



**Títol del treball:** Anàlisi de proteïnes portadores de l'antigen Sialil Lewis x (sLe<sup>x</sup>) en cèl·lules tumorals del càncer de pàncrees.

**Estudiant:** Míriam Peracaula Domínguez

Grau en Biologia i

**Correu electrònic:** miriamperacaula@gmail.com

Grau en Biotecnologia

**Tutor:** Rosa Peracaula Miró

**Empresa / institució:** Universitat de Girona;

Facultat de Ciències; Departament de Biologia;

Grup de recerca Bioquímica del càncer

**Vistiplau tutor :**

**Nom del tutor:** Rosa Peracaula Miró

**Empresa / institució:** Universitat de Girona

**Correu(s) electrònic(s):** rosa.peracaula@udg.edu

## **AGRAÏMENTS**

Primer de tot, m'agradaria agrair a tot el grup de recerca Bioquímica del Càncer per haver-me fet sentir part del seu grup durant tots aquests mesos. Vull donar les gràcies, en especial, a la Dra. Rosa Peracaula per haver-me donat la oportunitat de realitzar el treball de fi de grau en aquest grup de recerca, però sobretot, per la dedicació, paciència i la delicadesa quan els resultats que buscàvem no sortien com esperàvem. També, vull donar les gràcies a Dra. Esther Llop, perquè tot i que, no tutoritzava el meu treball sempre m'ha transmès que si tenia algun problema podia recórrer a ella.

També m'agradaria donar les gràcies a tots els estudiants de doctorat que estan en el laboratori de bioquímica per la seva ajuda infinita. En el cas de la Laura i l'Anna, la paraula gràcies es queda curta ja que sempre han estat predisposades a ajudar-me amb el que calgués, i en fer-me sentir totalment integrada en el grup. A en Pedro, li vull agrair la majoria de coses que he après a fer al laboratori ja que va ser el primer que em va acollir quan vaig arribar. I, a l'Adrià li dono les gràcies pel bon rotllo que transmet sense ell ni saber-ho. I, per suposat, a la Montse per la seva alegria i suport constant.

Finalment, vull donar les gràcies a la meva família per tots els ànims i per haver suportat el meu caràcter en moments de tensió i nervis durant el treball.

Moltes gràcies a tots els que heu format part i heu fet possible aquest treball!

## RESUM

El càncer és una de les malalties amb major incidència i una de les causes principals de mort en tot el món. En concret, el càncer de pàncrees (PaC) té una taxa de supervivència molt baixa degut, entre d'altres factors, a la dificultat de diagnosticar-lo en estadis inicials.

Les cèl·lules de PaC presenten alteracions en els patrons de glicosilació, com un augment de l'antigen glucídic Sialil Lewis x (sLe<sup>x</sup>), que està relacionat amb la seva capacitat d'invasió i metàstasi. La biosíntesi de sLe<sup>x</sup> requereix en les últimes etapes dels enzims  $\alpha$ -2,3-sialil-transferases ST3Gal III o ST3Gal IV. En aquest projecte s'ha treballat amb dues línies cel·lulars de PaC, Capan-1 i BxPC3, i amb les seves corresponents línies cel·lulars silenciades amb shRNAs contra els gens ST3GAL3 (sh7 i sh9) o ST3GAL4 (sh1 i sh4). L'objectiu d'aquest treball ha estat analitzar les diferències d'expressió de sLe<sup>x</sup> entre les línies silenciades respecte a les línies cel·lulars control, i determinar les proteïnes portadores del sLe<sup>x</sup> que hagin disminuït el seu contingut en sLe<sup>x</sup> en les línies silenciades.

Per aquests anàlisis, s'han cultivat les línies cel·lulars silenciades (sh1, sh4, sh7 i sh9 de Capan-1 i sh1, sh7 i sh9 de BxPC3) i les control. S'han avaluat dues metodologies per obtenir llistats proteics de les línies cel·lulars, i a partir de la seva quantificació s'ha comparat per *Western Blot* (WB) amb anticossos anti-sLe<sup>x</sup> les diferències d'expressió de sLe<sup>x</sup> entre les línies silenciades i control, on les silenciades han presentat una disminució del nivell de sLe<sup>x</sup> respecte les control, sobretot, en proteïnes de massa molecular elevada, superior a 180kDa. Per poder identificar algunes d'aquestes proteïnes s'han analitzat els llistats proteics per electroforesi bidimensional.

A partir de l'optimització de les condicions de l'electroforesi bidimensional, comparant la tinció amb blau de *Coomassie* i el WB amb sLe<sup>x</sup>, s'han detectat una sèrie de proteïnes que presenten senyal de sLe<sup>x</sup> en totes les línies cel·lulars tant control com silenciades, on s'han identificat, per massa molecular i punt isoelèctric, vuit proteïnes amb senyal per sLe<sup>x</sup> en cèl·lules Capan-1 i vuit proteïnes en cèl·lules BxPC3. En el cas de Capan-1 s'han pogut identificar tres proteïnes amb senyal per sLe<sup>x</sup> en les línies control però que no es detecten en les línies silenciades, i en el cas de BxPC3 una proteïna amb senyal per sLe<sup>x</sup> que no es detecta en les línies silenciades corresponents.

## RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia y una de las causas principales de muerte en todo el mundo. En concreto, el cáncer de páncreas (PaC) tiene una tasa de supervivencia muy baja debido, entre otros factores, a la dificultad de diagnosticarlo en estadios tempranos.

Las células de PaC presentan alteraciones en los patrones de glicosilación, como un aumento del antígeno glucídico Sialil Lewis x (sLe<sup>x</sup>) que está relacionada con su capacidad de invasión y metástasis. La biosíntesis de sLe<sup>x</sup> requiere en las últimas etapas las enzimas  $\alpha$ -2,3-sialil-transferasas ST3Gal III o ST3Gal IV. En este proyecto se ha trabajado con dos líneas de PaC Capan-1 y BxPC3 y con sus correspondientes líneas celulares silenciadas con shRNAs contra los genes ST3GAL3 (sh7 y sh9) o ST3GAL4 (sh1 y sh4). El objetivo de este trabajo ha sido analizar las diferencias de expresión de sLe<sup>x</sup> entre las líneas silenciadas respecto a las líneas celulares control, y determinar las proteínas portadoras del sLe<sup>x</sup> que hayan disminuido su contenido en sLe<sup>x</sup> en las líneas silenciadas.

Para estos análisis, se han cultivado las líneas celulares silenciadas (sh1, sh4, sh7 y sh9 de Capan-1 y sh1, sh7 y sh9 de BxPC3) y control. Se han evaluado dos metodologías para obtener estos lisados proteicos de las líneas celulares y a partir de su cuantificación, se ha comparado por *Western Blot (WB)* con anticuerpos anti-sLe<sup>x</sup> las diferencias de expresión de sLe<sup>x</sup> entre las líneas silenciadas y control, donde las silenciadas han presentado una disminución del nivel de sLe<sup>x</sup> respecto las control, sobretodo, en proteínas de masa molecular elevada, superior a 180kDa. Para poder identificar alguna de estas proteínas se han analizado los lisados proteicos por electroforesis bidimensional.

A partir de la optimización de las condiciones de la electroforesis bidimensional, comparando la tinción de azul de *Coomassie* i el WB con sLe<sup>x</sup> se han detectado una serie de proteínas que presentan señal de sLe<sup>x</sup> en todas las líneas celulares tanto en las control como silenciadas, donde se han identificado, por masa molecular i punto isoeléctrico, ocho proteínas con señal por sLe<sup>x</sup> en células Capan-1 y ocho proteínas en células BxPC3. En el caso de Capan-1 se han podido identificar tres proteínas con señal sLe<sup>x</sup> en las líneas control pero que no se detectan en las líneas silenciadas, y en el caso de BxPC3 una proteína con señal sLe<sup>x</sup> que no se detecta en las líneas silenciadas correspondientes.

## ABSTRACT

Cancer is one of the most frequent diseases and one of the leading causes of death worldwide. Specifically, pancreatic cancer (PaC) has a very low survival rate due to the difficulty of diagnosing it in the early stages, among other factors.

The PaC cells present alterations in their glycosylation pattern of their cell surface, such as an increase of Sialyl Lewis x (sLe<sup>x</sup>) carbohydrate antigen which is related to their invasion capacity and metastasis. In the last stages of the sLe<sup>x</sup> biosynthesis are required the enzymes  $\alpha$ -2,3-sialyltransferases ST3Gal III or ST3Gal IV. In this project we have worked with two tumour cell lines; Capan-1 and BxPC3 and their respected silenced cell lines with shRNAs against the genes ST3GAL3 (sh7 and sh9) or ST3GAL4 (sh1 and sh4). The objective of this project was to analyze the differences of expression of sLe<sup>x</sup> between the silenced lines respect to the control cell lines, and to determine the carriers of sLe<sup>x</sup> that have decreased their content in sLe<sup>x</sup> in the silenced lines.

For these analyses, all the silenced (sh1, sh4, sh7 and sh9 of Capan-1 and sh1, sh7 and sh9 of BxPC3) and control cell lines have been cultivated. Two methodologies have been evaluated to obtain their protein cell lysate, and based on their quantification, we have compared the differences in sLe<sup>x</sup> expression between silenced lines and control cell lines using anti-sLe<sup>x</sup> in *Western Blot (WB)*. The silenced cell lines show a decrease in sLe<sup>x</sup> signal respect to the control lines, especially in high molecular weight proteins above 180kDa. In order to identify some of these proteins, we have analyzed the protein cell lysate using two-dimensional electrophoresis.

Based on the optimization of the two-dimensional electrophoresis, we have compared the blue Coomassie stain and the WB with sLe<sup>x</sup>, and we have detected a group of protein that present a sLe<sup>x</sup> signal in the control and in the silenced cell lines. Using their molecular mass and their isoelectric point we detected eight protein with sLe<sup>x</sup> signal in all Capan-1 cell lines and eight proteins in all BxPC3 cells lines. In the case of Capan-1, we have identified three proteins with sLe<sup>x</sup> signal in control cell lines but not in their silenced cell lines, and in the case of BxPC3 one protein with sLe<sup>x</sup> signal which is not detected in their respected silenced cell lines.

# ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1 Càncer.....	1
1.2 Càncer de pàncrees .....	2
1.3 Glicobiologia .....	3
1.3.1 Sialil-transferases (ST) .....	6
1.3.2 Antígens Sialil Lewis (sLe <sup>x</sup> i sLe <sup>a</sup> ).....	6
2. OBJECTIUS I HIPOTESIS .....	8
3. MATERIAL I METODOLOGIA .....	9
3.1 Línies cel·lulars.....	9
3.2 Tècniques de cultius cel·lulars .....	9
3.2.1 Protocol de descongelació.....	9
3.2.2 Protocol de canvi de medi.....	10
3.2.3 Protocol de tripsinització.....	10
3.2.4 Protocol de recompte cel·lular .....	11
3.2.5 Sembra cel·lular .....	12
3.3 Tècniques de bioquímica .....	12
3.3.1 Protocol d'obtenció dels llisats cel·lulars .....	12
3.3.2 Protocol Bradford .....	13
3.3.3 Protocol d'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS .....	14
3.3.4 Protocol d'electroforesi bidimensional (E2D) .....	15
3.3.5 Tinció Blau de Coomassie .....	17
3.3.6 Tinció de nitrat de plata.....	17
3.3.7 Protocol Western Blot .....	17
3.3.8 Protocol Stripping.....	19
3.4 Anàlisi de imatges.....	19
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	20
4.1 Obtenció dels llisats cel·lulars i quantificació proteica.....	20
4.2 Anàlisi de l'expressió de Sialil Lewis x en les línies cel·lulars de PaC silenciades amb gens de ST3GAL3 i ST3GAL4, per SDS-PAGE i Western Blot.....	22
4.2.1 Anàlisi proteic .....	22
4.2.2 Anàlisi del senyal Sialil Lewis x en les línies cel·lulars de PaC silenciades amb els gens de ST3GAL3 i ST3GAL4 per SDS-PAGE i Western Blot.....	23
4.2.3 Anàlisi de la quantitat de proteïna transferida en una membrana mitjançant un <i>stripping</i> <anti-tubulina>.....	23
4.3. Electroforesi bidimensional per analitzar els llisats proteics de les línies cel·lulars de Capan-1 i BxPC3	24

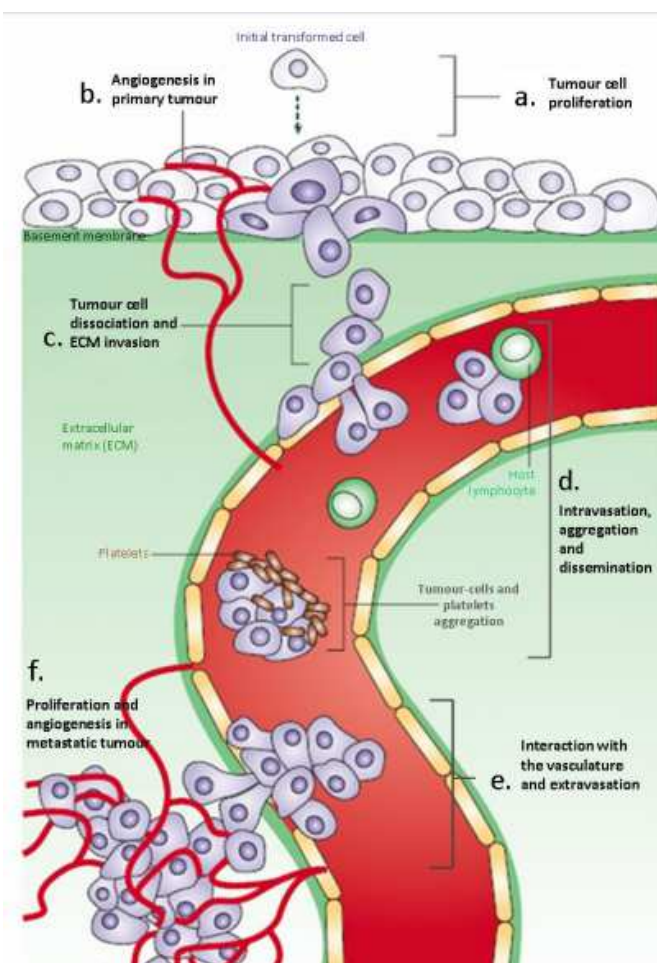
4.3.1 Optimització condicions de l'electroforesi 2D.....	24
4.4 Anàlisi dels llistats cel·lulars per electroforesi 2D i posterior <i>Western Blot</i> amb anticossos anti-sLe <sup>x</sup> ....	27
4.4.1 Línies cel·lulars Capan-1 .....	27
4.4.2 Línees cel·lulars BxPC3.....	29
4.4.3. Canvis generals en el patró de sLe <sup>x</sup> en les línies silenciades vs. les corresponents scramble.....	30
4.5. Detecció de proteïnes d'elevat pes molecular .....	31
4.6 Observacions /Comentaris finals.....	33
5. CONCLUSIONS .....	34
6. SOSTENIBILITAT I ÈTICA .....	35
7. BIBLIOGRAFIA .....	36

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1 Càncer

Actualment, el càncer s'ha convertit en un dels problemes de salut més preocupants arreu del món (Siegel, et al., 2015). Presenta una taxa de incidència cada vegada més elevada, provocant que sigui una de les causes de mort principals en el món amb 9.5 milions de morts en el 2018, i s'espera que augmenti en les pròximes dècades (Ferlay, et al., 2018).

El càncer és un terme genèric emprat per definir un grup de malalties caracteritzades per presentar una proliferació excessiva de les cèl·lules degut a alguna desregulació d'alguns dels mecanismes de control de creixement cel·lular, afectant així a la pèrdua de l'homeòstasi. Posteriorment a aquest descontrol, aquestes cèl·lules anomenades tumor o neoplàsia adquiriran la capacitat invasiva. Quan es parla de capacitat invasiva fa referència a que aquestes cèl·lules migren des de la seva regió d'origen a altres òrgans o teixits sans a través del sistema circulatori o limfàtic, i si sobreviuen a aquest conjunt de successos s'assenten a nous teixits, aquest fenomen es coneix com a metàstasi (Hejmadi, 2010). Quan una neoplàsia acaba generant una metàstasi significa que ha resistit a un conjunt de fenòmens d'estrès cel·lular com l'acció del sistema immunitari o sistemes fisiològics com l'entrada al torrent sanguini. Durant aquest procés metastàtic és essencial que les cèl·lules es puguin adherir als endotelis abans de l'extravasació (**Figura 1**). Aquesta unió es produeix en primer terme a través de la interacció de les *E-selectines* dels vasos sanguinis amb alguns lligands de les cèl·lules tumorals com són: antigens glucídics Sialil Lewis x (sLe<sup>x</sup>), Sialil Lewis a (sLe<sup>a</sup>) (Reymond, et al., 2013).



**Figura 1.** Etapes de la progressió de les cèl·lules tumorals. a. Proliferació i creixement descontrolat de les cèl·lules. b. Formació del primer tumor (necessitat d'angiogènesi). c. Migració i colonització de les cèl·lules tumorals cap al torrent sanguini. d. Migració a través del corrent sanguini cap a un nou teixit. e. Extravasació. f. Formació d'un segon tumor (metàstasi). Extret de (Fuster & Esko, 2005) (Bassagañas, 2014).



Així doncs, el terme càncer maligne s'utilitza quan es produeixen els anteriors fenòmens descrits; descontrol del creixement i proliferació cel·lular, migració, invasió i metàstasi (Hanahan & Weinberg, 2011). En canvi, quan únicament es produeix un creixement anormal d'un conjunt de cèl·lules es tracte de tumors benignes, els quals hauran de ser extirpats (Weinberg, 2007) (**Figura 1**).

Com s'ha comentat, l'origen de l'aparició d'un tumor es troba en un descontrol en els mecanismes de control del creixement i/o proliferació cel·lular. Aquest descontrol ve originat per l'aparició de mutacions en el grup de gens conegut com a oncògens<sup>1</sup> i/o els gens supressors de tumors<sup>2</sup>, entre d'altres. En el primer grup les mutacions provoquen una sobreactivació provocant una increment en el creixement i la divisió cel·lular, mentre que en el segon grup provoquen una pèrdua de funció fent que no es pugui inhibir la divisió cel·lular i induir la apoptosi (Knudson, 2001). S'han descrit diferents capacitats que adquireixen les cèl·lules tumorals per esdevenir malignes: senyalització de la proliferació i insensibilitat a senyals de repressió de creixement, evasió de l'apoptosi, permetre la seva replicació immortal, inducció de l'angiogènesi i activació de la invasió i metàstasi (Hanahan & Weinberg, 2011). A més, s'ha detectat un metabolisme alterat (Tennant, et al., 2009), presència de substàncies inflamatòries, evasió del sistema immunitari, i interacció amb l'estroma tumoral que afavoreixen els processos descrits. També s'han descrit alteracions en el glicoma de les cèl·lules tumorals que influeixen en aquests processos (Weinberg, 2007): limitació en el potencial replicatiu, invasió i metàstasi de teixit (Hanahan & Weinberg, 2011) (Pietras & Ostman, 2010).

