

# **Kolesterolin esiintyminen ihmisen hermostollisissa syöpäsoluissa**

Reija Silvennoinen  
Pro gradu -tutkielma  
Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Solubiologia

## **Alkusanat**

Tämä pro gradu -työ on suoritettu Jyväskylän yliopistossa bio- ja ympäristötieteiden laitoksella, molekyyli­tunnistuksen kemiallisen biologian osastolla syksyn 2007 ja syksyn 2008 välisenä aikana. Osa työn kokeellisesta osuudesta suoritettiin Tampereen yliopiston solututkimuskeskuksessa ja lääketieteen laitoksella.

Haluan kiittää asiantuntevia ohjaajiani FT, dosentti Tuula Jalosta ja FM Kirsi Pakkasta saamastani ensiluokkaisesta ohjauksesta ja tuesta työn kaikissa vaiheissa. Myös laboratoriomestarit Pirjo Kauppinen ja Arja Mansikkaviita sekä kaikki minua auttaneet bio- ja ympäristötieteiden laitoksen henkilökunnan jäsenet ansaitsevat lämpimät kiitokset. Kiitän suuresti myös Jertta-Riina Sarkasta ja Heidi Teppolaa Tampereen yliopistossa suoritettuihin töihin liittyvästä avusta ja ohjauksesta.

Työn valmistumisen kannalta ensiarvoisen tärkeitä olivat myös opiskelutovereilta ja ystäviltä saamani kullanarvoiset neuvot sekä vanhempieni ja sisarusteni tarjoama kannustus ja tuki.

<b>Tekijä:</b>	Reija Silvennoinen
<b>Tutkielman nimi:</b>	Kolesterolin esiintyminen ihmisen hermostollisissa syöpäsoluissa
<b>English title:</b>	Occurrence of cholesterol in human neural cancer cells
<b>Päivämäärä:</b>	6.12.2008 <b>Sivumäärä:</b> 79
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
<b>Oppiaine:</b>	Solubiologia
<b>Tutkielman ohjaajat:</b>	FT, dosentti Tuula Jalonen ja FM Kirsi Pakkanen

---

**Tiivistelmä:** Aivojen kuivapainosta merkittävä osa on kolesterolia, jonka riittävä pitoisuus on edellytys muun muassa hermosolujen aksoniin myelinaatiolle ja toimivan synapsiverkoston kehitykselle. Tässä työssä SH-SY5Y neuroblastooma- ja U373-MG astrozytooma-soluja käytettiin malleina tutkittaessa kolesterolin sijoittumista ja toimintaa ihmisen hermostollisissa syöpäsoluissa. Kolesterolin sijoittumista havainnoidtiin fluoresoivan filipiinin sekä konfokaalimikroskopian avulla, ja solujen sisältämän kolesterolin määrä selvitettiin spektrofotometrisesti. Soluja erilaistettiin morfogeneisiin lukeutuvalla retinoidihapolla (RA). Lisäksi solujen kolesterolitasapainoa koeteltiin poistamalla kolesterolia soluista metyyli-beta-syklodekstriinillä (MBCD), estämällä solujen kolesterolisynteesi lovastatiinilla, tai lisäämällä kolesterolia solujen kasvuympäristöön. Käsittelyiden aiheuttamia muutoksia solujen morfologiassa ja elinkykyisyydessä selvitettiin faasikontrastimikroskopian sekä trypaanisinin- ja tuman Hoechst-värjäysten avulla.

RA erilaisti neuroblastooma-soluja ja sai ne kasvamaan morfologialtaan sekä neuronaalisiksi että hermotukisolun kaltaisiksi. Sen sijaan astrozytooma-soluissa RA:n erilaistava vaikutus jäi vähäiseksi. Yllättäen kolesterolisynteesiä hidastava lovastatiini muutti astrozytooma-solut morfologialtaan tähtimäisiksi. Tämän, yleensä aivojen patologiin tiloihin yhdistetyn morfologian muutoksen aiheutti todennäköisimmin kolesterolisynteesin sivutuotteina syntyvien, solun aktiinitukirangan säätelyyn osallistuvien isoprenoidien väheneminen soluissa. Käsittely RA:n ja lovastatiinin yhdistelmällä korosti morfologista erilaistumista molemmassa solulinjoissa ja aiheutti lisäksi apoptoosiin viittaavia muutoksia astrozytooma-solujen tumissa.

Astrozytooma-solut sisälsivät hieman neuroblastooma-soluja enemmän kolesterolia. Molemmassa solulinjoissa pääosa kolesterolista sijoittui tumaan ja erilaisiin vesikulaarisiin rakenteisiin tuman ympärille. Erilaistuminen, kolesterolisynteesin esto tai kolesterolin lisäys solujen kasvatusympäristöön eivät aiheuttaneet havaittavia muutoksia kolesterolin sijoittumisessa. Lysosomeihin liittyvän kalvoproteiini 2:n immunofluoresenssivärjäyksen perusteella käsittelet eivät aiheuttaneet myöskään kolesterolin kertymistä lysosomeihin, mikä kertoo solujen kyvystä ylläpitää kolesterolin kuljetus- ja kohdennusmekanismit myös muuttuvassa ympäristössä. Molemmat solulinjat näyttivät vastaavan kolesterolisynteesin estoon lisäämällä ulkopuolisen kolesterolin sisäänottoa, mikä ilmeni solujen kolesterolin kokonaismäärän kasvuna lovastatiini-käsittelyn seurauksena. Edes MBCD-käsittely ei selvästi vähentänyt solujen kokonaiskolesterolipitoisuutta, mutta aiheutti kolesterolin kasautumisen neuriteissa, mikä voi tarkoittaa, että solujen ulokkeita rajaava solukalvo on erityisen herkkä kolesterolitasapainon muutoksille.

Tutkimuksen tulokset antoivat viitteitä myös kolesterolin osuudesta myöhäisten endosomaalisten vesikkelien toimintaan ja SH-SY5Y-solujen kiinnittymiseen. Hydrofobinen amiini U18666A, lovastatiini ja RA muuttivat lysosomien kokoa ja sijoittumista erityisesti neuroblastooma-soluissa. Kolesterolin roolia solujen kiinnittymisessä tukivat puolestaan lamellipodeista löytyneet kolesterolikasaumat sekä polymeerasiketjureaktio-menetelmällä todettu kolesterolin ja lovastatiinin aiheuttama muutos neuroblastooma-solujen adheesiota välittävän ADAM23-geenin lähetti-RNA:n koossa.

Kokonaisuudessaan kolesterolilla näytti olevan dynaaminen tasapaino SH-SY5Y- ja U373-MG -soluissa. Kuitenkin kolesterolin biosynteesireitin toiminnan esto muutti erityisesti RA:lla käsiteltyjen neuraalisten syöpäsolujen toimintaedellytyksiä. Havainnot kannustavat selvittämään RA:sta ja lovastatiinista koostuvan yhdistelmälääkityksen mahdollisuuksia muun muassa hermoston syöpien hoidossa.

---

**Avainsanat:** Kolesteroli, aivot, morfologia, neuroblastooma, astrozytooma, lovastatiini, lysosomi

---

**Author:** Reija Silvennoinen  
**Title of thesis:** Occurrence of cholesterol in human neural cancer cells  
**Finnish title:** Kolesterolin esiintyminen ihmisen hermostollisissa syöpäsoluissa  
**Date:** 6.12.2008 **Pages:** 79

**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Cell Biology  
**Supervisors:** PhD Tuula Jalonen and M.Sc. Kirsi Pakkanen

---

**Abstract:**

Cholesterol is essential for brain development and synaptogenesis. Apart from supporting normal brain cell functions, cholesterol is a potent player in many neurodegenerative disorders. In this thesis the human SH-SY5Y neuroblastoma and U373-MG astrocytoma cell lines were used as models to study cholesterol localization in neuronal and glial tumour cells. The cells were induced to differentiate with retinoic acid (RA) for seven days, after which the cellular distribution of free cholesterol was visualized with sterol-binding fluorescent dye filipin and confocal microscopy. To disrupt the intracellular cholesterol homeostasis, the cells were grown in the presence of exogenous cholesterol, or cholesterol was depleted using methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MBCD) or cholesterol synthesis inhibitor lovastatin.

Based on the phase contrast microscopy observations, RA induced the differentiation of neuroblastoma cells into distinct neuronal and non-neuronal phenotypes but had little effect on astrocytoma cell morphology. The 48 hour lovastatin-treatment caused stellation of astrocytoma cells, a phenomenon usually observed after brain trauma. The differentiation seemed most prominent when the cells were treated simultaneously with RA and lovastatin. In addition, this drug combination induced apoptotic effects in the astrocytoma cells.

The amount of cholesterol was larger in the astrocytoma cells compared to the neuroblastoma cells. Nevertheless, filipin staining pattern was quite similar in both cell lines: most of the cholesterol was found inside and around the nucleus. Neither culturing the cells in the presence of exogenous cholesterol nor inhibiting cholesterol synthesis with lovastatin induced marked changes in the cholesterol distribution. Moreover, none of the treatments caused accumulation of cholesterol in late endosomal structures, which were visualized by immunofluorescence labeling of Lamp2-protein. This can be considered as an indication of active regulation and fast turnover rate of cholesterol. Further evidence supporting this view came from the observation that blocking the cholesterol biosynthetic pathway with lovastatin resulted in an increase in the amount of total cellular cholesterol. The MBCD had no profound effect on total amount of cholesterol, but it induced cholesterol aggregation in the long neurites of differentiated neuroblastoma cells, reflecting the importance of plasma membrane cholesterol balance in the formation and maintenance of neurites.

Cholesterol may also regulate movement or fusion events of late endosomes and lysosomes since lovastatin, RA and U18666A, a drug altering lysosomal cholesterol content, caused clustering of late endosomes and lysosomes in the neuroblastoma cells. Observations also support a role for cholesterol in neural cancer cell adhesion, as cholesterol was found in aggregates at potential focal adhesion sites. Furthermore, cholesterol and lovastatin treatments changed the expression of ADAM 23, a member of the disintegrin and metalloproteinase-family, earlier reported to mediate the adhesion of neuroblastoma cells.

All in all, the SH-SY5Y and U373-MG neural cancer cells are rich in cholesterol, which appears to be dynamically regulated in both cell lines. The contribution of the cholesterol biosynthetic pathway to cancer cell function, and the observed effect of lovastatin on the differentiated neuroblastoma and astrocytoma cells should encourage researchers to develop statin-based treatments for neural tumors and various neurodegenerative conditions.

---

**Keywords:** Cholesterol, brain, morphology, neuroblastoma, astrocytoma, lovastatin, lysosome

## Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	9
1.1 Solukalvon kolesteroli ja lipidilautat.....	10
1.2 Kolesterolin käsittely kudoksissa.....	11
1.2.1 Kolesterolia käsittelevät solut ohutsuolessa ja maksassa.....	11
1.2.2 Kolesteroli aivoissa.....	12
1.2.3 Kolesterolin merkitys aivosolujen toiminnalle ja rakenteelle.....	12
1.3 Kolesterolin solunsisäinen kuljetus.....	14
1.3.1 Kolesterolin valmistus ja kuljetus solukalvolle.....	15
1.3.2 Ulkopuolelta otetun kolesterolin endosomaalinen kuljetus soluissa.....	17
1.3.3 Kolesterolin poisto soluista.....	18
1.4 Kolesteroliaineenvaihdunnan säätely.....	19
1.5 Verenkierroelimistö, kolesteroli ja statiinit.....	20
1.6 Kolesterolin rooli sairauksissa.....	22
1.6.1 Kolesterolin käsittelyn geneettiset häiriöt.....	22
1.6.2 Kolesteroli ja keskushermoston sairaudet.....	23
1.6.3 Kolesterolin yhteys syöpään.....	24
1.6.4 Neuroblastooma- ja astrozytoma-kasvaimet ja kolesteroli.....	25
2. Tutkimuksen tarkoitus.....	27
3. Materiaalit ja menetelmät.....	28
3.1 Solulinjat.....	28
3.2 Solujen käsittelyt.....	28
3.3. Elinkykyisyystestit.....	29
3.4 Vapaan kolesterolin värjäys filipiinillä.....	29
3.5 Epäsuora immunofluoresenssivärjäys ja tumien Hoechst-värjäys.....	30
3.6 Solujen kolesterolipitoisuuden määrittäminen.....	31
3.7 BODIPY-kolesteroliesterin sisäänotto soluihin.....	32
3.8 RNA:n eristys ja käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktio (RT-PCR).....	32
3.9 Tilastolliset analyysit ja kuva-aineiston käsittely.....	33
4. Tulokset.....	35
4.1 Solujen morfologia.....	35

4.1.1 SH-SY5Y neuroblastooma-solut .....	35
4.1.2 U373-MG astrozytoma-solut .....	37
4.2 Solujen elinkykyisyys .....	39
4.2.1 SH-SY5Y neuroblastooma-solut .....	39
4.2.2 U373-MG astrozytoma-solut .....	40
4.3 Retinoidihapon ja lovastatiinin vaikutus U373-MG astrozytoma-solujen välimuotoisiin filamentteihin .....	41
4.4 Kolesterolin sijoittuminen .....	44
4.4.1 Kolesterolin sijoittuminen SH-SY5Y neuroblastooma-soluissa .....	44
4.4.2 Kolesterolin sijoittuminen U373-MG astrozytoma-soluissa .....	46
4.4.3 Lovastatiinin ja MBCD:n vaikutus kolesterolin sijoittumiseen SH-SY5Y neuroblastooma-solujen neuriteissa .....	46
4.5 Kolesterolin määrä .....	48
4.5.1 SH-SY5Y neuroblastooma-solut .....	48
4.5.2 U373-MG astrozytoma-solut .....	49
4.6 Kolesterolin sijoittuminen endosomaalisen reitin päätepisteeseen .....	49
4.6.1 Myöhäisten endosomien ja lysosomien sijainti .....	49
4.6.2 Kolesterolin sijoittuminen myöhäisiin endosomeihin ja lysosomeihin .....	51
4.6.3 U18666A:n vaikutus SH-SY5Y neuroblastooma-solujen lysosomeihin .....	51
4.7 Kolesteroliesterit SH-SY5Y-soluissa .....	53
4.8 ADAM 23:n ilmentyminen SH-SY5Y-soluissa .....	53
5. Tulosten tarkastelu .....	55
5.1 Retinoidihappo ja lovastatiini SH-SY5Y- ja U373-MG -solujen erilaistajina .....	55
5.1.1 Retinoidihapon vaikutus morfologiaan ja erilaistumiseen .....	55
5.1.2 Lovastatiinin vaikutus morfologiaan ja elinkykyisyyteen .....	56
5.1.3 Retinoidihapon ja lovastatiinin yhteisvaikutus .....	58
5.2 Kolesterolin sijoittuminen ja määrä SH-SY5Y- ja U373-MG -soluissa .....	59
5.2.1 Kolesterolin sijoittuminen solun keskiosiin sekä tumaan ja lamellipodeihin .....	59
5.2.2 Lovastatiinin ja retinoidihapon vaikutus kolesterolin määrään .....	61
5.2.3 MBCD:n vaikutus SH-SY5Y -solujen neuriteihin ja elinkykyisyyteen .....	63
5.3 Kolesterolin vaikutus SH-SY5Y -solujen endosomaalisiin vesikkeleihin .....	65
5.4 Kolesterolin vaikutus ADAM 23:n ilmentymiseen SH-SY5Y -soluissa .....	66

5.5 Yhteenveto: kolesteroli SH-SY5Y- ja U373-MG -soluissa.....	68
6. Lähdeluettelo .....	70

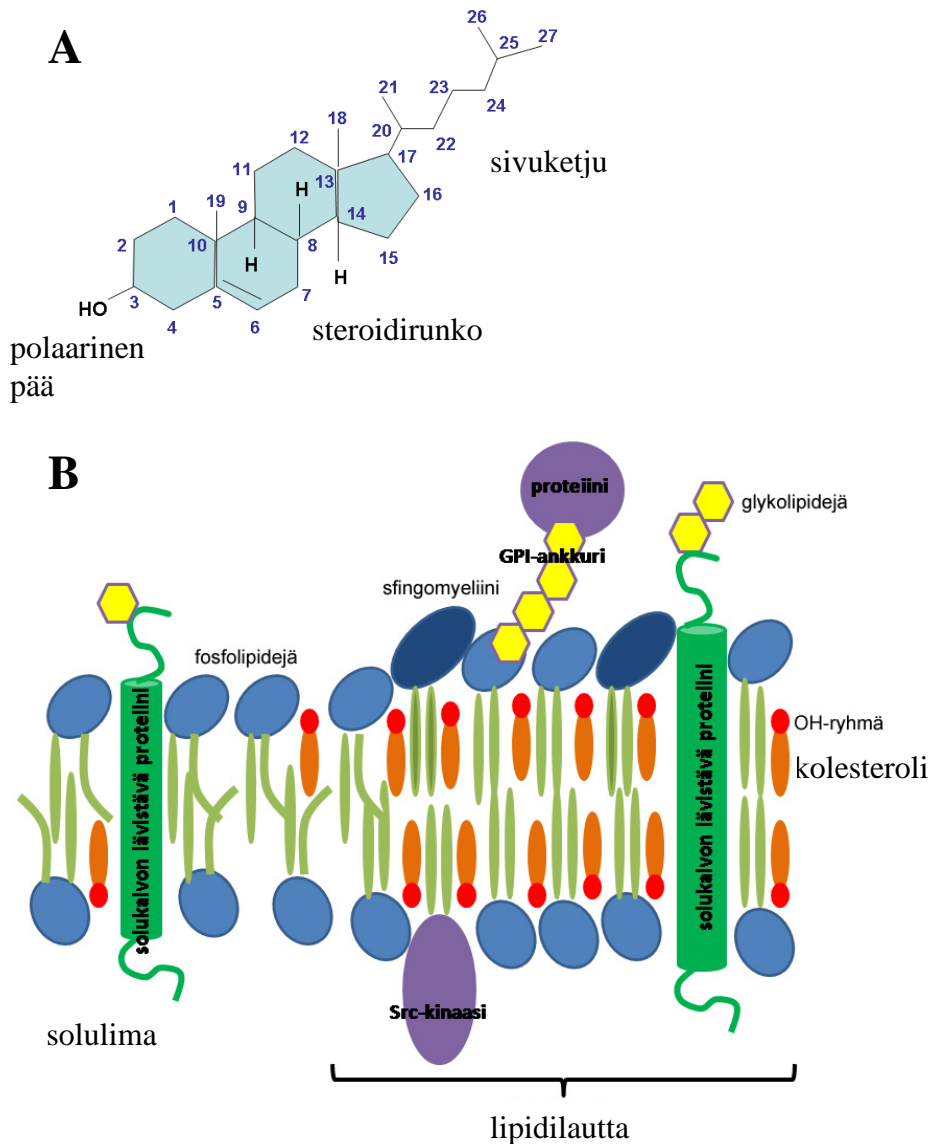
## Lyhenteet

ABC	ATP Binding Casette (ATP:tä sitova kuljettaja)
ACAT	assyli-koentsyymiA-kolesteroliasyyli transferaasi
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase, disintegrointi-metalloproteiinaasi
ATP	adenosiinitrifosfaatti
BSA	Bovine Serum Albumine, naudan seerumin albumiini
DRM	Detergent Resistant Membrane, detergenttejä kestävä kalvo
ER	Endoplasmic Reticulum, solulimakalvosto
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (gliasolujen säikeinen hapan proteiini)
HDL	High Density Lipoprotein (korkeatiheyksinen lipoproteiini)
HMG-KoA-reduktaasi	3-hydroksi-3-metyylyglutaryyli-koentsyymiA -reduktaasi
Lamp2	Lysosome associated membrane protein 2 (lysosomien kalvoproteiini 2)
LDL	Low Density Lipoprotein (matalatiheyksinen lipoproteiini)
LXR	Liver X Receptor, maksan X-reseptori
MBCD	metyyli-beta-syklodekstriini
MEM	Modified Eagle Medium
NPC	Niemann-Pick tyyppi C
PBS, PBS' A	Phosphate Buffered Saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PCR	Polymerase Chain Reaction, polymeraasiketjureaktio
PFA	paraformaldehydi
RA	retinoidihappo
RT-PCR	Reverse Transcriptase -PCR, käänteistranskriptaasi-PCR
RXR	Retinoid X-Receptor, retinoidi X reseptori
SCAP	SREBP Cleavage-Activating Protein (SREBP:tä säätelevä proteiini)
SR-BI	Scavenger Receptor BI (siivooja-reseptori BI)
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein (steroleja säätelevään elementtiin sitoutuva proteiini)
TBP	TATA-box Binding Protein, TATA-elementtiin sitoutuva proteiini
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (erittäin matalatiheyksinen lipoproteiini)



## 1. Johdanto

Kolesteroli on eläinsoluissa esiintyvä kalvolipidi, jonka runko koostuu neljästä toisiinsa liittyneestä hiilirenkaasta. Steroidirungon hiilessä 3 on kiinni hydroksyyli-ryhmä, hiilien 5 ja 6 välillä on kaksoissidos ja hiilessä 17 on kiinni iso-oktyyli-hiilivetyketju (Kuva 1A). Sivuketjua lukuun ottamatta kolesterolimolekyylin rakenne on jäykkä ja tasomainen.



**Kuva 1.** Kolesterolin rakenne ja sijoittuminen solukalvossa. A) Kolesterolin rakenne. B) Kolesterolin sijoittuminen solukalvolla ja lipidilautassa. Lipidilautoissa fosfo- ja sfingolipidien rasvahappoketjut (vaalean vihreä) ovat tyydyttyneitä ja suoraa, minkä seurauksena ne pakkautuvat tiiviisti. Lipidilautassa on runsaasti kolesterolia sekä GPI (glykosyyli-fosfatidyyli-inositoli) -ankkuroituneita proteiineja. Kuvattuna on myös solukalvon läpäiseviä proteiineja. Solukalvon lävistävän osan pituus ohjaa näiden proteiinien sijoittumista. Src-kinaasi on ankkuroitunut lipidilauttaan tyydyttyneillä rasvahappoketjuilla.

Kasveissa kolesterolia vastaavana sterolina toimii stigmasteroli ja hiivalla ergosteroli. Eläinsoluissa kolesterolia tarvitaan paitsi solukalvon ja muiden kalvorakenteiden rakenneosaksi, myös sappihappojen, lisääntymishormonien ja kortikosteroidien valmistukseen.

### 1.1 Solukalvon kolesteroli ja lipidilautat

Kalvolipidit kuuluvat kolmeen pääluokkaan: fosfolipideihin, sfingolipideihin ja steroleihin. Kolesteroli muodostaa solutyypistä riippuen noin kolmasosan solukalvon lipideistä (Lange ym., 1989). Kolesteroli jäykistää ja vahvistaa solukalvon rakennetta, vähentää sen juoksevuuutta ja vaikuttaa esimerkiksi polaaristen molekyylien kykyyn läpäistä solukalvo (Ks. yleiskatsaus Ohvo-Rekilä ym., 2002). Kolesterolimolekyylin vesihakuinen hydroksyyliiryhmä suuntautuu kohti kalvon ulkopintaa ja määrää siten lipidin asennon kaksoiskalvossa (Kuva 1B). Kolesterolin steroidirungon ja hiilivetyketjun metyyliiryhmät muodostavat pääasiassa heikkoja hydrofobisia ja van der Waalsin vuorovaikutuksia muiden kalvolipidien kanssa. Lipidien väliset vuorovaikutukset eivät ole tasavertaisia, mikä johtaa solukalvolla toisistaan poikkeavien lipidialueiden syntyyn. Fosfolipidien tyydyttyneet, suorat hiilivetyketjut pakkautuvat kalvon tasossa tiiviimmin kuin tyydyttymättömät hiilivetyketjut, jotka pystyvät taipumaan hiilten välisten kaksoissidosten ansiosta. Fosfolipidejä pienemmät, rungoltaan tasomaiset kolesterolimolekyylit täyttävät tehokkaasti suorien hiilivetyketjujen väliset tilat ja tiivistävät siten tyydyttyneiden lipidien pakkaantumista (Smaby ym., 1996; Samsonov ym., 2001 ja Kuva 1B).

Sfingomyeliinin, tyydyttyneen fosfatidyylikoliinin ja kolesterolin tiivis vuorovaikutus muodostaa pohjan myös lipidilautta-hypoteesille (Ks. yleiskatsaukset Simons ja Ikonen, 1997 sekä Brown ja London, 1998). Solun kalvoille muodostuvien lipidilauttojen uskotaan osallistuvan muun muassa signalointiin, soluadheesioon sekä lipidien ja proteiinien kalvoliikenteen säätelyyn. Solun kalvoilta voidaan eristää lipidilauttoja muistuttavia rakenteita käsittelemällä soluja matalassa lämpötilassa pintajännitystä alentavilla aineilla. Nämä detergenttejä kestävä kalvot (DRM, engl. *Detergent Resistant Membranes*) sisältävät myös proteiineja, jotka joko läpäisevät kalvon tai kiinnittyvät siihen erilaisilla lipidiankkureilla (Kuva 1B): glykosyyli-fosfatidyyli-

inositoli-molekyylit ankkuroivat proteiineja solukalvon ulommalle lehdelle, ja rasvahappoketjut, kuten myristiini- ja palmitiinihappo, kiinnittävät muun muassa Src-perheen tyrosiinikinaasit solukalvon sisemmälle lehdelle (Ks. yleiskatsaus Simon ja Ikonen, 1997). On huomattava, että eri olosuhteissa soluista eristettyjen DRM:ien koostumus voi vaihdella, eivätkä nämä rakenteet välttämättä vastaa elävien solujen kalvoilla esiintyviä lipidilautoja. Tiedeyhteisö ei myöskään ole yksimielinen lipidilautojen koosta, eliniästä tai biologisesta merkityksestä. Tässä tutkielmassa käytetty lipidilautta-termi viittaa tarkemmin erottelematta kaikkiin solukalvon pieniin, rajallisiin, runsaasti kolesterolia ja tyydyttyneitä fosfolipidejä sisältäviin alueisiin.

## 1.2 Kolesterolin käsittely kudoksissa

Elimistön keskimääräinen kolesterolipitoisuus on useimmilla lajeilla 2,2 mg/g kudosta. Hyvin runsaasti kolesterolia, hiirellä noin 10 mg/g, löytyy lisämunuaisista, joiden steroidihormoneja tuottavissa soluissa suurin osa kolesterolista on varastoituneena estereinä solulimaan. Keuhkoissa ja munuaisissa kolesterolia on lajista riippuen 4 - 5 mg/g ja lähes kaikissa muissa kudoksissa, myös koko kehon kolesteroliaineenvaihduntaa ohjaavassa maksassa, vain 1,5 - 4 mg/g kudosta. Näissä kudoksissa pääosa kolesterolista sijaitsee parenkyymisolukon solukalvoissa. Aivot ovat selvästi elimistön kolesterolirikkein elin, sillä ne sisältävät kolesterolia noin 15 - 20 mg/g. Huomattava osa aivojen kolesterolista sijaitsee hermosolujen aksoneita ympäröivässä myeliinissä (Ks. yleiskatsaus Dietschy ja Turley, 2004).

### 1.2.1 Kolesterolia käsittelevät solut ohutsuolessa ja maksassa

Veren lipoproteiinit huolehtivat ravinnosta saadun ja soluissa valmistetun kolesterolin oikeasta jakautumisesta kolesterolia eri määrien tuottavien ja käyttävien kudosten välillä. Lipoproteiinien sisältämät apolipoproteiinit säätelevät lipoproteiinien aineenvaihduntaa ja toimivat esimerkiksi solujen lipoproteiinireseptorien ligandeina.

Ravinnon sisältämä kolesterolia ja triglyseridit imeytyvät ohutsuolessa enterosyyttien apikaaliselta pinnalta soluihin. Enterosyytit kokoavat kolesteroliesterit ja triglyseridit apolipoproteiini B 48:n kanssa kylomikroneiksi. Lämpimitaltaan 100 - 200 nm:n kokoiset kylomikronit eritetään enterosyyttien basolateraalista pinnalta lymfateiden kautta vereen ja kuljetetaan lihas- rasva- ja maksakudoksiin. Lihas- ja rasvakudoksissa

kylomikroneiden triglyseridit käytetään energiaksi tai varastoidaan, jonka jälkeen jäljelle jääneet, runsaasti kolesteroliestereitä sisältävät jäännekylomikronit kuljetetaan maksaan.

Maksasolut erittävät kolesterolia sappeen sellaisenaan ja sappihapoiksi muunnettuna, tai valmistavat siitä apolipoproteiini B:n kanssa VLDL:ää (engl. *Very Low Density Lipoprotein*). Lämpimitaltaan 20 - 70 nm:n kokoiset VLDL-hiukkaset kypsyvät verenkierrossa LDL:ksi (engl. *Low Density Lipoprotein*), joka kuljettaa kolesterolia sitä tarvitseviin kudoksiin. Maksasolut voivat valmistaa myös apolipoproteiini A1:tä sisältäviä HDL-hiukkasia (engl. *High Density Lipoprotein*), jotka vastaanottavat kudoksista ylimääräistä kolesterolia ja kuljettavat sen takaisin maksasoluihin sappihappojen, tai steroideja valmistaviin kudoksiin steroidihormonien, raaka-aineeksi.

### 1.2.2 Kolesteroli aivoissa

Veri-aivoeste rajoittaa valikoivasti makromolekyylien vaihtoa aivojen ja muun elimistön verenkierron välillä. Veri-aivoesteen muodostavat aivojen hiusverisuonten endoteelisolut ja astrozyttien ulokkeet estävät muun muassa lipoproteiinien kulun hiusverisuonten seinämien läpi (Reese ja Karnovsky, 1967; ks. myös yleiskatsaus Wolburg ym., 2008). Tästä johtuen aivot ovat täysin paikallisen kolesterolisynteesin varassa. Kolesterolin kuljetus aivosolujen välillä tapahtuu ainoastaan aivoissa esiintyvien, HDL:ää muistuttavien lipoproteiinien ja näiden sisältämien tyyppien E, J ja D apolipoproteiinien avulla.

Astrozyttien uskotaan ohjaavan aivojen kolesteroliaineenvaihduntaa (Mauch ym., 2001; Gong ym., 2002). Myös hermosolut valmistavat runsaasti kolesterolia varsinkin aivojen kehityksen alkuvaiheessa. Tämän lisäksi kypsyvät hermosolut ovat riippuvaisia astrozyttien tuottamasta ja erittämästä kolesterolistä, jota tarvitaan muun muassa kasvavien aksonien ja dendriittien solukalvoihin sekä toimivan synapsiverkoston muodostamiseen (Jurevics ja Morell, 1995; Mauch ym., 2001; Göritz ym., 2005). Hermoston kehittyessä oligodendrosyytit tuottavat paikallisesti kaiken aksoneiden myelinaatioon tarvittavan kolesterolin (Saher ym., 2005).

