



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

Melanomaren biomarkatzaila lipidikoak

*Arantza Perez-Valle, Jone Garate,
Cristina Penas, Roberto Fernández,
Ainara Herraiz, Egoitz Astigarraga,
Gabriel Barreda-Gómez,
Laura Guevara, José Andres
Fernández, Maria Dolores Boyano,
Begoña Ochoa, Aintzane Asumendi
eta Sergio Lage*

139-144 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.19>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



Melanomaren biomarkatzaile lipidikoak

Pérez-Valle Arantza¹, Garate Jone³, Fernández Roberto³, Penas Cristina¹, Lage Sergio¹, Guevara Laura², Herraiz Ainara⁴, Astigarraga Egoitz⁴, Barreda-Gómez Gabriel⁴, Fernández Jose Andrés³, Boyano María Dolores¹, Ochoa Begoña², Asumendi Aintzane¹.

¹Zelulen Biologia eta Histologia saila, ²Fisiologia saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, ³Kimika Fisikoa saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, ⁴IMG Pharma Biotech, Derio

Arantza.perezv@ehu.eus

Laburpena

Lipidoak molekula oso heterogeneoak dira, eta hortaz, horien funtzioak anitzak dira. Izan ere, besteak beste, zelulen biziraupenean, hazkuntzan, euren arteko elkarrekintzetan eta heriotzean ezinbesteko zeregina dute. Funtzio horiek guztiek lotura zuzena dute zelulen gaiztotzearekin; hain zuzen ere, eraldaketa, progresio eta metastasiarekin. Azken urteotan, minbiziaren markatzaile genetikoak, epigenetikoak eta proteikoak ikerkuntzan aurrera pausuak eman diren arren, asko dago aztertzeke oraindik gaixotasun honen lipidomikari buruz. Horregatik, lan honen helburua melanomaren diagnostikoan, iragarpenean eta terapiaren hautaketan lagunduko duten biomarkatzaile lipidikoak aurkitzea da.

Hitz gakoak: minbizia, melanoma, biomarkatzaile, lipidomika

Abstract

Since lipids are very heterogeneous molecules, they perform very distinct functions. For instance, they play a critical role in cell survival, proliferation, cell-interactions and death. All these processes are directly linked to the malignification of the cells, concretely to the transformation, progression and metastasis. Despite the great progression made lately in the research of new genetic, epigenetic and proteomic biomarkers for cancer, there is still a lot to know about the lipidomics of this illness. Therefore, the aim of this study is to find new lipidomic biomarkers which will help in the diagnosis, prognosis and therapy election in melanoma.

Keywords: cancer, melanoma, biomarker, lipidomics

1. Sarrera eta motibazioa

Minbizia, ehun baten zelula normalen hazkuntza anomaloaren ondorioz sortzen da. Zelula hauek kontrol gabe hazten dira, eta sortzen duten masari tumorea deritzo. Gaur egun, minbizia mundu osoan ematen diren heriotzen erdiaren erantzule da. Gaixotasunaren estadio aurreratuetan beste ehun eta organo ezberdin batzuetara ere heda daiteke, azkeneko horien egituraren eta funtzioaren eraginez; horri, metastasia deritzo eta minbiziak sortzen dituen heriotzen %90aren erantzule da.

Melanoma, konkretuki, azalean dauden melanozitoen gaiztotzearen ondorioz sortzen da. Izan ere, 200.000 bat kasu berri diagnostikatzen dira urtero mundu mailan. Minbizi kasu guztien artean %1,5a melanoma da¹, eta larruazaleko minbizien %4a den arren, horiek eragindako heriotzen %80aren erantzule da, 41.000 heriotza urtero mundu osoan², hain zuzen ere. Urteetan zehar melanoma kasuek gora egin duten arren, honen heriotza tasa ez da proportzionalki hazi. Biziraupenaren areagotzea tratamendu antitumoral eraginkorragoen agerpenari eta batez ere, diagnostiko goiztiarrari sor zaizkio (Karagiannis et al., 2015). Arrazoi horregatik,

¹<https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/MELANOMA/Paginas/incidencia.aspx>

²<https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/CANCERPORLOCALIZACION/MELANOMA/Paginas/pronostico.aspx>

biomarkatzaile berrien identifikazioak eta farmako antitumoral berrien garapenak etorkizun zabala izango dute medikuntzaren arlo honetan.

