

Gradu Amaierako Lana  
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

# Proteina konbertasen adierazpena minbizi- zelula parental eta minbizi-zelula ametan (CSC)

Egilea:  
Irati Oiartzabal Narbarte  
Zuzendaria:  
Iker Badiola Echaburu

© 2017 Irati Oiartzabal



<b>1. SARRERA</b> .....	1
<b>2. HELBURUA</b> .....	3
<b>3. MATERIAL ETA METODOAK</b> .....	3
3.1 HASLEEN FROGAKETA qPCR BIDEZ.....	4
3.1.1. Zelulen hazkuntza.....	4
3.1.2 RNA erauzketa eta kuantifikazioa.....	5
3.1.3 RNAtik cDNA lortzeko erretrotranskripzioa (RT-PCR).....	5
3.1.4 PCR konbentzionala eta elektroforesia .....	5
3.1.5 qPCR hasleak frogatzeko.....	5
3.2 KONBERTASA-ADIERAZPENAREN AZTERKETA qPCR BIDEZ .....	6
3.3 KALKULU ETA ESTADISTIKAK.....	6
<b>4 EMAITZAK</b> .....	7
4.1 HASLEEN FROGAKETA qPCR BIDEZ.....	7
4.1.1. Zelulen hazkuntza, RNA erauzketa eta kuantifikazioa .....	7
4.1.2 PCR konbentzionala eta elektroforesia .....	8
4.1.3 qPCR hasleak frogatzeko.....	8
4.2 KONBERTASA-ADIERAZPENAREN AZTERKETA qPCR BIDEZ .....	9
<b>5. EZTABAIDA</b> .....	11
<b>6. ONDORIOAK</b> .....	13
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	14



## LABURPENA

Minbizia hilkortasun oso handiko gaitza da, 2015. urtean 8,8 milioi hildako eragin zituen. Nahiz eta tratamendu bortitz eta luzeak aplikatu, askotan denbora baten ostean gaixotasunaren errekuarentzia gertatzen da, baita metastasiak ere. Eta hemen dago arazoa, izan ere, kasu horietan gaiztotasun maila handiko minbizi-zelula erresistenteak agertzen dira. Uste da guzti horren atzean minbizi-zelula amak (*Cancer Stem Cells, CSC*) daudela, zelula amen antzeko ezaugarriak dituzten minbizi-zelulak. Izan ere, orain arte erabilitako tratamenduek tumoreetako zelula guztiak hiltzen dituzte CSCak izan ezik, eta honek gaixotasunaren errekuarentzia eragiten du. Honen aurrean, CSCen mekanismoak ulertu eta hauen aurkako tratamendu espezifiko eta eraginkorra aurkitzea beharrezkoa bihurtu da minbizitari aurre egiteko. Hori lortzeko itua proproteina konbertasak izan daitezkeela proposatu da. Hauek minbiziaren garapenerako ezinbestekoak diren hainbat proteinen aktibazioan parte hartzen dute (hazkuntza faktoreak, esaterako). Eta ikusi da hainbat minbiziren kasuan konbertasak adierazpena normalean baino altuagoa dela. Honen aurrean, konbertasa-adierazpena aztertu eta konparatu da, koloneko minbizidun zelula-lerro metastatiko eta ez-metastatikoetako CSC eta zelula parentaletan. Ikusi da konbertasak adierazpena handiagoa dela CSCetan minbizi-zelula parentaletan baino, eta baita zelula-lerro metastatikoan zelula-lerro ez-metastatikoan baino. Honen aurrean, beharrezkoa da ikerketarekin jarraitzea, bai mRNA mailan baita proteina mailan ere, konbertasak minbizian duten inplikazio eta eragina aztertu eta frogatzeko.



## 1. SARRERA

Zelula amak etengabe zatitu daitezkeen zelula ez-desberdintzatuak dira, eta organismo helduetan ehunak berritu eta kalteak konpontzeko funtzioa dute. Izan ere, mikroingurunearen arabera, zelula espezializatuak eta zelula ama berriak sor ditzakete zatiketa asimetrikoen bidez (Sherley 2002). Horretarako, zelula arruntek ez dituzten hainbat mekanismo azaltzen dituzte, hala nola, berritzeko (*self-renewal*) eta hainbat zelula motara desberdintzatzeko gaitasunak. Mekanismo hauek estuki erregulatuta daude (Borah eta lank. 2015).

Organismo helduen hainbat ehunetan aurki daitezke zelula amak, eta azken urteetan tumoreetan ere antzeko ezaugarriak dituzten zelulak aurkitu dira. Zelula horiek minbizi-zelula amak dira (*Cancer Stem Cells, CSC*), eta besteak beste, desberdintzapen maila baxua dute eta etengabe zatitu eta berritzeko ahalmena daukate. Tumoreetan zelula-heterogeneotasun handia dago: populazio txiki bat minbizi-zelula amei dagokie, eta gainontzekoak zelula parentalak izango dira. Azken horiek desberdintzatuak daude eta ez daukate ama zelulen antzeko ezaugarriak (Tannishtha eta lank. 2001). CSCen sorrera adierazpen genetiko, epigenetika eta mikroingurunearen araberakoa izango da (Medema 2013), eta bi gertaeren bidez eman daitekeela uste da. Alde batetik, zelula ama arrunt batean berritze mekanismoa deserregulatzea. Eta bestetik, tumore-zelula parental bat desdiferentziatu, zelula ama bihurtu eta berritze gaitasuna eskuratzea (Clarke eta lank. 2006). Bi kasuetan, berritze gaitasuna ez da behar bezala erregulatua egongo, eta hori da CSCei etengabe zatitu eta berritzeko ahalmena ematen diena. Horregatik, ezaugarri berezi horiek izatearen ondorioz, pentsatzen da minbizi-zelula amak (CSC) direla tumorea sortzea eragingo dutenak, baita ondoren tumore hori garatu eta zabaltzea bultzatuko dutenak ere (Borah eta lank. 2015). Gainera, ikusi da zelula arruntek ez dituzten beste hainbat ezaugarri ere badituztela. Alde batetik, hainbat babes-mekanismo dituzte, adibidez proteina antiapoptotikoen adierazpen altua eta ABC ponpak (Zhou eta lank. 2009). Honek minbizi-zelula amek tratamenduekiko erresistentzia sortzea eragiten du. Hau da, orain arte erabilitako tratamenduek (kimioterapia, erradioterapia, eta abar) tumore-zelula parentalak hiltzen dituzte, baina ez CSCak (Moitra 2015). Bestalde, migratzeko gaitasuna daukate, eta horren ondorioz metastasia gerta daiteke (Guo eta Dou 2015).

