

Gradu Amaierako Lana
Biologia Gradua

CEMIP (KIAA1199) proteinaren azterketa melanomaren hedapenari lotutako balizko biomarkatzaile gisa

Egilea:
Luzia Urquiola Azpiazu

Zuzendaria:
Aintzane Apraiz Garcia

Zuzendarikidea:
Neskuts Izagirre Arribalzaga

© 2021, Luzia Urquiola Azpiazu

Laburpena

Larruazaleko melanoma azaleko minbizi mota ezberdinen artean aurki genezakeen kasu larrienetakoa da, honek erakusten duen metastasia garatzeko ahalmena dela eta. Gainera, azken urteotan intzidentzialioa goraka doa, eta ikerketa-ildo ugari abiatu dira horren harira, besteak beste, metastasi ahalmena aurreikusteko biomarkatzaile bila. CEMIP (*Cell Migration-Inducing and Hyaluronan-Binding Protein*, HYBID edo KIAA1199 moduan ere ezaguna) deritzon proteina interesgarria da zentzu honetan, migrazioa emendatzeaz gain, Azido Hialuronikoa (AH) degradatzeko duen gaitasunagatik eta EMT (*Epithelial Mesenchymal Transition*) faboratzeagatik eredu zelular ezberdinetan. CEMIP mailaren igoera hainbat minbizi motetan aurkitu da eta biomarkatzaile gisa proposatu den arren, larruazaleko melanoman izan dezakeen funtzioa oraindik ziurtatzeke dago, eta hori izan dugu gure lanean hizpide. Alde batetik, immunohistokimika bidez, ikusi dugu estadio ezberdinetako melanomadun gaixoek metastasia garatu edo ez garatzearen araberrako ezberdintasunak ageri dituztela CEMIP mailan, gaixotasunaren garapena aurreikusteko biomarkatzaile gisa izan dezakeen garrantzia frogatuz. Bestelako eredu zelularretan ez bezala, histaminak ez du CEMIP endogenoaren maila igoarazi baina plasmido bidezko CEMIP gainadierazpenak melanoma-zelulen migrazioa areagotzen duela frogatu dugu, zeinak metastasiaren garapenarekin erlazioa izan dezakeen.

Hitz gakoak: CEMIP, larruazaleko melanoma, metastasia, histamina

Abstract

Cutaneous melanoma is one of the most aggressive skin cancers type due to its metastatic power. Moreover, the worldwide incidence of cutaneous melanoma has been increasing annually and some studies in order to find a biomarker that could help to predict cell-migration have arisen. Related to that, a protein called CEMIP (*Cell Migration Inducing Protein* also known as *Hyaluronan Binding Protein- HYBID* or KIAA1199) could be interesting because not only promotes cell-migration, but also the degradation of *Hyaluronic Acid*, and the *Epithelial Mesenchymal Transition (EMT)*. This knowledge has led to suggest CEMIP as a biomarker in many different cancers, but there are limited data regarding to cutaneous melanoma. Our work consisted firstly on the evaluation of the possible biotarget function of CEMIP by analysing different melanoma stages with immunohistochemistry, where we found significant differences in the CEMIP expression depending on whether the patient had suffered metastasis or not, demonstrating the possibility to use CEMIP to predict the illness development. In the other hand, we saw that histamine does not increase the expression of CEMIP in melanoma cells, as suggested in other cellular examples, but we have proved that the overexpression of CEMIP promotes cell migration, suggesting the relationship between CEMIP and metastasis development in melanoma.

Keywords: CEMIP, cutaneous melanoma, metastasis, histamine

Aurkibidea

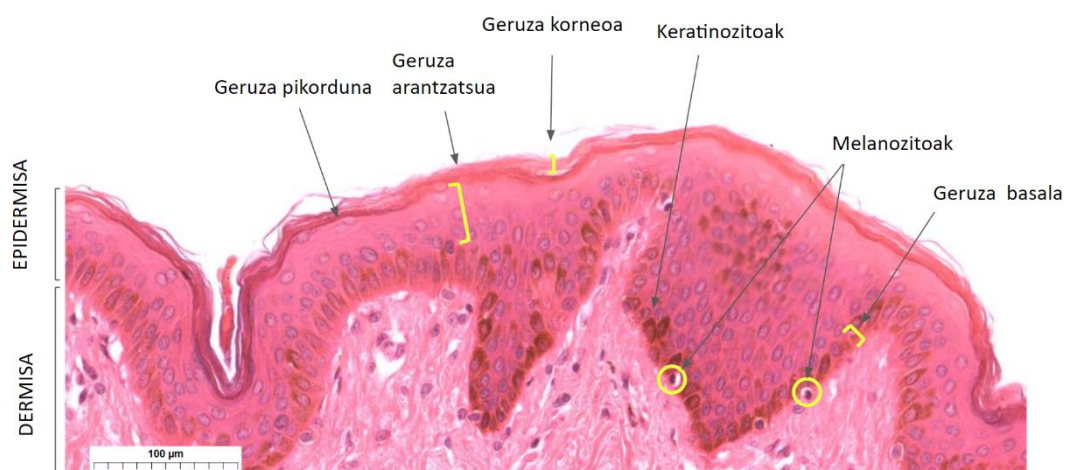
1. SARRERA	1
1.1 Larruazaleko melanoma	1
1.2 CEMIP (KIAA1199)	4
2. HELBURUAK	6
3. METODOLOGIA	7
3.1 Parafinatan sartutako ehunen immunohistokimika (IHC) eta irudien azterketa	7
3.2 Zelula-lerroak eta zelulen hazkuntza	9
3.2.1 <i>Histamina</i>	10
3.3 Plasmidoen gainadierazpen iragankorrerako transfekzioa	10
3.4 Migrazioa	11
3.4.1 <i>Zauriaren itxiera-bidezko migrazioaren azterketa (Wound-healing assay)</i>	11
3.4.2 <i>Mintzean zeharreko migrazioa (Transwell migration assay)</i>	12
3.5 Western Blot	13
3.5.1 <i>Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa</i>	14
3.5.2 <i>Elektroforesia</i>	14
3.5.3 <i>Transferentzia</i>	15
3.6 Analisi estatistikoa	16
4. EMAITZAK	16
4.1 Immunohistokimika-bidezko CEMIP proteinaren adierazpen-azterketa	16
4.2 Histaminaren efektua melanoma-zelulen migrazio-ahalten eta CEMIP endogenoaren adierazpen-mailan	17
4.3 CEMIP proteinaren emendioaren eragina melanoma zelulen migrazio-ahalmenean ... 18	
5. EZTABAIDA	20
6. ONDORIOAK	21
7. ESKER ONAK	22
8.ERREFERENTZIAK	22
9.ERANSKINAK	25

1. SARRERA

1.1 Larruazaleko melanoma

Larruazaleko melanoma, gorputzeko gainestaldura eratzen duen geruzan kokatutako melanozitoen gaitzotzearen ondoriozko minbizi mota da. Azal zuridunen artean minbizi arruntenetakoa da, eta biztanleriaren azalaren fenotipoa eta eguzki-argiaren esposizio-denboraren arabera munduko toki ezberdinetan intzidentzia-tasa ezberdinak aurki genitzakeen arren, intzidentzia-balio globala goraka doa, gainontzeko minbizi motak baino abiadura azkarragoan (Leonardi *et al.*, 2018). Gainera, azaleko melanomak garatzen duen metastasirako (hau da, bestelako organoetara zabaltzeko) ahalmena dela eta, hau, azaleko minbiziaren baitan aurki genetzakeen forma larrienetakoa da; are gehiago, azaleko minbiziekin lotutako heriotza-kasu gehiengoan erantzule nagusia da (Schadendorf *et al.*, 2018).

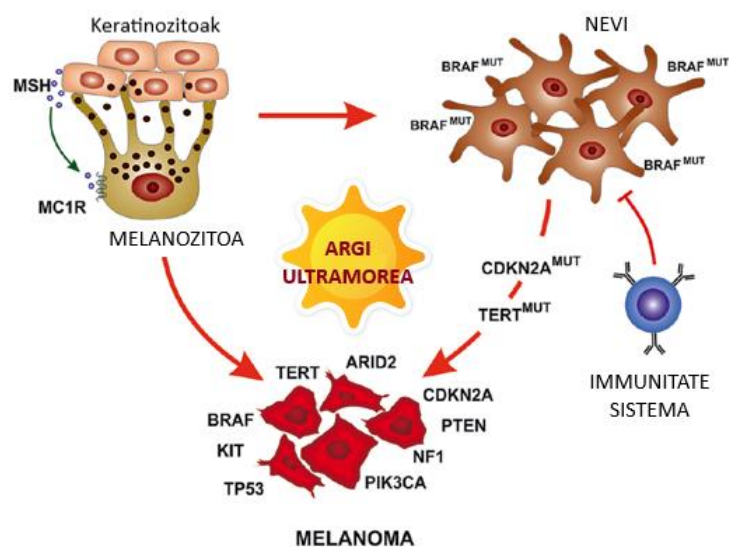
Egoera normalean, larruazalean, melanozitoak epidermiseko oinaldeko geruzan edo geruza basalean aurkitzen dira keratinozitoen artean sakabanatuta (**1.irudia**). Melanozito osasuntsuen zatiketa-kopurua oso murrizta den arren, hauen proliferazio-indizea emendatu egiten da melanozitoa zelula neoplasiko bilakatzen den heinean, eta prozesu honen baitan, hainbat mutazioren pilaketak ere nabarmentzen dira (Schadendorf *et al.*, 2018). Horren harira, patologikoki garrantzitsuak diren mutazio gehien erantzuleak A eta B argi ultramoreak direla behatu da. Argi ultramoreak eragindako DNA kalteak ekiditeko, azaleko keratinozitoek egoera arruntean *MSH (Melanocyte Stimulating Hormone)* ekoizten dute, zeina melanozitoetako *MC1R (MelanoCortin Receptor 1)* hartzailearekin lotzen den. Modu honetan, melanozitoetan melanina ekoiztu eta jariatzen da, argi ultramorearen aurkako babes funtzio gisa (Leonardi *et al.*, 2018).



1. Irudia. Giza-larruazalaren ohiko antolaketa histologikoa. Epidermisaren geruza basalean (*Stratum basale*) melanozitoak eta keratinozitoak, ondoreen geruza arantzatsua (*Stratum spinosum*), geruza pikorduna (*Stratum granulosum*) eta azkenik geruza korneoa (*Stratum corneum*). *Histology Guide*-tik hartutako irudia.

Argi ultramoreak melanoma baten garapena bi mekanismoren bidez sustatu dezake; alde batetik, argi ultramoreak zuzenean transforma ditzake melanozito arruntak melanoma zeluletan, tumore supresoreak diren geneetan mutazioak pilatzen badira. Gene horien artean, ezagunenak *TP53*, *NF1* eta *PTEN* dira, nahiz eta minbizi-kasu bakoitzaren jatorria ezberdina izan daitekeen.

