

Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Gizakien melanoma-zelula metastasikoek askaturiko exosomen eragina melanoma-zelula metastasikoen eta ez-metastasikoen oldarkortasunean

Egilea:
Nerea Urrestizala Arenaza
Zuzendaria:
Beatriz Arteta Ruiz
Zuzendarikidea:
César A. Martín Plágaro

© 2020, Nerea Urrestizala Arenaza

Leioan, 2020ko ekainaren 18an

AURKIBIDEA

0. HITZAURREA: COVID-19ren ERAGINA	0
1. SARRERA ETA HELBURUAK	1
2. MATERIALA ETA METODOAK	
2.1. Zelulen hazkuntza	3
2.2. Exosomen isolamendua	3
2.3. Tratamenduak	3
2.4. Bideragarritasunaren azterketa	4
2.5. Migrazioaren azterketa: Zauri-itxiera	4
2.6. Migrazioa <i>FluoroBlok</i> TM intsertuetan.....	5
2.7. Estatistika.....	5
3. EMAITZAK	
3.1. Exosomaz garbituriko BFSaren eragina bideragarritasunean eta migrazioan	5
3.2. A2058 zelulen exosomen eragina A2058 zelulen bideragarritasunean	6
3.3. A2058 zelulen exosomen eragina COLO-800 zelulen bideragarritasunean	7
3.4. A2058 zelulen exosomen eragina MELHO zelulen bideragarritasunean	8
3.5. A2058 zelulen exosomen eragina A2058 zelulen migrazio-gaitasunean	8
3.6. A2058 zelulen exosomen eragina COLO-800 zelulen migrazio-gaitasunean.....	9
3.7. A2058 zelulen exosomen eragina MELHO zelulen migrazio-gaitasunean.....	10
3.8. A2058, COLO-800 eta MELHO zelulen migrazioa <i>FluoroBlok</i> TM intsertuetan	10
4. EZTABAIDA	11
5. ONDORIOAK	14
6. BIBLIOGRAFIA	14

0. HITZAURREA: COVID-19ren ERAGINA

Lanaren prozedura esperimentalak irailean hasi nituen, beraz, martxoan, lanaren atal esperimentala bukatu nuen kasik. Hala ere, helburuetako bat zen teknika baten (*FluoroBlok*TM intsertuak) erabilgarritasuna frogatzea, optimizazioa egitea eta, denbora izatekotan, teknika erabiliz intereseko parametroak aztertzea. Covid-19ren pandemiak, ordea, ez du horretarako aukerarik eman, eta azkenean froga bakarra egin ahal izan dut teknika horrekin. Hala ere, emaitza nahikotxo nituen dagoeneko, beraz, ez dut lanaren ikuspegia aldatu behar izan. Uste dut, beraz, itxialdiak ekarritako zailtasun nagusia komunikazioa izan dela, idazketa-fasean sorturiko zalantza guztiak bide telematikoen bidez konpontzea askoz arazotsuagoa eta motelagoa izan baita.

1. SARRERA ETA HELBURUAK

Zientziaren etengabeko aitzinamenduak zorioneko ondorioak izan ohi ditu pertsonon bizi-kalitatean, eta horren adibidea da azken urteotan minbiziaren intzidentziak jasandako murrizketa. Zoritxarrez, ordea, minbizi mota guztiek ez diote joera orokorrari jarraitu; melanomaren intzidentziak, adibidez, gora egin du mundu mailan. Euskal Autonomia Erkidegoan, 2001-2015 urteen artean, melanomaren intzidentzia hazi egin zen % 1,8 emakumeengan eta % 2,5 gizonezkoengan.¹ Egia da luzatu egin dela melanoma-gaixoen bizi-itxaropena, baina tratamenduen hobekuntzak baino, detekzio goiztiarrerako metodoen garapenak ahalbidetu du hori.²

Melanomak melanozitoetan du jatorria. Melanozitoak zelula pigmentu sortzaileak dira; melanosoma izeneko organulu espezifikoen bidez melanina ekoizten dute, eta ostean keratinozitoei transferitzen diete.³ Keratinozitoetan metaturiko melaninak, larruazalaren eta ilearen kolorea zehazteaz gain, babes-funtzioa du UV erradiazioaren aurrean.⁴ Larruazalean eta ile-folikuluetan egoteaz gain, melanozitoak barne-belarrian, ubean, nerbio-sisteman eta bihotzean ere badaude. Beraz, larruazaleko minbiziaz gainera, hain ohikoak ez diren beste melanoma mota batzuk ere garatu daitezke; adibidez, begitako melanoma.³

Metastasiaren aurretik, 5 urterako biziraupen-probabilitatea % 98 da. Behin metastasia gertatu ostean, ordea, giza-minbizi oldarkorrenetarikoa da melanoma; biziraupen-probabilitatea % 64 da metastasi lokalen kasuan, eta % 23 urruneko metastasietan.² Ahalegin handiak egin dira metastasi kasuetan ere eraginkorrak diren tratamenduak aurkitzeko. Oso ohikoak dira, adibidez, BRAF proteinan oinarrituriko tratamenduak, mutaturik baitago melanoma kasuen % 50an. Tratamendu horiek, ordea, gehienetan ez dute arintze iraunkorrik lortzen, erresistentzia garatu eta metastasia berriz agertzen baita 6-8 hilabeteren buruan.⁵

1889an, “hazia eta lurzorua” teoria proposatu zen, zeinaren arabera 2 osagai ezinbesteko dauden metastasia gerta dadin: tumore-zelula inbaditzaileak (haziak) eta mikroingurune faboragarria (lurzoru emankorra). Alde batetik, mikroinguruneak tumore primarioaren zelulak inbaditzaile bihurtu eta odol-korrontera askatzeko prozesuak faboratu behar ditu; bestetik, itu-ehunak ere mikroingurune harkorra izan behar du metastasia garatu dadin.⁶ Minbiziaren mikroinguruneak hurrengo osagaiak ditu: zelulaz kanpoko matrizea, odol- eta linfa-hodiak, seinale-molekulak eta zelulak (fibroblastoak, immunitate-zelulak...)⁷ Mikroinguruneak tumorearen garapena eta metastasia faboratu ditzan ezinbestekoa da minbizi-zelulen eta mikroingurunea osatzen duten zelulen arteko komunikazioa. Horretarako, kontaktu zuzenaz eta faktore solugarriez gain, minbizi-zelulek komunikazio bide alternatiboa erabiltzen dute: exosomak.⁸

Zelula guztiek mintz-besikulak askatzen dituzte zelulaz kanpoko ingurunera. Mintz plasmatikotik askatzen diren besikulei mikrobosikula deritze; endosoma goiztiarren mintzaren inbaginazioz sortzen direnei, berriz, exosoma. Exosomak endosoma multibesikularretan metatzen dira eta endosoma mintz plasmatikoarekin fusionatzean askatzen dira kanpo-mediora.⁹ Organismoaren fluido askotan aurkitu izan dira exosomak; odola¹⁰, gernua¹¹ eta listua¹², adibidez.

1983an topatu ziren lehen aldiz, arratoien erretikulozitoetan, zelulak dagoeneko behar ez zituen osagaien deuseztapen-lanetan.¹³ 1996an euren garrantzia azaleratu zen immunologiaren esparruan, frogatu baitzen B linfozitoek exosomen bidezko seinaleztapena gauzatzen dutela hartutako immunitate-erantzunean.¹⁴ 2007an,

mRNA eta miRNA molekulak topatu ziren mastozitoek askaturiko exosometan, eta horrek informazio genetikoaren transferentzia horizontalerako aukera berria zabaldu zuen.¹⁵ Gaur egun badakigu exosomek jatorrizko zeluletatik eratorritako proteinak, lipidoak eta azido nukleikoak transferi diezazkieketela itu-zelulei, eta funtzio fisiologiko askotan parte hartzen dutela; immunitatea, estresaren aurreko erantzuna edo zelulen desberdintzapena, adibidez.¹⁶ Hala ere, distira guztiak ez dira urre, eta aztergai dago exosomek tumore-hazkunderaren eta metastasiaren bultzatzaile moduan izan zezaketen funtzioa.

