

Gradu Amaierako Lana / Final Degree Project  
Medikuntzako Gradua / Medical Degree

**9. motako subtilisina/kexina proproteina  
konbertasaren (PCSK9) inhibizioaren eragina  
koloneko minbizi-zelula ametan (MZA)  
/ Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9  
(PCSK9) inhibition effects on colon cancer  
stem cells (CSC)**

Egilea / Author  
**Rafael Gómez-Coronado**

Zuzendaria / Director  
**Iker Badiola Etxaburu  
Patricia Garcia Gallastegi**

© 2020, Rafael Gómez-Coronado Martín



## Laburpena

Minbizi-zelula amak (MZA) minbizi askoren erresistentziaren eta berragerpenen atzean daudela uste da, eta beraz, horiek aztertzea ezinbestekoa da etorkizunean tratamendu eraginkorrak sortzeko. Munduan minbiziak eragiten dituen heriotzetatik, kolon-ondestekoa bigarrena da maiztasunari dagokionez. Halaber, minbizi horren zelula parentaletan PCSK9k babes funtzioa duela frogatu da. Horrez gain, koloneko MZAetan PCSK9aren gainadierazpena ikusi da.

Ikerketa honetan, MZAen hazkuntzan PCSK9ak zer eragina duen aztertu nahi izan da. Horretarako CRISPR/Cas9 bidez PCSK9a erauzitako SW620 zelulak aztertu dira eta diluzio klonala egin ondorengo kolonia puruetatik abiatuz, zelulen edizioa PCR eta elektroforesiz bermatu da. Azkenik, PCSK9 gabeko SW620 zeluletatik MZAk sortu dira kolonosferak sortuz eta ondoren, horien proliferazioa aztertu da XTT saio kolorimetrikoa erabiliz.

Tamalez, ikerketa taldearen kontroletik haratago egon diren arazo logistikoek, ikerketa geldiarazi dute. Hala ere, egindako ikerketa bibliografikotik, hepatokartzinomaren PCSK9aren adierazpena aldarrikatu izan daitekeela ikusi da. Dirudienez, minbiziaren fase goiztiarretan PCSK9aren adierazpena gutxituta dago eta fase aurreratuetan ordea, handituta. Bestalde, talde honen aurreko ikerketan PCSK9rik gabeko kolon-ondesteko SW620 zelula parentaletan hazkuntza moteltzen dela ikusi bada ere, LDL aberatseko medioan edo PCSK9 aberatseko medioan hazteak izan ditzaken ondorioak aztertzearen beharra aldarrikatu da. Gainera, SW620 zelulen jatorri metastasikoak lortutako emaitzetan eragina izan dezakeela ere arrazoitu da. Azkenik, literatura zientifikoa eta ikerketa taldearen aurreko ikerketetatik abiatuz, MZAetan PCSK9 ezak hazkuntza moteldu beharko zuela teorizatu da. Hala ere, ikerketa gehiagoren beharra dago (*in vitro* zein *in vivo*) konbertasak minbizian dituen funtzio zehatzak aztertzeko, bai PCSK9ren portaera eta adierazpenean, bai zelula parental zein MZAetan.

**Gako-hitzak:** Minbizi-zelula ama (MZA), kolon-ondesteko minbizia, PCSK9, apoptosia, LDL metabolismoa, hepatokartzinoma.

**Abstract**

Cancer stem cells (CSCs) are an important reason for the resistance to treatment and recurrence of many cancers. As such, studying CSCs is essential to create effective future treatments. Colorectal cancer (CRC) causes many deaths, ranking second when taking stock of worldwide cancer deaths. In CRC, PCSK9 has been linked to increased survival. Moreover, an overexpression of PCSK9 has been observed in CSCs.

This study set out to analyse the impact of PCSK9 on the growth of the CSCs. To do this, SW620 cells were used and PCSK9 was deleted using CRISPR/Cas9. After obtaining pure colonies through clonal dilution, we verified that PCSK9 had been deleted using PCR and electrophoresis. Finally, after we developed colonospheres to create CSCs from the edited PCSK9 SW620 cells, growth was analysed using the XTT colorimetric assay.

Unfortunately, for logistical reasons beyond our control, we had to halt the investigation. Nevertheless, we theorise, based on the bibliographic study we carried out, that PCSK9 expression in hepatocarcinoma may vary from early stages to advanced stages of cancer. In early stages, PCSK9 expression seems to be decreased; whereas in advanced stages, PCSK9 seems to be overexpressed. In addition, we claim that the effects of PCSK9-deleted colorectal parental cells should be monitored in an LDL-enriched medium or in a PCSK9-enriched one to find out whether growth halts, as previously reported. We also find out that the metastatic origin of the SW620 parental cells could have influenced those results. Finally, based on the existing literature and data from previous studies, we theorise that non-PCSK9 CSCs' growth should have been impeded if the investigation would have been concluded. Nevertheless, the exact function of the convertase in cancer needs further study (in vitro and in vivo) to account for PCSK9's varying behaviour and expression in both parental cells and CSCs.

**Keywords:** Cancer Stem Cell (CSC), colorectal cancer (CRC), PCSK9, apoptosis, LDL metabolism, hepatocellular carcinoma (HCC).



## ESKER ONAK

Eskerrak eman nahi dizkiot, bereziki, Iker Badiola doktoreari, lana bideratzen, zuzenketak egiten eta galdera guztiak argitzen igaro duen denbora guztiagatik. Bera gabe lan hau ez litzateke posiblea izango. Patricia Garciari ere eskerrak eman nahi dizkiot, egin duen laborategiko lanagatik, hasierako laguntza guztiagatik eta lana borobiltzeko egindako azken zuzenketengatik.

Eskerrik asko



## AURKIBIDEA

<b>1. SARRERA.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. MINBIZIA .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Okertu diren zelulak.....	1
1.1.2. Kolon-ondesteko minbizia .....	2
<b>1.2. MINBIZI-ZELULA AMAK .....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Minbizi-zelula amen hierarkia eredu .....	7
1.2.3. Minbizi-zelula amen biziraupena .....	9
<b>1.3. PROPROTEINA KONBERTASAK .....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Bederatzi proproteina konbertasa mota daude .....	11
<b>1.4. PCSK9.....</b>	<b>13</b>
1.4.1. PCSK9aren historia.....	13
<b>1.5. PROTEINA KONBERTASAK ETA MINBIZIA.....</b>	<b>17</b>
<b>1.6. PCSK9 ETA MINBIZIA .....</b>	<b>18</b>
<b>2. HIPOTESIA ETA HELBURUAK .....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIALAK ETA METODOAK.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. ZELULEN MANTENUA ETA HAZKUNTZA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. CRISPR/CAS9.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. PUROMIZINA PLAKETAN ZELULEN HAZKUNTZA.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4. DILUZIO KLONALA .....</b>	<b>28</b>
<b>3.5. DNA-REN ERAUZKETA .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6. PCR .....</b>	<b>29</b>
<b>3.7. ELEKTROFORESIA .....</b>	<b>30</b>
<b>3.8. KOLONOSFERAK.....</b>	<b>31</b>
<b>3.9. PROLIFERAZIOAREN AZTERKETA .....</b>	<b>32</b>
<b>4. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK .....</b>	<b>33</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>41</b>



## 1. SARRERA

### 1.1. MINBIZIA

Minbiziaren intzidentzia handitzen joan da XXI. mendean, aldaketa demografikoak eta arrisku faktoreekiko esposizioen handipenak bideratuta. Eusko Jaurlaritzaren Osasun Sailak aipatzen duenez, 2013-2017 bosturtekoan, minbiziaren ondorioz 30.835 biztanle hil ziren Euskal Autonomia Erkidegoan, horrek, batez beste, 6.167 heriotza dakartza urtero (3.763 gizon eta 2.404 emakume). Izan ere, biztanleriaren heriotza-kausa nagusia da, % 29,6 alegia. Batez besteko hori gizonen kasuan handiagoa da (% 35,7). Emakumeetan ordea, txikiagoa (% 23,2) da, horietan bigarren heriotza-kausa bilakatuz (zirkulazio-aparatuaren gaixotasunen atzetik) (1).

#### 1.1.1. Okertu diren zelulak

Minbizi-zelulak hazkuntza eta heriotza kontrolatzen duten seinaleei erantzuten ez dioten zelulak dira, eta hortaz, etengabe zatitzen direnak, zeinak, gainera, heriotzari ihes egiten dioten. Izan ere, hazkuntza erregulatzen duten zenbait geneetan mutazioak gertatzen direnean tumore zelula bilakatzen dira, baina prozesua abiarazi duen mutazioaren identifikazioa askotan ezinezkoa da. Adibidez, Minbizi Genoma Proiektuan 60 mutazio baino gehiago aurkitu ziren minbizi-zeluletan. Ulegarria da, hortaz, hainbeste mutazioen atzean zelula horien hazkuntza eragin duen genearen edo geneen identifikazioa zaila izatea. Hala ere, eta minbizi-zelula bakar bat 60 mutazio izatera heldu daitekeen arren, badaude nahiko ezagunak diren eta prozesu tumoralean abiarazleak diren hainbat gene. Horietatik hazkuntza promotorea den *RAS* genea (proto-onkogenea) edo tumore-ezabatzailea den *p53a* oso garrantzitsuak dira, minbizi askotan mutatuak ikusi direlako eta tumore askoren sorkuntzaren erantzuleak direla uste delako. Beraz, guzti hori kontuan izanda, minbizia gaixotasun genetiko delako argi dago (kontuz, genetiko ez baita heredagarriaren sinonimoa) (2).

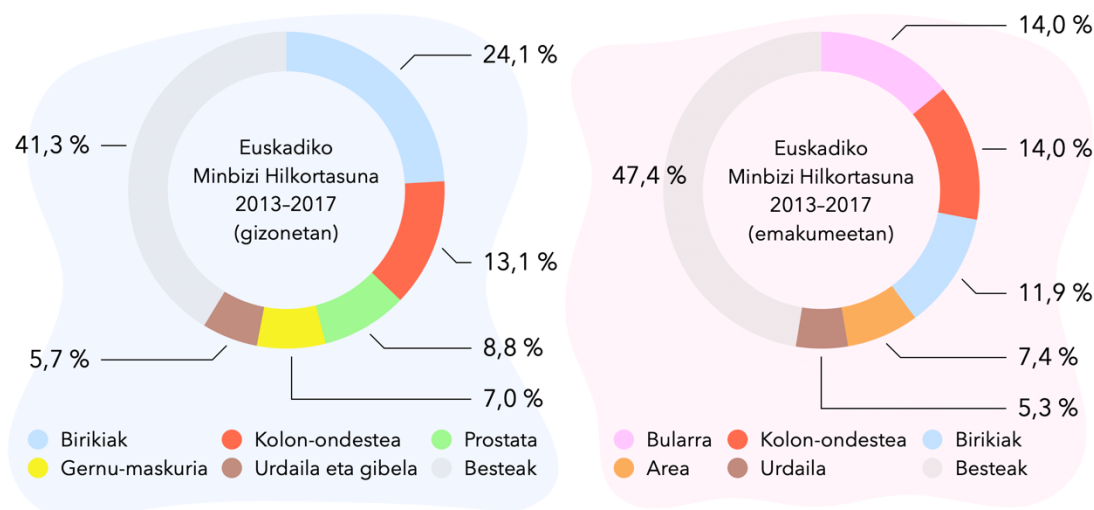
Behin mutazioa gertatzen dela, “mikroeboluzioa” bezala deskribatu den prozesua hasten da, zeinaren azkenengo pausua normalean metastasia (metastasia leku berria esan nahi du) den (2).

Prozesu hori dela medio, ezagutzen diren 100 minbizi mota baino gehiago sortzen dira, eta horien izendapena normalean jatorrizko organo edo ehunetik dator (3). Alabaina, aurrerago ikusiko denez, azkenengo urteetan prozesu hori azaltzeko teoria berriak indarra hartzen hasi dira.

### 1.1.2. Kolon-ondesteko minbizia

Munduko Osasun Erakundearen arabera (MOE), 2018an, kolon-ondesteko 1.849.518 (% 10,2) minbizi kasu berri diagnostikatu ziren munduan, maiztasunari dagokionez hirugarrena izanik (biriketako eta bularretakoak lehenengo eta bigarren postuan jarri ziren hurrenez hurren). Alabaina, minbiziz hil ziren pertsonak aztertuz gero, kolon-ondesteko minbizia bigarrena da. Hala, hildako kopurua 880.792ra (% 9,2) heldu zen gainerako minbiziekin (lehenengo postuan biriketako minbizia) konparatuz gero (4).

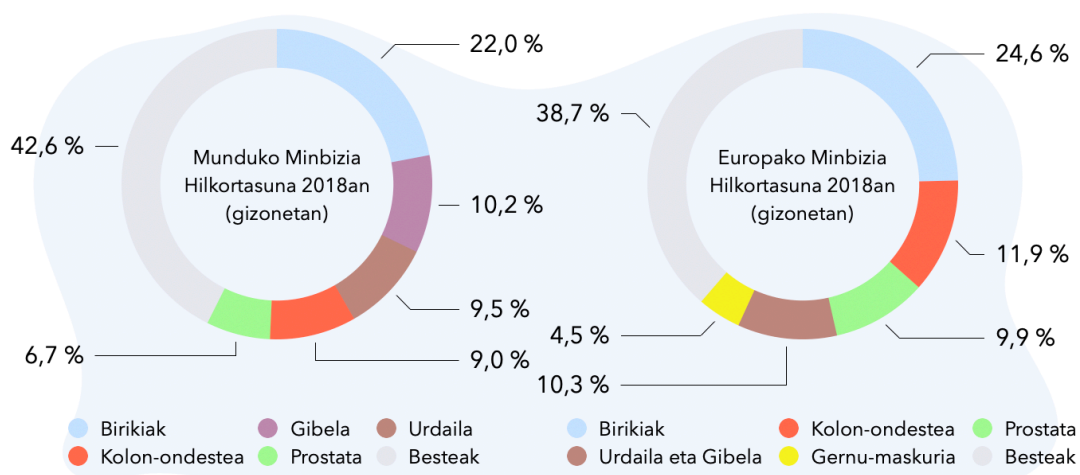
Sexuari dagokionez, Euskal Autonomia Erkidegoan, gizonetan biriketako minbizia da (% 24,1) heriotza gehien eragiten dituen, ostean kolon-ondestekoa dagoela (% 13,1). Emakumeetan aldiz, bularreko minbizia (%14,0) ohikoena da, eta ondoren, kolon-ondestekoa (% 14) kokatzen da (1) **(1. Irudia)**.



**1. Irudia. EAEko sexuaren araberako minbizia hilkortasuna.** Gizonetan kolon-ondesteko minbizia bigarrena da hilkortasun maiztasunari dagokionez (% 13,1), baita emakumeetan ere (% 14,0).

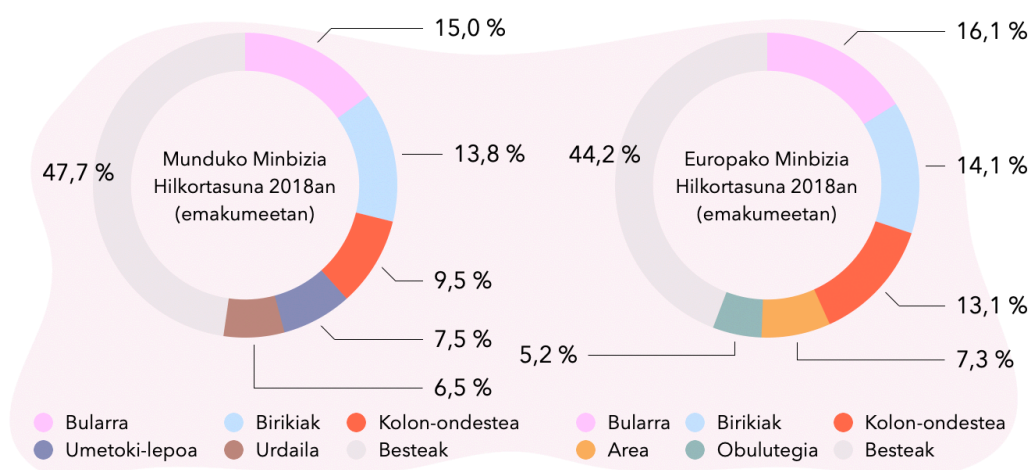
MOEren (2018) datuen arabera, Europako gizonen minbizien hilkortasun maiztasunei erreparatuz gero, kolon-ondestekoa bigarrena da (% 11,9), biriketako minbiziaren atzetik (% 24,6). Emakumeen mundu mailako datuetan aldiz, kolon-ondestekoa

laugarren postuan kokatzen da (% 9), biriketako (% 22), gibealeko (% 10,2) eta urdaileko (% 9,5) minbizien atzetik (4) **(2. Irudia).**



**2. Irudia. Munduko eta Europako minbizia hilkortasuna gizonetan.** Munduan, kolon-ondesteko minbizia hirugarrena da hilkortasuna begiratzuz (% 9) gero eta European ordea, bigarrena (% 11,9). Bi kasuetan biriketako minbizia da mortalitate handiena duena, bai munduan (% 22) zein European (% 24,6). Mundu mailan, ordea, gibealeko minbizia (% 10,2) bigarrena da hilkortasunari dagokionez.

MOEren (2018) datuekin jarraituz, Europako emakumeetan, hilkortasuna hirugarrena kokatzen da (% 13,1), bularreko (% 16,1) eta biriketako (% 14,1) minbizien atzetik. Mundu mailan ere, hirugarrena da hilkortasunari dagokionez (% 9,5), bularreko (% 15) eta biriketako (% 13,8) minbizien atzetik (4) **(3. Irudia).**



**3. Irudia. Munduko eta Europako minbizia hilkortasuna emakumeetan.** Munduan, kolon-ondesteko minbizia hirugarrena da hilkortasuna begiratzuz gero (% 9,5) eta European, hirugarrena da ere (% 13,1). Bi kasuetan, bularreko minbizia da hilkortasun handiena duena, bai munduan (% 15) zein European (% 16,1). Horren atzean, bai mundu zein Europa mailan, biriketako minbizia dago, % 13,8ko eta % 14,1eko hilkortasunarekin hurrenez hurren.

