

Algunos aspectos de la regulación de la síntesis de Mevalonato en células Hep G2 en cultivo*

Polo, Mónica P.^{1,2}; Alaniz, María J. T. de^{1,3}; Bravo, Margarita G. de^{1,2}.

1- Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), UNLP-CONICET

2- Area Cs. Biológicas del Dto. de Introducción a la Medicina.

3- Cátedra de Bioquímica. Facultad de Ciencias Médicas, Calle 60 y 120. (1900) La Plata. Argentina

RESUMEN: Se estudiaron aspectos cinéticos y regulatorios de la hidroximetil-glutaril-coenzima A reductasa, principal enzima reguladora de la síntesis de colesterol, en células derivadas de un hepatoblastoma humano en cultivo. La presencia de suero fetal en el medio de cultivo inhibió la actividad de la reductasa sin modificar los valores de Km y la adición de mevalonato a un medio con suero fetal inhibió aún más a la actividad reductasa. Los resultados nos permiten sugerir que, al igual que en diversas células normales en cultivo, en Hep G2 opera un complejo mecanismo de regulación de la HMG-CoA reductasa en el cual se hallan involucrados esteroides y no-esteroides derivados del mevalonato.

Palabras claves: Hep G2 - Mevalonato- HMGCoA-reductasa - Regulación.

SUMMARY: Some aspects in the regulation of mevalonate synthesis in Hep G2 cells, a human hepatoblastoma in culture. Polo, Mónica P.^{1,2}; Alaniz, María J. T. de^{1,3}; Bravo, Margarita G. de^{1,2}. Kinetics and regulatory aspects of the hydroxymethyl-glutaril-coenzyme A reductase activity were studied. This enzyme catalyzes the rate-limiting step in the cholesterol biosynthetic pathway. Fetal serum inhibited reductase activity, but it did not modify its Km value. The addition of mevalonate to a culture medium with fetal serum increased the inhibition of the reductase. Our results indicate that the regulatory mechanisms in which sterols and non sterol mevalonate derivatives are involved, as in many normal cells in culture, are still present in the Hep G2 cells.

Key words: Hep G2 - HMG CoA reductase - mevalonate - regulation.

Introducción

El colesterol es un componente principal de la membrana de las células animales. Si se bloquea la colesterogénesis en células de mamífero en cultivo el crecimiento celular (1) y la síntesis de ADN (2) disminuyen y las células mueren si no se las suplementa con colesterol y/o alguno de sus precursores como el mevalonato.

El ácido mevalónico es el precursor clave de una vía metabólica cuyos productos finales son el colesterol y una variedad de derivados esteroides y no esteroides. La síntesis de mevalonato a partir de 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A (HMG-CoA) es catalizada por la

HMG-CoA reductasa [EC 1.1.1.34] y constituye el principal paso regulatorio de esta vía (3,4).

Actualmente existen amplias evidencias de que tanto el crecimiento celular como la síntesis de ADN están estrechamente ligados a la vía del mevalonato. Esto se debe fundamentalmente a que este desempeña dos funciones principales en el ciclo celular:

- es precursor del colesterol requerido para la proliferación de membranas que acompaña al crecimiento celular (fundamentalmente durante la fase G₁) y,

- actúa, a través de un mecanismo desconocido, en la iniciación de la replicación del ADN (4-11).

Entre los productos de la vía del mevalonato que pueden ser importantes en la proliferación celular figuran algunas especies de ARNt isoprenilados y proteínas modificadas protraduccionalmente por restos isopreno derivados del mevalonato (12-14).

Correspondencia a:

* Dra. Margarita García de Bravo. INIBIOLP. Facultad de Cs. Médicas, Calles 60 y 120. (1900) La Plata. Tel.: 0221-4236967
FAX: 0221-4258988. e-mail: mgarcia@atlas.med.unlp.edu.ar

Recibido: 22-5-02

Aceptado: 6-8-02

La HMG-CoA reductasa es una de las enzimas conocidas más reguladas. Su actividad está controlada a diversos niveles y por varios mecanismos de regulación feed-back (4). El hígado, que secreta colesterol al torrente sanguíneo, y las células y tejidos que proliferan rápidamente tienen normalmente una importante actividad de HMG-CoA reductasa (10).

