



Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

PCSK9 proteinaren adierazpena minbizi ama zeluletan giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsietan

Egilea:
Naroa Fontal Moa

Zuzendaria:
Iker Badiola Etxaburu

Zuzendarikidea:
Patricia Garcia Gallastegi

© 2021, Naroa Fontal Moa

AURKIBIDEA

1. LABURPENA.....	1
2. SARRERA.....	1
2.1. Kolon eta ondesteko minbizia.....	1
2.2. Minbizi ama zelulak (CSC).....	1
2.3. CSCen markatzaileak.....	2
2.4. PCSK9 (<i>Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9</i>).....	3
2.5. PCSK9ren papera kolesterolaren metabolismoan.....	3
2.6. Hiperlipidemia eta minbizia.....	4
3. HIPOTESIA ETA HELBURUAK.....	4
4. MATERIALAK ETA METODOAK.....	5
4. 1. Giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsien <i>Tissue MicroArray</i> (TMA).....	5
4.2. Immunofluoreszentzia saioak.....	5
4.3. Argazkien prozesamendua.....	6
4.4. Analisi estatistikoa.....	6
5. EMAITZAK.....	6
5.1. PCSK9 eta CD133k kolokalizazioa erakusten dute giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsietan.....	6
5.2. PCSK9 eta CD133ren kolokalizazio portzentajea altuagoa da gibelego metastasian tumore primarioan baino.....	9
6. EZTABAIDA.....	9
7. ONDORIOA.....	12
8. BIBLIOGRAFIA.....	13

1. LABURPENA

Kolon eta ondesteko minbiziak intzidentzia handia du mundu mailan, hirugarren minbizi ohikoena izanik. Gainera, minbizi mota honek tumore errepikariak eta metastasiak sortzeko joera du, portzentaje handi baten. Gero eta ebidentzia gehiago dago minbizi ama zelulak (CSC, *Cancer Stem Cells*) birgaixotzea eta terapien aurkako erresistentziaren erantzuleak direla baieztatzeko. Proproteina konbertasen (PC) eta minbiziaren arteko erlazioa sakonki aztertua izan da, hala ere, familia honen kidea den PCSK9k (*Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9*) gaitz honetan duen paperaren inguruko ezagutza eskasa dago. PCSK9 eta CSCen arteko erlazioa argitu nahian, lan honetan PCSK9k kolon eta ondesteko CSCetan duen adierazpena aztertu da giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsietan. Horretarako, PCSK9 eta CSCen markatzailea den CD133ren kolokalizazioa aztertu da, tumore primario eta metastasikoen arteko konparaketa eginez, immunofluoreszentzia saioak burutuz. Emaitzek bi markatzaileen arteko kolokalizazioa agerian utzi dute, metastasietan kolokalizazioa handiagoa izanik, PCSK9 eta kolon eta ondesteko CSCen arteko korrelazioaren existentzia iradokiz. Honek, PCSK9k tumoreen garapen eta hedapenean nolabaiteko papera eduki dezakeela aditzera ematen du.

2. SARRERA

2.1. Kolon eta ondesteko minbizia

Espainiako estatuan kolon eta ondesteko minbizia bigarren tumore ohikoena da gizonezkoetan, prostatako minbiziaren ostean, eta emakumezkoetan, bularreko minbiziaren ostean (Asociación Española Contra el Cáncer, 2018). Mundu mailan, kolon eta ondesteko minbizia hirugarren kokatzen da intzidentzia mailan, gizon zein emakumezkoetan, eta minbiziak eragindako bigarren heriotza-kausa da (The International Agency for Research on Cancer, 2020). Minbizi mota hau pairatzen duten paziente gehienek, %70-80 inguru, tumore lokalizatuak dituzte diagnostikoaren hasieran. Hala ere, tumore errepikariak eta metastasiak pairatzeko arriskua dago, portzentaje handi baten. Esterako, diagnostikatutako pazienteen erdiak metastasiak garatzen bukatuko du, gehienak gibelesko metastasiak direlarik (Saunders & Iveson, 2006). Gaur egungo erduek proposatzen dutenez, birgaixotzea ekiditea zaila da terapiak minbizi ama zelulak (CSC, *Cancer Stem Cells*) ezabatzea lortzen ez dutenean (Ben-Ze'ev et al., 2016).

2.2. Minbizi ama zelulak (CSC)

Tumoreak, histologikoki, heterogeneoak dira, nahiz eta jatorriz zelula bakarretik sortu

izan diren (Nassar & Blanpain, 2016). Ezaugarri hau CSCak kontuan hartzen dituen hierarkiaren hipotesiaren bitartez azaldu daiteke. Hipotesi honen arabera, tumorea osatzen duten zelula populazio desberdinak daude, zeinen artean CSCak aurkitzen ditugun (Vincent et al., 2019). Zelula hauek zenbait ezaugarri komun dituzte ohiko zelula ama enbrionarioekin, hala nola, proliferatzeko eta haien burua berritzatzeko gaitasuna (Massard et al., 2006); hauek dira, zehazki, tumorea bere heterogenotasun guztiarekin birsortzeko gaitasuna duten tumore zelula bakarrak (Vincent et al., 2019). Hortaz, minbizi zelula guztiek ez dute tumore berriak sortzeko gaitasun bera. Heterogenotasun hau da, hain zuzen, tumorea hedatzeko eta metastasiak sortzeko gaitasuna eskaintzen duen ezaugarria (Nassar & Blanpain, 2016).

CSCen existentziaren lehen ebidentzia 1990eko hamarkadan burututako leuzemia mielogeno akutuari (LMA) buruzko ikerketetan aurkitu zen lehen aldiz. Hamarkada bat geroago, bularreko minbizian aurkitu ziren, CSCen kontzeptua tumore solidoetara hedatuz. Gaur egun, CSCak zenbait tumore solidotan identifikatuak izan dira, haien artean kolon eta ondesteko minbizian (Hirata et al., 2019). Aurkikuntza honetan ostean, ikerketa askok CSCetan jarri dute arreta, izan ere, zelula hauek, tumoreak sortzeko gaitasun altua aurkezteaz gain, minbizia tratatzeko ohiko farmakoen aurreko erresistentzia garatu dezakete, hala nola, kimioterapia eta erradioterapiaren aurreko erresistentzia (Vincent et al., 2019). Erresistentzia honen garapena, besteak beste, ABC (*ATP-binding cassette*) garraiatzaileei esker ematen da (Kozovska et al., 2014), baita DNA konpontzeko mekanismo eta proteina anti-apoptotikoak edukitzeagatik (Massard et al., 2006). Hori dela eta, CSCen aurka bideratutako terapia berrien beharra agerian gelditzen da.

