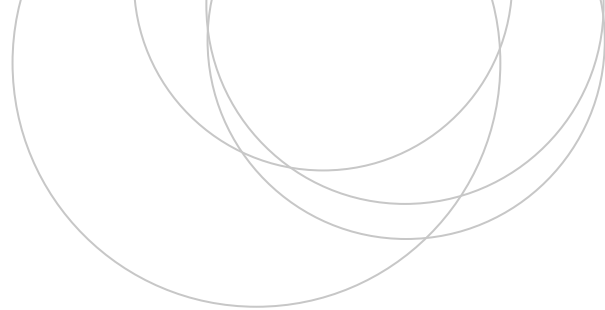




Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Grado Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua / Grado en Bioquímica y Biología  
Molecular

# Giza kolon eta ondesteko minbizidun zelula- lerroetatik eratorritako ama-zeluletan PCSK9 proteinaren inhibizioak duen eragina

Egilea/Autor/a:  
Maddi Urdangarin Ollo  
Zuzendaria/Director/a:  
Iker Badiola Echaburu  
Zuzendarikide/Codirector/a:  
Patricia García Gallastegi

© 2021, Maddi Urdangarin Ollo

## AURKIBIDEA

<b>1. SARRERA.....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK.....</b>	<b>2</b>
<b>3. MATERIAL ETA METODOAK .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1. ZELULA-LERROAK ETA -HAZKUNTZAK .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2. PCSK9 KONBERTASAREN ADIERAZPEN-MAILA ZELULA PARENTALETAN ETA CSCETAN QRT-PCR BIDEZ.....</b>	<b>4</b>
3.2.1. RNA erauzketa eta kuantifikazioa .....	4
3.2.2. RNAtik cDNA lortzeko erretrotranskripzioa (RT-PCR).....	4
3.2.3. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR).....	4
<b>3.3. PCSK9 PROTEINAREN ADIERAZPEN-MAILA ZELULA PARENTALETAN ETA CSCETAN WESTERN PLAPAKETAREN BIDEZ .....</b>	<b>5</b>
3.3.1. Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa .....	5
3.3.2. Western plapaketa.....	5
<b>3.4. INHIBITZAILE KIMIKO BIDEZKO PCSK9REN ISILARAZPENA SW480 ZELULA-LERROKO ZELULA PARENTALETAN ETA CSCETAN .....</b>	<b>6</b>
3.4.1. CSCek sortutako tumoresferen tamainaren azterketa .....	6
3.4.2. Zelulen bideragarritasunaren azterketa (XTT saioa) .....	6
<b>3.5. KALKULU ESTADISTIKOAK .....</b>	<b>7</b>
3.5.1. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR).....	7
3.5.2. Western plapaketa.....	7
3.5.3. CSCek sortutako tumoresferen tamainaren azterketa .....	7
3.5.4. XTT saioa.....	8
<b>4. EMAITZAK.....</b>	<b>8</b>
<b>4.1. PCSK9 KONBERTASAREN ADIERAZPEN-MAILA ZELULA PARENTALETAN ETA CSCETAN QRT-PCR BIDEZ.....</b>	<b>8</b>
4.1.1. RNA erauzketa eta kuantifikazioa .....	8
4.1.2. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR).....	8
<b>4.2. PCSK9 PROTEINAREN ADIERAZPEN-MAILA ZELULA PARENTALETAN ETA CSCETAN WESTERN PLAPAKETAREN BIDEZ .....</b>	<b>9</b>
4.2.1. Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa .....	9
4.2.2. Western plapaketa.....	9
<b>4.3. INHIBITZAILE KIMIKO BIDEZKO PCSK9REN ISILARAZPENA SW480 ZELULA-LERROKO ZELULA PARENTALETAN ETA CSCETAN .....</b>	<b>10</b>
4.3.1. CSCek sortutako tumoresferen tamainaren azterketa .....	10
4.3.2. XTT saioa.....	11
<b>5. EZTABAIDA .....</b>	<b>11</b>
<b>6. ONDORIOAK .....</b>	<b>14</b>
<b>7. ERREFERENTZIAK .....</b>	<b>14</b>
<b>8. ERANSKINAK.....</b>	<b>16</b>
1. ERANSKINA.....	16
2. ERANSKINA.....	17
3. ERANSKINA.....	18
4. ERANSKINA .....	19

## LABURPENA

Minbiziak 2020. urtean 10 milioi heriotza inguru eragin zituen, horietatik guztietatik 935.000 zegozkion kolon eta ondesteko minbiziari. Oro har, kirurgia, kimioterapia edota erradioterapia gisako sendabideen bidez trata daitezkeen arren, gaur-gaurkoz gaixoen epe luzeko pronostikoa ezin da ziurtatu, gaixotasun horien berragerpenaren eta metastasiaren intzidentzia handia delako. Badirudi minbizidun ama-zelulak —*Cancer Stem Cell, CSC*— direla, hain zuzen ere, berragerpen, metastasi, heterogenotasun, kimioterapia eta erradioterapia tratamenduen kontrako erresistentziaren eragileak. Hortaz, erabateko eraginkortasuna duen terapia aurkitzeko helburuaz, CSCen autoberritzearen eta horien seinaleztapen-mekanismoak aztertzen dituzten ikerketa ugari daude abian, eta ikusi da proproteina konbertasak—PC— minbiziaren aurkako terapien iturri izan daitezkeela. Proproteina konbertasek, besteak beste, eragiten dituzten mozketen bidez, minbiziaren garapenean eta metastasian parte hartzen duten zenbait proteina, atxikitze-molekula eta hazkunde-faktore aktibatzen dituzte. Hortaz, minbizia molekula onkogeniko horien gehiegizko adierazpenaren ondoriozkoa denez, eta zenbait minbizitan, kolonekoetan esaterako, proproteina konbertasaren adierazpena asaldaturik dagoenez, etorkizuneko tratamendu berri bihurtu litezke. Gauzak horrela, molekula horiek izan dezaketean garrantzia kontuan izanik, giza kolon eta ondesteko zelula-lerroetako PCSK9 proproteina konbertasaren adierazpena aztertu da gene zein proteina mailan, denbora errealeko PCR kuantitatibo, Western plapaketa eta inhibitzaile kimiko bidezko isilarazpen-saioren bidez. Emaitzek agerian utzi dute oro har proproteina konbertasaren adierazpena altuagoa dela CSCetan zelula parentaletan baino. Bestalde, PCSK9 konbertasaren inhibizioak CSCen bideragarritasuna nabarmen txikitu du. Ikerketa gehiago egitea nahitaezkoa bada ere, emaitza guztiek aditzera eman dute proproteina konbertasaren eta minbiziaren artean nolabaiteko lotura dagoela eta, ondorioz, etorkizuneko terapia izatera hel litezkeela.

**Gako-hitzak:** minbizia, kolon eta ondesteko minbizia, minbizidun ama-zelulak, proproteina konbertasak, PCSK9.

## 1. SARRERA

Munduko Osasun Erakundeak emandako datuek agerian uzten dute minbizia hilkortasun handiko gaixotasuna dela; izan ere, 2020. urtean 10 milioi heriotza inguru eragin zituen, horietatik guztietatik 935.000 kolon eta ondesteko minbiziari —KOM— zegozkionak ([WHO, 2021](#)). Gertuago etorri, Euskal Autonomia Erkidegoan, EAEn, minbizia da biztanleriaren heriotza-kausa nagusia, eta bai emakumetan, bai gizonetan KOM da, bularrekoaren eta biriketakoaren ostean hurrenez hurren, heriotza gehien dakarrena: gizonetzkoen kasuan minbiziagatiko % 13,1eko hilkortasuna eta emakumezkoetan % 14koa, hain zuzen ere ([Lopez de Munain eta Audicana, 2019](#)). Are gehiago, hilkortasun-tasa altua ez ezik, intzidentzia-tasa ere altua du; izan ere, KOM da emakumeen artean bigarren minbizirik ohikoena, eta hirugarrena gizonen artean. Azken urteotan diagnostiko goiztiarrarekin eta tratamenduekin loturiko aurrerapenak izan badira ere, bi tasa horiek gorantz doaz. Espainian, esaterako, 2025erako intzidentzia-tasa % 13,57 igoko dela balioesten da, eta hilkortasuna, berriz, % 13,83 ([Portillo et al., 2020](#)). Ezbairik gabe, datu horiek kezagarriak dira eta, horregatik, ikerketa ugari daude abian terapia eraginkorrak bilatzeko helburuarekin.