Larruazalean *nevi*-ak ere ager daitezke. Horiek, melanozitoak era anormal batean haztean sortzen diren masak dira. Tumore onberatzat hartzen diren arren, batzuk lesio gaiztoaren aurrekoak izan daitezke; hau da, denborarekin melanoma bat gara dezakete. *Nevi*-ak nahiko ohikoak dira eta normalean ez dute garrantzi klinikorik, baina askotan kendu eta aztertzen dira, melanoma ez direla ziurtatzeko. Lesio gaiztoaren aurrekoak izan daitezkeenez, lan honetan aztertuko dira, melanozito normalak eta melanoma alderatuz.

Azkeneko urteotan biomarkatzaile berriak aurkitu diren arren, melanomaren heterogeneotasuna dela medio, ezin izan dira markatzaile guztiz fidagarriak aurkitu (Gogas et al., 2009). Biomarkatzaileen ikerketa batez ere minbiziaren genetika, epigenetika eta proteomikan oinarrituta burutu da, baina gutxi dakigu gaur egun gaixotasun honen lipidomikari buruz. Hala ere, azkenaldian lipidoek eta haien metabolismoak minbizian duten garrantzia nabarmendu da. Aipatu bezala, melanoma oso heterogeneoa da, beraz, tumorea osatzen duten osagai guztiak aztertzea da gaur egungo joera. Horregatik, lan honetan larruazal normaleko melanozitoen eta melanomaren lipidomika aztertu da, bi horien arteko ezberdintasunak ikertu nahian.

Lipidomika-analisien helburua zelula edo ehun jakin bateko lipido guztien identifikazioa eta kuantifikazioa da. Horrez gain, lipidoek beste lipidoekin, proteinekin zein gene-adierazpenarekin duten erlazioa aztertzen da (Perrotti et al., 2016). Arlo berri hau, 2003an sortu zen eta ordutik etengabe garatzen ari da, gero eta garrantzi handiagoa hartu duelarik ehun normal eta tumoralak sailkatu eta ezberdintzeko (Yang eta Han, 2016).

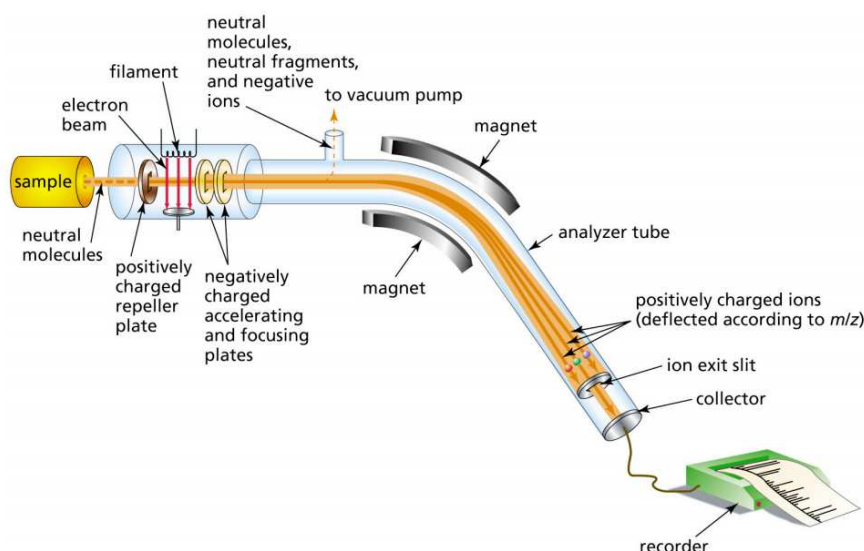
Zelulen lipidoma izugarri konplexua da, lipido mota bakoitzeko espezie ugari baitaude. Esaterako, ugaztun zelula bakar batean 1.500 lipido espezie baino gehiago egon daitezke. Horien artean minbiziarekin lotura duten ezagunenak gantz azidoak, glizerofosfolipidoak, glizerolipidoak, prenolak, sakarolipidoak, esfingolipidoak eta esterolak dira (Perrotti et al., 2016).