2.3. CSCen markatzaileak

CSCak identifikatzeko eta isolatzeko zelula hauen markatzaile espezifikoak behar dira. Markatzaile hauen identitatea zehazterako orduan kontuan eduki behar da CSCak zelula populazio heterogeneoa direla, bai fenotipikoki bai funtzionalki (Hirata et al., 2019). Kolon eta ondesteko tumoreetako CSCak CD133 gainazaleko markatzaileari esker isolatu ziren lehen aldiz (Ricci-Vitiani et al., 2007), eta, gaur arte, minbizi mota honetako CSCak identifikatzeko hainbat markatzaile berri aurkitu dira, hala nola CD44 edo aldehido deshidrogenasa (ALDH1) (Kozovska et al., 2014). Hala ere, karakterizatutako markatzaile guztien artean, CD133ren adierazpena da kolon eta ondesteko CSCen ezaugarri unibertsalena (Hirata et al., 2019).

CD133 (prominina-1) 120 kDa-eko transmintz glikoproteina bat da, zehazki, mintz plasmaticoaren lipido mikrodomeinuetan metatzen dena. Gaur egun, CD133 zelula amen markatzaile bezala erabiltzen da tumore solido gehienetan, kolon eta ondesteko minbiziak barne (Barzegar Behrooz et al., 2019). Are garrantzitsuago, glikoproteina hau zuzenean inplikaturako zelula amen propietateetan, hala ere, haren funtzio fisiologiko zehatzak ez daude guztiz

argi. Argi dagoena da CD133k zelula-zelula elkarrekintzetan eta mintzaren antolakuntzan eragina duela (Barzegar Behrooz et al., 2019). Horrez gain, markatzaile hau metastasi eta inbasioarekin lotzen da, baita ABC garraiatzaileen adierazpenarekin ere, honela CSCei propietate kimio-erresistenteak eskainiz. Hori dela eta, CD133 minbizi askoren pronostiko txarrarekin lotzen da, kolon eta ondesteko minbizia barne (Vincent et al., 2019). CSCen aurkako terapia espezifikoak garatzerakoan hauek identifikatu eta isolatzea lehenengo pausua bakarrik ez da; honen ostean zelula hauetan itu espezifikoak bilatu behar dira.

2.4. PCSK9 (*Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9*)

Proteina konbertasak (PC) substratu proteikoen mozketa eta ondoriozko aktibazioaz arduratzen diren serina proteasak dira. Orain arte, bederatzi entzima deskribatu dira familia honen barruan (Klein-Szanto et al., 2017). Esan bezala, PCek zenbait substraturen aktibazioan parte hartzen dute, haien artean zitokinak, hazkuntza faktoreak, proteasak eta hartzaileak (Siegfried et al., 2020). Proteina hauen gehiegizko aktibazioak zenbait prozesu patofisiologiko sustatu ditzake, hala nola, minbizia, obesitatea, diabetesa edo Alzheimer gaixotasuna. Beraz, haien substratuak prozesatzeko gaitasunagatik PCak estuki erlazionatuta daude gaitz hauekin. Zehazki, PCek minbiziarekin duten erlazioa sakonki aztertua izan da (Siegfried et al., 2020). Familia honen kidea den PCSK9 (*Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9*) oso ikertua izan da kolesterolaren metabolismoan duen inplikazioa dela eta. Giza PCSK9 692 aminoazidotako zimogeno disolbagarri bezala sintetizatzen den glikoproteina da (Melendez et al., 2017). Sintetizatzen den proteina aitzindari hau erretikulu endoplasmatikokoan prozesatzen da, mozketa auto-katalitiko intramolekular bat pairatuz. Prozesamendu honek PCSK9 zimogenoaren pro-peptidoa moztu du N-terminaletik. Jarraian, mozketa produktuak jariatu egiten da, odol plasmara heldu arte. Mozketa honen helburua proteinak bere aktibitate katalitiko eskuratzea da, dena den, moztutako pro-peptido segmentua PCSK9ri lotuta geratzen da, proteinaren gune katalitikoari lotuz modu ez-kobalentean. Hori dela eta, jariatutako PCSK9 entzimatikoki inaktiboa da (Melendez et al., 2017). PCSK9 hepatozitoetan eta heste biloxketan adierazten da garapenean zehar, kantitate handitan. Organismo helduetan, berriz, proteina honen adierazpena nabarmenki jaisten da. Hala ere, gibel eta heste dira PCSK9 adierazten duten ehun nagusiak (Seidah et al., 2003).

2.5. PCSK9ren papera kolesterolaren metabolismoan

PCSK9ren inguruko ikerketa peptido honek kolesterolaren metabolismoan duen inplikazioa aztertzeari zuzendua dago gehienbat, izan ere, PCSK9 kodetzen duen genean ematen diren funtzio-irabazte mutazioek hiperkolesterolemia familiarrarekin lotuta daude (Lambert et al., 2012). Hiperkolesterolemia familiarra, plasman LDL (*low-density lipoprotein*) kolesterol maila altuak izateagatik bereizten den dislipemia mota da, herentzia autosomiko dominantea

duena. Zenbait mutazio desberdinek gauzatu dezakete hiperkolesterolemia familiarra, zehazki, hiru gene identifikatu dira gaitz honen sortzaile gisa: LDLR (LDL hartzailea), apolipoproteina B eta PCSK9 (Lambert et al., 2012). LDLR hepatikoak odoleko LDLa eskuratzeaz arduratzen dira, odola partikula hauez “garbituz” (Mahboobnia et al., 2021). Modu honetan, LDLRek LDLa lotu egiten dutenean, internalizatu egiten dira, klatrinaz gaineztatutako besikuletan, non LDLa lisosometan degradatzen den. Jarraian, LDLRa birziklatu egiten da, mintz plasmatikora bueltatuz, LDL gehiago lotu eta liseritu ahal izateko. PCSK9k badu eragina bidezidor honetan, izan ere hepatozitoetako LDLRen zelula barneko degradazioa bultzatzen du, hots, hartzailearen degradazioa sustatzen du lisosoman (Lambert et al., 2012). Modu honetan, PCSK9k mintz LDLR maila jaitea eta, ondorioz, odol LDL mailaren igoera sustatzen du. LDLRen andeatzea bultzatzeko, jariatutako PCSK9, LDLR-ren zelulaz kanpoko domeinura lotzen da, modu honetan, hartzailea PCSK9rekin batera endozitatzen da. PCSK9k LDLR-ren konfomazio irekia bultzatzen du, hartzailearen liseriketa lisosomala bultzatuz (Melendez et al., 2017). Hau honela, PCSK9ren inhibizioa hiperkolesterolemiaren aurkako terapia gisa erabil daiteke.