Minbizia hilkortasun oso handiko gaitza da, 2015. urtean 8,8 milioi hildako eragin zituen (MOE, 2015). Diagnostiko azkar bati esker minbizia kirurgia bidez azkar erradikatzea lortzen bada, bizi itxaropena handia izaten da gaixoetan. Baina askotan, nahiz eta tratamendu bortitz eta luzeak aplikatu, denbora baten ostean gaixotasunaren errekurrentzia gertatzen da, baita metastasiak ere. Eta hemen dago arazoa, izan ere, kasu horietan gaiztotasun maila handiko minbizi-zelula erresistenteak agertzen dira. Uste da guzti horren atzean CSCak daudela. Izan ere, aurretik aipatu bezala, zelula horien ezaugarri bereziek farmakoekiko erresistenteak izatea eta migratzeko ahalmena izatea eragingo dute, horrela minbiziaren errekurrentzia eta metastasiak eraginez (Guo eta Dou 2015). Ezaugarri horiek erregulatu gabeko berritze prozesuak, erreplikazio tasa baxuak, eta babes-mekanismo bereziak dira, besteak beste. Horregatik, ohiko tratamenduak aplikatzean, tumoreko zelula parentalak hilko dira, baina minbizi-zelula amak ez. Hauek denbora batez isilpean mantendu daitezke (*dormancy*), baina epe baten ostean berriro ere tumorea sortuko dute, baita metastasia ere kasu askotan (Clevers 2011). Honen aurrean, CSCen mekanismoak ulertu eta hauen aurkako tratamendu espezifiko eta eraginkorra aurkitzea beharrezkoa bihurtu da minbiziari aurre egiteko.

Honen haritik, minbiziaren garapenean eta metastasian eragina duten hainbat proteina identifikatu dira, esaterako metaloproteinasak, atxikitze molekularak eta hazkuntza faktoreak. Azken horiek zelulen hazkuntza eta biziraupenerako ezinbesteko funtzioak betetzen dituzte. Hain zuzen ere, zelulen zatiketan parte hartzen dute, zelulak G<sub>1</sub> fasera eta S fasera sartzea erregulatuz (Khatib eta lank. 2002). Proteina horiek proproteina izeneko forma inaktiboan ekoizten dira. Eta forma aktibora bihurtzeko proteina konbertasak (PC) beharrezkoak dira, zeinek proproteinetan proteolisiak eragiten dituzten, proteina aktiboak sortuz (Khatib eta lank. 2002). Hasiera batean 7 identifikatu ziren: PC1, PC2, PC4, PC5, PC7, PACE4 eta Furina. Eta beranduago beste bi: NARC eta SKI. (Artenstein eta Opal 2011).

Ikusi da konbertasa-adierazpena zelula osasuntsuetan baino handiagoa dela minbizi askoren kasuan (Borah et al. 2015), eta baita funtzio garrantzitsua bete dezaketela minbiziaren garapenean eta metastasian eragina izango duten hainbat proteinen aktibazio prozesuan ere. Hau da, konbertasen adierazpen altu horrek zelulen hazkuntza eragingo duten molekularak gehiegi aktibatzea eragin dezake, zelulen biziraupena eta minbiziaren sorrera, garapena eta gaiztotzea bultzatuz (Scamuffa eta lank. 2008).



## 2. HELBURUA

Proteina konbertasek CSCtan eta beren mekanismoetan izan dezaketen garrantzia aztertu nahi da. Izan ere, azken urteetako ikerketek azaldu dute, minbizi-zelula guztien (CSCak barne) aurkako tratamendu horietako baten itua proteina konbertasak izan daitezkeela (Khatib eta lank. 2001). Honetan oinarrituz, lanaren helburua koloneko minbizi zelula-lerro metastatiko eta ez-metastatikoaren proteina konbertasa adierazpena aztertzea izango da, eta lerro bakoitzean minbizi zelula parental zein CSCen adierazpena ere konparatuko da. Aipatu bezala, CSCek ama zelulen antzeko hainbat ezaugarri dituzte (horri esker ahalmen bereziak dituzte), eta zelula parentalek aldiz, ez. Aurrekariak kontutan izanda hipotesia da konbertasaren adierazpena desberdina dela lerro zelular bateko minbizi-zelula parental eta CSCen artean, baita lerro metastatiko eta ez-metastatikoaren artean ere. Horrela, alde batetik CSCtan eta lerro metastatikoan konbertasaren adierazpena ea altuagoa den frogatu ahal izango da. Eta bestetik, gaixotasunaren garapenean funtzio garrantzitsua izan dezaketenak identifikatu ahal izango dira. Gainera, minbizi eta konbertasa adierazpenaren arteko erlazio bat ezartzea ere izango da xedea. Izan ere, hipotesia baieztatuko balitz, ikerketa honek abiapuntu moduan balio dezake aurrerantzean konbertasa hauen funtzionalitatea aztertzeko eta baliozko tratamenduak garatzeko.