Aproximadament, el 90% dels tumors presenten el seu origen en els teixits epitelials, probablement perquè estan més exposats a carcinògens degut a la seva localització i perquè tenen la capacitat de dividir-se durant més temps. Aquests tipus de tumors són coneguts com a carcinomes (Weinberg, 2007). Dins del carcinomes es poden trobar els adenocarcinomes que fa referència a aquells tumors on els seu origen és el teixit glandular, i es troben normalment en el colon, ovari, pit, pròstata i en el teixit pancreàtic, entre d'altres (National Cancer Institute, 2015). No obstant, el càncer es pot classificar en més de 100 tipus diferents, i els diferents subtipus de tumor es poden trobar a òrgans específics on les cèl·lules que l'originen presenten diferents alteracions.

## 1.2 Càncer de pàncrees

La incidència de morts degut a l'aparició de tumors pancreàtics ha anat augmentat gradualment, mentre que la incidència i la mortalitat d'altres càncers més comuns ha anat disminuint. Actualment, un 4.5% de la població mundial afectada pel càncer mor a causa del càncer de pàncrees (American Cancer Society, 2018). Tanmateix, només un 4% del pacients sobreviu 5 anys després del diagnòstic, la resta presenta una mitjana de supervivència de 3 a 6 mesos després del diagnòstic. Aquest fet s'explica per la falta d'agents quimioterapèutics eficaços en aquest tipus de càncer. Per aconseguir-ho cal conèixer de manera molt acurada el mecanisme biològic que contribueix al desenvolupament i a la progressió dels tumors pancreàtics (Vicent, et al., 2011).

El pàncrees és un òrgan glandular que es localitza darrera l'estómac i morfològicament es divideix en quatre parts (cap, coll, cos i cua), i té com a principals funcions el fet d'ajudar a la correcta digestió dels aliments (de Braud, et al., 2004) i la producció d'hormones. Així doncs, aquest òrgan es pot anomenar glàndula mixta ja que histològicament es pot dividir en dues regions funcionals: per una banda presenta el component endocrí

---

<sup>1</sup> Gens que activen el creixement i la divisió cel·lular.

<sup>2</sup> Gens implicats en la inhibició de la divisió cel·lular i indueixen l'apoptosi.

que representa un 1% de la massa total i que està constituït per un conjunt de poblacions cel·lulars que es troben en els illots de Langerhans i produeixen un conjunt d'hormones com la insulina i el glucagó. D'altra banda, també es defineix com una glàndula exocrina perquè les cèl·lules acinars secreten el suc pancreàtic al sistema ductal. El suc pancreàtic conté enzims digestius, que en el duodè afavoreixen l'absorció i la digestió del nutrients (Vegue, 2004) (Siegel, et al., 2015).

Pel que fa el càncer de pàncrees s'ha vist que la majoria de casos corresponen a càncers pancreàtics exocrins (American Cancer Society, 2018), és a dir, les cèl·lules exocrines del pàncrees són les més afectades i per tant més propenses a desenvolupar un tumor (Freitas, et al., 2009). Aproximadament, el 95% dels càncers de pàncrees exocrins són adenocarcinomes i en particular el més habitual és l'adenocarcinoma pancreàtic ductal o PaC.

El gran problema que presenta el PaC, és el fet de que es sol diagnosticar quan aquest ja ha colonitzat altres òrgans, és a dir, quan es troba en estadis molt avançats provocant que els tractaments no siguin efectius (de Braud, et al., 2004). Un dels motius d'aquest diagnòstic tardà és que els símptomes en els estadis inicials són inexistent o molt lleus i fins que no apareixen símptomes com dolor abdominal, nàusees, vòmits, acidesa estomacal, tonalitat groguenca i pèrdua de pes entre d'altres, no s'acaba fent un diagnòstic exhaustiu (Freitas, et al., 2009). Per tant, aquest diagnòstic en fases ja desenvolupades del càncer és el que fa que el 95% de pacients diagnosticats per càncer de pàncrees morin i tinguin una esperança de vida d'uns pocs mesos (Wachsmann, et al., 2012).

L'aparició del càncer de pàncrees ve originat per diverses mutacions en oncogens i gens supressors de tumors com DPC4, MTS1,p53 (Lowy,et.al., 2008). D'altra banda, també es parla de diversos factors de risc que poden influir en la seva aparició: tabac, edat, i/o dieta (de Braud, et al., 2004).

Tal i com s'ha comentat, un dels principals problemes és el diagnòstic precoç del càncer de pàncrees, quan aquest pot ser extirpable, i que es pugui trobar en estadis poc avançats. Per saber l'estadi del tumors es realitza un estudi histopatològic del mateix. Aquest es basa en un sistema de classificació anomenat TNM, on el primer que es porta a terme és l'estudi de la mida del tumor. Un cop definida la mida, s'observa si aquest grup de cèl·lules tumorals s'ha propagat cap a nòduls limfàtics propers. I finalment, si es detecta metàstasi es determina quins òrgans es troben afectats (de Braud, et al., 2004) (Hirshberg Foundation for Pancreatic Cancer Research, 2018).

### **1.3 Glicobiologia**

La glicobiologia és la ciència que estudia l'estructura molecular, la biosíntesi i la funció biològica dels glicans i derivats. Aquesta disciplina es pot considerar bastant nova ja que anteriorment les principals funcions que se li designaven als carbohidrats era la de font d'energia i la de material estructural. En canvi, en els últims 30 anys, amb el desenvolupament de noves tecnologies especialitzades en l'anàlisi d'estructures i funcions van permetre obrir un nou món sobre la gran importància dels glicans en la biologia molecular (Rademacher, et al., 1988). Actualment, aquesta nova àrea és un dels camps on hi ha més investigació degut al descobriment del rol d'aquests gliconjugats en molts processos biològics com poden ser l'adhesió o la motilitat, la regulació de la comunicació entre la cèl·lula i la matriu extracel·lular i entre diverses cèl·lules, actuar com a missatgers...etc. (Varki, et al., 2009). Concretament, els glicans i gliconjugats són crucials per els processos que es produeixen al llarg de la progressió tumoral (Fuster & Esko, 2005).

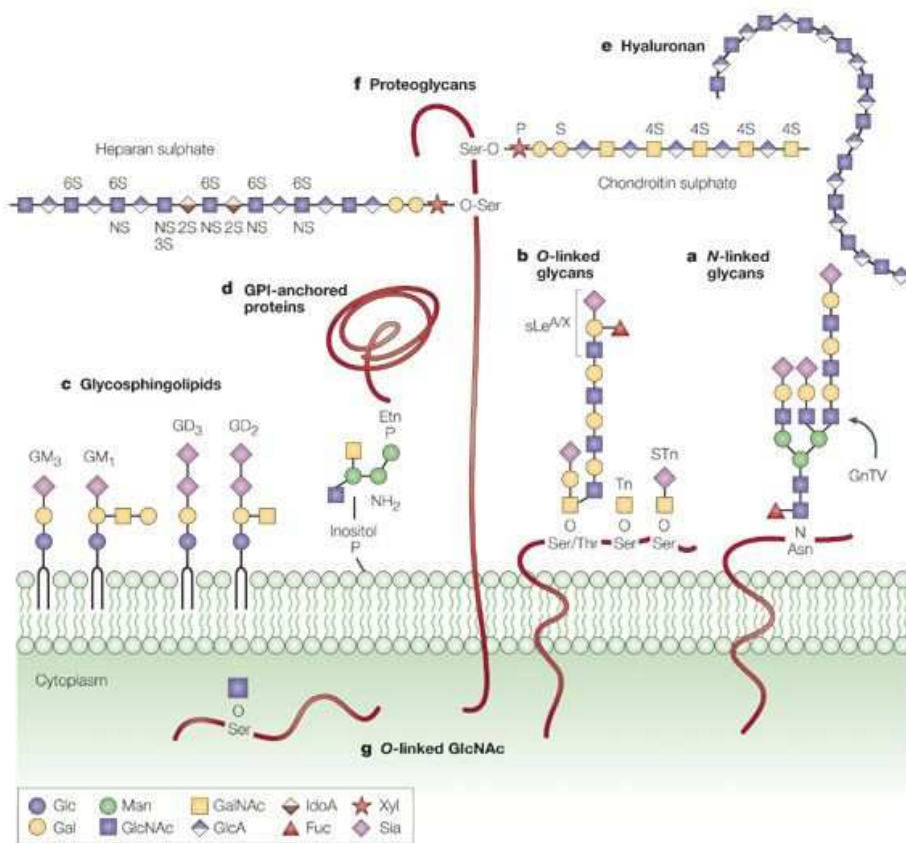
Els glicans, també coneguts com a carbohidrats estan constituïts per unitats bàsiques de monosacàrids (sacàrids) que es poden enllaçar entre elles mitjançant enllaços glicosídics donant lloc a oligosacàrids<sup>3</sup> o polisacàrids<sup>4</sup> (Brooks, et al., 2002). Així doncs, mitjançant la unió de diversos monosacàrids i la unió covalent d'aquests a proteïnes o lípids a través dels enllaços glicosídics acaben donant lloc a una gran varietat de glicoconjugats (**Taula 1**) (**Figura 2**) (Varki, et al., 2009) que acaben formant una capa densa sobre la superfície de les cèl·lules donant lloc al denominat glicocàlix. Com a resultat d'aquesta gran diversitat de glicans proporcionada per les diferents estructures que es poden formar, es poden dur a terme les funcions mencionades anteriorment (Varki, et al., 2009). Els encarregats de permetre la formació d'aquests enllaços glicosídics són diversos enzims, on dels més rellevants en la formació de les estructures dels glicans són les glicosil-transferases (GT) que actuen en la ruta secretora de biosíntesi dels glicans, en el reticle endoplasmàtic i/o l'aparell de Golgi (Brooks, et al., 2002) (Varki, et al., 2009).

**Taula 1.** Tipus de glicans juntament amb la seva estructura i el seu lloc d'unió. També es mostra els llocs de biosíntesi indicant l'ordre de la seva síntesi. Extret de (Varki, et al., 2009).

Tipus de glicans	Lloc d'unió	Estructura (Lineal o Ramificada)	Lloc de la biosíntesi (1=primer pas, 2=segon pas).
<b>N-Glicans</b>	Units a proteïnes que presenten residus de asparagina (seqüència Asn-X-Ser/Thr).	Ramificada	1. Reticle endoplasmàtic 2. Aparell de Golgi
<b>O-Glicans</b>	Units a proteïnes que contenen residus de serina i/o treonina.	Ramificada	1. Aparell de Golgi
<b>Glicoproteïna (O-GlcNAc)</b>	Proteïnes nuclears i citoplasmàtiques enllaçades via serines a monosacàrids O-acetilglucosamina	Lineals	1. Nucli o Citoplasma
<b>Proteoglicans (conjunt de glicosaminoglicans, GAG, units)</b>	Unit a proteïnes mitjançant la interacció amb els residus de xilosa que es troben units a un OH d'un residu de serina.	Lineals	1. Reticle endoplasmàtic 2. Aparell de Golgi o 1. Aparell de Golgi
<b>Glicolípid</b>	Unit a un lípid.	Ramificada	

<sup>3</sup>Carbohidrat format per entre 2 i 10 monosacàrids.

<sup>4</sup>Carbohidrat format per 10 o més monosacàrid.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Cancer

**Figura 2.** Tipus de glicans existents on a. N-glicans, b. O-glicans, c. Glicolípids, d. Glicosilfosfatidilinositol unit a proteïnes, f. Proteoglicans que inclouen sulfat d'heparina, sulfat de condroitin i l'àcid hialurònic f. O-glicans units a proteïnes nuclears i/o citoplasmàtiques. Els monosacàrids estan representats mitjançant símbols amb formes geomètriques. Extret de (Fuster & Esko, 2005).

Les glicosil-transferases (GT) són una família d'enzims intracel·lulars i transmembrana que permeten la glicosilació de diferents molècules (Brooks, et al., 2002), utilitzant com a substrat diferents monosacàrids activats amb grups fosfats que permetran la seva unió covalent amb altres monosacàrids/oligosacàrids, proteïnes, lípids, DNA o altres molècules. Els compostos formats per la unió de glicans amb altres molècules es coneixen com a glicoconjugats (Brooks, et al., 2002) (Lairson, et al., 2008).

Les glicosil-transferases es poden classificar en diferents famílies en funció de l'especificitat del substrat (**Taula 2**)(Varki, et al., 2009) (Brooks, et al., 2002).

**Taula 2.** Principals famílies de glicosil-transferases. Classificació de l'*International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)*, basada en els diferents tipus dels sucres donadors. CMP= Citidina monofosfat, GDP= Guanosina difosfat, UDP=Uridina difosfat.

Família de glicosil-transferases	Sucre donador
Sialil-transferases (ST)	CMP-Àcid sialic
Fucosil-transferases	GDP-Fucosa
Galactosil-transferases	UDP-Galactosa
N-acetilglucosaminil-transferases	UDP-GlcNAc
N-acetilgalactosaminil-transferases	UDP-GalNAc
Manosil-transferases	GDP-Manosa

Tal com s'ha esmentat anteriorment, les cèl·lules tumorals presenten alterat el patró de glicosilació si es compara amb les cèl·lules sanes del mateix teixit. Les alteracions que es poden detectar són sobreexpressió o subexpressió de determinades estructures glucídiques o expressió de noves estructures. S'ha descrit que la presència de glúcids en la superfície cel·lular és clau per diversos estadis en la progressió del tumor, com per exemple la invasió de nous teixits i òrgans o bé l'adhesió de les cèl·lules tumorals a les cèl·lules endotelials facilitant així la metàstasi. Aquestes alteracions glucídiques que permeten aquests processos poden venir produïdes per canvis en els nivells d'expressió dels enzims encarregats d'aquesta glicosilació, és a dir, de les glicosil-transferases (Varki, et al., 2009).

### 1.3.1 Sialil-transferases (ST)

Un exemple d'alteració de l'expressió de glicosil-transferases que es pot donar en les cèl·lules tumorals és la sobreexpressió de les sialil-transferases. Les sialil-transferases són un tipus de glicosil-transferases intracel·lulars ancorades a la membrana de l'aparell de Golgi i tenen la principal funció de transferir un residu d'àcid siàlic del CMP-Sia als monosacàrids terminals de les cadenes d'oligosacàrids que constitueixen les glicoproteïnes i els glicolípid (Harduin-Lepers, et al., 2001) (Varki, et al., 2009). Un augment d'aquests enzims té com a conseqüència un increment de la seva activitat, donant com a resultat un augment de residus d'àcid siàlic als glicans de les cèl·lules cancerígens (Wang, 2005).

Quan es parla de l'àcid siàlic es fa especialment referència a l'àcid neuramínic (Neu), en particular al *N*-acetyl-neuramínic acid o Neu5Ac (Angata&Varki, 2002).

Les molècules d'àcid siàlic es troben implicades en la regulació de la interacció de les cèl·lules amb l'entorn extracel·lular i en la regulació de l'afinitat dels receptors (Brooks, et al., 2002). També, aporten una càrrega negativa a la cadena del glicà que pot promoure el despreniment de les cèl·lules que conformen la massa tumoral a causa d'un fenomen de repulsió (Narayanan, 1994). El increment de l'àcid siàlic a la superfície cel·lular va associada al increment del potencial invasiu de les cèl·lules tumorals (Fuster & Esko, 2005). A més, les cadenes amb àcid siàlic protegeixen les cèl·lules del reconeixement del sistema immunitari i regulen el temps de supervivència de les cèl·lules tumorals en el torrent sanguini (Wang, 2005).

D'acord amb la posició on s'enllaci l'àcid siàlic es poden definir 3 grups de ST diferents;  $\alpha$ -2,6-sialil-transferases,  $\alpha$ -2,8-sialil-transferases i  $\alpha$ -2,3-sialil-transferases (Varki, et al., 2009). Aquest treball es centrarà en els canvis produïts per les  $\alpha$ -2,3-sialil-transferases on dins d'aquest tipus de sialil-transferases podem trobar-ne sis tipus més (ST3GAL1-6). Destacar la  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -2,3-sialil-transferasa 3 (ST3Gal III) i la  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -2,3-sialil-transferasa 4 (ST3Gal IV), les quals s'encarreguen de transferir àcid siàlic  $\alpha$ -2,3 a galactoses terminals de cadenes de N i O-glicans per la biosíntesi dels determinants glucídics Sialil Lewis x i Sialil Lewis a, comentats més endavant (Varki, et al., 2009).

L'enzim ST3Gal III ve codificat per el gen que conté el mateix nom ST3GAL3 i es troba localitzat al cromosoma 1 (1p34.1) (OMIM, 2017), mentre que l'enzim ST3Gal IV codificat pel gen ST3GAL4 es situa al cromosoma 11 (11q24.2) (OMIM, 2014).

