



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Facultade de Ciencias

## GRAO EN BIOLOXÍA

### Memoria do traballo de fin de grao

# **ANÁLISE DE DIFERENTES MOTIVOS DE CORTE PARA PROTEASAS ESPECÍFICAS DE CÉLULAS DE OVARIO TUMORAIS E O SEU USO COMO ELEMENTO TERAPÉUTICO**

*ANÁLISIS DE DIFERENTES MOTIVOS DE CORTE PARA PROTEASAS ESPECÍFICAS DE  
CÉLULAS DE OVARIO TUMORALES Y SU ESTUDIO COMO ELEMENTO TERAPÉUTICO*

*ANALYSIS OF DIFFERENT CUTTING MOTIFS FOR SPECIFIC TUMOR OVARY CELL  
PROTEASES AND THEIR STUDY AS A THERAPEUTIC ELEMENT*

*Andrea Balsa Díaz*

*Curso: 2019-2020. Convocatoria: xuño.*

*Director académico: Ángel José Vizoso Vázquez*

*Laboratorio de Bioquímica e Bioloxía Molecular*

*Desexo dedicarlle o meu traballo á miña familia e aos meus amigos. Este é un pequeno paso neste longo viaxe de catro anos pero é un gran paso na miña vida persoal. É o final dunha etapa para min e páreceme adecuado reflexar o meu enorme agradecemento e aprecio a todas esas persoas que foron parte dela. Moitas foron as que de maneira directa ou indirecta me axudaron a superar esta etapa e a todas elas lles agradezo que estiveran no meu camiño, ás que me viron empezar pero non rematar e tamén a esas que chegaron para quedarse.*

*Por último, tamén quero agradecerlle ao meu director, Ángel Vizoso, o seu tempo e dedicación ao meu traballo e a aportación á miña formación como futura bióloga. Así como a todo o profesorado que me mostrou a paixón que se pode ter por esta ciencia e que me ensinaron a namorarme de campos da bioloxía nos que nunca pensei que vería tanta fermosura.*

# ÍNDICE

<b>1. RESUMO</b> .....	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
2.1 O CANCRO .....	6
2.1.1 CANCRO DE OVARIO .....	6
2.2 MARCADOR CELULAR (HER2) .....	8
2.3 <i>AFFIBODY</i> .....	9
2.4 <i>KLK (Human kallikrein-related peptidasas)</i> .....	9
2.4.1 AS KLKs E O CANCRO DE OVARIO .....	10
<b>3. OBXECTIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
4.1 CONSTRUCCIÓN DO CONTROL NEGATIVO .....	11
4.1.1 REACCIÓN DE CLONAXE LR .....	11
4.1.2 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES .....	13
4.1.3 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO .....	13
4.2 CONSTRUCCIÓN DE DIFERENTES PROTEÍNAS DE FUSIÓN .....	14
4.2.1 PCR .....	14
4.2.2 RECUPERACIÓN DO ADN PLASMÍDICO A PARTIR DUN XEL DE AGAROSA .....	15
4.2.3 CUANTIFICACIÓN DAS MOSTRAS .....	15
4.2.4 REACCIÓN DE CLONAXE BP .....	15
4.2.5 REACCIÓN DE CLONAXE LR .....	16
4.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN .....	16
4.3.1 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS BL21-DE3 .....	16
4.3.2 ELECTROFORESE EN XEL DE ACRILAMIDA .....	16
4.3.3 EXPRESIÓN E PURIFICACIÓN DAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN .....	16
4.3.4 ELECTROFORESE EN XEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE) .....	17
4.3.5 WESTERN BLOT .....	17
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
5.1 CLONAXE DAS DISTINTAS CONSTRUCCIONS PLASMÍDICAS .....	18
5.2 EXPRESIÓN E PURIFICACIÓN DAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN .....	19
5.3 RESULTADOS WESTERN BLOT .....	20
5.3.1 A DIANA FUNCIONA .....	20

5.3.2. A DIANA NON FUNCIONA .....	22
6. DISCUSIÓN.....	23
7. CONCLUSIÓNS.....	26
8. BIBLIOGRAFÍA.....	27
8.1 PROTOCOLOS.....	30
ANEXO I:.....	31
ANEXO II:.....	32
ANEXO III:.....	33

## 1. RESUMO

O cancro ovárico é un dos máis letais entre os cancros xinecolóxicos. A prognose dos pacientes que padecen este cancro acostuma ser grave debido a súa tardía detección, como consecuencia dunha falta de sintomatoloxía evidente nas fases iniciais da enfermidade. O tratamento actual consiste na cirurxía citorreductiva combinada con tratamentos quimioterápicos, aínda que tamén se inclúen outros como o uso da radiación, tratamentos hormonais ou a inmunoterapia, que se atopa en desenvolvemento. Os tratamentos quimioterápicos permiten a supervivencia dunha maior porcentaxe de pacientes, pero ocasionan tamén un alto número de efectos secundarios, asociados a súa baixa especificidade, afectando non só ás células cancerixenas senón tamén as células sas. Por isto, atopámonos na necesidade de analizar novos biomarcadores con maior sensibilidade e especificidade. Un exemplo de biomarcador intensamente estudado é HER2, receptor 2 do factor de crecemento epidermal humano con sobreexpresión nas células tumorais por mutación no ADN, que fai ás células cancerixenas máis sensibles á estimulación do crecemento. Neste traballo elaborouse un experimento de análise de posibles dianas útiles para o cancro ovárico. Analizouse a especificidade de catro KLKs (*Human kallikrein-related peptidasas*) serina proteasas implicadas na tumoroxénese por activación de procesos proteolíticos asociados con fenotipos neoplásicos, en combinación co biomarcador HER2. Estes biomarcadores poden ser un punto de partida para o estudo de tratamentos específicos contra o cancro.

PALABRAS CHAVE: cancro ovárico, quimioterapia, HER2, KLK (*Human kallikrein-related peptidasas*)

## 1. RESUMEN

El cáncer de ovario es uno de los más letales entre los cánceres ginecológicos. La prognosis de los pacientes que sufren este cáncer suele ser grave debido a su detección tardía, por la falta de sintomatología evidente durante las primeras fases. Actualmente, el tratamiento consiste en la cirugía citorreductiva combinada con tratamientos hormonales o la inmunoterapia, que se encuentra en proceso de desarrollo. El uso de tratamientos quimioterapéuticos permite la supervivencia de un mayor número de pacientes, pero también existen numerosos efectos secundarios, asociados a la baja especificidad de estos tratamientos que no solo afectan a las células tumorogénicas, sino también a las células sanas. Por estos hechos, nos encontramos en la necesidad de descubrir nuevos biomarcadores con mayor sensibilidad y especificidad. Un ejemplo de biomarcador intensamente estudiado es HER2, receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano que se encuentra sobreexpresado en las células tumorales por mutación en el ADN que hace que las células cancerígenas sean más sensibles a la estimulación del crecimiento. En este trabajo hemos elaborado un experimento de análisis de otras posibles dianas útiles para el cáncer de ovario. Hemos analizado la especificidad de cuatro KLKs (*Human kallikrein-related peptidasas*) serina proteasas implicadas en la tumorogénesis por activación de procesos proteolíticos asociados con fenotipos neoplásicos. Estos biomarcadores pueden ser un punto de partida para el estudio de tratamientos específicos contra el cáncer.

PALABRAS CLAVE: cáncer ovárico, quimioterapia, HER2, KLK (*Human kallikrein-related peptidasas*)

## 1. ABSTRACT

Ovarian cancer is the deadliest of gynaecologic cancers. The prognosis of patients suffering from this cancer is usually serious owing to the poor detection of this type of cancer, because of the lack of evident symptoms during the early stages. Currently, the treatment consists of cytoreductive surgery combined with hormonal therapy or immunotherapy, which is under development. The use of chemotherapeutic treatments allows the survival of a greater number of patients, but there are also numerous side effects, associated with the low specificity of these treatments which not only affect tumorigenic cells, but also healthy ones. Due to these facts, it is of utmost priority to discover new biomarkers with greater sensitivity and specificity. An example of biomarker is HER2, a receptor for human epidermal growth factor that is overexpressed in tumour cells by mutations in DNA that make cancer cells more sensitive to growth stimulation. In this work an experiment is carried out to analyse other possible useful targets for ovarian cancer. We have analysed the specificity of four KLKs (Human kallikrein-related peptidases) serine proteases involved in tumorigenesis by activation of proteolytic processes associated with neoplastic phenotypes. These biomarkers can be a starting point for the study of specific cancer treatments.

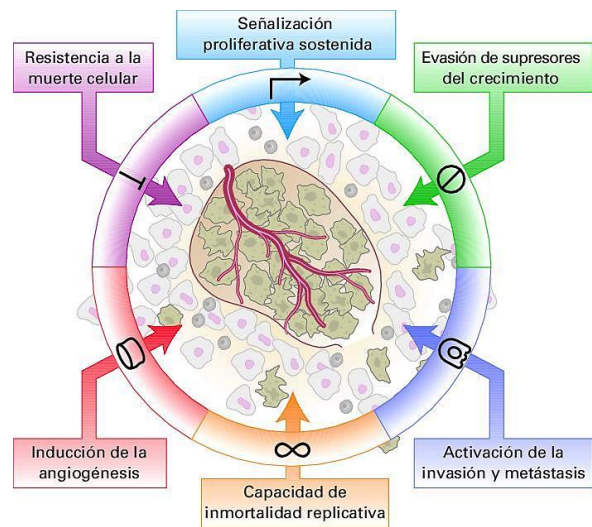
KEY WORDS: ovarian cancer, chemotherapy, HER2, KLK (Human kallikrein-related peptidases).

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 O CANCRO

Datos rexistrados pola Organización Mundial da Saúde (OMS) (<https://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>) indican que cerca dun 16% de persoas falecen como consecuencia do cancro. En 2015, 8.8 millóns de persoas morreron por esta enfermidade, das mortes rexistradas o 70% foron en países con ingresos medios ou baixos, onde menos do 30% dos pacientes teñen acceso a tratamentos específicos.

O proceso de formación do cancro denomínase **oncoxénese ou tumoroxénese**, resultado da interacción entre factores xenéticos do paciente e medioambientais. Tipicamente, a tumoroxénese deriva dunha serie de mutacións en múltiples xenes que dá lugar a un tipo celular que prolifera de maneira progresiva e con rapidez, o que crea oportunidades para mutacións adicionais (**Figura 1**). Nalgúns casos, as células dun tumor primario migran a novos tecidos onde forman tumores secundarios, un proceso denominado **metástase** (Lodish et al., 2016). Polo xeral, os xenes que se ven afectados no proceso cancerixeno pódense dividir en dous grupos, aqueles con mutacións que lles fan adquirir funcións (activación) e que se coñecen como oncoxenes e aqueles onde ambos alelos sofren unha mutación que provoca a perda de función (inactivación) os denominados xenes supresores de tumores (Fearon & Dang, 1999).



**Figura 1:** panorama de cambios nas células que causan cancro. Por Lodish et al. (2016).

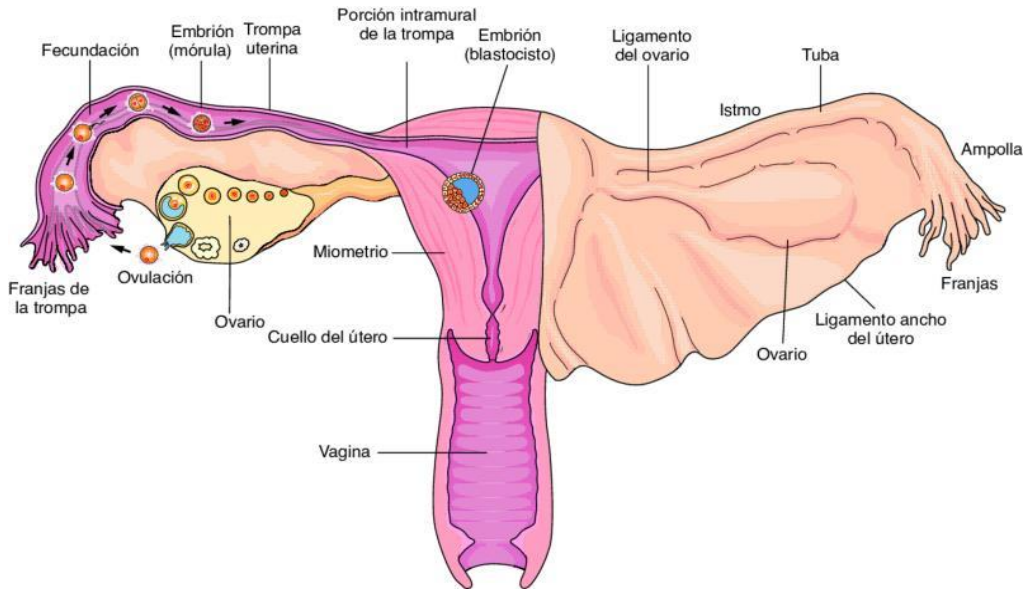
Comunmente, as mutacións que derivan en cancro, xorden durante a exposición de toda unha vida a carcinóxenos, substancias encontradas no ambiente entre as que se inclúen certos químicos e radiacións (Lodish et al., 2016). Do total, só entre un 5%-10% se consideran asociados á xenética, pois na súa maioría atribúense ao ambiente e ao estilo de vida do paciente (Jeyaraman et al., 2019).