#### 1.1.2.1. Arrisku faktoreak

Gizona izateak eta adinak gaixotasunaren intzidentziarekin erlazio estua daukate. Hala ere, herentziazko zein ingurugiroko eragileak ere garrantzizkoak dira kolon-ondesteko minbiziaren garapenerako (5). Herentziari dagokionez, kolon-ondesteko minbizidun pazienteen % 10-20ak historia familiarra duela ikusi da (6).

Bestalde, ingurugiro eragile aldakor asko daude minbizi mota horrekin erlazionatuta, hala nola, erretzea, alkoholaren kontsumoa, obesitatea edota haragi gorri eta prozesatuen gehiegizko kontsumoa (5) (**4. Irudia**).

#### 4. Irudia. Kolon-ondesteko minbizi

**garatzeko arrisku faktoreak.** Gorriz, arriskua handitzen duten arrisku faktoreak eta berdez, babesa ematen dutenak. Bestelakoak titulua duten eta berdez agertzen direnak, babes faktoreak diren zalantzan dago. Izan ere, zenbait ikerketa babesa ematen dutela esaten badute ere, beste batzuek zalantzan jartzen dute hori horrela izatea (5) (E. Dekker et. al-etik moldatua).

##### Herentziazko faktoreak

- Kolon-ondesteko minbizi sindrome heredagarriak
- Aurrekari familiarrak

##### Bestelakoak

- Aspirina edo AINE-ak
- Menopausian hormonoterapia
- Estatinak
- Etnia
- Gizona
- 2. motatako diabetesa
- Hesteetako gaixotasun inflamatorioa (HGI)

##### Arrisku faktore aldagarriak

- Erretzea
- Haragi prozesatua
- Alkohol kontsumoa
- Haragi gorria
- Fruitu eta barazki gutxi jatea
- Gorputzeko gantza eta obesitatea

##### Arrisku faktore aldagarriak

- Ariketa fisikoa
- Bihi osoko zerealak
- Zuntzeko dieta
- Esnekiak
- Arrainaren kontsumoa
- Hiru intxaur
- Bitaminak (D, C, etab.)
- Kaltziozko gehigarriak

#### 1.1.2.2. Patogenesisia

Minbizi gehienak polipo batetik hasten dira, eta aldi berean, polipoa sortzeko prozesua kriptak aberrante batekin hasten da, neoplasikoa den aitzindaria bilakatuko dena (polipoa). Hori 10-15 urte inguru ondoren kolon-ondesteko minbizia bilakatuko da. Kolon-ondesteko minbizi gehienek abiapuntua minbizi-zelula ama edo zelula ama antzekoa den zelula da, zeinak aldaketa genetiko eta epigenetikoei esker, lehen azaldu diren onkogeneen aktibazioa eta gene tumore-supresoreen inaktibazioa eragiten ditu. Minbizi-zelula ama horiek kripten oinarrian kokatzen dira eta tumorearen progresioaren eta iraunkortzearen arduradunak dira (7) (8).

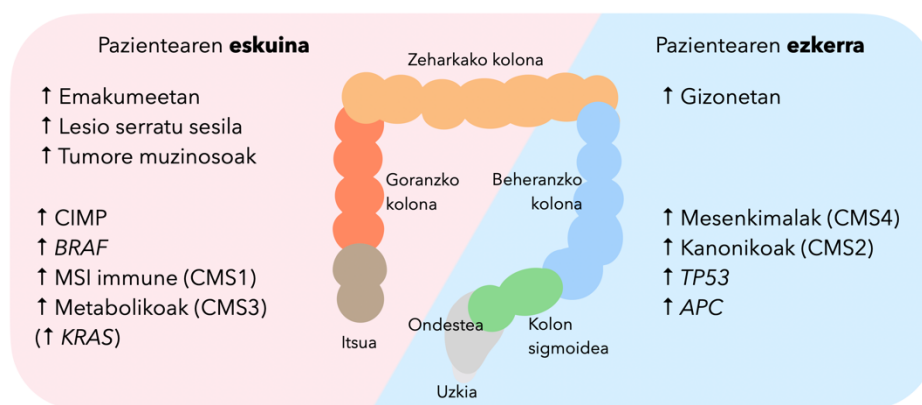
Oro har, hiru prozesu aitzindari desberdintzen dira: alde batetik adenoma-kartzinoma bidea (kolon-ondesteko tumoreen % 70 bide hori jarraituz osatzen da) eta adenoma zerratuaren bidea daude, zeinetan aldaketa genetiko eta epigenetiko sekuentzialak



gertatzen diren. Lehenengoa *RAS* aktibazioarekin edo *TP53* funtzio galerarekin erlazionatu da. Bigarrena ordea, *RAS* eta *RAF* mutazioekin eta ezegonkortasun epigenetikoarekin erlazionatu da, hau da, CpG irlen metilazioarekin (CIMP). Horrek mikrosatelite egonkor eta ezegonkorreko minbiziak sortzen ditu, eta, azkenengo hori da, hain zuzen ere, aipatutako bideetatik hirugarrena. Gauzak horrela, kolon-ondesteko minbiziak mikrosatelite egonkorreko edo ezegonkorreko minbiziak bezala ere sailka daitezke (9).

### 1.1.2.3. Eskuineko eta ezkerreko minbizia

Eskuineko (hurbileko) koloneko eta ezkerreko (urrutiko) kolon eta ondesteko minbizien ezaugarri molekularrak aztertuta, ezberdintasun ugari daude, enbriologikoak, biologikoak eta anatomikoak diren desberdintasunez gain (**5. Irudia**). Gainera, metastasia aztertzerakoan kokapena ere garrantzitsua da. Izan ere, kolon-ondesteko atal bakoitzean dauden mutazio espezifikoek tratamendu farmakologikoa zehaztu dezakete. Tratamendu horien artean, anti-EFGR farmakoa dago, zeinaren eragina ezkerreko aldeko minbizietan askoz ere eraginkorra den (10).



**5. Irudia. Ezkerreko eta eskumako kolon-ondesteko minbizien arteko desberdintasunak.** Irudian kolon-ondesteko atal desberdinak ageri dira. Kontuan hartu behar da zeharkako koloneko bi heren eskumako aldekoak kontsideratzen direla. Orokorrean eskuma aldeko tumoreak pronostiko txarrago batekin erlazionatu dira, bereziki metastasi aldiari. Laburpenak; MSI: Mikrosateliteen ezegonkortasuna. CIMP: CpG irlen metilazioen fenotipoa. CMS: Kolon-ondesteko minbizia azpimoten adostutako sailkapena (Dekker E, et al-etik moldatua) (5).

## 1.2. MINBIZI-ZELULA AMAK

Tumoreak zelula bakar batetik sortzen diren arren, bere hazkuntza prozesuan zelulak modu desberdinean zatitzen dira, azkenean azpipopulazio desberdinez eratutako masa

heterogeneo bat sortzen duten arte. Azken urteetako ikerketak, populazio horren azpipopulazioaren zelula mota batean sakontzen hasi diren arren, jada 1970. urtean, leuzemia akutu mieloblastiko (LAM) batean, minbizi-zelula ama (MZA) deritzona deskribatu zuten lehenengo aldiz, geroago tumore solidoetan aurkitu zena (11).

Horren harira, garai hartako ikertzaileek aurkitu zutena aipagarria da. Izan ere, odoleko minbizi-zelula guztiak *in vitro* eta *in vivo* minbizia sortzeko gaitasun berdina ez zutela ikusi zuten. Hala, mieloma eta leuzemiaren kasuan, milioi bat zelula baino gehiago ezarri behar izan zituzten minbizia garatzeko (12). Efikazia txiki horren zergatiaren inguruan bi teoria agertu ziren: minbizi-zelulak potentzial txikia zutela minbizia edo metastasia sortzeko edota minbizi-zelulak heterogeneoak zirela eta tumoreen barnean minbizia edo metastasia sortzeko gaitasuna zuen populazio txiki bat zegoela (13).

Azken hori da gaur egun garrantzia hartu duen teoria, zeinean MZAk azpipopulazio hori sortzen duten. Aipatzekoa da ere, horri minbizi-zelula amen (MZA) modelo hierarkizatua deritzola eta, garai horretara arte eboluzio klonalaren teoria zela minbiziaren patogenesia azaltzeko onartuen zegoen teoria (14).

MZA zer den hobeto ulertzeko, zelula amen antzekoak direla jakin beharra dago, desberdintzapen prozesuan atzera egin duten zelulak baino ez direla azken finean. Hain zuzen ere, definizioz, baldintzak egokiak badira, edozein zelula espezializatueta desberdintzeko gaitasuna duten eta auto-berritze prozesua gauzatzeko gai diren zelulak dira zelula amak, zeinak gainera, beraien potentzialaren arabera, totipotenteak, pluripotenteak, multipotenteak eta unipotenteak izan daitezke. Potentzial horiek, preseski, garrantzitsuak dira geroago azalduko den MZAen hierarkia eredua hobeto ulertzeko.

MZAen aurkikuntza, hortaz, iraultzailea izan da tumore prozesuak ulertzeko, eta gainera, klinikoki ulergaitzak diren hainbat adierazpenei erantzuna ematen dio. Beraz, kimioterapia edota erradioterapia tratamendu arrakastatsu baten ondoren minbiziaren berragertzeari, metastasiaren agerpenari, tumoreen latentziari edota minbiziaren aurkako tratamenduen erresistentziari erantzuna ematen dio teoria horrek. Izan ere, MZAen auto-berritze gaitasunak, epe-luzeko biziraupen klonalak eta beraien biziraupena bermatzen duten bestelako defentsa mekanismoek (15), ohiko minbiziaren aurkako terapietikiko erresistentzia eta jatorrizko tumorearekiko desberdinak diren

bigarren mailako edo metastasikoak diren tumoreak sortzeko gaitasuna ematen diote besteak beste (16) (17) (18).

### 1.2.1. Minbizi-zelula amen hierarkia eredua

Eredu horren arabera, genetikoki desberdinak diren MZAen azpi-klonak, ezarritako hierarkia bat jarraituz, minbiziaren gainerako zelulekin elkar bizi eta hazteko gaitasuna dute, minbiziaren heterogeneotasuna handituz (19).

MZAen eredu hierarkizatuaren 4 oinarriak hurrengoak dira (20):

1. Tumoreetako heterogeneotasunaren zati handi bat antolamendu hierarkizatu batetik dator, zenbaitetan jatorrizko ehunarekiko oso antzekoa dena.
2. Hierarkia hori MZAk sustatzen dute, baina tumorearen zati handiena MZAk ez diren zelulak osatzen dute, proliferazio iragankorra baino egiteko gaitasuna ez dutenak eta epe luzeko hazkuntzan parte hartzen ez dutenak.
3. MZAen identitatea programaturik dago. Izan ere, MZAk ez diren zelula tumoralen xenotxertaketetan, oso gutxitan tumoreak sortzen direla argi dago. Beraz, plastikotasun murriztua dago hierarkian.
4. MZAk ohiko erradioterapia eta kimioterapiarekiko erresistentea da, terapia horiek, normalean, MZAk ez diren zelulak baitituzte itu bezala. Horrek berrerortzea azal dezake.

Beraz, MZAen hierarkiaren ereduaren arabera, hainbat motatako zelula amak daude tumore batean (21) **(6. Irudia)**. Horretan zelula ama enbrionarioak (ZAE) dira primitiboenak, auto-berritzeko gai direnak eta pluripotenteak kontsideratzen direnak (22). Horren azpian, bestelako zelula ama multipotenteak daude, horietako batzuk: zelula ama neuronalak (23), zelula ama endotelialak (24) edota zelula ama hematopoietikoak dira, besteak beste (25). Zelan guzti horiek hierarkia honetan ZAEk baino beherago kokatzen diren, multipotenteak kontsideratzen dira pluripotenteak beharrean (23), eta beraz, gaitasun murriztuagoko zelulak. Era berean, multipotenteak diren zelula horietatik sortzen diren zelulak, hierarkian beherago dagoen beste talde batean kokatzen dira, desberdintzapen gaitasun mugatuagoa baitute (21). Terminologia aldetik ere kontuz ibili behar da, minbizi-zelula ama eta aitzindaria/guraso (progenitor) askotan nahasten baitira eta aipatu bezala, hierarkia zein biologia desberdineko bi zelula mota dira.

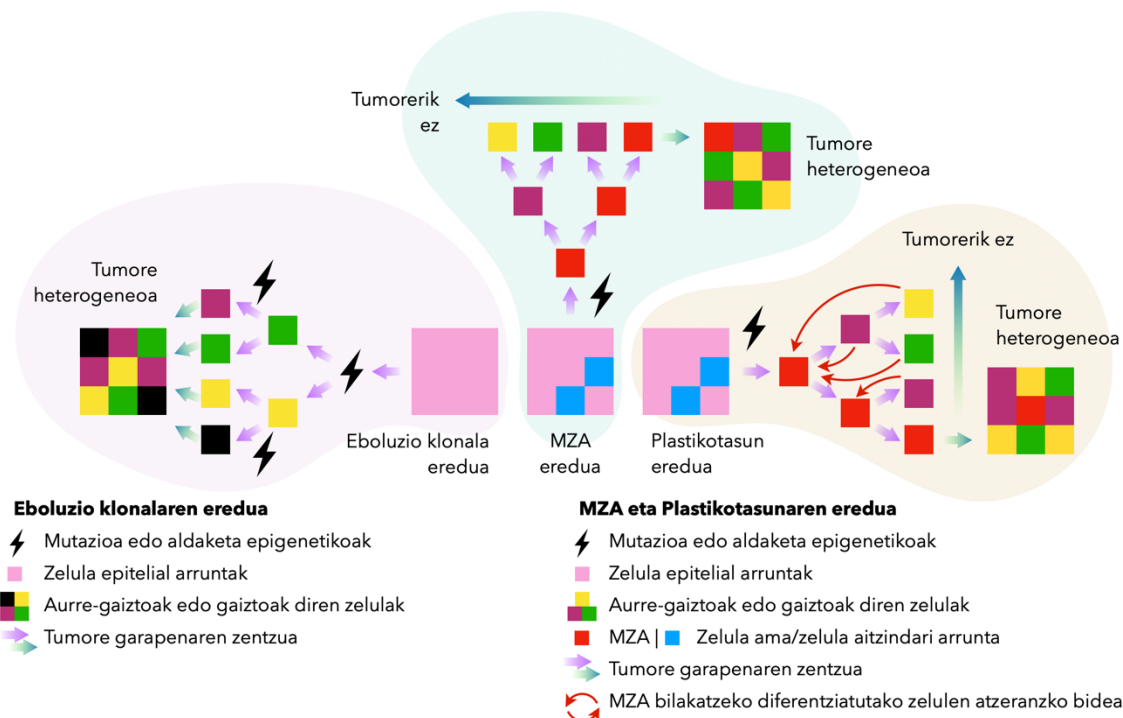
**6. Irudia. MZA neuronaletan proposatu den hierarkia eredua** (21) (23). Minbizi-zelula amen (MZA) hierarkia ereduak, minbizien jatorria MZA bat dela proposatzen du. Kasu honetan MZA hori zelula ama enbrionarioa (ZAE, laranja) da, pluripotentea eta auto-berritzeko gaitasuna duena, eta beraz, tumoreak sortzeko gaitasun handia duten zelulak dira. Zelula horiek asimetrikoki zatitzen dira eta zelula horietatik tumore masak sortzen joaten dira. Hala, hierarkia osatuko duten oinordetza sortzen joango da, zeinak desberdintzen joaten diren heinean gaitasunak gero eta mugatuagoak izango dituzten (horiz, berdez eta urdinez). Azkenean, tumoreak sortzeko gaitasun gutxiko desberdintzapen altuko zelulak sortzen dira (morez) (21) (Irudia Bradshaw eta kolaboratzaileetatik moldatua).



Eredu horrek, MZAk, zelula ama enbrionario arruntan (ez tumoralen) mutazioetatik edo zelula aitzindarien mutazioetatik sortzen direla proposatzen du. Mutazioak jaiotzetik edo denboran zehar metatzen joaten dira, eta, era horretara, kontrolik gabeko hazkuntza eta sakabanatze gaitasuna duten zelulak sortzen dira. Hala ere, zenbait ikerketetan MZAk bestelako zeluletatik sortzeko gaitasuna dutela ere ikusi da, epigenetikoak edo ingurune faktoreek eragindako aldaketengatik. Ikus daiteke, beraz, tumoreen biologia eta tratamenduan konplexutasun handia sortzen duela horrek. Ikerketa horiek, proposatutako hierarkia ereduak, gaur egun arte ezaguna izan den eboluzio klonalaren teoriarekiko bateraezina ez dela erakusten dute, MZAk eboluzio klonalaren ereduaren ikuspuntutik ere sortu baitaitezke (21).

Hori guztia kontuan izanda, hiru teoria nagusi proposatu dira. MZAen ereduak (**hierarkikoa**), zeinean tumore heterogeneotasuna MZAetik abiatzen den. Eboluzio klonalaren ereduak (**estokastikoa**), zeinean minbizi heterogeneotasuna zelulen mutazio pilaketan ondorioz gertatzen den. Eta azkenik, **plastikotasunaren** eredu bezala ezagutzen dena, zeinean aurreko bi ereduaren bateragarritasuna kontuan hartzen den. Plastikotasunaren ereduaren arabera, desberdintzapen prozesua noranzko bi dauka. Izan ere, tumore zelulen barne prozesu edota mikroingurunearen eraginak zelula

desberdintzatuak MZAen ezaugarriak izatera eraman ditzake, eta, kontrara, prozesu horiek, MZAk zelula amak izateari uztera eraman ditzake. Beraz, atzeranzko zein aurreranzko urratsak eman daitezke (26) (7. Irudia).



**7. Irudia. Proposatutako tumore sorkuntza eta garapenaren hiru ereduek: Eboluzio klonala, MZAen hierarkia eredua eta Plastikotasunaren eredua.** Eboluzio klonalaren ereduan mutazioen metaketaren ondoriozko tumorearen garapena irudikatzen du. MZAen hierarkia ereduek zelula ama edo aitzindari baten aldaketa epigenetiko edo mutazio batetik abiatuz, MZAk sortzen dira eta horiek tumore prozesua abiarazten dute. Plastikotasunaren ereduek MZAen hierarkia eredua jarraitzen du baina MZAen ondorengoetan mutazioak desberdintzapena ere gauzatu dezakeela irudikatzen du, prozesuan atzera eginez (26) (Rich JN-tik moldatua).