### 1.2.3 Kolesterolin merkitys aivosolujen toiminnalle ja rakenteelle

Aktiopotentiaalien muodostuminen ja hermosignaalien eteneminen perustuu aksonien ionikanavien toimintaan. Hermosolujen aksoneissa on osoitettu olevan runsaasti kolesterolia sisältäviä lipidilauttoja (Ledesma ym., 1998), jotka voivat ohjata ionikanavien sijoittumista ja toimintaa. Esimerkiksi syklisten nukleotidien säätelemien ionikanavien

CNGA2-alayksiköiden on todettu sijoittuvan hajuhermosolujen lipidilauttoihin sekä rotan hajuepiteelissä että transfektoiduissa soluviljelmissä. Kun hajuhermosolujen solukalvon kolesterolipitoisuutta pienennetään, ionikanavien kyky sitoa ligandiaan heikkenee ja kanavien läpi kulkeva ionivirta pienenee (Brady ym., 2003).

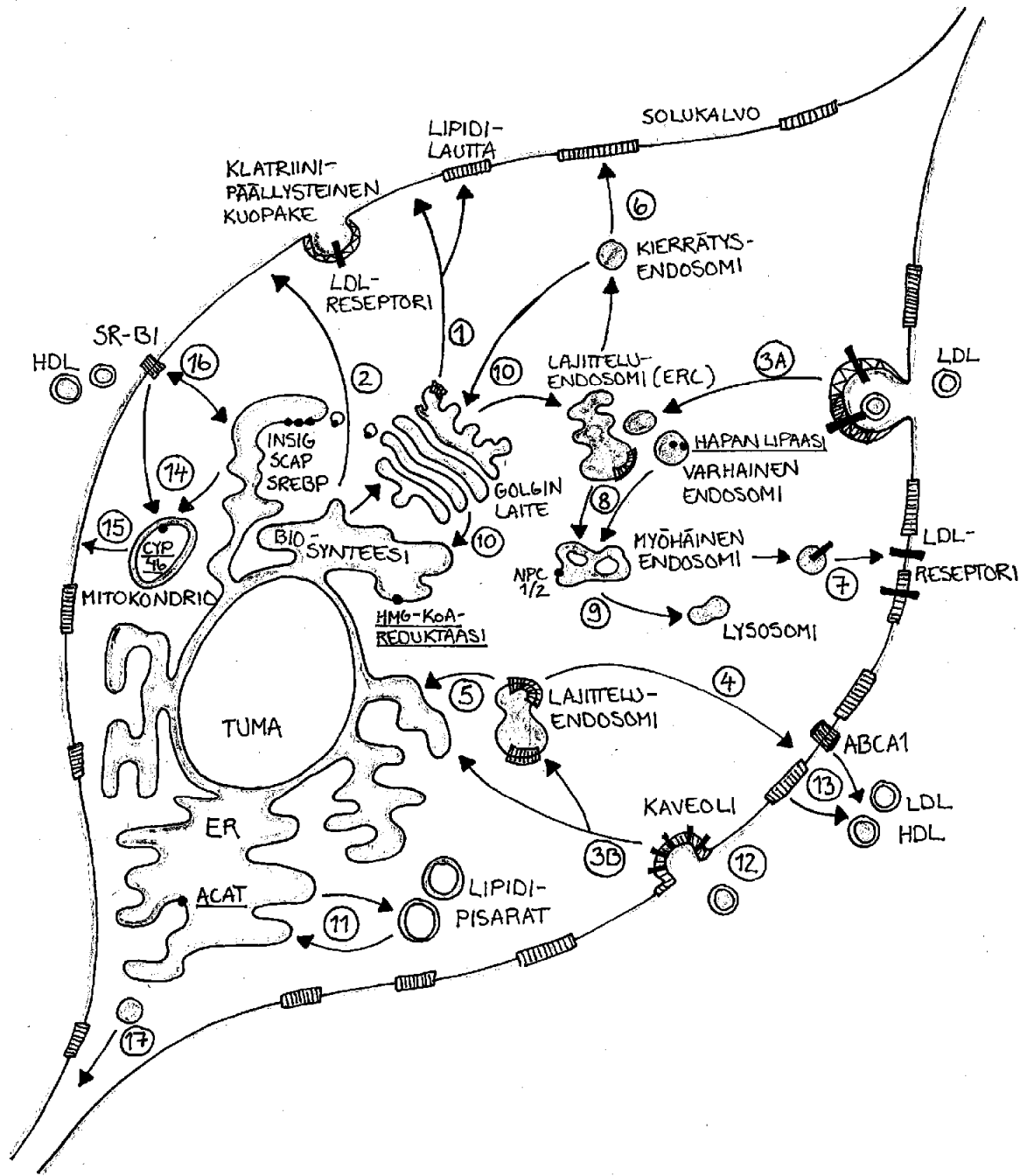
Suurin osa keskushermoston synapseista sijaitsee hermosolujen dendriittien okamaisissa ulokkeissa (engl. *dendritic spines*). Hippokampuksesta eristetyissä neuroneissa solukalvon kolesterolipitoisuuden alentaminen johtaa dendriittien okahaarakkeiden romahtamiseen. Myös syy ilmiöön on selvillä: okahaarakkeiden muotoa ylläpitävät aktiinifilamentit kiinnittyvät solukalvon runsaasti kolesteroli sisältäviin lipidilauttoihin (Hering ym., 2003).

Synapseissa solukalvon koostumus vaikuttaa herm välittäjäaineita sisältävien synaptisten vesikkelien kykyyn fuusioitua synapsirakoa rajaavaan kalvoon (vesikkelien eksosytoosi). Pre-synaptisen päätteen soluliman puoleisella kaksoiskalvon lehdellä on erityisen runsaasti kolesterolia (Igbavboa ym., 1997). Näillä kalvoilla kolesterolia sisältävien lipidilauttojen on osoitettu keräävän yhteen monia välittäjäainevesikkelien eksosytoosiin tarvittavia ja prosessia ohjaavia proteiineja (Jia ym., 2006). Post-synaptisella kalvolla kolesteroli ohjaa välittäjäainereseptorien, esimerkiksi AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroksi-5-metyyli-4-isoksatsolipropionihappo) -tyypin glutamaattireseptorien, sijoittumista. Kolesterolin väheneminen epävakauttaa erityisesti lipidilauttoihin liittyneitä AMPA-reseptoreja ja lisää niiden kierrätystä solunsisäisen varaston ja solun pinnan välillä (Hering ym., 2003).

Synaptisten välittäjäainevesikkelien kalvolla kolesteroli sitoo vesikkelien kierrätystä ohjaavaa synaptofysiiniä. Kolesterolin on havaittu lisäävän synaptofysiini-positiivisten vesikkelien määrää erilaistetuissa SH-SY5Y neuroblastooma-soluissa (Sarkanen ym., 2007). Edelleen kolesterolin vähennyksen on osoitettu pysäyttävän synaptisten kaltaisten vesikkelien (engl. *synaptic-like microvesicles*) valmistuksen neuroendokriinisissä PC-12 -soluissa (Thiele ym., 2000).

### 1.3 Kolesterolin solunsisäinen kuljetus

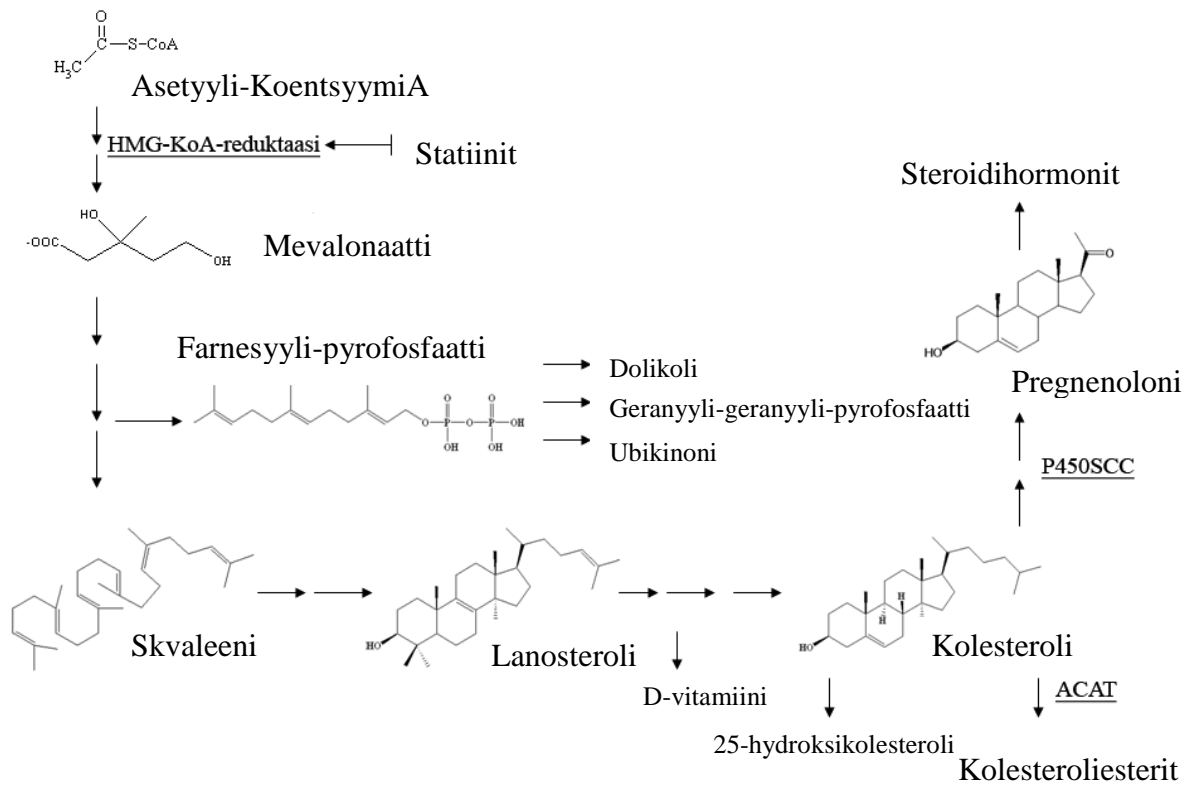
Aitotumalliset solut valmistavat kolesterolia solulimakalvostossa (ER, engl. *Endoplasmic Reticulum*) ja vastaanottavat kolesterolia myös veren lipoproteiineilta reseptorivälitteisellä endosytoosilla. Solussa kolesteroli kiertää jatkuvasti soluliman kalvorakenteiden ja solukalvon välillä (Slotte ym., 1987 ja Kuva 2).



**Kuva 2.** Kolesterolin kuljetus hermosolussa. Kolesterolin valmistuksen nopeuden määrää solulimakalvostossa (ER) sijaitseva 3-hydroksi-3-metyylyglutaryyli-koentsyymiA-reduktaasi (HMG-KoA-reduktaasi). Vastavalmistettu kolesterolia päätyy solukalvolle ja lipidilautoihin Golgin laitteen kautta (1) tai heikommin tunnettua, suoraa kuljetusreittiä pitkin (2). Solut ottavat lipoproteiineja sisään klatriini-päällysteisissä vesikkeleissä (3A). Endosomeissa hapan lipaasi hydrolysoi lipoproteiinien kolesteroliesterit vapaaksi kolesteroliksi, joka päätyy lajitteluendosomeihin (ERC, endosyyttinen lajitteluosasto, *endocytic recycling compartment*) (3A ja 3B). Kolesterolia voidaan lajitella kuljetettavaksi takaisin solukalvolle (4,6) tai ER:ään (5). LDL (*low density lipoprotein*) -reseptori palautetaan solukalvolle kierrätysendosomeissa (7). Lajitteluendosomeista kolesterolin kuljetus voi edetä myös myöhäisiin endosomeihin (8), joissa NPC (*Niemann-Pick type C*) -proteiinit poistavat suurimman osan kolesterolista ennen sen päätyä lysosomeihin (9). Kaiken aikaa Golgin laite välittää kolesterolin sijoittumista endosomien ja ER:n välillä (10). ER:ssä ylimääräinen kolesterolia voidaan esteröidä asyyli-koentsyymiA-kolesteroliasyyli transferaasin (ACAT) toimesta ja varastoida lipidipisaroiksi solulimaan (11). Kolesterolia päätyy soluihin myös kaveoleiden kautta (3B, 12). Ylimääräinen kolesterolia poistetaan soluista lipoproteiineille ABC (*ATP binding cassette*) -kuljettajien avulla (13). Kolesterolia voidaan käyttää muiden steroidien valmistukseen tai se voidaan hapettaa kolesterolia-24-hydroksylaasin (CYP46) avulla (14), jolloin syntyvät oksisterolit eritetään ulos solusta (15). Steroidihormonien valmistukseen käytettävä kolesterolia otetaan soluun SR-BI:n (*scavenger receptor BI*) välityksellä HDL:ltä (*high density lipoprotein*) (16). Hermosolun soomassa valmistettu kolesterolia täytyy kuljettaa aksoneiden ja dendriittien päissä sijaitseviin synapseihin (17). Kuvassa on esitetty myös kolesterolin säätelyyn osallistuvat SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*), SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) ja Insig-proteiinit. Runsaasti kolesterolia sisältävät lipidilautat on kuvattu solukalvon paksunnoksina. (Kuvassa esitetyt solun rakenteet eivät ole todellisessa mittakaavassa). Kuva perustuu yleiskatsaukseen Simons ja Ikonen, 2000.

### 1.3.1 Kolesterolin valmistus ja kuljetus solukalvolle

Kolesterolin synteesireitti on monivaiheinen ja siihen osallistuu yli 30 entsyymiä, joista osa on ankkuroitunut ER:n kalvolle (Reinhart ym., 1987). Kolesterolisynteesin nopeutta säätelevä entsyymi on 3-hydroksi-3-metyylyglutaryyli-koentsyymiA-reduktaasi (HMG-KoA-reduktaasi), joka katalysoi mevalonaatin muodostumista. Tätä seuraava kuuden entsyymattisen reaktion sarja johtaa triterpeenin skvaleenin syntyyn. Skvaleeni on kolesterolin lisäksi myös isoprenoidien esiaste. Kolesterolin valmistuksessa seuraava tärkeä välituote on lanosteroli. Kolesterolisynteesireitillä toimii takaisinkytkevä säätely: lanosterolin tai sen hapettuneiden muotojen suuri pitoisuus ER:ssä johtaa HMG-KoA-reduktaasin proteolyttiseen pilkkoutumiseen (Song ym., 2005; Lange ym., 2008). Lanosterolista syntyy useiden peräkkäisten demetylaatioiden ja kaksoissidosten pelkistyksen jälkeen kolesterolia. Soluissa kolesterolista voidaan edelleen valmistaa kolesteroliestereitä, hydroksyylikolesterolia tai steroidihormoneja (Kuva 3).



**Kuva 3.** Kolesterolin valmistus eläinsolussa sekä synteesireitin tärkeitä sivutuotteita. Entsyymit on alleviivattu: 3-hydroksi-3-metyyliglutaryyli-koentsyymiA-reduktaasi (HMG-KoA-reduktaasi), asyyli-koentsyymiA-kolesteroliasyyylitransferaasi (ACAT) ja P450 sivuketjun pilkkova entsyymi (P450SCC). Kuva perustuu yleiskatsaukseen Ikonen, 2008.

ER:n kolesterolipitoisuus on hyvin matala, mikä mahdollistaa reagoimisen pieniinkin muutoksiin lipidin määrässä. Matalan pitoisuuden ylläpito edellyttää kolesterolin tehokasta poistoa ER:ltä: vastasyntetisoidun kolesterolin on raportoitu saavuttavan solukalvon noin 20 - 30 minuutissa (Heino ym., 2000; Sugii ym., 2006). Lipidin kuljetukselle on kuvattu kaksi vaihtoehtoista reittiä. Pieni osa syntetisoidusta kolesterolista kulkeutuu ER:ltä vesikkeleissä Golgin laitteen *trans*-puolen kautta solukalvolle. Tätä reittiä käyttävä kolesteroli liittyy usein lipidilauttoihin, joiden kokoaminen saattaa alkaa jo ER:llä (Heino ym., 2000). Pääosa kolesterolista kuitenkin ohittaa Golgin laitteen ja päättyy solukalvolle toistaiseksi tuntemattomalla, ei-vesikulaarisella kuljetusmekanismilla (Baumann ym., 2005 ja Kuva 2).

Lähes kaikki tumalliset solut kykenevät valmistamaan kolesterolia lähtien vain muutamasta hiiliatomista koostuvasta asetaatista. Kolesterolin monimutkainen synteesireitti kuluttaa kuitenkin runsaasti energiaa ja vaatii useita, eri puolilla solua sijaitsevia entsyymejä. Tästä johtuen muun muassa sähköiseen viestinvälitykseen



erikoistuneiden hermosolujen on osoitettu suosivan energiaa tuhlaavan biosynteesin sijaan kolesterolin reseptorivälitteistä sisäänottoa (Fünfschilling ym., 2007).

### 1.3.2 Ulkopuolelta otetun kolesterolin endosomaalinen kuljetus soluissa

Reseptorivälitteisessä endosytoosissa solukalvolta kuroutuu proteiinipeitteisiä rakkuloita. Solussa rakkulat menettävät nopeasti proteiinipeitteen ja yhdistyvät, jolloin syntyy läpimitaltaan 50 - 100 nm:n kokoisia varhaisia endosomeja. Varhaisten endosomien sisältö lajitellaan ja kuljetetaan tarvittaessa myöhäisiin endosomeihin. Myöhäisten endosomien matala pH saa aikaan kuljetettavien molekyylien irtoamisen reseptoreistaan, jolloin reseptorit voidaan kierrättää takaisin solukalvolle. Happamin ympäristö vallitsee lysosomeissa, jotka ovat reseptorivälitteisen endosytoosin päätepaikkoja. Solun sisäänsä ottamia molekyyliä lajitellaan lisäksi erilaisissa endosyyttisissä kalvorakkuloissa, esimerkiksi monivesikkelisissä rakenteissa (engl. *multivesicular bodies*). Erilaiset lajittelukeskukset ja niiden sisäiset osat eroavat toisistaan paitsi pH:n, myös vesikkeleitä ympäröivän kalvon proteiini- ja lipidikoostumuksen suhteen.

LDL:n ja sen reseptorin sisäänotto on malliesimerkki klatrinivälitteisestä endosytoosista. Endosomin sisäisen pH:n lasku saa aikaan LDL:n irtoamisen reseptorista, joka kierrätetään nopeasti takaisin solukalvolle. Jäljelle jäänyt lipoproteiini hajotetaan ja sen sisältämät kolesteroliesterimolekyylit hydrolysoidaan vapaaksi kolesteroliksi pääasiassa myöhäisissä endosomeissa. Muun muassa kolesterolin hydrolyysistä vastaava hapan lipaasi -entsyymi toimii aktiivisesti jo varhaisissa endosomeissa (Sugii ym., 2003). LDL:ltä peräisin olevaa kolesterolia on todettu olevan runsaasti kierrätysendosomeissa sekä monivesikkelisissä rakenteissa, mutta hyvin vähän lysosomeissa (Hao ym., 2002; Möbius ym., 2003). Lysosomien kolesterolipitoisuus pysyy pienenä, sillä suurin osa kolesterolista poistuu myöhäisistä endosomeista NPC 1 ja NPC 2 (Niemann-Pick tyyppi C) -proteiinien välityksellä ennen lysosomeihin päätymistä (Kuva 2).

NPC-proteiinit sisältävät samanlaisen kolesterolia sitovan domeenin (engl. *sterol sensing domain*) kuin HMG-KoA-reduktaasi ja monet kolesteroliaineenvaihdunnan säätelyyn osallistuvat molekyylit (Ohgami ym., 2004). Vaikka NPC-proteiinien toimintaa ei tunneta yksityiskohtaisesti, on jo kauan tiedetty, että mutaatio näissä proteiineissa on syy Niemann-Pick-sairauden C-tyyppiin, jossa LDL:ltä peräisin oleva kolesteroli kertyy

sfgolipidien kanssa myöhäisiin endosomeihin ja häiritsee kolesterolin kuljetusta solussa (Liscum ja Faust, 1987; teVruchte ym., 2004).

Steroideja tuottavilla soluilla on jatkuva tarve kolesterolille, sillä kolesterolista valmistettuja steroidihormoneja ei varastoida soluihin. Steroidien muodostamiseen kykeneviä soluja löytyy ainakin lisämunuaisesta (adrenaliini ja muut steroidihormonit), kiveksistä ja munasarjoista (lisääntymishormonit) sekä aivoista (neurosteroidit). Rotan munasarjan granuloosisolut ottavat HDL:n kuljettamaa kolesteroliesteriä sisäänsä SR-BI-reseptorin (engl. *Scavenger Receptor BI*) kautta ja käyttävät tätä progestiinin valmistuksen pääasiallisena kolesterolin lähteenä (Reaven ym., 1995). SR-BI on ensimmäinen tunnistettu HDL:n reseptori solun pinnalla, mutta sen ligandeiksi kelpaavat myös muut lipoproteiinit. SR-BI:n aloittamaa kolesterolin kuljetusreittiä kutsutaan valikoivaksi reitiksi, sillä se ei vaadi kokonaisen lipoproteiinin ottoa solun sisään. HDL-lipoproteiineilta kaapatut kolesteroliesterit eivät myöskään käytä samaa endosomaalista kuljetusreittiä kuin LDL:ltä peräisin oleva kolesteroli (Reaven ym., 1995 ja Kuva 2).

### 1.3.3 Kolesterolin poisto soluista

Kolesteroli on liian suurina pitoisuuksina soluille haitallista, siksi sen poistoon on kehittynyt monta mekanismia. Kolesterolia esteröivän asyyli-koentsyymiA-kolesteroliasyyli transferaasin (ACAT) lisäksi tärkeimpiä solun kolesterolipitoisuutta alentavia molekyyliä ovat SR-BI, solukalvon ABC-kuljettajaproteiinit (engl. *ATP Binding Cassette transporters*) sekä kolesterolioksidien muodostumista katalysoivat entsyymit.

SR-BI välittää paitsi kolesteroliestereiden sisäänottoa, myös ylimääräisen kolesterolin siirtoa veren HDL:lle. Maksasolujen, makrofagien ja lisämunuaisen kuorikerroksen solujen on osoitettu ottavan SR-BI:tä ja kolesteroliköyhää HDL:ää sisäänsä endosytoosilla, lisäävän kolesterolia HDL:ään ja erittävän lipoproteiinia uudelleen noin seitsemän tunnin sisällä (Pagler ym., 2006). Kolesterolia poistavat soluista myös ABC-kuljettajat, jotka ovat moninkertaisesti kalvon läpäiseviä proteiineja (Kuva 2). ABCA1 sijoittuu soluissa paitsi solukalvolle myös varhaisiin ja myöhäisiin endosomeihin (Neufeld ym., 2001). ABCA1 sitoo apolipoproteiini A1:tä tai apolipoproteiini E:tä, jonka seurauksena kolesterolia siirtyy solukalvolta muodostamaan kiekkomaisia HDL-hiukkasia (Kim ym., 2007). Toinen ABC-perheen proteiini, ABCG1, osallistuu muodostuneiden HDL-hiukkasten kypsyttämiseen lisäämällä partikkeleihin lipidejä (Karten ym., 2006).

Myös solukalvon DRM:hin lukeutuvat kaveolit saattavat edistää kolesterolin poistoa toimimalla alustoina, jotka helpottavat kolesterolin siirtymistä soluilta lipoproteiineille (Frank ym., 2001; Storey ym., 2007).

Solut pystyvät hapettamaan kolesterolia, jolloin syntyy 24(S)-, 25- tai 27-hydroksyyli-kolesterolia. Hapetetut sterolit ovat kolesterolia polaarisempia ja pystyvät siksi kulkeutumaan spontaanisti ulos soluista solukalvon läpi (Björkhem ym., 1998 ja Kuva 2). Kolesterolia hapettavat entsyymit ovat mitokondrion kalvolla sijaitsevia sytokromi P450 -perheen proteiineja (Lund ym., 1999). Myös tärkeimmät eritettävien steroidihormonien valmistuksesta vastaavat entsyymit, esimerkiksi pregnenolonia tuottava P450 sivuketjun pilkkova entsyymi (engl. *P450 side chain cleavage enzyme*), sijaitsevat mitokondriossa. Maksasoluissa 7 $\alpha$ -hydroksylaasi katalysoi lisäksi kolesterolin hapetusta 7 $\alpha$ -hydroksyylikolesteroliksi, joka on tärkeä välituote sappihappojen valmistuksessa.

Kolesteroli-24-hydroksylaasi (CYP46) ilmentyy lähes yksinomaan keskushermostossa ja erityisesti neuroneissa (Lund ym., 1999). Kolesterolista syntyvä 24-hydroksyylikolesteroli päätyy suoraan veri-aivoesteen läpi verenkiertoon ja sieltä hajotettavaksi maksaan. Tämän mekanismin oletetaan olevan tärkein yksittäinen aivojen kolesterolipitoisuutta pienentävä tekijä (Björkhem ym., 1997 ja 1998). 24-hydroksyylikolesterolilla on myös tärkeä rooli aivojen kolesterolitasapainon ylläpidossa. Neuronien valmistama ja erittämä 24-hydroksyylikolesteroli lisää astrozyyteissä apolipoproteiini E:n ja ABCA1:n ilmentymistä ja tätä kautta kolesterolin eritystä aivojen lipoproteiineille (Liang ym., 2004; Abildayeva ym., 2006). Lipoproteiinien kuljettama kolesteroli on taas käytettävissä synapsien tai neuriittien muodostamiseen ja muokkaukseen neuroneissa.

#### 1.4 Kolesteroliaineenvaihdunnan säätely

Kolesteroliaineenvaihduntaa säätelevät SREB-proteiinit (engl. *Sterol Regulatory Element-Binding protein*), jotka ohjaavat kolesterolin ja rasvahappojen biosynteesiä sekä kolesterolin reseptorivälitteistä sisäänottoa. Kun solussa on runsaasti kolesterolia, SREBP on ankkuroituneena ER:lle kofaktorinsa SCAP:n (engl. *SREBP Cleavage-Activating Protein*) kanssa. SCAP sisältää kolesterolia sitovan domeenin ja reagoi solun alentuneeseen kolesterolipitoisuuteen edistämällä SREBP/SCAP-kompleksin vesikulaarista kuljetusta Golgin laitteeseen (Nohturfft ym., 1999). Golgin laitteessa SREBP:stä pilkotaan

kahdessa entsyymatisessa reaktiossa osa, joka siirtyy tumaan. Tumassa aktivoitunut transkriptiotekijä lisää esimerkiksi HMG-KoA-reduktaasin, LDL-reseptorin ja ACAT:n ilmentymistä. Kolesteroli estää näiden geenien luentaa sitoutumalla SCAP:iin, joka tämän seurauksena muodostaa yhdistymän Insig-proteiinin kanssa. Insig-proteiinin sitoma SCAP ei voi kuljettaa SREBP:tä Golgin laitteeseen, jossa transkriptiotekijänä toimiva osa pilkotaan (Radhakrishnan ym., 2007). Kolesteroliaineenvaihduntaa ohjaavat myös hapettuneet sterolit, jotka soluun kertyessään edistävät Insig-SCAP -yhdistymän syntyä ja lisäävät HMG-KoA-reduktaasin proteolyttistä pilkkoutumista (Lange ym., 2008).

Kolesteroliaineenvaihduntaa säätelee lisäksi kaksi tuman hormonireseptorien superperheeseen kuuluvaa jäsentä: maksan X-reseptori (LXR, engl. *Liver X Receptor*) ja retinoidi X-reseptori (RXR, engl. *Retinoid X Receptor*). Nämä proteiinit muodostavat toiminnallisen heterodimeerin, joka sitoutuu kohdegeenin promoottorissa sijaitsevaan LXR-reagoivaan elementtiin (engl. *LXR responsive element*) ja aktivoi geenin luennan. LXR- ja RXR-reseptorien ligandeja ovat retinoidit, hapettuneet lipoproteiinit ja sterolit, esimerkiksi 25-hydroksyylikolesteroli, jotka säätelevät LXR/RXR:n välityksellä muun muassa kolesterolia hapettavien entsyymien, apolipoproteiini E:n ja ABC-kuljettajien geenien ilmentymistä (Liang ym., 2004; Quinn ym., 2005; Abildayeva ym., 2006).

### 1.5 Verenkierroelimistö, kolesteroli ja statiinit

Veren kohonnut LDL-kolesterolipitoisuus altistaa valtimonkovettumataudille, joskaan kolesterolin osuus tapahtumissa ei ole yksiselitteinen. Oksidaatio-hypoteesin mukaan LDL:n kolesterolin ja proteiinosasten hapettuminen verisuonten seinämissä lisää LDL:n hallitsematonta fagosytoosia valtimon seinän makrofageihin. Hapettuneiden lipidien kertyminen makrofageihin saa ne muuttumaan vaahtosoluiksi, jotka yhdessä paikallisen tulehdusreaktion kanssa aloittavat valtimon tukkivan aterooman muodostamisen (Ylä-Herttuala ym., 1989; ks. myös yleiskatsaus Heinecke, 1998).

Koska veren korkea LDL-kolesterolipitoisuus lisää verisuonisairauksien riskiä, kohonnutta kolesterolipitoisuutta pyritään alentamaan statiineilla. Statiinien farmakologinen kohde-elin on maksa, jossa statiinit toimivat kolesterolin biosynteesin nopeutta määräävän entsyymien, HMG-KoA-reduktaasin, kilpailevina estäjinä (Istvan ja Deisenhofer, 2001 ja Kuva 1). HMG-KoA-reduktaasin toiminnan esto johtaa paitsi maksan kolesterolisynteesin hidastumiseen, myös LDL-reseptorin transkription lisääntymiseen,

mikä lisää LDL:n sisäänottoa maksasoluihin ja tehostaa veren kolesterolin alentumista (Salter ym., 1989).

Ensimmäinen HMG-KoA-reduktaasin estäjä, mevastatiini, eristettiin *Penicillium*-suvun sieniviljelmästä 1970-luvun alussa. Myöhemmin samankaltaisia yhdisteitä (lovastatiini) on eristetty *Aspergillus*-suvun sienistä (Endo ym., 1976). Kliinisessä käytössä on myös puolisynteettisiä lovastatiinin johdoksia (pravastatiini, simvastatiini) ja täysin synteettisiä statiineja (atorvastatiini, fluvastatiini). Lovastatiini koostuu heksahydronaftaleenirenkaasta sekä metyyliesteri- ja hydroksihapposivuketjuista, jotka voivat muodostaa laktonirenkaan. Lovastatiinin hydroksihapposivuketju matkii HMG-KoA-reduktaasin luonnollisen substraatin rakennetta. Lovastatiinin laktonimuoto on inaktiivinen aihiolääke, joka muuttuu biologisesti aktiiviseksi lääkemolekyyliksi, kun laktonirengas hydrolysoidaan maksasoluissa (Alberts ym., 1980).

