

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**VPLIV FENILBUTIRATA NA AKTIVNOST Z AMP
AKTIVIRANE PROTEIN-KINAZE V SESALSKIH
CELICAH**

DIPLOMSKO DELO

Tina KOCJAN

Mentor: doc. dr. Toni Petan
Somentor: doc. dr. Uroš Petrovič

Nova Gorica, 2013

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci, so eksplicitno navedeni v diplomskem delu.

Tina Kocjan

Zahvala

Diplomsko delo sem opravljala na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti na Institutu »Jožef Stefan«.

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Toniju Petanu za vse deljeno znanje, koristne napotke in predvsem potrpežljivost pri nastajanju diplomskega dela. Iskreno se zahvaljujem tudi somentorju doc. dr. Urošu Petroviču za pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi Anji Pucer in Vesni Brglez za pomoč pri delu v laboratoriju. Zahvala gre tudi celotni ekipi v laboratoriju Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti, ki so mi vsak na svoj način pomagali pri delu v laboratoriju.

Hvala vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastanku diplomskega dela.

Posebna zahvala pa gre mami Mileni in očetu Jožetu, ki sta me skozi celotni študij finančno in moralno podpirala in sta bila vedno na voljo, ko sem ju potrebovala. Hvala tudi bratu Mihatu, ki je vedno našel spodbudno besedo ob pravem času. In še nazadnje hvala fantu Simonu, ki je z mano delil dobre in slabe trenutke v času študija in je vedno verjel vame in v moj uspeh.

Povzetek

Fenilbutirat (PB) je zaviralec histonskih deacetilaz. Uporablja se pri zdravljenju motenj ciklusa sečnine in je v kliničnih raziskavah za zdravljenje drugih bolezni, na primer diabetesa, cistične fibroze in raka. Z AMP aktivirana protein-kinaza (AMPK) je evolucijsko ohranjen protein, ki se aktivira pri povečanju razmerja AMP/ATP v celici, in je eden izmed ključnih senzorjev v uravnavanju energetskega metabolizma na ravni celice in organizma. Molekulski mehanizem delovanja PB v celici in njegov vpliv na celični metabolizem ni popolnoma pojasnjen. Diplomsko delo je temeljilo na hipotezi, da PB aktivira AMPK v sesalskih celicah. Celice HEK293T (človeške embrionalne ledvične celice) smo gojili v prisotnosti PB in z imunodetekcijo po prenosu western določali raven aktivacije AMPK in njene pomembne tarče, ključnega encima pri sintezi maščobnih kislin, acetil-koencim A-karboksilaze (ACC). Rezultate imunodetekcije smo kvantitativno ovrednotili. Ugotovili smo, da inkubacija celic s PB privede do povišanja ravni fosforilacije katalitične podenote α na treoninu 172, ki je nujna za aktivacijo celotne AMPK. Ravno tako smo potrdili povišanje ravni fosforilacije regulatorne podenote β na serinu 108, ki lahko dodatno prispeva k aktivaciji AMPK. Zaznali smo tudi višjo raven fosforilacije proteina ACC, ki jo AMPK s fosforilacijo inaktivira, in s tem potrdili povišanje delovanja AMPK. Iz zbranih rezultatov sklepamo, da PB aktivira AMPK v sesalskih celicah, kar potrjuje delovno hipotezo diplomskega dela.

KLJUČNE BESEDE: fenilbutirat, z AMP aktivirana protein-kinaza, AMPK, HEK293T, celične kulture, imunodetekcija, acetil-koencim A-karboksilaza, ACC.

Abstract

Phenylbutyrate (PB) is a histone deacetylase inhibitor used in the treatment of urea cycle disorders and in clinical trials for the treatment of other diseases for example diabetes, cystic fibrosis and cancer. AMP-activated protein kinase (AMPK) is an evolutionary conserved enzyme that is physiologically activated by the elevation of the cellular AMP/ATP ratio, and is one of the key sensors in the regulation of energy metabolism in the cell and the whole organism. The molecular mechanism of cellular action of PB and its effect on cell metabolism is not completely understood. Our diploma thesis was based on the hypothesis that in mammalian cells AMPK can be activated by PB. Human embryonic kidney cells (HEK293T) cells were cultured in the presence of PB and the levels of activation of AMPK and its major target, the key enzyme in fatty acid synthesis, acetyl-CoA carboxylase (ACC), were determined by immunodetection following western blotting. The results obtained were quantitatively evaluated. Our results show that incubating the cells with PB leads to a significant increase in the level of phosphorylation of threonine 172 in the catalytic subunit α of AMPK, which is necessary for full activation of the enzyme. We also detected a significant increase in the phosphorylation level of the regulatory subunit β of AMPK at the serine 108 position, which can further contribute to the activation of AMPK. Additionally, a higher level of phosphorylated, and thus inactivated, ACC was detected, thus confirming the increase in AMPK activity. In summary, our results show that AMPK is activated in mammalian cells grown in the presence of PB and confirm the working hypothesis of the diploma thesis.

KEYWORDS: phenylbutyrate, AMP-activated protein kinase, AMPK, HEK293T, cell culture, immunodetection, acetyl-CoA carboxylase, ACC.

KAZALO VSEBINE

I

1 UVOD	1
1.2 Hipoteza in namen diplomskega dela	1

2

2 TEORETIČNE OSNOVE	2
2.1 Fenilbutirat (PB)	2
2.1.1 Splošno o PB	2
2.2 Z AMP aktivirana protein-kinaza (AMPK)	5
2.3 Vpliv PB na celične procese povezane z delovanjem AMPK	8

3

3 PRAKTIČNI (EKSPERIMENTALNI) DEL	9
3.1 Materiali	9
3.1.1 Uporabljena aparatura	9
3.1.2 Uporabljene kemikalije in ostali reagenti	10
3.1.3 Uporabljene raztopine.....	11
3.1.4 Uporabljeni encimi	12
3.1.5 Uporabljena protitelesa.....	12
3.1.6 Uporabljeni kompleti.....	12
3.2 Metode dela	13
3.2.1. Celice HEK293T kot modelni organizem	13
3.2.10 Ponovna imunodetekcija brez odstranjevanja protiteles z membrane PVDF	23
3.2.11 Kvantitativno ovrednotenje rezultatov s programom ImageJ.....	24
3.2.2 Gojenje celic HEK293T v prisotnosti PB in priprava celičnih lizatov	13
3.2.3 Ultrazvočna obdelava vzorcev (sonifikacija)	15
3.2.4 Kolorimetrično določanje koncentracije proteinov v celičnih lizatih	15
3.2.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)	15
3.2.5.1 Barvanje gelov PAGE s srebrovim nitratom	18
3.2.6 Prenos western.....	19
3.2.7 Inkubacija s protitelesi.....	20
3.2.7.1 Metoda 1 za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK.....	20
3.2.7.2 Metoda 2 za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK.....	20
3.2.7.3 Metoda 3 za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK.....	21
3.2.7.4 Metoda 4 za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK.....	21
3.2.8 Kemiluminiscenčna detekcija.....	22

3.2.9 Odstranjevanje protiteles z membran (»membrane stripping«) in ponovna detekcija proteinov na membrani PVDF.....	22
---	----

4

4 REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1 Vpliv PB na aktivacijo AMPK v sesalskih celicah ter optimizacija prenosa western	25
4.1.1 Optimizacija imunodetekcije aktivacije AMPK s kontrolnimi vzorci	26
4.1.1.1 Optimizacija metode detekcije	26
4.1.1.2 Optimizacija časa tretiranja celic in koncentracije oligomicina.....	29
4.1.1.3 Izbor najbolj optimalnih pogojev za imunodetekcijo aktiviranih oblik AMPK.	30
4.1.2 Izbira primernega pufra za lizo celic	30
4.1.3 Izbira primernega časa tretiranja celic HEK293T s PB.....	33
4.1.4 Kvantifikacija in analiza izražanja AMPK.....	34

5

5 ZAKLJUČKI	42
--------------------------	----

6

6 VIRI	43
6.1 Članki v revijah	43
6.2 Knjige	48
6.3 Elektronski viri	49

SEZNAM PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Sestava 10 % ločevalnega in 4 % koncentracijskega gela za NaDS-PAGE.</i>	16
<i>Preglednica 2: Sestava raztopine za odstranjevanje protiteles.</i>	22
<i>Preglednica 3: Vpliv PB na aktivacijo AMPKa.</i>	34
<i>Preglednica 4: Vpliv PB na aktivacijo AMPKβ1.</i>	36
<i>Preglednica 5: Vpliv PB na aktivacijo ACC.</i>	38

SEZNAM SLIK

<i>Slika 1: Kemijska zgradba fenilbutirata.</i>	2
<i>Slika 2: Domene tipične sesalske AMPK</i>	5
<i>Slika 3: Dva različna pogleda na kristalinično strukturo sesalske AMPK</i>	6
<i>Slika 4: Vpliv aktivirane AMPK na metabolizem</i>	7
<i>Slika 5: Shema gojenja celic v mediju DMEM z dodatkom 10 % FBS, tretiranja celic s PB in priprave celičnih lizatov.</i>	13
<i>Slika 6: Shematski prikaz sestave elektroforezne celice (Mini-Protean 3, Bio-Rad, ZDA.</i>	17
<i>Slika 7: Shematski prikaz sestave aparature za prenos western (Mini Trans-Blot, Bio-Rad, ZDA).</i>	18
<i>Slika 8: Shematski prikaz klasične imunodetekcije po prenosu western (ECL Western blotting protocols, Amersham, ZDA).</i>	21
<i>Slika 9: Prikaz imunološke detekcije pAMPKα in pAMPKβ1 po prenosu western iz navodil kompleta protiteles za detekcijo AMPK in ACC</i>	25
<i>Slika 10: Imunološka detekcija pAMPKα in pAMPKβ1 po prenosu western.</i>	26
<i>Slika 11: Imunološka detekcija pAMPKα in pAMPKβ1 po prenosu western. Optimizacija koncentracije oligomicina in časa tretiranja celic HEK293T.</i>	27
<i>Slika 12: Imunološka detekcija pAMPKα, AMPKα, pAMPKβ1 in AMPKβ1 po prenosu western. Izbira primernega pufru za lizo celic.</i>	29
<i>Slika 13: Imunološka detekcija pAMPKα in pAMPKβ1 po prenosu western. Izbira primernega časa tretiranja celic HEK293T s PB.</i>	31
<i>Slika 14: Kvantifikacija in analiza izražanja AMPK pri treh neodvisnih ponovitvah imunološke detekcije pAMPKα, AMPKα, pAMPKβ1, AMPKβ1, pACC, ACC ter β-aktina po prenosu western.</i>	33
<i>Slika 15: Grafični prikaz vpliva PB na aktivacijo AMPKα.</i>	34
<i>Slika 16: Grafični prikaz vpliva PB na aktivacijo AMPKβ1.</i>	36
<i>Slika 17: Grafični prikaz vpliva PB na aktivacijo ACC.</i>	38

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab	protitelo (»Antibody«)
ACC	acetil-koencim A-karboksilaza
Ac-CoA	acetil-koencim A
AcOH	ocetna kislina
AgNO ₃	srebrov nitrat
BSA	goveji serumski albumin (»Bovine Serum Albumin«)
°C	stopinja Celzija
Da	dalton, enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ¹² C
dH ₂ O	destilirana voda
DMEM	osnovni medij za gojenje celičnih kultur (»Dulbecco's modified Eagle's medium«).
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotreitol
EtOH	etilni alkohol, etanol
FBS	serum govejega zarodka (»Fetal Bovine Serum«)
h	ura
HEK	človeške embrionalne ledvične celice (»Human Embryonic Kidney cells«)
HRP	hrenova peroksidaza
kDa	1000 daltonov
lizat NaDS1	celični lizat, pridobljen z NaDS1
lizat NaDS2	celični lizat, pridobljen z NaDS2
lizat NP-40	celični lizat, pridobljen z NP-40
M	molaren
min	minuta
NaCl	natrijev klorid
NaDS1	pufer 1 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS
NaDS2	pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
NaN ₃	natrijev azid
NP-40	detergent v pufru za pripravo celokupnih celičnih lizatov
pACC	fosforilirana oblika acetil-koencim A-karboksilaze
PBS	fosfatni pufer »Phosphate Buffered Saline«
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PVDF	polivinilidendifluorid (poli-1,1-difluoroeten)
s	sekunda
TBS	puferska raztopina Tris in NaCl (»Tris-Buffered Saline«)
TBST	puferska raztopina Tris in NaCl z dodatkom Tween 20 (»Tris-Buffered Saline and Tween 20«)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	tris(-hidroksimetil)-aminometan
vrt./min	vrtljaji na minuto (rpm, »revolutions per minute«)

1 UVOD

Razumevanje mehanizmov delovanja farmakoloških sredstev na celico in procese v njej je bistvenega pomena pri zagotavljanju optimalne uporabe teh snovi z minimalnim negativnim učinkom na okolje (Lawless, 2009). 4-fenilbutanojska kislina oziroma natrijev-4-fenilbutirat (PB) je zaviralec histonskih deacetilaz in se danes uporablja za zdravljenje motenj ciklusa sečnine ter v kliničnih testiranjih za zdravljenje diabetesa tipa 2, nevrodegenerativnih obolenj, raka, bolezni v povezavi s hemoglobinom, cistične fibroze in drugih bolezni motoričnega nevrona (Iannitti in Palmieri, 2011). PB vpliva na izražanje genov in tako modulira celični metabolizem (Lawless in sod., 2009).

Eden od ključnih igralcev v uravnavanju energetskega metabolizma v celici je z AMP aktivirana protein-kinaza (AMPK) (Kahn, 2005). AMPK je evolucijsko ohranjen protein, ki se aktivira pri povečanju razmerja AMP/ATP. Z odzivom na adipokine, kot sta leptin in adiponektin, AMPK regulira energetske stanje na ravni celotnega organizma. Aktivirana AMPK vklopi vrsto celičnih procesov, pri katerih nastaja energija (ATP), ustavi pa tiste, ki energijo porabljajo. AMPK je tarčni protein antidiabetičnih zdravil, ker povečuje občutljivost celic na inzulin in vzdržuje metabolično okolje. Aktivatorji AMPK pa so tudi potencialna zdravila proti raku, saj nekateri tumor supresorski proteini, kot je kinaza LKB1, delujejo tako, da aktivirajo AMPK (Hardie, 2010; Feng in sod., 2005)

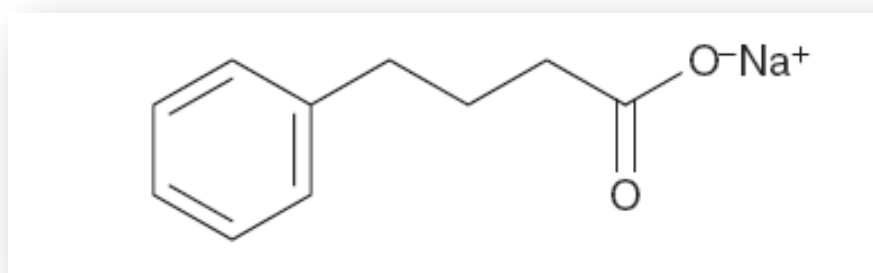
1.2 Hipoteza in namen diplomskega dela

Delovna hipoteza diplomskega dela je, da fenilbutirat (PB) aktivira z AMP aktivirano protein-kinazo (AMPK) v sesalskih celicah. Glavni namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali inkubacija sesalskih celic v prisotnosti ustreznih koncentracij PB privede do aktivacije celične AMPK. Kot modelni sistem smo izbrali celice HEK293T (človeške embrionalne ledvične celice), ki smo jih tretirali z različnimi koncentracijami PB in spremljali spremembe v aktivaciji AMPK z imunodetekcijo. Pomemben cilj v tem diplomskem delu je bila tudi optimizacija tehnike imunodetekcije fosforilirane in nefosforilirane AMPK po elektroforezni ločbi celičnih proteinov in prenosu western.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Fenilbutirat (PB)

Fenilbutirat (PB) je sestavljen iz aromatskega obroča, alkilne verige in karboksilne skupine, zaradi česar ga uvrščamo v skupino derivatov maščobnih kislin, katerih fiziološka vloga v organizmu obsega: (i) izgradnjo sestavnih delov membrane (fosfolipidov in glikolipidov), (ii) kovalentne modifikacije proteinov, (iii) energijski vir za celice, (iv) udeležbo pri celični signalizaciji (Stryer, 2000: str. 603).



Slika 1: Kemijska zgradba fenilbutirata.

PB je torej aromatska maščobna kislina, ki se v človeškem organizmu pri β -oksidaciji pretvori v feniletanojsko kislino (PA), (Spira in Carducci, 2003), ta pa se preko acetilacije konjugira v fenilacetoglutamin, ki ga izločajo ledvice (Webster in sod., 1976).

2.1.1 Splošno o PB

Zaradi širokega spektra lastnosti PB, zanimanje za to molekulo narašča po celem svetu (Iannitti in Palmieri, 2011). Natrijeva sol fenilbutirata je registrirano zdravilo za zdravljenje motenj ciklusa sečnine (Zeitlin in sod., 2002). Kot smo že omenili, se PB pri β -oksidaciji pretvori v PA, ta pa se preko acetilacije konjugira v fenilacetoglutamin, ki se izloči preko urina. Preko te metabolne poti PB pozitivno vpliva na motnje ciklusa sečnine in omili hiperamonemijo (Leonard, 2006). Predlagan je bil za zdravljenje pomanjkanja encima za sintezo sečnine, ornitin transkarbamilaze (OTC), ki je ena izmed najpogostejših okvar ciklusa sečnine (Maestri in sod., 1996). Predlagan je bil tudi za zdravljenje nosečnic s pomanjkanjem OTC, saj med in po zdravljenju na zarodku ni bilo opaziti kvarnih posledic hiperamonemije (Redonnet-Vernhet in sod., 2000). Medtem pa Wilcken (2004) trdi, da je v nosečnosti za zdravljenje bolje uporabiti natrijev benzoat, ker ga lahko zaužijemo s hrano ali pijačo, medtem ko PB lahko poškoduje tkiva v požiralniku. PB se trži pod različnimi imeni: triButyrate, Buphenyl (v ZDA) in Ammonaps (v Evropi). Motnje ciklusa sečnine z neonatalnim pojavom so bile

pred uporabo zdravila smrtne že v prvem mesecu življenja, stopnja preživetja pa se je s postavitvijo diagnoze v prvem mesecu življenja in z uporabo PA ali PB povečala na skoraj 80 % (Evropsko javno poročilo..., 2006).

Molekulski mehanizem delovanja PB še ni povsem pojasnjen, na osnovi najnovejših dognanj pa sklepamo, da vpliva na acetilacijo proteinov v celici (Lawless in sod., 2009), acetilacijo histonov pa štejemo med najpomembnejše epigenetske mehanizme preoblikovanja kromatina in kontrole izražanja genov (Iannitti in Palmieri, 2011). Glede na to, da PB inhibira delovanje histonskih deacetilaz, je zanimiv predvsem kot antitumorsko sredstvo (Marks in sod., 2000), saj zavira rast in diferenciacijo različnih človeških rakastih celic: (i) pri raku na debelem črevesu, (ii) pri Burkittovem limfomu, (iii) pri primarno akutni mieloični levkemiji, (iv) pri retinoblastomu, (v) pri raku na prostati, (vi) pri možganskih tumorjih (celicah glioma, meduloblastoma in astrocitoma), (vii) pri raku jeter in (viii) pri hematološkem malignomu (Svechnikova in sod., 2008). PB je bil preizkušen tudi v kliničnih študijah za mielodisplastični sindrom (ponovljivi maligni gliom) (Bhalla in List, 2004; Phuphanich in sod., 2005).