### 1.2.3. Minbizi-zelula amen biziraupena

Gaur egungo immunitatearen zaintzaren teoriaren arabera, gure sistema immunea minbiziaren aurkako lehenengo lerroko defentsa da. Baina gure immunitate sistemaren zahartzeaz gain, horren immunogenikoak ez diren edota immunodepresoreak diren MZAen azpi-klonak sortzen direnez, minbizi-zelulak defentsa horretatik ihes egin dezakete (27). Sistema immunetik ihes egiteko mekanismoen artean, hurrengoak dira aipagarrienak (28) (29) (30):

1. MZAk MHCI-aren azpierreulazioaren bitartez edo adierazpen faltaren bitartez sistema immunetik ihes egiten dute. Izan ere, immunoaktibatzailea den MHC-Ia

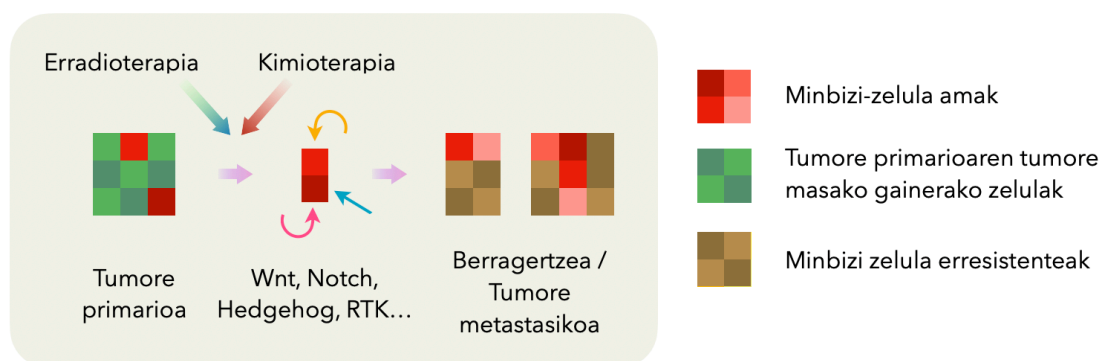
(HLA A-C) gutxitu egiten dute immunosupresorea den MCH-Ib (HLA E-G) handitzen duten bitartean.

2. MHCII-aren eta koestimulatzailerak diren CD40, B7-1 eta B7-2-ren supresioa ere eragiten dute.
3. Minbizi-zelulek Natural Killer-rentzako (NK) ligandoa faltan dute eta gainera, NK inhibizio-ligandoaren (HLA-G) adierazpena handituta dute.
4. M2 makrofagoen polarizazioa eta aktibitate fagozitikoa inhibitzen dute.
5. Tumore mikroingurunean hainbat zitokina jariatzen dituzte, hala nola, eraldatze hazkuntza  $\beta$ -faktorea (TGF- $\beta$ ), IL-4, IL-6 eta IL-10, immunitate sistemaren erantzuna mantsotzen dutenak.
6. Heldugabeak diren zelula dentritiko mieloideak, TGF- $\beta$  jariatzaileak diren zeluletan bilakatzen dituzte. Modu horretan, zelula jariatzaile horiek, T zelula immunosupresoreen (T-reg) hedapena sustatzen dute.
7. Horrez gain, T zelula immunosupresoreak eta lerro mieloidetik etorritako zelula amak (MDSC) erakartzen dituzte, tumoreen hazkuntza eta metastasia erraztuz.

Hortaz, MZAk sistema immunitik ihes egiteko eta bizirauteko hainbat mekanismo erabiltzen dituzte. Horrez gain, kanpoko eragileen aurrean ere erresistentzia erakusten dute, hala nola, kimioterapia eta erradioterapia bezalakoei, lehen aipatu den bezala. Kimioterapiaren erresistentziaren arduradunak izatearen teoria, 2015ean proposatu zen (31) (32).

Horrekin erlazionatuta, aipatu behar da nola ehun osasuntsuko zelula amak ere, gainerako ehunetako zelulekin konparatuz, toxinekiko eta farmako exogenoekiko erresistenteagoak diren. Izan ere, gaitasun hori ezinbestekoa dute zelula amek beraien biziraupena bermatzeko. Hala, zelula amek ATP-menpeko garraiatzaile (ABC) ugari dituzte, zeinak hainbat ikerketetan substantzia toxikoen kanporapenaren erantzuleak direla ikusi den. Proteina garraiatzaile horien geneak ABCB1, ABCG2 eta ABCC5 dira besteak beste, eta farmakoekiko multierresistentzia (FME/MDR) familia genea bezala ezaguna denaren barnean daude, minbizi-zelula askotan agertzen direnak (33). Gene horiek berezko kimioerresistentzian edo erresistentzia induzituaren erantzuleak dira eta minbizi-zeluletan, horien gainadierazpena eta beraz, ponpen adierazpenaren handipena dago. Gainera, MZAetan FME geneen adierazpena gainerako minbizi-zeluletan baino handiagoa da (31).

Horrek MZAk metastasiaren erantzuleak zelan izan ahal diren ulertzen laguntzen du. Modu horretan, berezkoa den erresistentziari esker, terapia ondoren biziraun diren MZAk, tumorearen berragertzea eragiten dute. Gainera, berragertzen diren tumoreak edota metastasiak, hasierako tumore primarioarekiko zelula inguru eta mutazio oso desberdinak izan ditzakete ezegonkortasun genomikoa dela eta (34) **(8. Irudia)**.



**8. Irudia. Erresistente den minbizi-zelula ama (MZA) berragertzearen eta metastasiaren erantzulea da.** Hasierako tumorea MZA populazio txiki bat dauka beste zenbait zelulaz gain. Berezkoa den erresistentzia duten MZAk, kimioterapia eta erradioterapiari eusten diote eta, autokrinoa eta parakrinoa den estimulazioari/seinaleei (Wnt, Notch, Hedgehog...) esker, hazi egiten dira. Azkenean, tumore primarioarekiko desberdina den tumorea agertzen da, normalean, oldarkorragoa (12) (Jung, Y; Kim, WY-tik moldatua).

### 1.3. PROPROTEINA KONBERTASAK

Proproteinak serina proteasak dira, hidrolasa peptidikoak hain zuzen ere, zeinak subtilisina endoproteasekin (bakteria) eta kexinarekin (legamia) homologia daukaten. Entzima horiek beste proteina batzuen aktibazioa sustatzen dute, eta era horretara, proteina kateen edo soilik proteina zehatz baten aktibazioa abiarazten dute (35). Prozesua zeluletan gertatzea ohikoa bada ere, horien gehiegizko edo gutxiegiako aktibazioak bereziki garrantzitsuak dira.

#### 1.3.1. Bederatzi proproteina konbertasa mota daude

Guztira bederatzi proproteina konbertasa daude **(1. Taula)**, zeinetatik zazpi C-muturraren RXRR/KXRa ezagutu eta hidrolizatzen dute eta beste biak, PCSK9a eta MBTPS1a, basikoak ez diren aminoazidoak ezagutzen dituzte. Oro har, nahiko ezaguna den gorputzeko kokapen zehatz bat izan ez ezik, zelula barneko egitura zehatzetan ere aurkitu daitezke (36) **(2. Taula)**.

**1. Taula. Proproteina konbertasen gene eta proteina izendapena.** Totalean dauden bederatzi proproteina konbertasa batzen ditu taula honek beraien proteinen izenarekin, onartuta dauden sinonimoekin, kromosometako kokapenarekin eta HGNC-an dagokion identifikazio kodearekin (36).

Gene ikurra	Onartutako proteina izena	Sinonimoak	Kromosoma	HGNC ID
PCSK1	PCSK1	PC1, PC3, PC1/3, SPC3, NEC1	5q15	HGNC: 8743
PCSK2	PCSK2	PC2, SPC2	20p12.1	HGNC: 8744
FURIN	Furin	PCSK3, SPC1, PACE	15q26.1	HGNC: 8568
PCSK4	PCSK4	PC4, SPC5, DKFZp434B217, MGC34749	19p13.3	HGNC: 8746
PCSK5	PCSK5A eta PCSK5B	PC5, PC6, SPC7	9q21.13	HGNC: 8747
PCSK6	PCSK6	SPC4	15q26	HGNC: 8569
PCSK7	PCSK7	PC7, PC8, LPC, SPC7	11q23.3	HGNC: 8748
MBTPS1	MBTPS1	PCSK8, SKI-1, KIAA0091, S1P	16q23.3-q24.1	HGNC: 15456
PCSK9	PCSK9	PC9, NARC-1, FH3	1p32.3	HGNC: 20001

Laburdurak. HGNC ID: HGCN-HUGO Izendapen Komitea; LPC: Linfoma proproteina konbertasa; MBTPS1: 1. guneko, mintzera lotutako peptidasa-transkripzio faktorea; NARC-1: Apoptosi bidez erregulatutako konbertasa neurala; NEC: Konbertasa neuroendokrinoa; PACE: Aminoazido basikoein parekatutako hondakin-zatitze entzima; PC: proproteina konbertasa; PCSK: Subtilisina/kexina motatako proproteina konbertasa; S1P: 1.go guneko proteasa; SKI-1; Subtilisina/kexina-isozima 1; SPC: subtilisina proproteina konbertasa.

**2. Taula. Proproteina konbertasen ehun adierazpenaren eta gune-azpizelularren kokapena.** Proproteina konbertasa bakoitza bereziki non adierazten den, zein kokapen azpizelularra duten eta jariatuak izatekotan, zer mekanismo erabiltzen duten (jariatua, hau da, urrunera edo jaregina, hurbilera) laburtzen du taulak (36).

Protoproteina konbertasa	Ehun adierazpena	Kokapen azpizelularra	Jariapena
PCSK1	Neuroendokrinoa	Azidoak erregulatutako pikorretan	Jariatua
PCSK2	Neuroendokrinoa	Azidoak erregulatutako pikorretan	Jariatua
Furin	Nonahi	TGN, azal zelularra, endosomak	Jaregina
PCSK4	Germinal	Azal zelularra?	Jaregina
PCSK5A eta PCSK5B	Hedatua: giltzurrun gaineko guruin kortexean, hesteak, obarioa, giltzurruna	Azal zelularra, ECM	PCSK5A jariatu PCSK5Ba jaregin
PCSK6	Hedatua: muskulua, bihotza, hipofisia, giltzurruna, hestea, zerebeloa	Azal zelularra, ECM	Jariatua
PCSK7	Nonahi	TGN, azal zelularra, endosomak	Ez jariatua
MBTPS1	Nonahi	Cis- eta erdiko- Golgi	Ez jariatua
<b>PCSK9</b>	Gibela, hestea, giltzurruna eta garuna	TGN, extrazelularra	Jariatua

Laburdurak. ECM: Zelula kanpoko matrizea; MBTPS1: Mintzera lotutako peptidasa-transkripzio faktorea; 1 gunea; PCSK: subtilisina/kexina motatako proproteina konbertasa; TGN: trans-Golgi sarea.



## 1.4. PCSK9

Konbertasaren biologia zelularrari dagokionez, PCSK9a pre-proteina konbertasera sintetizatzen da (~74-kDa-eko aitzindaria) eta erretikulu endoplasmatikoa dagoenean, zatiketa intramolekular bat jasaten du prodomeinua eta jariatuko den PCSK9 heldua emanez. Behin heldua denean, PCSK9aren domeinu katalitikoa LDLRaren (LDL hartzailea, LDL-R) EFG-A domeinuarekin lotzen da, eta, era horretara, PCSK9-LDLR konplexua sortzen da, zeina lisosometara abiatzen den LDLRaren degradazioa burutzeko. Dirudienez, PCSK9ak duen Cys eta His aberatseko C-terminal muturra (CHRD) ezinbestekoa da LDLRaren degradazio prozesu horretan, baina ez lisosometarainoko garraiorako, zeinean APLP2 (amiloide aitzindari-antzeko proteina 2) bezalako proteinak inplikaturik egon daitezkeela uste den (37). Beraz, PCSK9ak LDLRen degradazioa burutzen dute, era horretara plasmako LDL (LDLC) kontzentrazioa handituz.

Arlo horretan, hiperkolesterolemia familiarraren egindako ikerketak garrantzitsuak izan dira. Izan ere, pertsona horietan PCSK9aren gainadierazpena ikusi da, eta horrek, LDLC-aren handipena eta LDLRen degradazioaren handipena bultzatzen dituela. Gainera, gainadierazpen horrek gibelko birsorkuntza gaitasunean arazoak dakarrela ere ikusi da (38). Bestalde, hori ikertzen zeudela, kontrakoa ere ikusi da, hau da, PCSK9aren adierazpena gutxituta daukaten pertsonak. Horietan PCSK9aren gene erregulatzaileretan (142X eta 679X) mutazioak ikusi dira, LDLC-ren kontzentrazioak jaisten dituztenak (39).

Bestalde, eta orain arteko ikerketa gehienak PCSK9k LDLarekin duen erlazioan zentratu diren arren, bada PCSK9ak betetzen duen beste funtzio garrantzitsu bat, azken urteetan garrantzia hartzen joan dena eta ikerketa honetarako ezinbestekoa dena. Hori apoptosi zelularraren erregulazioaren parte hartzailea dela da (40).

### 1.4.1. PCSK9aren historia

Proteina konbertasaren aurkikuntza eta oinarritzko ikerketa eta klinikaren garapena oso azkar gertatu zen. Jarraian, urteetan zehar egindako aurkikuntza garrantzitsuenak agertzen dira (**10. Irudia**).

**1999.** Urte horretan hiperkolesterolemia familiarrarekin erlazionatua egon zitekeen gene baten identifikazioarekin hasi ziren. Hala, Frantziako Hiperkolesterolemia Familiarrerako Ikerkuntza Sareak hiperkolesterolemia familiarrerako hirugarren *locus* bat aurkitu zuen bertako familia batean, herentzia Mendeliar argia zuena eta autosomiko gainartzailea zena. Genea 1p32 kromosoman kokatuta zegoen (**1. Taula**) eta ez zuen zerikusirik momentu horretara arte ezagutzen ziren geneekin (41) (38).

**2003.** Seidah eta kolaboratzaileak PCSK9a aurkitu zuten, garai horretan NARC-1 (erregulatutako apoptosi neuralaren 1 konbertasa) izena zuena. Konbertasa hori hepatozitoetan, giltzurruneko zelula mesenkimaletan, kolon eta hesteetako zelula epitelialetan eta enbrioiaaren neuronetan aurkitu zuten, 1p33–34.4 kromosoman hain zuzen ere (42). Hiperkolesterolemia familiarraren *locus* batetik hurbil zegoela aldarrikatu zuen taldeak, 1p34.1–p32an kokatutakoa. Hala, Frantziako ikertzaileekin kontaktuan jarri ziren eta kolaborazio baten bidez, PCSK9ko mutazioak hiperkolesterolemia familiarraren erantzulea zela frogatu zuten (43) (38).

**2004.** Nahiz eta PCSK9a eta hiperkolesterolemia familiarra lotuta zeudela aurkitu izan, PCSK9ak zer mekanismo erabiltzen zituen urte horretara arte ezezaguna izan zen. Izan ere, PCSK9aren gainadierazpenak LDLR-ren degradazioa zekarrela ikusi zen, eta horrek, logikoa den bezala, LDLC-ren handipena zekarrela (44) (45) (46). Kontrara, PCSK9aren isilpenak, LDLC-ren gutxipena zekarrela ikusi zuten hurrengo urtean PCSK9a isilduta zuten saguetan (47).

**2005.** PCSK9aren funtzio gabezia edo azpi-adierazpenak LDLCren kontzentrazioa jaitsi zezakeela frogatzeko, Dallaseko Bihotz Ikerketa taldeak (DHS), gainerako populazioarekiko 5-eko pertzentila baino txikiagoko LDLCa zuten pazienteen PCSK9aren sekuentziazioa egin zuten. Hori egiterakoan, PCSK9aren hainbat mutazio identifikatu zituzten: C679X-a eta Y142X-a (afrikar-amerikarretan), zeinak zentzugabeko (nonsense) mutazioak ziren eta R46L-a (europar-amerikarretan), ez-zentzugabeko mutazioa zena (48).

**2006.** Aurreko talde berdinak PCSK9aren funtzioa gutxituta zuten pazienteetan, gaixotasun kardiobaskularrekiko (GKB) babesa zenbaterainokoa zen aztertutako Arteriosklerosi Arriskua Komunitateetan Ikerketan (ARIC), zeinetan GKBekiko izugarritzko babesa suposatzen zuela ikusi zuten. Hala, zentzugabeko mutazioa zuten

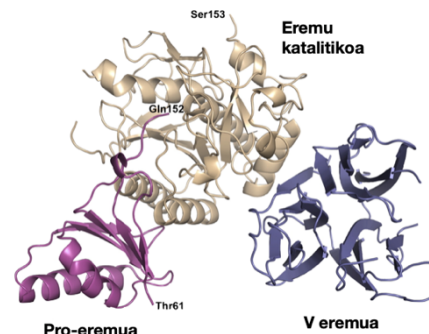
afrikar-amerikarretan, LDLC-aren kontzentrazioaren % 28ren jaitsiera ikusi zuten, eta gaixotasun arterial-koronarioaren (GAK) % 88ko gutxipena. Bestalde, europar-amerikarretan egindako ikerketetan, zeinetan mutazio apalagoa zen, LDLC-aren % 15eko gutxipena ikusi zuten eta % 46eko murrizketa gaixotasun arterial-koronarioetan (49). Bestalde, PCSK9rik gabeko eta LDLC mailak oso baxuak zituzten pertsona osasuntsuak aurkitu zituzten, PCSK9aren inhibizioaren segurtasuna konfirmatzen zuena (50).

Azkenik, ikerketa horretaz aparte, PCSK9aren funtzionamenduaren informazioa sakontzen joan zen. Izan ere, LDLRari zelulaz-kanpo lotu, horren birziklapena galarazi eta lisosomen bidezko degradaziora bideratzen zuela ikusi zen urte honetan. Hori oso garrantzitsua izan zen, zelulaz kanpo PCSK9ak lotzeak, antigorputzak erabiltzea posiblea zela iradokitzen baitzuen, PCSK9a inhibitzeko (51).

