



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Gibeleko endotelioaren
konbertasen eginkizuna gibelesko
metastasian**

*Ander Martin San Sebastian
eta Patricia Garcia-Gallastegui*

123-128 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.15>



Gibeleko endotelioaren konbertasen eginkizuna gibelesko metastasian

Martin-San Sebastian, A.¹, García-Gallastegui, P.¹

¹Zelulen Biologia eta Histologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, UPV/EHU

ander.martinss@ehu.eus

Laburpena

Konbertasen eginkizuna tumoreen garapenean sarritan ikertu da eta tumore-zeluletan horien adierazpen-mailan gertatutako aldaketak deskribatu dira. Artikulu honetan, konbertasen garrantzia minbizian ikertzen dugun arren, ikertzen dugun zelula ez da minbizi zelula. Konbertasen adierazpena tumorearen mikroingurunean aztertzen dugu gibelesko sinusoideko zelula endotelialtan konbertasen adierazpena ikertuz. Modu honetan, gibel sinusoideko zelula endotelialen konbertasen adierazpenean gertatutako aldaketak aztertu ditugu, SW620ekin (koloneko tumore-zelula metastatikoak) zein CSC-SW620ekin (koloneko tumore-zelula ama metastatikoak) kontaktuan jartzerakoan. Hala, mRNA mailan, zelula endotelial hepatikoen konbertasen adierazpenean aldaketak ikusten dira, eta bereziki interesgarriak dira *PCSK9* eta *PACE4*-n gertatutako aldaketak.

Hitz gakoak: Konbertasak, Gibeleko Endotelioa, Gibeleko Metastasia, Mikroingurune tumoral

Abstract

*The role of convertases in tumor development has often been investigated and changes in the expression level of convertases in tumor cells have been described. In this article, although we investigate the importance of convertases in cancer, the cell we investigate is not the cancer cell. We studied the expression of convertases in the tumor microenvironment by investigating their expression in hepatic sinusoid endothelial cells. Thus, we have analyzed the changes produced in the expression of convertases in hepatic sinusoid endothelial cells upon contact with both SW620 (metastatic colon tumor cells) and CSC-SW620 (metastatic colon stem cells). Thus, at the mRNA level, changes in the expression of hepatic endothelial cell convertases are observed, with changes in *PCSK9* and *PACE4* being of particular interest.*

Keywords: Convertases, Hepatic endothelium, Hepatic metastasis, Tumor microenvironment

1. Sarrera eta motibazioa

Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) 19,3 milioi minbizi kasu zenbatu zituen 2020an mundu mailan eta, eragin handiena dutenak kontuan hartuz, koloneko minbizia hirugarren postuan kokatu zuen (1,9 milioi kasu). Minbizia zelularen barne mekanismoen deserregulazioak ezaugarritzen duen gaixotasuna da eta horrek kontrolik gabeko zelulen ugalketa eragiten du. Fenomeno hori edozein organotan gerta daiteke eta bereziki kaltegarria izango da bizi-organoren batean gertatzen bada. Gainera, aipatu beharra dago minbiziaren arriskurik handiena metastasi-prozesua dela, gaixotasun horren ondoriozko heriotza-kausa nagusitzat hartzen baita. Horregatik, prozesu metastasikoa nola gertatzen den ikertzeak garrantzi handia dauka prozesu hau ekiditeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Metastasia, tumore zelulak beste organo eta ehun batzuetara hedatzean sortzen den prozesu bat da, gaixotasunaren hedapena eraginez. Fenomeno hori hainbat faktorek eragiten dute, besteak beste, kontrolik gabeko zelulen ugalketa eta tumore-zelulek matrizearen beharrik gabe ugaltzeko gaitasuna bereganatzea. Zelula osasuntsu gehienek azalera solido bat behar dute behar bezala hazi ahal izateko eta, horrelakorik ez dagoenean, apoptosi fenomeno bat gertatzen da. Gertakari hori defentsa-mekanismo bat da, zelulek organo batetik beste batera kontrolik gabe migratzea eragozten duena. Minbizi-zelulek matrize solidorik behar ez dutenez, defentsa-mekanismo hori saihestea lortzen dute. Horregatik, minbizi-zelula batzuk gai dira tumore primario lokalizatutik abiatuta hainbat leku kolonizatzeke (Becker et al., 2007). Tumore-zelulak, gainera, zirkulazio-sistematik irten eta beste ehunetan infiltratzeko gai dira. Horretarako, seinalizazio parakrinoa martxan jartzen dute eta metaloproteasa moduko entzimak sortzeko gaitasuna garatzen dute. Entzima horiek zelulaz kanpoko matrizea degradatzeko gai dira eta tumore-zelula ehun berrira sartzea ahalbidetzen dute (Massagué eta Obenauf, 2016).