Pri zdravljenju obolenj centralnega živčnega sistema, je velika ovira krvno-možganska pregrada. Ta ščiti možgane pred molekulami iz krvnega obtoka, hkrati pa omogoča esencialne presnovne procese v možganih. PB, tako kot še nekateri drugi inhibitorji histonskih deacetilaz, lahko preči krvno-možgansko pregrado, zato ga obravnavajo kot potencialnega kandidata za zdravljenje možganskih obolenj in motenj povezanih s hrbtnjačo (Kazantsev in Thompson, 2008). PB je na primer izboljšal nevrološko stanje pri mišjem modelu z hipoksično-ishemičnimi poškodbami možganov (Qi in sod., 2004). Pri študijah na opicah rezus so PB vnesli intravensko, nato pa so ga zasledili v cerebrospinalni tekočini. Prisotnost PB, in njegovega glavnega metabolita PA, v cerebrospinalni tekočini bi lahko pozitivno vplivala na zdravljenje možganskih tumorjev, še posebno meningitičnih malignomih (Berg in sod., 2001).

Za neurodegenerativne bolezni, kot so spinalna mišična atrofija (SMA) in amiotrofična lateralna skleroza (ALS), trenutno še ni učinkovitega zdravila. Bilo pa je že veliko narejenega v smeri razumevanju mehanizmov, vpletenih v te bolezni (Miller in sod., 2007). Uporaba PB in njegovih derivatov je bila široko raziskana *in vitro*, kot tudi *in vivo*. Odkrili so pomembne gene in procese, ki imajo glavno vlogo pri boleznih živčevja: (i) poti, ki vplivajo na nastanek RNK, (ii) transport v aksonih, (iii) delovanje mitohondrijev (Dion in sod., 2009). PB se je izkazal kot pomemben kandidat za farmakološko zdravljenje SMA, saj je povzročil povečanje transkripcije nadomestnega gena (SMN2) za okvarjen gen (SMN1) pri SMA (Andreassi in sod., 2004). PB se je izkazal tudi kot dober kandidat za terapijo ALS, saj bi lahko z oviranjem določenih nevrotoksičnih molekularnih mehanizmov upočasnil začetek in napredovanje ALS. (Ryu in sod., 2005). Izvedena je bila klinična študija druge faze, pri kateri so na pacientih z ALS preverjali varnost in farmakodinamiko naraščajočih odmerkov PB. Izkazalo se je, da je PB varen za uporabo. Večina sodelujočih je lahko prenašala višje koncentracije PB (21 g/dan, vendar je bil PB pri nižjih koncentracijah (9 g/dan) bolj učinkovit pri histonski acetilaciji (Cudkowicz in sod., 2009).

Pri kliničnih študijah s PB pri Huntingtonovi bolezni (HB) in drugih sorodnih nevrodegenerativnih boleznih so ugotovili, da je PB varen in ga pacienti dobro prenašajo v dozah do 15 g/dan, medtem, ko se pri dozah 18 g/dan že pojavijo nezaželeni učinki (Hogarth in sod., 2007). PB je izboljšal preživetje in oslabil striatalno atrofijo na mišjem modelu s HB, če je bil dodan pred pojavom simptomov bolezni (Ferrante in sod., 2003). Učinkovitost zdravljenja s PB je velikokrat omejena z njegovo toksičnostjo, če je odmerek prevelik. Predvidevajo, da se toksičnost PB pri prevelikem odmerku poveča zaradi večjega deleža nastalih stranskih metabolitov PB. β -oksidacija je namreč pri povečani koncentraciji maščobnih kislin manj učinkovita. Obstaja možnost, da je kateri izmed še neodkritih metabolitov PB v organizmu močno toksičen (Kasumov in sod., 2004).

Pozitivne učinke pri terapiji s PB so ugotovili tudi pri pacientih s cistično fibrozo. PB uravnava stresne proteine (angl. »heat shock proteins«) in tako vpliva na zvižanje F508-CFTR mutiranih proteinov, ki jih celice sicer razgradijo že na mestu sinteze v ER, da tvorijo funkcionalne kloridne kanale v lipidnem dvosloju, vendar z zmanjšanim odpiralnim časom in posledično z zmanjšano prevodnostjo v primerjavi z nemutiranimi proteini CFTR. Tako lahko vsaj delno obnovimo delovanje kloridnih celičnih kanalov (Praphanphoj in sod., 2000) in s tem delovanje epitelijske dihalne celice (Rubenstein in sod., 1997).

Ishemija mrežnice je pogost vzrok vizualne oslavitve pri ljudeh in živalih (Osborne in sod., 2004). V študijah, izvedenih na laboratorijskih podganah, so PB dodajali pred in po izbruhu ishemije. Ugotovili so, da je PB popolnoma ohranil ganglijske celice mrežnice, če je bil dodan pred izbruhom ishemije, prav tako je bil zmanjšan vpliv ishemije na stanjšanje mrežnice in izgubo ganglijskih celic v mrežnici. Pri dodatku PB po izbruhu te bolezni ni bilo opaziti pozitivnih učinkov (Jeng in sod., 2007). Preučevali so tudi vpliv PB na ishemijo jeter pri miših. Izkazalo se je, da PB za 50 % zniža umrljivost pri miših prizadetih z ishemijo jeter (Vilatoba in sod., 2005).

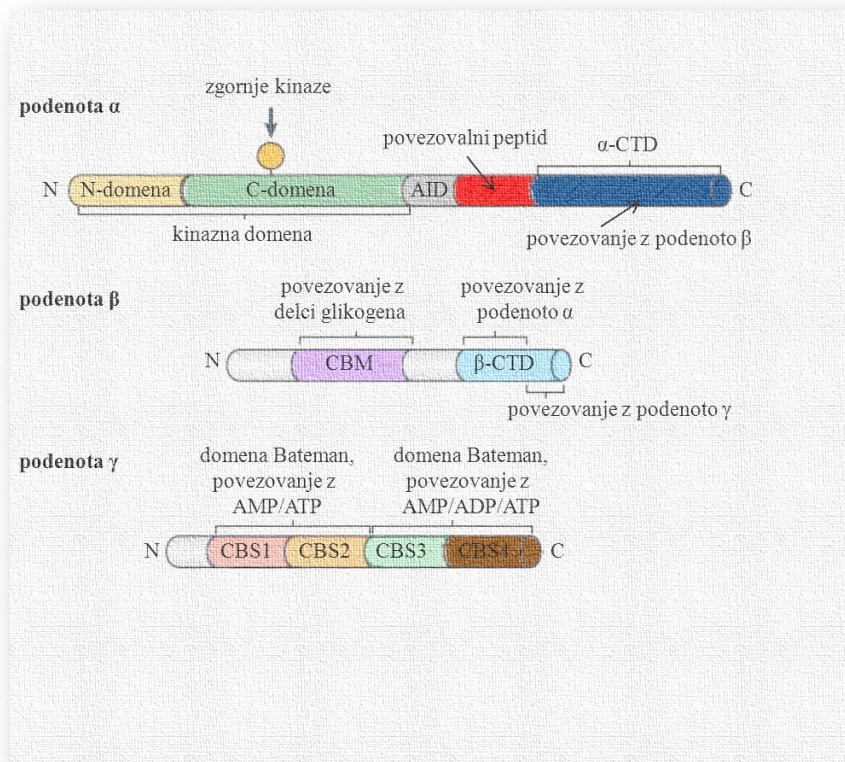
PB stimulira izražanje fetalnega hemoglobina pri ljudeh (Dover in sod., 1992; Dover in sod., 1994) in kaže 40–70 % učinkovitost pri zdravljenju bolezni srpastih celic in β -talasemije (Perrine, 2008). PB je učinkovit tudi pri zdravljenju adrenoleukodistrofije, ker stimulira produkcijo proteina, ki nadomesti mutirani transporter ATP in s tem prepreči kopičenje maščobnih kislin v celici (Kang in sod., 2002). Raziskave so pokazale pozitivne učinke PB tudi pri zdravljenju diabetesa tipa 2. Ugotovili so, da PB poveča kapaciteto zvižanja receptorjev inzulina v mišjih celicah ter tako poveča aktivnost inzulina (Ozcan in sod., 2006).

Nedavno so raziskovali uporabo PB tudi pri Wilsonovi bolezni (Van den Berghe in sod., 2009), intrahepatični holestazi, kjer je PB delno izboljšal stanje bolezni (Van der Velden in sod., 2010). Potekale so tudi študije uporabe PB pri Parkinsonovi bolezni (Kubota in sod., 2006). Ugotavljajo tudi, da bi PB lahko bil novo terapevtsko sredstvo za obnovo spomina pri Alzheimerjevi bolezni (Ricobaraza in sod., 2009).

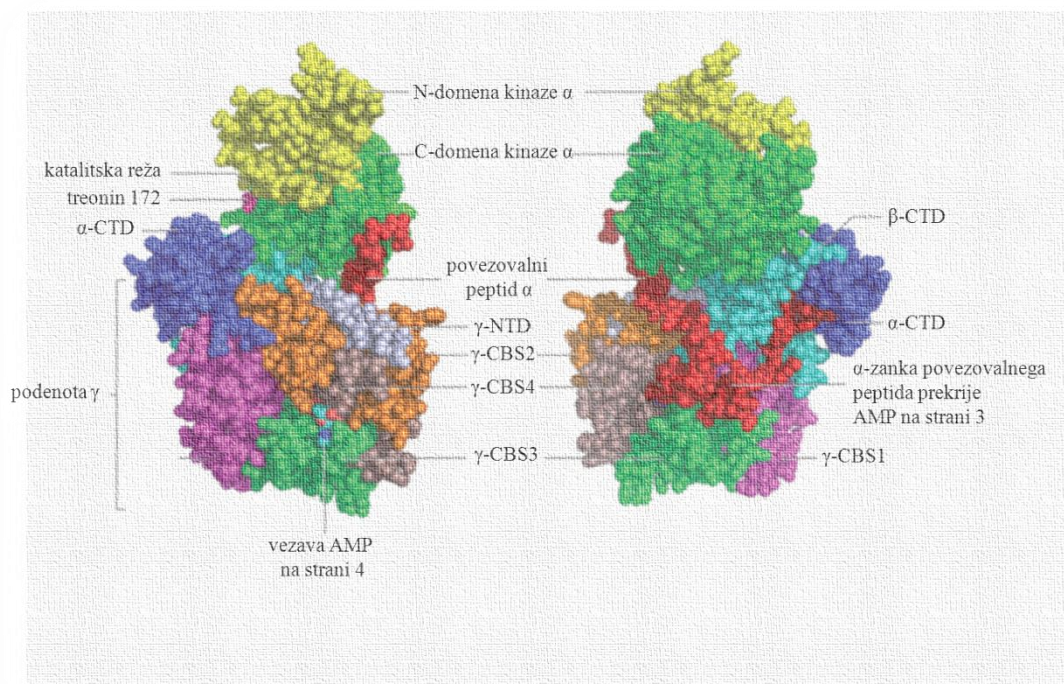
2.2 Z AMP aktivirana protein-kinaza (AMPK)

Glavni vir energije, ki je na razpolago celici za takojšnjo rabo v vsakem trenutku njenega življenja, je adenozin-5'-trifosfat (ATP). Za preživetje mora celica konstantno vzdrževati razmeroma visoke vrednosti ATP (Boyer in sod., 1977) in natančno uravnavati ravnovesje hitrosti porabe in nastajanja ATP. Eden izmed najpomembnejših celičnih senzorjev, ki zaznava in se odziva na spremembe na ravni ATP-ja, je z AMP aktivirana protein-kinaza (AMPK), ki je eden od ključnih igralcev pri uravnavanju energetskega metabolizma (Carling in sod., 2012).

AMPK je evolucijsko ohranjen protein, ki deluje kot glavni senzor energijskega stanja in potreb na ravni celice in posredno celotnega organizma. AMPK združi različne prehranske in hormonske signale v telesu ter preko njih uravnava pomembne procese, kot so vnos hrane, nadzor telesne teže in metabolizem sladkorjev in maščob. Ortologe AMPK najdemo praktično v vseh evkariontih: (i) v enoceličnih mikroorganizmih (*Saccharomyces cerevisiae*), (ii) v praživalih (*Giardia lamblia*), (iii) v rastlinah (*Physcomitrella patens*), (iv) v sesalcih (Kahn in sod., 2005).



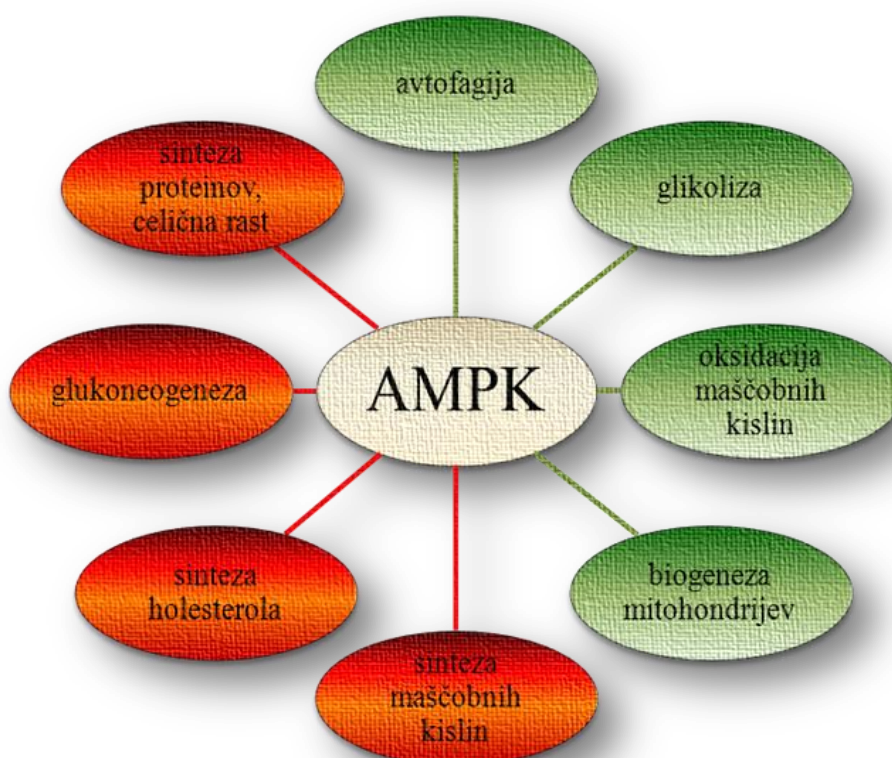
Slika 2: Domene tipične sesalske AMPK. AMPK je heterotrimer, sestavljen iz katalitične podenote α in regulatornih podenot β in γ . Domena CTD podenote β se poveže s podenotama α in γ ter tako tvori jedro kompleksa. AID, avto-inhibitorna domena; α -CTD, domena na C-terminalnem koncu podenote α ; CBM, modul na katerega se vežejo ogljikovi hidrati; β -CTD, domena na C-terminalnem koncu podenote β ; CBS, motiv podoben cistationin- β -sintazi, dve enoti CBS tvorita t.i. domeno Bateman (Hardie in sod., 2012). Barve domen so za lažje razumevanje podobne tistim na sliki 3.



Slika 3: Dva različna pogleda na tridimenzionalno strukturo sesalske AMPK. Model kristalinične strukture sesalske AMPK je na desni strani za približno 180° obrnjen okoli y osi v primerjavi z njegovo orientacijo prikazano na levi strani. α -CTD, domena na C terminalnem koncu podenote α ; β -CTD, domena na C terminalnem koncu podenote β ; AID, avto-inhibitorna domena ni razvidna v tem prikazu, nahaja pa se med C-domeno kinaze α in povezovalnim peptidom α ; γ -NTD, domena na N-terminalnem koncu podenote γ ; γ -CBS1–CBS4, ponovitve motivov CBS v podenoti γ (Xiao in sod., 2011).

AMPK je sestavljena iz treh podenot (sliki 2 in 3): katalitične podenote α in regulatornih podenot β in γ . Pri sesalcih je heterotrimer AMPK lahko zgrajen iz kombinacije dveh izooblik podenote α , dveh izooblik podenote β in treh izooblik podenote γ (Carling, 2004). Podenota α je sestavljena iz kinazne domene na N-terminalnem koncu, avto-inhibitorne domene (AID) in podaljšanega povezovalnega peptida (na sliki označen z rdečo barvo), ki povezuje AID z domeno na C-terminalnem koncu podenote α (α -CTD), (Pang in sod., 2007; Chen in sod., 2009). Nedavne raziskave so pokazale, da se prej omenjeni povezovalni peptid poveže z podenoto γ (Xiao in sod., 2011). Podenota β vsebuje modul, na katerega se lahko vežejo ogljikovi hidrati (CBM), zaradi katerega se lahko AMPK pri sesalcih povezuje z delci glikogena (Hudson in sod., 2003; Polekhina in sod., 2003). Domena na C terminalnem koncu (β -CTD) tvori jedro kompleksa, ki povezuje α -CTD in podenoto γ . Podenota γ vsebuje štiri tandemske ponovitve zaporednega motiva imenovanega CBS (CBS1, CBS2, CBS3, CBS4), (Bateman, 1997). Dve zaporedni ponovitvi CBS tvorita t.i. domeno Bateman, ki v reži med ponovitvami motiva CBS veže ligande. V prostoru so motivi razporejeni tako, da tvorijo ploščat disk s po enim CBS motivom v posameznem kvadrantu. Podenota γ ima tako skupno 4 vezavna mesta (Kemp, 2004) za ligande – adenoinske nukleotide (Ignoul in Eggermont, 2005; Scott in sod., 2004). Ugotovili so, da je v podenoti γ vezavno mesto na CBS2 vedno prazno, in da je na vezavno mesto CBS4 trdno vezan AMP, medtem ko se lahko na vezavni mesti na CBS1 in CBS3 vežejo

AMP, ADP ali ATP. AMP vezan na CBS1 povzroči alosterično aktivacijo, medtem ko AMP ali ADP vezan na CBS3 uravnava fosforilacijo na treoninu 172 (Thr-172) (Xiao in sod., 2011). Na neposredno aktivacijo AMPK vplivajo zgornje celične kinaze, kot sta s Ca^{2+} /kalmomodulinom aktivirana protein kinaza-kinaza (CaMKK) in jetrna kinaza B1 (LKB1), ki se aktivirajo zaradi povišane koncentracije kalcija v celici ali nizke energetske ravni (znižano razmerje AMP/ATP ali ADP/ATP) v celici in organizmu (Oakhill in sod., 2011). Fosforilacija na Thr-172 znotraj katalitične podenote α je nujna za aktivacijo AMPK (Kahn in sod., 2005), pri čemer AMP vzdržuje njeno aktivirano stanje z inhibicijo defosforilacije, medtem ko ATP pospešuje njeno defosforilacijo. Poglavitni ključ za aktivacijo AMPK je torej razmerje AMP/ATP (Hardie, 2010). Fosforilacija na serinu 108, znotraj regulatorne podenote β , je tudi potrebna za aktivacijo celotne AMPK, ni pa nujna (Warden in sod., 2001).