**2007.** Urte horretako aurkikuntzatik garrantzitsuena PCSK9aren egitura molekularra izan zen (**9. Irudia**). Hori aurrerapen handia suposatzen zuen, aurreko urteko aurkikuntzarekin batera (kanpoan lotzen zela), proteinaren aurkako antigorputz monoklonalak sortzeko atea irekitzen baitzuen (52).

### 9. Irudia. PCSK9aren egitura molekularra.

Arrosaz: pro-eremuaren xingola; marroiz: eremu katalitikoa; urdinez: V eremua. Gln152 pro-eremuaren C bukaera aurkezten duen bitartean, Ser153 eremu katalitikoaren N bukaera aurkezten du (52).



PCSK9aren inhibiziorako hainbat teknika proposatu ziren: antigorputz monoklonalak (mAbs), PCSK9 sintesiaren inhibizioa ARN mezulariaren (ARNm) inhibizioaren bidez, PCSK9aren kontrako txertoak, adnektinen bidezko inhibizioa edota gene-edizio tekniken bidezkoa besteak beste (38).

**2009.** Gauzak horrela, urte horretan PCSK9aren aktibitatea inhibitzeko antigorputzak (mAbs) erabiliz, saio garrantzitsu bat aurrera eraman zen. Horretan LDLRaren kontzentrazioa jaisteko eraginkorrak zirela frogatu zen, esate baterako, LDLC-aren mailak % 80 gutxitzea heldu ziren gizakiak ez ziren primateetan (53).

**2012.** Urte batzuk izan ziren 2009tik hona, baina azkenean, entsegu kliniko batean PCSK9aren inhibizio antigorputzak (mAb) gizakietan LDLRaren kontzentrazioa jaisteko eraginkorrak zirela frogatu zen. Ikerketa horretan alirocumab antigorputzak LDLC-aren kontzentrazioa % 60n jaitsi zuen. Horrela, alirocumabaren efikazia eta segurtasuna agerian geratu zen (54).

**2014.** PCSK9a inhibitzeko CRISPR/Cas9 teknika *in vivo* erabiltzea posible zela ikusi zen lehenengo aldiz. Egindako ikerketan, CRISPR/Cas9a erabiliz, saguen PCSK9aren % 50 baino gehiago isiltzea lortu zuten. Horrek plasmako kolesterol totalaren % 35-40ko gutxipena ekarri zuen (55).

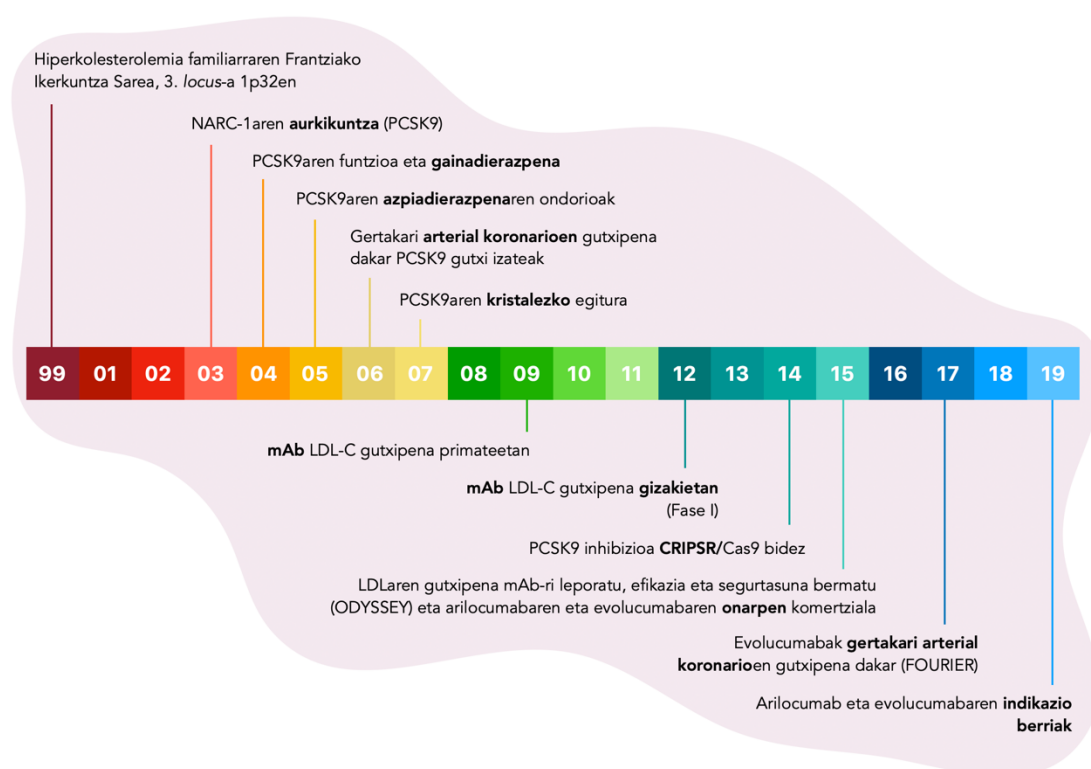
**2015.** 2012tik 2015erarte alirocumabaren inguruan egin ziren ikerketek, bere segurtasunaren eta efikaziaren berri baino ez zuten ematen. Oro har, urte horietan zehar onartu ziren entsegu klinikoak ugariak izan ziren, baina antigorputz monoklonalen efikazia eta segurtasuna bermatzen zuen ikerketa garrantzitsu bat aipatzekoa da, ODYSSEY izenekoa (56). Guzti horrek, urte horretan, alirocumab (Praluent®) eta evolocumab (Repatha®) antigorputzak 50 estatu baino gehiagotan tratamendu gisa onartzea ekarri zuen. Horren aplikaziorako ondorengo baldintzak bete behar ziren: lehen mailako hiperlipidemia edota gaixotasun kardiobaskular bat izatea, adostutako gehien toleratu daitekeen estatina kontzentrazioa hartzen aritzea eta lipido maila normaltzea ezinezkoa izatea. Beraien erabilera Europar Batasunean ere onartu zen, alirocumabarena 2015eko irailaren 23an eta evolocumabarena 2015eko uztailaren 7an (57) (58).

**2017.** Onartutako antigorputzen efikazia klinikoari buruzko datu garrantzitsuak atera ziren urte horretan FOURIER izeneko saioari esker. Horrela 26 hilabeteetan zehar jarraitutako gaixotasun kardiobaskularra zuten eta estatinak hartzen zituzten pazienteetan, evolucumaba edo plazeboa gehitu zioten beraien oinarritzko tratamenduari. Gauzak horrela, evolucumabaren erabilpenak LDL kolesterolaren mailak % 59 jaisten zuela ikusi zen plazeboarekin konparatuz, eta, horrez gain, gertakari kardiobaskularren % 15eko gutxipena zekarrela (59).

Antigorputz monoklonalez gain beste metodo batzuk ere agertu ziren, PCSK9aren sintesiaren inhibizioa suposatu zutenak, eta beraz, genearen adierazpenean eraginez. Horiek genearen isilpena ARN-isiltzailearen bitartez (siARN) edota aurkako-

noranzko oligonukleotidoak (ASOs) izan ziren, zeinak PCSK9aren sintesia gutxitzen duten mARNaren translazioan eraginez (38).

**2019.** Azkenik, urte horretan Europako Medikamentuen Erakundeak (EMA) alirocumab eta evolocumabaren erabilpena indikazio berrietarako onartu zituen, arrisku kardiobaskularra jaisteko ezarritako gaixotasun arteriosklerotikoa duten pazienteetan, ODYSSEY OUTCOMES izeneko ikerketak ateratako ondorioetatik abiatuz. Ikerketak syndrome koronario akutua (SKA) izandako pazienteetan arrisku kardiobaskularren % 15eko gutxipena frogatu zuen (57) (58) .



**10. Irudia. PCSK9aren ardatz kronologikoa.** PCSK9a aurkitu zenetik 2019rarte egin diren lipido metabolismo inguruko aurkikuntza garrantzitsuenak (1.4.1. atalaren laburpena) (38) (60).

## 1.5. PROTEINA KONBERTASAK ETA MINBIZIA

90. hamarkadan proteina konbertasen eta minbiziaren arteko erlazio posiblea ikertzen hasi zen. Momentu horretan PCSK1 eta PCSK2 gainadierazita ikusi zituzten zeinbait minbizia neuroendokrinoetan. Lehen aldiz, gizaki baten intsulinomaren cDNA-n PCR bidezko anplifikazioa egitean agertu ziren, eta horietatik eratorritako produktua furinaren antzekoa zela ikusi zuten (61).

Geroago, PCSK3a klonatu eta sekuentziatu zuten; hori egiterakoan, bere eremu katalitikoa furinaren eta PCSK2arekin homologia handia aurkitu zuten. Nahiz eta furina antzeko eremu katalitikoa izan, ikerlariak PCSK proteina horiek, furina antzeko ez zen funtzioa zutela ondorioztatu zuten. Izan ere, furinarekin alderatuz, bereziki neuroendokrinoa zen ehunean agertzen ziren eta konpartimentu azpi-zelular desberdinetan (62).

Intsulinoman ez ezik, PCSK2 eta PCSK3 proteinak feokromozitoman gainadierazita ikusi zituzten, gainerako ehun adrenalean adierazpen baxua zen bitartean (63). Momentu horretan, argi gelditu zen PCSK-k minbiziekin erlazionatuta zeudela (64) eta, gainera, PCSKen gainadierazpenaren eta tumore oldarkortasunaren arteko korrelazioa ere zegoela ikusi zuten. Erlazio hori nonahi agertzen diren proteasak, furina eta PCSK4a aztertzean frogatu zuten (35) (65). Gaur egun hainbat tumoreetan PCSKen gainadierazpena aurkitu da, hala hola, biriketako zelula txikiko kartzinoman, zelula txikikoa ez den biriketako kartzinoman, bularreko minbizian, kolon-ondesteko minbizian edota buruko eta lepoko minbizietan besteak beste (35).

Guzti horiez gain, konbertasen eta minbiziaren erlazioan, oso garrantzitsua izan zen aurkitzea zelak minbizietan, kanpoko matrizeko metaloproteasak (MMPs), konbertasen (PCSK) substratu moduan jokatzen zuten (64). Aurkikuntza iraultzaile hori Stromelysina-3-ren aktibazio prozesuan ikusi zen (66). Metaloproteasa inaktibatua horrek proteina konbertasa batentzat, furinarentzat, 10 aminoazidoko mozketak gune bat dauka. Behin furina bertan kokatuta, intrazelularra den gertakari proteolitiko bat gertatu ondoren, metaloproteasaren aktibazioa suertatzen da. Aktibatuta dagoenean, metaloproteasak tumore aurrerapen eta zelulaz kanpoko matrizearen (ZKM) degradazioarekin hasten da. Modu horretan, furina, konbertasen eta inbasio tumoralak edota metastasiaren arteko erlazioa agerian geratu zen eta konbertasak etorkizuneko tratamendu itua izateari bultzada eman zion (35).

## 1.6. PCSK9 ETA MINBIZIA

Hasieran, PCSK9aren historia aztertu denean, ikerketa gehienak LDLaren metabolismoaren inguruan izan direla ikusi da, baina konbertasak beste zeinbat prozesuetan ere erlazionatuta daudela aipatu da. Hain zuzen ere, LDL metabolismoaz gain, zelulen apoptosiarekin, hantura erantzunarekin, garapen neuronalarekin eta

tumore metastasiarekin ere erlazionatu dira (67) (68) (69) (70) (71). Beraz, argi dago PCSK9aren eta minbiziaren artean erlazioa dagoela.

Izan ere, kartzinoma hepatozelularrean PCSK9aren adierazpenaren gutxipena ikusi da eta hemendik, PCSK9 proteinaren jaitsierak LDL hartzailearen espresioaren handipena dakarrela ikusi da (gogoratu PCSK9aren funtzioa LDLRaren degradazioa burutzea dela). Era horretara, hepatokartzinomako zelulek LDL kontzentrazio handiagoa berenganatzeko aukera daukate eta beraz, etengabe energiak hornitzeko gaitasuna **(12. Irudia laranja, PCSK9 ezaren 1. gezi gorria)**. Ikerketa berdinean hepatokartzinomako inguruko zelula zirrotikoetan (estromako zeluletan) PCSK9aren gainadierazpena ikusi da. Estromako zelula horietan, LDLR eta LDLR-mRNA txikituta ikusi dira, eta beraz, zelula horiek LDLa sortzen dutenez eta LDLRaren adierazpena murriztuta dutenez, hiperlipidemia sortzearen eta zelula tumoralen energia-hornikuntzaren erantzuleak direla ondorioztatu da **(12. Irudia laranja, behearazko gezi berdea)**. Azkenik, hepatokartzinoma duten pazienteetan ere, plasmako PCSK9aren kontzentrazioaren handipena ikusi da (72) **(11. Irudia Bath M, et al)**.

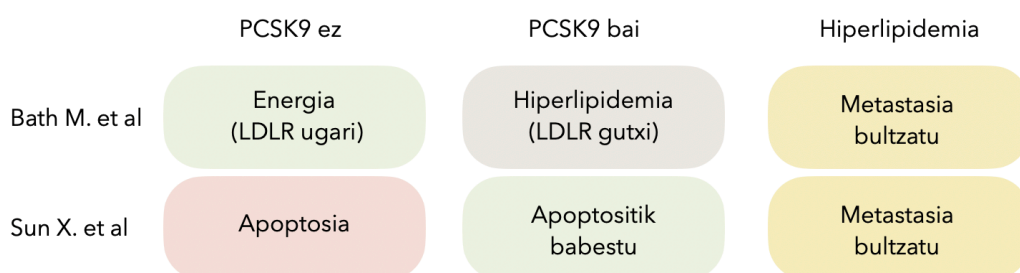
Aipatzekoa da zelan hepatokartzinomako adierazpen paraneoplasiko ohikoenen artean hiperlipoproteinemia (HL) ugarienetarikoa den, % 10-25 bitarteko prebalentzia baitu, hipogluzemia, hiperkaltzemia eta eritrozitosia baino ugariagoa izanik. Izan ere, mekanismoa guztiz ezaguna ez bada ere, minbizi hepatozitoen HMG-CoA erreduktasak (kolesterol sintesian entzima garrantzitsua) feedback negatiboa galtzen duela uste da, lehen aipatutako kolesterol handipenaren produkzioa ekarriz (73). Beraz, eta tumoralak ez diren zeluletan LDLRaren degradazioaren (PCSK9aren gainadierazpenaren) eta tumoreen HMG-CoA erreduktasaren indarpenaren atzean zer nolako mekanismoa inplikaturik dagoen ez jakin arren, hepatokartzinoma zuen eta PCSK9aren gainadierazpena zuen Japoniako gizon batean arrazoi posible bat aurkitu da (74).

Gizon horretan, alde batetik, tumoralak ez zen ehunean, LDL hartzaileen (LDLR) adierazpena oso txikia ikusi zen, baita LDL hartzaileekin erlazionaturik 1. motakako proteinarena (LRP-1) ere. Bestalde, esterol-erregulatzailea den 2. motakako proteinaren (SREBP-2) mRNA-a eta bere itua den PCSK9a handituta ikusi zen ehun

tumorelean (ez-tumorekin, estromakorekin konparatuz), baita HMG-CoA erreduktasaren kontzentrazioa ere. Horrez gain, PCSK9 plasma proteina aktiboaren kontzentrazioa ere handituta zegoela ikusi zen (74).

Ikerketa horrek plasmako PCSK9aren kontzentrazioak ehun ez-tumorelean, lipido metabolismoan eragina duela proposatzen du, LDLR eta LRP-1 proteinen adierazpena gutxituz, eta hortaz, HL paraneoplasikoa sortuz. Beraz, eta mekanismo zehatzak jakin ez arren, dirudienez, plasmako PCSK9aren gainadierazpenak hiperlipidemia paraneoplasikoaren atzean egon daiteke, ez-tumoreala den ehunean hori gertatzeko beharrezkoak diren aldaketak gauzatuz. Aldaketa horiei esker, hepatokartzinomako zelulak hazten dira eta metastasiak sortzeko beharrezkoa duten mikroingurunea sortzen dute. Halaber, beste faktore asko hartu behar dira kontuan, horien artean, tumore zeluletan HMG-CoA erreduktasaren adierazpen handia. Beraz, litekeena da HLaren atzean dagoen zergatia multifaktoriala izatea (74).

Horri konplexutasuna gehitzeko, badago talde baten ikerketa bat zeinetan hepatokartzinomako zeluletan, PCSK9ak bestelako funtzio bat betetzen duen. Izan ere, PCSK9a isilduz, gibelego zelula metastasikoen metastasiaren gaitasunaren gutxipena ikusi da (LDLC mailak gutxituta mantenduz). Hala, PCSK9a isilduta duten zeluletan, kaspasa-3aren kontzentrazioak handituta ikusi dira eta, gainera, apoptosiaren aurkako Bcl-2aren gutxipena (Bax/Bcl-2 ratioa handituta) eta apoptosiaren aldekoa den TNF $\alpha$ -ren handipena ikusi da. PCSK9 ezak TNF $\alpha$ -k bideratutako apoptosia (bide estrintsekoa) bultzatzen duela iradokitzen du horrek (69) **(12. irudian laranja, PCSK9 ezaren goiko gezi gorria) (11. Irudia Sun X, et al).**



**11. Irudia. Bath M, et al. eta Sun X, et al. artikuluen arteko konparaketa.** Bath M-ren ikerketan PCSK9 eza minbizia zelulentzat onuragarria dela adierazten duen bitartean, Sun X-ren ikerketak PCSK9 eza minbizia zelulak hiltzen dituela aldarrikatzen du (hau da, PCSK9a babesgarria da). Bietan hiperlipidemia metastasia bultzatzen duela aldarrikatzen dute.



Hala ere, ikerketa talde guztiek, hepatokartzinomako zelulek beraien mikroingurunea moldatzeko eta metastasia sortzeko beharrezkoak diren aldaketak sortzen dituztela aldarrikatzen dute, modu horretan hiperlipidemia sortuz eta metastasi gaitasuna handituz (69) (72) (74).