#### 2.1.1 CANCRO DE OVARIO

O sistema xenital feminino está formado por dous ovarios, dúas trompas uterinas, o útero, a vaxina e os xenitais externos (**figura 2**). Os ovarios teñen forma de améndoa e miden uns 3 cm de lonxitude, 1.5 cm de ancho e 1 cm de espesor. A súa superficie está recuberta por un epitelio cúbico simple, denominado epitelio xerminativo. Debaixo deste atópase unha capa de tecido conxuntivo denso, a túnica albugínea e máis profundamente encóntrase a denominada cortiza, na que predominan os folículos ováricos. A parte máis profunda do ovario é a rexión medular ou medula formada por tecido conxuntivo laxo (Junqueira & Carneiro, 2015).

O cancro ovárico é unha malignidade epitelial que globalmente afecta a preto de 240.000 persoas e causa máis de 150.000 mortes ao ano (Kossai et al., 2018). O *Global Cancer Observatory* (GCO) é unha plataforma web que presenta as estatísticas referentes ao cancro (<https://gco.iarc.fr/>). Segundo estatísticas do ano 2018, este tipo de cancro é o oitavo máis común

e o sétimo en mortalidade feminina, sendo maior o risco a partir dos 75 anos, onde acada ser o quinto máis mortal (Ferlay et al., 2015).



**Figura 2:** órganos internos do sistema xenital feminino. Por Junqueira & Carneiro (2015).

Os pacientes afectados por esta patoloxía normalmente teñen unha prognose grave debido a súa tardía detección consecuencia da falta de sintomatoloxía nas fases iniciais da enfermidade (Gong et al., 2020). O cancro ovárico preséntase tipicamente con 3-4 meses de dor e distensión abdominal, síntomas que poden ser erroneamente atribuídos ao síndrome de intestino irritable. O *National Institute for Health and Care Excellence* de Reino Unido (NICE) recomenda que na presenza destes síntomas se proceda a avaliación da concentración do antíxeno canceríxeno 125 (CA125) no soro (Jayson et al., 2014). Os niveis de CA125 son elevados no 90% de pacientes que presentan un estadio avanzado pero só no 50% daqueles que o sofren en estadios iniciais e polo xeral prodúcese só en resposta a células ováricas canceríxenas da liña epitelial (Roett & Evans, 2009).

A maioría dos factores de risco están relacionados coa teoría da ovulación incesante: parece que o microtrauma producido durante a rotura da cápsula ovárica que se produce en cada ovulación, sería un estímulo para a aparición de cancro. Tamén se inclúen outros factores de risco como a idade, a endometriose, a historia familiar ou síndromes de cancro ovárico hereditario (Pellicer & Bonilla-Musoles, 2014). O estadio de todos os cancros xinecolóxicos está clasificado de acordo a *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO, <http://www.who.int/publications/i/item/9789282151304>, ver táboa S1, ANEXO I) (Dorn et al., 2014).

O tratamento estándar é a cirurxía citorredutiva e a quimioterapia, aínda que tamén se inclúen outros tratamentos como a radiación, tratamento mediante hormonas ou a inmunoterapia, que está actualmente en desenvolvemento, pero a porcentaxe de supervivencia segue sendo baixa. A porcentaxe de resposta a esta primeira liña de terapia é dun 80-90% (Kossai et al., 2018), aínda que nun inicio este cancro é un dos máis tratables as células canceríxenas habitualmente desenvolven resistencia á quimioterapia (Januchowski et al., 2017). Os tratamentos quimioterápicos permite a supervivencia de máis pacientes oncolóxicos pero ocasionan porén unha serie de efectos secundarios, xa que estes tratamentos non só van exercer o seu efecto sobre as células tumorais, senón tamén sobre os tecidos sans (Ferreiro et al., 2003).

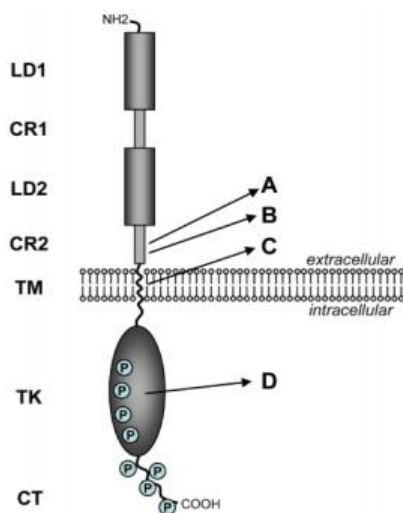


Dada a expectativa de vida excepcionalmente mala neste tipo de cancro, existe unha necesidade urxente de descubrir novos biomarcadores con alta sensibilidade e especificidade para a diagnose temperá e o seu emprego en terapias dirixidas (Wang et al., 2016). Como resultado do mellor coñecemento da bioloxía molecular do cancro, estanse identificando novas dianas terapéuticas para o cancro ovárico: inhibidores anti-VEGF/VEGFR anxióxénicos, inhibidores PARP, inhibidores EGFR, inhibidores do receptor folato ou inhibidores de IGFR (Lim & Ledger, 2016).

## 2.2 MARCADOR CELULAR (HER2)

O xene do receptor 2 do factor de crecemento epidermal humano (HER2) está localizado no cromosoma 17q12-21 e codifica para un receptor con actividade tirosina quinasa (RTK) (Luo et al., 2018) que pertence á familia HER (*human epidermal growth factor receptor*) de receptores activados por factores de crecemento epidermais (EFG) (Lodish et al., 2016). Son receptores transmembrana de cadea sinxela con certa homoloxía entre eles. A súa estrutura consiste nun dominio extracelular de unión a ligando con rexións ricas en cisteína, unha rexión transmembrana anfipática e un dominio intracelular con actividade tirosina quinasa. Posúe tamén unha cola carboxílica onde se atopan lugares críticos de fosforilación tirosínica (**Figura 3**) (Moasser, 2007).

Este receptor ten unha baixa especificidade de tecido tanto a nivel de ARN como a nivel proteico, aínda que está considerado un marcador adecuado para o tecido feminino (**ANEXO II**) (*Tissue expression of ERBB2 - Summary - The Human Protein Atlas*, n.d.). Nos cancros de mama poden detectarse dende 25 a 50 copias do xene HER2 e un aumento de entre 40 e 100 veces da proteína que codifica, o que resulta en dous millóns de receptores expresados na superficie da célula (Albagoush & Limaiem, 2020).



**Figura 3:** estrutura de HER2/neu. A estrutura consiste en dúas rexións de unión a ligando (LD1 & LD2), dúas rexións ricas en cisteínas (CR1 & CR2), un dominio transmembrana curto (TM), un dominio catalítico tirosina quinasa (TK) e unha cola carboxilo-terminal (CT). Cunha P redondeada indícanse as fosforilacións nos dominios TK ou CT. As letras situadas á dereita especifican áreas que están alteradas ou mutadas en tumores producidos de forma natural ou inducidos experimentalmente. A) Lugar dunha mutación somática encontrada en tumores. B) Lugar de delección de 48 pb que se produce de forma natural na isoforma humana  $\Delta$ HER2. C) Lugar de mutación no oncoxene neuT descuberto inicialmente nun tumor inducido a un rato. D) Lugar de mutación encontrado en casos raros de cancros pulmonares humanos. Por Moasser (2007).

A unión dun EGF ao seu receptor desencadea un cambio conformacional no dominio extracelular do receptor que remata na formación dun dímero funcional (Lodish et al., 2016). A dimerización resulta na autofosforilación dos residuos tirosina do dominio citoplasmático do receptor (Iqbal & Iqbal, 2014) que provoca a activación de múltiples procesos celulares, como a proliferación, a supervivencia ou a diferenciación celular (Connell & Doherty, 2017). A desestabilización destas rutas de sinalización é común en moitos tumores malignos humanos (Reese & Slamon, 1997).

Nas células tumorais, con frecuencia, mutacións no ADN provocan a sobreexpresión deste receptor, o que resulta nunha maior sensibilidade á estimulación do crecemento por baixos niveis de EGFs (Lodish et al., 2016). A sobreexpresión deste receptor foi detectada en varios tipos de cancro, ata un 30 % en casos de cancro de mama ou dun 35% a un 45% en casos de cancro de páncreas (Luo et al., 2018). En pacientes de cancro ovárico observouse unha sobreexpresión de HER2 de ata un 20%-30% (Iqbal & Iqbal, 2014).

Estando a desenvolver numerosas estratexias para empregar HER2 como diana terapéutica, empregando anticorpos como trastuzumab (detecta o dominio IV do receptor HER2) ou pertuzumab (únese ao dominio II inhibindo a heterodimerización de HER2). Tamén se está analizando o uso de inhibidores tirosina quinasa ou incluso conxugados de anticorpos con toxinas, que poidan unirse a HER2 e introducir consecuentemente un citotóxico (Ocaña et al., 2020).

### 2.3 AFFIBODY

Os *affibody* son proteínas coa capacidade de unirse a moléculas diana pero que non derivan de inmunoglobulinas e que se constrúen mediante enxeñería de proteínas. Os *affibody* están construídos a partir dunha base de tres hélices, que orixinalmente forma o denominado dominio Z composto por 58 aminoácidos (Ståhl et al., 2017), obtido mediante cambios introducidos no dominio B da proteína A de estafilococos (Nygren, 2008). Este dominio trihelicoidal forma parte dun receptor natural para a porción Fc da inmunoglobulina G. Demostrouse que podía ser empregado como base de moléculas capaces de unirse especificamente a diferentes dianas. A construción de amplas librerías de *affibody* deriva da aleatorización de trece posicións de dúas das tres hélices do dominio (Frejd & Kim, 2017).

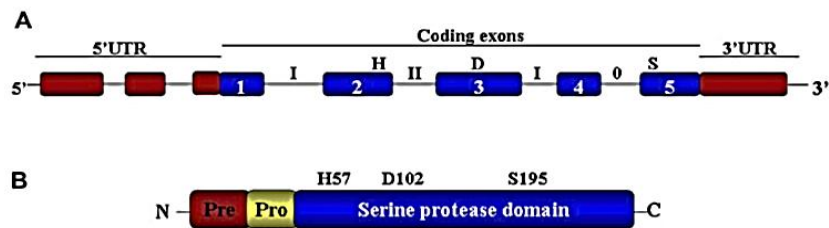
As librerías son habitualmente xeradas en fagos e a isto séguese a aplicación da técnica de *biopanning* contra as dianas obxectivo (Löfblom et al., 2010) que permite seleccionar os péptidos que demostran unha alta afinidade coa diana (McGuire et al., 2009). Desta forma nos últimos anos desenvolvéronse *affibody* de alta afinidade contra varias proteínas asociadas a tumores. Entre estes atópanse *affibody* con dianas que inclúen o receptor do factor de crecemento epidérmico (EGFR), o receptor do factor de crecemento 1 similar á insulina (IGF1R) (Xue et al., 2016) ou coa diana HER2 que mostrou excelente afinidade tumoroxénica (Frejd & Kim, 2017).

No ámbito terapéutico estas moléculas mostran numerosas características vantaxosas, incluíndo: o seu pequeno tamaño que deriva nunha rápida penetración no tecido, subministro eficiente de doses molares máis altas para a mesma masa que no caso de proteínas máis grandes ou rutas de administración alternativas. Tamén permiten a enxeñería directa de novos formatos ou a conxugación de cargas útiles dirixidas a sitios específicos que poden levar ao desenvolvemento de axentes terapéuticos de gran especificidade (Ståhl et al., 2017).

### 2.4 KLK (*Human kallikrein-related peptidasas*)

Son un subgrupo de 15 serina proteasas acuñadas calcireínas, por derivación da palabra grega para páncreas, onde se atopan en alta concentración (Yu et al., 2014). As calcireínas son proteínas con actividade proteolítica similar á tripsina (KLK1-2, KLK4-6, KLK8 e KLK10-KLK15) e á quimiotripsina (KLK3/PSSA, KLK7 e KLK9) (Avgeris & Scorilas, 2016). Estas enzimas regulan importantes procesos fisiolóxicos e patolóxicos como a licuefacción do seme, a descamación da pel, a inmunidade innata, a neurodexeneración, procesos de degradación ou a remodelación da matriz extracelular (Sotiropoulou et al., 2009).