Slika 4: Vpliv aktivirane AMPK na metabolizem. Aktivirana AMPK vklopi vrsto kataboličnih procesov, pri katerih nastaja ATP (na sliki označeni z zeleno barvo), ustavi pa anabolične procese, ki energijo porabljajo in niso ključne za preživetje (na sliki označeni z rdečo barvo). Pri slednjih je ena izmed njenih glavnih tarč ključni encim pri sintezi maščobnih kislin acetil-koencim A-karboksilaza (ACC), ki jo AMPK s fosforilacijo inaktivira (Hardie, 2010).

Aktivacijo AMPK med drugim lahko povzročijo dejavniki celičnega stresa, ki vplivajo na znižanje ravni ATP. Mednje spadajo tudi metabolični strupi: (i) inhibitorji cikla trikarboksilne kisline (arzenit), (ii) inhibitorji dihalne verige (antimicin A, azid), (iii) inhibitorji sinteze ATP v mitohondrijih (oligomicin) in (iv) razklopnik oksidativne fosforilacije (dinitrofenol). Med pogoste povzročitelje spadajo tudi patološki stres: (i) ishemija (zmanjšana prekrvavljenost tkiv, ki vodi do pomanjkanja kisika in glukoze v celicah), (ii) hipoksija (nezadostna preskrba tkiv s kisikom), (iii) oksidativni stres in (iv) hiperosmotski stres. Vsi ti dejavniki vodijo k povišanju razmerja AMP/ATP, ki posledično aktivira AMPK (Kahn in sod., 2005). Zanimivo je, da tudi fizična aktivnost preko aktivacije AMPK povečuje občutljivost celic na inzulin in vzdržuje metabolično okolje, ki zmanjšuje verjetnost za razvoj debelosti in diabetesa tipa 2. Pri aktivaciji AMPK s fizično aktivnostjo se pojavijo še drugi pozitivni učinki, kot so povišana raven oksidacije maščobnih kislin, povečanje števila mitohondrijev in povečan vnos glukoze (Kahn in sod., 2005; Feng in sod., 2005).

Spojine iz nekaterih rastlin, kot je rezveratrol iz rdečega vina in čokolade, epigalokatehin iz zelenega čaja, genistin iz soje in berberin iz navadne mahonije (*Berberis aquifolium*) že dlje časa poznamo kot alternativno zaščito pred modernimi boleznimi (rak, debelost in diabetes). Šele pred kratkim pa so odkrili, da vsi aktivirajo AMPK (Hardie, 2010).

Aktivatorji AMPK so potencialna zdravila proti raku. Kinaza LKB1, ki je aktivator AMPK, hkrati tudi zavira rast tumorja. Dejstvo, da metformin, ki je zdravilo za diabetes tipa 2 in aktivator AMPK, za 30 % zmanjša pojavnost raka pri sladkornih bolnikih, priča o pomembni in zaenkrat še premalo raziskani povezavi med energetskega metabolizmom in rakavimi obolenji (Hardie, 2010; Gallagher in LeRoith, 2011).

2.3 Vpliv PB na celične procese, povezane z delovanjem AMPK

Ortolog sesalske AMPK se pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* imenuje *SNF1*. Pri raziskavah, ki so jih opravili na teh kvasnih celicah, so dokazali, da so proteini Ssb, sicer homologi sesalskih proteinov Hsp70, nujni za zaznavanje količine glukoze, glede na katero aktivirajo ali inaktivirajo Snf1. V predhodnih raziskavah so dokazali, da PB v celici vpliva na povišanje izražanja genov, ki kodirajo zapis za nekatere stresne proteine iz družine Hsp70 (»heat shock proteins 70«), (Wright in sod., 2004). Delovanje stresnih proteinov pa lahko privede do povišanega razmerja AMP/ATP, ki posledično aktivira AMPK (Kahn in sod., 2005).

Pri študiji na človeških celicah hepatoma, se je izkazalo, da PB lahko prepreči s palmitatom-inducirano inaktivacijo AMPK (Rahman in sod., 2009), poleg tega pa obnovi zaloge adiponektinskega receptorja, izraženega v jetrnih celicah (AdipoR2), ki verjetno deluje tudi kot protivnetni hormon pri popravljalnem procesu steatoze jeter (Aygun in sod., 2008; Sheikh in sod., 2008). Adiponektin prav tako aktivira AMPK v jetrih in s tem povzroči razgradnjo maščobnih kislin in zaustavi proces sinteze glukoze (Kahn in sod., 2005).

3 PRAKTIČNI (EKSPERIMENTALNI) DEL

3.1 Materiali

3.1.1 Uporabljena aparatura

Aparatura	Proizvajalec
analitska tehtnica, GH-252	A&D Instruments, Velika Britanija
centrifuga, Mini Centrifuge GMC 060	LMS Harmony, Japonska
centrifuga, Mini Spin Plus	Eppendorf, Nemčija
čitalec mikrotitrskih ploščic, Tecan Infinite M1000	Tecan, Avstrija
električni napajalnik za elektroforezo, PowerPack basic	BioRad, ZDA
električni napajalnik za elektroforezo, PowerPack P21	Biometra, Nemčija
grelni stresalnik, Vortemp 56	Tehtnica, Železniki, Slovenija
magnetni mešalec z gretjem, Rotamix SHP10	Tehtnica, Železniki, Slovenija
magnetni mešalec z gretjem, Monotherm	Variomag, ZDA
Neubauerjeva števna komora	PAA, Nemčija
pH meter, Seven Easy	Mettler, Toledo, Švica
precizna tehtnica, Vibra AJ	Tehtnica, Železniki, Slovenija
skener za gele in filme, Image Scanner 41079	Amersham Biosciences, ZDA
sonifikator, UP200S Ultrasonic processor	Hielscher, Nemčija
stresalnik, Single Platform Shaker, model 55	Reliable Scientific
stresalnik, Rotamax 120	Heidolph Instruments, Nemčija
vortex, MS 3 basic	IKA, Nemčija

3.1.2 Uporabljene kemikalije in ostali reagenti

Kemikalija	Proizvajalec	Kemikalija	Proizvajalec
akrilamid/ bisakrilamid (40 %)	Sigma Aldrich, Nemčija	ocetna kislina	J.T. Baker, Nizozemska
AgNO ₃	Sigma Aldrich, Nemčija	oligomicin	Cell Signaling Technology, ZDA
APS	Serva, Nemčija	Page Blue raztopina za barvanje proteinov	Thermo Scientific, ZDA
blokirna raztopina (»western blocking reagent«)	Roche, Nemčija	PBS	Gibco, ZDA
BSA	Sigma Aldrich, ZDA	Pierceov reagent	Thermo Scientific, ZDA
citronska kislina	Serva, Nemčija	pufer za NaDS- PAGE	Invitrogen, ZDA
DMEM	Gibco, ZDA	razvijalna raztopina (za WB)	Kodak, ZDA
EtOH	Merck, Nemčija	raztopina za odstranjevanje protiteles »Strong Antibody Stripping Solution«	Chemicon International, ZDA
FBS	Gibco, ZDA	standard #26614 (neobarvan)	Thermo Scientific, ZDA
fiksirna raztopina (za WB)	Kodak, ZDA	standard #26616 (obarvan)	Thermo Scientific, ZDA
filmi	Kodak, ZDA	TEMED	Sigma Aldrich, ZDA
glicin	Serva, Nemčija	tripan modro	Sigma Aldrich, ZDA
HCl	Merck, Nemčija	Tris	Serva, Nemčija
Pierceov ionski detergent #22663	Thermo Scientific, ZDA	Tryple Select	Gibco, ZDA
izopropanol	Applichem, Nemčija	Tween 20	Sigma Aldrich, Velika Britanija
luminol/ojačevalec »LumiLight Western Blot Substrate«	Roche, Nemčija	vodikov peroksid »LumiLight Western Blot Substrate«	Roche, Nemčija
metanol	Applichem, Nemčija	4-fenilbutanojska kislina	Sigma Aldrich, ZDA
mleko v prahu	Pomurske mlekarnе, Slovenija	5x nanašalni pufer	Fermentas, ZDA

NaCl	Applichem, Nemčija	20x DTT	Fermentas, ZDA
NaDS	Serva, Nemčija		

3.1.3 Uporabljene raztopine

- **4-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE:** 200 mM Tris (pH 6,8), 8 % (m/v) NaDS, 40 % (v/v) glicerol, 4 % (v/v) β -merkaptotanol, 50 mM EDTA (pH 8), noževa konica barvila bromfenol modro
- **blokirni pufer z mlekom:** 5 % (m/v) mleka v prahu v pufru TBST
- **blokirni pufer z BSA:** 5 % (m/v) BSA v pufru TBST
- **elektroforezni pufer pri NaDS-PAGE:** 25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM glicin, 0,1 % (m/v) NaDS
- **pufer TBS:** 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5
- **pufer TBST:** 0,1 % (v/v) Tween-20 v pufru TBS
- **pufer 1 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om (Invitrogen, ZDA):** 2-kratni NaDS pufer ((100 mM Tris (pH 6,8), 4 % (m/v) NaDS, 20 % (v/v) glicerol, 2 % (v/v) β -merkaptotanol, 25 mM EDTA (pH 8), barvilo bromfenol modro))
- **pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om:** 1-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE ((50 mM Tris (pH 6,8), 2 % (m/v) NaDS, 10 % (v/v) glicerol, 1 % (v/v) β -merkaptotanol, 12,5 mM EDTA (pH 8), barvilo bromfenol modro))
- **pufer za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NP-40:** 50 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % NP-40, 1/100 proteaznih inhibitorjev
- **pufer za pripravo koncentracijskega gela PAGE:** 0,5 M Tris (pH 6,8)
- **pufer za pripravo ločevalnega gela PAGE:** 1,5 M Tris (pH 8,8)
- **pufer za razredčitev protiteles:** 2,5 % (m/v) BSA v pufru TBST
- **raztopina za fiksiranje pri barvanju s Page Blue (Fermentas):** 25 % (v/v) izopropanol, 10 % (v/v) očetna kislina
- **raztopina za fiksiranje pri barvanju s srebrovim nitratom:** 30 % (v/v) etanol, 7 % (v/v) očetna kislina
- **razvijalec za barvanje s srebrovim nitratom:** 270 mM Na_2CO_3 , 0,05 % formaldehid
- **Towbinov pufer:** 25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM glicin, 0,1 % (m/v) NaDS, 20 % (v/v) metanol

3.1.4 Uporabljeni encimi

- proteazni inhibitorji (Thermo Scientific, ZDA, kat. št. 78425)
- fosfatazni inhibitorji (Thermo Scientific, ZDA, kat. št. 78420)

3.1.5 Uporabljena protitelesa

Primarna protitelesa

- zajčja monoklonska protitelesa usmerjena proti fosforilirani obliki AMPK α (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535)
- zajčja monoklonska protitelesa usmerjena proti nefosforilirani obliki AMPK α (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2603)
- zajčja protitelesa usmerjena proti fosforilirani obliki AMPK β 1 (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 4181)
- zajčja monoklonska protitelesa usmerjena proti nefosforilirani obliki AMPK β 1/2 (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 4150)
- zajčja protitelesa usmerjena proti fosforilirani obliki ACC (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 3661)
- zajčja monoklonska protitelesa usmerjena proti nefosforilirani obliki ACC (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 3676)
- zajčja poliklonska protitelesa usmerjena proti β -aktinu (Abcam, Velika Britanija, kat. št. 1801)
- zajčja poliklonska protitelesa usmerjena proti β -aktinu (Novus Biologicals, ZDA, kat. št. NB600-532)

Sekundarna protitelesa

- kozja protitelesa, konjugirana s HRP, usmerjena proti zajčjim protitelesom (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 7074)
- kozja protitelesa, konjugirana s peroksidazo, usmerjena proti zajčjim protitelesom (Jackson ImmunoResearch, ZDA, kat. št. 111-035-003)

3.1.6 Uporabljeni kompleti

- komplet protiteles za detekcijo AMPK in ACC (»AMPK and ACC Antibody Sampler Kit«, Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 9957)
- substrat Lumi-Light za kemiluminiscenčno detekcijo po prenosu western (»Lumi-Light Western Blotting Substrate«, Roche, Nemčija, kat. št. 12015200001)
- komplet proteinov BSA in reagenta za določanje celokupnih koncentracij proteinov (»Pierce 660 nm Protein Assay Kit«, Thermo Scientific, ZDA, kat. št. 22662)

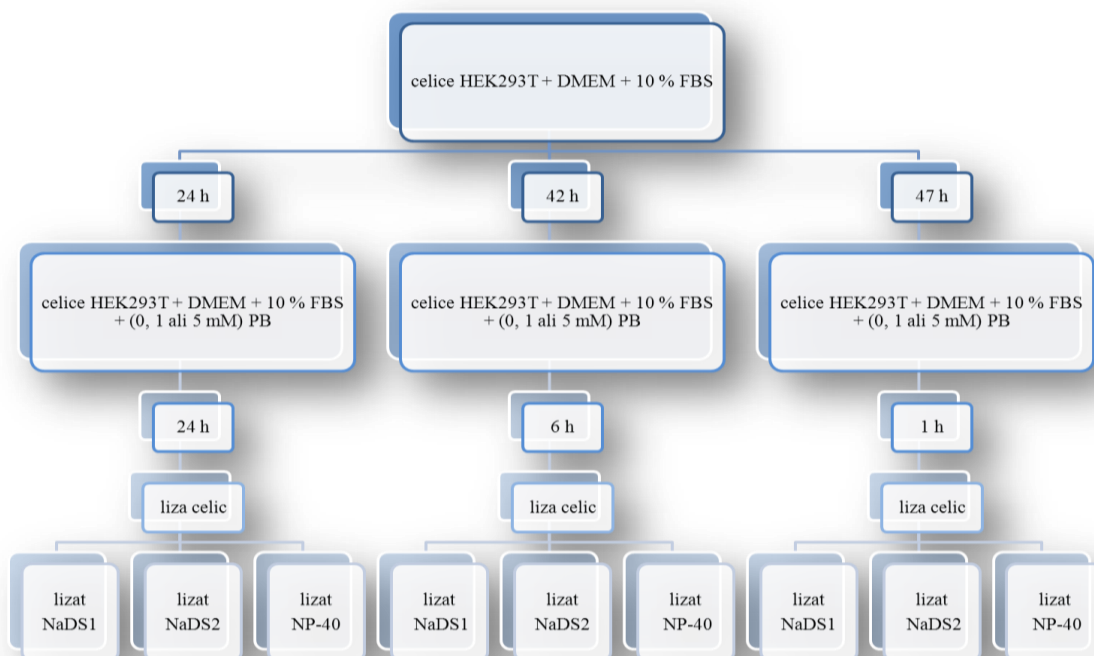
- komplet za pripravo nanašalnih pufrov («Protein Loading Buffer Pack», Fermentas, ZDA, kat. št. R0891)

3.2 Metode dela

3.2.1. Celice HEK293T kot modelni organizem

Celice HEK293 ali človeške embrionalne ledvične celice so pridobili s transformacijo normalnih človeških embrionalnih ledvičnih celic z DNK adenovirusa 5. Celice HEK293 so enostavne za gojenje in izrazito dovzetne za transfekcijo in so eden izmed najpogostejše uporabljenih modelov človeške oz. sesalske celice v molekularno-bioloških laboratorijih. Pri preučevanju vpliva PB na aktivnost AMPK v sesalskih celicah smo uporabili celice HEK293T, ki izhajajo iz celic HEK293, in v katerih se stabilno izraža antigen T virusa SV40, ki omogoča podvojevanje plazmidov z izvorom podvojevanja SV40 in s tem visoka raven heterolognega izražanja poljubnih genov (Wikipedia. HEK cell, 2012).

3.2.2 Gojenje celic HEK293T v prisotnosti PB in priprava celičnih lizatov



Slika 5: Shema gojenja celic v mediju DMEM z dodatkom 10 % FBS, tretiranja celic s PB in priprave celičnih lizatov.

Celice HEK293T smo gojili v gojišču DMEM z dodatkom 10 % FBS v nadzorovani atmosferi s 5 % CO₂ in pri temperaturi 37 °C. Pri precepljanju celic za potrebe poskusa smo jih najprej previdno sprali s PBS, jih odlepili z raztopino Tryple Select (Invitrogen, ZDA) in celice nežno resuspendirali v 10-kratnem volumnu medija z 10 % FBS, kar obenem omogoča nevtralizacijo proteinaz z raztopine Tryple Select. Odvzeli smo 30 µl suspenzije celic, dodali 30 µl barvila tripan modro in prešteli celice z uporabo Neubauerjeve števne komore. V posamezno vdolbinico plošče s 6 vdolbinicami smo nacepili 300.000 celic HEK293T oz. 700.000 celic v primeru nacepljanja na dno flaške T25.

Celice smo želeli izpostaviti različnim časom delovanja PB-ja (1, 6 in 24 h), nato pa pripraviti celične lizate s tremi različnimi pufru za lizo celic. S tem namenom smo celice najprej gojili 24, 42 in 47 h (slika 5) v ustreznem številu paralelk, nato pa gojišče zamenjali s svežim gojiščem z dodanim PB s končno koncentracijo 1 in 5 mM. Negativne kontrole niso vsebovale PB-ja. Založno raztopino PB s koncentracijo 1 M smo pripravili iz ekvimolarnega deleža 4-fenilbutanojske kisline in NaOH v milliQ vodi, ki smo jo sterilno filtrirali z uporabo 0,2 µm filtra. Po preteku 1, 6 oz. 24 h od začetka tretmaja s PB, smo ploščo s celicami prenesli na led, celice 3-krat sprali s PBS, nato pa PBS odstranili in celice v posamezni paralelki lizirali z uporabo enega izmed treh izbranih pufrov:

- **pufer 1 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS** ((100 mM Tris (pH 6,8), 4 % (m/v) NaDS, 20 % (v/v) glicerol, 2 % (v/v) β-merkaptotanol, 25 mM EDTA (pH 8), barvilo bromfenol modro))
- **pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS** ((50 mM Tris (pH 6,8), 2 % (m/v) NaDS, 10 % (v/v) glicerol, 1 % (v/v) β-merkaptotanol, 12,5 mM EDTA (pH 8), barvilo bromfenol modro))
- **pufer za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NP-40** ((50 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 % NP-40, 1/100 proteaznih inhibitorjev))

Uporabili smo 100 µl določenega pufru za lizo celic v vdolbinici plošče s 6 vdolbinicami oz. 300 µl določenega pufru za celice gojene v flaški T25. Z uporabo strgala smo celice mehansko ločili od podlage in lizirali. NaDS-celične lizate smo nato inkubirali 5 min pri 95 °C. Vse celične lizate smo shranili na -80 °C. Za pozitivno kontrolo pri prenosu western (WB) smo uporabili lizate celic, ki smo jim 30 min pred lizo dodali 10 µl 0,1 mM raztopine oligomicina v DMSO (končna koncentracija 0,5 µM), oziroma 2 µl 1 mM raztopine oligomicina v DMSO (končna koncentracija 1 µM).

3.2.3 Ultrazvočna obdelava vzorcev (sonifikacija)

Obdelava snovi z ultrazvokom (v nadaljevanju sonifikacija) smo uporabili za homogenizacijo celokupnih celičnih lizatov. Sonifikacija pripomore k popolnemu razbitju ostankov celičnih struktur, različnih nukleoproteinskih in membranskih kompleksov, pri čemer pride tudi do razbitja dolgih verig nukleinskih kislin in s tem pomembnega zmanjšanja viskoznosti vzorcev.

Pri sonifikaciji vzorcev z volumnom med 0,1 in 5 ml, smo uporabili sonotrodo premera 1 mm. Vzorec smo sonificirali 10 s in ga ohladili za 10 s na ledu. Postopek smo trikrat ponovili.