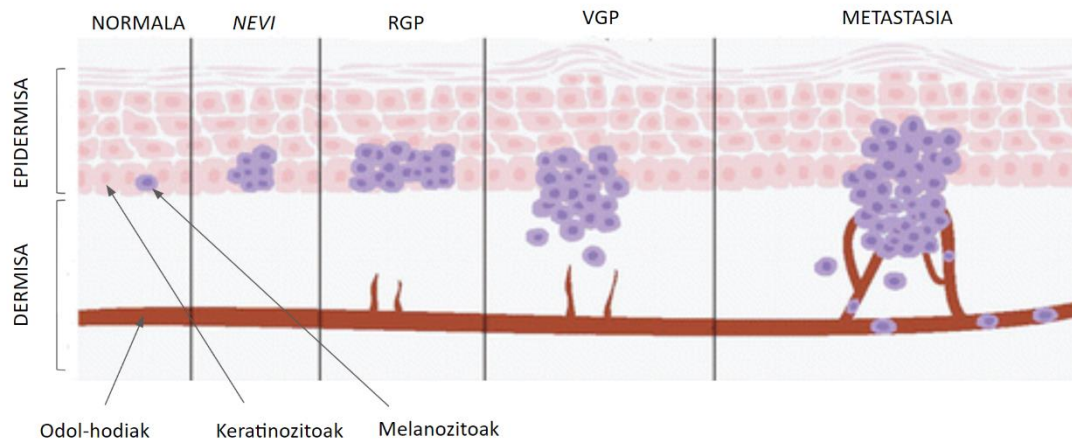
Bigarren aukerak zuzenean melanoma garatu ordez, lehenik melanozitoak *Nevi* (i.e. lesio edo tumore onberak) bilakatzean datza. Hau gertatzeko ematen den mutazio ohikoena *BRAF^{V600E}* da, zeina *Nevi*-en %80an behatu den. Mutazio bakan hau ez da nahikoa izaten *in situ* melanomak garatzeko eta urte luzez mantendu daiteke inolako kalterik eragin gabe, immunitate-sistemari esker. Izan ere, immunitate-sistemaren lehen babes geruzan dauden keratinozitoek jariatzen dituzten babes-molekulei esker (i.e zitokinak) zelulen proliferazio eta migrazioa ekiditen da ([Speeckaert et al., 2010](#)). Hala ere, argi ultramorearen izpiek *Nevi*-en transformazioa eragin dezakete mutazio gehiagoren pilaketak eragin ditzaketelako, horien artean, *TERT* eta *CDKN2A* geneen gaineko mutazioak. Azkenik, melanometatik abiatutako metastasia garatzeko, maiz, *PTEN* (*Phosphate-and-Tensin Homologue*) edo *TP53* (*Tumour-Protein 53*) moduko geneen gaineko mutazioak garatzen dira ([Leonardi et al., 2018](#)) ([Schadendorf et al., 2018](#)).



2. Irudia: Argi ultramoreak melanomak garatzeko jarraitu ditzakeen bi bideak, eta horiek egiteko gerta daitezkeen mutazioak. Alde batetik, melanoma zuzenean eratzen da, eta bestetik, lehenik *Nevi*-ak eratzen dira, zeina immunitate-sistemaren bidez kontrolpean egon daitekeen. [Leonardi et al., 2018](#) lanean proposatutako irudia euskaratuta.

Melanoma edo lesio gaiztoen garapenean, orohar, hiru fase nagusi ezberdintzen dira: 1) Fase erradiala, 2) Fase bertikala eta 3) Metastasiaren garapena. Fase edo hazkuntza erradial edo *Radial growth phase* (RGP) deritzonean, melanoma-zelulek epidermisan zehar hazteko gaitasuna

eskurutzen dute; fase honen ondoren, hazkuntza bertikal edo *Vertical Growth Phase (VGP)* deritzon fasea gertatzen da, melanoma dermisean zehar hedatzea ahalbidetzen duena. Azkenik, metastasia garatzen da, eta melanoma bestelako kokapen edo organoetan zehar hedatzen da (Zaidi *et al.*, 2008).



3. irudia: Larruazalaren bilakaera melanomaren fase ezberdinetan. Qendro *et al.*, 2014 lanean proposaturiko irudia euskaratuta.

Minbiziaren eta kasu konkretu honetan larruazaleko melanomaren aurrean hartu beharreko hurbilketa terapeutiko zein pronostikoaren aurreikuspenarako, berebiziko garrantzia dauka gaixotasunaren garapen-maila nahiz pronostikorako biomarkatzaile molekularrak zehazteak. Garapen-maila zehazteko, AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) lan-taldeak argitaraturiko estadio ezberdinen sailkapena da erabilitako irizpen hedatuena. Melanomaren kasuan, egun, AJCCren 8. edizioa da indarrean dagoena zeinak, batez ere, lesioaren sakonera (i.e. Breslow indizea), ultzerazio agerpena, hurbileko gongoilen afektazioa edo bestelako kokapenetarainoko hedapena hartzen dituen irizpide nagusi moduan.

Alde batetik, 0 estadioan *in situ* garatutako melanomak barneratzen dira. 0 estadioko melanoma zelulak epidermisera mugatuta agertzen dira eta behin kenduz gero, ia 100 %eko osatze-tasa dute. Ondoren, I eta II estadioak ditugu, zeinak tumore goiztiar moduan ezagutzen diren, bestelako organoetara zabaldu izanaren zantzurik erakusten ez dutelako. I eta II estadioen kasuan, ez dugu melanoma-zelularik aurkituko hurbileko gongoiletan, ez eta bestelako metastasirik ere. Bi hauen arteko ezberdintasuna lesioaren sakonera eta ultzerazioaren araberakoa da: I estadioaren barnean, ultzerazioa garatu edo ez, $\leq 1.0\text{mm}$ -ko sakonera duten kasuak barneratzen dira lehenik, eta ultzeraziorik ez duten eta $> 1.0\text{-}2.0\text{mm}$ bitarteko sakonera dutenak bigarrenik. Aldiz, II estadioan barneratzen dira $> 1.0\text{-}2.0\text{mm}$ sakonera duten ultzerazioa erakusten duten kasuak edo sakonera $2.0\text{mm-}4.0\text{mm}$ tartekoa dutenak, ultzerazioa erakutsi edo ez. Tumore berantiarretan, larruazaleko jatorrizko lekutik kanpo zelulek mugitzeko gaitasuna erakusten dute. III. estadioan, hurbileko gongoilak

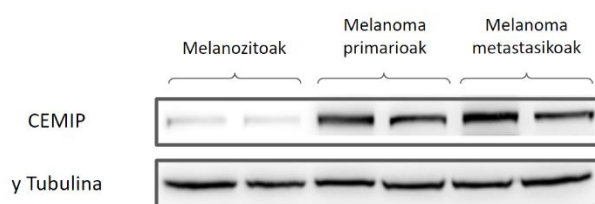
kalteturik daude baina ez dago urrunagoko organoetan metastasirik, lesioaren sakonera edozein dela ere. Azkenik, IV estadiotan, bestelako organoetara metastasia garatu duten laginak barneratzen dira, edozein delarik lesioaren sakonera eta afektaturiko hurbileko gongoilen kopurua (**1. Taula**) (Gershenwald & Scoyler, 2018; Keung & Gershenwald, 2020).

1.taula. AJCC komiteak proposaturiko melanomen estadio ezberdinen sailkapenerako irizpideak. (T=lesioaren sakonera, U= ultzerazioa, G=hurbileko gongoilen afekzioa, M=metastasia; E/A = ez da aplikagarria).

	T	U	G	M
0	E/A	E/A	E/A	E/A
I	≤1.0mm	Bai/Ez	Ez	Ez
	> 1.0-2.0mm	Ez	Ez	Ez
II	> 1.0-2.0mm	Bai	Ez	Ez
	> 4.0mm	Bai/Ez	Ez	Ez
III	Edozein	Edozein	Bai	Ez
IV	Edozein	Edozein	Edozein	Bai

1.2 CEMIP (KIAA1199)

Minbiziaren hedapena geldiarazteko prozesuan, aztertu beharreko gertaera garrantzitsuetako bat zelulen migrazio-ahalmena da, honek eragin dezakeen metastasiak egun dauden aukera terapeutikoen eraginkortasuna murriztea baitakar. Horren harira, zelulen migrazioan parte hartzen duten geneen identifikazioa ezinbesteko pausua izango da minbiziari aurre egiteko (Evensen *et al.*, 2015). Zelulen migrazio-ahalmenari lotutako proteinen artean CEMIP edo HYBID (*Cell Migration Inducing Protein, Hyaluronan Binding*) daukagu. Hau lehenengo aldiz biriketako minbizian aurkitu bazen ere, gerora beste hainbat minbizi motetan identifikatu da, zeinetan CEMIP gainadierazpena metastasia garatzeko gaitasunarekin estuki lotuta dagoela behatu den (Liu *et al.*, 2021). Hala ere, egun, ezezaguna da melanoman izan dezakeen inplikazioa. Horren harira, gure ikerketa-taldeko aurrekariari erreparatuz gero, behatu da CEMIP adierazpena, larruazaleko melanoma lerro-zelularretan, melanozito arruntetan baino handiagoa dela, **4. irudian** agertzen den moduan. Honek CEMIP proteina larruazaleko melanomaren diagnosirako biomarkatzaile gisa erabil daitekeela iradokitzen digu.



4. Irudia: ikerketa-taldeak larruazaleko melanometan behatutako CEMIP adierazpenaren aldaerak, melanozitoetan, melanoma primario eta melanoma metastasikoen lerro zelularretan. Melanoma metastasikoak: A2058, eta Colo800.

CEMIP proteina kodetzen duen genea 15q25.1 kromosoman kokatzen da; 153kDa (1361 aa) dituen proteinari dagokionean, hainbat izan dira egotzitako kokapenak: hasiera batean nukleo eta batez ere zitoplasman kokatu arren (Li Li *et al.*, 2017), egun badakigu zelulatik kanporatua ere izan daitekeela (Fink *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019) eta mintz plasmaticoari atxikia ere egon liteke (Yoshida & Okada, 2019).

Aurretik aipatutako moduan, CEMIP (KIAA1199) zelulen migrazio-ahalmenarekin erlazionatu da maiz (Liu *et al.*, 2021). CEMIP proteinak migrazio-ahalmenaren handipenean izan dezakeen eraginaren baitan, bi mekanismo nagusi egon daitezke; batetik, CEMIP Azido Hialuronikoaren (AH) despolimerizazioarekin erlazionatu da (Yoshida *et al.*, 2014) eta bestetik, EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*) prozesuan inplikatu da (Li Li *et al.*, 2017).

AH-k eragindako migrazioaren oinarrian, azukre honen funtzio biologikoa dago eta hau azukrearen tamaina molekularren arabera da: pisu molekular altuko AH-k hantura eta angiogenesisia gelditzeaz arduratzen dira, eta pisu molekular baxuko AH zatiek aldiz, kontrako funtzioa izateaz gain, migrazio zelularra areagotzen dute (Yoshida & Okada, 2019). CEMIP (KIAA1199) inguruko ikerketak areagotzen ari diren heinean, AH despolimerizazio eta CEMIP proteinaren arteko lotura ikusi da, batez ere giza fibroblastoetan (Yoshida *et al.*, 2014). Hauetan, CEMIP bidez liseritutako AH zatiak gune estrazelularrera jariatzen dira eta matrize estrazelularra desitxuratu egiten da (Shimizu *et al.*, 2018). Modu honetan, zelulen migrazioa bultzatzen da, eta muturreko kasuetan, metastasia eman daiteke (Fink *et al.*, 2015; Yoshino *et al.*, 2018).