As calcreínas están codificadas por 15 xenes que se encontran agrupados aproximadamente nunha secuencia de 300 kb na rexión 19q13.33-13.41 (Avgeris & Scorilas, 2016) a excepción da KLK1B situada na posición 4q35 (Yu et al., 2014). Todas conteñen cinco exóns codificantes de lonxitudes comparables cunha homoloxía de secuencia de entre o 30% e o 80% e a súa actividade enzimática depende da conservación dos aminoácidos do seu centro catalítico (histidina (*His*), aspartato (*Asp*) e serina (*Ser*)) (Avgeris & Scorilas, 2016). Estes xenes codifican proteínas duns 230 aminoácidos e a súa estrutura terciaria consiste en dous barriles  $\beta$  antiparalelos de seis cadeas xustapostas e dúas hélices  $\alpha$  co sitio activo entre os barrís. Son sintetizados como preproenzimas, que son proteolizados para dar lugar a proenzimas, que posteriormente serán activados mediante o corte do pro-peptido do extremo amino terminal (**Figura 4**) (Stefanini et al., 2015).



**Figura 4:** representación esquemática dun xene de calcreína e a súa proteína. **A)** Os xenes das calcreínas consisten en cinco exóns codificantes (caixas azuis) de lonxitude similar e catro intróns (barra gris) con tamaño variable. As caixas vermellas representan os extremos 5' e 3'UTRs. Os números romanos indican a fase intrónica. **B)** As proteínas calcreínas están expresadas como pre-proenzimas. A secuencia amino-terminal pre- (sinal) guía ao enzima ao retículo endoplasmático para a secreción. Os proenzimas son activados extracelularmente tras o corte do pro-dominio. H57, D102 e S195 son os aminoácidos do sitio catalítico. Por Emami & Diamandis (2007).

Despois da súa activación, existe un gran número de factores inhibidores endóxenos que regulan a súa actividade. A importancia de manter a actividade destas proteínas baixo control, débese á desregulación na súa expresión que se observa en patoloxías como a tumoroxénese e a progresión canceríxena, as enfermidades da pel, a neurodexeneración ou as patoloxías respiratorias e cardíacas. A súa implicación nun amplo espectro de enfermidades humanas motiva o desenvolvemento e avaliación de terapias que teñen por diana estas proteínas (Avgeris & Scorilas, 2016).

### 2.4.1 AS KLKs E O CANCRO DE OVARIO

As calcreínas están implicadas na tumoroxénese por activación de procesos proteolíticos asociados a fenotipos neoplásicos. Os mecanismos involucrados inclúen a modulación da biodispoñibilidade de factores de crecemento e a activación de receptores de hormonas e receptores activados por proteasas (PARs) dando lugar a rutas de sinalización proliferativa, á degradación da matriz extracelular, á ruptura das unións e a indución da transición epitelial-mesenquimal (EMT). O fenotipo EMT conduce ao incremento da migración e invasión das células tumorais e a modulación das interaccións entre as células canceríxenas e o microambiente que as rodea, promovendo a anxioxénese e outros procesos tumoroxénicos (Stefanini et al., 2015). En casos de cancro ovárico a maior parte dos membros da familia das calcreínas (KLK2–8, KLK10, KLK11, KLK13–15) atópanse sobreexpresados tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico (Avgeris et al., 2012).

A identificación de biomarcadores novos e efectivos é crucial para a elaboración do cadro clínico dos pacientes e para a optimización do tratamento en expensas de alcanzar unha maior

efectividade e menor toxicidade. Neste contexto, as calcreínas que presentan sobreexpresión no tecido ovárico canceríxeno actúan como marcadores potenciais para a diagnose e prognose desta enfermidade. Encontrouse un elevado nivel de ARNm de dez calcreínas (KLK3, 8, 10, 11, 13 e 15) mentres que a nivel proteico encontráronse doce (KLK3-11 e KLK13-15) (Dorn et al., 2014). Concretamente, os niveis de ARNm de KLK6 e KLK13 están correlacionados cunha mala prognose e poden predicir eficazmente a recorrencia do tumor no cancro epitelial ovárico (Avgeris et al., 2012). Estas dúas calcreínas tamén parecen reforzar a utilidade en diagnóstico e prognóstico do biomarcador de cancro ovárico CA125, xa que existen evidencias de que a concentración de KLK6 e KLK13 no soro aumenta a sensibilidade do diagnóstico de CA125 en estadios iniciais (Dorn et al., 2014).

KLK6 asociouse clinicamente cunha etapa tardía, un histotipo seroso, un tumor residual, supervivencia libre de enfermidade e resposta á quimioterapia, que o indican como un candidato a biomarcador moi prometedor (Emami & Diamandis, 2007). Ademais, púxose de relevo o impacto terapéutico da KLK4 cando tratamentos das liñas celulares de cancro de ovario que sobreexpresaban esta calcreína, con SFTI-FCQR, deron lugar a unha redución da formación de agregados multicelulares e a un aumento da sensibilidade ao paclitaxel, en mulleres con cancro de ovario epitelial seroso (Avgeris & Scorilas, 2016).

### 3. OBXECTIVOS

- Analizar a especificidade de catro dianas dirixidas a proteasas da familia das calcreínas (KLKs) en tecido ovárico canceríxeno contra tecido ovárico san, co obxectivo de detectar un biomarcador eficiente que permita desenvolver unha nova estratexia de tratamento.

- Avaliar o efecto combinado das dianas para as calcreínas (KLKs) cun *affibody* de recoñecemento específico para HER2, mediante a construción de diferentes proteínas de fusión que poderían ser empregadas na elaboración de nanopartículas quiméricas. As nanopartículas serían destinadas para unha liberación selectiva de cargas citotóxicas preferentemente a células de cancro ovárico. O recoñecemento das células ováricas canceríxenas realizaríase en dúas fases. Un primeiro recoñecemento do marcador celular HER2 (sobreexpresado en células tumorais de ovario) mediante o uso dun *affibody* específico e un segundo recoñecemento a través de dianas de corte para calcreínas que activarían a liberación do citotóxico.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CONSTRUCCIÓN DO CONTROL NEGATIVO

Trátase dunha proteína de fusión formada pola etiqueta 6XHis combinada coa proteína glutatión S-transferasa (GST) no seu extremo amino-terminal e a ORF do *affibody* Z342 xunto coa etiqueta Flag no seu extremo carboxilo-terminal.

#### 4.1.1 REACCIÓN DE CLONAXE LR

Partindo da construción plasmídica pDONR221-Z342 (cedida por Ángel Vizoso) transfírese a ORF do *affibody* Z342 ao vector pDEST-565 (**figura 5**) mediante o uso de *Gateway® Technology (Invitrogen)*. Este vector contén xenes de resistencia á ampicilina (Amp<sup>r</sup>) e ao cloranfenicol (Cm<sup>r</sup>). Contén o xene *ccdB*, flanqueado por sitios *attR* para o clonaxe da ORF de Z342 que se atopa fusionada cunha cola de seis histidinas e a proteína glutatión S-transferasa (6XHis-GST) no seu



Lévase a cabo a reacción de clonaxe LR para transferir a ORF do *affibody* Z342 ao vector pDEST-565 e crear un clon de expresión con sitios *attB*. Emprégase o protocolo *Gateway® Technology with Clonase® II (Invitrogen)* proporcionado pola empresa *Thermo Fisher Scientific*, ao que se lle introducen modificacións que permiten optimizar o proceso. Prepáranse catro tubos de PCR cos compoñentes descritos na **táboa 1**.

**Táboa 1:** reaccións para clonaxe LR.

COMPOÑENTES	MOSTRA
Clon de entrada (50-150 ng/reacción)	1 µl
Vector de destino (150 ng/µl)	1 µl
LR clonase II Master mix	0.5 µl

Desconxélese a enzima *Gateway® LR Clonase® II* manténdoa durante aproximadamente dous minutos en xeo. As reaccións preparadas serán incubadas durante tres horas a 25°C. Unha vez transcorrido este tempo, engádense 0.5 µl de proteinasa K a cada reacción, que inactiva as nucleasas que poderían danar o ADN. Incúbase durante dez minutos máis, a 37 °C.

Unha vez remata o proceso, lévase a cabo a transformación de células competentes.

#### 4.1.2 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Transfórmanse células competentes de *Escherichia coli* mediante o protocolo de transformación química provisto no manual *Gateway® Technology with Clonase® II* coa introdución de modificacións que aumentan a súa eficiencia e reducen os custos. Emprégase a cepa *E. coli One Shot® OmniMAX™ 2-T1<sup>R</sup>* coa mutación *gyrA96*. Esta mutación fai ás células sensibles ao produto proteico do xene *ccdB* (o produto proteico interfere coa ADN xirasa na replicación do ADN), que é substituído pola ORF do *affibody* no proceso de clonaxe, evitando así a aparición de falsos positivos na placa de cultivo.

Desconxélese en xeo un vial de células da cepa *One Shot® OmniMAX™ 2-T1<sup>R</sup>* quimicamente competentes. Engádense 2.5 µl do produto da reacción de clonaxe (**apartado 4.1.1**) no vial de células e mestúrase coidadosamente. Nunca por pipeteo. Incúbase o vial en xeo durante 30 minutos e posteriormente aplícase un choque térmico de 45 segundos a 42°C. O choque térmico fai que a membrana bacteriana sexa máis permeable ás moléculas de ADN exógeno. Retírase o vial do bloque térmico e déixase durante dous minutos en xeo.

Antes de plaquear dilúese a transformación en 100 µl de medio LB (Luria-Bertani). Esténdese o contido do vial sobre unha placa de agar con ampicilina (sistema de selección para as células que integren o vector) e incúbase durante toda a noite a 37°C en posición invertida.

#### 4.1.3 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Para a extracción e purificación do ADN emprégase o *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific™)*.

Recóllense dúas colonias e engádeselles 250 µl de solución de resuspensión a cada unha. As bacterias son resuspendidas completamente mediante o *vortex* ou mediante pipeteo. Engádense 250 µl de solución de lise e mestúrase a través de inversión do tubo, entre catro e seis veces. O proceso de lise permite a liberación do ADN plasmídico. O resultado da lise é neutralizado para crear unhas condicións adecuadas para a unión do ADN plasmídico á membrana de sílice da



columna de centrifugación, mediante a adición de 350 µl de solución de neutralización e a posterior mestura mediante inversión.

Procédese ao centrifugado durante cinco minutos a 13000 rpm. Os restos celulares e o SDS precipitan mentres que o sobrenadante, que contén o ADN plasmídico, se verte nunha columna de centrifugación *GeneJET* por decantación ou pipeteo. Centrifúgase durante un minuto a 13000rpm e descártase o líquido filtrado. O ADN plasmídico queda sobre a membrana da columna de centrifugación. O ADN lávase con 500 µl de solución de lavado e centrifúgase durante 30-60 segundos para retirar os posibles contaminantes. Descártase o líquido filtrado novamente. O proceso de lavado repítase con outros 500 µl de solución de lavado. Faise unha centrifugación adicional de un minuto para retirar calquera resto desta solución.

Finalmente o ADN plasmídico é eluído da membrana con 50 µl de tampón de elución. Incúbase durante dous minutos a temperatura ambiente, centrifúgase durante outros dous minutos e a columna de centrifugación *GeneJET* descártase.

## 4.2 CONSTRUCCIÓN DE DIFERENTES PROTEÍNAS DE FUSIÓN.

Proteínas de fusión constituídas pola proteína de unión á albumina (GST) coa etiqueta 6XHis no seu extremo amino-terminal, a diana de corte para as distintas proteasas (KLKs) que temos como obxectivo analizar (KLK5, KLK6, KLK7 e KLK8) e a ORF do *affibody* Z342 cun epítopo *Flag* no seu extremo carboxilo-terminal (**figura 8**).



**Figura 8:** esquema-resumo da proteína de fusión co corte de proteasa que corresponde coas diferentes calcineínas que se pretende analizar.

### 4.2.1 PCR

O proceso de PCR (reacción en cadea da polimerasa) realízase empregando un termociclador *T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad)*, no que se leva a cabo o proceso que implica 35 ciclos de tres pasos cada un. Un primeiro paso de desnaturalización do ADN (98°C), un paso de aliñamento onde o cebador hibrida co ADN (59°C) e por último un paso de elongación do amplicón (72°C). Ao final do último ciclo inclúese unha elongación adicional de dez minutos. Os cebadores empregados no proceso (**táboa S2, ANEXO III**) teñen unha secuencia complementaria aos extremos da ORF do *affibody* Z342 que se atopa no vector pJET1.2-Z342™ e a secuencia de corte da proteasa correspondente. Ademais, conteñen a secuencia *attB* que permite o clonaxe posterior do produto obtido. Para preparar as reaccións empréganse os reactivos e cantidades indicados na **táboa 2**.