## 3. MATERIAL ETA METODOAK

Proteina konbertasaren adierazpena aztertzeko, zeluletatik erauzitako cDNA laginak BioDonostia Ikerketa Zentrotik jaso dira zuzenean, eta konbertasak amplifikatzeko hasleak (**1. Taula**) Bordeleko Unibertsitateetik. Izan ere, proiektu hau BioDonostia, Bordeleko Unibertsitatea eta Euskal Herriko Unibertsitatearen arteko kolaborazioa da. Jasotako cDNA laginak koloneko minbizidun bi zelula-lerro dagozkie. SW480 minbizidun zelula-lerro ez-metastatikoa eta SW620 minbizidun zelula-lerro metastatikoa. Bakoitzetik zelula parentalak (P) eta minbizi-zelula amak (CSC) jaso dira, beraz, guztira 4 cDNA lagin jaso dira. Lagin horietako bakoitzean sei konbertasa ezberdinen adierazpena neurtu da: PACE4, NARC, SKI, PC5, PC7 eta Furina. Gainera,  $\beta$ -aktina gene konstitutiboaren adierazpena ere aztertu da kontrol moduan (Hotowy eta Bednarz-misa 2016).

Jasotako laginekin lanean hasi aurretik hasleak egokiak diren frogatu da. Izan ere, hasle horiek orain arte ez dira erabili zelula-lerro zehatz horietan. Horretarako, SW480 zelulak kultibatu, RNA erauzi, erretrotranskripzio bidez cDNA lortu (RT-PCR) eta qPCRa egin da. Ondoren, jasotako laginekin qPCR teknikaren bidez sei konbertasen adierazpena aztertu da (PACE4, NARC, SKI, PC5, PC7, Furina).

	Forward haslea	Reverse haslea
<b>PACEE4</b>	GTACCTCAACTGGGCCAGA (20)	TCGTAGCTGGCGTAGGAATC (20)
<b>NARC</b>	CACTCTGTATGCTGGTGTCTAG (22)	TCTTCCTGGCTTCTGGTGA (20)
<b>SKI</b>	TATACCGGTGTGGCAGGTGATACTTACAA AA (31)	CATGAGCTCCAAGACTGTAAGATGGCTGATT (31)
<b>PC5</b>	GAAGCCAATCCGTTTCTGAC (20)	GTAGATGGCCAGGTCTCC (18)
<b>PC7</b>	GTGTGGGACAGGCTCTTCT (19)	CGAAGTCCTCTTCCCAACTG (20)
<b>Furin</b>	GCAACACCTGGTGGTACAGA (20)	TCTGCGGAGTAGTCATGTGG (20)
<b>B-aktina</b>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC (21)	CTCCTTAATGTCACGCACGAT (21)

1. Taula. Konbertasak anplifikatzeko erabili diren hasleen sekuentziak

### 3.1 HASLEEN FROGAKETA qPCR BIDEZ

#### 3.1.1. Zelulen hazkuntza

SW480 zelula-lerroa desizoztu eta T-25 edukiontzi batean (SARSTEDT, ref: 831810) kultibatu dira, 5 ml zelula medio konpletoan: 500 ml DMEM+F12+GlutaMax medioa (GIBCO, ref: 31331028), 50 ml FBS (Fetal Bobine Serum) (HYCLONE, ref: SV3016003), 5 ml L-Glutamina amino esentziala (SIGMA-ALDRICH, ref: G7513) eta 5,5 ml Penicilina/Estreptomizina (GIBCO, ref: 15140122). Zelulak 37°C eta %5 CO<sub>2</sub>-ko baldintzetan inkubatu dira (HeraCell 150, ThermoScientific™). 3 egunen ostean zelulak edukiontzitik askatu PBS eta tripsina bidez (GIBCO, ref: 70011036;70011036), eta zelulen kontaketa egin da TC20™ Automated Cell Counter bidez (BIO-RAD). Kontaketarako 5 µl zelula eta 5 µl Trypan urdina tindatzailea erabili da (SIGMA, ref: D2650). Berririo kultibatu dira T-75 edukiontzi berri batean (SARSTEDT, ref: 831813), medio konpletoarekin batera. Behar adina zelula lortu arte 3 pase egin dira.

### 3.1.2 RNA erauzketa eta kuantifikazioa

Zeluletatik RNA erauzketa RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit bidez egin da (Qiagen, ref: 74104), fabrikatzailearen argibideak jarraituz. Ondoren, RNAREN kuantifikazioa eta kalitatearen azterketa egin da UV espektroskopian oinarrituz, NanoDrop bidez (Synergy HT, BioTek<sup>®</sup>).

### 3.1.3 RNAtik cDNA lortzeko erretrotranskripzioa (RT-PCR)

Honetarako 1,4µl RNA lagin, 4µl iScript Reaction Mix eta 1µl iScript Reverse Transcriptase (iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit, BIO-RAD, ref: 1708890) eta 13,6µl DEPC-Treated H<sub>2</sub>O (Sigma, ref: D5758) gehitu dira Eppendorf bakoitzera (3 erreplika). Erreakzioa Thermal Cycler (MyCycler, BIO-RAD) termozikladorean burutu da, ondorengo baldintzetan: 5 minutuz 25°C; 30 minutuz 42°C, 5 minutuz 85°C eta 4°C-tan mantendu.