Statiinit katkaisevat kolesterolisynteesireitin suhteellisen varhaisessa vaiheessa. Tämän takia statiineilla on veren kolesterolin alentamisen ohella myös monimuotoisia eli pleiotrooppisia vaikutuksia, jotka johtuvat kolesterolisynteesireitin välituotteiden tärkeistä fysiologisista rooleista. Mevalonaatista valmistetaan muun muassa isoprenoideja, jotka toimivat pienten monomeeristen G-proteiinien, kuten Ras:n ja Rho:n, lipidiankkureina (Roy ym., 1999; Cordle ym., 2005). Nämä signaalintimolekyylit ovat inaktiivisina solulimassa, mutta ankkuroituvat solukalvolle aktivoiduttuaan. Pienet G-proteiinit säätelevät muun muassa solusykliä, mitoosia, solutukirangan muutoksia ja solunsisäistä liikennettä. Muita kolesterolin valmistuksen tärkeitä sivutuotteita ovat mitokondrion elektroninsiirtoketjussa toimiva ubikinoni ja proteiinien glykosylaatiosta huolehtiva dolikoli (Kuva 3).

Statiinien ateroskleroosia estäviin pleiotrooppisiin vaikutuksiin kuuluvat tulehduksen hillitseminen, endoteelisolujen typpioksidituoton lisääminen ja sileälihassolujen lisääntymisen esto. Statiineilla on myös joitain suhteellisen harvinaisia haitallisia sivuvaikutuksia. Näihin kuuluvat lihasolujen vauriot sekä masennus ja unihäiriöt (Ks. yleiskatsaus De Angelis, 2004). Hermostolliset sivuvaikutukset antavat viitteitä kolesterolin tärkeästä roolista aivojen toiminnassa.

## 1.6 Kolesterolin rooli sairauksissa

Kolesterolin valmistusta, kuljetusta ja varastointia ohjaavien geenien mutaatiot aiheuttavat monia periytyviä sairauksia. Lisäksi kolesteroliaineenvaihdunnan häiriöt voivat olla osallisia monissa keskushermoston sairauksissa sekä syövän synnyssä.

### 1.6.1 Kolesterolin käsittelyn geneettiset häiriöt

Familiaalinen hyperkolesterolemia on yleisimmin LDL-reseptorin tai tämän ligandin, apolipoproteiini B:n, mutaatiosta johtuva, vallitsevasti periytyvä sairaus, jossa veren LDL-kolesterolitaso on pysyvästi suurentunut (Innerarity ym., 1987). Ilman lääkettä seurauksena on valtimonkovettumatauti jo varhaisessa iässä. Mutaatiot ihmisen ABCA1-geenissä aiheuttavat puolestaan Tangierin taudin, jolle tyypillinen löydös on veren erittäin pieni HDL-pitoisuus (Rust ym., 2000). Koska kolesteroli ei pääse siirtymään soluista ulos, taudille on ominaista kolesterolin kertyminen nielurisoihin, lymfosyytteihin sekä valtimoiden seinämien soluihin, mikä johtaa myös ateroskleroosin kehittymiseen (Clee ym., 2000).

Kolesterolin valmistuksen häiriöt ovat syynä ainakin seitsemään erilaiseen periytyvään sairauteen. Yleisin näistä sairauksista on Smith-Lemli-Opitz syndrooma, joka aiheutuu kolesterolin biosynteesin viimeistä reaktiota katalysoivan, 7-dehydrokolesteroli-7-reduktaasin puutoksesta. Syndroomasta johtuva kolesterolin puute ja 7-dehydrokolesterolin kertyminen soluissa voi aiheuttaa vakavia epämuodostumia ja henkistä jälkeenjääneisyyttä (Fitzky ym., 2001).

Kolesterolin varastoinnin ongelmat tulevat esiin muun muassa Wolmanin taudissa, jossa kolesteroliestereitä kertyy erityisesti lysosomeihin. Wolmannin tauti ja sen lievempi muoto, kolesteroliesterien varastointisairaus (engl. *cholesteryl ester storage disease*), aiheutuvat mutaatioista kolesteroliestereitä pilkkovan lysosomaalisen hapan lipaasi -entsyymin geenissä (Anderson ym., 1994). Kun soluihin lipoproteiinireseptorien välityksellä otettua kolesterolia ei voida hyödyntää, solujen toiminta vaikeutuu. Wolmanin taudin kliinisiin oireisiin lukeutuvat maksan laajentuminen, suoliston toiminnan häiriöt ja lisämunuaisten kalkkeutuminen. Sairaus johtaa usein potilaan kuolemaan ennen yhden vuoden ikää (Anderson ym., 1999).

### 1.6.2 Kolesterolin ja keskushermoston sairaudet

Kolesterolilla on kiistaton epidemiologinen yhteys sepelvaltimotautiin. Sen sijaan kolesterolin osuus aivojen patologiaan tiloisiin on paljon epäselvempi. Kolesterolia on esitetty osalliseksi muun muassa Alzheimerin, Parkinsonin ja Huntingtonin taudin syntyyn tai etenemiseen (DeLau ym., 2006; Leoni ym., 2008).

Parhaiten ymmärretty keskushermostoon vaikuttava kolesterolitasapainon häiriötila on Niemann-Pick sairauden C-tyyppi (NPC). Tämä autosomaalinen, resessiivisesti periytyvä sairaus aiheuttaa dementiaa sekä muita neurologisia oireita, ja johtaa usein kuolemaan varhaisessa iässä. NPC-potilaista eristetyissä soluissa ulkopuolelta otetun kolesterolin kuljetus pysähtyy myöhäisiin endosomeihin ja lysosomeihin. Koska kolesterolia ei pääse ER:lle, solujen kolesteroliaineenvaihdunnan säätely häiriintyy. NPC-fibroblasteille tyypillisiä piirteitä ovat LDL-reseptorin vaimennussäätelyn toimimattomuus, kolesterolin normaalia hitaampi esteröinti sekä tarpeettoman runsas kolesterolin valmistus (Liscum ja Faust, 1987). Hermosoluissa NPC1-proteiinin mutaatio estää erityisesti kolesterolin kuljetusta aksoneihin (Karten ym., 2002).

Toinen keskushermoston sairaus, jolla on havaittu vahva yhteys kolesteroliin, on Alzheimerin tauti. Tämä hermostonrappeumasairaus johtuu muun muassa myrkyllisten amyloidiplakkien kertymisestä, liiallisesta tau-proteiinin fosforylaatiosta ja aivokudoksen kroonisesta tulehduksesta. Kohonnut veren kolesterolipitoisuus voi lisätä Alzheimerin taudin riskiä, ja statiinien käytön on todettu pienentävän dementian todennäköisyyttä (Wolozin ym., 2000). Geneettinen Alzheimerin taudille altistava tekijä on lipidejä kuljettavan apolipoproteiini E:n alleeli 4, jonka on todettu lisäävän amyloidi-beta-peptidikertymien syntyä aivoissa (Dolev ja Michaelson, 2004). Apolipoproteiini E4:ää ilmentävissä astrosyyteissä tuotettu HDL ei ehkä kuljeta kolesterolia neuroneille yhtä tehokkaasti kuin muita apolipoproteiini E:n alleeleja sisältävät lipoproteiinit (Gong ym., 2002). Tämän lisäksi amyloidi-beta-esiasteproteiinin pilkkomisesta vastaavan gamma-sekretaasi-yhdistymä toimii aktiivisesti hermosolujen solukalvolla runsaasti kolesterolia sisältävissä lipidilautoissa (Urano ym., 2005; Hur ym., 2008). Edelleen solukalvon kolesterolin vähennyksen on huomattu lisäävän amyloidi-beta-esiasteproteiinin normaalia pilkkoutumista ja vähentävän soluille myrkyllisten amyloidi-beta-peptidien syntyä (Kojro ym., 2001).

### 1.6.3 Kolesterolin yhteys syöpään

On ehdotettu, että ylivilkas kolesteroliaineenvaihdunta voi olla syöpäsoluille tyypillinen ominaisuus. Käytännössä kokeelliset tulokset ovat kuitenkin osoittaneet, että solujen kolesteroliaineenvaihdunnan nopeus ja säätely vaihtelevat solulinjan ja syöpätyypin mukaan: Paksusuolen syöpäsoluissa on selvästi enemmän HMG-KoA-reduktaasia ja LDL-reseptoreja kuin terveissä suolen soluissa (Hentosh ym., 2001). Samoin leukemiasolujen on osoitettu paitsi valmistavan, myös ottavan normaaleja monosyyttejä enemmän kolesterolia ympäristöstään (Vitols ym., 1994). Näissä syöpäsoluissa ylivilkas kolesteroliaineenvaihdunta saattaa ainakin osaksi johtua kolesterolitasapainon takaisinkytkevän säätelyn heikosta toiminnasta. Tilanne voi kuitenkin olla päinvastainen esimerkiksi kohdunkaulan syöpäsoluissa, joissa LDL-reseptorin välityksellä tapahtuva kolesterolin sisäänotto on poikkeuksellisen hidasta (Gal ym., 1982). Syöpäsolut jakautuvat nopeasti ja tarvitsevat runsaasti kolesterolia solukalvojen valmistukseen. Solukalvon lipidien valmistuksen ja solun jakautumisnopeuden säätelyllä on havaittu yhteys ainakin CHO (engl. *Chinese Hamster Ovary*) -syöpäsoluissa, joissa fosfatidyylinositoli-3-kinaasi/Akt -signaalintireitin eston on havaittu pysäyttävän SREBP:n kuljetuksen ER:n ja Golgin laitteen välillä. Solun jakautumista säätelevän signaalintireitin aktivoituminen saattaa siis suoraan säädellä solukalvon lipidien synteesinopeutta (Du ym., 2006).

Kolesteroliaineenvaihdunnan häiriöt voivat olla myös osallisena syövän synnyssä, sillä kolesterolin tiedetään epäsuorasti vaikuttavan monen karsinogeneesiin liittyvän signaalireitin toimintaan. Solun kolesterolipitoisuus saattaa muovata esimerkiksi Hedgehog-reseptorikompleksin toimintaa, sillä Hedgehog sitoo kovalenttisesti kolesterolia ja sijoittuu Patched ja Smoothed -reseptoreidensa kanssa solukalvolla runsaasti kolesterolia ja kaveoliinia sisältäville alueille (Karpen ym., 2001). Todisteita on löytynyt myös kolesterolin kyvystä säädellä Ras-proteiineja: Roy ynnä muut (1999) havaitsivat H-Ras ja K-Ras-proteiinien sisältävän erilaiset lipidiankkurit, ja sijoittuvan tämän seurauksena valikoivasti solukalvon lipidilauttoihin tai näiden ulkopuolelle. Kaveoliinin mutatoinnin ja kolesterolin vähennyksen havaittiin estävän lipidilauttoihin liittyvää H-Ras-proteiinia aktivoimasta Raf-signaalinvälittäjää. Vastaavasti kolesterolin lisäys solukalvolle johti Ras-signaloinnin lisääntymiseen (Roy ym., 1999).



#### 1.6.4 Neuroblastooma- ja astrozytooma-kasvaimet ja kolesteroli

Neuroblastooma on erityisesti lasten ja nuorten sympaattisen hermoston kasvain, joka saa yleisimmin alkunsa lisämunuaisten ydinkerroksessa tai selkäytimessä. SH-SY5Y on kolmas alaklioni 1970-luvulla ihmisen luuytimen neuroblastoomasta eristetystä SK-N-SH-solulinjasta (Biedler ym., 1973 ja 1978). SH-SY5Y-solulinja koostuu solutyypeistä, jotka eroavat toisistaan muun muassa morfologiansa sekä sähköfysiologisten ja adheesio-ominaisuuksiensa perusteella (Walton ym., 2004; Biagiotti ym., 2006; Marzi ym., 2007; Roiha, 2008). N-tyypin (engl. *Neuronal*) solut ovat muun muassa noradrenaliinia tuottavia neuroblasteja. Soluilla on suuri tuma, vähän solulimaa ja ne kasvattavat spontaanisti lyhyitä neuriiitteja. N-tyypin solut kiinnittyvät tiukasti toisiinsa ja kasvavat heikosti alustaan tarttuvina ryppäinä. S-tyypin (engl. *Substrate adherent*) solut ovat tyypiltään epiteelimäisiä ja niillä on useita Schwannin soluille ja muille hermotukisoluille tyypillisiä ominaisuuksia. S-tyypin solut ovat suuria ja ohuita ja kasvavat tiukasti kiinni alustassaan (Biagiotti ym., 2006; Marzi ym., 2007). Sekä N- että S-tyypin neuroblastooma-solut ovat erilaistuneet kasvaimen kantasoluista. Vilkkaasti jakautuvia SH-SY5Y-solulinjan kantasoluja on luonnehdittu myös välimuotoisiksi I-tyypin (engl. *Intermediate*) soluiksi, sillä niissä on piirteitä sekä N- että S-tyypin soluista (Walton ym., 2004).

SH-SY5Y neuroblastooma-solujen kykyä käsitellä kolesterolia on tutkittu jonkin verran, mutta kokonaiskuva solujen kolesteroliaineenvaihdunnan piirteistä puuttuu. SH-SY5Y-solujen tiedetään valmistavan nopeasti ja tehokkaasti kolesterolia asetaatista, mutta sisältävän kokonaisuudessaan vähemmän valmista sterolia kuin fibroblasti-tyyppiset solut (Pörn ja Slotte, 1990). SH-SY5Y-solulinjaa on usein käytetty hermosolumallina tutkittaessa amyloidiplakkien ja kolesterolin roolia Alzheimerin taudin etenemisessä (Famer ja Crisby, 2004; Cole ym., 2005; Cecchi ym., 2008).

Astrozyttien muodostamat kasvaimet kattavat noin 60 % kaikista aikuisilla esiintyvistä aivokasvaimista. Astrozytoomat saavat usein alkunsa pikkuaivoissa tai selkäytimessä. Astrozytoomat ja vielä pahanlaatuisemmat glioblastoomat ovat yleisyydestään huolimatta heikosti luokiteltuja. Kasvaimia muodostavat solut voidaan jaotella karkeasti kolmeen tyyppiin: glioblastoomiin, gliosarkoomiin ja jättilis-glioblastoomiin (Ks. yleiskatsaus Miller ja Perry, 2007).

U373-MG astrozytooma-glioblastooma-solut edustavat kahta morfologiatyyppiä: Valtaosa soluista on pieniä, fibroblasteja muistuttavia, säikeisiä soluja, joilla on muutamia

ulokkeita. Lisäksi solulinjassa saattaa esiintyä monitumaisia jättisoluja, joiden alkuperä on epävarma. Astrocytooma-solut ovat myös kolesteroliaineenvaihduntansa suhteen neuroblastooma-soluja heikommin tunnettuja. U373-MG -solujen on osoitettu sisältävän ainakin LDL-reseptoreja ja kolesterolin biosynteesin avainentsyymiä, HMG-KoA-reduktaasia (Kikuchi ym., 1997). Yleisesti primaarisia astrocyyttejä ja astrocytooma-syöpäsolulinjoja vertailemalla on todettu, että astrocytooma-solut ovat saattaneet menettää eräitä astrocyteille tyypillisiä kolesterolin käsittelyä ohjaavia mekanismeja. Ainakin GA-1 astrocytooma-soluissa kolesterolisynteesi on astrocyytteihin verrattuna hitaampaa ja heikommin säädeltyä. Nämä syöpäsolut myös erittävät normaaleihin soluihin verrattuna runsaammin kolesterolia sisältäviä HDL-hiukkasia (Ito ym., 1999; Zhang ym., 2000).

## 2. Tutkimuksen tarkoitus

Riittävä kolesterolipitoisuus on edellytys hermoston toimintakyvylle. Aivojen kolesterolitasapaino riippuu hermosolujen ja hermotukisolujen keskinäisestä vuorovaikutuksesta, ja kolesterolitasapainon häiriöt voivat johtaa hermoston patologiaan tiloihin. Lovastatiini on laajassa kliinisessä käytössä oleva veren kolesterolia alentava lääke, jonka vaikutusta syöpäkasvaimiin on viime aikoina tutkittu tiiviisti. Useat selvitykset osoittavat, että kolesterolin biosynteettinen reitti on keskeinen syöpäsolujen toiminnalle. U18666A puolestaan on hydrofobinen amiini, jonka vaikutus jäljittelee hermostoon keskeisesti vaikuttavaan NPC-sairauteen liittyvää kolesterolin kertymistä lysosomeihin.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli

1. Havainnoida, missä kolesterolia sijaitsee SH-SY5Y neuroblastooma- ja U373-MG astrocytoma-soluissa, ja muuttuuko kolesterolin sijoittuminen tai määrä solujen erilaistuessa retinoidihapon vaikutuksesta.
2. Selvittää kyseisten syöpäsolujen kykyä käsitellä ylimääräistä kolesterolia ja toisaalta tutkia solujen kykyä selvitä tilanteesta, jossa kolesterolia on poistettu soluista. Kolesterolin määrä vähennettiin käsittelemällä soluja kolesterolisynteesiä estävällä lovastatiinilla sekä solukalvolta kolesterolia poistavalla metyyli-beta-syklodekstriinillä.
3. Tutkia, miten solun kolesteroliliikennettä häiritsevä U18666A vaikuttaa kolesterolin sijoittumiseen neuroblastooma- ja astrocytoma-solujen lysosomeihin.
4. Selvittää, vaikuttavatko kolesterolia muokkaavat käsittelyt muun muassa solujen kiinnittymistä välittävän ADAM 23:n ilmentymiseen neuroblastooma-soluissa.

### 3. Materiaalit ja menetelmät

#### 3.1 Solulinjat

Tutkimuksessa käytettiin kahta hermostollista syöpäsolulinjaa: SH-SY5Y-soluja (ihmisen neuroblastooma-solulinja, American Type Culture Collection, Manassas VA, USA) ja U373-MG -soluja (ihmisen astrozytooma-solulinja, European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, UK). Molemmat solulinjat oli saatu lahjoituksena Tampereen yliopiston Solubiologian ja Ympäristötoksikologian laitoksilta.

SH-SY5Y-soluja kasvatettiin mediumissa, joka koostui 1:1 MEM (Modified Eagle Medium) ja F-12 Kaighn's Nutrient mixture -kasvatusmedieista (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Mediumiin lisättiin 10 % loppupitoisuuteen vasikan sikiön seerumia (Fetal Bovine Serum, PAA Laboratories, Basching, Itävalta) sekä 1mM L-glutamiinia (Gibco Invitrogen), 0,5 % aminohapposeosta (MEM Non Essential Amino Acids, PAA Laboratories) ja 1 % antibioottiseosta (Antibiotic/antimycotic solution, PAA Laboratories). Antibioottien loppupitoisuudet mediumissa olivat 10 U/ml penisilliiniä, 0,1 mg/ml streptomysiinisulfaattia ja 0,25 µg/ml amfoterisiiniä.

U373-MG -soluja kasvatettiin MEM-kasvatusmediumissa (Gibco Invitrogen), johon lisättiin 10 % loppupitoisuuteen vasikan sikiön seerumia (PAA Laboratories), 2 mM L-glutamiinia (Gibco Invitrogen), 1 mM natrium-pyruvaattia (Fluka, Buchs, Sveitsi), 1 % aminohapposeosta (PAA Laboratories) ja 1 % antibioottiseosta (PAA Laboratories). Molempia solulinjoja kasvatettiin +37 °C lämpötilassa inkubaattorissa, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5 %.

#### 3.2 Solujen käsittelyt

Soluja erilaistettiin seitsemän päivän ajan lisäämällä mediumiin retinoidihappoa (RA, Retinoic Acid all-*trans* isomer, MP Biomedicals, Solon, USA) 5 µM loppupitoisuuteen. Osaa soluista käsiteltiin seitsemän päivän kasvatuksen ajan myös 10 µg/ml kolesterolilla (3β-hydroksi-5-kolesteeni, Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Nämä käsittelyt perustuvat SH-SY5Y neuroblastooma-solujen erilaistamiseen aiemmin kehitettyyn menetelmään (Sarkanen ym., 2007). Lovastatiinia ([8-[2-(4-hydroksi-6-okso-oksaani-2-yyli)etyyli]-3,7-dimetyyli-1,2,3,7,8,8a-heksahydronaftaleeni-1-yyli]2-metyyli)butanoaatti, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) lisättiin soluille 0,8 µM loppupitoisuuteen 48

tunniksi, ja U18666A:ta (3b-[2-(dietyylilamino)etoksi]-androst-5-en-17-oni-monohydrokloridi, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) 0,5 µg/ml loppupitoisuuteen 18 tunnin ajaksi. Kaikkien edellä mainittujen aineiden kantaliuokset valmistettiin puhtaaseen etanoliin (96 % w/v), ja kontrollisoluille lisättiin etanolia 0,25 % loppupitoisuuteen. Beta-syklodekstriinit ovat glukoosimonomeereistä koostuvia syklisiä polymeerejä. Kolesterolin poistoon solukalvoilta käytettiin metyyli-beta-syklodekstriiniä (MBCD, Sigma), joka liuotettiin mediumiin 5 mM loppupitoisuuteen. Soluja käsiteltiin MBCD:tä sisältävällä mediumilla 30 minuuttia (+37 °C).

### 3.3. Elinkykyisyystestit

Trypaanisinen (engl. *trypan blue*,  $C_{34}H_{23}N_6O_{14}S_4Na_4$ ) on diatsoväri (tolueenin johdannainen, Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze, Saksa), joka läpäisee kuolleen tai vahingoittuneen solun solukalvon ja värjää soluliman siniseksi. Elinkykyisyystestejä varten soluja siirrostettiin halkaisijaltaan 3,5 cm:n kokoisille maljoille (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA ja Sarstedt, Nümbrecht, Saksa), kasvatettiin seitsemän vuorokautta ja käsiteltiin tänä aikana edellä mainituilla tavoilla. Solujen morfologiaa tarkasteltiin Olympuksen (Tokio, Japani) CX 40 faasikontrastimikroskoopilla, ja soluja kuvattiin mikroskooppiin liitettyllä Artcam-300MI kameralla (Olympus) ja QuickPhoto 2.2 -ohjelmistolla (Promicra, Praha, Tsekin tasavalta). Elinkykyisyystestiä varten solut irrotettiin maljoilta 3-4 minuutin trypsiinikäsittelyllä (Gibco Invitrogen; +37 °C), sentrifugoitiin pohjaan ja resuspensoitiin huolellisesti sopivaan määrään (0,5 - 2 ml) PBS'A:ta. 20 µl soluliuosta ja 20 µl 0,4 % Trypaanisinen -väriliuosta (Fluka, laimennettu PBS:ään) sekoitettiin Eppendorf-putkessa, ja värin annettiin tarttua soluihin kolmen minuutin ajan huoneenlämmössä (+22 °C). Tämän jälkeen elävät ja kuolleet (siniseksi värjäytyneet) solut laskettiin hemosytometrissä (Marienfeld Laboratory, Saksa). Solujen elinkykyisyys määritettiin laskemalla elinkykyisten solujen prosenttiosuus kaikista soluista.

### 3.4 Vapaan kolesterolin värjäys filipiinillä

Filipiini on antibiootteihin luokiteltava polyeni, joka sitoo vapaata (esteröitymätöntä) kolesterolia ja fluoresoi spontaanisti UV-valolla eksitoitaessa. Kolesterolin värjäystä varten solut kasvatettiin lasisilla peitinlaseilla (Menzel GmbH & Co., KB, Braunschweig, Saksa).

Ennen kiinnitystä solut pestiin kolmesti PBS'A:lla (fosfaattipuskuroitu suolaliuos). Solut kiinnitettiin upottamalla peitinlasit PBS:ään laimennettuun 4 % paraformaldehydiin (PFA, Merck) 30 minuutiksi, jonka jälkeen peitinlasit pestiin kolmasti (5 minuuttia/pesu) PBS'A:lla. Kaikki työvaiheet suoritettiin huoneenlämmössä. Kiinnityksen ja pesujen jälkeen soluja käsiteltiin 10 minuuttia 1,5 mg/ml glysiini-PBS-liuoksella ja tämän jälkeen 60 minuuttia PBS:ään laimennetulla filipiinillä (100 µg/ml, laimennettu metanoliin tehdystä 10 mg/ml kantaliuoksesta, Sigma). Sopiva filipiini-pitoisuus (50 - 125 µg/ml) ja käsittelyaika (30 - 120 min) selvitettiin testaamalla ennen varsinaisten kokeiden aloitusta. Lopuksi soluja pestiin kolmasti PBS:llä (5-10 minuuttia/pesu). Peitinlasit pedattiin objektilaseille Mowiol-DABCO-seoksen avulla (20 mg/ml Mowiol, jossa 25 mg/ml DABCO, Sigma). Filipiini-värjäyksen lisäksi soluista värjättiin epäsuoralla immunofluoresenssimenetelmällä lysosomeihin liittyvä kalvoproteiini 2 (Lamp2, engl. *Lysosome associated membrane protein 2*).

### 3.5 Epäsuora immunofluoresenssivärjäys ja tumien Hoechst-värjäys

Filipiinillä käsiteltyjen näytteiden immunofluoresenssivärjäys voitiin aloittaa ilman permeabilisointia, sillä filipiini lisäsi solukalvon läpäisevyyttä. Solut huuhdeltiin kerran PBS:llä. Lamp2-proteiinin tunnistava primaarinen vasta-aine (hiiren H4B4, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa University, Iowa City, USA) laimennettiin 1:100 3 % naudan seerumin albumiini (BSA, Sigma) -PBS -seokseen, ja soluja käsiteltiin vasta-aineella 60 minuuttia. Ennen sekundaarisen vasta-aineen lisäystä solut pestiin kolmasti (5 minuuttia/pesu) PBS:llä. Sekundaarinen, hiirtä vastaan suunnattu Alexa 555:een liitetty vasta-aine (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) tai NL 557:een liitetty aasin immunoglobuliini G (R&D Systems, Minneapolis, USA) laimennettiin 1:200 3 % BSA-PBS:ään. Soluja käsiteltiin sekundaarisella vasta-aineella 30 minuuttia. Lopuksi peitinlaseja pestiin kolmasti PBS:llä (5 minuuttia/pesu) ja ne siirrettiin objektilaseille Mowiol-DABCO:on. Soluja tarkasteltiin ja kuvattiin 60x öljy-objektiivilla Olympuksen IX81-konfokaalimikroskoopilla (jossa ohjelma Fluorview 1000).

U373-MG -soluille suoritettiin GFAP-proteiinin (engl. *Glial Fibrillary Acidic Protein*) epäsuora immunovärjäys. Solut kiinnitettiin kuten edellä ja niitä permeabilisoitiin 0,5 % Triton X:llä (Sigma, laimennettu PBS:ään) 15 minuuttia huoneenlämmössä. Pesujen jälkeen epäspesifiset sitoutumiskohdat tukittiin 3 % BSA-PBS:llä (30 minuuttia

huoneenlämmössä). Primaari-vasta-aineen (kanissa tuotettu anti-GFAP, Sigma, 1:100 laimennus 3 % BSA-PBS:ssä) annettiin vaikuttaa 80 minuuttia, jonka jälkeen solut pestiin kolmasti PBS:llä. Sekundaarivasta-aineena toimi NL 493:een liitetty aasin immunoglobuliini G (R&D Systems), joka laimennettiin 1:200 3 % BSA-PBS:ään. Pesujen jälkeen soluille lisättiin vielä Hoechst 33258 -tumaväri (Sigma, laimennettuna 1:1000 PBS:ään) 10 minuutiksi. Lopuksi soluja pestiin yhteensä puoli tuntia, ja peitinlasit asetettiin objektilaseille kuten edellä. Näytteitä tarkasteltiin Axiovert 25 - fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss, Jena, Saksa) ja kuvattiin mikroskooppiin liitetyllä Leitz DMRPE -kameralla (Leica, Solms, Saksa).

### 3.6 Solujen kolesterolipitoisuuden määrittäminen

Solujen sisältämän vapaan kolesterolin määrä selvitettiin spektrofotometrisesti. Käytetty menetelmä perustuu *orto*-ftaalialedehydin ja kolesterolin reaktioon, joka tuottaa reaktioseokseen näkyvällä aallonpituudella absorboivan värin. Yhdisteen tuottama absorbanssi on lineaarisesti riippuvainen näytteen sisältämästä kolesterolin määrästä (Rudel ja Morris, 1973). Standardisuoran avulla selvitettiin eri tavoin käsiteltyjen, homogenisoitujen ja kuivattujen solunäytteiden sisältämä kolesterolimäärä. Homogenisointia varten solut pestiin kolmasti PBS'A:lla, jonka jälkeen ne irrotettiin maljalta mekaanisesti ja siirrettiin maljan huuhteluun käytetyn PBS'A:n tai veden kanssa Eppendorf-putkeen. Solut hajotettiin 23 G neulalla ja ruiskulla vetämällä soluliuos noin 40 kertaa neulan läpi. Solulysaatteja säilytettiin

-80 °C lämpötilassa. Solulysaatit kuivattiin lyofilisoimalla ja standardit (10 – 50 µg kolesterolia) haihduttamalla liuottimena käytetty kloroformi. Näytteille lisättiin 2 ml etikkahappoon (CH<sub>3</sub>COOH) liuotettua *orto*-ftaalialehydiä (0,5 mg/ml, Fluka) ja seosta pidettiin jäällä noin 10 minuuttia. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 1 ml vahvaa rikkihappoa (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ja värin annettiin kehittyä sekoituksen jälkeen noin tunnin ajan. Kuoppalevyille pipetoitujen näytteiden ja standardien absorbanssit luettiin aallonpituudella 550 nm spektrofotometrisellä levylukijalla (LabSystems Oy, Helsinki, Suomi). Standardipisteet sovitettiin suoralle, jolta luettiin kolesterolin määrä näytteissä. Kolesterolin määrä suhteutettiin solujen määrään näytteissä (solut laskettiin hemosytometrissä).

### 3.7 BODIPY-kolesteroliesterin sisäänotto soluihin

Lasisilla peitinlaseilla kasvatetuille soluille lisättiin 10 µg/ml BODIPY-kolesteroliesteriä (Molecular Probes, liuotettu 96 % etanoliin) 15 minuutiksi, jonka jälkeen solut pestiin neljästi PBS:llä (5 minuuttia/pesu). Kiinnitys ja peitinlasien asetus objektilaseille suoritettiin kuten filipiini-värjäyksissä. Näytteitä tarkasteltiin Axiovert 25 - fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss).

### 3.8 RNA:n eristys ja käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktio (RT-PCR)

RNA-eristystä varten soluja kasvatettiin halkaisijaltaan 3,5 cm:n maljoilla seitsemän vuorokauden ajan. RNA:n eristykseen käytettiin Eurozol-reagenssia (EuroClone, Milano, Italia), jota lisättiin 1 ml noin miljoonalle solulle. Viiden minuutin jälkeen solut sekoitettiin pipetoimalla ja siirrettiin Eppendorf-putkiin. Putkiin lisättiin 100 µl kloroformia, ja ravistelun jälkeen putkien annettiin seisoa jäällä 5 minuuttia. Tämän jälkeen putkia sentrifugoitiin 15 minuuttia +4 °C:ssa (12 000 g). Syntyneestä gradientista otettiin talteen ylin fraktio. RNA saostettiin isopropanolilla, jota lisättiin 1:2 Eurozolin määrään nähden. Huolellisen ravistelun jälkeen putkia inkuboitiin jäällä 5 minuuttia. RNA pelletoitettiin sentrifugoimalla putkia 10 minuuttia +4 °C:ssa (12 000 g). Pelletti pestiin 75 %:een dietyylipyrokarbonaatilla käsiteltyyn veteen laimennetulla etanolilla ja sentrifugoitiin pohjaan (15 minuuttia) +4 °C:ssa (9600 g). RNA-pelletin kuivatuksen jälkeen RNA liuotettiin sopivaan määrään dietyylipyrokarbonaatilla käsiteltyä vettä +60 °C:ssa lämpöblokkissa (10 min). Lopuksi RNA-pitoisuus ja näytteen puhtausaste määritettiin NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä (NanoDrop, Wilmington, USA).