3.2.4 Kolorimetrično določanje koncentracije proteinov v celičnih lizatih

Koncentracijo proteinov smo določali s pomočjo kompleta proteinskih standardov govejega serumskega albumina (BSA) in »Pierceovega reagenta« za določanje celokupnih koncentracij proteinov (»Pierce 660 nm Protein Assay Kit«, Thermo Scientific, ZDA). Metoda je kolorimetrična, hitra in ponovljiva. Temelji na vezavi kompleksa barvilo-kovina na protein v kislem okolju, kar povzroči premik v absorpcijskem vrhu barvila. Obarvanje, ki nastane, je stabilno in narašča sorazmerno z naraščajočo koncentracijo proteinov. Metodo lahko uporabljamo kljub visokim koncentracijam detergentov in reducentov v vzorcih. Metoda je relativna, kar pomeni, da za določanje koncentracije proteinov v celokupnih celičnih lizatih potrebujemo umeritveno krivuljo. Dobimo jo iz izmerjene absorbance standardizirane lestvice proteina BSA (iz zgoraj omenjenega kompleta), katerih koncentracije so znane (125–2000 µg/ml). Standardizirana lestvica proteinov BSA je pripravljena v raztopini 0,9 % NaCl in 0,05 % NaN₃.

Reakcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca kompleta. 10 µl ustrezno redčenega celokupnega lizata smo nanegli v vdolbinico na mikrotitrski plošči. Poleg vzorcev z neznano koncentracijo smo k vsaki meritvi dodali še ustrezne slepe vzorce in standardizirano lestvico proteina BSA, s pomočjo katere smo pripravili umeritveno krivuljo. Vzorcem smo nato dodali po 150 µl Pierceovega reagenta, ploščo stresali 1 min, inkubirali 5 min na sobni T, nato pa pomerili vrednosti absorbance pri 660 nm z uporabo čitalca mikrotitrskih plošč (Infinite M1000, Tecan, Švica).

3.2.5 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS je analitična metoda, ki omogoča ločevanje proteinov glede na molekularno maso. Molekule NaDS se enakomerno vežejo na razvite verige proteinov in s tem izničijo njihov lastni naboj, tako da so vsi proteini z vezanim NaDS na enoto dolžine relativno enako negativno nabiti. Razmerje med celotnim nabojem in dolžino posamezne polipeptidne verige je torej

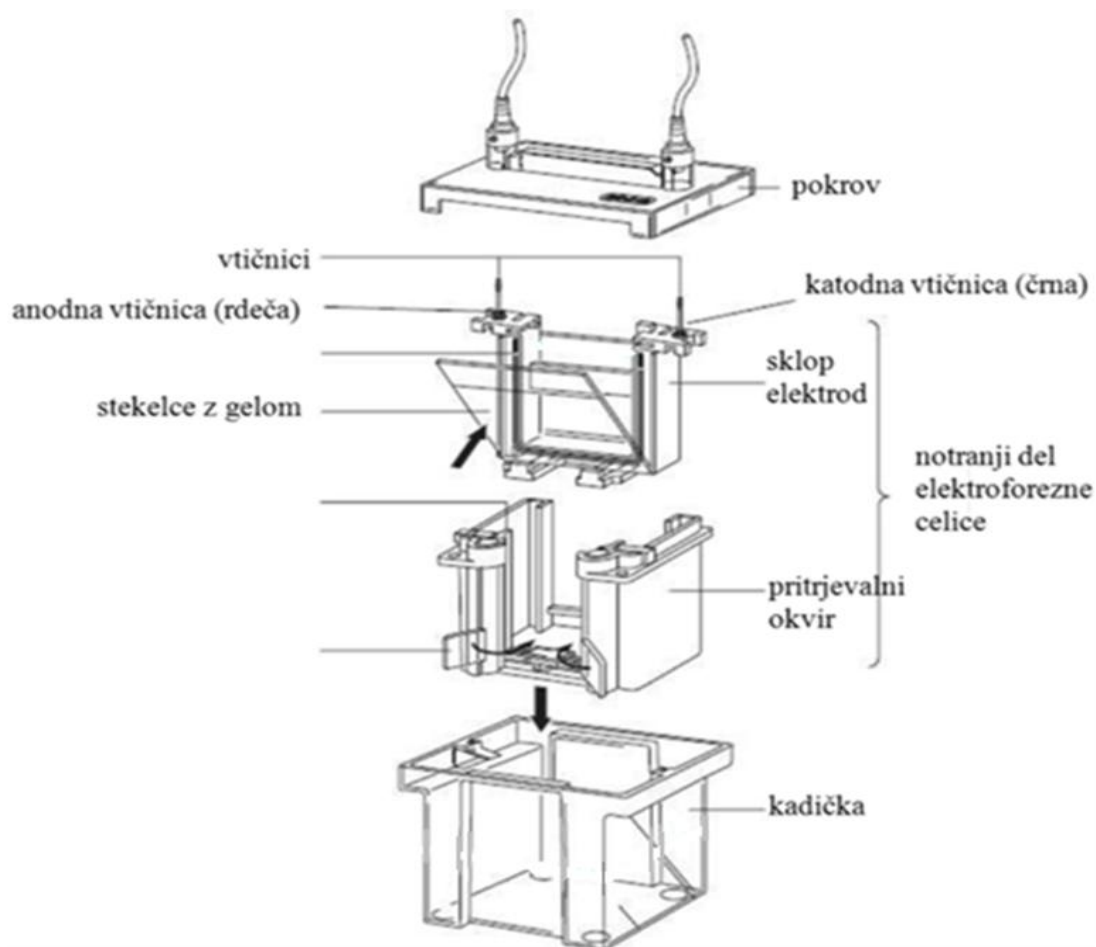
enako za vse proteine. Pomembna posledica tega je, da se molekule pri tej metodi ločujejo predvsem na podlagi dolžine polipeptidne verige oziroma molekulske mase proteina. Hitrost potovanja proteinov je obratno sorazmerna z njihovo velikostjo.

Elektroforezo v prisotnosti NaDS smo izvajali na poliakrilamidnih gelih, sestavljenih iz 10-odstotnega ločevalnega gela in 4-odstotnega koncentracijskega gela, debeline 0,75 mm. Najprej smo pripravili ločevalni gel. Stekelca za vlivanje gela z distančniki zelene debeline smo predhodno temeljito očistili z detergentom in etanolom. Gel smo pripravili po recepturi, prikazani v preglednici 1. Dodatek raztopine TEMED omogoči začetek polimerizacije gela, 10 % APS pa je katalizator polimerizacije. Gel smo pred vlivanjem med stekelca dobro premešali, da je bila polimerizacija enakomerna. Gel smo vlili med stekelca do ustrezne višine (0,5 cm pod predvideno spodnjo mejo žepkov koncentracijskega gela), preostali del pa zalili z vodo, da je izrinila mehurčke in vlažila gel. Počakali smo 45 min, da se je gel strdil, odlili vodo in odvečne kapljice popivnali s filter papirjem. Pripravili smo še koncentracijski gel (tabela 2), ga vlili med stekelca, vstavili glavniček in počakali 45 min, da se je gel strdil. Gele smo ponavadi predhodno pripravili in jih uporabili šele čez nekaj dni. Zato smo odstranili glavniček, žepke pa zalili z vodo, da smo preprečili izsušitev. Shranili smo jih v hladilniku (4 °C) v papirnati brisači, ki je bila navlažena z vodo in zavita v aluminijasto folijo.

Preglednica 1: Sestava 10 % ločevalnega in 4 % koncentracijskega gela za NaDS-PAGE.

	10 % ločevalni gel	4 % koncentracijski gel
končni volumen (ml)	10 ml	5 ml
dH ₂ O	4,85 ml	3,175 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml	/
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	/	1,25 ml
40 % (m/v) akrilamid/bisakrilamid	2,5 ml	0,5 ml
10 % (m/v) NaDS	100 µl	50 µl
10 % (m/v) APS	50 µl	25 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl

Pred začetkom elektroforeze smo pripravljena stekelca z gelom vstavili v posodo za elektroforezo in do vrha nalili elektroforezni pufer za NaDS-PAGE (slika 6). Celokupne celične lizate, ki smo jih nanesti na gel, smo pripravili po protokolu opisanem pod točko 3.2.1. Pred vsako uporabo smo celične lizate segreli na sobno temperaturo, zvrtnčili in kratko centrifugirali. V posamezen žep na gelu smo nanesti po 10 µg celokupnih proteinov. Kadičko smo pokrili s pokrovom, ki smo ga priklopili na električni tok. Elektroforeza je potekala 40 min, pri konstantnem toku 20 mA. Spremljali smo potek elektroforeze in počakali, da se je lestvica velikostnega standarda lepo ločila.



Slika 6: Shematski prikaz sestave elektroforezne celice (*Mini-Protean 3, Bio-Rad, ZDA*).

3.2.5.1 Barvanje gelov PAGE s srebrovim nitratom

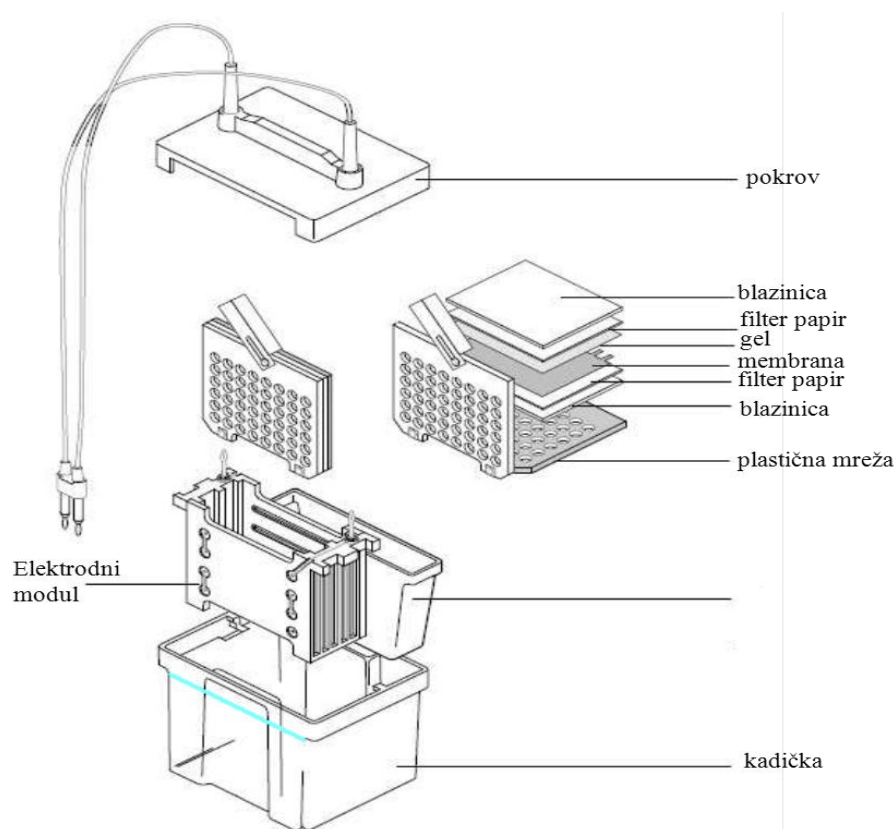
Metodo smo uporabili po prenosu western, da smo ocenili uspešnost prenosa proteinov.

Gel smo potopili v fiksirno raztopino (30 % etanol in 7 % očetna kislina) za 30 min. Nato smo ga spirali z večkratnimi menjavami vode (20–60 min), da smo odstranili kislino in topne komponente (NaDS, ioni Cl^- in aminokislino), ki imajo visoko afiniteto do Ag^+ ionov. Tekom spiranja je ozadje gela postajalo prozorno. Po spiranju smo gel 30 min stresali v 100 ml raztopine reducenta DTT (5 $\mu\text{g/ml}$ DTT). Gel smo sprali z vodo 2-krat po 1 min, nato pa smo ga 1 h stresali v raztopini AgNO_3 (0,1 % (m/v) AgNO_3), ki smo jo pripravili tik pred uporabo. Gel smo ponovno sprali z vodo in nato še na hitro z razvijalcem. Dolili smo približno 100 ml razvijalca in ob stresanju razvijali. Razvijalec smo zamenjali, če je postal rumen. Ko so bile lise dovolj intenzivne, smo z dodatkom 5–10 g trdne citronske kisline prekinili razvijanje. Rezultate smo dokumentirali s skeniranjem gela.

3.2.6 Prenos western

Prenos western je metoda, pri kateri s pomočjo električnega toka prenesemo proteine iz poliakrilamidnega gela na membrano PVDF.

Najprej smo izvedli NaDS-PAGE (opisana pod točko 3.2.5). Med potekom NaDS-PAGE smo izrezali 4 kose filter papirja in 1 kos membrane PVDF v dimenzijah enakih elektroforeznemu gelu. Po končani NaDS-PAGE smo PVDF membrano omočili za 30 s v metanolu, za 60 s v destilirani vodi in nato še za 15 min v Towbinovem pufru. Gel PAGE smo v Towbinovem pufru spirali 10 min. Nato smo začeli s sestavo aparature za prenos western (slika 7). Razprli smo plastično mrežo in jo položili v pladenj, v katerega smo nalili Towbinov pufer. Na beli del plastične mreže, smo položili omočeno blazinico, 2 kosa filter papirja, membrano, gel, 2 kosa filter papirja in še eno omočeno blazinico. Vsako plast smo dobro omočili s Towbinovim pufrom in povaljali s stekleno epruveto, da smo odstranili vse zračne mehurčke med plastmi, ki ovirajo prenos proteinov. Plastično mrežo smo zaprli in postavili v elektrodni modul tako, da je bil črni del mreže ob črnem delu elektrodnega modula. Do vrha smo nalili Towbinov pufer (slika 7), vstavili magnetno mešalo in aparaturo ohlajali z ledom, da bi preprečili pregrevanje sistema. Proteini so bili v Towbinovem pufru negativno nabiti in so v električnem polju potovali proti pozitivni anodi. Kadičko smo pokrili tako, da sta bili elektrodi ustrezno orientirani (rdeča na rdečo, črna na črno) in jo priključili na električni tok. Prenos western je potekal 90 min pri konstantnem električnem toku 200 mA.



Slika 7: Shematski prikaz sestave aparature za prenos western (Mini Trans-Blot, Bio-Rad, ZDA). Z modro barvo je označena raven Towbinovega pufru.

3.2.7 Inkubacija s protitelesi

Metodo (opisana v točki 3.2.7.1), ki je bila podana v navodilih za uporabo kompleta protiteles za detekcijo AMPK in ACC (»AMPK and ACC Antibody Sampler Kit«, Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 9957), smo tekom dela spreminjali z namenom izboljšave pridobljenih rezultatov. Uporabili smo štiri različne metode za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK s kontrolnimi vzorci.

3.2.7.1 Metoda 1 za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK

Po končanem prenosu western smo membrano sprali v 100 ml pufru TBS in jo položili na pokrov steklene petrijevke, ki smo ga predhodno temeljito očistili z etanolom. Membrano smo inkubirali 1 h, ob rahlem stresanju, v 5 % mleku v prahu, raztopljenem v pufru TBST. Sledile so 3 ponovitve 5-minutnega spiranja membrane v pufru TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali primarna protitelesa (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535, 2603, 4181, 4150), redčena 1:1000 v 5 % BSA, raztopljenem v pufru TBST. Membrano smo ob stresanju inkubirali čez noč pri 4 °C z rahlim stresanjem.

Naslednji dan je sledilo spiranje membrane (3-krat po 5 min) v pufru TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali sekundarna protitelesa (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 7074), redčena 1:2000 v 5 % mleku v prahu v pufru TBST. Inkubacija je potekala 1 h ob rahlem stresanju pri sobni temperaturi. Membrano smo nato ponovno spirali 3-krat po 5 min s pufrom TBST. Sledila je kemiluminiscenčna detekcija.

3.2.7.2 Metoda 2 za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK

Po končanem prenosu western smo membrano sprali v 100 ml pufru TBS in jo položili na pokrov steklene petrijevke, ki smo ga predhodno temeljito očistili z etanolom. Membrano smo inkubirali 1 h, ob rahlem stresanju, v 5 % BSA, raztopljenem v pufru TBST, pri 4 °C. Sledile so 3 ponovitve 5-minutnega spiranja membrane v pufru TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali primarna protitelesa (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535, 2603, 4181, 4150), redčena 1:1000 v pufru TBST. Membrano smo ob stresanju inkubirali čez noč pri 4 °C z rahlim stresanjem.

Naslednji dan je sledilo spiranje membrane (3-krat po 5 min) v pufru TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali sekundarna protitelesa (Jackson ImmunoResearch, ZDA, kat. št. 111-035-003), redčena 1:10000 v pufru TBST. Inkubacija je potekala 1 h ob rahlem stresanju pri sobni temperaturi. Membrano smo nato ponovno spirali 3-krat po 5 min s pufrom TBST. Sledila je kemiluminiscenčna detekcija.

3.2.7.3 Metoda 3 za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK

Po končanem prenosu western smo membrano sprali v 100 ml pufra TBS in jo položili na pokrov steklene petrijevke, ki smo ga predhodno temeljito očistili z etanolom. Membrano smo inkubirali 1 h, ob rahlem stresanju, v 2,5 % mleku v prahu, raztopljenem v pufu TBST. Sledile so 3 ponovitve 5-minutnega spiranja membrane v pufu TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali primarna protitelesa (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535, 2603, 4181, 4150), redčena 1:1000 v 5 % BSA, raztopljenem v pufu TBST. Membrano smo ob stresanju inkubirali čez noč pri 4 °C z rahlim stresanjem.

Naslednji dan je sledilo spiranje membrane (3-krat po 5 min) v pufu TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali sekundarna protitelesa (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 7074), redčena 1:2000 v 2,5 % mleku v prahu v pufu TBST. Inkubacija je potekala 1 h ob rahlem stresanju pri sobni temperaturi. Membrano smo nato ponovno spirali 3-krat po 5 min s pufom TBST. Sledila je kemiluminiscenčna detekcija.

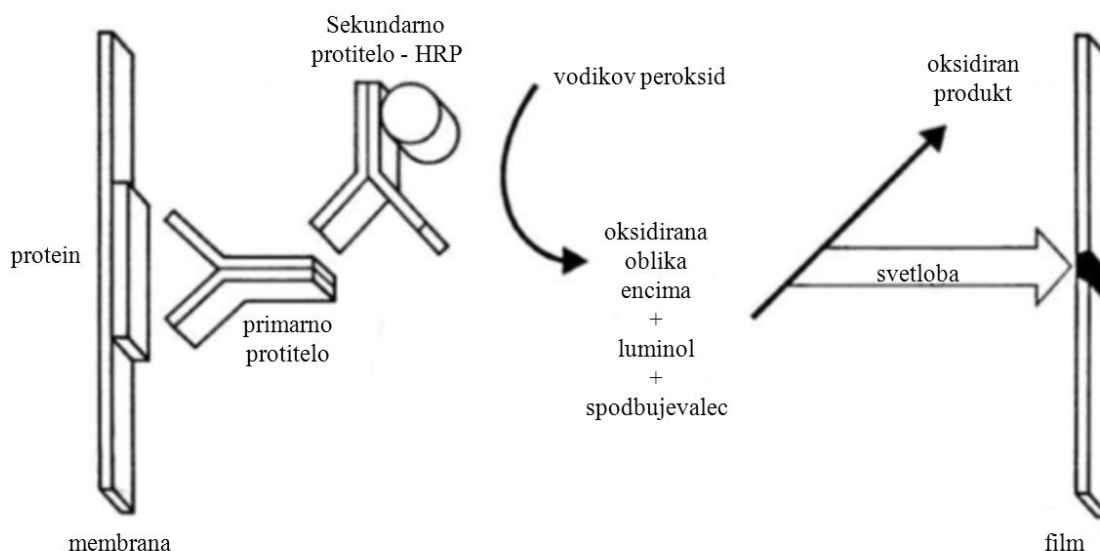
3.2.7.4 Metoda 4 za optimizacijo imunodetekcije aktivacije AMPK

Po končanem prenosu western smo membrano sprali v 100 ml pufra TBS in jo položili na pokrov steklene petrijevke, ki smo ga predhodno temeljito očistili z etanolom. Membrano smo inkubirali 1 h, ob rahlem stresanju, v 5 % BSA, raztopljenem v pufu TBST. Sledile so 3 ponovitve 5-minutnega spiranja membrane v pufu TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali primarna protitelesa (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535, 2603, 4181, 4150), redčena 1:1000 v 2,5 % BSA, raztopljenem v pufu TBST. Membrano smo ob stresanju inkubirali čez noč pri 4 °C z rahlim stresanjem.