Lipidoek, ezinbesteko eginkizunak betetzen dituzte zeluletan. Orokorrean, zelulen mintzetako nahitaezko osagaiak dira eta babes funtzioa burutzen dute, energia kimikoa gorde, zelulen seinaleztapena ahalbidetu, eta ehunetan zelulen arteko elkarrekintzetan parte hartu, besteak beste. Funtzio horiek guztiak kartzinogenesi prozesuarekin estuki lotuta daude, zelulen eraldaketa, progresio eta metastasiarekin, hain zuzen ere. Fosfolipidoek, esaterako, seinaleen transdukzioa, post-transdukzio modifikazioak, homeostasia, zelula-atxikidura, migrazioa, apoptosia, neurotransmisioa, besikulen garraioa eta energia-biltegiak arautzen dituzte (Perrotti et al., 2016).

Lan honen atal bat egiteko, erabili diren zeluletatik zelula-mintzak isolatu dira mikroarraiak egiteko. Horietan, mintzak immobilizatu eta inprimatu dira teknologia berri batez baliatuta. Horrela, mintzen ingurumen lipidikoa mantentzen da, horien egitura eta funtzionalitatea mantenduz. Horrez gain, mikroarrai formatuaren abantailak kontserbatzen dira, hau da, ehunka lagin immobilizatuta porta baten tamainako azalera batean.

Aipaturiko analisiak burutzeko masa-espektrometria erabiltzen da; lipido-molekula bakoitzari masa bat dagokionez, lagin batean lipido ezberdinak identifikatu daitezke. Analisisien lehenengo urratsean laginetako molekulak apurtzen dira ionizazio metodo ezberdinak erabiliz (*ESI-Electrospray ionization*; *MALDI-Matrix-assisted laser desorption/ionization*, besteak beste). Sortzen diren ioiak positiboak edo negatiboak izango dira, molekulen egituraren arabera; beraz, lagin baten molekula guztiak aztertzeko, lagin bakoitzean bi analisi egin behar dira, bat ioi positiboak aztertzeko, eta bestea ioi negatiboak aztertzeko. Jarraian, ioiak laginketa konotik pasatzen dira eta analizatzailerara helduko dira. Bertan, bakoitzaren intentsitatea eta masa molekularra aztertuko da, euren karga/masa erlazioan (m/z) oinarrituz. Azkenik, emaitzak masa espektroetan ematen dira. Hauek, grafika moduan islatzen dira, non piko bakoitza masa jakin bati dagokion, eta piko bakoitzaren tamainak masa jakin horren kantitate erlatiboa adierazten du.

1. Irudia. Masa-espektrometro baten eskema.



2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esan bezala, lipidomika 2003an ezarri zen, beraz zientziaren arlo berri bat da. Duela gutxi arte, biomarkatzaile genetiko zein proteikoetan oinarritu da minbiziaren ikerketa. Aldiz, azkeneko urteotan lipidoek minbiziaren sorreran eta hedakuntzan duten garrantzia frogatu da. Esaterako, lipidoek minbiziarekin duten lotura ikertuz, 2000. urtetik 2012. urtera 13 artikulua baino ez ziren argitaratu; oster, 2012tik gaur egun arte 91 publikatu dira. Melanomaren kasuan konkretuki, artikulua bakarra aurkitu da, beraz, lan honen garrantzia premiazkoa da.

