

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA KROŠEL

**MERJENJE IZRAŽANJA GENOV ZA METALOTIONEINE
V HUMANIH CELIČNIH LINIJAH GLIJE**

**MEASUREMENT OF METALLOTHIONEIN GENE
EXPRESSION IN HUMAN GLIA CELL LINES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Inštitutu Jožef Stefan in Nacionalnem inštitutu za biologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom zn. sod. dr. Ingrid Falnoga, mag. farm.

Zahvaljujem se vsem, ki ste mi pomagali pri izdelavi diplomske naloge: mentorici izr. prof. dr. Janji Marc, somentorici dr. Ingrid Falnoga, Simoni Jurkovič-Mlakar, dr. Janezu Ščančarju, dr. Ireni Zajc, Andreji Zelenik in dr. Magdi Tušek-Žnidarič.

Posebna zahvala moji družini in Sergeju.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom zn. sod. dr. Ingrid Falnoga, mag. farm.

Predsednik komisije: zasl. prof. dr. Aleš Krbavčič, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Bojan Doljak, mag. farm.

Ljubljana, 2009

Maja Krošel

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	V
POVZETEK/ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 METALOTIONEINI SESALCEV	1
1.2 PRIMARNA STRUKTURA METALOTIONEINOV	1
1.3 TERCIARNA STRUKTURA METALOTIONEINOV IN VEZAVA KOVIN	1
1.4 IZOFORME METALOTIONEINOV	2
1.5 TKIVNA IN CELIČNA PORAZDELITEV METALOTIONEINOV	3
1.6 FIZIOLOŠKE FUNKCIJE METALOTIONEINOV	4
1.7. METALOTIONEINI V PATOLOŠKIH STANJIH	4
1.8 GENSKA REGULACIJA IN INDUKCIJA METALOTIONEINOV	5
1.9 METALOTIONEINI V CENTRALNEM ŽIVČNEM SISTEMU	8
1.9.1 <i>Astroцитi</i>	8
1.9.2 <i>Izražanje in vloga MT-1/2 v centralnem živčnem sistemu</i>	9
1.9.3 <i>Izražanje in vloga MT-3 v centralnem živčnem sistemu</i>	10
1.9.4 <i>Nevrotoksičnost kadmija</i>	11
1.10 METODE DOLOČANJA IZRAŽANJA GENOV ZA METALOTIONEINE	11
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 POTEK POSKUSOV	14
3.2 CELIČNA LINIJA U87 MG	15
3.2.1 <i>Opis celične linije U87 MG</i>	15
3.2.2 <i>Odtaljevanje celic</i>	15
3.2.3 <i>Gojenje celic</i>	15
3.2.4 <i>Štetje celic s hemocitometrom</i>	16
3.2.5 <i>Test toksičnosti CdCl₂ za celično linijo U87 MG</i>	17
3.2.6 <i>Izpostavitev celične linije Cd²⁺ za določanje proteinov</i>	18
3.2.7 <i>Izpostavitev celične linije Cd²⁺ za določanje mRNA</i>	18
3.3 DOLOČANJE PROTEINOV	19
3.3.1 <i>Priprava celičnega lizata</i>	19

3.3.2	<i>Izolacija metalotioneinov</i>	20
3.3.3	<i>Merjenje kovin, vezanih na metalotioneine</i>	21
3.4	KVANTITATIVNO DOLOČANJE MRNA	22
3.4.1	<i>Izolacija celokupne RNA</i>	22
3.4.2	<i>UV-spektrofotometrično določanje koncentracije in čistote izolirane RNA</i>	23
3.4.3	<i>Določanje kakovosti izolirane RNA</i>	23
3.4.4	<i>Sinteza cDNA</i>	24
3.4.5	<i>Princip kvantitativne verižne reakcije s polimerazo</i>	24
3.4.6	<i>Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo</i>	25
3.4.7	<i>Analiza rezultatov reakcij kvantitativne verižne reakcije s polimerazo</i>	28
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1	CELIČNA LINIJA U87 MG	30
4.1.1	<i>Test toksičnosti CdCl₂ za celično linijo U87 MG</i>	30
4.1.2	<i>Fotografiranje celične linije U87 MG med izpostavitvijo Cd²⁺</i>	31
4.2	DOLOČANJE PROTEINOV	32
4.2.1	<i>Delež kovin v vodotopnem in partikularnem delu celičnega lizata</i>	32
4.2.2	<i>Vezava kovin na metalotioneine</i>	34
4.3	KVANTITATIVNO DOLOČANJE MRNA	38
4.3.1	<i>Priprava celokupne RNA</i>	38
4.3.1.1	<i>UV-spektrofotometrično določanje koncentracije in čistote izolirane RNA</i>	38
4.3.1.2	<i>Določanje kakovosti izolirane RNA</i>	39
4.3.2	<i>Razvoj metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo</i>	40
4.3.2.1	<i>Načrtovanje začetnih oligonukleotidov</i>	40
4.3.2.2	<i>Optimizacija koncentracij oligonukleotidnih začetnikov in cDNA ter pogojev kvantitativne verižne reakcije s polimerazo</i>	41
4.3.3	<i>Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo</i>	43
4.3.3.1	<i>Dokaz enakosti učinkovitosti pomnoževanja genov MT-1a, MT-2a in Tfr</i>	44
4.3.3.2	<i>Izračun relativnega izražanja genov MT-1a in MT-2a</i>	45
4.3.3.3	<i>Relativno izražanje genov MT-1a in MT-2a</i>	49
5	SKLEPI	53
6	LITERATURA	54
7	PRILOGE	60

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz izoforme MT-2A pri sesalcih. Prikazani sta C-terminalna α -domena in N-terminalna β -domena z 20 Cys (kvadrati) in njihovimi žveplovimi atomi (S), ki vežejo dvo- ali enovalentne ione, v tem primeru Zn^{2+} . Domeni sta povezani s kratkim peptidnim delom, ki vključuje tri AK (LINK) (10).	2
Slika 2: Shematski prikaz MT in primerjava AK-zaporedij posameznih človeških izoform MT glede na MT-2A; pri ostalih izoformah so podani AK-ostanki, ki se razlikujejo od MT-2A; Cys so označeni sivo. Prikaz koordinacijskih vezi s Zn^{2+} temelji na določitvi teh v MT-2A pri podganah (6).	3
Slika 3: Pregled genske regulacije MT. Regulatorna regija genov za MT ima več regij, ki inducirajo transkripcijo. To so: 1) regije MRE (<i>angl.</i> metal responsive elements), ki se aktivirajo z vezavo transkripcijskega faktorja MTF-1 z vezanim Zn^{2+} , 2) regija GRE (<i>angl.</i> glucocorticoid responsive elements), 3) regija, aktivirana s proteini STAT (<i>angl.</i> signal transducer and activator of transcription kinases), 4) regija ARE (<i>angl.</i> antioxidant responsive elements), katere aktivacija je odvisna od celičnega redoks stanja (50).	7
Slika 4: Glavne funkcije MT-1/2 v CZS (10).	10
Slika 5: Shema eksperimentalnega dela: izpostavitve celične linije U87 MG $1 \mu M$ $CdCl_2$ in analiza izražanja genov za MT z metodama atomske absorpcijske spektrofotometrije in kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR).	14
Slika 6: Shematski prikaz verižne reakcije s polimerazo (PCR) (86).	25
Slika 7: Na sliki levo: Shema aparature za qPCR. Vzorce damo v ciklični termostat, ki programirano spreminja temperaturo za vsak cikel PCR. Vzorci so izpostavljeni ekscitacijski svetlobi (ksenonska žarnica), oddano fluorescenco meri CCD-kamera. Na sliki desno: Po interkalaciji v dvovijačno DNA molekula SYBR Green I močno fluorescira (absorpcija svetlobe pri 465 nm, oddajanje svetlobe pri 510 nm) (90).	26
Slika 8: Test toksičnosti $CdCl_2$ za celično linijo U87 MG. Celice so bile izpostavljene 0, 0,5, 1, 2, 10, 20, 50, 100 μM raztopini $CdCl_2$ za 48 ur. Na ordinati sta % preživetja celic in vrednost $A_{570/690}$, izračunana na podlagi meritev petih paralelk, podana je standardna deviacija.	30
Slika 9: Fotografiji celične linije U87 MG, posneti pri 40-kratni povečavi (mikroskop Reichert Jung, fotoaparatus Nikon, Coolpix 995), a) takoj po začetku 48-urne izpostavitve $1 \mu M$ $CdCl_2$ in b) tik pred koncem 48-urne izpostavitve $1 \mu M$ $CdCl_2$	32
Slika 10: Masni deleži Zn^{2+} in Cu^{1+} in Cd^{2+} v vodotopnem delu (supernatantu) celičnega lizata po 0, 1, 3, 24 in 48 urah izpostavitve celic U87 MG $1 \mu M$ $CdCl_2$	34
Slika 11: Elucijski kromatogrami supernatantov celic U87 MG, izpostavljenih $1 \mu M$ $CdCl_2$ za 0, 1, 3, 24 in 48 ur (HPLC, 2x Superdex TM 75 10/300 GL, zanka 0,5 ml, pretok 0,5 ml/min, pufer 30 mM Tris-HCl, 1 mM ditiotritol, pH 8,0; 0,5 ml-frakcije). Puščici označujeta mesti elucije izoform MT-1/2 in MT-3.	36

Slika 12: Elucijski kromatogram standarda MT-1/2, Sigma (HPLC, 2x Superdex™ 75 10/300 GL, zanka 0,5 ml, pretok 0,5 ml/min, pufer 30 mM Tris-HCl, 1 mM ditiotritol, pH 8,0; 0,5 ml-frakcije). Puščica označuje mesto elucije izoform MT-1/2.....	37
Slika 13: Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (BioAnalyzer) celokupne RNA, izolirane iz vzorca celic, izpostavljenih 1 µM raztopini CdCl ₂ za 24 ur.....	40
Slika 14: Diagrama disociacijske krivulje za gen <i>MT-2a</i> (LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5). Na abscisi je temperatura, na ordinati negativni prvi odvod intenzitete fluorescence po temperaturi, prikazani sta a) disociacijski krivulji za dva naključna vzorca cDNA v optimizacijski reakciji qPCR pri temperaturi naleganja oligonukleotidnih začetnikov 61 °C ter b) disociacijske krivulje za vse vzorce cDNA v optimizirani reakciji qPCR.....	43
Slika 15: Standardna krivulja za gen <i>MT-1a</i> (LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5), narisana na podlagi vrednosti Ct standardnih raztopin. Na abscisi je logaritem koncentracije cDNA, na ordinati Ct (cikel, v katerem intenziteta preseže nastavljen prag).....	45
Slika 16: Diagram pomnoževanja za gen <i>MT-1a</i> (LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5). Na abscisi je število ciklov, na ordinati intenziteta fluorescence, prikazane so krivulje pomnoževanja za vse vzorce cDNA.	46
Slika 17: Diagram disociacijske krivulje za gen <i>MT-1a</i> (LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5). Na abscisi je temperatura, na ordinati prvi negativni odvod intenzitete fluorescence po temperaturi, prikazane so disociacijske krivulje za vse vzorce cDNA.	47
Slika 18: Indukcija transkripcije gena za subizoformo MT-1A. Celice U87 MG smo izpostavili 1 µM CdCl ₂ za 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 ur. Izražanje <i>MT-1a</i> smo normalizirali z genom za transferinski receptor (<i>TfR</i>). Rezultat predstavlja povprečno vrednost meritev dveh paralelnih vzorcev celic, podana je standardna deviacija.	50
Slika 19: Indukcija transkripcije gena za subizoformo MT-2A. Celice U87 MG smo izpostavili 1 µM CdCl ₂ za 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 ur. Izražanje <i>MT-2a</i> smo normalizirali s genom za transferinski receptor (<i>TfR</i>). Rezultat predstavlja povprečno vrednost meritev dveh paralelnih vzorcev celic, podana je standardna deviacija.	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sestava 50 ml medija za gojenje.....	16
Preglednica II: Sestava 50 ml pufra 1x PBS.....	16
Preglednica III: Sestava 100 ml pufra za lizo celic (pH 7,6).....	19
Preglednica IV: Sestava 2 l elucijskega pufra (pH 8).....	20
Preglednica V: Meje detekcije merjene raztopine pri AAS (87).....	21
Preglednica VI: Temperaturna shema reverzne transkripcije (RT).....	24
Preglednica VII: Začetni oligonukleotidi za pomnožena zaporedja genov <i>TfR</i> , <i>MT-1a</i> in <i>MT-2a</i> : ime gena, nukleotidno zaporedje za smerni (F) in protismerni (R) oligonukleotidni začetnik, temperatura tališča (Tm) za vsak oligonukleotidni začetnik ter dolžina pomnoženega zaporedja.....	27
Preglednica VIII: Sestava 20 µl-mešanice za posamezno pomnoženo zaporedje (za eno reakcijo).....	27
Preglednica IX: Pogoji reakcij qPCR za določanje pomnoženih zaporedij genov <i>MT-1a</i> , <i>MT-2a</i> in <i>TfR</i> . Edini različen pogoj med posameznimi pomnoženimi zaporedji je temperatura naleganja oligonukleotidnih začetnikov.....	28
Preglednica X: Število celic po koncu izpostavitve, mase usedlin in supernatantov celičnih lizatov ter vsebnosti kovin (Zn^{2+} , Cu^{1+} , Cd^{2+}) v usedlinah in supernatantih po 0, 1, 3, 24 in 48 urah izpostavitve 1 µM $CdCl_2$	33
Preglednica XI: Koncentracije kovin (Zn^{2+} , Cu^{1+} , Cd^{2+}) v usedlinah in supernatantih celičnih lizatov in v 1 µM raztopinah $CdCl_2$ (Medij) po 0, 1, 3, 24 in 48 urah izpostavitve celic U87 MG 1 µM $CdCl_2$. Podane so tudi koncentracije kovin v začetni 1 µM raztopini medija s $CdCl_2$	33
Preglednica XII: Optimizacijske reakcije qPCR za posamezna pomnožena zaporedja, navedene so količine sestavin mešanice in pogoji reakcij qPCR, ki smo jih spreminjali glede na optimizirane pogoje reakcij qPCR za vzorce. To so: količina 5 µM raztopine smerne oligonukleotidnega začetnika (F), količina 5 µM raztopine protismernega oligonukleotidnega začetnika (R), količina cDNA, temperatura naleganja oligonukleotidnih začetnikov (OZ) in čas pomnoževanja pri 72 °C. Optimalni pogoji so označeni odebeljeno.....	42
Preglednica XIII: Standardna krivulja: ime gena, enačba premice, učinkovitost in napaka reakcije.....	44
Preglednica XIV: Vrednosti Ct vzorcev za tarčna gena <i>MT-1a</i> , <i>MT-2a</i> in referenčni gen <i>TfR</i> . Vzorec je poimenovan s številom ur izpostavitve 1 µM $CdCl_2$, za vsako izpostavitvev smo pripravili dva paralelna vzorca celic.....	48

POVZETEK/ABSTRACT

Metalotioneini so nizkomolekularni, s cisteini bogati proteini, odgovorni za homeostazo esencialnih kovinskih ionov, detoksifikacijo neesencialnih kovinskih ionov in vezavo radikalov. Astrociti, celice možganske glije, so pomembno mesto kopičenja kovin v centralnem živčnem sistemu, zato vsebujejo velike količine metalotioneinov. Metalotioneini so pri sesalcih prisotni v štirih izoformah, predvsem izoformi MT-1 in MT-2 sta zelo inducibilni, eden najmočnejših induktorjev je kadmij. V okviru diplomske naloge smo proučevali gensko izražanje in sintezo metalotioneinov v humani celični liniji astrocitomov, U87 MG, pred in po izpostavitvi 1 μM raztopini CdCl_2 . Izražanje in sintezo MT smo določili na dveh nivojih – na nivoju mRNA in na nivoju proteinov. Na nivoju mRNA smo določili raven mRNA za dva izmed genov, ki nosijo zapis za MT, *MT-1a* in *MT-2a*, z metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo. Na nivoju proteinov smo prisotnost izoform MT-1 in MT-2 po ločitvi z izključitveno HPLC gelsko izključitveno kromatografijo določili posredno z merjenjem koncentracij vezanih kovin (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+}) z metodo atomske absorpcijske spektrofotometrije. Tako na nivoju proteinov kot na nivoju mRNA smo ugotovili, da pri danih pogojih ni prišlo do povečanega genskega izražanja in sinteze MT v humani celični liniji U87 MG po izpostavitvi 1 μM CdCl_2 .

Metallothioneins are low molecular weight cysteine-rich proteins, responsible for intracellular homeostasis of essential metal ions, detoxification of unessential metal ions and free radical sequestering. Astroglia cells represent the major sites for accumulation of metal ions in central nervous system. For this reason astroglia cells possess high cytosolic levels of metallothioneins. Metallothioneins can be found in four major isoforms, with isoforms MT-1 in MT-2 being highly inducible. One of the strongest inducers is cadmium. Our aim was to establish gene expression and synthesis of metallothioneins in human astrocytoma cell line U87 MG exposed to 1 μM solution CdCl_2 by measuring the mRNA levels and the protein levels. We explored the transcriptional induction of MT-1A and MT-2A subisoforms by quantitative polymerase chain reaction. We analysed the protein levels of MT-1 and MT-2 isoforms by HPLC size exclusion chromatography and atomic absorption spectrophotometry by measuring the metal binding (Zn^{2+} , Cu^{1+} , Cd^{2+}). Our results suggest that at given conditions 1 μM CdCl_2 did not increase the gene expression and synthesis of metallothioneins in human astrocytoma cell line U87 MG.

SEZNAM OKRAJŠAV

A _{št.}	Absorbanca _{valovna dolžina v nm}
AAS	atomska absorpcijska spektrofotometrija
AK	aminokislina
bp	bazni par
Ct	cikel qPCR, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag
cDNA	komplementarna DNA
ETAAS	elektrotermična AAS
FAAS	plamenska AAS
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
M, mM, μM	molarost; mol/l, mmol/l, μmol/l
MT	metalotioneini
MT-1, MT-2, MT-3, MT-4	izoforme metalotioneinov
MT-1A, MT-2A ipd.	subizoforme metalotioneinov
<i>MT-1a, MT-2a</i> ipd.	geni za metalotioneine
MTT	1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid
CŽS	centralni živčni sistem
PBS	fosfatni pufer, <i>angl.</i> Phosphate Buffered Saline
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PŽS	periferni živčni sistem
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
RSD	relativna standardna deviacija
SD	standardna deviacija
<i>TfR</i>	gen za transferinski receptor
T _m	temperatura taljenja
totRNA	celokupna RNA

1 UVOD

1.1 Metalotioneini sesalcev

Metalotioneini (MT) so bili prvič izolirani leta 1957 iz ledvične skorje konjev kot proteini z vezanim kadmijem (Cd^{2+}) (1). Ime izvira iz njihove visoke vsebnosti kovin in števila cisteinskih ostankov (Cys) (2,3).

Klasifikacija MT temelji na podobnosti v aminokislinskem in nukleotidnem zaporedju ter filogenetskem izvoru MT. MT kot superdružino delimo v družine, poddružine in podskupine (4). Po danes znanih podatkih so MT prisotni v celicah vseh evkariontskih organizmov - praživali, gliv, rastlin in živali (5).

1.2 Primarna struktura metalotioneinov

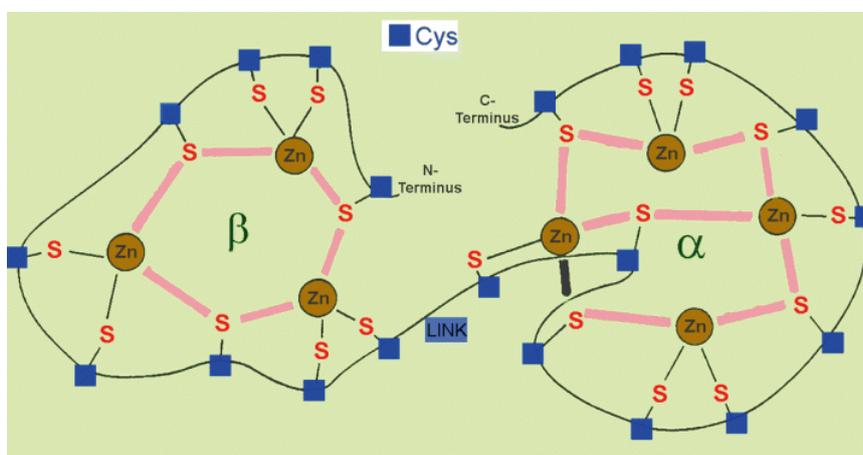
Sesalski MT so nizkomolekularni proteini (6-7 kDa) z visoko vsebnostjo kovinskih ionov (predvsem Zn^{2+} , Cu^{1+} in Cd^{2+}). Sestavljeni so iz 61 do 68 aminokislin (AK), ne vsebujejo aromatskih AK in histidina ter imajo zelo malo hidrofobnih AK. Vsebujejo pa 18-23 Cys, človeški 20, pri čemer sta njihova število in položaj visoko konzervativna, in tvorijo zaporedja Cys-x-Cys, Cys-x-y-Cys in Cys-Cys (x in y predstavljata AK, ki niso Cys). Konstantno mesto imata večinoma tudi AK lizin, ki sodeluje pri konformaciji proteina, ter AK serin, ki ima pomembno vlogo pri stabilizaciji kompleksa liganda s kovino (6).

1.3 Terciarna struktura metalotioneinov in vezava kovin

Vezavo kovinskih ionov na biološke ligande v največji meri določata elektronegativnost liganda in razmerje med nabojem in premerom kovinskega iona. Zaradi specifične AK-sestave (zaporedje Cys) imajo MT visoko afiniteto do vezave kovinskih kationov (7). Ena molekula MT lahko veže do 7 dvovalentnih ali 12 enovalentnih kovinskih kationov (8).