**Táboa 2:** reaccións de PCR.

REACTIVOS	MOSTRAS
<i>5X Phusion HF Buffer</i>	10 µl
DNTPs 2.5 mM	4 µl
Cebador <i>forward</i> 10 µM	2.5 µl
Cebador <i>reverse</i> 10 µM	2.5 µl
ADN molde (50 ng/ µl)	1 µl
<i>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase</i>	0.5 µl

Unha vez remata o proceso de PCR, prepárase un xel de agarosa ao 1% p/v en tampón TBE e cárganse 8 µl de mostra mesturados con 2 µl de tampón de carga 5X, migrando 45 minutos a 65V. Isto permite corroborar a presenza dunha única banda que se corresponda co tamaño esperado do amplicón, ademais de comprobar que non se producen amplificacións inespecíficas.

#### 4.2.2 RECUPERACIÓN DO ADN PLASMÍDICO A PARTIR DUN XEL DE AGAROSA

Emprégase o *kit* de extracción *Thermo Scientific GeneJET*.

O primeiro paso é mesturar o tampón de unión coa PCR en proporción 2:1 v/v. Posteriormente engádense 700 µl de tampón de lavado á columna de purificación. Centrifúgase durante un minuto e realízase de novo o descarte do fluxo filtrado. Faise unha centrifugación adicional de un minuto. Por último, a columna de purificación transfírese a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL e engádense 50 µl de tampón de elución no centro da membrana. Centrifúgase durante un minuto e o ADN eluído, xa purificado, etiquétase e gárdase a -20°C.

#### 4.2.3 CUANTIFICACIÓN DAS MOSTRAS

Emprégase un espectrofotómetro *BioSpectrometer (Eppendorf)* cunha cubeta *Eppendorf µCuvette® G1.0* que permite medir a absorbancia das mostras empregando volumes de tan só 1µl. Os resultados refléxanse na **táboa S3 (ANEXO IV)**.

A cuantificación de ácidos nucleicos fúndase na capacidade que estes presentan para a absorción de luz no rango ultravioleta, de forma que o seu máximo de absorción está en lonxitudes de onda de 260 nm, mentres que os posibles contaminantes presentan o seu máximo a 280 nm (proteínas) ou 230 nm (compostos orgánicos). Por isto, o índice A260/280 permite definir a calidade dos ácidos nucleicos extraídos. Considérase que é de boa calidade cando este cociente é próximo a 1.8.

#### 4.2.4 REACCIÓN DE CLONAXE BP

Clónase o produto de PCR obtido no **apartado 4.2.1** empregando o protocolo *Gateway® Technology with Clonase® II* para a realización da reacción BP.

O vector doador (pDONR221) contén o xene de resistencia á kanamicina (Kan') e ao cloranfenicol (Cm') e o xene *ccdB*, substituído polo produto de PCR no proceso de clonaxe, evitando así a aparición de falsos positivos na placa de cultivo. Prepárase un tubo de PCR a temperatura ambiente cos compoñentes indicados na **táboa 3**.

*Táboa 3: reaccións para clonaxe BP*

COMPOÑENTES	MOSTRA
Clon de entrada (50-150 ng/reacción)	1 µl
Vector de destino (150 ng/µl)	1 µl
BP clonase II Master mix	0.5 µl

As reaccións preparadas incúbanse durante tres horas a 25°C. Unha vez transcorrido este tempo engádense 1 µl de proteinasa K a cada reacción que inactiva as nucleasas que poderían danar o ADN. Incúbase durante dez minutos máis, a 37 °C.

Unha vez remata o proceso, lévanse a cabo os pasos dende a transformación de células ata a cuantificación de mostras pasando pola extracción do ADN plasmídico, seguindo os mesmos



procedementos que os descritos previamente. O ADN plasmídico obtido envíase a secuenciar para verificar a súa validez, comprobando a ausencia de mutacións indesexadas e a correcta pauta de lectura.

#### 4.2.5 REACCIÓN DE CLONAXE LR

Logo de xerar o clon de entrada que contén a secuencia nucleotídica de interese, realízase a reacción de clonaxe LR para transferir o inserto de interese ao vector de destino pDEST-565 con sitios *attR* para obter un clon de expresión con sitios *attB*. O procedemento é equivalente ao desenvolto no **apartado 4.1.1**. Unha vez remata o proceso, lévanse a cabo os procedementos de transformación de células competentes e extracción e cuantificación de ADN plasmídico de forma equivalente á xa descrita.

### 4.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN

#### 4.3.1 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS BL21-DE3

Procédese a unha nova transformación celular empregando a cepa BL21-DE3 (Novagen). Esta cepa contén o profago  $\lambda$ DE3 que transporta o xene da T7 ARN polimerasa baixo control do promotor lacUV5, inducible por IPTG (González & Fillat, 2018).

Repítase o proceso de transformación explicado anteriormente

#### 4.3.2 ELECTROFORESE EN XEL DE ACRILAMIDA

Permite avaliar se as condicións de cultivo e indución da expresión son as adecuadas para producir correctamente as proteínas de interese. A separación proteica por electroforese lévase a cabo en xel de acrilamida ao 10%.

- **Xel concentrador (5 mL):** 3.65 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 670  $\mu$ l Tris-HCl pH 6.8, 620  $\mu$ l acrilamida (40%), 50  $\mu$ l APS, 25  $\mu$ l SDS (20%) e 5  $\mu$ l TEMED.

- **Xel separador (20 mL):** 9.7 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 5 mL de Tris-HCl 1.5M pH 8.8, 5 mL acrilamida (40%), 200  $\mu$ l APS (10%) e 100  $\mu$ l SDS (20%).

Dispónse 1 mL de cada un dos cultivos en distintos *ependorf* e centrifúganse a 13000rpm durante un minuto. Descártase o medio e resuspéndense as células en auga destilada en función da densidade óptica do cultivo, de tal maneira que a OD<sub>600</sub> final sexa 10. Mestúranse 30  $\mu$ l de cultivo con 10  $\mu$ l de tampón de carga Laemli 4X e aplícase un tratamento térmico ás mostras antes de cargalas no xel, mediante unha incubación de dez minutos a 95°C. Cárganse no xel 20 $\mu$ l de cada mostra e 5  $\mu$ l de *NZYColour Protein Marker II* (NZYTech).

#### 4.3.3 EXPRESIÓN E PURIFICACIÓN DAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Cultívanse as células BL21-DE3 (Novagen) transformadas, en 1 L de LB en matraces de 2 L. Indúcese a expresión mediante a adición de 1 mM de IPTG cando os cultivos alcanzan unha densidade celular próxima a OD<sub>600</sub>=0.8. Tras tres horas de expresión as células recóllense por centrifugación a 5000 rpm durante cinco minutos.

As células lísanse por medio de tampón de lise e sonicación (60 ciclos de tres segundos sonicando ao 70% de amplitude e sete segundos de repouso en xeo) e centrifúganse de novo

durante unha hora a 18000 rpm para a separación de fases. As proteínas de fusión purifícanse empregando cromatografía de afinidade combinada con cromatografía de exclusión molecular.

Para a cromatografía de afinidade emprégase unha columna HisTrap HP 5 mL nun equipo AKTA Prime (*GE Healthcare*). Para equilibrar a columna e lavala logo da inxección de mostra emprégase o tampón A (50 mM Tris-HCl pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM). A elución da proteína de fusión de interese da columna de afinidade realízase con tampón B de elución (50 mM Tris-HCl pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1mM, 300 mM imidazol). Posteriormente realízase unha cromatografía de exclusión molecular empregando unha columna HiLoad75 Superdex (*GE Healthcare*) equilibrada con tampón A e recóllense cinco alícuotas de 1 mL.

As alícuotas de interese concéntranse en concentradores Pierce PES 10MWCO (*Thermo Scientific*) mediante centrifugación a 4500 rpm e 4°C durante vinte minutos.

#### 4.3.4 ELECTROFORESE EN XEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE)

A separación de proteínas realízase por electroforese en xel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE). O propósito destes xeles é a separación de proteínas estritamente segundo o seu peso molecular. O SDS únense ás proteínas nunha proporción dunha molécula cada dous aminoácidos, enmascarando a carga propia da proteína e dotándoa dunha carga negativa uniforme. Por tanto, a migración dos complexos SDS-proteína ten lugar unicamente en función do seu tamaño.

A electroforese realízase seguindo o método de Laemli (1970) e empregando o sistema *Mini PROTEAN® 3 Cell* (*Bio-Rad®*). O xel prepárase a unha concentración do 5% de acrilamida no xel concentrador e 10% de acrilamida no xel separador. As mostras dilúense ao 75% en tampón de carga 4X (Tris-HCl 0.12 M pH 6.8, SDS ao 6%, glicerol 10%, 2-Mercaptoetanol ao 15% e azul de bromofenol 0.0025%). Posteriormente desnaturalízanse incubando as mostras a 100°C durante dez minutos. A electroforese realízase mantendo unha voltaxe constante de 150V en tampón de electroforese (Tris-HCl 25mM pH 8.3, glicina 192 mM e SDS 0.1%) ata que a fronte alcanza o final do xel. O marcador de referencia utilizado é *ProteinMarker II* (*Thermo-Fisher*).

Despois de levar a cabo a electroforese das proteínas, o xel tinguense nunha solución de tinguido (10% acético, 0.25 mg/mL azul de Coomassie (*Bio-Rad®*)) durante polo menos dez minutos con axitación orbital. Tras isto, o exceso de colorante elimínase cunha solución de destinguido (10% acético). Finalmente, a captura das imaxes mostradas obtense mediante dixitalización con equipo *Molecular Imager® Gel Doc XR* e o software *Image Lab™* (*Bio-Rad*).

#### 4.3.5 WESTERN BLOT

Para que as proteínas sexan accesibles á detección por anticorpos, son transferidas dende o xel de poliacrilamida a unha membrana de nitrocelulosa por acción dun campo eléctrico (electrotransferencia). Este método susténtase nunha corrente eléctrica e un tampón de transferencia, para levar as proteínas dende o xel á membrana. Para isto, amontóanse na orde descrita os seguintes elementos (do polo negativo, o cátodo; ao polo positivo, o ánodo): esponxa, papeis de filtro empapados en tampón de transferencia, xel, membrana, papeis de filtro e outra esponxa. Esta montaxe, chamada coloquialmente sándwich, dispónse no sistema de transferencia *Mini Trans-Blot Cell* (*Bio-Rad*) e aplícase unha corrente eléctrica, de amperaxe constante a 300 mA durante unha hora.

É preciso bloquear os lugares de unión que quedan libres tras a transferencia, pois en caso de non facerse o anticorpo empregado na detección pode unirse a eles dificultando a distinción da proteína de fusión de interese. Para isto a membrana de nitrocelulosa lávase con 25 mL de TBS durante cinco minutos a temperatura ambiente e posteriormente incúbase en 25 mL de solución de bloqueo (5% p/v de soroalbumina bovina (BSA) en tampón TBS) durante unha hora, tamén a temperatura ambiente. Finalmente lávase tres veces durante cinco minutos con 15 mL de TBST (tampón TBS e 0.1% v/v Tween 20). Deste modo, o anticorpo só poderá unirse ao seu antíxeno específico, reducindo así o ruído de fondo e os falsos positivos.

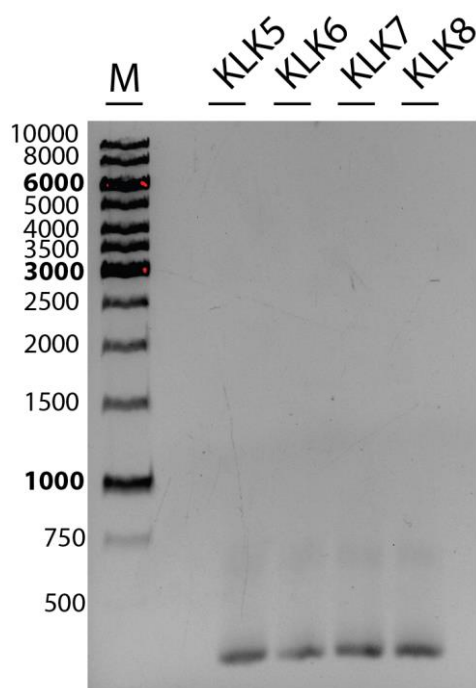
Para a detección empréganse anticorpos monoclonais específicos, neste caso anti-Flag-HRP (*Proteintech*) ou anti-6xHis-HRP (*Proteintech*), que inclúen a peroxidasa de ravo (HRP) para a posterior detección do anticorpo, pois a súa actividade pode medirse facilmente mediante reaccións cromoxénicas ou luminiscentes (Hiraga *et al.*, 2001). Incúbase a membrana en axitación moderada xunto a unha disolución de anticorpo primario (0.5-5µg/mL) en tampón TBST con 5% p/v de BSA durante toda a noite a 4°C.