Estatu Batuetako Minbiziaren Institutu Nazionalak adierazten duenez, beste organo eta ehun batzuen kolonizazioaren fenomenoak ez da ausaz gertatzen, minbizi mota bakoitzak organo espezifiko batera migratzen baitu. Gibela hainbat funtzio dituen bizi-organoa da, besteak beste, odolaren desintoxikazioa. Eginkizun hori bete ahal izateko, beharrezkoa da irrigazio handia izatea, odol bolumen handia igaro ahal izateko bertatik. Horren ondorioz, hainbat metastasik gibela kolonizatzeke joera dute; izan ere, zirkulazio-sistemaren bidez migratzen duten zelula metastasikoak gibeletik igaro beharko dira, eta gibelean ainguratuta gera daitezke (Van den Eynden et al., 2013).

Koloneko minbiziaren kasuan, gaixoen %50ak gibeletiko metastasia garatzen du gaixotasunean zehar. Horrek lotura estua erakusten du koloneko minbiziaren eta gibeletiko metastasiaren garapenaren artean, lehentasun metastatiko argia erakutsiz (Vatandoust et al., 2015).

Metastasi prozesuan tumore-zelula metastatikoek eta zelula endotelialek harreman estua ezartzen dute. Tumore-zelula metastatikoek, kolonizatuko duten organora iristean, seinale parakrinoak eta justakrinoak bidaltzen dituzte haien artean. Harreman horien ondorioz, aldaketak ezartzen dira faktore protumoralen adierazpenean (Maishi eta Hida, 2017).

Tumore zeluletan aztertutako aldaketetako bat proproteina konbertasetan gertatzen dena da. Molekula hauek lotura peptidikoak hidrolizatzeaz arduratzen diren entzima serina proteasak dira, horietako bakoitza ebaketa-puntu ezberdin baterako espezifikoa delarik (Bontemps et al., 2006). Batzuetan zelulak ez ditu proteinak bere egoera aktiboan sortzen, proproteina egoeran baizik eta aktibatzeke, dagokion konbertasak, polipeptidoaren C mutur terminala moztu beharko du. Hori da PC5 konbertasaren kasuan gertatzen dena, integrinen zenbait alfa-azpiunitaterekin elkarreraginean aritzen denean. Integrinak oso molekula garrantzitsuak dira migrazio zelularrean eta, ondorioz, baita metastasian ere. Horrek guztiak lotura zuzena erakusten du zelularen migrazio ahalmenaren eta konbertasen ekintzaren artean. Hala ere, hori ez da kasu bakarra. Izan ere, furina bezalako konbertasek metaloproteasen aktibazioan ere eragiten dute. Aipatu moduan, metaloproteasak zelulaz kanpoko matrizea degradatzeaz arduratzen diren entzimak dira. Beraz,

konbertasa horiek ere, tumore-zelulen infiltrazioa ahalbidetzen dute ehun berrietan (Khatib et al., 2002).

Metastasian, aipatutako funtzioa izateaz gain, konbertasek funtsezko eginkizuna dute tumore-prozesuen angiogenesisian ere, migrazio zelularri eragiten dioten faktoreak erregulatuz. Tumorea garatzea ahalbidetzen duten odol-hodiak sortzea ezinbesteko urratsa da tumorea sortzeko. Horren harira, furina moduko konbertasa batzuk, zenbait lotura peptidiko hautsiz, VEGF heldugabea heltzeko gai direla frogatu da (Siegfried et al., 2003). VEGF hazkuntza-faktorea da, zelula endotelialek odol-hodiak sortzea eragiten duena, hau da, angiogenesisia sustatzen duena.