Bestalde, EMT metastasia bideratzen duen gertaera bat da, honen baitan gertatzen den zelulen arteko loturen apurketa dela eta. Hemen, euren artean lotura sendoak dituzten jatorri enbrionario epitelialeko zelulek fenotipo mesenkimala eskuratzen dute. Horrela, zelula mugiezinak izatetik, izaera mugikorra eskuratzen igarotzen dira (Brabletz *et al.*, 2018). EMT Transkripzio Faktoreez (TF) aktibatutako prozesu konplexua da, zeinetan kaderinaren menpeko lotura interzelular sendoak apurtzen diren eta zelulek matrize estrazelularreko bestelako osagaietara atxikitzea lortzen duten. Horren harira, behatu da Wnt/ β -Katenina bidezidorrak funtzio garrantzitsua duela EMT garapenean.

Izan ere, β -Kateninaren pilaketa ematen da zitoplasman, eta hau nukleora mugitzean, minbizi-zelulen mugimendu-ahalmena areagotzen duten geneen aktibazioa areagotzen da (Basu *et al.*, 2018). Azken ikerketetan, hainbat minbizi motetan CEMIP proteina eta EMT nahiz tumore metastasien arteko lotura behatu da (Liu *et al.*, 2021).

CEMIP endogenoan adierazpenaren erregulazioan diharduten faktoreen artean, Histamina eta TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*) molekulak deskribatu dira dermiseko giza-fibroblastoetan eginiko ikerketa batean (Yoshida *et al.*, 2020). Alde batetik, argi ultramorearen aurrean, epidermisaren erantzun nagusiak azaleko zelulen heriotza eta hantura bultzatzea dira, eta horretan diharduten keratinozitoak dira TGF- β 1 -en iturri nagusiak. TGF- β 1 hazkuntza faktoreak zelulen hazkuntza, ehunen konponketa, fibrosia eta sistema immuneak eragindako hanturretan diharduen gene-superfamilia bateko kideak dira (Hasova *et al.*, 2011). Hauen funtzio nagusia Matrize Estrazelularra (ME) kaltetzean, hau osatzen duten molekulen adierazpena bultzatzea da, AH barne. Horretaz gain, azken ikerketek erakutsi dute AH degradazioa negatiboki eraendu dezaketela, CEMIP genearen adierazpena murrizten baitu (Yoshida *et al.*, 2013).

Beste aldetik, histamina hantura-erantzun eta berehalako hipersentsibilitatearen erantzule nagusia da, hartzaille ezberdinen bidez lan egiten duena. Horien artean, *H4R (Histamin 4 Receptor)* hartzaillea immunitate-sistemako zeluletan adierazteaz gain, honek tumore ezberdinekin lotura estua duela eta TGF- β 1 seinale-bidea inhibitzen duela ikusi da (Nicoud *et al.*, 2019). AH molekulen pisu molekularren murrizketa, histamina-hartzailen degradazioaren ondorioa da eta batik bat argi ultramoreaz kalteturiko azaletan behatu da. Baldintza hauetan, histamina gainadierazten da mastozitoetan eta ingurune estrazelularra jariatzen da. Histaminaren kopurua emendatzean, KIAA1199 proteinaren adierazpena ere emendatzen da, eta honekin batera AH despolimerizazioa (Yoshida *et al.*, 2013).

2. HELBURUAK

Taldeko aurrekariak eta literatura aztertuta, lan honen **helburu orokorra** CEMIP melanomaren hedapenarekin erlazionatuta egon daitekeen aztertzea da **bi helburu zehatz** definituz:

- CEMIP proteinaren adierazpen mailak larruzaleko melanoman biomarkatzaile moduan izan dezakeen funtzioa aztertzea lesio onberak (*nevi*) eta estadio ezberdinetako melanoma ehunak alderatuta.
- CEMIP proteinak melanoma zelulen migrazio-ahalmena erregulatzeko ahalmenik duen aztertzea.

3. METODOLOGIA

3.1 Parafinatan sartutako ehunen immunohistokimika (IHC) eta irudien azterketa

Donostiako Onkologikoan, Guruzetako ospitalean eta Basurtoko ospitalean errekrutatutako pazienteen laginak Euskal Biobankuaren bitartez eskuratu ziren, Etikako Batzordearen oniritzia (P12018136 kodea) izanik. Guztira 117 lagin batu genituen, lesio onberak zein estadio ezberdinetako melanomak barne. **2.taulak** pazienteen datuak laburbiltzen ditu.

2.taula: erabilitako laginen datuak (*E= Emakumezkoak eta G = Gizonezkoak.*) Lehenengo zutabeen guk proposaturiko sailkapena: 0=*Nevi*-ak; 1= *In situ* melanomak. Tumore goiztiarren barruan, 2 (I estadioa) eta 3 (II estadioa) taldeak. Tumore berantiarren kasuan, 4 (III estadioa) eta 5 (IV estadioa) taldeak. Huetan zelulek mugitzeko gaitasuna erakutsi dute. Azkenik, 6. taldean metastasi biopsiak. Estadioari dagokionez, AJCC-k proposatu moduan, 0 zenbakiaz *in situ* melanomak, eta ondoren lau estadioak, **1.taulan** aipatutako irizpideen arabera.

	SAILKAPENA	ESTADIOA	METASTASIA	SEXUA E/G	ADINA E/G
	0	-	0	12/3	43,9/67,3
	1	0	0	8/3	52,3/65,3
GOIZTIARRA	2	I	0 1	15/7 5/0	43,8/46,7 66
	3	II	0 1	6/4 7/12	52,8/74,25 72,5/60,4
	4	III	1	6/13	58,6/56,2
BERANTIARRA	5	IV	1	1/4	50/61,8
	6	IV	1	4 / 7	63,7/68,2

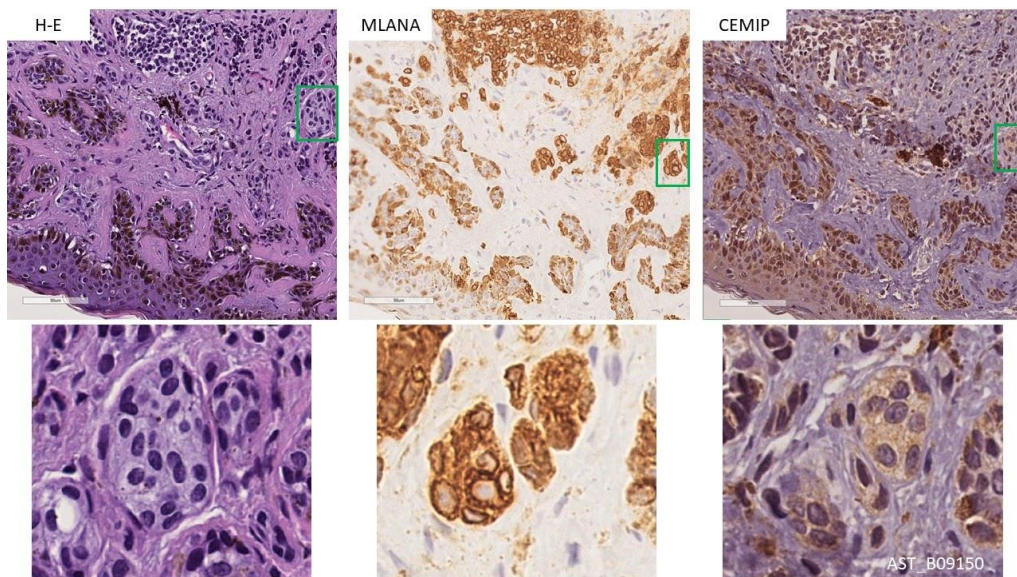
IHC bidezko prozesamendua *Dako PT Link* pre-tratamendu moduluaren eta *Dako Autostainer Link 48 (Agilent)* ekipo automatizatuan burutu ziren, beraiek gomendatutako erreaktiboekin eta **3. taulan** zehaztutako antigorputz eta egoeratan. IHC prozesamenduaren azken pausoak (i.e. deshidratazioa, garbiketa eta laginen muntaia) Medikuntzako Fakultateko Biologia Zelularra eta Histologia Saileko histologiako laborategian burutu ziren, ikerketa taldekideen eskutik; baita laginak eskaneatzearen ardura ere. Eskaneatutako laginak *Aperio ImageScope 12.4.3. (Leica Biosystems)* programarekin ikuskatu ziren.

Gainera, lana egiteko, eskura genituen baita hematoxilina-eosina (H-E) ohiko tindaketa topologikoaz prestatutako lagin guztien sekzioen irudi eskaneatuak. H-E bidezko tindaketa erabilgarria da ehunaren egituraketa orokorra aztertzeko zein melanomaren kasuan, berezko melaninadun guneak

identifikatzeko. Kasu horretan, antigorputz bidezko tindaketak egin ostean, zailtasunak suerta diezazkiguke jatorrizko pigmentu eta antigorputzen bidezko tindaketak bereizterako garaian; izan ere, erabilitako metodologiarekin, proteina ituekiko positiboak diren eskualdeak, erreakzionatu ondoren kolore arrez markatzen dira, zeina melanina pigmentuarekiko oso antzekoa den. Arazo hau saihesteko, H-E tindaketaren bidez, melanina gabeko eskualdeak aukeratu genituen (**ikus 5. irudia**). Horrez gain, eta bereziki lesio txikietan, zaila gerta liteke jatorri melanozitikodun lesioak identifikatzea; horretarako, batez ere *nevietan*, sekzio paraleloak MLANA (baita MART-1, *Melanoma Antigen Recognized by T-Cells* deitua) proteinarekiko aztertu ziren, proteina hau melanozitoen familiako zelulekiko espezifiko izatean (Busam & Jungbluth, 1999). Modu honetan, melanozitoak, keratinozito edo bestelako zeluletatik argi bereiztu genituen. Azkenik, CEMIP proteinaren antigorputzen bidezko tindaketak behatu genituen, begi bistaz behatutako intentsitatea CEMIP proteinaren tindaketei zegokiena zela ziurtatzeko. Esandakoaren adibide bat **5. irudian** laburbiltzen da.