En muchas células tumorales, el mecanismo feed-back negativo ejercido por el colesterol exógeno sobre la HMG-CoA reductasa está ausente o profundamente deteriorado (15-18). Se ha demostrado que en algunos casos el defecto en esta regulación feed-back "precede" a la transformación maligna (16). Muchas células neoplásicas, pese a que tienen una elevada actividad HMG-CoA reductasa, obtienen la mayor parte del colesterol que necesitan de las LDL plasmáticas (19) y la presencia de tumores ocasiona frecuentemente una alteración de la composición lipídica del hígado huésped. (20-21).

Por eso es sumamente útil contar con un buen modelo de células en cultivos para estudiar la vía del mevalonato y el metabolismo del colesterol. La línea tumoral Hep G2, que deriva de un hepatoblastoma humano, expresa muchas de las funciones atribuidas a un hepatocito humano normal. Estas células secretan varias proteínas plasmáticas (22) incluyendo lipoproteínas (23-25), expresan diversos receptores, entre ellos los de LDL (26-27) y sintetizan y secretan ácidos biliares (28). En resumen es una línea celular, altamente diferenciada, muy útil como modelo de estudio de las funciones y metabolismo del hepatocito humano normal.

Nuestro objetivo fue estudiar aspectos cinéticos y regulatorios de la HMG-CoA reductasa en esta línea celular a fin de evaluar su utilidad como modelo para encarar estudios sobre el efecto de distintos componentes sintéticos y naturales sobre el crecimiento celular y el metabolismo lipídico, en especial la vía del mevalonato.

Materiales y Métodos

Reactivos. [$^3\text{-}^{14}\text{C}$]HMG-CoA (56.98 mCi/mM) y [^3H] mevalonolactona (33.00 Ci/mmol) fueron adquiridos a la firma DuPont NEN (Boston, MA, USA). Glucosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y HMG-CoA se obtuvieron de la firma Sigma (St. Louis, MO, USA). Para cromatografía en capa fina (TLC) se utilizaron placas de silicagel G marca Merck

(Alemania). Todos los reactivos inorgánicos y los solventes utilizados fueron de calidad pro análisis. El suero fetal estéril fue obtenido de Gen SA (Bs. As., Argentina).

Cultivo de células en monocapa

Las células Hep G2 (American Type Culture Collection Collection, Rockville, MD, USA) utilizadas para estos experimentos se mantuvieron a 37° en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) con suero fetal bovino inactivado (SFB) al 10 % (29) subcultivándolas semanalmente utilizando una dilución 5:1.

Los experimentos se iniciaron sembrando $2,5 \times 10^5$ células en botellas cerradas de vidrio blando de 95 cm² de superficie de pegado (tipo Khole) con 15 mL de medio MEM + 10% de (SFB). En los experimentos en los que fue necesario el uso de medio sin suero, se utilizó el medio libre de suero MEM opción Zn (MEM Zo), (30) Los procedimientos seguidos para la preparación de células Hep G2 permitieron la obtención de poblaciones homogéneas con elevada viabilidad y reproductibilidad de comportamiento metabólico. La estimación de la viabilidad celular se efectuó por medio del test de exclusión de azul tripán (31). Este test rutinariamente indicó que más del 90% de las células se encontraban en condiciones adecuadas de viabilidad.

Homogeneización de suspensiones de células cultivadas en monocapa

Para obtener una suspensión de las células que fueron cultivadas en monocapa se eliminó el medio de cultivo y las células, todavía adheridas a las botellas de cultivo, fueron lavadas tres veces con 10 ml de solución fisiológica helada. Posteriormente las células fueron removidas con una espátula de goma adicionando para ello un volumen conocido de solución fisiológica. La suspensión celular se recogió en tubos, se centrifugó a baja velocidad (1.500 xg, 5 min). Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se congeló en nitrógeno líquido.

Inmediatamente antes de ser utilizado, el pellet de células se resuspendió adicionando 0,4 ml de buffer de resuspensión por miligramo de proteína celular. El dosaje de la proteína celular total (PCT) en suspensiones de células Hep G2 se llevó a cabo utilizando una técnica semejante a la descrita por Patterson (32) aplicando luego la microtécnica de Lowry (33).