### 3.1.4 PCR konbentzionala eta elektroforesia

Erretrotranskripzioa gertatu dela frogatzeko SW480 zelulen β-aktina gene konstitutiboa amplifikatu da (Hotowy eta Bednarz-misa 2016). Honetarako 0,8 µl cDNA lagin, 0,8 µl hasle, 5 µl MyTaq<sup>™</sup> Red Mix (BIOLINE, ref: 25047) eta 3,4 µl DEPC-Treated H<sub>2</sub>O (Sigma, ref: D5758) gehitu dira eppendorf batean. Erreakzioa Thermal Cycler (MyCycler, BIO-RAD) termozikladorean burutu da, ondorengo baldintzetan: 1 minutuz 95°C (ziklo 1); 15 segundoz 95°C, 15 segundoz 59°C eta 10 segundoz 72°C (30 ziklo); 4°C-tan mantendu hartu arte. Ondoren, PCR produktuak aztertzeko elektroforesia egin da. Horretarako agarosa gela prestatu da: 0,3 g agarosa (Conda, ref:8012), 15 ml H<sub>2</sub>O eta GelRed Nucleic Acid Stain (BIOTIUM, ref: 41003) tanta bat nahastu eta berotu dira. Azken honek UV izpien bidez gelesko bandak ikustea baimenduko du. Orraziarekin solidifikatzen utzi eta kaleak kargatu dira: batean 10 µl HyperLadder<sup>™</sup> 100bp markatzaile (BIOLINE, ref: 33029) eta beste 3 kaleetan 10 µl lagin. Gela 1X TAE indargetzailearekin estali elektroforesi aparatuan (RunOne<sup>™</sup> Electrophoresis Cell and Power Supply, EmbiTec) eta migrazioa 100 V-tan egin da 25 minutuz.

### 3.1.5 qPCR hasleak frogatzeko

Behin SW480 zeluletatik lortutako cDNA badagoela frogatuta, 6 konbertasen hasleak frogatu dira PCR kuantitatibo bidez, non DNA amplifikatzeaz gain lortutako

produktuaren kuantifikazioa egiten den aldi berean. Horretarako cDNA laginak, hasleak eta SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ref: 43676591) erabili dira. Azken honek amplifikaziorako beharrezko molekulez gain Silver Green fluoroforoa dauka, momentu oro zenbat produktu dagoen kuantifikatzea baimenduko duena. Ura erabili da kontrol negatibo modura.

96 putzuko plaka erabili da (MicroAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode 0,1 ml, Life Technologies, ref:4346906). Putzu bakoitzean guztira 25 µl gehitu dira. Alde batetik, 10 µl DNA nahaste (0,02 µl DNA + 9,98 µl DEPC-Treated H<sub>2</sub>O (Sigma, ref: D5758), eta bestetik 15 µl erreakzio nahaste (0,5 µl hasle, 12,5 µl SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ref: 43676591) eta 2 µl DEPC H<sub>2</sub>O). Erreakzioa CFX96<sup>™</sup> Real-Time System (BIO-RAD) termozikladorean burutu da, ondorengo baldintzetan: 10 minutuz 95°C (ziklo 1); 15 segundoz 95°C eta 1 minutuz 60°C (40 ziklo); 15 segundoz 95°C, 1 minutuz 60°C eta 15 segundoz 95°C (ziklo 1).

### **3.2 KONBERTASA-ADIERAZPENAREN AZTERKETA qPCR BIDEZ**

Aurreko qPCRaren prozedura bera jarraitu da, baina kasu honetan 4 cDNA aztertu dira (SW480 P, SW480 CSC, SW620 P, SW620 CSC) eta horietako bakoitzarekin 6 konbertasa (PACE4, NARC, SKI, PC5, PC7, Furina) eta β-aktina gene konstitutiboak. (Hotowy eta Bednarz-misa 2016) Hemen ere putzu bakoitzean guztira 25 µl gehitu dira. Alde batetik, 10 µl DNA nahaste (2,5 µl DNA + 7,5 µl DEPC-Treated H<sub>2</sub>O (Sigma, ref: D5758), eta bestetik 15 µl erreakzio nahaste (0,5 µl hasle, 12,5 µl SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ref: 43676591)) eta 2 µl DEPC-Treated H<sub>2</sub>O (Sigma, ref: D5758). Erreakzioaren baldintzak berdinak izan dira. Saiakera hau 3 aldiz errepikatu da, emaitzen 3 erreplika lortu eta ondoren analisi estatistikoa egin ahal izateko.

### **3.3 KALKULU ETA ESTADISTIKAK**

Anplifikazioko emaitzak Ct balio moduan adierazita lortzen dira (*Threshold Cycle Value*). Balio horrek produktu kopuru zehatz bat lortzeko eman behar izan diren ziklo kopurua adierazten du eta fluoreszentzia neurtuz lortzen da. Proteina baten adierazpena zenbat eta handiagoa izan, lehenago helduko da kopuru zehatz horretara (ziklo kopuru gutxiago beharko dira), eta beraz Ct balio txikiagoa izango da. Balioa 40 baino altuagoa bada ez da kontuan hartuko. Lortutako emaitzak β-aktina gene konstitutiboaren

adierazpen mailarekin normalizatu dira. Horretarako, Ct balioetatik abiatuta *fold change* balioak kalkulatu dira, konbertasen adierazpenak gene konstitutiboaren adierazpena oinarritzat hartuz azaltzeko.