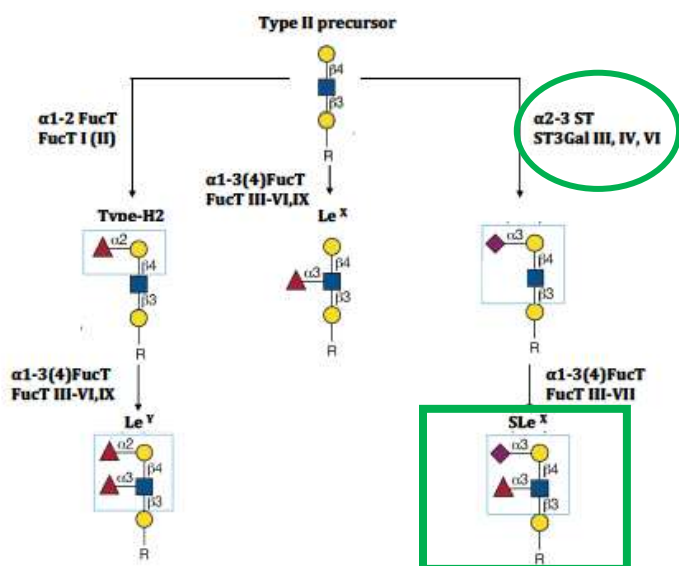
### 1.3.2 Antígens Sialil Lewis (sLe<sup>x</sup> i sLe<sup>a</sup>)

Els antígens Sialil Lewis es poden trobar expressats a les cèl·lules tumorals i permeten la seva adhesió a l'endoteli abans de l'extravasació afavorint així la metàstasi (Kim, et al., 1988) (Satomura, et al., 1991). El paper del sLe<sup>x</sup> és clau en els mecanismes d'invasió i metàstasi dels tumors. S'ha descrit una sobreexpressió

d'aquest antígen en molts càncers malignes, de la mateixa manera que s'ha pogut correlacionar els nivells alts de sLe<sup>x</sup> amb una disminució de la supervivència dels pacients (Pinho & Reis, 2015).

sLe<sup>x</sup> és un lligand de selectines. Les selectines són proteïnes de membrana que fan la funció de receptors i permeten la interacció de les cèl·lules de l'endoteli i els leucocits i la seva extravasació durant el procés inflamatori. En el càncer la interacció de sLe<sup>x</sup> de les cèl·lules tumorals amb les selectines de l'endoteli activat és un pas previ al procés de metastasi (Pinho & Reis, 2015). S'han definit tres grups de selectines; L-selectines (leucòcits), E-selectines (cèl·lules endotelials), i P-selectines (cèl·lules endotelials i plaquetes) on s'ha descrit que l'antigen sLe<sup>x</sup> interacciona amb les E-selectines (Takada, et al., 1993). Així doncs, totes les cèl·lules tumorals que presenten una sobreexpressió d'aquest antígen adopten la capacitat d'adherir-se als endotelis que expressen E-selectina podent arribar així a altres teixits llunyans, per tant, produint metastasi (Brooks, 2002).

Les  $\alpha$ 2,3- sialil-transferases (ST), en concret les ST3Gal III i ST3Gal IV són importants per la biosíntesi de sLe<sup>x</sup> (Figura 3). L'antigen sLe<sup>x</sup> es pot formar a partir dels enzims ST3Gal IV, ST3Gal VI, i en menor grau del ST3Gal III, mentre que el sLe<sup>a</sup> es forma per acció de l'enzim ST3Gal III, i en menor grau per l'acció de ST3Gal IV. Aquests enzims actuen en les últimes reaccions de ruta biosintètica transferint l'àcid siàlic a les unitats terminals del glicà (Varki, et al., 2009).



**Figura 3.** Síntesi dels antígens Lewis (tipus II; Lewis Y i Lewis X). S'observen diferents sialil-transferases i fucosil-transferases implicades en la síntesi dels antígens Lewis (tipus II). Les rodones grogues representen galactoses, els triangles la fucosa, el rombes l'àcid siàlic i el quadrat N-acetilglucosamina. En verd es troben les estudiades en aquest projecte. Extret i modificat de el llibre *Essentials of Glycobiology* (Varki, et al., 2009).

El grup de recerca on s'ha realitzat aquest treball ha descrit que el increment en l'expressió de  $\alpha$ 2,3- STs (ST3GAL3 i ST3GAL4) en les cèl·lules tumorals del pàncrees augmentava el nivell de sLe<sup>x</sup>, i conseqüentment la migració, la invasió i el potencial metastàtic de les cèl·lules transfectades amb aquests gens (Pérez-Garay, et al., 2010).

També, més recentment es van generar cèl·lules de PaC silenciades amb *shRNAs* de interferència per silenciar els gens de ST3GAL3 i ST3GAL4. Aquestes cèl·lules silenciades van mostrar una disminució de l'expressió dels gens ST3GAL3 i ST3GAL4 en cèl·lules pancreàtiques BxPC3 i Capan-1, el que va implicar una reducció en sLe<sup>x</sup>, i una disminució de la migració i invasió (Guerrero, 2019).

## 2. OBJECTIUS I HIPOTESIS

Taking into account the above explanations, the main objectives of this project are framed in a general project that aims to analyse the level of sLe<sup>x</sup> expression in the ST3GAL3 and ST3GAL4 silenced pancreatic cells, and to identify potential proteins that could be carriers of sLe<sup>x</sup> and that show a decrease of sLe<sup>x</sup> in the ST3GAL3 and ST3GAL4 silenced cells

In order to achieve this main purpose, we design the following specific objectives:

1. To culture the pancreatic cancer cells, silenced and control cells, and to obtain the corresponding cell lysates.
2. To analyse the sLe<sup>x</sup> content of the pancreatic cancer lysates from control pancreatic cells (PaC) and their corresponded silenced ST3GAL3 and ST3GAL4 PaC cells by Western Blot (WB).
3. To establish the optimum conditions for the two dimensional electrophoresis (2DE) analyses of the cell lysates.
4. To analyse the cell lysates by 2DE in parallel: staining with Coomassie Blue and WB with SLe<sup>x</sup> to identify potential proteins that are carriers of sLe<sup>x</sup>.

### 3. MATERIAL I METODOLOGIA

#### 3.1 Línies cel·lulars

Les línies cel·lulars utilitzades corresponen a cèl·lules humanes de càncer de pàncrees: Capan-1 (HTB-79, ATCC) i BxPC-3 (CRL-1687, ATCC). Capan-1 es va establir a partir de cèl·lules pancreàtiques d'un adenocarcinoma pancreàtic (Fogh, et al., 1977) provinent d'un procés de metàstasi del fetge. Mentre que les BxPC3, és una línia cel·lular provinent d'un adenocarcinoma pancreàtic no metastàtic (Tan, et al., 1986) (Deer, et al., 2010).

Aquestes línies cel·lulars presenten una expressió moderada-elevada de l'antigen Sialil Lewis x mesurada prèviament amb citometria de flux. Tanmateix, per poder detectar la implicació de les  $\alpha$ 2,3-STs ST3Gal III i ST3Gal IV en la biosíntesi de sLe<sup>x</sup>, el grup de recerca de Bioquímica del càncer van transduir les cèl·lules amb diferents shRNAs (shRNA 1, shRNA 4, shRNA 7, shRNA 9) que al hibridar amb el corresponent gen inhibia la seva expressió (**Taula 3**).

**Taula 3.** Nomenclatura de les línies cel·lulars segons el gen silenciament i el shRNA utilitzat (Guerrero 2019).

Tipus cel·lular	ShRNA utilitzat pel silenciament	Silenciament de gen	Nomenclatura de les línies cel·lulars
<b>Capan-1</b>	-	-	control Capan-1
	shRNA scramble	-	scramble Capan-1
	shRNA 1	ST3GAL4	sh1 Capan-1
	shRNA 4	ST3GAL4	sh4 Capan-1
	shRNA 7	ST3GAL3	sh7 Capan-1
	shRNA 9	ST3GAL3	sh9 Capan-1
<b>BxPC3</b>	-	-	control BxPC3
	shRNA scramble	-	scramble BxPC3
	shRNA 1	ST3GAL4	sh1 BxPC3
	shRNA 7	ST3GAL3	sh7 BxPC3
	shRNA 9	ST3GAL3	sh9 BxPC3

#### 3.2 Tècniques de cultius cel·lulars

##### 3.2.1 Protocol de descongelació

BxPC3	CAPAN-1
1. Treure els criotubs (BxPC3 i Capan-1) del tanc de nitrogen líquid i descongelar-los en un bany a 37°C	
2. Preparar 10mL de Medi DMEM (10%FBS) en tubs de 15mL.	2. Preparar 5mL de Medi DMEM (20%FBS) per les Capan-1 en tubs de 15mL.
3. Afegir-hi les cèl·lules dels criotubs.	
4. Centrifugar 5min a 1500rpm 4°C.	
5. Retirar el sobrenedant amb la bomba.	
6. Resuspendre les cèl·lules amb 6mL de medi.	
7. Pipetejar tot el contingut del tub i abocar-lo en un flascó T75.	
8. Incubar a 37°C	



En el protocol exposat prèviament, el tant per cent de FBS (sèrum fetal boví [Gibco]) en el medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) ([Gibco]) és diferent en funció de si es treballa amb una línia cel·lular o un altre. Això s'explica perquè les cèl·lules Capan-1 els hi costa més créixer i per tant s'hi afegeix més FBS, un 10% més. Així doncs, hi hauran més factors de creixement afavorint més la proliferació.

### 3.2.2 Protocol de canvi de medi

Després de 48h de l'aplicació del protocol de descongelació, es va valorar si era necessari fer un canvi de medi i es va addicionar DMEM amb FBS (10%-BxPC-3 o 20%-Capan-1). S'hi afegeix 1% puromicina (antibiòtic) a tots aquelles flascons que tenien les cèl·lules transformades ja que d'aquesta manera permetia seleccionar aquelles que havien incorporat el vector amb els shRNAs corresponents. El vector incorporat a part de ser resistent a la puromicina conté el corresponent *shRNA* de interferència per silenciar els gens de ST3GAL3 o ST3GAL4.

El protocol aplicat per portar el canvi de medi és el següent.

BxPC3	CAPAN-1
1. Aspirar el medi del flascó pel costat on no hi ha les cèl·lules adherides.	
2. Afegir 10mL de Medi DMEM (10%FBS) per les cèl·lules BxPC3 pel mateix costat.	2. 5mL de Medi DMEM (20%FBS) per les Capan-1 pel mateix costat.

Normalment, el canvi de medi és necessari cada 3 dies, aproximadament.

### 3.2.3 Protocol de tripsinització

La tripsinització és una tècnica utilitzada per desenganxar les cèl·lules de la superfície del flascó que es troben adherides al mateix quan es troben a una confluència cel·lular al voltant del 75%. Per obtenir aquestes cèl·lules en suspensió s'utilitzaran diverses proteases que degradaran les proteïnes d'adhesió, en el nostre cas es va utilitzar la tripsina (Trypsin-EDTA (1X) 0.25% [Gibco]).

BxPC3	CAPAN-1
1. Aspirar el medi.	
2. Addicionar 10mL de PBS 10X.	
3. Aspirar el PBS.	
4. Afegir 4mL de tripsina-EDTA.	
5. Incubar 5min a 37°C.	
6. Observar microscopi invertit si les cèl·lules es troben desenganxades, sinó es deixen més temps al incubador.	
7. Colpejar suaument.	
2. Afegir 10mL de Medi DMEM (10%FBS) pel mateix costat.	2. 5mL de Medi DMEM (20%FBS) pel mateix costat.
9. Resuspendre 10-15 vegades amb la pipeta de 10mL. (passar-ho en un falcón de 15mL)	
10. Centrifugar 5min 1500rpm, 4°C.	
11. Aspirar el sobrenedant sense emportar-se el <i>pellet</i> .	
12. Resuspendre el <i>pellet</i> en sec (donantcops).	

13. Afegir 6mL de Medi DMEM (10%FBS) .	13. 6mL de Medi DMEM (20%FBS) pel mateix costat.
14. Resuspendre bé.	

Un cop s'hagin tripsinitzat tots els flascons de tots els tipus de cèl·lules s'haurà de sincronitzar el seu creixement amb l'objectiu de no detectar diferències en la glicosilació degudes a diferències en la confluència cel·lular.

### 3.2.4 Protocol de recompte cel·lular

Després de la tripsinització es compten el nombre de cèl·lules. Saber el nombre de cèl·lules que es disposa és molt important per múltiples procediments en cultiu cel·lular, com per sembrar plaques amb un nombre determinat de cèl·lules, de manera que el creixement entre les cèl·lules control i les silenciades en el nostre cas sigui semblant i així aconseguir una confluència similar entre elles. Existeixen diverses tècniques per fer el recompte cel·lular i en aquest projecte s'ha realitzat de dues maneres, mitjançant la cambra de Neubauer o utilitzant l'Scepter.

#### Cambra de Neubauer

La cambra de Neubauer [Sigma- Aldrich] és una placa amb forma de portaobjectes on la seva part central es troba dividida en 2 quadricules i cada una d'aquestes dues conté 4 quadrants de  $1\text{mm}^2$ . Cada un d'aquests 4 quadrants està format per 16 quadrats de  $0.25\text{mm}^2$ . Aquesta disposició forma un volum de  $0.1\text{mm}^3$  que és on es posarà la mostra per fer el recompte (Fisher Scientific, 2019). Amb aquest mètode s'utilitza el Blau de tripà (0.4 % Trypan Blue) [Sigma Aldrich®] que és un colorant que tenyeix aquelles cèl·lules mortes perquè al tenir la membrana aberrant pot entrar i tenyir el citoplasma. En canvi, en les cèl·lules vives aquest fenomen no es produirà i quedaran de color blanques. Així doncs, amb aquest colorant podrem diferenciar els dos tipus de cèl·lules; vives i mortes (Strober, 2001).

#### Scepter [ Scepter™ Millipore-Sigma Aldrich]

Aquest és un instrument automàtic que ens dona la concentració de cèl·lules en la mostra amb un temps de 30 segons. La quantificació es basa en la mida cel·lular discriminant aquelles cèl·lules més grans que deriven de *debris* i no detecta aquelles cèl·lules molt petites ( $<3\mu\text{m}$ ).

En aquest projecte es disposava de, dues línies cel·lulars, Capan-1 i BxPC3, i cada una d'elles de diferents tipus cel·lulars (control, scramble<sup>5</sup>, i silenciades amb shRNA) es va decidir utilitzar el Scepter ja que és un mètode automàtic i més ràpid. No obstant, abans de fer el recompte automàtic per totes les cèl·lules es va utilitzar la cambra de Neubauer per aprendre la metodologia, i també, va servir per poder fer una comparativa entre aquets dos mètodes on aquest últim és caracteritza per ser menys exacte i resolutiu.

Cambra Neubauer	Scepter
1. Agafar eppendorf.	1. Agafar un falcon
2. Afegir 75 uL de blau de tripà +25uL de cèl·lules (falcón).	2. Afegir 400mL PBS +100mL de cèl·lules (falcón de 15mL).
3. Carregar 10uL en la cambra de Neubauer.	
4. Contar camp de 4x4 i fer la mitjana.	

<sup>5</sup>Són les cèl·lules que es poden considerar el control negatiu/intern perquè han estat silenciades amb un shRNA que presenta una seqüència que no hibridarà en cap zona del DNA, per tant, no silenciarà cap gen.

### 3.2.5 Sembrar cel·lular

La sembra cel·lular consisteix en dipositar una concentració determinada de cèl·lules en flascons o plaques de cultiu<sup>6</sup>. El volum que s'ha de sembrar es pot calcular amb la següent fórmula:

Concentració de cèl·lules calculada amb Scepter· **XmL(volum) per sembrar**<sub>(el que es vol saber)</sub> = Quantitat de cèl·lules que es vol sembrar.

### 3.3 Tècniques de bioquímica

Les tècniques bioquímiques són utilitzades en l'àmbit de bioquímica amb l'objectiu de detectar i quantificar molècules biològiques per obtenir coneixements sobre processos bioquímics.

En el projecte que s'ha portat a terme, s'ha realitzat un anàlisi per conèixer les proteïnes de les línies cel·lulars silenciades que presenten una reducció de sLe<sup>x</sup> i quines són les proteïnes que actuen com a *carriers* de sLe<sup>x</sup> en les diferent línies cel·lulars

#### 3.3.1 Protocol d'obtenció dels llisats cel·lulars

La lisi cel·lular és la primera etapa del fraccionament cel·lular per l'obtenció de proteïnes. Aquesta tècnica es basa en la disrupció cel·lular i l'extracció del contingut cel·lular permeten l'obtenció de proteïnes entre d'altres molècules.

Els mètodes de lliat cel·lulars es poden dividir en dos grans categories: disrupció química i/o disrupció física. Tanmateix, en els últims anys la disrupció química s'ha imposat sobre la física en l'àmbit de recerca ja que s'han desenvolupat detergents que proveeixen uns bons resultats. Els detergents permeten la lisi cel·lulars i influeixen en els efectes de solubilització (Thermo Fisher Scientific, 2018).

El protocol per l'obtenció dels llisats implica la preparació d'un tampó de lisi que en aquest projecte és un tampó que conté urea i tiourea i CHAPS per ser utilitzat en una electroforesi bidimensional (E2D) ja que es necessita un agent desnaturalitzant com és la urea/tiourea i un detergent neutre per no alterar la càrrega de la proteïna (Berkelman & Stenstedt, 1998) (Biorad, 2017).

El tampó d'urea (E2D Lysis Buffer)<sup>7</sup> conté unes concentracions finals de: 7M UREA [SERVA], 2M TIOUREA [FLUKA], 30mM Tris-HCL pH 8.5, 4% CHAPS [Sigma-Aldrich] i Inhibidors de proteases [*Protease complete ultra tablets mini easypack*- ROCHE-REF: 05 892 970 001].

Un cop preparat el tampó es van agafar les plaques preparades (75% de confluència) per fer els llisats i es va aplicar el següent protocol:

RENTAR LA PLACA
1. Aspirar el medi de la placa amb la bomba.
2. Rentar amb 10mL de PBS (aplicar-ho per un costat de la placa).
3. Aspirar PBS.
4. Repetir 2 o 3 vegades.

<sup>6</sup>Volum de cèl·lules a sembrar +10mL de medi DMEM en una placa de petri 10cm de diàmetre.

<sup>7</sup>Es va preparar per un volum final de 5mL.

LLISAR AGULLA <sup>8</sup>	LLISAR BEADS <sup>9</sup>
1. Afegir 400mL del tampó E2D Lysis buffer.	
2. Deixar en gel 10min.	
3. Rascar amb <i>cell scrapper</i> i recollir en eppendorf normal.	3. Rascar amb <i>cell scrapper</i> i recollir en <i>Lysing Matrix Tubes (beads mill)</i> .
4. Passar 20 vegades l'agulla (injeccions) evitant la formació d'escuma.	4. Homogenitzador 40seg 6m/s.
5. En gel 15min.	5. Esperar 15min en gel i tornar a homogenitzar.
6. Centrifugar 10min 14.000g.	6. Centrifugar 10min 14.000g.
7. Aspirar el sobrenedant i passar-lo en un nou eppendorf.	7. Aspirar el sobrenedant i passar-lo en un nou eppendorf.
8. Mostra a punt per quantificar.	8. Centrifugar 10min 14.000g.
	9. Aspirar el sobrenedant i passar-lo en un nou eppendorf.
	10. Mostra a punt per quantificar.

Per poder fer una quantificació de proteïna s'aplica el mètode de quantificació de Bradford.