Gizakia, gutxi gorabehera, 37,2 bilioi zelulaz osaturik dago ([Zimmer, 2021](#)), eta gorputzeko beharren arabera orekan egongo dira: zelula berriak behar badira, hazi eta banatu egingo dira; zelulak zahartzean edo kaltetzean, ordea, hil egingo dira eta zelula berriek ordezkatu dute euren lekua. Dena den, zenbait arrazoi dela medio, prozesu ordenatu horiek hautsi egin daitezke. Egoera horietan, zaharrak edo kaltetuak diren zelulak ez dira hilko, bizirik jarraituko dute. Horrela, minbizi-zelulak hazten eta ugaltzen joango dira, eta tumore izeneko minbizi-ehun masa eratuko dute. Tumoreak oso heterogeneoak dira; izan ere, tumoreen arteko heterogenitatea ez ezik, tumoreen barrukoa ere badago ([Landau et al., 2013](#)). Alde batetik, tumoreak edozein zelula izan dezake abiapuntu. Beraz, abiapuntu duen zelularen eta haren kokalekuaren arabera, eratzen dena ezberdina izango da. Are gehiago, gaixo batetik bestera, ehun berean edo ehun desberdinetan sortutako tumoreak ere aldakorrek dira. Bestetik, kontuan izan behar da tumorearen barruan ere heterogeneotasun handia dagoela. Badirudi horren guztiaren atzean minbizidun ama-zelulak —*Cancer Stem Cells, CSC*— daudela; izan ere, zelula horiek asimetriki zatitzeko gaitasuna dute eta, hortaz, hainbat motatako tumore-zelulatan bereiztekoa ([Rich, 2016](#)).

CSCak leuzemian 1994. urtean identifikatu ziren lehenengoz ([Lapidot et al., 1994](#)), eta dagoeneko gizakien zenbait tumore solidotan identifikatu dira, hala nola melanomako ([Fang et al., 2005](#)), garuneko ([Singh et al., 2004](#)), bularreko ([Al-Hajj et al., 2003](#)), prostatako ([Collins et al., 2005](#)) eta kolon-ondesteko ([Ricci-Vitiani et al., 2007](#)) minbizietan. CSCak minbizi-zelulen azpimultzo txikiak dira, etengabe zati daitezkeen desberdintzapen baxuko zelulak, alegia. Zelula arruntek ez bezala, autoberritzeko —*self-renewal*— gaitasuna dute, bai eta hainbat motatako zeluletan desberdintzeko gaitasuna ere. Bestalde, badirudi zelula horiek direla berragerpen, metastasi, heterogeneotasun eta kimioterapia- eta erradioterapia-tratamenduen kontrako erresistentziaren eragileak ([Yu et al., 2012](#)).

Zelulok, besteak beste, sendagai anitzeko erresistentzia garraiatzaileak —*multidrug resistance transporters*, MDR— adierazten dituzte eta, horrez gain, DNA konpontzeko ahalmen handiagoa ere erakusten dute. Bestalde, CSCek, gainontzeko minbizi-zelulen antzera, epitelio-mesenkima trantsizio prozesuari —EMT— esker migratzeko eta inbaditzeko gaitasuna eskuratzen dute eta, ondorioz, berritzeko eta zelula ezberdinetan desberdintzatzeko gaitasuna dutenez, uste da paper aktiboa betetzen dutela metastasi prozesuetan ([Zhou et al., 2021](#)).

Nolanahi ere, CSCen aurkako terapia eraginkorrik ez izateak horien inguruko interesa piztu du. Gauzak horrela, ikerketa ugari daude abian CSCen berritzearen eta bereizketaren oinarrian dauden seinaleztapen-mekanismoak aztertzeko. Frogatu da CSCen erregulatuzaile direla zelula barneko zenbait seinaleztapen-bidezidor, horien artean *Wnt*, *Notch*, *Hedgehog* eta TGF- $\beta$ , bai eta zelulaz kanpoko faktoreak ere —mikroingurunea—, hala nola hipoxia eta zelulaz kanpoko matrizea —ECM—. Ildo beretik, hainbat transkripzio-faktore pluripotente ere badira CSCen funtsezko erregulatuzaileak, tartean Oct4, Sox2, NANOG, KLF4 eta MYC ([Koury et al., 2017](#)). Arestian aipaturiko bidezidor horietako proteina askok, zuzenean edo zeharka, proproteina konbertasen, PC, laguntza behar dute euren funtzioa betetzeko. Minbiziaren garapenean eta metastasian parte hartzen duten zenbait proteina, atxikitze-molekulak eta hazkunde-faktoreak esaterako, modu inaktiboan sintetizatzen dira, eta mozketara beharrezko dute aktibo bihurtzeko. Eta, horixe da, hain zuzen ere, proproteina konbertasa horien lana: proproteina horietan proteolisia eragitea aktibo bihurtzeko ([Scamuffa et al., 2008](#)).

Egun, bederatzi serina proteasak osatzen dute proproteina konbertasen familia. Lehen zazpi kideak —PC1, PC2, furina, PC4, PC5, PACE4 eta PC7— arduratzen dira, besteak beste, zenbait hormona polipeptidikoren, hazkunde-faktoreen eta horien hartzaileen eta atxikitze-molekulen aktibazioaz eta inhibizioaz. Zortzigarren kideak, SKI-1ek, aktibatzen ditu mintzari loturiko transkripzio-faktore eta Golgi aparatutik igarotzen diren zenbait proteina espezifiko. Kolesterola eta gantz azidoen sintesia kontrolatzen duen entzima nagusia da, baina hainbat funtzio homeostatiko ere arautzen ditu. Azkenik, PCSK9k modu ez-entzimatikoa jokatzen du kolesterolaren eta lipidoen homeostasia erregulatzen duten zelula gainazaleko hartzaileen degradazio endosomala eta lisosomala eraginez, batik bat dentsitate baxuko lipoproteinen hartzaileena ([Seidah eta Prat, 2012](#)).

Ikusi da zenbait minbizi kasutan, kolonekoan esate baterako, proproteina konbertasa horien adierazpena asaldaturik dagoela. Gauzak horrela, PCek hazkunde-faktoreen, zitokinen eta hartzaileen aktibazioa eragiten dutenez, eta minbizia, batez ere molekula onkogeniko horien gehiegizko adierazpenaren ondoriozkoa denez, proproteina konbertasak minbiziaren aurkako terapien iturri bilakatu dira ([Gerovska et al., 2021](#)).

## 2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK

**Hipotesia:** PCSK9 zelula-gainazaleko hartzaile askoren jardura erregulatzeko gai da, baita, agian, tumorearen garapenarekin edota inhibizioarekin loturik egon daitezkeen mintz-proteinena ere.

Horregatik, hipotesia da PCSK9k eragin zuzena duela kolon eta ondesteko minbizidun ama-zelulen jardueretan eta funtzioetan.

**Helburuak:** lehen aipaturiko hipotesi hori egiaztatzeko, honako helburu hauek bete dira:

- Giza koloneko eta ondesteko minbizidun zelula-lerroetan PCSK9 proproteina konbertasaren adierazpena aztertzea, bai zelula parentaletan, bai eta minbizidun ama-zeluletan ere.
- PCSK9ren inhibizioak duen eragina neurtzea minbizidun ama-zeluletan.

### 3. MATERIAL ETA METODOAK

#### 3.1. ZELULA-LERROAK ETA -HAZKUNTZAK

Lan honetarako hiru zelula-lerro erabili dira, SW620, SW480 eta COLO320, hain zuzen ere. SW620 zelula-lerroko zelulak (ATCC ref: CCL-227™) koloneko tumore-zelula metastasikoak dira; SW480 lerroko zelulak (ATCC ref: CCL-228™), aldiz, koloneko tumore-zelula ez-metastasikoak; eta, azkenik, COLO320 kolon-ondesteko kartzinoma zelula-lerroa da (ATCC ref: CCL-220™). Kasu bakoitzean, zelula parentalak —P— eta minbizidun ama-zelulak —CSC— izan dira aztergai.

Oro har, zelulen hazkuntza prozesua zelula-lerro guztietarako bera izan da, aldatu den bakarria erabilitako medioa izan baita. SW620 zelula-lerroaren kasurako L15 medioa erabili da (SIGMA-ALDRICH, ref: SLCC7508, 0876); S480rako *Dulbecco's Modified Eagle Medium* —DMEM— (GIBCO, ref: 12491015) eta COLO320rako RPMI medioa (GIBCO, ref:21875-034). Medio guztiak honakoez osatu dira: % 10 FBS (HYCLONE, ref: SV3016003), % 1 penizilina/estreptomizina (GIBCO, ref: 15140122) eta % 1 L-Glutamina aminoazidoa (SIGMA-ALDRICH, ref: G7513).

Zelula-lerro guztien kasuan, zelula parentalak T-75 (SARSTEDT, ref: 833911) fraskora itsatsirik daude; beraz, lehenik eta behin, medioa kendu da. Ondoren, *Phosphate-Buffered Saline* soluzioarekin —PBS— (SIGMA-ALDRICH, ref: P4417) garbitu da, medioa erabat kendu ahal izateko. Zelulak ontzitik askatzeko beharrezkoa da atxikitze-proteinen lotura haustea eta, horretarako, tripsina-EDTA entzima-disoluzioa gaineratu da (GIBCO, ref: 70011036) eta 4 minutuz mantendu da 37 °C-ra. Ondoren, haren efektua inaktibatzeke, kasuan kasuko medioa gaineratu da tripsinaren bolumen berean, medioak seruma baitauka.