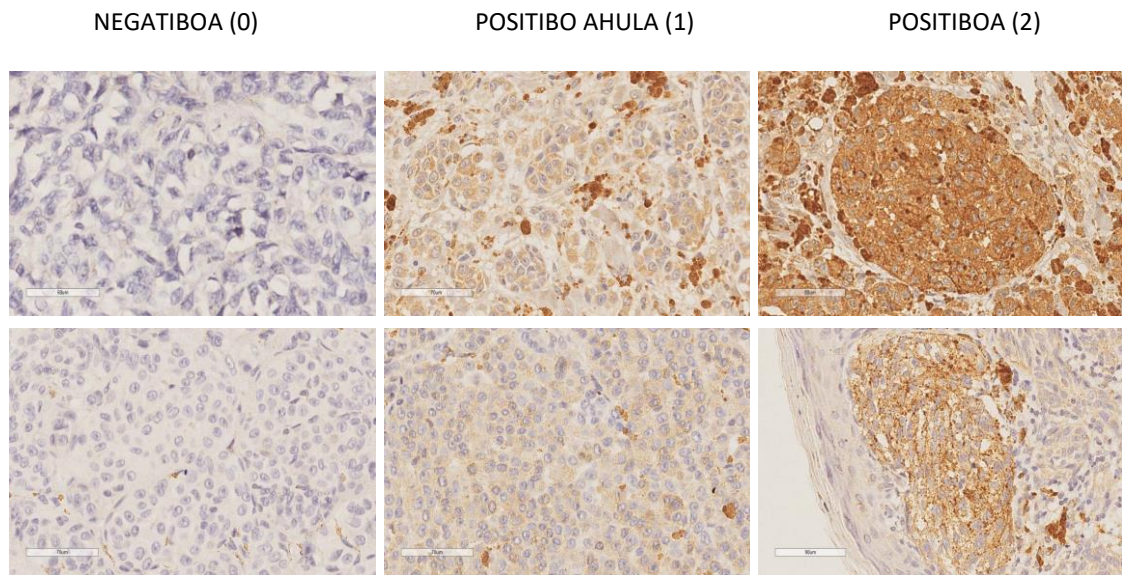
3.Taula: IHC prestaketetan erabilitako antigorputzak

Antigorputza	Erreferentzia	Non ekoitzia	Etxe komertziala	Diluzioa	Inkubazioa	Antigeno desestalketa
MLANA	NBP2-15197	Sagua	Novus	1:300	20 min	pH=6
KIAA1199 (CEMIP)	21129-1-AP	Untxia	Proteintech	1:200	30 min	pH=6



5.irudia: Melaninaren jatorrizko pigmentazioak sor ditzakeen arazoak ekiditeko jarraitutako prozesua. Lehenik, H-E tindaketaren bidez zelulak behatu genituen: kolore argiz zitoplasmak eta ilunagoz nukleoak. MLANA tindaketaren bidez, melanozitoak bestelako zelulengandik bereizi genituen. Azkenik, CEMIP proteinarekiko espezifiko den antigorputza gehitu genituen proteinaren identifikaziorako.

Ondoren argazkiak atera ziren, eta hauek aztertu genituen, intentsitatearen arabera, **6. Irudian** azaldu bezala (0-tik 2-ra, negatiboa, positibo ahula, positiboa).



6. irudia: CEMIP markatzailearen intentsitatea zehazteko erabilitako irizpideak

3.2 Zelula-lerroak eta zelulen hazkuntza

Lanean zehar erabilitako zelula-lerroak melanometatik eskuratutako A2058 eta Colo800 izan ziren. A2058 zelulak %10 FBS (*Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher Scientific Gibco*) -dun DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific Gibco*) medioarekin batera erein genituen. Colo800 zelulak aldiz, %10 FBS-dun RPMI (*Roswell Park Memorial Institute, Thermo Fihser Gibco*) medioarekin erein genituen. Zelulen kultiboak T25 ontzietan egin genituen, eta bertan utzi genituen zelulak hazten. Hauen altxaketak bikoizte-denboraren arabera izan ziren. Lehenik eta behin, ontziko medioa kendu eta hondakinak PBS (*Phosphate-Buffered Saline*)-rekin garbitu genituen. Ondoren, tripsina-EDTA 1x (*Thermo Fihser Scientific*) gehitu genuen zelulak altxatzeko. 2 minutuz 37°C eta %5 CO₂ -rekin mantendu, eta tripsinaren aktibitatea %10 FBS-dun medioarekin gelditu genuen. Ontzian gelditutako zelula guztiak eskuratzeko, berriz PBS erabili genuen, eta lortutako nahastetik gure zelulak soilik eskuratzeko, 300xg, 4°C-tan zentrifugatu genuen 5 minutuz. Amaitzeko, gainjalkina kendu eta pellet-ean gelditutako zelulak kultibo medio berrian berreseki genituen. Erein beharreko zelula kopurua lortzeko, zelula kontaktak egin genituen *Trypan urdina* eta gure laginaren nahastea (1:1) *TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad)* zelulen kontagailu-automatikoan sartuz. Trypan urdinak mintz plasmatikoa kaltetuta duten zelulak identifikatzen ditu, hauen barnera sartzen delako. Modu honetan, zelula hilen eta bizien arteko bereizketa egiten da.

3.2.1 Histamina

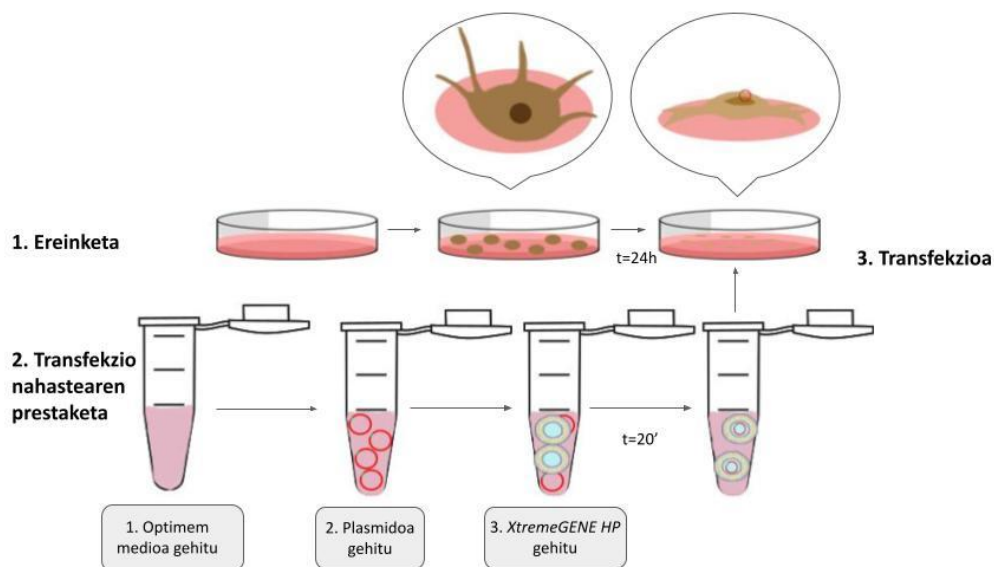
Histaminak CEMIP proteinaren adierazpenean eta zelulen migrazioan izan dezakeen eragina A2058 eta Colo800 melanoma zeluletan aztertu genuen. CEMIP proteina endogenoaren mailan izan zezakeen eragina aztertzeko 6 putzuko 2 plaka erabili genituen lerro bakoitzean, eragina 24 eta 48h-tara aztertu ahal izateko eta putzu bakoitzean $2,5 \times 10^5$ zelula erein genituen zegozkien medioarekin. Ereinketaren ondoren, 24 orduz inkubatu genituen plakak %5 CO₂ -rekin eta 37°C-tara. Ondoren, histamina kontzentrazio ezberdinak gehitu genituen putzuetan: 0 µM, 1µM, 10µM eta 50µM, hurrenez hurren. Migrazioan izan zezakeen efektua aztertzeko, ordea, 96 putzutako plaketan erein ziren zelulak aurrerago azaldutako moduan.

3.3 Plasmidoen gainadierazpen iragankorrerako transfekzioa

Ereinketa 6 putzuko plaketan egin genuen, eta erantzunak 24h eta 48h-tara ikusteko, bi plaka ezberdin erabili genituen. Putzu bakoitzean, A2058 lerro zelularren 2×10^5 zelula erein genituen 2 ml mediotan, eta Colo800 zelulak handiagoak izanik, $1,5 \times 10^5$ zelula erein genituen (2 ml-tan, baita), esan bezala, 24h eta 48h-ko plaka ezberdinetan. Transfekzioa, zelulak erein eta hurrengo egunean gauzatu zen.

Transfekzioari erreparatuz gero, hemen erabilitako osagaiak hiru izan ziren: *Opti-MEM* (*Thermo Fisher Scientific, Gibco*) medioa, *XtremeGENE HP* (*Roche*) lipofektamina eta plasmidoak (pCDNA 3.1(-) hutsa, kontrol moduan eta gizakiaren CEMIP kodetzen duen sekuentzia daraman plasmidoa-pCDNA 3.1(-)-CEMIP - ([Yoshida et al., 2013](#))). Lehenik eta behin, gure zelulei gehitu beharreko transfekzio-nahastea prestatu genuen. Hau gauzatzeko, *Opti-MEM* medioa, DNA plasmidikoa (500ng/putzuko) eta *XtremeGene HP* liposomak nahastu genituen, 100 µl:0,5 µg:3 µl proportzioan (putzuko), behar genituen bolumenen arabera. Bi nahaste ezberdin prestatu genituen; pcDNA 3.1 (-) plasmidoarekin kontrol negatiboa, eta pcDNA 3.1 (-)-CEMIP plasmidoa erabiliz gainadiarazpenerako nahastea. Bortex-arekin astindu arin baten ondoren, 20 minutuz inkubatu genituen kontrol negatiboaren nahastea eta CEMIP gainadierazteko nahastea giro-tenperaturan.

Transfekzioa egiteko, putzu bakoitzean prestaturiko nahastearen 100 µl gehitu genituen, tantaka, kontuan izanik putzu bakoitzean gehitu beharreko nahastea kontrol negatiboko plasmidoaz edo CEMIP plasmidoaz osatuta zegoen. 24h eta 48h-tara, proteina erauzi eta kuantifikatu ostean, laginak -80°C-tara gorde genituen Western Blot-eko egunera arte.



7. irudia: Transfektzioa egiteko jarraitu dugun prozesua

3.4 Migrazioa

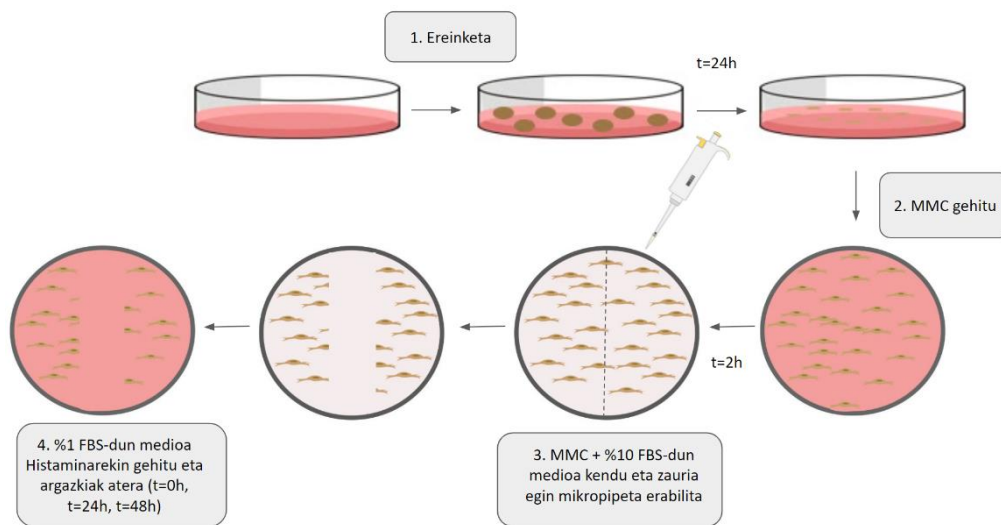
3.4.1 Zauriaren itxiera-bidezko migrazioaren azterketa (*Wound-healing assay*)

Entsegu honen oinarria ondokoa da: zelulaz betetako putzu batean hutsune (*zauri*) bat sortzen da eta zelulak zauri horrek utzitako espaziorantz mugituz nola hutsunea okupatzen duten ebaluatzen da. Kasu honetan zelulen migrazioa aztertu genuen CEMIP endogenoaren adierazpena igoarazteko asmoz histamina kontzentrazio ezberdinak gehituta, 96 putzuko plaketan ereindako bi lerro zelularretan: A2058 eta Colo800. Era berean, eta aurretik deskribatutako moduan, bi lerro zelularretako zelulak 6 putzutako plaketan erein ziren histaminak CEMIP endogenoaren mailan izan zezakeen efektua aztertzeko.

