



Gradu Amaierako Lana

Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Estatinen eragina Ca^{2+} intrazelularraren mobilizazioan, Huh7 zeluletan

Egilea:
Eneritz Aizquibel Irastorza

Zuzendariak:
Aida Marino Sánchez
César Martín Plágaro

AURKIBIDEA:

1. Sarrera.....	3
2. Materialak eta metodoak.....	5
A. Zelulen hazkuntza	5
B. Zelulen ereinketa eta estatinen gehitzea	5
C. $[Ca^{2+}]$ intrazelularraren neurketa, Fura-2AM eta fluoreszentsiazko mikroskopia inbertitua erabiliz	5
– Erabili beharreko ATP eta UTP kontzentrazioen determinazioa	
– Suramina + ATP/UTP erabiliz egindako zinetikak	
– EGTA + tapsigargina + ATP/UTP + Ca^{2+} erabiliz egindako zinetikak, estatina ezberdinen presentzian	
– EGTA + ATP/UTP erabiliz egindako zinetikak, estatina ezberdinen presentzian	
D. Datuen analisisa.....	7
E. miR-27b-ren qRT-PCR, estatina ezberdinen presentzian.....	7
3. Emaitzak	8
A. $[Ca^{2+}]$ intrazelularraren neurketa, Fura-2AM eta fluoreszentsiazko mikroskopia inbertitua erabiliz	8
– Erabili beharreko ATP eta UTP kontzentrazioen determinazioa	
– Suramina + ATP/UTP erabiliz egindako zinetikak	
– EGTA + tapsigargina + ATP/UTP + Ca^{2+} erabiliz egindako zinetikak, estatina ezberdinen presentzian	
– EGTA + ATP/UTP erabiliz egindako zinetikak, estatina ezberdinen presentzian	
B. miR-27b-ren qRT-PCR, estatina ezberdinen presentzian.....	12
4. Ondorioak eta eztabaida.....	12
5. Bibliografia	14

1. SARRERA:

Hiperkolesterolemia odoleko kolesterol-lipoproteinen maila altuari deritzo, bereziki LDL lipoproteinen emendioari, eta aterosklerosi goiztiarraren agerpena eragin dezake. Aterosklerosia arterien endekapenezko patologia kroniko bat da, eta ateroma plaka du oinarritzko lesioa. Lesio horren ondorioz, gaixotasun kardiobaskularrak izateko arriskua emendatzen da, munduan zehar hainbat pertsonen osasuna kolokan jartzen delarik¹.

Hiperkolesterolemiari aurre egiteko, estatinak erabili ohi dira, kolesterolaren sintesian parte hartzen duen HMG KoA erreduktasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril-KoA erreduktasa) entzima hepatikoaren inhibitzaileak hain zuzen ere². Izan ere, animalia zelulek azetil KoA-tik abiatuta sintetizatzen dute kolesterola, HMG KoA erreduktasa delarik entzima mugatzailea³. Entzima horren inhibizioaren eraginez, gibelean kolesterol endogeno gutxiago sintetizatzen da, odolera kolesterol gutxiago jariatuz eta odoleko kolesterol mailaren igoera ekidinez².

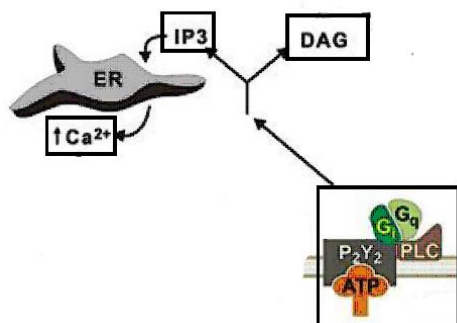
Euren efizientzia, segurtasun, jatorri eta ezaugarrien arabera, estatina mota ezberdinak daude, atorbastatina, rosubastatina, prabastatina eta sinbastatina besteak beste⁴. Aipatutako estatinak hiperkolesterolemiari aurre egiteko baliagarriak direla frogatu den arren, albo-ondorioak dituztela ere behatu da⁵. Esate baterako, estatinek 2. motako diabetes mellitus-a pairatzeko arriskua emendatu dezakete, pankreako zelulek intsulina modu egokian ez jariatzearen ondorioz⁶. Gainera, estatinek miopatia edo kalte muskularra ere eragin dezakete⁷. Horrez gain, nahiz eta oso ohikoa ez izan, estatinek kalte hepatikoa ere eragin dezaketela ikusi da⁵. Aipatzekoa da, estatinak hartzen dituzten paziente batzuetan albo-ondorio horiek behatu diren arren, honen inguruan asko dagoela ikertzeke oraindik.

2. motako diabetes mellitus-ari dagokionez, bere funtsezko ezaugarria odolean azukre maila altua izatea da, intsulinarek jariatzea edo erabilera egokia ez izatearen ondorioz. Hainbat ikerketek baieztatzen duten moduan, diabetesak arazo kardiobaskularrak eragin ditzake, sistema purinergikoa dela medio. Izan ere, 2. motako diabetesa pairatzen duten pazienteek ez dute behar bezala erantzuten ATP-ren eta UTP-ren aurrean; nukleotido horiek basodilatazioa eragiten dutenez, 2. motako diabetesaren presentzian arazo kardiobaskularrak ageri ohi dira⁸. 2. motako diabetesaren aurrean zelulek ATP eta UTP-ren aurrean behar bezala ez erantzutearen arrazoia nukleotido horien hartzaileek behar bezala ez funtzionatzea izan daiteke, P2Y₂ hartzaileek bereziki⁸.

P2Y₂ hartzaileak G proteinei loturiko hartzaile purinergikoak dira; P hizkiak hartzaile purinergikoari egiten dio erreferentzia, P2-k ATP-ren hartzaile purinergikoa dela adierazten duen bitartean (P1

adenosinaren hartzailea izango da). P2 hartzaileen barruan, bi talde bereizten dira, P2X eta P2Y hartzaileak hain zuzen ere. P2X hartzaileak katioien kanalak dira; horrela, ATP kanal horietara lotzean, kanala ireki eta Ca^{2+} -a zelula barnean sartuko da. P2Y hartzaileak ordea, G proteinei loturiko hartzaileak dira, euren seinalearen transdukzioa konplexuagoa delarik. P2X eta P2Y hartzaileen gain ATP-ren analogo eta nukleotido ezberdinek duten potentziaren arabera, hartzaileen are eta sailkapen sakonagoa egiten da⁹. Adibidez, P2Y₂ hartzailea bai ATP-k eta bai UTP-k aktibatzen dute, beste P2Y hartzaileekin gertatzen ez den moduan¹⁰.