Esekiduran daudela zelulen bideragarritasuna aztertu da Tripan urdinaren metodoa erabiliz (SIGMA, ref: D2650). Azterketa honetarako, 5 µL Tripan urdin eta 5 µL zelula dituen medioa nahastu dira, eta *TC20 Automated Cell Counter* (BIO-RAD) izeneko zitometro elektronikoko bat erabiliz, zelula-kopurua eta zelulen bideragarritasuna kalkulatu da. Bien bitartean, zelulak mediotik banatzeko zelula-medioa 15 mL-ko tutu atean jarri eta zentrifugatu da 5 minutuz 1500 r.p.m-ra. Ondoren, gainjalkina kendu, eta jalkina berreseki da 1 mL dagokion medioan. Jarraian, T-75 frasko berri batean 10 mL medio eta kasuan kasuko zelula-medioaren bolumen jakina jarri dira.

Bestalde, zelula-lerro bakoitzeko zelula parentaletatik abiatuta, minbizidun ama-zelulak lortu dira. Kasu guztietan, edozein izanik ere zelula-lerroa, F12 medioa erabili da. Medio horrek DMEM F12 (GIBCO, ref: 11320033) (GIBCO, ref: 31331028) edukitzeaz gain, honako osagarriak ere baditu: N-2 (GIBCO, ref: 17502048), B27 (GIBCO, ref: 17504044), 10 ng/mL FGF<sub>2</sub> —*Fibroblast Growth Factor*— eta 20 ng/mL de EGF —*Epidermal Growth Factor*— (Peprotech, London, United Kingdom) hazkunde-faktoreak. CSCen sorrera itsaspen baxuko 6 putzuko plaketan egin da (SARSTEDT, ref: 833920500), esekiduran alegia. Gauzak horrela, zelulen-hazkuntza egitean, tripsinizazioaren urratsa ez da egin, zuzenean kontatu eta zentrifugatu dira. Edonola ere, zelulak 37 °C-an eta % 5 CO<sub>2</sub>-ko baldintzapean inkubatu dira (HeraCell 150, ThermoScientific™).

### **3.2. PCSK9 KONBERTASAREN ADIERAZPEN-MAILA ZELULA PARENTALETAN ETA CSCetan qRT-PCR BIDEZ**

*PCSK9* konbertasaren adierazpena aztertu da ondorengo sei laginetan: SW620, CSC-SW620, SW480, CSC-SW480, COLO320 eta CSC-COLO320. Kontrol modura glizeraldehido-3-fosfato deshidrogenasa —GAPDH— gene konstitutiboaren adierazpena aztertu da. Erabilitako hasleak [1. eranskinean](#) daude.

#### **3.2.1. RNA erauzketa eta kuantifikazioa**

mRNAREN erauzketarako *RNeasy Plus mini Kit*-a (QIAGEN, ref: 74104) erabili da eta, horretarako, fabrikatzailearen argibideak jarraitu dira. Behin mRNA erauzita, haren kuantifikazioa egin da *NanoDrop* espektrofotometro bidez (Synergy HT, BioTek®). Zehazki, 260 nm-an neurtu da absorbantzia eta A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratioa aztertu da —balioak 2 ingurukoa izan behar du—. mRNA lagina hozkailuan gorde daiteke -40 °C-an erabili bitarte.

#### **3.2.2. RNAtik cDNA lortzeko erretrotranskripzioa (RT-PCR)**

mRNA erauzi eta kuantifikatu ostean, erretrotranskripzioa egin da mRNAtik DNA kodetzailea —cDNA— eskuratzeko. Horretarako, honako osagaiak erabili dira: 1000 ng RNA lagina, 4 µL *iScript Reaction Mix*, 4 µL *iScript Reverse Transcriptase* (*iScript*™ cDNA Synthesis Kit, BIO-RAD, ref: 1708890) eta *DEPC-Treated H<sub>2</sub>O* (SIGMA, ref: D5758). Erreakzioa *Thermal Cycler* (MyCycler, BIO-RAD) termozikladorean eraman da aurrera ondoko baldintzapean: 5 minutuz 25 °C; 30 minutuz 42 °C; 5 minutuz 85 °C eta, azkenik, 4 °C-ra mantendu da.

#### **3.2.3. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR)**

Sei cDNA izan dira aztergai eta kasu bakoitzean *PCSK9* eta gene konstitutiboaren, GAPDH, adierazpena aztertu da. PCR erreakzioa aurrera eramateko 96 putzuko plaka erabili da (BIO-RAD, ref: HSP9601) eta ondorengo osagaiak erabili dira: 5 µL DNA nahaste —0,5 µL DNA + 4,5 µL *DEPC*-

*Treated H<sub>2</sub>O* (SIGMA, ref: D5758)—, eta 5 µL erreakzio nahastea —0,5 µL hasle, 4,5 µL *SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, ref: 43676591)—. Analisi estatistikoak ahalbidetzeko kasu bakoitzerako PCSK9ren sei erreplika egin dira eta gene konstitutiboaren hiru. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa *CFX96™ Real-Time System* (BIO-RAD) termozikladorean egin da ondorengo baldintzapetan: lehen zikloa 10 min 95 °C-ra; 40 ziklo 15 s 95 °C-ra eta 1 min 57 °C-ra; azken zikloa 5 s 65 °C-ra eta 0,5 s 95 °C-ra eta, amaitzeko, 4 °C-ra mantendu da.

### **3.3. PCSK9 PROTEINAREN ADIERAZPEN-MAILA ZELULA PARENTALETAN ETA CSCetan WESTERN PLAPAKETAREN BIDEZ**

#### **3.3.1. Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa**

250 µL *RIPA Lysis Buffer* eta 2,5 µL proteasa inhibitzaileen nahastean berreseki da jalkina. Ondoren, izotzetan mantendu da 15 minutuz eta, ostean, xiringa baten laguntzaz zelulak apurtu dira (BD Microlance, ref: 304000). Jarraian, zentrifugatu egin da 13.000 r.p.m-an 5 minutuz, eta gainjalkina jaso da. Proteinak -40 °C-ra gorde dira erabili arte.

Proteinen kuantifikazioa azido bizinkoninikorekin —BCA— (SIGMA, lot: SHBB2670V) egin da. Azido ahul hori oso erabilia da biokimikako entseuetan, soluzio bateko proteina totala determinatzea ahalbidetzen baitu. Kuantifikaziorako lehenik eta behin patroi-zuzena eraiki da. Horretarako, 50 µL bolumeneko 6 nahaste prestatu dira BSaren eta H<sub>2</sub>O Milli-Qren bolumen gradualak erabiliz. Bestalde, laginen prestaketari dagokionez, 5 µL lagin eta 45 µL H<sub>2</sub>O Milli-Qren nahasteak prestatu dira. Jarraian, lagin bakoitzari 1 mL azido bizinkoniniko eta CuSO<sub>4</sub> nahaste gaineratu zaio —50:1-eko erlazioan—, eta 30 minutuz ilunpetan inkubatu dira 37 °C-an. Azkenik, *BIO-RAD SmartSpec Plus* espektrofotometroan absorbantzia neurtu da 562 nm-ko uhin luzeran. Emaitzak [2. eranskinean](#) daude.

#### **3.3.2. Western plapaketa**

Western plapaketak lagin bateko proteinak aztertzea ahalbidetzen du. Lehenik eta behin, elektroforesia egin behar da. Elektroforesiko gelak —% 10 akrilamida— bi zati ditu: goialdean *stacking* gela, eta behealdean, aldiz, *running* gela, proteinak banatu ahal izateko. Kasu honetan izkinako kaleak *NZYColour Protein Marker II* markatzaileekin (Nzytech, ref: MB090) kargatu dira eta besteak laginekin —100 µg proteina, 12,5 µL Laemmli 4x, eta RIPA/H<sub>2</sub>O, bolumen totala 50 µL izanik—, eta gutxi gorabehera 1,5 orduz utzi da 100 V-an.

Ostean, transferentzia egin da 0,2 µm poro tamainako nitrozelulosazko mintz batera —PVDF— (Protran, ref: 10401396). Transferentzia polo negatibotik —beltza— polo positibora —gorria— egin da, SDSak karga negatiboa ematen baitie proteinei. Transferentzia egiteko honako ordenako “sandwich” modukoa prestatu da: kuxina, paperezko filteroa, proteina gela, nitrozelulosazko mintza, paperezko filteroa eta kuxina. Kartutxo hori kubetan sartu da, kubeta 1 x TAE indargetzaileaz bete da goraino, eta



hiru orduz 100 V-ra mantendu da izotzetan —gau osoan zehar ere utz daiteke—. Transferentziaren ostean, mintza 6 mL % 5 esnearekin blokeatu da, 1 h-z eta mugimenduan. Blokeoa garrantzitsua da ondoren antigorputza soilik intereseko proteinara batzeko. Jarraian, *rabbit anti-PCSK9 antibody* (Abcam, EPR7627(2), ab181142) antigorputz primarioa jarri da —1:1000—, eta gau osoan zehar utzi da ilunpean 4 °C-ra. Gaua pasa ondoren, 10 minutuko 3 garbiketa egin dira TBS-T x 1 erabiliz, eta *Goat Anti-Rabbit HRP Conjugated* antigorputz sekundarioarekin (Abcam, ref: ab6721) —1:3000— inkubatu da ordubetez giro tenperaturan eta mugimenduan. Ondoren, 10 minutuko 3 garbiketa egin dira TBS-T x 1-arekin. Bi antigorputzak berreskuratu egin dira. Azkenik, errebelatzeko *SuperSignal™ West Femto* kit-a erabili da (Thermo Scientific, ref: 34094).