Tridimenzionalno strukturo MT so določili s pomočjo rentgenske kristalografije in jedrske magnetne resonance (9). MT so sestavljeni iz dveh podenot, bolj stabilne C-terminalne α -domene, v kateri lahko 11 Cys veže štiri dvovalentne ione ($\text{M}_4\text{Cys}_{11}$; M = kovina) in bolj reaktivne N-terminalne β -domene, v kateri 9 Cys veže tri dvovalentne ione (M_3Cys_9). Z

vezavo kovinskih ionov na tiolne skupine (-SH) Cys se tvorijo tiolatne vezi ($S_{Cys}-M-S_{Cys}$). Divalentni ioni so v obeh domenah vezani tetraedrično, medtem ko so enovalentni razporejeni trigonalno (8). Šele po vezavi kovinskih ionov se MT organizirajo v nativno konformacijo (6). Shematski prikaz vezave kovinskih ionov na MT je podan na Sliki 1.



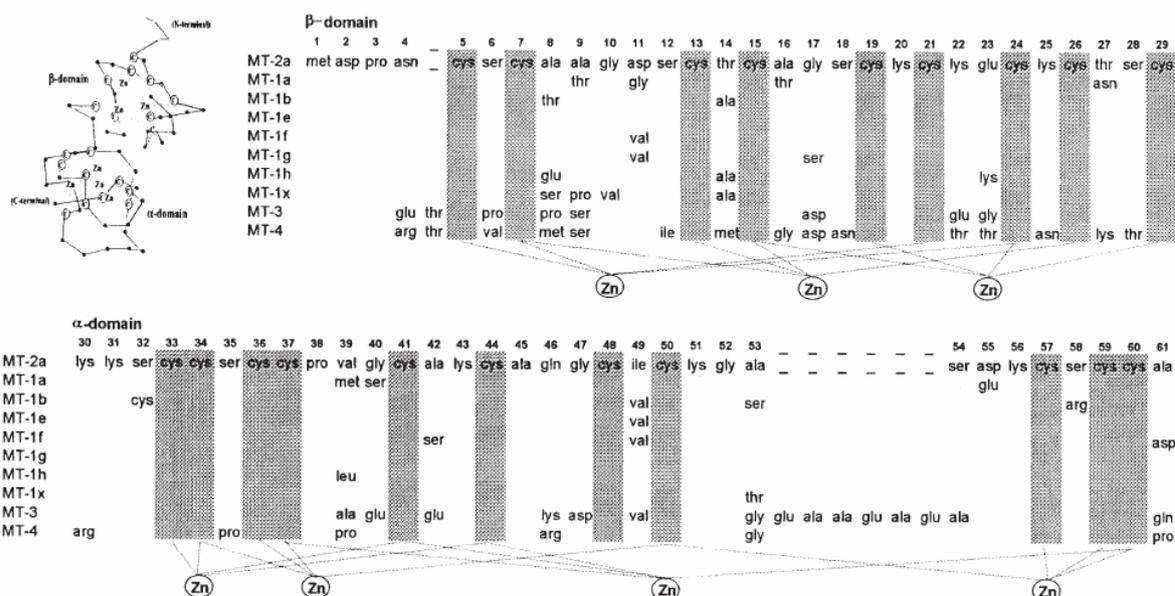
Slika 1: Shematski prikaz izoforme MT-2A pri sesalcih. Prikazani sta C-terminalna α -domena in N-terminalna β -domena z 20 Cys (kvadrati) in njihovimi žveplovimi atomi (S), ki vežejo dvo- ali enovalentne ione, v tem primeru Zn^{2+} . Domeni sta povezani s kratkim peptidnim delom, ki vključuje tri AK (LINK) (10).

V tkivih so večinoma prisotni MT z mešano sestavo, tako imajo MT vezane predvsem Zn^{2+} - in Cu^{1+} -ione. V fizioloških pogojih MT niso nasičeni s kovinami in imajo tudi proste tiolne skupine. Te se lahko oksidirajo in so v veliki meri odgovorne za izredno reaktivnost MT. Zaradi fizikalno-kemijskih podobnosti kovinskih ionov MT vežejo tudi neesencialne kovine, kot so kadmij (Cd^{2+}), svinec (Pb^{2+}), živo srebro (Hg^{2+}), srebro (Ag^{1+}), zlato (Au^{1+}), bizmut (Bi^{3+}) in kobalt (Co^{2+}) (11). V manjšem deležu sta v celici prisotni še oksidirana oblika MT (metalotionin; z intramolekularnimi disulfidnimi vezmi) ter apo-MT (tionein) brez vezanih kovinskih ionov (12).

1.4 Izoforme metalotioneinov

Na podlagi AK-sestave in naboja ločimo štiri izoforme MT: MT-1 (61 AK), MT-2 (62 AK), MT-3 (68 AK) in MT-4 (62 AK). Za MT-1 je poznanih vsaj 7 subizoforn (MT-1A, B, E, F, G, H, X), medtem ko imajo ostale izoforme le eno, torej MT-2A, MT-3 in MT-4 (13). Zaradi podobnih lastnosti izoformi MT-1 in MT-2 ponavadi označujemo z MT-1/2.

MT-3 z 68 AK se razlikuje od MT-1 in MT-2 (MT-1/2) po dodatni AK treonin na N-terminalnem koncu in z glutatom bogatim heksapeptidom na C-terminalnem koncu ter različnem naboju. Za to izoformo je značilno konzervativno zaporedje Cys(6)-prolin-Cys-prolin(9), ki ima pomembno vlogo pri strukturi in sodeluje pri specifični nevroinhibitorni funkciji MT-3 (14).



Slika 2: Shematski prikaz MT in primerjava AK-zaporedij posameznih človeških izoform MT glede na MT-2A; pri ostalih izoformah so podani AK-ostanki, ki se razlikujejo od MT-2A; Cys so označeni sivo. Prikaz koordinacijskih vezi s Zn^{2+} temelji na določitvi teh v MT-2A pri podganah (6).

1.5 Tkivna in celična porazdelitev metalotioneinov

Količina, izoforme in vsebnosti kovin MT se razlikujejo in so specifične za posamezna tkiva in celice, raven izražanja pa je odvisna tudi od fizioloških in okoljskih pogojev. Vrednosti MT v celicah se lahko razlikujejo tudi do 400-krat (15,16).

Po Bremnerju in Beattieju je najvišja koncentracija MT v telesu v jetrih, ledvicah, črevesju in trebušni slinavki (17). Izoformi MT-1 in MT-2 sta prisotni v vseh celicah (18), izoforma MT-3 je značilna za možgane (14), v mnogo nižjih koncentracijah pa se nahaja tudi v ledvicah (19), trebušni slinavki in črevesju (16), žlezah slinavkah (20), očeh (21) reproduktivnih organih ter rakastih tkivih dojke, žolčnika in prostate (22). MT-4 je prisoten le v epitelijskih celicah kože, jezika, prebavne cevi in vagine (23).

MT so predvsem znotraj-, pa tudi zunajcelični proteini. V celici se nahajajo večinoma v citoplazmi, a se lahko prerazporejajo med posameznimi celičnimi predelki. Najdemo jih v lizosomih (24) in intramembranskem prostoru mitohondrijev (25). Med celično proliferacijo in diferenciacijo se pojavljajo tudi v jedru in/ali okoli njega (26). Do spremenjene znotrajcelične distribucije pride tudi pri različnih boleznih (tumorji itd.) (27).

1.6 Fiziološke funkcije metalotioneinov

Na Cys v MT temeljita dve kemijski aktivnosti - vezava kovin in redoks aktivnost, ki sta osnova vsaj dveh bioloških funkcij - vezave esencialnih in toksičnih kovinskih ionov ter nevtralizacije reaktivnih zvrsti. MT imajo različne vloge v fizioloških, patoloških in toksikoloških stanjih. Ker MT niso en protein, ampak jih je vsaj deset, ki se lahko sočasno izražajo v nekem tkivu v različnih koncentracijah, imajo tudi različne subizoforme verjetno različne funkcije (13).

Osnovne fiziološke funkcije MT so: a) metabolizem in homeostaza esencialnih kovinskih ionov, in sicer predvsem Zn^{2+} (Zn^{2+} je katalitični ali strukturni element več kot 300 encimov ter mnogo transkripcijskih faktorjev in strukturnih proteinov), pa tudi Cu^{1+} , b) detoksifikacija neesencialnih kovinskih ionov (največ Cd^{2+} in tudi Hg^{2+} , Ag^{1+} , pri čemer se vodotopni, v kompleks vezani kovinski ioni iz celic zlahka odstranijo) ter c) uravnavanje znotrajceličnega redoks ravnotežja z razmerjem med apo-MT in MT (12). Sodelujejo pri vezavi radikalov (antioksidativno delovanje) in posredno pri proliferaciji, diferenciaciji in apoptozi celic ter sintezi DNA (8,17,29,30,31,32). MT so znani tudi kot proteini akutne faze, katerih sinteza se inducira ob vnetju, bakterijski infekciji in drugih celičnih stresih (33).

1.7. Metalotioneini v patoloških stanjih

Predvideva se, da MT niso bistveni za življenje, vendar predstavljajo pomembno prednost pri preživetju v primeru različnih oblik celičnega stresa (13), zato pri številnih bolezenskih stanjih pride do spremenjenega izražanja MT. Do povišanih vrednosti MT v tumorskih celicah pride pri večini tumorjev (tumorji dojke, debelega črevesa, ledvic, jeter, pljuč, nazofarinksa, jajčnikov, prostate, žlez slinavk, testisov, žleze ščitnice in sečnega mehurja) in le pri nekaterih tumorjih so MT znižani (hepatocelularni karcinom in adenokarcinom

jeter). Izražanje genov za MT ni enako pri vseh tumorjih, ampak je odvisno od stopnje diferenciacije tumorskih celic in proliferativnega indeksa tumorja ter od vrste tkiva in genskih mutacij (34). Povečano izražanje genov za MT je povezano tudi z odpornostjo tumorskih celic na toksične učinke kemoterapevtikov in obsevanja (35).

Do spremenjenih koncentracij MT v možganih pride pri nevrodegenerativnih boleznih, pri Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni so znižane, pri meningitisu, cerebralnem infarktu in Creutzfeldt-Jacobovi bolezni pa zvišane (14). Vendar je potrebno poudariti, da so tudi zvišanja in znižanja velikokrat variabilna in odvisna od stopnje bolezni, na kar kaže novejša literatura. Pripravki z MT-1 in/ali MT-2 obetajo, da bi se lahko uporabljali v zdravljenju več nevroloških motenj, pri katerih sta glavna patofiziološka procesa oksidativni stres in vnetje (36,37).

V teku je veliko študij, ki poskuša ovrednotiti pomen MT kot bioloških označevalcev za raven cinka v organizmu, izpostavljenost kovinam in prognozo nekaterih tumorjev (13).

1.8 Genska regulacija in indukcija metalotioneinov

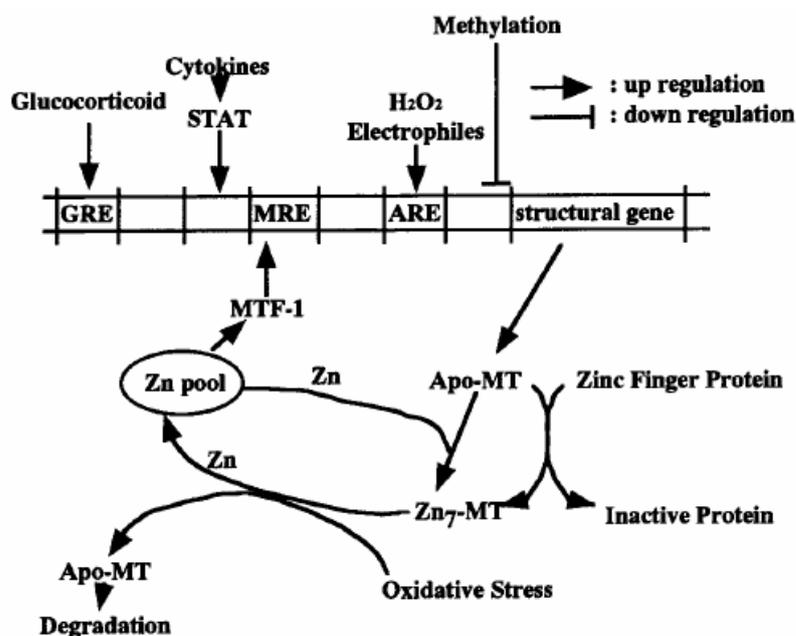
Pri človeku se geni, ki nosijo zapis za MT, nahajajo na enem lokusu na kromosomu 16 (16q13) (38,39), poleg tega pa se na vsaj še štirih kromosomih nahajajo nefunkcionalni geni (40). Med 17 geni za MT na kromosomu 16 jih je 10 funkcionalnih, in sicer 7 genov za MT-1 (*MT-1a*, *MT-1b*, *MT-1e*, *MT-1f*, *MT-1g*, *MT-1h*, *MT-1x*) in po eden za MT-2 (*MT-2a*), MT-3 (*MT-3*) ter MT-4 (*MT-4*). Geni *MT-1c*, *MT-1d*, *MT-1i*, *MT-1l* in *MT-1k* so predvidoma nefunkcionalni. Pri nekaterih bolezenskih stanjih so zaznali tudi mRNA *MT-1r*, *MT-1m* in *MT-1y*. Gen *MT-0* je bil identificiran iz njegovega zaporedja cDNA, njegovo izražanje pa je znano samo v jetrih fetusa. Geni za MT podoben protein 5 (*MTL-5*) so na kromosomu 11 in se uporabljajo kot biološki kazalci diferenciacije moških spolnih celic (17). Strukturni del gena za MT sestavljajo trije eksoni. Ekson 1 kodira del N-terminalne β -domene, ekson 2 β -domeno od AK 11 ali 12 naprej in ekson 3 celo α -domeno (od AK 31 ali 32 naprej) (41).

V posameznem tkivu se ne izražajo vsi geni in ti, ki se, imajo različno raven izražanja. Poznamo veliko število induktorjev MT, ki sprožijo izražanje preko različnih signalnih poti kot odgovor na fiziološke, fizikalne in kemične dogodke (16,41). Danes je poznana predvsem regulacija izražanja izoform MT-1/2, katerih sinteza je koordinirano regulirana in je povečana pod vplivom kovin, hormonov (glukokortikoidi, progesteron, vitamin D₃),

bakterijskih lipopolisaharidov (LPS), citokinov, oksidantov, stresa, sevanja, alkilirajočih kemoterapevtikov itd. (16).

Promotorska regija genov za MT je sestavljena iz nukleotidnih zaporedij TATA in InR, na katera se veže bazalni transkripcijski faktor TFIID, kar spodbudi tvorbo transkripcijskega kompleksa in začetek prepisovanja. Izražanje genov je povezano s cis-elementi znotraj regulatornih delov DNA, ki se nahajajo pred promotorsko regijo, na katera se večinoma vežejo trans-transkripcijski regulatorni proteini. Za regulacijo transkripcije so večinoma odgovorne regije MRE (*angl.* metal responsive elements), ki jih je šest (MREa – MREg) (43). Aktivacijo regij MRE povzroči vezava transkripcijskega faktorja MTF-1 (*angl.* metal-binding transcription factor 1) z vezanim Zn^{2+} in je odgovoren tako za bazalno kot za inducirano izražanje MT, ki ga sprožijo kovine (te so najmočnejši induktorji) in snovi, ki povzročajo tvorbo radikalov. MTF-1 vsebuje šest motivov cinkovih prstov, ki so odgovorni za vezavo na DNA. Vendar pa lahko regije MRE reagirajo tudi z drugimi jedrnimi proteini, ki lahko ali sprožijo ali preprečijo transkripcijo (17,44,45). Radikali (elektrofilni ksenobiotiki, reaktivne dušikove in kisikove zvrsti) regulirajo sintezo MT tudi preko regije ARE (*angl.* antioxidant responsive elements) in preko proteinkinaznih signalnih poti, ki so povezane z različnimi sekundarnimi prenašalci (46,47), glukokortikoidi pa preko regije GRE (*angl.* glucocorticoid responsive elements), ki ni prisotna v vseh genih za MT (17).

Veliko kovin, kot so Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{1+} in Bi^{3+} , inducira prepisovanje genov za MT-1/2, a sta najmočnejša induktorja Zn^{2+} in Cd^{2+} (48). Citokini inducirajo sintezo MT preko aktivacije proteinov STAT (*angl.* signal transducer and activator of transcription kinases), ki se vežejo na STAT-odzivne elemente v regulatorni regiji genov za MT-1/2 (49) ter posredno preko sproščanja glukokortikoidov (16).



Slika 3: Pregled genske regulacije MT. Regulatorna regija genov za MT ima več regij, ki inducirajo transkripcijo. To so: 1) regije MRE (*angl.* metal responsive elements), ki se aktivirajo z vezavo transkripcijskega faktorja MTF-1 z vezanim Zn²⁺, 2) regija GRE (*angl.* glucocorticoid responsive elements), 3) regija, aktivirana s proteini STAT (*angl.* signal transducer and activator of transcription kinases), 4) regija ARE (*angl.* antioxidant responsive elements), katere aktivacija je odvisna od celičnega redoks stanja (50).

Na izražanje genov za MT-1/2 vplivajo tudi epigenetski dejavniki, in sicer struktura kromatina ter metilacija regulatornih odsekov genov za MT (16). V določenih primerih, kot je npr. v jetrih odraslih mišk, lahko pride tudi do ojačevanja genov za MT-1 zaradi izpostavitve Cd²⁺. Dodatne kopije so tudi inducibilne. Gensko ojačevanje je proces, pri katerem se specifična zaporedja DNA podvajajo z večjo frekvenco kot ostala zaporedja istega genoma. Ta proces je običajno opažen v razmerah, pri katerih je povečano izražanje določenega gena povezano z odpornostjo celic na toksične dražljaje (51,52).

Večina regulacije izražanja MT poteka na nivoju transkripcije, vendar pa lahko raven MT uravnavajo tudi posttranskripcijski procesi, saj povečani tvorbi mRNA MT ne sledi vedno tudi povečana sinteza MT (53). Regulacija citoplazemske koncentracije MT je povezana tudi s stopnjo razgradnje ali transporta MT v celične organele (10).

Kljub visoko homologni 5'-regulatorni regiji izoform MT-3 in MT-1 se transkripcijska regulacija izoforme MT-3 razlikuje od regulacije izoform MT-1/2. Vključena je v druge signalne poti in vstopa v interakcijo z drugimi proteinskimi molekulami kot MT-1/2. Izoforma MT-3 je običajno konstitutivno prisotna v območjih s fiziološko visoko

vsebnostjo Zn^{2+} -ionov, ki najbrž regulirajo izražanje gena za MT-3 preko interakcije z MTF-1 (54,55).

1.9 Metalotioneini v centralnem živčnem sistemu

1.9.1 Astrociti

V centralnem živčnem sistemu (CŽS) sodelujeta pri prenosu informacij v glavnem dva tipa celic, nevroni in glija celice. Astrociti so ena od vrst celic glije, ki jo delimo na makroglijo (Schwanove celice v PŽS, oligodendrociti in astrociti v CŽS) in mikroglijo v CŽS (56). Kljub temu, da astrociti predstavljajo 50 % celic v CŽS, so jim dolgo časa pripisovali le pasivno podporno funkcijo, ki poskrbi za homeostazo in vzdrževanje primerne mikrookolja za delovanje nevronov. Vendar se je izkazalo, da imajo astrociti edinstveno vlogo, da lahko v skladu s spremembami v neposrednem okolju spreminjajo svojo obliko in funkcijo, zato imajo popolnoma različne vloge v različnih življenjskih obdobjih (57).

V razvojnem obdobju so astrociti ali astroglija glavni vir molekul zunajceličnega matriksa in adhezijskih molekul, ki oblikujejo pot rastočim nevronom (58). Astrociti zagotavljajo rastočim nevronom, ki še nimajo stikov s svojimi tarčnimi postsinaptičnimi celicami, trofično podporo s sintezo in izločanjem številnih nevrotrofičnih dejavnikov (59). Astroglija aktivno sodeluje tudi pri tvorbi in vzdrževanju sinaptičnih stikov (60). Astrociti so odgovorni tudi za ustvarjanje in vzdrževanje tesnih stikov med endotelijskimi celicami, ki skupaj z astrociti in periciti tvorijo krvno-možgansko pregrado (61).

V odraslem obdobju astrociti skrbijo predvsem za ustvarjanje primerne okolja za delovanje nevronov. Privzemajo prebitek zunajceličnega kalija, amonijeve ione in nekatere nevrotrosmiterje ter tako ščitijo celice pred ekscitacijsko poškodbo. Astrociti regulirajo tvorbo in vzdrževanje sinaps. So enakopraven člen tridelne sinapse s sposobnostjo modulacije sproščanja nevrotrosmiterjev v sinaptično špranjo (63,64,65).

Razne možganske poškodbe lahko povzročijo, da se mirujoči astrociti spremenijo v reaktivne celice, ki aktivno posredujejo v procesu regeneracije centralnega živčevja oziroma pri brazgotinjenju, kadar pride do večje izgube živčnih celic. Za proces reaktivne glioze sta značilni hkratna proliferacija mikroglije in hipertrofija astrocitov. Prehod astrocitov iz mirujočega v reaktivno stanje spremlja povečano izražanje in sproščanje

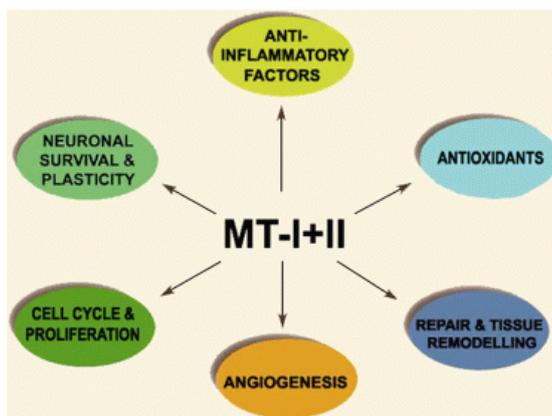
molekul, kot so različni rastni dejavniki, citokini, encimi, citoskeletni proteini, molekule zunajceličnega matriksa in receptorji (57).