2.6. Hiperlipidemia eta minbizia

Zenbait ebidentziek agerian utzi dute hiperlipidemia eta minbiziaren arteko erlazioa existitzen dela (Mahboobnia et al., 2021). Minbizi zelulek erreprogramazio metabolikoa pairatzen dute, aldaketa hauen barnean lipidoen metabolismoarekin erlazionatutako aldaketak ere ematen dira. Izatez, zelula tumoralek kolesterol eskaera handiagoa dute, haien hazkuntza handitua dela eta. Kolesterol mintz plasmatikokoaren osagai garrantzitsua da eta, hori dela eta, zelulek haren beharra dute zatiketa eta hazkuntza prozesuan mintzaren biosintesia bultzatu nahi badute. Horrez gain, energia iturri eta seinale molekula gisa ere du garrantzia. Hori dela eta, plasma LDL-kolesterol maila altua minbiziarekin erlazionatuta egon daiteke. Izatez, LDL-kolesterol maila altuek kolon eta ondesteko minbiziarekin korrelazio positiboa duela ikusi da, intzidentzia eta arrisku handiagoa suposatzen duelarik (Mahboobnia et al., 2021).

3. HIPOTESIA ETA HELBURUAK

Hiperlipidemiak minbiziaren garapenean eduki ahal dituen inplikazioak ezagutuz, eta PCSK9k kolesterolaren metabolismoan duen papera kontuan hartuz, kolon eta ondesteko minbiziaren eta proproteina konbertasa honen arteko korrelazioa existitzen dela pentsa genezake. Hori dela eta, lan honetan PCSK9k kolon eta ondesteko tumoreetan eta, zehazki, minbizi mota honetako CSCetan duen garrantzia aztertu nahi da. Zehazki, PCSK9 CSCetan adierazten dela hipotetizatzen dugu, bereziki ehun metastatitikoan, tumore primarioarekin alderatuz. Hipotesi hori frogatzeko PCSK9ren adierazpena eta lokalizazioa aztertu da giza

pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsietan, immunofluoreszentzia saioak burutuz. Saio hauetan, hain zuzen, PCSK9 eta CSCen markatzailea den CD133ren kolokalizazioa aztertu da, pazienteen tumore primario zein gibelesko metastasietan.

4. MATERIALAK ETA METODOAK

4.1. Giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsien *Tissue MicroArray* (TMA)

Tumoreetan PCSK9k duen adierazpena aztertzeke giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsiak erabili ziren. Ikerketa honetako esperimentu guztiek Espainiako eta Europar Batasuneko indarreko lege-araudia betetzen dute. Pazienteen laginak eta datuak Ikerketarako Euskal Biobankua-OEHUN-ak emandakoak dira. Paziente guztiei jakinarazi zitzairen eta idatziz eman zuten haien ehunak proiektu honetan erabiltzeko baimena. Horretarako, Euskal Autonomia Erkidegoko Osasun Sistema Publikoko Batzorde Etiko eta Zientifikoek onartutako dokumentu bat sinatu zuten (CEIC 11/51 eta CEIC 18/37).

Giza pazienteen biopsiekin *tissue microarray*-ak (TMA) egin ziren, lagin ezberdinen arteko analisi konparatiboa egin ahal izateke. Modu honetan, PCSK9ren adierazpena eta lokalizazioa aztertu zen minbizi ehun eta estadio desberdinetan. Zehazki, paziente hauen tumore primario eta gibelesko metastasiak aztertu ziren. Guztira, 24 pazienteen laginak aztertu ziren, bakoitzaren tumore primario eta gibelesko metastasi biopsien bi erreplika erabiliz. 24 paziente hauetatik 7-k minbizia I-II. estadioan zuten lehenengo lagina eskuratzerakoan, beste 7-k III. estadioan eta, azkenik 10-ek IV. estadioan. Aipatzekoa da pazienteen erdia emakumezkoak eta beste erdia gizonezkoak zirela.

4.2. Immunofluoreszentzia saioak

Pazienteen biopsiak biltzen dituen TMAekin immunofluoreszentzia saioak burutu ziren, PCSK9 eta minbizi ama zelulen (CSC, *Cancer Stem Cells*) markatzailea den CD133ren lokalizazioa eta adierazpena ehun hauetan aztertzeke helburuz. Horretarako, aurretiaz prestatutako TMAen desparafinazioa burutu zen eta 98°C-tan inkubatu ziren *antigen retrieval* (zitrato indargetzailea 0,1 M (pH6)) soluzioarekin 20 minutuz. Gero, ur destilatuarekin garbitu eta gune ez-espezifikoen blokeoa burutu zen ahuntz serumarekin 10 minutuz inkubatu. PBS (*phosphate-buffered saline*) bidezko garbiketarako burutu ostean, TMAk PBS, % 5 BSA (*bovine serum albumin*) eta % 0,1 Triton X-100 soluzioan diluitutako ahuntz anti-PCSK9 (5 µg/mL, ab28770 Abcam) eta untxi anti-CD133 (10 µg/mL, ab19898 Abcam) antigorputz primarioekin inkubatu ziren gauean zehar 4°C-tara. TMAk PBSz garbitu ziren hiru aldiz, eta PBS, % 5 BSA eta % 0,1 Triton X-100 nahastean diluitutako eta fluoreszentziaz markatutako asto anti-ahuntz

(4 µg/mL, A32814 Invitrogen) eta asto anti-untxi (4 µg/mL, A21206 Invitrogen) antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren ordubetez giro tenperaturan. DNA markatzeko DAPI (10,9 µM, D3571 Invitrogen) erabili zen. PBS bidez garbiketak egin ostean, TMAen muntaia burutu zen Fluoromount-G (0100-01, SouthernBiotech) erabiliz. Azkenik, laginak fluoreszentzia mikroskopio konfokalean (Zeiss Apotome) behatu ziren eta AxioCam 506 mono ER5c kamera erabili zen argazkiak ateratzeko.