### 3.3.2 Protocol Bradford

El mètode Bradford és una de les tècniques més emparades per determinar la concentració de proteïna total en una mostra. Aquest mètode és colorimètric on el reactiu que conté, *Coomassie G-250*, s'uneix a les proteïnes gràcies al medi àcid<sup>10</sup> donant lloc a una coloració blavosa. La longitud d'ona òptima per mesurar la coloració blavosa és 595nm (Stoscheck, 1990). No obstant, el problema d'aquest mètode és que només dona una resposta lineal en marges de concentració de proteïna petita. Així doncs, serà imprescindible elaborar una recta de calibració i observar si el valor d'absorbància obtingut de la mostra es troba dins de rang lineal de la corba, si no és així s'haurà de diluir fins que es trobi dins dels marges.

El protocol aplicat és el següent:

1. Temperar el reactiu Bradford [Quickstart™ Bradford 1X Dye Reagent] a temperatura ambient.
2. Encendre el lector [Sinergy 4-BioTeck].
3. Preparar el diluent per fer la recta patró: 12uL del 2DE Lysis buffer (Per Vf=10mL: 7M Urea, 2M tiourea, 30mM Tris-HCl pH=8.5, 4% CHAPS, pastilla d'inhibidor de proteases)<sup>11</sup> + 6mL d'aigua mQ.
4. Preparar les següents dilucions de la recta patró:

**Taula 4.** Valors utilitzats per elaborar la recta d'equilibratge per quantificar a través del mètode Bradford

Tub	[Prot] (ug/mL)	final	Volum (uL)	BSA patró	Volum diluent (uL)
1	25		10	2mg/mL	790
2	20		10	2mg/mL	990
3	15		6	2mg/mL	794
4	10		500	Tub 2	500

<sup>8</sup>Tipus de disrupció mecànica que consisteix en realitzar un mínim de 25 passades amb una xeringa de 25G.

<sup>9</sup>*LysisBeads* són boletes petites de ceràmica que estan dissenyades per provocar una disrupció mecànica i una homogeneïtzació cel·lular i tissular utilitzant el Tissue Lyser [FastPrep-24MP]. Aquestes *Beads* es troben en els *Lysing Matrix Tubes*.

<sup>10</sup>El medi àcid l'incorpora el mateix reactiu ja que conté àcid fosfòric.

<sup>11</sup>És el mateix tampó, E2D Lysis buffer, que el que es prepara per la lisi cel·lular.

5	5	500	Tub 4	500
6	2.5	500	Tub 5	500
7	1.25	500	Tub 6	500
8 (Blanc)	0	0	-	500

5. Preparar les dilucions de les mostres ( $V_f=500\mu\text{L}$ ):  $1\mu\text{L}$  mostra +  $499\mu\text{L}$  aigua mQ.
6. Carregar les dilucions als pouets:  $150\mu\text{L}$  de les dilucions (mostra/patró) +  $150\mu\text{L}$  Reactiu Bradford.
7. Incubar 5min a temperatura ambient.
8. Mesurar en el lector [BioTek, SINERGY 4].

Amb el lector es sabrà la absorbància i es podrà calcular la recta de regressió i la seva " $r^2$ " juntament amb les concentracions de proteïna que hi ha a cada mostra. A partir d'aquesta concentració i de la quantitat de proteïna que es vulgui carregar a l'electroforesi es carregarà un determinat volum o altre del llistat.

### 3.3.3 Protocol d'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

Les proteïnes migraran a través del gel de poliacrilamida amb una velocitat que és funció inversa al pes molecular que presenten, és a dir, les proteïnes amb massa molecular (MM) més petita migraran més ràpid. Aquest fenomen es produeix com a conseqüència de l'acció del detergent iònic SDS que el que fa és trencar les interaccions hidrofòbiques desnaturalitzant les proteïnes, i els hi proporciona càrrega negativa embolcallant-les. Així doncs, la separació es produirà únicament per massa molecular (Hames, 1998). El protocol portat a terme és el següent:

#### ❖ Preparació dels gels.

1. Muntar els dos vidres de 1.5mm on s'haurà de polimeritzar el gel i col·locar-los en el marc de polimerització. Es marca fins on es vol que arribi al gel separador (aprox. el gel superior ha de ser de 3cm).

Tampó gel separador (4X): 1.5M Tris-HCl pH8.6-8.8, 0.4% SDS.

Tampó gel apilador (4X): 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS.

2. En un falcon de 50mL es prepara la barreja per obtenir dos gels separadors al 8% (3.2mL sol. acril/bisacril[40%, ACROS ORGANICS- Methylenebisacrylamide 37.5:1 for Biochemistry], 4mL tampó gel inferior 4X, 8.8mL aigua mQ, 80 $\mu\text{L}$  persulfat amònic al 15% i 18 $\mu\text{L}$  TEMED [SERVA, N,N,N',N'-Tetramethyl-ethilendiamine]) i s'introdueix mitjançant una pipeta entre els dos vidres fins la marca feta anteriorment. I, s'espera 30min a que el gel polimeritzi.

3. En un falcon de 15mL es prepara la barreja per obtenir dos gels concentradors al 5% (0.75mL sol. acril/bisacril 5%[40%, ACROS ORGANICS- Methylenebisacrylamide 37.5:1 for Biochemistry], 1.5mL tampó gel superior x4, 3.7mL aigua destil·lada, 60 $\mu\text{L}$  persulfat amònic 15%, 6 $\mu\text{L}$  TEMED) i s'introdueix fins a dalt del vidre. Tot seguit es posa la pinta per marcar els diferents pouets i es deixa polimeritzar 30min.

#### ❖ Càrrega del gel i electroforesi

1. Col·loquem els vidres amb el gel dins del suport i ho posem dins d'una cubeta i l'emplenem amb tampó d'elució 1x (Tampó d'elució 10X= 1.92M Glicina, 0.25M Tris pH 8.3-8.5, 1%SDS).

2. Preparem les mostres amb el tampó d'aplicació 4X (120 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% (v/v) glicerol, 8% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.05% blau de bromofenol).

3. S'escalfen les mostres 5min a 90°C en el Termoblock, i seguidament es refreda amb gel.

4. Es retira la pinta de les butxaques i carreguem 30 $\mu\text{L}$  de mostra i 3 $\mu\text{L}$  de marcador molecular pretenyit [Page Ruler™ Prestained Protein Ladder].

5. Engeguem la font d'electroforesi i posem a 90V fins que la mostra entri al gel separador, un cop ha entrat augmentem el voltatge a 120V.

### 3.3.4 Protocol d'electroforesi bidimensional (E2D)

És una tècnica d'elevada resolució on l'objectiu principal és separar proteïnes segons punt isoelèctric (pI) i massa molecular (MM). Primerament, les proteïnes d'una mostra són separades per un gel de gradient de pH (*strip*) en condicions desnaturalitzants d'acord amb el seu punt isoelèctric. Després d'aquesta primera separació, les proteïnes es separen en funció de la seva massa molecular a través d'una electroforesi amb un gel de poliacrilamida<sup>12</sup> amb presència de SDS. Un cop tenim les proteïnes en el gel es poden aplicar diferents protocols com són les tincions (el nostre cas Blau de *Commassie* o *tinció nitrat de plata*) o identificació de proteïnes (en el nostre cas fent un *Western Blot* amb anticossos específics) (Berkelman & Stenstedt, 1998).

En quant el protocol seguit per portar a terme una electroforesi 2D es pot dividir en 3 etapes: rehidratació del gel de primera dimensió amb la mostra, primera dimensió, segona dimensió (SDS-PAGE).

La primera part, tal i com indica el nom consisteix en una **rehidratació** activa del gel amb la mostra on s'ha de preparar el tampó de rehidratació. El protocol que s'ha fet servir de guia indica que s'utilitzin 340uL per mostra (Biorad, 2017), és a dir, en el cas que es prepararessin dos *strips* seria 680uL de tampó. Aquest tampó està format per: Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS (4% w/v), DTT (65mM) 46.526uL del stock mare a 950mM, IPG Buffer pH3-10 (1.5% v/v): 10.2uL, Blau de bromofenol (0.005% v/v): 3.4uL del stock 1%, la mostra llisada de proteïna amb tampó 2D lysis: (200ug de proteïna per *strip*) i Aigua mQ per enrasar fins a 680uL.

Un cop ja tenim aquest tampó de rehidratació preparat es seguirà amb el següent protocol (Biorad, 2017):

1. Incubació de la mostra amb el tampó de rehidratació en el *roller* a temperatura ambient durant 1h.
2. Col·locar la mostra en una safata d'electroforesi.
3. Tallar el *strip* [GE Healthcare Immobiline™ Dry Strip pH=3-10] a 17.5cm i col·locar-lo en la safata en el sentit correcte: traient la tira de plàstic (el gel cap a baix, en contacte amb la mostra, i el pol positiu a l'esquerra) i deixar-ho 30min.
4. Recobrir el *strip* amb oli mineral [Sigma-Aldrich] per evitar que s'evapori la mostra.
5. Engegar el programa de rehidratació activa a 50V a 20°C *overnight*.

La **primera dimensió** (IEF), comença després de la rehidratació *overnight* on ens apuntarem el temps que el *strip* ha estat en rehidratació i es seguirà aquest protocol (Biorad, 2017):

1. STOP el programa de rehidratació.
2. Treure l'oli mineral que recobreix els *strips*.
3. Col·locar 2 papers [GE health Labnet] amb aigua mQ en els elèctrodes i un amb DTT (13mM) al càtode per cada *strip*.
4. Recobrir d'oli mineral.
5. Iniciar el programa teixits que consta de 9 passos (**Taula 5**).
6. En el pas 8 pausar el programa i canviar els papers.
7. Activar el programa i deixar *overnight*.

---

<sup>12</sup>En el nostre cas s'ha utilitzat un gel del 8%.

**Taula 5.** Valor dels paràmetres que s'adquireix a cada pas del programa teixits aplicat per la IEF.

STEP	V (Voltatge)	VOLTATGE SLOPE	TIME	VxHR (volts x hora)
1	0-500	LINEAR	00:30	125
2	500		01:00	500
3	500-2000	LINEAR	00:30	625
4	2000		01:00	2000
5	2000-5000	LINEAR	00:30	1750
6	5000		01:00	5000
7	5000-8000	LINEAR	00:30	5250
8	8000		VHOURS 85000	85000
9	500		99:00(∞)	
<b>TOTAL</b>		<b>10h</b>		<b>95000aprox</b>

Finalment, es porta a terme la **segona dimensió** (SDS-PAGE). Primer de tot cal preparar el tampó d'equilibrat (TE) (10mL), que està format per: Urea 6M: 3.6036g, 2% SDS (w/v): 0.2g, 30% Glicerol(v/v): 3mL i 50mM Tris pH8.8: 500uL del stock 1M.

En realitat, per equilibrar es fan servir dos tampons d'equilibrat (TE), on el primer es caracteritza per portar DTT i el segon IAA.

-TE1 (5mL): 0.00501g DTT + TE. → Solució reductora.

-TE2(5mL): 0.1248g IAA + TE. → Solució alquilant.

Mentre es preparen els tampons es necessari escalfar l'agarosa en la placa i mantenir-la calenta en el termoblock a 65°C. A partir d'aquí es portarà a terme la següent metodologia (Biorad, 2017):

1. Tallar els *strips* segons la dimensió dels gels de poliacrilamida (8%) de la segona dimensió que s'hagin preparat. Els talls dels *strips* es faran d'acord al criteri que s'estableixi per l'anàlisi de les mostres.
2. Incubar els *strips* en TE1 15min i posteriorment en TE2 15 minuts.
3. Mullar els *strip* amb tampó d'elució 10X i col·locar-lo entre els vidres de la electroforesi.
4. Clavar la pinça dels marcadors entre els vidres i afegir l'agarosa per segellar i deixar solidificar 10min, aproximadament.
5. Emplenar la cubeta de tampó d'elució.
6. Treure la pinça del marcador molecular i carregar pròpiament 5uL de marcador.
7. Córrer el gel a 5mA/gel en la font d'electroforesi i pujar progressivament 5mA/gel cada 15min.
8. Quan el front de blau de bromofenol ha arribat al final del gel indica que ha finalitzat l'electroforesi, i s'atura el voltatge.
9. Es desmunta els vidres i s'elimina el *strip* i l'agarosa.

Un cop han corregut els gels de SDS-PAGE [Criterion Empty Cassettes, Bio-Rad] polimeritzats al 8% (4.4mL H<sub>2</sub>O mQ, 1.6mL d'acrilamida/bisacrilamida [40%], 2mL tampó gel separador (x4), 40µL persulfat (15%) i 4µL TEMED) es poden portar a terme protocols diferents en funció de quin sigui l'objectiu que s'estigui buscant.

Per exemple, es pot fer una tinció de blau de *Comassie* amb l'objectiu de veure les proteïnes que ha separat aquesta electroforesi 2D en funció del seu punt isoelèctric i la seva massa molecular, o es pot fer una tinció de nitrat de plata que és més sensible (Simpson, 2010) (Rabilloud, et al., 1994). Tanmateix, també es pot fer un *Western Blot* que mitjançant anticossos ens permetrà identificar antígens característics.

### 3.3.5 Tinció Blau de Coomassie

El colorant blau de *Coomassie* és específic per proteïnes i proporciona una tinció quantitativa ja que s'observen uns *spots* més intensos quan més proteïna hi ha. Aquesta tinció presenta una sensibilitat propera a 1µg (Simpson, 2010).

Així doncs, un cop ha corregut el gel es pot aplicar una tinció de blau de *Coomassie*:

1. Es posa el gel amb un tupper amb una solució de fixació entre 10min a 1h.
2. Aboquem la solució fixadora (7% àcid acètic, 50% metanol, 43% $H_2O$ mQ) i afegim una solució de Blau de Coomassie (1% Coomassie Brilliant Blue Reagent en 1:4:4: àcid acètic, metanol i  $H_2O$ mQ) i es deixa 15min amb agitació.
3. Abocar la solució de *Coomassie* en el mateix pot ja que es reutilitza i fem un rentat amb àcid acètic al 7% dins la campana.
4. Es deixa o/n amb àcid acètic 7% per acabar d'eliminar el colorant.
5. S'elimina l'àcid acètic i es neteja el gel amb aigua mQ.
6. Es plastifica el gel i es fa una fotografia.

### 3.3.6 Tinció de nitrat de plata

La tinció de nitrat de plata és un mètode no quantitatiu que té una sensibilitat fins a mil vegades superior a la de blau de *Coomassie* permetent detectar proteïnes entre 2 i 5ng (Rabilloud, et al., 1994). Aquesta tinció s'utilitzarà quan es vulgui determinar la presència d'alguna proteïna minoritària que no es detecta per blau de *Coomassie*. El protocol següent és el següent:

1. Fixació de proteïnes durant 1h aproximadament en agitació suau amb solució fixadora (50% metanol, 12% d'àcid acètic i 37% formaldehid[0.5mL/L]).
2. Rentats: 3x20min amb etanol 50% en agitació.
3. Pretractament oxidant: deixar 1min en solució oxidant (0.2g/ $LNa_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ , Si Vf=50mL, 0.01g  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  i 50mL  $H_2O$  mQ).
4. Rentats: 3x20s en  $H_2O$ mQ.
5. Impregnació: deixar 20min en solució d'impregnació (2g/L  $AgNO_3$ , Si Vf=50mL, 0.1g  $AgNO_3$ , 37.5µL formaldehid i 50mL  $H_2O$ mQ).
6. Rentats: 2x20s en  $H_2O$ mQ
7. Revelat: deixar fins que es vegi que va quedant marró en solució de revelat (Si Vf= 50mL, 3g  $Na_2CO_3$ , 25µL formaldehid, 1mL  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  i 50mL  $H_2O$ mQ) i agitació suau.
8. Rentats: 2x20s en  $H_2O$ mQ.
9. Aturada: deixar 10min en solució d'aturada(50%metanol, 12% àcid acètic) i agitació suau.
10. Rentats: 1x20min en 50% metanol. Els gels es poden conservar en metanol o  $H_2O$ mQ.

### 3.3.7 Protocol Western Blot

L'objectiu d'aquesta tècnica és bàsicament detectar les proteïnes que presenten l'antigen sLe<sup>x</sup>, o altres com EGFR. El protocol portat a terme diferència 3 parts d'aquesta tècnica: la transferència, incubació amb anticossos i revelat, i les condicions òptimes per aquest es mostren a continuació.

- ❖ **TRANSFERÈNCIA:** les proteïnes són transferides per aplicació d'un camp elèctric a una membrana on es quedaran immobilitzades.



1. Preparar 1L de tampó de transferència (TT)<sup>13</sup>Tris-Glicina (per 1L: 14.4g Glicina, 3g TRIS, 800mL H<sub>2</sub>O mQ, 200mL metanol) o Carbonat bicarbonat (per 800mL: 40mL NaHCO<sub>3</sub> 0.2M, 12mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2M, fins a 640mL amb H<sub>2</sub>O mQ, 160mL metanol) deixar-lo 4°C o -20°C
2. Preparar els components de la transferència: membranes PDVF, whatmans, esponges, cassetes i cubeta.
3. Desmuntar l'electroforesi i marcar els gels i apuntar com s'han marcats per així saber la orientació correcte.
4. Equilibrar els components de la transferència (MEMBRANES PVDF: 15 seg amb metanol+ 2min aigua mQ + 10-20min amb TT, WHATMANS I ESPONGES: 10-20min en TT, GELS 10-20min en TT al agitador).
5. Muntar la transferència. Casset: Cara negra, Esponja, 2 Whatmans<sup>14</sup>, Gel, Membrana, 1Whatman, Esponja i cara blanca. Cada vegada que posem un component es passa un *roller* per evitar bombolles.
6. Posem el casset a la cubeta amb una "mosca"/magneto i el bloc de gel, cobrim amb TT fins la mida del forats del casset i posem la tapa.
7. Transferir a 30V *overnight* o a 100V durant 4hores a 4°C, amb agitació constant.
8. Desmuntar la transferència. S'ha de marcar la membrana igual que el gel per saber en quina cara tenim les proteïnes.

❖ **INCUBACIÓ AMB ANTICOSSOS:** a la membrana amb les proteïnes immobilitzades s'haurà d'aplicar un bloqueig amb albúmina de sèrum boví (BSA), que s'uneix a les zones sense proteïnes, per evitar les unions inespecífiques dels anticossos. Seguidament, s'utilitzarà un anticòs primari dirigit contra l'antigen específic que vulguem determinar. Finalment, s'addicionarà un anticòs secundari marcat que s'uneix específicament contra el primari, i que li proporcionarà la detecció ja que portarà un marcatge que es podrà detectar.

