex (RISC) activity contributes to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *53*, 1538-1548.
- Yu, L., Di, Y., Xin, L., Ren, Y., Liu, X., Sun, X., Zhang, W., Yao, Z., and Yang, J. (2017). SND1 acts as a novel gene transcription activator recognizing the conserved Motif domains of Smad promoters, inducing TGFbeta1 response and breast cancer metastasis. *Oncogene* *36*, 3903-3914.
- Yue, S., Li, J., Lee, S.Y., Lee, H.J., Shao, T., Song, B., Cheng, L., Masterson, T.A., Liu, X., Ratliff, T.L., and Cheng, J.X. (2014). Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell. Metab.* *19*, 393-406.
- Yung, Y.C., Stoddard, N.C., and Chun, J. (2014). LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* *55*, 1192-1214.
- Zaugg, K., Yao, Y., Reilly, P.T., Kannan, K., Kiarash, R., Mason, J., Huang, P., Sawyer, S.K., Fuerth, B., Faubert, B., *et al.* (2011). Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev.* *25*, 1041-1051.
- Zhao, C.T., Shi, K.H., Su, Y., Liang, L.Y., Yan, Y., Postlethwait, J., and Meng, A.M. (2003). Two variants of zebrafish p100 are expressed during embryogenesis and regulated by Nodal signaling. *FEBS Lett.* *543*, 190-195.

H. APPENDIX: ENGLISH VERSION

Introduction

1. SND1 protein

SND1 (*Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1*), also known as TSN, SNc-Tudor, p100 or SND p102 (in the rat), was first described by Tong et al. in human B-lymphoblastoma cells. They showed that SND1 enhanced the transactivation of gene expression mediated by EBNA-2 (*Epstein-Barr virus nuclear antigen 2*) by binding to it, and they classified it as a transcriptional coactivator and named it p100 coactivator (Tong et al., 1995). SND1 can be found in many different organisms besides humans and mice such as in protozoa (Hossain et al., 2008), fungi (Porta et al., 1999), plants (Sami-Subbu et al., 2001), insects (Ponting, 1997b), fish (Abe et al., 2005), cows (Keenan et al., 2000) or rats (Sakamoto et al., 1999).

1.1. General characteristics of SND1

1.1.1. Structure

The gene that codes for SND1 is a highly conserved gene; in the human genome (location: 7q32.1; GeneID 27044), mouse genome (location: 6A3.3; GeneID 56463) and rat genome (location: 4q22; Gene ID 64635) it is very similar in length, around 400.000 nucleotides. It has more than 200 exons and it codes for a 910 amino acid protein with a molecular weight of 120 kDa.

The bioinformatic analysis of the sequence enabled Ponting to predict for the first time 4 consecutive Staphylococcal nuclease (SN) domains (SN1-SN4) (Ponting, 1997a) (**Figure A.1**). The SN activity is Ca^{2+} -dependent and can degrade both DNA and RNA (Chesneau and el Solh, 1994), but it has been described that the SNs in the SND1 sequence lack the amino acids necessary to bind to Ca^{2+} and the substrate (Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997a; Porta et al., 1999).

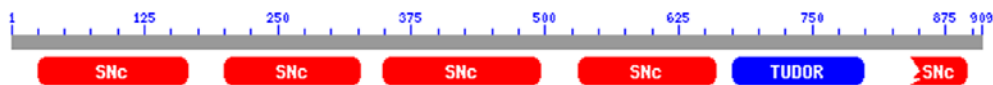


Figure A.1: Domains identified in the sequence of SND1. Several domains have been identified: 4 Staphylococcal nuclease domains (SNc in the image), a Tudor domain and an incomplete SNc in the C terminus.

The presence of another domain was also predicted, the one that appears in the Tudor protein of *Drosophila melanogaster* (Tudor domain) (Ponting, 1997a). The Tudor protein participates in the oogenesis of *D. melanogaster*, and the Tudor domain can be found in several proteins that interact with RNA molecules (Ponting, 1997a).

SND1 has a fifth SN domain in the C-terminus (SN5) (Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997a) (**Figure A.1**). Its sequence is shorter than in the other SN domains and its length varies among different species

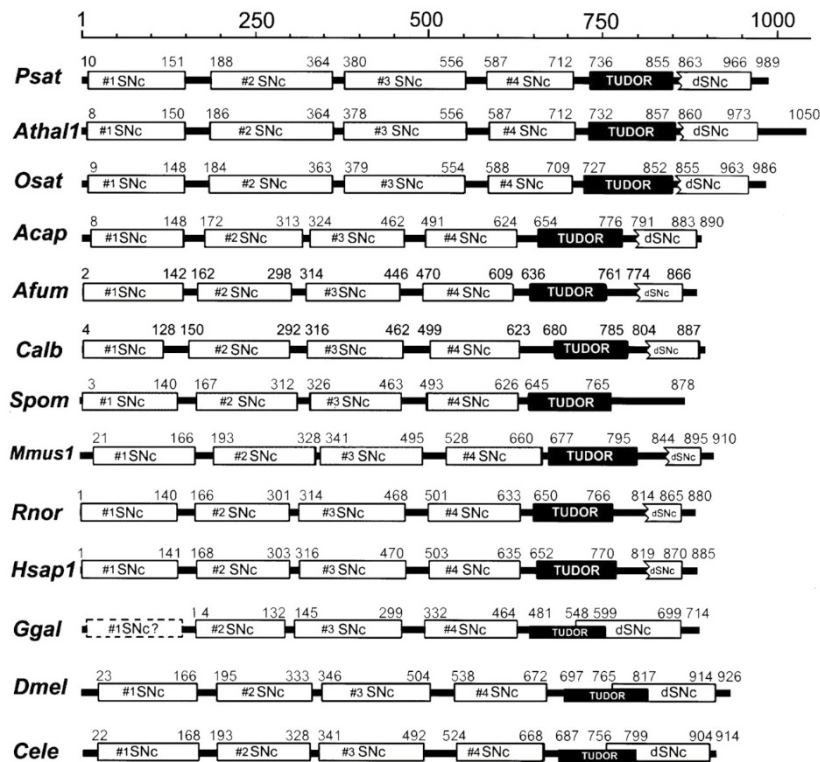


Figure A.2: Diagram of the domains identified in the SND1 sequence of several organisms. Species shown: *Pisum sativum* (Psat, pea), *Arabidopsis thaliana* (Athal, plant), *Oryza sativa* (Osat, rice), *Ajellomyces capsulatum* (Acap, fungus), *Aspergillus fumigatus* (Afum, fungus), *Schizosaccharomyces pombe* (Spom, yeast), *Candida albicans* (Calb, yeast), *Mus musculus* (Mmus, mouse), *Rattus norvegicus* (Rnor, rat), *Homo sapiens* (Hsap, human), *Gallus gallus* (Ggal, hen), *Drosophila melanogaster* (Dmel, vinegar fly), *Caenorhabditis elegans* (Cele, nematode). Taken from (Abe et al., 2003).

(Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997b; Abe et al., 2003) (**Figure A.2**). The last 2 domains are usually considered as a unit, Tudor-SN5 double domain.

SND1 is a highly conserved protein. The SN1-4+Tudor-SN5 domain pattern is found in the homologues of different species and different cell types (**Figure A.2**) (Porta et al., 1999; Sami-Subbu et al., 2001; Abe et al., 2003; Zhao et al., 2003; Abe et al., 2005; Hossain et al., 2008).

The promoters of the human and rat SND1 genes (GenBank EF690304 eta AY957585) were described in our group (Rodriguez et al., 2006; Armengol et al., 2013) based on the cDNA sequence of the rat gene (GenBank AAU05374) (Palacios et al., 2006). These promoters also show a high level of homology and the regions needed to maintain a basal transcription level seem to be similar, they lack TATA boxes and have CCAAT and CpG islands instead (Rodriguez et al., 2006; Rodriguez et al., 2007; Armengol et al., 2013). Although the interaction with several factors that regulate gene transcription has been shown in vivo and in vitro in the cloned promoters, there is not much information regarding the functionality of those. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments have shown that Sp1 (specificity protein 1), NF-Y (nuclear factor Y) eta NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) transcription factors can bind to the SND1 promoter (Armengol et al., 2013).

1.1.2. Location

SND1 protein and its mRNA are expressed in almost every tissue in mice, especially in epithelial cells, replicating cells, progenitor cells and cells from secretory organs (Fashe et al., 2013). According to different publications, intracellular location seems to depend on the cell type and physiological situation. Some of these works have reported a nuclear and cytoplasmic location (Broadhurst et al., 2005; Saarikettu et al., 2010) while others have described it to be just extranuclear (Keenan et al., 2000; Garcia-Arcos et al., 2010). Our group has shown that SND1 is located in the cytoplasm in rat hepatocytes both by immunocytochemistry and by Western blotting (WB) analysis (**Figure A.3**) (Palacios et al., 2006; Garcia-Arcos et al., 2010).

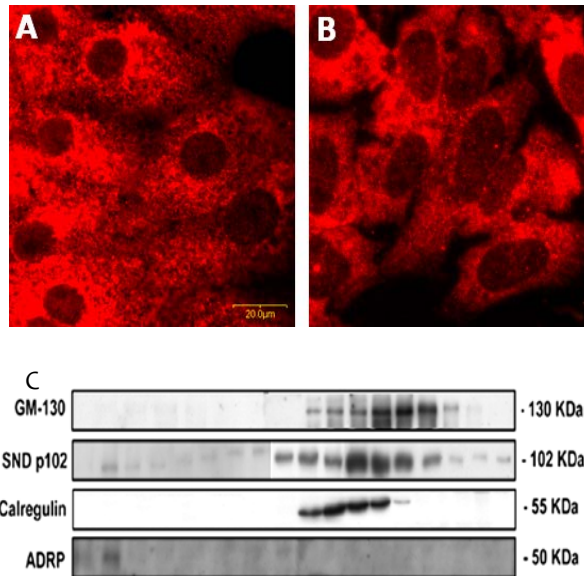


Figure A.3: Findings of our group on the intracellular location of SND1. SND1 was immunodetected in primary rat hepatocytes (A) and HepG2 cells (B) (taken from (Palacios et al., 2006)). Extranuclear location can be observed. Furthermore, the postnuclear supernatant of rat liver was fractionated by centrifugation in a density gradient and markers of Golgi apparatus (GM-130), endoplasmic reticulum (calregulin) and lipid droplets (ADRP) and SND1 were detected by Western blotting in different fractions (C) (taken from (Garcia-Arcos et al., 2010)). SND1 cofractionates with cytoplasmic markers.

1.2. SND1 functions

So far, different groups have followed different research lines in the analysis of the function of SND1. SND1 is probably a multifunctional protein that plays different roles depending on the species, cell type or physiological condition.

1.2.1. Transcriptional regulation

Many works have shown that SND1 is related to transcriptional regulation. Tong and colleagues showed that besides the interaction with EBNA2, SND1 could bind transcription factor IIE (TFIIE) (Tong et al., 1995). It has also been described that SND1 can bind c-Myb (Dash et al., 1996) and signal transducer and activator

of transcription 5 (Stat5) (Paukku et al., 2003). Cells overexpressing SND1 in mammary gland epithelial cell lines showed a 100 times higher Stat5-mediated transcriptional activation (Paukku et al., 2003).

Other works have related SND1 and Stat6 transcription factor. Stat6 is the main mediator in the interleukin 4 (IL4)-mediated gene regulation. Yang and colleagues found that the SND1 SN domains could interact with Stat6 in COS-7 cells. They also showed that SND1 could interact with the big subunit of II RNA polymerase, suggesting that SND1 functions as a bridging factor between STAT6 and the II RNA polymerase (Yang et al., 2002). According to Valineva and colleagues, SND1 functions as a bridging factor between Stat6 and CBP (CREB-binding protein) in COS-7 cells. On the other hand, SND1 was found to be necessary in HeLa cells for Stat6 to recruit histone acyltransferase activity (Valineva et al., 2005). In another work, that same group showed that SND1 plays a bridging role between Stat6 and A RNA helicase. The luciferase activity of Stat6-mediated transcriptional activity after treatment with IL4 was higher when SND1 and A helicase were overexpressed (Valineva et al., 2006).

Low and colleagues showed that SND1 could also function as a bridging factor in the interaction between Stat6 and polycystin-1 (PC1). PC1 is an integral membrane protein expressed in the ciliary epithelia of the kidney and plays an important role as a sensor of the movement of the external fluids: this movement promotes the proteolysis of the cytoplasmic region of PC1 which then translocates to the nucleus where it enhances the Stat6-mediated transcription by interacting with SND1 and Stat6 (Low et al., 2006).

Besides transcription factors, some other proteins have been shown to interact with SND1. Leverson and colleagues described that Pim1 serine/threonine kinases can bind and phosphorylate SND1 to form a stable complex that can enhance the transcriptional activity of the c-Myc transcription factor (Leverson et al., 1998).

A more recent work has suggested that SND1 participates in the regulation of the transforming growth factor β 1 (TGF β 1) signaling pathway promoting breast cancer (Yu et al., 2017). According to this work SND1, together with GCN5 histone acetylase, binds the Smad2/3/4 promoter to enhance its transcriptional activation.

1.2.2. RNA metabolism

The interaction between SND1 and RNA molecules was first described back in 2001. In the development of rice seeds a massive production of the protein prolamine occurs, and several proteins were found bound to the mRNA of prolamine, including SND1 (Sami-Subbu et al., 2001).

In another work, the interaction between SND1 and the angiotensin II type 1 receptor (AT1R) was described. Authors showed that in smooth muscle cells of blood vessels SND1 binds the 3'-untranslated region (3'-UTR) of AT1R mRNA and positively regulates its expression (Paukku et al., 2008).

Aside from the interactions with mRNA molecules, the research line relating SND1 and the gene expression regulation by RNA interference (RNAi) is gaining strength, often suggesting a direct interaction between SND1 and RNA molecules. The RNAi is a very complex process in which an mRNA molecule and several protein complexes participate. Among these, the RNA-induced silencing complex (RISC) can specifically identify an mRNA molecule and degrade it with its nuclease activity.

In 2003 Caudy and colleagues found SND1 to be present in the RISC of different cell types (Caudy et al., 2003). They showed that SND1 has nuclease activity in *D. melanogaster* but, unlike the nuclease activity in RISC, this was nonspecific and could degrade both RNA and DNA molecules. In this context, authors suggested that the function of SND1 could be to help in the degradation of mRNA fragments previously cleaved by RISC (Caudy et al., 2003).

This nuclease activity does not match the predictions made by the bioinformatic analyses of the SND1 sequence (Callebaut and Mornon, 1997; Ponting, 1997a). On the other hand, another work about the nuclease activity of RISC discarded SND1 as the responsible for the small interfering RNA (siRNA)-directed RNA strand cleaving, since this activity is Mg²⁺-dependent and the SN activity is Ca²⁺-dependent. Moreover, addition of SN inhibitors did not inhibit RISC nuclease activity (Schwarz et al., 2004).

Other works have tried to clarify these contradictions by expressing partial human SND1 protein fragments in *E. coli* and analyzing their nuclease activity. These works showed that SND1 has nuclease activity and that SN1 and SN2 are necessary for this activity. In a similar way, they detected RNase activity, but not in

the SN1-less fragments. They found that at least 2 SN domains are needed to bind RNA molecules and that the Tudor-SN5 domain does not participate in this binding (Li et al., 2008). This is consistent with the characterization of the Tudor domain of human and *D. melanogaster* SND1 homologues: the acidic nature of the surface makes the RNA binding difficult (Li et al., 2008; Friberg et al., 2009). Sundstrom and colleagues also showed that SND1 has RNase activity, which is disrupted when SND1 is proteolyzed between the Tudor and SN5 motives (Sundstrom et al., 2009).

In a study using *Plasmodium falciparum* SND1, fragments containing 2 SN domains and the Tudor domain also showed Ca²⁺-dependent nuclease activity and could cleave single stranded DNA and RNA molecules. However, contradicting previous data, this work described that the Tudor domain was able to bind RNA (Hossain et al., 2008).

Besides participating in the RNAi, according to Yang and colleagues, SND1 also interacts with components of the spliceosome (Yang et al., 2007). In eukaryotic cells, the splicing of pre-mRNA molecules is an essential process for the regulation of gene expression (Schellenberg et al., 2008; Staley and Woolford, 2009; Wahl et al., 2009). The spliceosome complex carries out this splicing, where small nuclear RNA (snRNA) molecules, spliceosome proteins and many other proteins can be found. These proteins of the spliceosome are also known as small nuclear ribonucleoproteins (snRNP). The spliceosome finds and cleaves out the introns defined in the pre-mRNA sequence and joins the exons together. The alternative splicing of a pre-mRNA molecule gives rise to different mRNA molecules so that different proteins or different sized versions of the same protein can be produced from a single pre-mRNA.

In some experiments, using recombinant proteins, SND1 was found to interact with several snRNPs. Moreover, SND1 has been shown to accelerate the kinetics of splicing by hastening the spliceosome assembly *in vitro* (Yang et al., 2007). Moreover, other works have also described this activity, which disappears when SND1 is proteolyzed between the Tudor and SN5 domains (Sundstrom et al., 2009). In fact, is the Tudor domain the one that accelerates the spliceosome assembly *in vitro* (Yang et al., 2007).

1.2.3. Lipid metabolism

Although most of the work about SND1 in the literature is about its implication in the transcriptional regulation and RNA metabolism, there is also some evidence that relates SND1 with lipid metabolism.

Our research group was first interested in SND1 due to the analysis of an endoplasmic reticulum (ER) cholesteryl ester hydrolase (CEH) from rat liver. Our group described a chromatographic procedure to purify microsomal CEH activity (Cristobal et al., 1999) from lysosomal and cytosolic CEH activities. SND1 was identified in the purified microsomal fraction. Since then our group has developed several tools for the analysis of SND1 such as recombinant vectors for overexpression and specific antibodies (Palacios et al., 2006).

The first functional studies related to the management of lipids were carried out in primary cultures of rat hepatocytes with differential expression of SND1 by adenoviral vectors. We showed that SND1 overexpression promoted microsomal cholesteryl ester (CE) and triglyceride (TG) levels to drop and the secretion of phospholipids (PL) without a change in the number of VLDL particles (Palacios et al., 2006).

In other works, the relation between SND1 and lipid droplets (LD) has been studied. We showed that SND1 translocates to LDs in different steatotic models (Garcia-Arcos et al., 2010). One of the steatotic models was the oleic acid (OA) treatment in primary cultures of rat hepatocytes; when OA was removed from the culture media, the relative location of SND1 and adipophilin (LD marker) changed without disappearing from the LDs (Garcia-Arcos, 2008). This SND1 translocation in primary hepatocytes promoted by OA was shown to be glucose- and insulin-dependent (Garcia-Arcos, 2008), which suggests that the location of SND1 can be steatogenic and lipogenic factor-dependent.

Some other groups besides ours also relate SND1 and lipid management. Keenan and colleagues found SND1 in the LDs of milk-secreting cells in cows and mouse adipocytes, among others (Keenan et al., 2000). This work suggested an unspecific role of SND1 in TG-accumulating organelles. Loss-of-function studies suggest that SND1 is necessary for adipogenesis as SND1 deletion invalidates dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine and insulin-induced adipocyte differentiation.

Moreover, SND1 also impairs the expression of fatty acid (FA) and glucose metabolism regulator peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) target genes aP2 and adipsin (Duan et al., 2014). A more recent work suggests a possible interaction between SND1 and monoglyceride lipase (MGL). This interaction seems to promote the ubiquitinylation and degradation of MGL, which can regulate FA availability (Rajasekaran et al., 2016).

1.3. Physiopathological relevance of SND1

Despite the fact that the molecular function of SND1 has not been elucidated yet, there is growing evidence of its physiopathological relevance. Underexpression of SND1 has been related to lower cellular growth or even cell death (Tong et al., 1995; Hossain et al., 2008), and its overexpression has been related to several pathological conditions where a positive correlation between SND1 expression level and proliferation is observed.

For example, hydrogen peroxide, which promotes cell division in smooth muscle cells of blood vessels, induces SND1 overexpression (Sakamoto et al., 1999). On the other hand, SND1 overexpression in smooth muscle cells of blood vessels also induces AT1R overexpression (Paukku et al., 2008)

It is also widely known that SND1 expression is altered in several cancer types. SND1 expression is higher in breast cancer (Ho et al., 2009) or colon cancer (Tsuchiya et al., 2007) than in healthy tissue. The latter work showed that SND1-overexpressing cell lines lose the contact-mediated growth inhibition and E-cadherin localization in cell-cell contact sites. This suggested that SND1 promotes the internalization of plasma membrane E-cadherin (Tsuchiya et al., 2007). SND1 overexpression has also been observed in prostate cancer (Kuruma et al., 2009); this work proposed SND1 expression control as a treatment to stop abnormal cell growth.

SND1 has a cleavage site for caspase-3-like enzymes between the Tudor and SN5 domains, and when SND1 is proteolyzed in this region it fails to perform some of its functions. When the site for caspase-3 cleavage was mutated, consequently avoiding proteolysis, enhanced proliferation was observed together with a higher survival rate against induced apoptosis. On the contrary, siRNA-mediated SND1 degradation enhanced the response against induced apoptosis (Sundstrom et al., 2009). These results show that SND1 promotes cellular

proliferation and that its degradation by caspase-3 is necessary for an adequate apoptotic response, suggesting it plays an important role in one of the principal cancer hallmarks, uncontrolled cell proliferation.