La composición del buffer de resuspensión usado fue: buffer fosfato (pH: 7,4) 50 mM; EDTA 1 mM y DTT 5 mM (34).

Utilizando un equipo Heat-Systems Ultrasonic, modelo W-220F (Plainview, New York) equipado con un microtip de la misma marca modelo C2, se sonicó a la suspensión celular 3 veces, durante 10 segundos cada vez, a la mitad de la potencia de salida. Esta operación se llevó a cabo manteniendo el material permanentemente en lecho de hielo.

Ensayo de actividad HMG-CoA reductasa

La determinación de la actividad enzimática se realizó utilizando una modificación de la técnica de Shapiro y col. (35) descrita por Brown y col. (36). Para medir la actividad reductasa total, se tomó una alícuota de células homogeneizadas (100 mg de proteína), se llevó a un volumen de 90 ml con el buffer de resuspensión y se preincubó 30 min a 37°C para permitir la activación de la enzima que pudiese estar inactivada por fosforilación (35). Posteriormente se adicionaron 100 ml de una solución de cofactores conteniendo: buffer fosfato (pH: 7,4) 0,2 M; glucosa-6-P 40 mM; NADP⁺ 5 mM; EDTA sódico 20 mM; DTT 10 mM y glucosa-6-P deshidrogenasa 0,7 UI. El ensayo se inició con la adición de DL-[3-¹⁴C]-HMG-CoA (13.000 cpm/nmol y 3,52 nmol/ml) a una concentración final de 176 mM (para ensayos estándar). El volumen final de la mezcla de incubación fue de 200 ml.

Luego de incubar 30 min a 37°C se detuvo la reacción agregando 25 ml de HCl 6M. Se adicionó [³H]mevalonolactona (50 nCi) como estándar interno, se lactonizó el ácido mevalónico obtenido en la reacción incubando 30 min a 37°C en el medio ácido y se centrifugó 5 min a 8.000 rpm.

La mevalonolactona se separó por TLC sembrando 100 ml del sobrenadante libre de proteínas en placas de vidrio de 20 x 20 cm. con una capa de silicagel G de 0,25 mm. de espesor, activadas durante 45 min a 120°C. La cromatografía se desarrolló utilizando benceno:acetona (1:1, v/v) como fase móvil.

Finalizada la cromatografía las placas se secan al aire y la región correspondiente a mevalonolactona (aprox. R_f 0,5-0,9) fue removida de la placa por raspado de la sílica y se recogió en viales de vidrio conteniendo 10 ml de solución de centelleo dioxano-fluor (5 g de difeniloxazole (PPO) + 100 g de naftaleno/litro de tolueno). La radiactividad fue cuantificada en un contador de centelleo líquido RackBeta

1214 utilizando un programa de detección dual para ³H-¹⁴C. El estándar interno de [³H]mevalonolactona es utilizado para corregir, por recuperación incompleta, el dato hallado en ¹⁴C. La actividad de HMG-CoA reductasa fue expresada en pmoles de mevalonolactona/mg de proteína celular/min.

Tratamiento estadístico de los resultados.

Los resultados experimentales se encuentran expresados como el promedio de al menos 3 determinaciones ± 1 desviación estándar (SD).

Las hipótesis estadísticas se ensayaron mediante el test "t" de Student. Se utilizó un nivel de significación para errores de tipo I de 0,05 a 0,01 (95 a 99 % de confianza). Para aquellas diferencias de medias en las cuales el estadístico t quedó comprendido en el intervalo de confianza impuesto por un valor de $\alpha = 0,01$ (o menor), la decisión se la consideró altamente significativa. Para $\alpha = 0,05$ se la consideró significativa y para valores de $\alpha > 0,05$ no significativa.

Las rectas de calibración de técnicas de uso rutinario se ajustaron mediante el método de cuadrados mínimos. Cada recta se estudió por regresión determinándose coeficientes de correlación lineal.

Resultados

Caracterización de la HMG-CoA reductasa de células Hep G2.

Utilizando una suspensión celular sonicada de pool de células como fuente de enzima se determinó la síntesis de mevalonato en las condiciones standard descritas en Métodos pero adicionando cantidades variables de sustrato o de proteína celular al medio de incubación.

La velocidad de síntesis de mevalonato determinada utilizando distintas concentraciones de sustrato en el medio de incubación se muestra en la Tabla 1.