1. Preparar TBST ( 1L: 10mL TRIS, 20mL NaCl 5M, 1mL Tween-20, enrasar amb H<sub>2</sub>O mQ) i solucions d'incubació i bloqueig (BSA3% en TSBST: 1.5g BSA en 50mL TBST).
2. Bloqueig durant 1 hora a *overnight* en la solució de bloqueig (3%BSA [Bovine Serum Albuminen Fraction V] enTBST).
3. Rentats:
  - 5x5 segons en aigua mQ
  - 1x 5min en TBST
4. Incubació amb l'anticòs primari (CSLEX 1/70) [Pharmingen<sup>TM</sup>] o (Anti-EGFR<sup>15</sup> 1/10000) [sc-373746, A-10 Santa Cruz] en TBST, 0,5% BSA durant 2 hores en agitació.
5. Rentats:
  - 5x5 segons en aigua mQ
  - 3x 5min en TBST
6. Incubació amb l'anticòs secundari, en el cas de CSLEX s'utilitza el [Mouse-POD (IgG+IgM): 1/40000]en TBST, 0,5% BSA durant 1 hores en agitació, o en el cas de Anti-EGFR [Goat Anti-Mouse IgG H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate 1mg/mL, Ref:401215, Millipore:1/10000].
7. Rentats:
  - 5x5 segons en aigua mQ
  - 5x 5min en TBST

<sup>13</sup>Es prepara 1L de TT per cada gel que es vulgui transferir.

<sup>14</sup>Si es fa una transferència d'un gel mitjà (13x8cm) es posa un sol whatman.

<sup>15</sup>Quan es faci un *Western Blot* <EGFR> el bloqueig serà amb un 5% de llet en pols i les incubacions dels anticossos amb un 3% de llet en pols.

## ❖ REVELAT

1. Eliminar l'excés de líquid de la membrana i col·locar-la en una superfície llisa.
2. Barrejar 1000 o 3000ul de solució A i 1000 o 3000ul de solució B [Immobilion Western, Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore]. En gels petits (8x8cm) 1000ul, en gels mitjans (13x8cm) 3000ul.
3. Incubar 5min protegit de la llum.
4. Eliminar l'excés de revelador de la membrana i col·locar-la entre els dos plàstics. Eliminar les bombolles.
5. Adquisició de la imatge amb el luminometre [Alpha Innotech FluoChem™ SP].

### 3.3.8 Protocol Stripping

El terme *stripping* és com s'anomena a la metodologia que consisteix en eliminar l'anticòs primari i secundari que es troba unit a la membrana utilitzada prèviament per la realització d'una nova incubació amb anticossos. Aquesta metodologia és útil quan es vol investigar la presència de més d'una proteïna en la mateixa membrana. El protocol seguit és el que es mostra a continuació:

1. Si la membrana està seca posar-la 20 segons, aproximadament, amb metanol fins que es trobi humida.
2. Rentats: 3x5segons H<sub>2</sub>OmQ i 2x5min TBS.
3. Incubació amb solució de stripping [Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific]: 10min RT en agitació i 20min en el bany a 37°C i anar agitant cada 5min.
4. Rentats: 2x10min TBS i 2x5min TBST.
5. Es continua amb el protocol del Western Blot però amb els anticossos considerats oportuns segons la proteïna que es vulgui detectar.

### 3.4 Anàlisi de imatges

Al llarg d'aquest projecte s'han analitzat diferents imatges per quantificar la quantitat de proteïna observada en gels tenyits amb *blau de Coomassie* o per identificar una proteïna concreta d'una membrana de *Western Blot* a un gel tenyit amb *Coomassie*.

Per quantificar la quantitat proteica d'una determinada línia cel·lular s'ha utilitzat el programa *ImageJ*. Amb aquest s'han seleccionat el conjunt de bandes amb més intensitat de cada una de les línies cel·lulars i s'ha calculat per cada una un valor de intensitat. També, s'ha quantificat tot el carril sencer de cada una de les línies cel·lulars analitzades. Per exemple: s'ha escollit la mostra control Capan-1 i s'han seleccionat les bandes més ben definides i intenses, on per cada una d'elles s'ha obtingut un valor de intensitat i s'han relativitzat respecte les mateixes bandes de les altres línies cel·lulars. Tot seguit s'ha fet el mateix però ara seleccionant tot el carril del control Capan-1 que ha donat un valor de intensitat que s'ha relativitzat amb els valors dels carrils de les altres línies cel·lulars. La ràtio (intensitat de les bandes control respecte cadascuna de les altres línies cel·lulars) obtinguda per les dues metodologies va ser pràcticament la mateixa.

D'altra banda, l'anàlisi de imatge que fa referència a la identificació d'un *spot* concret d'una membrana de *Western Blot* amb el corresponent *spot* del gel tenyit amb blau de *Coomassie* s'ha realitzat mitjançant el programa *Adobe Photoshop*. A través d'aquest programa es poden sobreposar les imatges i determinar els *spots* que es solapen. Per portar a terme un bon solapament s'ha agafat com a referència els *spots* majoritaris de mateixa massa molecular i punt isoelèctric que es detecten tant a la membrana com en el gel tenyit, assegurant que els marcadors de pes molecular es solapen.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

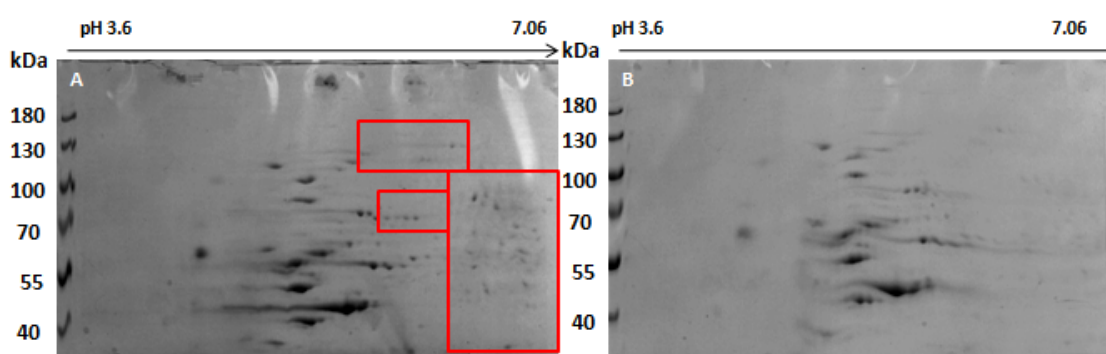
Els resultats obtinguts mostren els anàlisis de sLe<sup>x</sup> en llisats cel·lulars de cèl·lules de PaC que han estat silenciades amb els gens de les sialil-transferases ST3GAL3 i ST3GAL4.

### 4.1 Obtenció dels llisats cel·lulars i quantificació proteica

En primer lloc es van cultivar les cèl·lules control i silenciades, tant de les línies cel·lulars Capan-1 com BxPC3. Es van sembrar  $1.8 \cdot 10^6$  cèl·lules en plaques de petri de 10cm de diàmetre fins a obtenir una confluència del 75%, aproximadament. A partir d'aquestes plaques es van obtenir els corresponents llisats cel·lulars.

Els llisats cel·lulars s'han realitzat mitjançant l'aplicació de dos mètodes diferents de disruptió mecànica: 1) amb múltiples passades d'injeccions utilitzant una xeringa amb una agulla de 25G 2) amb el *Lysing Matrix Tubes (beads mill)* utilitzant el *Tissue Lyser*. Per determinar el mètode més òptim per l'extracció de proteïnes s'ha fet una comparativa a partir d'una quantificació per Bradford d'un llisat cel·lular obtingut per cadascuna de les dues metodologies. La quantificació d'una mostra de cèl·lules scramble BxPC3 ha donat valors similars pels dos mètodes: 3.42ug/uL llisada amb agulla, i 3.47ug/uL llisada amb *beads*. Amb aquests valors de concentració no es pot determinar si hi ha alguna metodologia més òptima ja que les concentracions de proteïna són pràcticament iguals.

No obstant, es va valorar si alguna d'aquestes metodologies podia influir en la resolució dels *spots* obtinguts en gels d'electroforesi bidimensional. Realitzant una electroforesi 2D i la posterior tinció amb blau de *Coomassie* carregant la mateixa quantitat de proteïna provinent del mateix llisat cel·lular es va detectar que els *spots* del gel, provinent de les cèl·lules llisades amb *beads* tenien millor definició i resolució (**Figura 4A**). També es detecten més *spots* (veure **requadre vermell Figura 4A**) al gel de la mostra llisada amb *beads*. Els *spots* es van quantificar mitjançant el programa *ImageJ* i s'obtenien valors més elevats d'intensitat en el gel amb mostra llisada amb *beads* que amb agulla. Així doncs, es decideix realitzar els futurs llisats utilitzant *beads*.



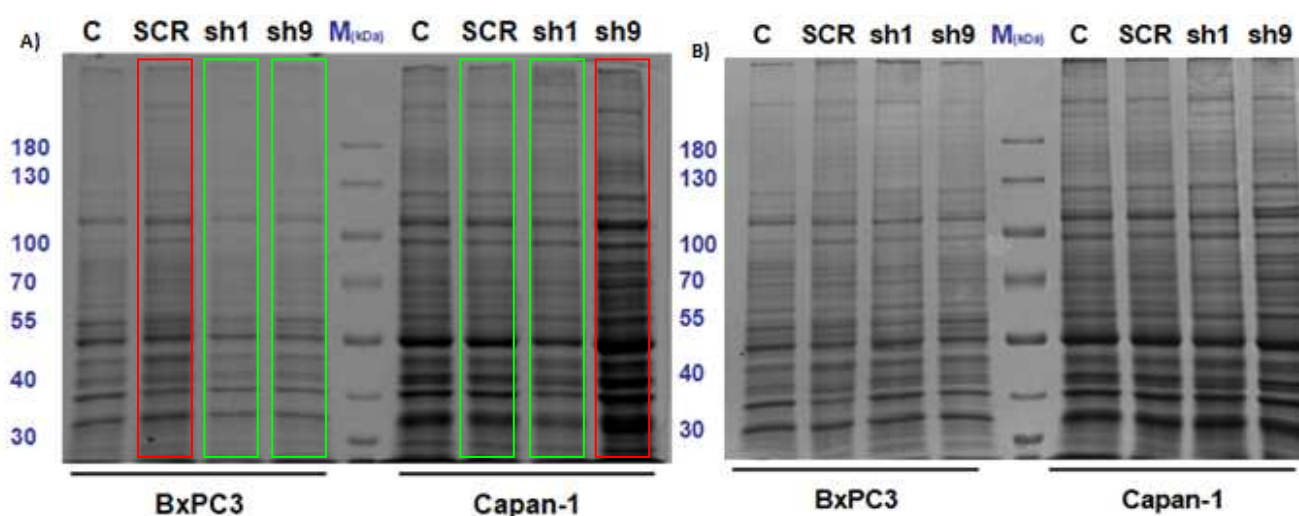
**Figura 4.** A. Gel d'electroforesi 2D tenyit amb blau de *Coomassie* on s'ha utilitzat una mostra BxPC3 scramble llisada amb *beads* amb un *strip* de primera dimensió de pH 3.6-9.5, on es va avaluar la separació de proteïnes en el marge de pH 3.6 a 7.06 (0-11.5cm del *strip*) . B. Gel d'electroforesi 2D tenyit amb blau de *Coomassie* on s'ha utilitzat mostra BxPC3 scramble llisada amb agulla amb un *strip* de primera dimensió de pH 3.6-9.5, on es va avaluar la separació de proteïnes en el marge de pH 3.6 a 7.06 (0-11.5cm del *strip*). En **vermell** els *spots* que es detecten només en un gel.

Per valorar que la quantificació proteica amb el mètode de Bradford dels llisats cel·lulars era prou acurada (**Taula 6**) es van analitzar els llisats proteics de les diferents línies cel·lulars: Capan-1 (control, scramble, sh1, i sh9) i BxPC3 (control, scramble, sh1, i sh9) mitjançant un gel d'electroforesi convencional tenyit amb blau de *Coomassie*. Es van quantificar les bandes tenyides amb *Coomassie* de cadascuna de les mostres amb el programa *ImageJ* per analitzar si la quantitat de carrega proteica era la mateixa entre les diferents línies

cel·lulars, i en cas de detectar diferències es va recalculer el valor de la concentració proteica de la mostra (Figura 5A).

**Taula 6.** Valors de les concentracions proteiques de cada línia cel·lular quantificades pel mètode de Bradford i recalculades mitjançant l'anàlisi d'intensitat de les bandes del gel tenyit amb *Coomassie* amb el programa *ImageJ*.

	Concentració (ug/uL)	Control	Scramble	Sh1	Sh9
Quantificades per Bradford	BxPC3	2.06	1.53	1.71	2.812
	Capan-1	0.97	0.98	1.18	1.00
Recalculades gel <i>Coomassie</i> amb <i>ImageJ</i>	BxPC3	2.06	1.92	1.12	2.06
	Capan-1	0.97	0.84	0.84	1.5



**Figura 5. A)** Gel d'electroforesi tenyit en blau de *Coomassie* on es detecta que les concentracions proteiques de cada línia cel·lular no estan acuradament quantificades ja que hi ha diferència de intensitat entre elles quan s'ha carregat la mateixa quantitat proteica segons la quantificació obtinguda pel mètode de Bradford (Capan-1 40ug, i BxPC3 25ug). En vermell els carrils que presenten més intensitat de bandes respecte el control, i en verd els que presenten menys intensitat respecte el control. C=control, scr=scramble. **B)** Gel d'electroforesi tenyit en blau de *Coomassie* on, a partir de les concentracions proteiques recalculades mitjançant l'anàlisi d'intensitat de les bandes del gel A tenyit amb *Coomassie* amb el programa *ImageJ*, s'observa que la quantitat de proteïna carregada (Capan-1 40ug, i BxPC3 25ug) és la mateixa en cada línia cel·lular indicant que les concentracions recalculades amb *imageJ* són correctes.

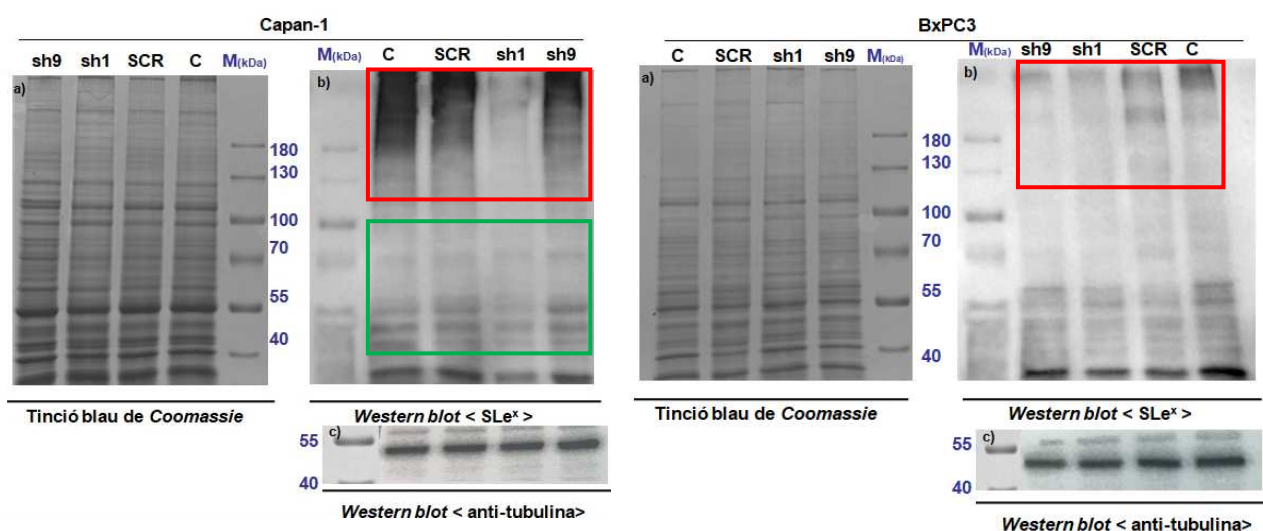
Observant cada carril de la **Figura 5A**, on es va carregar la mateixa quantitat de proteïna segons la quantificació feta pel mètode de Bradford per cada línia cel·lular, s'observen intensitats diferents entre els carrils indicant així que les concentracions quantificades pel mètode Bradford no van ser prou acurades. Aquests errors poden provenir del propi mètode utilitzat ja que la recta patró utilitzada per interpolar el valor de concentració proteica presenta un pendent molt baix ( $\text{pendent} < 0.5$ ), provocant que petites diferències d'absorbàncies, degudes a errors experimentals, puguin donar valors de concentració molt diferents. Es va valorar utilitzar altres mètodes de quantificació com és el mètode BCA però es va descartar perquè provoca interferències amb agents quelants i reductors (Thermo Fisher Scientific, 2010).

El programa *ImageJ* permet quantificar la intensitat de les bandes proteiques a partir de la imatge digital del gel tenyit amb blau de *Coomassie* (**Figura 5A**). Es calcula la intensitat de banda o carril de cada una de les línies cel·lulars, i es normalitzen els valors a partir d'un de referència (s'ha utilitzat el control), i així es recalculen les noves concentracions. Observant la **Figura 5B** es veu com les noves concentracions són més exactes ja que la intensitat de les bandes dels carrils de cada línia cel·lular és pràcticament igual.

## 4.2 Anàlisi de l'expressió de Sialil Lewis x en les línies cel·lulars de PaC silenciades amb gens de ST3GAL3 i ST3GAL4, per SDS-PAGE i Western Blot

Per electroforesi i *Western Blot* amb anticossos anti-sLe<sup>x</sup> dels llisats cel·lulars s'analitzarà el grau d'expressió de proteïnes amb sLe<sup>x</sup>. S'utilitzaran les línies cel·lulars Capan-1 i BxPC3 control, i silenciades per als gens de ST3GAL3 i ST3GAL4. Les proteïnes de les diferents línies cel·lulars es separen per pes molecular mitjançant una electroforesi convencional on a cada pouet es carrega un llisat cel·lular diferent: control, scramble, i les silenciades amb shRNAs (sh1 i sh4 silenciades per ST3GAL4, i sh7 i sh9 silenciades per ST3GAL3). Tot seguit, es realitza un *Western Blot* utilitzant com anticòs primari anti-sLe<sup>x</sup> (CSLEX) que s'unirà als antígens sLe<sup>x</sup>, i posteriorment un anticòs secundari marcat amb peroxidasa, que reconeix la part constant de l'anticòs primari i reacciona amb la solució reveladora permetent la detecció de senyal d'aquelles proteïnes que presentin antigen sLe<sup>x</sup>.