4.3. Argazkien prozesamendua

Giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsien TMAen immunofluoreszentzia saioaren emaitzen argazkiak Fiji (Image J) argazki prozesamendu programarekin tratatu ziren. Emaitzen analisia modu kualitatibo zein kuantitatiboan egin ahal izateko, Fiji programaren bidez PCK9 eta CD133 markatzaileen adierazpena eta lokalizazioa aztertu zen lagin desberdinetan. Horretarako, markatzaile ezberdinen seinalea kuantifikatu zen, fluoroforo gorriaren (PCSK9ren seinalea) eta berdearen (CD133) azalera neurtuz. Horrez gain, bi markatzaileen (PCSK9 eta CD133) kolokalizatutako azalera kuantifikatu zen, kolore horiaren azalera neurtuz.

4.4. Analisi estatistikoa

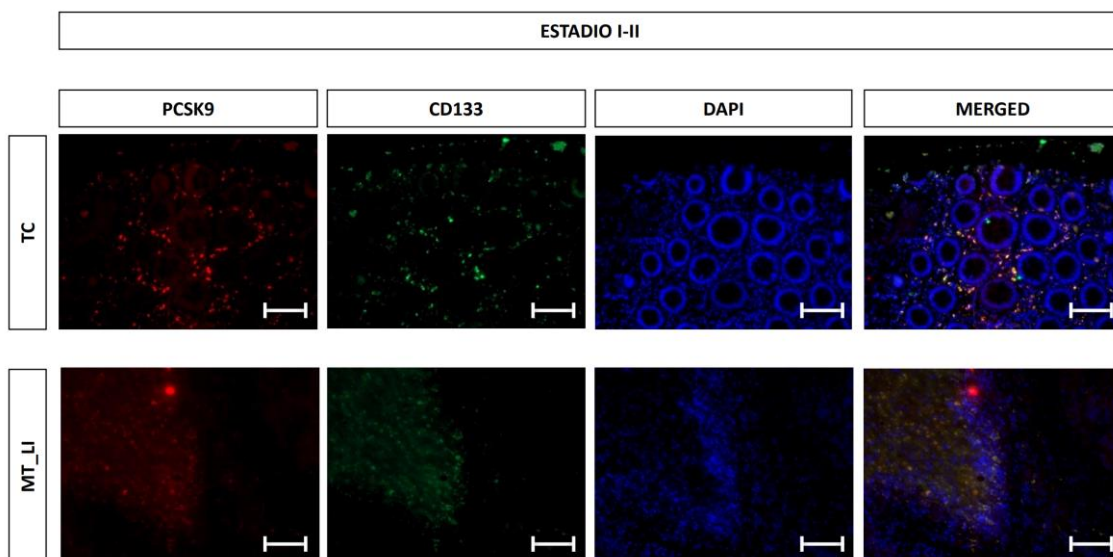
Datu kuantitatiboak Microsoft Excel programarekin tratatu ziren. Lortutako balioak batez besteko \pm desbideratze estandar gisa adierazi ziren. Alderaketa estatistikoak burutzeko Student-en t-testa erabili zen, non $p < 0,05$ balioak estatistikoki adierazgarritzat hartu ziren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,025$ eta *** $p < 0,001$ izanik).

5. EMAITZAK

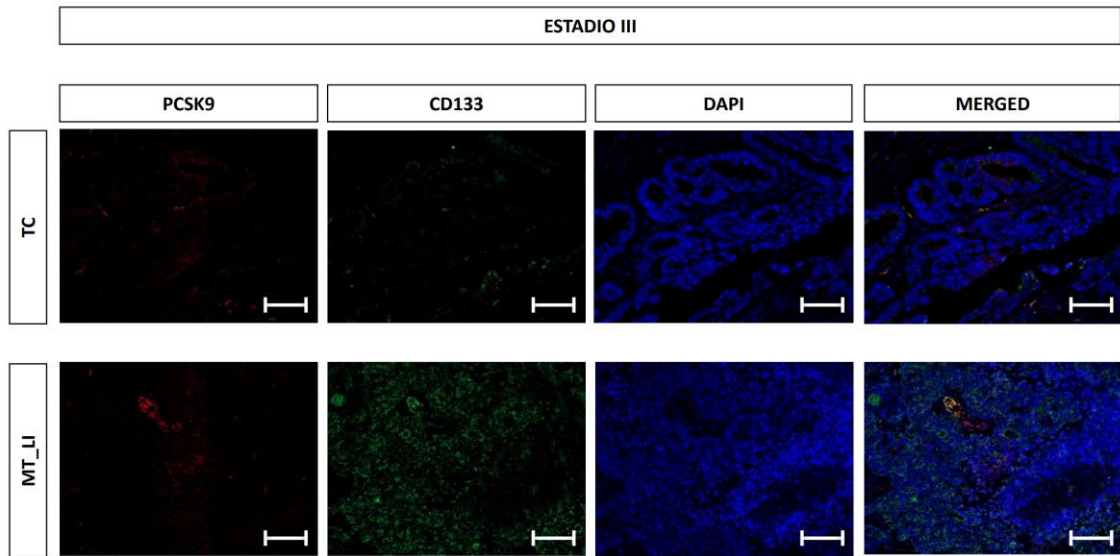
5.1. PCSK9 eta CD133k kolokalizazioa erakusten dute giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsietan

PCSK9k kolon eta ondesteko minbizian eduki dezaken inplikazioa aztertze helburuz, proteina honen adierazpena eta lokalizazioa aztertu zen giza pazienteen tumore primario zein gibekeko metastasi biopsietan. Horretarako, aipatutako minbizi ehunen laginak biltzen zituen TMAekin immunofluoreszentzia saioak burutu ziren, PCSK9 eta minbizi ama zelulen (CSC, *Cancer Stem Cells*) markatzailea den CD133ren lokalizazioa aztertze. Immunofluoreszentzia saioaren emaitzen irudiek agerian utzi zuten PCSK9 giza pazienteen tumoreetan adierazten zela, are gehiago, PCSK9 eta CSCen CD133 markatzailea kolokalizatu egiten zirela (1., 2. eta 3. irudiak).