ATP-k eta ATP-ren analogoek, funtzio biologiko asko betetzen dituzte ehun eta zelula ezberdinetan, hepatozitoetan barne¹¹. Fosfatidilinositol- Ca^{2+} seinaleztapen bidezidorrari loturiko P2Y hartzaileak espezie ezberdin askotako hepatozitoetan deskribatu izan dira¹². Seinaleztapen bidezidor hori dela eta, ATP edo bere analogoetako bat P2Y hartzaileera lotzean, fosfolipasa C-ren aktibazioa eragingo du, inositol trifosfatoa (IP_3) askatu eta honek erretikulu endoplasmatikotik Ca^{2+} -aren askapena eragingo duelarik. Horrela, hepatozitoetan zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioa emendatuko da¹³. Ca^{2+} kontzentrazio intrazelularrak hainbat entzimen erregulazioan parte hartzen duenez, Ca^{2+} kontzentrazio zitosolikoan egon daitezkeen gorabeherak hepatozitoen funtzionamendu egokia baldintzatu dezakete¹².



1. irudia: ATP (edo UTP) P2Y₂ hartzaileetara lotzean, fosfolipasa C aktibatzen da; IP_3 askatu eta erretikulu endoplasmatikoko Ca^{2+} -a zitosolera ateratzen da, zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioa emendatuz¹⁴.

P2Y₂ hartzaileen funtzionamendu ezegokia 2. motako diabetesarekin erlazionatuta dagoenez eta estatinek 2. motako diabetesa eragin dezaketenez, estatinek P2Y₂ hartzaileengan eragina izan dezaketela pentsatu da. Estatinek 2. motako diabetesaz gain kalte muskularra eta kalte hepatikoa ere eragin ditzakete; hori dela eta, kasu honetan hepatozitoetako P2Y₂ hartzaileengan estatinek duten eragina aztertu da Huh7 giza hepatokartzinomako zeluletan, estatinek eragiten duten kalte hepatikoa ulertzeko helburuaz. Izan ere, estatinek P2Y₂ hartzaileen gain eraginik ote duten, eta eraginik izatekotan zein eragin duten aztertzeke dago oraindik.

2. MATERIALAK ETA METODOAK:

A. Zelulen hazkuntza:

Ikerketa honetan Huh7 zelula-lerroa erabili da, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) medioan inkubatu delarik. Medioari %5eko behi-fetuaren seruma (FBS, ingelesez *Fetal Bovine Serum*), 2 mM L-glutamina, 100 unitate/ml penizilina eta 100 µg/ml estreptomizina gehitu zaizkio.

B. Zelulen ereinketa eta estatinen gehitzea:

Huh7 zelulak 24 putzutxotako plaketan erein dira, estalkien gainean; 12 putzutuan 50.000 zelula erein dira, eta beste 12 putzuetan 25.000 zelula, 1 ml DMEM medioan. Zelulak 24 orduz eta 37°C-tan inkubatu ondoren, estatina ezberdinen 5µM gehitu dira putzu ezberdinetan: atorbastatina, rosubastatina, sinbastatina eta prabastatina hain zuzen ere. Hala ere, putzu batzuetan ez da estatinarik gehitu, ondoren kontrol moduan erabili ahal izateko, edo estatinen beharrik ez duten esperimentuak egin ahal izateko. Zelulak 24 orduz eta 37°C-tan inkubatu dira.

C. [Ca²⁺] intrazelularraren neurketa, Fura-2 AM eta fluoreszentsiazko mikroskopia inbertitua erabiliz:

Zelulak 24 orduz inkubatu ondoren, 50.000 zelula ereindako putzuetako [Ca²⁺] intrazelularraren neurketak egin dira. Horretarako, neurketa bakoitza egin baino 45 minutu lehenago Fura-2 AM zunda fluoreszentea gehitu da putzura, 1,5 µM kontzentrazioan, zelulen zitosolera sartu dadin. Fura-2 AM zunda Ca²⁺-ari lotuta dagoenean 340 nm-tan agertzen da kitzikapen maximoa eta Ca²⁺-ari lotuta ez dagoenean, berriz, 380 nm-tan. Zundaren igorpena berdina da Ca²⁺-ari lotuta edo aske egon, bi kasuetan 510 nm-tan igortzen baitu argia.

Behin Fura-2 AM gehitu eta zelulak 45 minutuz 37°C-tan inkubatu ondoren, Huh7 zelulak hazi diren estalkia mikroskopioan ezartzeko diskoan jarri da, eta 500 µl medio gehitu dira diskora, 37°C-tan, F12 nutrient mixture medioa hain zuzen ere. Aipatzekoa da, medio honek ez duela ia Ca²⁺-rik.

Ondoren, Nikon TE300 mikroskopia erabiliz, [Ca²⁺] intrazelularraren neurketak egin dira ilunpean, x 40 objetiboa erabiliz, eta baldintza esperimental ezberdinetan. PTI DeltaRAM sistemaz baliatuz, zelulak 350 ms-ro kitzikatu dira 340 nm eta 380 nm-tan; kasu bakoitzerako, 340 nm eta 380 nm-tako absorbantzia balioen ratioak (340/380) behatu dira denboran zehar, zitosoleko [Ca²⁺]-a handitzean ratioaren balioa areagotzen delarik. PTI ImageMaster software-a erabiliz, zelula bizien irudiak ere lortu dira.

Neurketak egin eta 24h-tara, neurketa berdinak egin dira 25.000 zelula ereindako putzuetako zelulekin. 24h horietan zehar zelulak 37°C-tan inkubatu dira.

Aipatu den bezala, $[Ca^{2+}]$ intrazelularraren neurketak hainbat baldintza esperimental ezberdinetan burutu dira, eta hainbat aldiz errepikatu dira, ondoren azalduko den moduan.