Cuando la concentración de sustrato ensayada fue 1/4x; 1/2x; x y 2x de la standard (176 mM), se observaron pequeños incrementos en la velocidad de síntesis de mevalonato que acompañan al aumento de la cantidad de HMG-CoA presente sin que exista una relación lineal entre ellos.

Tabla 1. Actividad HMG-CoA reductasa determinada usando distintas concentraciones de sustrato en el medio de incubación.

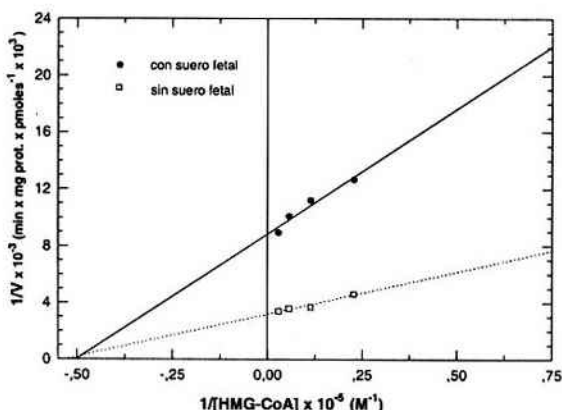
Concentración de HMG-CoA en el medio de incubación (mM)	Actividad HMG-CoA reductasa (pmoles/min/mg prot. celular)	
	Con Suero Fetal	Sin Suero Fetal
44	79,1	226,8
88	89,3	270,9
176	99,3	295,4
352	112,1	312,4

La actividad enzimática fue determinada en células Hep G2 en fase logarítmica de crecimiento incubadas durante las últimas 24 horas en medios con y sin suero fetal. Los análisis fueron realizados por el método standard descrito excepto por los cambios indicados en la concentración de HMG-CoA. Los valores representan promedios de análisis realizados por triplicado (los cuales difieren entre sí menos de 10%) utilizando alícuotas de la suspensión del pool de células homogeneizadas por sonicación conteniendo 100 μg de proteína.

Utilizando los datos de la Tabla 1 y trazando la doble recíproca de Lineweaver-Burk fue posible calcular la constante de Michaelis aparente (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}). Los resultados se muestran en la Figura 1, donde puede observarse que la incubación durante 24 horas en un medio sin suero fetal se traduce en un notable incremento de la velo-

cidad máxima sin modificación en el valor de la constante de Michaelis encontrada ($K_m = 1,99 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $V_{\text{max}} = 113,20$ pmoles por min por mg para la reductasa de células incubadas con suero fetal en el medio y $K_m = 1,88 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $V_{\text{max}} = 314,01$ pmoles por min por mg para células incubadas en medio sin suero fetal).

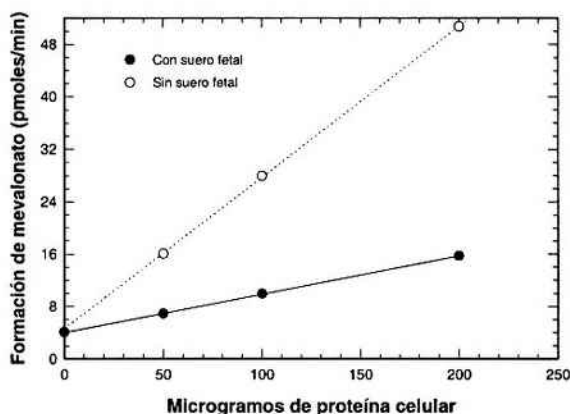
Figura 1. Curva de Lineweaver-Burk para HMG-CoA reductasa de Hep G2. Los datos representan el promedio incubaciones realizadas por triplicado (que difieren entre sí en menos del 10%) con las concentraciones de HMG-CoA indicadas, 100 mg de proteína celular y las restantes condiciones standard descritas en Materiales y Métodos. Las constantes cinéticas calculadas a partir de la curva de Lineweaver-Burk ajustando los datos por análisis de regresión a rectas del tipo $y = b + ax$, son: $K_m = 1,99 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $V = 113,20$ pmoles por min por mg para la reductasa de células incubadas con suero fetal en el medio y $K_m = 1,88 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $V_{\text{max}} = 314,01$ pmoles por min por mg para células incubadas en medio sin suero fetal. El coeficiente de correlación lineal (r^2) fue mayor de 0,95 en ambos casos.