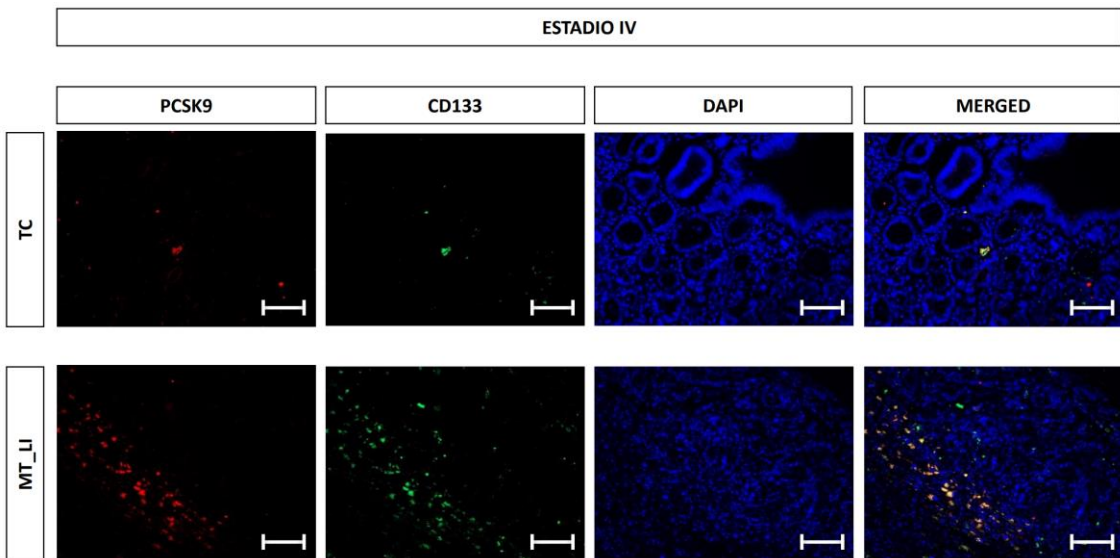
Bi markatzaileen kolokalizazioa modu kualitatiboan aztertzeaz gain, datuen analisi kuantitatiboa ere egin zen. Horretarako PCSK9 eta CD133ren adierazpena eta kolokalizazioa kuantifikatu zen, haien fluoreszentiaren seinalearen azalera neurtuz Fiji (Image J) argazki prozesamendu programa erabiliz. Lortutako datuekin, PCSK9rekin kolokalizatutako CSCen portzentajea kalkulatu zen. Emaitzen arabera, CD133 markatzailea adierazten duten CSCen %24,77-a PCSK9rekin kolokalizatuak daude. Datuek, beraz, baieztatzen dute argazkietan behatutakoa, hots PCSK9 eta CD133 kolokalizatu egiten direla giza pazienteen minbizi biopsietan. Kolokalizazioa berdinki behatu zen estadio bat zein besteetan, kolokalizatutako CSCen portzentajea %35,91-a izan zelarik I-II. estadioko laginetan, %13,99 II. estadioan eta %24,51 IV. estadioan.



1. irudia: PCSK9 eta CD133ren lokalizazioa I-II. estadiotako tumore primario (TC) eta gibelesko metastasietan (Mt_Li). Bi markatzaileen adierazpena behatu daiteke bi minbizi ehunetan; PCSK9 fluoroforo gorriz, CD133 berdez eta DNA urdinez markatu direlarik. Kolore horiak kolokalizazioa adierazten du. Irudiek PCSK9 eta CSCen markatzailea den CD133 kolokalizatu egiten direla erakusten dute kolon eta ondesteko tumoreetan, bai tumore primario bai gibelesko metastasi ehunean. Eskala-barra 50µm-koa da.



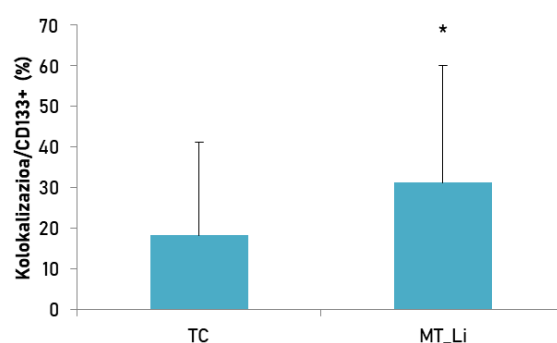
2. irudia: PCSK9 eta CD133ren lokalizazioa III. estadiotako tumore primario (TC) eta gibelesko metastasietan (Mt_Li). Irudiek bi markatzaileen adierazpena erakusten dute non PCSK9 fluoroforo gorritz, CD133 berdez eta DNA urdinez markatu diren. Kolore horiak kolokalizazioa adierazten du. Irudiek PCSK9 eta CSCen markatzailea den CD133 kolokalizatu egiten direla erakusten dute kolon eta ondesteko tumoreetan, bai tumore primario bai gibelesko metastasi ehunean. Eskala-barra 50µm-koa da.



3. irudia: PCSK9 eta CD133ren lokalizazioa VI. estadiotako tumore primario (TC) eta gibelesko metastasietan (Mt_Li). Irudiek bi markatzaileen adierazpena erakusten dute non PCSK9 fluoroforo gorritz, CD133 berdez eta DNA urdinez markatu diren. Kolore horiak kolokalizazioa adierazten du. Irudiek PCSK9 eta CSCen markatzailea den CD133 kolokalizatu egiten direla erakusten dute kolon eta ondesteko tumoreetan, bai tumore primario bai gibelesko metastasi ehunean. Eskala-barra 50µm-koa da.

5.2. PCSK9 eta CD133ren kolokalizazio portzentajea altuagoa da gibelesko metastasian tumore primarioan baino

PCSK9k kolon eta ondesteko minbizi biopsietan duen adierazpena eta lokalizazioaren azterketarekin jarraitzeko, proteina honen adierazpena aztertu zen minbizi ehun desberdinetan, alegia tumore primario eta gibelesko metastasian. Horretarako, immunofluoreszentzia saioetan kolokalizatutako CSCen portzentajea kalkulatu zen bi lagin mota hauetan, estadio desberdinetan. Emaitzek aditzera eman zuten PCSK9 adierazten duten CSC gehiago zegoela, hots, PCSK9 eta CD133 markatzaileen kolokalizazioa altuagoa zegoela gibelesko metastasian (%31,3) tumore primarioan (%18,3) baino (4. irudia). Bi emaitzen arteko alderaketa estatistikoa burutzeko Student-en t-testa burutu zen, emaitza adierazgarritzat har zitekeelarik ($p < 0,05$).