Baldintza ez-patologikoetan, melanozitoak eta keratinozitoak exosoma-sistemaren bidez komunikatzen dira; keratinozitoek melanozitoen melanina-ekoizpena erregulatzen dute exosomen bidez, eta melanozitoek keranozitoen portaera (desberdintzapena eta pigmentazioaren transferentzia, adibidez).¹⁷ Melanomak, ordea, exosomen bidezko komunikazio-sistema hori asaldatzen du. Izan ere, melanoma-zelulek melanozito arruntek baino exosoma kopuru handiagoa ekoizten dute, eta horren ondorioz, melanoma-gaixoek exosoma kontzentrazio handia izan ohi dute plasman. Exosoma horiek, gainera, molekula bereizgarriak izaten dituzte.¹⁸

Proteomika-analisiak azaleratu dute melanoma-zelula metastasikoetatik eratorritako exosometan onkoproteina ezagunak transferitzen direla; hala nola, hazkuntza-faktore epidermikoaren hartzailea (ingelesez, EGFR) edo tirosina-kinasa proteina 2 (PTK2). Proteina horiek migrazio-gaitasuna, baskularizazioa eta immunitate-erantzuna erregulatzen dituzte, guztiak metastasiarekin loturiko prozesuak.¹⁸ 2019. urtean aurrerakuntza garrantzitsuak egin ziren proteina horietako batzuen karakterizazioan. Frogatu zen, adibidez, hezur-metastasia burutu dezaketen melanoma-zelulek hezur-metastasirik gauzaten ez duten melanoma-zelulen migrazioa sustatzen dutela hezurretara, CXCR7 molekularen aberasturiko exosomen bidez.¹⁹ Ikusi zen, bestalde, kartzinoma hepatozelularreko zelulek miR-21 molekuletan aberasturiko exosomak askatzen dituztela, eta exosomek euren buruaren gain eragiten dutela PTEN proteinaren adierazpena isilarazi eta zelula-zatiketa edota migrazioa sustatzeko.²⁰ Era berean, deskribatu zen *TP53* genea mutaturik duten kolon-minbiziko zelula batzuek askaturiko exosomek fibroblastoen proliferazioa sustatzen dutela *TP53*ren adierazpena isilaraziz.²¹

Ikusi da, gainera, tumore-zelula ezberdinetatik isolaturiko exosomek joera dutela, animalia bizietan txertatuz gero, euren jatorrizko ehunetara zuzentzeko. Hau da, exosomak modu espezifikoan zuzentzen zaizkie zelula edo ehun jakinei. Gaitasun hori metastasiarekin ere lotu da; izan ere, minbizi mota bakoitzean metastasi sekundarioak ehun jakin batzuetan garatu ohi dira maiztasun handiagoz. Dirudienez, ituraketaren erantzuleak exosomen gainazaleko integrinak lirateke.¹⁷

Jakinik exosomek tumore-mikroingurune faboragarrien sorreran parte hartzen dutela, exosometan zelula-zatiketaekin eta migrazioarekin loturiko molekulak detektatu izan direla eta minbizian oldarkortasun-maila oso anitzeko zelulak aurki daitezkeela, lanaren helburuak hurrengoak dira:

- 1) A2058 giza melanoma-zelula metastasikoen exosomek A2058 zelulen, COLO-800 melanoma-zelula metastasikoen eta MELHO melanoma-zelula ez-metastasikoen bideragarritasunean duten eragina aztertzea.
- 2) A2058 zelulen exosomek hiru melanoma-zelula horien migrazio-gaitasunean duten eragina aztertzea.
- 3) Etorkizunean exosomek inbasio-gaitasunean duten eragina aztertzeko, zelula-kultiboetarako intsertuen teknika probatu eta, ahal den heinean, optimizatzea.

2. MATERIALA ETA METODOAK

2.1. Zelulen hazkuntza

Lanean giza melanomaren 3 zelula-lerro erabili dira: A2058 (CRL-11147, ATCC®), COLO-800 (ACC193, Innoprot, Derio) eta MELHO (ACC62, Innoprot, Derio). Hazkuntza-inguru osoan hazi dira hirurak: bakoitzaren hazkuntza-inguru espezifikoak % 10 behi-fetu serumean (BFS) (Gibco®-ThermoFisher Scientific, AEB), penizilina eta estreptomizina antibiotikoak (100 unitate/mL eta 100 µg/mL, hurrenez hurren) (Gibco®-TF Scientific, AEB) eta anfoterizina B antimikotikoa (0,25 µg/mL) (Gibco®-TF Scientific, AEB). A2058 zelulen kasuan “Dulbeccok aldaturiko Eagleren hazkuntza-ingurua” (ingelesez *Dulbecco's Modified Eagles's Medium*, DMEM) erabili da, eta besteen kasuan, “Roswell Park Institutu Memoriala-1640 hazkuntza-ingurua” (ingelesez *Roswell Park Memorial Institute*, RPMI), biak Gibco®-TF Scientific konpainiarenak. Zelula guztiak 37 °C-tan eta % 5 CO₂ atmosferan inkubatu dira. Zelulek kultibo-flaskoaren % 80-90 estali dutenean, garbitu egin dira 4 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Alemania) den 1x gatz-indargetzaile fosfatodunarekin (ingelesez *phosphate buffered saline*, PBS), eta % 0,05 Tripsina-EDTA soluzioan (Gibco®-TF Scientific, AEB) inkubatu dira, zelulak flaskoaren gainazaletik altxatzeko. Inkubatu eta gero BFS gehitu da tripsina neutralizatzen. Segidan zelulak 5 minutuz zentrifugatu dira 220 g-tan.

2.2. Exosomen isolamendua

A2059 zelulak 8 T175 flaskotan erein dira DMEM hazkuntza-inguru osoan eta 4 egunez inkubatu dira, zelulek flaskoaren gainazalaren % 90 estali arte. Bigarren egunean hazkuntza-ingurua ordezkatu da, berriz ere DMEM osoarekin, baina oraingoan serumaren berezko exosomez garbituriko BFS erabiliz. Laugarren egunean hazkuntza-ingurua bildu eta 10 minutuz zentrifugatu da, 2000 g-tan eta 4 °C-tan. Gainjalkina iragazi egin da 0,22 µm-ko porodun iragazkietan zehar. Iragazitako bolumena zentrifugatu egin da 100 kDa-eko *Amicon® Ultra-15* iragazkietan (Merk Millipore, Alemania), 4000 g-tan eta 4 °C-tan. Zentrifugazioa errepikatu egin da iragazkia zeharkatu ezin duen bolumena 15 mL-ra murrizteko behar bezain beste aldiz, hori baita ultrazentrifugak onartzen duen bolumen maximoa. Behin lortutakoan, bolumena bi aldiz ultrazentrifugatu da 70 minutuz, 100.000 g-tan eta 4 °C-tan. Ultrazentrifugazioa bien artean gainjalkina baztertu egin da eta jalkina 1x PBS 15 mL-tan berreseki da. Bigarren ultrazentrifugazioan lorturiko jalkina 1x PBS 100-150 µL-tan berreseki da, *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (TF Scientific, AEB) bidez kuantifikatu da eta -80 °C-tan gorde da erabili arte.

2.3. Tratamenduak

Aldez aurretik kultibo-baldintzak optimizatu dira hazkuntza-inguruari, hasierako zelula kopuruari eta BFS kontzentrazioari dagokionez. **Bideragarritasuna:** 25.000 zelula/mL erein dira 96 putzuko plaketan, eta hurrengo baldintzetan inkubatu dira: 1) % 0 BFS, % 1 eta % 5 BFS arrunta, % 1 eta % 5 exosomez garbituriko BFS, kasu guztietan hazkuntza-inguru espezifikoan. Bideragarritasuna 24 orduko tarteetan neurtu da, 6 egunez. 2) 0 % BFS, % 1 BFS, 0 % BFS + 50 µg/mL exosoma eta 1 % BFS + 50 µg/mL exosoma (kasu guztietan exosomez garbituriko BFS eta hazkuntza-inguru espezifikoak). Bideragarritasuna 48, 72 eta 96 ordura neurtu da. **Migrazioa:** 400.000 zelula/mL erein dira 96 putzuko plaketan, eta hurrengo baldintzetan inkubatu dira: 1)

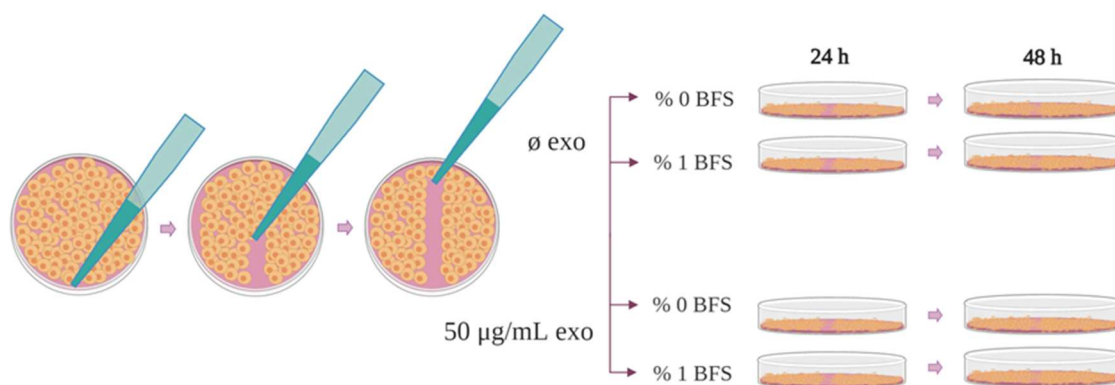
% 0 BFS, % 1 eta % 5 BFS arrunta, % 1 eta % 5 exosomez garbituriko BFS, kasu guztietan hazkuntza-inguru espezifikoa. Neurketak 24 eta 48 ordura egin dira. 2) 0 % BFS, % 1 BFS, 0 % BFS + 50 µg/mL exosoma eta 1 % BFS + 50 µg/mL exosoma (kasu guztietan, berezko exosomez garbituriko BFS eta hazkuntza-inguru espezifikoa). Neurketak 24 eta 48 ordura egin dira.