Naslednji dan je sledilo spiranje membrane (3-krat po 5 min) v pufu TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali sekundarna protitelesa (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 7074), redčena 1:2000 v 2,5 % BSA, raztopljenem v pufu TBST. Inkubacija je potekala 1 h ob rahlem stresanju pri sobni temperaturi. Membrano smo nato ponovno spirali 3-krat po 5 min s pufom TBST. Sledila je kemiluminiscenčna detekcija.

3.2.8 Kemiluminiscenčna detekcija

Metoda temelji na reakciji med kemiluminiscenčno molekulo (luminolom) in hrenovo peroksidazo, konjugirano na sekundarnih kozjih protitelesih, ki v prisotnosti vodikovega peroksida katalizira oksidacijo luminola. Rezultat reakcije je svetloba, katero z dodatkom kemiluminiscenčnega ojačevalca še ojačamo. Svetlobo, ki jo detektiramo na filmu, zaznamo kot temno liso.



Slika 8: Shematski prikaz klasične imunodetekcije po prenosu western (ECL Western blotting protocols, Amersham, ZDA).

Pripravili smo kaseto z ojačevalnim zaslonom in jo obrisali s papirnato brisačo omočeno z destilirano vodo. Odrezali smo folijo v velikosti kasete z ojačevalnim zaslonom in jo prilepili v kaseto. Membrano smo po spiranju v pufru TBST prestavili v čisto kadičko. Na membrano smo enakomerno porazdelili 1 ml raztopine s substratom Lumi-light (50 μ l ojačevalca luminol in 50 μ l vodikovega peroksida, ki sta bila redčena z 900 μ l vode) in inkubirali 5 min. Membrano smo odcedili in jo prestavili v kaseto med listi folije. V temnici smo v kaseto z membrano vstavili film in ga, v odvisnosti od intenzitete nastalih lis, eksponirali 1–30 min. Film smo nato vzeli iz kasete in ga potopili v kadičko z razvijalcem, prenesli v fiksir in sprali v vodi. Rezultate smo dokumentirali s skeniranjem filma.

3.2.9 Odstranjevanje protiteles z membran (»membrane stripping«) in ponovna detekcija proteinov na membrani PVDF

Protitelesa smo z membrane PVDF odstranili, kadar smo želeli na isti membrani ponovno nanesti protitelesa, ki so bila usmerjena proti proteinom podobnih velikosti kot prvotno detektirani proteini. V našem primeru smo z membrane PVDF odstranili zajčja

protitelesa usmerjena proti fosforilirani obliki AMPK β 1 in nefosforilirani obliki AMPK β 1/2, nanesti pa smo zajčja poliklonska protitelesa usmerjena proti β -aktinu. Znano je, da se ne glede na vplive fizioloških in patoloških faktorjev količina β -aktina v celici ne spreminja v veliki meri, zato smo ga uporabili kot kontrolo nanosa proteinov na posamezen žepek.

Preglednica 2: Sestava raztopine za odstranjevanje protiteles.

	Volumen 10-kratne raztopine za odstranjevanje protiteles	Volumen dH ₂ O	Končni volumen
1 blot (7 x 10 cm)	2 ml	18 ml	20 ml

Raztopino za odstranjevanje protiteles smo pripravili po recepturi, prikazani v preglednici 2. Membrano, ki je bila shranjena v pufru TBST, smo potopili v raztopino za odstranjevanje protiteles in inkubirali 15 min ob rahlem mešanju. Sledilo je 1 h blokiranje membrane v 5 % mleku in 1 % BSA, ki smo ju raztopili v pufru TBS. Po 1 h smo odlili blokirno raztopino in dodali primarna protitelesa usmerjena proti β -aktinu, redčena v razmerju 1 : 5000 v raztopini 5 % mleka in 1 % BSA v pufru TBS. Membrano smo ob stresanju inkubirali 2 h na sobni temperaturi. Nato smo odlili raztopino s protitelesi in membrano 5 min spirali v milliQ vodi. Po spiranju smo dodali v 2,5 % BSA v pufru TBST ustrezno redčena sekundarna protitelesa (Jackson ImmunoResearch, ZDA). Membrano smo inkubirali 1 h ob rahlem stresanju na sobni temperaturi. Odlili smo raztopino s protitelesi in membrano 2 x 10 min spirali s pufrom TBST, nato pa še 2 x 10 min z milliQ vodo. Sledila je kemiluminisčenčna detekcija (točka 3.2.7).

3.2.10 Ponovna imunodetekcija brez odstranjevanja protiteles z membrane PVDF

Metode smo se posluževali, kadar smo želeli na isti, že uporabljeni, membrani PVDF zaznati drugi tarčni protein, ki se je po molekulski masi dovolj razlikoval od prvotnega (lisi na gelu se nista prekrivali). Tako smo detektirali fosforilirano obliki ACC, ki je poglobitna tarča AMPK.

Membrano smo po kemiluminisčenčni detekciji spirali 6 x 10 min v pufru TBST. Nato smo jo blokiral 1 h v 5 % mleku v pufru TBST. Sledilo je spiranje 3 x 5 min v pufru TBST. Po spiranju smo pufer TBST odlili in dodali primarna zajčja protitelesa, usmerjena proti fosforilirani obliki ACC in nefosforilirani obliki ACC, redčena v razmerju 1 : 1000 v 5 % BSA v pufru TBST. Membrano smo ob stresanju inkubirali čez noč v hladni sobi (4 °C).

Naslednji dan je sledilo 3 x 5 min spiranje v pufru TBST. Po spiranju smo dodali sekundarna protitelesa, ustrezno redčena v raztopini 2,5 % BSA v pufru TBST.

Inkubirali smo 1 h ob rahlem stresanju na sobni temperaturi. Ponovili smo 3 x 5 min spiranje v pufru TBST. Sledila je kemiluminisčenčna detekcija, opisana pod točko 3.2.7.

3.2.11 Kvantitativno ovrednotenje rezultatov s programom ImageJ

ImageJ je brezplačni program, ki ga je ustvaril Wayne Rasband z Nacionalnega inštituta za duševno zdravje (Bethesda, Maryland, ZDA), podružnice Nacionalnega inštituta za zdravje (»National Institute of Health« ali krajše »NIH«, ZDA). Izdelan je na osnovi programa ImageJ prvotno ustvarjenega za operacijski sistem Mac OS. Deluje na vseh operacijskih sistemih, ki imajo nameščen programski jezik Java.

S pomočjo ImageJ smo ovrednotili intenziteto lis, ki smo jih pridobili s tehniko imunodetekcije fosforilirane in nefosforilirane AMPK, fosforilirane in nefosforilirane ACC ter β -aktin-a.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Vpliv PB na aktivacijo AMPK v sesalskih celicah ter optimizacija prenosa western

Glavni cilj diplomskega dela je bila ugotovitev, ali inkubacija sesalskih celic s PB privede do aktivacije AMPK.

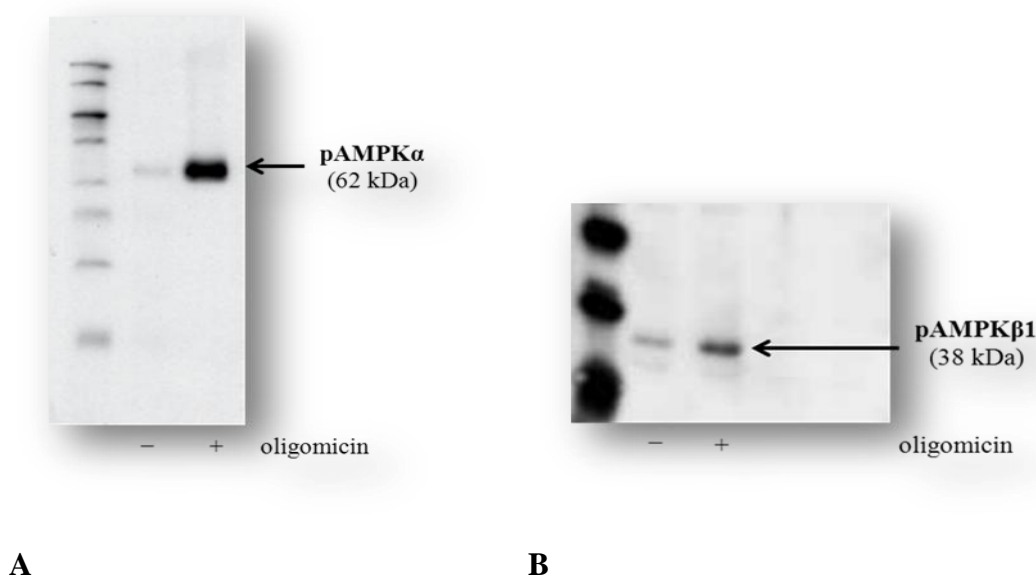
Pri delu smo uporabljali človeške celice HEK293T, ki so primeren model za raziskovanje splošnih signalnih in metabolnih poti v sesalskih celicah. Aktivacijo AMPK smo zasledovali z imunološko detekcijo aktivirane, t.j. fosforilirane oblike AMPK v lizatih celic HEK293T, ki smo jih predhodno tretirali s PB. Celice smo pred pripravo celičnih lizatov tretirali z 1 mM PB ali 5 mM PB. Za pozitivno kontrolo smo uporabili lizat celic, ki smo jim 30 min pred lizo celic dodali oligomicin, ki je inhibitor oksidativne fosforilacije (ATP-sintaze) in aktivator AMPK (Navodilo za uporabo oligomicina, 2010). Za negativno kontrolo pa smo uporabili celični lizat, katerega celice niso bile tretirane z nobeno izmed kemikalij. Po pripravi celokupnih celičnih lizatov smo določili tudi celokupno koncentracijo proteinov, in sicer je 100 µl posameznega celičnega lizata ponavadi vsebovalo med 60 in 160 µg proteinov. Pri NaDS-PAGE smo na en žepček na gelu nanесли 10 µg celičnih proteinov. Za prenos proteinov s poliakrilamidnega gela na PVDF membrano smo uporabili prenos western. Aktivirano AMPK smo detektirali s tehniko imunodetekcije, s protitelesi proti fosforilirani obliki AMPK. Pri tem smo uporabili protitelesa, s katerimi smo lahko ločeno zaznali fosforilacijo na dveh ključnih mestih za aktivacijo AMPK: Thr-172 v podenoti α in Ser-108 v podenoti β . Količino celotne AMPK smo določili z uporabo protiteles proti nefosforilirani obliki AMPK. Dodatno potrditev aktivacije AMPK v celici smo dobili tako, da smo s tehniko imunodetekcije spremljali tudi fosforilacijo ACC, poglavitne tarče AMPK, kar predstavlja neodvisen dokaz dejanskega delovanja AMPK v celici (Lin in sod., 2012). Detekcijo »hišnega proteina« β -aktina v celičnih lizatih smo pri delu uporabljali kot kontrolo za enakomeren nanos vzorcev na gel in ob analizi rezultatov za normalizacijo ravni aktiviranih oblik AMPK in ACC.

Naš drugi cilj v tem diplomskem delu pa je bila optimizacija imunodetekcije fosforilirane in nefosforilirane AMPK po prenosu western. Pri optimizaciji smo preizkusili štiri različice metode za imunodetekcijo aktivirane AMPK v kontrolnih vzorcih, ki so podrobneje opisane pod točko 3.2.7 (Inkubacija s protitelesi). Prav tako smo med optimizacijo izbrali primeren čas tretiranja celic s PB, kot tudi pufer za lizo celic. V nadaljevanju sledi podrobnejši opis rezultatov optimizacijskih postopkov tretiranja celic in imunodetekcije AMPK, ki so pripeljala do izbora najustreznejše metode, v točki 4.1.4 pa je opisana kvantifikacija in končna analiza aktivacije AMPK s fenilbutiratom.

4.1.1 Optimizacija imunodetekcije aktivacije AMPK s kontrolnimi vzorci

4.1.1.1 Optimizacija metode detekcije

Najprej smo z uporabo kontrolnih vzorcev celičnih lizatov HEK293T želeli potrditi ustreznost protokola za imunodetekcijo iz navodil kompleta protiteles za detekcijo AMPK in ACC.

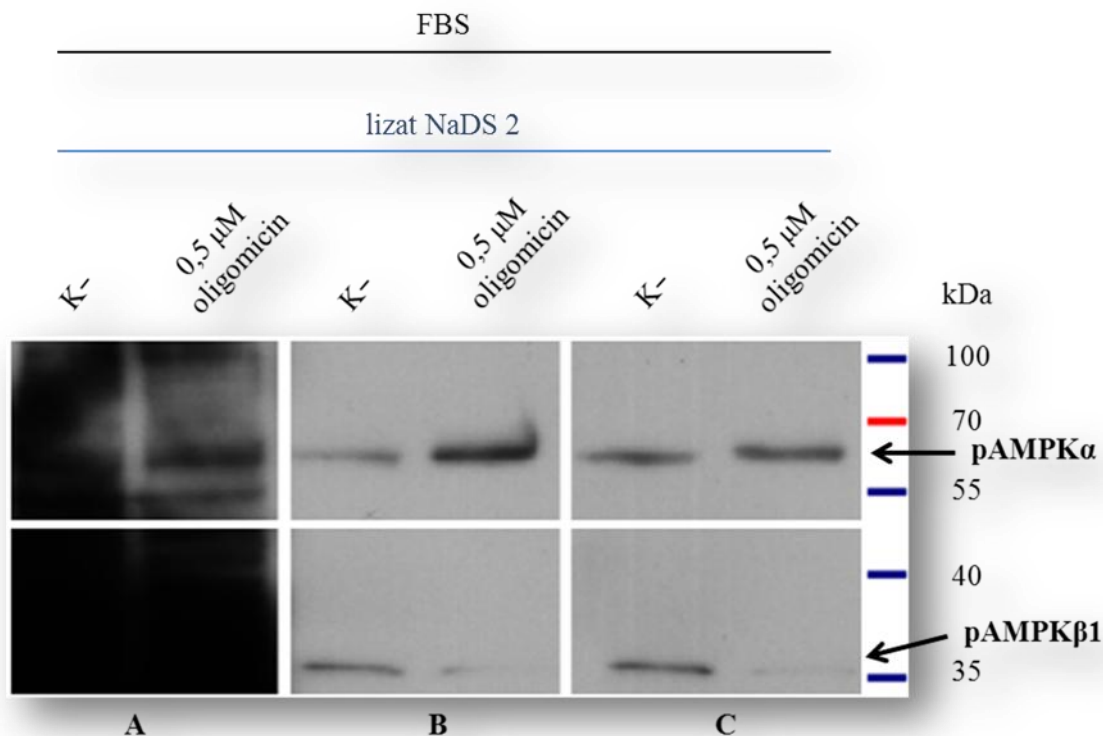


Slika 9: Prikaz imunološke detekcije pAMPK α in pAMPK β 1 po prenosu western iz navodil kompleta protiteles za detekcijo AMPK in ACC. Slika A kaže, da se fosforilirana oblika podenote α , pAMPK α , v celicah C2C12 pojavi le v primeru gojenja celic v prisotnosti aktivatorja AMPK, oligomicina. Končna koncentracija oligomicina v poskusu je bila 0,5 μ M. Slika B pa prikazuje detekcijo aktivirane podenote β 1 AMPK, pAMPK β 1, po inkubaciji celic s C2C12 oligomicinom (Navodilo za uporabo kompleta..., 2011).

Pri našem delu smo za pripravo pozitivne kontrole za aktivacijo AMPK v celicah HEK293T prav tako uporabili oligomycin. Oligomycin je antibiotik, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces diastatochromogenes*. Deluje tako, da se veže na ATP-sintazo, ki pretvarja ADP v ATP, ustavi njeno delovanje ter tako blokira oksidativno fosforilacijo. Zaradi povišanega razmerja AMP/ATP se posledično aktivira AMPK (Kahn in sod., 2005).

Celice smo gojili v prisotnosti oligomicina le zadnjih 30 min celotnega, 48-urnega obdobja gojenja celic, tik pred lizo celic (glej točko 3.2.2). Za negativno kontrolo smo uporabili celični lizat netretiranih celic gojenih pri enakih pogojih. Koncentracijo oligomicina smo določili na podlagi objavljenih rezultatov predhodnih študij iz navodil za uporabo oligomicina (Navodilo za uporabo oligomicina, 2010).

Imunodetekcijo aktivacije AMPK s kontrolnimi vzorci smo optimizirali z uporabo štirih različnih standardnih metod imunodetekcije po prenosu western. Rezultati prvih treh so prikazani na sliki 11, rezultati četrte metode pa so prikazani na sliki 12.



Slika 10: Imunološka detekcija pAMPKα in pAMPKβ1 po prenosu western. Uporabili smo tri različne načine za optimizacijo metode detekcije aktivacije AMPK, in sicer: **A:** metoda dela je podrobno opisana pod točko 3.2.7.2; **B:** metoda dela je podrobno opisana pod točko 3.2.7.1; **C:** metoda dela je podrobno opisana pod točko 3.2.7.3.

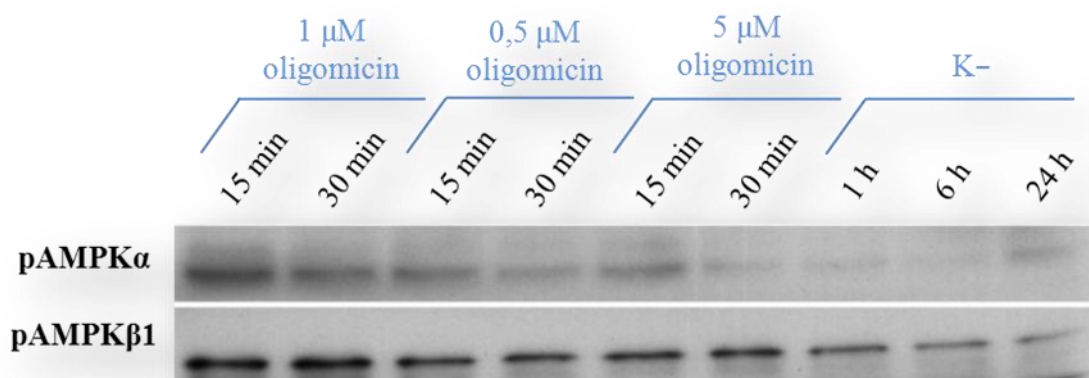
Imunološka detekcija pAMPKα in pAMPKβ1 po prenosu western, prikazana na sliki 10A, se je od drugih dveh bistveno razlikovala v tem, da pri celotnem postopku nismo uporabili mleka, in da smo protitelesa redčili le v pufru TBST. Membrano smo blokirali 1 h v raztopini 5 % BSA v pufru TBST pri 4 °C, primarna protitelesa smo redčili 1:1000 v pufru TBST, sekundarna protitelesa pa smo redčili 1:10000 v pufru TBST. Metoda je podrobneje opisana pod točko 3.2.7.2. Aktivirana oblika pAMPKα je bila sicer zaznavna, vendar je bilo ozadje zelo močno, da bi lahko ocenili raven aktivacije AMPKα. Detekcije pAMPKβ1 nismo mogli oceniti, saj je bilo ozadje pretemno, da bi lise pAMPKβ1 sploh opazili.