A2058 zelula-lerroko zelulak 4×10^4 zelula/putzuko dentsitatearekin erein genituen 96 putzuko mikroplakan, eta histamina kontzentrazio bakoitzerako 4 erreplika egin genituen, 3 aldiz errepikatutako esperimenduetan. Colo800-ren kasuan, hauen tamaina handiagoa izanik, ereindako dentsitatea 3×10^4 zelula putzuko izan zen, eta kasu honetan bi bider egin genuen esperimendua. Ereindako zelulak hazten utzi genituen 24 orduz, 37°C -tara eta %5 CO_2 -rekin. Ondoren, Mitomizina C (MMC) $100\mu\text{l}$ ($1\mu\text{g/ml}$) gehitu genituen putzuko eta 37°C -tan eta %5 CO_2 -rekin inkubatu genituen 2 orduz, zelulen bikoizketa gelditzeko. MMCdun kultibo medioa kendu ondoren, zelulak PBS bidez garbitu, PBS kendu eta zauri bertikalak egin genituen putzuetan, mikropipetaren punta esterilak erabilita. Azkenik, ohiko 10% FBS daraman kultibo medioaren ordez, Colo800 lerroaren kasuan %1 FBS zeraman RPMI medioa gehitu genien, eta aldiz A2058 lerroko zelulei %1 FBS zeraman DMEM medioa. Hauek aurretik zehaztutako histamina kontzentrazioak zeramatzen: $0\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ eta $50\mu\text{M}$.

Zauria egin ondoren ($t = 0h$), argazkiak atera genituen *JENOPTIK (ProgRes CT3)* kamara atxikituta daraman *Nikon Eclipse TS100* mikroskopio inbertituan zauriaren hasierako azalera kalkulatzeko. Hurrengo bi egunetan, 24 eta 48 h-tara, argazkiak errepikatu genituen zauriaren itxiera kalkulatu ahal izateko. Azaleraren kalkulua *Fiji (Image J)* programako “*Wound Healing Size Tool.ijm*” plugin-aren bidez kalkulatu genuen. Horretarako, *K. Yue et al.-ek (2010)* proposaturiko adierazpen estatistikoaz baliatu ginen non $A_{t=0h}$ zauria eginiko momentuan honek zuen azalera den eta $A_{t=\Delta h}$ zauriak 24 edo 48 ordutara duen azalera den.

$$\text{Zauriaren itxiera (\%)} = [(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}) / (A_{t=0h})] \times 100$$



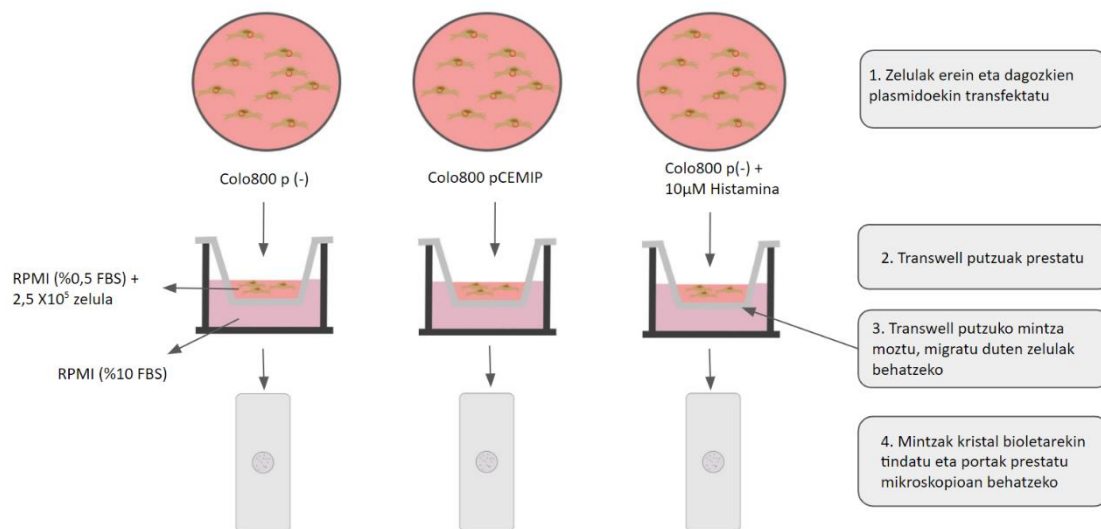
8. irudia: *Wound healing assay* egiteko jarraitutako prozedura

3.4.2 Mintzean zeharreko migrazioa (*Transwell migration assay*)

Kasu honetan, migrazio-ahalmena, zelulek tamaina jakineko porodun mintz bat zeharkatzeko trebetasunaren arabera neurtzen da. Entsegu mota hau CEMIP-en gainadierazpenak migrazioan izan zezakeen eragina ebaluatzeko erabili genuen. Lehenik eta behin, Colo800 zelulak erein genituen 6 putzuko plakan $2,5 \times 10^5$ zelula/putzuko dentsitatearekin eta 24 orduz 37°C eta %5 CO_2 -tan hazten eduki ondoren, transfekzioa burutu genuen aurretik azaldutako moduan. Erreplika bat pCDNA 3.1 (-)-CEMIP plasmidoa erabiliz tranfektatu genuen, eta bi erreplika pCDNA 3.1 (-) erabilita, horietako batean, ondoren, histaminarekin gehitzeko. 24 orduz 37°C eta %5 CO_2 -tan inkubatu eta gero, zelulen migrazioa aztertzeko diseinatutako mintz-dun saskitxoetan (*Cell Culture Insert, Transparent PET Membrane, 24well 8.0µm pore size, Life Sciences*) erein genituen. Horretarako, lehenik zelulak altxatu genituen. Hauek RPMI (%0,5 FBS) medioaren 500 µl-tan berreseki genituen. Histaminadun laginean

aldiz, zuzenean RPMI (%0,5 FBS) medioan $10 \mu\text{M}$ histamina gehitu genuen. Berresakitako laginak kuantifikatu eta $2,5 \times 10^5$ zelula/ml kontzentrazioan jarri genituen.

Saskitxoaren sistema prestatzerakoan, lehenik eta behin putzuan (saskitxo azpian) $600 \mu\text{l}$ RPMI (%10 FBS) gehitu genien. Ondoren, saskitxoaren gainaldean, 5×10^4 zelula erein genituen $200 \mu\text{l}$ -tan. 24 orduz zelulak inkubatu genituen, 37°C eta %5 CO_2 -tan, eta ondoren laginak prozesatu genituen. Hasteko, mintza zeharkatu ez zuten zelulak kontu handiz kendu ziren belarrietarako bastoitxo bat erabiliz; ondoren, zelulak mintzean fixatu eta tindatu genituen kristal bioleta (%0,2), etanola (%8) eta paraformaldehidoa (%4) erabilita, 30 minutuz. Ondoren, 3 minutuko tartearekin 6 garbiketa egin genituen PBS-rekin gehiegizko tindaketa kentzeko. Azkenik, saskitxoetako mintzak moztu eta porta batean atxikitu genuen. Laginak, argazki-kamara atxikitua duen *Olympus BX50* mikroskopikoarekin aztertu genituen lehenik 2X handipenarekin mintza guztiz behatzeko, eta ondoren, 10X handipenarekin argazkiak zatika ateratzeko. Lagin bakoitzeko 7 argazki atera ziren, beraietan zeuden zelulak zenbatuz. Entsegua 3 aldiz errepikatu genuen.



9. irudia: *Transwell* sistemaren bidez migrazioa behatzeko jarraitutako prozesua

3.5 Western Blot

Teknika honek, zelulako proteina jakinen adierazpen maila modu konparatiboan aztertzea ahalbidertzen du. Kasu honetan, histaminak eragindako CEMIP endogenoaren balizko igoera zein transfekzioaren ondorengoko CEMIP kopuruaren igoera baieztatzeko erabili zen.

3.5.1 Proteinen erauzketa eta kuantifikazioa

Proteina erauzteko, proteasa eta fosfatasa inhibitzaileekin 100 µl RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay Buffer, Sigma-Aldrich*) gehitu genituen putzu bakoitzean, 1:1:100 (µl) proportzioan. Ondoren, *scraper* baten laguntzaz, gure laginak batu genituen. Hauek ondo lisatzeko, lehenik xiringa bat erabiliz zelulak ongi apurtu genituen eta proteina kuantifikatu arte, -80°C-tan gorde. Prozesu guztia izotzetan egin genuen proteinen desnaturalizazioa ekiditeko.

Lisatutako laginetatik proteinak eta atal ez solugarriak bereizteko, laginak zentrifugatu genituen 5 minutuz, 13000 RPM eta 4°C-tara mikrozentrifuga batean. Gainjalkina eskuratu, eta hauen 10µl, 40µl ur destilatuarekin nahastu genituen. Diluzio honek absorbantzia neurtzerakoan arazorik ez izatea ahalbidetu zigun. Kuantifikaziorako, 96 putzuko plaka batean, lehenik gure laginen proteina-kontzentrazioa eskuratu ahal izateko zuzen-patroia osatu genuen BSA (*Bovine Serum Albumine, Sigma-Aldrich*) eta ur destilatuaren nahasketen bidez (0µg/ µl - 0,2µg/ µl - 0,4 µg/ µl - 0,6 µg/ µl - 0,8µg/ µl - 1µg/µl). Absorbantzia neurtzeko, BCA (*Bicinchoninic Acid, Sigma-Aldrich*) eta CuSO₄ nahasketa egin genuen (100:2).

Plakako lehenengo lerroan zuzen-patroiaren 10µl eta egindako nahastearen (BCA + CuSO₄) 200µl gehitu genituen. Hurrengo lerroetan prozesu bera jarraitu genuen intereseko laginekin. 30 minutuz inkubatzen eduki ondoren, laginen absorbantzia neurtu genuen 562nm-tara *BioTek[®] Synergy HT* mikroplaka irakurgailua erabiliz. Gure zuzen patroiaaren absorbantzieta oinarrituta, laginetako proteinen kontzentrazioak eskuratu genituen. Western Blot-a burutzeko lagineko 30 µg proteina erabili genituen.

3.5.2 Elektroforesia

Aztertu beharreko laginak Laemmly (5x), DTT (10x) eta proteinaren kontzentrazioaren arabera RIPA bolumenarekin nahastu genituen. Ondoren, 5 minutuz 95°C-tara berotu genituen *TS1 Biometra ThermoShaker* aparatuan, eta gero egoera desnaturalizatzailean (*SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfated - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) prestatutako gelaren bidez, zeinak poliakrilamida %4 eta %7 nahastuak zeramatzan. Gure laginak 10 minutuz 100V-tara jarri genituen lehenik gelean sartzeko, eta ondoren ordu eta erdiz 120V-tara, guztiz migratu arte. Elektroforesirako erabilitako bufferak Tris HCl (0,5M, pH=6,8) 12,5ml, Glizina 10ml (%13), SDS 15g (%20) eta MiliQ ura zeramatzan, azken hau nahasteak 75 ml eskuratzeko behar adina.