Behin bandak errebelatuta, *stripping*-a egin da proteina konstitutiboa, GAPDH, detektatzeko. Gauzak horrela, mintza *stripping buffer*-az garbitu da 20 minutuz mugimenduan giro tenperaturan. Jarraian, mintza blokeo-soluzioan —% 5 esnea— utzi da giro tenperaturan ordubetez. Ostean, antigorputza gaineratu da, eta aurreko prozedura bera jarraitu da. Horretarako, 1:1000 *Mouse Anti-GAPDH* antigorputz primarioa (Abcam, ref: ab8245) eta 1:3000 *Goat Anti-Mouse HRP Conjugated* (sc516102) antigorputz sekundarioa erabili dira.

### **3.4. INHIBITZAILE KIMIKO BIDEZKO PCSK9ren ISILARAZPENA SW480 ZELULA-LERROKO ZELULA PARENTALETAN ETA CSCetan**

SW480 zelula-lerroa erabili da inhibitzaile kimiko batek, PF-06446846 klorhidratoak (MedChemExpress, ref: 1632250-50-0) hain zuzen ere, CSCetan duen eragina aztertzeko. Zelula parentalen minbizidun ama-zelulak lortzeko [3.1 ataleko](#) urratsak jarraitu dira. Guztira 6 plaka egin dira eta hirugarren egunean inhibitzailea gaineratu da ondorengo moduan: kontroltzat hartu diren bi plakei ez zaie ezer gaineratu, beste biri DMSO soilik, eta azkenekoei 8 µL DMSO eta 2 µL inhibitzaile. Horietatik guztietatik, hain zuzen ere, hiru plaka CSCek sortutako tumoroesferen tamainaren eta zelulen bideragarritasunaren azterketak egiteko erabili dira, eta gainontzeko plaketako zelulak -40° C-ko hozkailuan gorde dira etorkizunean beste saio batzuk egiteko.

#### **3.4.1. CSCek sortutako tumoroesferen tamainaren azterketa**

Inhibitzailea gaineratu eta handik 12 ordura, zelulak frenorik gabe zentrifugatu eta DMEM F12<sup>++</sup> medio berrian berreseki dira. Ondoren, mikroskopia optiko bidez 6. egunera argazkiak atera zaizkie ondoko hiru baldintza hauetan: CSC-SW480, CSC-SW480+DMSO, CSC-SW480+ Inhibitzailea+DMSO.

#### **3.4.2. Zelulen bideragarritasunaren azterketa (XTT saioa)**

Inhibitzaile kimikoaren bidezko PCSK9ren inhibizioak zelulen bideragarritasunean duen eragina aztertzeko XTT entseguak egin dira. Honako teknika tetrozolio gatza (2,3-bis [2-Metoxi-4-nitro-5-

sulfofenil] -2H-tetrazolio-5-karboxanilida) —XTT— formazan gatzera erreduzitzeko duen gaitasunean oinarritzen da.

Entsegua 96 putzuko plakan (SARSTEDT, ref: 83.3924.300) egin da eta, horretarako, *Cell Proliferation Kit II (XTT)* kit komertziala erabili da (Roche, ref: 11465015001). Alde batetik, SW480 zelula parentalen diluzio seriatuak egin dira zuzen-patroia eratzeko (abiapuntua 100.000 zel/putzu). Bestetik, 100  $\mu$ L-ko bolumen finalarekin, CSCak putzuetan erein dira. Ondoren, XTT eta elektroli akoplamentuko nahasketaren —50:1— 50  $\mu$ L gaineratu dira putzu bakoitzera. 4 ordutan 37 °C-ra eta % 5 CO<sub>2</sub>-ra mantendu dira. Denbora hori igarota, absorbantzia neurtu da 490 nm-ko uhin luzeran.

### 3.5. KALKULU ESTADISTIKOAK

#### 3.5.1. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR)

Anplifikazioko emaitzak *Threshold Cycle Value (Ct)* unitatean ematen dira, eta balio horrek adierazten du zenbat ziklo gertatu behar diren produktu kopuru jakin bat lortzeko —fluoreszentzia neurtuz lortzen da—. Gauzak horrela, zenbat eta handiagoa izan genearen adierazpena, ziklo gutxiago eman beharko ditu kopuru horretara iristeko eta, ondorioz, Ct balio txikiagoa izango du —balioa >40 bada, ez da kontuan hartuko—. Lortutako Ct balio horiek gene konstitutiboaren adierazpen mailarekin normalizatu dira (a. ekuazioa), eta datu horietatik *Fold change* delako balioa —bi balioen arteko aldea— eskuratu da (b. ekuazioa), hurrenez hurren, honako ekuazioen bidez:

$$(a) \Delta Ct = Ct(\text{konbertasa}) - Ct(\text{gene konstitutiboa})$$

$$(b) \text{Fold change} = 2^{-\Delta Ct}$$

**1. ekuazioa:** *Fold Change* ( $2^{-\Delta Ct}$ ) balioa lortzeko ekuazioa, Ct balioetatik abiatuta.

Ondoren, datu horiek erabiliz, Microsoft® Excel® kalkulu-orrian hiru grafiko egin dira, eta PCSK9ren adierazpenean aldaketa adierazgarririk ote den aztertu da. Datuak esanguratsuak diren jakiteko, desbideratze estandarra, errore estandarra eta T-Student balioak kalkulatu dira.  $p < 0,05$  baldin bada, emaitzak esanguratsuak dira eta hipotesia onartu egingo da.

#### 3.5.2. Western plapaketa

*GeneSnap* softwarean lortutako TIFF irudien analisirako Fiji izeneko programa erabili da. Gelean lortutako banden intentsitate-unitateak lortu eta horiek kontrolarekiko, GAPDHarekiko alegia, normalizatu dira. Datu horiekin, Microsoft® Excel® kalkulu-orrian grafiko bat sortu da.

#### 3.5.3. CSCek sortutako tumoro-esferen tamainaren azterketa

Baldintza bakoitzari zegozkion sei putzuetako laginen bosna argazki atera dira, eta ondoren Fiji bidez zelula-taldekapen horien azaleraren batezbestekoa kalkulatu da. Jarraian, desbideratze estandarra, errore estandarra eta T-Student balioak kalkulatu dira.

### 3.5.4. XTT saioa

SW480 zelulekin lortutako absorbantzia balioak erabili dira zuzen-patroia sortzeko. CSCen putzuetako absorbantziak ezagutuz, zuzen-patroian lortutako ekuazioa erabili da zelula-kopurua lortzeko, eta errore estandarra eta T-Student balioak kalkulatu dira.

## 4. EMAITZAK

### 4.1. PCSK9 KONBERTASAREN ADIERAZPEN-MAILA ZELULA PARENTALETAN ETA CSCetan qRT-PCR BIDEZ

#### 4.1.1. RNA erauzketa eta kuantifikazioa

*NanoDrop*-ean lortutako RNA kontzentrazioak 1. taulan ageri dira. Lortutako RNA laginekin erretrotranskripzioa egin da cDNA lortu eta harekin denbora errealeko PCR kuantitatiboa egiteko.

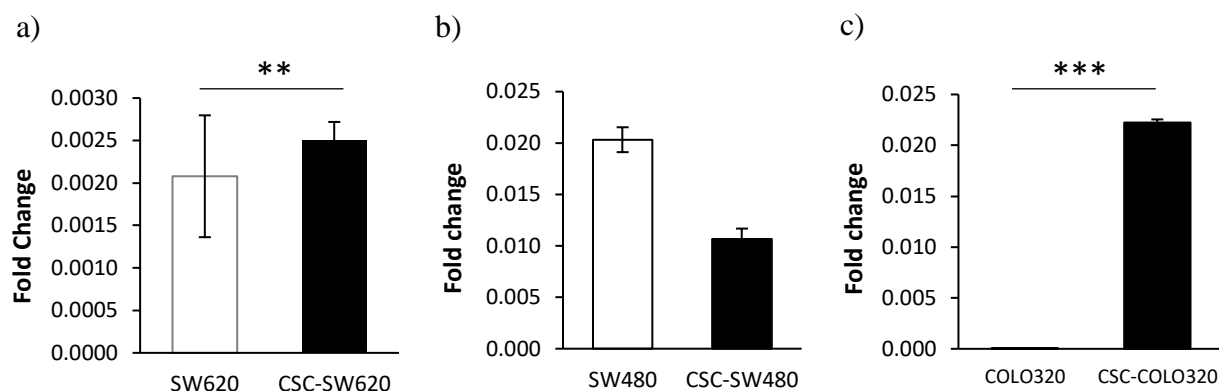
**1. taula: RNAren erauzketa eta kuantifikazioa.** SW620, CSC-SW620, SW480, CSC-SW480, COLO320 eta CSC-COLO320 zelula-lerroetatik erazitako RNAren kontzentrazioak (ng/ $\mu$ L) eta  $\Delta$ Abs<sub>260/280</sub> aldaketa ageri dira.