Imunološki detekciji pAMPKα in pAMPKβ1 po prenosu western, prikazani na sliki 10B in 10C, pa sta bili uspešni. V prvem primeru (slika 10B) smo membrano blokirali 1 h v 5 % mleku v prahu, raztopljenem v pufru TBST, in sicer pri sobni temperaturi, primarna protitelesa smo redčili 1:1000 v 5-odstotni raztopini BSA v pufru TBST, sekundarna protitelesa pa smo redčili 1:2000 v 5 % mleku v prahu, raztopljenem v pufru TBST

(podrobneje opisano pod točko 3.2.7.1). V drugem primeru (slika 10C) je metoda zelo podobna, le da smo pri blokiranju membrane in pri inkubaciji z raztopino sekundarnih protiteles uporabili polovično koncentracijo mleka (2,5 %) (podrobneje opisano pod točko 3.2.7.3). Obe metodi detekcije sta bili uspešni, vendar se je, zaradi nekoliko večje razlike med signaloma pozitivne in negativne kontrole (slika 10B), metoda z višjo, 5-odstotno, koncentracijo mleka izkazala za bolj ustrezno (točka 3.2.7.1). V nadaljevanju dela smo, ob optimizaciji časa tretiranja celic in koncentracije oligomicina, obenem preizkusili tudi četrto različico postopka imunodetekcije, pri katerem mleka nismo uporabili, in ki se je izkazala za optimalno (točka 4.1.1.3.)

4.1.1.2 Optimizacija časa tretiranja celic in koncentracije oligomicina

Z namenom doseči čim večjo razliko med količinama aktivirane AMPK pri pozitivni in negativni kontroli, smo se odločili preizkusiti različne čase in koncentracije oligomicina pri tretiranju celic HEK293T. Začetno koncentracijo oligomicina (pozitivna kontrola) smo določili na podlagi objavljenih rezultatov predhodnih študij (Navodilo za uporabo oligomicina, 2010). Preverili smo tudi, ali se aktivacija AMPK pri netretiranih celicah (negativna kontrola) spremeni v odvisnosti od časa.



Slika 11: Imunološka detekcija pAMPKα in pAMPKβ1 po prenosu western. Optimizacija koncentracije oligomicina in časa tretiranja celic HEK293T. Metoda dela je podrobno opisana pod točko 3.2.7.4.

Celice smo gojili v mediju s FBS-jem. Za lizo celic smo uporabili pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om, ki je 1-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE. Po prenosu proteinov z gela PAGE na PVDF membrano, smo membrano razrezali na 2 enaka dela, ki sta vsebovala 9 različnih vzorcev: 6 vzorcev celic tretiranih z 0,5 μM, 1 μM ali 5 μM oligomicinom 15 ali 30 min pred lizo celic (glej sliko 11) in 3 vzorce netretiranih celic odvzetih iz medija FBS 1, 6 ali 24 h pred dodatkom pufru za lizo celic (glej sliko 11). Za imunološko detekcijo smo uporabili primarna zajčja protitelesa (1:1000), usmerjena proti fosforiliranim oblikama AMPKα in AMPKβ1 (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535 in 4181) ter sekundarna protitelesa usmerjena proti zajčjim protitelesom (1:2000) (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 7074).

Odločili smo se, da preizkusimo še četrto različico postopka imunodetekcije po prenosu western. Glede na prej opisane metode (4.1.1.1) smo tokrat spremenili sestavo blokirnega pufra in pufra za redčenje protiteles tako, da smo se izognili uporabi mleka. Mleko bi namreč lahko oviralo delovanje nekaterih protiteles usmerjenih proti fosforilirani obliki proteinov, zaradi velikih količin fosfoproteina kazeina, na katerega se protitelesa lahko vežejo nespecifično (Navodilo za uporabo fosforiliranih protiteles, Abcam, 2012). Tako smo kot blokirni pufer uporabili raztopino 5 % BSA v puftru TBST, primarna in sekundarna protitelesa pa smo redčili z 2,5 % raztopino BSA v puftru TBST (podrobneje opisano pod točko 3.2.7.4). Lise na sliki 11 so bile dovolj jasne, temnega ozadja ni, zato smo vse nadaljnje eksperimente izvajali po metodi opisani pod točko 3.2.7.4, torej brez uporabe mleka.

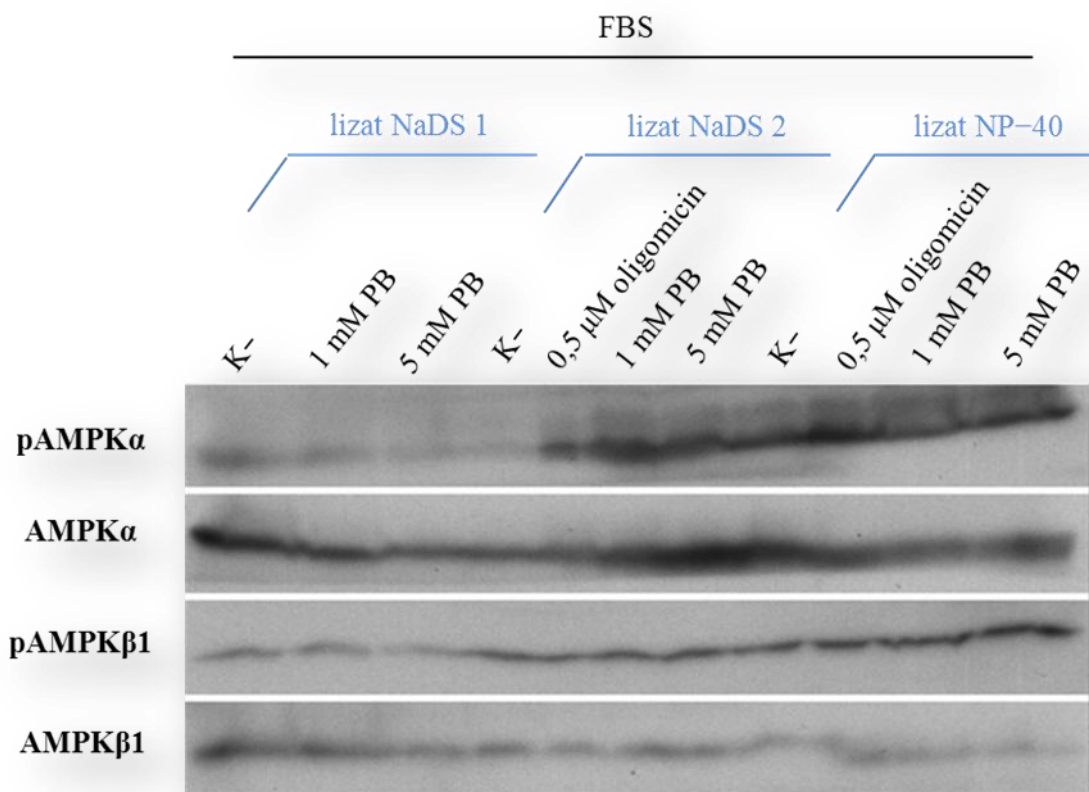
Rezultati so pokazali, da se raven aktivacije AMPK spreminja v odvisnosti od koncentracije oligomicina in časa tretiranja celic. Najvišjo intenziteto lise pAMPK α oz. aktivacijo AMPK smo zaznali pri analizi vzorcev lizatov celic, ki smo jih inkubirali 15 min v prisotnosti 1 μ M oligomicina. Zato smo se odločili, da bomo pri nadaljnjih eksperimentih uporabljali ta vzorec kot pozitivno kontrolo. Pri vzorcih celic, ki smo jih gojili v kompletnem mediju s FBS-jem in brez oligomicina, torej v optimalnih pogojih za rast celic, pa, po pričakovanjih, ni bilo zaznati pomembnih ravni aktivirane oblike AMPK. Pri nadaljnjih poskusih smo zato za negativno kontrolo izbrali vzorce lizatov celic, ki smo jih gojili 1 h v sveže zamenjanem kompletnem mediju.

4.1.1.3 Izbor najbolj optimalnih pogojev za imunodetekcijo aktiviranih oblik AMPK

Imunodetekcijo aktiviranih oblik AMPK smo izvajali po metodi opisani pod točko 3.2.7.4, torej brez uporabe mleka. Kot pozitivno kontrolo smo uporabljali celice, ki smo jih pred dodatkom pufra za pripravo celičnih lizatov za 15 min tretirali z 1 μ M oligomicinom. Kot negativno kontrolo pa smo uporabljali vzorce, ki smo jih pridobili z lizo celic, ki niso bile tretirane z oligomicinom in smo jih po 1 h gojenja odvzeli iz svežega medija FBS.

4.1.2 Izbira primernega pufra za lizo celic

Preizkusili smo, če se kvaliteta detekcije aktivirane AMPK spreminja v odvisnosti od priprave celičnega lizata v različnem puftru za lizo celic. Pripravili smo po 3 biološke replike vsakega vzorca, vsaka biološka replika pa je bila pripravljena v drugačnem puftru za lizo celic (glej točko 3.2.2). Bistvena razlika med pufri 1, 2 in 3 je v izbiri in koncentraciji detergenta. Pufra 1 in 2 vsebujeta različni koncentraciji SDS, ki je močnejši detergent in raztopi vse membrane (citoplazemsko, jedrno in membrano drugih organelov), medtem ko pufer 3 vsebuje NP-40, ki je bolj blag detergent in raztopi le citoplazemsko membrano. Pufer 1 vsebuje 2-kratno količino sestavin pufra 2, torej je 2-krat koncentriran. Z uporabo pufrov 1 in 2 smo torej dobili celokupne celične lizate, pri lizi celic s pufrom 3 pa smo v prvi fazi dobili le citosolne (vodotopne) proteine, nakar smo s sonifikacijo homogenizirali vzorce in raztopili tudi membranske proteine in prav tako pridobili celokupne celične lizate (glej točko 3.2.3).



Slika 12: Imunološka detekcija pAMPK α , AMPK α , pAMPK β 1 in AMPK β 1 po prenosu western. Izbira primernega pufru za lizo celic.

Celice smo gojili v mediju s FBS-jem. Enako zaporedje vzorcev celičnih lizatov smo nanegli na dva gela PAGE. Po prenosu proteinov z gelov PAGE na PVDF membrani, smo membrani razrezali na 2 enaka dela, ki sta vsebovala po 11 različnih vzorcev: 3 vzorce (negativno kontrolo, celice tretirane z 1 mM PB in celice tretirane s 5 mM PB), pri katerih smo uporabili pufer 1 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om, 4 vzorce (negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, celice tretirane z 1 mM PB in celice tretirane s 5 mM PB), pri katerih smo uporabili pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om in 4 vzorce (negativno kontrolo, pozitivno kontrolo, celice tretirane z 1 mM PB in celice tretirane s 5 mM PB), pri katerih smo za pripravo celokupnih celičnih lizatov uporabili pufer NP-40. Za imunološko detekcijo smo uporabili 4 različna primarna zajčja protitelesa (1:1000), usmerjena proti fosforilirani in nefosforilirani obliki AMPK α in AMPK β 1 (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535, 4181, 2603 in 4150), ter sekundarna protitelesa usmerjena proti zajčjim protitelesom (1:2000) (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 7074). Metoda je podrobneje opisana pod točko 3.2.7.2.

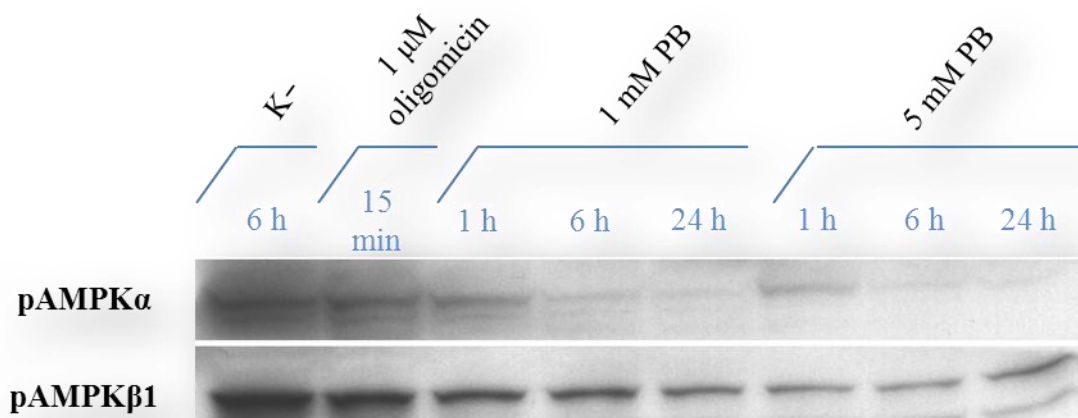
Rezultati so pokazali, da se raven aktivacije AMPK spreminja v odvisnosti od izbire pufru za lizo celic. Detekcija pAMPK α pri vzorcih, pri katerih smo uporabili pufer 1 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om je bila uspešna, vendar ni bilo zaznati bistvenih ravni aktivirane oblike AMPK, zato nismo mogli potrditi, ali se je AMPK α v

prisotnosti PB res fosforilirala. Detekcija pAMPK α pri vzorcih, pri katerih smo uporabili pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om, je bila uspešna. Zaznati je bilo značilno povečane ravni aktivirane oblike AMPK, negativna in pozitivna kontrola sta bili primerljivi z rezultati iz navodil kompleta protiteles za detekcijo AMPK in ACC (točka 4.1.1), pri celičnih lizatih tretiranih z 1 mM PB in s 5 mM PB, pa je bilo opaziti močno intenziteto lis, zato sklepamo, da se je AMPK α ob prisotnosti PB res fosforilirala. Detekcija pAMPK α pri vzorcih, pri katerih smo za pripravo celokupnih celičnih lizatov uporabili pufer NP-40, je bila uspešna, vendar je bila intenziteta lis, ki so pripadale negativni kontroli, pozitivni kontroli, celicam tretiranim z 1 mM PB in celicam tretiranim s 5 mM PB, med seboj zelo podobne, zato nismo mogli potrditi, ali se je AMPK α v prisotnosti PB res fosforilirala. Detekcija pAMPK β 1 je bila uspešna ne glede na izbiro pufru za lizo celic, vendar pa v nobenem primeru nismo zaznali bisvenih razlik med količinami aktivirane oblike AMPK β . Glede na to, da je fosforilacija na Thr-172 znotraj katalitične podenote α nujna za aktivacijo AMPK (Kahn in sod., 2005), fosforilacija na serinu 108, znotraj regulatorne podenote β pa je potrebna za aktivacijo celotne AMPK, ni pa nujna (Warden in sod., 2001), smo se zanašali na rezultate, ki smo jih pridobili z detekcijo pAMPK α . Z uporabo protiteles proti nefosforilirani obliki AMPK α in AMPK β 1 smo določili količino celotne AMPK. Detekcija je bila v vseh primerih uspešna.

Pri vzorcih, pri katerih smo uporabili pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om, smo pridobili najbolj optimalne ravni aktivirane oblike AMPK, zato smo v nadaljnjih eksperimentih uporabljali le vzorce, pri katerih smo uporabili pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om. Pufer 1 in pufer 2 za pripravo celičnih lizatov imata enako sestavo, le da je prvi 2-krat bolj koncentriran. Pufer 3 za pripravo celičnih lizatov pa vsebuje blažji detergent, ne vsebuje reducenta (β -merkaptotanol), kar pomeni, da tekom izolacije ne poruši strukture proteinov, ki so povezani z disulfidnimi mostički. Posledično so lahko celični proteini, vključno s proteazami in fosfatazami, kljub prisotnosti NP-40 lahko še vedno aktivni, zato smo vanj dodajali inhibitorje proteaz in fosfataz. Na gel smo torej v vsakem primeru nanašali denaturirane proteine. Pri delu pa lahko tudi pride do napak, ki bi lahko negativno vplivali na končni rezultat: npr. slab prehod proteinov iz žepka v gel, slabega prenosa proteinov, zaradi motečih snovi v pufru, starost lizata v času nanosa na gel (fosforilacija se sčasoma izgublja), itd. Ne glede na to, smo lahko na osnovi naših rezultatov z gotovostjo sklepali, da je pufer 2 optimalen za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om.

4.1.3 Izbira primernega časa tretiranja celic HEK293T s PB

Testirali smo tudi, ali je aktivacija AMPK odvisna od časa tretiranja celic s PB-jem. Pri tem smo celice gojili 1, 6 oz. 24 h v prisotnosti 1 mM in 5 mM PB



Slika 13: Imunološka detekcija pAMPK α in pAMPK β 1 po prenosu western. Izbira primernega časa tretiranja celic HEK293T s PB.

Celice smo gojili v mediju s FBS-jem. Za lizo celic smo uporabili pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om, ki je 1-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE. Po prenosu proteinov z gela PAGE na PVDF membrano smo membrano razrezali na 2 enaka dela, ki sta vsebovala po 8 različnih vzorcev: negativno kontrolo, pozitivno kontrolo (1 μ M oligomycin), 6 vzorcev celic, ki smo jih tretirali z 1 oz. 5 mM PB za 1, 6 ali 24 h pred dodatkom pufru za lizo celic. Za imunološko detekcijo smo uporabili primarna zajčja protitelesa (1:1000), usmerjena proti fosforiliranima oblikama AMPK α in AMPK β 1 (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535 in 4181), ter sekundarna protitelesa usmerjena proti zajčjim protitelesom (1:2000) (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 7074). Metoda je podrobneje opisana pod točko 3.2.7.2.