3.5.3 Transferentzia

Elektroforesia amaituta, proteinak nitrozelulosazko mintz batera igaro genituen, 3 orduko transferentzian, 85V-tara. Transferentzian erabilitako bufferrak Tris 5,8g, Glizina 9g, SDS 1g, MiliQ ura 800ml eta 200ml metanol zeramatzan. Transferentziaren ondoren, *Ponceau Gorria* produktuaren bidez, mintzean emandako transferentzia behatu eta mozketak-lekuak zehaztu genituen. Beharrezko TBST (*Tris-Buffered Saline-0.1 % Tween 20*)-bidezko garbiketak egin, eta blokeo-disoluzioa gehitu genuen, esne-hautsa TBST-an disolbatuz (%5ean).

Ordu betez inkubatu eta gero, identifikatu nahi genuen proteina bakoitzaren aurkako antigorputz primarioa gehitu eta gau osoan inkubatzen utzi genuen gure mintza 4°C-tan, beti ere mugimenduan eta estalita, mintza lehortu ez zedin (**ikus 4. taula**). Hurrengo egunean, TBST bidez 3 garbiketa egin genituen antigorputz primarioa kentzeko, 10 minutuko tartearekin garbiketa bakoitzaren artean. Ondoren, antigorputz sekundarioa gehitu genuen (**ikus 5. taula**). Hau ordu betez inkubatzen eduki, eta hasieran egindako garbiketak errepikatu genituen (TBST-rekin 3 garbiketa 10 minutuko tartearekin). Proteinen xingolen behaketarako kimiolumineszentzia erabili genuen, *SuperSignal Chemiluminescent HRP* produktuen bidez. Mintzak *Syngene G:BOX* aparatuan sartu genituen, eta *GeneSnap* programan behatu genituen. Laginen arteko karga-egokitasuna aztertzeko β -Actina eta α -Tubulina erabili genituen.

4.Taula: Western Blot-ean erabilitako antigorputz primarioak

Proteina	Antigorputza	Non ekoitzia	Diluzioa	Etxe komertziala	Behaketa
CEMIP	Rabbit	Ahuntza	1:500	Proteintech	Kimiolumineszentzia
β -Actina	Rabbit	Ahuntza	1:500	Sigma Aldrich	Kimiolumineszentzia
α -Tubulina	Mouse	Sagua	1:3000	Sigma Aldrich	Kimiolumineszentzia

5.Taula: Western Blotean erabilitako antigorputz sekundarioak.

Antigorputza	Non ekoitzia	Diluzioa	Etxe komertziala	Behaketa
Anti-Rabbit	Ahuntza	1:5000	Abcam	Kimioluminiszentzia
Anti- Mouse	Ahuntza	1:4000	Southern Biotech	Kimioluminiszentzia

3.6 Analisi estatistikoa

Immunohistokimikako laginak *IBM SPSS Statistics 26* bidez aztertu genituen, CEMIP-en adierazpen-mailak, pazienteen estadio edota eboluzioarekin (i.e. metastasiaren garapena ala ez) izan zezaketen erlazioa aztertuz. Aldagai hauek kategorikoak dira eta nominalak ez ezik, ordinalak ere kontsidera daitezke. Hasteko, azterketa estatistikorako kategoriko nominalen frogetara mugatu ginen, kontingentzia taulak eraikiz; aldagaien arteko balizko interdependentzia *Chi-karratuaren* bidez aztertu genuen. Interdependentzia ikusitako kasuetan, aldagaiak ordinal moduan kontsideratuz, test ez-parametrikokoak aplikatu genituen (*Kruskal-Wallis-en H* eta *Mann-Whitney-ren U testak*) ezberdintasunak baieztatu eta zehaztu nahian.

Migrazioarekin erlazionatutako emaitza guztiak desbiderapen estandarren baitan adierazi genituen (\pm SD). Bi laginen arteko konparaketak egiteko *Student t-test* erabili genuen, *Fisher testaren* bidez bariantza berdineko datuak zirela baieztatu ondoren *Microsoft Excell (Office 2019)* programaren bitartez.

p- balioa $\leq 0,05$ zen kasuetan emaitzak estatistikoki esanguratsuak zirela onartu dugu. Irudietan, izartxo bidez (*, ** eta ***) adierazgarritasun estatistikoaren gradu desberdinak adierazten dituzte ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ eta $p \leq 0,001$, hurrenez hurren). Bestalde, egoera bakoitzaren errepikatutako esperimendu kopurua (n) parentesi artean adierazten da.

4. EMAITZAK

4.1 Immunohistokimika-bidezko CEMIP proteinaren adierazpen-azterketa

CEMIP proteinaren adierazpena intentsitatearen bidez eskuratu genuen, aztertutako pazienteen laginetan, hauen melanomaren estadioaren arabera, metastasia garatu zuten edo ez kontuan izanda **(1. eranskina)**. Emaitza horietan oinarrituta, I eta IV estadioko melanoma pairatu duten pazienteen artean, metastasia garatu izanaren edo ez izanaren arabera antolatuta **(ikus 6. taula)**, *Chi karratuak*, esperotako frekuentziekin alderatuta ezberdintasun esanguratsuak aurkitu zituen CEMIP mailarekiko ($p=0,04$). *Kruskal-Wallis-en H* testaren bidez, CEMIP intentsitatearen arabeko ezberdintasunak daudela baieztatu genuen metastasia garatu zutenen eta ez zutenen artean ($p=0,041$). Bestalde *Mann-Whitney* bidezko binakako azterketan ezberdintasun esanguratsuak aurkitu ziren CEMIP-ekiko negatibo *versus* positibo eta positibo-ahul *versus* positibo taldeen artean ($p=0,039$ eta $p=0,023$, hurrenez hurren).

6. Taula. I eta IV arteko estadioko melanoma pairatu duten gaixoen artean metastasia garatu duten edo ez kontuan hartuta CEMIP proteinaren adierazpenaren arabeko intentsitatearen taldekapenak.

		METASTASI-GARAPENA		
		Ez	Bai	Guztira
CEMIP	Negatiboa	8	7	15
	Positibo ahula	17	17	34
	Positiboa	7	24	31
Guztira		32	48	80

Fase goiztiarreko melanomadun pazienteetan zentratuz (I-II estadioak), eta berriz ere metastasi-garapenaren arabera sailkatuta (**ikus 7. taula**), *Chi-karratuak* berriz ere esperotakoarekiko ezberdintasun esanguratsuak adierazi zituen CEMIP-aren adierazpen mailarekiko ($p=0,022$). Aldagaiak kategoriko ordinal moduan egindako analisisietan, *Kruskal-Wallis-en H* frogaren bitartez, ezberdintasun esanguratsuak eskuratu ditugu CEMIP-aren intentsitateari dagokionez, metastasia garatu zutenen eta ez zutenen artean ($p=0,023$). *Mann-Whitney* frogaren bidezko binakako alderaketan, ezberdintasun esanguratsuak identifikatu ziren “positibo ahul” eta “positibo” taldeen artean ($p=0,006$). Ez genuen lotura esanguraturik aurkitu estadioen araberrako zein bestelako konparaketetan, ezta *nevi* eta *in situ* melanomak sartzean ere. Beraz, CEMIP mailak lotura erakusten du metastasi-garapenarekin bai melanoma estadio guztiak zein goiztiarrak kontutan hartuz.

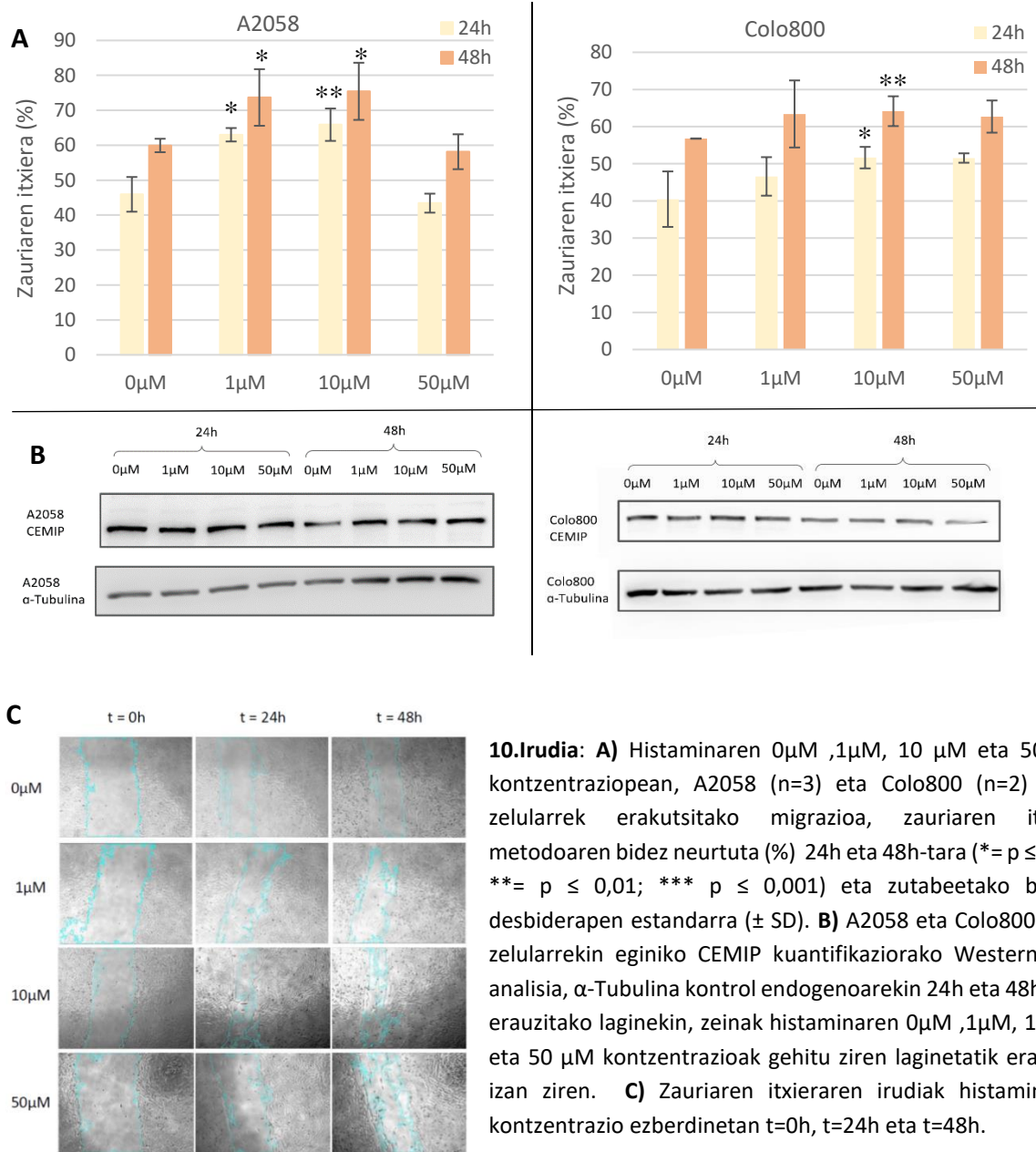
7. Taula I eta II estadioko melanoma pairatu duten gaixoen artean metastasia garatu duten edo ez kontuan hartuta CEMIP proteinaren adierazpenaren araberrako intentsitatearen taldekapenak.