2.4. Bideragarritasunaren azterketa

*Presto Blue*TM (InvitrogenTM-TF Scientific, AEB) soluzioa erabili da kultiboen bideragarritasuna aztertzeko. *Presto Blue*TM erreaktiboak erresazurina du osagai nagusia eta zelulen erredukzio-gaitasunean oinarritzen da. Soluzioa zeluletan sartzen da eta bertan, zelulen erreduktasa-aktibitatearen arabera erresazurina erresofurinara erreduzitzen da eta kolorez aldatu egiten da. Kolore aldaketa hori absorbantzia edo fluoreszentsia neurtuz detekta daiteke, eta zelulen jardura metabolikoaren adierazlea da.²² Tratamendu bakoitzari dagokion inkubazio-epaia igarotakoan, hazkuntza-inguru espezifikoa 1:10 diluituriko *Presto Blue*TM soluzioarekin ordezkatu da zelula mota bakoitzari zegokion ingurua. Bi orduren buruan erresazurinarene erredukzioa neurtu da neurketa fotometriko bikoitza eginez, 570 nm-tan eta 620 nm-tan. Horretarako *Labsystems Multiskan Ascent* (TF Scientific, AEB) mikroplaka-irakurlea erabili da.

2.5. Migrazioaren azterketa: Zauri-itxiera

Zauri-itxiera (ingelesez, *wound healing*) izeneko teknika erabili da migrazioa aztertzeko. 96 putzuko plakari I motako kolagenoaren (Gibco[®]-TF Scientific, AEB) % 1eko soluzioa gehitu zaio zelula bakoitzaren hazkuntza-inguru espezifikoa. Ordu erdiren buruan kolagenoa bildu eta zelulak gehitu dira. Zelulak erabat itsatsi direnean, hazkuntza-ingurua baztertu eta C mitomizina (Fisher ScientificTM, TF Scientific, AEB) soluzioaren 100 µL gehitu dira. Mitomizina C alkaloido aziridinikoen taldeko antibiotikoa da, eta zelula-zikloa eteten du, zatiketa oztopatuz. Zelula mota guztiek ez dute sentikortasun bera mitomizinarekiko, beraz, alde aurretik bideragarritasun-saioak egin dira determinatzeko zein den kasu bakoitzean zelulak hil gabe horien zatiketa hobekien inhibitzen duen kontzentrazioa: 1 µg/mL COLO-800 zelulentzat eta 2 µg/mL A2058 eta MELHO zelulentzat.



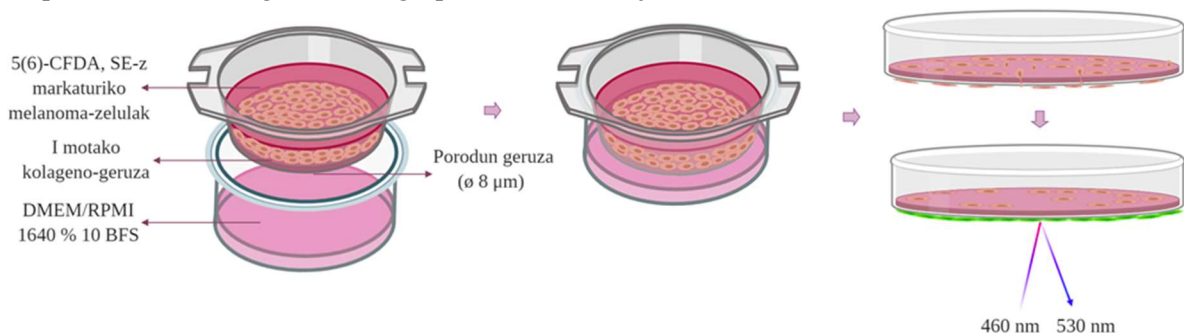
1. Irudia. “Zauri-itxiera” teknikaren eskema.

Bi orduraz inkubatu ostean soluzioa kendu eta mikropipeta-puntak erabiliz “zauria” egin da bertikalean. Jarraian garbiketak egin dira altxaturiko zelulak deuseztatzeko, eta 100 µL hazkuntza-inguru oso gehitu dira argazkiak egin bitartean egonkortasuna mantentzeko. Segidan $t = 0$ h argazkiak hartu dira fase-contraste mikroskopia

erabiliz 4x handipenarekin. Bukatzean, tratamenduak gehitu dira (Ikus. 1. Irudia). 24 eta 48 orduren buruan argazkiak errepikatu dira eta migraturiko azalera *Image J* programaren *MRI Wound Healing Tool* luzapenaren bidez neurtu da. Programaren parametroak argazki bakoitzaren eskakizunen arabera doitu dira, baina, oro har, hurrengoak izan dira: *Method = Variances*, *Variance filter radius = 10*, *Threshold = 50*, *Radius open = 4* eta *Min. Size = 10000*.

2.6. Migrazioa FluoroBlok™ intsertuetan

Hasteko, % 1 I motako kolagenodun hazkuntza-ingurua gehitu da 30 minutuz: 600 µL putzuan (2. Irudiko lehen marrazkian, behekoa) eta 200 µL 8 µm BD Falcon™ FluoroBlok™ Insert Systems intsertuen ganberan (lehen marrazkian, goikoa). Zelulei 5 µl 5(6)-CFDA, SE (5 µg/mL) (Invitrogen™, TF Scientific, AEB) tindatzaile fluoreszente gehitu zaie eta 20 minutuz inkubatu dira, 37 °C-tan eta % 5 CO₂ atmosferan. Ostein 220 g-tan zentrifugatu dira 5 minutuz, eta 100.000 zelula/mL kontzentrazioa eraman dira euren hazkuntza-inguru espezifikoan. Putzuaren hondoko kolageno-soluzioa hazkuntza-inguru osoaren 500 µL-rekin ordezkatu da. Intsertuaren ganberako kolageno-soluzioa ere baztertu eta 100 µL zelula-esekidura gehitu dira. 2 kontrol egin dira: 1) Zundarik gabeko zelulen 100 µL, zelulen autofluoreszentzia zuzentzeko eta 2) hazkuntza-inguru soila, fenol gorriaren seinalea zuzentzeko. Fluoreszentzia *Fluoroskan Ascent*® (TF Scientific, AEB) fluorimetroan neurtu da, konpainia bereko Thermo Scientific™ Ascent™ Software programa erabiliz. Kitzikapena 460 nm-tan egin da, eta igorpena 530 nm-tan jaso.



2. Irudia. FluoroBlok™ Insert Systems intsertuekin egindako saioan jarraituriko prozeduraren eskema.

2.7. Estatistika

Kasu guztietan aldagaien arteko 2 isatseko t Student proba egin da, lagin biei bariantza bera onartuz. Ezberdintasunen adierazgarritasun estatistikoa hurrengo irizpideei jarraituz irudikatu da: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,005$. Barra-grafikoen kasuan, desbiderapen estandarra errore-barraren bidez irudikatu da. Bideragarritasunaren azterketan, zutabe-grafikoak egiteko balioak estandarizatu egin dira \emptyset exo % 0 BFS laginarekiko, eta sakabanatze-grafikoak egiteko balioak \emptyset exo % 0 BFS laginaren $t = 24$ h balioarekin.

3. EMAITZAK

3.1. Exosomaz garbituriko BFSaren eragina giza melanoma-zelulen bideragarritasunean eta migrazioan

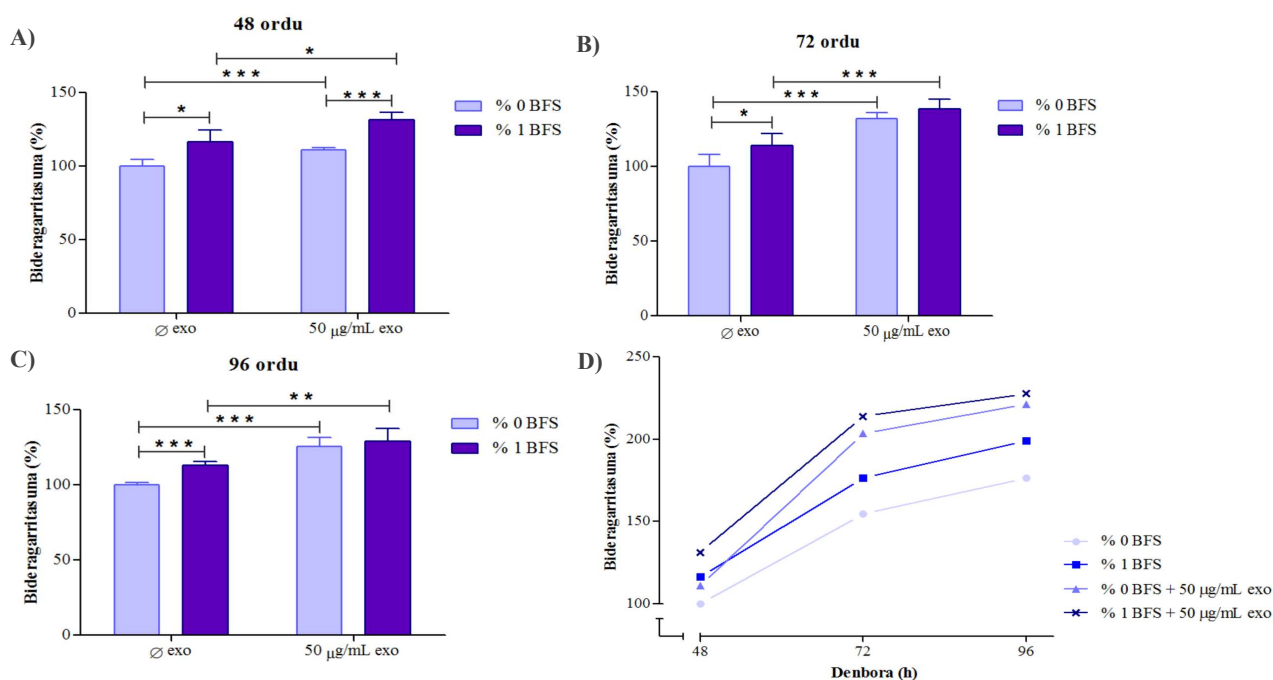
BFSak zelulen hazkunderako ezinbestekoak diren mantengai eta hazkuntza-faktore guztiak ditu. Konposaketa, ordea, zehaztugabea da, eta animaliaren odolean garraiatzen diren exosomak ere baditu. Minbizi-zelulek askaturiko exosomen eragina aztertzeko, ezinbestekoa da lagin guztietan bestelako