Eristetty kokonais-RNA käännettiin vastaavaksi cDNA:ksi kaupallisella kitillä (High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit, Applied Biosystems, CA, USA) valmistajan ohjeiden mukaan. Reaktio suoritettiin PCR-laitteella (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) seuraavalla ohjelmalla: 10 minuuttia +25 °C, 120 minuuttia +37 °C ja 7 minuuttia +4 °C. Reaktiota varten 5 µg RNA:ta laimennettiin 50 µl:aan vettä. Reaktioseoksen (tilavuus 100 µl) lopullinen nukleotidi-konsentraatio oli 4 mM ja entsyymien (Multiscribe Reverse Transcriptase, Applied Biosystems) aktiivisuus 2,5 U/reaktio.

RT-PCR-reaktioseoksen tilavuus oli 50 µl. Tässä työssä käytettyjen ADAM 23-geenin tunnistavien alukkeiden (TAG Copenhagen A/S, Tanska) sekvenssit löytyvät



lähteestä Teppola, 2008. PCR-reaktioseoksessa alukkeiden loppupitoisuus oli 0,4  $\mu\text{M}$ , nukleotidien loppupitoisuus 50  $\mu\text{M}$ /nukleotidi, ja DNA-polymeraasin (Biotools DNA polymerase tai F-501L DynaZyme II DNA polymerase, Finnzymes, Espoo, Suomi) aktiivisuus 1 U/reaktio. PCR-reaktioseokseen lisättiin 5  $\mu\text{l}$  cDNA-liuosta suoraan käänteiskopiointireaktioseoksesta. ADAM 23 -geenin ilmentymistä vertailtiin TATA-elementtiin sitoutuvan proteiinin (TBP, engl. *TATA-box Binding Protein*) ilmentymiseen. TBP-alukkeiden (Proligo, Sigma) sekvenssit löytyvät lähteestä Teppola, 2008. Negatiivisesta kontrollireaktiosta jätettiin pois cDNA. PCR-ohjelma oli seuraava ADAM 23:lle / TBP:lle: Alkudenaturaatiota (94/95 °C, 5 minuuttia) seurasi 31 sykliä, joista jokainen koostui alukkeiden kiinnittymisvaiheesta (53/57 °C, 50 sekuntia), pidennysvaiheesta (70/72 °C, 1 minuutti 20 sekuntia) ja denaturaatiosta. Viimeisen pidennysreaktion pituus oli 10 minuuttia.

PCR-tuotteet analysoitiin elektroforeesilla 1 %:ssa agarosigeelissä, jossa oli 0,5  $\mu\text{g/ml}$  etidiumbromidia. Ajopuskurina oli yksinkertainen Tris-etanoliamiini. Geeliin pipetoitiin näytteiden lisäksi DNA:n molekyylipainostandardi (1 kb DNA-ladder, Fermentas, Ontario, Kanada). Geeljä ajettiin 90 voltin jännitteellä noin tunti. Lopuksi geelit kuvattiin UV-valossa digitaalikameralla (Olympus).

### 3.9 Tilastolliset analyysit ja kuva-aineiston käsittely

Mikroskooppikuvia analysoitiin ja käsiteltiin Image J -ohjelmalla (Rasband, W.S. Image J, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Kuvissa 9 – 12 filipiinin fluoresenssi on esitetty intensiteettivärjäyksenä (cyan hot, Image J), jossa suurimman intensiteetin pikselit ovat vaaleimpia.

Fluoresenssikuvista suoritettiin seuraavia analyysijä: Astrozytooma-solujen Hoechst-värjätyt tumat laskettiin käsin. Ilmoitetut tulokset (Taulukko 1) ovat erityyppisten tumien prosenttiosuudet sadasta tumasta/käsittely. Lamp2-positiivisten rakenteiden kasautumista eri käsittelyjen vaikutuksesta analysoitiin laskemalla sellaisten solujen osuus, joissa vesikkelit ovat selvänä rykelmänä solussa. Luvut on laskettu konfokaalimikroskooppikuvista yhteensä 100 - 150 solusta/käsittely, ja ilmoitettu keskihajonta kuvaa 5 - 7 eri kuvasta laskettujen keskiarvojen poikkeamia (Kuva 15A). Jotta eri solutyypin osuudet olisivat samat, kuvat valittiin niin, että N-tyypin solujen osuus oli käsittelystä riippumatta 60 – 80 % kaikista analysoiduista soluista. Lisäksi

konfokaalimikroskooppikuvista mitattiin vesikkelien pinta-alaa Image J – ohjelmalla (Kuva 16). Analyysiin valittiin sattumanvaraisesti 20 - 32 solua/käsittely. Näitä tuloksia sekä elinkykyisyyshmääritysten ja kolesterolin määrän mittausten tuloksia analysoitiin tilastollisesti yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) SPSS-ohjelmalla (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Tukeyn monivertailutestin antamaa tulosta  $P < 0,05$  pidettiin tilastollisesti merkitseväenä. Kuvissa 6, 7, 14, 15 ja 17 tämän P-arvon alittaneet käsittelyt on osoitettu tähdillä.

## 4. Tulokset

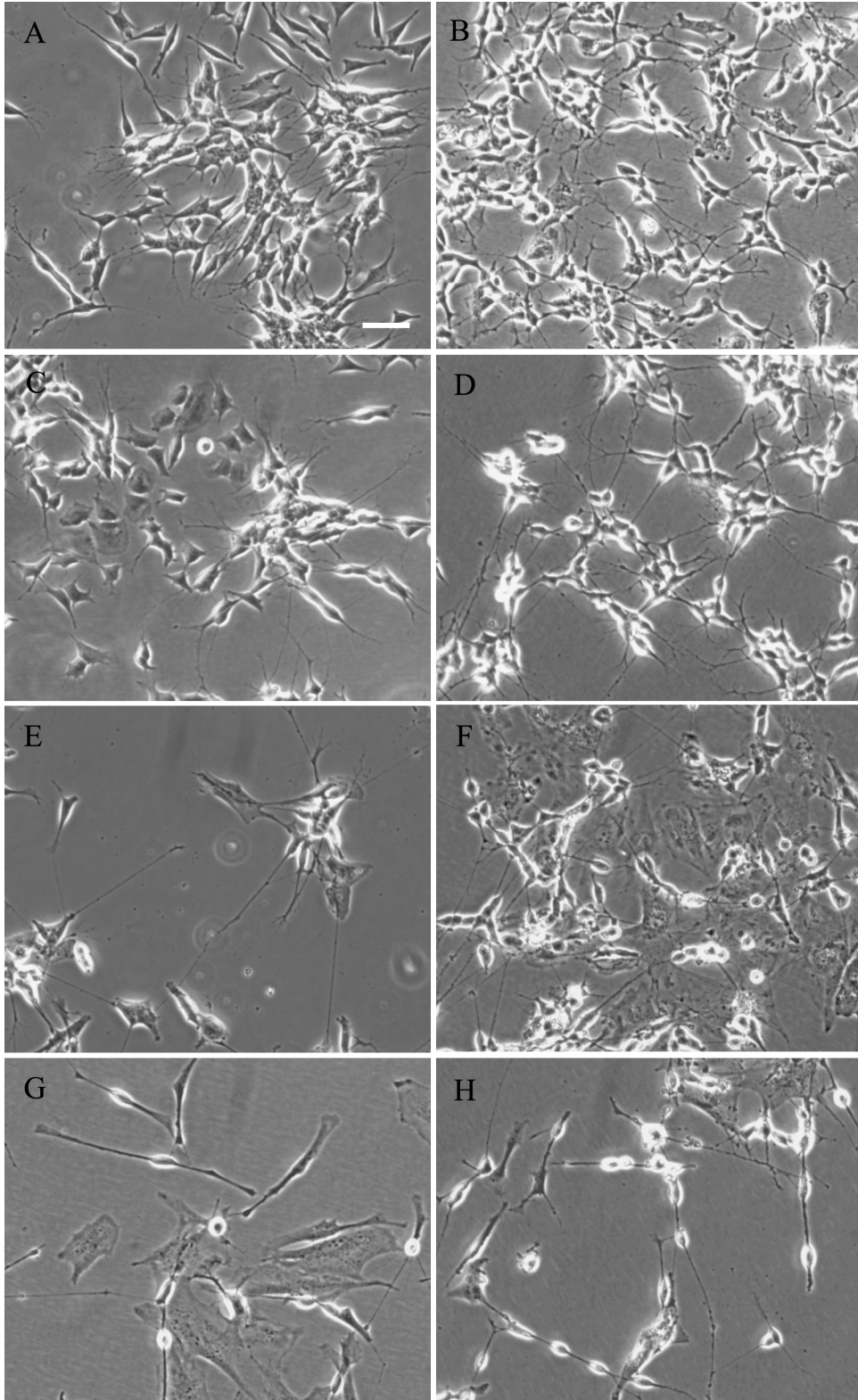
### 4.1 Solujen morfologia

SH-SY5Y neuroblastooma- ja U373-MG astrozytooma-solujen erilaistumista tutkittiin kasvattamalla soluja seitsemän vuorokauden ajan ja käsittelemällä viljelmiä tänä aikana RA:lla, kolesterolilla, lovastatiinilla, tai näiden yhdistelmillä. Solujen erilaistumista arvioitiin morfologian lisäksi yleisen kasvunopeuden ja solujen elinkykyisyyden perusteella.

#### 4.1.1 SH-SY5Y neuroblastooma-solut

Seitsemän päivän kasvatuksen jälkeen käsittelemättömissä kontrolliviljelmissä oli erotettavissa spontaanisti lyhyitä neuriitteja kasvattaneita N-tyyppin soluja sekä yksittäisiä, suuria S-tyyppin soluja. RA-käsittely lisäsi solujen erilaistumista, mikä ilmeni N-tyyppin solujen kasvattamien neuriittien pituuden kasvuna (Kuva 4E) ja solujen jakautumisen hidastumisena. S-tyyppin solujen suhteellinen osuus viljelmissä kasvoi RA-käsittelyn myötä, ja seitsemän päivän viljelyn jälkeen osa N-tyyppin soluista kasvoi jättiläsolujen päällä (Kuva 4: E ja F). Osaa soluviljelmistä käsiteltiin seitsemän päivän ajan myös kolesterolilla, jonka on raportoitu tukevan SH-SY5Y-solujen RA-välitteistä erilaistumista. Lisätty kolesterolia ei tuonut esiin uusia piirteitä solujen morfologiassa.

HMG-KoA-reduktaasin estäjänä toimivalla lovastatiinilla ei ollut selvää vaikutusta neuroblastooma-solujen morfologiaan. Sen sijaan lovastatiini näytti lisäävän N-tyyppin solujen kasvattamien pitkien neuriittien määrää RA- ja kolesterolikäsittelyiden yhteydessä: Image J-ohjelmalla neljästä mikroskooppikuvasta mitattujen, 20 - 24 pisimmän neuriitin pituus oli kontrollisoluilla keskimäärin 47 µm, RA-erilaistetuilla soluilla 88 µm, RA+lovastatiini-käsitellyillä soluilla 90 µm ja RA+lovastatiini+kolesterolikäsitellyillä soluilla 92 µm. Neuriittien pituuden lisäyksen ohella lovastatiini sai RA-erilaistetut N-tyyppin solut muodostamaan soluketjuja, ja osan välimuotoisista soluista kasvamaan muodoltaan palkkimaiseksi (Kuva 4: G ja H). Kolesterolin poistoon käytetyllä MBCD:llä ei ollut vaikutusta solujen morfologiaan, mutta käsittely lisäsi huomattavasti maljalta irronneiden solujen määrää.



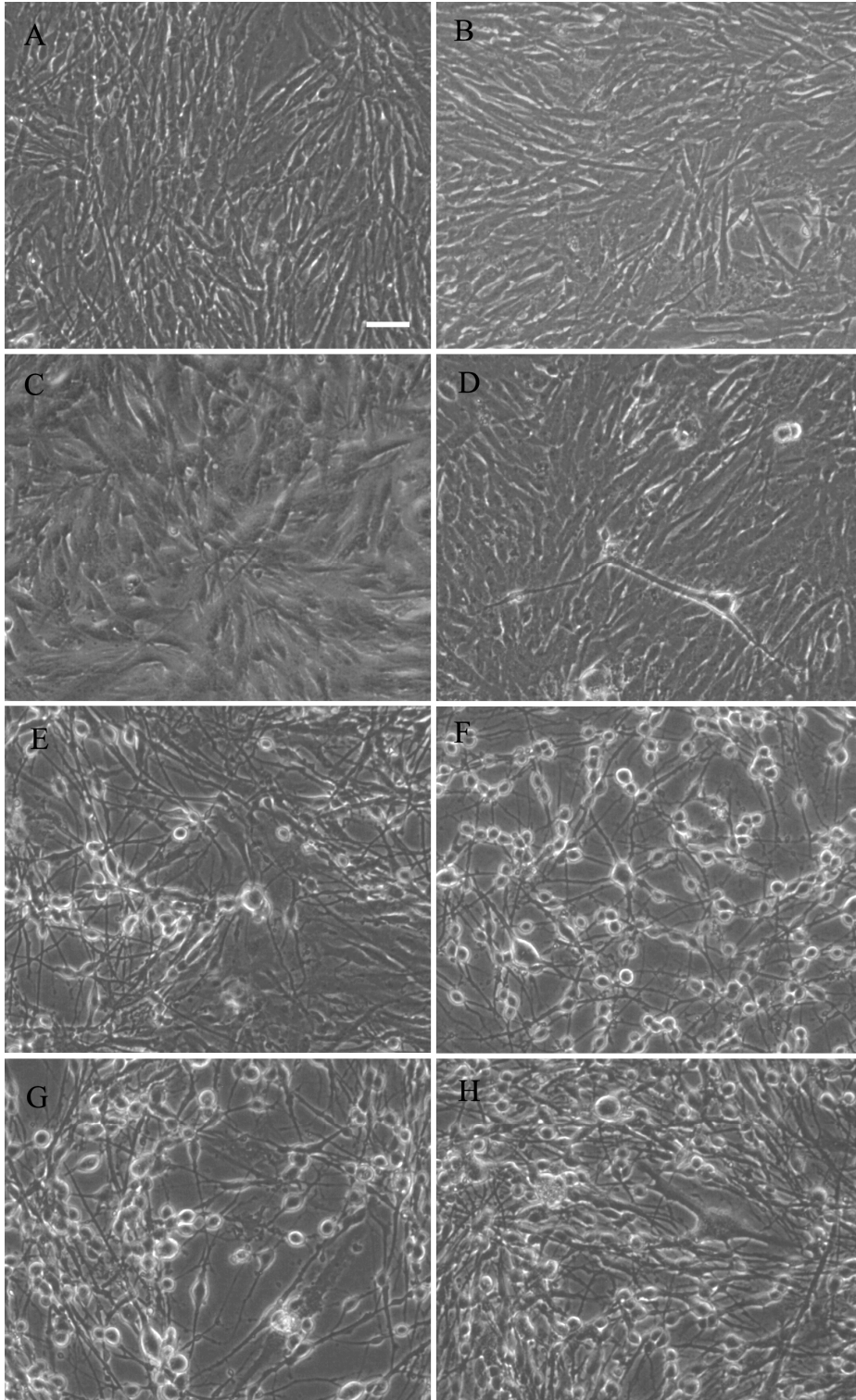
**Kuva 4.** RA:n, kolesterolin ja lovastatiinin vaikutus SH-SY5Y-solujen morfologiaan. Soluja viljeltiin seitsemän päivää ja käsiteltiin seuraavasti: A) kontrolli, B) kolesteroli, C) lovastatiini, D) lovastatiini+kolesteroli, E) RA, F) RA+kolesteroli, G) RA+lovastatiini ja H) RA+kolesteroli+lovastatiini. Mittajana 20 $\mu$ m, kaikissa kuvissa on sama suurennos.

#### 4.1.2 U373-MG astrozytooma-solut

U373-MG -solujen morfologia vaihteli selvästi kasvutiheyden ja kasvualustan mukaan. Harvemmassa kasvavat, käsittelemättömät solut olivat yleisesti kooltaan ja muodoltaan vaihtelevampia kuin hyvin tiheässä kasvavat solut. Täysillä maljoilla kasvaneet astrozytooma-solut muistuttivat morfologialtaan fibroblasteja.

Seitsemän päivän viljelyn jälkeen solut kasvoivat maljoilla pääsääntöisesti erittäin tiheässä (Kuva 5). RA hidasti solujen jakautumisnopeutta lievästi, minkä seurauksena RA:lla käsitellyt solut jäivät morfologialtaan hieman kontrollisoluja pyöreämmiksi (Kuva 5C). Kasvatuksen ajaksi mediumiin lisätty kolesteroli ei juuri aiheuttanut muutoksia solujen lisääntymisnopeudessa tai morfologiassa.

48 tunnin lovastatiini-käsittely sai aikaan selkeän muutoksen astrozytooma-solujen morfologiassa: Käsittelyn seurauksena solujen soomaosat muuttuivat pallomaisiksi ja solut kasvattivat ohuita ulokkeita. Vaikka enemmistö soluista muuttui muodoltaan tähtimäisiksi (engl. *stellated*), osassa lovastatiinilla käsitellyistä viljelmissä oli havaittavissa myös morfologialtaan fibroblastimaiseksi jääneitä soluja (Kuva 5E). Tähtimäisiksi muuttuvien solujen osuus oli suurin viljelmissä, joita oli käsitelty RA:lla tai kolesterolilla ennen lovastatiini-käsittely aloitusta (Kuva 5: F, G ja H).



**Kuva 5.** RA:n, kolesterolin ja lovastatiinin vaikutus U373-MG -solujen morfologiaan. Soluja viljeltiin seitsemän päivää ja käsiteltiin seuraavasti: A) kontrolli, B) kolesteroli, C) RA, D) RA+kolesteroli, E) lovastatiini, F) lovastatiini+kolesteroli, G) RA+lovastatiini ja H) RA+kolesteroli+lovastatiini. Mittajana 20µm. Kaikissa kuvissa on sama suurennos.

## 4.2 Solujen elinkykyisyys

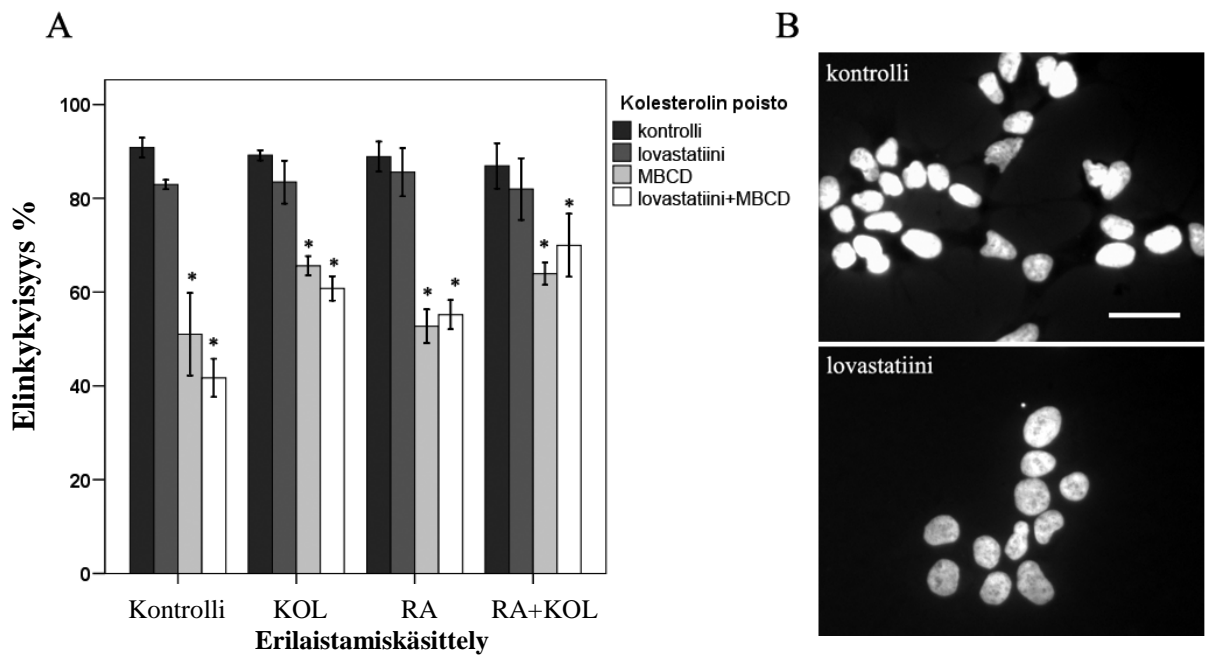
RA:lla, kolesterolilla, lovastatiinilla ja MBCD:llä sekä näiden yhdistelmillä käsiteltyjen SH-SY5Y- ja U373-MG -solujen elinkykyisyys määritettiin trypaanisini-värjäyksen avulla. Ehyt solukalvo estää värin pääsyn solulimaan, joten vain vahingoittuneet tai kuolevat solut värjäytyvät sinisiksi. 30 minuutin MBCD-käsittely aiheutti huomattavaa neuroblastooma-solujen irtoamista kasvualustasta, joten kyseinen käsittely jätettiin pois astrozytoma-soluilta. Elinvykyisyydestit suoritettiin kahtena (SH-SY5Y, Kuva 6) tai kolmena (U373-MG, Kuva 7) täysin erillisenä kokeena.

### 4.2.1 SH-SY5Y neuroblastooma-solut

SH-SY5Y-solujen erilaistaminen RA:lla tai solujen kasvatus ylimääräisen kolesterolin läsnä ollessa ei vaikuttanut solujen elinkykyisyyteen. Lovastatiini-käsittely heikensi lievästi solujen elinkykyisyyttä, mutta ero kontrollisoluihin ei ollut tilastollisesti merkitsevä (Kuva 6A). Lovastatiinilla käsitellyille neuroblastooma-soluille suoritettiin lisäksi Hoechst-tumavärjäys, jonka perusteella lovastatiini ei heikentänyt tumien kuntoa (Kuva 6B).

Puolen tunnin käsittely MBCD:llä heikensi solujen elinkykyisyyttä selvästi. Kaikkien MBCD:llä käsiteltyjen viljelmien solut värjäytyivät tilastollisesti merkitsevällä erolla kontroleihin nähden ( $P < 0,001$ ,  $n = 2 - 6$ , tilastollisesti merkitsevät erot tuottaneet käsittelyt on osoitettu tähdillä kuvassa 6). Erilaistamattomien solujen elinkykyisyys laski eniten lovastatiini+MBCD -yhdistelmäkäsittelyn seurauksena, kun taas RA:lla erilaistetuille soluille pelkkä MBCD-käsittely oli haitallisempi. Solujen kasvatus ylimääräisen kolesterolin läsnä ollessa ei merkittävästi suojellut soluja pelkän MBCD:n vaikutukselta, mutta paransi solukalvon kuntoa MBCD+lovastatiini -yhdistelmäkäsittelyn aikana ( $P = 0,02$ ,  $n = 4$  verrattaessa MBCD+lovastatiini ja MBCD+lovastatiini+kolesteroli -käsittelyjä ja  $P = 0,006$ ,  $n = 4$  verrattaessa samoja käsittelyjä RA:lla erilaistetuissa soluissa).

Kokonaisuudessaan tulokset antoivat viitteitä siitä, että erilaistamattomat solut saattavat olla hieman herkempiä lovastatiinille ja MBCD:lle, tosin erot RA:lla käsiteltyihin soluihin eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

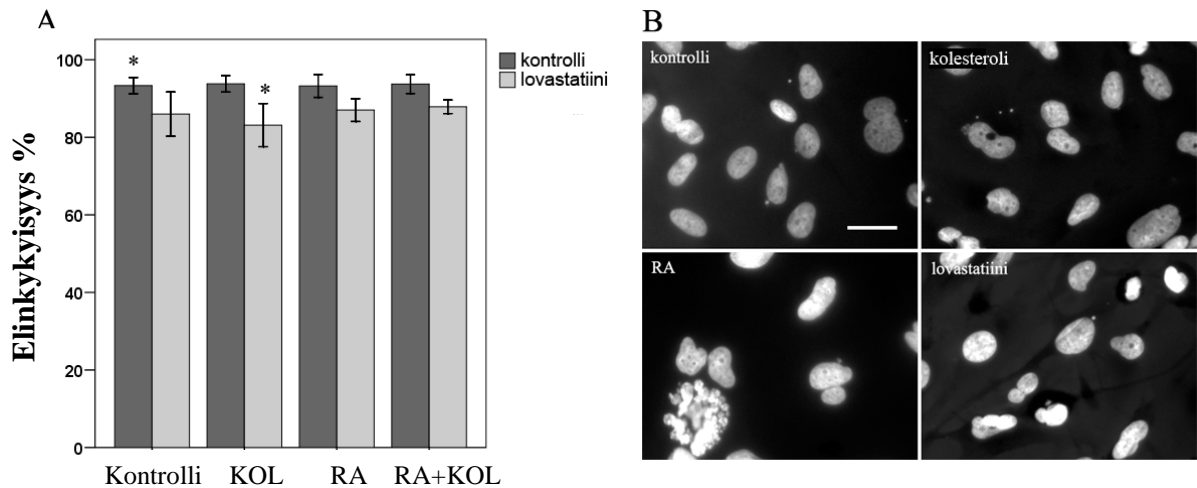


**Kuva 6.** SH-SY5Y-solujen elinkykyisyys. A) Kolesterolin (KOL), RA:n sekä kolesterolin poistoon käytettyjen lovastatiinin ja MBCD:n vaikutus solujen elinkykyisyyteen trypaanisini-värjäyksen perusteella. Palkit edustavat elinkykyisyytensä säilyttäneiden solujen prosenttiosuutta. Vähintään kahdessa erillisessä kokeessa saatujen tulosten keskihajonta on ilmoitettu virhepylväillä. Tähdet osoittavat käsittelyt, jotka poikkesivat kontrollista tilastollisesti merkitsevästi ( $P < 0,001$ ,  $n = 2 - 6$ ) B) Lovastatiinilla ei juuri ollut vaikutusta neuroblastooma-solujen tumien morfologiaan. Mittajana 20  $\mu\text{m}$ . Suurennos on sama molemmissa kuvissa.

#### 4.2.2 U373-MG astrozytoma-solut

RA tai kolesteroli eivät trypaanisini-värjäyksen perusteella vaikuttaneet suuresti astrozytoma-solujen elinkykyisyyteen. Lovastatiini puolestaan lisäsi maljalta irtoavien, kuolleiden solujen määrää, ja heikensi myös käsittelyn jälkeen yhä kasvualustassa kiinni olevien solujen solukalvon kuntoa jonkin verran. Lovastatiini+kolesteroli -käsittelyjen solujen elinkykyisyys laski tilastollisesti merkitsevällä erolla kontrollisoluihin nähden ( $P = 0,03$ ,  $n = 4$  ja  $6$ , osoitettu tähdillä kuvassa 7A). Astrozytoma-solujen tilaa eri käsittelyiden jälkeen analysoitiin myös tuman Hoechst-värjäyksen perusteella. Selvästi poikkeavia tumia löytyi RA:lla ja lovastatiinilla käsitellyistä näytteistä paljon enemmän kuin kontrolleista tai pelkällä kolesterolilla käsitellyistä viljelmistä (Taulukko 1). Osiin pilkkoutuneita, apoptoottiselta vaikuttavista tumia oli havaittavissa varsinkin RA -käsittelyssä. Lovastatiinin vaikutus ilmeni puolestaan tumien tiivistymisenä (Kuva 7B ja Taulukko 1).





**Kuva 7.** Kolesterolin (KOL), RA:n ja lovastatiiniin vaikutus seitsemän päivän ajan kasvatettujen U373-MG-solujen elinkykyisyyteen. A) Trypaanisinen-elinkykyisyystestien tulokset. Palkit edustavat elinkykynsä säilyttäneiden solujen osuutta keskiarvona vähintään kolmesta erillisestä kokeesta. Havaintojen keskihajonta on ilmoitettu virhepylväillä. Tähdet osoittavat käsittelyt, joiden välille syntyi tilastollisesti merkitsevä ero ( $P = 0,03$ ,  $n = 4$  ja  $6$ ). B) Käsittelyjen vaikutus astrozytooma-solujen tumien morfologiaan. Mittajana  $20 \mu\text{m}$ . Suurennos on kaikissa kuvissa sama.

**Taulukko 1.** RA:n, kolesterolin ja lovastatiinin vaikutus U373-MG -solujen tumien morfologiaan Hoechst-värijäyksen perusteella ( $n = 100$  solua/käsittely).