Aipaturikoan oinarrituz, lan honetan planteaturiko helburua hurrengoa izan da:

- Analisi lipidomiko ezberdinak erabiliz, melanomaren biomarkatzaile lipidikoak aurkitzea, ehun normal eta minbizidunak ezberdintzeko gai direnak. Hori, zelula-lerroetan zein biopsietan aztertu da, masa-espektrometria bidezko analisi ezberdinak erabiliz.

3. Ikerketaren muina

Ikerketa hau, zelula-lerroetan eta biopsietan burutu da. Horretarako, zelula-lerro ezberdinak hazi egin dira: pigmentazio ezberdineko 3 melanozito-lerro, nevus biopsietatik isolatutako 9 melanozito-lerro, eta 15 melanoma-lerro. Azken horien artean, tumore primarioetatik isolatutakoak eta metastasi batetik isolatutakoak ezberdintzen dira (1. Taula).

1. Taula. Lan honetan erabilitako lerro zelularren jatorria eta izena.

Melanozitoak	Nevi	Melanoma Primarioak	Melanoma Metastasikoak
HEMn-LP	N1	Mel-Ho	Colo-800
HEMn-MP	N2	A375	RPMI-7951
HEMn-DP	N3	G-361	Hs294t
	N4	Sk-Mel-28	A2058
	N5	Sk-Mel-31	Sk-Mel-3
	N6	ME4405	WM-266-4
	N7		Sk-Mel-2
	N8		HT144
	N9		VMM1

Nevi biopsietatik melanozitoak isolatzeko, digestio mekaniko eta entzimatikoa erabili dira, estroma desagerrarazi eta zelulak soilik lortzeko asmoz. Horien artean, melanozitoak daude, baina baita keratinozitoak eta fibroblastoak ere. Horregatik, kultiboan jarri ondoren purifikatuz joan dira, melanozitoen kultibo puruak izan arte.

Zelula-lerro horiek guztiak kultibatu eta bertatik lipidoak eta mintzak isolatu dira, bi lipidomika analisi ezberdin burutzeko. Alde batetik, lehenengo analisisian, lipidoak isolatzeko Bligh & Dyer isolamendu metodoa erabili da. Horretan kloroformoa, metanola eta ur destilatua erabiltzen dira eta estraktuak zentrifugazio ezberdinak eginez lortzen dira. Jarraian, lipidoma oso konplexua denez eta konposatu ezberdinek masa oso berdintsuak izan dezaketenez, likido kromatografia ultra-azkarra (UHPLC) erabiliz lipido mota ezberdinak bereizten dira. Ondoren, lipidoak QTOF masa-espektrometroan sartzen dira, ionizazio-iturrian sartuz molekulek karga positiboa edo negatiboa hartzen dutelarik. Azkenik, ioi bakoitzari masa bat esleitzen zaio, eta bakoitzaren intentsitatea neurtzen da, lagin horretan duten kontzentrazio erlatiboa jakiteko (Guevara, 2016).

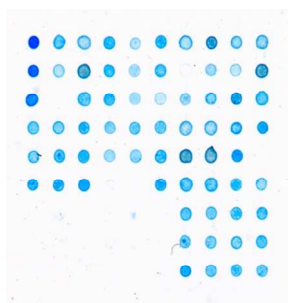
Beste alde batetik, MALDI bidezko analisia egiteko, lehenik eta behin lagin bakoitzetik zelula-mintzak isolatu dira, sakarosarekin zelulak apurtuz eta zentrifugazioen bitartez mintzak isolatuz. Horiek, porta batean jarri dira mikroarrai bat osatuz. Zelula-lerro bakoitzeko 3 erreplika jarri dira, beraz, mikroarrai osoan 100 bat lagin aztertu dira momentu berean. Analisi lipidomikoa egiteko, puntu guztien gainetik matrize organiko bat jarri da, horrek molekulen ionizazioa ahalbidetzen baitu. Ioi positiboak lortzeko MBT-a (2-merkaptobenzotiazol) erabili da, eta aldiz, ioi negatiboak lortzeko DAN-a (1,5-diaminonaftaleno). Hau, MALDI masa-espektrometroan sartu, eta puntu bakoitzean dauden lipidoak aztertu dira. Beste teknikan ez bezala, ez da aurretik lipidoen banatze bat egiten, beraz, baliteke masa jakin baterako lipido mota bat baino gehiago egotea. Aldiz, teknika honen bitartez, lipido bakoitzaren antolamendu espaziala jakin dezakegu. Ondorioz, mikroarrai hauetan mintzak ditugunez, lipido bakoitza mintzetan nola antolatzen den aztertu daiteke.