Cuando distintas cantidades de proteína fueron adicionadas al medio de incubación en presencia de una concentración fija de sustrato (176 mM) se observó que la velocidad de síntesis de mevalonato es proporcional a la cantidad de enzima en el rango de proteína celular ensayado aún cuando la suspensión celular homogeneizada utilizada como

fente de enzima fue obtenida de células que presentan una elevada actividad enzimática como las incubadas en ausencia de suero fetal (Fig. 2). Los datos pudieron ajustarse por análisis de regresión a una recta del tipo: $y = b + ax$, donde b corresponde al blanco de reactivos ensayado (de 4,04 pmoles de mevalonato/min) y $r^2 > 0,97$ en ambos casos.

Figura 2. Efecto de la cantidad de proteína sobre la síntesis de mevalonato en células Hep G2 en fase logarítmica de crecimiento. Alícuotas de suspensión de pool de células homogeneizadas por sonicación conteniendo las cantidades indicadas de proteína fueron incubadas y analizadas como se describe en "Materiales y Métodos". Los datos representan el promedio de incubaciones realizadas por triplicado.



Efecto del mevalonato sobre la actividad HMG-CoA reductasa en células Hep G2 incubadas en presencia y ausencia de suero fetal

Se utilizaron células incubadas en medios con y sin suero fetal. A la mitad de las botellas de cada uno de estos grupos se le adicionó mevalonato a una concentración final de 0,5 mM (37) durante las últimas 24 horas de tratamiento. El mevalonato fue obtenido tratando mevalonolactona (Sigma) con NaOH 0,1 M a 56°C durante 15 minutos, neutralizando la solución obtenida con HCl 1N hasta pH 7,4 inmediatamente antes de su adición a las botellas.

Finalizado el tratamiento, las células fueron removidas de las botellas y procesadas para obtener la suspensión celular homogeneizada por sonicación. El ensayo de actividad HMG-CoA reductasa se realizó en las condiciones standard descritas en Métodos utilizando la suspensión celular sonicada como fuente de enzima y haciéndose cada determinación por duplicado.

La adición de mevalonato al medio condicionado tanto en presencia como en ausencia de suero fetal ocasionó una significativa disminución de la actividad HMG-CoA reductasa (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del mevalonato sobre la actividad HMG-CoA reductasa en células Hep G2 cultivadas en monocapa.

Tratamiento	Actividad HMG-CoA reductasa (pmoles/min/mg prot. celular)
Sin Suero:	
Control	274,51 ± 51,20
Mevalonato	105,43 ± 22,18 *
Con Suero:	
Control	111,82 ± 9,93
Mevalonato	36,13 ± 5,70 *

La actividad enzimática fue determinada en células Hep G2 en fase logarítmica de crecimiento incubadas durante las últimas 24 horas en medios con o sin suero fetal y en presencia o ausencia de mevalonato. Los análisis fueron realizados en las condiciones standard descritas en "Materiales y Métodos". Los valores representan promedio ± 1SD de cuatro determinaciones realizadas por duplicado utilizando alícuotas de la suspensión de células homogeneizadas por sonicación conteniendo 100 µg de proteína. Significativamente diferente respecto al control correspondiente: * p < 0,001.

Discusión

La utilización de modelos de células tumorales hepáticas en cultivos es imprescindible para el emprendimiento de estudios de regulación del crecimiento y metabolismo lipídico hepático. Si bien estos modelos pueden presentar algunas diferencias comparados con los cultivos primarios no replicativos de hepatocitos normales (38), estos últimos tienen otras desventajas, como la difícil obtención de fragmentos en buenas condiciones metabólicas, amplias diferencias individuales y corto tiempo de vida lo cual impide estudios de regulación a largo plazo.

La línea tumoral Hep G2 es un hepatoblastoma humano que conserva muchas de las características bioquímicas de las células del parénquima hepático (22,39).