exosomarik gabeko seruma erabiltzea. Izan ere, deskribatu izan da birika-minbizitik eratorritako A549 zelulen kasuan BFS arruntak dituen zelulaz kanpoko besikulek migrazioa sustatu dezaketela.²³ Exosomaz garbituriko seruma erabiltzeko, ordea, aurretiaz frogatu behar da horrek ez duela zelulen portaeran eragiten. Horretarako zelulen bideragarritasuna eta migrazioa aztertu dira laginak BFS arruntaren eta serumaren berezko exosomez garbituriko BFSaren kontzentrazio ezberdinekin inkubatu ostean.

Bideragarritasunari dagokionez, 96 ordura ez da ezberdintasun adierazgarririk antzeman BFS arruntaren eta exosomaz garbituriko BFSaren artean, ez % 1 ez % 5eko proportzioan. Hortik aurrera, ordea, % 1 BFS arruntarekin hazitako zelulen bideragarritasuna nabarmen handiagoa da (datuak ez dira azaltzen). Ondorioztatu da, beraz, hasierako zelula-kontzentrazioa 25.000 zelula/mL izanik, minbizi-zelulen exosomen eragina aztertzeko saioak 96 orduz luzatu daitezkeela gehienez. Migrazioaren azterketaren emaitzek, bestalde, ez dute ezberdintasun estatistikoki adierazgarririk erakutsi BFS mota bien artean (datuak ez dira azaltzen).

3.2. A2058 zelulen exosomen eragina A2058 zelulen bideragarritasunean

Aztertzeko A2058 zelulek askaturiko exosomek zelula-lerro bereko zelulen bideragarritasunean nola eragiten duten, A2058 zelulak inkubatu dira exosomen presentzian eta horien gabezia, bai % 0 BFS bai % 1 BFS baldintzetan, eta bideragarritasunaren neurketak egin dira 48, 72 eta 96 ordura.



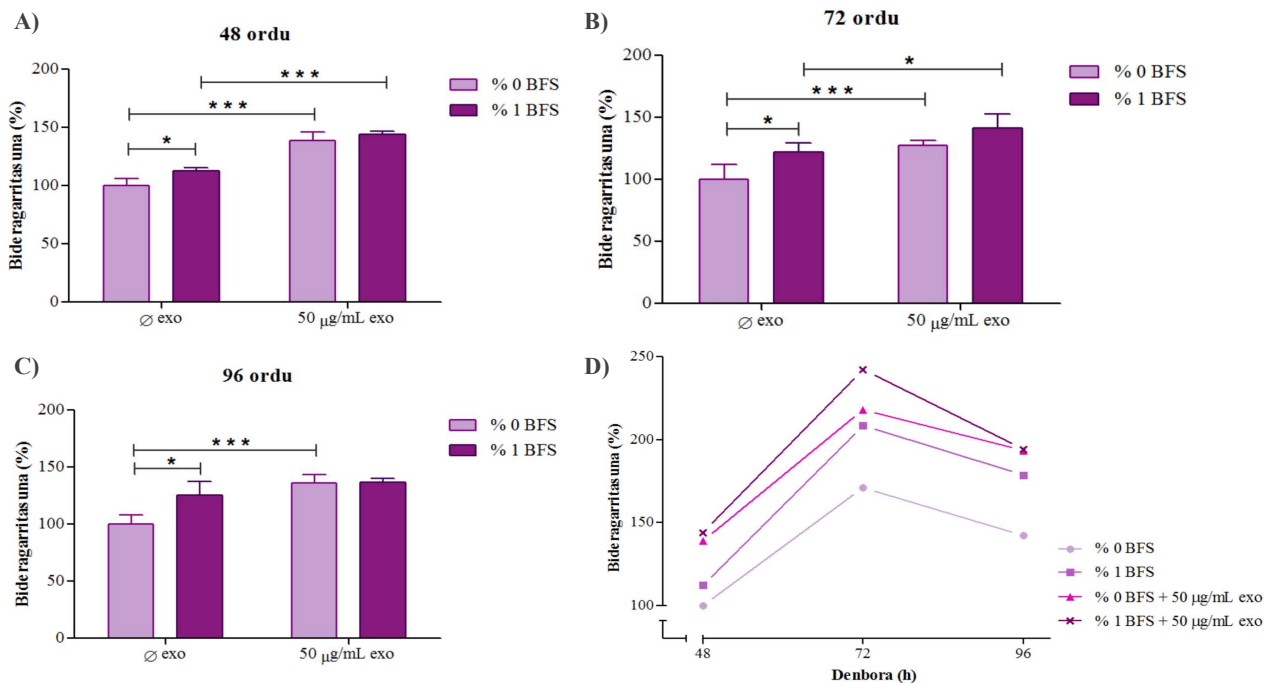
3. Irudia. A2058 melanoma-zeluletatik eratorritako exosomen eragina A2058 zelulen bideragarritasunean.

A) Tratamenduak gehitu eta 48 ordura eginiko neurketa. B) 72 ordura eginiko neurketa. C) 96 ordura eginiko neurketa. D) Tratamendu bakoitzarekin lorturiko bideragarritasunaren aldaketak denboraren funtzioan.

Emaitzek erakusten dute exosomek A2058 zelulen bideragarritasuna handitzen dutela denbora-tarte guztietara, bai % 0 BFS eta bai % 1 BFS laginetan. Hala ere, oro har, esangura estatistikoa handiagoa da % 0 BFS laginen kasuan. Hazkundearen erritmoa murriztu bada ere, bideragarritasunaren joera gorakorra mantendu egin da 96 orduraino. Exosomarik gabeko kultiboetan % 1 BFS laginen bideragarritasuna handiagoa da % 0 BFS laginena baino, eta ezberdintasuna areagotu egiten da 96 ordura. Exosomadun kultiboetan ere % 1 BFS laginen bideragarritasuna handiagoa da hasieran, baina denborarekin ezberdintasuna desagertu egiten da.

3.3. A2058 zelulen exosomen eragina COLO-800 zelulen bideragarritasunean

A2058 zelulek askaturiko exosomek oldarkortasun-maila txikiagoko COLO-800 zelula metastasikoen bideragarritasunean eragiten duten aztertzeko, COLO-800 zelulak inkubatu dira exosomen presentzian eta horien gabezia, bai % 0 BFS bai % 1 BFS baldintzetan, eta bideragarritasuna neurtu da 48, 72 eta 96 ordura.



4. Irudia. A2058 melanoma-zeluletatik eratorritako exosomen eragina COLO-800 zelulen bideragarritasunean.

A) Tratamenduak gehitu eta 48 ordura eginiko neurketa. **B)** 72 ordura eginiko neurketa. **C)** 96 ordura eginiko neurketa. **D)** Tratamendu bakoitzarekin lorturiko bideragarritasunaren aldaketak denboraren funtzioan..

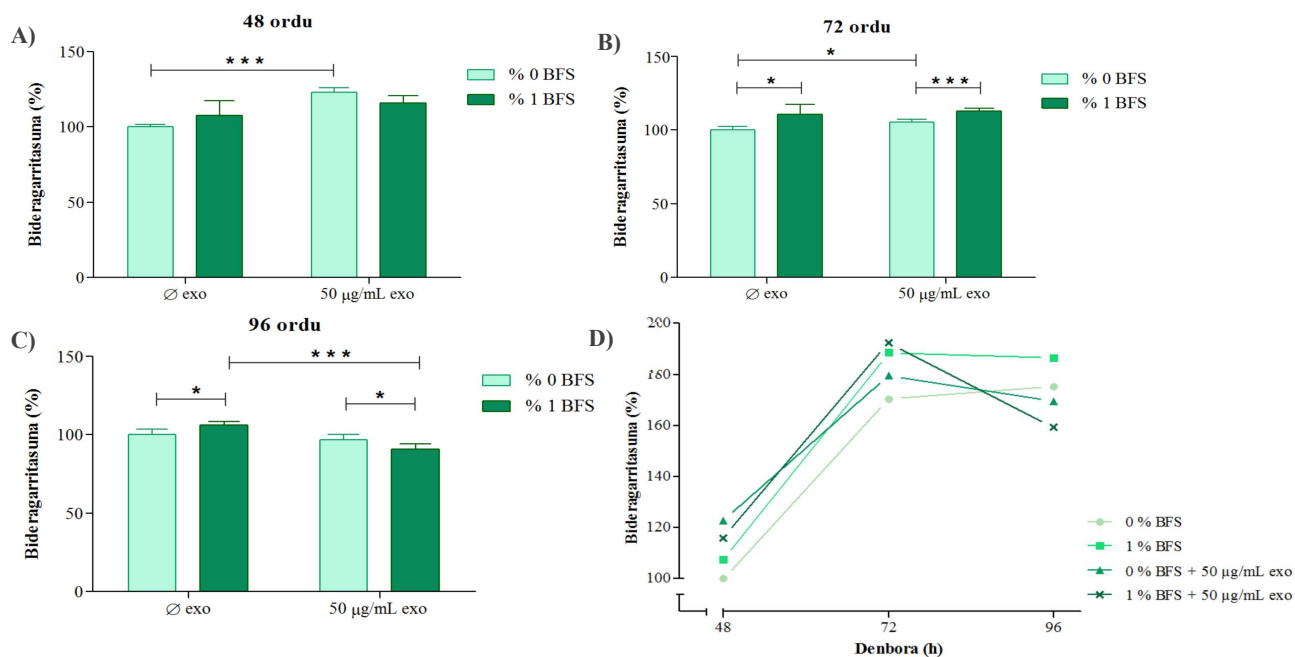
A2058 melanoma-zelula metastasikoen exosomek COLO-800 zelulen bideragarritasuna handitu dute 48 eta 72 ordura, bai % 1 BFS bai % 0 BFS laginetan. 96 ordura, ordea, bideragarritasunaren sustapena % 0 BFS laginetan baino ez da mantendu.