Erabili beharreko ATP eta UTP kontzentrazioen determinazioa:

Mikroskopioan $[Ca^{2+}]$ intrazelularraren neurketak egiten hasi eta minutu batera ATP gehitu da zeluletara, 10 minutuko zinetikak egin direlarik. Neurketak hainbat ATP kontzentrazio ezberdinetan egin dira, ATP 5 μ M eta ATP 100 μ M kontzentrazioen artean. ATP zelulen mintzeko hartzaileetara lotu ondoren ATP kontzentrazio bakoitzarekin zitosoleko $[Ca^{2+}]$ -a nola aldatu den behatu da. Neurketak ATP kontzentrazio ezberdinetan egin dira, $[Ca^{2+}]$ intrazelularraren igoera maximoa izateko ATP kontzentrazio baxuena determinatzeko. Neurketa horiek estatinekin inkubatu gabeko zelulekin egin dira.

Neurketa berdinak burutu dira ATP ordeztu UTP erabiliz, eta UTP kontzentrazio ezberdinez baliatuz, UTP 0,25 μ M eta UTP 100 μ M kontzentrazioen artean. Horrela, $[Ca^{2+}]$ intrazelularraren igoera maximoa izateko UTP kontzentrazio baxuena determinatu da.

Suramina + ATP/UTP erabiliz egindako zinetikak:

ATP/UTP gehitzean Ca^{2+} -aren mobilizazioa P2Y₂ hartzaileen bidez ematen dela frogatzeko, suramina erabili da. Izan ere, Huh7 zeluletan suramina gehitu ondoren ATP eta UTP ezingo dira P2Y₂ hartzaileetara lotu, suraminak hartzaileak blokeatzen baititu. Zinetika horiek egiteko, neurketak hasi aurretik 5 μ M, 10 μ M eta 20 μ M suramina gehitu da zelulen mediora. Ondoren neurketak hasi eta minutu batera ATP 100 μ M edo UTP 0,75 μ M gehitu da, 10 minutuko zinetikak egin direlarik.

EGTA + tapsigargina + ATP/UTP + Ca^{2+} -a erabiliz egindako zinetikak, estatina ezberdinen presentzian:

Estatina ezberdinekin inkubatutako zelulei 0,4 mM EGTA gehitu eta neurketak hasi dira; EGTA-k medioaren Ca^{2+} erresiduala kelatzen edo harrapatzen du, zelula barrura sartzea ekidinez. Horrela, zelula barneko Ca^{2+} -aren mobilizazioa soilik aztertu da. ATP/UTP gehitzean Ca^{2+} -a erretikulu endoplasmatikotik ateratzen dela frogatzeko, neurketak hasi eta 1. minutuan 1 μ M tapsigargina gehitu da zelulen mediora, tapsigarginak erretikulu endoplasmatikoko Ca^{2+} -a zitosolera kanporatzen duelarik. 3. minutuan 100 μ M ATP edo 0,75 μ M UTP gehitu da eta zitosoleko $[Ca^{2+}]$ -a aldatu den ala ez behatu da. Zelulen mintzeko Ca^{2+} bonbek modu egokian funtzionatzen duten aztertzeko, 6.

minutuan 2,4 mM Ca^{2+} (CaCl_2 Optimem medioan disolbatuta) gehitu da zelulen mediora eta 12 minutuko zinetikak egin dira. Kasu honetan ere, estatina ezberdinekin inkubaturiko zelulak erabili dira, baita estatinekin inkubatu gabeko zelulak ere (kontrol moduan).

EGTA + ATP/UTP erabiliz egindako zinetikak, estatina ezberdinen presentzian:

Estatinek P2Y_2 hartzaileengan eraginik ote duten aztertzeke, Huh7 zelulak estatina ezberdinekin inkubatu eta zinetikak egin dira. Lehenik eta behin, zelulen mediora 0,4 mM EGTA gehitu da, zelula barneko Ca^{2+} -aren mobilizazioa soilik aztertzeke. Ondoren, zinetikak hasi dira; horretarako, behin $[\text{Ca}^{2+}]$ intrazelularraren igoera maximoa izateko ATP kontzentrazio baxuena determinatuta (100 μM), zinetikak egin dira ATP kontzentrazio hori erabiliz. Horretarako, neurketak hasi eta 1 minutuan ATP gehitu eta 10 minutuko zinetikak egin dira.

Neurketa berdinak burutu dira UTP erabiliz; horretarako, $[\text{Ca}^{2+}]$ intrazelularraren igoera maximoa izateko UTP kontzentrazio baxuena erabili da (0,75 μM).

Neurketa horiek egiteko, estatina ezberdinekin inkubaturiko zelulak erabili dira, baita estatinekin inkubatu gabeko zelulak ere (kontrol moduan). Horrela, ATP edo UTP gehitzean zelulak estatinekin inkubatuta egoteak zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioan aldaketaren bat eragiten duen ala ez behatu da.

D. Datuen analisia:

Kasu bakoitzerako, 340 nm eta 380 nm-tako absorbantzia balioen ratioak (340/380) behatu dira denboran zehar. Ratio balio horietatik (R) zitosoleko $[\text{Ca}^{2+}]$ -a kalkulatu ahal izateko, $[\text{Ca}^{2+}] = K_D \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$ formula erabili da. R_{\max} kalkulatzeko, tritoia gehitu da laginetara, zelulen mintza apurtu eta Ca^{2+} guztia Fura-2AM-ra batu dadin, 340/380 seinale maximoa lortuz. R_{\min} kalkulatzeko aldiz, EGTA agente kelatzailea gehitu da laginetara; honek Ca^{2+} guztia kelatzen duenez, 340/380 seinale minimoa lortu da. K_D balioari dagokionez, 224 nM balioa erabili da. Zitosoleko $[\text{Ca}^{2+}]$ -a kalkulatu eta datuak analizatzeko, Microsoft Excel programa erabili da.

E. miR-27b-ren qRT-PCR, estatina ezberdinen presentzian:

Estatinek miR-27b mikroRNA-ren adierazpen maila areagotzen duten ala ez aztertzeke, Huh7 zelulak 24 orduz estatina ezberdinekin inkubatu (5 μM) eta qRT-PCR egin da, estatina bakoitzaren presentzian agertzen den miR-27b maila neurtzeke.