Astrociti so prve celice CŽS, ki pridejo v stik s kovinami, ki preidejo krvno-možgansko pregrado. Premorejo mehanizme za kopičenje in s tem ščitijo okoliške nevronske celice pred toksičnim vplivom kovin. Tako vsebujejo velike količine MT-1/2 in drugih prenašalnih proteinov za kovine (ceruloplazmin), visoke citosolne koncentracije glutationa in ključne metaloencime (glutamin sintetaza, Cu-/Zn-superoksid dismutaza) (66).

1.9.2 Izražanje in vloga MT-1/2 v centralnem živčnem sistemu

Vse tri izoforme MT se konstitutivno izražajo v vseh predelih CŽS (71). V najvišjih koncentracijah sta izoformi MT-1/2 prisotni v astrocitih in v nižjih tudi v ostalih celicah, kot so endodimske celice, epiteljske celice horoidnega pleteža, meningne celice pie mater in endoteljske celice krvnih žil. V nevronih je izražanje MT-1/2 nižje kot v astrocitih in je v glavnem v dendritih in aksonih z največjo koncentracijo v hipokampusu (41). Astrociti izločajo MT-1/2 v izvencelični prostor, kjer se vežejo na receptorje družine LDL - LRP1 (*angl.* lipoprotein receptor-related protein-1) in LRP2 (megalin) - na nevronih ter tako povečajo preživetje in rast okoliških nevronov. MT-3 ima nasprotno biološko aktivnost, saj preprečuje rast nevronov (13).

MT-1/2 v možganih vežeta in oddajata v glavnem Zn^{2+} , Cu^{1+} pa glede na do sedaj poznana dejstva predvsem v primeru bolezenskih stanj (Menkesova in Wilsonova bolezen) in Cd^{2+} v primerih, ko pri okvari krvno-možganske pregrade prehaja v tkivo (41). Glavni funkciji MT-1/2 v možganih sta poleg homeostaze Zn^{2+} tudi zaščita nevronov pred apoptozo (10,41). Glavne biološke funkcije MT-1/2 v CŽS so prikazane na Sliki 4.



Slika 4: Glavne funkcije MT-1/2 v CZS (10).

1.9.3 Izražanje in vloga MT-3 v centralnem živčnem sistemu

Najbolj očitna in posebna funkcija izoforme MT-3 je inhibicija rasti nevronov, ki so jo odkrili v kulturi z izvlečkom možganov z Alzheimerjevo boleznijo (14). Takrat je bil protein poimenovan dejavnik zaviranja rasti (GIF, *angl.* growth inhibitory factor) in nekoliko kasneje preimenovan v MT-3. Raven izražanja MT-3 v astrocitih in nevronih še ni povsem pojasnjena. Imunohistokemične metode kažejo, da se MT-3 nahaja predvsem v astrocitih in le malo v nevronih (14,68), medtem ko *in situ* hibridizacija kaže prisotnost mRNA MT-3 pretežno v nevronih (14,74).

Koncentracije MT-3 so visoke v glutamatnih nevronih hipokampusa, amigдали in piriformnem korteksu, v katerih je prisotna visoka koncentracija vezikularnega Zn^{2+} . Slednji se sprošča iz sinaps in ima nevromodulatorno vlogo (41). Znotraj- in zunajcelično ima MT-3 večjo sposobnost vezave radikalov, predvsem hidroksilnih, kot primerljiva koncentracija MT-1/2 v možganih (75). Zato pride do povečanega izražanja MT-3 v reaktivnih astrocitih v akutni fazi po poškodbi možganov, v katerih MT-3 ščiti pred smrtjo nevronov. Po raziskavah s transgenimi miškami iz leta 1997 MT-3 ni potreben za zaščito možganov pred eksogenim Zn^{2+} ali Cd^{2+} (77). So pa Kanao in sod. leta 2005 v poskusih s transgenimi miškami, ki so jim inaktivirali gene za MT-1/2, ugotovili, da v primeru pomanjkanja teh izoform veže živo srebro (Hg^{2+}) izoforma MT-3 (78).

1.9.4 Nevrotoksičnost kadmija

Kadmij je kemični element II-B skupine. Ta v naravi razmeroma redka prehodna kovina se v okolju pojavlja predvsem v obliki spojin s kisikom (CdO), klorom (CdCl_2) in žveplom (CdSO_4 , CdS). Prisoten je v nekaterih cinkovih, manj v svinčevih in bakrovih rudah, najdemo ga tudi v vodi, zraku in hrani. Veliko ga je v cigaretne dimu. Kadmijeve spojine uporabljajo v baterijah, kovinskih prevlekah, barvilih, plastiki, zlitinah itd. (79).

Kadmij velja za enega najbolj toksičnih okoljskih in industrijskih onesnaževalcev. Glavna pot vnosa Cd^{2+} je z vdihanim zrakom. Kopiči se v ledvicah, jetrih, pljučih, možganih in testisih, saj ima zelo dolgo razpolovno dobo (okoli 20 let) (80).

Nevrotoksičnost Cd^{2+} se kaže v nevroloških motnjah in spremembah normalne nevrokemije v možganih pri živalih. V epidemioloških študijah z industrijskimi delavci, izpostavljenimi Cd^{2+} , so bile opisane motnje pozornosti in spomina ter upočasnjena psihomotorična aktivnost. Zaradi selektivne prepustnosti krvno-možganske pregrade se običajno v možganih nahaja zelo malo Cd^{2+} . Vendar se v primeru kronične obremenjenosti s Cd^{2+} prepustnost krvno-možganske pregrade za Cd^{2+} poveča. Cd^{2+} lahko v možganskih celicah sproži tvorbo radikalov, povečano lipidno peroksidacijo, porabo tiolnih skupin, spremenjeno homeostazo kalcija in poškodbo DNA. Lahko moti metabolizem Zn^{2+} in Cu^{1+} v možganih. Zaradi svoje kemijske podobnosti s kalcijem Cd^{2+} moti transportne poti kalcija v živčnih celicah. Cd^{2+} lahko vpliva na ravnotežje ekscitacije/inhibicije v prid inhibitornih živčnih prenašalcev v sinapsi. V več raziskavah navajajo tako *in vitro* kot *in vivo* apoptotično delovanje Cd^{2+} (81). Cd^{2+} se, kot eden najmočnejših induktorjev sinteze MT, veliko uporablja v študijah izražanja MT.

1.10 Metode določanja izražanja genov za metalotioneine

Izražanje genov za MT lahko ocenjujemo na nivoju proteinov ali mRNA. Na nivoju proteinov lahko uporabimo direktne ali indirektne metode določanja. Za direktno določanje proteinov so v uporabi:

- imunološki testi z encimsko sklopljenimi reakcijami (ELISA) ali radioaktivnimi označevalci (RIA),
- imunohistokemične metode,

- poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE) s prenosom western.

Bolj pogosto se MT določajo z indirektnimi metodami z merjenjem vsebnosti in/ali koncentracije kovinskih ionov (npr. atomska absorpcijska spektrofotometrija) ali z elektrokemično ali fotometrično določitvijo tiolnih skupin v povezavi s kromatografskimi metodami, kot je HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti). Veliko je uporabljana tudi UV-absorpcijska spektrofotometrija, s katero po ločitvi proteinov s HPLC merimo absorbanco pri 254 nm (tiolatna vez – S_{Cys}-M; M = kovina), 280 nm (pri-/odsotnost aromatskih AK) ali 200 nm (peptidna vez).

Novejše so metode za oceno genskega izražanja na nivoju mRNA:

- prenos northern,
- *in situ* hibridizacija,
- mikromreže,
- kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (qPCR).

Na podlagi analize izražanja genov na dveh nivojih - proteinov in mRNA - lahko ugotovimo, ali pride pri sintezi proteinov do kakršnih koli posttranskripcijskih procesov, ki povzročijo, da se količina mRNA razlikuje od količine proteinov.

2 NAMEN DELA

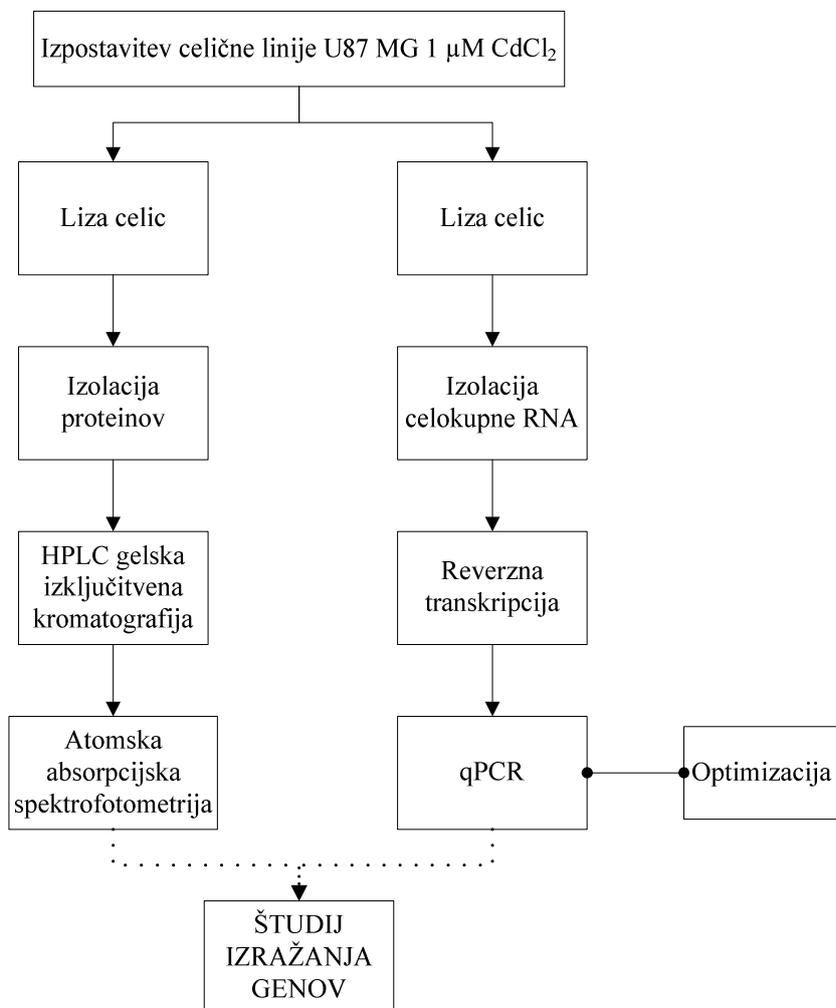
Astrociti, celice možganske glije, so pomembno mesto kopičenja kovin v CZS in vsebujejo veliko količino MT. Na izražanje genov za MT vpliva veliko induktorjev sinteze MT, eden najmočnejših je Cd^{2+} .

V okviru diplomske naloge bomo proučevali izražanje genov za MT v humani celični liniji astrocitomov, U87 MG, po izpostavitvi 1 μM raztopini CdCl_2 . Preverili bomo hipotezo, da Cd^{2+} -ioni inducirajo gensko izražanje in sintezo MT v astrocitomih. Indukcija je odvisna od koncentracije Cd^{2+} in časa izpostavitve.

Izražanje MT bomo spremljali na dveh nivojih – na nivoju mRNA in na nivoju proteinov. Na nivoju mRNA se bomo osredotočili na merjenje izražanja dveh genov za MT, *MT-1a* in *MT-2a*, z uporabo metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR). Ker v literaturi ni podatkov o določanju teh genov v astrocitomih, bomo pred tem razvili ustrezno metodo. Poskuse bomo izvedli s po dvema paralelnima vzorcema celic. Izražanje MT na nivoju proteinov bomo spremljali posredno, z merjenjem koncentracij na MT vezanih kovin (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{1+}) z metodo atomske absorpcijske spektrofotometrije. Predvsem nas bo zanimala vezava Cd^{2+} na MT in morebitna indukcija sinteze MT. Poskuse bomo izvedli s po enim vzorcem celic.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Potek poskusov



Slika 5: Shema eksperimentalnega dela: izpostavitev celične linije U87 MG 1 μM CdCl₂ in analiza izražanja genov za MT z metodama atomske absorpcijske spektrofotometrije in kvantitativne verižne reakcije s polimerazo (qPCR).

3.2 Celična linija U87 MG

3.2.1 Opis celične linije U87 MG

Izražanje genov za MT smo merili v humani celični liniji glije, U87 MG. U87 MG je celična linija tumorskih astrocitov, astrocitomov (stopnja malignosti IV). Celice, zvezdaste oblike, se pritrdijo na podlago plastenke za gojenje celic in rastejo v enem sloju. Celično linijo smo gojili na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) v Ljubljani v skladu z internimi navodili za gojenje celičnih linij (83).

3.2.2 Odtaljevanje celic

Celice U87 MG so bile shranjene v tekočem dušiku pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vialo s celicami smo odtalili pri sobni temperaturi in vsebino prenesli v 25 cm^2 -plastenko za gojenje celic ter dodali medij za gojenje. Po 10 urah smo medij zamenjali s svežim, da smo odstranili dimetilsulfoksid (DMSO, krioprotektant med zamrznitvijo).

3.2.3 Gojenje celic

Celice smo gojili v sterilnih plastenkah s perforiranim zamaškom v ustreznem mediju za gojenje (Preglednica I) v CO_2 -inkubatorju ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , ICO_2 -185, Kambič). Plastenko za gojenje celic smo vedno označili z imenom celične linije, pasažo (zaporedno število presajanj) in datumom presajanja. Delo je potekalo v sterilnih pogojih v komorah z laminarnim pretokom zraka. Medij, pufer in encim 0,1 % tripsin smo pred uporabo vedno segreti na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Celice smo »prehranjevali« vsak tretji ali četrti dan, tako da smo izrabljen medij s pipeto odstranili iz plastenke za gojenje celic in ga nadomestili z ustreznim volumnom svežega.

Celice smo presadili v novo, večjo plastenko za gojenje celic, ko so dosegle 70-80 % konfluenco (delež prerasti dna plastenke za gojenje celic): odstranili smo izrabljen medij in sprali celice s pufrom 1x PBS (Preglednica II), da smo odstranili morebitne mrtve celice. Celice smo odlepili od podlage plastenke za gojenje celic z ustreznim volumnom encima, 0,1 % tripsina (TrypLE Express, Gibco). Plastenko smo nato inkubirali nekaj minut v CO_2 -

inkubatorju in preverili pod mikroskopom, ali so se celice odlepile od podlage. Delovanje encima smo ustavili z dodatkom svežega medija in homogenizirano celično suspenzijo prenesli v centrifugirko, ki smo jo centrifugirali 5 min pri 10000 obratih/min (centrifuga PLC-322, Tehnica, Železniki). Usedlino s celicami smo nato ponovno suspendirali v svežem mediju (če smo želeli prešteti celice, smo 10 μ l celične suspenzije uporabili za štetje s hemocitometrom), jo prenesli v novo plastenko za gojenje celic, dodali ustrezno količino medija in celice vrnili CO₂-inkubator. Na tak način smo celice gojili do ustreznih količin.

Preglednica I: Sestava 50 ml medija za gojenje.

Sestavina	Količina
Minimalni esencialni medij, MEM (Minimum Essential Medium Eagle, PAA)	44 ml
Serum zarodka goveda, FBS (Fetal Bovine Serum, PAA)	5 ml
L-glutamin (Stable Glutamine, 200 mM, PAA)	0,5 ml
Penicilin/streptomycin (PAA)	0,5 ml

Preglednica II: Sestava 50 ml pufra 1x PBS.

Sestavina	Količina
Fosfatni pufer (Dulbecco's PBS (10x) without Ca an Mg, PAA)	5 ml
Sterilna voda	45 ml

3.2.4 Štetje celic s hemocitometrom

Celice smo šteli, kadar smo nameravali v novo plastenko za gojenje celic prenesti željeno število celic. Iz 1 ml celične suspenzije smo vzeli 10 μ l vzorca in ga zmešali s 40 μ l tripan modrega. Tripan modro je barvilo, ki prodre samo v mrtve celice, jih obarva modro in jih tako loči od živih. 10 μ l mešanice smo nanесли na hemocitometer in celice prešteli v štirih kvadratih, površine 1 mm². Število celic v suspenziji izračunamo po enačbi 1.

$$\frac{(A + B + C + D) \cdot R \cdot K_p}{4} \quad 1$$

A, B, C, D - število celic v posameznem kvadratu,

R - faktor redčenja; 5 v primeru 10 μ l celične suspenzije v 40 μ l tripan modrega,

K_p - faktor za izračun števila celic v 1 ml celične suspenzije ($K_p = 10^4$).

3.2.5 Test toksičnosti CdCl_2 za celično linijo U87 MG

Citotoksičnost CdCl_2 za celice U87 MG smo ugotavljali z barvilom MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid). MTT je rumena vodotopna snov, ki jo mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste nevodotopne kristale formazana, ki so topni v dimetilsulfoksidu. Količina nastalega formazana se določi kolorimetrično in je linearno odvisna od števila živih celic (84).

Celice smo nasadili na mikrotitrsko ploščo z 96 vdolbinami z gostoto 8000 celic/0,2 ml medija/vdolbino in jih približno 24 ur inkubirali na 37 °C in 5 % CO_2 , da so se celice pritrdile na podlago. Nato smo celicam odvzeli medij in jim dodali svež medij (kontrola, CdCl_2 neizpostavljene celice) ali medij z različnimi končnimi koncentracijami CdCl_2 (0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM). Za kontrolo in vsako koncentracijo CdCl_2 smo pripravili pet paralelk. V tri vdolbine smo nanegli samo medij, brez celic (slepa kontrola). Po 45 urah inkubacije smo v vsako vdolbino dodali 20 μ l MTT ter ploščo inkubirali nadaljnje 3 ure. Medij smo nato s pipeto previdno odstranili in v vsako vdolbino dodali 0,2 ml dimetilsulfoksida, da smo raztopili kristale formazana. Absorbanco (A) ali optično gostoto (OD) smo izmerili z GENios spektrofluorimetrom (Tecan, Austria) pri 570 nm (referenčni filter 690 nm). Povprečje absorbanc slepe kontrole smo odšteli od absorbanc vdolbin s celicami in zatem izračunali povprečje absorbanc petih paralelk. Citotoksičnost CdCl_2 smo podali kot odstotek preživetja celic, izpostavljenih različnim koncentracijam CdCl_2 , glede na neizpostavljeno kontrolo, ki smo ga izračunali po enačbi 2.

$$\% \text{ preživetja celic} = 100 \cdot \frac{A_{Cd}}{A_{kontrola}} \quad 2$$

3.2.6 Izpostavitev celične linije Cd²⁺ za določanje proteinov

Po približno en milijon celic smo nasadili v 25 cm²-plastenke za gojenje celic s 5 ml medija. Naslednji dan smo izrabljen medij odstranili in dodali 5 ml medija s CdCl₂ s končno koncentracijo 1 μmol/l_{medija} (112,41 μg/l). Celice smo izpostavili 1 μM raztopini CdCl₂ za 1, 3, 24 in 48 ur. Pripravili smo tudi kontrolo (CdCl₂ neizpostavljene celice), tako da smo izrabljen medij le zamenjali s 5 ml svežega in jo inkubirali nadaljnjih 48 ur. Po končani izpostavitvi smo vzorcu celic najprej odstranili raztopino CdCl₂, ki smo jo shranili v označeno centrifugirko na -80 °C za kasnejšo analizo kovin z metodo masne spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Celice smo sprali s 3,5 ml 1x PBS, jih odlepili od podlage z 1,5 ml 0,1 % tripsina in inkubirali 2 min. Dodali smo 5 ml svežega medija, vsebino prenesli v centrifugirko, jo centrifugirali 5 min pri 8000 obratih/min (centrifuga PLC-322, Tehnica, Železniki). Nato smo odstranili supernatant in usedlino ponovno suspendirali v 1 ml svežega medija ter 10 μl te celične suspenzije uporabili za štetje celic. Preostali del celične suspenzije smo centrifugirali 5 min pri 8000 obratih/min. Supernatant smo odstranili, usedlino pa še dvakrat sprali z 1x PBS tako, da smo jo ponovno suspendirali v 2 ml 1x PBS in vsebino centrifugirali 5 min pri 8000 obratih/min. Nato smo usedlino ponovno suspendirali v 1 ml 1x PBS, jo prenesli v mikrocentrifugirko in jo centrifugirali. Supernatant smo odstranili in vzorce (celice v usedlini) shranili na -80 °C.

3.2.7 Izpostavitev celične linije Cd²⁺ za določanje mRNA

Po približno en milijon celic smo nasadili v 25 cm²-plastenke za gojenje celic s 5 ml medija za gojenje. Naslednji dan smo izrabljen medij odstranili in dodali 5 ml medija s CdCl₂ s končno koncentracijo 1 μmol/l_{medija} (112,41 μg/l). Celice smo izpostavili 1 μM raztopini CdCl₂ za 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 ur. Celicam, ki smo jih izpostavili Cd²⁺ za 72 ur, smo po približno 35 urah izpostavitve zamenjali izrabljen medij s Cd²⁺ s svežim, ki je vseboval Cd²⁺. Pripravili smo tudi kontrolo (CdCl₂ neizpostavljene celice), ki smo jo inkubirali 3 ure v času poskusa. Za vsako izpostavitev in neizpostavljeno kontrolo smo pripravili dva paralelna vzorca celic. Po končani izpostavitvi smo celice sprali s 3,5 ml 1x PBS ter v plastenko za gojenje celic dodali 1,6 ml reagenta TRIzol® (Invitrogen, ZDA) za izolacijo celokupne RNA. Plastenko smo nato inkubirali 5 min na sobni temperaturi,

vsebino s pipeto dobro premešali in jo prenesli v mikrocentrifugirke. Vzorce smo shranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Določanje proteinov

Izolacijo in delno karakterizacijo MT smo izvedli s HPLC gelsko izključitveno kromatografijo in atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo. Podatki o retencijskem času standarda MT-I/II, prisotnost UV odziva pri 205 nm ter detekcija Zn^{2+} , Cu^{1+} in Cd^{2+} ob istem retencijskem času so nam služili za karakterizacijo ali potrditev prisotnosti MT v naših vzorcih. S tem smo dobili osnovne podatke o vezavi esencialnih kovin (Zn^{2+} , Cu^{1+}) ter kovin, privzetih iz medija po izpostavljenosti (Cd^{2+}).