48 ordura exosomadun laginen bideragarritasunaren hazkundera nabarmen handiagoa da exosomarik gabeko laginena baino. D) grafikoan ikus daitekeen moduan, ordea, 48-72 orduen bitartean % 1 BFS lagin bien malda oso antzekoa da, % 0 BFS laginena baino askoz handiagoa, eta exosomarik gabeko % 1 BFS laginaren bideragarritasun-ehunekoak exosomadun % 0 BFS laginarena berdindu du kasik. Barra-grafikoetan ere berdina ikus daiteke: hasiera batean (48 h), exosomadun laginen bideragarritasuna exosomarik gabekoena baino handiagoa da % 1 BFS laginetan, ezberdintasuna estatistikoki oso esanguratsua izanik, gainera. Denborak aurrera egin ahala, ordea, ezberdintasuna asko murriztu da. % 0 BFS laginetan, ordea, exosomadun laginen nagusitasuna mantendu egin da uneoro.

96 ordura, bestalde, bideragarritasuna nabarmen murriztu da kasu guztietan. Murrizketa hori bereziki handia izan da exosomadun % 1 BFS laginen kasuan; hain zuzen ere, bideragarritasunaren hazkunderik handiena izan duten laginak.

3.4. A2058 zelulen exosomen eragina MELHO zelulen bideragarritasunean

A2058 zelulek askaturiko exosomek tumore primario batetik eratorritako MELHO zelulen bideragarritasunean eragiten duten aztertzeko, MELHO zelulak inkubatu dira exosomen presentzian eta horien gabezian, bai % 0 BFS bai % 1 BFS baldintzetan, eta bideragarritasunaren neurketak egin dira 48, 72 eta 96 ordura.



5. Irudia. A2058 melanoma-zeluletatik eratorritako exosomen eragina MELHO zelulen bideragarritasunean.

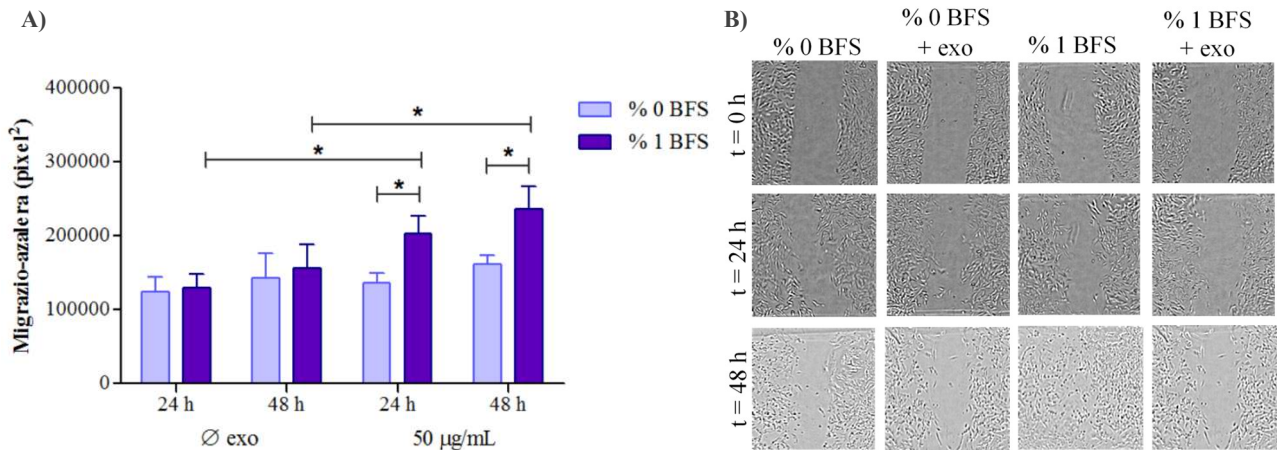
A) Tratamenduak gehitu eta 48 ordura eginiko neurketa. B) 72 ordura eginiko neurketa. C) 96 ordura eginiko neurketa. D) Tratamendu bakoitzarekin lorturiko bideragarritasunaren aldaketak denboraren funtzioan..

A2058 zelulen exosomek bideragarritasunaren handipena eragin dute soilik MELHO zelulen % 0 BFS laginetan. Gainera, ezberdintasunaren esangura estatistikoak behera egin du denborak aurrera egin ahala, desagertu arte. 72 ordura, bestalde, bai exosomadun laginetan bai exosomarik gabekoetan, % 1 BFS laginen bideragarritasuna handiagoa da, ezberdintasuna esanguratsua izanik. 96 ordura, ordea, bideragarritasunaren murrizketa antzeman da kasu guztietan, exosomarik gabeko % 0 BFS laginetan izan ezik, zeintzuetan bideragarritasunaren hazkundeak aurrera jarraitzen duen.

Exosomarik gabeko % 1 BFS laginak pairatu duen bideragarritasunaren murrizketa txikia izan da; beraz, oraindik ere mantendu egin da % 0 BFS eta % 1 BFS laginen arteko ezberdintasun estatistikoki esanguratsua, % 1 BFS laginaren bideragarritasuna handiagoa izanik. Bideragarritasunaren murrizketa bereziki handia izan da exosomadun % 1 BFS laginean; hain zuzen ere, 72 ordura bideragarritasun-ehunekorik handiena zuen lagina. Hain izan da handia bideragarritasunaren galera, non ezberdintasun adierazgarriak agertu diren exosomarik gabeko % 1 BFS laginarekin, horren bideragarritasuna handiagoa izanik esangura estatistiko handiarekin. Era berean, exosomadun % 0 BFS laginaren bideragarritasunak % 1 BFS laginarena gainditu du.

3.5. A2058 zelulen exosomen eragina A2058 zelulen migrazio-gaitasunean

Aztertzeko A2058 zelulek askaturiko exosomek zelula-lerro bereko zelulen migrazioan eragiten duten, A2058 zelulak inkubatu dira exosomen presentzian eta horien gabezian, bai % 0 BFS bai % 1 BFS baldintzetan, eta migrazio-azaleraren neurketak egin dira 24 eta 48 ordura.



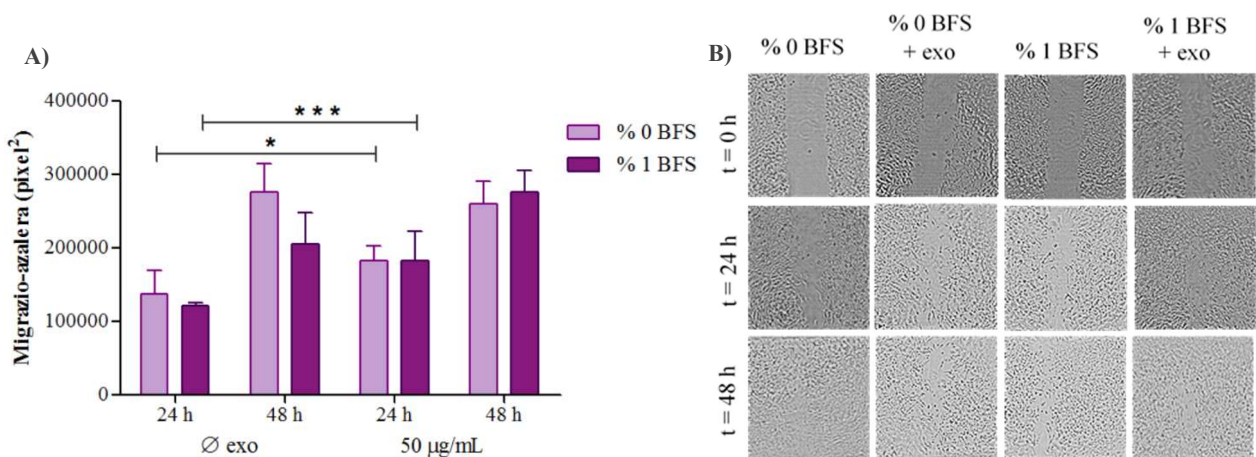
6. Irudia. A2058 melanoma-zeluletatik eratorritako exosomen eragina A2058 zelulen migrazio-gaitasunean.