3. EMAITZAK:

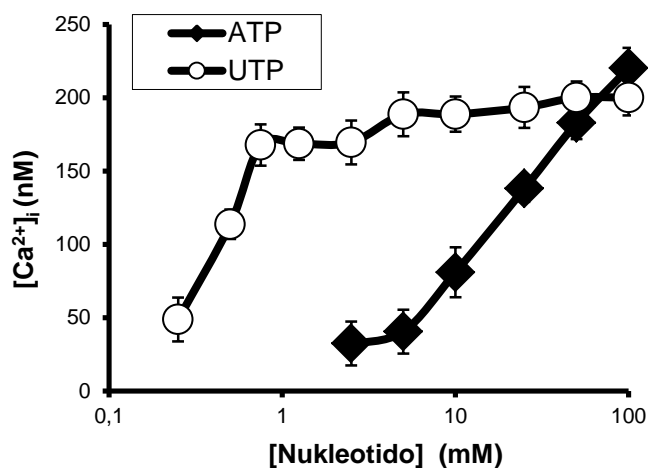
A. $[Ca^{2+}]_i$ intrazelularren neurketa, Fura 2-AM eta fluoreszentsiazko mikroskopia inbertitua erabiliz:

Erabili beharreko ATP eta UTP kontzentrazioen determinazioa:

$[Ca^{2+}]_i$ intrazelularren igoera maximoa izateko ATP kontzentrazio baxuena determinatzeko, neurketak ATP kontzentrazio ezberdinetan egin dira, 2. irudian ikus daitekeen moduan. 100 μM ATP baino kontzentrazio txikiagotan $[Ca^{2+}]_i$ intrazelularren igoera txikiagoa gertatzen da. Hori dela eta, ondoren egingo diren neurketa guztietan erabiliko den ATP kontzentrazioa 100 μM ATP izango da.

UTP-ren kasuan, 0,75 μM UTP baino kontzentrazio txikiagotan $[Ca^{2+}]_i$ intrazelularren igoera txikiagoa da. Beraz, ondoren egingo diren neurketa guztietan erabiliko den UTP kontzentrazioa 0,75 μM UTP izango da.

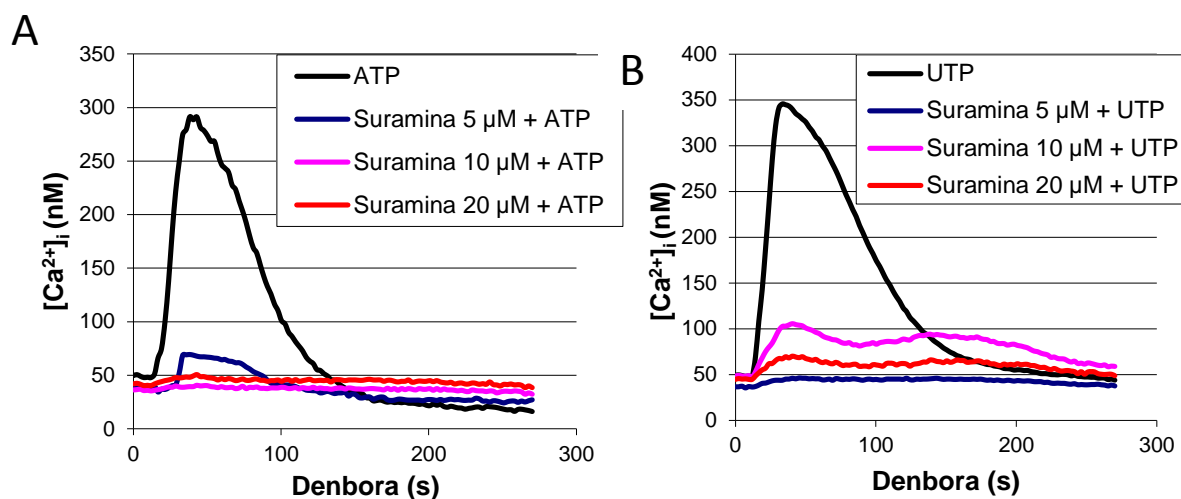
2. irudian behatu daitekeen moduan, egoera normalean Huh7 zelulen $[Ca^{2+}]_i$ intrazelularra 40 nM ingurukoa da. 100 μM ATP gehitzean $[Ca^{2+}]_i$ intrazelularra batez beste 220 nM ingurura igotzen da eta 0,75 μM UTP gehitzean, 200 nM ingurura.



2. irudia: Ca^{2+} kontzentrazio intrazelularren igoera ATP eta UTP kontzentrazio ezberdinetan. Neurketak hainbat ATP/UTP kontzentrazio ezberdinetan egin dira (ATP 5 μM eta 100 μM artean eta UTP 0,25 μM eta 100 μM artean). ATP/UTP kontzentrazio bakoitzarekin zitosoleko $[Ca^{2+}]_i$ -a nola aldatu den behatu da, irudi honetan kontzentrazio bakoitzak eragin duen zitosoleko $[Ca^{2+}]_i$ -aren igoera maximoa adierazten delarik. Kasu bakoitzerako hiru esperimentu independente egin dira (3 errepikapen), kasu bakoitzean 20 zelula aztertuz.