3.3.1 Priprava celičnega lizata

Vzorce zamrznjenih celic, izpostavljenih Cd^{2+} , in vzorec neizpostavljene kontrole ($\sim 10^6$ celic/vzorec) smo odtalili in jim dodali 1 ml pufru za lizo celic (Preglednica III), ki smo ga predhodno, da bi zmanjšali prisotnost kisika, pretresli v ultrazvočni kadički in prepihali s tekočim dušikom do nasičenja (~ 10 min).

Preglednica III: Sestava 100 ml pufru za lizo celic (pH 7,6).

Sestavina	Količina
10 mM Tris-HCl	158 mg
10 mM ditiotritol	1,5 mg
0,5 M saharoza	855 mg
Destilirana voda	do 100 ml

Celice smo lizirali s trikratnim zaporednim zamrzovanjem in odtaljevanjem v tekočem dušiku. Na ta način smo zaradi nastanka kristalov razbili membrane celic in njenih predelkov in sprostili znotrajcelično vsebino. Celični lizat smo centrifugirali 35 min pri 13000 g in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf AG Centrifuge 5804 R, rotor F-45-30-11, Nemčija). Supernatant celičnega lizata smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in tako supernatant kot usedlino stehali ter ju do uporabe shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Izolacija metalotioneinov

MT smo iz supernatantov celičnih lizatov izolirali s HPLC gelsko izključitveno kromatografijo. Ta metoda omogoča ločevanje molekul na osnovi njihove velikosti. Kromatografska kolona je napolnjena s stacionarno fazo, ki jo predstavljajo porozni delci agaroze in dekstrana. Največje molekule potujejo najhitreje, saj se lahko gibljejo le med delci stacionarne faze, ne morejo pa difundirati vanje. Manjše molekule na svoji poti vzdolž kolone zahajajo v pore, se v njih nekaj časa zadržujejo in nato oddifundirajo v mobilno fazo. Njihov elucijski volumen je zato večji. Stopnja zamreženosti stacionarne faze in dimenzija kolone določata obseg velikosti molekul, ki se bodo lahko med seboj ločile (85,86).

Ločena molekula je tako okarakterizirana s časom zadrževanja na koloni (retencijski čas) ali z elucijskim volumnom mobilne faze, ki je potreben za elucijo molekule iz kolone. Retencijski čas (R_t) se uporablja predvsem pri HPLC, elucijski volumen (V_e) pa pri klasični gelski kromatografiji.

Kromatografija je bila izvedena s HPLC sistemom, sestavljenim iz naslednjih komponent:

- črpalka: Pump L-7100 (Merck Hitachi),
- injektor: Injector 7725i (Rheodyne, ZDA),
- dve zaporedno vezani koloni SuperdexTM 75 10/300 GL (Pharmacia Biotech AB, Švedska),
- detektor: UV Detector L-7400 (Merck Hitachi),
- zbiralec frakcij: Fraction Collector L-7650 (Merck).

Uporabljeni koloni optimalno ločujeta proteine in peptide z molekulsko maso 3-70 kDa. Z zaporedno vezavo dveh kolon smo omogočili ločitev vseh treh izoform MT, MT-1, MT-2 in MT-3. Celokupni volumen kolone je znašal 48 ml. Uporabljeni koloni smo ekvilibrirali z dvema volumnoma (~ 100 ml) elucijskega pufra (Preglednica IV).

Preglednica IV: Sestava 2 l elucijskega pufra (pH 8).

Sestavina	Količina
30 mM Tris-HCl	9,456 g
0,1 mM ditiotreitrol	0,0308 g
Destilirana voda	do 2 l

Približno 0,5 ml odtaljenega supernatanta smo nanesti na umerjeno kolono pri pretoku elucijskega pufra (mobilne faze) 0,5 ml/min in zbirali 100 0,5 ml-frakcij, pri čemer smo za nadaljnjo analizo uporabili le frakcije, v katerih so se predvidoma eluirali MT. V eluatu smo neposredno (on-line) spremljali absorbanco pri 205 nm, kjer ima absorpcijski vrh peptidna vez. Nazadnje smo na kolono nanesti še standard MT-1/2, zmes izoform MT-1 in MT-2 (Metallothionein from Rabbit Liver, Sigma, ZDA).

3.3.3 Merjenje kovin, vezanih na metalotioneine

Koncentracijo na MT vezanih kovin (Zn^{2+} , Cu^{1+} , Cd^{2+}) smo merili v supernatantu in usedlini celičnega lizata ter HPLC frakcijah supernatanta in standarda MT-1 /2, z atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo (AAS). Metoda temelji na absorpciji svetlobe določene valovne dolžine atomov v osnovnem stanju, pri čemer je potrebno kovinske ione predhodno pretvoriti v atomarno stanje. Poznamo dve metodi tvorbe prostih atomov:

- plamenska AAS (FAAS), pri kateri vzorec (tekočina, plin) razpršimo v aerosol, ki ga pomešamo z oksidantom in gorilnim plinom ter vodimo v plamen.
- elektrotermična AAS (ETAAS), pri kateri vzorec (tekočina, trdna snov) vnesemo v grafitno cevko, ki jo s pomočjo električnega toka programirano segrevamo.

Kot vir svetlobe za vzbujanje atomov v osnovnem stanju se ponavadi uporablja žarnica z votlo katodo. Padec intenzitete svetlobe določene valovne dolžine pri prehodu skozi vzorec je, v skladu z Beer-Lambertovim zakonom, sorazmeren koncentraciji določenega kovinskega iona.

Koncentracijo Cu^{1+} in Cd^{2+} v frakcijah, supernatantih in usedlinah smo merili z ETAAS na aparaturi Hitachi Z-8270 Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrometer (Hitachi, Japonska), Zn^{2+} pa z FAAS na aparaturi Varian AA-5 Atomic Absorption Spectrometer (Varian, ZDA). Meje detekcije za posamezne elemente v merjeni raztopini so podane v Preglednici V.

Preglednica V: Meje detekcije merjene raztopine pri AAS (87).

Element	FAAS	ETAAS
Cd	8 ng/ml	0,2 ng/ml
Zn	5 ng/ml	/
Cu	15 ng/ml	0,4 ng/ml

3.4 Kvantitativno določanje mRNA

Relativno izražanje genov za MT smo določali za dva izmed genov, ki nosijo zapis za MT, in sicer za gena *MT-1a* in *MT-2a*. Relativno količino mRNA izoform MT-1A in MT-2A v vzorcih celic, izpostavljenih Cd^{2+} , in neizpostavljenih celic smo določili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR), zato smo pred tem izolirali celokupno RNA iz celic, z reverzno transkripcijo sintetizirali cDNA in količino slednje določili z metodo qPCR. Količina cDNA je odvisna od količine mRNA v vzorcu. Za natančno relativno kvantifikacijo mRNA MT-1A in MT-2A smo določili tudi relativno količino mRNA oziroma cDNA za referenčni gen, gen za transferinski receptor (*TfR*).

3.4.1 Izolacija celokupne RNA

RNA smo izolirali v prostoru, ločenem od prostorov, namenjenih pripravi reakcijskih mešanic za PCR in detekcijo produktov PCR. Izolacija je potekala v komori za sterilno delo, uporabljali smo materiale in opremo brez ribonukleazne aktivnosti

Celokupno RNA (totRNA) smo iz vzorcev izolirali po postopku TRIzol® Reagent (Invitrogen, ZDA). Reagent TRIzol® vsebuje fenol in gvanidinijev izotiocianat, ki razbijeta membrane celic in celičnih organelov, a ohranita celovito RNA.

Vzorci celic ($\sim 10^6$) v 1,6 ml reagenta TRIzol®, shranjene na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo odtalili in jih dobro suspendirali s pipetiranjem. Po 5 min inkubacije pri sobni temperaturi smo vzorcem dodali 320 μl kloroforma, jih premešali, inkubirali 3 min pri sobni temperaturi ter centrifugirali 15 min pri 12000 g in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zgornjo, brezbarvno vodno fazo s totRNA smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, ji dodali 0,8 ml izopropanola, ki je omogočil precipitacijo totRNA, ter ju dobro premešali. Po 10 min inkubacije pri sobni temperaturi smo centrifugirali 10 min pri 12000 g in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odpipetirali smo supernatant in usedlini s totRNA dodali 1,6 ml 75 % etanola, ju premešali na vrtničnem mešalniku in centrifugirali 5 min pri 7500 g in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ves supernatant smo odpipetirali in posušili mikrocentrifugirke s totRNA na dnu. Nato smo totRNA raztopili v 50 μl vode brez ribonukleazne aktivnosti. Vzorce totRNA smo shranili na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.2 UV-spektrofotometrično določanje koncentracije in čistote izolirane RNA

Koncentracijo in čistoto izolirane totRNA smo izmerili z aparaturo NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ZDA). Absorbanco smo merili pri 260 nm in 280 nm. Rezultat je bil podan v obliki razmerja absorbanc pri 260 in 280 nm ($A_{260/280}$), pokazatelja čistosti totRNA, in koncentracije totRNA, izračunane iz absorbance pri 260 nm (100).

Vzorci izolirane totRNA v mikrocentrifugirkah smo odtalili, dobro premešali na vrtničnem mešalniku in nanašali 1,5 μ l vzorca na optično vlakno aparature, vsak vzorec smo nanesli dvakrat.

3.4.3 Določanje kakovosti izolirane RNA

Za ugotavljanje kakovosti totRNA smo uporabili komplet Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Nemčija) in aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Nemčija). Aparatura omogoča avtomatizirano ločevanje molekul RNA na osnovi njihovih velikosti s kapilarno elektroforezo, izmeri fluorescenco in poda rezultat v obliki elektroferograma in faktorja RIN (*angl.* RNA Integrity Number), ki pove kakovost RNA.

Ustrezno redčene vzorce totRNA (0,5 μ g/ μ l) in standard velikosti Agilent RNA 6000 Ladder (Agilent Technologies, ZDA) smo denaturirali 2 min pri 80 °C, kratko centrifugirali in shranili na ledu. Nato smo pripravili mešanico gela (Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix) in barvila (RNA Nano Dye Concentrate) in je nanesli po 9 μ l v predpisane vdolbine na čipu (RNA 6000 Nano Chip). V vdolbine za standard velikosti in vzorce na čipu smo najprej nanesli po 5 μ l reagenta Agilent RNA 6000 Nano Marker in nato v iste vdolbine po 1 μ l standarda velikosti in vzorcev. Vsak vzorec smo nanesli dvakrat. Čip smo z vrtničenjem premešali in vstavili v aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer. Podatke smo analizirali s programom 2100 Expert Software (Agilent Technologies, Nemčija).

3.4.4 Sinteza cDNA

Sintezo cDNA smo z reverzno transkripcijo izvedli s kompletom High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, ZDA) po navodilih proizvajalca v prostoru za izolacijo RNA.

mRNA v vzorcih smo z reverzno transkriptazo prepisali v cDNA tako, da smo vzorce totRNA odtalili ter jih redčili z vodo brez ribonukleazne aktivnosti na končno koncentracijo 0,2 µg/µl. Na ledu smo odtalili reagenta v kompletu, ju premešali z vrtinčnim mešalnikom, kratko centrifugirali in pripravili reakcijsko mešanico glede na število vzorcev, ki je vsebovala (za en vzorec):

- 10 µl 2X RT Buffer in
- 1 µl 20X RT Enzyme Mix.

Pripravljeno reakcijsko mešanico smo premešali z vrtinčnim mešalnikom, kratko centrifugirali in na ledu 11 µl reakcijske mešanice dodali 9 µl vzorca totRNA (0,2µg/µl) v 0,5 ml-mikrocentrifugirkah. Tako smo obratno prepisali 1,8 µg totRNA v 20 µl-mešanici. Mešanico smo premešali z vrtinčnim mešalnikom, kratko centrifugirali in vzorce totRNA obratno prepisali v cikličnem termostatu Thermocycler RoboAmp 4200P (MWG Biotech, Nemčija). Reverzna transkripcija je potekala po temperaturni shemi, opisani v Preglednici VI.

Preglednica VI: Temperaturna shema reverzne transkripcije (RT).

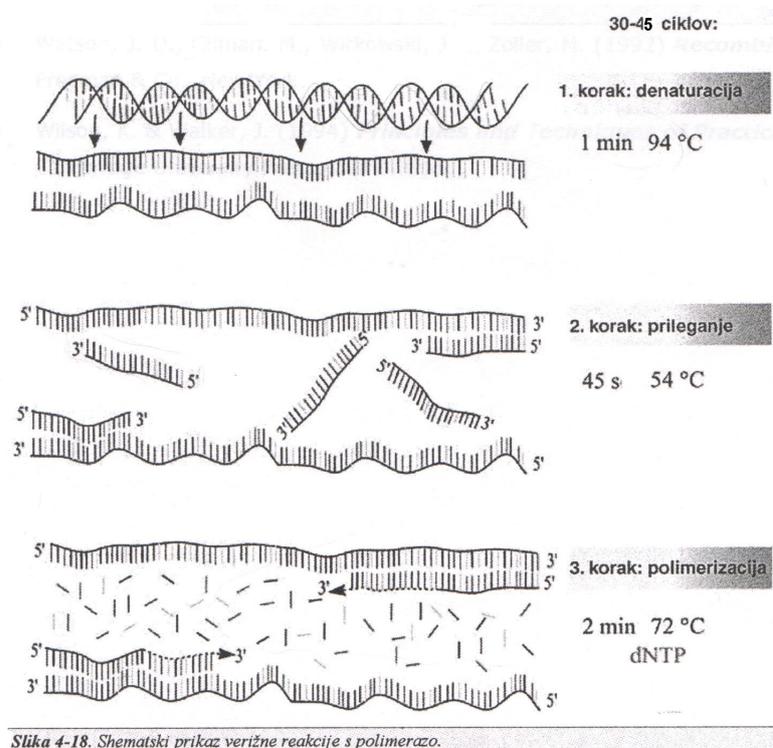
Pogoji RT	1. korak	2. korak	3. korak
Temperatura (°C)	37	95	4
Čas	60 min	5 min	∞

Vzorci cDNA smo shranili na -60 °C.

3.4.5 Princip kvantitativne verižne reakcije s polimerazo

Princip metode qPCR temelji na detekciji pomnoženega zaporedja DNA med samo reakcijo PCR (Slika 6). Od začetnega števila kopij tarčnega zaporedja nukleinske kisline je odvisno, koliko ciklov bo potrebnih, da zaznamo fluorescenco poročevalske molekule (88),

v našem primeru barvila SYBR Green I, ki se vrine v dvovijačno DNA in močno fluorescira. Vezava je nespecifična, zato lahko zaznamo tudi nespecifične produkte in dimere oligonukleotidnih začetnikov, kar preverimo z analizo disociacijske krivulje po zadnjem ciklu PCR (89).



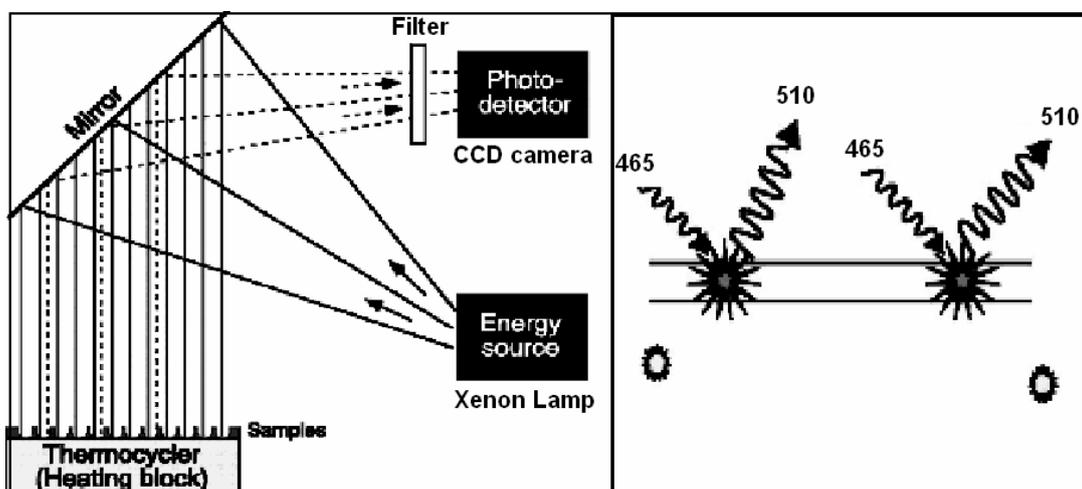
Slika 6: Shematski prikaz verižne reakcije s polimerazo (PCR) (86).

3.4.6 Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo

Za merjenje izražanja genov *MT-1a* in *MT-2a* smo metodo predhodno optimizirali: na novo smo razvili smerne in protismerne oligonukleotidne začetnike za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij tarčnih in referenčnega gena (poglavje 4.3.2.1); določili smo ustrezne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in cDNA, temperaturo naleganja oligonukleotidnih začetnikov ter čas pomnoževanja pri 72 °C (poglavje 4.3.2.2).

Reakcije qPCR smo opravljali v prostoru, kjer se pripravljajo reakcijske mešanice za PCR, v komori za sterilno delo. Reakcije qPCR smo izvajali v cikličnem termostatu LightCycler 480 II (Roche Applied Science, ZDA) in meritve spremljali s programom LightCycler®

480 SW, Ver. 1.5. Aparatura ima kot vir ekscitacije ksenonsko žarnico, ki vzbuja barvilo SYBR Green I pri 465 nm, oddano fluorescenco meri CCD-kamera pri 510 nm (Slika 7).



Slika 7: Na sliki levo: Shema aparature za qPCR. Vzorci damo v ciklični termostat, ki programirano spreminja temperaturo za vsak cikel PCR. Vzorci so izpostavljeni ekscitacijski svetlobi (ksenonska žarnica), oddano fluorescenco meri CCD-kamera. Na sliki desno: Po interkalaciji v dvovijačno DNA molekula SYBR Green I močno fluorescira (absorpcija svetlobe pri 465 nm, oddajanje svetlobe pri 510 nm) (90).

Za pripravo reakcijskih mešanic smo uporabili komplet LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 2x conc. (Roche Applied Science, ZDA). Ta je vseboval DNA-polimerazo FastStart Taq DNA Polymerase, reakcijski pufer, 2'-deoksinukleozid trifostate, barvilo SYBR Green I in $MgCl_2$. Pripravo reakcijskih mešanic in reakcije qPCR smo izvajali v skladu z navodili proizvajalca kompleta in aparature.

Liofilizirane oligonukleotidne začetnike za pomnožena zaporedja genov *MT-1a*, *MT-2a* in *TfR* (Sigma Genosys) smo po navodilih proizvajalca raztopili v avtoklavirani ultračisti vodi, da smo dobili 100 μM raztopine oligonukleotidnih začetnikov. Iz teh raztopin smo nato pripravili ustrezne količine 5 μM delovnih raztopin oligonukleotidnih začetnikov. Začetni oligonukleotidi in njihove lastnosti so navedeni v Preglednici VII.

Preglednica VII: Začetni oligonukleotidi za pomnožena zaporedja genov *TfR*, *MT-1a* in *MT-2a*: ime gena, nukleotidno zaporedje za smerni (F) in protismerni (R) oligonukleotidni začetnik, temperatura tališča (T_m) za vsak oligonukleotidni začetnik ter dolžina pomnoženega zaporedja.

Gen	Nukleotidno zaporedje	T_m [°C]	Dolžina pomnoženega zaporedja [bp]
<i>TfR</i>	F: 5'-GCATTCTCTAACTTGTTTGGTGGAG-3'	65,6	188
	R: 5'-GTCCCATAGCAGATACTTCCAC	61,3	
<i>MT-1a</i>	F: 5'-CTCGAAATGGACCCCAACT-3'	63,8	219
	R: 5'-ATATCTTCGAGCAGGGCTGTC-3'	64,4	
<i>MT-2a</i>	F: 5'-TGCAACCTGTCCC GACTCTA-3'	65,8	268
	R: 5'-GGAAGTCGCGTTCTTTACATCT-3'	63,2	

V mikrocentrifugirki smo pripravili reakcijsko mešanico za določanje posameznega pomnoženega zaporedja cDNA, ki je vsebovala avtoklavirano ultračisto vodo, reagent SYBR Green I Master ter smerni (F) in protismerni (R) oligonukleotidni začetnik (Preglednica VIII). Potrebni volumen smo izračunali iz števila reakcij za določanje vzorcev in slepe kontrole ter upoštevali 10 % prebitok. Pripravljeno reakcijsko mešanico smo premešali z vrtnčenjem in kratko centrifugirali.

Preglednica VIII: Sestava 20 μ l-mešanice za posamezno pomnoženo zaporedje (za eno reakcijo).

	<i>TfR</i>	<i>MT-1a</i>	<i>MT-2a</i>
SYBR Green I Master [μ l]	10	10	10
Avtoklavirana ultračista voda [μ l]	6,6	6	6
5 μ M F [μ l]	0,7	1	1
5 μ M R [μ l]	0,7	1	1
cDNA [μ l]	2	2	2
Skupaj [μl]	20	20	20

Po 18 μ l reakcijske mešanice smo nanegli v vdolbinice na mikrotitrski ploščici z 96 vdolbinami (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche Applied Science, ZDA) in dodali po 2 μ l vzorca cDNA. Za določanje genov *MT-2a* in *TfR* smo vsako reakcijo opravili enkrat, za *MT-1a* pa v dvojnikih. Za vsako reakcijsko mešanico na ploščici smo

izvedli tudi slepo reakcijo, v kateri smo namesto cDNA reakcijski mešanici dodali avtoklavirano ultračisto vodo. Ploščico smo pokrili z prozorno samolepilno folijo (LightCycler® 480 Sealing Foil, Roche Applied Science, ZDA), jo centrifugirali 1 min pri 1900 g in dali v ciklični termostat ter določili pogoje reakcije qPCR za pomnoženo zaporedje (Preglednica IX).