A) Migrazio-azaleraren balioak tratamenduen gehikuntzatik 24 eta 48 ordura. **B)** "Zauriaren" argazkiak..

Exosomek A2058 zelulen migrazioa sustatu dute soilik % 1 BFS laginetan, bai 24 eta bai 48 ordura. Ezberdintasun estatistikoki adierazgarria dago, gainera, exosomadun % 0 BFS eta % 1 BFS laginen artean, azkenekoek izanik migrazio-azalerarik handiena 24 eta 48 ordura.

3.6. A2058 zelulen exosomen eragina COLO-800 zelulen migrazio-gaitasunean

Aztertzeke A2058 zelulek askaturiko exosomek COLO-800 zelulen migrazioan eragiten duten, COLO-800 zelulak inkubatu dira exosomen presentzian eta horien gabezian, bai % 0 BFS bai % 1 BFS baldintzetan, eta migrazio-azaleraren neurketak egin dira 24 eta 48 ordura.



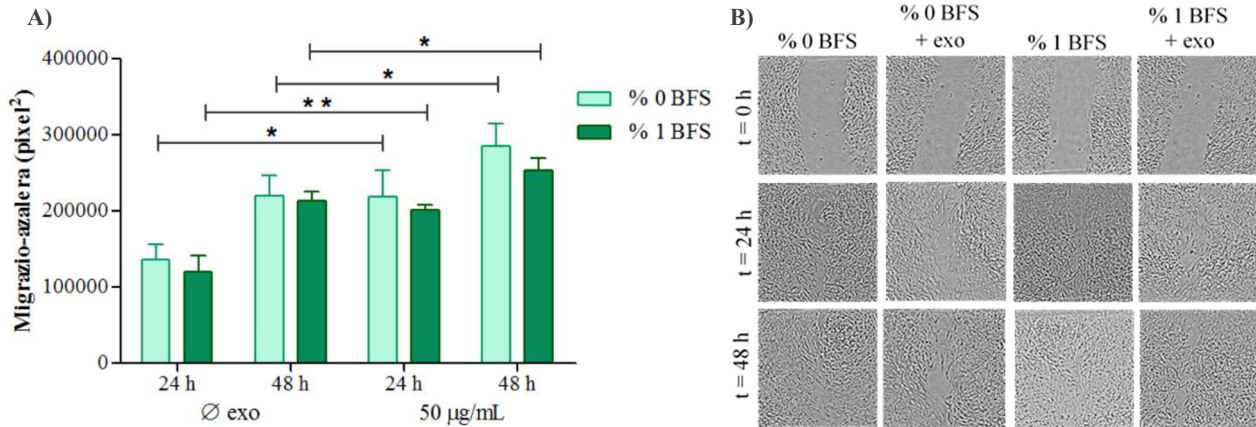
7. Irudia. A2058 melanoma-zeluletatik eratorritako exosomen eragina COLO-800 zelulen migrazio-gaitasunean.

A) Migrazio-azaleraren balioak tratamenduen gehikuntzatik 24 eta 48 ordura. **B)** "Zauriaren" argazkiak.

Hogeita lau ordura exosomen presentziak migrazio-tasaren hazkunde estatistikoki adierazgarria eragin du % 0 BFS laginetan eta, bereziki, % 1 BFS laginetan. Exosomek, ordea, ez dute migrazioaren sustapen adierazgarrikerik eragin 48 ordura. Bestalde, ez dago ezberdintasun adierazgarrikerik % 0 BFS eta % 1 BFS laginen artean, ez exosomen presentzian ez horien gabezian

3.7. A2058 zelulen exosomen eragina MELHO zelulen migrazio-gaitasunean

Aztertzeke A2058 zelulek askaturiko exosomek MELHO zelulen migrazioan eragiten duten, MELHO zelulak exosomen presentzian eta horien gabezia inkubatu dira, bai % 0 BFS bai % 1 BFS baldintzetan, eta migrazio-azaleraren neurketak egin dira 24 eta 48 ordura



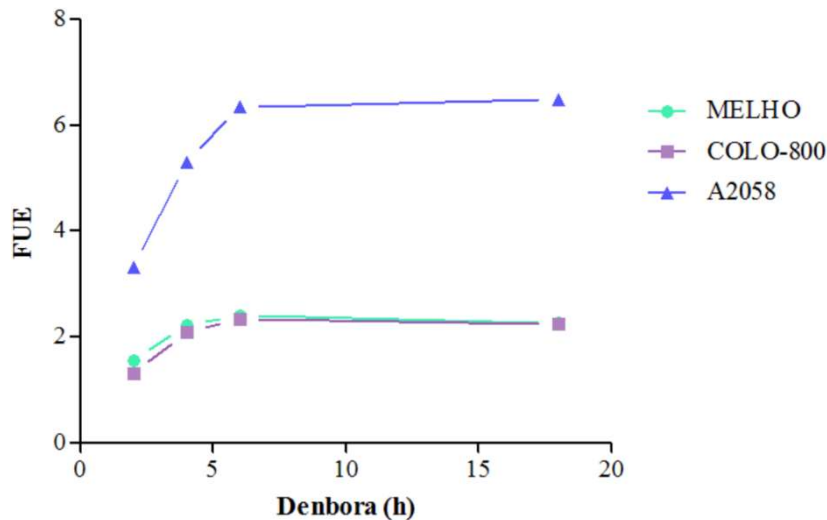
8. Irudia. A2058 melanoma-zeluletatik eratorritako exosomen eragina MELHO zelulen migrazio-gaitasunean.

A) Migrazio-azaleraren balioak tratamenduen gehikuntzatik 24 eta 48 ordura. B) "Zauriaren" argazkiak.

MELHO zelulei dagokienez, A2058 zeluletatik eratorritako exosomek migrazio-azaleraren emendio estatistikoki adierazgarria eragin dute lagin guztietan (bai % 0 BFS bai % 1 BFS), 24 ordura eta 48 ordura. Ez dago ezberdintasun adierazgarririk % 0 BFS eta % 1 BFS baldintzetan hazitako populazioen artean, ez exosomadun laginetan ez exosomarik gabekoetan.

3.8. A2058, COLO-800 eta MELHO zelulen migrazioa FluoroBlok™ intsertuetan

Etorkizunean, matrize konplexuagoak erabiliz inbasio-gaitasuna aztertzeari begira, *FluoroBlok™* intsertuen bidez A2058, COLO-800 eta MELHO zelulen migrazio-gaitasuna aztertu da I motako kolageno-geruza batean zehar. Emaitzen interpretazioa baino, teknikaren optimizazioa da helburua. Lerro guztietan kolagenoa eta porodun geruza zeharkatu dituzten zelulak egon dira, baina 6 orduren buruan maximoa jo dute guztiek.



9. Irudia. FluoroBlok™ intsertuetan egindako migrazio-saioaren emaitzak. FUE: Fluoreszentzia-Unitate Erlatiboa.

4. EZTABAIDA

Lanaren helburua izan da A2058 melanoma-zelula metastasikoetatik eratorritako exosomek A2058, COLO-800 eta MELHO zelulen oldarkortasunean duten efektua aztertzea, eta emaitzek erakutsi dute exosomek bideragarritasunaren eta migrazio-gaitasunaren handipena eragiten dutela zelula guztietan. Kasu bakoitzean, ordea, zelulen sentikortasuna eta inguruko baldintzen eragina oso bestelakoak izan dira. Ezberdintasun horiek ulertzeko bidean, ezinbestekoa da lehenbizi zelula-lerro bakoitzaren ezaugarriak gogora ekartzea.

A2058 zelulak giza melanoma-zelula metastasikoak dira, linfa-gongoiletako metastasi-gune batetik isolaturikoak. Mutazioak dituzte zelula-zikloarekin eta aktibitate metabolikoarekin hertsiki loturiko hainbat genetan; hala nola, MAPK bidezidorraren aktibazio konstitutiboa eragiten duen ^{V600E}BRAF mutazioa²⁴ edo p53 proteinaren disfuntzioa dakarren TP53 p.Val274Phe mutazioa.²⁵ Gainera, ez dituzte erretinoblastomaren proteina (pRB) eta PTEN tumore supresoreak adierazten²⁶. pRB-ren gabeziak zelula-zikloa gain-aktibatu eta, p53 proteinaren disfuntzioarekin batera, seneszentziaren funtzionamendu egokia oztopatzen du. COLO-800 zelulak, bestalde, melanoma-zelula metastasikoak dira, azal azpiko metastasi-gune batetik isolaturikoak, baina ez A2058 zelulak bezain oldarkorrak. Hauek ere *BRAF* eta *TP53* geneen mutazioak dituzte, baina ez da pRB edo PTEN proteinen gabeziarik deskribatu. A2058 zelulak ez bezala, heterozigotoak dira p53 proteinaren mutaziorako²⁷, eta horrek, pRB proteinaren adierazpenarekin batera, seneszentzia-mekanismo eraginkorrakoak eskainiko lizkieke. MELHO zelulei dagokienez, tumore primario batetik eratorritako melanoma-zelula ez-metastasikoak dira,²⁸ baina ezer gutxi esan daiteke euren ezaugarrien inguruan, literatura oso eskasa da eta.