4. irudia: PCSK9rekin kolokalizatuak dauden CSCen (CD133⁺) portzentajea giza pazienteen tumore primario (TC) eta gibelesko metastasietan (MT_Li). Kolokalizazio portzentajea adierazgarriki altuagoa da gibelesko metastasietan, tumore primarioarekin alderatuta. Lortutako datuak paziente guztien laginen batez bestekoa adierazten dute, haien desbideratze estandarrarekin. Datuak Student-en t-test probarekin tratatu dira non * $p < 0,05$, ** $p < 0,025$ eta *** $p < 0,001$ diren.

6. EZTABAIDA

Kolon eta ondesteko minbizia hirugarren minbizi ohikoenetarikoa da eta, mundu mailan, osasunerako arazo larria suposatzen du, izatez minbizia eragindako bigarren heriotza kausa da (The International Agency for Research on Cancer, 2020). Hilkortasun honen atzean tumore errepikariak eta metastasiak daude, zeintzuetan CSCek garrantzi handia duten (Ben-Ze'ev et al., 2016). Egia esan, gaur egungo terapia antitumoralek CSCak ezabatzerakoan huts egiten dute, zelula hauek kimioterapia eta erradioterapiaren aurka garatu dezaketen erresistentzia dela eta (Vincent et al., 2019). Beraz, honako tratamenduok, CSCen aurka egitea

lortzen ez dutenak, ez dute arrakasta handirik kolon eta ondesteko tumoreak ezabatzerako orduan. Honen aurrean, CSCak modu espezifikoan erasoko dituen terapien beharra agerian gelditzen da. Horretarako, itu espezifiko bat bilatu behar da zelula hauetan. Proproteina konbertasak (PC) substratu ugariaren prozesamenduan parte hartzen dute. Prozesaketa gaitasun hau dela eta, minbizian duten erantzukizuna nahiko azertua izan da azken urteetan (Siegfried et al., 2020). Proteina hauen artean PCSK9 aurki dezakegu. PCSK9 eta kolesterolaren arteko erlazioa oso ikasi izan da, dena den, proteina honen eta minbiziaren arteko erlazioa, oraindik, ez dago argi (Mahboobnia et al., 2021). Kolesterol mailak minbiziaren aurrera egitearekin erlazionatuta egon daitekeela ikusirik (Mahboobnia et al., 2021), lan honetan PCSK9 eta CSCen arteko erlazioa ikastea dugu helburu. Horretarako, PCSK9ren adierazpena aztertu da giza pazienteen kolon eta ondesteko minbizi biopsietan, proteina honek minbizian eduki dezakeen inplikazioa ulertu ahal izateko, horretarako immunofluoreszentzia saioak burutuz. Tumore primario zein gibelesko metastasi ehunekin burututako saioek agerian utzi dute PCSK9 kolon eta ondesteko CSCetan adierazten dela, izan ere PCSK9 eta CD133 (CSCen markatzailea) kolokalizatu egiten dira ehun hauetan (1., 2. eta 3. irudiak). PCSK9ren presentziak CSCetan serina proteasa honek kolon eta ondesteko CSCen propietate tumorigenikoetan nolabaiteko eginkizuna izan lezakeela iradoki dezake. Aurretiaz, minbizian zenbait PCen espresioan gorabeherak daudela ikusi izan da, kolon eta ondesteko minbizian barne (Tome et al., 2019); nahiz eta PCek, zehazki, CSCetan eduki dezaketan inplikazioa ez dagoen guztiz argi. Honen inguruan, Gerovska et al.-ek CSC baldintzak imitatzen zituen kolon kartzinoma zelulez osotutako tumorosferen tamaina murrizketa ematen zela adierazi zuten, tumorosferetan PCak inhibitu ondoren. Inhibizioaren ondorioz CSCek euren burua berriztatzeko gaitasuna galtzen zutela ikusi zen. Ikerketak PCen aktibitatea eta metaloproteasen espresioaren arteko erlazioa agerian utzi zuten, PCen aktibitateak CSCen biologia eta mantenuan zereginen bat izan lezakeela iradokiz (Gerovska et al., 2021).

PCek, beraz, CSCetan nolabaiteko papera eduki ahal duten arren, talde honen barruan dagoen PCSK9ren eginkizuna momentuz ez da argitu. Lan honek, nahiz eta PCSK9k kolon eta ondesteko CSCetan duen papera ez aztertu, PCSK9ren lokalizazioa erakusten du kolon eta ondesteko minbizi ehunean (1., 2. eta 3. irudiak), serina proteasa honen eta minbiziaren arteko erlazioaren existentzia iradokiz. Badaude hipotesi hau eusten duten zenbait *in vitro* eta *in vivo* ikerketa, hots PCSK9ren eta minbiziaren arteko erlazio zuzena ezartzen dutenak. Honi buruzko lehen ikerketek PCSK9k propietate anti-apoptotikoak dituela deskribatu zuten. Zaid et al.-ek, hain zuzen, PCSK9 KO saguen hepatozitoen proliferazioa gutxitu eta apoptosia igotzen zela deskribatu zuten. Efektu hau saguari kolesterolean aberatsa zen dieta bat ezarriz arindu zitekeen (Zaid et al., 2008). Bide beretik jarraituz, Sun et al.-ek ere PCSK9ren eragin anti-apoptotikoa deskribatu zuten saguen gibelean; horrez gain PCSK9ren gabeziak melanomaren gibelesko

inbasioaren aurreko babesa eskaintzen zuela proposatu zuten, kolesterol mailarekin erlazionatutako mekanismoak direla medio (Sun et al., 2012). PCSK9k apoptosi eta proliferazioarekin duen lotura aztertuta, serina proteasa hau minbizian gainadierazita dagoela pentsa genezake. Marimuthu et al.-ek PCSK9-ren gainespresioa behatu zuten urdaileko adenokartzinoman. Hemen, PCSK9ren espresioa 13 aldiz handituta zegoen, urdail mukosa osasuntsuarekin alderatuta. Ondorioz, ikerketa honek ondorioztatu zuen PCSK9 zenbait minbizi motetan biomarkatzaile potentziala izan daitekeela (Marimuthu et al., 2013).