Lagina	RNA kopurua (ng/ $\mu$ L)	$\Delta$ Abs <sub>260/280</sub>
SW620	1661,5	2,145
CSC-SW620	566,344	2,190
SW480	1200	2.1
CSC-SW480	946,773	2,152
COLO320	225	2,061
CSC-COLO230	430	1,925

#### 4.1.2. Denbora errealeko PCR kuantitatiboa (qRT-PCR)

*PCSK9*ren adierazpena aztertzeke egindako qRT-PCRren emaitzek erakusten dute, oro har, minbizidun ama-zeluletan konbertasaren adierazpena altuagoa dela. Hain zuzen ere, 1. irudiko a) eta c) grafikoetan ikus daitekeen moduan, SW620 eta COLO320 zelula-lerroetatik eratorritako minbizidun ama-zeluletan handiagoa da konbertasaren adierazpena zelula parentaletan baino eta, gainera, aldea esanguratsua da; izan ere, lortutako T-Student balioak, hurrenez hurren,  $p=0,001$  eta  $p=2,58E-11$  dira. SW480 zelula-lerroaren kasuan, ordea, kontrakoa gertatzen dela antzeman daiteke, parentaletan altuagoa baita adierazpena. Edonola ere, zelula parentalen zein CSCen artean dagoen *PCSK9*ren adierazpenaren aldea ez da esanguratsua,  $p=0,647$  baita. Bestalde, zelula-lerro ez-metastasikoa eta metastasikoa alderatuz,

ondoriozta daiteke *PCSK9*ren adierazpena zelula lerro ez-metastasikoan altuagoa dela metastasikoetan baino.



**1. irudia: SW620 eta COLO320 zelula-lerroetan *PCSK9*ren adierazpena altuagoa da CSCetan.** SW620, CSC-SW620, SW480, CSC-SW480, COLO320 eta CSC-COLO320 laginen anplifikazioaren emaitzak *Fold Change* balioetan adierazita ageri dira; zuriz, zelula parentalak, eta beltzez, CSCak. Zelula-lerro bakoitzerako *PCSK9*ren Ct balioei *GAPDH*ren Ct balioen batezbestekoa kendu zaie ( $\Delta Ct$ ) eta, ondoren, *Fold change* balioa ( $2^{-\Delta Ct}$ ) kalkulatu da. Azkenik, balio horien batezbestekoa, desbideratze estandarra, errore estandarra eta T-Student balioak kalkulatu dira (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 4.2. *PCSK9* PROTEINAREN ADIERAZPEN-MAILA ZELULA PARENTALETAN ETA CSCetan WESTERN PLAPAKETAREN BIDEZ

### 4.2.1. Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa

Proteinen erauzketa *material eta metodoak* ataleko [3.3.1. azpiatalean](#) azaldutako protokoloa jarraituz egin da. *BIO-RAD SmartSpec Plus* espektrofotometroan egindako neurketen emaitzak 3. taulan ageri dira.

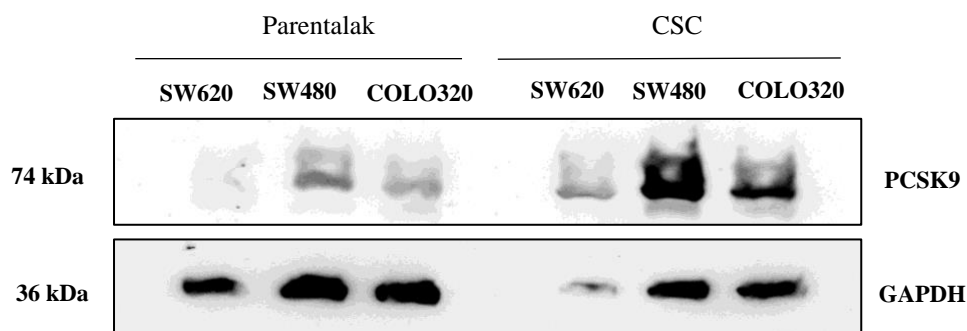
**3. taula: Proteinaren erauzketa eta kuantifikazioa.** SW620, CSC-SW620, SW480, CSC-SW480, COLO320 eta CSC-COLO320 zelula-lerroetatik erauzitako proteinen kontzentrazioak eta absorbantzia balioak ageri dira.

Laginak	Absorbantzia	Kontzentrazioa ug/uL
SW480 (P)	0,59	7,7
SW620 (P)	0,525	7,0
COLO320 (P)	1,132	13,9
SW480 (CSC)	0,448	6,1
SW620 (CSC)	0,523	6,9
COLO320 (CSC)	0,625	8,1

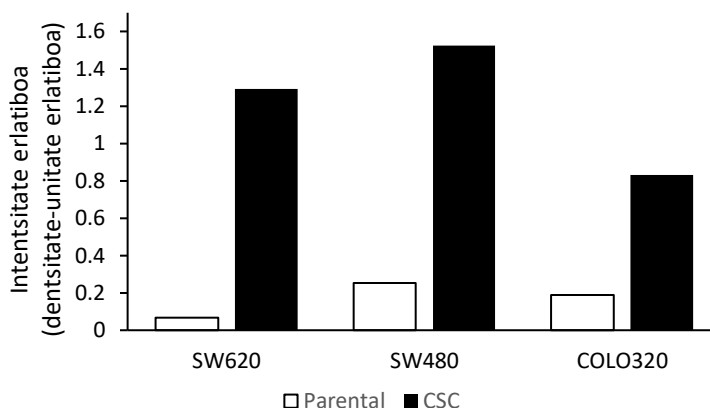
### 4.2.2. Western plapaketa

2. eta 3. irudietako datuek erakusten dute hiru zelula-lerroetan *PCSK9* proteinaren adierazpena altuagoa dela CSCetan zelula parentaletan baino. Bestalde, zelula parentalen kasuan, SW620ko zelulek erakusten dute *PCSK9* proteinaren adierazpenik baxuena; SW480 zelula-lerrokoek, berriz, altuena. Intentsitate

erlatiboak kalkulatu, bistakoa da zelula parentalen eta CSCen alderik txikiena COLO320 zelula-lerroan gertatzen dela, eta beste bi zelula-lerroetan ezberdintasuna antzekoa dela.



**2. irudia: PCSK9 proteinaren adierazpena altuagoa da CSCetan zelula parentaletan baino hiru-zelula lerroetan.** Giza kolon eta ondesteko zelula-lerroetatik erazitako proteinen Western plaketaren emaitzak ageri dira, eta bandak SW620, SW480, COLO320, CSC-SW480, CSC-SW620 eta CSC-COLO320 laginei dagozkie, hurrenez hurren. Emaitzak GAPDH kontrolarekiko normalizatu dira.

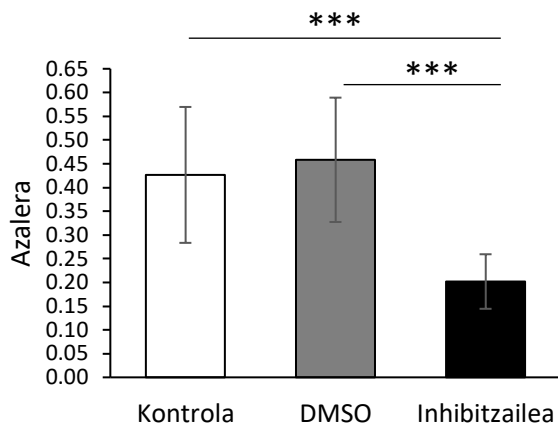


**3. irudia: CSCetan PCSK9 proteinaren adierazpena altuagoa da.** Giza kolon eta ondesteko zelula-lerroetatik erazitako proteinen Western plaketaren banden intentsitate normalizatuak ageri dira; zuriz, zelula parentalak, eta beltzez, CSCak. Zelula-lerro guztien kasuan, PCSK9 proteinaren adierazpena altuagoa da CSCetan parentaletan baino, eta parentalen artean SW480 lerroko zelulek adierazten dute gehien.