Konbertasek zelula mota desberdinetan duten inplikazioa sakon aztertu bada ere, ez dakigu nola adierazten diren prozesu metastasikoan gibel sinusoideko zelula endotelialen mailan.

Horregatik, lan honetan honako hipotesi hau planteatzen dugu: gibel sinusoideko zelula endotelialak koloneko tumore-zelula eta tumore-zelula amek jariatutako faktore disolbagarriekin kontaktuan jartzean, zelula endotelialen proproteina konbertasen adierazpenean aldaketak gertatuko dira

Lehen aipatutako hipotesi hori egiaztatzeko, honako helburu hauek bete nahi dira:

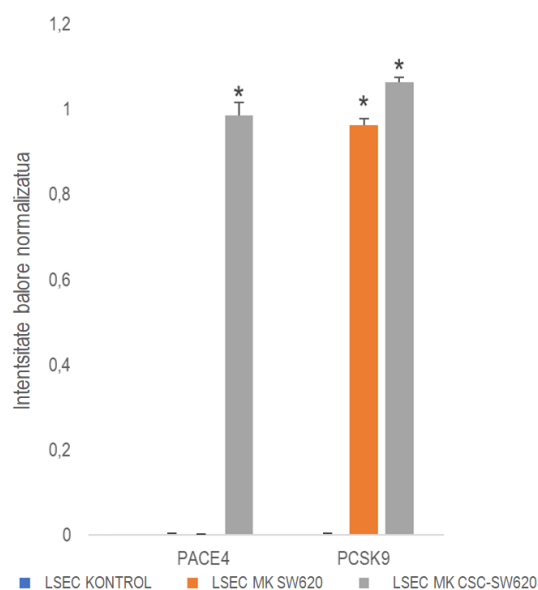
- *In vitro* eredu bat sortzea gibel sinusoideko zelula endotelialen portaera aztertzeko tumore-zelulen eta koloneko tumore-zelula ama metastatikoek eraginpean.
- Gibel sinusoideko zelula endotelialen mRNA erauzteak, tumore-zelulek eta koloneko tumore-zelula ama metastatikoek jariatutako faktore disolbagarrien eraginpean.
- Gibel sinusoideko zelula endotelialeko proproteinen konbertasen transkripzioaren azterketa konparatiboa egitea, adierazitako baldintzetan.

3. Ikerketaren muina

Lehenik eta behin, aztertutako 3 zelula-lerroak hazi ziren: gibel sinusoideko zelula endotelialak (*liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC), koloneko tumore-zelula metastasikoak (SW620) eta koloneko tumore-zelula metastasikoak (CSC-SW620). Gibeletako metastasiaren *in vitro* ereduak egiteko, minbizi zelulekin baldintzatutako medioak lortu ziren. Medio hauek zelulak aberastu gabeko medioan 24 orduz haziz lortu ziren. Lortu ondoren, 24 orduz hazi ziren LSECak medio horiekin, eta zelulak bildu ziren mRNA erauzteko. Behin mRNA lortuta, alderantzizko transkripzioa burutu zen cDNA lortzeko.

Orduan, PCR arrunt bat egin zen, zeinetan *PACE4* eta *PCSK9* konbertasen adierazpenean gertatutako aldaketak aztertu ziren. Entzima horien adierazpen erlatiboa kalkulatzeko aktina erabili zen kontrol gisa. Elektroforesia egin ondoren, emaitzak Fiji bidez aztertu ziren 5 intentsitate-neurketa eginez, eta 1. irudiko grafikoa lortu zen. Grafiko horretan, 5 neurketen batezbestekoa irudikatu zen eta “*” ikurrak kontrolarekiko aldaketa estatistikoki adierazgarria zela esan nahi du.