Aurretik esan denez, PCSK9a ere apoptosiarekin erlazioa daitekeela proposatu da. Izan ere, PCSK9 genea, apoptosis erregulatutako konbertasa 1 (NARC-1) bezala ere ezagutzen da. Apoptosia bi bidezidor jarraituz gerta daiteke, bide estrintsekoa edota intrintsekoa (edo mitokondrial). Azken hori da, hain zuzen ere, orain aztertuko dena, PCSK9ak kaspasa menpeko apoptosis eragiten baitu bide mitokondrial erabiliz (40) (67).

Alde batetik, neurogliomako minbizi-zeluletan PCSK9aren gainadierazpenak zelularen bideragarritasunaren handipena dakarrela ikusi da. Izan ere, apoptosis blokeatzen duten XIAP eta p-Akt handituta ikusi dira kaspasa-3-aren kontzentrazioa gutxituta ikusten den bitartean. Bestalde, Bax/Bcl-2aren ratioa gutxituta ikusi da, c-zitokromoaren kontzentrazioa mitokondrioan handituta eta zitoplasman txikituta. Horiek guztiak, apoptosiaren aurkako estimuluak dira, zeinak zelularen heriotza galarazten duten (**12. Irudia arrosaz, behearanzko bidea**). Gainera, PCSK9a isiltzerakoan, kontrako prozesua ere ikusi da, XIAP eta p-Akt txikituta ikusi dira, Bax/Bcl-2 ratioa handituta eta, c-zitokromoaren mitokondrioko kontzentrazioaren gutxipena zitoplasman handituta ikusi den bitartean. Apoptosiaren aurkako molekulen gutxipenak eta c-zitokromoaren zitosoleko kontzentrazioaren handipenak, azkenean, kaspasa-3aren kontzentrazioaren handipena dakartzate, zeinak zelulak apoptosira bideratzen dituen (**12. Irudia arrosaz, goranzko bidea**) (67).

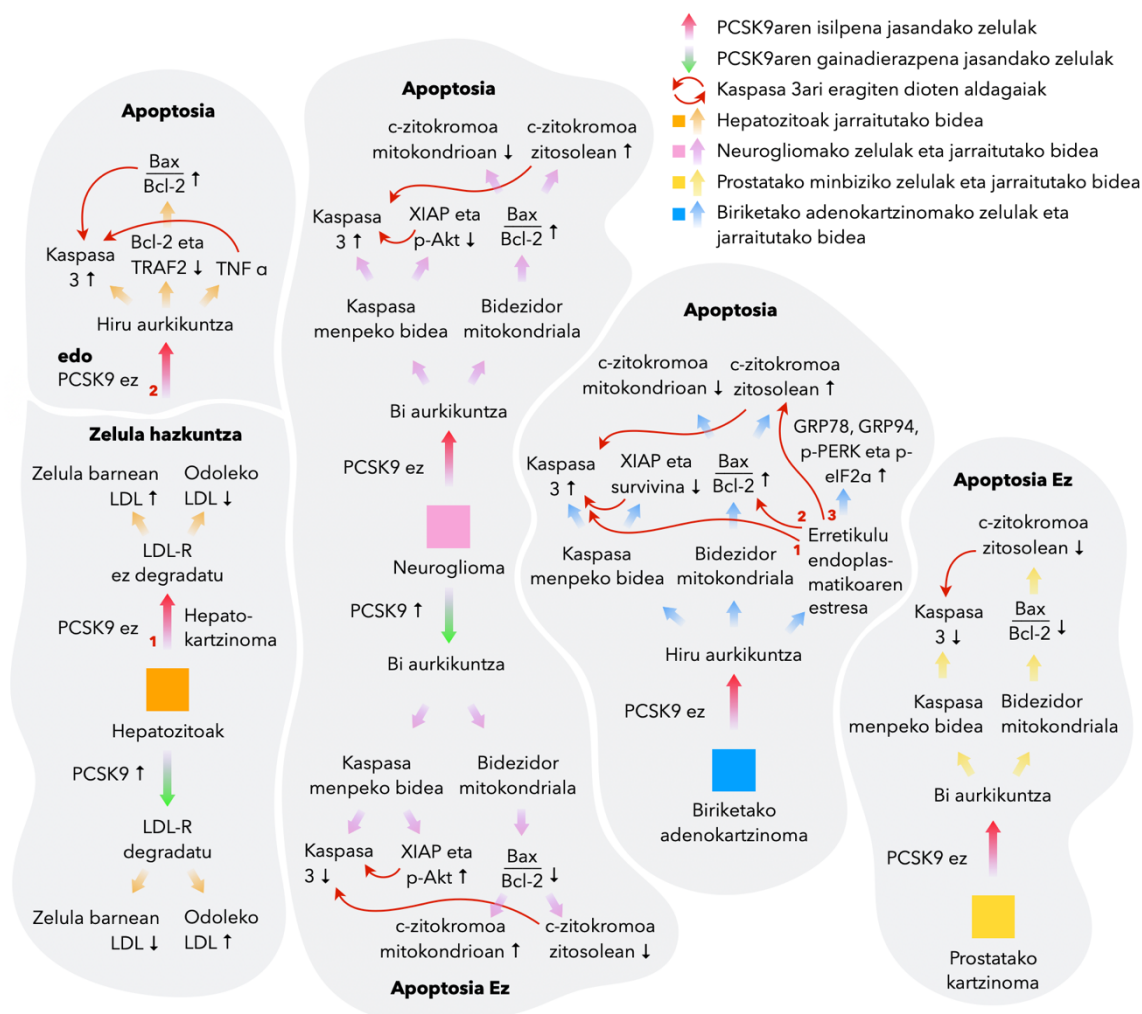
Antzeko prozesua ere biriketako adenokartzinoman ikusi da, hau da, mitokondrioaren bidezidorraren bidezko kaspasa menpeko apoptosis ere ikusi da. Hala, apoptosiaren inhibitzaileak diren XIAP eta survivina gutxituta ikusi dira. Gainera, apoptosiaren aldekoa den c-zitokromoaren zitosoleko kontzentrazioa handituta ere ikusi da, mitokondrioko kontzentrazioa txikituta ikusi den bitartean. Horiek guztiak, kaspasa-3aren kontzentrazioaren handipena eragiten dute, zelula apoptosira bideratzen duena (**12. Irudia urdinez, hiru aurkikuntzatik urdinezko 1. eta 2. geziak**). Hala ere, kasu horretan, erretikulu endoplasmaticoaren estresaren menpeko apoptosis ere ikusi da,

GRP78, GRP94, p-PERK eta p-eIF2 $\alpha$  handituta ikusi baitira, eta horiek, zelula apoptosira bidera dezakeen ur-jauzi erreakzio martxan jartzen duten molekulen artean daude **(12. Irudia urdinez, erretikulu endoplasmatikoaren estresaren gezi urdin bakarra)**. Izan ere, erretikulu endoplasmatikoaren estresaren bidezko apoptosia bai bide intrintsekoan zein intrintsekoarekin erlazionatu da. Beraz, bidezidor mitokondrialari dagokionez, Bcl-2aren inhibizioa gauzatzen du Bax/Bcl-2 ratioa handituz eta, hortaz, zitosoleko c-zitokromoaren kontzentrazioaren handipena eta mitokondrioaren c-zitokromoaren kontzentrazioaren gutxipena eragiten ditu **(12. Irudia urdinez, erretikulu endoplasmatikoaren estresaren 2. gezi gorria)**. Gainera, zitosoleko c-zitokromoaren kontzentrazioaren handipenarekin ere modu zuzenean erlazionatu da Ca<sup>2+</sup> menpeko seinalizazio bide bati esker **(12. Irudia urdinez, erretikulu endoplasmatikoaren estresaren 3. gezi gorria)**. Azkenik, kaspasa-3aren kontzentrazioaren handipenarekin erlazionatu da, bai bide mitokondrialak eragindako kaspasa aktibazioa dela medio (zitosoleko c-zitokromoa handituz) zein modu zuzenean, kaspasa-12aren aktibazioa dela eta sortzen den ur-jauzi erreakzioa dela medio **(12. Irudia urdinez, erretikulu endoplasmatikoaren estresaren 1. gezi gorria)** (75) (76) (40).

Bi ikerketa horietan oinarrituz, eta PCSK9aren isilpenak kaspasa menpeko aktibazioa ekartzen duela ikusita, bizirauteko bide hori erabiltzen duten minbizi-zelula orotan horrela izan beharko zuela pentsatzera eramanez dezake. Beraz, logikoena, PCSK9aren gainadierazpena aurkeztea izango litzateke minbizi-zeluletan. Hala ere, prostatakoko kartzinomako minbizi-zeluletan kontrakoa ikusi da.

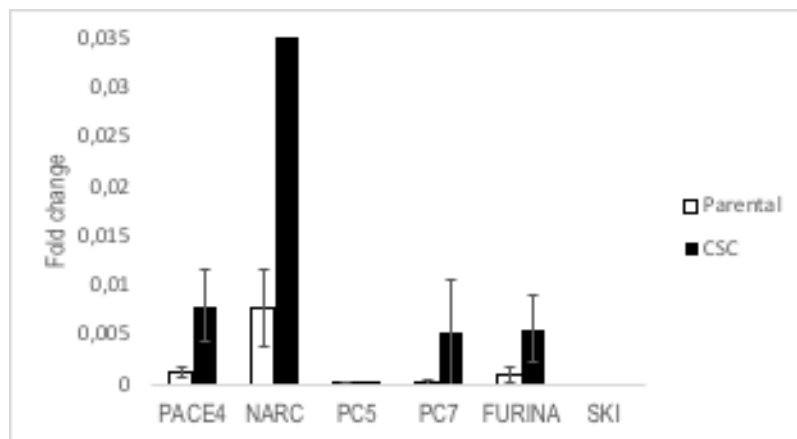
Horietan, PCSK9aren isilpenak, mintz mitokondrialaren potentzialen (MMP) inhibizioa eragiten duela ikusi da. Bcl-2aren handipena eta hortaz, Bax/Bcl-2 ratioaren gutxipena ere dakarrela ikusi da, eta beraz, zitosoleko c-zitokromoaren kontzentrazioaren gutxipena. Horrek kaspasa-3a aktibatzen ez duenez, apoptosia gertatzea galarazten da **(12. Irudia horiz)** (77).

Beraz, litekeena da, PCSK9a zelularen kokapenaren arabera modu desberdinetan erantzutea. Hori PCSK9ak hepatokartzinoman, prostatakoko kartzinoman eta neuroglioman zein biriketako kartzinoman adierazten duen funtzioaren aldakortasunaren erantzun posibleetako bat izan daiteke.



**12. Irudia.** PCSK9aren isilpenak eta gainadierazpenak duen funtzioa minbizi mota desberdinetan. PCSK9aren isilpenak apoptosira bideratzen ditu zelulak neuroglioman zein biriketako adenokartzinoman. Hepatozitoetan ordea, PCSK9aren isilpenak apoptosia zein zelula hazkuntzarekin erlazionatu da. Prostatako kartzinoman, PCSK9aren isilpenak apoptosia ezarekin erlazionatu da. PCSK9aren gainadierazpenak, hepatozitoetan hiperlipidemiarekin erlazionatzen den bitartean, neurogliomako zeluletan apoptosia ezarekin.

Azkenik, PCSK9ak eta MZAk ikertzen aritu den ikerketa talde batek, PCSK9aren gainadierazpena ikusi du MZAetan (78) (**13. Irudia**). Hala ere, horietan konbertasaren gainadierazpenak zer eragina duen ez da aztertu eta tamalez, MZAetan PCSK9aren adierazpena aztertu duen talde bakarra denez, ez dago hori konparatzeko daturik.



**13. Irudia. Proteina desberdinen adierazpena SW620 zelula parental eta MZAetan.** Irudian NARC-ren (PCSK9) adierazpena zelula parentaletan eta MZAetan (CSC) konparatzen da, azken horietan ugariagoa izanik (78) (Irudia Signaling Lab Ikerketa Taldeak erraztua).

## 2. HIPOTESIA ETA HELBURUAK

PCSK9ak apoptosis galarazten duela jakina da. Gainera, koloneko minbizi-zelula parentaletan ere, babes hori frogatu da. Koloneko minbizi-zelula ametan (MZA) PCSK9aren gainadierazpena ikusi denez (78), babes eragin berdina izango duelakoan, MZAen hazkuntzan PCSK9ak zer efektu duen aztertu nahi da.

Horretarako koloneko SW620 zelula parentaletan PCSK9 genearen edizioa CRISPR/Cas9 teknika bidez egingo da. Ondoren, *knockout* homozigotikoak aukeratzeko genotipaketa burutuko da eta jarraian kolonosferak sortuz MZA sortuko dira. Amaitzeko, PCSK9a isildutako MZAen eta basatien arteko hazkuntza konparatzeko XTT kolorimetria saioa egingo da.

## 3. MATERIALAK ETA METODOAK

Ikerketa ATCC enpresatik erositako (ATCC® CCL- 227TM) nodulu linfatiko batetik lortutako SW620 zelula-lerroko koloneko zelula metastasikoekin burutu zen.

### 3.1. ZELULEN MANTENUA ETA HAZKUNTZA

Ikerketarekin hasteko SW620 zelula parentalak 1 mL % 10eko behi-fetu serumeko (SFB) (SV30160.03, Hyclone, GE Healthcare Life Sciences, Logan. UT, USA), 2 mM L-glutamina (G7513, Sigma, St. Louis, MO), 100 U/mL penizilina eta 150 µg/mL

estreptomizina (15140-122, Gibco), 9 mL DMEM mediodun (Lonza 12-733, Basel, Switzerland) T-75 edukiontzi (83.3911, Sarstedt) batean kultibatu ziren (nahaste horri DMEM medio osoa deituko zaio hemendik aurrera).

Astean behin T-75 edukiontzia aldatuz subkultibaketak egin ziren. Horretarako zelulak tripsina (25300-062, Gibco) bidezko prozedura erabiliz askatu ziren. Hori egiteko T-75 edukiontziak berogailutik atera ziren, DMEM medio osoak kendu ziren eta edukiontziak PBSrekin (10010023, Gibco) garbitu ziren. Jarraian, zelulak askatzeko 3 mL tripsina gehitu ziren eta 5 minutuz 37 °C-tan inkubatu ondoren, edukiontzian DMEM medio osoko 3 mL gehitu ziren tripsina indargabetzeko. Zelulak aske zeudela, 15 mL-ko (10468502, Falcon) tutu batean jarri ziren eta 1500 bira minututan (bm) 5 minutuz zentrifugatu ziren. Hori bukatuta, gain-jalkina bota zen eta zelula horiek 15 mL-ko tutu horretan zeudela 1 mL DMEM medio osoan berreseki ziren. Bukatzeko, nahaste hori T-75 edukiontzi berri batean jarri zen hasieran erabilitakoaren berdina zen 9 mL DMEM medio osoan.

### 3.2. CRISPR/CAS9

Aurreko prozesua bi asteetan zehar egin zen, eta hirugarrenean, medioak kendu eta PBSa erabiliz, T-75 edukiontziak garbitu ziren. Jarraian 10 mL DMEM medioan jarri ziren eta aurretik lortutako plasmidoak gehitu ziren. Nahaste hori 48 orduz 37 °C-tan inkubatzen utzi zen. Era horretara CRISPR/Cas9 teknikaren bidez 5'UTR sekuentzian (transkripzioaren hasieran eta erregulazioan parte-hartzaile garrantzitsua da) delezio bat eraginez PCSK9aren edizioa burutu zen.

CRISPR/Cas9 teknika aplikatzeko sei plasmido mota desberdin erosi ziren (pSpCas9 (BB) – 2A – Puro (PX459) V 2.0, Feng Zhang), zeinak anpizilinarekiko erresistentzia geneak eta CRISPR/Cas9 kodetzeko informazioa zuten. Plasmidoetan, sei sgRNA mota transfektatu ziren, eta horiek integratu zirela bermatzeko eta ikerketarekin jarraitu ahal izateko, PCRa eta genotipaketa burutu zen.

Behin plasmidoak egokiak zirela, lipofektamina erabiliz (TransIT®-LT1 Transfection Reagent, Mirus Bio) SW620 zelula bakoitzean bi plasmido sartu ziren (**4. Taula**), bata DNAREN sekuentziarekiko ur-gora lotuko zena eta bestea, ur-behera (**3. Taula**). Modu horretan DNAREN harizpi bakoitzean bi mozketak burutu ziren. CRISPR/Cas9-an

sakonduz, hainbat gauza argi izan behar dira: alde batetik, DNA harizpi bakoitzarekin hibridatuko den sekuentzia crisprRNA edo crRNA izena du eta, bestetik, endonukleasara lotuko den sekuentzia trcrRNA izena. Azken hori **3. Taulan** letra lodiz agertzen den sekuentzia da. Zehazki, DNArekin lotuko den bateragarria den eta horrekin oligonukleotido gisa lotuko den crRNA-aren atalari *spacer* deritzo. Bestalde, endonukleasa DNA sekuentziara ere lotu behar zaio, horretarako, itua ez den DNA harizpian, PAM izeneko sekuentzia dago. Oro har, moztuko den sekuentzia, PAMarekiko ur-gora kokatzen da eta *protospacer* izena du. Hortik dator PAM horren izena, *Protospacer Adjacent Motif* bezala ezaguna baita. Hau da, hain zuzen ere, bakterioek birusei egiten dioten mozketen espezifikotasunaren arrazoia, PAMa aurkezten ez badute mozketarik ezin baitute egin. Hori bakterioek beraien buruaren genomari mozketak ez egitearen arrazoia (PAMaren espezifikotasuna) ere bada. Aplikatuko den CRIPR/Cas9 teknikan, beraz, espezifikotasuna bi osagaiengatik gertatzen da: PAM sekuentzia (nukleasa bakoitzekiko laborategiak errazten duena) eta diseinatu den sgRNA-ren crRNA-ko *spacer* sekuentzia. Azken hori sgRNA-aren 5' muturrean kokatzen den 17-20 nukleotidoko sekuentziak izaten dira.

**3. Taula. PCSK9arekin ur-gora edo ur-behera hibridatzeko erabilitako crRNA-aren sekuentziak.** Letra lodiz endonukleasa sgRNA-ri lotzeko beharrezkoa den sekuentzia.