### 4.3. INHIBITZAILE KIMIKO BIDEZKO PCSK9ren ISILARAZPENA SW480 ZELULA-LERROKO ZELULA PARENTALETAN ETA CSCetan

#### 4.3.1. CSCek sortutako tumoroesferen tamainaren azterketa

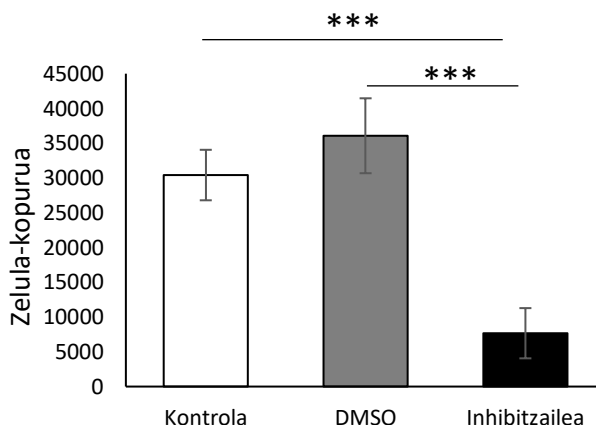
Ezer gaineratu ez zaien zelulen eta DMSO gaineratu zaien zelulen azalera oso antzeko da. Bi talde horiek inhibitzailea duten laginekin alderatzean, ordea, ikus daiteke alde nabaria dagoela; izan ere, lehen bi kasu horietan azalera 0,426 mm<sup>2</sup> eta 0,458 mm<sup>2</sup> da hurrenez hurren, eta inhibitzailearen kasuan, berriz, 0,20 mm<sup>2</sup>. Kontrol-DMSO, kontrol-inhibitzaile, DMSO-inhibitzaile taldeen arteko T-Student balioak, hurrenez hurren, 0,532, 2,785E-07 eta 9,703E-10 izan dira. CSCen argazkiak [3. eranskinean](#) daude.



**4. irudia:** inhibitzailearen presentzian CSC-SW480en azalera txikiagoa da. CSC-SW480 zelulen azalera neurtu da inhibitzailea gaineratu eta handik 6 egunera. Zuriz kontrola, grisez DMSO duten laginak eta beltzez DMSO+Inhibitzailea duten laginak ageri dira. Baldintza bakoitzean putzuko bosna argazki atera dira, eta ondoren azalaren batezbestekoa, desbideratze estandarra, errore estandarra eta T-Student balioak kalkulatu dira. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.3.2. XTT saioa

Zelularen bideragarritasunaren entseguko datuek erakusten dute, alde batetik, DMSO laginen eta kontrolaren artean alderik ez dagoela ( $p = 0,151$ ); eta, bestetik, gainontzeko taldeen artean aldea nabaria dela, kontrola-inhibitzaile ( $p = 6,332E-06$ ) eta DMSO-inhibitzaile ( $9,293E-06$ ). Bestalde, inhibitzailearen presentzian zelula-kopurua txikiagoa lortu da, besteekin alderatuz ia laurdena baino ez.



**5. irudia:** inhibitzailearen presentzian CSC-SW480 zelulen bideragarritasuna txikiagoa da. CSC-SW480 zelula-kopurua aztertu da 490 nm-an absorbantzia neurtuz. Zuriz kontrola, grisez DMSO duten laginak eta beltzez DMSO+Inhibitzailea duten laginak ageri dira. Zelula-kopuruaren batezbestekoa kalkulatzeko [4.eranskineko](#) zuzen-patroia erabili da. Behin datu horiek lortuta, desbideratze estandarra, errore estandarra eta T-Student balioak kalkulatu dira (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 5. EZTABAIDA

Egun, organismoak kodetutako proteinen aniztasuna areagotzen duten berrehun itzulpen osteko aldaketa baino gehiago ezagutzen dira. Aldaketa horietako batzuk, proteolisia kasu, itzulezinak dira, eta proteasa izeneko entzimek bideratzen dituzte erreakzio horiek. Entzima proteolitikoen artean daude serina proteasak, eta horien barruan proproteina konbertasak ([Seidah eta Prat, 2012](#)).

Ikusi da proproteina konbertasaren adierazpena edo jarduera asalaturik dagoela gizakien tumore ugarran, koloneko minbizian esaterako. Koloneko minbizian proteasa horiek duten garrantzi klinikoa, oro har, koloneko minbizi zelulen fenotipo gaiztoaren eta metastasikoaren eragile diren proteinak proteolitikoki aktibatzen duten gaitasunean oinarritzen da ([Sfaxi et al., 2014](#)). Edonola ere, SKI-1aren moduan, azkena aurkitu zen proproteina konbertasaren kasurako ez da deskribatu proteolisirako gaitasunik. Zehazki, PCSK9, NARC-1 izenez ere ezaguna, odoleko LDL-kolesterolaren homeostiaren erregulatzailea da, zelula-gainazaleko LDL-kolesterol hartzaileetara lotzean beroriek degradatzen baititu. Ondorioz, LDL-kolesterola ez da zeluletara sartzen, odolean geratzen da. LDL maila altuak hiperkolesterolemia eragiteaz gain, badirudi gibleko metastasiarekin ere baduela nolabaiteko lotura ([Seidah eta Prat, 2012](#)). Hortaz, konbertasa horrek giza kolon eta ondesteko minbiziarekin eta metastasiarekin loturarik izan dezakeen edo ez ikertzeko, eta loturarik balego, haren inhibizioa terapia-estrategia potentzial bihurtzeko, lan honen hari nagusia izan da, hain zuzen ere, gene zein proteina mailan PCSK9 proproteina konbertasaren adierazpena aztertzea zelula parentaletan zein CSCetan.

Gene zein proteina mailako PCSK9ren adierazpenak aztertuz, ñabardurak egonik ere, zenbait ondorio atera daitezke. qRT-PCRren emaitzak aztertuz ([1. irudia](#)), ikusi da SW480 zelula-lerroan salbu, gainontzeko zelula-lerroetan PCSK9ren adierazpena handiagoa dela CSCetan. Proteina mailan, aldiz, kasu guztietan, bai eta SW480 zelula-lerroan ere, PCSK9ren adierazpen altuagoa erakusten dute CSCek zelula parentalek baino ([2. irudia](#)). PCSK9 konbertasaren kasuan ez da deskribatu minbizi-zelulen fenotipo gaiztoen eta metastasikoaren eragile diren proteinak proteolitikoki aktibatzen duten gaitasunik, baina gai da zelula-gainazaleko hartzaile askoren jarduera erregulatzeko, hala nola, arestian aipaturikoen gain, dentsitate baxuko lipoproteinen hartzaileena (VLDLR) edota E apolipoproteinen bigarren hartzaileena (ApoE2). Bestalde, frogatu gabe egonagatik, Liu eta bere kideek 2020. urtean *Nature* aldizkarian argitaratutako artikuluan mahaigaineratu zuten konbertasa honek ere eragina izan dezakeela tumoreen aurkako immunologian garrantzitsuak izan daitezkeen mintz-proteinetan ([Liu et al., 2020](#)). Jakina, hori egiaztatzeko beharrezkoa izango da proproteina konbertasa honek zein molekulatan eragiten duen jakitea. Dena den, alde aurretik CSCak minbiziaren berragerpen, metastasi, heterogeneotasun eta kimioterapia- eta erradioterapia-tratamenduen kontrako erresistentziaren eragile direla onartuz ([Yu et al., 2012](#)), eta zelula horietan PCSK9ren adierazpena altuagoa dela ikusita, ondoriozta daiteke PCSK9k minbiziaren garapenarekin loturiko molekuletan eragina izan dezakeela.

Bestalde, zelula-lerro metastasikoak eta ez-metastasikoak alderatuz, pentsa daiteke proproteina konbertasaren adierazpena altuagoa dela zelula-lerro metastasikoetan. Dena den, qRT-PCR eta Western plaketaren emaitzek erakusten dute SW480 zelula-lerro ez-metastasikoko zelula parentalek zein CSCek SW620 lerrokoek baino gehiago adierazten dutela. Edonola ere, ikerketa gehiago egitea beharrezkoa litzateke; izan ere, dentsitate erlatiboaren grafikoari erreparatuz ([3. irudia](#)), nahiz eta lerro metastasikoan adierazpen baxuagoa lortu, parentalen eta CSCen artean alde nabarmena dagoela ikus daiteke, ia ezer ere ez adieraztetik, zerbait adieraztera pasatzen baita. Bestalde, lerro-metastasikoan,

qRT-PCRan behintzat, parentalen eta CSCen arteko aldea ez da esanguratsua. Hortaz, beharrezkoa litzateke, saioak lagin gehiagorekin errepikatzeaz gain, beste zelula-lerro batzuekin ere egitea.