Yoo and colleagues also described that SND1 can interact with metadherin (MTDH) (Yoo et al., 2011). Among others, MTDH is accountable for modulating the expression of genes that regulate the cellular invasion and metastatic capacities. Some of the works previously mentioned showed that the overexpression of either SND1 or MTDH promoted hepatocellular carcinoma (HCC) viability and tumorigenicity. These cells also showed a higher RISC activity. Together with these results, the inhibition of the SND1 nuclease activity lowered the HCC viability. They suggested that the SND1- or MTDH-mediated increase in RISC activity could enhance the degradation of tumor suppressor genes promoting HCC tumorigenicity (Yoo et al., 2011).

The exact role of SND1 in promoting tumorigenicity remains unknown but many other works have also established a correlation. SND1 has been shown to promote resistance to apoptosis and to regulate the expression of genes associated with metastasis and chemoresistance. High expression of SND1 in primary tumors has also been strongly associated with reduced metastasis-free survival. The same work showed that breast cancer patients who have had metastases had a higher SND1 expression (Blanco et al., 2011).

Some other works suggest that SND1 participates in the angiogenesis. Shantekadur and colleagues described that SND1 promotes the expression of angiogenic factors by the NF- κ B pathway activation-mediated induction of mir-221. This work showed a correlation between the SND1 expression level and the aggressiveness of the tumors (Santhekadur et al., 2012). It has also been proposed that SND1 can be an inducer of the epithelial-mesenchymal transition (EMT). SND1 seems to regulate the cellular migratory and invasive capacities that are essential in EMT by stabilizing AT1R mRNA and activating TGF β signaling pathway (Abe et al., 2003; Santhekadur et al., 2014).

In some studies of the SND1 gene promoter, our group showed that SND1 expression can be modulated in some cellular stress conditions. We showed that NF- κ B -mediated proinflammatory stimuli in HCC and ER stress could enhance SND1 expression (Armengol et al., 2013; Armengol et al., 2014). Cellular stress has been related to several pathologies, including cancer (Mantovani et al., 2008; Hazari et al., 2016).

Although most of the works describe protumorigenic effects of SND1, there are also some that could suggest otherwise. It has been described that endocannabinoids have an antitumorigenic effect by modulating the induction of apoptosis and inhibiting angiogenesis and cellular migration (Hermanson and Marnett, 2011). MGL cleaves an endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol (2-AG), which negatively regulates the endocannabinoid signaling pathway. As mentioned before, MGL is degraded because of the interaction with SND1 (Rajasekaran et al., 2016), which suggests that SND1 could have a protective role in some cancers.

2. Metabolic adaptations in cancer

Nowadays metabolic deregulation is considered a hallmark of cancer (Hanahan and Weinberg, 2011) and more and more works have shown that cancer cells modulate their metabolism in order to promote proliferation, survival and metastatic capacities (Tennant et al., 2009; Huang and Zong, 2017; Vander Heiden and DeBerardinis, 2017).

2.1. Adaptations of the energetic metabolism

In normal cells and normoxic conditions, most of the final products of glycolysis are directed towards the tricarboxylic acid (TCA) cycle and are totally oxidized in the mitochondria, and most of the ATP is obtained via oxidative phosphorylation. However, in hypoxic conditions, the pyruvate obtained in the glycolysis is converted into lactate by lactic fermentation (Tennant et al., 2010). The inhibitory effect of oxygen on the fermentation is known as Pasteur Effect.

On the other hand, cancer cells are programmed to direct the pyruvate towards the lactic fermentation even in normoxic conditions, which is known as Warburg effect (Warburg, 1956). This metabolic pathway is not energetically as efficient as the aerobic glycolysis as less ATP per glucose molecule is obtained. Accordingly, cancer cells show an elevated glucose consumption rate to sustain tumor growth. At the same time, the high lactate production entails the acidification of the tumor environment, promoting tumor growth and invasion among others (Kraus and Wolf, 1996; Gatenby and Gillies, 2004; Parks et al., 2017).

Warburg first explained the high lactate production in cancer cells as an impaired oxidative metabolism, but, as many other works, he failed to demonstrate that cancer cells had an impaired mitochondrial

respiration (Vander Heiden et al., 2009; Koppenol et al., 2011). Furthermore, mitochondrial respiration has been shown to be essential for tumor growth (DeBerardinis and Chandel, 2016).

In addition to glucose, many other nutrients also contribute significantly to the basic metabolic functions of cancer cells. The most common is glutamine (Altman et al., 2016), but in recent years it has been shown that different cancer cells use different carbon sources so the list of carbon sources that cancer cells can use is becoming larger (Vander Heiden et al., 2009). Considering that most cancer cells grow in a nutrient-deprived microenvironment, the flexibility to use different nutrients can somehow be advantageous.

Not every metabolic adaptation contributes in the same level to the tumor development. Nowadays there is not a clear classification and different works use different criteria to classify these adaptations of metabolic activities. Some of these adaptations play an important role in the transformation of cancer cells. These adaptations of metabolic activities are usually the result of mutant enzymes generated by genetic inheritance or somatic mutations. Most studied mutations include those of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) (Losman and Kaelin, 2013), fumarate hydratase (FH) and succinate dehydrogenase (SDH) complex proteins (Laurenti and Tennant, 2016).

IDH enzymes catalyze the decarboxylation of isocitrate to form α -ketoglutarate (α -KG). Mutations in IDH1 and IDH2 genes can be found in different tumor types and these mutant enzymes synthesize D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) from α -KG. D-2HG accumulates and inhibits the activity of some α -KG-dependent dioxygenases, including the prolyl hydroxylases that regulate the degradation of hypoxia-induced factor 1 (HIF1) α subunit and the methylation state of DNA (Losman and Kaelin, 2013; Laurenti and Tennant, 2016).

The SDH complex and FH catalyze consecutive reactions in the TCA. First succinate is oxidized to fumarate by the SDH complex and the latter is hydrated to form malate in a reversible reaction. SDH also participates in the electron transport chain. Mutations in these enzymes result in an accumulation of succinate and fumarate which, like D-2HG, can interfere with the activity of some dioxygenases promoting the accumulation of HIF (Laurenti and Tennant, 2016).

Many other activities, although not necessary for cell transformation, make an important contribution to tumor development. These activities are often regulated by oncogenes and tumor suppressor genes. For example, enzymes implicated in glucose metabolism or glutaminolysis and different metabolite carriers are targets of the c-Myc protooncogene (Dang, 1999). Kirsten rat sarcoma (KRAS) oncogene targets include enzymes that regulate the cellular redox balance and enzymes implicated in the synthetic pathways of different macromolecules. The mechanistic target of rapamycin complex one (mTORC1) signaling pathway also regulates the synthesis of lipids, proteins and nucleic acids. The deregulation of these metabolic activities can promote tumorigenesis (Flier et al., 1987; Howell et al., 2013; Altman et al., 2016). Besides the mutations that occur in oncogenes and tumor suppressor genes, the mutations of enzymes implicated in the synthesis of arginine can promote proliferation by directing the aspartate towards nucleotide synthesis (Rabinovich et al., 2015).

Some other metabolic activities are not even necessary for tumor growth and development and are differently modulated depending on the cancer type. The pyruvate kinase M2 (PKM2) enzyme is an example of a dispensable activity for tumor development. Some cancers show an overexpression of this enzyme but it is not necessary for the development of breast cancer or leukemia. On the other hand, loss of PKM2 can promote tumorigenesis in some models and its activation can inhibit tumor growth (Dayton et al., 2016; Israelsen et al., 2013; Israelsen and Vander Heiden, 2015).

Some of the most important adaptations of cancer cells are the ones that enable cells to deal with hypoxic conditions. Many solid tumors develop hypoxic areas as they outgrow their vascularization capacity as a consequence of uncontrolled cell proliferation. The low availability of oxygen promotes the accumulation of HIF proteins by inhibiting their hydroxylation and proteasomal degradation. The stabilized HIF α translocates then to the nucleus and, after heterodimerizing with HIF β , activates the expression of target genes. HIF signaling activation promotes vascularization by activating the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). Moreover, many other metabolic adaptations happen to enhance the survival rate in hypoxic conditions. HIF proteins also activate the expression of several glycolytic enzymes and the glucose transporter 1 (GLUT1). At the same time, they inhibit the oxidation of pyruvate in the TCA by promoting the expression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), enzyme that inhibits pyruvate dehydrogenase (PDH). As a result, glucose utilization for lipid synthesis is inhibited and the use of other carbon sources is promoted. In normoxic conditions, HIFs are targeted by oxygen-dependent prolyl hydrolases and degraded after

ubiquitinylation (Tennant et al., 2009; Santos and Schulze, 2012; Eales et al., 2016). However, many tumors remain in pseudohypoxic conditions where even in the presence of normal oxygen concentrations HIFs are stabilized by several mutations above described.

2.2. Lipid metabolism

2.2.1. Adaptations

Although initially they were not considered important, nowadays, it is essential to understand the changes in lipid metabolism to understand the biology of tumors. Lipids participate in various important processes of tumor biology and are essential for the development of tumoral phenotype. They play an extremely important role in cell growth and proliferation. As indispensable components of biological membranes, PL and cholesterol availability in proliferating cells must be high, so besides enhancing exogenous lipid absorption, de novo synthesis pathways are also overactivated.

It has been previously described that cancerous cells and tissues have higher cholesterol levels than normal cells and tissues and overexpression and overactivation of cholesterologenic enzymes has been shown (Huang and Freter, 2015). Mutations in tumor protein 53 (TP53), which is overexpressed in 50% of human cancers, can promote an overactivation of the mevalonate pathway enhancing the proteolysis of sterol regulatory element-binding proteins (SREBP). In breast cancers with TP53 mutations, for example, overexpression of sterol O-acyltransferase 2 (SOAT2), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (HMGS1), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1 (IDI1), squalene epoxidase (SQLE) and lanosterol synthase (LSS) has been described (Silvente-Poirot and Poirot, 2012).

Although the adaptations of FA metabolism in cancer were not considered important at first, many works have underlined the role they play in tumor development in recent years. Several enzymes of the FA biosynthetic pathway such as ATP citrate lyase (ACLY), acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS) are overexpressed in most cancer types, ensuring a high FA synthesis rate by enhancing the cytosolic acetyl-CoA availability (Santos and Schulze, 2012; Baenke et al., 2013; Beloribi-Djefaffia et al., 2016). Many tumors have also shown an overexpression and overactivation of choline kinase, essential for

phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) synthesis (Ramirez de Molina et al., 2002). Enzymes implicated in FA oxidation can also have an impact in the cancerous phenotype. Carnitine palmitoyltransferase 1A and 1C (CPT1A and CPT1C), the enzymes that catalyze the limiting step in FA oxidation, appear to be overexpressed in some tumor types. Some studies show that tumors overexpressing CPT1C show higher FA oxidation levels, and the consequent higher ATP production makes these tumors more resistant to hypoxia-induced cell death. Those works suggest a correlation between CPT1 expression level and tumor development (Zaugg et al., 2011; Balaban et al., 2015).

Excessive lipids (such as cholesterol and FA) are stored in LDs and the overaccumulation of LDs is considered as a hallmark of the cancer aggressiveness since tumors with a high number of LD have been shown to be more resistant to chemotherapy (Santos and Schulze, 2012; Beloribi-Djefalia et al., 2016). It has been described that breast, lung, liver, colon and prostate cancer cells have a higher number of LDs and that the size of these is bigger compared to the ones in normal cells. Furthermore, in breast cancer TG content of LDs has been associated with a higher survival rate of cancer cells (Balaban et al., 2015).

Lipids also play a central role in different signaling pathways in both normal and cancer cells. Due to the overactivation of lipid synthesis in cancer, there is an increased availability of lipids that participate in tumorigenic signaling pathways. Cholesterol is an essential component of biological membranes that, together with sphingolipids, forms membrane microdomains known as lipid rafts. Lipid rafts play an important role modulating the plasma membrane geometry, regulating the lateral diffusion of molecules and regulating signal transductor proteins. Lipid and protein composition of lipid rafts differs from neighbor areas of the plasma membrane allowing some level of plasma membrane compartmentalization. Signal transduction of key processes for cancer development such as adhesion, migration, survival and proliferation are lipid raft-dependent (Mollinedo and Gajate, 2015). Cancer cells seem to have a higher number of cholesterol rich lipid rafts (CRLR) which is in accordance with the characteristic higher cholesterologenesis and cholesterol accumulation of cancer cells (Li et al., 2006).

Taking into account that cholesterol is the main component of lipid rafts, CRLRs probably play important roles in tumor progression. Some works have shown that CRLRs are important mediators of Akt signaling (Mollinedo and Gajate, 2015). Phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) and its downstream Akt (also known as protein B kinase) are implicated in the regulation of proliferation and apoptosis and the inappropriate

activation of these promotes the invasive cancer phenotype (Courtney et al., 2010). As many other pathways implicated in cell survival, PI3K/Akt signaling pathway is located in lipid rafts (Gao et al., 2011) suggesting that these domains play a central role in cancer development (Li et al., 2006). In addition to cholesterol, other lipids also play an important role as second messengers in different signaling pathways. These include lysophosphatidic acid (LPA), phosphatidic acid (PA) and diglycerides (DG), which can modulate cell proliferation, migration and survival by binding G protein-coupled receptors (Anliker and Chun, 2004; Baenke et al., 2013; Yung et al., 2014).

Lastly, lipids also participate in the posttranscriptional modification of several proteins. Acyl groups can covalently bind to different proteins. Cholesterol synthesis pathway intermediates such as farnesyl or geranylgeranyl groups can also bind to some proteins to ensure the correct membrane localization of those. Cholesterol derivatives such as oxysterols and cholesterol itself also play an important role in protein modifications. For example, hedgehog signaling pathway ligands can be modified by covalently binding cholesterol or oxysterols, which modulates their intracellular trafficking. Since many lipid-modified proteins play critical roles in tumor development, lipid metabolism deregulations can severely affect carcinogenesis (Baenke et al., 2013).

2.2.2 Regulation

SREBP

Lipid biosynthetic pathways are highly regulated as many cellular functions depend on lipid availability. Several genes that code proteins of the FA and cholesterol biosynthetic pathways are SREBP targets (Baenke et al., 2013). Mammals produce 3 isoforms of SREBPs: SREBP1a and SREBP1c, products of alternative splicing of the same gene, and SREBP2, synthesized from a different gene. Unlike other transcription factors, SREBPs are synthesized as integral proteins inserted in the ER membrane (**Figure A.4**). The N-terminus of these proteins binds to the sterol response element (SRE) sequences of promoters of lipogenic genes and promote their transcription. Among the three isoforms, SREBP1a and SREBP1c are more active in the regulation of genes implicated in FA synthesis and SREBP2 in the regulation of cholesterologenic genes (Ye and DeBose-Boyd, 2011).

For the N-terminal fragment of SREBPs to be able to activate gene transcription, they need to be released from the ER and translocated to the Golgi apparatus, where the active fraction is cleaved by the action of specific proteases so it can be translocated to the nucleus (**Figure A.4**). SREBP cleavage-activating protein (SCAP) and insulin induced gene (INSIG) proteins play key roles in this process functioning as sterol level sensors enabling or preventing the transport of SREBPs from the ER to Golgi. When cellular sterol levels are low, SCAP and INSIG release from each other and INSIG is degraded by the proteasome; consequently, the SCAP/SREBP complex is transported to the Golgi apparatus by coat protein II (COPII) vesicles. Once in the Golgi apparatus site-1 protease (S1P) and site-2 protease (S2P) consecutively cleave SREBP releasing the active N-terminal fragment that translocates to the nucleus promoting the activation of the transcription of target genes.

On the contrary, when cellular sterol levels are high, ER cholesterol concentration rises and binds to SCAP. This binding induces a conformational change in SCAP and promotes its binding to INSIG. This binding prevents the internalization of the SCAP/SREBP complex into COPII vesicles, so SREBP remains in the ER and does not activate the transcription of lipogenic genes (**Figure A.4**) (Brown and Goldstein, 1997; Ye and DeBose-Boyd, 2011).

In addition to the proteolysis-mediated regulation, the activity of SREBP proteins can be modulated by several coactivators such as p300 and cyclic adenosine monophosphate response element-binding (CREB) protein. On the other hand, SREBP proteins can be phosphorylated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) promoting its polyubiquitinylation and degradation (Xu et al., 2013).

The regulation of the SREBP1c isoform seems to be mostly insulin-dependent (Eberle et al., 2004). Insulin promotes SREBP1c expression in hepatocyte cultures (Azzout-Marniche et al., 2000). More recent works also suggest that insulin promotes the proteolytic activation of SREBP1c, although the exact mechanism remains to be clarified (Xu et al., 2013).

LXR

Together with the SREBP system, liver X receptor (LXR) nuclear receptors also play a key role in the regulation of lipid metabolism. LXR receptors in the liver are activated by oxysterols and oxidized cholesterol

derivatives. There are two LXR isoforms, LXR α and LXR β , and both need to form heterodimers with retinoid X receptor (RXR) to bind to DNA and regulate gene expression.

In mammals, LXRs positively regulate the expression of several genes implicated in cholesterol utilization. These include the enzyme that catalyzes the limiting step in bile acid synthesis cytochrome P450 7a1 (Cyp7a1), the transporters that participate in the reverse transport of cholesterol ATP binding cassette A1 and G1 (ABCA1 and ABCG1) and the transporters that participate in the biliary cholesterol secretion ABCG5 and ABCG8. It has also been described that LXRs promote the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR), negatively regulating cholesterol absorption (Currie et al., 2013; Bovenga et al., 2015).

LXRs also play an important role in the regulation of FA metabolism. On the one hand, they promote FA synthesis by enhancing the expression of lipogenic enzymes such as FAS, stearoyl-CoA desaturase (SCD) and ACC. On the other hand, it also regulates the transcription of genes implicated in the metabolism and secretion of TG-rich lipoproteins, including lipoprotein lipase (LPL), cholesteryl ester transfer protein (CEPT), phospholipid transfer protein (PLTP) and E apolipoprotein (APOE) (Li and Glass, 2004).

FA synthesis can also be regulated by the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-mediated phosphorylation of ACC, which catalyzes the rate-limiting step of FA synthesis pathway, when the cellular energy level is low. Malonyl-CoA, product of ACC, also prevents the transport of FAs to the mitochondria by inhibiting CPT1 to avoid FA synthesis and oxidation to happen simultaneously (Brownsey et al., 2006).

PPAR α

Other important regulators of liver lipid metabolism are peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). PPAR α is activated by ligand binding and together with PPAR γ and PPAR β/δ comprise the nuclear receptor 1C (NR1C) subfamily. Tissues with a high FA oxidation rate show higher PPAR α activity. PPAR α functions as a cellular energetic level sensor and participates in the regulation of most of the processes in lipid metabolism, including FA oxidation, ketogenesis, FA activation, LD formation and plasma lipoprotein metabolism (Pawlak et al., 2015). It can be activated by many different endogenous and exogenous ligands such as dietary FAs, eicosanoids, endocannabinoids, PLs, and lysophospholipids. Changes in the

concentration of these lipids have an impact in the regulation of PPAR α target genes. These include fatty acid transfer protein 1 (FATP1), fatty acid transporter/cluster of differentiation 36 (FAT/CD36), acyl-coenzyme A oxidase 1 (ACOX1) and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (EHHADH). (Kersten and Stienstra, 2017). In starvation conditions, when FA oxidation is activated, acetyl-CoA is utilized for ketone body synthesis and PPAR α regulates the mitochondrial HMGCS, which catalyzes the rate-limiting step of the pathway. Regarding lipoprotein metabolism, PPAR α induces the expression of LPL by binding to its promoter. PPAR α agonists enhance the expression of SREBP1c target genes by promoting the binding of PPAR α to the SREBP1c promoter (Pawlak et al., 2015).

Objectives

SND1 (Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1) is a highly-conserved protein in eukaryotic organisms. It is considered to be a multifunctional protein because of its capacity to bind numerous proteins (Tong et al., 1995; Yang et al., 2002; Yang et al., 2007; Blanco et al., 2011; Su et al., 2015) and RNA molecules (Paukku et al., 2008; Lei et al., 2011; Gao et al., 2015), and it is thought to carry out different functions depending on the cell or tissue type as well as the physiological or pathological state.

The exact physiological function of SND1 has not been unraveled yet, but most works describe gene transcription regulation (Tong et al., 1995; Solan et al., 2002; Yang et al., 2002; Paukku et al., 2003; Valineva et al., 2005) and RNA metabolism-related functions (Caudy et al., 2003; Paukku et al., 2008; Gao et al., 2010; Weissbach and Scadden, 2012).

There are few works relating SND1 to lipid metabolism. The first functional studies on the management of lipids showed a relation between SND1 and alterations in PL secretion of quiescent hepatocytes (Palacios et al., 2006). In accordance with a possible function in lipid metabolism, SND1 translocates to lipid droplets (LD) in different steatotic models (Garcia-Arcos et al., 2010).

More recent works also suggest that SND1 may have some function in lipid metabolism. It has been suggested that SND1 is essential for adipogenesis, participating in the differentiation of adipocytes (Duan et al., 2014). SND1 has also been described to interact with MGL affecting the availability of FAs, which cells use as energy source (Rajasekaran et al., 2016).

Despite the fact that the molecular function of SND1 has not been elucidated yet, there is growing evidence of its physiopathological relevance. Underexpression of SND1 has been related to lower cellular growth or even cell death (Tong et al., 1995; Hossain et al., 2008), and its overexpression has been related to several pathological conditions where a positive correlation between SND1 expression level and proliferation is observed.