UR GORA	UR BEHERA
<p><b>1.1</b></p> <p>F5'-<b>CACCG</b>TGGCGTGATCTGCGCGCCCC-3' R3'-CACCGCACTAGACGCGCGGG<b>CAAA</b>-5'</p> <p>Kromosoma 1: 55,039,491-55,039,513</p>	<p><b>2.1</b></p> <p>F5'-<b>CACCG</b>AGGCGCGTGCGCGGTCCACGC-3' R3'-CTCCGGCACGCGCCAGGTGCG<b>CAAA</b>-5'</p> <p>Kromosoma 1: 55,039,775-55,039,797</p>
<p><b>1.2</b></p> <p>F5'-<b>CACCG</b>GTGTGGGTGCTTGACGCCT-3' R3'-CCACACCCACGAAGTGGGAC<b>CAAA</b>-5'</p> <p>Kromosoma 1: 55,039,512-55,039,532</p>	<p><b>2.2</b></p> <p>F5'-<b>CACCG</b>CCGTGCGCGGTCCACGCCGG-3' R3'-CGGCACGCGCCAGGTGCGGCC<b>CAAA</b>-5'</p> <p>Kromosoma 1: 55,039,772-55,039,794</p>
<p><b>1.3</b></p> <p>F5'-<b>CACCG</b>TGTGGGTGCTTGACGCCTG-3' R3'-CACACCCACGAAGTGGGAC<b>CAAA</b>-5'</p> <p>Kromosoma 1: 55,039,511-55,039,531</p>	<p><b>2.2</b></p> <p>F5'-<b>CACCG</b>CCGTGCGCGGTCCACGCCGG-3' R3'-CGGCACGCGCCAGGTGCGGCC<b>CAAA</b>-5'</p> <p>Kromosoma 1: 55,039,772-55,039,794</p>

Laburpenak: F, forward esan nahi du (5'→3') eta R, reverse esan nahi du (3'→5').

Aplikatuko zen teknika horrek osatzen zuten osagaiak batzean, CRISPR/Cas9 erribonukleoproteina konplexua osatzen da, eta crRNA-ren osagarria den DNAREN ebaketa puntuan mozketa bat egiten du DNAREN bi harizpian. Jarraian zelulak

konponketa homologoaren (HDR) edo ez-homologoaren (NHEJ) bitartez mozketak hori konpontzen saiatzen da. NEHJak intserzio edota delezio mutazioak eragiten dituzte eta, horiek, genearen inaktibazioa.

Beraz, teknika horrekin PCSK9 genearen edizio desberdineko SW620 zelula parental desberdinak lortu ziren (**4. Taula**) eta, horrez gain, plasmidoetan anpizilinarekiko erresistentzia geneak zeudenez, SW620 zelulak anpizilinarekiko erresistentzia lortu zuten PCSK9a mozteko gaitasunaz gain.

**4. Taula. Hasle konbinazio desberdinetatik lortutako zelula-lerro desberdinak.** 3. Taulan dauden sekuentziak zelula desberdinetan konbinatzerakoan sortu ziren zelula-lerroei jarri zitzaizen izendapena agertzen da (Adb. 1.1. ur-gora duen plasmidoa eta 2.1. ur-behera duen plasmidoa SW620 zelula batean sartu zen. Horri, A deitu zitzaion).

	<b>2.1</b>	<b>2.2</b>	<b>2.3</b>
<b>1.1</b>	A	B	C
<b>1.2</b>	A'	B'	C'
<b>1.3</b>	A''	B''	C''

### 3.3. PUROMIZINA PLAKETAN ZELULEN HAZKUNTZA

Behin transfekzioa eginda, transfekzioa egiteko erabili ziren T-75 edukiontziak aldatu ziren lehen azaldu den zelula askatze prozesua jarraituz eta edukiontzi berrietan sartu ziren. T-75 edukiontzi horietan, 10 mL DMEM medio osoa eta 2 mg/mL puromizina (P8833, Sigma-Aldrich) gehitu ziren eta berogailuan 37 °C-tan 2 egunez inkubatu ziren. Transfekzioa modu egokian burutu baldin bazen zelulak biziraungo zuten, bestela puromizinarekiko sentiberak izango ziren eta hil egingo ziren. Mikroskopia optiko alderantzizkatuan T-75 edukiontzi bakoitzean zelulak zeudela baieztatu ondoren, A (1.1. eta 2.1. sekuentziak dituen plasmidoak dituen) eta B' (1.2. eta 2.2. sekuentziak) lerro-zelularrak aukeratu ziren ikerketarekin jarraitzeko eta gainerakoak izoztu ziren.

Izozketa burutzeko, T-75ak PBSarekin garbitu ziren, tripsina bidezko aurreko prozesua jarraituz zelulak askatu ziren eta zentrifugatu ondorengo gain-jalkina bota ondoren, 15 mL-ko tutuetan 900 µL SFB eta 100 µL % 10eko DMSO isuri ziren. Azkenik, lortu zen nahaste hori izozteko 1 mL-ko edukiontzietan (Nalgene® Mr. Frosty, C1562-Sigma Aldrich) sartu ziren.

### 3.4. DILUZIO KLONALA

Izoztu ez ziren eta T-75 edukiontzian zeuden SW620 zelulen A eta B' kolonietatik, puruak ziren zelulak lortzeko diluzio klonala egin zen. Teknika hori zelula esekiduraren diluzio jarraituak egitean oinarritzen da, putzu bakoitzeko zelula bat edo gutxiago lortu arte. Horrela klon indibidualak isolatzea lortzen da eta zelula-kolonia puruak lortzen dira (zelula bakar batetik hazitako koloniak). Hori aurrera eramateko, 96-putzuko plakak (Corning® 96-well microplates) erabili ziren. Prozesua burutzeko lehenengo putzuak hutsik utzi ziren eta gainerako zutabeetako putzuetako 7 lerrotan 90 µl DMEM medio osoa jarri zen. Jarraian, zelulen medioa bota eta PBSarekin garbitu ondoren, kultiboak askatzeko tripsina bidezko prozedura burutu ostean, 1,2 mL-ko DMEM medio osoa gehitu zen 15 mL-ko tutuetan. Nahaste horren 100 µL pipetarekin ondo irabiatu ondoren, lehenengo zutabeetako putzu bakoitzean isuri ziren. Gero, lehenengo putzuko zutabeko bigarren lerroan, lehenengo lerroko putzutik 10 µL isuri ziren. Jarraian, prozedura behin eta berriz egin zen. Kontuan hartu behar da, aurreko putzuko 10 µL hartzean eta hurrengo putzuan lagina isuri aurretik, lehenik nahastea pipetarekin irabiatu zela eta prozesu hori putzu guztietan errepikatu zela. Diluzioak aurrera joan ahala, azkenean PCSK9a editatuta zuten zelula puru bakarretik hasitako koloniak egon beharko ziren, horietan genotipaketa modu egokian egiteko. Guztira plaketako 12 zutabeetatik 12ak bete ziren eta zeuden 8 lerro guztiak ere. Behin diluzioak eginda, 10 egunetan 37 °C-tan berogailuan utzi ziren.

Beraz, prozesua amaitu orduko 96-putzuko 2 plaka lortu ziren, A (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 eta A12) eta B' (B'1, B'2, B'3, B'3, B'5, B'6, B'7, B'8, B'9, B'10, B'11 eta B'12) zelula-lerroak zituztenak.

### 3.5. DNA-REN ERAUZKETA

Behin kolonia puruak izanda, horien genotipaketa egin zen PCSK9aren genearen edizioa modu egokian gertatu zela eta PCSK9 genearen bi aleloak editatuta zeudela bermatzeko. Hori egiteko kolonia puruak behar zirenez, hau da, zelula bakar batetik hazitako zelula-koloniak, aurreko diluzio klonalaren zelula-lerro bakoitza, A (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 eta A12) eta B' (B'1, B'2, B'3, B'3, B'5, B'6, B'7, B'8, B'9, B'10, B'11 eta B'12) alegia, erabili ziren.



Plaka bakoitzaren zelulak zituen azken zutabe bakoitzetik, 10 µL hartu ziren eta T-25etan (83.3910, Sarstedt) erein ziren 4 mL DMEM medio osoan 37° C-tan 48 orduz. Jarrian, tripsina bidezko askatzea egin zen, eta zentrifugatu (1500 bm, 5 min) ondoren lortu zen jalkina, 1 mL suerotan bersuspenditu eta bitan banandu zen. Erdia 15 mL-ko tutuan 1 mL DMEM medio osoa gehitzen berreseki zen 3 mL DMEM osoko T-25 berri batean jartzeko. Ostean, 37 °C-tan 48 ordu inkubatu ondoren izoztu ziren, edizioa arrakastatsua izatekotan lagin bezala erabili ahal izateko (izozketa prozesua 3.3. atalean egindakoaren berdina). Jalkinaren beste erdia (500 µL) QIAamp DNA Mini Kit (51304, Qiagen) protokoloa jarraituz DNA erauzteko erabili zen. Prozedura amaitu ondoren, DNAREN kuantifikazioa NanoDrop bidezko (Synergy™ HT, BIOTEK) UV espektrofotometroa erabiliz egin zen. Horretan neurketak 260 nm eta 280 nm-tan egin ziren. Azkenik, laginaren kalitatea bermatzeko, 260/280 ratioa kalkulatu zen. Jakina denez, balioa 2 denean DNA purua kontsideratzen da eta beraz genotipatzeko prozesuarekin jarraitu ahal da, baina balioa 2 baino txikiagoa denean, lagina kutsatuta dagoela esan nahi du eta ezinezkoa litzateke genotipatzeko prozesuarekin jarraitzea.

### 3.6. PCR

Genotipaketa burutzeko beharrezkoa den lagina lortu behar zenez, eta horretarako, PCSK9 genea anplifikatu behar zenez, PCR konbentzionala erabili zen. Zelula-klon bakoitzeko (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B'1, B'2, B'3, B'3, B'5, B'6, B'7, B'8, B'9, B'10, B'11 eta B'12) Eppendorf bat prestatu zen zeinetan 4 ng/µL DNA lortzeko beharrezko zen lagin bolumena gehitu zen, 0,8 µL *forward* eta *reverse* hasle (**5. Taula**), 5 µL MyTaq™ Red Mix (2504, Bioline) eta azkenik, 10 µL-ko bolumena lortu arte DEPCTreated H<sub>2</sub>O (D5758, Sigma-Aldrich) gehitu zen.

DNAREN anplifikazioa egiteko Thermal Cycler (MyCycler™, Bio-Rad) termozikladorea erabili zen ondorengo balditzetan jarritz: 1 minutuz 95 °C-tan (ziklo 1); 15 segundoz 95 °C-tan (35 ziklo), 15 segundoz 60 °C-tan (35 ziklo), 10 segundoz 72 °C-tan (35 ziklo) eta azkenean, 4 °C-tan mantendu ziren laginak hartu ziren arte. Behin prozesua bukatuta, CRISPR/Cas9 teknika eraginkorra izatekotan, lortutako anplikoaren tamaina 200 base parekoa (bp) izango zen, eta eraginkorra ez izatekotan ordea, 400 bp-koa.

**5. Taula. PCSK9 genea anplifikatzeko erabili ziren hasleen sekuentziak.** Lehenengo haslea, forward haslea, 3'→5' zentzuzko DNA katean (minus edo antisense) kokatzen da 5'→3' zentzura gene sekuentzia anplifikatzeko. Bigarren haslea, reverse haslea, kontrakoa egiten du 3'→5' zentzura gene sekuentzia aplifikatzeko.

	<b>Forward haslea (5'→3')</b>	<b>Reverse haslea (5'→3')</b>
<b>PCSK9</b>	AGTCCGGGGGTTCCGTTAAT (20)	GAGGAGACCTAGAGGCCGT (19)

### 3.7. ELEKTROFORESIA

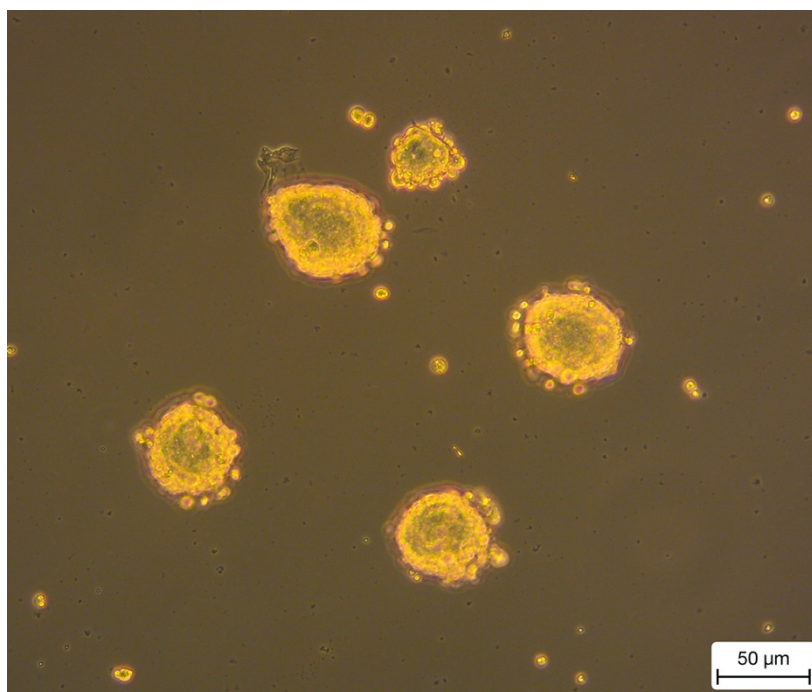
PCSK9aren edizioa eraginkorra izan zen aztertze azkenengo urratsa da. PCRaren ondorioz lortu ziren DNA sekuentziak erabili ziren agarosazko gelean elektroforesia egiteko. Teknika horretan, izan ere, DNA zatikiak gelean daudela, katodotik (karga negatiboko poloa) anodorantz (karga positibokoa) mugitzen dira DNAaren fosfatoen ondoriozko karga negatiboak eraginda. Gainera, beraien mugimendua DNA zatiki bakoitzak duten pisu molekularren arabera izango denez, tamaina desberdineko DNA zatikiak banatu eta desberdintzea posible egiten du. Hori gertatzeko DNA molekulen masa/karga uniforme izatea ere ezinbestekoa da. Era horretara 400 bp DNA zatiak katodotik hurbilago ikusiko ziren eta 200 bp-takoak ordea, anodotik hurbilago.

Elektroforesia burutzeko lehenik agarosazko gela prestatu zen. Horretarako 0,6 g agarosa (8012, Conda) eta 30 mL TAE 1X (T8280, Aldrich ) erabili ziren. Horiek berotu eta nahastu ondoren, 1,5 µL GelRed Nucleic Acid Stain (41003, Biotium) gehitu zitzaion nahasteari. Azkenengo horrek transluminadorearen ultramore izpiei (UV) esker DNA zatikiak eratuko zituzten bandak ikustea ahalbidetzen zuen produktua zen. Nahastea prest zegoela, moldean jarri zen kaleak sortuko zituen orraziarekin batera eta gela solidotzen utzi zen. Hori behin bukatuta, lehenengo kalean 10 µL HyperLadder™ 100 bp-ko markatzaile (33029, Biotium) jarri ziren eta hurrengo 12 kaleetan, 10 µL lagin (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B'1, B'2, B'3, B'3, B'5, B'6, B'7, B'8, B'9, B'10, B'11 eta B'12). Ondoren 1X TAE indargetzailea elektroforesi gela estaltzeko erabili zen. Azkenik, elektroforesi tresna (RunOne™ Electrophoresis Cell and Power Supply, EmbiTec) 100 V-tan martxan jarri zen eta 20 minutuz migrazioa gertatzeko itxaron zen. Prozesua amaitzean, gela hartu eta transiluminadorean (High-Performance UV Transilluminators, UVP)

lortutako emaitza aztertzeko jarri zen. Ikerketarekin jarraitzeko, 200 bp-ko banda homozigotikoak zituzten laginen izoztutako zelula-lerroak baino ez ziren erabiliko.

### 3.8. KOLONOSFERAK

MZAekin lan egiten dutenen artean, oso ohikoak dira *in vitro* 3D bezala ezagutzen diren kultiboak, zeinetan zelulak suspentsioan hazten diren, *in vivo* baldintzetan jarrita. Kolon-ondesteko minbizia horrela kultibatzean sortzen diren esferoideak kolonosfera izena hartzen dute (79). MZAk sortzeko beraz, kolonosferak sortuko ziren lan honetan (14. Irudia).



**14. Irudia. Kolonosferen irudi mikroskopikoa.** Irudian koloneko minbizi-zelula amak (MZA) sortzen dituzten egitura esferikoak agertzen dira (irudia P. Garcia-Gallastegik erraztuta).

Kolonosferak eratzeko hainbat MZA mota sortu ziren. Alde batetik, PCSK9a modu egokian editatuta zuten SW620ak erabili ziren. Bestetik, zelula horiekin konparatzeko hiru kontrol erabili ziren: aurretik prestatuta zeuden bi plasmido huts zituzten SW620 zelulak, lipofektamina gehitu zitzairen SW620 zelulak eta SW620 zelula basatiak.

Kolonosferak sortzeko 6 putzutako bi suspentsio plaka (83.3920.500, Sarstedt) erabili ziren. Plaka horiek gainazal hidrofobikoa zuten, zelulak gainazalera atxikitzea saihestu zen, zelulak esferak sortzera bultzatuz. Plaka bat A-tik lortutako 3 zelula-

lerroekin eta B'-ren 3 zelula-lerroekin bete zen, eta bestea, aipatutako 3 kontrolekin. MZAk sortzeko 2 mL DMEM F12 medio (11320033, Gibco), N-2 gehigarria (17502048, Gibco), B27 gehigarria (A3582801, Gibco), glukosa (A2494001, Gibco), 100 U/mL penizilina eta 150 µg/mL estreptomizina (15140-122, Gibco), 10 ng/mL FGF<sub>2</sub> (Fibroblastic growth factor) eta 20 ng/mL EGF (Epidermal growth factor) (Peprotech, London, UK) erabili ziren (guzti horri DMEM F12 medio osoa deituko zaio).