1. irudia. Konbertasen adierazpen aldaketak LSECetan medio desberdinekin



Behatu zenez, *PACE4* eta *PCSK9* konbertasen arteko aldaketak esanguratsuak dira.

PACE4 konbertasa ez da adierazten LSEC kontroletan, ez eta SW620 baldintzatutako medioarekin tratatutakoetan ere. Aldiz, CSC-SW620en medio baldintzatuarekin tratatzen direnean, LSECek konbertasa hori adierazten dute. *PACE4* konbertasa honen adierazpena areagotuta egotea ez da batere arraroa, tumoreen agresibitatearen adierazlea baita.

Konbertasa honen jarduera nagusietako bat MMP-11 edo Str-3 gisako metaloproteasak heltzea da. Entzima horiek tumore prozesuetan agertzen dira behin eta berriz, zelulaz kanpoko matrizea degradatzeko gai baitira. Bere ekintzari esker tumore-zelulak mugitu egin daitezke, ehun berriak kolonizatu daitezkeelarik. Beraz, *PACE4*ren adierazpen altuaren arrazoa izan daiteke, *PACE4*ren adierazpena handituz gero, metaloproteasa helduen kopurua handitzen dela. Horrela, LSECek migratu eta angiogenesi prozesuan parte har lezakete, zelulaz kanpoko matrizea degradatuta egongo bailitzateke metaloproteasen ondorioz (Bassi et al., 2000).

Bestalde, PCSK9 konbertasa odoleko LDL kolesterolaren hartzailearen erregulazioaren arduraduna da. Konbertasa honek LDL kolesterolaren hartzailearengan eragiten du. Zelularen gainazalarekin garatzen duen loturaren bidez, LDL kolesterolaren hartzailea barneratzea eta degradatzea eragiten du, horrela odoleko LDL kolesterola handitzea eraginez, zelulek ezin baitute barneratu. Odoleko LDL kolesterol-maila altua metastasi hepatikoarekin lotu izan da (Sun et al. 2012).

LDL motako kolesterolaren eta metastasiaren arteko erlazioa, molekula honek, koloneko tumore-zeluletan aldaketa ugari eragitearekin lotuta dago. Horrela, seinaleztapen-bideak ugaritzen dira, hala nola MAPK, eta horrek zelula-zikloaren deserregulazioa eragiten du, kontrolik gabeko ugaritzea gertatzen da eta tumorearen eraketan eragiten du (Wang et al., 2017). Gainera, oxigenoaren espezie erreaktiboen (ROS) pilaketa areagotzea ere eragiten du koloneko kartzinometan. ROSe hantura prozesua eragiten dute, eta horrek tumorearen garapena errazten du. Azpimarratzekoa da, bereziki koloneko tumoreetatik eratorritako gibleko metastasian, odoleko LDL kolesterol-maila handiak daudela (Wang et al., 2017).

Ikertutako LSECetan *PCSK9* adierazpen-mailak aztertuz gero, adierazpen hori nulua dela ikusten da, baina, aitzitik, LSECak SW620en ingurune baldintzatuarekin tratatzean, adierazpena agertzen da. *PCSK9*ren adierazpen-maila are gehiago handitzen da CSC-SW620en ingurune baldintzatuarekin tratatzean. Emaiza horiek bat datoz aurretik egindako ikerketa lanekin. Izan ere, koloneko tumore-zelulak gibel sinusoideko zelula epitelialekin kontaktuan jartzean, azken hauek *PCSK9*ren adierazpena handitzen dute, eta, beraz, odoleko LDL kolesterolaren mailak handitzen dira zeharka. LDL kolesterolaren handitze horrek aurretik aipatutako ondorioak izango ditu, eta tumorearen garapena erraztuko du.

4. Ondorioak

Lan honetan, erlazio zuzena ikusten da tumore-zelulen eta LSEC-en arteko interakzioaren eta konbertasen adierazpenaren aldaketaren artean. Tumore-zelulek (SW620 edo CSC-SW620) disolbagarriak diren faktoreak jariatzeak PACE4 eta *PCSK9* entzimak aldatzea eragiten du.