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

$$\text{Fold Change} = 2^{-\Delta Ct}$$

#### 1. Ekuazioa. Ct balioetatik abiatuta Fold Change balioa ( $2^{-\Delta Ct}$ ) lortzeko erabilitako ekuazioa

Behin balio hori lortuta, grafikak irudikatu eta geneen arteko adierazpen aldaketen adierazgarritasuna kalkulatu da. Alde batetik, lerro-zelular bereko P eta CSCen arteko adierazpen aldaketen esangurak, eta bestetik bi lerro-zelularren arteko adierazpen aldaketen esangurak. Horretarako, desbideratze estandarra, errore estandarra eta T-Student balioak kalkulatu dira (n=3).

## 4 EMAITZAK

### 4.1 HASLEEN FROGAKETA qPCR BIDEZ

#### 4.1.1. Zelulen hazkuntza, RNA erauzketa eta kuantifikazioa

Hiru pase egin ostean hazitako zelulen kontaketa egin da TC20<sup>TM</sup> Automated Cell Counter bidez (BIO-RAD) (**2. Taula**). 1ml-ko bi lagin hartu dira horretarako, A eta B.

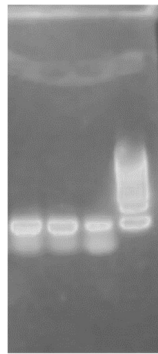
	A lagina	B lagina	Batez-bestekoa
Zelulak guztira	7.14x10 <sup>6</sup>	7.63x10 <sup>6</sup>	7.39x10 <sup>6</sup>
Zelula biziak (kopurua)	4.95x10 <sup>6</sup>	6.06x10 <sup>6</sup>	5.5x10 <sup>6</sup>
Zelula biziak (%)	%69	%79	%74

#### 2. Taula. Zelulen kontaketa emaitzak

Beraz, azken paseko edukiontziko zelulen kontzentrazioa  $5,5 \times 10^6$  zelula/ml da, eta hori izan da RNA erazteko erabilitako peletean zegoen zelula kopurua. Zelula horietatik 50  $\mu$ l RNA erazi, eta NanoDrop bidez (Synergy HT, BioTek®) kuantifikazioa egin da. Lortutako RNA kontzentrazioa 1400 ng/ $\mu$ l izan da, 1,98-ko absorbantzia ratioarekin.

#### 4.1.2 PCR konbentzionala eta elektroforesia

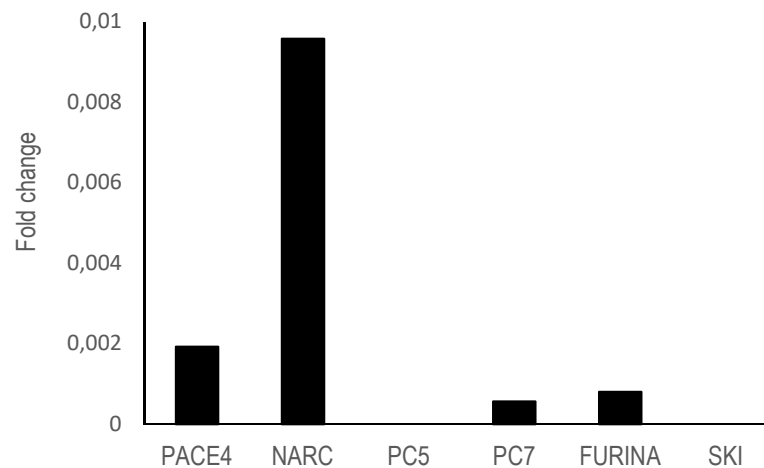
Elektroforesi gelean (**1. Irudia**), eskuineko kolean markatzailea ikus daiteke, eta ezkerreko beste hiru kaleak PCR produktuen hiru erreplikei dagozkie. Anplifikazioa ondo gertatu dela eta  $\beta$ -aktina produktua sortu dela ikusi da. Izan ere, erreplikei dagozkien kaleetan 100 bp inguruko banda argia ikus daiteke (markatzailearen azken banda 100 bp-ri dagokio). Beraz, ondorioztatu da RT-PCRa egoki gertatu dela, eta konbertasen hasleak frogatzeko cDNA badagoela.



**1. Irudia.** Elektroforesi bidez lortutako emaitzak. Ezkerretik eskuinera: laginen hiru erreplika eta markatzailea. Laginen banda nagusia markatzailearen 100 bp-tako bandarekin bat dator.

#### 4.1.3 qPCR hasleak frogatzeko

qPCRko emaitzetan (**1. Grafika**) ikus daiteke hasleak egokiak direla, 4 konbertasen kasuan badagoelako adierazpena (PACE4, NARC, PC7, Furina). Beste bi kasuetan ez da adierazpenik ikusi (PC5, SKI). Baliteke hasleak bi kasu horietan ez izatea egokiak, baina baita SW480 zeluletan konbertasa horien adierazpenik ez egotea ere.