Posteriormente lávase tres veces durante cinco minutos empregando 15 mL de TBST para eliminar o anticorpo primario que non se uniu especificamente. A membrana revélase empregando o substrato quimio-luminiscente *Pierce ECL Plus* (*Thermo Fisher Scientific*) durante un minuto. Retírase o exceso de solución da membrana sen deixar que se seque. A luz emitida é captada por cámaras CCD, nun sistema *Molecular Imager® Gel Doc XR* e co software *Image Lab* (*Bio-Rad*). Analízase a imaxe por densitometría para avaliar a cantidade relativa de mancha e cuantificar o resultado en termos de densidade óptica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CLONAXE DAS DISTINTAS CONSTRUCCIÓNS PLASMÍDICAS

Os resultados das catro PCR móstranse na **figura 9**, obtense en tódolos casos unha banda única de menos de 500 pares de bases, sendo o tamaño esperado de 170 pares de bases aproximadamente, polo que se procede ao clonaxe no vector pDONR221 mediante reaccións BP.



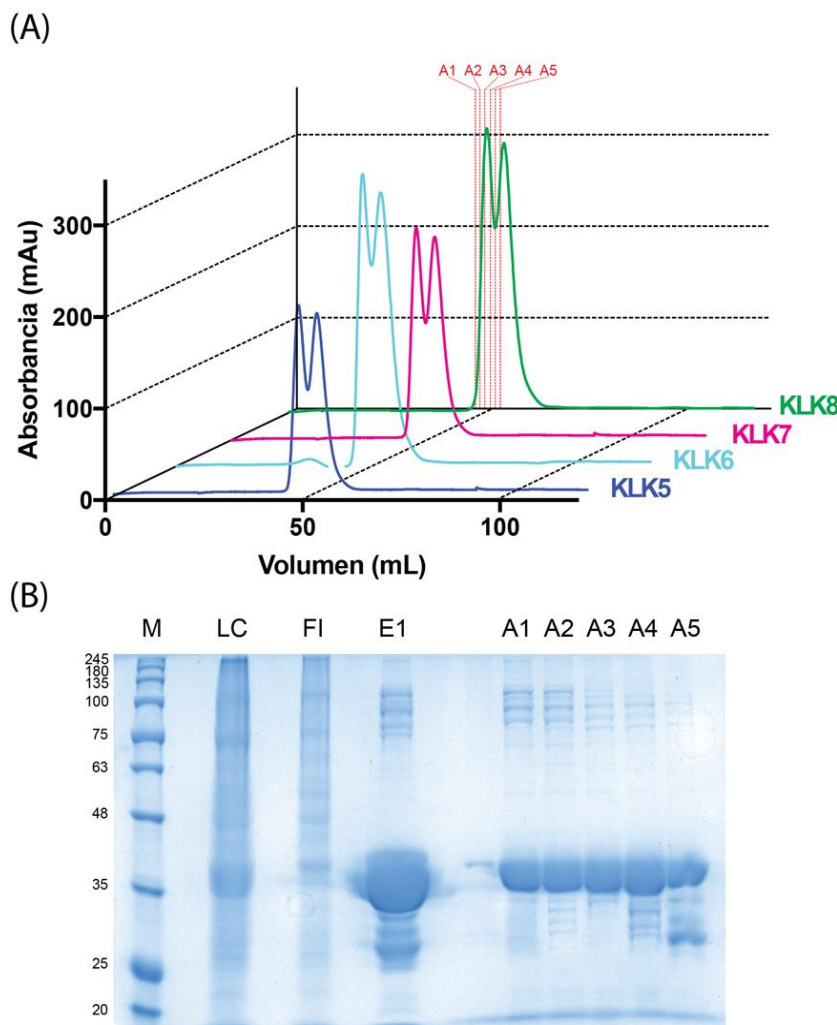
**Figura 9:** xel de agarosa resultado da PCR para as proteínas de fusión elaboradas coas dianas para as catro calcreínas analizadas. M: marcador. Os números á esquerda do xel, sinalan o tamaño de referencia en pb.

De cada unha das reaccións de clonaxe obtéñense máis de 25 colonias. Recóllense dúas colonias de cada placa Petri das transformacións e cultívanse en medio líquido LB en axitación, co fin de obter suficiente masa celular. De cada un dos cultivos realízase unha extracción de ADN plasmídico segundo o procedemento explicado no apartado 4.1.3. Os resultados de ditas preparacións resúmense na táboa S4 (ANEXO IV).

Unha vez obtidos os resultados de secuenciación, procédese a clonar as distintas ORF no vector pDEST-565, deseñado para a expresión heteróloga de proteínas en bacterias. Tras a transformación das distintas reaccións de clonaxe LR e selección en placas LB con ampicilina, obtéñense de novo máis de 25 colonias por placa. Selecciónase unha colonia de cada unha delas e cultívanse en medio líquido LB. Posteriormente elabórase unha preparación de ADN plasmídico (táboa S5, ANEXO IV) para despois transformar células BL21-DE3.

## 5.2 EXPRESIÓN E PURIFICACIÓN DAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN

As proteínas que conteñen as diferentes dianas de corte para as calcreínas purifícanse mediante o uso combinado de cromatografía de afinidade e cromatografía de exclusión molecular (figura 10), seguindo o procedemento anteriormente explicado no apartado 4.3.3.



**Figura 10:** purificación das proteínas de fusión. (A) Cromatograma das proteínas purificadas que conteñen as diferentes dianas de corte para KLK. As liñas puenteadas de cor vermella corresponden ás diferentes alicuotas de 1 mL recollidas para a proteína de fusión que contén a diana de corte para KLK8. (B) Xel SDS-PAGE tinguido con Coomassie que representa os diferentes pasos do proceso de purificación da proteína de fusión que contén a diana de corte para KLK8. M: marcador; LC: lisado celular; FI: fracción inespecífica non unida a columna de níquel-agarosa. E1: eluído da columna de níquel-agarosa con 300 mM de imidazol. A1-A5: alicuotas recollidas na cromatografía de exclusión molecular.

De tódalas fraccións recollidas na cromatografía de exclusión molecular, utilízanse soamente as fraccións A1-A3 para obter uns graos de pureza, das proteínas de interese, superiores ao 90%. Os resultados, en termos de concentración e cantidade total de proteína obtida resúmense na **táboa 4**.

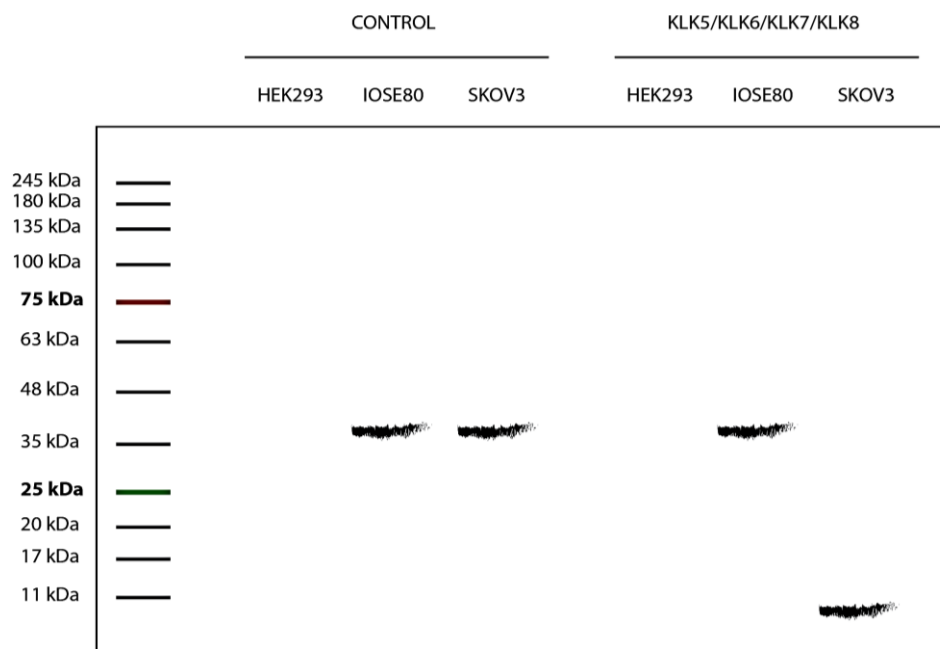
**Táboa 4:** resultados das diferentes purificacións, cuantificadas mediante espectrofotometría utilizando absorbancias a 280nm e coeficientes de extinción molar específicos. . KLK5: 52830 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; KLK6: 52830 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; KLK7: 55810 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; KLK8: 52830 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

	GST-KLK5-Z342	GST-KLK6-Z342	GST-KLK7-Z342	GST-KLK8-Z342
Concentración (mg/mL)	7.234	7.812	6.861	8.012
Proteínas totais (mg)	0.864	0.839	0.763	0.912

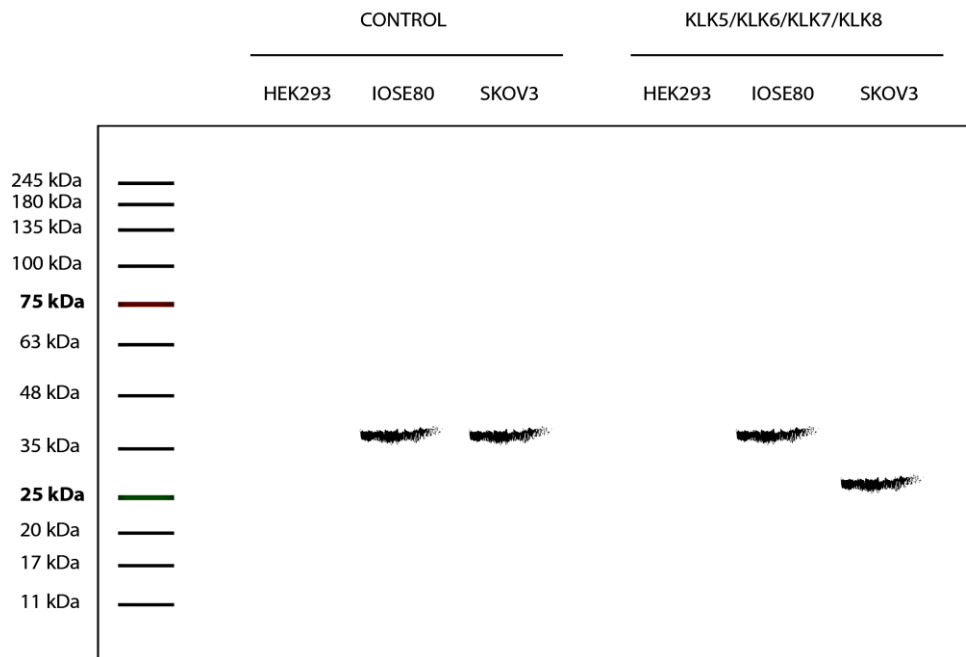
### 5.3 RESULTADOS WESTERN BLOT

Os resultados expostos son unha representación hipotética dos supostos en que a diana que se desexa analizar funcione ou non.

#### 5.3.1 A DIANA FUNCIONA



**Figura 11:** esquema representativo do resultado dunha proba Western blot empregando o anticorpo monoclonal anti-Flag conxugado con HRP. Preséntase o resultado con tres liñas celulares humanas (HEK293, IOSE80 e SKOV3) e un control negativo. Tamaño esperado 6XHis-GST-Z342-Flag: 36.22kDa. Tamaño esperado 6XHis-GST: 27.42kDa. Tamaño esperado Z342-Flag: 8.27kDa.



**figura 12:** esquema representativo do resultado dunha proba Western blot empregando o anticorpo monoclonal anti-6XHis conxugado con HRP. Preséntase o resultado con tres liñas celulares (HEK293, IOSE80 e SKOV3) e un control negativo. Tamaño esperado 6XHis-GST-Z342-Flag: 36.22kDa. Tamaño esperado 6XHis-GST: 27.42kDa. Tamaño esperado Z342-Flag: 8.27kDa.