In addition to alterations in the apoptotic mechanisms, deregulation of oncogene expression and stimulated angiogenesis, cancer cells need to rewire their metabolism in response of the high energy requirement of uncontrolled proliferation. Many works suggest the relevance that metabolic alterations might have in cell growth, migration and metastatic processes among others. Deregulation of the homeostasis of cholesterol metabolism is closely related to cell proliferation (Clendening et al., 2010; Dang, 2012). The relevance of cholesterol in cancer progression is related to the role that it plays in several cellular functions.

On the one hand, cholesterol is essential for the localization of many proteins of different cellular signaling pathways, given that it is one of the main components of lipid rafts. On the other hand, some of the intermediates of the cholesterol synthesis pathway (farnesyl, geranylgeranyl) participate in posttranscriptional modifications of proteins and oxidized cholesterol derivatives can act as ligands for nuclear receptors (Hedgehog signaling) modulating the metabolic homeostasis and cell differentiation (Olkkonen et al., 2012). Therefore, besides cholesterol content, cellular distribution of cholesterol can play a central role in cancer development.

In view of these precedents, we proposed that the alterations of cellular proliferation characteristics associated with the overexpression of SND1 could be related to its function in lipid metabolism.

In this context, the specific objectives were:

- To clarify the role of SND1 in lipid metabolism.
- To find out whether the alterations in lipid metabolism caused by SND1 have an impact on the proliferation characteristics (growth, adhesion, migration) of cells.

Results

1. Alterations in cholesterol metabolism

1.1 SND1-overexpressing hepatoma cell lines

To investigate the functional significance of SND1 overexpression in liver cancer cells, McA RH7777 rat hepatoma cells were stably transfected with the cDNA of rat *Snd1* (McA-S cells) or the bacterial *LacZ* gene (McA-L cells). Two McA-S monoclonal lines with a different level of SND1 overexpression were selected. McA-S1 and McA-S2 overexpressed *Snd1* mRNA nearly 6 and 12 times, respectively, compared to McA-L (Fig D1.A). High expression levels of SND1 protein were confirmed by WB (Fig D1.B) and immunocytochemistry (Fig D1.C).

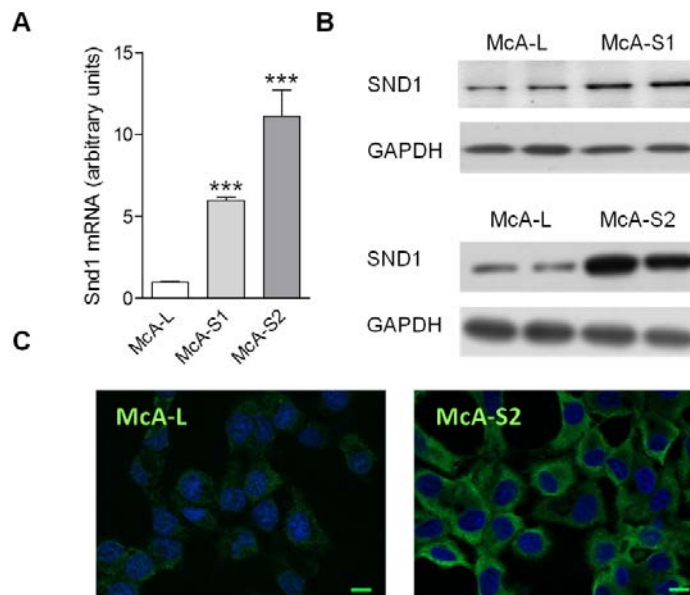


Fig D1. Characterization of SND1-overexpressing cell lines. SND1 overexpression and cellular localization were analyzed in stably transfected SND1-overexpressing McA-L and McA-S hepatoma cells. (A) SND1 mRNA levels were quantified by RT-qPCR. (B) SND1 protein levels were analyzed by western blot. (C) Representative confocal fluorescence micrographs show DNA (blue) and SN1 (green). Gapdh expression was used for normalization in RT-qPCR and western blot analyses. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: *** $P \leq 0.001$.

1.2 Lipid characterization of McA-L and McA-S cell lines

Exacerbation of *de novo* lipid biosynthesis, necessary to sustain cell growth and proliferation, is a well-known component of metabolic reprogramming in neoplastic tissues. As a first approximation to analyzing whether SND1 is implicated in the regulation of lipid production, we studied the impact of SND1 overexpression on the cellular levels of lipids by TLC. Results show that CE levels were nearly 2 and 3 times higher in McA-S1 and McA-S2, respectively, than in McA-L line (**Fig D2**).

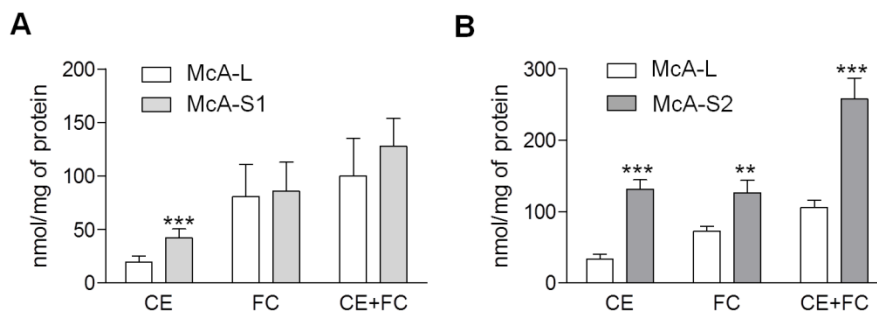


Fig D2. Cholesterol content of McA-L and McA-S cells. Lipids from McA-L and McA-S cells were extracted and free cholesterol (FC) and cholesteryl esters (CE) were quantified by image analysis after thin layer chromatography separation. (A) Analysis of McA-L and McA-S1 cells. (B) Analysis of McA-L and McA-S2 cells. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

To provide more evidence of a link between SND1 expression and cellular CE levels in hepatoma cells, we treated McA-L cells with anti-SND1 or negative control siRNA. As shown in **Fig D3.A** and **D3.B** anti-SND1 siRNA caused a substantial downregulation of SND1 both at protein and mRNA levels. Together with that, we confirmed that down regulation of SND1 expression did not alter FC while reducing CE content (**Fig D3.C**). These results suggest that the characteristic overaccumulation of CE in McA-S cells is caused by SND1 overexpression.

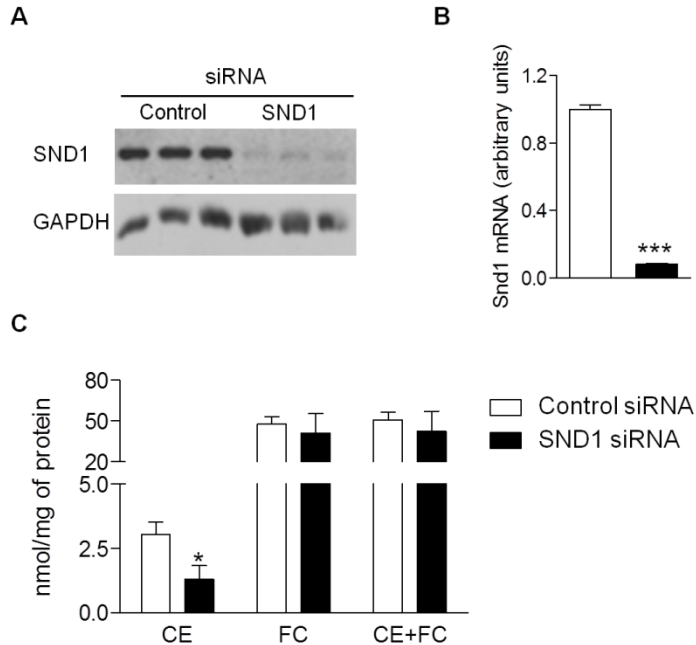


Fig D3. The effect of SND1 underexpression on cellular lipid content. SND1 expression was downregulated in Mca-L by treatment with anti-SND1 siRNAs. As a control for the transfection control siRNAs were used. (A) SND1 protein level analyzed by western blot. (B) SND1 mRNA analysis. (C) Lipid analysis of Mca-L cells after siRNA treatment. Lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and free cholesterol (FC) and cholesteryl esters (CE) were quantified by image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

1.3 Mca-S cells have a higher mobilization capacity of cholesterol stores

As a short-term response, high cellular cholesterol supply is followed by esterification with FAs keeping FC below toxic levels; generated hydrophobic, non-toxic CEs are stored in cytosolic LDs and can be hydrolyzed depending on the cellular needs. To analyze cellular cholesterol distribution and mobilization, Mca-L and Mca-S cells were stained with filipin and analyzed by confocal microscopy. Filipin is a fluorescent dye for FC, so it mainly stains plasmatic membranes. As shown in **Fig D4.A**, there is no noticeable difference in FC distribution between Mca-L and Mca-S cells.

To test whether cholesterol stores can be mobilized to provide FC, McA-S1 and control cells were treated for 1 min with 16 mM hpCD, a compound capable of extracting cholesterol from membranes (**Fig D4.C**). After 1 min of treatment the distribution of filipin in SND1-overexpressing hepatoma cells did not change while McA-L cells lost fluorescent signal in plasma membrane the fluorescence of filipin (**Fig D4.A**), suggesting that McA-S cells have a higher capacity to mobilize cholesterol from intracellular pools. Enhanced expression of proteins involved in lipid mobilization and cholesterol traffic (**Fig D4.B**) might warrant adequate short-term provision of FC to the plasma membrane in McA-S hepatoma.

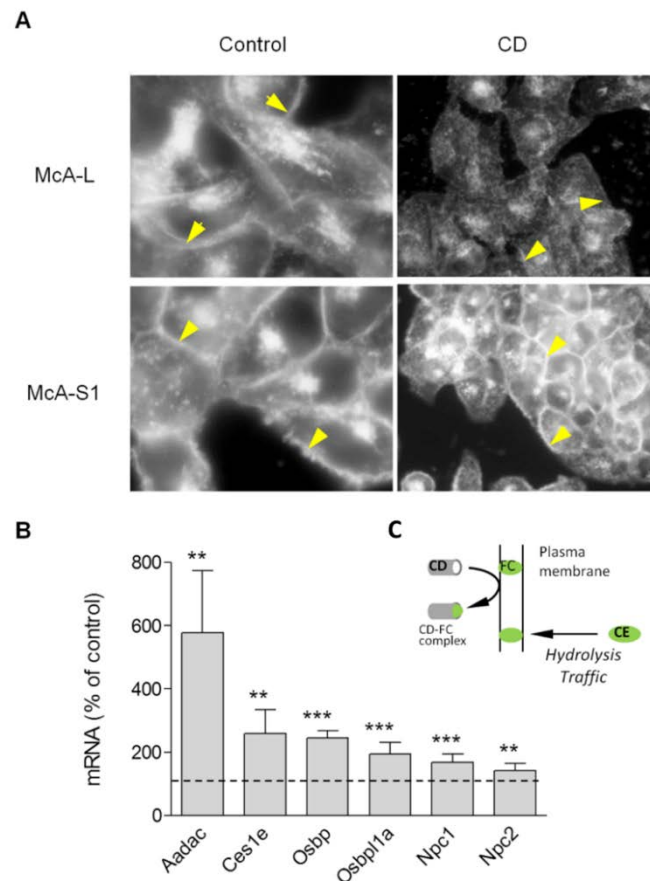


Fig D4. Cholesterol cellular distribution and mobilization capacity. (A) Representative confocal micrographs of filipin fluorescence in control and 16 mM 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (CD)-treated cultures shown at different magnification. Arrowheads indicate staining loss at plasma membrane in McA-L cells while McA-S1 cells maintained fluorescence intensity. (B) mRNA levels of hydrolytic enzymes and proteins involved in cholesterol traffic in McA-S1 cells (percentage of the mRNA levels in McA-L hepatoma) quantified by qPCR. Gapdh expression was used for normalization. (C) Schematic representation showing how cyclodextrins extract cholesterol from plasma membranes promoting mobilization of intracellular stores to replenish it. CE, cholesteryl esters; FC, free cholesterol. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

To confirm the results of the cytochemical analysis we used saponin, a plant-derived compound that increases plasma membrane permeability in a cholesterol content-dependent manner. Taking advantage of this property, we analyzed the effect of mCD on the permeability to Trypan blue in the presence of saponin (**Fig D5.A**). As shown in **Fig D5.B**, saponin caused a concentration-dependent increase of membrane permeability. Higher FC content of plasma membrane in McA-S2 cells is revealed by a higher deduced Bmax than in control cells in the saponin assay. After cholesterol sequestration by mCD treatment, saponin-induced permeability decreased but in lower degree in McA-S2; permeation kinetics in these cells reached the same Bmax value of non-treated cells, which reflects the capacity of McA-S cells to provide FC to plasma membrane and compensate for mCD-mediated extraction.

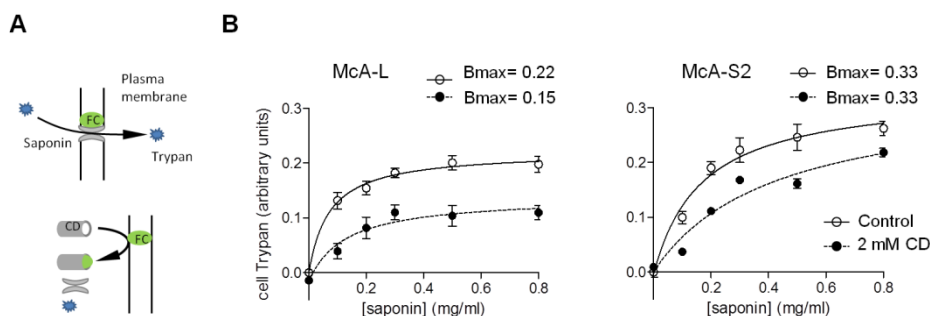


Fig D5. Saponin-induced permeation of membranes. (A) Representation of the use of cholesterol-binding compounds to analyze cholesterol content of cell membranes. Cholesterol content-dependent incorporation of saponin to the cell membrane allows Trypan blue to permeate into the cytoplasm. Extraction of FC from plasma membrane using 2-methyl- β -cyclodextrin (CD) diminishes Trypan blue permeated into cells. (B) Trypan permeated into cells in presence of increasing concentrations of saponin in control and CD-treated cultures. A one site binding kinetics equation fit to the data. Maximum binding (Bmax) values indicate the membrane cholesterol content. Values represent the mean \pm SD of $N \geq 5$.

1.4 Overaccumulation of cholesteryl esters in McA-S cells is caused by an overactivation of cholesterogenesis and a higher esterifying capacity

Plasma lipoproteins and cholesterol synthesis from acetyl-CoA are the two cholesterol sources for hepatocytes. To determine the source of cholesterol for overaccumulation as CE in McA-S hepatomas we analyzed the incorporation of the radioactive lipogenic substrates in McA-L and McA-S cells. First we analyzed the incorporation of [3 H]acetate into cellular and secreted lipids. **Fig D6.A** shows higher radioactivity

incorporation into CE in McA-S cells, with a 100% increase after 4 h incubation. Radioactivity of CE in the media was also higher in McA-S cells, indicating that the CE accumulation is not caused by an impaired secretion.

To discern CE-associated radioactivity coming from the esterification of newly synthesized FAs from that coming from newly synthesized cholesterol, the incorporation of radioactive OA into CE was measured. After 4 h of incubation McA-S2 cells had only 20% more radioactivity associated to the FA moiety of CE than control cells (**Fig D6.B**), a much lighter increase compared to that observed in the acetic acid (AA) incorporation. The results show that although McA-S cells have a higher esterifying capacity that may affect CE accumulation, the main cause for CE accumulation in these cells is an overactivation of the de novo cholesterol synthesis.

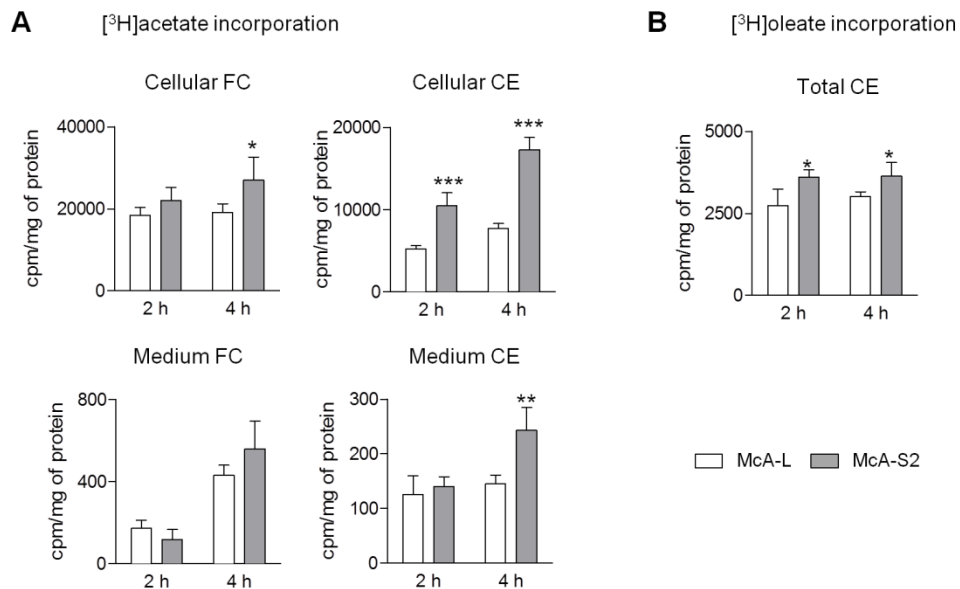


Fig D6. Incorporation of radioactive lipogenic substrates in cellular and secreted free cholesterol (FC) and cholesteryl esters (CE) (A) Analysis of the incorporation of $[^3\text{H}]$ acetate into FC and CE in cells and culture media after incubation in McA-L and McA-S2 cells. (B) Incorporation of $[^3\text{H}]$ oleate in total CE. Cells were incubated for 4 h with the lipogenic substrate before lipid extraction, separation by thin layer chromatography and quantification by image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ to show differences between cell lines.

To further analyze the meaning of the incorporation experiments, cells were treated with atorvastatin. It is a well-known inhibitor of the main flux-driving reaction of the cholesterol synthesis pathway, that catalyzed by Hmgcr. **Fig D7** shows that in the presence of atorvastatin cellular levels of CE were significantly reduced in Mc-S cells compared to McA-L.

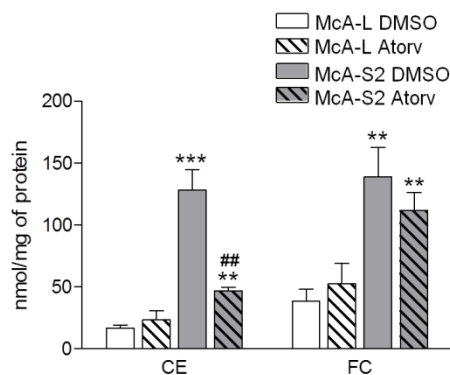


Fig D7. Cholesterol content of McA-L and McA-S cells after treatment with atorvastatin (Atorv). McA-L and McA-S cells were treated with 0,1 μ M atorvastatin or vehicle (DMSO 0.6 %) for 4 h, lipids were then extracted and separated and quantified by thin layer chromatography and image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: ** P \leq 0.01, *** P \leq 0.001 to show differences between cell lines; ## P \leq 0.01 to show the effect of atorvastatin.

All these results are in accordance with the expression of genes implicated in the cholesterol synthesis and secretion. The expression of Hmgcr and enzymes that participate in the regulation of cholesterol synthesis such as cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (Hmgcs1) and squalene epoxidase (Sqle) was higher in McA-S cells (**Fig D8**). The fact that mRNA levels of proteins implicated in cholesterol consumption for biliary secretion in hepatocytes such as Cyp7a1 and Cyp27a1 (bile acid synthesis) or Abcg5 (apical cholesterol export) showed opposite modifications in McA-S cells, together with the unaltered expression of Abca1 (basolateral cholesterol export), suggests that quantitatively important processes in cellular cholesterol outflow are not significantly altered due to SND1 overexpression. Besides, it has previously been shown that cholesterol secretion in McA-S cells is not impaired (**Fig D6.A**).

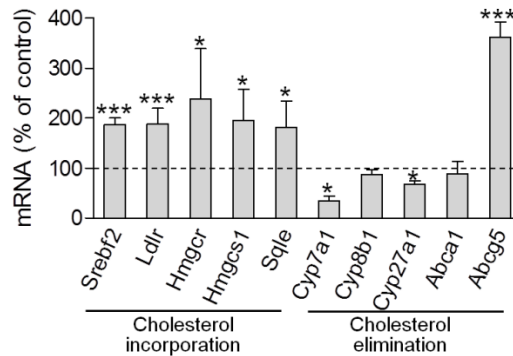


Fig D8. mRNA levels of proteins involved in cholesterol provision and elimination in McA-L and McA-S cells. mRNA levels were quantified by RT-qPCR. Gapdh expression was used for normalization. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

In addition to showing that McA-S cells secrete more CEs, we also show that they incorporate less exogenous cholesterol compared to McA-L (**Fig D9**). This somehow confirms that CE accumulation in McA-S cells is caused by an overactivation of the de novo cholesterol synthesis.

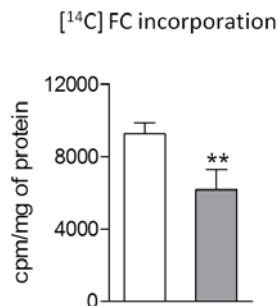


Fig D9. Incorporation of radioactive cholesterol. McA-L and McA-S cells were incubated with [¹⁴C]cholesterolarekin for 4 h and radioactivity of cell lysates was measured. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$.