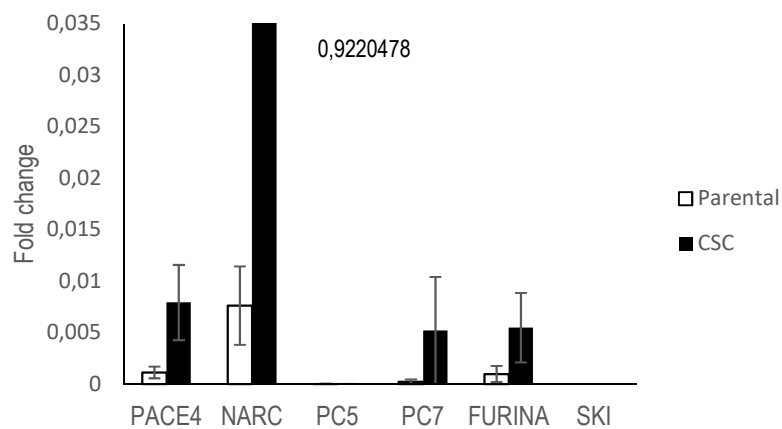
1. **Grafika.** Sei konbertasei dagozkien hasleak egokiak direla frogatzeko, SW480 zeluletatik lortutako cDNA laginekin egindako anplifikazioen emaitzak, Fold Change balioetan adierazita ( $2^{-\Delta Ct}$ ).

## 4.2 KONBERTASA-ADIERAZPENAREN AZTERKETA qPCR BIDEZ

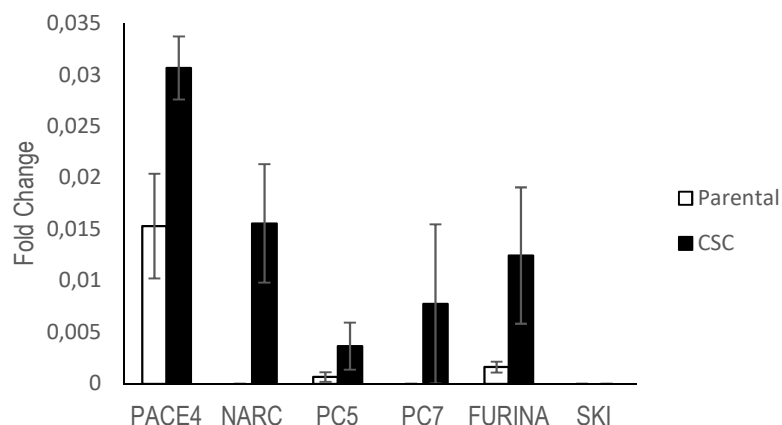
Konbertasa-adierazpena azaltzen duten grafikak behean ikus daitezke. Lehenengoa SW480 zelula-lerroari dagokio (koloneko minbizidun lerro ez-metastatikoa) (**2. Grafika**) eta bigarrena SW620 zelula-lerroari (koloneko minbizidun lerro metastatikoa) (**3. Grafika**).

Alde batetik, konbertasa guztietan ikusi da adierazpena, SKI konbertasaren kasuan izan ezik. Honek ez du adierazpenik adierazi, ez SW480 zeluletan ezta SW620 zeluletan ere. Bestalde, argi ikus daiteke orokorrean zelula metastatikoetan konbertasa-adierazpena handiagoa dela, NARC konbertasaren adierazpena izan ezik. Azken honen adierazpena altuagoa da zelula ez-metastatikoetan. Estatistiken bidez lerro-arteako konparaketa egin da, zelula metastatiko eta ez-metastatikoaren arteko emaitzak konparatu dira. Honen bidez, alde batetik SW480 parental eta SW620 parentalen arteko adierazpen-ezberdintasunaren adierazgarritasuna kalkulatu da, eta bestetik SW480 CSC eta SW620 CSC-en artekoa. T-Student balioak kalkulatu dira, eta kasu gehienetan ikusi da ezberdintasunak ez direla adierazgarriak. Aldaketa adierazgarriak azaldu dituen konbertasa bakarria PACE4 izan da. Hala ere, gainontzekoek joera argi bat azaltzen dute, nahiz eta emaitzak ez izan adierazgarriak.

Azkenik, konbertasa-adierazpena nabarmen altuagoa da minbizi-zelula amei (CSC) dagozkien laginen kasuan, zelula parentalen laginetan baino. Joera hori kasu guztietan bete da, bai bi zelula-lerroetan, baita konbertasa bakoitzean ere. Kasu honetan lerro-barneko konparaketa egin da. Hemen, bai SW480 zelulen baita SW620 zelulen barnean Parental eta CSCen arteko adierazpen-ezberdintasunaren adierazgarritasuna neurtu da. Hala ere, T-Student balioek azaldu dute CSC eta zelula parentalen arteko adierazpen-ezberdintasuna ez dela esanguratsua, nahiz eta joera nabarmena ikusi den.



**2. Grafika.** SW480 zelula-lerroko laginekin egindako qPCR amplifikazioen emaitzak, Fold Change balioetan adierazita ( $2^{-\Delta Ct}$ ). Sei konbertasa ezberdinen adierazpena aztertu da, eta bakoitzean zelula parental (zuriz) eta minbizi-zelula amak (beltzez).



**3. Grafika.** SW620 zelula-lerroko laginekin egindako qPCR amplifikazioen emaitzak, Fold Change balioetan adierazita ( $2^{-\Delta Ct}$ ). Sei konbertasa ezberdinen adierazpena aztertu da, eta bakoitzean zelula parental (zuriz) eta minbizi-zelula amak (beltzez).



T-Student	PACE4	NARC	PC5	PC7	FURINA	SKI
SW480 P-CSC	0,140	0,094	0,600	0,393	0,264	-
SW620 P-CSC	0,061	0,054	0,269	0,373	0,179	-
SW480 CSC -SW620 CSC	0,009	0,120	0,187	0,800	0,402	-

**3. Taula.** Konbertasa adierazpenaren emaitzekin lortutako T-student balioak. Goitik behera: SW480 lerro-barneko konparaketa, SW620 lerro barneko konparaketa eta minbizi-zelula amen SW480-SW620 lerro-arteko konparaketa.