Duela gutxi agerian geratu zen kolesterolaren metabolismoak garrantzia izan zezakeela minbiziaren aurkako immunoterapian; izan ere, Yang eta kideek frogatu zuten kolesterola esterifikatzen duen entzima baten inhibizioak, ACAT1renak alegia, T CD8<sup>+</sup> zelulen jarduera antitumoralak bultzatuz ditzakeela, T zelulen antigenoen hartzaileen taldekapenak handitzean. Halaber, odoleko kolesterol maila murrizteak T zelula adaptatiboetan oinarritutako minbiziaren aurkako immunoterapia indartu dezake eta, horrez gain, badirudi zelula-mintzeko kolesterolak funtsezko eginkizuna betetzen duela MHC-I molekulen birziklapenean ([Yang et al., 2016](#)). Gauzak horrela, azken urteotan zenbait ikerketa eraman dira aurrera PCSK9ren inhibizioak minbiziaren garapenean izan dezakeen eragina aztertzeko. Esate baterako, Li eta bere kideek hiperkolesterolemia tratatzeko merkaturatutako bi antigorputz monoklonal erabiliz, evolocumab eta alirocumab hain zuzen ere, PCSK9ren jarduera inhibitu zuten, eta frogatu zuten saguetan koloneko tumoreen garapena moteldu egiten zela. Badirudi, ordea, eragin horrek ez zuela loturarik kolesterolarekin; azaleko minbizidun zeluletako kolesterol hartzaileen geneak inhibituz, hazkundera ez baitzen murriztu. Aitzitik, egiaztatu zuten PCSK9ren inhibizioak eskuragarriago egiten dituela minbizidun zelulak immunitate-zelulen aurrean —T zelulak esaterako—, larruazaleko eta bularreko minbizi-zelulen gainazaleko MHC-I molekulen kopurua handiagotzen baitu. Hori horrela izanik, badirudi bi medikamentu horiek minbiziaren aurkako terapia potentzial izatera hel litezkeela, eta bistakoa da egun dauden tratamenduekin alderatuta zenbait abantaila dituztela, besteak beste, eskuragarritasunaren eta kostuaren ikuspuntutik ([Liu et al., 2020](#)).

Nolanahi ere, ikerketa horiek guztiak *in vivo* modeloetan oinarritu dira, sistema konplexuetan. Horregatik, lan honek ere izan du beste helburu bat: hiperkolesterolemia tratatzeko erabiltzen den farmako baten —klorhidratoa— bidezko inhibizioak, *in vitro* CSCen bideragarritasunean izan dezakeen eragina aztertzea. Farmakoak PCSK9 proteinaren adierazpena inhibitzeko erribosoma 34 kodoiaren inguruan gelditzera bultzatzen du ([Lintner et al., 2017](#)). CSCek sorturiko tumoroesferen azterketek zein XTT saioek (4. eta 5. irudiak) erakusten dute konbertasa honen inhibizioak eragina duela zelulen tamainan eta hazkunderan, lortu diren balioak estatistikoki esanguratsuak baitira. Hortaz, badirudi SW480 zelula-lerrotik eratorritako minbizidun ama-zeluletan, behintzat, konbertasaren inhibizioak tumoroesferen hazkundera murriztu duela. Emaitza horiek bat datoz beste ikerketa batzuetakoekin. Esaterako, 2015. urtean Piao eta bere kideek frogatu zuten PCSK9ren inhibizioak U251 zelula-lerroko zelulen ugartzea gutxitzen zuela; izan ere, Western plaketaren bidez ikusi zuten, alde batetik, c-kaspasa-3ren adierazpena igo egiten zela eta, bestetik, zenbait proteina anti-apoptotikoren adierazpena, XIAP-rena and p-Akt-rena alegia, jaitsi egiten zela ([Piao et al., 2015](#)). Nolanahi ere, zelula ezberdinak izanik, baliteke SW480 lerroaren kasuan proliferazioaren gutxitze horren atzean beste eragileren bat egotea. Horregatik, etorkizunera begira, oso garrantzitsua izango da, besteak beste, PCSK9ren substratuak zeintzuk diren zehaztea, haren inhibizioak izan ditzakeen ondorioak ezagut daitezten.



## 6. ONDORIOAK

Lan honen bidez frogatu da PCSK9ren adierazpena altuagoa dela hiru zelula lerroetako minbizidun ama-zeluletan zelula parentaletan baino. Ez da frogatu, ordea, zelula-lerro metastasikoan altuagoa denik ez-metastasikoan baino. Dena den, entseguak zelula-lerro bakar batean egin dira eta, gainera, ez dago argi SW480 lerroko zelulek zein puntutaraino ez duten metastasia sortzeko gaitasunik. Ondorioz, bistakoa da ikerketa gehiago egin beharko liratekeela, bai zelula-lerro gehiagorekin, bai lagin kopuru handiagoarekin. Bestalde, frogatu da PCSK9ren inhibizioak CSCek sortutako tumoroesferen tamainan eta bideragarritasunean eragina duela. Ondorioz, hipotesiarekin bat, ondoriozta daiteke PCSK9k izan baduela eragin zuzena kolon eta ondesteko minbizidun ama-zelulen jardueretan eta funtzioetan.

Emaitza horiek itxaropentsuak diruditen arren, abiapuntua besterik ez dira. Izan ere, ezin ahanztz daiteke PCSK9k molekula ugariaren erregulazioan parte hartzen duela eta, ondorioz, balitekeela haren inhibizioak esperotako ondorioez haratago, beste batzuk ere eragitea. Horregatik, beharrezkoa izango entseguen bidez hainbat zelula-lerrotan inhibizioak duen eragina aztertzea, bai eta lortutako emaitzak *in vivo* ere frogatzea. Oraindik lehen urratsak baino ez badira ere, dudarik gabe, arrazoi ugari daude minbiziaren aurkako terapia ez-inbaditzaile baten hastapena izan daitekeen ikerketa honi ekiteko. Lan honetan lehen helburuak baino ez dira bete eta, jakina, jomugara iristeko oraindik ere asko dira bete beharrekoak. Bide honetan funtsezkoa izango da minbizidun ama-zeluletan PCSK9k zein molekulatan eragiten duen jakitea, ezagutza hori izango baita, ezbairik gabe, aurrerapen terapeutikoen giltzarria.

## 7. ERREFERENTZIAK

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., eta Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>

Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., eta Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*, 65(23), 10946–10951. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2018>

Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A. N., Hotz, S., Van Belle, P. A., Xu, X., Elder, D. E., eta Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer research*, 65(20), 9328–9337. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1343>

Gerovska, D., García-Gallastegi, P., Descarpentrie, J., Crende, O., Casado-Andrés, M., Martín, A., . . . Badiola, I. (2021). Proprotein convertases blockage up-regulates specifically metallothioneins coding genes in human colon cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(3), 118912. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118912>

Koury, J., Zhong, L., eta Hao, J. (2017). Targeting Signaling Pathways in Cancer Stem Cells for Cancer Treatment. *Stem Cells International*, 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/2925869>

Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., . . . Wu, C. J. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152(4), 714–726. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.019>

- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Lintner, N. G., McClure, K. F., Petersen, D., Londregan, A. T., Piotrowski, D. W., Wei, L., . . . Cate, J. H. D. (2017). Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain. *PLoS Biology*, 15(3), e2001882. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001882>
- Liu, X., Bao, X., Hu, M., Chang, H., Jiao, M., Cheng, J., . . . Li, C. Y. (2020). Inhibition of PCSK9 potentiates immune checkpoint therapy for cancer. *Nature*, 588(7839), 693–698. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2911-7>
- Lopez de Munain, A. eta Audicana, C. (2019). Minbizia Euskal Autonomia Erkidegoa. Eusko Jaurlaritzaren Osasun Saila.
- Piao, M. X., Bai, J. W., Zhang, P. F., eta Zhang, Y. Z. (2015). PCSK9 regulates apoptosis in human neuroglioma u251 cells via mitochondrial signaling pathways. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(3), 2787–2794.
- Portillo, I., Idigoras, I., Bilbao, I., Hurtado, JL., Urrejola, M., Mentxaka, A., eta Hurtado, JK. (2020). Euskadiko kolon eta ondesteko minbiziaren baheketa-programa.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., eta De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature05384>
- Rich, J. N. (2016). Cancer stem cells. *Medicine*, 95(1S), S2-S7. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000004764>
- Scamuffa, N., Siegfried, G., Bontemps, Y., Ma, L., Basak, A., Cherel, G., . . . Khatib, A. M. (2008). Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1), 352–363. <https://doi.org/10.1172/jci32040>
- Seidah, N. G., eta Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(5), 367–383. <https://doi.org/10.1038/nrd3699>
- Sfafi, F., Scamuffa, N., Lalou, C., Ma, J., Metrakos, P., Siegfried, G., . . . Khatib, A. M. (2014). Repression of liver colorectal metastasis by the serpin Spn4A a naturally occurring inhibitor of the constitutive secretory proprotein convertases. *Oncotarget*, 5(12), 4195–4210. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1966>
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., eta Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- Sun, X., Essalmani, R., Day, R., Khatib, A. M., Seidah, N. G., eta Prat, A. (2012). Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Deficiency Reduces Melanoma Metastasis in Liver. *Neoplasia*, 14(12), 1122-IN5. <https://doi.org/10.1593/neo.121252>
- World Health Organization. Cancer. (2021). Berreskuratuta: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [2021/05/03]
- Yang, W., Bai, Y., Xiong, Y., Zhang, J., Chen, S., Zheng, X., . . . Xu, C. (2016). Potentiating the antitumour response of CD8+ T cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature*, 531(7596), 651–655. <https://doi.org/10.1038/nature17412>
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., eta Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2144–2151. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>
- Zhou, H. M., Zhang, J. G., Zhang, X., eta Li, Q. (2021). Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00430-1>
- Zimmer, C. (2021). How Many Cells Are In Your Body? Berreskuratuta: <https://www.nationalgeographic.com/science/article/how-many-cells-are-in-your-body> [2021/05/03]