Las Hep G2 mantienen funciones especializadas de hepatocitos normales, incluyendo síntesis de apolipoproteínas y secreción y catabolismo de lipoproteínas (29). Fueron utilizadas con éxito en el estudio del rol regulatorio de lípidos (24,40) y hormonas (25) en la síntesis y secreción de apolipoproteínas y lipoproteínas, y para el estudio de la remoción de varias clases de lipoproteínas mediadas por receptor (26, 27, 41, 42).

La actividad de la HMG-CoA reductasa de células Hep G2, al igual que en células hepáticas norma-

les puede ser regulada a diferentes niveles. Por un lado, inhibidores competitivos de la reductasa pertenecientes a la familia de los "statins" son activos sobre esta línea celular disminuyendo la síntesis de colesterol (43) y ocasionando una inducción de la cantidad total de enzima (44). Por otra parte, los resultados presentados en la Tabla 1 muestran que la presencia de suero fetal (que contiene LDL) en el medio de cultivo inhibe la actividad de la reductasa efecto que se ha reportado en células hepáticas normales en cultivo (45). Esta inhibición de la actividad enzimática parece deberse a una disminución de la cantidad de enzima presente en las células dado que la afinidad por DL-hidroxiacetilglutaril CoA (medida a través de los valores de Km registrados) no se encuentra modificada (Figura 1). Podría deberse a la inhibición feedback por esteroides derivados de la degradación de las LDL absorbidas desde el medio. De modo que, el mecanismo de regulación feedback por esteroides, que opera a nivel de la transcripción del gen de reductasa en células normales (46), parece estar conservado en estas células neoplásicas, a diferencia de lo descrito para otras células tumorales las cuales son resistentes a este tipo de regulación por esteroides (47). Finalmente, se sabe que la administración de ácido mevalónico a animales inhibe la actividad HMG-CoA reductasa (48) y este efecto inhibitorio también fue reportado en células Hep G2

(49). En la Tabla 2 puede verse que la adición de mevalonato 0,5 mM al medio de cultivo inhibe 2,6 veces la actividad HMG-CoA reductasa cuando las células Hep G2 son incubadas en medio sin suero. Esto indicaría que la elevada disponibilidad de mevalonato permite producir esteroides en cantidades suficientes como para inhibir la reductasa por el tradicional mecanismo feedback que opera en la mayoría de las células normales. El hecho de que la adición de mevalonato 0,5 mM al medio con suero, puede inhibir adicionalmente la actividad HMG-CoA reductasa que se halla parcialmente disminuida por la presencia de LDL llevándola a valores próximos a los correspondientes al blanco de reactivos (~ 4 pmoles/min) permite sugerir que, al igual que en diversas células normales en cultivo, en Hep G2 opera un complejo mecanismo de regulación de la HMG-CoA reductasa en el cual se hallan involucrados esteroides y no-esteroides derivados del mevalonato (46, 50).

Conclusión

Por lo expuesto es posible considerar a las células Hep G2 en cultivo como un modelo útil y fidedigno para realizar estudios sobre el efecto que distintos componentes sintéticos y naturales ejercen sobre el crecimiento celular y el metabolismo lipídico, en especial la vía del mevalonato. El origen humano de estas células representa una notable ventaja sobre cualquier otro modelo de células en cultivo.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas), Técnicas) y de la CICBA (Consejo de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires) y la asistencia técnica de la Sra. M. Prinzo.

Bibliografía

1. Brown, M.S. and Goldstein, J.L., 1974. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J. Biol. Chem.* **249**: 7306-7314.