## 5. EZTABAIDA

Minbizia hilkortasun oso handiko gaitza da, eta nahiz eta tratamendu bortitzak aplikatu, denbora baten ostean gaixotasunaren errekuarentzia gertatzen da, baita metastasiak ere. Uste da guzti horren atzean CSCak daudela. Izan ere, zelula horiek zelula amen gisako ezaugarri bereziak dituzte, eta orain arte erabilitako tratamenduek tumoreko zelula guztiak hiltzen dituzte, CSCak izan ezik. Ondorioz, zelula horietatik abiatuz tumorearen birsorkuntza, gaitzaren errekuarentzia eta askotan metastasiak sortzen dira. Beraz, minbizi-zelula guztien aurkako tratamendu berriak beharrezkoak bihurtu dira minbiziari aurre egiteko (Guo eta Dou 2015). Azken urteetako ikerketek azaldu dute, tratamendu horietako baten itua proteina konbertasak izan daitezkeela (Khatib eta lank. 2001). Horretan oinarrituz, lan honen helburua koloneko minbizidun bi zelula-lerrotan proteina konbertasen adierazpena aztertzea izan da. Alde batetik, zelula parental eta CSCen arteko konbertasa-adierazpenak konparatzeko, eta bestetik zelula-lerro metastatiko eta ez-metastatikoaren artean konbertasa-adierazpena konparatzea. Izan ere, minbizi-zelulen hazkuntza eta biziraupenerako ezinbestekoak diren hainbat molekula proproteina moduan ekoizten dira, eta konbertasen bidezko aktibazioa behar izaten dute beren funtzioak bete ahal izateko. Hala ere, oraindik ez dago guztiz argi konbertasa bakoitzak daukan garrantzia edo inplikazioa minbizian (Khatib eta lank. 2002).

Alde batetik, lerro metastatiko eta ez-metastatikoaren CSCen arteko konbertasa-adierazpenaren konparaketari dagokionez, lortutako emaitzetan ikusi da adierazpena orokorrean altuagoa dela zelula-lerro metastatikoan (NARC konbertasaren kasuan ez da hau bete) (**1. Grafika eta 2. Grafika**). Nahiz eta estatistikoki emaitzak ez diren esanguratsuak izan kasu gehienetan, joera argi bat ikus daiteke (**3. Taula**). Honekin ondoriozta daiteke konbertasen adierazpen altua minbiziaren gaiztotzean inplikaturik egon daitezkeela, metastasia bultzatuz. PACE4 konbertasaren kasuan adierazpen-aldaketa

esanguratsua da bi lerroetako CSCen artean ( $p=0,009$ ), eta honek iradokitzen du ikerketa gehiago beharrezkoa dela konbertatzen inplikazioa frogatzeko. Bestalde, lerro bakoitzaren barnean zelula parental eta CSCen arteko konparaketari dagokionez, konbertasa-adierazpena nabarmen altuagoa da minbizi-zelula amei (CSC) dagozkien laginen kasuan, zelula parentalen laginetan baino. Hori kasu guztietan bete da, bai bi zelula-lerroetan, baita konbertasa bakoitzean ere. (**1. Grafika** eta **2. Grafika**). Nahiz eta estatistikoki emaitzak ez diren adierazgarriak izan (**3. Taula**), joera nabarmena ikusi da, eta beharrezkoa da ikerketa gehiago egitea. Izan ere, aurretik aipatu bezala, ikusi da CSCak izan daitezkeela minbiziaren sortzaile, baita honen garapenaren eta metastasiaren erantzule ere (Borah eta lank. 2015). Metastasia prozesu oso dinamikoa da, non zelulen arteko eta zelula-matriz extrazelular arteko interakzio ugari ematen diren. Eta hainbat ikerketatan adierazi da proproteina konbertasek funtzio garrantzitsua bete dezaketela prozesu horretan, interakzio horiek faboratuko dituzten molekulak gehiegi aktibatzen dituztelako kasu askotan. Adibidez, hazkuntza faktoreak, metaloproteinasak eta atxikitze molekulak. Horrela, metastasia faboratuko da (Scamuffa eta lank. 2008).

Hainbat ikerketatan ikusi da koloneko minbiziaren kasuan, IGF1 eta IGF2 hazkuntza faktoreen eta beren hartzaileen gehiegizko aktibazioa dela metastasiaren sorrera eta garapenaren eragileetako bat (Scamuffa eta lank. 2008). Hazkuntza faktoreek zelulen zatiketan parte hartzen dute, zelulak G<sub>1</sub> fasera eta S fasera sartzea erregulatuz. Hauen aktibazioa gehiegizkoa bada, zelulen gehiegizko zatiketa eragingo da, eta horrela minbiziaren gaiztotasun fenotipoa, angiogenesisia, inbasioa eta metastasia bultzatuko da, baita apoptosia ekidin ere (Khatib eta lank. 2002). Gainera, frogatu da nagusiki furina dela hazkuntza faktoreen eta beren hartzaileen aktibazioaz arduratzen den konbertasa koloneko minbiziaren kasuan, nahiz eta furinarik gabeko LoVo zeluletan PC5 konbertasak ere funtzio hori bete dezakeela ikusi den (Khatib eta lank. 2001). Furina da minbizian gehien ikertu den konbertasa, izan ere, ikusi da hainbat minbizi motaren garapenean inplikaturik dagoela, esaterako, birika, bular, buru, lepo eta koloneko minbiziak (Khatib eta lank. 2002). Kontuan hartuta hazkuntza faktoreen gehiegizko aktibazioa dela koloneko minbiziaren gaiztotze eta metastasiaren erantzuleetako bat, pentsa daiteke furinaren eta PC5en adierazpen altua zuzenki inplikaturik egon daitekeela prozesu horretan. Lortutako emaitzen kasuan, PC5en adierazpena furinarena baino askoz ere baxuagoa dela ikusi da. Baina bi konbertasaren kasuan adierazpena altuagoa izan da

CSCetan zelula parentaletan baino, eta baita lerro metastatikoan ez-metastatikoan baino. Nahiz eta estatistikoki ez diren emaitza esanguratsuak izan, joera nabarmena da eta bat dator aurretik aipatutako beste ikerketen emaitzekin.