1.5 High de novo cholesterol synthesis is coupled to its esterification in McA-S cells

As explained in section 1.3, high cellular cholesterol supply is followed by esterification with FAs to keep FC below toxic levels and generated hydrophobic, non-toxic CEs are stored in cytosolic LDs until they are hydrolyzed in response to cellular needs. Since SND1-overexpressing cell lines had higher cholesterologenesis,

we supposed that incorporation of extracellular cholesterol to intracellular CE stores would be less efficient at least in short term. To test this question we analyzed the incorporation of the fluorescent derivative NBD-cholesterol into cell structures by confocal microscopy. **Fig D10.A** shows that 30 min were enough to label McA-L LDs due to the incorporation of NBD-cholesterol by esterification. Nevertheless, very few LDs were labelled in McA-S cells.

To address whether McA-S hepatomas had limited capacity for cholesterol esterification we quantified mRNA levels of the two sterol O-acyltransferase (SOAT) isozymes expressed in hepatocytes, Soat1 and Soat2. **Fig D10.B** shows that expression levels in McA-S hepatoma were nearly 4-fold higher than in McA-L cells. Altogether, these results suggest that SND1 overexpression favors the coupling of cholesterol esterification to the high cellular *de novo* production of cholesterol.

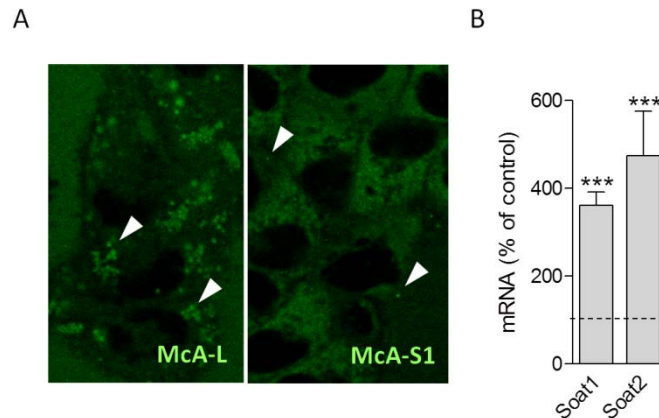


Fig D10. Exogenous NBD-cholesterol incorporation and gene expression of cholesterol esterification enzymes. (A) Representative confocal micrographs of cells incubated with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD)-cholesterol (green) for 30 min. Arrowheads indicate lipid droplets where fluorescence of esterified NBD-cholesterol is concentrated. (F) mRNA levels of proteins involved in the esterification of cholesterol in McA-L and McA-S cells quantified by qPCR. Gapdh expression was used for normalization. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: *** $P \leq 0.001$ to show differences between cell lines.

1.6 Overactive cholesterologenesis in McA-S cells is caused by a constitutive overactivation of the SREBP2 system

SREBP2 functions as the cellular cholesterol content sensor. Low cellular FC content induces the proteolytic activation of the inactive SREBP2 localized in the ER releasing the amino terminal domain that translocates to the nucleus. This active form of SREBP2 induces the expression of proteins implicated in

cholesterol supply such as Hmgcr and Ldlr by binding to the sterol response elements of target gene promoters (**Fig D11**).

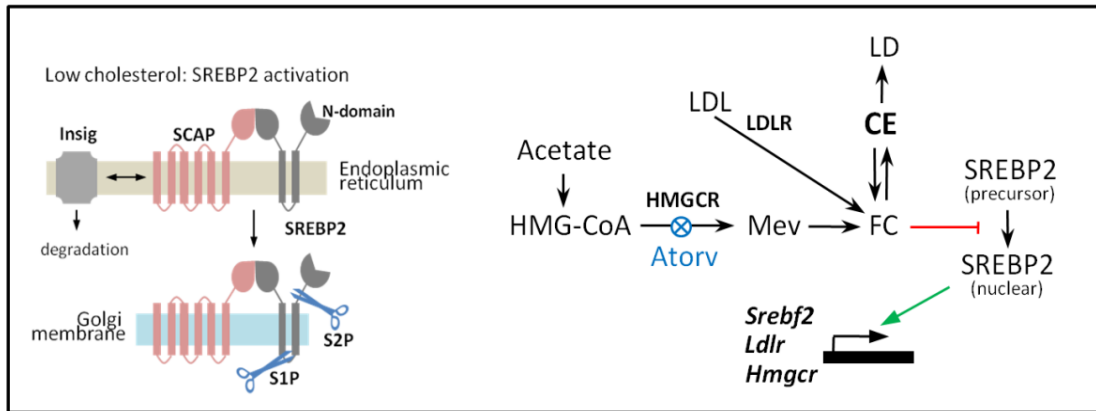


Fig D11. Activation of SREBP2 transcription factors. Left: diagram of the activation mechanism of SREBP2. Low cellular cholesterol level promotes dissociation of the INSIG anchor and SCAP, allowing full length SREBP2 to translocate to Golgi system, where sequential cleavage by S1P and S2P proteases releases the active, nuclear SREBP2 (N-domain). Right: diagram of the main cellular cholesterol sources: mevalonate (Mev) pathway (*de novo* synthesis) and low density lipoprotein (LDL) uptake. Excess free cholesterol (FC) blocks SREBP2 activation and is esterified (CE, cholesteryl ester) to be accumulated in lipid droplets (LD). Low levels of FC enable proteolytic release of the active form of SREBP2 that transactivates *Ldlr*, *Hmgcr* and *Srebf2* genes. Atorv, atorvastatin.

Despite Mca-S cells had high cholesterol levels compared to control cells (**Fig D1**), genes implicated in cholesterol synthesis and incorporation like *Hmgcr* or *Srebf2* were overexpressed (**Fig D8**). To analyze whether the SREBP regulation system functions correctly in Mca-S cells, cholesterol was exogenously added in the culture media by addition of LDL. In response to FC supply, cellular homeostatic systems function by inhibiting the biosynthetic pathway of cholesterol (by suppression of *Hmgcr* expression) and the extracellular cholesterol incorporation (**Fig D11**). As expected, homeostatic control functions correctly in Mca-L cells, which showed no extra FC or CE accumulation after incubation with LDL. On the contrary, cellular cholesterol augmented over its already high basal levels in Mca-S cells (**Fig D12**). However, when the main control point (HMGCR) of the biosynthetic pathway of cholesterol was bypassed by mevalonate supply (**Fig D11**), control cells tended to accumulate cholesterol up to the Mca-S basal level (**Fig D12**).

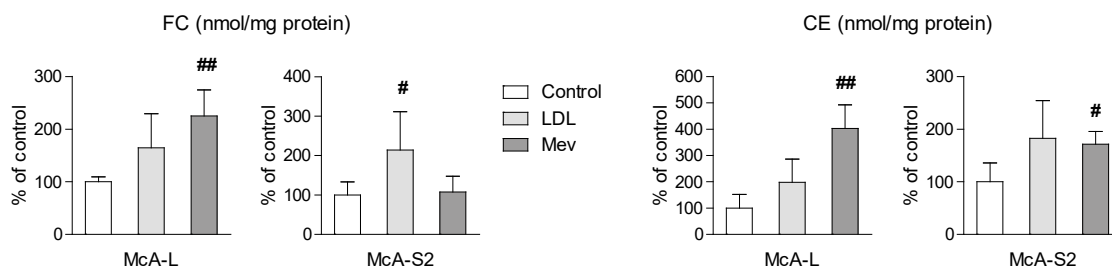


Fig D12. The effect of LDL and mevalonate on cholesterol content. Cultures were supplemented with 1 mM mevalonate (Mev) or LDL (0.1 mg cholesterol/ml) during 48 h and afterwards cellular lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and free cholesterol (FC) and cholesteryl esters (CE) were quantified by image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ to show differences between LDL or mevalonate-treated and vehicle-treated cultures.

To confirm these results, nuclear SREBP was analyzed by immunohistochemistry. Fluorescence microscopy confirmed that in basal condition McA-S hepatoma has higher levels of nuclear SREBP2, which is revealed by the higher degree of colocalization with the nuclear blue marker Hoechst (**Fig D13.A**). In addition, SREBP2 protein expression was analyzed in subcellular fractions by WB.

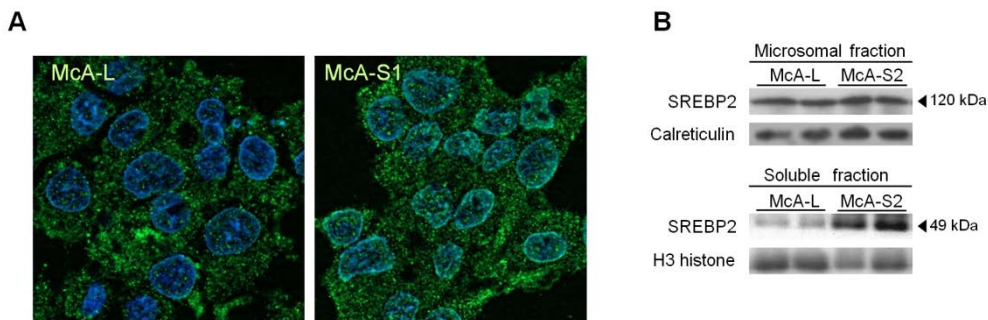


Fig D13. Analysis of SREBP2 localization and expression levels. (A) Representative fluorescence micrographs of McA-L and McA-S1 cells. DNA (blue) and SREBP2 (green) were labelled with fluorophores. McA-S1 cells show nuclear colocalization of both fluorescence signals. (B) SREBP2 levels in the microsomal and the soluble fractions of McA-L and McA-S2 cells analyzed by western blotting. The inactive SREBP2 (120 kDa) was analysed in the microsomal fraction using calreticulin for normalization; the active, nuclear SREBP2 (49 kDa) was detected in the soluble fraction which contained similar amounts of H3 histone.

1.7 Deregulation of the SREBP2 system in Mca-S cells is caused by lower cholesterol levels in endoplasmic reticulum membranes

Being SND1 localized mainly in the ER we hypothesized that its effect on the deregulation of cholesterol homeostasis could be exerted by altering the cholesterol pool in the ER membranes. To unravel this question, first cholesterol levels in the microsomal fraction were analyzed. Differences were detected in the protein content of membranes isolated from the two cell lines (slightly higher in Mca-S2 cells than in control, data not shown), that is why we report FC molar content referred to that of PLs. Cholesterol content in microsomes from SND1-overexpressing cells was significantly lower than in those from control cells (**Fig D14.A**).

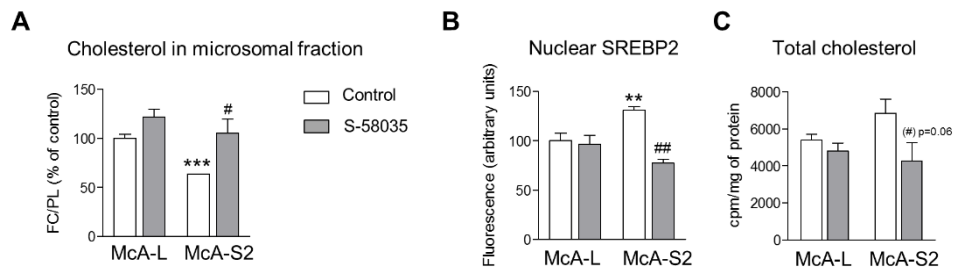


Fig D14. Effect of cholesterol content of ER membranes on the activation of SREBP2. (A) Lipids were extracted from microsomal fractions isolated from cells treated with 10 μ M Sandoz-58035 (S-58035) or vehicle (0.03% DMSO) for 4 h. Free cholesterol (FC) and phospholipids (PL) were quantified by image analysis after thin layer chromatography separation. FC content is referred to PL and is expressed as the percentage of the levels in McA-L in control condition. (B) Fluorescence of immunostained nuclear SREBP2 and (C) radioactivity from [3 H]acetate (20 μ Ci/plate) incorporated into cellular cholesterol (summation of FC and cholesteryl esters) were quantified in cells treated with 10 μ M S-58035 or vehicle (0.03% DMSO) for 4 h. Values in graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ to show differences between McA-L and McA-S; # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ to show differences between S-58035-treated and vehicle-treated cells.

Treatment with the inhibitor of cholesterol esterification Sandoz-58035 enhanced the FC content of McA-S2 microsomal membranes (**Fig D14.A**) and consequently nuclear SREBP2 levels dropped from 130% (with respect to control) to 75%, while in control cells no significant changes occurred (**Fig D14.B**); changes in [3 H]acetate incorporation into total cholesterol in McA-S cells paralleled those of nuclear SREBP2 levels (**Fig D14.C**).

These results demonstrate that the exacerbated cholesterol synthesis in McA-S cell line depends on the maintenance of the regulatory pool of FC in the ER under the threshold required for SREBP2 activation. In

spite of having higher cholesterol content, McA-S cells have lower cholesterol levels in the ER membranes and are unable to inactivate the SREBP2 regulatory system.

2. Adaptations in the synthesis of triglycerides

2.1. SND1-overexpressing cells have lower triglyceride content

Besides the deregulation of cholesterol metabolism described in Chapter 1, the possible effect of SND1 overexpression on the metabolism of other lipids was analyzed. In order to further analyze the metabolism of FA-containing lipids, TG and PL contents were quantified in the lipid characterizations of McA-L and McA-S. Total PL content was calculated by the summation of PC, PE, PS, PI and SM contents. Neither total PL content nor percentages of main PLs (PC and PE) were significantly different between McA-L and McA-S. However, McA-S cells showed 49% lower TG levels compared to control cells (**Fig D15**).

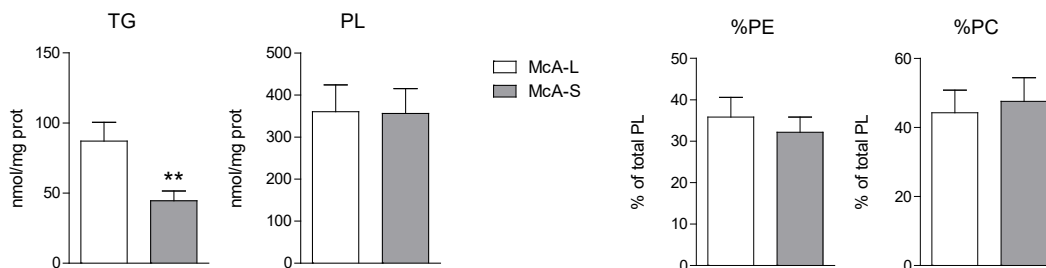


Fig D15. Acylglyceride content of McA-L and McA-S cells. Lipids from McA-L and McA-S cells were extracted and triglycerides (TG), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol, phosphatidylserine and sphingomyelin were quantified by image analysis after thin layer chromatography separation. Total phospholipid (PL) was calculated by the summation of the latter five lipids. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 26$ obtained in 6 independent experiments. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$.

To study whether the lower TG content in McA-S cells is due to an impaired synthesis capacity, the gene expression of the main biosynthetic enzymes (**Fig D16.A**) was analyzed. **Fig D16.B** shows that expression levels of Agpat and Dgat1 is 50% and 75% higher than in control cells, respectively. This suggests that the McA-S cells have the ability to esterify FAs and to synthesize TGs, and therefore it seems that TG deficiency may be due to another metabolic limitation or a higher FA consumption.

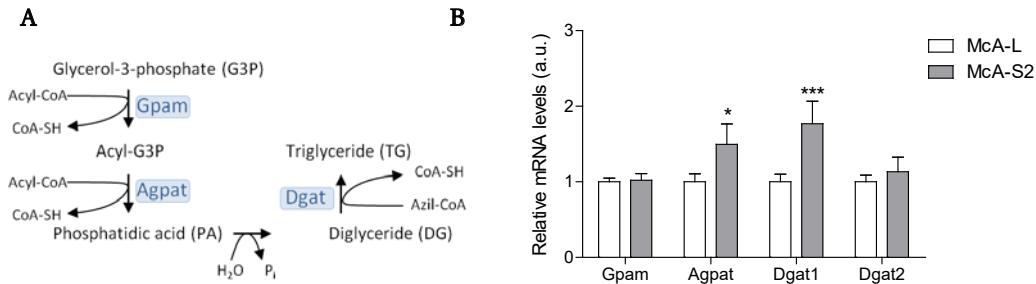


Fig D16. Expression of the main enzymes of the triglyceride synthesis pathway. (A) Diagram of the TG biosynthetic pathway. (B) Relative mRNA levels of TG biosynthetic enzymes in Mca-L and Mca-S cells by RT-qPCR. Gapdh expression was used for normalization. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

2.2. The channeling of fatty acids towards triglycerides is lower in Mca-S cells

In order to study the reason behind the low content of the TG content of Mca-S cells, the incorporation of radioactive lipogenic substrates was analyzed to further understand the metabolic fluxes (**Fig D17**). Tritiated AA and OA were used for these experiments.

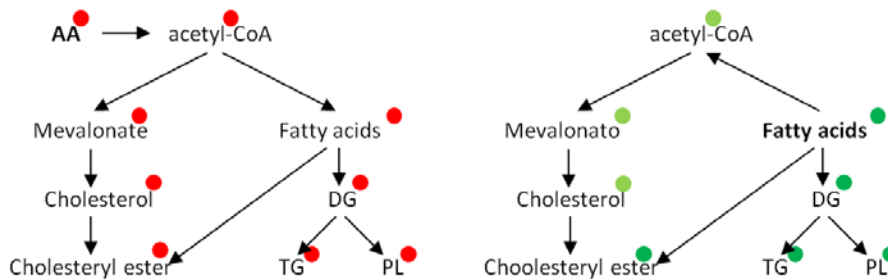


Fig D17. Incorporation of radioactive acetic acid and oleic acid into cellular lipids. As soon as it enters the cell, acetic acid (AA, red mark) is activated with coenzyme A (CoA). This can be used in two main biosynthetic pathways: in the mevalonate pathway for cholesterol synthesis and in the formation of fatty acids (lipogenesis) for acylglyceride synthesis. Fatty acids can also be esterified with cholesterol. Oleic acid added in culture media (dark green mark) is also activated with CoA and is esterified with cholesterol or into acylglycerides. For the radioactivity coming from fatty acids to be incorporated into free cholesterol, fatty acids must be oxidized first to produce acetyl-Coa (light green mark). DG, diglycerides, TG, triglycerides, PL, phospholipids.

Both the incorporation of newly synthesized FAs (from AA) and exogenously added radioactive OA into TGs was lower in McA-S cells (**Fig D18**). These results are consistent with the data of lipid characterization since, as shown in **Fig D15**, McA-S cells have 49% lower TG levels.

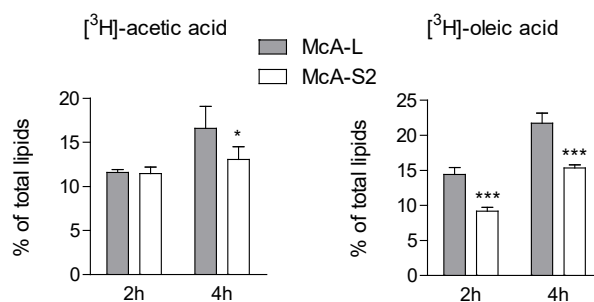


Fig D18. Radioactive lipogenic substrate incorporation into triglycerides. Cells cultured for 68 h in 96 mm diameter culture dishes were treated with 20 μCi [^3H]acetic acid or 15 μCi [^3H]oleic acid. After 2 or 4 h cells were harvested and lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and radioactivity was measured. Data are represented as the percentage of the sum of the radioactivity in phospholipids, diglycerides, triglycerides, free cholesterol and cholesteryl esters. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ to show differences between cell lines.

Furthermore, it seems that the last esterification required for TG synthesis could be the metabolic limitation of McA-S cells. In fact, the esterification of FAs in DGs, which are intermediaries of the TG synthetic pathway, and PLs synthesized from DGs (**Fig D19**) is the same in McA-S and control cells. There is also no limitation in the esterification of exogenously added radioactive OA since the incorporation of radioactivity into PLs, which are essential components of the membranes, is similar to the incorporation in McA-L cells (**Fig D19**).

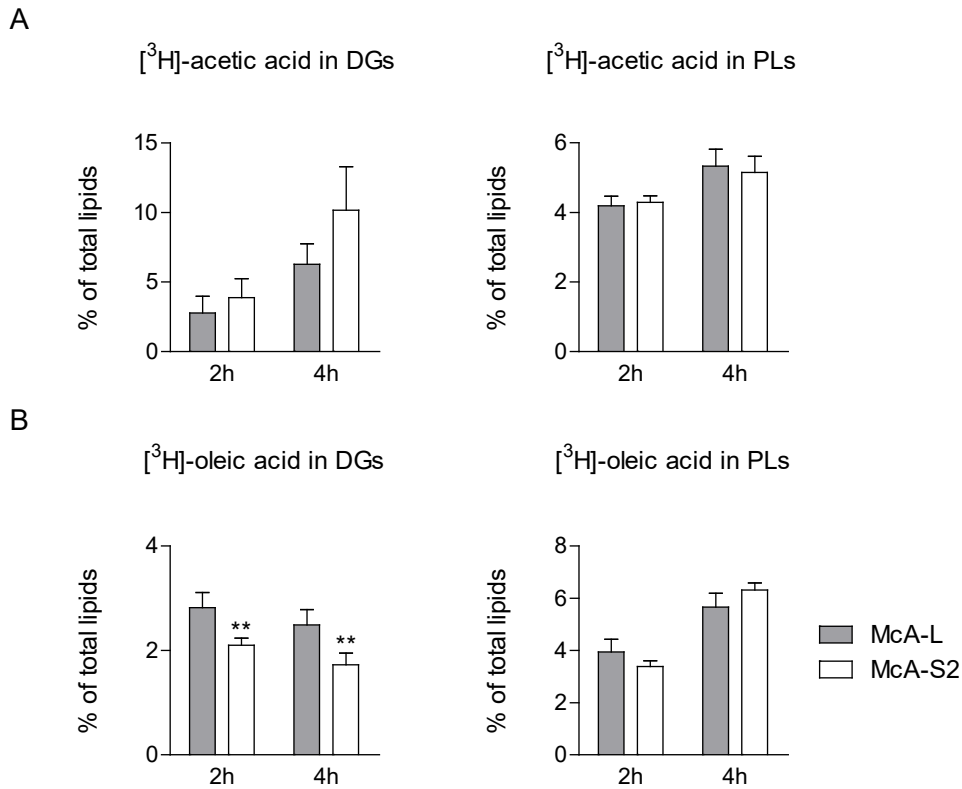


Fig D19. Incorporation of radioactive lipogenic substrates in diglycerides (DG) and phospholipids (PL). Incorporation experiments were carried out as described in Fig D18 using (A) [³H]acetic acid or (B) [³H]oleic acid. Data are represented as the percentage of the sum of the radioactivity in phospholipids, diglycerides, triglycerides, free cholesterol and cholesteryl esters. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: ** P \leq 0.01.