Käsittely	Fragmentoituneet tumat (%)	Tiivistyneet tumat (%)	Muodoltaan poikkeavat tumat yhteensä (%)
Kontrolli	2,0	3,0	5,0
Kolesterol	3,0	3,0	6,0
RA	5,0	3,0	8,0
RA + kolesterol	14,0	2,0	16,0
Lovastatiini	2,0	7,0	9,0
Kolesterol+ lovastatiini	2,0	9,0	11,0
RA+ lovastatiini	13,0	9,0	22,0
RA+ kolesterol+ lovastatiini	8,0	13,0	21,0

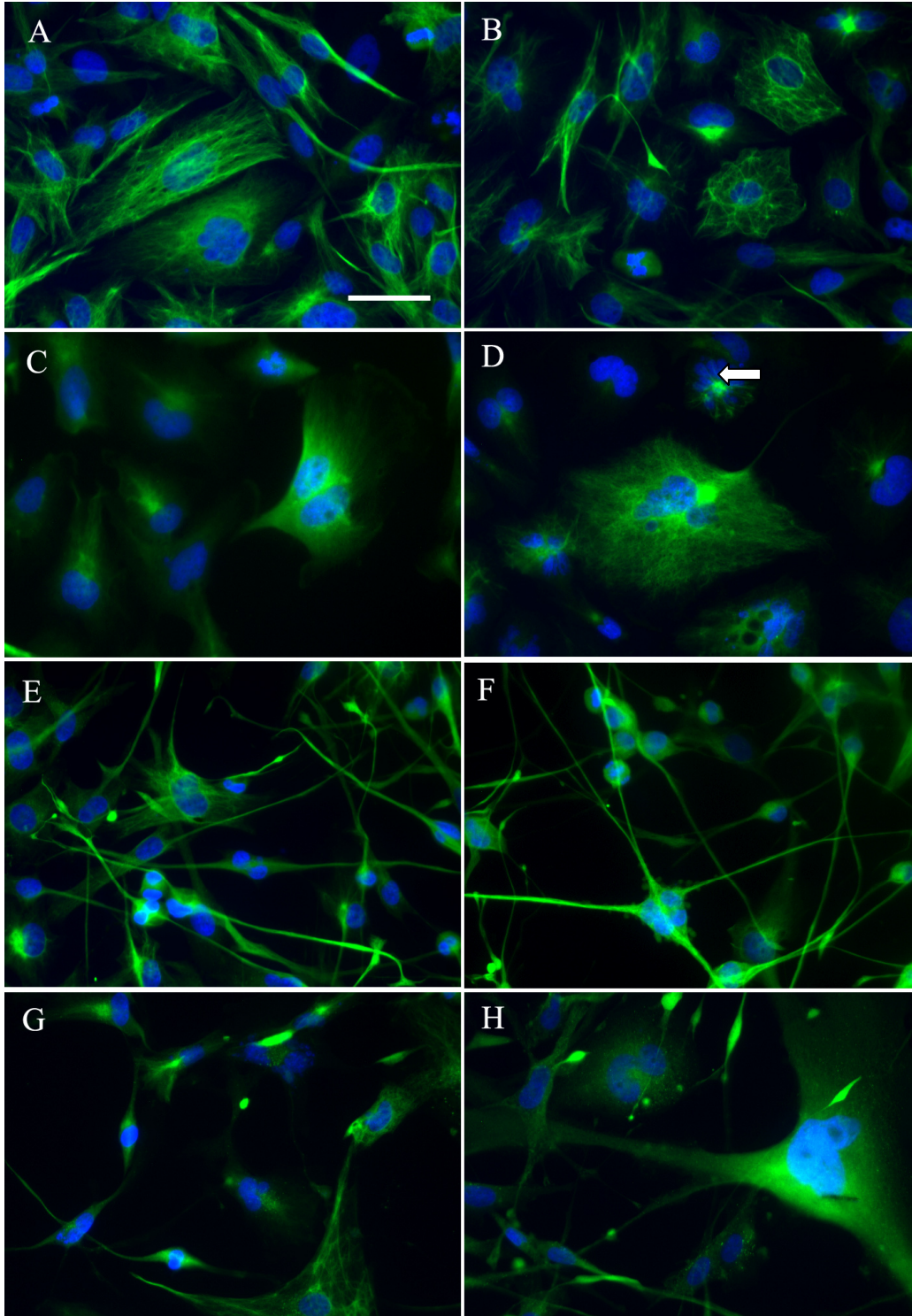
### 4.3 Retinoidihapon ja lovastatiinin vaikutus U373-MG astrozytooma-solujen välimuotoisiin filamentteihin

U373-MG -soluista värjättiin epäsuoralla immunofluoresenssimenetelmällä GFAP-proteiini, joka on astrozyteille tyypillisten välimuotoisten filamenttien rakenneproteiini. Värijäyksellä pyrittiin selvittämään GFAP:n osuutta lovastatiinin aiheuttamassa morfologian muutoksessa.

Vajaa viidesosa U373-MG -soluista oli GFAP-negatiivisia. Hoechst-värjättyjen tumien perusteella hyvinvoivissa kontrollisolussa GFAP erottui tyypillisesti ympäri solulimaa levittäytyvinä säikeinä (Kuva 8A). Pienessä osassa soluista GFAP oli kerääntynyt tuman läheisyyteen kirkkaasti fluoresoivaksi kasaumaksi. U373-MG -solut jakautuivat tiheään tahtiin, joten GFAP-filamenttien muodon vaihtelu selittyy luultavimmin kontrollisolujen sijoittumisella eri vaiheisiin solusyklejä.

RA:lla käsitellyissä soluissa GFAP leimautui tyypillisesti tasaisempana ja haaleampana kuin kontrolleissa tai kolesteroli-käsitellyissä soluissa: GFAP:n säikeinen rakenne oli vaikeammin erotettavissa, mikä käy selvästi ilmi vertailemalla kuvassa 8 kohdissa A, C, D ja H esiintyvien monitumaisten jättisolujen soluliman filamentteja. Osassa RA:lla käsitellyistä soluista filamentit olivat hajonneet ja GFAP oli kertynyt kirkkaammin fluoresoivaksi kohdaksi tuman lähelle (Kuva 8: C ja D). Kuvassa 8D on osoitettu nuolella RA:lla käsitellyissä viljelmissä tyypillisesti esiintynyt apoptoottiselta vaikuttava solu, jossa tuma ja GFAP-filamentit ovat hajoamassa.

Lovastatiinin vaikutuksesta tähtimäiseksi muuttuneiden solujen soomaosissa ja ulokkeissa GFAP värjäytyi kirkkaana ja melko tasaisena (Kuva 8: E ja F). Kuten suurimmassa osassa RA:lla käsitellyistä soluista, filamenttien säikeinen rakenne näytti puuttuvan myös tähtimäisistä soluista. Osassa astrozytooma-solujen muodostamista ulokkeista GFAP kerääntyi kirkkaiksi kasoiksi. Tämä lovastatiinin aiheuttama GFAP:n fluoresenssin kasautuminen oli voimakkainta soluissa, joita oli kasvatettu RA:n ja lisätyn kolesterolin läsnä ollessa (Kuva 8: G ja H).



**Kuva 8.** Kolesterolin, RA:n ja lovastatiinin vaikutus U373-MG -solujen solutukirankaan. Vihreä GFAP, sininen tumaväri Hoechst. Soluja kasvatettiin seitsemän päivää ja käsiteltiin seuraavasti: A) kontrolli, B) kolesterolin, C) RA D) RA+kolesterolin, nuoli osoittaa mahdollisesti apoptoottista solua, E) lovastatiini, F) lovastatiini+kolesterolin, G) RA+lovastatiini ja H) RA+kolesterolin+lovastatiini. Mittajana 25 $\mu$ m. Suurennos on kaikissa kuvissa sama.

## 4.4 Kolesterolin sijoittuminen

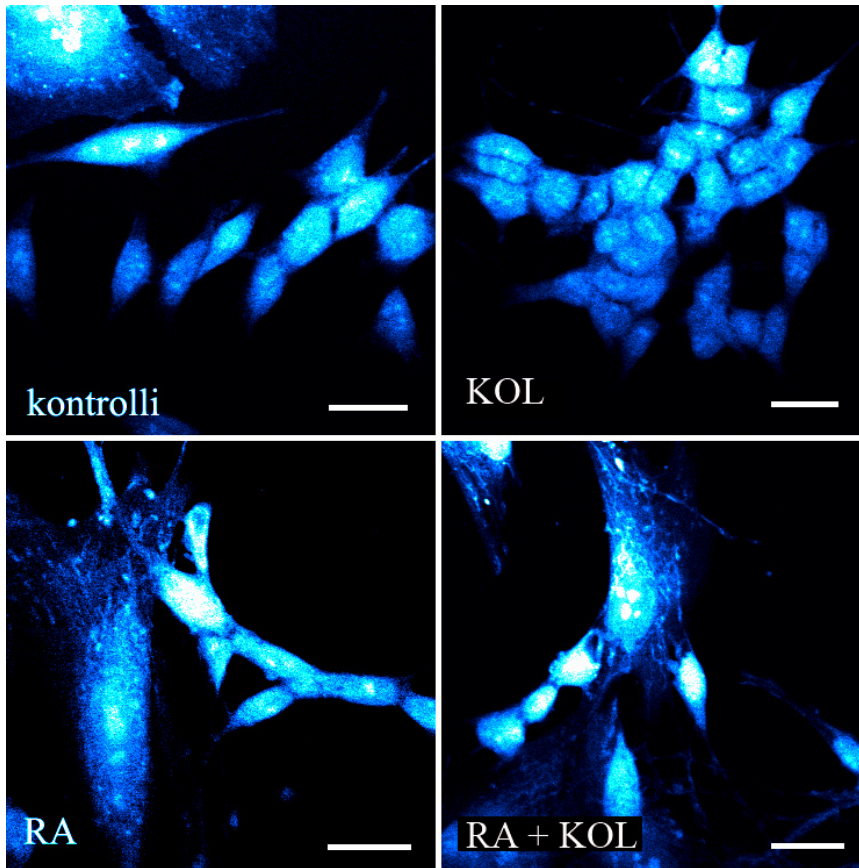
Kolesterolin sijoittumista soluissa analysoitiin kolesteroliin sitoutuvan filipiinin fluoresenssin perusteella. Kolesterolin sijainnin muutoksia seurattiin neuroblastooma-soluilla erityisesti RA-välitteisen erilaistumisen ja astrocytooma-soluilla lovastatiinin aiheuttaman morfologiamuutoksen jälkeen.

### 4.4.1 Kolesterolin sijoittuminen SH-SY5Y neuroblastooma-soluissa

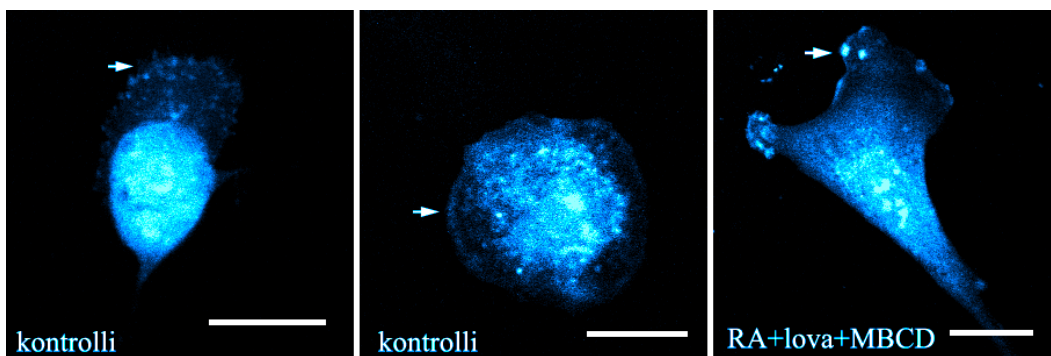
Erilaistamattomissa N-tyyppin neuroblastooma-soluissa filipiini värjäsi melko tasaisesti koko soluliman. Kirkkain fluoresenssi näytti keskittyvän erityisesti tumaan ja sen läheisyyteen. Filipiinin tarkasteluun käytetty UV-laser saa soluissa helposti aikaan autofluoresenssia, siksi tumien autofluoresenssin mahdollisuus suljettiin pois värjäämättömillä kontrollinäytteillä. Solukalvon kolesteroli värjäytyi selvimmin N-tyyppin solujen neuriittien sooman läheisissä alkuosissa, kun taas itse soomissa solukalvon fluoresenssi oli vaikeammin erotettavissa. Suurten S-tyyppin solujen solulimassa filipiinin fluoresenssi oli yleisesti N-tyyppin soluihin verrattuna haaleampaa. Myös S-tyyppin soluissa solukalvon fluoresenssi oli hyvin heikkoa, sillä pääosa kolesterolista sijoittui tuman ympäristöön erilaisiin rakenteisiin (Kuva 9).

Neuroblastooma-kasvaimissa ja niistä eristetyissä solulinjoissa on mukana myös välimuotoisia I-tyyppin soluja, jotka luultavasti edustavat kasvainten kasvua ylläpitävää kantasolupopulaatiota. Tämän tyyppisissä soluissa filipiinin fluoresenssi oli hyvin voimakasta tuman ympärillä, mutta myös solukalvon alueilla, jotka muodostivat lamellipodeja muistuttavia rakenteita. Lähellä solukalvon etenevää reunaa kolesteroli keräytyi tyyppillisesti tiiviiksi alueiksi. Kolesterolin poisto solukalvolta MBCD:llä ei estänyt kolesterolin kerääntymistä lamellipodeissa (Kuva 10).

N-tyyppin neuroblastooma-solut reagoivat RA:han muun muassa kasvattamalla pitempiä neuriitteja. RA:lla erilaistaminen ei kuitenkaan muuttanut kolesterolin sijoittumista soluissa tai vaikuttanut filipiinin fluoresenssiin neuriiteissa. Myöskään solujen kasvatus ylimääräisen kolesterolin läsnä ollessa ei silmämääräisen arvion perusteella vaikuttanut filipiinin fluoresenssin voimakkuuteen tai sijoittumiseen missään solutyypissä (Kuvat 9 ja 10).



**Kuva 9.** Kolesterolin sijoittuminen seitsemän päivää viljellyissä, käsittelemättömissä sekä RA:lla erilaistetuissa ja kolesterolilla (KOL) käsitellyissä N- ja S-tyyppin neuroblastooma-soluissa. Filippiinin fluoresenssi on esitetty intensiteettivärjäyksenä, jossa voimakkaimman fluoresenssin alueet ovat vaaleimpia. Mittajanat 20  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 10.** Kolesterolin kerääntyminen solukalvolle I-tyyppin neuroblastooma-soluissa, joita on viljelty seitsemän päivän ajan. Filippiinin fluoresenssi on esitetty intensiteettivärjäyksenä, jossa voimakkaimman fluoresenssin alueet ovat vaaleimpia. Nuolet osoittavat kolesterolikertymiä lamellipodeissa. Mittajanat 20  $\mu\text{m}$ . Lova on lyhenne lovastatiinista.

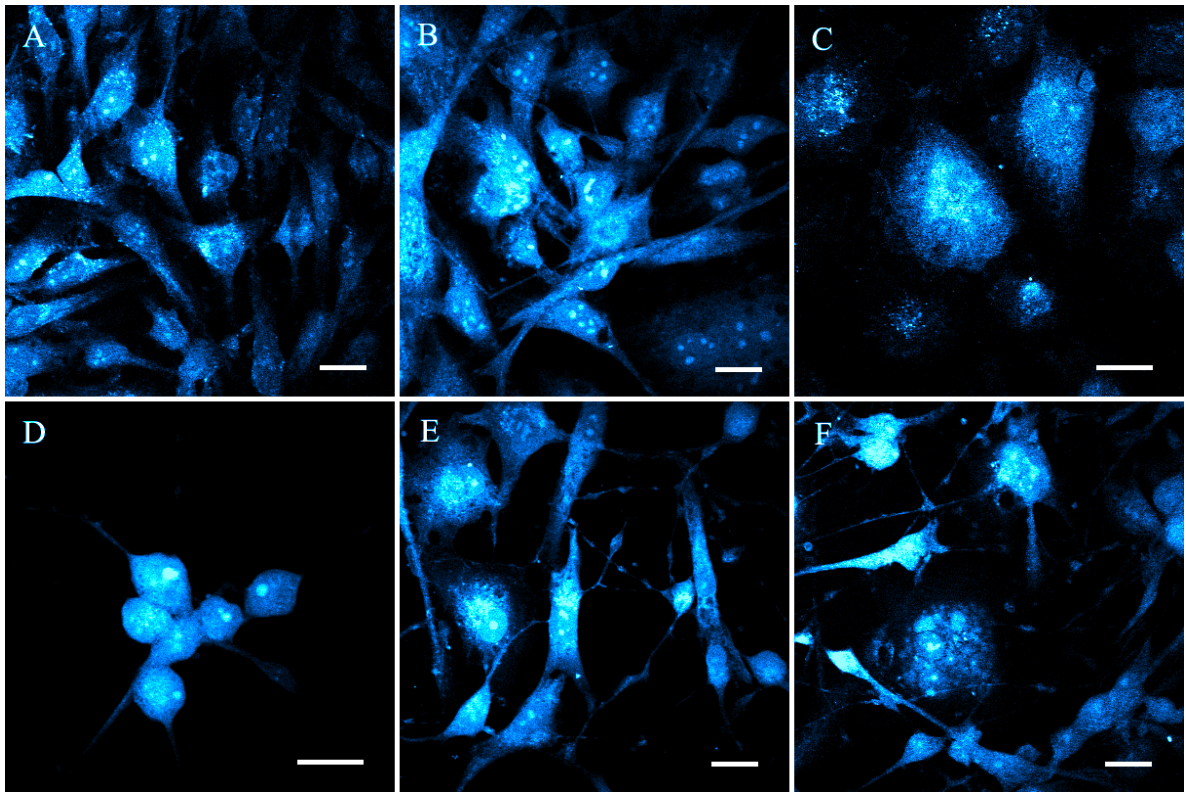
#### 4.4.2 Kolesterolin sijoittuminen U373-MG astrozytooma-soluissa

Myös astrozytooma-soluissa filipiinin vahvin fluoresenssi keskittyi tumaan sekä sen ympäristössä erityisen kirkkaana erottuviin pisteisiin (Kuva 11). RA:lla käsitellyissä soluissa, jotka olivat usein muodoltaan kontrollisoluja pyöreämpiä, filipiinin fluoresenssi oli vahvaa tuman lähellä, mutta erottui vain heikkona solukalvolla (Kuva 11C). Solujen kasvatus ylimääräisen kolesterolin läsnäollessa ei merkittävästi lisännyt filipiinin fluoresenssia tai muuttanut kolesterolin sijoittumista soluissa.

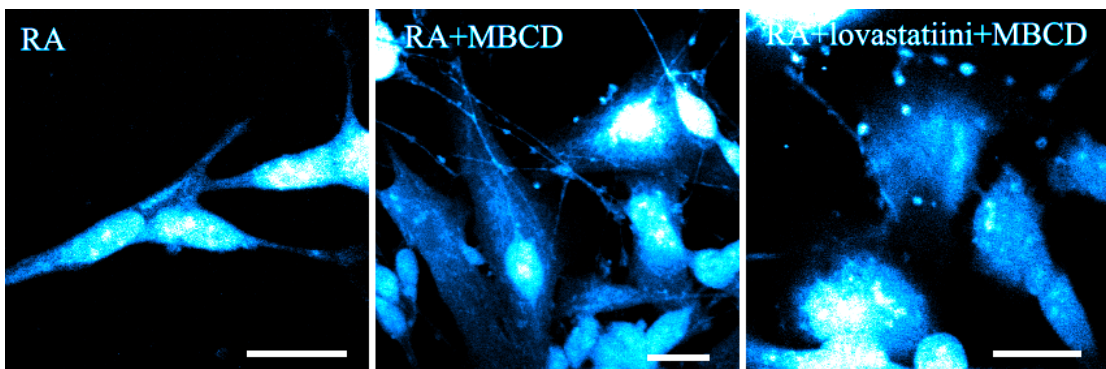
Lovastatiini-käsittelyn seurauksena filipiinin fluoresenssi voimistui solujen pallomaisiksi muuttuneissa soomaosissa, minkä seurauksena kolesterolin jakaantuminen soluliman eri osiin ei enää erottunut selkeästi (Kuva 11D). Kolesterolia oli nähtävissä myös tähtimäisten solujen ulokkeissa, joissa sooman läheiset osat fluoresoivat suhteellisesti voimakkaimmin. RA+lovastatiini ja RA+kolesteroli+lovastatiini - yhdistelmäkäsittelyt aiheuttivat kolesterolin kasautumista näissä ulokkeissa (Kuva 11: E ja F).

#### 4.4.3 Lovastatiinin ja MBCD:n vaikutus kolesterolin sijoittumiseen SH-SY5Y neuroblastooma-solujen neuriiiteissa

Lovastatiinilla tai solukalvolta kolesterolia poistavalla MBCD:llä ei ollut suurta vaikutusta fluoresenssin jakautumiseen neuroblastooma-solujen soomaosissa. Sen sijaan RA:lla erilaistettujen solujen kasvattamisessa pitkissä neuriiiteissa kolesteroli kasautui MBCD-käsittelyn seurauksena. Myös lovastatiini lisäsi jonkin verran kolesterolin epätasaista jakaantumista neuriiiteissa, ja kolesterolin kasautuminen olikin selvästi voimakkainta lovastatiini+MBCD -yhdistelmäkäsittelyssä. Solujen kasvatus ylimäärin kolesterolia sisältävässä mediumissa ennen MBCD- tai lovastatiini-käsittelyjä ei estänyt tai lisännyt filipiinin fluoresenssin kasautumista (Kuva 12).



**Kuva 11.** Kolesterolin sijoittuminen U373-MG -soluissa. Filipiinin fluoresenssi on esitetty intensiteettivärjäyksenä, jossa voimakkaimman fluoresenssin alueet ovat vaaleimpia. Mittajanat 20  $\mu\text{m}$ . Soluja kasvatettiin seitsemän päivän ajan ja käsiteltiin seuraavasti: A) kontrolli, B) kolesterolia, C) RA, D) lovastatiini, E) RA+lovastatiini ja F) RA+kolesterolia+lovastatiini. Kohdissa E ja F erottuu selvästi kolesterolin kertyminen pistemäisiin alueisiin solujen ulokkeissa.



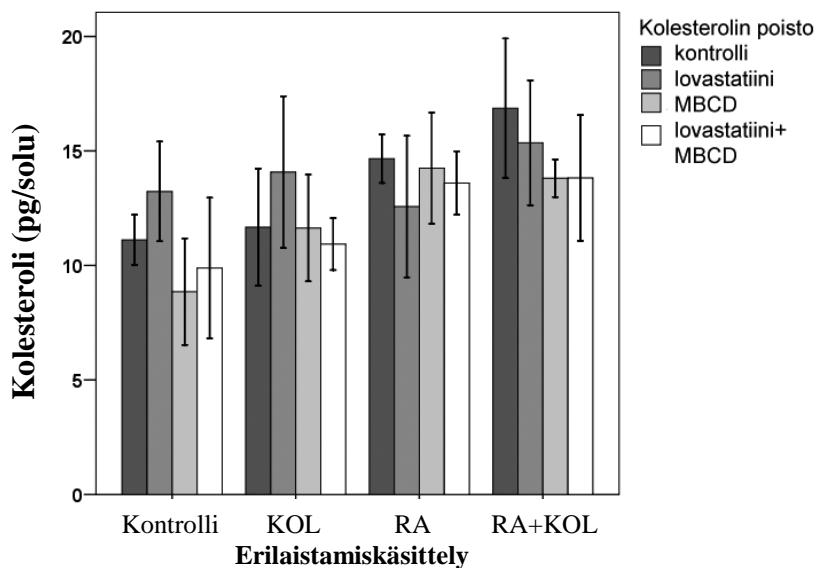
**Kuva 12.** MBCD:n ja lovastatiinin aiheuttama kolesterolin kasautuminen seitsemän päivää viljeltyjen, RA:lla erilaistettujen SH-SY5Y -solujen neuriteissa. Filipiinin fluoresenssi on esitetty intensiteettivärjäyksenä, jossa voimakkaimman fluoresenssin alueet ovat vaaleimpia. Mittajanat 20  $\mu\text{m}$ .

## 4.5 Kolesterolin määrä

RA:lla sekä solujen kolesterolitasapainoa koettelevilla yhdisteillä käsiteltyjen neuroblastooma- ja astrozytooma-solujen sisältämän kolesterolin kokonaismäärä selvitettiin spektrofotometrisesti.

### 4.5.1 SH-SY5Y neuroblastooma-solut

Käsittelemättömissä neuroblastooma-soluissa kolesterolia oli määrittämisen perusteella noin 11 pg/solu. Kolesterolin määrä oli keskimäärin 3 pg suurempi RA:lla erilaistetuissa soluissa, mutta hajonta tuloksissa oli suurta, minkä takia erot eivät ole tilastollisesti merkitseviä. Kolesterolin lisäys mediumiin kasvatuksen ajaksi ei merkittävästi nostanut solujen sisältämän kolesterolin määrää. Lovastatiini-käsittely näytti lisäävän kolesterolin määrää erilaistamattomissa soluissa (keskimäärin 2,5 pg:lla/solu), ja laskevan sitä RA:lla erilaistetuissa soluissa (keskimäärin 2 pg:lla/solu). Puolen tunnin käsittely MBCD:llä poisti kolesterolia soluista, mutta myös näiden tulosten hajonta oli suurta (Kuva 13).

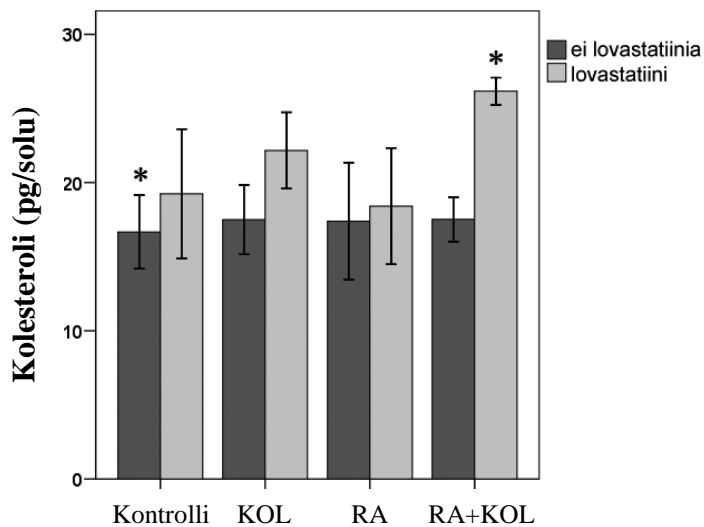


**Kuva 13.** Kolesterolin määrä SH-SY5Y-soluissa kolesterolin ja *orto*-ftaaliidehydriin klorimetrisen reaktion perusteella mitattuna. Soluja kasvatettiin seitsemän päivän ajan RA:n ja/tai kolesterolin (KOL) läsnä ollessa. Kolesterolin poistoon käytettiin lovastatiinia ja/tai MBCD:tä. Palkit edustavat keskiarvoa vähintään kahden spektrofotometrisen määrittämisen tuloksista. Havaintojen keskihajonta on ilmoitettu virhepylväillä.



#### 4.5.2 U373-MG astrozytooma-solut

Määrittysten perusteella astrozytooma-solut sisälsivät neuroblastooma-soluja enemmän kolesterolia, keskimäärin noin 16 pg/solu. Pelkkä lisätty kolesterolia tai RA-käsittely ei nostanut kolesterolin määrää soluissa (Kuva 14). Lovastatiini-käsittely sen sijaan näytti lisäävän kolesterolin määrää, varsinkin jos soluja kasvatettiin ylimäärässä kolesterolia. Selkein ero kontrolliin syntyi RA+kolesterol+lovastatiini -yhdistelmäkäsittelyssä (eron tilastollinen merkitsevyys:  $P = 0,046$ ,  $n = 3$  ja  $2$ , merkitty tähdellä kuvassa 14).



**Kuva 14.** Kolesterolin määrä astrozytooma-soluissa, joita kasvatettiin seitsemän päivän ajan RA:n tai kolesterolin (KOL) läsnä ollessa (tumman harmaat palkit), ja joiden kolesterolisynteesi estettiin lovastatiinilla (vaalean harmaat palkit). Palkit edustavat keskiarvoa vähintään kahden spektrofotometrisen määrittelyn tuloksista. Tähdet osoittavat käsittelyt, joiden välille syntyi tilastollisesti merkitsevä ero ( $P = 0,046$ ,  $n = 3$  ja  $2$ ). Havaintojen keskihajonta on ilmoitettu virhepylväillä.

#### 4.6 Kolesterolin sijoittuminen endosomaalisen reitin päätepisteeseen

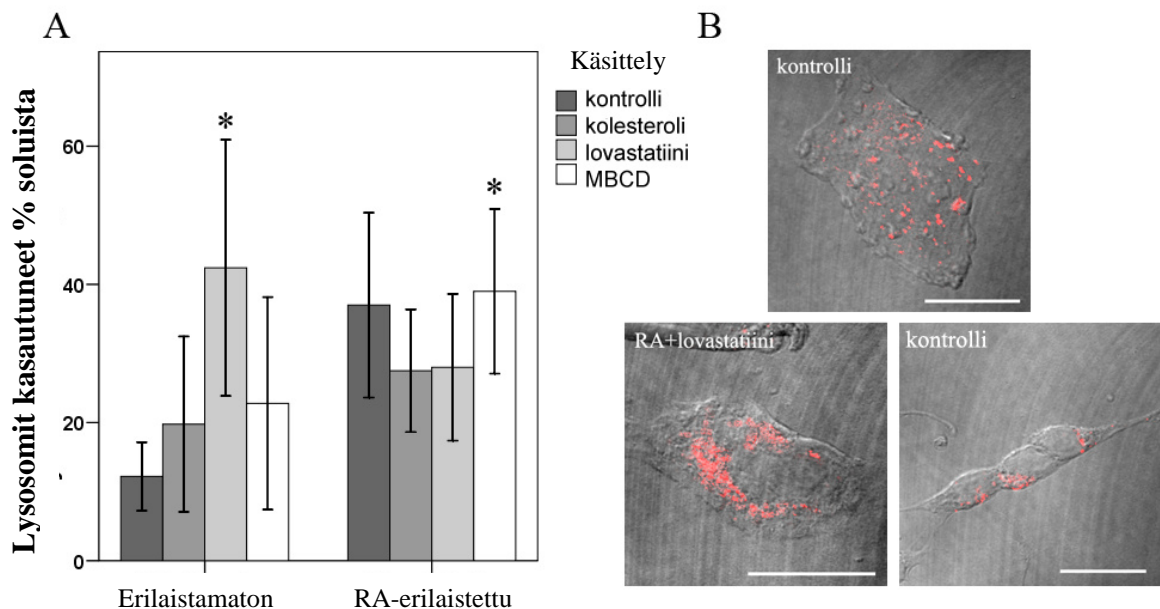
Kolesterolin sijoittumista myöhäisten endosomaalisen rakenteiden yhteyteen tutkittiin värjäämällä neuroblastooma- ja astrozytooma-soluista myöhäisten endosomien ja lysosomien kalvolla sijaitseva Lamp2-proteiini. Lamp2:n ja filipiinin fluoresenssien sijoittumista tarkkailtiin konfokaalimikroskoopilla.

##### 4.6.1 Myöhäisten endosomien ja lysosomien sijainti

Lamp2-positiivisten rakenteiden määrä ja sijoittuminen vaihtelivat solutyypistä riippuen. N-tyyppin neuroblastooma-soluissa lysosomit kerääntyivät usein yhdelle alueelle tuman läheisyyteen, kun S-tyyppin neuroblastooma- sekä astrozytooma-soluissa nämä rakenteet

olivat tyypillisesti enemmän hajallaan (Kuvat 15B ja 16A). Lamp2 -positiivisten rakenteiden taipumus kertyä yhteen osaan solua näytti muuttuvan neuroblastooma-soluissa käsittelyjen myötä. RA-käsittely (tilastollinen ero kontrolliin:  $P = 0,02$ ,  $n = 5$ ) sekä erilaistamattomien solujen lovastatiini-käsittely ( $P = 0,01$ ,  $n = 5$ ) lisäsivät vesikkeleiden kasautumista soluissa (Kuva 15).

Astrocytooma-soluissa RA- tai lovastatiini-käsittelyillä ei ollut selvää vaikutusta Lamp2:ta kalvollaan kantavien vesikkeliön sijaintiin. Näiden solujen Lamp2-positiiviset rakenteet olivat myös kooltaan ja esiintymiseltään yleisesti vaihtelevampia (Kuva 16A alin rivi).