2. Irudia. Zelula-mintzez egindako mikroarraien eskema eta analisi lipidomikoa. A- Zelula-lerro ezberdinen kokapena arraietan, puntu bakoitza lagin bat da. Horia: inprimazioaren kontrola. Laranja: Melanozitoak. Marroia: *Nevi*-ak. Urdina: Melanoma primarioak. Berdea: Melanoma metastasikoak. Zuria: lipido-estraktuak. B- Arraien tindaketa Bradford metodoarekin (proteinak tindatzeko). D- Arraietan, lipido jakin baten agerpena: gorria- presentzia urria; morea- presentzia ugaria. 1. irudia ionizazio positiboan, 2. Ionizazio negatiboan eginda.

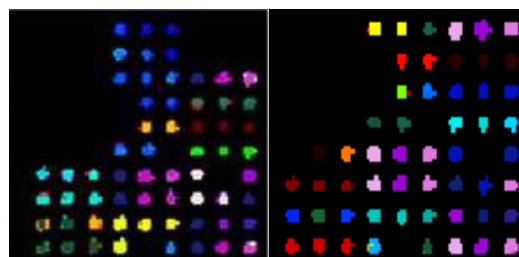
A

Kontrola	Kontrola	HEMn-MP	SK-MEL-3	WM-266-4	SK-MEL-31	NEVUS 1	NEVUS 4	NEVUS 7	HEMn-MP
Kontrola	Kontrola	HEMn-DP	SK-MEL-3	WM-266-4	SK-MEL-31	NEVUS 2	NEVUS 5	NEVUS 8	HEMn-DP
Kontrola		HEMn-LP	SK-MEL-3	WM-266-4	SK-MEL-31	NEVUS 3	NEVUS 6	NEVUS 9	HEMn-LP
A375	Hs294t	RPMI 7951	A2058	SK-MEL-28	ME4405	HEMn-MP	HEMn-MP	VMM1	SK-MEL-2
A375	Hs294t	RPMI 7951	A2058	SK-MEL-28	ME4405	HEMn-DP	HEMn-DP	VMM1	SK-MEL-2
A375	Hs294t	RPMI 7951	A2058	SK-MEL-28	ME4405	HEMn-LP	HEMn-LP	VMM1	SK-MEL-2
Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	MEL-HO	G361	COLO-800	HT144
Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	MEL-HO	G361	COLO-800	HT144
Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	Lip. estrakt.	MEL-HO	G361	COLO-800	HT144

B



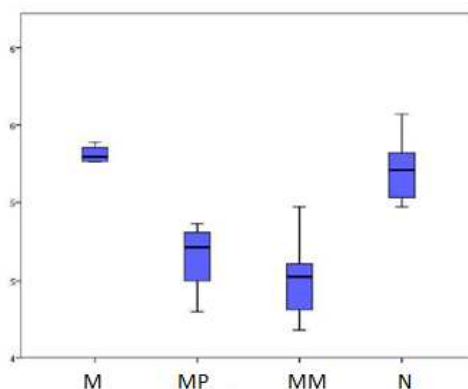
D



Aipaturiko bi analisi-teknikak osagarriak direnez, bien emaitzak batera aztertu dira lipidoen identifikazio zehatzago bat egiteko. Horrela, MALDI analisiaren bitartez ezin bada jakin masa konkritu bat zer molekulari dagokion, UHPLC-QTOF-etik lortutako emaitzetan ikusten da. Beti ere, lipido berdinak bi analisisen emaitzetan agertzen badira, emaitza horrek pisu handiagoa izango du.