Proliferating cells, both *in vivo* and *in vitro*, use glucose as the main carbon source in normal conditions. Most of the intracellular acetyl-CoA and glycerol, which serves as the backbone of acylglycerides, comes from glucose (Fig D20). To further understand the metabolic context in which McA-S cells incorporate less radioactivity in TGs, the incorporation of radioactive glucose and glycerol was analyzed in McA-L and McA-S cells.

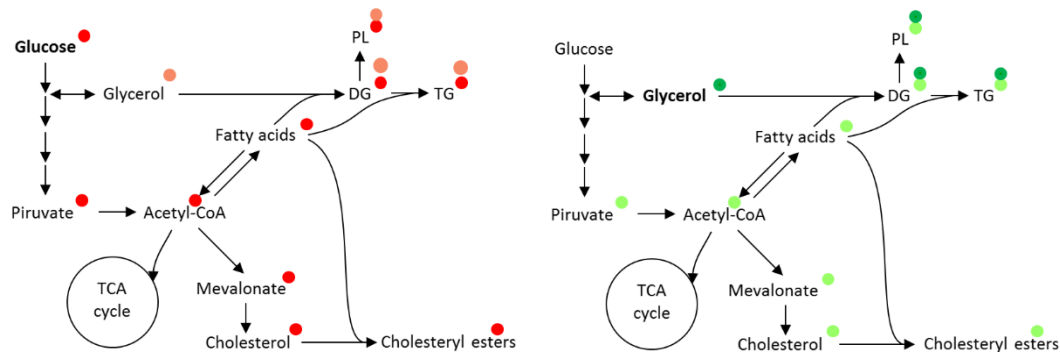


Fig D20. Incorporation of radioactive glucose and glycerol into cellular lipids. As soon as it enters the cell, glucose (dark red mark) is phosphorylated and converted to pyruvate and acetyl-CoA in the glycolytic pathway. Glycerol (light red mark), which serves as the backbone of acylglycerides, can also be produced using glycolytic intermediates. The radioactivity of exogenously provided glycerol (dark green mark) is primarily incorporated in acylglycerides. It can also be incorporated into lipids by the acetyl-CoA derived from metabolized glycerol (light green mark). DG, diglycerides, TG, triglycerides, PL, phospholipids.

As with the incorporation of other radioactive metabolites, McA-S cells incorporate less radioactivity from glucose into TGs than control cells (**Fig D21**) but no significant differences were found in the radioactivity incorporated into DGs. Moreover, McA-S cells incorporated more radioactivity into PLs, suggesting, as previous data, that the TG synthesis-limiting step is the last stage of the synthetic pathway.

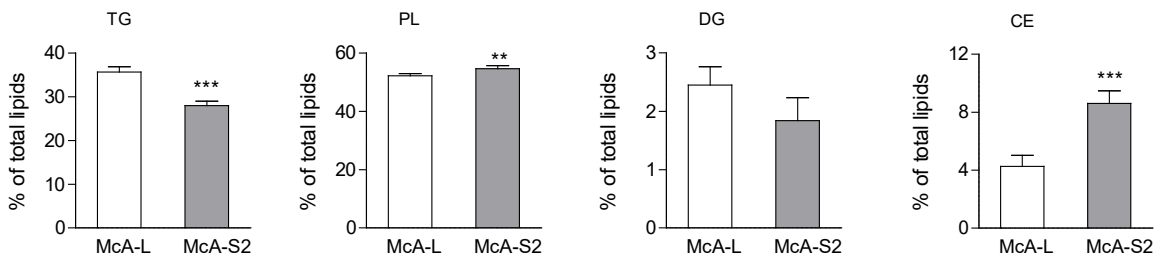


Fig D21. Incorporation of radioactive glucose into cellular lipids. Cells cultured for 68 h in 96 mm diameter culture dishes were treated with 20 μCi [^{14}C]glucose. After 4 h cells were harvested and lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and radioactivity was measured. Data are represented as the percentage of the sum of the radioactivity in phospholipids, diglycerides, triglycerides, free cholesterol and cholesteryl esters. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

By comparing the AA and glucose incorporation into lipids, the differences in the radioactivity incorporated into acylglycerides are very noticeable. After 4 h, between 20-30% of the AA radioactivity incorporated into lipids is channeled towards acylglycerides (**Fig D18** and **D19**), while in the case of glucose this percentage increases up to 80-85% (**Fig D21**). This can lead to think that glucose and AA are differently managed before incorporation into lipids. A difference between AA incorporation and glucose incorporation is that radioactivity from glucose can be incorporated into TGs from glycerol or acetyl-CoA (**Fig D20**). In this context, with the aim of further understanding the metabolic fluxes, incorporation of glycerol into lipids was analyzed. Radioactivity from glycerol can also be incorporated into TGs; glycerol can enter the glycolytic pathway producing acetyl-CoA that can be used for FA synthesis (**Fig D20**). However, direct incorporation of glycerol in acylglycerides is a much faster process, so in order to distinguish it from radioactivity derived from FAs, the incorporation of radioactivity from the glycerol was only measured at short times (10 min), to make sure that most of the radioactivity would come directly from glycerol.

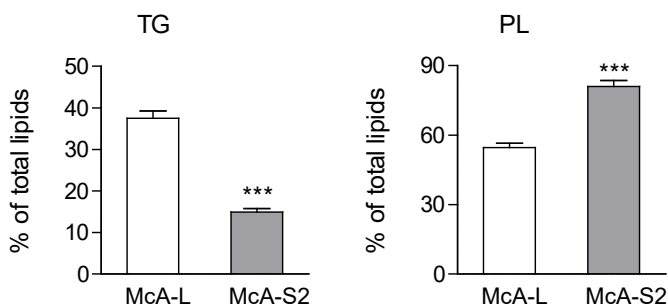


Fig D22. Incorporation of radioactive glycerol into triglycerides (TG) and phospholipids (PL). Cells cultured for 72 h in 96 mm diameter culture dishes were treated with 2 μCi [^{14}C]glycerol. After 10 minutes cells were harvested and lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and radioactivity was measured. Data are represented as the percentage of the sum of the radioactivity in phospholipids, diglycerides, triglycerides, free cholesterol and cholesteryl esters. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: *** $P \leq 0.001$.

Fig D22 shows that Mca-S cells also incorporate less radioactivity into TGs from glycerol than control Mca-L cells. Moreover, Mca-S cells seem to preferentially synthesize PLs.

To analyze whether the differences between Mca-L and Mca-S cells could be due to an impaired glucose utilization glucose captation and glucose in culture media were measured. **Fig D23** shows that even if both cell lines seem to have the same glucose captation capacity (**Fig D23.A**), after 72 h less glucose is left in the culture media of Mca-S cells (**Fig D23.B**), suggesting that the higher usage of glucose is due to an enhanced metabolism.

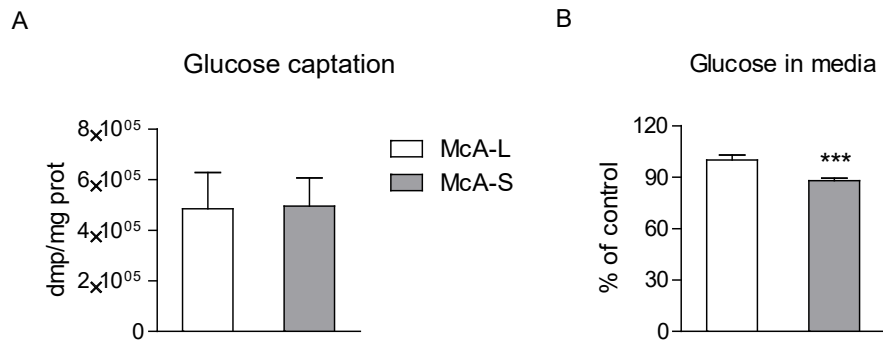


Fig D23. Glucose utilization in McA-L and McA-S cells. (A) 120,000 McA-L or McA-S cells were seeded in 35 mm diameter culture dishes and 10 μ Ci [¹⁴C]glucose were added. After 2 minutes cells were harvested and the incorporated total radioactivity was measured. (B) McA-L and McA-S cells were cultured in 96 mm diameter culture dishes for 72 h, media were collected and glucose concentration was measured using commercially available kits. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 4. Student's t-test: *** P \leq 0.001.

2.3. Is the overactivated cholesterologenesis the limiting factor for the synthesis of triglycerides?

Being the overaccumulation of CEs the main feature of SND1-overexpressing cells, we wanted to analyze if the lower TG content in these cells is somehow related to the alterations that SND1 causes in cholesterol metabolism. As a first approach, incorporation of radioactive lipogenic substrates was analyzed in the presence of S-58035, a well-known inhibitor of cholesterol esterification.

The data of radioactive AA incorporation show that in the presence of S-58035 both McA-L and McA-S cells incorporate more radioactivity compared to non-treated cells (**Fig D24**). However, even though the increase in McA-S cells is of about 30%, the contribution of this change is relatively low.

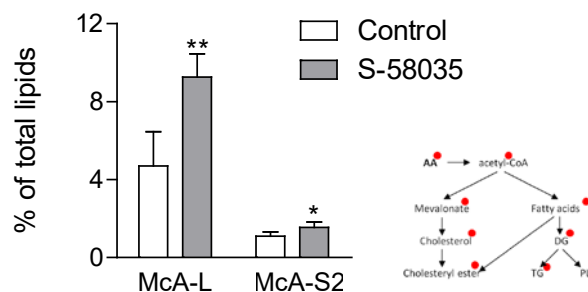


Fig D24. Effect of the inhibition of cholesterol esterification in the incorporation of radioactive acetic acid in triglycerides. Cells cultured in 96 mm diameter culture dishes for 67.5 h were treated with 10 μ M Sandoz-58035 (S-58035) or vehicle (0.03% DMSO). After 30 min a 20 μ Ci [³H]acetic acid trace per plate were added. After 4 h cells were harvested and lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and radioactivity was measured. Data are represented as the percentage of the sum of the radioactivity in phospholipids, diglycerides, triglycerides, free cholesterol and cholesteryl esters.

These data are consistent with the results of the lipid characterization in the presence of S-58035 (**Fig D25**). Although, as expected, a decrease in the content of CEs was observed (55% and 35% in the McA-L and McA-S cells, respectively); there was no change in the TG content.

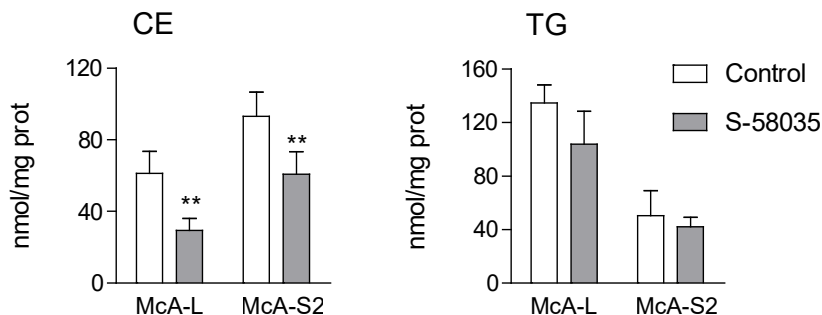


Fig D25. Effect of the inhibition of cholesterol esterification in the CE and TG content. Cells cultured in 96 mm diameter culture dishes for 67.5 h were treated with 10 μ M Sandoz-58035 (S-58035) or vehicle (0.03% DMSO) for 4 h. Lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and quantified by image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: ** P \leq 0.01.

Inhibition of cholesterol esterification is not enough to enhance the channeling of AA towards TG synthesis (**Fig D24**) nor the cellular TG content (**Fig D25**) in McA-S cells. Next, the effect of the inhibition of cholesterol synthesis on TG content was analyzed by characterizing the lipid composition of McA-L and McA-S cells in the presence of atorvastatin, an inhibitor of the main regulatory enzyme in cholesterol synthesis (Hmgcr). **Fig D26** shows that inhibition of cholesterol synthesis does not affect the TG content of either McA-S cells or control cells.

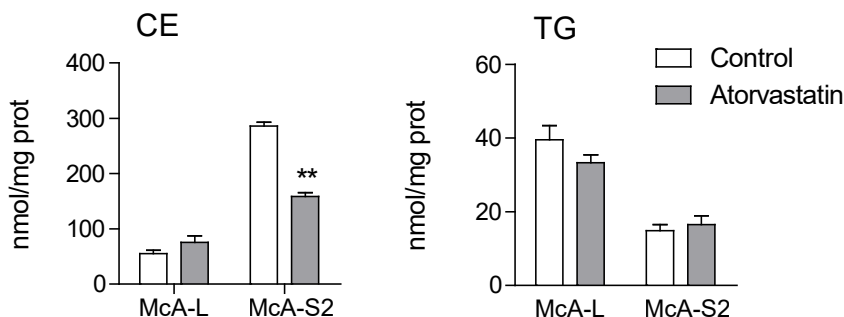


Fig D26. Effect of the inhibition of cholesterol synthesis on the CE and TG content. Cells cultured in 96 mm diameter culture dishes for 68 h were treated with 0,1 μ M atorvastatin or vehicle (0.06% DMSO) for 4 h. Lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and quantified by image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: ** P \leq 0.01.

Characterizations in the presence of these inhibitors show that the overactivation of cholesterologenesis and its consequent channeling of lipogenic precursors towards the synthesis of CE is not the main limiting factor for TG synthesis in McA-S cells. Data obtained after addition of exogenous cholesterol in the form of LDLs are consistent with these results (data not shown). Altogether, results suggest that the overactivation of de novo cholesterologenesis does not mean a limitation of substrate (acetyl-CoA) availability for TG synthesis.

With the aim of demonstrating this idea in a more direct way, acetyl-CoA availability was increased by adding AA to culture medium and the incorporation of radioactive AA into TGs was analyzed. **Fig D27** shows that after increasing the cytosolic acetyl-CoA availability by adding different AA concentrations, the TG content of McA- cells only increases slightly. Besides, in comparison to the increase observed in McA-S cells, the contribution of this change to the total lipid content is relatively low.

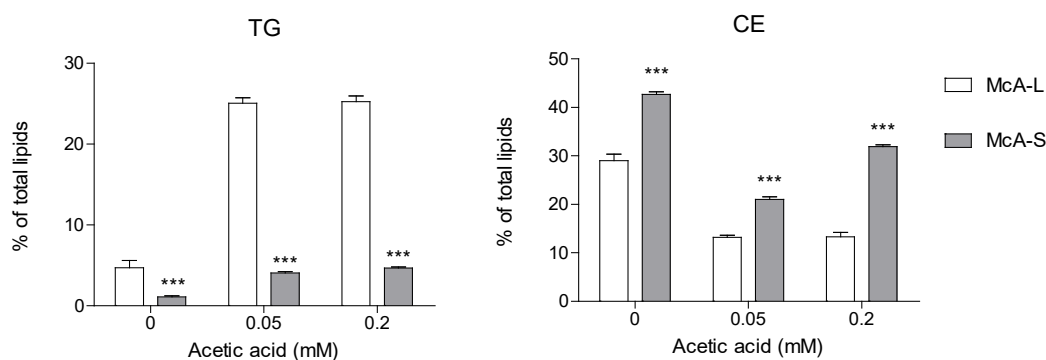


Fig D27. Incorporation of radioactive acetic acid into triglycerides (TG) and cholesteryl esters (CE) in the presence of different conditions of acetic acid. Cells cultured in 96 mm diameter culture dishes for 68 h were treated with 0.05 to 0.2 mM acetic acid in the presence of 20 μ Ci of [3 H]acetate for 4 h. Lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and quantified by image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: *** P \leq 0.001.

2.4. Cytosolic acetyl-CoA and NADPH are not channeled towards fatty acid synthesis in McA-S cells.

Acetyl-CoA is a central metabolite and its concentration can directly affect the balance of anabolic and catabolic pathways. Cytosolic acetyl-CoA was measured in both cell lines to analyze the possible differences in its availability. The results show that McA-S cells do not have lower cytosolic acetyl-CoA concentration (**Fig D28**).

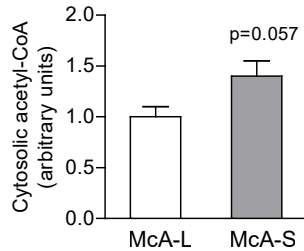


Fig D28. Cytosolic acetyl-CoA content. Cytosols from McA-L and McA-S cells were isolated and, after deproteinization by ultrafiltration, cytosolic acetyl-CoA concentration was measured using commercially available kits. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: P value shown in graph.

After confirming that acetyl-CoA availability is not the limiting factor for TG synthesis, the gene expression of enzymes that participate in FA synthesis and other steps of lipogenesis (**Fig D29.A**) was analyzed.

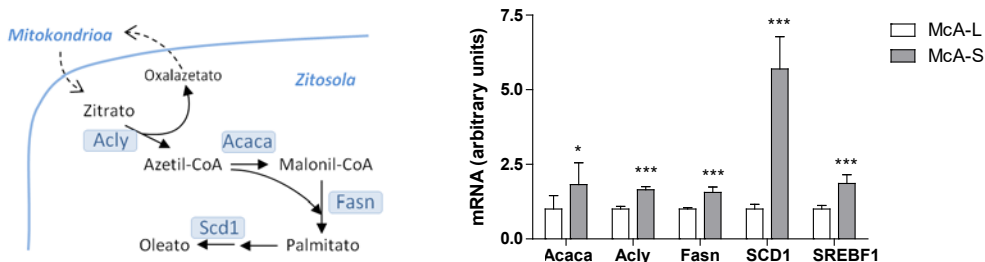


Fig D29. Expression of genes that participate in the synthesis of fatty acids. (A) Diagram with the main steps of the fatty acid synthesis pathway and important processes in the lipogenic program. (B) Relative mRNA levels of lipogenic enzymes in McA-L and McA-S cells analyzed by RT-qPCR. Gapdh expression was used for normalization. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

Fig D29.B shows that gene expression of the lipogenic enzymes is enhanced in SCD1-overexpressing cells. The overexpression of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) is especially remarkable; this protein is responsible for forming a double bond in the ninth position of FAs such as OA. In this context, it is worth mentioning that OA is preferentially used in cholesterol esterification (Chang et al., 1997). Among these proteins, the main flux-limiting enzyme of lipogenesis is ACC (Acaca gene).

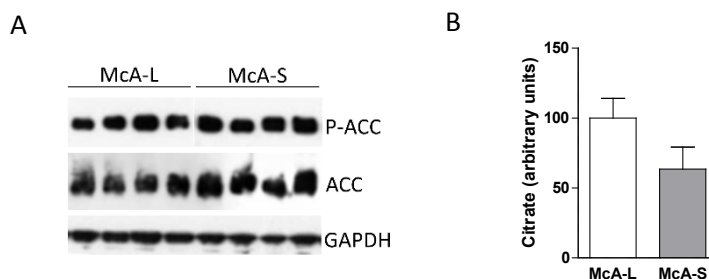


Fig D30. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. (A) Analysis of the phosphorylation state of the S79 (P-ACC) residue by western blot. 15 μ g protein were loaded per lane. GAPDH and total ACC were used as a reference. (B) Cytosolic citrate content. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$.

In addition to its expression, enzymatic activity of ACC can also be regulated; the concentration of citrate, which is a donor of cytosolic acetyl-CoA (**Fig D29.A**), and the phosphorylation state of ACC itself are especially important. **Fig D30.A** shows that there are not significant differences in ACC expression or its phosphorylation state. In this context, citrate and acetyl-CoA concentration-dependent allosteric modulation would be expected to be the main regulatory mechanism. Although citrate concentration in McA-S cells is lower than in control cells the difference is not statistically significant (**Fig D29.B**), which suggests that regulation of ACC activity is similar in both cell lines.

Besides the utilization of Acetyl-CoA, cholesterol synthesis and FA synthesis have in common the use of NADPH as electron donor. The main reactions for the reduction of oxidized NADP^+ are the ones catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and malic enzyme (ME). To analyze whether the activity of those could be a limitation, NADPH production was spectrophotometrically measured in isolated cytosols.