En les imatges que es presenten a continuació (**Figures 6 i 7**) s'observa que únicament s'han carregat les mostres control, scramble, sh1 i sh9 de Capan-1 i BxPC3, la resta de línies cel·lulars silenciades s'han descartat perquè en anàlisis previs no es va detectar una disminució del senyal sLe<sup>x</sup> respecte la mostra control o scramble, indicant que els shRNAs utilitzats (sh7 de BxPC3, i sh4, sh7 de Capan-1) no eren efectius per la disminució del nivell de sLe<sup>x</sup>. La línia cel·lular sh9 Capan-1 tampoc va presentar una disminució de senyal però s'ha analitzat igualment per tenir un exemple d'un sh no efectiu en el silenciament de ST3GAL3.



**Figura 6.** a) Tinció del gel d'electroforesi amb blau de *Coomassie* dels llisats de les diferents línies cel·lulars de Capan-1, a la dreta el marcador molecular (M). b) *Western blot* <sLe<sup>x</sup>> de les diferents línies cel·lulars de Capan-1 amb el marcador (M) a l'esquerra. C=control SCR= control intern (Scramble) c) *Western Blot*<anti-tubulina> de les diferents línies cel·lulars de Capan-1. Els **requadres vermell** i **verd** indiquen les principals diferències de senyal detectades entre les línies silenciades i les control.

**Figura 7.**a) Tinció de blau de *Coomassie* a les diferents línies cel·lulars de BxPC3, a la dreta el marcador molecular (M). b) *Western Blot*<sLe<sup>x</sup>> de les diferents línies cel·lulars de BxPC3 amb el marcador (M) a l'esquerra. C=control SCR= control intern (Scramble) c) *Western Blot*<anti-tubulina> de les diferents línies cel·lulars de BxPC3. El **requadre vermell** indiquen les principals diferències de senyal detectades.

### 4.2.1 Anàlisi proteic

El primer que es realitza abans de valorar les diferències de senyal sLe<sup>x</sup> entre les línies cel·lulars és assegurar que s'ha carregat la mateixa quantitat de proteïna, i que les possibles diferències de senyal entre línies cel·lulars que es puguin detectar siguin degudes únicament al silenciament del gen ST3GAL3 o ST3GAL4 i no a diferències en la carrega de proteïna.

La tinció blau de *Coomassie* s'ha realitzat perquè al ser quantitativa permet assegurar que s'ha carregat la mateixa quantitat de proteïna per cada línia cel·lular. Analitzant les bandes obtingudes utilitzant *ImageJ* es veu com hi ha la mateixa intensitat de banda (**Figura 6a i 7a**). Per tant, s'ha carregat la mateixa quantitat de proteïna en totes les mostres analitzades.

D'altra banda, es va analitzar la possible detecció de petites diferències d'intensitat en el rang de 40 a 50kDa de les cèl·lules silenciades, ja que els gens ST3GAL3 i ST3GAL4 que codifiquen per les sialil-transferases ST3Gal III (MM=42.2kDa) i ST3Gal IV (MM=39.04kDa) (Uniprot, 2019) es trobaven silenciats. Per tant, s'espera que en les línies cel·lulars sh1 i sh9, que són les silenciades, deixin d'expressar ST3Gal III i ST3Gal IV i per tant hi hagi una absència o disminució de la intensitat de les bandes en aquest rang. No obstant, aquest fenomen no es detecta a la **Figura 6a** ni a la **7a**. Una possible justificació seria que la tinció de blau de *Coomassie* té una sensibilitat propera a 1ug de proteïna i podria ser que les ST3Gal III i ST3Gal IV es trobessin en una quantitat inferior fent que no siguin detectables per aquesta tinció.

També, es van analitzar altres rangs de massa molecular per si es detectava absència o disminució de intensitat en les bandes de les línies silenciades ja que al silenciar un determinant gen també pot afectar al grau d'expressió d'altres gens, provocant que altres proteïnes variïn el seu nivell d'expressió. És per això que a les línies cel·lulars silenciades amb shRNA pels gens ST3GAL3 o ST3GAL4 també es podria detectar absència de bandes a altres rangs de pes molecular. Tanmateix, tampoc es detecta una clara disminució de intensitat, possiblement pel mateix motiu explicat anteriorment.

#### **4.2.2 Anàlisi del senyal Sialil Lewis x en les línies cel·lulars de PaC silenciades amb els gens de ST3GAL3 i ST3GAL4 per SDS-PAGE i Western Blot**

Pel que fa la detecció del senyal s'observa que les principals diferències en quant el senyal de sLe<sup>x</sup> es detecten a la part superior de la membrana (**Figura 6b i 7b, requadre vermell**), és a dir, en proteïnes de massa molecular elevada, per sobre de 100kDa, essent especialment remarcable per sobre de 180kDa. En les línies cel·lulars transfectades (*sh*) es detecta menys senyal per sLe<sup>x</sup> que les control i scramble com a conseqüència del silenciament dels gens ST3GAL3 o ST3GAL4.

Tanmateix, es pot afirmar que la línia cel·lular Capan-1 presenta més senyal de sLe<sup>x</sup> respecte la BxPC3. Aquest fenomen pot ser un dels motius pels quals es pot detectar de manera més clara diferències de senyal en diferents masses moleculars en les cèl·lules Capan-1, i en canvi costa més detectar diferències de senyal en cèl·lules BxPC3. Aquest fet es podria veure, sobretot, en el rang de 40-100kDa de Capan-1 on es detecten fàcilment diferències de intensitat de senyal sLe<sup>x</sup> (**Figura 6b, requadre verd**) en comparació amb BxPC3 si es mira el mateix rang.

Concretament, si s'observa la **Figura 6b** es veu com les línies cel·lulars sh1 i sh9 de BxPC3 presenten una disminució dels nivells de sLe<sup>x</sup> en comparació al grup control i el scramble indicant que el silenciament és efectiu. En canvi, les línies cel·lulars de Capan-1 (**Figura 7b**) s'observa que sh1 expressen menys senyal de sLe<sup>x</sup>, mentre que sh9 sembla que tinguin un nivell de sLe<sup>x</sup> semblant al scramble. Això podria indicar que el shRNA utilitzat en sh9 no és efectiu per la disminució de sLe<sup>x</sup>.

#### **4.2.3 Anàlisi de la quantitat de proteïna transferida en una membrana mitjançant un *stripping* <anti-tubulina>**

Per assegurar que la reducció del senyal, esmentada en l'apartat anterior, en les línies cel·lulars silenciades és ocasionada únicament pel *knockdown* produït en els gens codificants de sialil-transferases i no es degut a

una mala quantificació proteica, o bé que no s'hagi transferit tota la proteïna de cada una de les mostres a la membrana, es procedeix a fer un *stripping* anti-tubulina.

L'aplicació d'un *stripping* seguit d'un *Western Blot* <anti-tubulina> s'ha realitzat amb l'objectiu de detectar la presència de la proteïna tubulina en la mateixa membrana on s'han identificat proteïnes amb sLe<sup>x</sup>.

En aquest cas, la tubulina actuarà com una proteïna constitutiva, per tant, s'espera observar el mateix senyal en totes les línies cel·lulars ja que s'ha carregat la mateixa quantitat de proteïna en l'electroforesi. Si no és així serà indicatiu que hi ha algun error, i per tant, els nivells observats de sLe<sup>x</sup> no seran fiables degut a una mala quantificació de proteïna.

Com que la banda que correspon a la tubulina (49.9kDa) (Uniprot, 2019) presenta la mateixa intensitat en totes les mostres carregades (**Figura 6c i 7c**), es confirma que hi ha la mateixa quantitat de proteïna carregada en totes les mostres tant de Capan-1 com BxPC3. Així les diferències de senyal (sLe<sup>x</sup>) en el *Western Blot* <sLe<sup>x</sup>> anterior (**Figura 6b i 7b**) són degudes al silenciament amb shRNA i no a que s'hagi carregat diferent quantitat de proteïna.

### **4.3. Electroforesi bidimensional per analitzar els llisats proteics de les línies cel·lulars de Capan-1 i BxPC3**

L'objectiu de fer aquesta tècnica després de l'electroforesi convencional és perquè en aquesta última només es separaven les proteïnes en funció de la massa molecular (MM). Per tant, quan es feia un *Western Blot* únicament es podia determinar quines proteïnes d'un rang determinat de massa molecular específica presentaven senyal per sLe<sup>x</sup>, però no es podien assignar a bandes concretes del SDS-PAGE. El interès de fer una electroforesi bidimensional es troba en el fet que també separa per punt isoelèctric (pI), per tant, és molt més resolutiva. Així doncs, després de l'aplicació de *Western Blot* s'espera poder determinar quines proteïnes presenten senyal d'acord a les característiques de pes molecular i punt isoelèctric, i poder-les identificar en el gel de 2D tenyit amb blau de *Coomassie*. Amb l'electroforesi bidimensional dos proteïnes de mateixa massa molecular es podran separar i es podrà observar si les dues presenten senyal de sLe<sup>x</sup>.

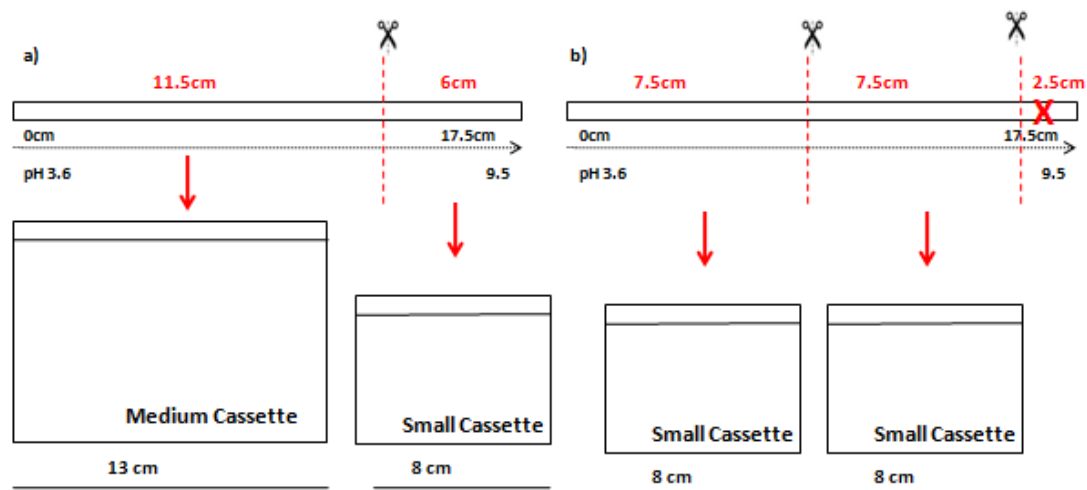
#### **4.3.1 Optimització condicions de l'electroforesi 2D**

Per poder determinar les condicions i els paràmetres adequats s'han portat a terme diferents electroforesis bidimensionals amb les seves rèpliques corresponents per comprovar la seva reproductibilitat. Així doncs, al llarg d'aquest projecte s'han realitzats uns primers gels on no s'ha detectat una bona definició i resolució, sobretot, perquè els *spots* no es trobaven ben focalitzats. Per tant, a continuació es presenten diferents paràmetres que s'han modificat per obtenir resultats reproduïbles.

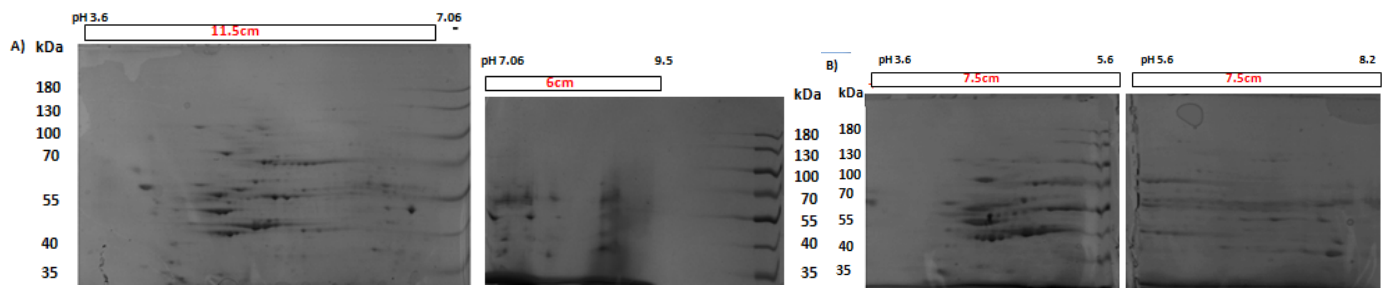
##### **-Mida dels gels**

A partir de *strips* de 17.5cm (de pH=3.6 a pH=9.5) amb un protocol prèviament descrit pel grup de treball s'ha dut a terme la primera dimensió.

A continuació per evitar treballar amb gels de segona dimensió de 18x18cm, que suposaria en l'etapa de *Western Blot* un consum molt elevat d'anticòs, s'ha avaluat el pas del *strip* de primera a dos gels de segona dimensió de grandàries més reduïdes: a) un gel de 13.3 x 8.7cm i 8x8cm o bé b) dos gels de 8x8cm, tallant prèviament el *strip* de primera dimensió (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema on es mostra els punts de tall del *strip* per passar de primera dimensió a segona dimensió en dos gels: a) *Medium cassette* (13.3x8.7cm) + *small cassette* (8x8cm) o b) *small cassette* (8x8cm) + *small cassette* (8x8cm).

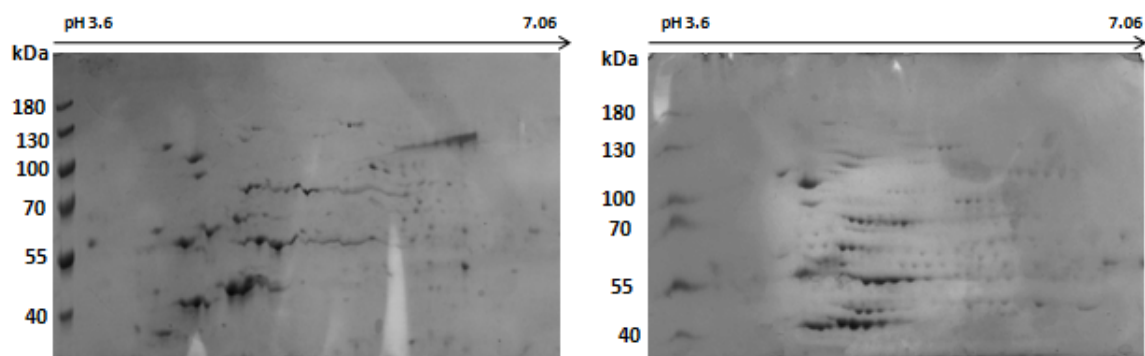


**Figura 9.A.** Tinció de *Coomassie* del gel *medium cassette* on s'ha col·locat un *strip* de 0 a 11.5cm (sh1 BxPC3) i del gel *small cassette* on s'ha col·locat el mateix *strip* però de 11.5 a 17.5cm. **B.** Tinció de *Coomassie* de 2 gels petits (*small cassette*) (sh1 BxPC3), amb *strips* (7.5cm i 7.5cm), on es separen les proteïnes per massa molecular (kDa) i per punt isoelèctric.

Comparant la resolució i la definició dels *spots* de la mateixa mostra (sh1 BxPC3), canviant únicament les dimensions del gel, es pot detectar com s'obté més bona resolució amb el gel del *medium cassette* (**Figura 9A**). Probablement, això es deu a que el *strip* no es talla pel mig, de manera que no s'altera en cap moment el fragment de pH on es situen la major part de les proteïnes.

#### - Voltatge i amperatge de la segona dimensió

S'ha detectat en varis gels realitzats una distorsió en els *spots* atribuïbles a la realització del gel de segona dimensió, com s'observa a la **Figura 10A**. Es va reduir el voltatge màxim al que s'arribava durant l'etapa de l'electroforesi (200V), quan s'augmentava l'amperatge fins a 40mA/gel (**Figura 10A**), a un màxim de 140V, quan s'augmenta l'amperatge fins a un màxim 25mA/gel (**Figura 10B**), el que va permetre millorar la resolució de l'electroforesi.

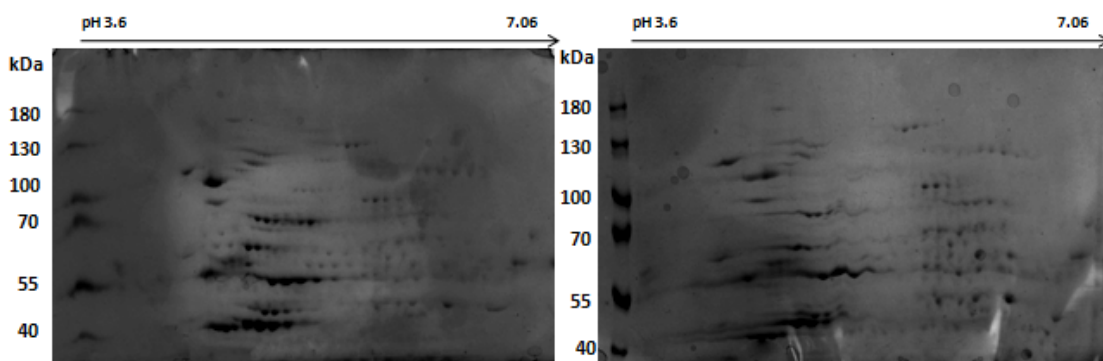


**Figura 10.** A l'esquerra gel on s'ha arribat a un màxim de 200V en la segona dimensió. A la dreta, gel on s'ha arribat a un màxim de 140V en la segona dimensió. Mostra carregada: BxPC3 scramble amb *strip* de 0-11.5cm en *medium cassette*.



Així doncs, es detecta que augmentant l'amperatge gradualment fins que s'arribava a un màxim de 140V els *spots* es trobaven ben focalitzats i es deixen d'observar les línies horitzontals (**Figura 10**), que són resultat d'un moviment electroendosmòtic de l'aigua i les proteïnes.