Lortutako emaitzek A2058 zelulen exosoma-sistemaren hainbat ezaugarri azaleratzen dituzte, arestian aipaturiko ezaugarriekin loturik egon litezkeenak. Alde batetik, gai dira oldarkortasun-maila ezberdineko melanoma-zelulen gainean eragiteko. Hasteko, A2058 zelulek, zelula metastasiko eta oso oldarkorrak izanik, euren buruaren gain eragin dute. Efektu hori ez da berria, deskribatu baitira exosomek bideraturiko efektu autokrino eta parakrinoen beste hainbat kasu^{20,29}. Horrek iradokitzen du, bestalde, exosomek bideraturiko egokitzapen asko behin-behinekoak direla. Izan ere, A2058 zelulak dagoeneko ingurukoek askaturiko exosomen eraginpean egon dira kultiboan. Beraz, exosomen eragina epe luzekoa balitz, zelulak dagoeneko eraldaturik leudeke guk tratamendua aplikatzean, eta ez genuke efekturik hautemango. Hainbat minbizi-zeluletan antzeko efektuak behatu dira (U87 garuneko tumore-zelulak edo MDAMB231 bularreko tumore-zelulak, adibidez)³⁰, eta horrek aditzera ematen du exosomen bidezko informazio-transferentzia mekanismo epigenetikoaren bidezkoa dela (proteinak, mRNak edo miRNak), eta ez informazio genetikoaren integrazio iraunkorraren bidezkoa. Joera logikoa dirudi minbizi-mikroingurune aldakor eta dinamikoaren testuinguruan.

Bestalde, A2058 zelulen exosomek COLO-800 zelulen gainean ere eragiten dute, oldarkortasun gutxiagoko zelula metastasikoak. Proposatu izan da mota horretako zelulak, hau da, tumore primario eta tumore metastasiko oldarkorren tarteko bidean dauden melanoma-zelulak, bereziki sentikorrek direla exosomen seinaleztapenarekiko, fase horietan ezinbestekoa baita informazioaren hedapen masiboa tumorearen oldarkortasuna areagotzeko.³¹ Zelula-lerro bien ezaugarriak ezagututa, aukera bat litzateke *TP53* generako

mutante homozigotoak diren A2058 zelulek COLO-800 zelulen *TP53* alelo basatiaren adierazpena isilaraztea, kolon-minbiziko zeluletan behatu den bezala²¹, edo PTEN tumore-supresorearen adierazpena isilaraztea²⁰.

A2058 zelulen exosomek, gainera, MELHO zelula ez-metastasikoen gainean ere eragiten dute. Efektu horren bestelako adibideak ere deskribatu izan dira; adibidez, metastasi-gaitasun urriko B16-F1 melanoma-zelulek B16-F10 klon metastasikoen exosomak barneratzean, Met72 proteina pro-metastasikoa adierazten dute eta B16-F10 zelulen pareko gaitasun metastasikoa garatzen dute.³² A2058 zeluletatik eratorritako exosomek MELHO zelulen bideragarritasuna edo migrazio-gaitasuna handitzeak, ordea, ez du esan nahi zelula metastasiko bihurtu dituztenik. Izan ere, tumore primariotik at migratu eta odol-korrontera askatzeaz gain, zelula metastasikoek beste erronka askori egin behar diete aurre; hala nola, estres mekanikoa, zelulaz kanpoko matritetik askatzeak eragindako apoptosia (anoikis) edo immunitate-sistemaren erasoak.³³ Gainera, migrazio-saioetan ezarritako kolageno geruzak ez ditu, inondik inora, zelulaz kanpoko matrizearen propietateak berdintzen, eta beraz, ez da inbasio-gaitasunaren adierazgarria. Intsertuen erabilgarritasuna ebaluatu nahi izan da, hain zuzen, etorkizunean, matrize konplexuagoetan zelulen inbasio-gaitasuna aztertzeko helburuarekin.

Xehetasunetara joanda, A2058 eta COLO-800 zelulen kasuan, exosomek bideragarritasuna handitzea eragin dute bai % 0 BFS laginetan bai % 1 BFS laginetan, % 0 BFS laginen ezberdintasunaren esangura estatistikoa handiagoa izanik % 1 BFS laginena baino. MELHO zelulen kasuan, exosomen eragina estatistikoki adierazgarria da soilik % 0 BFS laginetan. *Presto Blue*TM soluzioak zelulen bideragarritasuna islatzen du aktibitate-metabolikoaren neurketaren bitartez, eta aktibitate-metabolikoaren hazkundera zelula-kopuruaren hazkunderarekin lotu ohi da. Litekeena da, beraz, exosomek zelula-zatiketa sustatu izana; berme osoz baieztatu ahal izateko, ordea, zelula-zatiketa neurtzeko saio espezifikoak egin beharko lirateke. Nolanahi ere, bideragarritasuna zelula-zatiketaren adierazle moduan hartuz gero, emaitzek iradokitzen dute zelula-zatiketaren sustapenari dagokionean, zelulak harkorrangoak direla baldintza ez hain faboragarrietan. Tumoreen hazkundera oso muturreko baldintzak eragin ohi ditu (azidifikazioa, baraua...), eta horrek seinale moduan jardun lezake exosomek bideraturiko zelula-zatiketarekiko harrera handitu eta tumorearen hazkunderarekin aurrera jarraitzeko, atzeraelikadura positiboa balitz bezala.

Migrazioari begira, bestalde, A2058 zelula-lerroaren kasuan exosomek migrazioa sustatu dute soilik % 1 BFS baldintzetan. Badirudi, beraz, A2058 zelulek ezinbestekoak dituztela serumaren hazkuntza-faktore eta mantenugaiak exosomek bideraturiko migrazio-prozesua abiarazteko. Ikusirik A2058 zelulen kasuan serumak ez duela bideragarritasuna baldintzatu, kontuan hartzekoa da autofagiak izan zezakeen esangura. Minbizian, autofagia biziraupen-mekanismoa da, zeinaren bidez tumore-zelulek erregai metabolikoak eskuratu eta estres oxidatiboa murrizten duten. Autofagiak, ordea, zeresana du ere minbizi-zelulen migrazioan, ukipen lokalak erregulatzen baititu bertan parte hartzen duten proteinen degradazio selektiboaren bitartez. Ikusi da, ordea, mantenugaien gabeziak sustaturiko autofagiak migrazioa eta metastasia bertan behera uzten dituela.³⁴

COLO-800 zelulei dagokienez, migrazioaren sustapena esanguratsua da 24 ordura, baina 48 ordura desagertu egin da exosomen efektua. MELHO zelulen kasuan, exosomen presentziak migrazioaren sustapen estatistikoki adierazgarria eragin du baldintza guztietan eta denbora tarte guztietan. Kasu bietan, serumaren presentziak ez

du inolako eraginik. Beraz, migrazioaren sustapenean, A2058 zelulek serumaren mantenugai eta hazkuntza-faktoreen beharra dute; ez, ordea, COLO-800 eta MELHO zelulek. Gogora ekarri beharra dago, ordea, COLO-800 eta MELHO zelula-lerroak direla, hain zuzen, bideragarritasunaren azterketan 96 ordura beherakada handia pairatu dutenak. Zein lotura egon daiteke bi gertakari horien artean?

Litekeena da COLO-800 eta MELHO zelulen bideragarritasunaren murrizketa seneszentzia egoeran sartu edo zelulak hiltzearen ondoriozkoa izatea. Hala ere, lorturiko datuekin ezin da gertatutakoa zehaztu; horretarako, Anexina-V edo TUNEL saioak egin litezke zelula-heriotzaren jarraipena egiteko. Suposatuz, ordea, bideragarritasunaren murrizketa zelula-heriotzak edo seneszentzia egoerak eragin dutela, litekeena da kultiboin-guruaren glukosa edota aminoazidoen agortzea izatea horren eragilea. Izan ere, frogatu da W1-38 lerroan, adibidez, zelula-eduki maximora gerturatu ahala DNA, RNA eta proteinen sintesia inhibitu egiten dela, eta hazkuntza-ingurua berritu ostean berrabiarazi egiten dela. Beste aukera bat da, mantenugaiak erabat agortu ez baina, zelula-dentsitate handiaren ondorioz, zelula bakoitzaren xurgapen-azalera gutxitu eta horrek mantenugaien harrera murriztu izana.³⁵ Hipotesi biek azalduko lukete zergatik gertatu den bideragarritasunaren murrizketarik handiena zelula-zatiketa gehien sustatu duten baldintzetan (exosomadun % 1 BFS laginak). Migrazioaren kasuan, ordea, zelula-zatiketa inhibiturik dago mitomizina dela eta; beraz, dentsitatearen hazkunderik ez da gertatzen, eta ez dago DNAREN sintesiarekiko hainbesteko menpekotasunik.