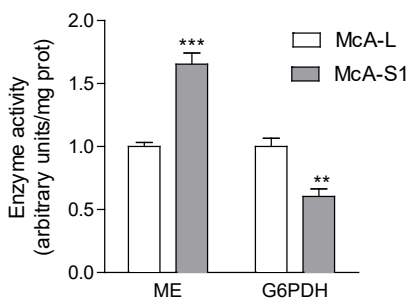


Fig D31. Activity of NADP^+ -reducing cytosolic enzymes. Cytosols of McA-L and McA-S cells cultured for 72 h were isolated and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and malic enzyme (ME) activities were analyzed by the spectrophotometric measurement of NADPH production. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 3$. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Fig D31 shows that ME activity in McA-S cells was 65% higher compared to control cells. On the other hand, the activity of the pentose phosphate pathway enzyme G6PDH was 40% lower in McA-S cells. As previously mentioned, in the experiments of incorporation of radioactive lipogenic substrates, 80-85% of glucose is channeled towards acylglyceride synthesis (**Fig D21**), while a big percentage of AA is channeled towards cholesterol synthesis (**Fig D6**). In this context, if TG synthesis used mainly NADPH produced by G6PDH, results shown in **Fig D31** could lead to think that the utilization of glucose could be the limiting factor for TG synthesis.

One of the major uses of glucose in cancer cells is the energy production necessary for the synthesis of biomolecules. In McA-S cells, although the proliferation rate (measured as BrdU incorporation) is the same as in McA-L cells (**Fig D32**), the metabolic rate (measured by MTT assay) is higher, which matches with the higher protein content in these cells.

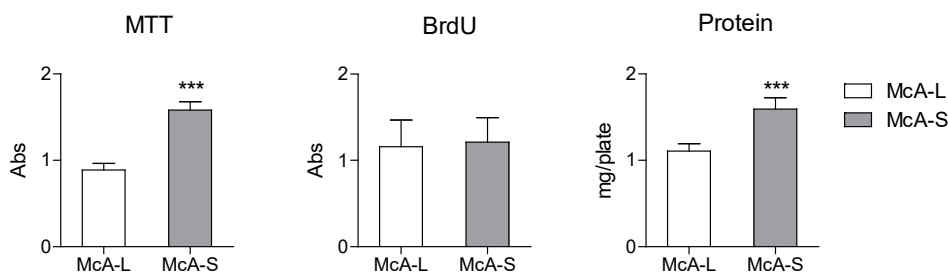


Fig D32. Measurement of cellular metabolic rate and protein content. (A) Metabolic rate (MTT assay), (B) proliferation rate (BrdU incorporation) and (C) total protein content (BCA assay) were analyzed in McA-L and McA-S cells cultured in 96 mm diameter culture dishes for 72 h. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 48$ for the MTT assay, $N \geq 24$ for BrdU assay and $N \geq 5$ for protein quantification. Student's t-test: *** $P \leq 0.001$.

These results suggest that McA-S cells have higher energy needs in order to maintain a higher cholesterologenesis (described in Chapter 1), and higher protein synthesis. This could explain the higher glucose utilization of McA-S cells (**Fig D23**), which could lead to a decreased glucose availability for G6PDH-mediated NADPH production.

Altogether, the results indicate that the limiting factor for TG synthesis in McA-S cells is a lower G6PDH-mediated NADPH production caused by a higher energy need. Next, we analyzed the incorporation of radioactive OA and AA in the presence of exogenous FAs, to see the effect of the cellular energy state. FAs would enter the mitochondria and could be used as energy source in the cell, therefore decreasing the

utilization of glucose. Then, glucose could be used to produce NADPH by G6PDH, reverting the phenotype of McA-S cells.

Fig D33 shows that in the presence of 400 μ M OA, incorporation of AA into TG is enhanced in McA-S cells, above the levels of McA-L cells. In addition, in steatotic conditions, OA incorporation is the same as in control cells.

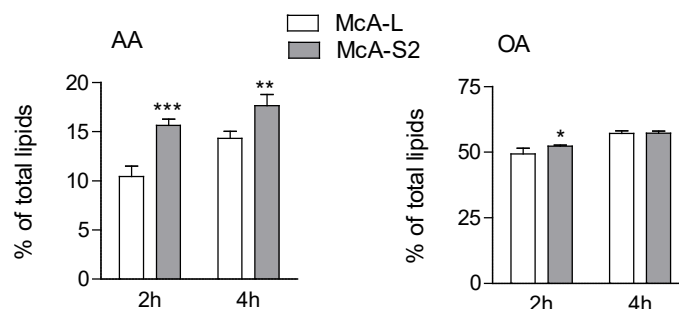


Fig D33. Incorporation of radioactive lipogenic substrates into triglycerides in prosteatotic conditions. Incorporation experiments were carried out as described in Fig D18 in the presence of 400 μ M oleic acid (OA). Data are represented as the percentage of the sum of the radioactivity in phospholipids, diglycerides, triglycerides, free cholesterol and cholesteryl esters. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

In addition, lipid content was characterized in the presence of exogenously added FAs to see if the changes observed in the metabolic fluxes had an impact on cellular TG content. **Fig D34** show that the TG content is increased up to the levels of control cells in McA-S by the addition of exogenous FAs.

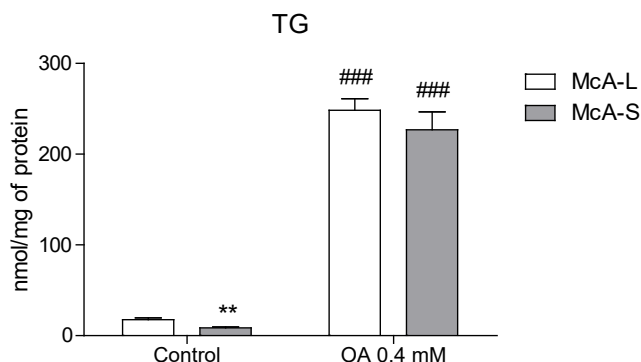


Fig D34. TG content of McA-L and McA-S cells in the presence of exogenous oleic acid (OA). Cells cultured in 96 mm diameter culture dishes for 64 h were treated with 0,4 mM OA or vehicle (albumin) and after 8 h lipids were extracted, separated by thin layer chromatography and quantified by image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: ** $P \leq 0.01$ to show differences between cell lines and ### $P \leq 0.001$ to show the effect of the treatment.

3. Cell morphology

The alterations of lipid metabolism caused by SND1 overexpression are described in Chapters 1 and 2 of the results. This includes the overaccumulation of CE and the higher cholesterol content of membranes described in the subsections 1.2 and 1.3 respectively. The impact of cholesterol in membrane properties such as fluidity, rigidity and elasticity is widely known. Moreover, it also plays an important role in the regulation of the localization of membrane proteins.

Clear differences of morphological features between McA-L and McA-S cells can be seen through a simple observation. In this context, we wanted to analyze how these morphological changes were related to the overexpression of SND1.

3.1 SND1-overexpressing cells are rounder than control cells and are closely linked to each other

As a first approach to characterize cell morphology, representative micrographs of both cell lines are shown in **Fig D35**. McA-L cells have a flatter morphology and show a higher number of elongations. On the other hand, the morphology of McA-S cells is rounder with almost no elongation. Moreover, McA-L cells are associated in loose colonies with intercellular space while McA-S cells associate in compacted colonies with no intercellular space.

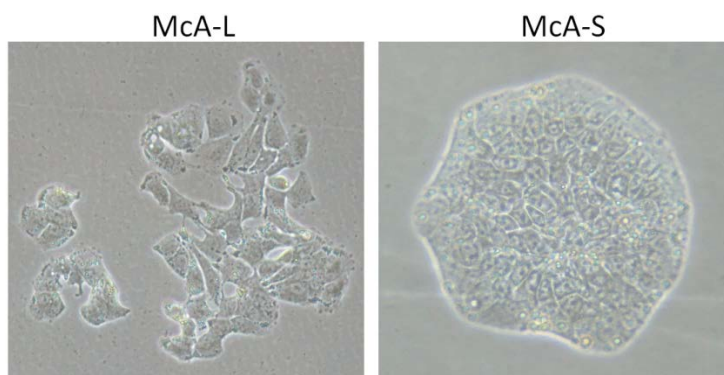


Fig D35. Phase-contrast micrographs of McA-L and McA-S cells. Micrographs of cells grown in gelatin-coated culture dishes were obtained in an inverted microscopy (10x objective).

To study the intracellular structure of these cells the distribution of actin, the main cytoskeletal protein, was analyzed by immunocytochemistry. Serial shots of the Z axis were obtained by structured illumination microscopy in the Apotome II microscopy to visualize the three dimensional structure of McA-L and McA-S cells. **Fig D36** show that McA-S cells are taller (in the Z axis) compared to control cells. This image does not show the morphology of colonies as clearly as **Fig D35** due to the limited capacity of McA-S cells to adhere to glass slides used for fluorescence microscopy. However, in regards to cell-matrix adhesion, McA-L cells show a bigger contact area with the matrix than McA-S cells.

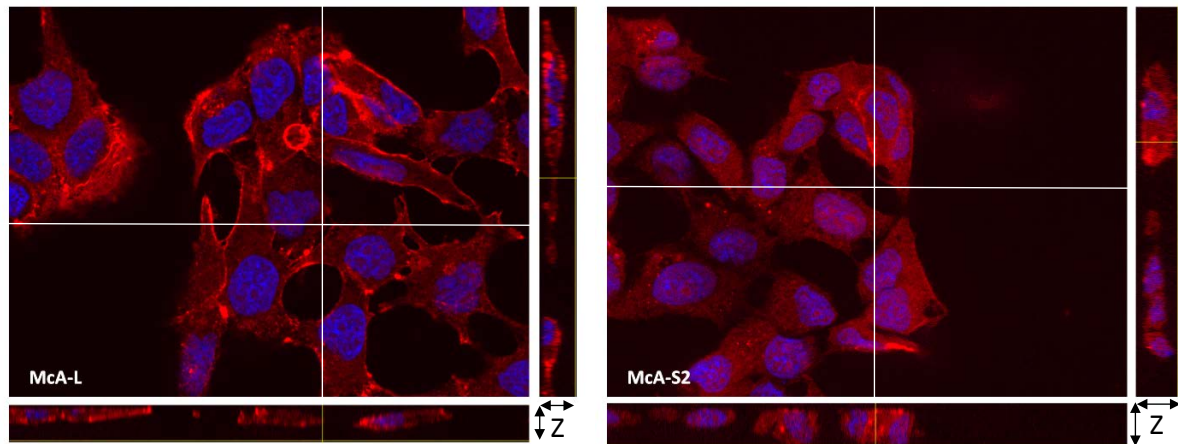


Fig D36. Three dimensional actin distribution of McA-L and McA-S cells. DNA was labelled by Hoechst dye (blue) and actin was labelled by specific fluorescent antibodies (red) and serial shots of the Z axis were obtained by structured illumination to build images of the Z-X and Z-Y planes.

3.2 Cell-cell interactions in McA-S cells are Ca^{2+} -dependent

Micrographs of McA-L and McA-S cells in **Fig D35** can lead to think that the reason behind the formation of compact colonies in McA-S cells could be that cell-cell interactions are stronger in these cells. There are different types of cell adhesion molecules (CAM), and each of them participates in a specific type of interaction. There are five main CAM superfamilies: cadherins, selectins, mucin-like CAMs and integrins. Among these, cadherins and selectins form Ca^{2+} -dependent interactions but cadherins are the main responsible proteins for cell-cell adhesion.

To analyze whether the strong cell-cell interactions observed in McA-S cells are Ca^{2+} -dependent or not, a quantitative analysis of the colonies obtained from the trypsinization of cell culture flasks was carried out

using a hemocytometer; the number of cells distributed in clusters of different sizes was counted. The analysis was carried out in two different ways: on the one hand, by directly looking the cells at the microscope after trypsinization and on the other hand, preincubating cells with EGTA before trypsinization. Since EGTA is a Ca^{2+} -selective chelating agent, the purpose of the treatment was to destabilize cell-cell interactions formed by cadherins and selectins to see if cell-cell adhesion was affected. Results of cluster size analysis in the non-treated cells (**Fig D37.A**) show that most of McA-L cells were either free or in small clusters formed by 2-3 cells. Moreover, most of the cells appeared in clusters with no more that 7 cells. In McA-S, although many cells appeared to be in small clusters (2-3 cells), more cells were found to be clustered in bigger cell groups. Most of these clusters were formed by 7-14 cells but clusters of up to 14-33 cells were found.

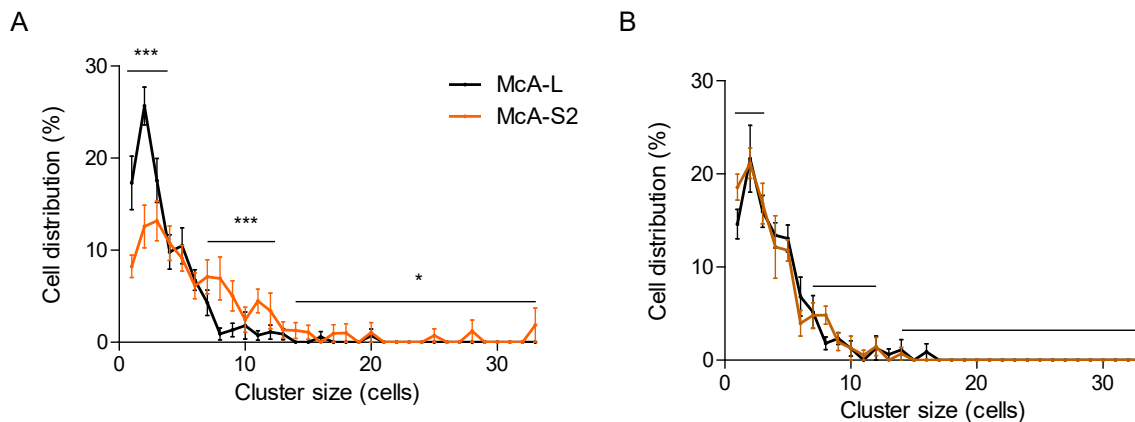


Fig D37. Cluster analysis of McA-L and McA-S cells. Cells cultured for 72 h were trypsinized and the cell number of cell groups of different sizes were counted using a hemocytometer and optic microscopy. Total cell number and the distribution of these in clusters of different sizes were counted each time. (A) 10 untreated cultures were analyzed in triplicate. (B) 0.05 % EGTA pretreated 5 cultures were analyzed in triplicate. Values represent the mean \pm SD. Two way ANOVA for the three selected sections: * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$.

When cells were pretreated with EGTA before the analysis the differences observed between both cell lines disappeared and most of the cells appeared to be grouped in small clusters (2-5 cells) both in McA-L and McA-S (**Fig D37.B**). The effect of the EGTA treatment is particularly noticeable in McA-S cells, where the number of clusters formed by 7-15 cells decreased significantly and clusters of more than 15 cells disappeared.

Data suggest that Ca^{2+} -dependent CAMs are probably behind the strong cell-cell interactions and compact colony formation in McA-S cells. As previously mentioned, the main CAMs responsible for intercellular interaction are cadherins, and among these, E cadherin (coded by the *Cdh1* gene) is the principal cadherin in

the interactions of polarized epithelial cells such as hepatocytes. Taking this into account, the expression of E-cadherin gene and protein were analyzed. Mca-S cells showed an overexpression of E-cadherin both at mRNA level and at protein level (**Fig D38**).

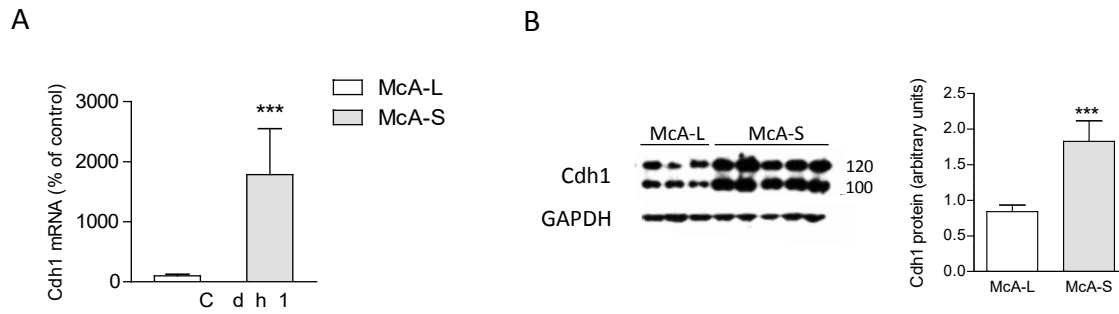


Fig D38. Expression analysis of E-cadherin. (A) Cdh1 mRNA levels were quantified by RT-qPCR. (B) E-cadherin protein levels were analyzed by western blot. Gapdh expression was used for normalization in both analyses. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: *** $P \leq 0.001$.

3.3 Strong intercellular interactions in Mca-S cells are a limitation for cell migration

Given that there are differences in cell morphology and cell interactions between SND1-overexpressing cells and control cells, they may also show differences in migratory capacities. As a first step to analyze this, Mca-L, Mca-S1 and Mca-S2 cells were grown until confluence in special plates for microscopy with a silicon insert with a defined cell-free gap suited for wound healing assays. Cell growth was monitored for 24 h after the insert was removed.

As shown in **Fig D39**, Mca-L cells and SND1-overexpressing Mca-S1 and Mca-S2 cells show a different way of filling the space. In the case of Mca-L, although there are gaps between the cells, loose cells are released from the front to the cell-free gap and move away in different directions. However, there is no such thing in Mca-S cells. Mca-S1 cells migrate as a block in the same direction without disrupting cell-cell interactions. In the case of the Mca-S2 cells it can also be seen that the front does not advance until the intercellular spaces

are completely filled. This suggests that the overexpression of SND1 has an impact on cell migration, probably due to the E-cadherin-mediated strong intercellular interactions described in the subsection 3.2.

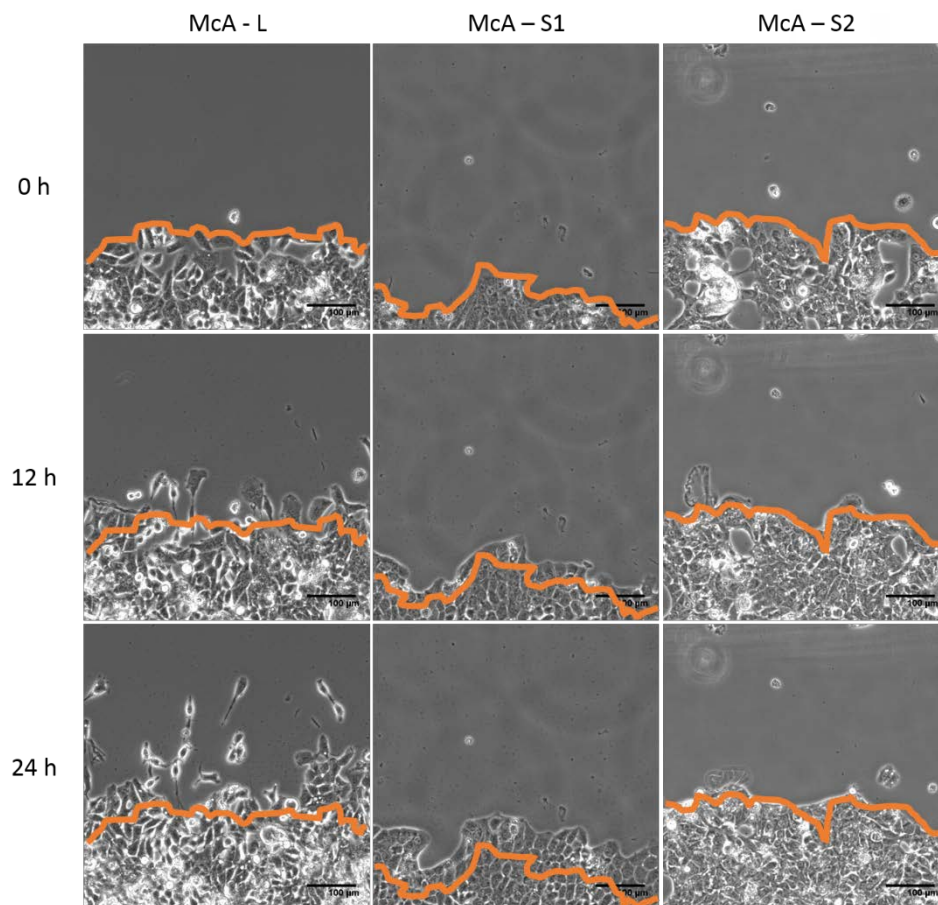


Fig D39. Wound-healing assays of **McA-L**, **McA-S1** and **McA-S2** cells. 21,000 cells/well were seeded in gelatin-coated special plates for microscopy with a silicon insert suited for wound-healing assays. After 12 h the insert was removed obtaining a 0.5 mm cell-free gap. Cell growth was monitored for 24 h (at 37 °C) and micrographs were taken every 20 min in the Biostation microscope. Representative micrographs taken at 0, 12 and 24 h are shown.

McA-S cells show a higher degree of cohesiveness among themselves. Next, we aimed to analyze if this could have an effect on the cell-matrix adhesion and/or the cell migration rate. First adhesion assays were performed to analyze the cell-matrix interaction rate. Two different matrices were used for these assays; gelatin (mainly type I collagen), which is routinely used for cell cultures, and a combination of gelatin and vitronectin (Vtn), which is used to enhance cell adhesion. Results in **Fig D40.A** show that more McA-S cells

adhere to the gelatin-coated plates and that both lines show a higher adhesion to the Vtn matrix. However, a large deviation in McA-S data was observed and taking into consideration the tendency of these cells to form big colonies (subsection 3.2), adhesion experiments were repeated with cells pretreated with EGTA before trypsinization to avoid the formation of big cellular clusters and analyze the adhesion capacity of single cells. Data are shown in **Fig D40.B**. EGTA-pretreated cells showed no significant differences regarding the adhesion capacity. As seen in the first assay, both lines showed a higher level of adhesion to the Vtn matrix.