Lan honetan lortutako emaitzak oso itxaropentsuak dira. Lagin bakoitzean 500 lipido inguru aurkitu dira. Horien artean, badaude beraien espresioa esanguratsuki ezberdina dutenak ehun osasuntsuan eta minbizian (3. Irudia). Gainera, aipatu beharra dago, emaitzak bi tekniketan errepikatzen direla; beraz, esan dezakegu metodologia hau baliagarria dela melanoman markatzaile lipidomikoak aurkitzeko.

3. Irudia. Lipido jakin baten espresioa aztertutako lau zelula mota ezberdinetan. M – Melanozitoak. MP- Melanoma primarioak. MM- Melanoma metastasikoak. N- *Nevi*.



4. Ondorioak

Erabilitako metodologia biomarkatzaile lipidomikoak aurkitzeko egokia dela frogatu da. Gainera, lan honek aurrerapen esanguratsuak eragingo ditu gaixotasun honen diagnostiko goiztiarra hobetzeko. Beti ere, hori da minbiziaren garapena ekiditeko modurik eraginkorrena. Gainera, melanomaren iragarpenean eta terapiaren hautaketan ere lagunduko dute. Gaur egun, terapia desberdinak erabil daitezke melanoma tratatzeko, eta gaixo batetik bestera tumoreak hain dira desberdinak, bakoitzarentzat terapia egokiena zein den erabakitzen lagunduko duten biomarkatzaileak aurkitzea ezinbestekoa den.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako emaitzen garrantzia ikusita, minbizidun ehunetan espresioa esanguratsuki ezberdina duten lipidoen funtzioa eta garrantzia aztertuko da aurrerantzean. Horien artean klinikoki interesgarriak izan daitezkeenak erabakiko da. Gainera, azkeneko horiek biomarkatzaile potentzial modura patentatzea aztertuko da.

Bestalde, lana borobiltzeko, MALDI irudi-masa-espektrometria erabiliko da pazienteetatik lortutako *nevus*- eta melanoma-biopsietatik egindako mozketetan lipido ezberdinen kokapena aztertzeko. Hori histologia-irudiekin alderatuko da tumorearen ikuspegi zabalago bat izateko. Horrela, espresioa esanguratsuki ezberdina duten lipidoen garrantzia eta funtzioa finkatuko da biopsietan duten kokapena jakinda.

Bukatzeko, zelula-mintzez osatutako mikrotxipak erabiliz, plataforma bioteknologiko berri bat garatu nahi da, biomarkatzaile lipidikoak aztertu, identifikatu eta kuantifikatu ahal izango dituenak.

6. Erreferentziak

- Gogas, H. et al. (2009): Biomarkers in Melanoma, *Annals of oncology*, 20 (Supplement 6), vi8-vi13.
- Guevara, L. (2016): Lipidómica en oncología: Aplicación al diagnóstico y pronóstico del melanoma maligno cutáneo, *Master amaierako lana*, Medikuntza fakultatea – UPV/EHU.
- Karagiannis, P. et al. (2015): Evaluating biomarkers in melanoma, *Frontiers in oncology*, 4, Article 383.
- Perrotti, F. et al. (2016): Advances in Lipidomics for Cancer Biomarkers Discovery, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (12).
- Yang, K. eta Han, X. (2016): Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences, *Trends in Biochemical Sciences*, 41, 954-969.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Espainiako Ekonomia, Industria eta Lehiakortasuneko Ministerioak finantzatutako ONCOFINDER proiektuaren barruan egin da.