Iz rezultatov je razvidno, da je bila aktivacija AMPK odvisna od časa tretiranja celic z 1 mM PB ali s 5 mM PB. Detekcija pAMPK α in pAMPK β je bila uspešna. Pri detekciji pAMPK α je bilo zaznati razlike v ravni aktivirane oblike encima, medtem ko pri detekciji pAMPK β teh razlik ni bilo zaznati. Kot smo že prej omenili, je fosforilacija na Thr-172 znotraj katalitične podenote α nujna za aktivacijo AMPK (Kahn in sod., 2005), fosforilacija na serinu 108, znotraj regulatorne podenote β pa je potrebna za aktivacijo celotne AMPK, ni pa nujna (Warden in sod., 2001). Aktivacije podenote β pri celicah tretiranih s PB-jem torej v tem primeru nismo mogli potrditi, pomembno pa je, da smo zaznali pAMPK α . Z uporabo protiteles proti nefosforilirani obliki AMPK α in AMPK β 1 pa smo določili količino celotne AMPK. Intenziteta lis pri detekciji pAMPK α in s tem tudi aktivacija AMPK, je bila najbolj močna pri vzorcih, katerih celice smo 1 h tretirali z 1 mM ali s 5 mM PB, zato smo ju uporabljali v nadaljnjih eksperimentih. Da so bili

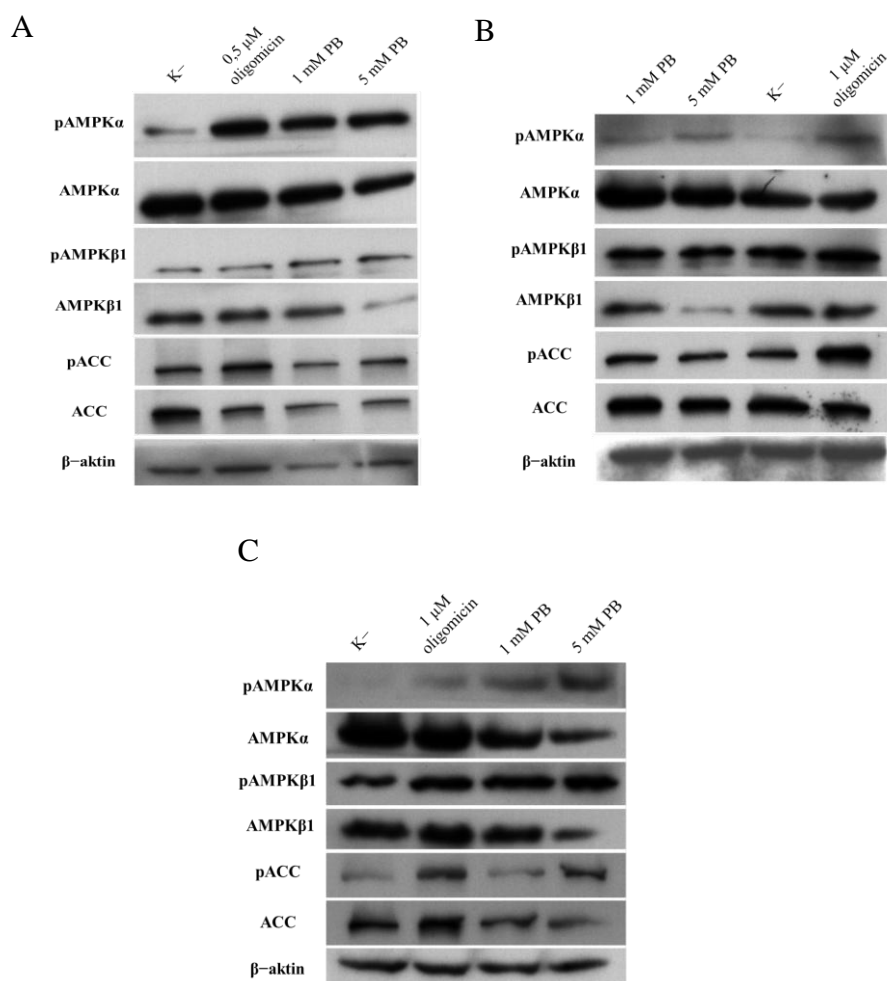
rezultati med seboj primerljivi, smo v nadaljnje kot negativno kontrolo uporabljali vzorce lizatov celic, ki smo jih gojili 1 h v sveže zamenjanem kompletnem mediju.

4.1.4 Kvantifikacija in analiza izražanja AMPK

Po optimizaciji tehnike imunodetekcije fosforilirane in nefosforilirane AMPK po elektroforezni ločbi celičnih proteinov in prenosu western, smo za potrditev rezultatov opravili tri neodvisne ponovitve imunološke detekcije pAMPK α , AMPK α , pAMPK β 1, AMPK β 1, pACC, ACC ter β -aktin-a.

Pri nadaljnih ponovitvah prenosa western in tehnike imunodetekcije smo uporabili vzorce, katerih celice smo pred dodatkom pufra za pripravo celičnih lizatov 1 h tretirali z 1 mM ali s 5 mM PB. Kot negativno kontrolo smo uporabljali vzorce lizatov celic, ki smo jih 1 h gojili v sveže zamenjanem kompletnem mediju. Kot pozitivno kontrolo pa smo uporabili vzorec, kjer smo celice 15 min tretirali z 1 μ M oligomicinom. Metoda je podrobneje opisana pod točko 3.2.7.2.

Rezultate (intenziteto lis, pridobljenih s tehniko imunodetekcije pAMPK α , AMPK α , pAMPK β 1, AMPK β 1, pACC, ACC ter β -aktin-a) smo kvantitativno ovrednotili s pomočjo programa ImageJ.

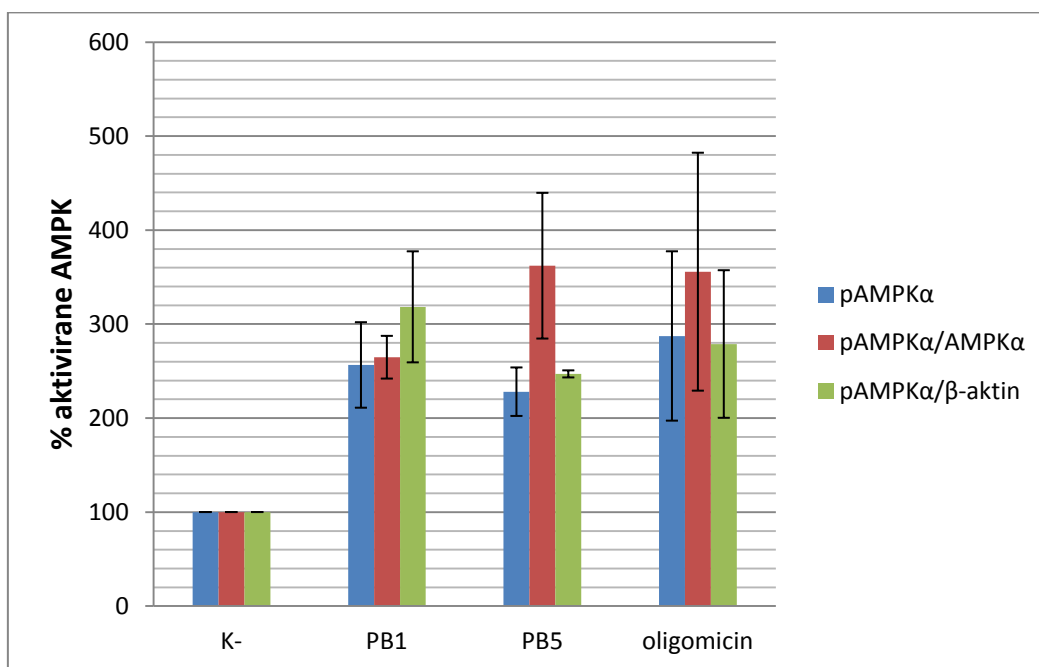


Slika 14: Imunološke detekcije pAMPK α , AMPK α , pAMPK β 1, AMPK β 1, pACC, ACC ter β -aktin-a po prenosu western. Prikazani so rezultati treh neodvisnih ponovitev detekcije, ki smo jih uporabili za kvantifikacijo ravni aktivacije in izražanja navedenih proteinov.

Celice smo gojili v mediju s FBS-jem. Za lizo celic smo uporabili pufer 2 za pripravo celokupnih celičnih lizatov z NaDS-om, ki je 1-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE. Po prenosu proteinov z gela PAGE na PVDF membrano smo membrano razrezali na 4 enake dele, ki so vsebovali po 4 enake vzorce, negativno in pozitivno kontrolo (1 μ M oligomycin), celice tretirane z 1 mM PB in celice tretirane s 5 mM PB. Na tej isti membrani razrezani na 4 enake dele, smo po postopku odstranjevanja protiteles, kot dodaten preizkus aktivacije AMPK in zanesljivosti rezultatov s tehniko imunodetekcije, detektirali tudi pACC (poglavitno tarčo AMPK) in ACC ter prisotnost »hišnega proteina« β -aktin-a. Za imunološko detekcijo smo uporabili primarna zajčja protitelesa (1:1000), usmerjena proti fosforilirani obliki AMPK α in AMPK β 1 ter proti nefosforilirani obliki AMPK α in AMPK β 1 (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 2535, 4181, 2603 in 4150), zajčja protitelesa usmerjena proti fosforilirani obliki ACC in nefosforilirani obliki ACC (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 3661, 3676), ter sekundarna protitelesa usmerjena proti zajčjim protitelesom (1:2000) (Cell Signaling Technology, ZDA, kat. št. 7074). Metoda je podrobneje opisana pod točko 3.2.7.2.

Preglednica 3: Vpliv PB na aktivacijo AMPK α . V preglednici so prikazane povprečne vrednosti detektirane pAMPK α (stolpec 1), ki smo jih normirali na količino celotne AMPK α (stolpec 2) oz. na količino β -aktina (stolpec 3). Intenziteto lis smo ovrednotili s pomočjo programa ImageJ (Navodila za uporabo programa ImageJ, 2009), pri čemer smo raven pAMPK α , AMPK α in β -aktin-a v vzorcih izrazili v odstotkih relativno na raven pAMPK α pri negativni kontroli (K $^-$). Dobljene vrednosti so povprečja treh neodvisnih eksperimentov in so prikazana s standardno napako povprečja (S.E.M).

	pAMPK α (%)	pAMPK α /AMPK α (%)	pAMPK α / β -aktin (%)
K $^-$	100	100	100
PB (1mM)	256 \pm 45	265 \pm 23	318 \pm 59
PB (5 mM)	228 \pm 26	362 \pm 77	247 \pm 4
oligomicin	287 \pm 90	356 \pm 127	279 \pm 79



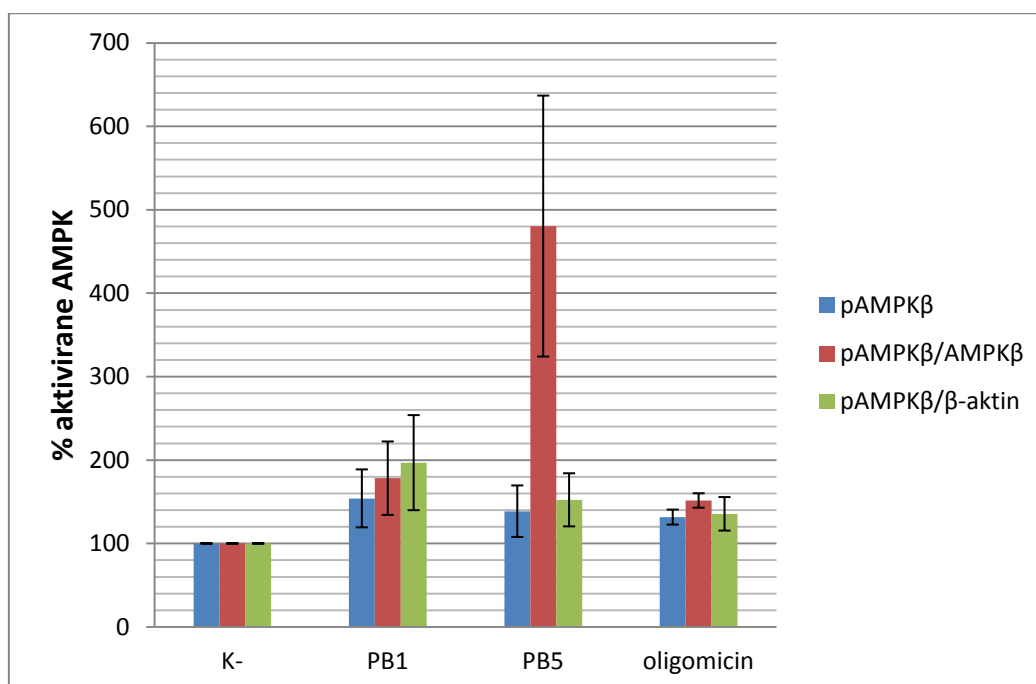
Slika 15: Grafični prikaz vpliva PB na aktivacijo AMPK α .

Vrednosti, prikazane na sliki 15, so povprečja treh neodvisnih eksperimentov detekcije pAMPK α , AMPK α in β -aktin-a (slika 14), normalizirane na negativno kontrolo (K $^-$) ter prikazane s standardno napako povprečja (S.E.M). Stolpiči modre barve prikazujejo količino fosforilirane AMPK α . Stolpiči rdeče barve prikazujejo razmerje med fosforilirano obliko AMPK α in nefosforilirano AMPK α . Stolpiči zelene barve pa prikazujejo razmerje med fosforilirano obliko AMPK α in β -aktinom, ki se v celicah

stalno izraža v enakih količinah. Iz rezultatov (preglednica 3 in slika 15) je razvidno, da je raven aktivacije pAMPK α pri negativni kontroli (K $-$) bistveno nižji v primerjavi s tistim, ki smo ga določili pri vzorcih tretiranih z 1 mM ali s 5 mM PB. Z normalizacijo povprečnih vrednosti intenzitet lis pAMPK α s povprečnimi intenzitetami lis celotne AMPK α oz. β -aktinom smo želeli v končni rezultat uvesti korekcijo glede na morebitna odstopanja zaradi neizbežnih napak pri delu (npr. majhna odstopanja v kvaliteti vzorcev, razlike pri nanosu vzorcev na gel, različna učinkovitost prenosa, spiranja membrane, imunodetekcije ipd.), kot tudi zaradi morebitnih vplivov PB-ja oz. oligomicina na izražanje AMPK (glej sliko 14). V obeh primerih normalizacije se vrednosti pri 1 mM in 5 mM PB nekoliko razlikujejo, vendar v vsakem primeru lahko z gotovostjo trdimo, da pri tretiranju celic HEK293T s PB-jem pride do povišanja ravni pAMPK α . Glede na to, da je fosforilacija na treoninu 172 znotraj katalitične podenote α nujna za aktivacijo celotne AMPK (Kahn in sod., 2005), lahko z veliko verjetnostjo sklepamo, da PB aktivira AMPK v sesalskih celicah.

Preglednica 4: Vpliv PB na aktivacijo AMPK β 1. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti detektirane pAMPK β 1 (stolpec 1), ki smo jih normirali na količino celotne AMPK β 1 (stolpec 2) oz. na količino β -aktina (stolpec 3). Intenziteto lis smo ovrednotili s pomočjo programa ImageJ (Navodila za uporabo programa ImageJ, 2009), pri čemer smo raven pAMPK β , AMPK β in β -aktin-a v vzorcih izrazili v odstotkih relativno na raven pAMPK β pri negativni kontroli (K $-$). Dobljene vrednosti so povprečja treh neodvisnih eksperimentov in so prikazana s standardno napako povprečja (S.E.M).

	pAMPK β 1 (%)	pAMPK β 1/AMPK β 1 (%)	pAMPK β 1/ β -aktin (%)
K $-$	100	100	100
PB (1 mM)	154 \pm 35	178 \pm 44	197 \pm 57
PB (5 mM)	137 \pm 31	480 \pm 156	152 \pm 32
oligomicin	132 \pm 9	151 \pm 9	135 \pm 20



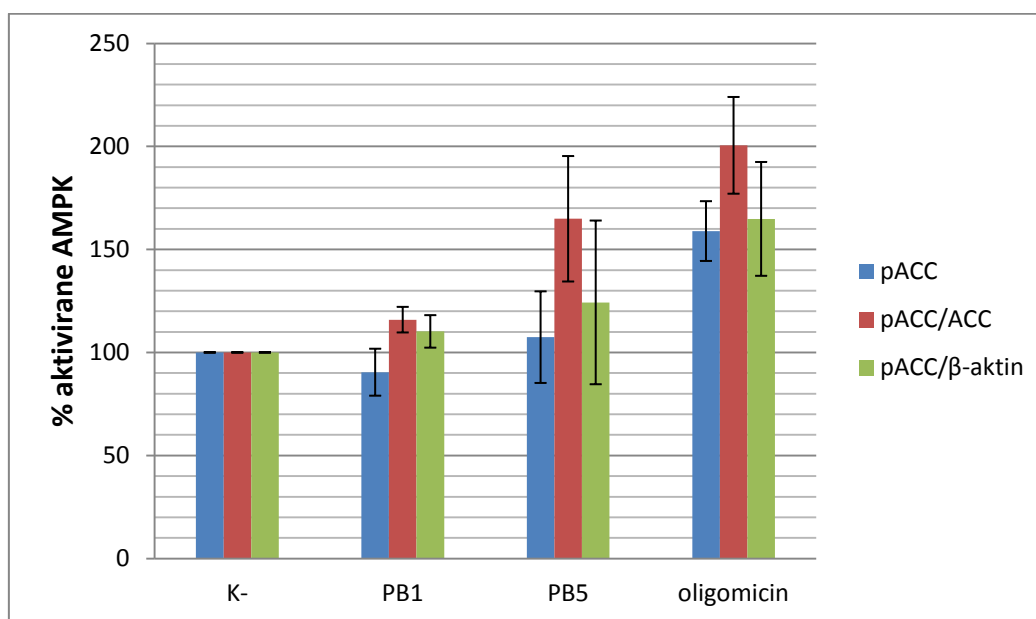
Slika 16: Grafični prikaz vpliva PB na aktivacijo AMPK β 1.

Vrednosti prikazane na sliki 16, so povprečne vrednosti intenzitete lis treh neodvisnih poskusov imunodetekcije pAMPK β 1, AMPK β 1 in β -aktin-a, izračunane v odstotkih relativno na ustrezne intenzitete lis pri negativni kontroli (K $-$). Povprečne vrednosti so prikazane s standardno napako povprečja (S.E.M). Stolpiči modre barve prikazujejo količino fosforilirane AMPK β 1. Stolpiči rdeče barve prikazujejo razmerje med

fosforilirano obliko AMPK β 1 in nefosforilirano AMPK β 1. Stolpiči zelene barve pa prikazujejo razmerje med fosforilirano obliko AMPK β 1 in β -aktinom, katerega količina se v celicah ne spreminja bistveno in nam je zato služil kot kontrola enakomernega nanosa proteinskih vzorcev. Iz rezultatov (preglednica 4 in slika 16) je razvidno, da je raven aktivacije pAMPK β 1 pri negativni kontroli (K $-$) nižji v primerjavi s tistim, ki smo ga določili pri vzorcih tretiranih z 1 mM ali s 5 mM PB. Tudi normalizirane povprečne vrednosti intenzitete lis pAMPK β 1 s povprečnimi intenzitetami lis celotne AMPK β 1 oz. β -aktinom so pri negativni kontroli nižje v primerjavi s tistimi, ki smo jih določili pri vzorcih tretiranih z 1 mM ali s 5 mM PB. Z gotovostjo lahko trdimo, da pri tretiranju celic HEK293T s PB-jem pride do povišanja ravni pAMPK β 1. Glede na to, da fosforilacija na serinu 108 v regulatorni podenoti β prispeva k aktivaciji celotne AMPK (Warden in sod., 2001), na osnovi naših rezultatov predpostavljamo, da mehanizem aktivacije AMPK s PB v sesalskih celicah vključuje tako fosforilacijo treonina 172 v podenoti α , kot tudi fosforilacijo serina 108 v podenoti β .

Preglednica 5: Vpliv PB na inaktivacijo ACC. V preglednici so prikazane povprečne vrednosti detektirane pACC (stolpec 1), ki smo jih normirali na količino celotne ACC (stolpec 2) oz. na količino β -aktina (stolpec 3). Intenziteto lis smo ovrednotili s pomočjo programa ImageJ (Navodila za uporabo programa ImageJ, 2009), pri čemer smo raven pACC, ACC in β -aktin-a v vzorcih izrazili v odstotkih relativno na raven pACC pri negativni kontroli (K-). Dobljene vrednosti so povprečja treh neodvisnih eksperimentov in so prikazana s standardno napako povprečja (S.E.M).

	pACC	pACC/ACC	pACC/ β -aktin
K-	100	100	100
PB (1 mM)	90 ± 11	116 ± 6	110 ± 8
PB (5 mM)	107 ± 22	165 ± 30	124 ± 40
oligomicin	159 ± 15	201 ± 23	165 ± 28



Slika 17: Grafični prikaz vpliva PB na inaktivacijo ACC.