2. Kandutsch, A.A. and Chen, H.W., 1977. Consequences of blocked sterol synthesis in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **252**: 409-415.
3. Brown, M.S. and Goldstein, J.L., 1980. Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* **21**: 505-517.
4. Goldstein, J.L. and Brown, M.S., 1990. Regulation of mevalonate pathway *Nature* **343**: 425-430.
5. Habenicht, A.J.R.; Glomset, J.A. and Ross, R., 1980. Relation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and Swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* **255**: 5134-5140.
6. Larson, R.A.; Chung, J.; Scanzu, A.M. and Yachnin, S., 1982. Neutrophils are required for the DNA synthetic response of human lymphocytes to mevalonic acid: evidence suggesting that a nonsterol product of mevalonate is involved. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 3028-3032.
7. Quesney-Huneus, V.; Galik, H.A.; Siperstein, M.D.; Erickson, S.K.; Spenser, T.A. and Nelson J.A., 1983. The dual role of mevalonate in the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **258**: 378-385.
8. Fairbanks, K.P.; Witte, L.D. and Goodman, D.S., 1984. Relationship to the mevalonate and mitogenesis in human fibroblasts stimulated with platelet derived growth factor. *J. Biol. Chem.* **259**: 1546-1551.
9. Sinesky, M. and Logel, J., 1985. Defective macromolecule biosynthesis and cell-cycle progression in a mammalian cell starved for mevalonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 3257-3261.
10. Siperstein, M.D., 1984. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J. Lipid Res.* **25**: 1462-1468.
11. Wejde, J.; Blegen, H. and Larsson, O., 1992. Requirement for mevalonate in the control of proliferation of human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **12**: 317-324.
12. Faust, J. R.; Brown, M. S. and Goldstein, J. L., 1980. Synthesis of delta²-isopentenyl tRNA from mevalonate in cultured human fibroblast. *J. Biol. Chem.* **255**: 6546-6548.
13. Beytia, E. D. and Porter, J. W., 1976. Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **45**: 113-142.
14. Schmidt, R.A.; Schneider, C. J. and Glomset, J., 1984. Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. *J. Biol. Chem.* **259**: 10175-10180.
15. Siperstein, M.D. and Fagan, V.M., 1964. Deletion of the cholesterol negative feed-back system in liver tumors. *Cancer Res.* **24**: 1108-1115.
16. Siperstein, M.D., 1970. Regulation of cholesterol

- biosynthesis in normal and malignant tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.* **2**: 65-100.
17. Kandutsch, A.A. and Handcock, R.L., 1971. Regulation of the rate of sterol synthesis and the level of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in mouse liver and hepatomas. *Cancer Res.* **31**: 1396-1401.
18. Beirne, O.R. and Watson, J.A., 1976. Comparison of regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in hepatoma cells grown in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 2735-2739.
19. Vitols, S., 1991. Uptake of low-density lipoprotein by malignant cells—possible therapeutic applications. *Cancer Cells* **3**: 488-495.
20. de Antueno, R.J.; Niedfeld, G.; De Tomás, M.E.; Mercuri, O.F. and Quintans, C., 1987. Tumor lipids and liver metabolism in the model human lung carcinoma/nude mice. *Biochem. Int.* **14**: 1097-1103.
21. Polo, M.; Bravo, M. G. de and Carbone, C., 1999. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in liver of athymic mice with or without an implanted human carcinoma. *Comp. Biochem. Physiol. Pt. B* **122**: 433-437.
22. Knowles, B.B.; Howe, C.C. and Aden, D.P., 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**: 497-499.
23. Zannis, V.I.; Breslow, S.L.; San Giacomo, T.R.; Aden, D.P. and Knowles, B.B., 1981. Characterization of the major apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochemistry* **20**: 7089-7096.
24. Rash, J.M.; Rothblat, G.H. and Sparks, C.E., 1981. Lipoprotein apolipoprotein synthesis by human hepatoma cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **666**: 294-298.
25. Tam, S.P.; Archer, T.K. and Deepley, R.G., 1985. Effects of estrogen on apolipoprotein secretion by the human hepatocarcinoma cell line, Hep-G2. *J. Biol. Chem.* **259**: 468-474.
26. Wu, G.Y.; Wu, C.H.; Rififi, V.A. and Stockert, R.J., 1984. Activity and regulation of low density lipoprotein receptors in a human hepatoblastoma cell line. *Hepatology* **4**: 1190-1194.
27. Leichtner, A.M.; Krieger, M. and Schwartz, A.L., 1984. Regulation of low density lipoprotein receptor function in a human hepatoma cell line. *Hepatology* **4**: 897-901.
28. Everson, G.T. and Polakoff, M.A., 1986. Hep-G2: a cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J. Biol. Chem.* **261**: 2197-201.
29. Thrift, R.N.; Forte, T.M.; Cahoon, B.E. and Shore, V.G., 1986. Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J. Lipid Res.* **27**: 236-250.
30. Richter, A.; Sanford, K.K. and Evans, V.J., 1972. Influence of oxygen and culture media on plating efficiency of some mammalian tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**: 1705-1710.
31. Jauregui, H.O.; Hayner, N.T.; Driscoll, J.L.; Williams-Holland, R.; Lipsky, M.H. and Galletti, P.M., 1981. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes freshly isolated cells, cell suspensions and primary monolayer cultures. *In vitro* **17**: 1100-1110.
32. Patterson, M.K. Jr., 1979. Measurement of growth and viability of cells in culture. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, (New York) **58**. 141-152.
33. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 256-275.
34. Cavanee, W.K.; Chen, H.W. and Kanutsch, A.A., 1981. Regulation of cholesterol biosynthesis in nucleated cells. *J. Biol. Chem.* **256**: 2675-2681.
35. Shapiro, D. J.; Nordstrom, J. L.; Mitschelen, J. J.; Rodwell, V. W. and Schimke, R. T., 1974. Micro assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in I-cell fibroblast. *Biochim. Biophys. Acta* **370**: 369-377.
36. Brown, M.; Goldstein, J. and Dietschy, J., 1979. Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. Comparison with the rate of cholesterol synthesis in different physiological states. *J. Biol. Chem.* **254**: 5144-5149.
37. Faibanks, K.P.; Barbu, V.D.; Witte, L.D.; Weinstein, I.B. and Goodman, D.S., 1986. Effects of mevinolin and mevalonate on cell growth in several transformed cell lines. *J. Cell Physiol.* **127**: 216-22.
38. Ellis, E.; Roeb, E. and Marschall, H.U., 2001. Primary cultures of human hepatocytes but not Hep G2 hepatoblastoma cells are suitable for the study of glycosidic conjugation of bile acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1530**:155-161.
39. Schwartz, A.L.; Fridovich, S.E.; Knowles, B.B. and Lodish, H.F., 1981. Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* **256**: 8878-8881.
40. Dashti, N. and Wolfbauer, G., 1987. Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, Hep G2: effects of oleic acid and insulin. *J. Lipid Res.* **28**: 423-436.
41. Havekes, L.; van Hinsbergh, V.; Kempen, H.J. and Emeis, J., 1983. The metabolism in vitro of human low density lipoprotein by the human hepatoma cell line Hep G2. *Biochem. J.* **214**: 951-958.
42. Dashti, N.; Wolfbauer, G.; Koren, E.; Knowles, B. and Alaupovic, P., 1984. Catabolism of human low density lipoproteins by human hepatoma cell line Hep-G2. *Biochim. Biophys. Acta* **794**: 373-384.