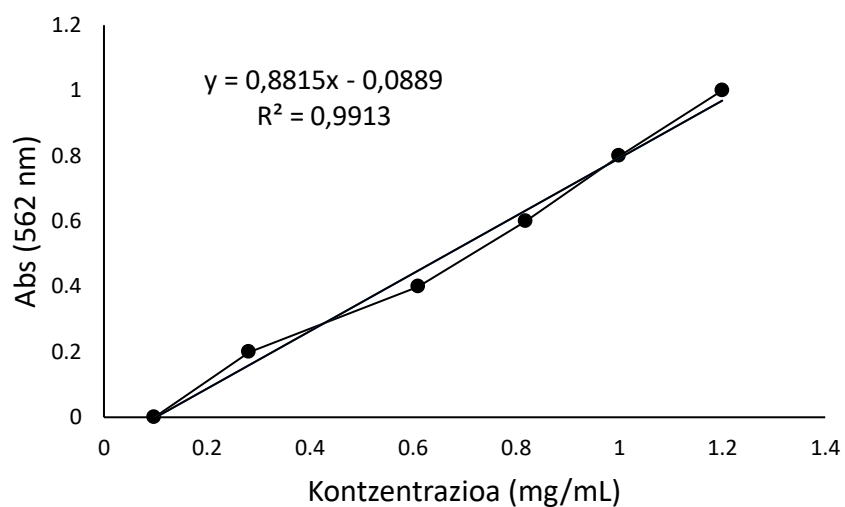
## 8. ERANSKINAK

### 1. ERANSKINA

**1. taula: PCRrako erabilitako hasleen sekuentzia eta tamaina.** PCR erreakzioetan aztertutako geneen, GAPDH eta PCSK9, hasleen aurreranzko —*forward*— eta atzeranzko —*reverse*— sekuentziak, bai eta horien tamaina ere.

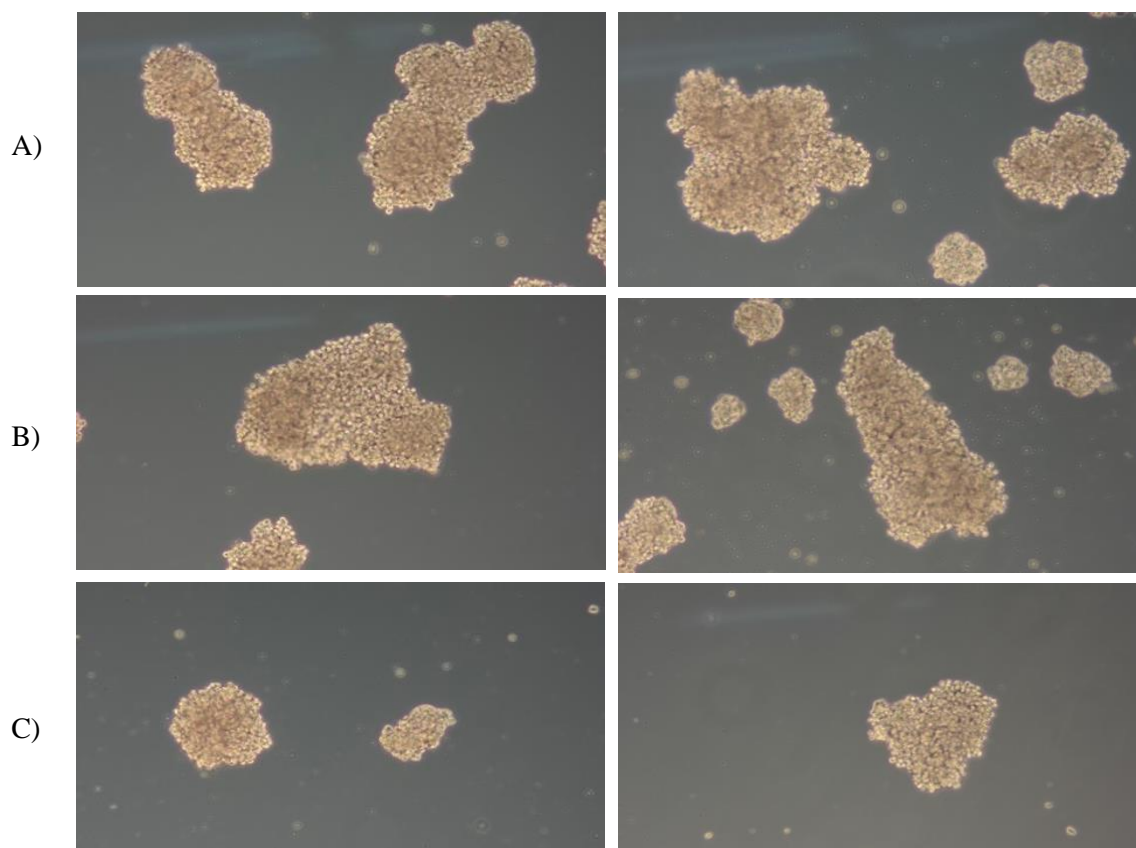
Hasleak	Sekuentzia	Hasleen tamaina
h-PCSK9 forward	5'-CACTCTGTATGCTGGTGTCTAG-3'	22
h-PCSK9 reverse	3'-TCTTCCTGGCTTCCTGGTGA-5'	20
h-GAPDH forward	5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'	22
h-GAPDH reverse	3'-GATCTCGCTCCTGGAAGATG-5'	20

## 2. ERANSKINA



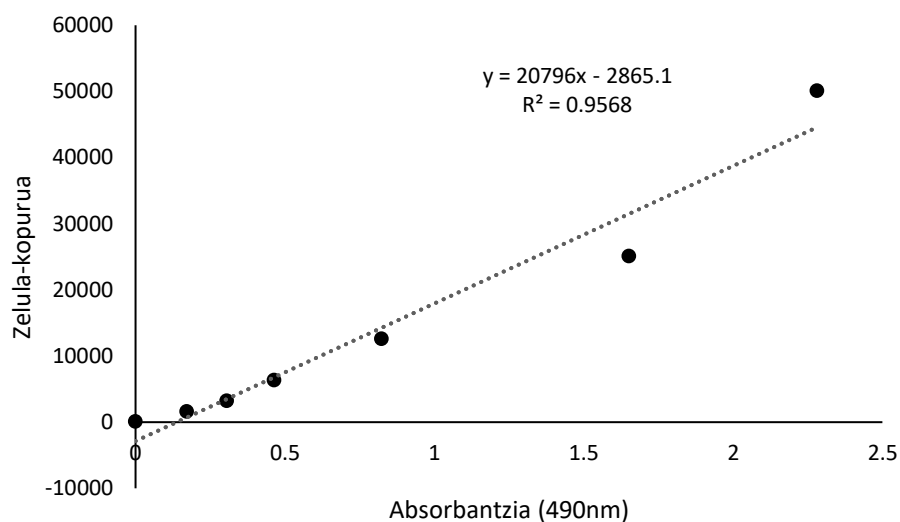
**1. irudia: azido bizinkoninikoaren zuzen-patroia.** Proteina-kontzentrazioa ebazteko eginiko azido bizinkoninikoaren teknikaren bidez lorturiko BSA kontzentrazioaren zuzen-patroia. 50  $\mu$ L bolumeneko 6 nahaste prestatu dira BSAREN eta H<sub>2</sub>O Milli-Qren bolumen gradualak erabiliz, eta lagin bakoitzari 1 mL azido bizinkoniniko eta CuSO<sub>4</sub> nahaste gaineratu zaio —50:1-eko erlazioan—. Absorbantzia 562 nm-ko uhin luzeran neurtu da *BIO-RAD SmartSpec Plus* espektrofotometroaren bidez.

### 3. ERANSKINA



**2. irudia: CSC-SW480 zelulen mikroskopia bidezko argazkiak (x10).** Inhibitzailea gaineratu eta handik 6 egunera Zeiss Primovert mikroskopia bidez hiru baldintzetako zelulen argazkiak atera dira: A) kontrola —inhibitzaile eta DMSOrik gabe—, B) DMSO —inhibitzailerik gabe— eta C) DMSO + inhibitzailea. Argazkiak Fiji/ImageJ bidez analizatu dira eta lortutako azaleren batezbestekoak [4.3.1. atalean](#) ageri dira.

#### 4. ERANSKINA



**3. irudia: SW480 zelulen zuzen-patroia.** CSCen zelula-kopurua kontzentrazioa ebazteko eginiko zuzen-patroia. Abiapuntua 10.000 zelula/putzuko izanik, diluzio seriatuak —1:2— prestatu dira —3 erreplika—, eta putzu bakoitzean XTT eta elektroli akoplamentuko nahastearen —50:1— 50  $\mu$ L gaineratu dira. Azkenik, absorbantzia neurtu da 490 nm-ko uhin-luzeran.