PCSK9a modu egokian editatuta zuten zelulak lortzeko, A eta B' lerro bakoitzeko 3 T-25 hartu (3.5. puntuan izoztutakoak) eta desizoztu ziren. Horren ostean, 4 mL DMEM medio osoko T-25 edukiontzi batean erein ziren berriz eta 37 °C-tan 48 orduz inkubatu ziren. Jarraian zelulak aurretik azaldutako tripsina bidezko prozedura berdina erabiliz askatu ziren eta zentrifugazioaren ondorioz sortutako gain-jalkina bota ondoren jalkina 1 mL DMEM medio osoan berreseki zen. Nahaste hori kontagailu automatikoarekin (TC20, Bio-Rad) zelulen kontaketa burutzeko erabili zen. Kontaketa egiteko nahastetik 5 µL zelula suspentsio hartu ziren eta 5 µL Trypan urdina (D2650, Sigma) tindatzailea gehitu zitzaien. Ostean, 2 mL DMEM F12 osoa gehitu zen plaketako putzu bakoitzean eta 10.000 zelula erein ziren tanta eran putzu bakoitzean.

Azkenik, 37 °C-tan eta 9 egunez berogailuan hazten utzi ziren. Bederatzigarren egunean, putzu aldaketa egin zen. Horretarako suspentsio bakoitza Eppendorf batera pasa zen, 1500 bm-tan 5 minutuz zentrifugatu ziren eta gain-jalkina bota ondoren, Eppendorfeko jalkinari 1 mL DMEM medio soila jarri zitzaion. Amaitzeko, nahaste hori 1mL DMEM soileko mediodun putzu berrietan 24 ordutan 37 °C-tan jarri zen.

### **3.9. PROLIFERAZIOAREN AZTERKETA**

24 ordu igaro ondoren, espektrofotometriaren bitartez MZAen hazkuntza eta bideragarritasun gaitasunak aztertzen ahalbidetzen duen XTT saio (11465015001, Sigma-Aldrich) kolorimetrikoa erabili zen. Saioa tetrazolio XTT gatzaren zatiketan oinarritzen da, formazan gatz disolbarria ematen duena. Prozesu hori soilik metabolikoki funtzionalak diren zeluletan gerta daiteke, mitokondrioko arnas-katean dagoen sukzinato-tetrazolio erreduktasa (EC 1.3.99.1) dela medio. Disolbagarria den formazan gatz, kolore ilun gorria aurkezten du, eta beraz, kolorearen kantitatea zuzenki erlazionatuta egongo da metabolikoki funtzionalak diren zelula kopuruarekin.

Beraz, XTT saioa burutzeko Cell Proliferation Kit II (XTT) protokoloa (11465015001, Sigma-Aldrich) jarraitu zen. Behin XTT nahastea lortuta, horren 50 µl XTT nahaste MZA dun putzuetako bakoitzean jarri ziren eta putzuak 4 ordutan inkubatu ondoren, UV espektrofotometroa erabiliz putzuen absorbantzia 455 nm-tan neurtuz formazan kolorantea kuantifikatu zen.

#### **4. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK**

Gaur egun, minbiziari aurre egiteko teknika ugari daude: kirurgia, erradioterapia, hormonoterapia, kimioterapia eta immunoterapia besteak beste. Hala ere, eta nahiz eta horien arteko konbinaketa desberdin ugari egin, ez dute minbiziaren guztizko desagerrarazpena ekartzen, eta berragerpenak (lokalak, erregionalak edo distantzian), ohikoak dira. Hala, koloneko minbiziaren kasuan, berragerpena % 40 ingurukoa da (80). Horren atzean, MZAk egon ahal direlakoan, lan honek eta honen inguruan egiten ari diren ikerketa orok, garrantzi handia daukate minbiziaren tratamenduan suposatu dezakeen iraultzagatik. Izan ere, koloneko minbizia gizonen eta emakumeen artean heriotza kausa handiko gaitza izanda, herrialde garatuetan bereziki altua dena, MZA en aurkako tratamenduek ezinbesteko garrantzia izan dezakete etorkizunean.

Sarreran ikusi denez, PCSK9ak garrantzia handia hartu zuen LDLaren metabolismoan daukan harremana dela eta. Harreman hori ere, minbizian ikusi da. Hala, PCSK9aren isilpenak, zelularen etengabeko energia-hornikuntzarekin erlazionatuta egon daitekeela uste da. Izan ere, PCSK9 gabezia LDLRak degradatzen ez direnez, LDL gehiago sartzen da zelulen barnera. Hori hepatokartzinomako zeluletan eta metastasi hepatoikoetan ikusi da (69) (72). Horrez gain, PCSK9aren gainadierazpena tumore zelulen metastasi gaitasunaren handipenarekin ere erlazionatu da (69).

Bestalde, konbertasak izanda, zelula kanpoko matrizeko metaloproteasen, atxikura-molekulen eta hazkuntza-faktoreen aitzindariak aktibo bilakatzeko ezinbestekoak direla ere kontuan hartu behar da. Horiek guztiak ere, zelula hazkuntzan eragina dute. Horren adibide lehen aztertutako metaloproteasen eta konbertasen arteko harremana dago, non konbertasak inbasio tumorala edota metastasiaren garapenean eragina dutela ikusi den (64) (66).

PCSK9aren inguruko azkenengo urteetako ikerketak beraz, konbertasa horren eta minbiziaren arteko erlazioa bilatzen saiatzen egon dira. Izan ere, PCSKen adierazpena handituta ikusi da hainbat tumoreetan, koloneko minbizietan barne (35).

Dena den, PCSKen eta minbiziaren inguruko ikerketak gero eta ugariagoak badira ere, MZAen eta PCSKen erlazioa aztertzen duten ikerketa publikaturik ez dago. Hala ere, ikerketa talde batek gainadierazpen hori MZAetan frogatu du (78), baina PCSK9ak zer nolako funtzioa duen oraindik ez da aurkitu. Lan honetan hori izan da lortu nahi izan dena, PCSK9 ezak MZAen hazkuntzan eta bideragarritasunean zer nolako eragina duen aztertzea.

Nahiz eta PCSK9aren funtzioa MZAetan ezezaguna den, aurretik aipatutako ikerketek apoptosiarekin erlazioa izan dezakeela iradokitzen dute. Horien arabera, PCSK9aren isilpenaren bitartez: c-zitokromo mitokondrialaren gutxipena eta zitoplasmatikoaren handipena gertatzen da, Bax/Bcl-2 ratioren handipena gertatzen da eta azkenik, proapoptotikoak diren proteinen handipena (kaspasa-3) eta antiapoptotikoak direnen gutxipena (survivina, p-Akt eta XIAP) (40) (67). Horrez gain, PCSK9aren isilpena erretiku endoplasmaticoaren estresak eragindako apoptosiarekin (40) eta TNF $\alpha$ -k bideratutako apoptosi bide estrintsekoarekin ere erlazionatu da (69).

Beraz, PCSK9ak minbizi-zelulak apoptositik babesten ditu eta PCSK9 ezak, apoptosira bideratzen ditu bide desberdin ugari erabiliz. Zelula parentaletan hori horrela bada, MZAetan berdina gertatzea espero da. Hala eta guztiz ere, kontuan hartu behar da minbizi-zelula guztiek ez dutela berdin erantzuten. Adibidez, prostatak minbizi-zeluletan PCSK9aren isilpenak kontrako efektua duela ikusi da, erradiazioak sortzen duen eraginetik babesten baititu zelulak, apoptosia ekidinez (77). Besta adibide bat PCSK9aren isilpenak etengabeko energia-hornikuntzarekin (hau da, PCSK9 ezak LDLR gehiago egotea eragiten du eta hortaz, energia gehiago) lotu duen ikerketa dago (72).

PCSK9ak duen funtzioa zelula bakoitzekiko desberdina izatea, proteina konbertasak duen kokapenarekin erlazioa izan dezake. Era horretara, PCSK9a minbizi-zelula batzuetan babesa eta beste batzuetan heriotza sustatzea posible litzateke. Gainera, zelula batzuetan minbizi-metabolismo lipidikoarekin erlazionatuta egotea eta beste batzuetan, ordea, apoptosiarekin egotea ere azal dezake. Kokapenaz gain, kontuan

hartzekoa da MZAen hierarkia ereduak erakusten duen heterogeneotasun handia, lan honetan aurrerago PCSK9aren eragina aztertzeko kontuan hartuko dena **(16. Irudia)**.

Aurreko ikerketak beraz, kolon-ondesteko MZAetan PCSK9a babes funtzioa duela pentsatzera bultzatzen dute. Ikerketa talde honek PCSK9ren eragina kolon-ondesteko zelula parentaletan aztertu zuenean, babes hori ere frogatu zen. Ikerketa horretan SW620 zelula parentalen hazkuntza aztertu zen, CRISP/Cas9 teknikaren bidez PCSK9 isilduta zuen zeluletan eta basatiak ziren zeluletan. Ikerketan XTT saioa burutu ondoren, editatu gabeko SW620 zelula basatietan hazkuntza handiagoa zela ikusi zen PCSK9a editatuta zutenekin alderatuz ( $p < 0.001$ ). Emaita horiek PCSK9aren isilpenak SW620 zelulak apoptosira bideratu ahal zituztela iradokitzen zuen. Emaita horietatik abiatuz eta zelan MZAetan PCSK9aren gainadierazpena ikusi zen, MZAetan eragina berdina izango zela pentsatuz, saioa MZAekin errepikatu zen. Ikerketa saio horren emaitzen arabera, nahiz eta PCSK9a editatuta zuten MZAetan kontroleko MZAetan baino hazkuntza txikiagoa izan, lortutako emaitzak ez ziren esanguratsuak ( $p = 0,608$ ) izan. Gainera, kolonosferen azalerak konparatu zirenean, lortutako emaitzek PCSK9aren edizioak MZAetan eraginik ez zuela adierazten zuten.

Beraz, koloneko minbizi-zelulen PCSK9aren isilpenak hazkuntzan eragina zuela frogatu izan zen arren, ezin izan zen berdina frogatu MZAetan. Horren arrazoia zein izan daitekeen aztertzerakoan, metodologian akats bat aurkitu zen, lan hau egiterakoan kontuan hartu zena. Akats hori, SW620 zeluletatik MZAk lortzeko prozesuan zegoen. Izan ere, MZAk sortu ondoren, F12 medio osotik segidan hartu ziren eta ikerketarekin jarraitu zen. Kontuan hartu behar da erabilitako DMEM F12 medioak EGF (hazkuntza-faktore epidermikoa) eta FGF<sub>2</sub> (hazkuntza faktore fibroblastikoa) hazkuntza faktoreak dituela eta horiek hazkuntzarako oso elikagai aberatsak direla. Medio aberats horretan MZAk sortu, eta atera bezain laster aztertzeak, benetako emaitzak estali ahal izan zituen. Horrela PCSK9rik gabeko zelulak apoptosiaren estimulua izan arren, horren aurka hazkuntza faktore ugarien eragina gainjarri ahal izan zen.

Prozesua horrela burutzeak PCSK9rik gabeko zelulen bideragarritasunean eta biziraupenean eragina izan dezakeela pentsatuz, oraingo honetan, MZAk sortu ondoren 24 orduz medio basal batean jarriko ziren. Horrek F12 medioan zeuden

hazkuntza faktoreen eragina apalduko zuen eta PCSK9aren benetako eragina neurtzea posiblea egingo zuen.

Tamalez, ikerketa taldearen kontroletik haratago egon ziren arazo logistikoek, laborategiko laneko emaitzak lortzea ezinezkoa egin zuen. Hala ere, aipatutako arrazoi guztiengatik MZAen hazkuntzaren moteltzea gertatu behar zela da emaitzarik probableena. Beraz, kolon-ondesteko MZAetan PCSK9ak babez funtzioa duela eta PCSK9 ezak apoptosi bide intrintsekoaren ala estrintsekoaren aktibazioa dakarrela da esperotako emaitza. Hala ere, beti buruan izan behar da kontrakoa ere posiblea litzatekeela, eta PCSK9a isiltzeak apoptosiaren aurkako babesa ematea. Horrela, prostatako kartzinoman ikusitakoa gerta daiteke, nahiz eta oso probablea ez den. Azkenik, eraginik ez izatea ere posible litzateke, eta PCSK9a izateak edo ez izateak inolako aldaketarik ez eragitea.

PCSK9 ezak hazkuntzan eragina ez izatearen kasuan zein hazkuntza moteltzearenean, interesgarria litzateke LDL aberatseko medioan MZAen hazkuntza kontrolarekiko handitzen den ikustea. Modu horretan PCSK9aren galera LDL metabolismoarekin erlazionatu ahal izango zen. Edonola ere, LDLaren benetako eragina aztertzeo, hoberena *in vivo* esperimentuak aurrera eramatea izango litzateke, *in vitro* zeluletan kolesterolaren eta metabolismoaren eraginak ez direlako guztiz ondo ikusten. LDLaren eraginaz gain, plasmako PCSK9aren eragina aztertzea ere interesgarria litzateke, horrek zelulen LDLR eta LRP-1 proteinen (74) adierazpena txikitzen duten edo zer nolako eragina izan dezakeen azter daiten.

Dena den, zelan kolon-ondesteko MZAetan PCSK9aren gainadierazpena ikusi den, aipatu diren aukera guztietatik eta aurreko guztia kontuan hartuz gero, PCSK9ak apoptosiaren aurkako babesa ematen duela da logika gehien duen teoria

Beraz, tumoreak hain konplexuak eta heterogeneoak izanda, parentalak diren zeluletan PCSK9aren isilpenak hazkuntza moteltzen badu ere (hau da, PCSK9a onuragarria), MZAentzat isilpen hori onuragarria, kaltegarria edo efekturik ez izatea gerta daiteke, jatorri zelular berdina izanda ere, tumore masa heterogeneoa eratzen duten bi zelula desberdin baino ez direla kontuan hartu behar baita.



Izan ere, ikerketa honen bilaketa bibliografikoa egiterakoan, hepatokartzinomaren kasuan interesgarria den zerbait ikusi da. Halaber, minbizi horretan PCSK9aren isilpenak bi eragin izan ditzakela ikusi da. Hori hobeto ulertzeko, ikusi **15. Irudia**.

	Tumoreko PCSK9 adierazpena	Estromako PCSK9 adierazpena	Hiperlipidemia	Minbiziaren Fasea
Bath M. et al	↓	↑	✓	Goiztiarra
Nagashima S. et al	↑	↓	✓	Aurreratua
Sun X. et al	↑	↑	✓	Aurreratua

**15. Irudia. PCSK9a hepatokartzinoman aztertu duten ikerketa desberdinen emaitzen konparaketa.** Irudian ikerketa desberdinak batzen dituen emaitzak alderatzen dira. Lehenengo bi zutabeetan hepatokartzinomako zelulen eta gibleko estromako PCSK9aren adierazpena handituta ala txikituta dagoen konparatzen da. Horrez gain, hirugarren zutabeak ikerketa guztietan hiperlipidemia hepatokartzinomaren metastasiaren garapenerako onuragarria dela eta PCSK9ak horretan eragina duela islatzen du. Azken zutabeak egindako ikerketak minbiziaren zein fasetan egin diren islatzen du, goiztiarra ala aurreratua izan daitekeena.

Hasierako estadioetan aztertutako pazienteetan, PCSK9 ezak zelularen energia-hornikuntzarekin eta beharrezkoa den elikagai ugariko mikroingurunea sortzearekin eta hortaz, metastasi gaitasunarekin erlazionatu da (**15. Irudia, Bath M.**). Baina beste ikerketa batek, PCSK9 ezak, TNF $\alpha$ -ren handipena eta apoptosiarekiko kitzikakorrak (Bcl-2 eta TRAF2 gutxiago) zelulak uzten dituela erakutsi du, horiek apoptosira bultzatuz (**15. Irudia, Sun X.**) (69). Emaita bi horien artean zer dagoen jakin ez arren, behar bada, MZAekin eta MZAen plastikotasunaren ereduarekin erlazionatu daiteke.

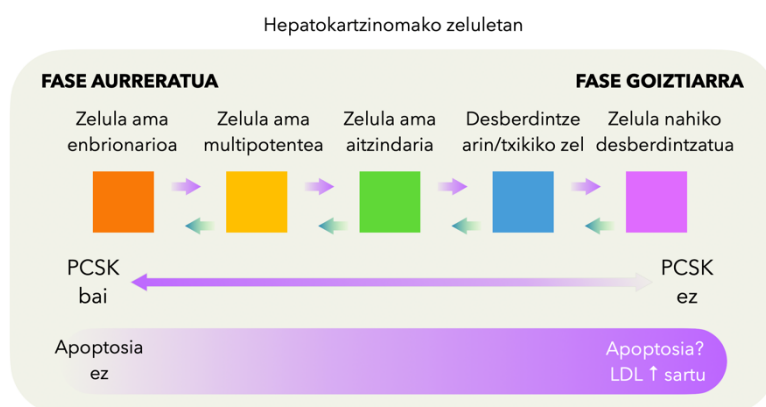
Baliteke zelulak des-desberdintzen diren heinean PCSK9a isiltzetik gaindiaraztera pasatzera (**16. Irudia**). Hasierako faseetan (**15. Irudia, Bath M.**) (**16. Irudia morez**) beharrezkoa den mikroingurunea sortzen dute tumore-zelulak; LDLz hornitzen dira, PCSK9a plasman handitzen joaten da eta gainerako estromako zeluletan aldaketak eragiten dituzte. Estromako zelula horietan, LDLRak degradatzen dira eta beraz, hiperlipemia sortzen da (69). Printzipioz, PCSK9aren isilpenak, apoptosira bideratu beharko zituen minbizi-zelulak, baina apoptositik ihes egiteko gaitasuna, sortutako mikroingurunetik, LDL sarrera handitik eta PCSK9 plasmatikoaren handipenagatik etor daiteke. Beraz, hasierako fase horietan PCSK9aren isilpena nagusitzen den arren, gerta daiteke minbizia aurreratzen joan egiten den ahala (**15. Irudia, Sun X**), tumore

zelula horiek PCSK9aren gainadierazpena aurkeztea (**16. Irudia laranjaz**). Hori horrela izatea ahalbidetzen duten zenbait datu daude.

Alde batetik, hepatokartzinomako zeluletan PCSK9aren adierazpenaren murrizketa ikusi duten ikerketak, minbiziaren fase goiztiarretan edota erasokortasun gutxiko minbizietan egin dira (72), beraz, hori ikusita posiblea da minbiziaren hasierako faseetan PCSK9aren adierazpena murriztuta egotea (**15. Irudia, Bath M**).