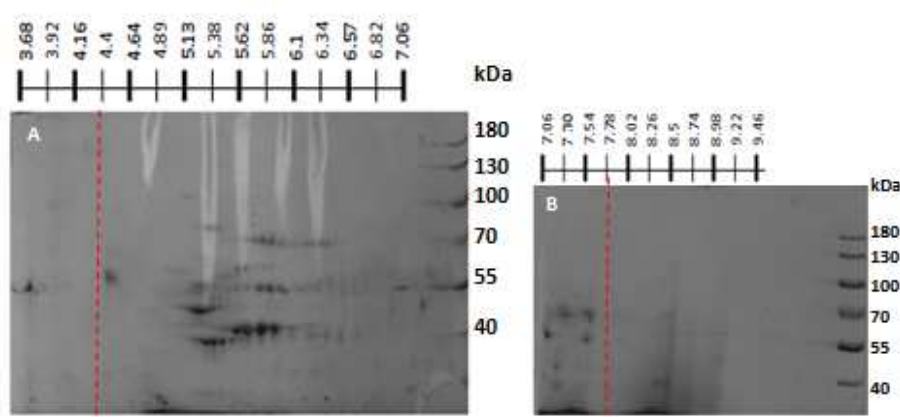
D'altra banda, s'ha vist que l'amperatge s'ha de mantenir constant i pujar-lo molt gradualment (5uA/gel cada 15minuts) per facilitar l'entrada de proteïnes d'alt pes molecular i una millor focalització. Si en comptes de 5uA/gel cada 15min es realitza 10uA/gel cada 15min no es detecten tants *spots* i no queden tan ben focalitzats (**Figura 11**).



**Figura 11.** A l'esquerra gel on s'ha augmentat 5uA/gel cada 15 minuts. A la dreta, gel on s'ha augmentat 10uA/gel cada 15 minuts. Mostra carregada: scramble BxPC3amb strip de 0-11.5cm en *medium cassette*.

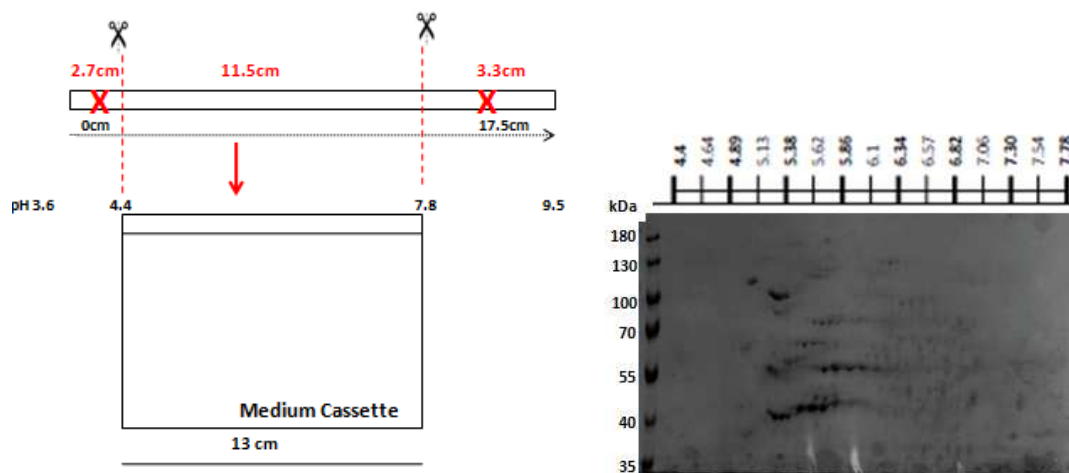
### -Detecció de les proteïnes mitjançant electroforesi 2D dels llisats cel·lulars seguit d'una tinció de blau de Coomassie

Amb l'observació dels *spots* en el gel bidimensional tenyit amb blau de *Coomassie* es pot observar les proteïnes que es detecten en quant al punt isoelèctric i la massa molecular. Es pot veure com s'obté un major nombre de proteïnes en el rang de pH 4.4 a 7.9 (**Figura 12**). La resta del *strip* que correspon als extrems (pH 3.6 a 4.4, i pH 7.8 a 9.5) no es detecten pràcticament proteïnes i es deixa d'analitzar.



**Figura 12. A.** Fotografia del gel *medium cassette* on s'ha col·locat un *strip* de 0 a 11.5cm (scramble BxPC3), i es separen les proteïnes per massa molecular (kDa) i per punt isoelèctric, on a l'esquerra es troba el pol + (pH=3.68) fins el a la dreta on hi ha el pol - (pH=7.06). **B.** Fotografia de gel petit (*small cassette*) (scramble BxPC3), amb *strip* (11.5cm a 17.5cm), on es separen les proteïnes per massa molecular (kDa) i per punt isoelèctric, on a l'esquerra es troba el pol + (pH=7.06) fins el a la dreta on hi ha el pol - (pH=9.46). Les **línies vermelles** acoten el fragment on es detecten la majoria de *spots*.

Així doncs, en les conseqüents electroforesis seguides de *Western Blot* només es faran amb el fragment de *strip* 2.7cm (pH=4.4) a 14.2cm (pH=7.8) que és el rang on s'han observat proteïnes. Per tant, a partir d'aquest moment el *strip* es tallarà com es mostra a continuació (**Figura 13**).



**Figura 13.** A l'esquerra, esquema on es mostra els punts de tall del *strip* per contenir tot el conjunt de proteïnes de la mostra en el mateix gel. A la dreta, gel d'electroforesi 2D on s'ha col·locat el fragment del *strip* de pH=4.4 a 7.8 on es detecten la majoria de les proteïnes cel·lulars més abundants.

Finalment, de les diferents repeticions d'aquest protocol 2D es pot concloure que per obtenir una bona resolució en aquesta tècnica és important tenir en compte diferents factors com: tallar el *strip* de 0 a 11.5cm (pH=3.6 a 7.06) i 11.5 a 17.5 (pH= 7.06 a 9.5), o en cas de voler contenir totes les proteïnes en el mateix gel el tall es produirà de 2.7cm a 14.2cm (pH=4.4 a 7.8), no superar el màxim voltatge (140V) i augmentar l'amperatge gradualment (cada 15minuts i 5uA/gel).

#### 4.4 Anàlisi dels llisats cel·lulars per electroforesi 2D i posterior *Western Blot* amb anticossos anti-sLe<sup>x</sup>

Un cop obtingudes les condicions òptimes de l'electroforesi bidimensional es va procedir a l'anàlisi dels llisats cel·lulars de les diferents línies cel·lulars, control (parental i scramble) i silenciades, per *Western Blot* amb l'objectiu de detectar quines de les proteïnes separades per l'electroforesi presentaven l'antigen sLe<sup>x</sup>.

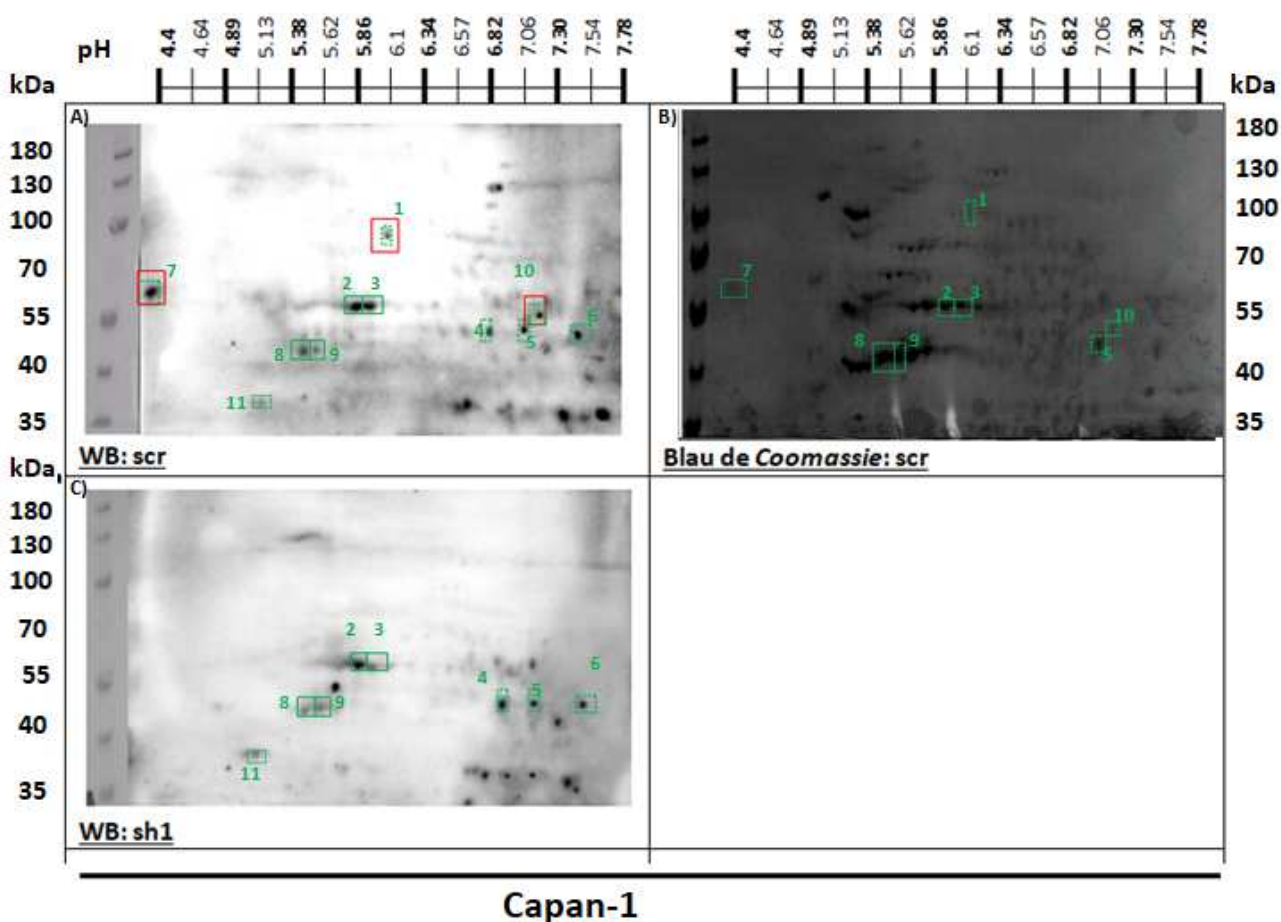
S'han escollit les línies cel·lulars (**Figura 6 i 7**) que presentaven una reducció de senyal significativa respecte el control i scramble (BxPC3: sh1, sh9 vs. Scramble i parental, i Capan-1: sh1 vs scramble i parental) amb l'objectiu de detectar quines eren les proteïnes que reduïen el seu contingut amb sLe<sup>x</sup> en les línies cel·lulars silenciades (shRNA). Per altra banda, totes aquelles proteïnes amb senyal sLe<sup>x</sup> que s'observen a les membranes control i scramble és interessant poder-les detectar en gels tenyits amb blau de *Coomassie* per identificar posteriorment quines proteïnes són *carriers* de sLe<sup>x</sup> i són de potencial interès.

##### 4.4.1 Línies cel·lulars Capan-1

Com que les cèl·lules de Capan-1 tenen un nivell més elevat de sLe<sup>x</sup> que BxPC3, es va a analitzar en primer lloc el nivell d'expressió de sLe<sup>x</sup> en les cèl·lules Capan-1 scramble. Es va comparar la imatge de la membrana del *Western Blot* amb la del gel d'electroforesi tenyit amb blau de *Coomassie* de la mostra scramble per tal de determinar quines de les proteïnes *carriers* de sLe<sup>x</sup> (spots de WB) es poden detectar en el gel de *Coomassie* (**Figura 14-requadres verds**).

Amb aquesta comparativa destaquen com a proteïnes detectades amb senyal de sLe<sup>x</sup> en les cèl·lules scramble Capan-1: **Proteïna 1**: MM=aprox.100kDa i pI=6.1, **Proteïna 2**: MM=55kDa i pI=5.9, **Proteïna 3**: MM=55kDa i pI=6, **Proteïna 4**: MM=aprox. 50kDa i pI=6.8, **Proteïna 5**: MM=aprox. 50kDa i pI=7, **Proteïna 6**: MM=aprox. 50kDa i pI=7.5, **Proteïna 7**: MM=aprox.60kDa i pI= 4.4, **Proteïna 8**: MM=aprox.50kDa i pI= 5.4, **Proteïna 9**: MM=aprox. 50kDa i pI=5.6, **Proteïna 10**: MM=aprox. 55kDa i pI=7.2, **Proteïna 11**: MM= 35-40kDa i pI= 5.2.

Algunes d'aquestes proteïnes (veure **requadre verd discontinu**) no es visualitzen<sup>16</sup> o no es detecten tan nítidament en el gel tenyit en blau de *Coomassie* presentat a continuació, sinó que s'ha hagut d'augmentar el contrast per poder-les detectar. Aquest fenomen es podria explicar amb el fet que hi ha proteïnes que es troben en quantitats molt baixes fent que la tinció de blau de *Coomassie* no sigui suficientment sensible com per detectar-les (sensibilitat 1ug). D'altra banda, el fet que el gel tenyit en blau de *Coomassie* no s'hagi corregut en l'electroforesi bidimensional en paral·lel amb el de transferència podria dificultar la visualització d'un patró de *spots* exactament idèntic.



**Figura 14.** A) Membrana de *Western Blot* on s'observen els *spots* amb senyal sLe<sup>x</sup> de la mostra scramble Capan-1. B) Gel tenyit amb blau de *Coomassie* on es veuen els *spots* de la mostra scramble Capan-1. C) Membrana de *Western Blot* on s'observen els *spots* amb senyal sLe<sup>x</sup> de la mostra sh1 Capan-1. A la part superior està indicada l'escala de pH per indicar quin punt isoelèctric té cada una de les proteïnes. Als marges esquerra i dret l'escala de massa molecular (kDa). Els **requadres verds** corresponen a les proteïnes amb senyal sLe<sup>x</sup> que també es detecten en el gel tenyit amb blau de *Coomassie*, en discontinu aquells *spots* que costen més de detectar i s'ha hagut d'augmentar el contrast per detectar-los. Els **requadres vermells** indiquen proteïnes amb senyal sLe<sup>x</sup> que no es detecten a la membrana de sh1 (silenciades). WB= *Western Blot* (tampó bicarbonat-carbonat), scr=scramble.

<sup>16</sup> Tot i no visualitzar-les clarament en el gel E2D tenyit amb blau de *Coomassie* sí que s'han detectat en altres membranes amb senyal sLe<sup>x</sup> (rèpliques) el mateix patró de *spots*, és per això que s'han classificat com a proteïnes portadores de senyal sLe<sup>x</sup>.

Tanmateix, es van comparar les membranes del *Western Blot* de scramble i sh1 per si hi havia alguna proteïna amb sLe<sup>x</sup> que expressés de manera diferencial el senyal sLe<sup>x</sup>.

Si es comparen les membranes de sh1 i scramble (**Figura 14**) es poden detectar diferents proteïnes amb senyal sLe<sup>x</sup> a la membrana de scramble Capan-1 (**Proteïna 1**: MM=aprox.100kDa i pI=6.1, **Proteïna 7**: MM=aprox.60kDa i pI= 4.4, **Proteïna 10**: MM= aprox. 55kDa i pI=7.2) que no s'observen en la sh1 de Capan-1 (**Figura 14A- requadre vermell**). Aquest fenomen indicaria que el silenciament del gen ST3GAL4 ha disminuït la biosíntesi de sLe<sup>x</sup> en els glicans de les proteïnes que es detecten només a la membrana de scramble Capan-1. Tanmateix, també s'han detectat proteïnes portadores de sLe<sup>x</sup> comunes entre les membranes scramble i sh1 amb nivells similars de sLe<sup>x</sup>. Es podria dir que el silenciament del gen ST3GAL4 no ha afectat a la biosíntesi de sLe<sup>x</sup> en els seus glicans. O bé, que el sLe<sup>x</sup> és conseqüència d'altres ST3Gal com ST3Gal III que en sh1 Capan-1 no es troba silenciada.

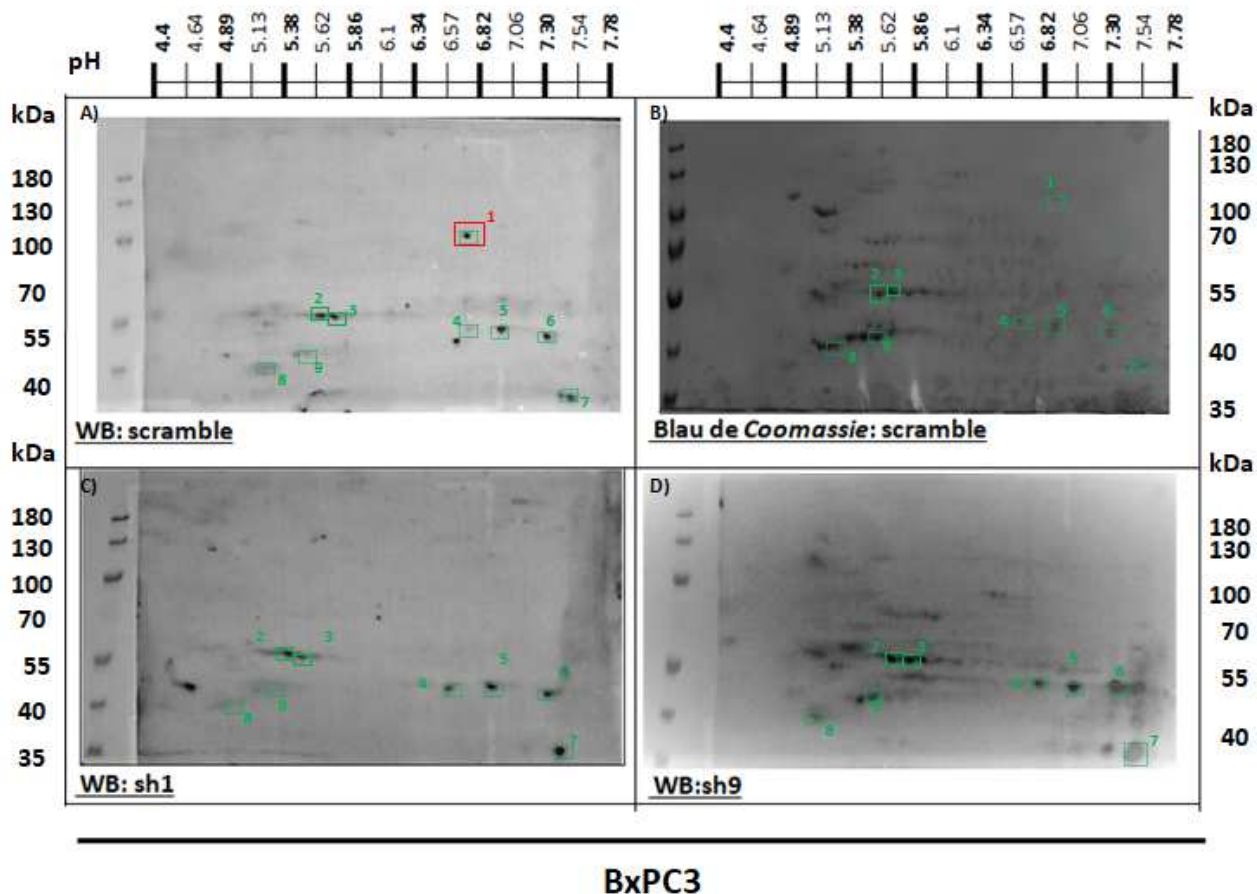
També hi han proteïnes amb sLe<sup>x</sup> que es detecten a sh1 i no a scramble, la proteïna que es veu clarament ben definida amb senyal sLe<sup>x</sup> sh1 Capan-1 és la que es troba entre la proteïna 2 i 9, la qual tindria una massa molecular aproximada de 55kDa i un punt isoelèctric al voltant de 5.7.