Preglednica IX: Pogoji reakcij qPCR za določanje pomnoženih zaporedij genov *MT-1a*, *MT-2a* in *TfR*. Edini različen pogoj med posameznimi pomnoženimi zaporedji je temperatura naleganja oligonukleotidnih začetnikov.

Temperatura		Čas	Postopek	
95 °C		5 min	Aktivacija DNA polimeraze	
95 °C		10 s	PCR: 45 ciklov	Denaturacija
65 °C (<i>MT-1a</i> , <i>TfR</i>)	68 °C (<i>MT-2a</i>)	15 s		Prileganje
72 °C		20 s		Podaljševanje
95 °C		5 s	Disociacijska krivulja	
65 °C		1 min		
97 °C		-*		
40 °C		10 s	Ohlajanje	

*Dvig temperature od 65 °C do 97 °C s hitrostjo 0,008 °C/s.

3.4.7 Analiza rezultatov reakcij kvantitativne verižne reakcije s polimerazo

Podatke reakcij qPCR smo analizirali s programom LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5 (Roche Applied Science, ZDA), z metodo absolutne kvantifikacije (Absolute Quantification Analysis). Program je izrisal diagram pomnoževanja in po naši nastavitvi bazne linije, praga in števila točk preverjanja določil vrednost Ct (cikel, v katerem intenziteta fluorescence preseže nastavljen prag, *angl.* threshold cycle) za vsak vzorec. Relativno izražanje genov smo izračunali v programu Microsoft Excel, z metodo $\Delta\Delta C_T$ (91). Ta metoda zahteva predhodni dokaz, da sta učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena približno enaki. Določitev učinkovitosti za pomnožena zaporedja genov *MT1-a*, *MT-2a* in *TfR* je opisana v poglavju 4.3.3.1.

Vrednosti Ct za tarčna gena smo normalizirali glede na referenčni gen tako, da smo za vsak vzorec izračunali ΔCt po enačbi 3.

$$\Delta Ct = C_{t_{\text{tarčni gen}}} - C_{t_{\text{referenčni gen}}} \quad 3$$

Ker nas je zanimala relativno izražanje genov *MT-1a* in *MT-2a* pri različnih časovnih izpostavitvah Cd^{2+} glede na neizpostavljeni vzorec, smo od vrednosti ΔCt za vzorce, izpostavljene Cd^{2+} , odšteli povprečno vrednost ΔCt za neizpostavljena vzorca (kontrola) po enačbi 4.

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{vzorec}} - \Delta Ct_{\text{kontrola}} \quad 4$$

Končno relativno izražanje genov *MT-1a* in *MT-2a* smo izračunali po enačbi 5.

$$\text{Relativno izražanje gena} = 2^{-\Delta \Delta Ct} \quad 5$$

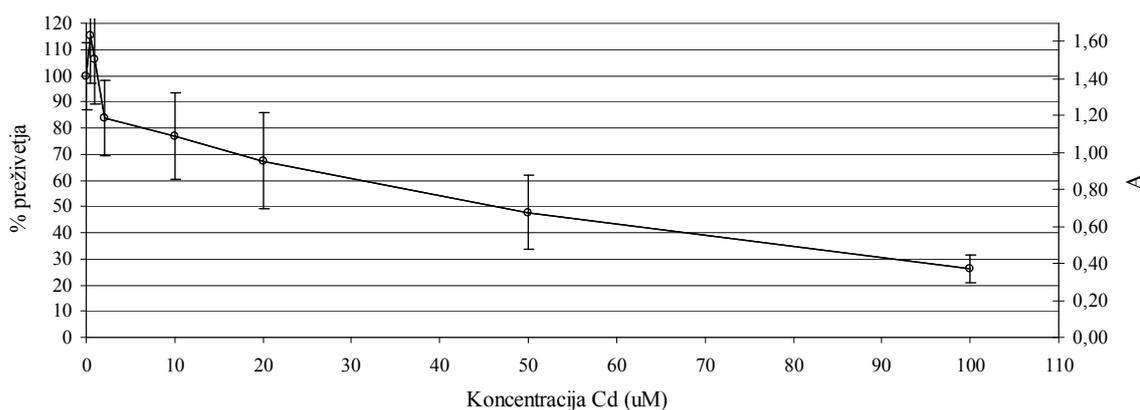
Rezultate za vsako časovno izpostavitve Cd^{2+} in neizpostavljeni vzorec smo izračunali iz povprečja dveh paralelnih vzorcev celic ter podali standardno deviacijo (SD) in relativno standardno deviacijo (RSD).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Celična linija U87 MG

4.1.1 Test toksičnosti CdCl₂ za celično linijo U87 MG

S testom toksičnosti smo preverili toksičnost različnih koncentracij Cd²⁺ na celice U87 MG. Celice smo za 48 ur izpostavili raztopinam z različnimi koncentracijami Cd²⁺: 0,5 μM (56,2 ng/ml), 1 μM (112,4 ng/ml), 2 μM (224,8 ng/ml), 10 μM (1,1 μg/ml), 20 μM (2,3 μg/ml), 50 μM (5,6 μg/ml) in 100 μM (11,2 μg/ml). Nato smo UV/VIS-spektrofotometrično določili odstotek preživelih celic glede na preživetje neizpostavljenih celic.



Slika 8: Test toksičnosti CdCl₂ za celično linijo U87 MG. Celice so bile izpostavljene 0, 0,5, 1, 2, 10, 20, 50, 100 μM raztopini CdCl₂ za 48 ur. Na ordinati sta % preživetja celic in vrednost A_{570/690}, izračunana na podlagi meritev petih paralelk, podana je standardna deviacija.

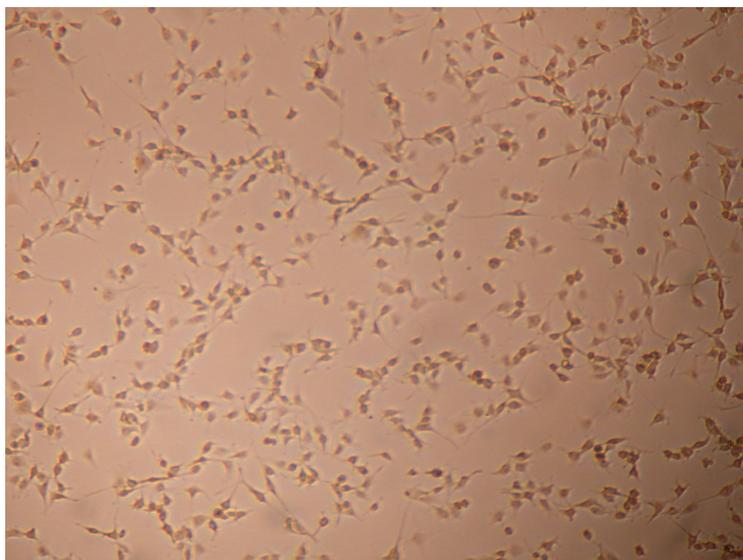
Iz Slike 8 je razvidno, da je izpostavitvev nizki, 0,5 μM in 1 μM koncentraciji Cd²⁺ vplivala spodbudno na razmnoževanje celic. V 0,5 μM raztopini je bilo po 48 urah več celic za 15,6 %, v 1 μM pa za 6,5 % več glede na število celic v mediju brez CdCl₂. Višje koncentracije Cd²⁺ so znižale delež preživelih celic, toksičnost Cd²⁺ je naraščala sorazmerno z višanjem koncentracije. Tako je pri 100 μM koncentraciji Cd²⁺ preživela le četrtina celic. Naši rezultati se ujemajo s študijo Singha in sod., v kateri so ugotovili, da je kratkotrajna izpostavitvev (72 h) nizkim koncentracijam Cd²⁺ (1 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 100 ng/ml) pomembno, do 50 %, povečala stopnjo proliferacije Leydigovih celic mišjih

testisov (celična linija TM3), medtem ko je visoka koncentracija Cd^{2+} (1 $\mu\text{g/ml}$) za več kot 50 % znižala delež preživelih celic (92).

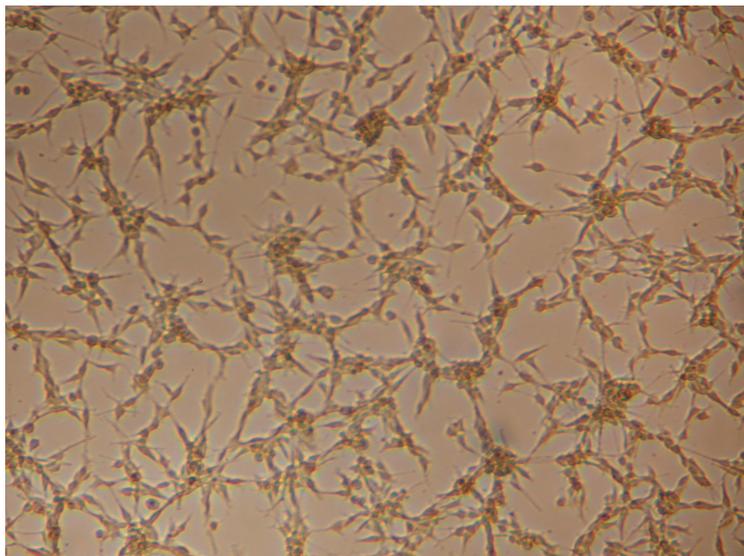
Poznano je, da se v primerih izpostavljenosti astrocitov različnim nevrotoksičnim snovem celice obnašajo v skladu s teorijo hormezije, ki govori o bifaznim modelu odnosa med koncentracijo nevrotoksina in učinkom v celici. Nizke koncentracije aktivirajo obrambne in prilagoditvene mehanizme in delujejo stimulatorno na celice, visoke koncentracije pa so toksične (93).

4.1.2 Fotografiranje celične linije U87 MG med izpostavitvijo Cd^{2+}

Za določitev izražanja genov za MT smo celično linijo U87 MG izpostavili 1 μM raztopini CdCl_2 . Med gojenjem, pred, med in po izpostavitvi smo celice opazovali pod mikroskopom (Reichert Jung). Na celicah, izpostavljenih CdCl_2 , nismo opazili nobenih morfoloških sprememb. Celice so se naprej razmnoževale (podvojitveni čas celic U87 MG je približno 24 ur) in pri veliki gostoti nasaditve tvorile skupke (Slika 9b).



a)



b)

Slika 9: Fotografiji celične linije U87 MG, posneti pri 40-kratni povečavi (mikroskop Reichert Jung, fotoaparater Nikon, Coolpix 995), a) takoj po začetku 48-urne izpostavitve $1 \mu\text{M CdCl}_2$ in b) tik pred koncem 48-urne izpostavitve $1 \mu\text{M CdCl}_2$.

4.2 Določanje proteinov

4.2.1 Delež kovin v vodotopnem in partikularnem delu celičnega lizata

Zanimal nas je delež kovin, predvsem Cd^{2+} , v vodotopnem in partikularnem delu celičnega lizata, oziroma v supernatantu in usedlini. Po 0, 1, 3, 24 in 48 urah izpostavitve celic $1 \mu\text{M Cd}^{2+}$, homogenizaciji in centrifugiranju smo z AAS izmerili koncentracijo kovin (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{1+}) v supernatantu in usedlini (Preglednica XI). V supernatantu se nahajajo vodotopne molekule (tudi MT), v usedlini pa fragmenti celičnih membran, nerazbite celice in celični organeli ipd. Iz stehtanih mas supernatantov in usedlin ter izmerjenih koncentracij kovin v supernatantih in usedlinah smo nato izračunali masne deleže kovin v vodotopnem in partikularnem delu celičnih lizatov (Slika 10).

Z metodo masne spektrometrije z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) smo izmerili koncentracije kovinskih ionov v začetni raztopini $1 \mu\text{M CdCl}_2$ (začetni medij, brez celic) in v $1 \mu\text{M}$ raztopinah medija s CdCl_2 po koncu posameznih izpostavitvev (Preglednica XI).

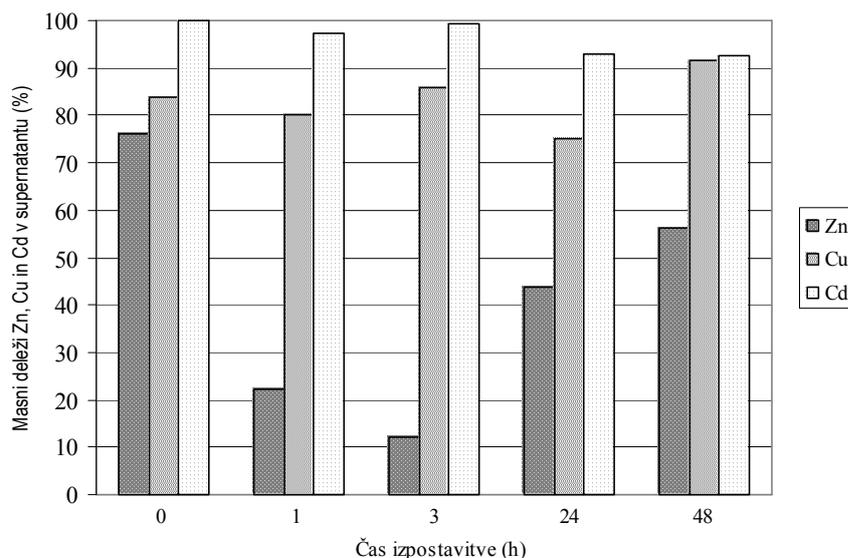
Preglednica X: Število celic po koncu izpostavitve, mase usedlin in supernatantov celičnih lizatov ter vsebnosti kovin (Zn^{2+} , Cu^{1+} , Cd^{2+}) v usedlinah in supernatantih po 0, 1, 3, 24 in 48 urah izpostavitve $1 \mu M$ $CdCl_2$.

Čas [h]	Število celic	Usedlina				Supernatant			
		Masa [g]	Vsebnost [ng]			Masa [g]	Vsebnost [ng]		
			Zn^{2+}	Cu^{1+}	Cd^{2+}		Zn^{2+}	Cu^{1+}	Cd^{2+}
0	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^6$	0,0094	84,8	3,1	0,0	1,0063	268,7	16,1	0,4
1	$(8,8 \pm 0,5) \cdot 10^5$	0,0134	53,0	3,3	0,0	1,0182	15,3	13,1	1,5
3	$(8,6 \pm 0,2) \cdot 10^5$	0,0043	37,1	3,4	0,0	1,0302	5,2	20,2	2,6
24	$(13,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$	0,0162	68,8	4,3	2,0	0,9845	63,7	12,7	25,8
48	$(3,0 \pm 0,2) \cdot 10^6$	0,0063	61,9	2,0	2,0	1,0305	79,4	21,7	25,5

Preglednica XI: Koncentracije kovin (Zn^{2+} , Cu^{1+} , Cd^{2+}) v usedlinah in supernatantih celičnih lizatov in v $1 \mu M$ raztopinah $CdCl_2$ (Medij) po 0, 1, 3, 24 in 48 urah izpostavitve celic U87 MG $1 \mu M$ $CdCl_2$. Podane so tudi koncentracije kovin v začetni $1 \mu M$ raztopini medija $sCdCl_2$.

Čas [h]	Koncentracija Zn^{2+}			Koncentracija Cu^{1+}			Koncentracija Cd^{2+}		
	Usedlina [ng/g _u]	Supernatant [ng/g _s]	Medij [ng/ml]	Usedlina [ng/g _u]	Supernatant [ng/g _s]	Medij [ng/ml]	Usedlina [ng/g _u]	Supernatant [ng/g _s]	Medij [ng/ml]
0	9021,3	267,0	300±39	329,8	16,0	26±1	0,0	0,4	1,2±0,4
1	3955,2	15,0	323±38	243,3	12,9	20±3	3,0	1,5	108±3
3	8627,9	5,0	287±1	779,1	19,6	20±3	4,7	2,6	112±2
24	4246,9	54,5	-*	262,4	12,9	-*	122,8	26,2	-*
48	9825,4	77,0	177±15	315,8	21,1	24±10	315,9	24,7	80±1
Začetna raztopina medija s $CdCl_2$	-	-	288±55	-	-	23±5	-	-	116±1

*Meritev koncentracij kovinskih ionov v raztopini medija s $CdCl_2$ po 24-urni izpostavitvi nam ni uspelo izvesti.



Slika 10: Masni deleži Zn^{2+} in Cu^{1+} in Cd^{2+} v vodotopnem delu (supernatantu) celičnega lizata po 0, 1, 3, 24 in 48 urah izpostavitve celic U87 MG $1 \mu M CdCl_2$.

Na Sliki 10 vidimo, da se je ves Cd^{2+} v celici nahajal predvsem v vodotopnem delu celičnih lizatov. Deleži Zn^{2+} in Cu^{1+} so bili nižji.

4.2.2 Vezava kovin na metalotioneine

V nadaljnjih poskusih smo spremljali vezavo Cd^{2+} na MT pri izpostavitvi subtoksični, $1 \mu M$ koncentraciji Cd^{2+} . Koncentracije kovin (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{1+}) v HPLC frakcijah supernatantov smo merili z AAS po 0, 1, 3, 24 in 48 urah izpostavitve Cd^{2+} . Izmerili smo tudi koncentracije kovin v HPLC frakcijah standarda MT-1/2.

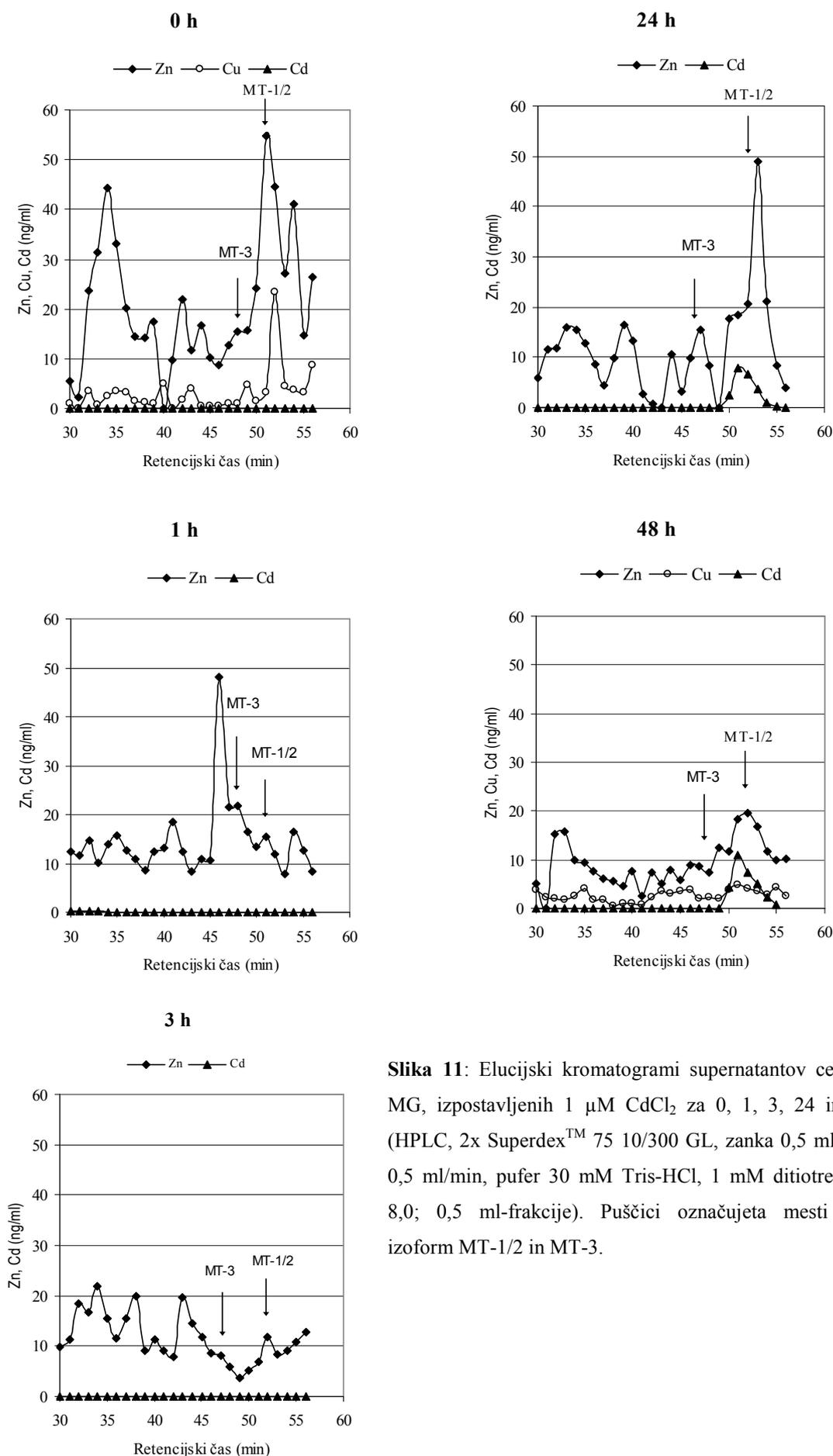
Regulacija dvovalentnih ionov v astrocitih je dokaj zapletena in odvisna od veliko dejavnikov. Med drugim so za normalno delovanje celice zelo pomembne ustrezne ravni Zn^{2+} in Cu^{1+} ter čim nižje ravni neesencialnih kovin, kot je Cd^{2+} . Astroцити vzdržujejo »prost« (nestabilno vezan) Zn^{2+} v ozkem koncentracijskem območju, kajti prenizke koncentracije inhibirajo celično rast in delitev, previsoke pa so toksične (94). MT-1/2 igrajo pomembno vlogo pri regulaciji homeostaze Zn^{2+} , sodelujejo pa tudi v detoksifikaciji neesencialnih, toksičnih kovin (Cd^{2+} , Hg^{2+}).