Suramina + ATP/UTP erabiliz egindako zinetikak:

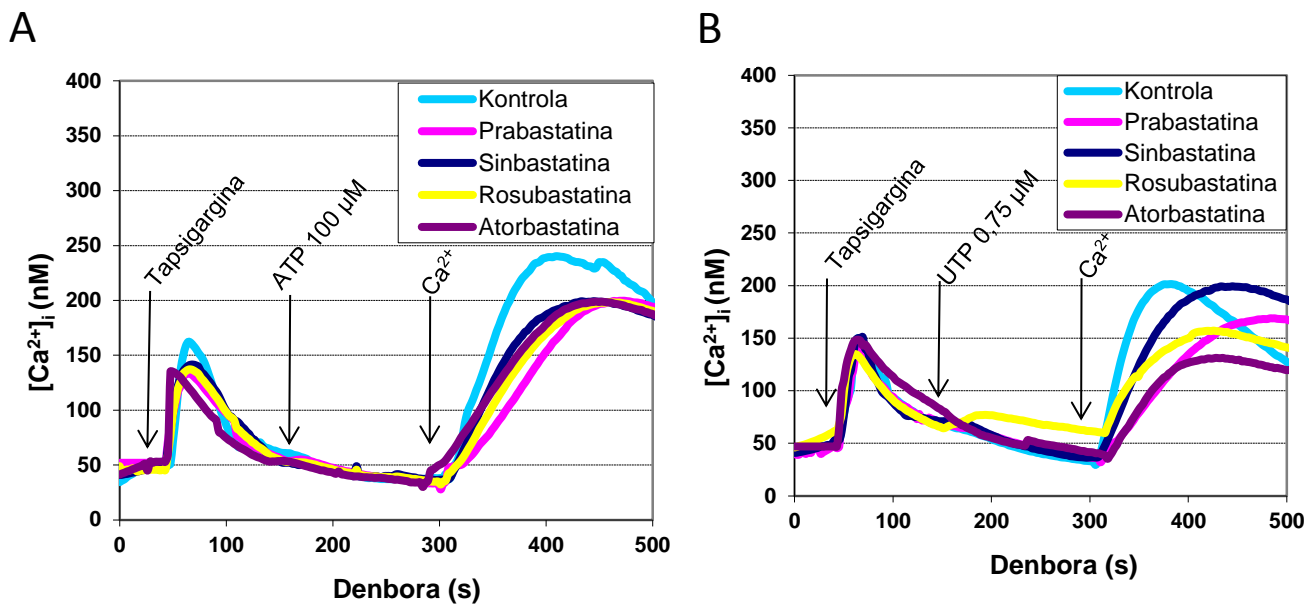
3. irudian ikus daitekeen moduan, suraminaren presentzian ATP edo UTP gehitzean, Ca^{2+} -aren mobilizazioa ekiditen da. Horrela, ATP edo UTP gehitzean Ca^{2+} -aren mobilizazioa eragiten dutenak P2Y_2 hartzaileak direla frogatu da.



3. irudia. ATP/UTP-k eragiten duten Ca^{2+} intrazelularraren mobilizazioa suraminaren presentzian, Huh7 zeluletan. A: Ca^{2+} intrazelularraren mobilizazioa, suraminaren presentzian ATP 100 μM gehitzean. Kontrol moduan ATP 100 μM gehitu da, suraminaren presentziarik gabe. B: Ca^{2+} intrazelularraren mobilizazioa, suraminaren presentzian UTP 0,75 μM gehitzean. Kontrol moduan UTP 0,75 μM gehitu da, suraminaren presentziarik gabe. Kasu bakoitzerako hiru esperimentu independente egin dira (3 errepikapen), kasu bakoitzean 20 zelula aztertu direlarik.

EGTA + tapsigargina + ATP/UTP + Ca^{2+} erabiliz egindako zinetikak, estatina ezberdinen presentzian:

Huh7 zelulak estatina ezberdinekin inkubatu ondoren, EGTA gehitu da zelulen mediora, Ca^{2+} intrazelularraren mobilizazioa soilik aztertzea baimenduz. Ondoren, zinetikak hasi eta lehenengo minutuan tapsigargina gehitu da, erretikulu endoplasmatikoko Ca^{2+} -a zitosolera atera dadin. 4. irudian ikusten den moduan, tapsigargina gehitzean Ca^{2+} -a zitosolera atera da. 3. minutuan ATP edo UTP gehitu da, eta ez du Ca^{2+} -aren mobilizaziorik eragin. Beraz, ATP/UTP gehitzean zitosolera ateratzen den Ca^{2+} -a erretikulu endoplasmatikokoa dela frogatu da. Zeluletako Ca^{2+} bonbek ondo funtzionatzen dutela ikusteko, 6. minutuan Ca^{2+} -a gehitu da zeluletara. 4. irudiari so eginez, medioan Ca^{2+} -a gehitzean zitosoleko $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -a igotzen dela ikusi da, Ca^{2+} bonbek ondo funtzionatzen dutela ondorioztatzen delarik.



4. irudia. ATP/UTP gehitzean Ca^{2+} -a erretikulu endoplasmatikotik ateratzen denaren eta zelulen mintzeko Ca^{2+} bonbek ondo funtzionatzen dutenaren frogapena. A: Zelulak estatina ezberdinekin inkubatu ondoren, zelulen mediora EGTA gehitu da; ondoren tapsigargina gehitu da, erretikulu endoplasmatikoko Ca^{2+} -a zitosolera atera dedin. 100 μM ATP gehitu eta zitosoleko $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -an eraginik duen ala ez aztertu da. 6. minutuan 2,4 mM Ca^{2+} gehitu da. B: Zelulak estatina ezberdinekin inkubatu ondoren, zelulen mediora EGTA gehitu da; ondoren tapsigargina gehitu da, erretikulu endoplasmatikoko Ca^{2+} -a zitosolera atera dedin. 0,75 μM UTP gehitu eta zitosoleko $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -an eraginik duen ala ez aztertu da. 6. minutuan 2,4 mM Ca^{2+} gehitu da. Kasu bakoitzerako hiru esperimentu independente egin dira (3 errepikapen), kasu bakoitzean 20 zelula aztertu direlarik.

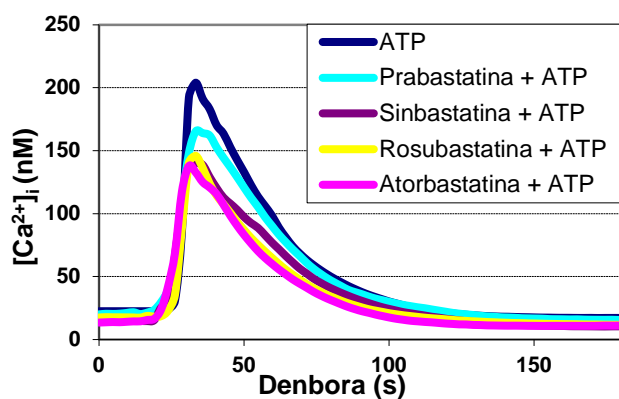
EGTA + ATP/UTP erabiliz egindako zinetikak, estatina ezberdinen presentzian:

Estatinek P2Y_2 hartzaileen gain dituzten efektuak aztertzeko asmoz, Huh7 zelulak estatina ezberdinekin inkubatu dira. Ondoren, EGTA gehitu da zelulen mediora, Ca^{2+} intrazelularren mobilizazioa soilik aztertzea baimenduz. Zinetikak hasi, eta estatina bakoitzaren presentzian ATP/UTP gehitzean gertatu den Ca^{2+} -aren mobilizazioa aztertu da.