**Kuva 15.** Lamp2-positiivisten vesikkeliön kasautuminen neuroblastooma-soluissa. A) Kuvassa on vertailtu kasautuneet Lamp2-rakenteet sisältävien solujen osuuksia erilaistamattomissa ja RA-erilaistetuissa viljelmissä, joita on käsitelty kolesterolilla, lovastatiinilla tai MBCD:llä. Palkit edustavat keskiarvoja ja virheenä on ilmoitettu keskihajonta 5-7 kuvasta analysoidun solujen ( $n = 100-150$ ) välillä. Tähdet osoittavat käsittelyt, jotka tuottivat tilastollisesti merkitsevän eron erilaistamattomiin kontrollisoluihin nähden. B) Lamp2-positiivisten vesikkeliön (punainen) sijoittuminen N- ja S-tyyppin neuroblastooma-soluissa, ja vesikkeliön kasautuminen RA:n ja lovastatiinin vaikutuksesta S-tyyppin solussa. Soluja viljeltiin seitsemän päivän ajan. Mittajana 20  $\mu\text{m}$ .

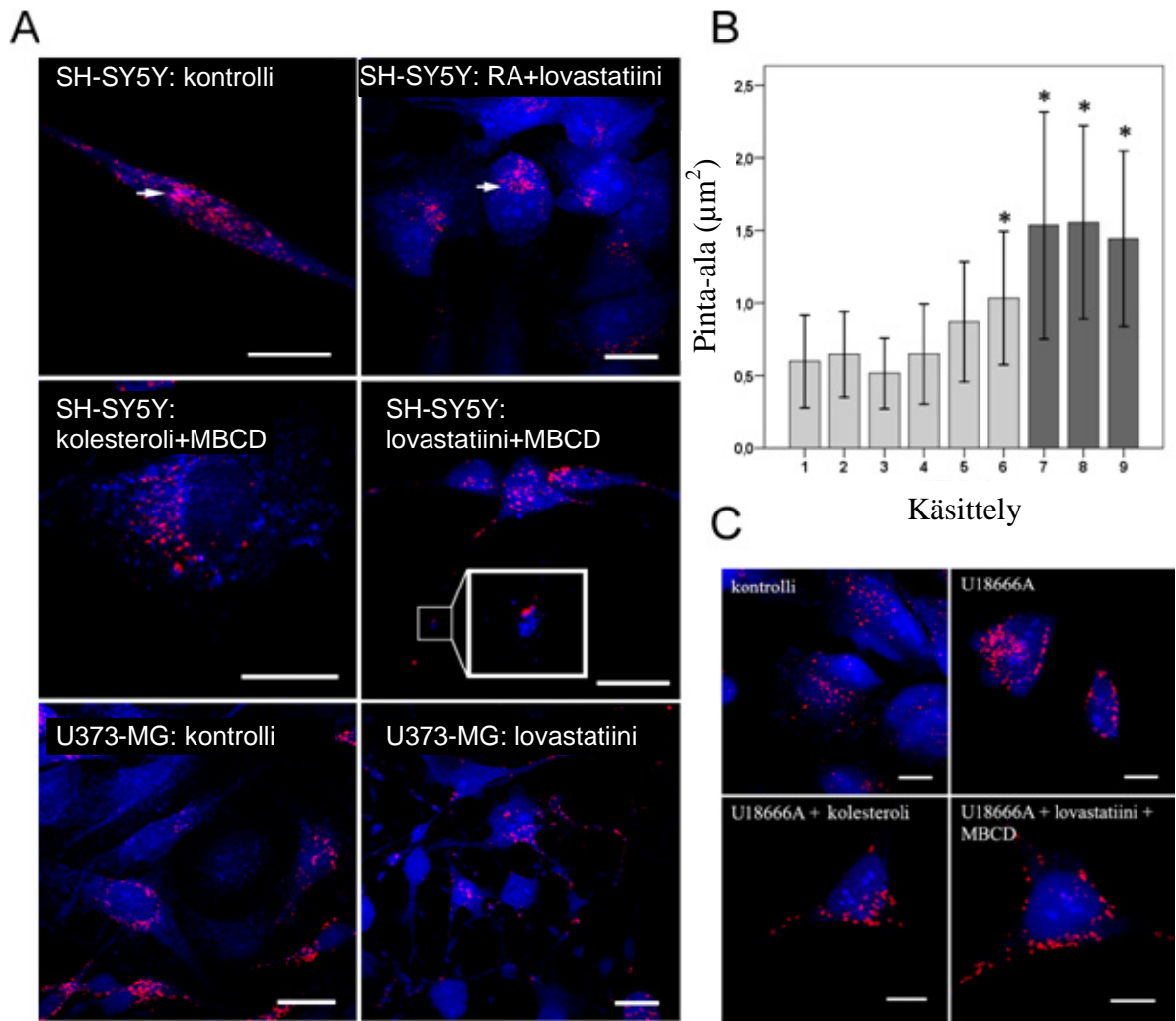
#### 4.6.2 Kolesterolin sijoittuminen myöhäisiin endosomeihin ja lysosomeihin

Konfokaalimikroskooppikuvissa filipiinin fluoresenssi oli sekä neuroblastooma- että astrozytooma soluissa voimakkaan pistemäistä alueilla, joilla oli runsaasti myös Lamp2-positiivisia vesikkeleitä. Varsinkin solujen reunamilla fluoresoivat alueet pysyivät kuitenkin erillisinä (Kuva 16A), eli nämä Lamp2-positiiviset rakenteet olivat suhteellisen kolesteroliköyhiä. Yleisesti fluoresenssien päällekkäisyys vaihteli solukohtaisesti, eikä se näyttänyt lisääntyvän tai vähentyvän erilaistamisen, kolesterolin lisäyksen tai lovastatiinilla ja MBCD:llä suoritettun kolesterolin poiston seurauksena (Kuva 16A).

#### 4.6.3 U18666A:n vaikutus SH-SY5Y neuroblastooma-solujen lysosomeihin

U18666A on hydrofobinen amiini, jota käytetään soluissa Niemann-Pick -fenotyypin jäljittelyyn. 18 tunnin käsittely U18666A:lla ei aiheuttanut havaittavaa muutosta kolesterolin sijoittumisessa neuroblastooma-soluissa (Kuva 16C). Käsittely kuitenkin kaksinkertaisti Lamp2-positiivisten rakenteiden keskimääräisen pinta-alan (Kuva 16B). Tilastollisesti kontrolleja suuremmat rakenteet olivat U18666A:lla käsittelyissä (kaikilla  $P < 0,001$ ,  $n = 20 - 21$ , Kuva 16B) sekä RA:lla erilaistetuissa, lovastatiinilla käsitellyissä neuroblastooma-soluissa ( $P = 0,015$ ,  $n = 24$ , Kuva 16B). Solujen kasvatus ylimäärässä kolesterolia tai kolesterolin poisto solukalvolta MBCD:llä U18666A-käsittelyn päätteeksi ei muuttanut U18666A:n vaikutusta lysosomien kokoon (Kuva 16B).

Myös astrozytooma-soluissa U18666A kasvatti Lamp2-positiivisten endosyyttisten vesikkelien keskimääräistä kokoa, joskin selvästi vähemmän: neuroblastooma-soluissa vesikkelirykelmien keskimääräinen pinta-alan lisäys oli noin  $1 \mu\text{m}^2$  (Kuva 16B), mutta astrozytooma-soluissa vain noin  $0,4 \mu\text{m}^2$  ( $n = 15$ , tuloksia ei ole esitetty tässä).

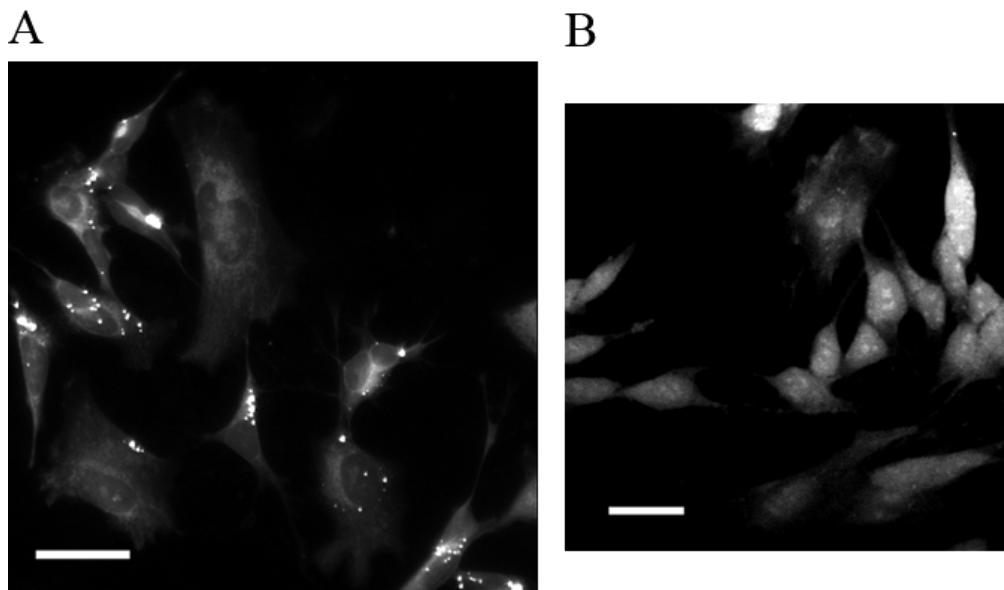


**Kuva 16.** RA:n, kolesterolin, lovastatiinin, MBCD:n ja U18666A:n vaikutus seitsemän päivää viljeltyjen SH-SY5Y- ja U373-MG-solujen lysosomeihin (Lamp2: punainen) ja kolesteroliin (filipiini: sininen). A) Kolesterolin ja Lamp2-positiivisten rakenteiden sijoittuminen SH-SY5Y- ja U373-MG-soluissa. Nuolet osoittavat alueita, joilla Lamp2:n ja filipiinin fluoresenssi on selvästi kolokalisoitunut. Yhdessä kuvista on rajattuna viisinkertaiseksi suurennettu alue SH-SY5Y-solun neuriitista, jossa Lamp2:n ja filipiinin fluoresenssit ovat vierekkään. B) Lamp2-positiivisten rakenteiden keskimääräinen pinta-ala kolesterolilla, RA:lla, lovastatiinilla tai MBCD:llä (vaalean harmaat palkit) sekä U18666A:lla (tumman harmaat palkit) käsitellyissä SH-SY5Y-soluissa: 1. kontrolli, 2. kolesteroli, 3. MBCD, 4. lovastatiini, 5. RA, 6. RA+lovastatiini, 7. U18666A, 8. U18666A+kolesteroli ja 9. U18666A+MBCD. Virheenä keskihajonta 20 - 32 analysoidusta solusta/käsittely. Käsittelyt 6, 7, 8 ja 9 (merkitty tähdillä) tuottivat tilastollisesti merkitsevät erot kontrolliin (1) nähden. C) Lamp2-positiivisten vesikkelien koon kasvu U18666A:lla käsitellyissä SH-SY5Y-soluissa. Mittajanat kaikissa kuvissa 20μm.

#### 4.7 Kolesteroliesterit SH-SY5Y-soluissa

Kolesteroliestereiden kuljetus on erityisen vilkasta steroidigeenisissä soluissa, joihin kuuluvat myös neurosteroideja tuottavat SH-SY5Y neuroblastooma-solut. BODIPY-kolesteroliesterin avulla voidaan seurata valikoivan reitin kautta soluun kulkevaa kolesterolia, sillä hapan lipaasi hajottaa endosomeihin päätyneet BODIPY-molekyylit.

BODIPY-kolesteroliesteri kertyi soluihin nopeasti ja 15 minuutin käsittelyn jälkeen kolesteroliesteriä oli nähtävissä solulimassa sekä heikosti solukalvon läheisyydessä (Kuva 17 A). Eniten fluoresenssia oli havaittavissa tuman ympäristössä sekä hyvin kirkkaissa pisteissä, jotka ovat luultavasti lipidipisaroiksi solulimaan varastoitunutta kolesteroliesteriä. Fluoresenssikuvien perusteella noin 50 % N- ja I-tyyppin soluista (n = 47) ja noin 15 % S-tyyppin soluista (n = 14) sisälsi BODIPY-kolesteroliesterin muodostamia lipidipisaroita. Kuvassa 17 B on esitetty vertailuksi vapaan kolesterolin sijoittuminen SH-SY5Y soluissa.

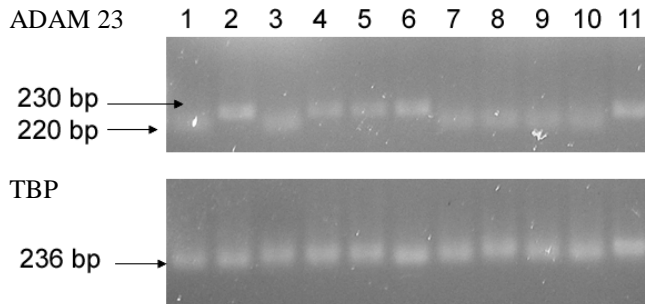


**Kuva 17.** A) BODIPY-kolesteroliesterit ja B) kolesterolin (filipiini-värjäys) seitsemän päivää viljeltyissä SH-SY5Y-soluissa. Mittajanat 25  $\mu\text{m}$ .

#### 4.8 ADAM 23:n ilmentyminen SH-SY5Y-soluissa

ADAM 23 on aivoissa esiintyvä disintegrointi- ja metalloproteiinaasi, jonka on raportoitu osallistuvan neuronaalisten solujen adheesioon. Tätä proteiinia koodittavan lähetti-RNA:n määrää neuroblastooma-soluissa tutkittiin RT-PCR:n avulla. Käänteiskopioitunutta cDNA:n laatu ja PCR-reaktion toiminta varmistettiin kontrollireaktioilla, joissa alukkeet sitoutuivat soluissa jatkuvasti ilmentyvään TBP:n lähetti-RNA:han. Kontrollireaktiot tuottivat

odotetun, noin 236 emäsparin kokoisen DNA:n jokaisesta näytteestä (Kuva 18, alaosa). Soluissa ilmentyneen ADAM 23 lähetti-RNA:n koko sen sijaan vaihteli eri käsittelyjen vaikutuksesta. Solut, joita oli käsitelty lovastatiinilla tai kolesterolilla tuottivat hieman suuremman DNA:n (noin 230 emäsparia) kuin muulla tavoin käsitellyt tai käsittelemättömät solut (noin 220 emäsparia). Lovastatiini ei kuitenkaan vaikuttanut RA:lla erilaistettujen solujen tuottaman ADAM 23:n lähetti-RNA:n kokoon (Kuva 18, yläosa).



**Kuva 18.** ADAM 23:n (yläosa) ja positiivisena kontrollina käytetyn TATA-elementtiin sitoutuvan proteiinin (TBP) lähetti-RNA:n (alaosa) ilmentyminen SH-SY5Y-soluissa. Käsittelyt: 1. kontrolli, 2. lovastatiini, 3. MBCD, 4. lovastatiini, 5. kolesterolia, 6. kolesterolia + lovastatiini, 7. RA, 8. RA + lovastatiini, 9. RA + MBCD, 10. RA+lovastatiini ja 11. RA + kolesterolia. Bp = emäspari.

## 5. Tulosten tarkastelu

### 5.1 Retinoidihappo ja lovastatiini SH-SY5Y- ja U373-MG -solujen erilaistajina

RA on morfogeeni, joka osallistuu keskushermoston kehityksen säätelyyn esimerkiksi ohjaamalla erilaistumattomien solujen kehittymistä neuroneiksi ja hermotukisoluiksi aivojen eri alueilla (Werner ja Deluca, 2002; Faigle ym., 2008). A-vitamiinin johdokset ovat myös potentiaalisia syöpälääkkeitä, sillä retinoidit kykenevät pysäyttämään solusyklin ja aiheuttamaan apoptoosia kasvainsoluissa (Ks. yleiskatsaus Miller, 1998; Encinas ym., 2000). RA:n vaikutukset soluihin välittyvät tumassa sijaitsevien alfa-, beta- ja gamma-retinoidihapporeseptorien sekä retinoidi-X-reseptorien kautta (Cheung ym., 1996).

Lovastatiini puolestaan toimii kolesterolisynteesin nopeuden määräävän entsyymin, HMG-KoA-reduktaasin, kilpailevana estäjänä. Tässä työssä soluja kasvatettiin mediumissa, jossa oli 10 % seerumia. Täten soluilla oli aina (käsittelyistä riippumatta) käytettävissään seerumin sisältämää vapaata ja lipoproteiineihin sitoutunutta kolesterolia.

#### 5.1.1 Retinoidihapon vaikutus morfologiaan ja erilaistumiseen

RA:n on osoitettu erilaistavan SH-SY5Y-soluja kohti neuronaalista solutyyppiä (Pählman ym., 1984; Sarkanen ym., 2007; Roiha, 2008). Tässä tutkimuksessa SH-SY5Y-solulinjan N-tyyppin solut reagoivat seitsemän vuorokauden RA-käsittelyyn hidastamalla jakautumistaan ja kasvattamalla pitkiä neuriiitteja, mitä pidetään merkkina hermosolujen erilaistumisesta.

Myös SH-SY5Y-solulinjaan kuuluvat S-tyyppin solut reagoivat RA:han. Morfogeenilla käsitellyissä viljelmissä suurten S-tyyppin solujen osuus kasvoi selvästi viljelyjakson loppupuolella. Sama havainto on tehty myös aiemmin, mutta S-tyyppin solujen osuus on lisääntynyt vasta viikon pituisen RA-käsittelyn jälkeen (Encinas ym., 2000; Sarkanen ym., 2007). S-tyyppin jättisoluja pidetään kaikkein erilaistuneimpana solutyyppinä SH-SY5Y-solulinjassa (Marzi ym., 2007). Pitkä RA-käsittely saattoi lisätä sekä S-tyyppin solujen erilaistumista että N-tyyppin solujen muuttumista S-tyyppin soluiksi, tosin kaikki havainnot eivät tue tätä teoriaa (Sarkanen ym., 2007). Neuroblastooma-solujen eri solutyyppien osuuksien

muutoksilla on merkitystä syöpähoitojen kannalta, sillä N-tyypin solut ovat luonteeltaan selvästi tuumorigeenisempiä kuin S-tyypin solut (Preis ym., 1988).

RA:lla ei ollut läheskään yhtä selvää vaikutusta U373-MG astrozytooma-solujen jakautumisnopeuteen tai morfologiaan. Aikaisempien tutkimusten perusteella hermotukisolujen herkkyys RA:lle vaihtelee: Ihmisen viljeltyjen astrozyttien sekä muutaman transformoidun solulinjan on raportoitu reagoivan retinoideihin. Esimerkiksi U343-MG, U87-MG ja T98G astrozytooma-solujen on osoitettu erilaistuvan retinoidikäsittelyn vaikutuksesta. RA:n vaikutus ei näissä soluissa ilmeisesti kuitenkaan välittynyt tuman retinoidireseptorien kautta, sillä reseptorien ilmentyminen ei muuttunut käsitellyissä soluissa (Bouterfa ym., 2000; Haque ym., 2007). Esimerkiksi neuroblastooma-soluilla retinoidireseptorien ilmentymisen on osoitettu lisääntyvän aina RA-käsittelyn seurauksena (Joshi ym., 2006).

RA:n apoptoottinen vaikutus syöpäsoluihin vaihtelee erityyppisissä soluissa. Tässä tutkimuksessa RA ei juuri heikentänyt SH-SY5Y- tai U373-MG -solujen elinkykyisyyttä. Hoechst-tumavärijäys osoitti vain lievää apoptoosin lisääntymistä U373-MG -soluilla pelkän RA käsittelyn seurauksena (Taulukko 1).

### 5.1.2 Lovastatiinin vaikutus morfologiaan ja elinkykyisyyteen

Astrozytit kasvattavat ulokkeita erilaistuessaan osana aivojen normaalia kehitystä sekä aktivoituessaan reaktiiviseksi astrogliaosiksi kutsutussa prosessissa. Reaktiiviselle astrogliaosille on tyypillistä välimuotoisten säikeiden rakenneproteiinin, GFAP:n, lisääntyminen soluissa. Aktivoituneita astrozytteja on löydetty aivoista neurologissa sairauksissa, kuten Alzheimerin taudissa, sekä erilaisten vaurioiden yhteydestä ja kasvaimien ympäriltä. Kuitenkin hermotukisolujen aktivaation fysiologinen merkitys on vielä huonosti tunnettu, ja reaktiivinen astrogliaosi voi olla sekä hyödyllinen että haitallinen reaktio (Ks. yleiskatsaus Pekny ja Nilsson, 2005). Viljeltyjen astrozyttien on havaittu muuttuvan reaktiivisiksi muun muassa mangaanin, syklisen adensiinimonofosfaatin ja amyloidi-beta-proteiinin vaikutuksesta (Jalonen ym., 1997; Liao ja Chen, 2001; März ym., 2007). Myös kolesterolin puutteen aiheuttama aktiinifilamenttien hajoaminen muuttaa astrozyttien morfologiaa (Tsai ym., 2006). Tässä tutkimuksessa lovastatiini-käsittely sai aikaan U373-MG astrozytooma-solujen morfologian muuttumisen. Soluille lisätty kolesteroli ei estänyt lovastatiinin vaikutusta,



vaan näytti jopa vahvistavan sitä. Tämän perusteella kolesterolin vähentyminen soluissa ei luultavasti ollut pääasiallinen syy morfologian muutokseen.

Lovastatiinin vaikutukset solujen morfologiaan johtuvat todennäköisimmin kolesterolisynteesireitin välituotteiden, geranyyligeranyylipyrofosfaatin (GGPP) ja farnesyylipyrofosfaatin (FPP) vähentymisestä soluissa (Rubins ym., 1998; Jiang ym., 2004; März ym., 2007). Nämä lipidit osallistuvat pienten G-proteiinien, esimerkiksi RhoA:n isoprenylointiin. Ras-sukuisen Rho-proteiiniperheen p21 jäsenet RhoA, Rac ja Cdc42 säätelevät solujen aktiinitukirankaa ja ohjaavat muun muassa lamellipodien, filopodien ja neuriittien muodostumista. Mikroglia-soluja tutkimalla on osoitettu, että isoprenyyli-lipidiankkurin puuttuessa Rac ei pääse sitoutumaan negatiiviseen säätelijäänsä, Rho-GDP-irtoamisen estäjään (Rho GDI). Tällöin Rac jää solulimaan GTP:tä sitovaksi muodoksi, mikä aiheuttaa muutoksia mikroglia-solujen aktiinitukirankaan (Cordle ym., 2005). Lovastatiinin vaikutus astrozytooma-solussa johtui siis todennäköisimmin kolesterolisynteesireitin toiminnan hidastumisen aiheuttamasta isoprenoidien puutteesta. Tämä teoria selittää myös, miksi lisätty kolesterolia vahvisti lovastatiini-käsittelyn vaikutuksia: ylimääräinen kolesterolia voi toimia HMG-KoA-reduktaasin negatiivisena säätelijänä SREBP:n kautta (Nohturfft ym., 1999) ja näin ollen hidastaa edelleen kolesterolisynteesiä ja isoprenoidien tuottoa.

Lovastatiinin aiheuttama RhoA:n inaktivaatio stimuloi neuriittien kasvua esimerkiksi neuronaaliksi erilaistetuissa PC-12-soluissa (Fernández-Hernando ym., 2005), kun taas Rac:n ja Cdc42:n aktivaation on todettu lisäävän neuriittien kasvua neuroblastooma-soluissa (Kozma ym., 1997; Joshi ym., 2007). Tässä tutkimuksessa lovastatiini-käsittely ei selvästi lisännyt neuriittien määrää erilaistamattomissa SH-SY5Y-soluissa. Työssä käytetty matala lovastatiinipitoisuus saattaa osaltaan selittää heikon vaikutuksen SH-SY5Y neuroblastooma-soluissa. Pieni lovastatiinipitoisuus riitti kuitenkin aktivoimaan astrozytooma-solut, minkä perusteella voi tehdä päätelmiä isoprenoideja tuottavan reaktioketjun aktiivisuudesta erityyppisissä soluissa: Jos näkyvään morfologian muutokseen johtavan isoprenoidivajeen oletetaan olevan samaa luokkaa molemmissa solulinjoissa, tuloksesta voi päätellä, että astrozytooma-soluissa lovastatiini-molekyylit estivät suuremman osan kaikista solun HMG-KoA-reduktaasi-molekyyleistä. Astrozytooma-soluissa saattaa siis olla erilaistamattomiin neuroblastooma-soluihin verrattuna vähemmän HMG-KoA-reduktaasia ja täten pienempi kapasiteetti valmistaa

kolesterolia. Ainakin rotan GA-1 astrozytooma-soluissa kolesterolisynteesin on todettu olevan normaaleja astrozyyttejä hitaampaa (Zhang ym., 2001). Toisaalta on myös mahdollista, että U373-MG -soluissa kolesterolisynteesireitti on SH-SY5Y-soluihin verrattuna tiukemmin säädelty. Tällöin U373-MG -solujen HMG-KoA-reduktaasin määrä on voinut vähentyä seerumin kolesterolin aiheuttaman takaisinkytkävän säätelyn takia.

Lovastatiinin on raportoitu aiheuttavan apoptoosia, mutta toisaalta toimivan myös hermosoluja suojaavana tekijänä (Kumano ym., 2000; Zacco ym., 2003; Famer ja Crisby 2004; Jiang ym., 2004). Tässä tutkimuksessa käytetyt solulinjat kärsivät selvästi voimakkaasta statiini-käsittelystä. Koska tutkimuksen pääasiallinen tarkoitus ei ollut tutkia lovastatiinin aiheuttamaa apoptoosia, kokeissa käytettiin matalaa statiinikonsentraatiota, mikä ei trypaanisini-värjäyksen perusteella merkittävästi heikentänyt neuroblastooma- ja astrozytooma-solujen elinkykyisyyttä. Hoechst-tumavärjäyksen perusteella lovastatiini aiheutti kuitenkin pienenäkin pitoisuutena tumien tiivistymistä astrozytooma-soluissa. Vastaavaa vaikutusta ei ollut havaittavissa neuroblastooma-soluissa. Lovastatiinin on aiemmin raportoitu aiheuttavan apoptoosiin liittyvää tuman ja kromatiinin tiivistymistä ainakin pahanlaatuisessa mesoteliooma-solulinjassa sekä neuroektodermaalisissa kasvainsoluissa (Rubins ym., 1998; Kim ym., 2000).

### 5.1.3 Retinoidihapon ja lovastatiinin yhteisvaikutus

Mielenkiintoista oli, että RA:n erilaistamat SH-SY5Y-solut reagoivat morfologiallaan lovastatiiniin selkeämmin kuin käsittelemättömät solut. RA:n tiedetään vähentävän HMG-KoA-reduktaasin ilmentymistä SK-N-SH-soluissa eli tämä retinoidi vaikuttaa neuroblastooma-soluihin statiinien tavoin (Dimitroulakos ja Yeger, 1996). Edelleen lovastatiinin vaikutusta mukaillen RA:n on osoitettu lisäävän Rac1:n ja Cdc42:n aktiivisuutta SH-SY5Y-soluissa (Joshi ym., 2007). Nämä havainnot saattavat selittää, miksi lovastatiini näytti lisäävän neuritiinien pituutta ja aiheuttavan morfologiamuutoksia erityisesti RA:lla erilaistetuissa SH-SY5Y-soluissa.

Myös astrozytooma-soluilla lovastatiini-käsittelyä seurannut aktivaatio näytti voimakkaammalta RA:lla käsitellyissä viljelmissä. Lisäksi Hoechst-tumavärjäys paljasti, että RA ja lovastatiini aiheuttivat yhteiskäsittelynä astrozytooma-solujen tumien pilkkoutumista, mitä pidetään yleisesti apoptoosin merkinä. Apoptoosin vaikutus ei kuitenkaan näkynyt trypaanisinisellä tehdyissä elinkykyisyysmittauksissa, sillä solut,

joiden tumat olivat Hoechst-värjäyksen perusteella alkaneet hajota, olivat luultavasti vasta apoptoosin alkuvaiheessa, jolloin solukalvo on vielä rakenteeltaan ja toiminnaltaan suhteellisen normaali.

Statiinien syöpävastaisten vaikutusten arvellaan johtuvan kasvutekijöiden aktivoimiin signalointireitteihin osallistuvien molekyylien isoprenylaation estymisestä (Rubins ym., 1998; Agarwal ym., 1999). Statiineja onkin tutkittu mahdollisina syöpälääkkeinä yksin ja yhdistelmänä muiden kemoterapiahoitojen kanssa. Lovastatiinin on huomattu tehostavan yleisten solunsalpaajien, 5-fluorourasiilin ja sisplatiinin, apoptoottista vaikutusta paksusuolensyöpäsoluissa, ja simvastatiinin on osoitettu tukevan N,N'-bis(2-kloroetyyli)-N-nitrosurean (BCNU) syöpävastaista vaikutusta rotan glioomiin (Soma ym., 1995; Agarwal ym., 1999). Edelleen lovastatiini ja PPAR-gamman (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) estäjä troglitazoni muokkaavat yhdessä (mutta eivät yksinään) solusykliä säätelevän koneiston toimintaa muun muassa ihmisen keuhkosyöpä- ja glioblastooma-soluissa (Yao ym., 2006). Myös lovastatiinista ja RA:sta koostuva yhdistelmähoito saattaisi olla toimiva lääke esimerkiksi hermoston syöpiin, sillä molemmat lääkeaineet ovat kohtuullisina annoksina turvallisia ja hyvin siedettyjä. Näiden suhteellisen yleisten, eri tarkoituksiin suunniteltujen lääkeaineiden yhteisvaikutusta aivoissa on syytä tutkia tarkemmin, sillä sekä RA että lovastatiini kykenevät siirtymään verenkierrosta aivoihin veri-aivoesteen läpi (Saheki ym., 1994; Werner ja Deluca, 2002), mikä saattaisi helpottaa esimerkiksi syöpälääkityksen kohdistamista.

## 5.2 Kolesterolin sijoittuminen ja määrä SH-SY5Y- ja U373-MG -soluissa

Kolesterolin sijoittuminen neuroblastooma- ja astrozytooma-soluissa oli filipiinin fluoresenssin perusteella yllättävän samankaltainen. Kolesterolia löytyi runsaasti solujen keskiosista ja varsinkin tuman ympäristöstä, mutta solujen reunamilla ja solukalvolla fluoresenssi oli heikompaa.