MT lahko vežejo do 7 dvovalentnih ali 12 enovalentnih ionov (8). V tkivih so večinoma prisotni MT z mešano sestavo, z vezanim Zn^{2+} , Cu^{1+} in neesencialnimi kovinami, vendar niso nasičeni s kovinami in imajo tudi proste tiolne skupine. Cu^{1+} -ioni so na MT vezani z

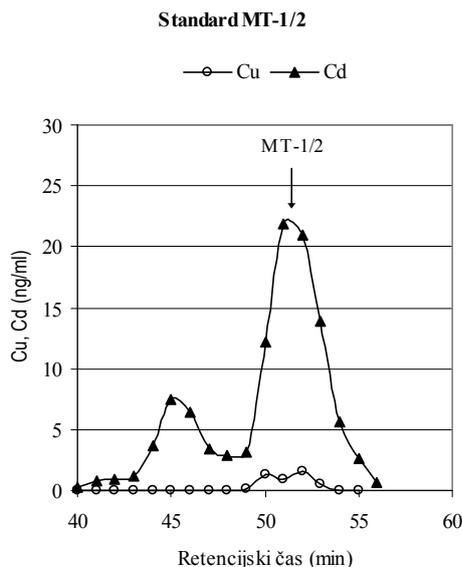
veliko afiniteto in jih Cd^{2+} ne more izpodriniti. Zn^{2+} -ioni, vezani na MT, niso vezani z enako afiniteto. Pri MT s samimi Zn^{2+} -ioni so štirje vezani močno, dva srednje močno in eden šibko. Reaktivnost MT je odvisna predvsem od vsebnosti Zn^{2+} (13). Če je v celici večja potreba po Zn^{2+} , se ta prenese z MT na druge proteine, proste tiolne skupine pa se lahko oksidirajo ali vežejo neesencialne kovine.

Mehanizem indukcije sinteze MT s Cd^{2+} poteka z izpodrivanjem Zn^{2+} z MT. V primeru nižje koncentracije Cd^{2+} v celici Cd^{2+} -ioni reagirajo s prostimi tiolnimi skupinami MT. Če je Cd^{2+} -ionov več, ti izpodrinejo šibkeje vezane Zn^{2+} -ione s tiolnih skupin. Presežni Zn^{2+} -ioni se med drugim vežejo na transkripcijski faktor MTF-1 in povečajo izražanje genov za MT.

Elucijski kromatogrami supernatantov so prikazani na Sliki 11. Elucijski kromatogram standarda MT-1/2 je prikazan na Sliki 12. Mesto elucije izoform MT-1 in MT-2 smo določili s standardom MT-1/2 iz zajčjih jeter (Metallothionein from Rabbit Liver, Sigma, ZDA). Mesto elucije izoforme MT-3 smo ocenili glede na vrh, ki se je eluiral pred standardom MT-1/2 in s primerjavo rezultatov za MT-3, ki so jih pri podobnih pogojih in z uporabo standarda za MT-3 dobili drugi raziskovalci (95,96,99).



Slika 11: Elucijski kromatogrami supernatantov celic U87 MG, izpostavljenih $1 \mu\text{M}$ CdCl_2 za 0, 1, 3, 24 in 48 ur (HPLC, 2x SuperdexTM 75 10/300 GL, zanka 0,5 ml, pretok 0,5 ml/min, pufer 30 mM Tris-HCl, 1 mM ditiotritol, pH 8,0; 0,5 ml-frakcije). Puščici označujeta mesti elucije izoform MT-1/2 in MT-3.



Slika 12: Elucijski kromatogram standarda MT-1/2, Sigma (HPLC, 2x Superdex™ 75 10/300 GL, zanka 0,5 ml, pretok 0,5 ml/min, pufer 30 mM Tris-HCl, 1 mM ditioneitol, pH 8,0; 0,5 ml-frakcije). Puščica označuje mesto elucije izoform MT-1/2.

Iz elucijskih kromatogramov je razvidno, da se izoformi MT-1 in MT-2 eluirata v območju z retencijskim časom med 50 in 55 min in vrhom pri 51 in 53 min. Izoforma MT-3 se eluira v območju retencijskega časa med 46 in 50 min z vrhom pri 47, 48 ali 49 min. Na variabilnost retencijskih časov elucije proteinov vplivajo majhne količine proteinov v vzorcih. Na nekaterih elucijskih kromatogramih vidimo lepo ločena vrhova za izoformi MT-1 in MT-2, npr. na elucijskem kromatogramu za standard MT-1/2 pri meritvah Cu^{1+} , medtem ko sta izoformi pri meritvah Cd^{2+} združeni v enem širokem vrhu.

Na elucijskih kromatogramih po 1 in 3 urah izpostavitve $1 \mu\text{M Cd}^{2+}$ so bile izmerjene koncentracije Cd^{2+} pod mejo detekcije. Iz elucijskih kromatogramov po 24 in 48 urah izpostavitve pa je razvidno, da je ves Cd^{2+} v vodotopnem delu celičnega lizata v tem času vezan na MT. Vezava Cd^{2+} na MT onemogoči interakcijo Cd^{2+} -ionov z drugimi molekulami v celici in torej njegovo toksično delovanje. Po 48 urah izpostavitve je delež Cd^{2+} v vrhu, ki ustreza MT-1/2, povečan glede na njegov delež po 24 urah izpostavitve.

V poskusu smo najbrž uporabili premajhno število celic ($\sim 10^6$) za posamezno časovno izpostavitvev. Zato smo izolirali majhno količino proteinov z nizkimi koncentracijami vezanih kovin. Posledično meritve kovin, predvsem Zn^{2+} , zaradi eksperimentalnih napak nihajo.

Na elucijskem kromatogramu neizpostavljenega kontrolnega vzorca celic (0 h), vidimo, da so bile izmerjene koncentracije Zn^{2+} in Cu^{1+} višje kot v ostalih vzorcih, kar je lahko posledica razlik v številu celic (Preglednica X). Celice smo prešteli po koncu izpostavitve in ugotovili, da so se celice med izpostavitvijo $1 \mu M Cd^{2+}$ naprej razmnoževale. Glede na končno število celic sta primerljiva samo elucijska kromatograma za 0 in 48 ur. Vendar so izmerjene koncentracije kovin na elucijskem kromatogramu za 48 ur nižje od koncentracij kovin na elucijskem kromatogramu za 0 ur. Možno je, da je prisotnost Cd^{2+} v celici spremenila znotrajcelični metabolizem. Cd^{2+} poleg genov za MT namreč poveča izražanje še številnih drugih genov (97). Pri tem lahko pride do prenosa Zn^{2+} in Cu^{1+} na druge proteine. Možno je tudi, da je prišlo do izločanja MT iz celic (98) ali razgradnje MT.

Zanimala nas je morebitna indukcija sinteze MT pri izpostavitvi $1 \mu M Cd^{2+}$. Na elucijskih kromatogramih bi se indukcija videla tako, da bi se koncentracije na MT vezanih kovin za nekajkrat povečale, do česar v našem poskusu ni prišlo, zato lahko ugotovimo, da ni prišlo do povečane sinteze MT.

Žnidarič in sod. so izvedli zelo podoben poskus z $1 \mu M CdCl_2$ na celični liniji U87 MG z AAS. Koncentracije kovin (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{1+}) v HPLC frakcijah so merili po 0, 3, 6, 12, 24 in 48 urah in ugotovili, da je prišlo v času med 12 in 48 urami izpostavitve do povečane vezave Cd^{2+} na MT in manjšanja deleža vezanega Zn^{2+} , katerega delež se je višal v vrhu, kjer so se eluirali visokomolekularni proteini (prosti volumen kolone, V_0). Na podlagi tega so sklepali, da je $1 \mu M Cd^{2+}$ povzročil izpodrivanje Zn^{2+} z MT-1/2 in indukcijo sinteze MT (99).

Na podlagi naših rezultatov ugotavljamo, da v humani celični liniji U87 MG ni prišlo do indukcije sinteze MT med 48-urno izpostavitvijo $1 \mu M CdCl_2$. Ugotavljamo tudi, da se ves Cd^{2+} v vodotopnem delu celičnega lizata veže na MT.

4.3 Kvantitativno določanje mRNA

4.3.1 Priprava celokupne RNA

4.3.1.1 UV-spektrofotometrično določanje koncentracije in čistote izolirane RNA

Izolaciji totRNA iz dveh paralelnih vzorcev celic, izpostavljenih $CdCl_2$ za 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 ur, in neizpostavljenih kontrol, je sledilo UV-spektrofotometrično določanje

koncentracije in čistote izolirane totRNA (aparatura NanoDrop). Absorbance smo merili pri 260 nm in 280 nm, vsak vzorec totRNA smo izmerili dvakrat.

Razmerje absorbanc pri 260 nm in 280 nm ($A_{260/280}$) je pokazatelj čistote totRNA. Vrednost $A_{260/280}$ okoli 2,0 pomeni čisto RNA, nižja vrednost kaže na onečiščenje vzorca totRNA z DNA, fenoli in proteini (100). Vrednost $A_{260/280}$, je bila za vse vzorce med 1,90-1,99, kar je pomenilo, da je izolirana totRNA čista. Podatki meritev koncentracije totRNA v vzorcih so navedeni v Prilogi (Preglednica I).

Koncentracije totRNA v vzorcih, izračunane iz A_{280} v skladu z Beer-Lambertovim zakonom, so se med vzorci zelo razlikovale. Razlike so lahko posledica različnega števila celic v vzorcih, kar pomeni različno količino totRNA v vzorcih. Število celic v vzorcu, kljub štetju s hemocitometrom pri presajanju, je bilo morda že na začetku poskusa izpostavitve Cd^{2+} različno, poleg tega pa so se celice tudi med izpostavitvijo naprej razmnoževale. Tako so imele celice, ki so bile izpostavljene Cd^{2+} za 72 ur, več časa za rast in razmnoževanje kot celice z 1-urno izpostavitvijo Cd^{2+} . Drug verjeten razlog za razlike v količinah totRNA v vzorcih so napake pri našem delu pri izolaciji totRNA iz vzorcev celic. Podatki meritev čistote totRNA v vzorcih so navedeni v Prilogi (Preglednica I).

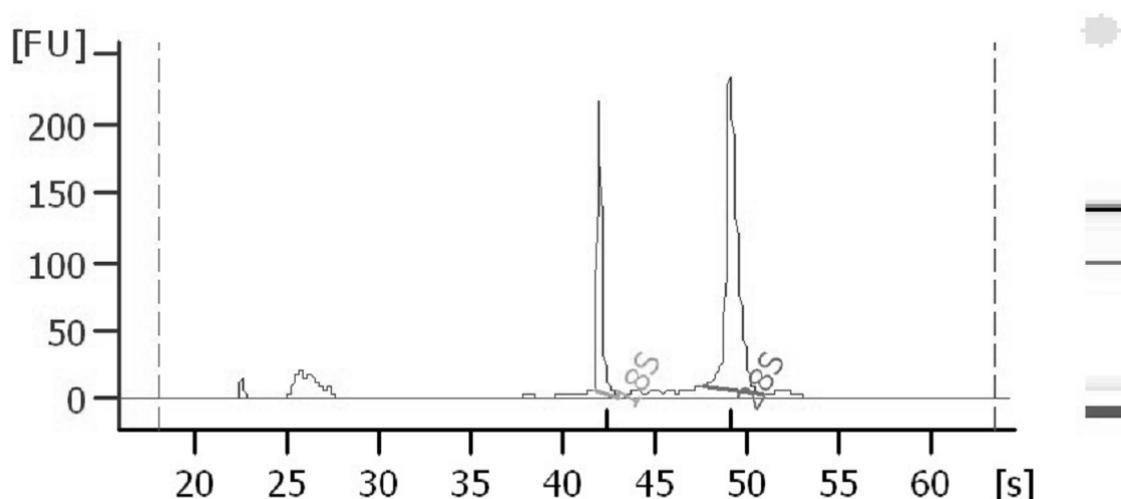
Z znano koncentracijo totRNA smo vzorce pripravili tako, da smo v vseh vzorcih obratno prepisali enako količino totRNA (1,8 μ g).

4.3.1.2 Določanje kakovosti izolirane RNA

Za natančnost metode qPCR je ključna kakovost izolirane totRNA, saj je učinkovitost reverzne transkripcije iz delno razgrajene totRNA znatno slabša kot iz intaktne (101). Kakovost izolirane totRNA v vzorcih smo preverili s kapilarno elektroforezo (aparatura Bioanalyzer), v dveh ponovitvah.

Na elektroferogramih so bili vidni ločeni in visoki vrhovi ribosomskih RNA različnih velikosti (rRNA 18S, rRNA 28S) v vzorcih totRNA (102). Vrednost faktorja RIN, številčne vrednosti kakovosti izolirane totRNA, je bila za vse vzorce blizu maksimalne vrednosti 10,00, med 9,65 in 9,95. To je pomenilo, da je bila kakovost izolirane totRNA dobra in med izolacijo ni prišlo do njenega razpada.

Vrednosti faktorja RIN za vzorce totRNA so navedene v Prilogi (Preglednica I).



Slika 13: Primer elektroferograma kapilarne elektroforeze (BioAnalyzer) celokupne RNA, izolirane iz vzorca celic, izpostavljenih 1 μM raztopini CdCl_2 za 24 ur.

4.3.2 Razvoj metode kvantitativne verižne reakcije s polimerazo

4.3.2.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov

Da smo zagotovili specifično pomnoževanje zaporedij tarčnih genov *MT1-a* in *MT2-a* ter referenčnega gena *TfR* v vzorcih cDNA, smo razvili ustrezne smerne in protismerne oligonukleotidne začetnike za ta nukleotidna zaporedja. Pri načrtovanju oligonukleotidnih začetnikov smo upoštevali čim več pravil, ki na splošno veljajo za ustrezno izbiro oligonukleotidnih začetnikov in pomnoženega zaporedja cDNA.

Oligonukleotidne začetnike za pomnožena zaporedja genov *MT-1a*, *MT-2a* in *TfR* smo izbrali na podlagi humanih nukleotidnih zaporedij za te gene v bazi podatkov Ensembl Genome Browser (103). Protismerni oligonukleotidni začetnik smo izbrali tako, da smo izbrano zaporedje gena prevedli v obratno komplementarno zaporedje. Izbrane pare oligonukleotidnih začetnikov za posamezna pomnožena zaporedja smo nato analizirali s programom IDT OligoAnalyzer (104), s katerim smo preverili, ali posamezen par oligonukleotidnih začetnikov ne bo tvoril sekundarnih struktur in dimerov, ter programom Basic Local Alignment Tool (BLAST) (105), s katerim smo preverili, ali so izbrani oligonukleotidni začetniki specifični za posamezen gen. Načrtovane začetne oligonukleotide smo preizkusili, kot je opisano v poglavju 4.3.2.2.

Nukleotidna zaporedja načrtovanih oligonukleotidnih začetnikov in njihove lastnosti so prikazani v Preglednici VII.

4.3.2.2 Optimizacija koncentracij oligonukleotidnih začetnikov in cDNA ter pogojev kvantitativne verižne reakcije s polimerazo

Za na novo razvite oligonukleotidne začetnike smo določili optimalne koncentracije smernega in protismernega oligonukleotidnega začetnika. Določili smo tudi optimalno koncentracijo cDNA, ustrezno temperaturo naleganja oligonukleotidnih začetnikov in čas pomnoževanja pri 72 °C. Optimizacijske reakcije qPCR smo izvajali po enakem postopku kot optimizirane reakcije qPCR za vzorce (poglavje 3.4.6) s to razliko, da smo te reakcije izvajali s po dvema naključnima vzorcema in v dvojnikih. Pogoji optimizacijskih reakcij qPCR (sestave mešanic, pogoji reakcij qPCR) so bili enaki optimiziranim reakcijam qPCR za vzorce razen naslednjih razlik:

- v količini smernega in protismernega oligonukleotidnega začetnika,
- v količini vzorcev cDNA,
- v temperaturi naleganja oligonukleotidnih začetnikov in
- v času pomnoževanja pri 72°C.

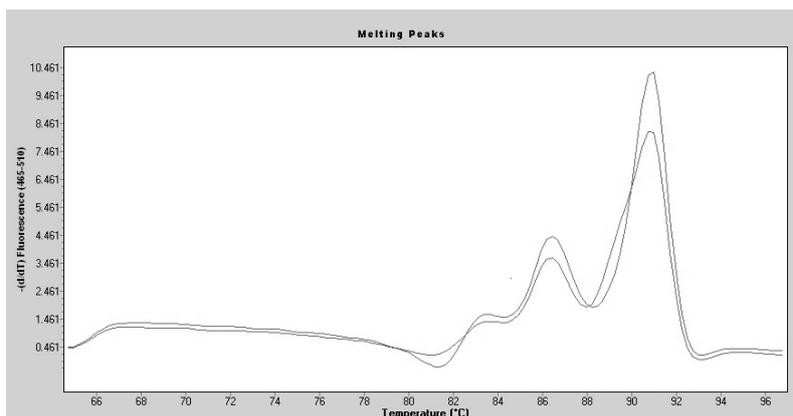
V Preglednici XII so navedene količine sestavin 20 µl-mešanic in pogoji, ki smo jih spreminjali v optimizacijskih reakcijah qPCR glede na optimizirane reakcije qPCR za vzorce.

Preglednica XII: Optimizacijske reakcije qPCR za posamezna pomnožena zaporedja, navedene so količine sestavin mešanice in pogoji reakcij qPCR, ki smo jih spreminjali glede na optimizirane pogoje reakcij qPCR za vzorce. To so: količina 5 μ M raztopine smernega oligonukleotidnega začetnika (F), količina 5 μ M raztopine protismernega oligonukleotidnega začetnika (R), količina cDNA, temperatura naleganja oligonukleotidnih začetnikov (OZ) in čas pomnoževanja pri 72 °C. Optimalni pogoji so označeni odebeljeno.

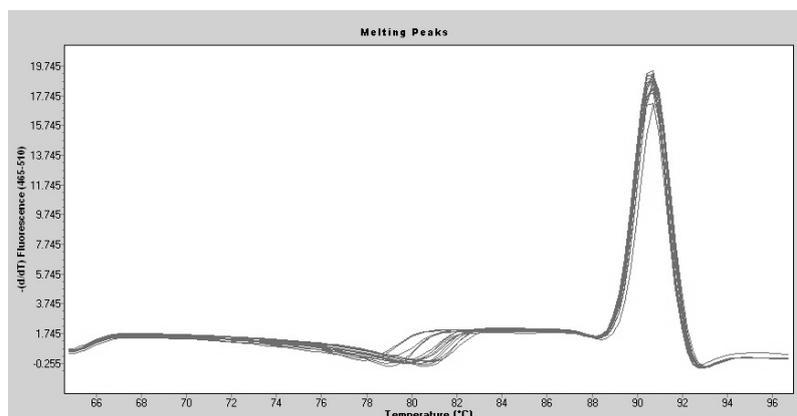
Pomnoženo zaporedje	5 μ M F [μ l]	5 μ M R [μ l]	cDNA [μ l]	Temperatura naleganja OZ [°C]	Čas pomnoževanja pri 72 °C [s]
<i>MT-1a</i>	2	2	1	59	25
	1	1	1	61	20
	1	1	1	65	20
	1	1	1	68	20
	1	1	2	65	20
<i>MT-2a</i>	1	1	1	65	15
	2	2	1	59	25
	1	1	1	61	20
	1	1	1	68	20
	1	1	2	68	20
<i>TfR</i>	2	2	1	59	25
	1	1	1	65	20
	1	1	2*	65	20
	0,7	0,7	2*	65	20
	0,4	0,4	2*	65	20
	1	1	1	68	20
	0,7	0,7	2	65	20

*40x redčena cDNA

Na podlagi diagramov pomnoževanja in analize disociacijske krivulje smo določili optimalne količine sestavin in pogojev reakcij qPCR. Tako smo količino cDNA v mešanici povečali z 1 μ l na 2 μ l, da smo zmanjšali vrednosti Ct na diagramih pomnoževanja posameznih pomnoženih zaporedij. Izbrali smo tiste pogoje reakcije in količine sestavin mešanice, kjer smo z analizo disociacijske krivulje preverili, da gre res za specifično pomnoževanje in da ne prihaja do tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov.



a)



b)

Slika 14: Diagrama disociacijske krivulje za gen *MT-2a* (LightCycler[®] 480 SW, Ver. 1.5). Na abscisi je temperatura, na ordinati negativni prvi odvod intenzitete fluorescence po temperaturi, prikazani sta a) disociacijski krivulji za dva naključna vzorca cDNA v optimizacijski reakciji qPCR pri temperaturi naleganja oligonukleotidnih začetnikov 61 °C ter b) disociacijske krivulje za vse vzorce cDNA v optimizirani reakciji qPCR.

Optimalne sestave mešanic za posamezna pomnožena zaporedja so navedene v Preglednici VIII. Optimalni pogoji reakcij qPCR za posamezna pomnožena zaporedja so navedeni v Preglednici IX.

4.3.3 Merjenje izražanja genov s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo

Za določanje izražanja genov za MT smo celice U87 MG izpostavili 1 μ M raztopini CdCl₂ za 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 ur. Za vsako časovno izpostavitv smo pripravili dva paralelna vzorca celic. Relativno izražanje genov za dva izmed genov, ki kodirajo MT,

MT-1a in *MT-2a* smo merili z metodo qPCR. Za natančno relativno kvantifikacijo smo podatke normalizirali glede na izražanje referenčnega gena, gena za transferinski receptor, *TfR*, ki se izraža enako ne glede na eksperimentalne pogoje.