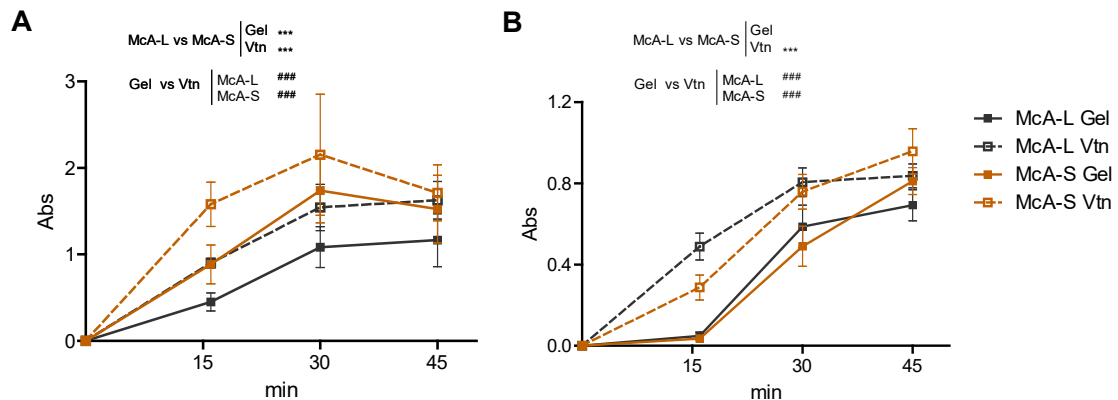


Fig D40. McA-L and McA-S2 adhesion assays. 96-well plate were coated with gelatin (Gel) or a combination of gelatin and vitronectin (Vtn) overnight and 300,000 cells/well were seeded. Cells adhered during 15, 30 and 45 min. Non-adhered cells were washed off, adhered cells were fixed and dyed with methyl violet (which binds DNA). Absorbance was measured at 590 nm wave length. (A) Cell without EGTA pretreatment and (B) EGTA-pretreated cells. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Two way ANOVA: *** $P \leq 0.001$ to show differences between cell lines and ### $P \leq 0.001$ to show the effect of Vtn.

Next, to quantify the migration rate, 300,000 cells were seeded in 35 mm diameter culture dishes and, after 12 h of adhesion, growth was monitored for 24 h in a BioStation. Micrographs were obtained every 20 min and the paths of random cells were tracked using ImageJ analysis software. Although it has been previously described that confluent McA-L and McA-S cells show a different way of migration (**Fig D39**), in this experiment, at a 40-50% confluence, no difference in the total migrated distance was found between both cell lines (**Fig D41**).

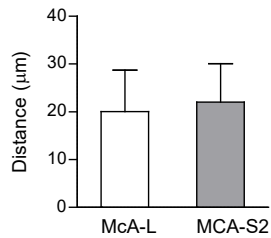


Fig D41. Migration rate of McA-L and MCA-S2 cells. 300,000 cells were seeded in 35 mm diameter culture dishes and, after 12h of adhesion, growth was monitored for 24 h in a BioStation. Micrographs were obtained every 20 min and the paths of random cells were tracked using ImageJ analysis software. Total migrated distance was calculated. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 12$.

McA-S cells do not seem to have any impairment in cell-matrix interactions or migration but the fact that they form stronger intercellular interactions, and thus form bigger cell clusters, seems to have an impact on the way these cells migrate.

3.4 Differences in the way McA-L and McA-S cells migrate may be related to the alterations in cholesterol metabolism caused by SND1 overexpression

Next, we aimed to analyze whether the morphological and migratory differences observed in McA-S cells are somehow related to the metabolic alterations described in Chapter 1. As previously analyzed and explained in detail, one of the main differences between McA-L and McA-S cells is the overaccumulation of cholesteryl esters due to alterations in cholesterol metabolism. Additionally, in section 1.3 a higher cholesterol content in McA-S cell membranes has also been described and, in section 3.2 of this chapter, higher E-cadherin expression. Since cadherins are localized in membrane lipid rafts (Marquez et al., 2012), differences in cholesterol content might be directly related to E-cadherin expression, affecting cellular properties such as adhesion and migration.

To analyze this, migration assays were repeated in the presence of hpCD, a cholesterol-sequestering compound. As shown in **Fig D42**, the morphology and migration of McA-S cells dramatically changes after treatment with hpCD. After hpCD treatment the morphology of McA-S cells resembles that of McA-L cells. Cells become flatter and, both elongations and intercellular spaces appear.

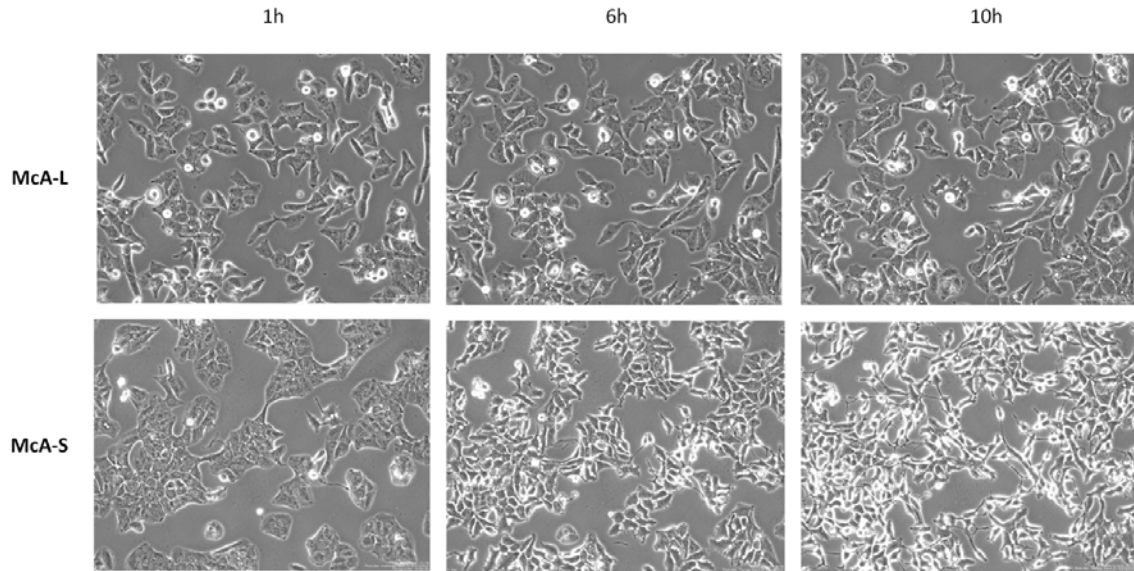


Fig D42. Analysis of the morphology and migration of McA-L and McA-S cells after cyclodextrin treatment. 300,000 cells were seeded in 35 mm diameter culture dishes and, after 12 h of adhesion, 2 mM 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin was added. Growth was monitored for 24 h in a BioStation and micrographs were obtained every 20 min. Representative micrographs taken at 1, 6 and 10 h are shown.

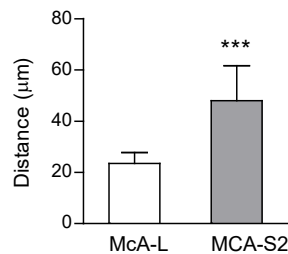


Fig D43. Quantification of migration of McA-L and McA-S cells after cyclodextrin treatment. Micrographs obtained in Fig D42 were analyzed by ImageJ by tracking random cells. Total distance migrated during 24 h was calculated. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 12$. Student's t-test: *** $P \leq 0.001$.

Besides the morphological changes observed in McA-S cells, migration rate was also significantly affected by hpCD treatment. Although both cell lines showed similar migration rates in basal conditions (**Fig D41**), after hpCD treatment the total distance migrated during 24 h doubled in McA-S cells (**Fig D43**).

4. Development of xenotumors derived from SND1-overexpressing hepatoma cells

In order to study the effects of SND1 overexpression on tumor development *in vivo*, Mca-L and Mca-S cells were subcutaneously injected to nude mice. The tumors grew for at least 3 weeks before analyzing the histology and composition of the tumors and the biochemical parameters of the serum isolated from the blood collected after finalizing the treatment.

4.1 Xenotumors maintain the main features of the cells

The first step was to analyze whether xenotumors maintained the differential expression of SND1. To this end, tumors developed after xenotransplantation of Mca-L and Mca-S (L and S tumors) were homogenized and the expression of SND1 protein was analyzed by WB. As shown in **Fig D44**, L and S tumors maintain the differential expression of SND1, which was 200 times higher in S tumors.

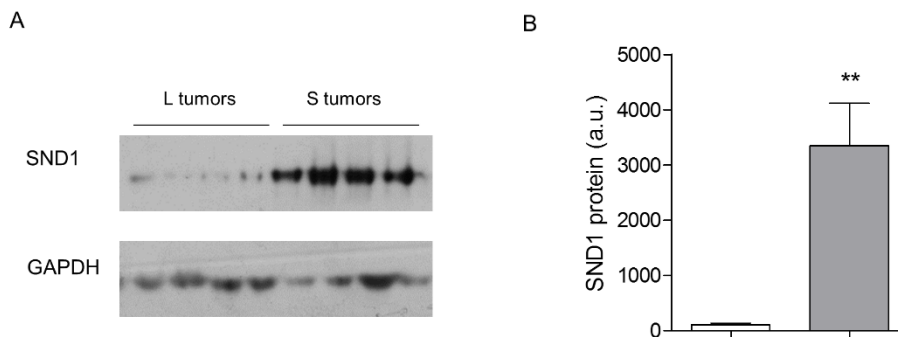


Fig D44. SND1 expression in xenotumors. (A) SND1 protein expression analysis in homogenized xenotumors by western blot. (B) Quantification of data showed in A. Gapdh expression was used for normalization. The graph represents the mean \pm SD of N \geq 5. Student's t-test: ** P \leq 0.01.

As described in Chapter 1 of results, the main feature of SND1-overexpressing hepatoma cells regarding lipid content is the overaccumulation of cholesterol in the form of CE. In addition, although not related with the alterations in cholesterol metabolism, MCA-S cells also show lower TG content compared to control cells.

Since the differential expression of SND1 observed in cells and in tumors is comparable, a lipid characterization of L and S tumors was done to see if features observed in cells were also present in tumors. L and S tumors were homogenized and lipids were extracted from the homogenate before separation and quantification. Results are shown in **Fig D45**. S tumors show 50% more CE than L tumors, which is in accordance with the results obtained in the lipid characterization of McA-L and McA-S cells. Moreover, the TG content of S tumors was 40% lower compared to control tumors, which also parallels the results observed in cell lines. Lastly, PL content was also quantified but no significant differences were found.

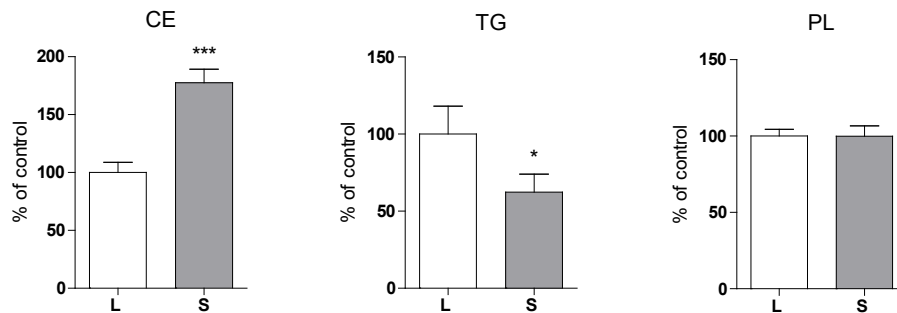


Fig D45. Lipid characterization of L and S tumors. L and S tumors were homogenized and lipids were extracted from the homogenate before separation by thin layer chromatography and quantification by image analysis. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 10$ obtained in two independent experiments. Student's t-test: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Although L and S tumors showed different lipid composition, there was no significant histological difference between the two types of tumors, with similar characteristics developed in both (**Fig D46**). Both L tumors and S tumors showed abundant necrotic areas and signs of the angiogenesis process (blood vessels). The presence of mitotic nuclei, indicator of the characteristic high proliferation rate of cancer cells, was also high in both tumor types. Together with those, some hypertrophied nuclei were also observed both in L and S tumors.

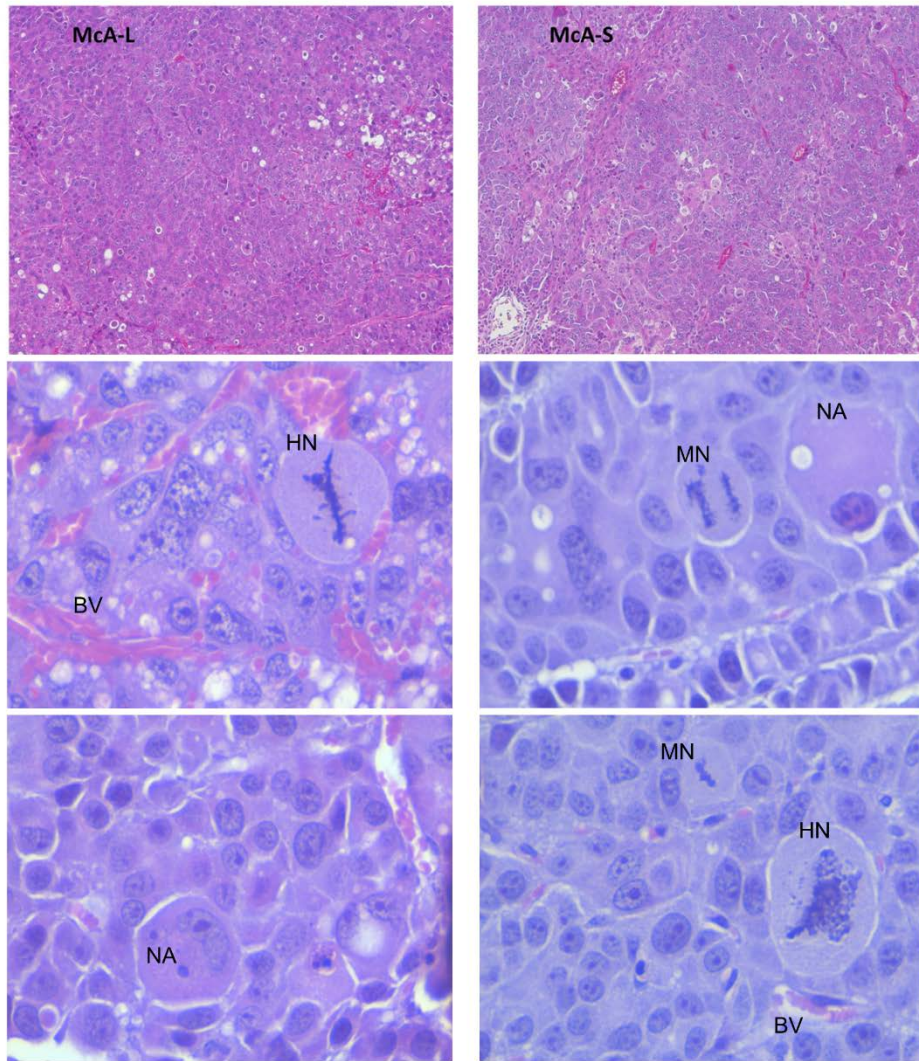


Fig D46. Hematoxylin and eosin staining of L and S tumor sections. Observed features with the 40x objective: HN, hypertrophied nuclei; BV, blood vessels; MN, mitotic nuclei; NA, necrotic areas.

4.2 SND1 overexpression accelerates tumor growth rate

To analyze if the overexpression of SND1 and the consequent cholesterol accumulation of S tumors could have any effect on tumor development, growth of tumors derived from subcutaneously injected McA-L and McA-S cells was analyzed in nude mice. To see whether the cholesterol overaccumulation could directly affect

tumor growth, nude mice were treated with Avasimibe, a well-known inhibitor of cholesterol esterification. Tumor growth was monitored by daily measurements with a caliper.

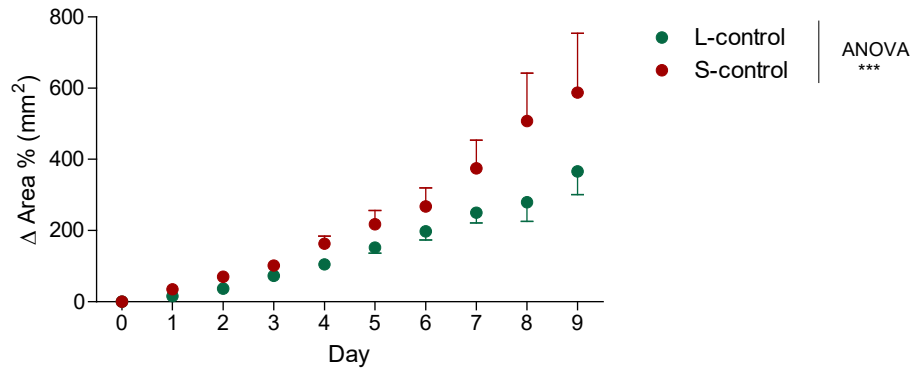


Fig D47. Analysis of L and S tumor growth. Nude mice were subcutaneously injected with Mca-L and Mca-S cells and the growth of developed tumors was monitored by daily measurements with a caliper. Growth is expressed as the increment of the area in relation with the area at day 0 of treatment (0.5 cm²). Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 6. Two way ANOVA: *** P \leq 0.001.

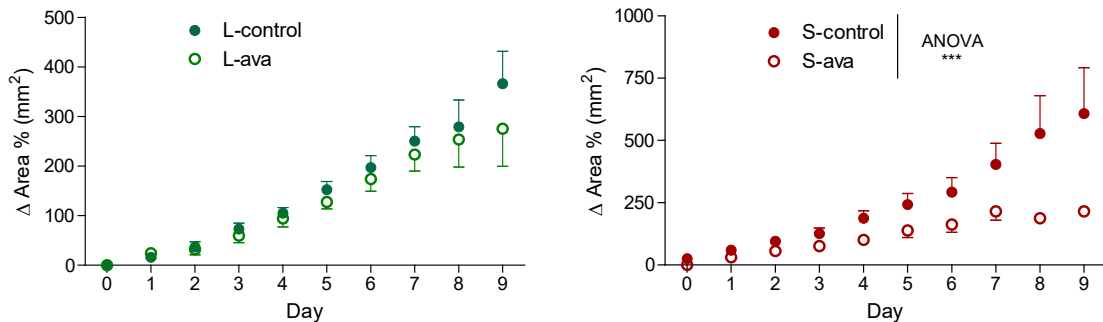


Fig D48. Effect of the inhibition of cholesterol esterification by Avasimibe (ava) on the growth of L and S tumors. Nude mice were subcutaneously injected with Mca-L and Mca-S cells and the growth of developed tumors was monitored by daily measurements with a caliper. When tumors reached 0.5 cm² 15 mg/kg Avasimibe or vehicle (5 ml/kg PBS) was injected every two days. Growth is expressed as the increment of the area in relation with the area at day 0 of treatment. Graphs represent the mean \pm SD of N \geq 6. Two way ANOVA: *** P \leq 0.001.

As shown in **Fig D47**, S tumors showed higher growth rate compared to L tumors. When the area of L and S tumors reached 0.5 cm², Avasimibe was intraperitoneally injected every two days. By inhibiting the esterification of cholesterol, growth rate of S tumors decreased while no significant changes were observed in the growth of L tumors (**Fig D48**). This suggests that the overaccumulation of cholesterol caused by SND1 overexpression can somehow have an impact on tumorigenesis by affecting tumor growth.

4.2 Mice with L and S tumors show differences in serum lipid and glucose contents

To see if the differences found in L and S tumors could have an impact on mice different serum parameters were measured. No significant differences were found in the serum TG content between animals with L and S tumors (data not shown), but glucose and cholesterol contents were different (**Fig D49.A**). Mice with S tumors had lower glucose and higher cholesterol levels in serum. Moreover, treatment with the cholesterol synthesis inhibitor Atorvastatin was able to revert the hypoglycemia of mice with S tumors (**Fig D49.B**).

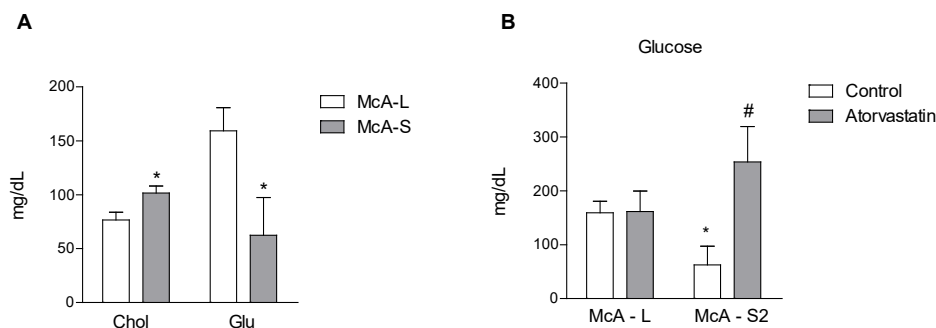


Fig D49. Serum parameters of mice with L and S tumors. Nude mice were subcutaneously injected with McA-L and McA-S cells and xenotumors were left to develop for three weeks. Atorvastatin was intraperitoneally injected every two days and control mice were injected with PBS. At the end of the experiment animals were sacrificed and blood was collected for serum isolation. Cholesterol (Chol) and glucose (Glu) content was measured with commercially available kits. Graphs represent the mean \pm SD of $N \geq 5$. Student's t-test: * $P \leq 0.05$ to show differences between cell lines and # $P \leq 0.05$ to show the effect of atorvastatin.