Aktivirana AMPK ustavi anabolične procese, ki niso ključni za preživetje, pri čemer je ena izmed njenih glavnih tarč encim, ki katalizira prvo in odločilno reakcijo pri sintezi maščobnih kislin, acetil-koencim A-karboksilaza (ACC), ki jo AMPK s fosforilacijo inaktivira (Hardie, 2010). Vrednosti prikazane na sliki 17 so povprečja treh neodvisnih eksperimentov detekcije pACC, ACC in β -aktin-a, normalizirane na negativno kontrolo (oligomicin) in so prikazane s standardno napako povprečja (S.E.M). Stolpiči modre barve prikazujejo količino fosforilirane ACC. Stolpiči rdeče barve prikazujejo razmerje med fosforilirano obliko ACC in nefosforilirano ACC. Stolpiči zelene barve pa

prikazujejo razmerje med fosforilirano obliko ACC in β -aktinom. Iz rezultatov (preglednica 5 in slika 17) je razvidno, da je raven aktivacije pACC pri negativni kontroli (K⁻) nekoliko nižji v primerjavi s tistimi, ki smo ga določili pri vzorcih tretiranih z 1 mM ali s 5 mM PB. Tudi normalizirane povprečne vrednosti intenzitete lis pACC s povprečnimi intenzitetami lis celotne ACC oz. β -aktinom so pri negativni kontroli nekoliko nižje v primerjavi s tistimi, ki smo jih določili pri vzorcih tretiranih z 1 mM ali s 5 mM PB. Kljub relativno visokim standardnim napakam povprečij, ki so sicer značilne za robustno metodo imunodetekcije po prenosu western, in majhnim razlikam v ravneh aktivirane ACC med vzorci in negativno kontrolo, rezultati kažejo, da tretiranje celic s PB-jem privede do fosforilacije ACC in s tem njene inaktivacije. Kljub temu pa je raven fosforilirane ACC nižji od pričakovanega. Razlike v intenzitetah lis na sliki 14 kažejo na potrebo po dodatnih poskusih oz. optimizaciji detekcije fosforilacije proteina ACC (čas tretiranja celic, koncentracija PB). Možno je, da je 1-urno tretiranje celic s PB-jem prekratko za fosforilacijo izdatnih količin ACC s strani aktivirane AMPK. Kljub nekoliko negotovi detekciji fosforilirane ACC, ki govori v prid aktivacije AMPK, smo v tem delu nedvomno pokazali aktivacijo AMPK v celicah tretiranih s PB-jem.

5 ZAKLJUČKI

Potrdili smo hipotezo, da 4-fenilbutirat (PB) lahko aktivira encim AMPK v sesalskih celicah. Pokazali smo, da 1-urna inkubacija človeških celic HEK293T v prisotnosti 1 mM in 5 mM PB privede do fosforilacije in s tem aktivacije AMPK. Dokazali smo fosforilacijo na treoninu 172 katalitične podenote α , ki je nujna za aktivacijo celotne AMPK. Dokazali smo fosforilacijo na serinu 108 v regulatorni podenoti β , ki dodatno prispeva k aktivaciji encima AMPK. Poleg tega pa smo pokazali še fosforilacijo poglavitnega substrata aktivirane AMPK, acetil-koencim A-karboksilaze (ACC), in s tem potrdili funkcionalnost fosforilirane AMPK.

Ugotovili smo, da optimalni pogoji za imunodetekcijo fosforiliranih oblik AMPK v celičnih lizatih s PB-jem tretiranih celic HEK293T vključujejo:

- pripravo celičnih lizatov z nanašalnim pufrom za NaDS-PAGE (50 mM Tris (pH 6,8), 2 % (m/v) NaDS, 10 % (v/v) glicerol, 1 % (v/v) β -merkaptotanol, 12,5 mM EDTA (pH 8), barvilo bromfenol modro)
- blokiranje vezavnih mest na membrani PVDF po prenosu western z raztopino 5 % BSA v pufu TBST,
- inkubacija membrane z raztopinama primarnih in sekundarnih protiteles v 2,5 % BSA v pufu TBST.

6 VIRI

6.1 Članki v revijah

Andreassi C., Angelozzi C., Tiziano F.D., Vitali T., De Vincenzi E., Boninsegna A., Villanova M., Bertini E., Pini A., Neri G., Brahe C. 2004. Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *European Journal of Human Genetics*, 12: 59–65

Aygun C., Kocaman O., Senturk O. 2008. Adiponectin: Is it a novel treatment modality to alleviate liver injury in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)? *Medical Hypotheses*, 70 (2): 457–458

Bateman A. 1997. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in Biochemical Sciences*, 22 (1): 12–13

Berg S., Serabe B., Aleksic A., Bomgaars L., McGuffey L., Dauser R., Durfee J., Nuchtern J., Blaney S. 2001. Pharmacokinetics and cerebrospinal fluid penetration of phenylacetate and phenylbutyrate in the nonhuman primate. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 47: 385–90

Bhalla K., List A. 2004. Histone deacetylase inhibitors in myelodysplastic syndrome. *Best Practice and Research, Clinical Haematology*, 17: 595–611

Boyer P.D., Chance B., Ernster L., Mitchell P., Racker E., Slater E.C. 1977. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annual Review of Biochemistry*, 46: 955–1026

Brusilow S.W. 1991. Phenylacetylglutamine may replace urea as a vehicle for waste nitrogen excretion. *Pediatric Research*, 29: 147–50

Carling D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade: a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*, 29 (1): 18–24

Carling D., Thornton C., Woods A., Sanders M.J. 2012. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? *The Biochemical Journal*, 445 (1): 11–27

Chen L., Jiao Z.H., Zheng L.S., Zhang Y.Y., Xie S.T., Wang Z.X., Wu J.W. 2009. Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase. *Nature*, 459 (7250): 1146–1149

Cudkovicz M.E., Andres P.L., Macdonald S.A., Bedlack R.S., Choudry R., Brown R.H. Jr, Zhang H., Schoenfeld D.A., Shefner J., Matson S., Matson W.R., Ferrante R.J. 2009. Phase 2 study of sodium phenylbutyrate in ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 10 (2): 99–106

- Dion P.A., Daoud H., Rouleau G.A. 2009. Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. *Nature Reviews, Genetics*, 10 (11): 769–82
- Dover G.J., Brusilow S.W., Charache S. 1994. Induction of HbF production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood*, 84 (1): 339-343
- Dover G.J., Brusilow S.W., Samid D. 1992. Increased fetal hemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate. *The New England Journal of Medicine*, 327 (8): 569–70
- Feng Z., Zhang H., Levine A.J., Jin S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (23): 8204–8209.
- Ferguson R.E., Carroll H.P., Harris A., Maher E.R., Selby P.J., Banks R.E. 2005. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*, 5 (2): 566–571
- Ferrante R.J., Kubilus J.K., Lee J., Ryu H., Beesen A., Zucker B., Smith K., Kowall N.W., Ratan R.R., Luthi-Carter R., Hersch S.M. 2003. Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *The Journal of Neuroscience*, 23 (28): 9418–9427
- Gallagher E.J., LeRoith D. 2011. Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1243: 54–68
- Hardie D.G., Ross F.A., Hawley S.A. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 13 (4): 251–262
- Hogarth P., Lovrecic L., Krainc D. 2007. Sodium phenylbutyrate in Huntington's disease: a dose-finding study. *Movement Disorders*, 22 (13): 1962–1964
- Hudson E.R., Pan D.A., James J., Lucocq J.M., Hawley S.A., Green K.A., Baba O., Terashima T., Hardie D.G. 2003. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Current Biology*, 13 (10): 861–866
- Iannitti T., Palmieri B. 2011. Clinical and Experimental Applications of Sodium Phenylbutyrate. *Drugs R&D*, 11 (3): 227–249
- Ignoul S., Eggermont J. 2005. CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 289 (6): C1369–C1378
- Jeng Y.Y., Lin N.T., Chang P.H., Huang Y.P., Pang V.F., Liu C.H., Lin C.T. 2007. Retinal ischemic injury rescued by sodium 4-phenylbutyrate in a rat model. *Exp Eye Res*, 84 (3): 486–492

- Kahn B.B., Alquier T., Carling D., Hardie, D.G. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism*, 1: 15–25
- Kang H.L., Benzer S., Min K.T. 2002. Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2, 99: 838–843
- Kasumov T., Brunengraber L.L., Comte B., Puchowicz M.A., Jobbins K., Thomas K., David F., Kinman R., Wehrli S., Dahms W., Kerr D., Nissim I., Brunengraber H. 2004. New secondary metabolites of phenylbutyrate in humans and rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 1, 32: 10–19
- Kazantsev A.G., Thompson L.M. 2008. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 7 (10): 854–868
- Kemp B.E. 2004. Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *The Journal of Clinical Investigation*, 113 (2): 182–184
- Kubota K., Niinuma Y., Kaneko M., Okuma Y., Sugai M., Omura T., Uesugi M., Uehara T., Hosoi T., Nomura Y. 2006. Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *Journal of Neurochemistry*, 97 (5): 1259–1268
- Lawless M.W., O'Byrne K.J., Gray S.G. 2009. Histone deacetylase inhibitors target diabetes via chromatin remodeling or as chemical chaperones? *Current Diabetes Reviews*, 5: 201–209
- Leonard J.V. 2006. Disorders of the urea cycle and related enzymes. 4th rev ed. Berlin: Springer.
- Lin Y.Y., Kiihl S., Suhail Y., Liu S.Y., Chou Y.H., Kuang Z., Lu J.Y., Khor C.N., Lin C.L., Bader J.S., Irizarry R., Boeke J.D. 2012. Functional dissection of lysine deacetylases reveals that HDAC1 and p300 regulate AMPK. *Nature*, 482 (7384): 251–255
- Maestri N.E., Brusilow S.W., Clissold D.B., Bassett S.S. 1996. Longterm treatment of a girl with ornithine transcarbamylase deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 335: 855–859
- Marks P.A., Richon V.M., Rifkind R.A. 2000. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 92: 1210–1216
- Miller R.G., Mitchell J.D., Lyon M., Moore D.H. 2007. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 24 (1): CD001447
- Oakhill J.S., Steel R., Chen Z.P., Scott J.W., Ling N., Tam S., Kemp B.E. 2011. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*, 332 (6036): 1433–1435

- Osborne N.N., Casson R.J., Wood J.P., Chidlow G., Graham M., Melena J. 2004. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23: 91–147
- Ozcan U., Yilmaz E., Ozcan L., Furuhashi M., Vaillancourt E., Smith R.O., Görgün C.Z., Hotamisligil G.S. 2006. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313 (5790): 1137–1140.
- Pang T., Xiong B., Li J.Y., Qiu B.Y., Jin G.Z., Shen J.K., Li J. 2007. Conserved α -helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase α subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (1): 495–506
- Perrine S.P. 2008. Fetal globin stimulant therapies in the betahemoglobinopathies: principles and current potential. *Pediatric Annals*, 37 (5): 339–346
- Phuphanich S., Baker S.D., Grossman S.A., Carson K.A., Gilbert M.R., Fisher J.D., Carducci M.A. 2005. Oral sodium phenylbutyrate in patients with recurrent malignant gliomas: a dose escalation and pharmacologic study. *Neuro-Oncology*, 7: 177–182
- Polekhina G., Gupta A., Michell B.J., van Denderen B., Murthy S., Feil S.C., Jennings I.G., Campbell D.J., Witters L.A., Parker M.W., Kemp B.E., Stapleton D. 2003. AMPK β -subunit targets metabolic stress-sensing to glycogen. *Current Biology*, 13 (10): 867–871
- Praphanphoj V., Boyadjiev S.A., Waber L.J., Brusilow S.W., Geraghty M.T. 2000. Three cases of intravenous sodium benzoate and sodium phenylbutyrate toxicity occurring in the treatment of acute hyperammonaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 23: 129–136
- Qi X., Hosoi T., Okuma Y., Kaneko M., Nomura Y. 2004. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Molecular Pharmacology*, 66 (4): 899–908
- Rahman S.M., Qadri I., Janssen R.C., Friedman J.E. 2009. Fenofibrate and PBA prevent fatty acid-induced loss of adiponectin receptor and pAMPK in human hepatoma cells and in hepatitis C virus-induced steatosis. *Journal of Lipid Research*, 11: 2193–202
- Redonnet-Vernhet I., Rouanet F., Pedespan J.M., Hocke C., Parrot F. 2000. A successful pregnancy in a heterozygote for OTC deficiency treated with sodium phenylbutyrate. *Neurology*, 54: 1008
- Ricobaraza A., Cuadrado-Tejedor M., Pérez-Mediavilla A., Frechilla D., Del Río J., García-Osta A. 2009. Phenylbutyrate ameliorates cognitive deficit and reduces tau pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropsychopharmacology*, 34 (7): 1721–1732. Epub 2009 Jan 14
- Rubenstein R.C., Egan M.E., Zeitlin P.L. 1997. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *The Journal of Clinical Investigation*, 100 (10): 2457–2465

- Ryu H., Smith K., Camelo S.I., Carreras I., Lee J., Iglesias A.H., Dangond F., Cormier K.A., Cudkowicz M.E., Brown R.H. Jr., Ferrante R.J. 2005. Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of antiapoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neurochemistry*, 93: 1087–1098
- Scott J.W., Hawley S.A., Green K.A., Anis M., Stewart G., Scullion G.A., Norman D.G., Hardie D.G. 2004. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *The Journal of Clinical Investigation*, 113 (2): 274–284
- Sheikh M.Y., Choi J., Qadri I., Friedman J. E., Sanyal A. J. 2008 . Hepatitis C virus infection: molecular pathways to metabolic syndrome. *Hepatology*, 47 (6): 2127–2133
- Spira A.I., Carducci M.A. 2003. Differentiation therapy. *Curr Opin Pharmacol*, 3: 338–43
- Svechnikova I., Almqvist P.M., Ekström T.J. 2008. HDAC inhibitors effectively induce cell type-specific differentiation in human glioblastoma cell lines of different origin. *International Journal of Oncology*, 32 (4): 821–827
- Van den Berghe P.V., Stapelbroek J.M., Krieger E., de Bie P., van de Graaf S.F., de Groot R.E., van Beurden E., Spijker E., Houwen R.H., Berger R., Klomp L.W. 2009. Reduced expression of ATP7B affected by Wilson diseasecausing mutations is rescued by pharmacological folding chaperones 4-phenylbutyrate and curcumin. *Hepatology*, 50 (6): 1783–1795
- Van der Velden L.M., Stapelbroek J.M., Krieger E., van den Berghe P.V., Berger R., Verhulst P.M., Holthuis J.C., Houwen R.H., Klomp L.W., van de Graaf S.F. 2010. Folding defects in P-type ATP 8B1 associated with hereditary cholestasis are ameliorated by 4-phenylbutyrate. *Hepatology*, 51 (1): 286–296
- Vilatoba M., Eckstein C., Bilbao G., Smyth C.A., Jenkins S., Thompson J.A., Eckhoff D.E., Contreras J.L. 2005. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis. *Surgery*, 138 (2): 342–351
- Warden S.M., Richardson C., O'Donnell J. Jr., Stapleton D., Kemp B.E., Witters L.A. 2001. Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *The Biochemical Journal*, 354: 275–283
- Webster L.T., Siddiqui U.A., Lucas S.V., Strong J.M., Mieyal J.J. 1976. Identification of separate acyl-CoA:glycine and acyl-CoA:L-glutamine N-acyltransferase activities in mitochondrial fractions from liver of rhesus monkey and man. *The Journal of Biological Chemistry*, 251: 3352–3358
- Wilcken B. 2004. Problems in the management of urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81 Suppl. 1: 86–91
- Wright J.M., Zeitlin P.L., Cebotaru L., Guggino S.E., Guggino W.B. 2004. Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate demonstrates a major influence on heat-

shock proteins treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line. *Physiological Genomics*, 16: 204–211

Xiao B., Sanders M.J., Underwood E., Heath R., Mayer F.V., Carmena D., Jing C., Walker P.A., Eccleston J.F., Haire L.F., Saiu P., Howell S.A., Aasland R., Martin S.R., Carling D., Gamblin S.J. 2011. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, 472 (7342): 230–233

The most complete structure for an AMPK heterotrimer to date. This study also suggests a model for the mechanism by which binding of AMP or ADP inhibits dephosphorylation of Thr172.

Zeitlin P.L., Diener-West M., Rubenstein R.C., Boyle M.P., Carlton K.K., Brass-Ernst L. and L. 2002. Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Molecular Therapy*, 6 (1): 119–126

6.2 Knjige

Stryer L. 2000. Biochemistry. 4. Izdaja. New York, USA, W.H. Freeman and Company: str. 1064

6.3 Elektronski viri

Navodilo za uporabo kompleta protiteles za detekcijo AMPK in ACC (7. julij, 2011), <http://www.cellsignal.com/products/9957.html> (pregledano 11. Marec, 2012)

Navodilo za uporabo oligomicina (13. april, 2010), <http://www.cellsignal.com/products/9996.html> (pregledano 13. april, 2012)

Navodilo za uporabo fosforiliranih protiteles, Abcam, (<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Western%20blotting%20of%20phospho-proteins%20protocol.pdf>) (pregledano 15. april, 2012)

Mini-Protean 3, Bio-Rad, ZDA, <http://www.plant.uoguelph.ca/research/homepages/raizada/Equipment/RaizadaWeb%20Equipment%20PDFs/9B.%20miniprotean3%20cell%20manual.pdf> (pregledano, 20. april, 2012)

Mini Trans-Blot, Bio-Rad, ZDA, <http://www.plant.uoguelph.ca/research/homepages/raizada/Equipment/RaizadaWeb%20Equipment%20PDFs/10B.%20minitransblot%20manual.pdf> (pregledano, 20. april, 2012)

ECL Western blotting protocols, Amersham, ZDA, https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314723116657/litdoc28955347AD_20110830195642.pdf (pregledano, 20. april, 2012)

Program ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html> (pregledano 25. maja, 2012)

Navodila za uporabo programa ImageJ, (13. Avgust, 2009), <http://panic.berkeley.edu/~ghe/GelDoc/UsingImageJ/UsingImageJ.pdf> (pregledano 25. maja, 2012)

Evropsko javno poročilo o oceni zdravila (EPAR) za zdravilo Ammonaps (29. junij, 2006), http://www.emea.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000219/WC500024751.pdf (pregledano 30. maja 2012)

Hardie D.G. 2010. AMP-activated protein kinase: regulating cellular and whole body energy balance, in Cohen, P. (ed.), Protein Phosphorylation: A mechanism for regulating most aspects of cell life. The Biomedical & Life Sciences Collection, Henry Stewart Talks Ltd, London (online at <http://hstalks.com/bio>), http://hstalks.com/lib.php?t=HST116.2653_1_2&c=252 (pregledano 3. September, 2012)

Navodila za prenos western fosforiliranih proteinov, (Abcam) <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Western%20blotting%20of%20phospho-proteins%20protocol.pdf> (pregledano 5. aprila 2012)

Wikipedia. HEK cell http://en.wikipedia.org/wiki/HEK_cell (pregledano 15. maja, 2012)