		METASTASI-GARAPENA		
		Ez	Bai	Guztira
CEMIP	Negatiboa	8	6	14
	Positibo ahula	17	5	22
	Positiboa	7	13	20
Guztira		32	24	56

4.2 Histaminaren efektua melanoma-zelulen migrazio-ahalmen eta CEMIP endogenoaren adierazpen-mailan

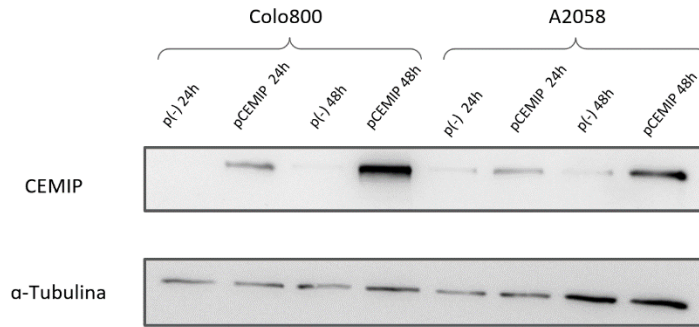
Zauri bidezko migrazioan behatu dugunez, histaminaren kontzentrazio ezberdinetan, zelulek migratzeko joera ezberdina erakutsi dute. A2058 lerro zelularraren kasuan, emaitza esanguratsuak eskuratu ditugu 24h-tara $1\mu\text{M}$ eta $10\mu\text{M}$ kontzentrazioak gehitu diren kasuetan ($p=0,02$ eta $p=0,007$), hauek gehiago migratu dutelarik. 48 ordotara eginiko neurketetan ere emaitza esanguratsuak eskuratu ditugu ($p=0,04$ eta $p=0,03$). $50\mu\text{M}$ gehitu dugun putzuetan aldiz, zelulen migrazioan emandako ezberdintasunak ez dira esanguratsuak izan. Colo800 lerro zelularrari dagokionez, kasu honetan emaitza esanguratsuak soilik histamina $10\mu\text{M}$ kontzentrazioan gehitu dugun laginetan eskuratu dugu, bai 24 ordotara, zein 48 ordotara ere ($p=0,013$ eta $p=0,01$) (**10A irudia**). Erabilitako histamina kontzentrazioek ez dute CEMIP endogenoaren maila areagotu (**10B irudia**), gure kasuan,

histaminak eragindako migrazio-igoera, CEMIP mailaren erregulazioarekiko independentea zela adieraziz. Mikroskopioan behatutako zauriaren itxieraren adibide bat **10C** irudian agertzen da.



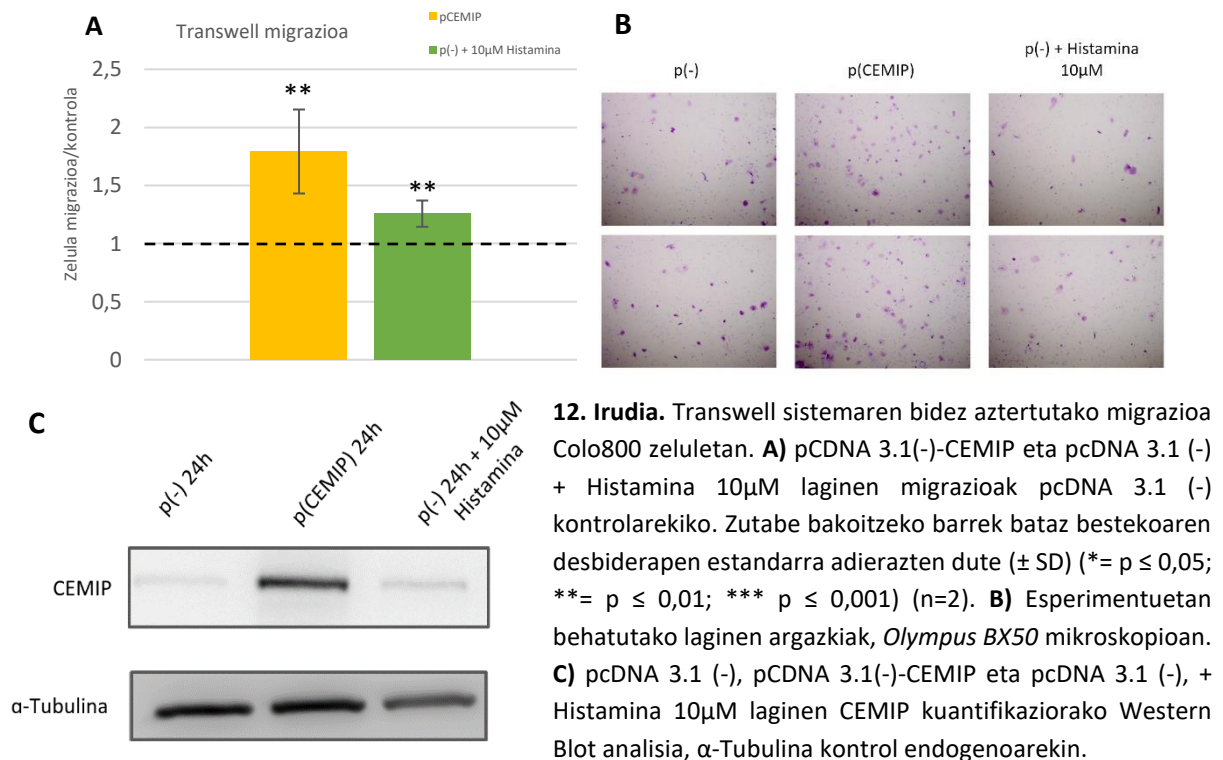
4.3 CEMIP proteinaren emendioaren eragina melanoma zelulen migrazio-ahalmenean

Plasmido bidez eginiko transfekzioen emaitzei dagokienez, ikusi da CEMIP proteinaren gainadierazpena eman dela esperimentera eginiko bi lerro zelularretan, zeinetan eragina handiagoa izan den 48h-tara 24h-tara baino (**11.irudia**).



11. irudia: pcDNA 3.1 (-) kontrol negatiboa eta pCDNA 3.1(-)-CEMIP bidezko gainadierazpenaren kuantifikaziorako Western Blot analisia, Colo800 eta A2058 lerro zelularretan, 24h eta 48h-tara, α -Tubulina kontrol endogenoarekin

Transwell migrazioan oinarrituta 3 esperimentu egin bagenituen ere, bat baztertu beharra izan genuen emaitzak erakusten zuten desbiderapena zela eta. Gainontzeko bi esperimentuetan, bakoitzean bi erreplika egin genituen eta zauri-bidezko migrazio-entseguetan lortutako emaitzetan oinarrituz, histamina, kontrol positibo moduan erabili genuen. **12A irudian** ikus daitekeenez, CEMIP proteinaren gainadierazpenak zein 10 μ M histaminak migrazioa emendatu zuten ($p=0,004$ eta $p=0,003$, hurrenez hurren). CEMIP-aren gainadierazpena zein histaminaren efektua CEMIP endogeno mailan **12C irudian** ikus daitezke, eta **12B** argazkian mikroskopioan behatutakoaren adibide bat.



5. EZTABAIDA

Larruazaleko melanomak metastasia garatzeko joera handia dauka (Leonardi *et al.*, 2018) zeinak bereziki garrantzitsu bilakatzen dituen fase goiztiarretan ere metastasirako joera identifikatu dezaketen biomarkatzaileen aurkikuntza zein metastasirako joera horretan inplikaturik dauden bidezidor molekularren deskribapena. CEMIP proteina minbizi-zelulen migrazio ahalmenarekin zein metastasia garatzeko ahalmenarekin erlazionatu izan da (Evensen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2021). baina ezer gutxi dago melanomaren inguruan deskribatuta. Lesio onbera (i.e. nevi) eta gaiztodun (i.e. melanoma) pazienteetatik eratorritako ehunetan egindako azterketaren arabera, CEMIP mailak ez du estadioaren araberako ezberdintasunik adierazten; aldiz, bai I-IV zein fase goiztiarreko (I-II) gaixoak aztertzerakoan, patroi ezberdina agertzen dute metastasirik garatu ez dutenek eta garatu dutenek, orohar, metastasia garatu dutenetan, CEMIP maila altuagoa detektatu dugularik (ikus 6. eta 7. taulak).

Guk eskuratutako emaitzak bat datoz beste ikerketa batzuetan eskuraturiko emaitzekin, hala nola, obulutegian (Shen *et al.*, 2019), garunean (Rodrigues *et al.*, 2019) edo urdailean (Jia *et al.*, 2017) egindakoekin. Ikerketa hauek amankomunean duten bilaketa da CEMIP maila eta metastasiaren arteko lotura, metastasia garatu duten laginetan kontzentrazioaren gorakada nabarmen bat behatu dutelako. Hori dela eta, etorkizunera begira, minbiziaren pronostiko edo eboluzioa aurreikusteko lagungarria izan litekeela proposatzen da.

Metastasirako ahalmenaren emendioarekin erlazionatuta egon daitezkeen mekanismoei dagokienez, larruazaleko melanoma ereduan, CEMIP proteinaren adierazpen-igoerak zelulen migrazioa nabarmenki areagotzen duela (kontrolak baino 1,79 aldiz gehiago) frogatu dugu. Emendio hau (Evensen *et al.*, 2015) lanetan ere behatutakoarekin bat dator. Larruazalean, CEMIP proteinak AH degradatzeko duen gaitasuna dela eta (Yoshida *et al.*, 2013) eta tamaina txikiko AHak zelulen migrazioa bultzatzearekin ikusi den erlazioa medio (Yoshida & Okada, 2019), CEMIP proteinak eragindako zelulen migrazio-ahalmena, AH despolimerizazioarekin estuki lotuta egon liteke. Argi ultramoreak kaltetutako larruazalaren testuinguruan, kalteak erakarrirako mastozitoen pilaketak histamina askatu eta histamina honek, dermiseko fibroblastoengan CEMIP igoera zein ondoriozko AHren degradazioa eragingo lituzkeela proposatu izan da (Yoshida *et al.*, 2020). Baliteke, beraz, azaleko melanoma zeluletan CEMIP kopuruaren igoerak dermiseko AH degradatzeko ahalmena handitu eta honek, matrize estrazelularren desegituraketa bidez, dermisean zeharreko migrazioa erraztea.

Dena dela, gure emaitzek ez dute melanoma zeluletan CEMIP proteinaren igoera histaminaren presentziari lotzen, migrazioaren emendioa eragin arren; zauri bidezko migrazioan emaitza esanguratsuenak 10 μ M histamina gehitzerakoan behatu ditugu, batik bat. A2058 lerro zelularrean, kontrola baino 1,43 aldiz gehiago migratu dute 10 μ M kontzentraziopean, 24 h-tara, eta aldiz, Colo800 lerro zelularrean kasuan, 1,27 aldiz gehiago. 48h-tara ezberdintasunak ez dira hain nabarmenak izan. 1 μ M gehitu dugun kasuetan, emaitzak ez dira oso garbiak izan, are gutxiago Colo800 lerro zelularrean, zeinak kontrolaren balio oso antzekoak erakutsi dizkigun. Aldiz, aipatzekoa da 50 μ M gehitzerakoan A2058 zelulek migratzeko ahalmen hau galdu dutela behatu dugula (0,94) **(10A irudia)**. Gertaera hau baliteke [Porretti et al., 2014](#) lanean proposatzen duten moduan gehiegizko kontzentrazioak eragindako ondorioa izatea, zeinak zelulen migrazioa ekiditen duen. *Transwell* sistemaren bidez eskuratutako emaitzetan ere histaminaren kasuan zelulek kontrola baino 1,25 aldiz gehiago migratu dutela behatu dugu.