These results suggest that S tumors might have a higher glucose consumption and that glucose could be channeled towards cholesterol synthesis (**Fig D50**).

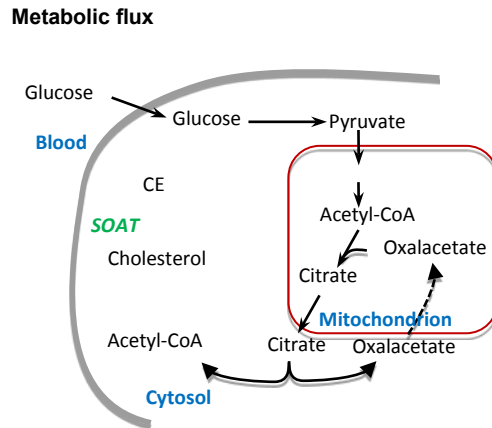


Fig D50. Diagram of the utilization of glucose. As soon as glucose enters the cell, it is phosphorylated and converted to pyruvate by the glycolytic pathway. In mitochondria, pyruvate is converted to acetyl-CoA that can be directed to the cytosol for cholesterol synthesis. CE, cholesteryl ester; CoA, A coenzyme; SOAT, sterol O-acyltransferase.

Cholesterol is transported through the bloodstream in the lipoproteins. Analyzing the distribution of cholesterol and other lipids in lipoproteins can help to further understand how tumors can affect the lipid physiology. To that end, serum lipoproteins were separated by FPLC and TGs and cholesterol were measured in each fraction. No significant changes were observed in the distribution of TG in different lipoproteins. However, some differences were found in the case of cholesterol. The increase of serum cholesterol in mice with S tumors (**Fig D49**) seems to be associated with an increase of cholesterol associated to the IDL/LDL fractions (**Fig D51**).

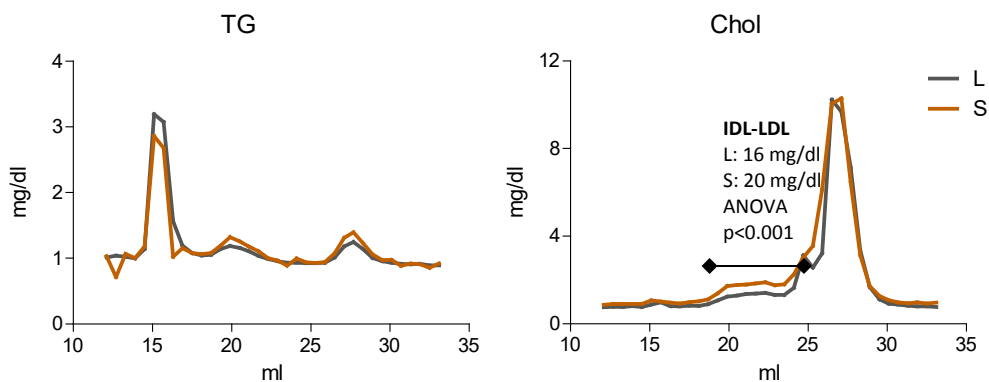


Fig D51. TG and cholesterol content of serum lipoproteins of mice with L and S tumors. Lipoproteins were separated by FPLC using a Superose™ 6 10/300 GL column, with a 0.3 ml / min flow of the mobile phase. After equilibrating the system, 200 μ L of serum filtered with a PVDF filter of 0.22 μ M I was injected into the column and 40 fractions of 400 μ L were collected. Cholesterol and TG content of each fraction were measured using commercially available kits. (Chol, cholesterol; TG, triglycerides; IDL, intermediate density lipoproteins; LDL, low density lipoproteins).

Discussion

1. Effects of SND1 overexpression-induced alterations in cholesterol metabolism on cancer

Neoplastic tissues undergo a metabolic reprogramming, and an important part of it is the overactivation of the *de novo* synthesis of lipids; that is essential to maintain cell growth and proliferation (Santos and Schulze, 2012). In particular, accumulation of CEs and deregulation of the mevalonate pathway have been described in several cancer cell types (Rao et al., 1999; Clendening et al., 2010) and are correlated with the aggressiveness of the tumors (Yue et al., 2014; de Gonzalo-Calvo et al., 2015). In the 1st part of the results we have shown that McA-S1 and McA-S2 hepatoma cells, which overexpress SND1, overaccumulate CEs (**Fig D2**). The overaccumulation of CEs increases with the overexpression of SND1 and diminishes when SND1 is underexpressed (**Fig D3**). In addition, tumors developed in nude mice after xenotransplantation of SND1-overexpressing hepatoma cells too overaccumulate CEs (**Fig D45**).

SND1-overexpressing McA-S cells have a higher cholesterol content in the plasma membrane (**Fig D5**) and they show a higher capacity to mobilize cholesterol from accumulated CEs to the plasma membrane (**Fig D4**). Membrane cholesterol content can induce changes in the location of many membrane proteins. In fact, proteins that take part in many signaling pathways locate in membrane domains called rafts. Those domains are rich in cholesterol and sphingomyelin. It seems that different rafts of a single cell can have a different composition, and composition can regulate which proteins locate in the rafts. Therefore, raft composition has an important implication on the role rafts play in signaling.

Among the proteins that locate in membrane rafts different G proteins, adenylate cyclase or tyrosine kinases have been described. Moreover, rafts can also interact with the actin cytoskeleton via different adaptor proteins (Simons and Ikonen, 1997; Pike, 2003; Staubach and Hanisch, 2011). Although there has been some controversy on that relation, several works have related plasma membrane rafts and E-cadherin, which is mainly present in adherens type cell-cell junctions (Seveau et al., 2004; Chartier et al., 2011; Marquez et al., 2012; Yap et al., 2015).

E-cadherin is classified among classic cadherins and is the main responsible for cell-cell junctions of epithelial cells. When those junctions need to break up E-cadherin is internalized by endocytosis and degraded in lysosomes (Kowalczyk and Nanes, 2012). In the 3rd part of results we have shown that morphology of SND1-overexpressing cells is dramatically different from that of control cells (**Figs D35 and D36**). In addition, we show that those differences might be a consequence of the differential expression of E-cadherin. If overexpression of SND1 induces a rise in the membrane content of cholesterol and E-cadherin locates in cholesterol-rich membrane rafts, it is not surprising that SND1-overexpressing cells show a higher stabilization degree of cadherin.

Although Tsuchiya et al. have previously described that SND1 overexpression induces the internalization of E-cadherin from plasma membrane (Tsuchiya et al., 2007), resources used in that work were completely different from ours. They showed E-cadherin location by immunocytochemistry techniques applied on cells fixed on glass, but **Fig D36** shows that SND1-overexpressing cells show a limited adherence on glass. On the other hand, several works have highlighted the importance of lipid composition of membranes in the structure of adherens junctions and membrane location of cadherins (Taufel et al., 2009; Baumgartner et al., 2014; Yap et al., 2015). Additionally, Marquez et al showed the relation between E-cadherin expression and location and cellular cholesterol content (Marquez et al., 2012). Tsuchiya et al. induced a transient SND1 overexpression and do not indicate whether that induced changes in cholesterol homeostasis (Tsuchiya et al., 2007). In this work, data suggest that E-cadherin overexpression is a consequence of changes in cholesterol homeostasis induced by SND1 overexpression.

E-cadherin overexpression affects, among others, colony formation. That is because it induces tighter cell-cell adhesion, as shown in **Fig D38**. On the other hand, although McA-S cells have no limitations to adhere to several extracellular matrices (**Fig 40.B**), their rounder morphology and the fact that they are part of bigger colonies make cell-matrix contact area smaller and binding to extracellular matrix weaker (**Fig D40.A**). When cells are treated with EGTA and Ca^{2+} -dependent adhesion (like that induced by E-cadherin) is impaired, cell-matrix adhesion equals in both cell lines (**Fig D40.B**).

Apart from affecting morphology, tighter cell-cell adhesion affects cell motility too. Although motility of McA-S cells is similar to that of control cells (**Fig D37**) the pattern of movements is completely different. SND1-overexpressing cells move in a much more coordinated fashion. Wound-healing assays showed that cells in

the front move all together and keeping attached to each other (**Fig D39**). This feature is lost in the presence of cholesterol-sequestering agent hpCD (**Fig D42**), which suggests that morphological differences are a consequence of the higher cholesterol content of the plasma membrane induced by SND1 overexpression.

It would not be surprising if the metabolic and morphologic changes had some effect on tumor development, especially in the development of secondary tumors. Metastases are accountable for most cancer-related deaths. Moreover, carcinomas derived from epithelial cells are the most prevalent among humans (Thiery, 2002). In recent years, steps necessary for the metastasis process to happen have been thoroughly described: (i) cells detach from the primary tumor and migrate, (ii) invade neighboring tissues, (iii) enter the bloodstream or lymph circulation, (iv) deal with anoikis state while detached from extracellular matrix, (v) escape blood or lymph vessels in a distant organ and migrate to the tissues, (vi) form a metastatic micronodule and (vii) undergo the necessary adaptations and reprogramming to form macrometastases (Thiery, 2002; Yao et al., 2011).

Phenotype changes occurring in EMT are considered essential for metastasis: cell-cell junctions between epithelial cells weaken and cell motility increases. While EMT is necessary for the initiation of the metastasis process, several works have proven that many secondary tumors, including HCC, show epithelial-like features and have a lower dedifferentiation level than primary tumors (Yao et al., 2011). That suggests that mesenchymal-epithelial transition might be important for the development of metastatic tumors, because it makes it possible for metastatic cells to recover phenotypic features of the primary tumor in the secondary focus. Overexpression of E-cadherin has been proposed as a representative characteristic of that process (Hugo et al., 2007). Recovering E-cadherin expression in the new environment helps in the cellular reprogramming because it helps reactivate signaling pathways lost when the cell detached from the primary tumor (Wells et al., 2008). That somehow might explain why subcutaneous tumors developed from SND1-overexpressing cells show a faster growth (**Fig D47**); the epithelial-like phenotype of McA-S cells would be an advantage for the development of new tumors. When nude mice were treated with avasimibe, an inhibitor of cholesterol esterification, the growth rate of S tumors equaled that of control tumors (**Fig D48**), which suggests that the alterations of cholesterol metabolism induced by SND1 might play an important role in tumorigenesis.

2. Mechanism behind the alterations of cholesterol metabolism

There are two cholesterol sources for hepatocytes: plasma lipoproteins and de novo synthesis from acetyl-CoA. Aiming to clarify what the cholesterol source for the CE accumulation in McA-S cells is, we analyzed the incorporation of radioactive lipogenic substrates by McA-S and McA-L cells and observed that McA-S cells show an increased cholesterogenesis (**Fig D6**). McA-S cells also have a bigger capacity to esterify cholesterol and FAs (**Figs D6** and **D10**), nevertheless, the inhibition of cholesterol synthesis by atorvastatin induced a decrease in CE levels (**Fig D7**). That suggests that overaccumulation of CEs in McA-S cells is mainly a consequence of the overactivation of the de novo synthesis of cholesterol. Lipogenic substrate incorporation assays also show that McA-S cells secrete more CE to the medium (**Fig D6.A**), which rules out the possibility that a lower secretion of CEs is accountable for the overaccumulation. Moreover, the main regulatory enzymes of the cholesterol synthesis pathway are overexpressed in McA-S cells (**Fig D8**). Therefore, CE accumulation in SND1-overexpressing cells seems to be a consequence of the increased cholesterogenesis.

Cholesterol is essential for many basic cellular functions. Among others, it is an essential membrane component, it takes part in vesicular transport processes and some intermediaries of its synthesis pathway (farnesyl or geranylgeranyl groups) can bind to proteins so that they can locate in membranes. Accordingly, cholesterol synthesis is a tightly regulated process. The main regulatory system is SREBP; in fact, many genes coding enzymes of the cholesterol biogenesis pathway are targets of SREBP2. Low cellular cholesterol levels induce the activation of SREBP2, which is in ER membranes in its inactive form and undergoes a proteolysis that releases the active N-terminal domain. Active SREBP2 translocates to the nucleus and induces the expression of genes involved in cholesterogenesis (Brown and Goldstein, 1997; Horton et al., 2003).

We have found that in McA-S cells target genes of SREBP2 like *Hmgcr* or *Srebf2* are overexpressed (**Fig D8**) and SREBP2 translocates to the nucleus (**Fig D13**). Those results suggest that, although cholesterol is overaccumulated, SREBP2 activation degree is high in McA-S cells, which suggests a deregulation of the system. In fact, when it works properly, this homeostatic system reacts to a cholesterol provision by inhibiting the expression of *Hmgcr* and *Ldlr*, which reduces de novo synthesis and incorporation of external cholesterol. When cholesterol was provided in the form of LDLs McA-L cells responded properly, but *Hmgcr* expression was not reduced in McA-S cells. That led to an enhanced cholesterol accumulation in McA-S cells, over the already high cholesterol content shown in basal condition (**Fig D12**). When mevalonate was provided, which

bypasses the control point of Hmgcr, both McA-L and McA-S cells accumulate CEs (**Fig D12**). SREBP2 seems to be constitutively activated in McA-S cells, in a cholesterol level-independent way (**Fig D13**).

The inactive form of SREBP2 is located in the ER and so are 2 important regulatory proteins of this homeostatic system, SCAP and INSIG. Given that the main location of SND1 is also ER, we hypothesized that the deregulation of cholesterol homeostasis might be a consequence of the alteration of the cholesterol content of ER membranes. Cholesterol measurement in the microsomal fraction of McA-L and McA-S cells showed that SND1-overexpressing cells have a lower cholesterol content in the ER membranes (**Fig D14.A**), which would induce the proteolysis of the inactive form of SREBP2 and the translocation to the nucleus of the active form (**Fig D14.B**). Besides, inhibition of cholesterol esterification normalized ER cholesterol levels and consequently nuclear levels of SREBP2 decreased to control levels (**Figs D14.A and D14.B**).

Our results suggest that excess cholesterol synthesis in McA-S cells is dependent on the regulatory ER cholesterol pool: ER cholesterol levels are below the threshold required to prevent SREBP2 from activation, therefore the cell receives the message to continue synthesizing cholesterol. It has been previously described that SREBP2 regulation is tightly associated to the ER cholesterol content and that the system can respond to slight changes in cholesterol concentration, but it is yet unknown how plasma membrane and ER membrane cholesterol contents are regulated (Brown et al., 2017).

Our data point to the possibility that alterations of cholesterol metabolism induced by SND1 overexpression are related to some function SND1 might have in the ER. Although the mechanism by which cholesterol induces a conformation change in SCAP has not yet been completely unraveled, it seems to happen via direct interaction (Radhakrishnan et al., 2004). SCAP needs to be in a certain conformation so that the translocation to Golgi apparatus happens, and that conformation involves the binding of two SCAP domains. That binding is impossible when one of the domains interacts with another molecule (Gao et al., 2017). This mechanism might explain the molecular basis by which SND1 affects the homeostatic system controlling cholesterol; low ER cholesterol levels induced by SND1 could lead to changes in membrane properties and that can have an impact on the structure of proteins.

3. Alterations in acylglyceride formation

Apart from the deregulation of cholesterologenesis, we wanted to analyze whether the overexpression of SND1 in hepatoma cells might have an effect on the metabolism of other lipids. We observed that McA-S cells have a lower TG content than control cells (**Fig D15**). Not only did we analyze the content, but also metabolic fluxes; we used different lipogenic substrates and in all cases the incorporation into TG was lower in McA-S cells (**Figs D19, D21 and D22**).

Gene expression analysis showed that McA-S cells have no limitation in TG synthesis (**Fig D16.B**), so we decided to analyze whether SND1 overexpression-induced excess cholesterologenesis could have a direct consequence on TG synthesis. To do so several approaches were made, by inhibiting cholesterol synthesis or esterification or by adding exogenous cholesterol with the aim of saturating the cell and limiting cholesterol synthesis. Based on the results (**Figs D24, D25 and D26**) we conclude that low TG content is not related with excess cholesterologenesis, because although small changes in metabolic fluxes were observed those changes did not have a significant impact on TG content. A lower availability of lipogenic substrates (acetyl-CoA) seems unlikely to be accountable for the low TG synthesis rate. Cytosolic acetyl-CoA measurements showed that, as suspected, McA-S cells do not have a lower acetyl-CoA availability (**Fig D28**). To make it clearer, different concentrations of acetate were added to the culture medium aiming to increase acetyl-CoA availability; even under those conditions there was no significant changes in TG content in McA-S cells (**Fig D27**). According to our results, scarcity of lipogenic substrates can be rejected as an explanation for the low TG synthesis rate of McA-S cells.

Expression level of enzymes of the FA synthesis pathway and other proteins involved in lipogenesis was analyzed and the whole lipogenic program was found to be overexpressed in SND1-overexpressing cells (**Fig D29.B**). ACC catalyzes the rate-limiting reaction of FA synthesis. Apart from its expression level, its enzymatic activity can be regulated by citrate concentration (citrate is the cytosolic acetyl-CoA donor, as depicted in **Fig D29.A**) and especially by its phosphorylation state. We found no significant differences in those factors too (**Fig D30**).

Cholesterol and FA synthesis pathways not only share the utilization of acetyl-CoA but also that of NADPH as electron donor. There are two main reactions for the reduction of NADP⁺, those catalyzed by G6PDH and

ME. Cytosolic ME activity is 65% higher in Mca-S cells than in control cells. G6PDH activity, which is the rate-limiting enzyme of the pentose phosphate pathway (PPP), is 40% decreased (**Fig D31**). Although utilization of glucose in the PPP is lower in Mca-S cells they have a higher glucose utilization (**Fig D23.B**). Likewise, their metabolic rate and protein content are higher than in control cells. It seems that glucose utilization is elevated in Mca-S cells in order to meet the higher energy requirements that sustain the increased cholesterol and protein synthesis, among others. Consequently, other uses of glucose might be decreased, including G6PDH; if that activity is decreased NADPH production is also decreased, which added to the higher NADPH consumption by excess cholesterologenesis results in a decreased NADPH availability for FA synthesis, which might explain the lower TG content of Mca-S cells.

Energy needed for FA, cholesterol and protein synthesis is mainly obtained from glucose oxidation. Glucose enters glycolysis and is transformed into pyruvate, which is transported into the mitochondrion and converted into acetyl-CoA, which can enter the TCA cycle. An alternative source of mitochondrial acetyl-CoA is β -oxidation of FAs. If that proposed in the previous paragraph was true, adding FAs in the culture medium of Mca-S cells would be a new mitochondrial acetyl-CoA source and dependency on glucose would decrease; in that case glucose could be used in the PPP, NADPH production would increase and consequently TG synthesis would increase too. **Figs D33** and **D34** show that adding a metabolite usable by the mitochondria (FAs) made FA synthesis and TG content in Mca-S cells increase to control levels.

Our results suggest that the limiting factor of TG synthesis in Mca-S cells is glucose utilization, specifically the NADPH production coupled to its oxidation. Although many works describe an overactivation of the pentose phosphate pathway in different cancer types, regulatory mechanisms of PPP are not yet fully understood. Different activation levels of PPP have been described in different tumor types and they are probably dependent on the cell type and metastasis area (Patra and Hay, 2014). In some cells cAMP can inhibit G6PDH activity through two different mechanisms: phosphorylation by protein kinase A (PKA) and reduction of G6PDH expression after binding to a cAMP response element present in its promoter (Patra and Hay, 2014). On the other hand, tumor suppressor TP53 can also take part in the regulation of PPP. TP53 binds to G6PDH and prevents it from forming dimers, which are the active form of the enzyme. TP53 mutations associated with cancer can abolish its capacity to interfere with G6PDH dimerization (Jiang et al., 2011). It has been described that in some cases oncogene KRAS induces glycolysis so that glycolytic intermediaries can enter the non-oxidative phase of PPP to synthesize ribose (Ying et al., 2012). Metastatic cells need a great

adaptation capacity to generate a new tumor in the secondary focus. Some of those changes are metabolic, including the oxidative and non-oxidative phases of PPP (Patra and Hay, 2014).

Conclusions

i. The overexpression of SND1 causes an overaccumulation of cholesteryl esters in hepatoma cell lines. This overaccumulation occurs as a result of a constitutively activated SREBP2, due to the effect of SND1 on the maintenance of low levels of regulatory cholesterol pools in the endoplasmic reticulum.

ii. The overaccumulation of cholesterol caused by SND1 overexpression promotes significant morphological changes in hepatoma lines. These changes appear to be due to a higher cholesterol content in the plasma membrane, as well as the increase in E-cadherin expression, which participated in the intercellular interactions.

iii. The overexpression of SND1, through the morphological changes caused by the formation of stronger cell-cell interactions, affects cell mobility.

iv. SND1 overexpression promotes an increase in the growth rate of xenotumors, which seems to be a consequence of the enhanced cholesterol synthesis caused by SND1.

v. SND1-overexpressing cells have low TG content. The utilization of acetyl-CoA for *de novo* cholesterol synthesis is not a limitation in terms of substrate availability. It seems that the main limiting factor for TG synthesis is the low NADPH production of pentose phosphate pathways, which is the result of a higher energy requirement.