43. Cohen, L.H.; Griffioen, M.; Havekes, L.; Schouten, D.; Hinsbergh, V.V. and Kempen, H.J., 1984. Effect of compactin, mevalonate and low density lipoprotein on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and low-density lipoprotein receptor activity in the human hepatoma cell line Hep-G2. *Biochem. J.* **222**: 35-39.
44. Qin, W.; Infante, J.; Wang, S. and Infante, R., 1992. Regulation of HMG-CoA reductase, apoprotein-B and LDL receptor gene expression by the hypocholesterolemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G2, human and rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1127**: 57-66.
45. Goldstein, J.L. and Brown, M.S., 1977. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 897-930.
46. Osborne, T.F.; Gil, G.; Goldstein, J.L. and Brown, M.S., 1988. Operator constitutive mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter abolishes protein binding to sterol regulatory element. *J. Biol. Chem.* **263**: 3380-3387.
47. Bennis, F.; Favre, G.; Le Gaillard, F. and Soula, G., 1993. Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity in the growth of human adenocarcinoma cell line A549. *Int. J. Cancer* **55**: 640-645.
48. Edwards, P.A.; Popjak, G.; Folgelman, A.M. and Edmond, J., 1977. Control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by endogenously synthesized sterols in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **252**: 1057-1063.
49. Boogaard, A.; Griffioen, M. and Cohen, L.H., 1987. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in human hepatoma cell line Hep G2. Effects of inhibitors of cholesterol synthesis on enzyme activity. *Biochem. J.* **241**: 345-351.
50. Nakanishi, M.; Goldstein, J.L. and Brown, M.S., 1988. Multivalent control of HMG-CoA reductase. Mevalonate-derived product inhibits translation of mRNA and accelerates degradation of enzyme. *J. Biol. Chem.* **263**: 8929-8937.