Baina, zergatik ez zitzaion berdina gertatu A2058 zelulei? Hipotesi bat da, A2058 zelulek autofagia mekanismo eraginkorragoak izan litzaketela, eta horrek, mantenugaien gabezia, erregai-metabolikoen iturri modura jardungo lukeela. Izan ere, arestian aipatu bezala, autofagia oso mekanismo arrakastatsua da minbizi-zeluletan, biziraupena ahalbidetzen baitu oso muturreko baldintzetan. Horri batu behar zaio, gainera, A2058 zelulek seneszentzia-mekanismoak asalaturik dituzteneko hipotesia. Bi ezaugarri horiek azalduko lukete, besteak beste, zergatik diren A2058 hain erresistenteak. Hipotesiaren arabera, COLO-800 eta MELHO zelulen kasuan autofagia ez litzateke hain eraginkorra izango, eta seneszentzia-mekanismoak funtzionalagoak lirateke; beraz, zelula-zatiketarako arazoak izango lituzkete mantenugaien eskasi-egoeretan, baina autofagiaren “falta” horrek eragingo luke, aldi berean, migrazioa inhibiturik ez egotea serumik gabeko laginetan (hasieran behintzat).

Horrek, ordea, ez du esan nahi COLO-800 eta MELHO zelulak, *in vivo*, zelula-dentsitate handiekiko hain sentikorrek direnik. Tumore-zelulen ezaugarria da glukosaren eskuragarritasunarekiko duten menpekotasun handia; kasu batzuetan, ordea, metabolitoen beharra inguruko zelulen laguntzaz ase dezakete. Zelula horiek aminoazidoak, lipidoak eta bestelako mantenugaiak exosometan paketatuta eta tumore-zelulei helarazten dizkiete.¹⁷ Minbiziarekin loturiko fibroblastoen askaturiko exosomek, adibidez, prostata- eta pankrea-minbizietako zelulak mantenugaiz hornitu eta euren biziraupena bermatzen dute muturreko baldintzetan.³⁶

Bukatzeko, gaiarekin izan lezakeen lotura dela eta, derrigorrezkoa da aipatzea 2020ko urtarrilean Joan Massagué ikertzailearen taldeak argitaratutako aurkikuntza: metastasia ez da mutazio-metaketa-oren ondorio posibleetako bat, baizik eta zelulen adierazpen-patroiaren eraldaketaren emaitza, patroi horiek zelulek birsorkuntza-prozedura fisiologikoetan eskuratzen dituztenen oso antzekoak izanik. Taldeak L1 zelula-atxikidura molekularren (L1CAM) garrantzia azaleratu zuen kolon eta ondesteko minbizien metastasian.³⁷

L1CAM molekularak, ordea, zeresana du ere melanomaren metastasi-prozesuan, molekularen gain-adierazpena azal-melanomaren metastasiarekin erlazionatu baita.³⁸ Frogatu da glioma-zelulek L1CAM molekularadun exosomak askatzen dituztela modu autokrino edo parakrinoan proliferazioa, mugikortasuna eta inbasibitatea sustatzeko²⁹; beraz, arrazoiak daude pentsatzeko melanomaren kasuan ere L1CAM molekularak bere efektua exosomen bidez gauzatu lezakeela. Melanoma-zeluletan, gainera, L1CAM molekula horren hartzaileetako bat adierazten da, $\alpha_v\beta_3$ integrina, tumore-zelulen biziraupen eta metastasiarekin lotu izan dena.³⁹ Kontuan hartzekoa da, beraz, exosomen bidezko seinaleztapenean molekula horrek izan dezakeen zeresana.

5. ONDORIOAK

- 1) A2058 zelula metastasikoen exosomek A2058 zelulen, COLO-800 zelula metastasikoen eta MELHO zelula ez-metastasikoen zatiketa sustatzen dute, sustapena handiagoa izanik BFSrik gabeko baldintzetan.
- 2) A2058 zelula metastasikoen exosomek A2058 zelulen, COLO-800 zelulen eta MELHO zelulen migrazioa sustatzen dute, A2058 zelulen kasuan sustapena BFSaren oso menpekoa izanik.
- 3) *FluoroBlok™* intsertu-sistema baliagarria da etorkizunean A2058, COLO-800 eta MELHO zelulen inbasio-gaitasuna aztertzeko matrize konplexuagoen eta gradiente kimikoen presentzian.

Lorturiko emaitzek exosomek minbiziaren ulermen eta tratamenduan izan lezaketan garrantzia indartzen badute ere, oraindik asko dago egiteko. Hurrengo urratsa, zelula-zatiketa eta migrazioaren sustapena zehazki zein molekularen bidez bideratzen den aztertzea litzateke. Integrinak proliferazioarekin eta migrazioarekin lotu izan dira; beraz, aukera bat $\alpha_v\beta_3$ integrina litzateke, kontuan hartuta L1CAM molekulari metastasiaren testuinguruan egotzi berri zaion garrantzia. Exosomen efektuaren erantzule diren molekularak identifikatzeak, terapien garapenaz gain, diagnostiko erreminten garapena ere sustatuko luke. Izan ere, proteomika-analisiak azaleratu dute melanoma-zelula metastasikoetatik eratorritako exosomen proteina-kontzentrazioa tumorearen garapenarekin eta gaixotasunaren pronostikoarekin harremandurik dagoela.¹⁸ Bide luzea dago aurretik, beraz, baina azaldu berri diren ildoak itxaropentsuak dira, eta jomuga, ezin argiagoa.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Lopez De Munain, A. *et al.* *Minbizia Euskal Autonomia Erkidegoan 2000-2015*. Osasun Saila (2017).
2. Tasas de supervivencia del cáncer de piel tipo melanoma. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-tipo-melanoma/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/tasas-de-supervivencia-para-el-cancer-de-piel-de-tipo-melanoma-por-etapas.html> (16/6/2020)
3. Cichorek, M., *et al.* Skin melanocytes: Biology and development. *Postep Derma i Alergol* **30**, 30–41 (2013).
4. London, D. A., *et al.* Effect of pigment on photomediated production of thymine dimers in cultured melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **67**, 261–264 (1976).
5. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
6. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **133**, 571–573 (1889).
7. Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer.* **8**, 761–773 (2017).
8. Tucci, M. *et al.* Exosomes in melanoma: A role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget.* **9** 20826–20837 (2018).
9. Raposo, G. *et al.* Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).
10. Caby, M. P., *et al.* Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* **17**, 879–887 (2005).
11. Pisitkun, T., *et al.* Identification of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**, 13368–13373 (2004).

12. Ogawa, Y., *et al.* Exosome-like vesicles in human saliva. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1059–1062 (2008).
13. Harding, C., *et al.* Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339 (1983).
14. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172 (1996).
15. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659 (2007).
16. Yuana, Y., *et al.* Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev* **27**, 31–39 (2013).
17. Stahl, P. D. & Raposo, G. Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology (Bethesda, Md.)* **34**, 169–177 (2019).
18. Lazar, I. *et al.* Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 464–475 (2015).
19. Mannavola, F. *et al.* Tumor-derived exosomes promote the in vitro osteotropism of melanoma cells by activating the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis. *J. Transl. Med.* **17**, 230 (2019).
20. Cao, L. Q. *et al.* Exosomal miR-21 regulates the TETs/PTENp1/PTEN pathway to promote hepatocellular carcinoma growth. *Mol. Cancer* **18**, 148 (2019).
21. Yoshii, S. *et al.* Exosomal microRNAs derived from colon cancer cells promote tumor progression by suppressing fibroblast TP53 expression. *Cancer Sci.* **110**, 2396–2407 (2019).
22. Presto Blue™ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A13261#/A13261> (16/6/2020)
23. Shelke, G. V., *et al.* Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles.* **3** (2014)
24. Sumimoto, H., *et al.* The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1651–1656 (2006).
25. Yu, K. S. *et al.* Elafin induces p53-dependent apoptosis in human melanoma cells. *IJC* **127**, 1308–1320 (2010).
26. Xing, F. *et al.* Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring V600E BRAF. *Oncogene* **31**, 446–457 (2012).
27. Cellosaurus cell line COLO 800 (CVCL_1135). https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1135 (16/6/2020)
28. MELHO Cell Line Summary. https://depmap.org/portal/cell_line/MELHO_SKIN?tab=mutation. (16/6/2020)
29. Pace, K. R., *et al.* Exosomal L1CAM Stimulates Glioblastoma Cell Motility, Proliferation, and Invasiveness. *Int. J. Mol. Sci. Artic.* **20**, 3982 (2019)
30. Antonyak, M. A. *et al.* Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4852–4857 (2011).
31. Boussadia, Z. *et al.* Acidic microenvironment plays a key role in human melanoma progression through a sustained exosome mediated transfer of metastatic molecules. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 245 (2018).
32. Hao, S. *et al.* Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp. Oncol.* **28**, 126–131 (2006).
33. Strilic, B. *et al.* Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell* **32** 282–293 (2017).
34. Dower, C. M., *et al.* Mechanisms and context underlying the role of autophagy in cancer metastasis. *Autophagy* **14**, 1110–1128 (2018).
35. Griffiths, J. B. The effect of medium changes on the growth and metabolism of WI-38. *J Cell Sci* **8**, 43–52 (1971)
36. Zhao, H. *et al.* Tumor microenvironment derived exosomes modulate cancer cell metabolism. *Elife* **5**, (2016).
37. Ganesh, K. *et al.* L1CAM defines the regenerative origin of metastasis-initiating cells in colorectal cancer. *Nat. Cancer* **1**, 28–45 (2020).
38. Thies, A. *et al.* Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* **38**, 1708–1716 (2002).
39. Wallstabe, L. *et al.* CAR T cells targeting $\alpha_v\beta_3$ integrin are effective against advanced cancer in preclinical models. *Adv. Cell Gene Ther.* **1**, e11 (2018).