Aipatutako saioak, dena den, *in vitro* edota animalia ereduarekin burututako ikerketak dira, izatez, gizakietan PCSK9k minbizian duen eragina frogatzen duten ikerketa gutxi daude. Lan honetan, giza pazienteen biopsiekin lan egin da, PCSK9ren papera zuzenean gizaki CSCetan ikasiz, emaitzek PCSK9 eta CSCen arteko erlazio bat erakutsi dutelarik. Gizakietan aurrera eramandako bi ikerketek aztertu dute, orain arte, LDL-kolesterol murrizketa eragiten duten PCSK9ren polimorfismoak eta minbizi arriskuaren arteko erlazioa, giza pazienteen jarraipena burutuz (Mahboobnia et al., 2021). Hauek minbiziaren agerpena aztertu zuten, haietariko batek 13 urtetan zehar, PCSK9 aldaeren eragina aztertzeko. Azterketa hauek ez zuten aurkitu PCSK9ren funtzio galera eta minbiziaren intzidentzia handiagoaren arteko asoziaziorik (Benn et al., 2011; Folsom et al., 2007).

Ikerketa lan honetan behatu da, CD133 eta PCSK9ren kolokalizazioaz gain, kolokalizazio portzentajea handiagoa dela gibelesko metastasian tumore primarioetan baino (4. irudia). CD133 metastasi eta inbasioarekin erlazionatuta dagoen markatzailea da (Vincent et al., 2019). Ehun metastasikoa osatzen duten CSCek PCSK9 gehiago adierazten dutenez, tumore primarioan daudenekin alderatuta, PCSK9 CSCen metastasiak sortzeko gaitasunarekin lotuta egon daitekeela suposatzen genezake, tumoreak sortzeko gaitasunean lagunduz. PCSK9ren papera aztertuta izan da metastasiak sortzeko gaitasunean. Hain zuzen, Sun et al.-ek melanoma zelulak (B16F1) sagu basati eta PCSK9 KO saguetan txertatu zituzten gibelesko metastasia eragiteko. Ikerketaren emaitzek agerian utzi zuten PCSK9 ez zuten saguetan gibelesko metastasia garatzeko arriskua txikiagoa zela (Sun et al., 2012). Hortaz, PCSK9ren adierazpenak nolabaiteko funtzioa eduki dezake metastasien sorreran, CSCetan.

PCSK9 CSCetan adierazten den peptidoa izanik, eta honek metastasiak sortzeko gaitasunean garrantzitsua eduki dezakeela ikusirik, PCSK9ren aurkako terapiak inplementatu ahaliko lirateke ohiko terapia antitumoralen efizientzia hobetzeko. Gaur egun, badaude PCSK9ren aurkako estrategia terapeutikoak giza erabilerarako. Terapia hauek, zehazki, PCSK9ren aurkako bi antigorputz monoklonal dira, evolocumab eta alirocumab; hauek PCSK9ren maila jaisten duten terapiak dira eta jada gizakion hiperkolesterolemiaren tratamendurako onartuak daude (Mahboobnia et al., 2021). Hori dela eta, PCSK9 itu proteina

interesgarria izan liteke, CSCen aurka egiteko. PCSK9ren inhibizioak minbiziaren tratamenduan duen eragina ere ikertua izan da; Momtazi-Borojeni et al. kolon minbizi animalia ereduak erabili zituzten PCSK9ren inhibizioaren efektua ikertzeko. Saguei anti-PCSK9 txertoa jarriz, animaliek anti-PCSK9 IgG-ak sortzea lortu zuten, PCSK9ren aurkako efektu espezifikoa zutenak. Tratamendua jaso zuten saguek plasmako PCSK9 maila nabarmenki murriztua zutela ikusi zuten. Sagu hauek tumoreak garatzeko arrisku baxuagoa zutela behatu zen eta, tumoreak garatuz gero, tumorearen hazkuntza nabarmenki baxuagoa zen (Momtazi-Borojeni et al., 2019). Beraz, PCSK9ren maila murrizteak tumorearen garapena oztopa dezake. Ikerketa berriago baten, PCSK9ren inhibizioak minbiziaren aurkako immunoterapiaren eragina sustatu egiten duela ikusi da (Liu et al., 2020). Hala ere, badirudi PCSK9k kolesterolarene gainean duen funtzioarekiko independentea den mekanismo baten bidez eragiten duela minbizian, Liu et al.-ek behatutakoaren arabera. Ikertzaile hauek PCSK9ren inhibizioak zelularen gainazaleko MHCI (*major histocompatibility protein class I*) maila handitzen duela ikusi zuten, T zelulek tumoreetan infiltratu eta hauek erasotzea ahalbidetuz. Hortaz, nahiz eta PCSK9 eta minbiziaren arteko harremanaren existentzia argitzen ari den, oraindik PCSK9k minbizian duen eginkizuna momentuz zehazteke dago.

7. ONDORIOA

Tumoreak heterogeneoak dira, hauek osatzen dituzten zelulen artean CSCak ageri dira. Zelula hauek tumorea bere heterogenotasun guztiarekin birsortzeko gaitasuna dute eta, gaur egun, minbiziaren aurkako terapietako erronka handia suposatzen dute, izan ere, zelula hauek ohiko terapietarako erresistentzia erakusten dute. Zelula hauen inguruko ezagutza zabaltzearen helburuarekin, lan honek PCSK9ren adierazpena aztertu du CSCetan. Emaitzek PCSK9 CSCetan adierazten dela erakutsi dute, serina proteasa honen eta minbizi ama zelulen arteko korrelazioa iradokiz. Horrez gain, PCSK9 gibeletako metastasietako CSCetan gehiago adierazten dela erakutsi dugu. Hau dela eta, PCSK9k tumoreen hedapen eta inbasioan nolabaiteko papera eduki dezakeela pentsa liteke. Hau horrela balitz, ohiko minbiziaren aurkako tratamenduekin batera PCSK9ren aurkako terapiak inplementatzearen aukera baloratu beharko litzateke. Honen abantaila da, gainera, PCSK9ren aurkako antigorputz monoklonalak jada erabiliak direla giza pazienteengan hiperkolesterolemiaren tratamendurako. Dena den, PCSK9k CSCetan duen eginkizun zehatza ikertzeke dago, baita peptido honen kontrako terapia espezifikoek CSCak modu zehatzean ezabatzen lagunduko luketen ere.