### 5.2.1 Kolesteroli sijoittuu solun keskiosiin sekä tumaan ja lamellipodeihin

Filipiinin kirkkain fluoresenssi sijoittui molemmissa solulinjoissa tumaan ja sen ympäristöön. Tuman rakenteissa, kuten tumajyväsissä ja Cajal-rakenteissa, ei ole rajaavaa kalvoa, vaan tuman sisäistä rakennetta ylläpitää tuman matriisi. Tuman tiedetään lisäksi sisältävän fosfolipidejä ja kolesterolia, jotka sijaitsevat paitsi tumakalvolla, myös

kromatiiniin sitoutuneena sekä tuman matriisissa (Khan ja Folch-Pi, 1967; Micheli ym., 1998; Albi ja Magni, 2002; Albi ym., 2003). Kromatiiniin sitoutuneet lipidi-proteiini-kompleksit saattavat osallistua nukleiinihappojen toiminnan säätelyyn: esimerkiksi tuman sfingomyeliinin on ehdotettu ohjaavan entsyymaattista pilkkoutumista vastustavan kaksijuosteisen RNA:n syntyä maksasoluissa (Micheli ym., 1998; Albi ja Magni, 2002). Maksasolujen tuman matriisissa on todettu olevan jopa enemmän kolesterolia kuin kromatiinissa. Kolesterolin uskotaan jäykistävän matriisin rakennetta, millä voi olla vaikutusta pakkaantuneen DNA:n avaamiseen replikaation aikana (Albi ym., 2003). Myös tässä työssä solujen tumissa havaituilla, noin tumajyväsien kokoisilla tiiviillä kolesterolikasaumilla saattaa olla jokin merkitys tuman sisäiselle rakenteelle tai toiminnalle.

Filipiinin fluoresenssi oli tyypillisesti voimakasta ja pistemäistä tuman ympäristössä. Filipiinin ja Lamp2:n fluoresenssit pysyivät useimmiten erillisinä, mikä saattaa tarkoittaa, että pääosa kolesterolista sijoittui myöhäisiä endosomeja ja lysosomeja aikaisempiin rakenteisiin. Filipiinin ei pitäisi myöskään sitoutua lipidipisaroihin, sillä näiden sisältämä kolesterolia on yleensä esteröityneessä muodossa. Koska myös ER:n kolesterolipitoisuus on yleensä matala, tuman ympäristön vahva fluoresenssi on todennäköisesti peräisin Golgin laitteen, varhaisten endosomien sekä erilaisten endosyyttisten lajitteluvälikappaleiden ja monivesikkelisten rakenteiden sisältämään runsaaseen kolesteroliin sitoutuneesta filipiinistä (Hao ym., 2002; Möbius ym., 2003).

Myös solujen lamellipodeissa kolesterolia löytyi erityisinä kasaumina. Kirjallisuuden mukaan solukalvon kolesterolipitoisuus ohjaa solujen adheesiota: Kolesterolin on osoitettu rikastuvan endoteelisolujen lamellipodeissa, joissa lipidi säätelee muun muassa aktiinin polymerisaatiota (Vasanji ym., 2004). Samoin kolesterolin määrän lisäys rotan fibroblastien solukalvolla vahvistaa solujen kiinnittymistä kasvualustaan alfa-1-beta-5-integriinin välityksellä, ja kasvattaa fokaaliadheesiokohtien kokoa (Gopalakrishna ym., 2000). Tässä työssä havaitut kolesterolikertymät solujen lamellipodeissa saattoivat hyvinkin olla kohtia, joissa solun etenevä reuna oli kiinnittynyt maljaan. Adheesiokohdissa solukalvolta vaaditaan erityistä jäykkyyttä, joka voidaan saavuttaa muokkaamalla solukalvon lipidikoostumusta (Ramprasad ym., 2008). Vastaavasti kolesterolin poiston on raportoitu heikentävän hiiren sarkooma-solujen kiinnittymistä alustansa (Ramprasad ym., 2007). Sama ilmiö näkyi myös tässä tutkimuksessa neuroblastooma-soluilla: MBCD-

käsittely irrotti runsaasti soluja maljalta mahdollisesti juuri solukalvon kolesterolin vähenemisen takia.

Vaikka solun kolesterolista jopa yli 60 % on arvioitu sijaitsevan solukalvolla (Warnock ym., 1993), solukalvot fluoresoivat filipiini-käsittelyn jälkeen vain heikosti. Eräs ongelma filipiinin käytössä kolesterolin sijoittumisen tutkimisessa onkin sen vaikutus solun kalvorakenteisiin: Molekyyli sitoo kolesterolia ja rikkoo samalla solukalvon järjestystä aiheuttaen sen heikkenemisen. Filipiini myös tuhoaa mahdollisten lipidilauttojen rakenteen (Ks. yleiskatsaus Gimpl ja Gehrig-Burger, 2007). Vaikka tässä tutkimuksessa filipiini-värjäys suoritettiin kiinnitetyille soluille, pitkän vaikutusajan ja suurehkon pitoisuuden takia filipiini saattoi muuttaa solukalvon rakennetta ja heikentää siten leimaantumista. Värjäysten tulkinnassa on myös otettava huomioon, että filipiini on verrattain heikko fluorofori ja sen fluoresenssi häviää nopeasti UV-laserin vaikutuksesta. Tämä oli havaittavissa kirkkaasti fluoresoivien alueiden nopeana himmenemisenä näytteiden ensimmäisen tarkastelun aikana.

### 5.2.2 Lovastatiinin ja retinoidihapon vaikutus kolesterolin määrään

Käsittelemättömissä neuroblastooma-soluissa filipiini leimasi kirkkaimmin N-tyyppin sekä välimuotoisten I-tyyppin solujen soluliman, mikä voi selittyä ainakin osaksi solujen jakautumisnopeudella: Kantasoluiksi luonnehditut I-tyyppin solut ja hyvin tuumorigeniset N-tyyppin solu jakautuvat paljon S-tyyppin neuroblastooma-soluja nopeammin (Ciccarone ym., 1989; Walton ym., 2004), ja saattavat käsitellä jatkuvan lipidikalvojen valmistuksen takia erityisen runsaasti kolesterolia.

Kolesterolisynteesin esto lovastatiinilla ei vähentänyt kolesterolin määrää, vaan näytti jopa nostavan sitä astrozytooma- ja erilaistamattomissa neuroblastooma-soluissa. Myös muut ovat todenneet, että statiini-käsittely harvoin laskee solujen kokonaiskolesterolipitoisuutta (Kirsch ym., 2003; Sugii ym., 2006). Ilmiö selittyy solujen kyvyllä vastustaa statiinin vaikutusta lisäämällä LDL-reseptorin määrää ja kolesterolin sisäänottoa solukalvolla (März ym., 2007). Lääkkeenä käytetyillä statiineilla on samanlainen vaikutus maksasolujen kolesterolin sisäänottoon, minkä ansiosta veren kolesterolipitoisuus laskee.

Astrozytooma-solut näyttivät kolorimetrisen määrittelyn perusteella sisältävän hieman enemmän kolesterolia kuin neuroblastooma-solut. Ero voi johtua pelkästään

astrozytooma-solujen suuremmasta koosta, tosin myös filipiinin fluoresenssi vaikutti silmämääräisesti arvioituna voimakkaamalta astrozytooma-soluissa. Astrozyyteillä oletetaan olevan hyvin keskeinen rooli hermosolujen tarvitseman kolesterolin tuottamisessa (Mauch ym., 2001; Göritz, 2005), joten havainto astrozytooma-solujen suuremmasta kolesterolipitoisuudesta on uskottava.

Lovastatiinin aktivoimissa astrozytooma-soluissa oli filipiinin fluoresenssin ja kolorimetrinen määrityksen perusteella kontrollisoluja enemmän kolesterolia. Morfologiavaikutuksen perusteella lovastatiini hidasti tehokkaasti näiden solujen kolesterolisynteesiä, joten ylimääräisen kolesterolin on oltava peräisin ympäristöstä. Kolesterolin määrä olikin suurin niissä lovastatiinin aktivoimissa soluissa, joiden kasvuympäristöön oli lisätty ylimääräistä kolesterolia. On otettava huomioon, että kauan *in vitro* -kasvatetut glioblastooma-solut poikkeavat useilta ominaisuuksiltaan aivojen astrozyteistä. Myöskään patologiisiin tiloihin tai aivovaurioon liittyvällä reaktiivisella astrogliaosilla ei välttämättä ole mitään tekemistä lovastatiini-välitteisen aktivaation kanssa. Tästä huolimatta havaintoja voi pohtia aivojen toiminnan kannalta: Jos reseptorivälitteisen kolesterolin sisäänoton lisääntyminen on tyypillistä aivovaurion seurauksena aktivoituville astrozyteille, vaurioalueen neuroneille jää vähemmän kolesterolia. Hermosolut kuitenkin tarvitsevat runsaasti ylimääräistä kolesterolia aksonien uudelleenkasvatukseen (deChaves ym., 1997). Lisääntynyt kilpailu kolesterolista saattaisi ainakin osaksi selittää, miksi astrozyttien aktivoitumisen on havaittu hidastavan keskushermoston vaurioiden parantumista (Bush ym., 1999).

RA voi säädellä solujen lipidiaineenvaihduntaa tuman LXR- ja RXR-reseptorien kautta. Tässä tutkimuksessa RA ei yksinään juuri vaikuttanut kolesterolin määrään astrozytooma-soluissa. RA:lla erilaistetuissa neuroblastooma-soluissa näytti sen sijaan olevan kontrollisoluja enemmän kolesterolia. Tulos ei välttämättä ole kovin luotettava havaintojen suuren hajonnan takia. Lisäksi kirjallisuudessa on ehdotettu, että RA-käsittely ja neuroblastooma-solujen erilaistuminen vähentäisivät solujen kolesterolin määrää: Petroni (2002) kumppaneineen on todennut, että RA vähentää kolesterolin valmistusta SK-N-BE neuroblastooma-soluissa. Fukumoto ynnä muut (2002) ja Fabrizi ynnä muut (1997) puolestaan raportoivat, että RA lisää kolesterolia soluista poistavan ABCA1-kuljettajan määrää ja alentaa kolesterolin endosytoosiin osallistuvan LDL-reseptorin sukuisen

proteiinin (engl. *LDL receptor related protein*) ilmentymistä hiiren ja ihmisen neuroblastooma-soluissa.

RA:lla erilaistetuissa neuroblastooma-soluissa lovastatiini-käsittely näytti vähentävän kolesterolin määrää. Edes solujen kasvatus ylimäärässä kolesterolia ei kumonnut vaikutusta. Tulokset vihjaavat, että näissä soluissa kolesterolisynteesin vähenemisen kompensointi mediumista otettavan kolesterolin määrää lisäämällä ei toiminut yhtä tehokkaasti kuin erilaistamattomissa neuroblastooma-soluissa tai astrozytooma-soluissa. Tulosten tulkinta ei kuitenkaan ole yksioikoista, sillä pelkästään RA-käsittelyn aiheuttamat S- ja N-tyypin solujen suhteellisten osuuksien muutokset saattavat selittää osan syntyneistä eroista. Lisäksi kolesterolin valmistusta ja erityistä säädellään soluissa yleensä itsenäisillä mekanismeilla (Abildayeva ym., 2006). Erilaistumisen ja kolesterolin yhteyden tarkempi selvittäminen edellyttäisi SH-SY5Y-solulinjan eri solutyypin erottelua sekä solujen valmistaman, sisäänsä ottaman ja erittämän kolesterolin yhtäaikaista määrityksiä.

### 5.2.3 MBCD:n vaikutus SH-SY5Y -solujen neuriitteihin ja elinkykyisyyteen

MBCD on syklinen oligosakkaridi, joka kykenee alentamaan solukalvon kolesterolipitoisuutta sitomalla kolesterolia sisäänsä syntyvään vesipakoiseen onteloon. Vaikka tässä työssä MBCD:n vaikutusta solukalvon kolesterolipitoisuuteen ei mitattu, kirjallisuuden tarjoamat todisteet MBCD:n solun kolesterolia vähentävästä vaikutuksesta ovat vakuuttavat (Ks. yleiskatsaus Zidovetzki ja Levitan, 2007).

MBCD-käsittely sekä RA- tai kolesteroli-käsittelyyn yhdistetty lovastatiini saivat aikaan kolesterolin kasautumisen neuroblastooma-solujen neuriiteissa. Tästä MBCD:n aiheuttamasta erikoisesta ilmiöstä löytyy maininta myös toisen tutkimusryhmän raportista (Yip ym., 2001). Kuten lovastatiini, myöskään MBCD-käsittely ei vähentänyt solujen kokonaiskolesterolipitoisuutta, mikä saattoi johtua solujen menettämän kolesterolin nopeasta korvaamisesta. Sekä lovastatiinin että MBCD:n vaikutus neuriittien kolesteroliin on luultavimmin peräisin solukalvon paikallisista kolesterolipitoisuuden muutoksista, joita ei pystynyt erottamaan filipiini-värjäyksen perusteella. Muun muassa lipidilautoilla kolesterolin määrä säätelee useiden signaalintiketjuja käynnistävien reseptorien toimintaa (Roy ym., 1999; Guirland ym., 2004), joten kolesterolin kertyminen neuriiteissa saattoi olla seurausta solukalvolta säädeltävän signaaloinnin muutoksesta. MBCD:llä on havaittu

olevan selvä vaikutus myös rotan viljeltyjen hermosolujen kasvattamiin neuriitteihin: kolesterolin vähennys solukalvolta MBCD:llä lisää selvästi hippokampuksen hermosolujen neuriittien pituutta ja solujen polaarisuutta käsittelyä seuraavien kolmen vuorokauden aikana (Ko ym., 2005). Olisi mielenkiintoista seurata myös neuroblastooma-soluja ja näiden neuriittien muotoa MBCD-käsittelyn jälkeen ja selvittää, ovatko havaitut kolesterolikertymät kenties kohtia, joista neuriitit lähtevät haaroittumaan edelleen.

MBCD heikensi selvästi neuroblastooma-solujen elinkykyisyyttä. Solujen kasvatus ylimääräisen kolesterolin läsnä ollessa vähensi jonkin verran MBCD:n vaikutusta, mikä johtui todennäköisimmin yhdisteen tehon heikkenemisestä sen sidottua mediumiin lisättyä kolesterolia. MBCD:n haitallisuutta on tutkittu tarkasti muun muassa PC-12- ja transformoiduissa Schwannin soluissa. 24 tunnin käsittely pienelläkin MBCD-pitoisuudella aiheuttaa näissä neuraalisiksi muunnetuissa soluissa apoptoosia, jonka oletetaan johtuvan kolesterolin vähentymisestä solukalvon lipidilautoilla (Ulloth ym., 2007). Sen sijaan lyhyt MBCD-käsittely ei useimpien raporttien mukaan heikennä solujen elinkykyisyyttä. Tässä työssä käytetty trypaanisiiniseen perustuva menetelmä ei välttämättä ole paras vaihtoehto solujen elinkykyisyyden määrittämiseen silloin, kun käsittelyt vaikuttavat solukalvon kolesterolin määrään. MBCD:n aiheuttama kolesterolin väheneminen voi muuttaa solukalvon juoksevuutta (Yip ym., 2001) sekä kalvon läpäisevyyttä, mikä saattoi aiheuttaa solujen elinkykyisyyteen nähden liiallista trypaanisiinisen siirtymistä MBCD:llä käsiteltyjen solujen sisään.

Trypaanisiinisen siirtymistä solulimaan onkin käytetty indikaattorina tutkittaessa MBCD:n ja kolesterolipitoisuuden vaikutusta solukalvon läpäisevyyteen (Ottico ym., 2003). Tässä valossa neuroblastooma-solujen elinkykyisyysmäärittelyssä saaduista tuloksista (Kohta 4.2.1) voi tehdä edellä esitettyjä havaintoja tukevia päätelmiä: RA:lla käsitellyissä soluissa selvimmin solukalvon läpäisevyyttä lisäsi pelkkä MBCD, kun taas kontrollisoluissa suurin vaikutus oli MBCD+lovastatiini-yhdistelmäkäsittelyllä. Edelleen lisätty kolesteroli vähensi solukalvon läpäisevyyttä enemmän MBCD+lovastatiini- kuin pelkän MBCD-käsittelyn yhteydessä. Nämä havainnot vihjaavat, että MBCD:n ohella sekä RA että lovastatiini muokkasivat jollain tavalla solukalvojen koostumusta. Tämä voi auttaa selittämään, miksi kolesteroli kasautui solujen ulokkeissa myös lovastatiinin vaikutuksesta ja erityisesti RA:lla erilaistetuissa soluissa, joita oli käsitelty MBCD:llä.



### 5.3 Kolesterolin vaikutus SH-SY5Y -solujen endosomaalisiin vesikkeleihin

Kolesterolin siirtyminen ulos myöhäisistä endosomeista ja lysosomeista on tärkeä vaihe lipidin solunsisäisen kierrätyksen kannalta. RA-välitteinen erilaistaminen, lovastatiini tai kolesterolin poisto solukalvolta MBCD:llä eivät tässä suhteessa heikentäneet solujen kykyä käsitellä kolesterolia, sillä käsitellyt eivät aiheuttaneet silmännähtävää kolesterolin kertymistä Lamp2-positiivisiin rakenteisiin. Edes NPC-fenotyypin jäljittelyyn käytettävä hydrofobinen amiini U18666A ei filipiinin fluoresenssin perusteella aiheuttanut kummassakaan käytetyssä solulinjassa selkeää kolesterolin kasautumista lysosomeihin. Tämä poikkeaa aikaisempien, muun muassa fibroblasteilla ja SK-N-SH neuroblastooma-soluilla suoritettujen tutkimusten tuloksista (Liscum ja Faust, 1989; Liscum ja Collins, 1991; Sparrow ym., 1999). Koska U18666A:n on raportoitu estävän nimenomaan LDL-reseptorin välityksellä soluun otetun kolesterolin kuljetusta (Liscum ja Collins, 1991), aineen heikko vaikutus saattoi ainakin teoriassa johtua siitä, että solut valmistivat kaiken kolesterolin itse. Tämä on kuitenkin epätodennäköistä, sillä U18666A ei näyttänyt aiheuttavan kolesterolin kasautumista edes lovastatiinilla käsitellyissä astrozytooma- tai neuroblastooma-soluissa. Heikko vaikutus saattoi johtua ainakin osittain käytetyn U18666A-reagenssin tehokkuuden heikkenemisestä pitkän säilytysajan takia.

U18666A-käsittely lisäsi kuitenkin Lamp2-positiivisten vesikkelikasaumien keskimääräistä kokoa sekä neuroblastooma- että astrozytooma-soluissa. U18666A on heikko emäs, joten myöhäisten endosomien ja lysosomien pH:n nousu saattaa selittää rakenteiden koon kasvun. Toisaalta Sobo ynnä muut (2007) raportoivat, että koon lisäyksen ohella U18666A estää lysosomien liikettä ja muuttaa niiden proteiini- ja lipiditasapainoa. Tutkimuksissa selvisi, että lysosomien sisäistä pH:ta säätelevä protonipumppu, vakuolaarinen ATPaasi, sijoittuu lysosomien kalvolla DRM:hin. U18666A:n aiheuttama, mahdollisesti kolesterolin lisääntymisestä aiheutuva kalvojen ominaisuuksien muutos heikentää vakuolaarisen ATPaasin aktiivisuutta, mikä johtaa lysosomien sisäisen pH:n nousuun (Sobo ym., 2007; Lafourcade ym., 2008). Filipiinin fluoresenssin perusteella näkymätön, mutta lysosomien toiminnan kannalta merkittävä kolesterolin kertyminen ja sen aiheuttama pH:n nousu lysosomeissa saattaa olla osallisena myös meidän havaitsemaamme Lamp2-positiivisten rakenteiden koon kasvuun. Mekanismin monimutkaisuudesta antaa viitteitä se, että suora kolesterolin lisäys tai sen

poisto neuroblastooma-solujen solukalvolta MBCD:llä ei muuttanut U18666A:n vaikutusta Lamp2-positiivisten vesikkelikasaukien kokoon.

Mielenkiintoista kyllä, lovastatiinilla oli U18666A:ta muistuttava vaikutus RA:lla erilaistettujen solujen lysosomien kokoon. RA ja lovastatiini-käsittelyt lisäsivät myös Lamp2-positiivisten rakenteiden keräytymistä yhteen neuroblastooma-solujen solulimassa. Vaikutelma kasautumisesta aiheutui todennäköisimmin lysosomien koon kasvusta, niiden liikkeiden hidastumisesta ja mahdollisesti vesikkeleiden määrän samanaikaisesta lisääntymisestä. RA:n on havaittu lisäävän lysosomaalisten entsyymien kuljetusta lysosomeihin (Kang ym., 1998), ja statiinien on todettu hidastavan vesikkelien liikkeitä. Sugii (2006) on kollegoineen todennut solussa valmistetulla kolesterolilla olevan tärkeän roolin endosyyttisessä liikenteessä. Kirjoittajat eivät kuitenkaan pystyneet selvittämään, miten endogeenisen kolesterolin puute muuttaa endosomeja ja hidastaa niiden liikkeitä.

#### 5.4 Kolesterolin vaikutus ADAM 23:n ilmentymiseen SH-SY5Y -soluissa

ADAM (engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase*) -geeniperheen tuotteet toimivat soluissa tarttumista säätelevinä disintegriineinä sekä kudosta hajottavina ja solukalvon proteiineja muokkaavina metalloproteinaaseina. ADAM-proteiinit ovat verrattain suuria ja koostuvat erillisistä pro-, metalloproteinaasi-, disintegriini-, kysteiinirikkaasta, epidermaalisen kasvutekijän kaltaisesta ja solukalvon läpäisevästä domeenista sekä soluliman puoleisesta hännästä. Tähän mennessä perheeseen kuuluvia proteiineja on kuvattu yli 30 erilaista. Vähän aikaa sitten löydetty, samaan alaperheeseen kuuluvat ADAM 11, 22 ja 23 ilmentyvät lähes ainoastaan hermokudoksessa, ja niillä uskotaan olevan merkitystä keskushermoston normaalille kehitykselle ja toiminnalle (Kärkkäinen ym., 2000; Sagane ym., 2005; Sun ym., 2007). Hiiret, joilta puuttuu toimiva ADAM 22-geeni, kärsivät ääreishermoston myelinaation puutteen aiheuttamista hermostollisista ongelmista ja kuolevat nuorena iässä (Sagane ym., 2005). Aivojen normaalin kehityksen ohjaamisen lisäksi ADAM-proteiineilla uskotaan olevan vaikutusta syövän syntyyn: solujen kiinnittyminen soluväliaineeseen ja toisaalta soluväliaineen hajotus ovat tärkeitä prosesseja pahanlaatuisten kasvaimien synnyssä ja niiden etäpesäkkeiden leviämässä. ADAM 11:n, 22:n ja 23:n sisältämä metalloproteinaasi-osan on todettu olevan inaktiivinen, ja nämä proteiinit toimivatkin lähinnä solujen kiinnittymisessä. ADAM 23:n on jo aiemmin osoitettu ilmenevän neuroblastooma- ja astrozytooma-soluissa ja välittävän muun muassa

NB100 ja SH-SY5Y neuroblastooma-solujen kiinnittymistä kasvualustaan alfa-v-beta-3-integriinin välityksellä (Cal ym., 2000).

RT-PCR -tulosten perusteella SH-SY5Y-solut ilmensivät ADAM 23:n lähetti-RNA:ta, mutta geenituotteen koko vaihteli eri tavoilla käsitellyissä soluissa. Käyttämämme alukkeet oli suunniteltu niin, että ne sitoutuvat eri eksoneihin. Täten suurempi geenituote saattoi olla peräisin silmikoitumattomasta RNA:sta tai RNA-eristystuotteeseen jääneestä genomisesta DNA:sta. Tässä tapauksessa lovastatiini ja kolesteroli estivät oikean lähetti-RNA:n synnyn. Kolesterolin onkin aiemmin todettu vähentävän ADAM 23:n ilmentymistä SH-SY5Y-soluissa (Teppola, 2008). Toisaalta hiiren ääreishermostossa, selkäytimessä ja viljellyissä Schwannin soluissa tiedetään kaikissa ilmenevän erikokoinen ADAM 22-muoto (Sagane ym., 2005). Myös ADAM 23:a on löydetty hiiren aivoista ainakin neljänä eri lähetti-RNA-muotona (Kärkkäinen ym., 2000). Kirjallisuuden valossa näyttäisi siis myös mahdolliselta, että lovastatiini- ja kolesteroli-käsitellyissä soluissa havaittu suurempi geenituote on syntynyt tarkoituksenmukaisesti vaihtoehtoisten eksonien silmikoinnin kautta. Tulosten selventäminen edellyttäisi kokeiden lisätoistoja ja PCR-tuotteiden sekvensointia.

Sekä lovastatiini- että kolesteroli-käsittelyt oletettavasti vähensivät kolesterolin biosynteesiä ja lisäsivät ulkopuolelta otetun kolesterolin määrää soluissa. Poikkeuksen muodostivat RA:lla erilaistetut solut, joissa lovastatiini ei näyttänyt lisäävän ulkopuolisen kolesterolin sisäänottoa tai aiheuttavan ADAM 23 lähetti-RNA:n koon kasvua. Solun ulkopuolelta otetun kolesterolin suurempi määrä soluissa voisi siis olla suuremman geenituotteen ilmenemiseen johtava tekijä. Ajatus, että solun käyttämän kolesterolin lähteellä voi olla merkitystä ADAM-perheen lähetti-RNA:n silmikoinnille ja toiminnalle ei ole täysin perusteeton, sillä kolesterolin biosynteesin eston on havaittu lisäävän ADAM 10:n ilmentymistä hermostollisissa soluissa (Kojro ym., 2001).

Jos kolesterolilla todella on vaikutusta esimerkiksi ADAM-proteiinien toimintaan disintegriininä, statiinit voisivat tarjota keinon säädellä syöpien etäpesäkkeiden syntyä. Lovastatiinin onkin jo todettu estävän ainakin rintasyövän ja keuhkon kasvainten etäpesäkkeiden syntyä hiirissä (Farina ym., 2002).

## 5.5 Yhteenveto: kolesteroli SH-SY5Y- ja U373-MG -soluissa

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kolesterolin sijoittumista ihmisen hermostollisissa SH-SY5Y- ja U373-MG -syöpäsolulinjoissa. Syöpäsoluilla on usein omat kolesterolin käsittelyyn liittyvät erikoisuutensa, joita pyrittiin valaisemaan erilaistamalla tutkittavia soluja ja muuttamalla solujen kolesterolitasapainoa.

Solujen ensisijaisena erilaistajana käytettiin RA:ta, joka onnistuneesti muutti SH-SY5Y-solujen morfologiaa ja hidasti solujen jakautumisnopeutta. Hieman yllättäen myös lovastatiini osoitti kykynsä solujen erilaistajana, ja sai astrozytooma-solut kasvattamaan ulokkeita tavalla, joka muistuttaa suuresti muun muassa aivovaurioiden yhteydessä esiintyvää astrogliaosia. Aivoissa reaktiiviseen astrogliaosiin liittyy usein GFAP:n ilmentymisen lisääntyminen. Immunofluoresenssivärjäyksen perusteella GFAP:n määrä ei kuitenkaan näyttänyt lisääntyvän aktivoituneissa U373-MG -soluissa, vaan muutos ilmeni ainoastaan välimuotoisten filamenttien rakenteen tiivistymisenä.

Kolesteroli sijoittuminen sekä erilaistetuissa että erilaistamattomissa neuroblastooma- ja astrozytooma-soluissa oli yllättävän yhtenäinen. Kolesterolin kierrätys ja ohjaus soluissa vaikutti toimivalta, sillä kasvatus ylimääräisen kolesterolin läsnä ollessa ei merkittävästi muuttanut kolesterolin määrää tai sijoittumista soluissa. Ylimääräistä kolesterolia ei myöskään kertynyt Lamp2-positiivisiin myöhäisiin endosomeihin tai lysosomeihin.

Lovastatiinin aktivoimat astrozytooma-solut näyttivät sisältävän kontrollisoluja enemmän kolesterolia, joka on oletettavasti peräisin solun ulkopuolisista lähteistä. Myös erilaistamattomat SH-SY5Y-solut vastasivat kolesterolin synteesireitin estoon lisäämällä kolesterolin ottoa mediumista. Ainoastaan RA:lla erilaistetuissa neuroblastooma-soluissa kolesterolin kokonaismäärä laski lovastatiini-käsittelyn seurauksena. Erilaistamattomissa soluissa havaittu kolesterolisynteesin eston ylikompensaatio saattaa olla osoitus solujen ylikierroksilla toimivasta kolesteroliaineenvaihdunnasta.

Kolesteroliaineenvaihdunta on ilmeisen vilkasta molemmissa tutkituissa solulinjoissa. SH-SY5Y neuroblastooma-soluissa kolesterolin synteesireitti saattoi toimia astrozytooma-soluja nopeammin, mutta astrozytooma-solut sisälsivät kokonaisuudessaan neuroblastooma-soluja enemmän kolesterolia. SH-SY5Y-solujen tiedetään myös valmistavan neurosteroideja, mikä edellyttää kolesterolin tehokasta, reseptorivälitteistä sisäänottoa soluihin (Guarneri ym., 2000). Neuroblastooma-solujen kyky tehokkaaseen

kolesterolin käsittelyyn ilmeni BODIPY-kolesteroliesterin nopeana sisäänottona ja kolesteroliestereiden kertymisenä lipidipisaroiksi erityisesti N- ja I-tyypin SH-SY5Y-soluissa. Nopea kolesterolin solunsisäinen liikenne saattaa osaltaan selittää, miksi kolesterolin sijoittuminen tai määrä ei muuttunut SH-SY5Y-solujen soomaosissa kolesterolia tehokkaasti solukalvolta poistavan MBCD-käsittelyn seurauksena.

Kolesterolitasapinon koettelu saattoi aiheuttaa muutoksia SH-SY5Y- tai U373-MG -solujen solukalvoissa: MBCD lisäsi huomattavasti neuroblastooma-solujen solukalvon läpäisevyyttä trypaanisiiniselle, ja MBCD- sekä lovastatiini-käsittelyt johtivat kolesterolikasaumien ilmaantumiseen erilaistettujen SH-SY5Y-solujen neuriiiteissa sekä aktivoituneiden astrozytooma-solujen ulokkeissa. Vaikutusten takana on todennäköisimmin lipidilauttojen kolesterolipitoisuuden muuttuminen, minkä tiedetään vaikuttavan muun muassa neuriiittien kehitystä ohjaavien signaalintiketjujen toimintaan. Myös neuroblastooma-solujen Lamp2-positiivisten endosomaalisten vesikkeleiden kanssa ja sijainnissa esiintyi muutoksia U18666A-, RA- ja lovastatiini-käsittelyiden seurauksena. Se, johtuivatko vaikutukset suoraan myöhäisiä endosomeja ja lysosomeja rajaavan kalvon kolesterolipitoisuuden muutoksesta, ei tässä tutkimuksessa selvinnyt.

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella voidaan siis todeta, että SH-SY5Y- ja U373-MG -solut sisältävät runsaasti kolesterolia ja kykenevät säilyttämään kolesterolitasapainonsa myös muuttuvassa ympäristössä. Kolesterolin synteesireitin esto lovastatiinilla muuttaa kuitenkin erityisesti RA:lla käsiteltyjen neuraalisten syöpäsolujen toimintaedellytyksiä, mikä kannustaa jatkamaan statiinien tutkimista mahdollisina syöpien ja hermostoa rappeuttavien sairauksien hoitona.