Bestetik, neurogliomaren (67) eta biriketako adenokartzinomaren (40) kasuak daude, PCSK9a babesa ematen duela aldarrikatzen dutenak (hortaz, PCSK9aren isilpena apoptosia ekarriko zuen) (**12. Irudia, arrosaz eta urdinez**). Horrez gain, minbiziaren fase aurreratuko gibealeko zeluletan, PCSK9aren isilpenak, TNF $\alpha$  bidezko apoptosia eragiten duelaren ikerketa ere badago (hortaz, PCSK9a babesa ematen du) (69) (**12. Irudia, laranjaz, 2. gezi gorria**) (**15. Irudia, Sun X**). Gainera, azkenik, ikerketa baten ikusitako kasua ere badago. Hori hepatokartzinoma fase aurreratuan (**15. Irudia, Nagashima S.**) zuen eta PCSK9aren gainadierazpena erakusten zuen gizona zen (74). Horrek fase aurreratuetan PCSK9aren gainadierazpena dagoela pentsatzera eramaten du.

Horiek guztiak zuzen badaude, eta ikerketak guztiak bateraezinak ez direla kontsideratzen badira, aurretik proposatutako eredua (**16. Irudia**) zuzena izan daiteke, hau da, hepatokartzinomako zelulek des-desberdintzen diren heinean PCSK9a isiltzetik gaindiaraztera pasatzera.



**16. Irudia. Hepatokartzinomako zelulak MZAen teoriaren ikuspuntutik begiratuta.** Minbizia fase aurreratuetan (ZAE, laranjaz) PCSK9ak apoptositik babesten ditu zelulak, eta, horiek desberdintzen diren heinean babes hori galtzen dute. Hala ere, PCSK9 ezak zelulak LDLz hornitzen ditu energia emanez eta bestelako aldaketak eraginez, apoptositik babestuz. Beraz zelulak desberdintzen diren heinean, PCSK9aren adierazpenaren murrizketa dago.

Beraz, fase goiztiarretan (desberdintzapen handiko zeluletan) PCSK9 ezak zelulak apoptosiarekiko kitzikor uzten badituzte ere (TNF $\alpha$  bidea), hainbat mekanismo direla medio (mikroingurunea, PCSK9 plasmolikoaren eragina, LDL ugariren sarrera edota ezezagunak diren mekanismoak) apoptositik ihes egiten dute minbizi-zelulak. Fase aurreratuetan ordea, apoptosirako seinaleek gainjartzen hasten diren puntuan (oreka galtzen hasten denean), PCSK9a adierazten dute zelulek (ziur aski hierarkiaren goiko aldeko zelulak), apoptositik ihes egiteko, puntu horretan LDL energia-hornikuntza edo mikroinguruneko seinaleak aski ez baitira apoptosia galarazteko **(16. Irudia)**. Aipatu behar da ere, zelan fase goiztiarretan hiperlipidemiak minbizi-zelulen energiaren lorpenean garrantzia duen, eta fase aurreratuan, ordea, metastasi gaitasunean.

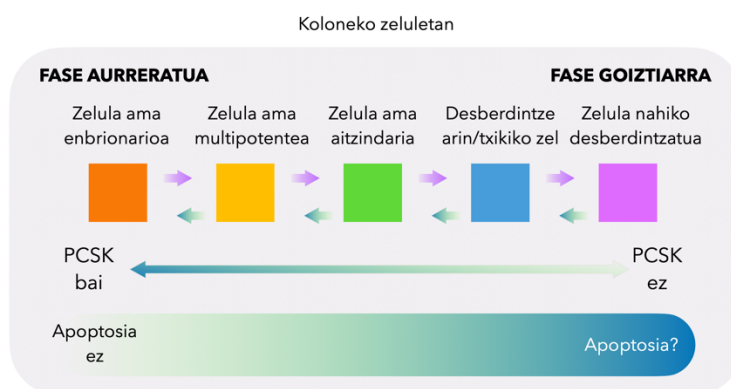
Dena den, minbizia nahiko konplexua den prozesua dela eta tumoreak oso heterogeneoak direla jakinda, ziurrenik ikerketa horiek guztiak aurrera eraman zirenean, ikerketarako erabili ziren minbizi-zelulek zituzten mutazioak zein hierarkian zuten kokapena ere, oso desberdinak ziren. Guzti hori argitzeko, ezinbestekoak dira MZAen inguruko ikerketa gehiago aurrera eramatea.

Hepatokartzinoman ikusitakoa aztertu ondoren, teoria berdina kolon-ondestean aplikatu daiteke. Behar bada, hepatokartzinomako zelula desberdintzatuetan bezala **(15. Irudia, Bath M)**, PCSK9 ezak, koloneko minbizi-zelula desberdintzatuen ere hazkuntza bultzatzea ekar dezake. Horren aurka ikerketa taldearen aurreko ikerketa dago. Horretan, aurretik aipatu denez, PCSK9 ezak hazkuntza moteltzearekin erlazionatu zen (hau da, PCSK9a minbizi-zelulentzat babes funtzioa betetzen zuela).

Hala ere, kontuan hartu behar da SW620 zelulak kolon-ondesteko zelula metastasikoetatik eratorritakoak direla eta metastasi gaitasuna duten zelulak, oro har, MZAen hierarkia ereduaren goiko aldean kokatzen direla. Beraz, aurreko ikerketan SW620 zelulak erabili zirenez, zelula horietan zein nahiko desberdintzatutako minbizi-zeluletan, PCSK9ak izan dezakeen eragina desberdina izan daiteke.

Horrez gain, baliteke aurretik egindako ikerketan PCSK9 ezak apoptosia ez ekartzea eta zelulen hazkuntza bultzatzea LDLR degradazioa galaraziz eta LDLa barneratuz, energia lortzeko **(17. Irudia)**. Hala ere, minbizi-zelulek apoptosia ez gertatzeko beharrezkoa duten energia LDLtik lortzen dutenez eta mikroinguruneko estimulazio seinale desberdinetatik lortzen dutenez, eta egindako ikerketak hori aztertu ez zuenez,

benetan egoera errealean PCSK9 ezak hazkuntzan eragina izango zuen ezin da jakin. Beraz, zelulak LDLrik gabeko medioan hazita eta bizirauteko beharrezkoa duten mikroingurunerik gabe, lehen aipatutako apoptosi oreka horretan, apoptosiaren aldeko estimuluak gainjartzea ekar dezake, zelulen hazkuntza motelduz. Hori dela eta, LDL eta PCSK9 ugariko *in vitro* medioetan (Bath M, eta kolaboratzaileek zelulak aurkitu zituzten bezala) zein *in vivo* egoeran zer gertatuko zen aztertzea interesgarria litzateke, lehen aipatu den bezala.



**17. Irudia. Koloneko zelulen PCSK9a MZAen teoriaren ikuspuntutik begiratuta.** Hepatokartzinomarekin antzeko berdina gertatuko dela suposatuz (16. Irudia), MZAk desberdintzen joaten diren heinean PCSK9aren adierazpenaren gutxipena dakartza. PCSK9 ezak apoptosia ekarriko zuen dudan jartzen da irudian.

Beraz, PCSK9aren isilpenak hazkuntzaren geldotzearen sinonimoa ez dela ikusi da aurreko adibidean, oraindik ezezagunak diren mekanismoak erabiliz apoptositik ihes egiten ahal baitute zelulek.

Argi dago minbiziaren mundua oso zabala eta konplexua dela, eta MZAen agerpenak, konplexutasuna handitu baino ez duela egin. Konplexutasun hori ulertzeko (edo konplexutasun berriak aurkitzeko) eta minbizi prozesu bera ulertzeko ere, ezinbestekoak dira minbizi-zelula amen ikerketa gehiago.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Euskadi.eus [Internet]. Euskadi: Eusko Jaurlaritzako Osasun Saila; 2001 – 2017 [eguneratua 2010–02–1; kontsulta 2019–10–08]. Erabilgarri: <https://www.euskadi.eus/informacion/registros-de-cancer/web01-a3regepi/es/>.
2. O'Connor CM, Adams JU. Essentials of Cell Biology [Internet]. Cambridge: Nature Education, 2010 [eguneratuta 2014–01–17; kontsulta 2019–11–12]. Erabilgarri: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/cell-division-and-cancer-14046590/#>.
3. Cancer.gov [Internet]. U.S. National Institutes of Health, National Cancer Institute; 2019 [eguneratua 2019–10–19.]. Erabilgarri: <https://www.cancer.gov/types>.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. GLOBOCAN. The Global Cancer Observatory (GCO). 2012 v1.0; IARC CancerBase No. 11.
5. Dekker E, Tanis P, Vleugels JL, Kasi P, Wallace M. Colorectal Cancer. The Lancet. 2019; 394(10207): 1467 - 1480.
6. Henrikson N, Webber E, Goddard K, Scrol A, Piper M, Williams MS, et al. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. Genetics in Medicine. 2015; 17(9): 702–712.
7. Medema J. Cancer stem cells: the challenges ahead. Nature Cell Biology. 2013;15(4): 338–344.
8. Nassar D, Blanpain C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. Ann Rev Pathol. 2016;11(1): 47–76.
9. Muzny D, Bainbridge M, Chang K, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012;487(47407): 330–337.
10. Loree J, Pereira A, Lam M, Willauer AN, Raghav K, Dasari A, et al. Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and consensus molecular subtypes. Clin Cancer Res. 2018;24(5): 1062–1072.
11. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Nat Med. 2011;17(3): 313–319.
12. Jung Y, Kim W. Cancer stem cell targeting: Are we there yet? Archives of Pharmacal Research. 2015;38(3): 414–422.
13. Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman I. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001;414(6859): 105–111.

14. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61(5): 759–767.
15. Bomken S, Fiser K, Heidenreich O, Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. *Br J Cancer*. 2010;103(4): 439–445.
16. Jariyal H, Gupta C, Bhat VS, Wagh JR, Srivasrtava. Advancements in Cancer Stem Cell Isolation and Characterization. *Stem Cell Rev and Rep*. 2019;15(6): 755–773.
17. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5): 646–674.
18. Dalerba P, Cho R, Clarke M. Cancer stem cells: models and concepts. *Annual Review of Medicine*. 2007;58(1): 267–284.
19. Kreso A, Dick J. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014; 14(3): 275–291.
20. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*. 2017;23(10): 1124–1134.
21. Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan S, Peng L, Davis P, Itinteang T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Surgery*. 2016;3: 21.
22. Biswas S, Guix M, Rinehart C, Dugger T, Chytil A, Moses H, et al. Inhibition of TGF- $\beta$  with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *J Clin Invest*. 2007;117(5): 1305–1313.
23. Gage F. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287(5457): 1433–1438.
24. Rafii S, Kloss C, Butler J, Ginsberg M, Gars E, Lis R, et al. Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood*. 2013;121(5): 770–780.
25. Doulatov S, Vo L, Chou S, Kim P, Arora N, Li H, et al. Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4): 459–470.
26. Rich JN. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(1 Suppl 1): S2–S7.
27. Bruttel V, Wischhusen J. Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Front Immunol*. 2014;5: 360.
28. Triaca V, Carito V, Fico E, Rosso P, Fiore M, Ralli M, et al. Cancer stem cells-driven tumor growth and immune escape: the Janus face of neurotrophins. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(23): 11770–11792.
29. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5: 15179.
30. Sharma A, Rudra D. Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis. *Front Immunol*. 2018;9: 883.

31. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5(4): 275–284.
32. Donnenberg V, Donnenberg A. Multiple drug resistance in cancer revisited: The cancer stem cell hypothesis. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2005;45(8): 872–877.
33. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*. 2001;11(7): 1156–1166.
34. Gerlinger M, Rowan A, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(10): 883–892.
35. Bassi DE, Fu J, Lopez de Cicco R, Klein-Szanto AJ. Proprotein convertases: "Master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol. Carcinog*. 2005;44(3): 151–161.
36. Jaaks P, Bernasconi M. The proprotein convertase furin in tumour progression. *Int. J. Cancer*. 2017;141(4): 654–663.
37. Seidah NG, Sadr M, Chrétien M, Mbikay M. The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *J Biol Chem*. 2013; 30(288): 21473–21481.
38. Stoekenbroek R, Kastelein J. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9: from genetics to clinical trials. *Current Opinion Cardiology*. 2018; 33(3): 269–275.
39. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, Kinch L, Grishin NV, Horton JD, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet*. 2006;79(3): 514–523.
40. Xu X, Cui Y, Cao L, Zhang Y, Yin Y, Hu X. PCSK9 regulates apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells via endoplasmic reticulum stress and mitochondrial signaling pathways. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;13(5): 1993–1999.
41. Varret M, Rabès JP, Saint-Jore B, Cenarro A, Marinoni JC, Civeira F, et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet*. 1999;64(5): 1378–1387.
42. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(3): 928–933.
43. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003; 34(2): 154–156.

44. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*. 2004; 279(47): 48865–48875.
45. Maxwell K, Breslow J. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(18): 7100–7105.
46. Park S, Moon Y, Horton J. Post transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem*. 2004;279(48): 50630–50638.
47. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, Anderson NN, Bashmakov Y, Ho YK, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(15): 5374–5379.
48. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*. 2005; 37(2): 161–165.
49. Cohen J, Boerwinkle E, Mosley T, Hobbs H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006; 354(12): 1264–1272.
50. Hooper A, Marias A, Tanyanyiwa D, Burnett J. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis*. 2007;193(2): 445–448.
51. Lagace T, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*. 2006;116(11): 2995–3005.
52. Piper D, Jackson S, Liu Q, Romanow WG, Shetterly S, Thibault ST, et al. The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure*. 2007; 15(5): 545–552.
53. Chan JC, Piper DE, Cao Q, Liu D, King C, Wang W, et al. A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(24): 9820–9825.
54. Stein E, Mellis S, Yancopoulos GD, Stahl N, Logan D, Smith WB, et al. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N Engl J Med*. 2012;366(12): 1108–1118.
55. Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res*. 2014;115(5): 488–492.



56. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Aversa M, et al. ODYSSEY LONG TERM Investigators. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372(16): 1489–1499.
57. Ema.europa.eu [Internet] Londres: European Medicines Agency (EMA); 2015 [eguneratua 2019–11–13; kontsulta 2020–03–15]. Erabilgarri: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/praluent>.
58. Ema.europa.eu [Internet] Londres: European Medicines Agency (EMA); 2015 [eguneratua 2019–11–27; kontsulta 2020–03–15]. Erabilgarri: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/repatha>.
59. Sebatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017;376(18): 1713–1722.
60. Warden B, Fazio S, Shapiro MD. The PCSK9 revolution: Current status, controversies, and future directions. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2020;30(3): 179–185.
61. Smeekens S, Steiner DF. Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem*. 1990;265(6): 2997–3000.
62. Smeekens SP, Avruch AS, La Mendola J, Chan S, Steinert DF. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(2): 340–344.
63. Konoshita T, Gasc JM, Villard E, Takeda R, Seidah NG, Corvol P, et al. Expression of PC2 and PC1/PC3 in human pheochromocytomas. *Mol Cell Endocrinol*. 1994;99(2): 307–314.
64. Breslin MB, Lindberg I, Benjannet S, Mathis JP, Lazure C, Seidah NG. Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin. *J Biol Chem*. 1993;268(36): 27084–27093.
65. Mbikay M, Sirosis F, Yao J, Seidah NG, Chrétien M. Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer*. 1997;75(10): 1509–1514.
66. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature*. 1995;375: 244–247.
67. Piao MX, Bai JW, Zhang PF, Zhang YZ. PCSK9 regulates apoptosis in human neuroglioma u251 cells via mitochondrial signaling pathways. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(3): 2787–2794.

68. Poirier S, Prat A, Marcinkiewicz E, Paquin J, Chitramuthu BP, Baranowski D, et al. Implication of the proprotein convertase NARC-A/PCSK9 in the development of the nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 2006;98: 838–850.
69. Sun X, Essalmani R, Day R, Khatib A, Seidah NG, Prat A. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia*. 2012; 14(12): 1122–1131.
70. Tang Z, Jiang L, Peng J, Ren Z, Wei D, Wu C, et al. PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in THP-1 derived macrophages. *Int J Mol Med*. 2012;30(4): 931–938.
71. Wu CY, Tang ZH, Jiang L, Li XF, Jiang ZS, Liu LS. PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL via Bcl/Bax-caspase 3 pathway. *Mol Cell Biochem*. 2012; 359(1-2): 347–358.
72. Bath M, Skill N, Marcus V, Deschenes M, Tan X, Bouteaud J, et al. Decreased PCSK9 expression in human hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterology*. 2015;15: 176.
73. Chang PE, Ong WC, Lui HF, Tank CK. Epidemiology and prognosis of paraneoplastic syndromes in hepatocellular carcinoma. *ISRN Oncol*. 2013; 2013;684026.
74. Nagashima S, Morishima K, Okamoto H, Ishibashi S. Possible involvement of PCSK9 overproduction in hyperlipoproteinemia associated with hepatocellular carcinoma: A case report. *Journal of Clinical Lipidology*. 2016;10(4): 1045-1049.
75. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013; 1833(12): 3460-3470.
76. Shi J, Jiang Q, Ding X, Xu W, Wang DW, Chen M. The ER Stress-Mediated Mitochondrial Apoptotic Pathway and MAPKs Modulate Tachypacing-Induced Apoptosis in HL-1 Atrial Myocytes. *PLOS ONE*. 2015;10(2): e0117567.
77. Gan SS, Ye JQ, Wang L, Qu FJ, Chu CM, Tian YJ, et al. Inhibition of PCSK9 protects against radiation-induced damage of prostate cancer cells. *Onco Targets Ther*. 2017;10: 2139–2146.
78. Signaling Lab Ikerketa Taldea. [Emaizta probisiolanak] PCSK9 Overexpression in Colon Cancer Stem Cells (CSC). 2020 [Publikatu barik].
79. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto C. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 2017; 108(3): 283–289.
80. Friedenreich CM, Shaw E, Neilson HK, Brenner DR. Epidemiology and biology of physical activity and cancer recurrence. *J Mol Med (Berl)*. 2017; 95(10): 1029–1041.