8. BIBLIOGRAFIA

- Asociación Española Contra el Cáncer. (2018). *Dimensiones del cáncer*. AECC Observatorio. <https://observatorio.aecc.es/>
- Barzegar Behrooz, A., Syahir, A., & Ahmad, S. (2019). CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *Journal of Drug Targeting*, 27(3), 257–269. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1479756>
- Ben-Ze'ev, A., Basu, S., & Haase, G. (2016). Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. *F1000Research*, 5(0), 1–10. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7579.1>
- Benn, M., Tybjærg-Hansen, A., Stender, S., Frikke-Schmidt, R., & Nordestgaard, B. G. (2011). Low-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer: A mendelian randomization study. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(6), 508–519. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr008>
- Folsom, A. R., Peacock, J. M., & Boerwinkle, E. (2007). Sequence variation in proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease gene, low LDL cholesterol, and cancer incidence. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16(11), 2455–2458. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0502>
- Gerovska, D., García-Gallastegi, P., Descarpentrie, J., Crende, O., Casado-Andrés, M., Martín, A., Eguía, J., Khatib, A. M., Araúzo-Bravo, M. J., & Badiola, I. (2021). Proprotein convertases blockage up-regulates specifically metallothioneins coding genes in human colon cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(3), Article 118912. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118912>
- Hirata, A., Hatano, Y., Niwa, M., Hara, A., & Tomita, H. (2019). Heterogeneity of colon cancer stem cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1139, 115–126. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_7
- Klein-Szanto, A. J., & Bassi, D. E. (2017). Proprotein convertase inhibition: Paralyzing the cell's master switches. *Biochemical Pharmacology*, 140, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.027>
- Kozovska, Z., Gabrisova, V., & Kucerova, L. (2014). Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 68(8), 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.019>

- Lambert, G., Sjouke, B., Choque, B., Kastelein, J. J. P., & Hovingh, G. K. (2012). The PCSK9 decade. *Journal of Lipid Research*, 53(12), 2515–2524. <https://doi.org/10.1194/jlr.R026658>
- Liu, X., Bao, X., Hu, M., Chang, H., Jiao, M., Cheng, J., Xie, L., Huang, Q., Li, F., & Li, C. Y. (2020). Inhibition of PCSK9 potentiates immune checkpoint therapy for cancer. *Nature*, 588(7839), 693–698. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2911-7>
- Mahboobnia, K., Pirro, M., Marini, E., Grignani, F., Bezsonov, E. E., Jamialahmadi, T., & Sahebkar, A. (2021). PCSK9 and cancer: Rethinking the link. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140, Article 111758. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111758>
- Marimuthu, A., Subbannayya, Y., Sahasrabudde, N. A., Balakrishnan, L., Syed, N., Sekhar, N. R., Katte, T. V., Pinto, S. M., Srikanth, S. M., Kumar, P., Pawar, H., Kashyap, M. K., Maharudraiah, J., Ashktorab, H., Smoot, D. T., Ramaswamy, G., Kumar, R. V., Cheng, Y., Meltzer, S. J., ... Pandey, A. (2013). SILAC-based quantitative proteomic analysis of gastric cancer secretome. *Proteomics - Clinical Applications*, 7(5–6), 355–366. <https://doi.org/10.1002/prca.201200069>
- Massard, C., Deutsch, E., & Soria, J. C. (2006). Tumour stem cell-targeted treatment: Elimination or differentiation. *Annals of Oncology*, 17(11), 1620–1624. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl074>
- Melendez, Q. M., Krishnaji, S. T., Wooten, C. J., & Lopez, D. (2017). Hypercholesterolemia: The role of PCSK9. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 625–626, 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.001>
- Momtazi-Borojeni, A. A., Nik, M. E., Jaafari, M. R., Banach, M., & Sahebkar, A. (2019). Potential anti-tumor effect of a nanoliposomal antiPCSK9 vaccine in mice bearing colorectal cancer. *Archives of Medical Science*, 15(3), 559–569. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.84732>
- Nassar, D., & Blanpain, C. (2016). Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11, 47–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438>
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature05384>
- Saunders, M., & Iveson, T. (2006). Management of advanced colorectal cancer: State of the art.

British Journal of Cancer, 95(2), 131–138. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603233>

- Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Bélanger Jasmin, S., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., & Chrétien, M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 928–933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335507100>
- Siegfried, G., Descarpentrie, J., Evrard, S., & Khatib, A. M. (2020). Proprotein convertases: Key players in inflammation-related malignancies and metastasis. *Cancer Letters*, 473, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.027>
- Sun, X., Essalmani, R., Day, R., Khatib, A. M., Seidah, N. G., & Prat, A. (2012). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia (United States)*, 14(12), 1122–1131. <https://doi.org/10.1593/neo.121252>
- The International Agency for Research on Cancer. (December 2020). *Cancer today*. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
- Tome, M., Pappalardo, A., Soulet, F., Lopez, J. J., Olaizola, J., Leger, Y., Dubreuil, M., Mouchard, A., Fessart, D., Delom, F. eric, Pitard, V., Bechade, D., Fonck, M., Rosado, J. A., Ghiringhelli, F., Dechanet-Merville, J., Soubeyran, I., Siegfried, G., Evrard, S., & Khatib, A. M. (2019). Inactivation of proprotein convertases in T cells inhibits PD-1 expression and creates a favorable immune microenvironment in colorectal cancer. *Cancer Research*, 79(19), 5008–5021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0086>
- Vincent, A., Ouelkdite-Oumouchal, A., Souidi, M., Leclerc, J., Neve, B., & Van Seuning, I. (2019). Colon cancer stemness as a reversible epigenetic state: Implications for anticancer therapies. *World Journal of Stem Cells*, 11(11), 920–936. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i11.920>
- Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Hamelin, J., Tremblay, M., Jacques, H., Jin, W., Davignon, J., Seidah, N. G., & Prat, A. (2008). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*, 48(2), 646–654. <https://doi.org/10.1002/hep.22354>