Honez gain, baliteke melanoma zeluletan CEMIP-aren gainadierazpenak eragindako migrazioaren igoera bestelako bidezidor molekularren bidezkoa izatea, gure kasuan, ez baitugu entseguetan AH-rik erabili. Aurretiaz aipatutako moduan ([Liu et al., 2021](#)), CEMIP, Wnt/ β -kateninaren bidezidorraren erregulazioarekin ere erlazionatu da, zeina EMT eta honi lotuta, zelulen migrazio-ahalmenarekin estuki erlazionatua dagoen. Interesgarria litzateke etorkizunean balizko lotua hau melanomaren kontestuan aztertzea.

6. ONDORIOAK

Lanaren hasieran jarritako helburuak hizpide izanik, eskuratutako ondorio nagusiak ondorengoak izan dira:

1. CEMIP proteina biomarkatzaile gisa erabiltzeko aukerari dagokionez, gure IHC laginekin eskuraturiko emaitzek adierazten duten moduan lotura estua dauka honen adierazpenak metastasia garapenarekin, eta beraz, minbiziaren agresibitatearekin. Beraz, balizko tresna izan daitekeela iradokitzen dugu.
2. Gure eremuan, histaminak eragindako migrazioaren emendioa CEMIP proteinaren maila endogenoarekiko independentea da.
3. Behin migrazio-areagotzailea dela ziurtatuta eta IHC analisisian lortutako emaitzak kontutan hartuta, CEMIP proteina melanoman metastasia garatzeko faktore garrantzitsua dela ondoriozta dezakegu.

Eginiko esperimntuen jarraipen gisa, CEMIP proteinaren migrazio ahalmena ziurtatzeko prozesuan hurrengo pausua honen isilarazpena egitea litzateke eta baldintza hauetan zelulen migrazioaren azterketa bat egitea, proteinaren funtzioaren galerak zeluletan duen eragina ziurtatzeko. Baita CEMIP-ak eragindako bidezidorretan sakontzea ere.

7. ESKER ONAK

Ez nuke lan hau amaitutzat jo nahi prozesu guztian zehar nola edo hala lagundu didatenei eskertu gabe. Lehenik eta behin, Aintzaneri, nire lanari egindako jarraipenagatik eta nigan izandako konfiantzagatik. Bigarrenik, Andrea eta Mariari, laborategian nirekin izandako pazientzia eta erakutsitako guztiagatik, nire eredu izateagatik. Azkenik, Neskutsi, lanaren errebisio eta zuzenketak egiteko arduragatik, eta nola ez, lanaren osaketan ez ezik, graduko lau urteetan izandako gora behera guztietan nire alboan egon zareten orori eskertu nahiko nizueke, izan klasekide, pisukide, familia, lagun... mila esker.

8. ERREFERENTZIAK

- Basu, S., Cheriyaundath, S. & Ben-Ze'ev A. (2018). Cell-cell adhesion: linking Wnt/ β -catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis. *F1000 Research*. 7:F1000 Faculty Rev-1488
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M.A. & Winberg, R.A. (2018). EMT in Cancer. *Nature Reviews Cancer*. (18): 128-134
- Busam, K.J. & Jungbluth, A.A. (1999). Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol*. 6(1):12-8
- Evensen, N.A., Li, Y., Kuscu, C., Liu, J., Cathcart, J., Banach, A., ... Zhang, Q. (2015). Hypoxia promotes colon cancer dissemination through up-regulation of cell migration-inducing protein (CEMIP). *Oncotarget*. 6(24): 20723–20739.
- Fink, S.P., Myeroff, L.L., Kariv, R., Platzer, P., Xin, B., Mikkola, D., ... Lawrence, E. (2015). Induction of KIAA1199/CEMIP is associated with colon cancer phenotype and poor patient survival. *Oncotarget*. 31: 30500–30515.
- Gershenwald, J.E. & Scoyler, R.A. (2018). Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Annals of Surgical Oncology*. 25: 2105-2110.
- Hasova, M., Crhak, T., Safrankova, B., Dvorakova, J., Muthny, T., Velebny, V. & Kubala, L. (2011). Hyaluronan minimizes effects of UV irradiation on human keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 303:277–284

- Jia, S., Qu, T., Wang, X., Feng, M., Yang, Y., Feng, X., ... Ma, R. (2017). KIAA1199 promotes migration and invasion by Wnt/ β -catenin pathway and MMPs mediated EMT progression and serves as a poor prognosis marker in gastric cancer. *PLoS One*. 12(4): e0175058.
- Keung, E.Z. & Gershenwald, J.E (2020). The eight edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer*. 18(8):775-784.
- Leonardi, G.C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghì, A., Spandidos, D. A., Mccubrey, J.A., ..., Candido, S.(2018). Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. *International Journal of Oncology*. (52):1071-1080
- Li Li, Yan, L-H., Manoj, S., Li, Y. & Lu Lu (2017). Central Role of CEMIP in Tumorigenesis and Its Potential as Therapeutic Target. *Journal of Cancer*. 8(12):2238-2246
- Liu, J., Yan, W., Han, P. & Tian, D. (2021). The emerging role of KIAA1199 in cancer development and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. (138):111507
- Nicoud, M.B., Formoso, K. & Medina, V.A. (2019). Pathophysiological Role of Histamine H4 Receptor in Cancer: Therapeutic Implications. *Frontiers in Pharmacology*. 10:556
- Porretti, J.C., Mohamad, N.A., Martín, G.A. & Cricco, G.P. (2014). Fibroblasts induce epithelial to mesenchymal transition in breast tumor cells which is prevented by fibroblasts treatment with histamine in high concentration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014 (51):29.38
- Qendro, V., Lundgren, D.H., Rezaul, K., Mahony, F., Ferrel, N., Bi, A., ... Latifi, A. (2014). Large-Scale Proteomic Characterization of Melanoma Expressed Proteins Reveals Nestin and Vimentin as Biomarkers That Can Potentially Distinguish Melanoma Subtypes. *J. Proteome Res*. 13(11):5031-5040.
- Rodrigues, G., Hoshino, A. Kenific, C.M., Matei, I.R., Steiner, L., Freitas, D., ... Lyden, D., (2019). Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis. *Nature Cell Biology* (21):1403-1412.
- Schadendorf, D., Van Akkooi, A.C.J, Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., ... , Stang, A. (2018). Melanoma. *Lancet*. (392):971-84
- Shen, F., Zong Z-H., Liu, Y., Chen, S., Sheng, X-J. & Zhao, Y., (2019). CEMIP promotes ovarian cancer development and progression via the PI3K/AKT signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. (114):108787
- Shimizu, H., Shimoda, M., Mochizuki, S., Miyamae, Y., Abe, H., Chijiwa, M., ..., Yoshida, H. (2018). Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Is Up-Regulated and

Involved in Hyaluronan Degradation in Human Osteoarthritic Cartilage. *The American Journal of Pathology*. (188):2109-2119

Speeckaert, R., Van Geel, N., Vermaelen, K.V., Lambert, J., Van Gele, M., Speeckaert, M.M. & Brochez, L. (2010). Immune reaction in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* (24): 334-344

Yoshida, H., Nagaoka, A., Kusaka-Kikushima, A., Tobiishi, M., Kawabata, K., Sayo, T., ..., Sakai, S. (2013). KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(14):5612-5617

Yoshida, H., Nagaoka, A., Nakamura, S., Tobiishi, M., Sugiyama, Y. & Inoue, S. (2014). N-terminal signal sequence is required for cellular trafficking and hyaluronan-depolymerization of KIAA1199. *FEBS letter.* (588):111-116

Yoshida, H., & Okada, Y. (2019). Role of HYBID (Hyaluronan Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization), Alias KIAA1199/CEMIP, in Hyaluronan Degradation in Normal and Photoaged Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 20(22):5804.

Yoshida, H., Aoki, M., Komiya, A., Endo, Y., Kawabata, K., Nakamura, T., *et al.*, (2020). HYBID and hyaluronan synthase coordinately regulate hyaluronan metabolism in histamine-stimulated skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry.* 295(8):2483-2494

Yoshino, Y., Goto, M., Hara, H. & Inoue, S. (2018). The role and regulation of TMEM2 (transmembrane protein 2) in HYBID (hyaluronan (HA)-binding protein involved in HA depolymerization/ KIAA1199/CEMIP)-mediated HA depolymerization in human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (505): 74-80

Yue, P.Y.K., Leung, E.P.Y., Mak, N.K. & Wong, R.N.S. (2010). A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. *Journal of Biomolecular Screening* 2010:427-43

Zaidi, M.R., Day, C-P. & Merlino, (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *The Journal of investigative dermatology.* 128(10):2381-2391

9. ERANSKINAK

1.Eranskina: IHC emaitzetan eskuraturiko emaitza orokorrak. Pazienteen melanomaren estadioaren arabera, hauek metastasia garatu duten edo ez kontuan hartuta erakusten duten CEMIP intentsitatea (0=Negatiboa;1=Positibo ahula;2=Positiboa). Lehenengo zutabeen guk proposaturiko sailkapena: 0=*Nevi*-ak; 1=*In situ* melanomak. Tumore goiztiarren barruan (metastasiaren zantzurik ez), 2 (I estadioa) eta 3 (II estadioa) taldeak. Tumore berantiarren kasuan (metastasia-zantzudun tumoreak) 4 (III estadioa) eta 5 (IV estadioa) taldeak. Azkenik, 6. Taldean, metastasiaren biopsiak (i.e. metastasia garatu deneko lekuan lortutako laginak). Estadioari dagokionez, AJCC-k proposatu moduan, 0 zenbakiaz *in situ* melanomak, eta ondoren lau estadioak, **1.taulan** aipatutako irizpideen arabera.

	GURE SAILKAPENA	AJCC 8ed ESTADIOA	METASTASIA	CEMIP intentsitatea			Guztira
				0	1	2	
GOIZTIARRA	0	-	EZ	2 (%13,3)	7 (%46,7)	6 (%40)	15
	1	0	EZ	0 (%0)	3 (%27,3)	8 (%72,7)	11
	2	I	EZ	4 (%18,2)	12 (%54,6)	6 (%27,2)	22
			BAI	1 (%20)	1 (%20)	3 (%60)	5
	3	II	EZ	4 (%40)	5 (%50)	1 (%10)	10
			BAI	5 (%26,3)	4 (%21)	10 (%52,7)	19
BERANTIARRA	4	III	BAI	1 (%5,3)	8 (%42,1)	10 (%52,6)	19
	5	IV	BAI	0 (%0)	4 (%80)	1 (%20)	5
	6	IV	BAI	2 (%18,2)	7 (%63,6)	2 (%18,2)	11