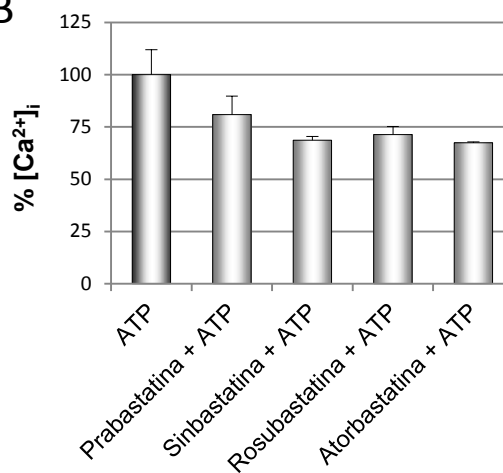
5-A irudian ATP-rekin egindako zinetikak ikus daitezke, zelulak estatina ezberdinekin inkubatu ondoren, eta kontrol moduan estatinekin inkubatu gabeko zelulak erabiliz. Estatina ezberdinekin egindako zinetikak kontrolarekin konparatuz, estatina bakoitzak $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intrazelularrean aldaketaren bat eragiten duen ala ez ikusi daiteke. Estatinen presentzian ATP gehitzean zitosoleko $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -a gutxiago igotzen dela ikusten da. 5-B irudian aztertu daitekeen moduan, estatinekin inkubatu gabeko zeluletan ATP gehitzean $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intrazelularra %100 igotzen dela kontsideratuz, zelulak prabastatinarekin inkubatzean $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intrazelularra %81 igotzen da; sinbastatinaren kasuan %69, rosubastatinaren kasuan %71 eta atorbastatinaren kasuan %67.

Behin ATP-ren efektua ikusita, UTP-ren efektua aztertu da. 5-C eta 5-D irudietan behatu daitezkeen moduan, zelulak prabastatinarekin inkubatzeko $[Ca^{2+}]_i$ intrazelularra %85 igotzen da; sinbastatinaren kasuan %80, rosubastatinaren kasuan %65 eta atorbastatinaren kasuan %69.

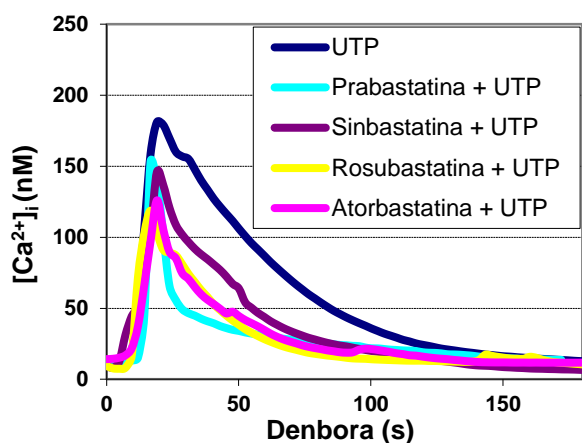
A



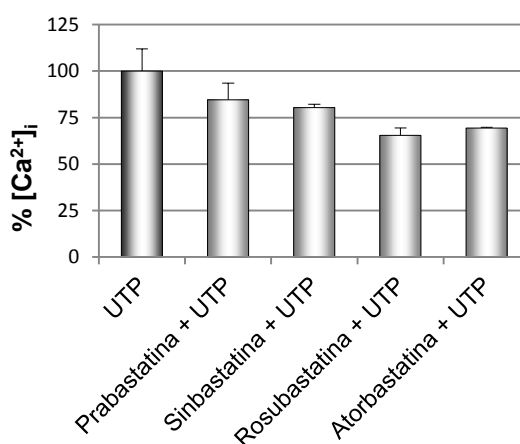
B



C



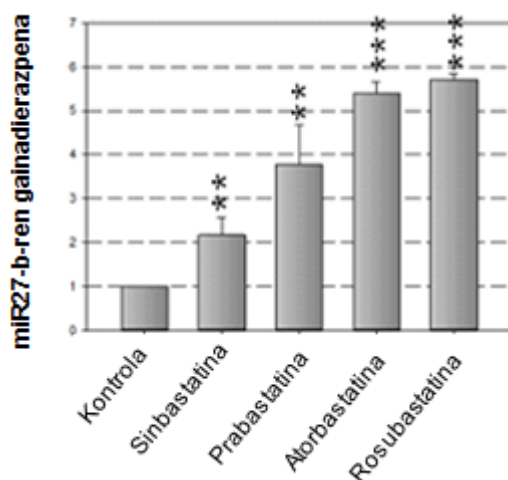
D



5. irudia. Estatinek Ca^{2+} intrazelularren mobilizazioan duten eragina. A: ATP 100 μM -ek eragindako Ca^{2+} intrazelularren mobilizazioa estatina ezberdinen presentzian, estatinekin inkubatu gabeko zelulak kontrol moduan erabiliz. B: ATP 100 μM -ek eragindako Ca^{2+} kontzentrazio intrazelularren igoera ehunekotan, estatina ezberdinen presentzian, estatinekin inkubatu gabeko zelulak kontrol moduan erabiliz. C: UTP 0,75 μM -ek eragindako Ca^{2+} intrazelularren mobilizazioa estatina ezberdinen presentzian, estatinekin inkubatu gabeko zelulak kontrol moduan erabiliz. D: UTP 0,75 μM -ek eragindako Ca^{2+} kontzentrazio intrazelularren igoera ehunekotan, estatina ezberdinen presentzian, estatinekin inkubatu gabeko zelulak kontrol moduan erabiliz. Kasu bakoitzerako hiru esperimentu independente egin dira (3 errepikapen), kasu bakoitzean 20 zelula aztertu direlarik.