4.3.3.1 Dokaz enakosti učinkovitosti pomnoževanja genov *MT-1a*, *MT-2a* in *TfR*

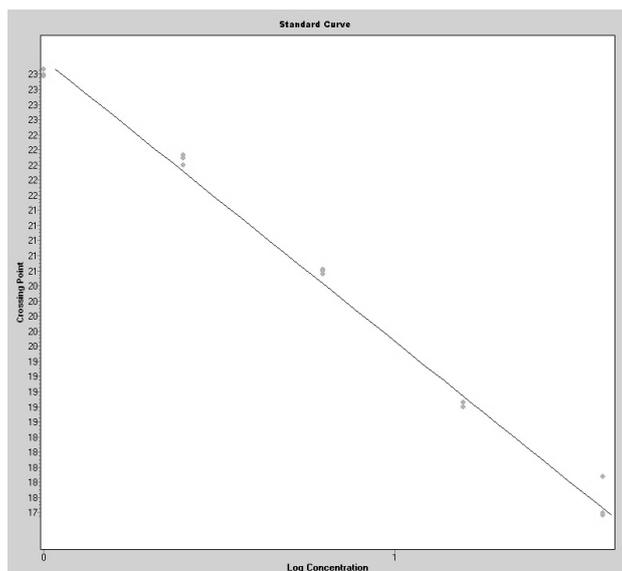
Za računanje relativnih ravni mRNA *MT-1A* in *MT-2A* smo uporabili metodo $\Delta\Delta C_T$. Ta metoda zahteva predhodni dokaz enakosti učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena. Zato smo za vsako pomnoženo zaporedje posebej določili naklon standardne krivulje in s tem učinkovitost pomnoževanja posameznega zaporedja.

Naključen vzorec cDNA smo serijsko redčili z avtoklavirano ultračisto vodo, pripravili smo štiri redčitve. Pet standardnih raztopin - vzorčno koncentracijo cDNA in štiri redčitve (2,5-, 6,3-, 15,6- in 39,1-kratna) - smo nanесли na mikrotitrsko ploščico v trojnikih (po 2 μ l) in v vsako vdolbino dodali po 18 μ l reakcijske mešanice. Za posamezno pomnoženo zaporedje smo reakcijo qPCR za določitev standardne krivulje izvajali pri enakih pogojih kot optimizirano reakcijo qPCR za vzorce (Preglednica IX). Če smo reakcijo standardne krivulje in reakcije vzorcev za posamezno pomnoženo zaporedje izvedli na dveh ploščicah v različnih reakcijah qPCR, nam je vzorec cDNA, ki smo ga uporabili pri obeh reakcijah, služil kot kalibrator.

S programom LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5, smo določili učinkovitost pomnoževanja posameznega nukleotidnega zaporedja. Potem ko smo nastavili bazno linijo, prag in število točk preverjanja ter navedli koncentracije standardnih raztopin, je program na podlagi vrednosti C_t standardnih raztopin izrisal linearno regresijsko krivuljo, podal enačbo premice, učinkovitost ter napako reakcije (Preglednica XIII).

Preglednica XIII: Standardna krivulja: ime gena, enačba premice, učinkovitost in napaka reakcije.

Gen	Enačba premice	Učinkovitost	Napaka
<i>MT-1a</i>	$y = -3,730x + 23,39$	1,854	0,0674
<i>MT-2a</i>	$y = -3,850x + 17,54$	1,819	0,0684
<i>TfR</i>	$y = -3,760x + 23,22$	1,845	0,0755

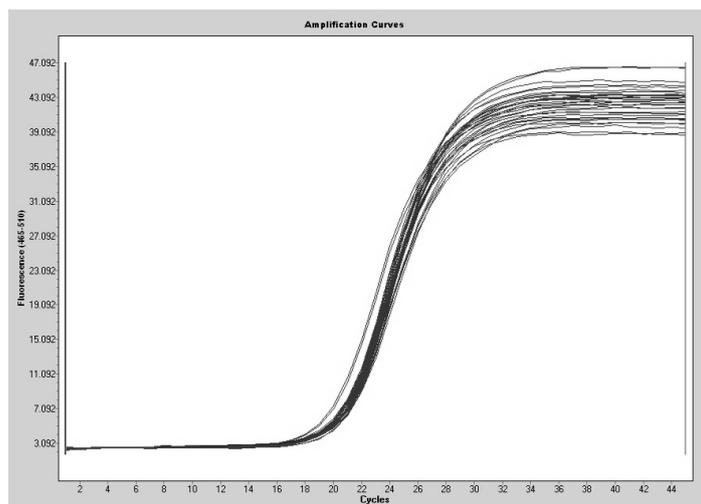


Slika 15: Standardna krivulja za gen *MT-1a* (LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5), narisana na podlagi vrednosti Ct standardnih raztopin. Na abscisi je logaritem koncentracije cDNA, na ordinati Ct (cikel, v katerem intenziteta preseže nastavljen prag).

Učinkovitosti pomnoževanja zaporedij tarčnih genov *MT-1a* in *MT-2a* ter referenčnega gena *TfR* so bile približno enake, zato smo za računanje relativnega izražanja genov *MT-1a* in *MT-2a* uporabili metodo $\Delta\Delta C_T$.

4.3.3.2 Izračun relativnega izražanja genov *MT-1a* in *MT-2a*

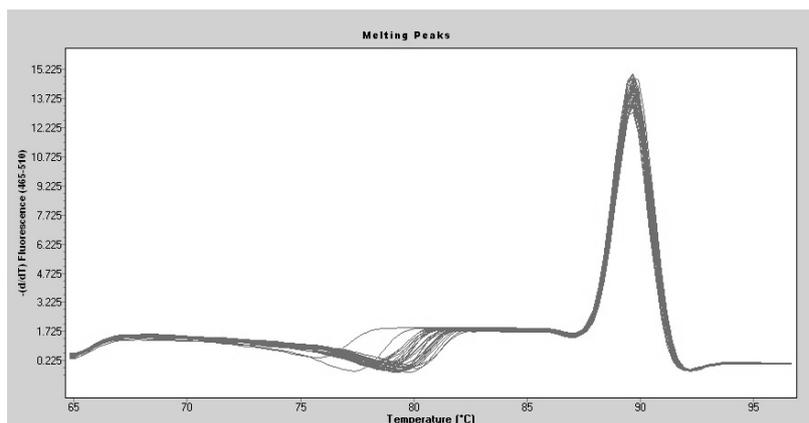
Program LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5, je na podlagi meritev (aparatura LightCycler) izrisal diagram pomnoževanja produkta PCR (Slika 16). Za vsako pomnoženo zaporedje smo nastavili bazno linijo (vrednost cikla pred dvigom fluorescence nad vrednost ozadja), prag (v eksponentni fazi pomnoževanja, *angl.* threshold) in število točk preverjanja. Na podlagi tega je program za vsako reakcijo določil vrednost Ct, to je cikel, v katerem vrednost fluorescence preseže nastavljen prag. Časovno izražanje genov *MT-1a* in *MT-2a* smo določili s primerjavo vrednosti Ct za vzorce cDNA. Vrednosti Ct so obratno sorazmerne začetni količini pomnoženih cDNA v vzorcu.



Slika 16: Diagram pomnoževanja za gen *MT-1a* (LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5). Na abscisi je število ciklov, na ordinati intenziteta fluorescence, prikazane so krivulje pomnoževanja za vse vzorce cDNA.

Za vsako pomnoženo zaporedje smo v istem programu izvedli tudi analizo disociacijske krivulje, s katero smo preverili specifičnost nastalih produktov PCR. Disociacijska krivulja predstavlja spremembo fluorescenčnega signala v odvisnosti od temperature taljenja (T_m). Med počasnim dviganjem temperature (65 °C do 97 °C) pri T_m dvovijačni produkt PCR disociira. Posledica je hiter padec fluorescenčnega signala. Če je v mešanici prisotnih več produktov PCR, lahko na diagramu disociacijske krivulje opazimo več vrhov z različnimi T_m . Ker gre pri kemiji SYBR za nespecifično detekcijo, lahko dodaten vrh na diagramu disociacijske krivulje predstavljajo tudi dimeri začetnih oligonukleotidov.

Z analizo disociacijske krivulje nismo pri nobenem vzorcu cDNA zaznali dodatnih vrhov in tako potrdili specifičnost vseh produktov PCR. Na Sliki 17 je prikazana disociacijska krivulja za pomnoženo zaporedje gena *MT-1a*.



Slika 17: Diagram disociacijske krivulje za gen *MT-1a* (LightCycler® 480 SW, Ver. 1.5). Na abscisi je temperatura, na ordinati prvi negativni odvod intenzitete fluorescence po temperaturi, prikazane so disociacijske krivulje za vse vzorce cDNA.

Vrednosti Ct smo prenesli v Microsoft Excel za izračun relativnega izražanja genov *MT-1a* in *MT-2a* po metodi $\Delta\Delta C_T$. Za gen *MT-1a* smo meritve Ct za vse vzorce izvedli v dvojnikih in izračunali povprečje Ct. Zaradi dobre ponovljivosti med dvojniki smo meritve Ct za gena *MT-2a* in *TfR* izvajali samo enkrat. Za gena *MT-1a* in *TfR* smo določali učinkovitost pomnoževanja z naključnim vzorcem (poglavje 4.3.3.1) in izražanje genov v vzorcih v dveh različnih reakcijah qPCR, zato smo meritve Ct za vzorce kalibrirali glede na meritve Ct vzorca, ki smo ga uporabili v obeh reakcijah. Za vzorec cDNA, ki smo ga uporabili v obeh reakcijah, smo izračunali razliko Ct med obema reakcijama. To vrednost smo nato odšteli od Ct vseh vzorcev. Za gen *MT-2a* smo učinkovitost in izražanje v vzorcih določili v eni reakciji qPCR, zato kalibracija ni bila potrebna.

Preglednica XIV: Vrednosti Ct vzorcev za tarčna gena *MT-1a*, *MT-2a* in referenčni gen *TfR*. Vzorec je poimenovan s številom ur izpostavitve 1 μM CdCl_2 , za vsako izpostavitve smo pripravili dva paralelna vzorca celic.

Vzorec	<i>MT-1a</i>	<i>MT-2a</i>	<i>TfR</i>
0 h	17,67	11,27	17,21
0 h*	17,32	10,50	16,43
1 h	17,69	11,50	17,46
1 h*	17,47	11,07	16,53
3 h	17,26	10,82	16,55
3 h*	16,53	10,10	16,89
6 h	17,45	11,03	17,41
6 h*	17,58	10,61	16,69
12 h	17,78	10,54	16,54
12 h*	17,54	10,68	16,44
24 h	17,62	10,90	16,25
24 h*	17,37	10,67	16,57
48 h	17,27	11,07	16,96
48 h*	17,26	10,99	16,87
72 h	17,90	11,49	17,71
72 h*	17,70	11,66	17,51

Vrednosti Ct za tarčna gena *MT-1a* in *MT-2a* smo normalizirali glede na referenčni gen *TfR* po enačbi 3. Normalizacija popravi vire nespecifične variabilnosti (količina in kakovost RNA, učinkovitost reverzne transkripcije itd.) (106). Obstaja več metod normalizacije: normalizacija glede na vhodno število celic, kar je večinoma težko izvedljivo, glede na količino RNA ter z uporabo eksternih ali internih (referenčni gen) kontrol. Najboljša metoda normalizacije je normalizacija na referenčni gen, saj le pri tej metodi upoštevamo vse dejavnike variabilnosti. Referenčni gen mora biti izražen enako ne glede na eksperimentalne pogoje (107).

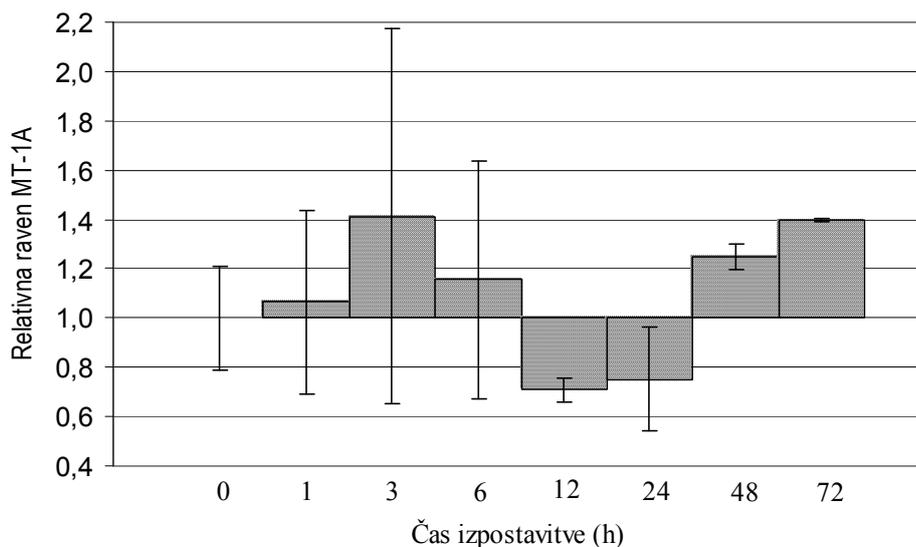
Končni rezultat - relativno izražanje genov *MT-1a* in *MT-2a* pri različnih časovnih izpostavitvah Cd^{2+} glede na neizpostavljeno kontrolo - smo izračunali po enačbah 4 in 5.

Rezultat smo podali kot povprečno vrednost meritev dveh paralelnih vzorcev celic, standardne deviacije (SD) in relativne standardne deviacije (RSD).

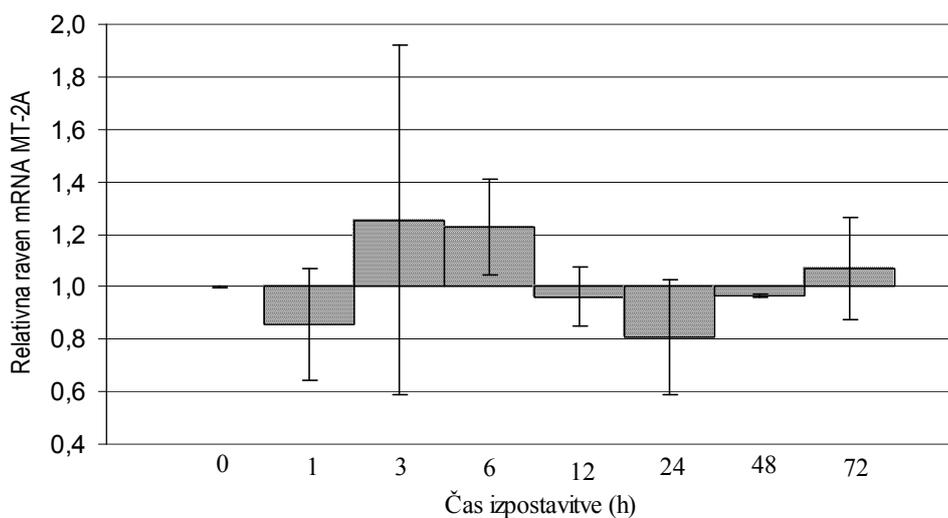
4.3.3.3 Relativno izražanje genov *MT-1a* in *MT-2a*

Izoformi MT-1 in MT-2 sta, za razliko od MT-3 in MT-4, zelo inducibilni, kovinski ioni, še posebej Cd^{2+} , pa veljajo za najmočnejše induktorje MT-1/2. Zato smo za preučevanje izražanja genov za MT izbrali Cd^{2+} , in sicer subtoksično, okoljsko relevantno, 1 μM koncentracijo CdCl_2 . Zanimalo nas je njihovo izražanje v astrocitih, ki zagotavljajo primerno okolje za delovanje nevronov in imajo mehanizme za kopičenje kovinskih ionov. Zato imajo visoke konstitutivne ravni MT. Procese smo opazovali na humani tumorski celični liniji astrocitomov, ki predstavlja ustrezen model za študij indukcije sinteze MT v astrocitih. Tumorske celice so nesmrtno in jih je zato lažje vzdrževati v laboratoriju.

Celično linijo humanih astrocitomov, U87 MG, smo izpostavili 1 μM raztopini CdCl_2 za 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 ur in pripravili tudi kontrolo (neizpostavljene celice), v dveh paralelkah. Iz celic smo izolirali totRNA in določili raven mRNA dveh subizoforn, MT-1A in MT-2A, s qPCR. Rezultati relativnih ravni mRNA MT-1A in MT-2A, SD in RSD so navedeni v Prilogi (Preglednica II). Na Sliki 18 in Sliki 19 sta prikazana diagrama relativnih ravni mRNA MT-1A in MT-2A v odvisnosti od časovne izpostavitve Cd^{2+} .



Slika 18: Indukcija transkripcije gena za subizoformo MT-1A. Celice U87 MG smo izpostavili $1 \mu\text{M CdCl}_2$ za 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 ur. Izražanje *MT-1a* smo normalizirali z genom za transferinski receptor (*TfR*). Rezultat predstavlja povprečno vrednost meritev dveh paralelnih vzorcev celic, podana je standardna deviacija.



Slika 19: Indukcija transkripcije gena za subizoformo MT-2A. Celice U87 MG smo izpostavili $1 \mu\text{M CdCl}_2$ za 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 ur. Izražanje *MT-2a* smo normalizirali s genom za transferinski receptor (*TfR*). Rezultat predstavlja povprečno vrednost meritev dveh paralelnih vzorcev celic, podana je standardna deviacija.

Že hiter pregled diagramov relativnih ravni mRNA MT-1A in MT-2A pokaže, da so bile razlike med relativnimi ravnmi mRNA MT-1A ali MT-2A pri različnih časih izpostavitve $1 \mu\text{M CdCl}_2$ zanemarljivo nizke, variabilnost med biološkimi ponovitvami pa velika. Poleg

pričakovanega povečanega izražanja genov *MT-1a* in *MT-2a* smo pri nekaterih časovnih izpostavitvah detektirali tudi njuno znižano izražanje.

Relativna raven mRNA MT-1A je v prvih 3 urah izpostavitve Cd²⁺ narasla na maksimalno vrednost - 1,41, in nato padla ter po 12 urah izpostavitve dosegla minimalno vrednost - 0,71. Raven mRNA je nato začela spet naraščati in dosegla vrednost blizu maksimalne - 1,40 - po 72 urah izpostavitve.

Kinetika ravni mRNA MT-2A je bila podobna ravni mRNA MT-1A s tem, da so bile razlike še manjše. Relativna raven mRNA MT-2A je v prvi uri izpostavitve CdCl₂ padla pod vrednost mRNA MT-2A v neizpostavljenih celicah. Po 3 urah izpostavitve je dosegla maksimalno vrednost - 1,25 - in padla do najnižje vrednosti - 0,81 - po 24 urah izpostavitve. Nato je začela spet naraščati do 72 ur izpostavitve CdCl₂ - 1,07.

Na diagramih so poleg povprečnih relativnih ravni mRNA MT-1A in MT-2A prikazane tudi vrednosti standardne deviacije (SD), izračunane na podlagi dveh paralelnih izpostavitvev 1 μM Cd²⁺. Iz vrednosti SD in RSD (Priloga, Preglednica II) je razvidno, da podatki dveh paralelnih vzorcev celic za več posameznih časovnih izpostavitvev zelo odstopajo od povprečnih vrednosti. Tako znaša RSD za vrednost mRNA MT-1A po 3 urah izpostavitve 53,9 % in po 6 urah izpostavitve 42,0 %. Najvišja RSD pri merjenju ravni mRNA MT-2A znaša 53,1 % po 3 urah izpostavitve Cd²⁺. Vzrokov variiranja rezultatov je več. Dejavnikom variabilnosti v fazah določanja izražanja genov za MT pred qPCR (število celic, izolacija totRNA, reverzna transkripcija itd.) smo se izognili z uporabo referenčnega gena, ki se je enako izražal v vseh vzorcih celic. En možen dejavnik variiranja so napake pri merjenju izražanja genov z metodo qPCR, torej napake zaradi meritev aparature LightCycler, napake zaradi nenatančnega pipetiranja volumnov sestavin mešanice v vdolbine mikrotitrne ploščice, napake zaradi nečistosti, nestabilnosti (barvilo SYBR Green I razpada na svetlobi) ali nepravilne priprave reagentov (ne povsem zmešane raztopine oligonukleotidnih začetnikov ali cDNA) itd. Drug, pomemben, dejavnik variiranja je biološka variabilnost med vzorci celic.

Povprečna vrednost meritev dveh paralelnih vzorcev tako morda ne predstavlja pravo vrednost relativnih ravni mRNA MT-1A in MT-2A. Poskus bi dal bolj jasno sliko, če bi namesto dveh paralelnih vzorcev celic uporabili vsaj tri ali več, ker bi tako lažje izločili skrajne vrednosti. Poleg tega bi morali za vsako posamezno časovno izpostavitvev Cd²⁺ hkrati opraviti tudi enak časovni poskus z neizpostavljenimi celicami (kontrola).

Metoda qPCR, predstavlja, pod pogojem, da so vse faze določanja (izolacija RNA, reverzna transkripcija in qPCR) narejene optimalno, visoko občutljivo metodo za študij izražanja genov (107). Zato lahko trdimo, da pri našem poskusu 1 μM Cd^{2+} verjetno ni povzročil pomembnega povečanega izražanja genov za subizoformi MT-1A in MT-2A v astrocitih. Ker so bile razlike v izražanju po različnih časih izpostavitve tako majhne, je lahko prišla do večjega izraza variabilnost med paralelnimi vzorci celic.

Indukcija MT v astrocitih zagotavlja zaščito astrocitov in okoliških struktur pred nevrotoksičnostjo težkih kovin. Ker MT tvorijo močne tiolatne vezi s kovinskimi ioni, ti ne reagirajo z drugimi biomolekulami (71). Astrociti imajo že konstitutivno velike količine MT. Tudi maligne vrste astrocitov, astrocitomi, imajo velike konstitutivne količine MT in te lahko naraščajo z naraščanjem stopnje malignosti astroцитomov (108). Celična linija astroцитomov, U87 MG, stopnje malignosti IV, ima z visokimi konstitutivnimi količinami MT (99) verjetno dovolj prostih tiolnih skupin za vezavo vseh Cd^{2+} -ionov, ki pridejo v celico med izpostavitvijo 1 μM raztopini CdCl_2 . Druga možna razlaga, zakaj ni prišlo do indukcije subizoform MT-1A in MT-2A, je, da pride do indukcije katere druge subizoforme MT-1, MT-1B, E, F, G, H, X, katerih izražanja nismo merili.