A **figura 11** e a **figura 12** son representacións do resultado que se obtería empregando a técnica Western blot se na análise das dianas de corte para as calcreínas (KLK5, KLK6, KLK7 e KLK8) se obtivese un resultado positivo, é dicir, a diana fose recoñecida correctamente. En ambas figuras móstrase o mesmo resultado (recoñecemento adecuado da diana) pero a diferenza atópase no anticorpo empregado para a detección da proteína de fusión (anti-Flag ou anti-6XHis).

Empréganse tres liñas celulares: HEK293 (liña celular de ril humano), IOSE80 (liña de celular de tecido ovárico) e SKOV3 (liña celular canceríxena de tecido ovárico).

A liña HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) é unha liña celular humana inmortalizada mediante a transformación cun adenovirus de células obtidas do ril dun feto humano polo investigador Frank Graham en 1977 no seu experimento 293, producíndose unha liña estable inmortalizada (Graham et al., 1977). A liña IOSE80 (*Immortalized Ovarian Surface Epithelium*) é unha liña celular humana inmortalizada, derivada de células epiteliais da superficie ovárica dun individuo san (Choi et al., 2001). A liña SKOV3 tamén é unha liña celular humana inmortalizada, de células ováricas canceríxenas que deriva do fluído ascítico dunha muller caucásica cun tumor ovárico, un adenocarcinoma moderadamente ben diferenciado (*SK-OV-3 Cell Line human 91091004 | Sigma-Aldrich, n.d.*).

Despois de certo número de divisións mitóticas, a maioría das células entran nunha fase de senescencia. A razón principal é o acurtamento progresivo dos extremos dos telómeros, que levan ao dano no ADN xenómico. A restauración da lonxitude dos telómeros pola telomerasa, un complexo de ribonucleoproteínas composto por un patrón interno de ARN e unha transcritasa inversa da telomerasa específica (TRET), leva a evitar a senescencia, é dicir, conseguir inmortalización da célula. A transcritasa inversa da telomerasa está ausente ou presente en niveles moi baixos nas células somáticas senescentes. Varios estudos demostraron que a sobreexpresión

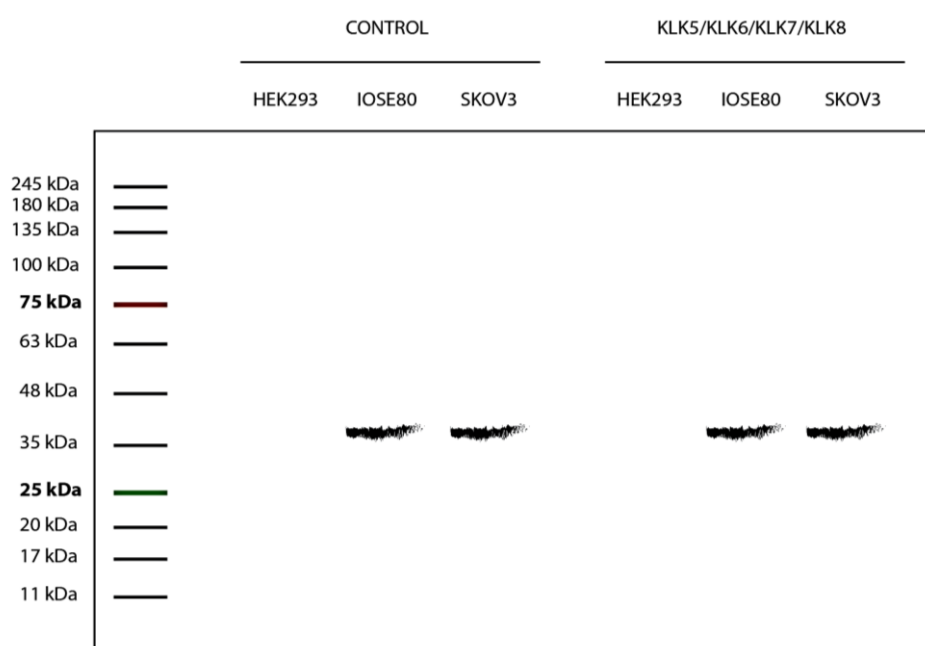
da TRET exóxena humana en forma dun transxene é suficiente para inmortalizar varios tipos de células humanas (Petkov et al., 2018).

Estas tres liñas cultívanse en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con FBS (*Fetal Bovine Serum*) ao 10% v/v e antibióticos 0.1% v/v (mestura de estreptomicina e penicilina) ata alcanzar unha confluencia do 70-80%. Nese momento, engádense 500 µg de cada unha das proteínas de fusión purificadas, previamente esterilizadas por filtración con membrana de 0.22 µm.

En caso de que a diana fose recoñecida correctamente o resultado do Western blot debería ser similar as **figuras 11 e 12** que se amosan. A proteína control só sería detectada na liña celular IOSE80 e na liña celular SKOV3, ambas liñas de tecido ovárico. Nas dúas liñas se detectaría unha banda de aproximadamente 35kDa, que correspondería coa construción **6XHis-GST-Z342-Flag** de 36.22kDa.

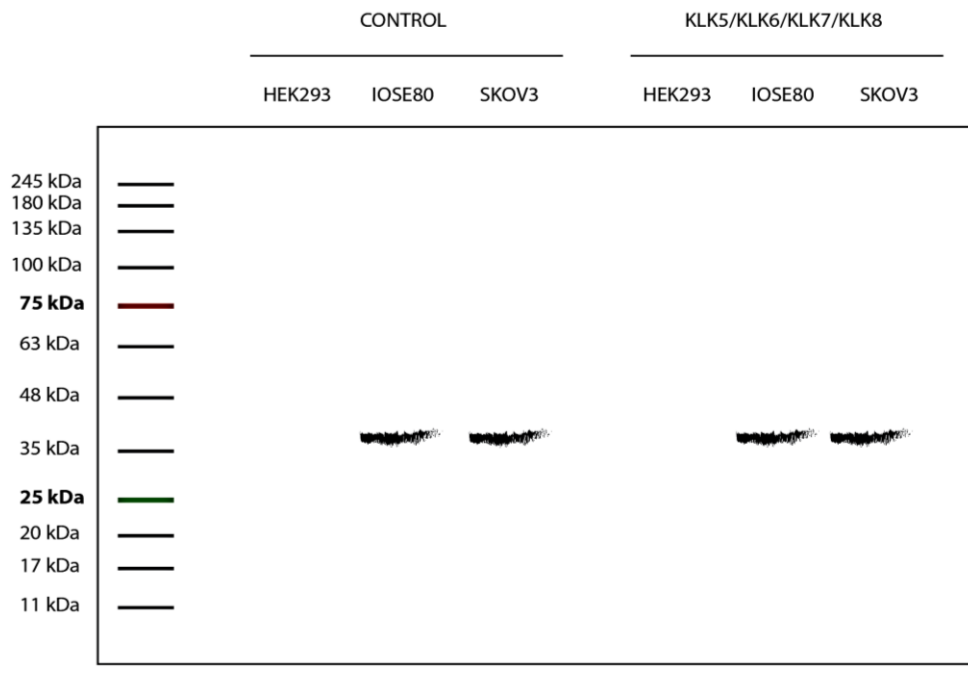
Nas células cultivadas en presenza da construción proteica que contén o corte para as calcreínas, a proteína de fusión sería detectada tamén no interior das liñas IOSE80 e SKOV3. Na liña IOSE80 observaríase unha banda arredor dos 35kDa correspondente á construción completa, como consecuencia da non proteólise (ausente ou con baixa expresión nesta liña celular) pola calcreína correspondente. No caso da liña SKOV3, a banda tería un tamaño menor, como consecuencia da proteólise (presente e con alta expresión nesta liña celular) pola calcreína correspondente. Neste caso, o tamaño da banda sería menor de 35kDa en ambas figuras pero variaría dependendo do anticorpo empregado para a súa detección. No caso de empregarse o anticorpo anti-Flag, a banda atoparíase por debaixo dos 11kDa correspondendo á construción **Z342-Flag** de 8.27kDa. De empregarse o anticorpo anti-6XHis a banda atoparíase arredor dos 25kDa correspondendo á construción **6XHis-GST** de 27.42kDa.

### 5.3.2. A DIANA NON FUNCIONA



**Figura 13:** esquema representativo do resultado dun Western blot empregando o anticorpo anti-Flag. Preséntase o resultado con tres liñas celulares (HEK293, IOSE80 e SKOV3) e un control negativo. Tamaño esperado 6XHis-GST-Z342-Flag: 36.22kDa. Tamaño esperado 6XHis-GST: 27.42kDa. Tamaño esperado Z342-Flag: 8.27kDa.





**Figura 14:** esquema representativo do resultado dun Western blot empregando o anticorpo anti-6XHis. Presentase o resultado con tres liñas celulares (HEK293, IOSE80 e SKOV3) e un control negativo. Tamaño esperado 6XHis-GST-Z342-Flag: 36.22kDa. Tamaño esperado 6XHis-GST: 27.42kDa. Tamaño esperado Z342-Flag: 8.27kDa.

Nas **figuras** anteriores (**13** e **14**) móstrase unha representación dos resultados que se obterían se a diana que se pretende analizar non fose funcional, é dicir, non fose recoñecida adecuadamente. En ambas figuras móstrase un mesmo resultado (recoñecemento erróneo da diana de corte) pero a diferenza atópase no anticorpo empregado para a detección da proteína de fusión (anti-Flag ou anti-6XHis).

Como xa se indicou no **apartado 5.3.1**, empréganse tres liñas celulares: HEK293, IOSE80 e SKOV3 que se cultivan como previamente se indicou nese mesmo apartado.

Os resultados que se obterían neste caso serían os seguintes. A proteína de fusión control non se detectaría na liña celular HEK293, pero si nas liñas celulares IOSE80 e SKOV3. Este resultado sería o mesmo que o que se obtería no caso de que a diana funcione (**apartado 5.3.1**) pois a función do control negativo e detectar variacións alleas ao obxectivo do noso experimento. Co control non se mide a efectividade da diana.

Tendo en conta as liñas celulares cultivadas en presenza da proteína de fusión coa diana de corte para as calcreínas, se a diana non funcionase os resultados serían similares aos que se observan nas **figuras 13** e **14**. A proteína de fusión non sería detectada no caso da liña celular HEK293, pero si se detectaría nas liñas IOSE80 e SKOV3. Como se observa, o resultado sería unha banda arredor dos 35kDa en ambas liñas celulares. O resultado debería ser o mesmo empregando o anticorpo anti-Flag e o anticorpo anti-6XHis. Non debería existir ningunha variación no tamaño da proteína detectado debido a non proteólise en ambos casos.

## 6. DISCUSIÓN

Neste traballo presentáronse unha serie de resultados representativos dos que se obterían do experimento planificado para a análise das proteasas KLK5, KLK6, KLK7 e KLK8, mediante o emprego da técnica Western blot. Propuxéronse dúas situacións opostas que se poderían acadar



con este proxecto, un resultado afirmativo, no que a diana para a proteasa de análise fose efectiva e un resultado negativo no que esta mesma diana non fose efectiva.

En ambos supostos, no que a diana é efectiva e no que a diana non é efectiva, observamos que a proteína de fusión elaborada non se detectaría no interior das células da liña HEK293 mentres que si se detectaría nas liñas IOSE80 e SKOV3, tamén en ambos supostos. A liña HEK293 é unha liña celular humana de ril e as dúas liñas restantes (IOSE80 e SKOV3) son ambas dunha liña celular ovárica, nun caso unha liña celular san (IOSE80) e noutro caso unha liña celular canceríxena (SKOV3). Polo tanto, a diferenza na ingreso da proteína de fusión deberíase á diferenza na natureza do tecido. Isto amosaría que a proteína elaborada posúe especificidade de tecido en favor das liñas celulares ováricas. A especificidade de tecido proporciónaa o *affibody* contra HER2, receptor transmembrana.

Entre as liñas IOSE80 e SKOV3 a diferenza radicaría no tamaño da proteína detectado cando a diana é efectiva. No suposto de que a diana non sexa efectiva, a secuencia de corte da calcreína correspondente non se recoñecería, como consecuencia a proteína de fusión non sería proteolizada e o tamaño detectado sería o correspondente á proteína de fusión completa, unha banda arredor dos 35kDa en ámbalas dúas liñas celulares ováricas. En caso de que a diana fose recoñecida correctamente pola calcreína correspondente, esta proteolizaríaa e o tamaño de proteína detectado na liña SKOV3 sería menor que o da proteína de fusión completa. Na liña IOSE80 a proteína de fusión non debería ser proteolizada ou en baixa medida. Polo tanto a diana de corte para as calcreínas actuaría en favor da selección de células de ovario canceríxenas. Isto é o que se observa nos resultados correspondentes ao recoñecemento adecuado da diana (**apartado 5.3.1**).