B. miR-27b-ren qRT-PCR, estatina ezberdinen presentzian:

Huh7 zelulak estatina ezberdinekin inkubatu eta estatina bakoitzaren presentzian miR-27b-ren adierazpen maila neurtu da qRT-PCR bidez. 6. irudian ikusten den moduan, zelulak sinbastatinarekin tratatzean miR-27b maila 2,2 aldiz handiagoa da, estatinekin inkubatu gabeko zelulekin konparatuz. Zelulak prabastatinarekin tratatzean ordea, miR-27b maila 3,8 aldiz handiagoa da estatinekin inkubatu gabeko zelulekin konparatuz. Zelulak atorbastatina eta rosubastatinarekin tratatzean, miR-27b-ren gainadierazpen are eta handiagoa ematen da, miR-27b estatinekin inkubatu gabeko zeluletan baino 5,5 aldiz gehiago adierazten baita gutxi gorabehera.



6. irudia. miR-27b-ren gainadierazpena Huh7 zeluletan estatina ezberdinen presentzian. miR-27b-ren gainadierazpen maila kontrol negatibo batekin konparatuz kalkulatu da, hau da, estatinekin tratatu gabeko zelulekin konparatuz. Emaizten adierazgarritasuna adierazteko, T-Student-en bi isatseko proba erabili da. $p < 0,01$: ***; $p < 0,025$: **; $p < 0,05$: * estatinekin tratatu gabeko zelulekin konparatuz.

4. ONDORIOAK ETA EZTABAIDA:

Lan honetan estatinek $P2Y_2$ hartzailleengan duten eragina aztertu da Huh7 giza hepatokartzinomako zeluletan, estatinek eragiten duten kalte hepaticoa ulertzeko helburuz. $P2Y_2$ hartzailleak ATP eta UTP-ren hartzailleak direnez, bi nukleotido horiek erabili dira $P2Y_2$ hartzailleen aktibitatea aztertzeko. ATP eta UTP nukleotidoak $P2Y_2$ hartzailleetara lotzean, Ca^{2+} -a erretikulu endoplasmatikotik irteten da, zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioa igoz¹². Hori dela eta, estatinen efektua aztertzeko Huh7 zelulak estatina ezberdinekin inkubatu dira; ATP eta UTP gehitu eta zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioa neurtu da baldintza experimental ezberdinetan. Horrela, estatinek $P2Y_2$ hartzailleengan eraginik ote duten behatu da.

Zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioaren igoera ATP/UTP kontzentrazioen araberakoa da¹² eta P2Y_2 hartzaileen bidezkoa dela ondorioztatu da. Izan ere, neurketak ATP-rekin egiteaz gain, UTP-rekin ere egin dira. ATP-k P2Y_2 ez den beste hartzaile batzuk ere aktibatzen ditu, P2Y_{11} ¹⁰ eta P2X^{15} hartzaileak besteak beste. UTP ordea, P2Y_2 hartzaileekiko espezifikoa da, nahiz eta P2Y_2 hartzaileez gain P2Y_4 hartzaileak ere aktibatzen dituen¹⁰. Hala ere, hepatozitoetan P2Y_1 , P2Y_2 ¹⁶ eta P2X^{17} hartzaileak soilik agertzen dira. Beraz, hepatozitoetan ATP-k P2Y_2 eta P2X hartzaileak aktibatu ditzake, UTP-k P2Y_2 hartzaileak soilik aktibatu ditzakeen bitartean. Suramina erabiliz, hepatozitoetan ATP-k eragiten duen zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioaren igoera P2Y_2 hartzaileen bidezkoa dela ondorioztatu da. Suraminak P2Y hartzaile gehienak blokeatzen ditu, P2Y_4 hartzaileak izan ezik¹⁸; horrela, hepatozitoetan dauden P2Y_1 eta P2Y_2 hartzaileak blokeatzen ditu. Suraminaren presentzian ATP gehitzean, Ca^{2+} -aren mobilizazioa ekiditen da. Horrela, ATP gehitzean Ca^{2+} -aren mobilizazioa eragiten dutenak P2Y_2 hartzaileak direla frogatu da, UTP-rekin gertatzen den moduan.

P2Y_2 hartzaileen eraginez erretikulu endoplasmatikoko Ca^{2+} -a ateratzen da zitosolera. ATP eta UTP gehitzean Ca^{2+} -a benetan erretikulu endoplasmatikotik ateratzen dela frogatzeko, tapsigargina erabili da. Tapsigarginak erretikulu endoplasmatikoko Ca^{2+} -a kanporatzen du, zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioa igoz. Horrela, tapsigargina gehitzean Ca^{2+} -a zitosolera atera da; ATP/UTP gehitzean ordea, ez da zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioan aldaketarik ikusi¹². Beraz, ATP/UTP gehitzean Ca^{2+} -a erretikulu endoplasmatikotik ateratzen dela frogatu da.

Zelulako Ca^{2+} bonbek ondo funtzionatzen dutela baieztatzeko, zelulen mediora Ca^{2+} -a gehitu da, eta Ca^{2+} -a gehitzean zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioa igo egin da. Beraz, Ca^{2+} -a zeluletan modu egokian sartzen dela frogatu da, zeluletako Ca^{2+} bonbek modu egokian funtzionatzearen ondorioz.

Estatina ezberdinekin inkubatutako Huh7 zelulak eta estatinekin inkubatu gabeko Huh7 zelulak konparatzean, ondorio interesgarriak atera dira. Izan ere, ATP/UTP gehitu eta zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioa neurtzean, estatinekin inkubatutako Huh7 zelulek zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioaren igoera txikiagoa pairatzen dutela ikusi da. Zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioa estatina guztien presentzian gutxiagotzen den arren, estatina bakoitzaren eragina ezberdina da; atorbastatinak, sinbastatinak eta rosubastatinak prabastatinak baino eragin handiagoa dute. Datu horiek bat egiten dute datu klinikoekin; izan ere, hepatoxizitate gehien sortzen duen estatina atorbastatina dela ikusi da; sinbastatinak hepatoxizitate pixka bat gutxiago sortzen du eta hepatoxizitate gutxien sortzen duena prabastatina da¹⁹.