Gainera, ikusi da VEGF-C hazkuntza faktorearen aktibazio prozesuan furina eta PC5 konbertasez gain, PC7k ere parte hartzen duela honen aktibazioan. Hazkuntza faktore honen funtzioa hodi baskularrak eta linfatikoak sortzea da, eta beraz, angiogenesisian parte hartzen duela ondorioztatu da. Eta hau oso garrantzitsua da minbiziaren garapenerako (Siegfried eta lank. 2003). Furina eta PC5eri dagozkien emaitzak aurretik aipatu dira, eta PC7ren emaitzak ere bat datoz. Adierazpena altuagoa da CSCtan zelula parentaletan baino, eta baita lerro metastatikoan ez-metastatikoan baino. Nahiz eta estatistikoki adierazpen-aldaketa ez den esanguratsua izan, joera nabaria da eta emaitzak bat datoz aurretik aipatutako ikerketen emaitzekin.

Azkenik, aipatzekoa da ez dela SKI adierazpenik ikusi, ez zelula parental ezta CSCtan, ezta lerro metastatiko zein ez-metastatikoan (**1. Grafika eta 2. Grafika**). Hainbat ikerketetan azaldu den moduan, SKIren funtzioa ezberdina da beste konbertasekin konparatuz. Izan ere, lipidoen metabolismoko proteinen aktibazioan hartzen du parte eta gainontzeko konbertasek orokorrean hazkuntza faktoreak, neuropeptidoak, azaleko glikoproteinak, hartzailak eta entzimak aktibatzeaz arduratzen dira (Khatib eta lank. 2002). Horregatik, baliteke SKI-k minbizian duen inplikazioa ez izatea esanguratsua. Hala ere, hasleak frogatu direnean ere ez da SKI adierazpenik ikusi, beraz, baliteke adierazpen-falta horren arrazoia hasleen diseinu okerra edo hasleekin lotutako arazoren bat izatea. Horregatik, beharrezkoa da ikerketa gehiago egitea SKI konbertasaren adierazpena eta minbizian daukan inplikazioa frogatzeko.

## **6. ONDORIOAK**

Orokorrean, lortutako emaitzetan ikusi da proproteina konbertasaren adierazpena nabarmenki altuagoa dela CSCtan zelula parentaletan baino, eta lerro metastatikoan ez-metastatikoan baino. Joera hori nabaria da nahiz eta estatistikoki adierazpen-aldaketak ez diren adierazgarriak izan.

Gainera, joera hori adierazi duten emaitzak bat datoz beste hainbat ikerketetan ikusitakoarekin, eta horregatik beharrezkoa da ikerketekin jarraitzea. Alde batetik, komenigarria da aztertutako lagin kopurua handitzea, emaitza estatistikoak fidagarriagoak izan daitezen. Eta bestetik, baliteke beste teknika batzuk erabiltzea ere komenigarria izatea. Izan ere, qPCR bidez mRNA mailako adierazpena aztertzen da, baina esaterako Wester Blot bidez proteina mailako adierazpena aztertuko litzateke, eta informazio garrantzitsua lortzea baimenduko luke. Azkenik, aipatzekoa da guzti hau abiapuntu bat besterik ez dela minbiziaren aurkako tratamendu berri posible baten ikerketan. Esan bezala, beharrezkoa da ikerketekin jarraitzea, eta teknika ezberdinak erabiliz konbertasek minbizian daukaten funtzio eta inplikazioa frogatzea. Behin hori eginda, konbertasa horien inhibizioaren eragina aztertu beharko litzateke, eta frogatu ea minbiziari aurre egiteko estrategia egokia den.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Artenstein, A.W. eta Opal, S.M., 2011. Proprotein Convertases in Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, 365:2507-2518.

Borah, A. eta lank., 2015. Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis*, 4:e177.

Clarke, M.F. eta lank., 2006. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, 66(19):9339-9344.

Clevers, H., 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*, 17(3):313-319.

Guo, M. eta Dou, J., 2015. Advances and perspectives of colorectal cancer stem cell vaccine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 76:107-120.

Hotowy, M.K.K. eta Bednarz-misa, A.G.I., 2016. Serum availability affects expression of common house-keeping genes in colon adenocarcinoma cell lines: implications for quantitative real-time PCR studies. *Cytotechnology*.

Khatib, A.M. et al., 2001. Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: Importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33):30686-30693.

Khatib, A.M. et al., 2002. Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *The American journal of pathology*, 160(6):1921-1935.

Medema, J.P., 2013. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nature Cell Biology*, 15(4):338-344.

Moitra, K., 2015. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *BioMed Research International*.

Scamuffa, N. et al., 2008. Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1):352-363.

Sherley, J.L., 2002. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *The Scientific World Journal*, 2:1906-1921.

Siegfried, G. et al., 2003. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 111(11):1723-1732.

Tannishtha, R. et al., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414:105-111.

Zhou, B.B.S. et al., 2009. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature Reviews. Drug discovery*, 8:806-823.