Badirudi entzima horiek minbizia tratatzeko diana terapeutiko posible bat direla. Izan ere, hauek inhibituz gero, *a priori*, deserregulazio zelularren prozesua geldiarazi liteke, edo minbiziaren agresibitatea murriztu, metaloproteasa helduen kopurua murriztuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako ondorioez ziur egon ahal izateko, beharrezkoa da eremu horren inguruko ikerketekin jarraitzea. Izan ere, konbertasa horiek funtzio ugari dituztenez, hauen inhibizio osoak edo partzialak nahi gabeko ondorioak ekarri ahalko lituzke. Horregatik, beharrezkoa da mRNA mailako aldaketa horiek proteina mailan ere gertatzen diren aztertzea, bai eta bi entzima horien inhibitzaile espezifikoak garatzeko aukera dagoen ere. Horrela, ikerketa bide berri bat irekitzen da, non fokua ez da jartzen tumore-zelulen konbertasetan, baizik eta tumorearen mikroingurunean, gure kasuan, gibeledko zelula endotelialean.

6. Erreferentziak

- Bassi, D.E., Mahloggi, H., Klein-Szanto, A.J.P. (2000). The Proprotein Convertases Furin and PACE4 Play a Significant Role in Tumor Progression. *Mol. Carcinog.* 28: 63-69
- Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., Hardin, J. (2007). *El Mundo de la Célula*, 6. ed. Pearson Educación, Madril.
- Bontemps, Y., Scamuffa, N., Calvo, F., Khatib, A.M. (2007). Potential Opportunity in the development of New Therapeutic Agents Based on Endogenous and Exogenous Inhibitors of the Proprotein Convertases. *Med. Res. Rev.* 27: 631–648
- Folkman, J., Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267: 10931-10934.
- Khatib, A.M., Siegfried, G., Chrétien, M., Metakros, P., Seidah, N.G. (2002). Proprotein Convertases in Tumor Progression and Malignancy. *Am. J. Pathol.* 160: 1921-1935
- Maishi, N., Hida, K. (2017) Tumor Endotelial Cells Accelerate Tumor Metastasis. *Cancer Sci.* 108: 1921-1926
- Massagu, J., Obenauf, A. (2016) Metastatic Colonization. *Nature* 529: 298-306
- Posthaus, H., Dubois, C.M., Müller, E. (2002). Novel insights into cadherin processing by subtilisin-like convertases. *FEBS Lett* 536: 203-208
- Scamuffa, N., Siegfried, G., Bontemps, Y., Ma, L., Basak, A., Cherel, G., Calvo, F., Seidah, N.G., Khatib, A.M. (2008). Selective Inhibition of Proprotein Convertases Represses the Metastatic Potential of Human Colorectal Tumor Cells. *J. Clin. Invest.* 118: 352–363
- Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J.A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chrétien, M., Seidah, N.G., Khatib, A.M. (2003). The Secretory Proprotein Convertases Furin, PC5, and PC7 Activate VEGF-C to Induce Tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 111: 1723–1732

- Sun, X., Essalmani, R., Day, R., Khatib, A., Seidah, N.G., Prat, A. (2012). Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Deficiency Reduces Melanoma Metastasis in Liver. *Neoplasia*. 14: 1122–1131
- Van den Eynden, G.G., Majeed, A.W., Illeman, M., Vermeulen, P.B., Bird, N.C., Hoyer-Hansen, G., Eefsen, R.L., Reynolds, R., Brodt, P. (2013). The Multifaceted Role of the Microenvironment in Liver Metastasis: Biology and Clinical Implications. *Cancer Res*. 73: 2031–2043
- Vatandoust, S., Price, T.J., Karapetis, C.S. (2015). Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J. Gastroenterol*. 21: 11767-11776
- Wang, C., Li, P., Xuan, J., Zhu, C., Liu, J., Shan, L., Du, Q., Ren, Y., Ye, J. (2017). Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression via ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation. *Cell Physiol Biochem* 42: 729-742

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Euskal Herriko Unibertsitatea, Bordeleko Unibertsitatea eta Euskampus Fundazioaren arteko lankidetzeta eta laguntzari esker egin da.