Como se entende, neste proxecto preténdese poñer en evidencia a especificidade e sensibilidade de dúas dianas, HER2 e as calcreínas escollidas, cun mesmo obxectivo, a detección específica de tecidos ováricos canceríxenos. O adecuado recoñecemento de ámbalas dúas dianas con levaría unha maior sensibilidade e especificidade dos tratamentos que poidan derivar do seu uso. Este obxectivo é do que parte a elaboración deste proxecto e vese impulsado polo feito de que os tratamentos de quimioterapia actuais son polo xeral só parcialmente efectivos e con levan numerosos efectos secundarios.

A quimioterapia basease na inhibición da división das células de crecemento rápido, característica das células canceríxenas, pero non as únicas, pois tamén afecta a células normais de proliferación rápida como as dos folículos pilosos, a medula ósea ou as células do tracto gastrointestinal. A destrución indiscriminada de células normais e a toxicidade dos axentes quimioterápicos convencionais, fan necesario atopar novos tratamentos específicos máis eficaces (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015). Optimizar os tratamentos oncolóxicos mediante o uso de terapias selectivas, empregando moléculas dirixidas a enzimas específicas ou receptores de factores de crecemento que interfiran con diversos procesos canceríxenos, poden ser as estratexias para mellorar a prognose dos paciente e a calidade do seu tratamento (Tsimberidou, 2015). A elaboración de cargas citotóxicas agregadas a un anticorpo específico para formar un ADC (*antibody-drug conjugate*) proporciona un mecanismo para a liberación dun axente citotóxico de forma específica. A especificidade adquirese mediante un anticorpo dirixido a moléculas da superficie da célula cancerosa. Un dos primeiros ADC en recibir a aprobación para a súa comercialización foi o ado-trastuzumab emtansine en 2013. Tratamento para o cancro de mama HER2-positivo construído con partes do anticorpo anti-HER2 (Lambert & Morris, 2017).

HER2 é un biomarcador ben caracterizado para a terapia dirixida (Satpathy et al., 2019). Luo e colaboradores realizaron unha metanálise de 34 estudos, que incluían datos de 5180 pacientes, no que se demostrou que a expresión de HER2 era maior en epitelio ovárico canceríxeno que en epitelio normal e que este receptor era un indicador de mala prognose (Luo et al., 2018). Os receptores da familia HER, á que pertence este receptor, teñen un papel central no crecemento, a supervivencia e a diferenciación celular, activando múltiples rutas de sinalización nas células normais (Iqbal & Iqbal, 2014). A súa presenza non só na poboación celular canceríxena, abre un oco para a actuación inespecífica que derivaría en efectos adversos debidos á afección das células sans. A inclusión dunha segunda diana permite acotar o rango de actuación e perfeccionar a especificidade do tratamento.

O recoñecemento da diana para calcreínas dentro da célula ovárica, permite dirixir o tratamento cara a poboación cancerosa e non cara toda a poboación celular ovárica. A rede proteolítica que conforman as proteasas calcreínas ten un papel crucial no ambiente tumoroxénico ovárico (Loessner et al., 2018). Análises por *microarray* de xenes demostraron unha sobretranscrición de KLK5-8 e KLK10 no cancro ovárico epitelial (EOC)(Santin et al., 2004). Tamén atopamos estudos que apoian fortemente que a sobreexpresión das calcreínas nos tecidos ováricos conduce a progresión canceríxena. Prezas e colaboradores desenvolveron un estudo onde se observaba un aumento do 92% da carga tumoroxénica en comparación a unha liña celular control (Prezas et al., 2006).

Nunha revisión realizada por Loessner e colaboradores en 2018, tendo en conta resultados de estudos clínicos e biolóxicos, categorizáronse os 15 membros da familia das calcreínas en función dos seus niveis de expresión en tecidos ováricos canceríxenos e normais. Concluiron que as KLK4, KLK5, KLK6 e posiblemente a KLK7 foran as dianas preferentes en estudos de inhibición do cancro ovárico (Loessner et al., 2018). Dende a perspectiva clínica KLK3 é a máis estudada pois está establecida como marcador para o tratamento do cancro de próstata (Yu et al., 2014). A expresión específica de KLK3/PSA na próstata foi explotada como diana para o desenvolvemento de estratexias terapéuticas que inclúen células presentadoras de antíxenos cargadas con PSA ou vacinas de PSA para o cancro de próstata (Sotiropoulou et al., 2009). PROSTVAC, é unha vacina que consiste nun vector recombinante de KLK3 que contén transxenes para tres moléculas coestimuladoras de células T (TRICOM). Esta vacina demostrou o seu éxito inhibindo a proliferación celular e o crecemento de tumores, con poucos efectos secundarios, coa mellora da supervivencia xeral (Stefanini et al., 2015).

O correcto funcionamento de ambas dianas (para HER2 e para a calcreína correspondente) permitiría discernir entre o tecido diana, neste caso tecido ovárico e actuar sobre a poboación celular canceríxena, evitando efectos secundarios derivados da baixa especificidade dos tratamentos actuais. Lu e colaboradores levaron a cabo a construción dunha nanopartícula cargada con doxorubicina e coa diana de recoñecemento de HER2 que detectaba e ingresaba no interior das células tumoroxénicas liberando o contido en doxorubicina. Estas nanopartículas mostraron unha inhibición no crecemento do tumor nun modelo de rato (Lu et al., 2016). A adición dunha segunda diana (para calcreínas) permitiría mellorar a especificidade á hora da aplicación terapéutica de nanopartículas de citotóxico.

## 7. CONCLUSIÓNS

Realizouse unha análise para comprobar a efectividade da diana de corte de catro calcreínas escollidas (KLK5, KLK6, KLK7 e KLK8) en combinación coa diana para o receptor transmembrana HER2, mediante a elaboración de distintas proteínas de fusión e o uso da técnica de Western blot para a súa detección en tres liñas celulares diferentes (HEK293, IOSE80 e SKOV3). Os posibles resultados obtidos desta análise son o recoñecemento inefectivo da diana de corte para as calcreínas indicadas, que desacreditaría a súa validez como biomarcadores efectivos contra o cancro de ovario. Tamén se poden obter resultados que demostren a efectividade desta diana o que sustentaría a hipótese do uso de certas calcreínas como biomarcadores efectivos para o cancro ovárico. Isto podería derivar nunha diana máis adecuada, específica e con maior sensibilidade que se presentaría como un posible punto de partida cara un tratamento contra o cancro de ovario máis efectivo e con reducidos efectos secundarios.

## 7.CONCLUSIONES

Se ha realizado un análisis para comprobar la efectividad de la diana de corte de cuatro calcreínas seleccionadas (KLK5, KLK6, KLK7 e KLK8) en combinación con la diana para el receptor transmembrana HER2, mediante la elaboración de distintas proteínas de fusión y el uso de la técnica Western blot para su detección en tres líneas celulares diferentes (HEK293, IOSE80 e SKOV3). Los posibles resultados obtenidos a partir de este análisis son el reconocimiento inefectivo de la diana de corte para las calcreínas indicadas, que desacreditaría su validez como biomarcadores efectivos contra el cáncer de ovario. También se pueden obtener resultados que demuestren la efectividad de esta diana, lo que sustentaría la hipótesis del uso de ciertas calcreínas como biomarcadores efectivos para el cáncer de ovario. Esto podría derivar en una diana más adecuada, específica y con mayor sensibilidad que se presentaría como un posible punto de partida hacia un tratamiento contra el cáncer ovárico más efectivo y con reducidos efectos secundarios.

## 7.CONCLUSIONS

We have performed an analysis to check the effectiveness of the cut-off target of four selected KLKs (KLK5, KLK6, KLK7 and KLK8) in combination with the target for the HER2 transmembrane receptor by making different fusion proteins and using the Western blot technique to detect them in three different cell lines (HEK293, IOSE80 and SKOV3). The possible results obtained from this analysis are the ineffective recognition of the cut-off target for the given KLKs, which would discredit their validity as effective biomarkers against ovarian cancer. We can also obtain a result that demonstrates the effectiveness of this target, which would support the hypothesis of the use of certain KLKs as effective biomarkers for ovarian cancer. This could lead to a more appropriate, specific and sensitive target that would be presented as a possible starting point towards a more effective treatment against ovarian cancer with reduced side effects.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Albagoush, S. A., & Limaiem, F. (2020). HER2. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*, 36(14), 1755–1761. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(00\)00162-3](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(00)00162-3)

Avgeris, M., Mavridis, K., & Scorilas, A. (2012). Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: From pathobiology to clinical relevance. *Biological Chemistry*, 393(5), 301–317. <https://doi.org/10.1515/hsz-2011-0260>

Avgeris, M., & Scorilas, A. (2016). Kallikrein-related peptidases (KLKs) as emerging therapeutic targets: focus on prostate cancer and skin pathologies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(7), 801–818. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1147560>

Choi, K. C., Kang, S. K., Tai, C. J., Auersperg, N., & Leung, P. C. K. (2001). The regulation of apoptosis by activin and transforming growth factor- $\beta$  in early neoplastic and tumorigenic ovarian surface epithelium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(5), 2125–2135. <https://doi.org/10.1210/jc.86.5.2125>

Connell, C. M., & Doherty, G. J. (2017). Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers. *ESMO Open*, 2. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000279>

Dorn, J., Beaufort, N., Schmitt, M., Diamandis, E. P., Goettig, P., & Magdolen, V. (2014). Function and clinical relevance of kallikrein-related peptidases and other serine proteases in gynecological cancers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 51(2), 63–84. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.865701>

Emami, N., & Diamandis, E. P. (2007). New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Molecular Oncology*, 1(3), 269–287. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.09.003>

Fearon, E. R., & Dang, C. V. (1999). Cancer genetics: Tumor suppressor meets oncogene. *Current Biology*, 9(2), 62–65. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80012-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80012-8)

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), 359–386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

Ferreiro, J., García, J. L., Barceló, R., & Rubio, I. (2003). Quimioterapia: efectos secundarios. *Gaceta Médica de Bilbao*, 100(2), 69–74. [https://doi.org/10.1016/s0304-4858\(03\)74432-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4858(03)74432-1)

Frejd, F. Y., & Kim, K. T. (2017). Affibody molecules as engineered protein drugs. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(3), 1–8. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.35>

Gong, G., Lin, T., & Yuan, Y. (2020). Integrated analysis of gene expression and DNA methylation profiles in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00632-9>

González, A., & Fillat, M. F. (2018). Aspectos Metodológicos de la Expresión de Proteínas Recombinantes en Escherichia coli. *Revista de Educación Bioquímica*, 37(1), 14–27.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), 59–72. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant & Cell Physiology*, 42(5), 462–468. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCE061>

Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/852748>

Januchowski, R., Sterzyńska, K., Zawierucha, P., Ruciński, M., Świerczewska, M., Partyka, M., Bednarek-Rajewska, K., Brazert, M., Nowicki, M., Zabel, M., & Klejewski, A. (2017). Microarray-based detection and expression analysis of new genes associated with drug resistance in ovarian cancer cell lines. *Oncotarget*, 8(30), 49944–49958. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18278>

Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C., & Ledermann, J. A. (2014). Ovarian cancer. *The Lancet*, 384, 1376–1388. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62146-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62146-7)

Jeyaraman, M. M., Abou-Setta, A. M., Grant, L., Farshidfar, F., Copstein, L., Lys, J., Gottschalk, T., Desautels, D., Czaykowski, P., Pitz, M., & Zarychanski, R. (2019). Dairy product consumption and development of cancer: An overview of reviews. *BMJ Open*, 9, 1–13. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023625>

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2015). *Histología básica* (12th ed.). Medica Panamericana.

Kossai, M., Leary, A., Scoazec, J.-Y., & Genestie, C. (2018). Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology*, 85(1–2), 41–49. <https://doi.org/10.1159/000479006>

Lambert, J. M., & Morris, C. Q. (2017). Antibody–Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review. *Advances in Therapy*, 34(5), 1015–1035. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0519-6>

Lim, H. J., & Ledger, W. (2016). Targeted therapy in ovarian cancer. *Women's Health*, 12(3), 363–378. <https://doi.org/10.2217/whe.16.4>

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Scott, M. P. (2016). *Biología celular y molecular*. (7th ed.). Medica Panamericana.