Honek adierazten du Huh7 zelulak estatinekin inkubatzean, P2Y_2 hartzaileak blokeatu egiten direla ala hartzaile gutxiago espresatzen direla, eta ondorioz, ATP/UTP kontzentrazio berdina gehitu arren,

estatinen presentzian zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioaren igoera ez dela horrenbestekoa. Honek zerikusia izan dezake estatinek eragiten duten kalte hepatikoarekin⁵; izan ere, estatinen presentzian P2Y_2 hartzailak blokeatu ala gutxiago espresatzen badira, zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioan gorabeherak egon daitezke. Ca^{2+} kontzentrazio intrazelularrak hainbat entzimen erregulazioan parte hartzen duenez, Ca^{2+} kontzentrazio intrazelularrean egon daitezkeen gorabeherak hepatozitoen funtzionamendu egokia baldintzatu dezakete.

Neurketa guzti horiekin, estatinek Huh7 zeluletan P2Y_2 hartzailak blokeatzen dituztela ala P2Y_2 hartzailen adierazpena gutxiagotzen dutela ondorioztatu da; hori dela eta, estatinen presentzian eta ATP edo UTP gehitzean, zitosoleko Ca^{2+} kontzentrazioaren igoera gutxiagotu egiten da. Hala ere, esperimentu gehiago egin beharko lirateke zelulak estatina kontzentrazio baxuagoetan inkubatuz; izan ere, nahiz eta estatinekin *in vitro* egiten diren esperimentu gehienetan 1-50 μM kontzentrazioak erabili, estatinek dosi terapeutikoetan giza serumean izan ohi duten kontzentrazioa 1-15 nM ingurukoa da, hepatozitoetan egon ohi den kontzentrazio zehatza ezezaguna den arren²⁰.

Estatinek P2Y_2 hartzailak blokeatzen dituzten ala P2Y_2 hartzailen adierazpena gutxiagotzen duten aztertzeko, estatina bakoitzaren presentzian Huh7 zeluletan dagoen miR-27b-ren adierazpen maila neurtu da. Estatinen presentzian Huh7 zeluletan miR-27b gehiago adierazten dela ikusi da, eragin gehiena atorbastatinak eta rosubastatinak dutelarik. Estatinen presentzian gertatzen den Ca^{2+} kontzentrazio intrazelularren jeitsiera eta miR-27b-ren gainadierazpena erlazionatuta egon daitezke, P2Y_2 hartzaila miR-27b-ren itua izatea posible delarik. miRWalk software-a²¹ erabiliz, P2Y_2 hartzaila miR-27b-ren itua dela ikusi da. Beraz, posible da estatinek Huh7 zeluletan miR-27b-ren adierazpena areagotzea, zelulen mintzean P2Y_2 hartzaila gutxiago adieraziz eta Ca^{2+} kontzentrazio intrazelularrean gorabeherak eraginez; gorabehera horiek hepatozitoen funtzionamendu egokia baldintzatu dezakete, estatinen albo ondorioekin zerikusia izan dezaketelarik.

5. BIBLIOGRAFIA:

1. Genest, J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**, 267–87 (2003).
2. Saxenhofer, H. & Weidmann, P. [HMG-CoA-reductase inhibitors: a new principle in the treatment of hypercholesterolemia]. *Ther. Umschau. Rev. thérapeutique* **47**, 509–13 (1990).
3. Alberts, A. W. Lovastatin and simvastatin--inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol biosynthesis. *Cardiology* **77 Suppl 4**, 14–21 (1990).
4. Jones, P. H. *et al.* Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR* Trial). *Am. J. Cardiol.* **92**, 152–60 (2003).

5. Hu, M., Cheung, B. M. Y. & Tomlinson, B. Safety of statins: an update. *Ther. Adv. drug Saf.* **3**, 133–44 (2012).
6. Zhao, W. & Zhao, S.-P. Different effects of statins on induction of diabetes mellitus: an experimental study. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 6211–23 (2015).
7. Sathasivam, S. Statin induced myotoxicity. *Eur. J. Intern. Med.* **23**, 317–24 (2012).
8. Thaning, P. *et al.* Attenuated purinergic receptor function in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **59**, 182–9 (2010).
9. Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I. & Weisman, G. A. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **452**, 552–62 (2006).
10. Jacobson, K. A. *et al.* Nucleotides Acting at P2Y Receptors: Connecting Structure and Function. *Mol. Pharmacol.* **88**, 220–30 (2015).
11. Keppens, S. The complex interaction of ATP and UTP with isolated hepatocytes. How many receptors? *Gen. Pharmacol.* **24**, 283–9 (1993).
12. Schöfl, C. *et al.* Regulation of cytosolic free calcium concentration by extracellular nucleotides in human hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **276**, G164–72 (1999).
13. Dickson, E. J., Falkenburger, B. H. & Hille, B. Quantitative properties and receptor reserve of the IP(3) and calcium branch of G(q)-coupled receptor signaling. *J. Gen. Physiol.* **141**, 521–35 (2013).
14. Kishore, B. K. *et al.* Targeting renal purinergic signalling for the treatment of lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus. *Acta Physiol. (Oxf)*. **214**, 176–88 (2015).
15. North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **82**, 1013–67 (2002).
16. Dixon, C. J., White, P. J., Hall, J. F., Kingston, S. & Boarder, M. R. Regulation of human hepatocytes by P2Y receptors: control of glycogen phosphorylase, Ca²⁺, and mitogen-activated protein kinases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **313**, 1305–13 (2005).
17. Fausther, M., Gonzales, E. & Dranoff, J. A. Role of purinergic P2X receptors in the control of liver homeostasis. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **1**, 341–348 (2012).
18. von Kügelgen, I. & Wetter, A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **362**, 310–23 (2000).
19. Perdices, E. V *et al.* Hepatotoxicity associated with statin use: analysis of the cases included in the Spanish Hepatotoxicity Registry. *Rev. española enfermedades Dig. organo Of. la Soc. Española Patol. Dig.* **106**, 246–54 (2014).
20. Björkhem-Bergman, L., Lindh, J. D. & Bergman, P. What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **72**, 164–5 (2011).
21. Dweep, H. & Gretz, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* **12**, 697 (2015).