V literaturi ni podatkov o preučevanju izražanja genov za subizoformi MT-1A in MT-2A z metodo qPCR za celično linijo U87 MG pri izpostavitvi 1 μM Cd^{2+} . V več študijah so preučevali inducibilnost MT s Cd^{2+} , pri čemer so uporabljali druge koncentracije Cd^{2+} , druge biološke sisteme in druge metode. V študiji določanja indukcije izoform MT-1/2 z merjenjem na MT vezanih kovin (AAS) v dveh različnih celičnih linijah astroцитomov, U87 MG in IPDDC-2A, pri izpostavitvi 1 μM CdCl_2 , so v nasprotju z našimi rezultati ugotovili, da pride do časovno odvisne indukcije (99). V študiji iz leta 1993 so Kikuchi in sod. z metodo indirektna imunofluorescence ugotovili, da 50 μM CdCl_2 zelo poveča količino MT v humani celični liniji astroцитomov, U373 MG (98). Liu in sod. so izvedli poskus, podoben našemu, na tumorski celični liniji tirocitov, ARO, ki so jo izpostavili 20 μM CdCl_2 za 0, 3, 6, 12, 24, 48 ur in merili relativno raven mRNA subizoform s qPCR. Prišlo je do časovno odvisne indukcije s podobno kinetiko, kot so jo dali naši rezultati (dva maksimuma). Raven mRNA MT-2A se je pri prvem maksimumu (6 h) povečala za 10-krat, pri drugem (72 h) pa kar za 30-krat. Podatkov za indukcijo MT-1A niso navedli (109). Seveda je pri navajanju rezultatov drugih študij potrebno upoštevati, da rezultati omenjenih študij niso povsem primerljivi z našimi, kajti izražanje in indukcija posameznih subizoform sta tkivno specifični in odvisni od fizioloških, fizikalnih in kemičnih dogodkov (16,41).

5 SKLEPI

Želeli smo ugotoviti, ali Cd^{2+} -ioni inducirajo gensko izražanje in sintezo MT v astrocitomih, celični liniji U87 MG. Indukcija MT je odvisna od koncentracije Cd^{2+} , ki so ji izpostavljene celice, in časa izpostavitve.

Na osnovi naših rezultatov lahko sklepamo:

- da kratkotrajna izpostavitve (48 h) 1 μM raztopini CdCl_2 stimulira razmnoževanje celic U87 MG,
- da se vsi Cd^{2+} -ioni v celici vežejo na MT,
- da ni prišlo do spremenjene sinteze MT po izpostavitvi 1 μM raztopini CdCl_2 , kar smo ugotovili s posrednim določanjem proteinov preko vezave kovin z atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo,
- da smo razvili ustrezno metodo kvantitativne verižne reakcije s polimerazo za merjenje izražanja dveh genov za MT, *MT-1a* in *MT-2a*, v astrocitomih,
- da se izražanje dveh genov za MT, *MT-1a* in *MT-2a*, ni spremenilo po izpostavitvi 1 μM raztopini CdCl_2 , kar smo ugotovili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo.

6 LITERATURA

1. Margoshes M, Vallee BL: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J M Chem Soc* 1957; 79: 4813-4814.
2. Kägi JHR., Valle BL: Metallothionein: A cadmium- and zinc- containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem* 1961; 235: 3460-3465.
3. Kägi JHR, Valle BL: Metallothionein: A cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex II. Physicochemical properties. *J Biol Chem* 1961; 236: 2435-2442.
4. Binz PA, Kägi JHR: Metallothionein: Molecular evolution and classification. V: Klaassen, CD, eds. *Metallothionein IV*. Basel: Birkhäuser Verlag 1999; 7-13.
5. Kägi JHR: Evolution, structure and chemical activity of class I Metallothioneins: An Overview. V: *Metallothionein III: biological roles and medical implications (Third international Conference on Metallothioneins)*. Suzuki KT, Imura N, Kimura M (eds.), Birkhäuser 1993; 29-56.1993.
6. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM: Metallothionein: The multipurpose protein – a review. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 627-647.
7. Nieborg E, Richardson HS: The Replacement of the Nondescript Term »Heavy Metals« by Biologically and Chemically Significant Classification of Metal Ions. *Environ Pollut (Series B)* 1980; 1: 3-26.
8. Nordberg M: Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 1998; 46: 243-254.
9. Robbins AH, Stout CD: X-ray structure of metallothionein. *Methods Enzymol* 1991; 205: 485-502.
10. Penkowa M: Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *FEBS J* 2006; 273: 1857-1870.
11. Falnoga I: Transport in interakcije živega srebra v podganah po dolgotrajni izpostavljenosti hlapom elementnega živega srebra (Hg⁰). Magistrsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 1991.
12. Krezel A, Maret W: The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signalling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; 463: 188-200.
13. Li Y, Maret W: Human metallothionein metallomics. *J Anal At. Spectrom* 2008; 23: 1055-1062.
14. Uchida Y, Takio K, Ihara Y, Zomonaga M: The Growth Inhibitory Factor That is Deficient in the Alzheimer's Disease Brain is a 68 Amino Acid Metallothionein-like Protein. *Neuron* 1991; 7: 337-347.
15. Woo ES, Monks A, Watkins AS, Wang AS, Lazo JS: Diversity of metallothionein content and subcellular localization in the National Cancer Institute tumor panel. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 41: 61-68.
16. Haq F, Mahoney M, Kiropatnick J: Signalling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 2003; 533, 1-2: 211-226.
17. Bremner I, Beattie JH: Metallothionein and the trace minerals. *Annu Rev Nutr* 1990; 10: 63-83.
18. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodila V: Induction, Regulation, Degradation, and Biological Significance of Mamallian Metallothioneins. *Critical Review in Biochem and Mol Biol* 2000; 35 (1): 35-70.

19. Garrett SH, Phillips H, Soniji S, Sens MA, Dutta R, Park S, Kim D, Sens DA: Transient induction of metallothionein isoform 3 (MT-3), c-fos, c-jun and c-myc in human proximal tubule cells exposed to cadmium. *Toxicol Letters* 2002; 126, 1: 69-80.
20. Irie Y, Mori F, Ming Keung W, Wakabayashi K: Expression of neuronal Growth Inhibitory Factor (Metallothionein-III) in the Salivary Gland. *Physiol Res* 2004; 53: 719-723.
21. Lu H, Hunt DM, Ganti R, Davis A, Dutt K, Alam J, Hunt RC: Metallothionein protects retinal pigment epithelial cells against apoptosis and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2002; 74: 83-92.
22. Sens MA, Somji S, Garrett SH, Beal CL, Sens DA: Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancer having a poor prognosis. *Am J Pathol* 2001; 159, 1: 21-26.
23. Quaipe J, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD: Induction of a New Metallothionein Isoform (MT-IV) Occurs during Differentiation of stratified Squamous Epithelia. *Biochemistry* 1994; 33: 7250-7259.
24. Johnson GF, Morell AG, Stockert RJ, Sternlieb I: Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis. *Hepatology* 1981; 1: 243-248.
25. Ye B, Maret W, Vallee BL: Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2317-2322.
26. Nartey N, Cherian MG, Banerjee D: Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. *Am J Pathol* 1987; 129: 177-182.
27. Woo ES, Kondo Y, Watkins SC, Hoyt DG, Lazo JS: Nucleophilic distribution of metallothionein in human tumor cells. *Exp Cell Res* 1996; 224: 365-371.
28. Vallee BL: The function of metallothionein. *Neurochem Int* 1995; 27: 23-33.
29. Vallee BL, Auld DS: Zinc coordination, functions and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 1990; 29: 5647-5659.
30. Palmiter RD: The elusive function of metallothionein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8428-8430.
31. Vašak M: Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace El Med Biol* 2005; 19: 13-17.
32. Maret W: Cellular Zinc and Redox States Converge in the Metallothionein/Thionein Pair. *J Nutr* 2003; 133: 1460S-1462S.
33. Sato M, Misao S, Hiroshi H: Induction of metallothionein synthesis by oxidative stress and possible role in acute phase response. V: Metallothionein III: biological roles and medical implications (Third International Conference on Metallothionein). Suzuki KT, Imura N, Kimura M (eds.), Birkhäuser 1993; 126-140.
34. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH: Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis – a review. *Mutat Res* 2003; 533: 201-209.
35. Koropatnick J, Pearson J: Altered cisplatin and cadmium resistance and cell survival in Chinese hamster ovary cells expressing mouse metallothionein. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 44-50.
36. Allan SM, Rothwell NJ: Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358: 1669-1677.

37. Mhatre M, Floyd RA, Hensley K: Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets. *J Alzheimers Dis* 2004; 6: 147-157.
38. Karin M, Eddy RL, Henry WM, Haley LL, Byers MG, Shows TB: Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5494-5498.
39. West AK, Stallings R, Hildebrand CE, Chiu R, Karin M, Richards RI: Genomics 1990; 8: 513-518.
40. Schmidt CJ, Hamer DH, McBride OW: Chromosomal location of human metallothionein genes: implications for Menkes' disease. *Science* 1984; 224: 1104-1106.
41. Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M: Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull* 2001; 55: 133-145.
42. Andrews GK: Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Food Nutr Sci* 1990; 14: 193-258.
43. Samson SL, Gedamu L: Molecular analysis of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 59: 257-288.
44. Tang CM, Westling J, Seto E: Trans repression of the human metallothionein IIA gene promoter by PZ120, a novel 120-kilodalton zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 680-689.
45. Ogra Y, Suzuki K, Gong P, Otsuka F, Koizumi S: Negative regulatory role of Sp1 in metal responsive element-mediated transcriptional activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 16534-16539.
46. Arizono K, Peterson KL, Brady FO: Inhibitors of Ca²⁺ channels, calmodulin and protein kinases prevent A23187 and other inductions of metallothionein mRNA in EC3 rat hepatoma cells. *Life Sci* 1993; 53: 1031-1037.
47. Ren Y, Smith A: Mechanism of metallothionein gene regulation by heme-hemopexin. Roles of protein kinase C, reactive oxygen species and cis-acting elements. *J Biol Chem* 1995; 270: 23988-23995.
48. Mursta M, Gong P, Suzuki K, Koizumi S: Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J Cell Physiol* 1999; 180: 105-113.
49. Boudny V, Kovarik J: JAK/STAT signalling pathways and cancer. *Janus kinases/signal transducers and activators of transcription*. *Naoplasma* 2002; 49: 349-355.
50. Davis SR, Cousins RJ: Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. *J Nutr* 2000; 130: 1085-1088.
51. Harris AL, Hochhauser D: Mechanism of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncol* 1992; 31: 205-213.
52. Dalton TP, Li QW, Bittel D, Liang LC, Andrews GK: Oxidative stress activates metal-responsive transcription factor-I binding activity. Occupancy in vivo of metal response elements in the metallothionein-I gene promoter. *J Biol Chem* 1996; 271: 26233-26241.
53. Vasconcelos MH, Tam SC, Beattie MH, Hesketh JE: Evidence for differences in the post-transcriptional regulation of rat metallothionein isoforms. *Biochem J* 1996; 315: 665-671.
54. El Ghazi I, Martin BL, Armitage IM: Metallothionein-3 Is a Component of a Multiprotein Complex in the Mouse Brain. *Experimental Biology and Medicine* 2006; 231: 1500-1506.

55. Andrews GK: Regulation of Metallothionein Gene Expression by oxidative Stress and Metal Ions. *Biochemical Pharmacology* 2000; 59: 95-104.
56. Seth P, Koul N: Astrocyte, the star avatar: redefined – a review. *J Biosci* 2008; 33: 405-421.
57. Kržan M: Funkcija astrocitov. *Zdravniški vestnik* 2001; 70: 553-559.
58. Pfrieger FW, Barres BA: Synaptic efficacy enhanced by glial cells *in vitro*. *Science* 1997; 277: 447-457.
59. Schwartz JP, Mishler K: β -adrenergic receptor regulation, through cyclic AMP, of nerve growth factor expression in rat cortical and cerebellar astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 1990; 10: 447-457.
60. Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA: Control of synapse number by glia. *Science* 2001; 291: 657-660.
61. Goldstein GW: Endothelial cell-astrocyte interactions: a cellular model for the blood-brain barrier. *Ann NY Acad Sci* 1988; 529: 31-39.
62. Alvarez-Maubecin V, Garcia-Hernandez F, Williams JT, Van Bockstaele EJ: Functional Coupling between neurons and glia. *J Neurosci* 2000; 20: 4091-4098.
63. Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG: Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 6822-6829.
64. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG: Tripartite synapse: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1998; 22: 208-215.
65. Vesce S, Bezzi P, Volterra A: The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function. *Science Progress* 1999; 82: 251-270.
66. Tiffany-Castiglioni E, Qian Y: Astroglia as Metal Depots: Molecular Mechanisms for Metal Accumulation, Storage and Release. *Neuro Toxicol* 2001; 22: 577-592.
67. Choudhuri S, Kramer KK, Berman NE, Dalton TP, Andrews GK, Klaassen CD: Constitutive expression of metallothionein genes in mouse brains. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 131: 144-154.
68. Masters BA, Quaipe CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD: Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci* 1994; 14: 5844-5857.
69. Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM: MT-III, a brain specific member of the metallothionein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6333-6337.
70. Palmiter RD: Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1219-1223.
71. Aschner M: The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB* 1996; 10: 1129-1136.
72. Palmiter RD, Sandgren EP, Koeller DM, Findley SD, Brinster RL: Metallothionein genes and their regulation in transgenic mice. In: Suzuki, NIKT.; Kimura M, eds. *Metallothionein III*. Basel: Birkhäuser Verlag 1993; 399-406.
73. Yamada M, Hayashi S, Hozumi I, Inuzuka T, Tsuji S, Takahashi H: Subcellular localization of growth inhibitory factor in rat brain: light and electron microscopic immunohistochemical studies. *Brain Research* 1996; 735: 257-264.

74. Masters BA, Kelly EJ, Quaife CJ, Brinster RL, Palmiter RD: Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity of cadmium. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91: 584-588.
75. Uchida Y, Gomi F, Masumizu T, Miura Y: Growth inhibitory factor prevents neurite extension and the death of cortical neurons caused by high oxygen exposure through hydroxyl radical scavenging. *The J of Biol Chem* 2002; 277: 32353-32359.
76. Sogawa CA, Asanuma M, Sogawa N, Miyazaki I, Nakanishi T, Furuta H, Ogawa N: Localization, regulation and function of metallothionein-III/growth inhibitory factor in the brain. *Acta Med Okayama* 2001; 55, 1: 1-9.
77. Erickson JC, Hollopeter G, Thomas SA, Froelick GJ, Palmiter RD: Disruption of the metallothionein-III gene in mice: Analysis of brain zinc, behaviour and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures. *J Neurosci* 1997; 17: 1271-1281.
78. Kameo S, Nakai K, Kurokawa N, Kanehisa T, Naganuma A, Satoh H: Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2005; 381: 1514-1519.
79. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR), US Public Health Service. Toxicological profile for Cadmium, Atlanta, GA, 1998.
80. Kostial K: Cadmium. Trace elements in human and animal nutrition, Vol. 2. Mertz W. (ed.), Academic Press, 1986.
81. Mendez-Armenta M, Rios C: Cadmium neurotoxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 23: 350-358.
82. Minami A, Takeda A, Nishibaba D, Takefuta S, Oku N: Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Research* 2001; 894: 336-339.
83. Sever N, Žegura B: Gojenje celičnih linij (10G-Pos 04-02). Nacionalni inštitut za biologijo, oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Ljubljana, 2007.
84. Sever N, Žegura B: MTT test (10G-Pos03-01). Nacionalni inštitut za biologijo, oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Ljubljana, 2007.
85. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. izdaja, SFD, Ljubljana, 2007; 129-132.
86. Kuhelj R: Biokemija v praksi: načela in tehnike. 3. izdaja, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, UL, Ljubljana, 2003; 99.
87. Ščančar J, Milačič R, Falnoga I, Čemažar M, Bukovec P: Use of nitric acid in sample pretreatment for determination of trace elements in various biological samples by ETAAS. *Jm Pharm Biomed Anal* 2000; 22: 993-1002.
88. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl NT: Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005; 34, 3: 597-601.
89. Wong ML, Medrano JF: Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005; 39, 1: 75-85.
90. Valasek MA, Repa JJ: The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29: 151-159.
91. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ method. *Methods* 2001; 25, 4: 402-408.

92. Singh KP, Kumari R, Pevey C, Jackson D, DuMond JW: Long duration exposure to cadmium leads to increased cell survival, decreased DNA repair capacity, and genomic instability in mouse testicular Leydig cells. *Cancer Letters* 2009; 279: 84-92.
93. Calabrese EJ: Astrocytes: Adaptive responses to low doses of neurotoxins. *Critical Rev in Toxicol* 2008; 38: 463-471.
94. Tapiero H, Tew KD: Trace elements in human physiology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacoth* 2003; 57: 399-411.
95. Yasutake A, Nagano M, Hirayama K: Alterations of metallothionein isomers in Hg(0)-exposed rat brain. *Arch Toxicol* 2003; 77, 1: 12-16.
96. Richarz AN, Bratter P: Speciation analysis of trace elements in the brains of individuals with Alzheimer's disease with special emphasis on metallothioneins. *Anal Bioanal Chem* 2002; 372, 3: 412-417.
97. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D: Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003; 192: 95-117.
98. Kikuchi Y, Irie M, Kasahara T, Sawada J, Terao T: Induction of metallothionein in a human astrocytoma cell line by interleukin-1 and heavy metals. *FEBS* 1993; 317, 1, 2: 22-26.
99. Žnidarič Tušek M, Pucer A, Fatur T, Filipič M, Ščančar J, Falnoga I: Metal binding of metallothioneins in human astrocytomas (U87 MG, IPDDC-2A). *BioMetals* 2007; 20: 781-792.
100. ND-1000 Spectrophotometer, V3.5 User's Manual. Nanodrop Technologies, ZDA, rev. 7/2007.
101. Swift GH, Peyton MJ, MacDonald RJ: Assessment of RNA quality by semiquantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques* 2000; 28, 3: 524-531.
102. Lightfoot S: Quantitation comparison of total RNA using Agilent 2100 bioanalyzer, ribogreen analysis and UV spectrometry. Agilent Technologies, ZDA, 2002.
103. Ensembl Genome Browser: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index (dostop 25.2.2009).
104. IDT OligoAnalyzer: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> (dostop 25.2.2009).
105. NCBI: Primer-BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (dostop 25.2.2009).
106. Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002; 29, 1: 23-39.
107. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C: An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001; 25, 4: 386-401.
108. Hiura T, Khalid H, Yanmashita H, Tokunaga Y, Yasunaga A, Shibata S: Immunohistochemical analysis of metallothionein in astrocytic tumors in relation to tumor grade, proliferative potential and survival. *Cancer* 1998; 11, 83: 2351-2369.
109. Liu ZM, Chen GG, Shum CKY, Vlantis AC, Cherian MG, Koropatnick J, Hasselt A: Induction of functional MT1 and MT2 isoforms by calcium in anaplastic thyroid carcinoma cells. *FEBS Letters* 2007; 581: 2465-2472.

7 PRILOGE

Priloga:

Preglednica I: Koncentracija, čistota in kakovost celokupne RNA v vzorcih.

Preglednica II: Relativna raven mRNA MT-1A in MT-2A po različnih časih izpostavitve $1 \mu\text{M Cd}^{2+}$.

Priloga

Preglednica I: Koncentracija, čistota ($A_{260/280}$) in kakovost (RIN) celokupne RNA v vzorcih; vzorec je poimenovan s časom izpostavitve $1 \mu\text{M CdCl}_2$, za vsako izpostavitve smo pripravili dve paralelna vzorca celic.

Vzorec	Koncentracija [ng/ μl]	$A_{260/280}$	RIN
0 h	563,4	1,91	9,65
0 h*	361,0	1,93	9,80
1 h	2089,1	1,95	9,70
1 h*	2187,4	1,96	9,65
3 h	1763,2	1,95	9,75
3 h*	641,4	1,94	9,70
6 h	1684,3	1,95	9,95
6 h*	1954,8	1,97	9,80
12 h	1202,9	1,97	9,90
12 h*	1101,0	1,96	9,75
24 h	1611,2	1,99	9,85
24 h*	1268,0	1,96	9,75
48 h	1698,0	1,98	9,70
48 h*	1873,5	1,95	9,65
72 h	2323,9	1,97	9,65
72 h*	2572,4	1,97	9,70

Preglednica II: Relativna raven mRNA MT-1A in MT-2A po 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 in 72 urah izpostavitve 1 μM CdCl_2 , za vsako izpostavitvev smo pripravili dva paralelna vzorca celic. Podane so vrednosti mRNA za vsak vzorec celic, povprečna vrednost mRNA dveh paralelnih vzorcev celic, standardna deviacija (SD) in relativna standardna deviacija (RSD).

Vzorec	MT-1A				MT-2A			
	mRNA	mRNA _{povp.}	SD	RSD[%]	mRNA	mRNA _{povp.}	SD	RSD[%]
0 h	1,16	1,00	0,21	21,2	1,00	1,00	0,00	0,5
0 h*	0,86				1,00			
1 h	1,36	1,06	0,33	35,2	1,02	0,86	0,21	18,2
1 h*	0,83				0,72			
3 h	0,97	1,41	0,76	53,9	0,87	1,25	0,67	42,0
3 h*	2,05				1,81			
6 h	1,55	1,15	0,49	42,0	1,36	1,23	0,18	15,9
6 h*	0,86				1,11			
12 h	0,68	0,71	0,05	6,6	1,05	0,96	0,11	10,5
12 h*	0,74				0,89			
24 h	0,62	0,75	0,21	27,9	0,67	0,81	0,22	18,8
24 h*	0,91				0,98			
48 h	1,29	1,25	0,05	4,2	0,97	0,97	0,00	0,5
48 h*	1,21				0,96			
72 h	1,39	1,40	0,00	0,2	1,22	1,07	0,19	17,0
72 h*	1,40				0,94			