Loessner, D., Goettig, P., Preis, S., Felber, J., Bronger, H., Clements, J. A., Dorn, J., & Magdolen, V. (2018). Kallikrein-related peptidases represent attractive therapeutic targets for ovarian cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(9), 745–763. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1512587>

Löfblom, J., Feldwisch, J., Tolmachev, V., Carlsson, J., Ståhl, S., & Frejd, F. Y. (2010). Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Letters*, 584(2010), 2670–2680. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.014>

Lu, N., Tian, Y., Tian, W., Huang, P., Liu, Y., Tang, Y., Wang, C., Wang, S., Su, Y., Zhang, Y., Pan, J., Teng, Z., & Lu, G. (2016). Smart Cancer Cell Targeting Imaging and Drug Delivery System by Systematically Engineering Periodic Mesoporous Organosilica Nanoparticles. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(5), 2985–2993. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b09585>

Luo, H., Xu, X., Ye, M., Sheng, B., & Zhu, X. (2018). The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. *PLOS ONE*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191972>

McGuire, M. J., Li, S., & Brown, K. C. (2009). Biosensors and Biodetection. In A. Rasooly & K.

E. Herold (Eds.), *Methods Mol Biol.* (Vol. 504). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-569-9>

Moasser, M. M. (2007). The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, *26*, 6469–6487. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>

Nygren, P. Å. (2008). Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS Journal*, *275*(11), 2668–2676. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06438.x>

Ocaña, A., Amir, E., & Pandiella, A. (2020). HER2 heterogeneity and resistance to anti-HER2 antibody-drug conjugates. *Breast Cancer Research*, *22*(13), 1–3. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-1252-7>

Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *93*, 52–79.

Petkov, S., Kahland, T., Shomroni, O., Lingner, T., Salinas, G., Fuchs, S., Debowski, K., & Behr, R. (2018). Immortalization of common marmoset monkey fibroblasts by piggyBac transposition of hTERT. *PLoS ONE*, *13*(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204580>

Prezas, P., Arlt, M. J. E., Viktorov, P., Soosaipillai, A., Holzscheiter, L., Schmitt, M., Talieri, M., Diamandis, E. P., Krüger, A., & Magdolen, V. (2006). Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biological Chemistry*, *387*(6), 807–811. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.102>

Reese, D. M., & Slamon, D. J. (1997). HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells*, *15*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/stem.150001>

Roett, M. A., & Evans, P. (2009). Ovarian cancer: An overview. *American Family Physician*, *80*(6), 609–616.

Santin, A. D., Zhan, F., Bellone, S., Palmieri, M., Cane, S., Bignotti, E., Anfossi, S., Gokden, M., Dunn, D., Roman, J. J., O'Brien, T. J., Tian, E., Cannon, M. J., Shaughnessy, J., & Pecorelli, S. (2004). Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: Identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Cancer*, *112*(1), 14–25. <https://doi.org/10.1002/ijc.20408>

Satpathy, M., Wang, L., Zielinski, R. J., Qian, W., Wang, Y. A., Mohs, A. M., Kairdolf, B. A., Ji, X., Capala, J., Lipowska, M., Nie, S., Mao, H., & Yang, L. (2019). Targeted drug delivery and image-guided therapy of heterogeneous ovarian cancer using HER2-targeted theranostic nanoparticles. *Theranostics*, *9*(3), 778–795. <https://doi.org/10.7150/thno.29964>

*SK-OV-3 Cell Line human 91091004 | Sigma-Aldrich.* (n.d.). Retrieved May 21, 2020, from [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_91091004?lang=es&region=ES](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_91091004?lang=es&region=ES)

Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., & Diamandis, E. P. (2009). Functional roles of human Kallikrein-related peptidases. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(48), 32989–32994. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.027946>

Ståhl, S., Gräslund, T., Eriksson Karlström, A., Frejd, F. Y., Nygren, P. Å., & Löfblom, J. (2017).



Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications. *Trends in Biotechnology*, 35(8), 691–712. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.007>

Stefanini, A. C. B., Da Cunha, B. R., Henrique, T., & Tajara, E. H. (2015). Involvement of kallikrein-related peptidases in normal and pathologic processes. *Disease Markers*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/946572>

*Tissue expression of ERBB2 - Summary - The Human Protein Atlas*. (n.d.). Retrieved May 9, 2020, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/tissue>

Tsimberidou, A.-M. (2015). TARGETED THERAPY IN CANCER. *Cancer Chemother Pharmacol*, 76(6), 1113–1132. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2861-1>

Wang, D., Zhu, H., Ye, Q., Wang, C., & Xu, Y. (2016). Prognostic value of KIF2A and HER2-neu overexpression in patients with epithelial ovarian cancer. *Medicine (United States)*, 95(8), 1–8. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002803>

Xue, X., Wang, B., Du, W., Zhang, C., Song, Y., Cai, Y., Cen, D., Wang, L., Xiong, Y., Jiang, P., Zhu, S., Zhao, K. N., & Zhang, L. (2016). Generation of affibody molecules specific for HPV16 E7 recognition. *Oncotarget*, 7(45), 73995–74005. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12174>

Yu, Y., Prassas, I., & Diamandis, E. P. (2014). Putative kallikrein substrates and their (patho)biological functions. *Biological Chemistry*, 395(9), 931–943. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0129>

## 8.1 PROTOCOLOS:

INVITROGEN. (2009). Gateway<sup>®</sup> Technology with Clonase<sup>™</sup> II A universal technology to clone DNA. In *Analysis*.

INVITROGEN. (2004). *One Shot<sup>®</sup> OmniMAX<sup>™</sup> 2 T1 Phage-Resistant Cells*.

Thermo Scientific. (n.d.). *Product Information: GeneJET Plasmid Miniprep Kit, #K0502*.

Thermo Scientific. (2015). *Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit*. 1–11. [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012661\\_GeneJET\\_Gel\\_Extraction\\_U G.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_U G.pdf)

*Western Blot*. (2011).

*Western Blotting Protocol | CST Cell Signaling Technology*. (n.d.). Retrieved May 21, 2020, from <https://www.cellsignal.com/contents/resources-protocols/western-blotting-protocol/western>

## ANEXO I:

### Táboa S1: clasificación dos estadios FIGO para os cancros xinecolóxicos

#### **Cancro de ovario:**

FIGO I: o tumor encóntrase limitado a un ou a ambos ovarios.

FIGO II: o tumor mostra extensións pelvianas.

FIGO III: o tumor presenta metástase peritoneal fóra da pelve ou implicado en nodos linfáticos.

FIGO IV: metástase distante.

---

#### **Cancro endometrial:**

FIGO I: o tumor está confinado no útero.

FIGO II: o tumor invadiu o estroma cervical pero non máis alá do útero.

FIGO III: o tumor invadiu a capa serosa (superficie do útero) ou os órganos adxacentes (ovario ou vaxina) ou os nodos linfáticos.

FIGO IV: o tumor está infiltrado noutros órganos como a vexiga ou o intestino ou produciuse metástase a distancia.

---

#### **Cancro cervical:**

FIGO I: o tumor está confinado a área cervical.

FIGO II: o tumor diseminouse máis alá do cérvix pero segue confinado na area pelviana.

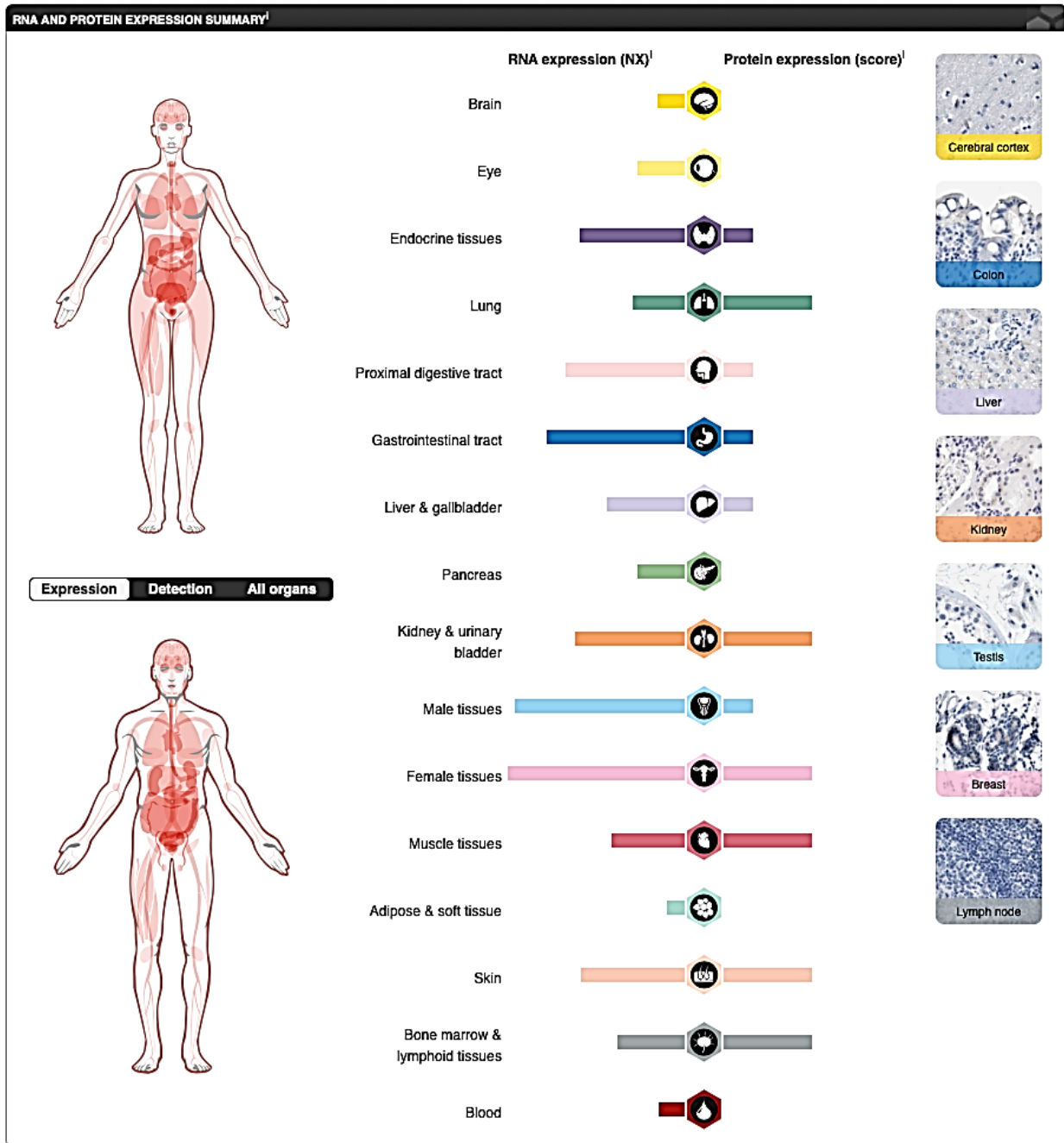
FIGO III: o tumor está diseminado á parede pelviana ou á parte baixa da vaxina.

FIGO IV: o tumor diseminouse a outros órganos pelvianos ou produciuse metástase a distancia.

---



ANEXO II:



Fonte: [proteinatlas.org](http://proteinatlas.org)

## ANEXO III

**Táboa S2: cebadores empregados nas reacción de clonaxe.**

CEBADORES	SECUENCIA	AMPLIFICACIÓN
AJVV077R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTACAGTTCGTCTTTCT TGTCATCGTCATCCTTGTAGTCCAGTTTTTTTCGCTTCCGCCAGCAGG	Z342
AJVV084F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAGACGAACTGCCG TTTCGTGGTAGCGGTGCGGGTTCTGGCGCC	KLK5-Z342
AJVV085F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAGACGAACTGGG CCCGCGTGGTAGCGGTGCGGGTTCTGGCGCC	KLK6-Z342
AJVV086F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAGACGAACTGTAT CTGTGCTATCAGGGTAGCGGTGCGGGTTCTGGCGCC	KLK7-Z342
AJVV087F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAAGACGAACTGGT GGTGCCTGGTAGCGGTGCGGGTTCTGGCGCC	KLK8-Z342

## ANEXO IV: concentracións resultantes das cuantificacións de ADN.

**Táboa S3: cuantificación de ADN correspondente ao apartado 4.2.3**

PROTEASA DIANA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
KLK5	96
KLK6	100
KLK7	280
KLK8	350

**Táboa S4: cuantificación de ADN correspondente ao apartado 5.1**

PROTEASA DIANA	CANDIDATOS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
KLK5	CANDIDATO 1	157
	CANDIDATO 2	115
KLK6	CANDIDATO 1	156
	CANDIDATO 2	139
KLK7	CANDIDATO 1	128
	CANDIDATO 2	176
KLK8	CANDIDATO 1	175
	CANDIDATO 2	149

**Táboa S5: cuantificación de ADN correspondente ao apartado 5.1**

PROTEASA DIANA	CONCENTRACIÓN (µg/mL)
KLK5	79
KLK6	115
KLK7	109
KLK8	52