## 6. Lähdeluettelo

- Abildayeva K., P.J. Jansen, V. Hirsch-Reinshagen, V.W. Bloks, A.H. Bakker, F.C. Ramaekers, J. de Vente, A.K. Groen, C.L. Wellington, F. Kuipers ja M. Mulder. 2006. 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 281:12799-808.
- Agarwal B., S. Bhendwal, B. Halmos, S.F. Moss, W.G. Ramey ja P.R. Holt. 1999. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 5:2223-9.
- Alberts A.W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch ja J. Springer. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:3957-61.
- Albi E., S. Cataldi, G. Rossi ja M.V. Magni. 2003. A possible role of cholesterol-sphingomyelin/phosphatidylcholine in nuclear matrix during rat liver regeneration. *J Hepatol.* 38:623-8.
- Albi E. ja M.V. Magni. 2002. The presence and the role of chromatin cholesterol in rat liver regeneration. *J Hepatol.* 36:395-400.
- Anderson R.A., R.S. Byrum, P.M. Coates ja G.N. Sando. 1994. Mutations at the lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase gene locus in Wolman disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:2718-22.
- Anderson R.A., G.M. Bryson ja J.S. Parks. 1999. Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype in Wolman and cholesterol ester storage disease. *Mol Genet Metab.* 68:333-45.
- Baumann N.A., D.P. Sullivan, H. Ohvo-Rekilä, C. Simonot, A. Pottekat, Z. Klaassen, C.T. Beh ja A.K. Menon. 2005. Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry.* 44:5816-26.
- Biagiotti T., M. D'Amico, I. Marzi, P. Di Gennaro, A. Arcangeli, E. Wanke ja M. Olivotto. 2006. Cell renewing in neuroblastoma: electrophysiological and immunocytochemical characterization of stem cells and derivatives. *Stem Cells.* 24:443-53.
- Biedler J.L., L. Helson ja B.A. Spengler. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33:2643-52.
- Biedler J.L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner ja L.S. Freedman. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res.* 38:3751-7.
- Björkhem I., D. Lütjohann, O. Breuer, A. Sakinis ja A. Wennmalm. 1997. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with  $^{18}O_2$  techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 272:30178-84.
- Björkhem I., D. Lütjohann, U. Diczfalusy, L. Stähle, G. Ahlborg ja J. Wahren. 1998. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res.* 39:1594-600.
- Bouterfa H., T. Picht, D. Kess, C. Herbold, E. Noll, P.M. Black, K. Roosen ja J.C. Tonn. 2000. Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines. *Neurosurgery.* 46:419-30.
- Brady J.D., C.T. Rich, L.Xuan, K. Stafford, C.J. Fowler, L. Lynch, J.W. Karpen, R. L. Brown, ja J.R. Martens. 2003. Functional Role of Lipid Raft Microdomains in Cyclic Nucleotide-Gated Channel Activation. *Mol Pharmacol* 65:503-511.

- Brown D.A ja E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:111-36.
- Bush T.G., N. Puvanachandra, C.H. Horner, A. Polito, T. Ostefeld, C.N. Svendsen, L. Mucke, M.H. Johnson ja M.V. Sofroniew. 1999. Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *Neuron.* 23: 297-308.
- Cal S., J.M.P. Freije, J.M. López, Y. Takada ja C. López-Otín. 2000. ADAM 23/MDC3, a Human Disintegrin That Promotes Cell Adhesion via Interaction with the  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin through an RGD-independent Mechanism. *Mol Biol Cell.* 11:1457-69.
- Cecchi C., F. Rosati, A. Pensalfini, L. Formigli, D. Nosi, G. Liguri, F. Dichiaro, M. Morello, G. Danza, G. Pieraccini, A. Peri, M. Serio ja M. Stefani. 2008. Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against A $\beta$  toxicity by increasing membrane cholesterol content. *J Cell Mol Med.* 12: 1990-2002.
- Cheung B., J.E. Hocker, S.A. Smith, U. Reichert, M.D. Norris, M. Haber, B.W. Stewart ja G.M. Marshall. 1996. Retinoic acid receptors beta and gamma distinguish retinoid signals for growth inhibition and neurogenesis in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 229:349-54.
- Clee S.M., J. Kastelein, M. van Dam, M. Marcil, K. Roomp, K.Y. Zwarts, J.A. Collins, R. Roelants, N. Tamasawa, T. Stulc, S. Suda, R. Ceska, B. Boucher, B. Rondeau, C. DeSouich, A. Brooks-Wilson, H.O.F. Molhuizen, J. Frohlich, J. Jr. Genest ja M.R. Hayden. 2000. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *J. Clin. Invest.* 106: 1263-1270.
- Ciccarone V., B.A. Spengler, M.B. Meyers, J.L. Biedler ja R.A. Ross. 1989. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* 49:219-25.
- Cole S.L., A. Grudzien, I.O. Manhart, B.L. Kelly, H. Oakley ja R. Vassar. 2005. Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloid beta-peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 280:18755-70.
- Cordle A., J.Koenigsnecht-Talboo, B. Wilkinson, A. Limpert ja G. Landreth. 2005. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *J Biol Chem.* 280:34202-9.
- DeAngelis G. 2004. The influence of statin characteristics on their safety and tolerability. *Int J Clin Pract.* 58:945-55.
- DeChaves E.I., A.E. Rusiñol, D.E. Vance, R.B. Campenot ja J.E. Vance. 1997. Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. *J Biol Chem.* 272:30766-73.
- DeLau L.M., P.J.Koudstaal, A. Hofman ja M.M. Breteler. 2006. Serum cholesterol levels and the risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 164:998-1002.
- Dietschy J.M, ja S.D. Turley. 2004. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 45:1375-97.
- Dimitroulakos J. ja H., Yeger. 1996. HMG-CoA reductase mediates the biological effects of retinoic acid on human neuroblastoma cells: lovastatin specifically targets P-glycoprotein-expressing cells. *Nat Med.* 2:326-33.
- Dolev I. ja D.M. Michaelson. 2004. A nontransgenic mouse model shows inducible amyloid-beta (A $\beta$ ) peptide deposition and elucidates the role of apolipoprotein E in the amyloid cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:13909-14.
- Du X., I. Kristiana, J. Wong ja A.J. Brown. 2006. Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. *Mol Biol Cell.* 17:2735-45.

- Encinas M., M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, A. Muhaisen, V. Ceña, C. Gallego ja J.X. Comella. 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem.* 75:991-1003.
- Endo A., M. Kuroda ja K. Tanzawa. 1976. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 72: 323-6.
- Fabrizi C., R. Businaro, T. Persichini, L. Fumagalli ja G.M. Lauro. 1997. The expression of the LDL receptor-related protein (LRP) correlates with the differentiation of human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 776:154-61.
- Faigle R., L. Liu, P. Cundiff, K. Funa, Z. Xia. 2008. Opposing effects of retinoid signaling on astroglialogenesis in embryonic day 13 and 17 cortical progenitor cells. *J. Neurochem.* 106:1681-98.
- Famer D. ja M. Crisby. 2004. Rosuvastatin reduces caspase-3 activity and up-regulates alpha-secretase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to A beta. *Neurosci Lett.* 371:209-14.
- Farina H.G., D.R. Buplik, D.F. Alonso ja D.E. Gomez. 2002. Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 19:551-9.
- Fernández-Hernando C., Y. Suárez ja M.A. Lasunción. 2005. Lovastatin-induced PC-12 cell differentiation is associated with RhoA/RhoA kinase pathway inactivation. *Mol Cell Neurosci.* 29:591-602.
- Fitzky B.U., F.F. Moebius, H. Asaoka, H. Waage-Baudet, L. Xu, G. Xu, N. Maeda, K. Kluckman, S. Hiller, H. Yu, A.K. Batta, S. Shefer, T. Chen, G. Salen, K. Sulik, R.D. Simoni, G.C. Ness, H. Glossmann, S.B. Patel ja G.S. Tint. 2001. 7-Dehydrocholesterol-dependent proteolysis of HMG-CoA reductase suppresses sterol biosynthesis in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz/RSH syndrome. *J. Clin. Invest.* 108: 905-915.
- Frank P.G., F. Galbiati, D. Volonte, B. Razani, D.E. Cohen, Y.L. Marcel ja M.P. Lisanti. 2001. Influence of caveolin-1 on cellular cholesterol efflux mediated by high-density lipoproteins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C1204-C1214.
- Fukumoto H., A. Deng, M.C. Irizarry, M.L. Fitzgerald, ja G.W. Rebeck. 2002. Induction of the Cholesterol Transporter ABCA1 in Central Nervous System Cells by Liver X Receptor Agonists Increases Secreted ABeta Levels. *J. Biol. Chem.*, 277: 48508-48513.
- Fünfschilling U., G. Saher, L. Xiao, W. Möbius ja K-A. Nave. 2007. Survival of adult neurons lacking cholesterol synthesis *in vivo*. *BMC Neurosci.* 8:1.
- Gal D., E.R. Simpson, J.C. Porter ja J.M. Snyder. 1982. Defective internalization of low density lipoprotein in epidermoid cervical cancer cells. *J Cell Biol.* 92:597-603.
- Gimpl G., ja K. Gehrig-Burger. 2007. Cholesterol reporter molecules. *Biosci Rep.* 27:335-58.
- Gopalakrishna P., S.K. Chaubey, P.S. Manogaran ja G. Pande. 2000. Modulation of alpha5beta1 integrin functions by the phospholipid and cholesterol contents of cell membranes. *J Cell Biochem.* 77:517-28.
- Gong J-C., M. Kobayashi, H. Hayashi, K. Zou, N. Sawamura, S.C. Fujita, K. Yanagisawa ja M. Michikawa. 2002. Apolipoprotein E (ApoE) Isoform-dependent Lipid Release from Astrocytes Prepared from Human ApoE3 and ApoE4 Knock-in Mice. *J. Biol. Chem.* 277: 29919-29926.
- Guirland C., S. Suzuki, M. Kojima, B. Lu ja J-Q. Zheng. 2004. Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron.* 42:51-62.
- Göritz C., D.H. Mauch DH ja F.W. Pfrieger. 2005. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci.* 29:190-201.



- Hao M., S.X. Lin, O.J. Karylowski, D. Wüstner, T.E. McGraw ja F.R. Maxfield. 2002. Vesicular and non-vesicular sterol transport in living cells. The endocytic recycling compartment is a major sterol storage organelle. *J Biol Chem.* 277:609-17.
- Haque A., A. Das, L.M. Hajiaghamohseni, A. Younger, N.L. Banik ja S.K. Ray. 2007. Induction of apoptosis and immune response by all-trans retinoic acid plus interferon-gamma in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells. *Cancer Immunol Immunother.* 56:615-25.
- Heino S., S. Lusa, P. Somerharju, C. Ehnholm, V.M. Olkkonen ja E.Ikonen. 2000. Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:8375-80.
- Heinecke J.W. 1998. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis.* 141: 1-15.
- Hentosh P., S.H. Yuh, C.E. Elson ja D.M. Peffley. 2001. Sterol-independent regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in tumor cells. *Mol Carcinog.* 32:154-66.
- Hering H., C.C. Lin ja M. Sheng. 2003. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci.* 23:3262-71.
- Hur J.Y., H. Welander, H. Behbahani, M. Aoki, J. Frånberg, B. Winblad, S. Frykman ja L.O. Tjernberg. 2008. Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J.* 275:1174-87.
- Igbavboa U., N.A. Avdulov, S.V. Chochina ja W.G. Wood. 1997. Transbilayer distribution of cholesterol is modified in brain synaptic plasma membranes of knockout mice deficient in the low-density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *J Neurochem.* 69:1661-7.
- Ikonen E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:125-38.
- Innerarity T.L., K.H. Weisgraber, K.S. Arnold, R.W. Mahley, R.M. Krauss, G.L. Vega ja S.M. Grundy. 1987. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:6919-23.
- Istvan E.S ja J. Deisenhofer. 2001. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science.* 292: 1160 – 1164.
- Ito J, L.Y. Zhang, M. Asai ja S. Yokoyama. 1999. Differential generation of high-density lipoprotein by endogenous and exogenous apolipoproteins in cultured fetal rat astrocytes. *J Neurochem.* 72:2362-9.
- Jalonen T.O., C.J. Charniga ja D.B. Wielt. 1997. beta-Amyloid peptide-induced morphological changes coincide with increased K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channel activity in rat cortical astrocytes. *Brain Res.* 746:85-97.
- Jia J.Y., S. Lamer, M. Schümann, M.R. Schmidt, E. Krause ja V. Haucke. 2006. Quantitative proteomics analysis of detergent-resistant membranes from chemical synapses: evidence for cholesterol as spatial organizer of synaptic vesicle cycling. *Mol Cell Proteomics.* 5:2060-71.
- Jiang Z, X. Zheng, R.A. Lytle, R. Higashikubo ja K.M. Rich. 2004. Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. *J Neurochem.* 89:168-78.
- Joshi S., R. Guleria, J. Pan, D. DiPette ja U.S. Singh. 2006. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene.* 25:240-7.
- Joshi S., R.S. Guleria, J. Pan, D. Dipette ja U.S. Singh. 2007. Heterogeneity in retinoic acid signaling in neuroblastomas: Role of matrix metalloproteinases in retinoic acid-induced differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1772:1093-102.

- Jurevics H. ja P. Morell. 1995. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem.* 64:895-901.
- Kang JX, J. Bell, A. Leaf, R.L. Beard, R.A. Chandraratna. 1998. Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:13687-91.
- Karpen H.E., J.T. Bukowski, T. Hughes, J.P. Gratton, W.C. Sessa ja M.R.Gailani. 2001. The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem.* 276:19503-11.
- Karten B., R.B. Campenot, D.E. Vance ja J.E. Vance. 2006. Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia. *J Biol Chem.* 281:4049-57.
- Karten B., D.E.Vance, R.B.Campenot ja J.E. Vance. 2002. Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons, of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *J Neurochem.* 83:1154-63.
- Khan A.A ja J. Folch-Pi. 1967. Cholesterol turnover in brain subcellular particles. *J Neurochem.* 14:1099-105.
- Kikuchi T., Y. Nagata ja T. Abe. 1997. In vitro and in vivo antiproliferative effects of simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on human glioma cells. *J Neurooncol.* 34:233-9.
- Kim J.S., F. Pirnia, Y.H. Choi, P.M. Nguyen, B. Knepper, M. Tsokos, T.W. Schulte, M.J. Birrer, M.V. Blagosklonny, O. Schaefer, J.F. Mushinski ja J.B. Trepel. 2000. Lovastatin induces apoptosis in a primitive neuroectodermal tumor cell line in association with RB down-regulation and loss of the G1 checkpoint. *Oncogene.* 19:6082-90.
- Kim W.S., A.S.Rahmanto, A. Kamili, K.A. Rye, G.J.Guillemin, I.C. Gelissen, W.Jessup, A.F. Hill ja B. Garner. 2007. Role of ABCG1 and ABCA1 in regulation of neuronal cholesterol efflux to apolipoprotein E discs and suppression of amyloid-beta peptide generation. *J Biol Chem.* 282:2851-61.
- Kirsch C., G.P. Eckert ja W.E. Mueller. 2003. Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol.* 65:843-56.
- Ko M., K. Zou, H. Minagawa, W. Yu, J.S. Gong, K. Yanagisawa ja M. Michikawa. 2005. Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 280:42759-65.
- Kojro E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz ja F. Fahrenholz. 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:5815-20.
- Kozma R., S. Sarner, S. Ahmed ja L. Lim. 1997. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol.* 17:1201-11.
- Kumano T., T.Mutoh, H. Nakagawa ja M. Kuriyama. 2000. HMG-CoA reductase inhibitor induces a transient activation of high affinity nerve growth factor receptor, Trk, and morphological differentiation with fatal outcome in PC12 cells. *Brain Research* 859:169-172.
- Kärkkäinen I., E. Rybnikova, M. Pelto-Huikko ja A.P. Huovila. 2000. Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci.* 15:547-60.
- Lafourcade C., K. Sobo, S. Kieffer-Jaquinod, J. Garin ja F.G. van der Goot. 2008. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS ONE.* 23:e2758.
- .

- Lange Y., D.S. Ory, J. Ye, M.H. Lanier, F.F. Hsu ja T.L. Steck. 2008. Effectors of rapid homeostatic responses of endoplasmic reticulum cholesterol and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem.* 283:1445-55.
- Lange Y., M.H. Swaisgood, B.V. Ramos ja T.L. Steck. 1989. Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* 264:3786-93.
- Ledesma M.D., K. Simons ja C.G. Dotti. 1998. Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:3966-71.
- Leoni V., C. Mariotti, S.J. Tabrizi, M. Valenza, E.J.Wild, S.M. D. Henley, N.Z. Hobbs, M.L. Mandelli, M. Grisoli, I. Björkhem, E. Cattaneo ja S. Di Donato. 2008. Plasma 24S-hydroxycholesterol and caudate MRI in pre-manifest and early Huntington's disease. *Brain.* 131:2851-2859.
- Liang Y., S. Lin, T.P. Beyer, Y. Zhang, X. Wu, K.R. Bales, R.B. DeMattos, P.C. May, S.D. Li, X.C. Jiang, P.I. Eacho, G. Cao ja S.M. Paul. 2004. A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. *J Neurochem.* 88:623-34.
- Liao S-L ja C-J. Chen. 2001. Manganese stimulates stellation of cultured rat cortical astrocytes. *Neuroreport.* 12: 3877-81.
- Liscum L. ja Collins. 1991. Characterization of Chinese hamster ovary cells that are resistant to 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one inhibition of low density lipoprotein-derived cholesterol metabolism. *J Biol Chem.* 266:16599-606.
- Liscum L. ja J.R. Faust. 1987. Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J Biol Chem.* 262:17002-8.
- Liscum L. ja J.R. Faust. 1989. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J Biol Chem.* 264:11796-806.
- Lund E.G., J.M. Guileyardo ja D.W. Russell. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. 1999. *Biochemistry.* 96: 7238-7243.
- Marzi I, M. D'Amico, T. Biagiotti, S. Giunti, M.V. Carbone, D. Fredducci, E. Wanke ja M. Olivotto. 2007. Purging of the neuroblastoma stem cell compartment and tumor regression on exposure to hypoxia or cytotoxic treatment. *Cancer Res.* 67:2402-7.
- Mauch D.H., K. Nägler, S. Schumacher, C. Göritz, E.C. Müller, A. Otto ja F.W. Pfrieger. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science.* 294:1354-7.
- Micheli M., E. Albi, C. Leray ja M.V. Magni. 1998. Nuclear sphingomyelin protects RNA from RNase action. *FEBS Lett.* 431:443-7.
- Miller W.H. Jr. 1998. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer.* 83:1471-82.
- Miller C.R. ja A. Perry. 2007. Glioblastoma. *Arch Pathol Lab Med.* 131:397-406.
- März P., U. Otten ja A.R. Miserez. 2007. Statins induce differentiation and cell death in neurons and astroglia. *Glia.* 55:1-12.
- Möbius W., E. van Donselaar, Y. Ohno-Iwashita, Y. Shimada, H.F. Heijnen, J.W. Slot ja H.J. Geuze. 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic.* 4:222-31.

- Neufeld E.B., A.T. Remaley, S.J. Demosky, J.A. Stonik, A.M. Cooney, M. Comly, N.K. Dwyer, M. Zhang, J. Blanchette-Mackie, S. Santamarina-Fojo ja H.B. Brewer Jr. 2001. Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCA1 Transporter. *J. Biol. Chem.* 276: 27584-27590.
- Nohturfft A., R.A. DeBose-Boyd, S. Scheek, J.L. Goldstein ja M.S. Brown. 1999. Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11235-40.
- Ohgami N., D.C. Ko, M. Thomas, M.P. Scott, C.C.Y. Chang ja T-Y.Chang. 2004. Binding between the Niemann–Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain. *PNAS.* 101:12473-8.
- Ohvo-Rekilä H., B. Ramstedt, P. Leppimäki ja J.P. Slotte. 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res.* 41:66-97.
- Ottico E., A. Prinetti, S. Prioni, C. Giannotta, L. Basso, V. Chigorno ja S. Sonnino. 2003. Dynamics of membrane lipid domains in neuronal cells differentiated in culture. *J Lipid Res.* 44:2142-51.
- Pagler T., S. Rhode, A. Neuhofer, H. Laggner, W. Strobl, C. Hinterndorfer, I. Volf, M. Pavelka, E.R.M. Eckhardt, D.R. van der Westhuyzen, G.J. Schütz ja H. Stangl. 2006. SR-BI-mediated High Density Lipoprotein (HDL) Endocytosis Leads to HDL Resecretion Facilitating Cholesterol Efflux. *J. Biol. Chem.* 281: 11193-11204.
- Pekny M. ja M. Nilsson. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 50 :427-34.
- Petroni A., M. Blasevich, N. Papini, P. La Spada ja C. Galli. Changes in Arachidonic Acid Levels and Formation and in Lipid Synthesis in the Human Neuroblastoma SK-N-BE During Retinoic Acid-Induced Differentiation. *J Neurochem.* 67:549 – 556.
- Preis P.N., H. Saya, L. Nádasdi, G. Hochhaus, V. Levin ja W. Sadée. 1988. Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer Res.* 48:6530-4.
- Pählman S., A.I. Ruusala, L. Abrahamsson, M.E. Mattsson ja T. Esscher. 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ.* 14:135-44.
- Pörn M.I. ja J.P. Slotte. 1990. Reversible effects of sphingomyelin degradation on cholesterol distribution and metabolism in fibroblasts and transformed neuroblastoma cells. *Biochem J.* 271:121-6.
- Quinn C.M., W. Jessup, J. Wong, L. Kritharides ja A.J. Brown. 2005. Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARγ ligands. *Biochem J.* 385:823-30.
- Radhakrishnan A., Y. Ikeda, H.J. Kwon, M.S. Brown ja J.L. Goldstein. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:6511-8.
- Ramprasad O.G., N. Rangaraj, G. Srinivas, J.P. Thiery, S. Dufour ja G. Pande. 2008. Differential regulation of the lateral mobility of plasma membrane phospholipids by the extracellular matrix and cholesterol. *J Cell Physiol.* 215:550-61.
- Ramprasad O.G., G. Srinivas, R.K.S. Rao, P. Joshi, J.P. Thiery, S. Dufour ja G. Pande. 2007. Changes in cholesterol levels in the plasma membrane modulate cell signaling and regulate cell adhesion and migration on fibronectin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 64:199-216.
- Reaven E., L. Tsai ja S. Azhar. 1995. Cholesterol uptake by the 'selective' pathway of ovarian granulosa cells: early intracellular events. *J Lipid Res.* 36: 1602-17.

- Reese, T. S. ja M.J. Karnovsky. 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34: 207–217.
- Reinhart M.P., J.T. Billheimer, J.R. Faust ja J.L. Gaylor. 1987. Subcellular Localization of the Enzymes of Cholesterol Biosynthesis and Metabolism in Rat Liver. *J Biol Chem.* 262: 9649-55.
- Roiha T. 2008. Morphological characterization of neuronal and non-neuronal phenotypes of the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. Pro gradu –tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Suomi.
- Roy S., R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J.F. Hancock ja R.G. Parton. 1999. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol.* 1:98-105.
- Rubins J.B., T.Greatens, R.A. Kratzke, A.T. Tan, V.A. Polunovsky ja P. Bitterman. 1998. Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:1616-22.
- Rudel L.L. ja M.D. Morris. 1973. Determination of cholesterol using *o*-phthalaldehyde. *J Lipid Res.* 14: 364-6.
- Rust S., M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J-C. Piette, J-F. Deleuze, H.B. Brewer, N. Duverger, P. Denèfle ja G. Assmann. 2000. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *J Clin. Invest.* 106: 1263-1270.
- Sagane K., K. Hayakawa, J. Kai, T. Hirohashi, E. Takahashi, N. Miyamoto, M. Ino, T. Oki, K. Yamazaki ja T. Nagasu. 2005. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. *BMC Neurosci.* 6:33.
- Saheki A., T. Terasaki, I. Tamai ja A. Tsuji. 1994. In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. *Pharm Res.* 11:305-11.
- Saher G., B. Brügger, C. Lappe-Siefke, W. Möbius, R. Tozawa, M.C.Wehr, F. Wieland, S. Ishibashi ja K.A. Nave. 2005. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci.* 8:468-75.
- Salter A.M., N. Ekins, M al-Seeni, D. N. Brindley ja B. Middleton. 1989. Cholesterol esterification plays a major role in determining low-density-lipoprotein receptor activity in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *J.Biochem.* 263: 255-260.
- Samsonov A.V., I. Mihalyov ja F.S. Cohen. 2001. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys J.* 81:1486-500.
- Sarkanen J.R., J. Nykky, J. Siikanen, J. Selinummi, T. Ylikomi ja T.O. Jalonen. 2007. Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem.*102:1941-52.
- Simons K. ja E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387: 569-72.
- Simons K. ja E. Ikonen. 2000. How cells handle cholesterol. *Science.* 290: 1721-6.
- Slotte J.P., J.F. Oram ja E.L. Bierman. 1987. Binding of high density lipoproteins to cell receptors promotes translocation of cholesterol from intracellular membranes to the cell surface. *J Biol Chem.* 262:12904-7.
- Smaby J.M., M. Momsen, V.S. Kulkarni ja R.E. Brown. 1996. Cholesterol-Induced Interfacial Area Condensations of Galactosylceramides and Sphingomyelins with Identical Acyl Chains. *Biochemistry.* 35: 5696 -5704.
- Sobo K., I. Le Blanc, P.P.Luyet, M. Fivaz, C. Ferguson, R.G. Parton, J. Gruenberg ja F.G. van der Goot. 2007. Late endosomal cholesterol accumulation leads to impaired intra-endosomal trafficking. *PLoS ONE.* 2:e851.

- Soma M.R., R. Baetta, M.R. De Renzis, G. Mazzini, C. Davegna, L. Magrassi, G. Butti, S. Pezzotta, R. Paoletti ja R. Fumagalli. 1995. In vivo enhanced antitumor activity of carmustine [N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea] by simvastatin. *Cancer Res.* 55:597-602.
- Song B-L., N.B. Javitt ja R.A. DeBose-Boyd. 2005. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell metabolism.* 1: 179-189.
- Sparrow S.M., J.M. Carter, N.D. Ridgway, H.W. Cook ja D.M. Byers. 1999. U18666A inhibits intracellular cholesterol transport and neurotransmitter release in human neuroblastoma cells. *Neurochem Res.* 24:69-77.
- Storey S.M., A.M. Gallegos, B.P. Atshaves, A.L. McIntosh, G.G. Martin, R.D. Parr, K.K. Landrock, A.B. Kier, J.M. Ball ja F. Schroeder. 2007. Selective cholesterol dynamics between lipoproteins and caveolae/lipid rafts. *Biochemistry.* 46: 13891-906.
- Sugii S., S. Lin, N. Ohgami, M. Ohashi, C.C. Chang ja T.Y. Chang. 2006. Roles of endogenously synthesized sterols in the endocytic pathway. *J Biol Chem.* 281:23191-206.
- Sugii S., P.C. Reid, N. Ohgami, H. Du ja T.Y. Chang. 2003. Distinct endosomal compartments in early trafficking of low density lipoprotein-derived cholesterol. *J Biol Chem.* 278:27180-9.
- Sun Y., Y. Wang, J. Zhang, J. Tao, C. Wang, N. Jing, C. Wu, K. Deng ja S. Qiao. 2007. ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Neurochem Res.*32:1217-23.
- Teppola H. 2008. Ihmisen SH-SY5Y neuroblastoomasolulinjan käyttöönotto ja erilaistaminen sähköfysiologia monielektrodimitauksia varten. Pro gradu – tutkielma, Tampereen yliopisto, Suomi.
- Thiele C., M.J. Hannah, F. Fahrenholz ja W.B. Huttner. 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol.* 2:42-9.
- Tsai H.I., L.H.Tsai, M.Y. Chen ja Y.C. Chou. 2006. Cholesterol deficiency perturbs actin signaling and glutamate homeostasis in hippocampal astrocytes. *Brain Res.* 1104:27-38.
- teVruchte D., E. Lloyd-Evans, R.J. Veldman, D.C. Neville, R.A. Dwek, F.M. Platt, W.J. van Blitterswijk ja D.J. Sillence. 2004. Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *J Biol Chem.* 279:26167-75.
- Ulloth J.E., F.G. Almaguel, A. Padilla, L. Bu, J.W. Liu ja M. De Leon. 2007. Characterization of methyl-beta-cyclodextrin toxicity in NGF-differentiated PC12 cell death. *Neurotoxicology.* 28:613-21.
- Urano Y., I. Hayashi, N. Isoo, P.C. Reid, Y. Shibasaki, N. Noguchi, T. Tomita, T. Iwatsubo, T. Hamakubo ja T. Kodama. 2005. Association of active gamma-secretase complex with lipid rafts. *J Lipid Res.* 46:904-12.
- Vasanji A., P.K. Ghosh, L.M. Graham, S.J. Eppell ja P.L. Fox. 2004. Polarization of plasma membrane microviscosity during endothelial cell migration. *Dev Cell.* 6:29-41.
- Vitols S., S.Norgren, G. Juliusson, L. Tatidis L ja H. Luthman. 1994. Multilevel regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in normal and leukemic cells. *Blood.* 84:2689-98.
- Walton J.D., D.R. Kattan, S.K. Thomas, B.A. Spengler, H.F. Guo, J.L. Biedler, N.K. Cheung ja R.A. Ross. 2004. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia.* 6:838-45.
- Warnock D.E., C. Roberts, M.S. Lutz, W.A. Blackburn, W.W. Young Jr ja J.U. Baenziger. 1993. Determination of plasma membrane lipid mass and composition in cultured Chinese hamster ovary cells using high gradient magnetic affinity chromatography. *J Biol Chem.* 268:10145-53.
- Werner E.A. ja H.F. Deluca. 2002. Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E672-E678.

- Wolozin B., W. Kellman, P. Ruosseau, G.G. Celesia ja G. Siegel. 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol.* 57:1439-43.
- Wolburg H., S. Noell, A. Mack, K. Wolburg-Buchholz ja P. Fallier-Becker. 2008. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 2008 Jul 16.
- Yao C.J., G.M. Lai, C.F. Chan, A.L. Cheng, Y.Y. Yang ja S.E. Chuang. 2006. Dramatic synergistic anticancer effect of clinically achievable doses of lovastatin and troglitazone. *Int J Cancer.* 118:773-9.
- Yip C.M., E.A. Elton, A.A. Darabie, M.R. Morrison ja J. McLaurin. 2001. Cholesterol, a modulator of membrane-associated Abeta-fibrillogenesis and neurotoxicity. *J Mol Biol.* 311:723-34.
- Ylä-Herttuala S., W. Palinski, M.E. Rosenfeld, S. Parthasarathy, T.E. Carew, S. Butler, J.L. Witztum, ja D. Steinberg. 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 84:1086-95.
- Zacco A, J. Togo, K. Spence, A. Ellis, D. Lloyd, S. Furlong ja T. Piser. 2003. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci.* 23:11104-11.
- Zhang L.Y., J.I. Ito, T. Kato, S. Yokoyama. 2000. Cholesterol homeostasis in rat astrocytoma cells GA-1. *J Biochem.* 128:837-45.
- Zidovetzki R. ja I. Levitan. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta.* 1768:1311-24.