D'altra banda comentar que les membranes presentades anteriorment s'han obtingut a partir d'una transferència (*Western Blot*) amb el tampó bicarbonat-carbonat en comptes del tampó TRIS-Glicina perquè és més bàsic (pH= 9.5) i així s'assegura que les proteïnes amb punt isoelèctric més bàsic es transfereixin a la membrana. No obstant, no s'han detectat diferències significatives utilitzant el tampó bicarbonat-carbonat respecte altres membranes transferides amb tampó TRIS-Glicina. Per tant, les imatges seleccionades per presentar en aquest treball segueixen el criteri de millor resolució i focalització, independentment del tampó utilitzat.

#### 4.4.2 Línees cel·lulars BxPC3

Pel que fa les proteïnes *carriers* de sLe<sup>x</sup> de les cèl·lules tumorals BxPC3 detectades a partir de la comparativa entre la membrana de *Western Blot* i el gel tenyit amb blau de *Coomassie* de la mostra scramble BxPC3 són: **Proteïna 1**: MM=aprox. 100kDa i pI=6.7, **Proteïna 2**: MM= 55 kDa i pI=5.6, **Proteïna 3**: MM=55kDa i pI=5.7, **Proteïna 4**: MM= aprox. 50kDa i pI=6.7, **Proteïna 5**: MM= aprox. 50kDa i pI= 7, **Proteïna 6**= aprox. 50kDa i pI=7.4, **Proteïna 7**: MM=aprox. 35kDa i pI=7.5, **Proteïna 8**: MM=40 kDa i pI=5.2, **Proteïna 9**: MM=aprox. 45kDa i pI=5.5 (**Figura 15- requadres verd**).

Una comparativa semblant també s'aplica entre les membranes scramble i sh1, scramble i sh9 de BxPC3, on també es detecta un *spot* amb senyal sLe<sup>x</sup> en la membrana de scramble (**Proteïna 1**: MM= 100kDa i pI= 6.7 ) que no s'observa a les membranes sh1 i sh9 de BxPC3 (**Figura 15- requadre vermell**). Així doncs, el nivell de sLe<sup>x</sup> d'aquesta proteïna únicament detectable a la membrana de scramble BxPC3 ha disminuït pel silenciament de ST3GAL4 en cas de sh1 i per ST3GAL3 en el cas de sh9.



**Figura 15. A)** Membrana de *Western Blot* on s'observen els spots amb senyal sLe<sup>x</sup> de la mostra scramble BxPC3. **B)** Gel tenyit amb blau de *Coomassie* on es veuen els spots de la mostra scramble BxPC3. **C)** Membrana de *Western Blot* on s'observen els spots amb senyal sLe<sup>x</sup> de la mostra sh1 BxPC3. **D)** Membrana de *Western Blot* on s'observen els spots amb senyal sLe<sup>x</sup> de la mostra sh9 BxPC3. A la part superior està indicada l'escala de pH per indicar quin punt isoelèctric té cada una de les proteïnes. Als marges esquerra i dret l'escala de massa molecular (kDa). Els **requadres verds** corresponen a les proteïnes amb senyal sLe<sup>x</sup> que també es detecten en el gel tenyit amb blau de *Coomassie*, en discontinuo aquells spots que costen més de detectar i s'ha hagut d'augmentar el contrast per detectar-los. Els **requadres vermells** indiquen proteïnes amb senyal sLe<sup>x</sup> que no es detecten a les membranes de sh1 i sh9 (silenciades). WB= Western Blot, scr=scramble.

Tanmateix, s'han detectat un conjunt de proteïnes *carriers* de sLe<sup>x</sup> que per pI i MM podrien ser comunes tant en Capan-1 com en BxPC3. Per tant, són un conjunt de *carriers* que es troben tant en cèl·lules provinents de tumors primaris (BxPC3) com en cèl·lules provinents de tumors secundaris o metàstasis (Capan-1). Aquestes proteïnes comunes en les dues línies cel·lulars serien les anomenades com a **Proteïna 2**, **Proteïna 3**, **Proteïna 4**, **Proteïna 5**, **Proteïna 6** i **Proteïna 9**.

#### 4.4.3. Canvis generals en el patró de sLe<sup>x</sup> en les línies silenciades vs. les corresponents scramble

Es pot observar que tant a les cèl·lules Capan-1 com a les BxPC3 no es detecten moltes diferències en el patró de spots amb senyal de sLe<sup>x</sup> entre les corresponents línies cel·lulars scramble vs. les sh. Aquest fenomen es podria explicar pel fet que només s'ha silenciat un gen ST3GAL (ja sigui ST3GAL3 o ST3GAL4) en cadascuna de les línies sh. Per tant, el sLe<sup>x</sup> que es troba en les proteïnes tant de les línies sh com en scramble pot ser generat per la resta d'enzims codificats per gens ST3GAL que no s'han silenciat, com són ST3GAL3, ST3GAL4, ST3GAL1, ST3GAL2, i ST3GAL6, i que poden incorporar sLe<sup>x</sup> en els glicans de les proteïnes.

A més, cal tenir en compte que els shRNAs utilitzats no generen un silenciament total dels gens ST3GAL3 i ST3GAL4. En el cas de sh1 Capan-1 hi ha un silenciament del 90% mentre que en sh1 i sh9 de BxPC3 el silenciament és del 70%, el que suggereix una disminució parcial del nivell dels corresponents enzims ST3Gal

III i ST3Gal IV de manera que poden generar sLe<sup>x</sup> en els glicans d'algunes proteïnes encara que sigui en menor grau.

Un altre aspecte a considerar fa referència al marge de masses moleculars on s'observen les proteïnes portadores de sLe<sup>x</sup>. Si s'observa la **Figura 6 i 7** les diferències de sLe<sup>x</sup> dels llisats entre les línies cel·lulars es donen bàsicament en el rang de massa molecular superior a 180kDa. Mentre que en el rang inferior de massa molecular no es detectaven diferències de senyal significatives. En els WB de les electroforesis 2D, la majoria de proteïnes *carriers* de sLe<sup>x</sup> s'han detectat a masses de 35 a 100kDa exceptuant tant la **Proteïna 1** de Capan-1 i com la **Proteïna 1** de BxPC3 que es troben al voltant de 100kDa. No obstant, no s'han pogut observar diferències per sobre de 180kDa. Això es podria explicar amb que hi ha hagut un problema d'entrada de proteïnes d'elevat pes molecular. Tanmateix, si s'observa el **requadre verd** de la **Figura 6b** que senyalava les diferències d'expressió de sLe<sup>x</sup> en el rang de 40 a 100kDa del WB provinent d'una electroforesi convencional de la línia cel·lular Capan-1, es veu com aquestes diferències de senyal sí que es veuen representades en el WB de l'electroforesi 2D ja que és el rang principal on s'han detectat *spots* diferencials entre les línies cel·lulars comparades. Aquest mateix fenomen no s'observa de manera tant evident en les membranes de BxPC3 provinents de E2D ja que en el rang de 40 a 100kDa de la membrana convencional de BxPC3 (**Figura 7b**) les diferències de senyal entre les cèl·lules control i silenciades no es detecten de manera tant clara com en el cas de Capan-1.

D'altra banda, un dels motius pels quals les proteïnes de més de 180kDa presentin una elevada senyal de sLe<sup>x</sup> pot ser a que els seus múltiples epítops presentin l'antigen sLe<sup>x</sup>, i no a que hi hagin moltes més proteïnes amb senyal sLe<sup>x</sup>. Mentre que, potser, les proteïnes de massa molecular inferior no es detecta tant senyal de sLe<sup>x</sup> perquè tenen menys epítops amb antigen sLe<sup>x</sup>.

Així doncs, amb l'objectiu de detectar diferències en el rang de massa molecular elevada es van repetir els *Western Blot* tapant el senyal de la part inferior de la membrana que corresponen a les proteïnes de baix pes molecular, per forçar la detecció de senyal on en un principi s'espera detectar diferències.

#### 4.5. Detecció de proteïnes d'elevat pes molecular

Es procedeix a analitzar el senyal sLe<sup>x</sup> en proteïnes d'elevat pes molecular perquè és on es detecten més diferències de sLe<sup>x</sup> en el *Western Blot* provinent de l'electroforesi convencional (**Figura 6 i 7**). Per fer-ho quan es realitza el *Western Blot* del gel provinent de la segona dimensió, a l'hora de revelar, es tapa la zona inferior a 100kDa per intentar obtenir més senyal a la part superior de la membrana.

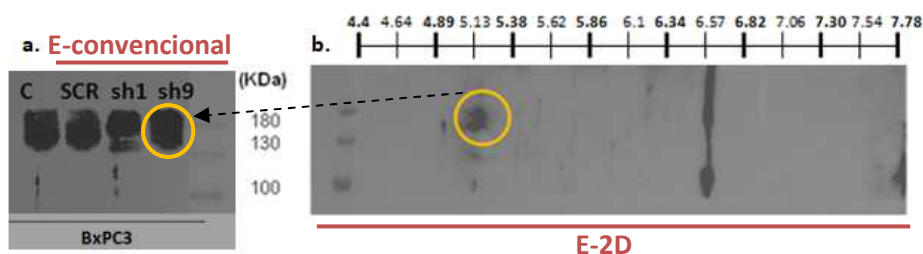


**Figura 16.** Imatge de membrana (WB) amb <sLe<sup>x</sup>> de la part de proteïnes d'elevat pes molecular d'una mostra de BxPC3 sh1 el fragment del *strip* col·locat és de pH=4.4 a 7.8 on conté totes les proteïnes.

La **Figura 16** mostra només dos *spots* febles, fet que porta a pensar que potser durant el pas de primera dimensió a la segona no entren en el gel de la segona dimensió (8% d'acrilamida) les proteïnes d'elevat pes molecular que serien les que mostrarien diferències de senyal més significatives entre les línies cel·lulars.

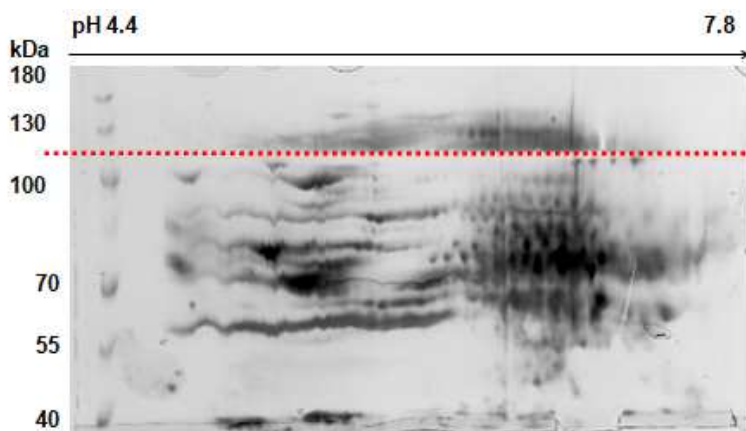
Per determinar si hi ha entrada de proteïnes d'elevat pes molecular es decideix fer un *stripping* seguit d'un *Western Blot* amb anticòs <EGFR> d'una de les membranes de les línies cel·lulars de BxPC3 ja que està descrit que expressen més EGFR que les Capan-1. El EGFR és un receptor proteic d'elevat pes molecular (MM=132kDa). Es va detectar un *spot* que té un pI de 5.13 i una MM entre 130 i 180 kDa, que està d'acord amb els paràmetres descrits a nivell biogràfic per la proteïna EGFR (p.I=6.17, MM=132kDa) (Uniprot, 2019) i també amb els paràmetres experimentals descrits per Reymond, M.A, et al.(1997) on detecten la EGFR en pI 5.85, 5.93 i 5.73 amb una MM de 151.9, 151.9, 150.5kDa per electroforesi 2DE. Les possibles diferències de pI es poden donar a nivell de glicosilació i/o fosforilació fent que al tenir carrega més negativa migrin més cap a pH àcids.

El senyal que es va obtenir per l'EGFR a la membrana provenint de l'electroforesi bidimensional (**Figura 17b**) on s'havien analitzat 200ug de llisat proteic va ser molt més feble que l'obtingut a la membrana provinent del SDS-PAGE (**Figura 17a**), on es van carregar 40ug de llisat. Per tant, es dedueix que hi ha una baixa transferència de proteïnes d'elevat pes molecular en els gels de segona dimensió.



**Figura 17a.** Membrana provinent d'electroforesi convencional que conté llisat de BxPC3 on s'ha realitzat un Western blot <EGFR>. **b.** *Western blot* <EGFR> de la part superior de la membrana provinent d'una electroforesi bidimensional (E-2D) on hi ha les proteïnes de pes molecular superior a 100kDa d'una mostra de sh9 BxPC3.

Per poder determinar que aquesta poca senyal no es deu a un problema de transferència sinó a un problema d'entrada de les proteïnes al gel es decideix fer una tinció de nitrats de plata sobre el gel tenyit amb blau de *Coomassie*. Observant la **Figura 18** es veu com a partir de 130kDa cap a masses moleculars més elevades no es detecten *spots*. Per tant, hi ha una limitació en l'entrada de proteïnes d'elevada massa molecular en el gel de segona dimensió. Vist això, es podria fer una electroforesi bidimensional al 6% en comptes del 8% per intentar que entrin les proteïnes d'elevat pes molecular que són les que tenen diferències a nivell de sLe<sup>x</sup>, o bé un gel en gradient (4%-15%).



**Figura 18.** Imatge gel (sh9 BxPC3 amb *strip* de 0-11.5cm en *medium cassette*.) tenyit amb nitrats de plata. La línia vermella separa el gel per on l'hem tallat per fer la tinció de nitrats amb l'objectiu de revelar-ho per separat per evitar que la part inferior (on hi ha més proteïnes) es cremés. El temps de revelat de la part inferior va ser de 2min, mentre que la part superior de 10min.

#### 4.6 Observacions /Comentaris finals

Els resultats presentats mostren com les cèl·lules Capan-1 i BxPC3 presenten proteïnes portadores de sLe<sup>x</sup> que es poden identificar en el gel d'acord a la seva massa molecular i el seu punt isoelèctric. En el cas que és volgués saber la proteïna concreta que es detecta s'hauria d'analitzar per espectrometria de masses. Les cèl·lules Capan-1 tenen un nivell de senyal de sLe<sup>x</sup> més elevat que les BxPC3 i aquesta diferència es podria explicar amb el fet que Capan-1 són cèl·lules provinents d'un procés de metàstasi del fetge on el paper de l'antigen sLe<sup>x</sup> ha estat clau per desenvolupar un tumor secundari en el pàncrees, mentre que les BxPC3 provenen d'un tumor primari de pàncrees. En les dues línies cel·lulars i utilitzant la metodologia d'electroforesi bidimensional s'han pogut detectar proteïnes *carriers* de sLe<sup>x</sup> que probablement són comunes, ja que comparteixen la mateixa massa molecular aproximada i punt isoelèctric, indicant així que tant en un tumor primari com secundari hi ha proteïnes comunes portadores de sLe<sup>x</sup>. Això ens pot portar a pensar que les sialil-transferases (ST3Gal III i ST3Gal IV) tenen tendència actuar sobre els glicans de les mateixes proteïnes.

D'altra banda, a partir de les línies cel·lulars silenciades tant de Capan-1 com BxPC3 pels gens ST3GAL3 i ST3GAL4 s'ha pogut detectar una disminució de senyal sLe<sup>x</sup> respecte les línies control. Com es pot apreciar en els WBs provinents de gels de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants, la zona principal on s'observa disminució de senyal per sLe<sup>x</sup> és en el rang superior de massa molecular, per sobre 100kDa, i especialment per sobre de 180kDa. Amb el pas d'electroforesi convencional a bidimensional per detectar més específicament (per MM i pI) quines proteïnes deixen de ser *carriers* de sLe<sup>x</sup> quan els gens ST3GAL3 i ST3GAL4 són silenciats es veu com afecta a un nombre baix de proteïnes, i no es detecten en la zona d'alt pes molecular sinó al voltant de 35-100kDa aprox. Això es deu a que l'entrada de proteïnes d'alt pes molecular del *strip* de la primera dimensió al gel de segona dimensió no és efectiva; com es comprova amb una proteïna d'alt pes molecular com és l'EGFR (MM=130-180KDa). És per això que en uns futurs estudis es proposaria l'opció de gels de gradient o una disminució de % d'acrilamida en els gels de segona dimensió per optimitzar l'entrada d'aquestes proteïnes d'alt pes molecular.



## 5. CONCLUSIONS

Based on the results and the discussion above-mentioned, the following conclusions have been obtained:

1. The knockdown of ST3GAL3 and ST3GAL4 of the Capan-1 and BxPC3 that generate a lower sLe<sup>x</sup> level compared to the control samples (scramble and parental cells) are those that have been transduced with the shRNAs, sh1 and sh9, in the case of BxPC3, and sh1 for Capan-1.
2. The most significant differences in sLe<sup>x</sup> signal are detected in high molecular mass proteins (over 180kDa). Therefore, the sialyl-transferases encoded by ST3GAL3 and ST3GAL4 tend to act mainly in these proteins, which are probably highly glycosylated.
3. To obtain focused and defined spots the parameters optimized in this work are: do not exceed the voltage of 140V in the second dimension of the 2DE, an increase of the amperage (5uA/gel every 15 minutes) gradually in the 2DE, and the use of beads for protein extraction.
4. The cell proteome of Capan-1 and BxPC3 is mainly found in the pH range from 4.4 to 7.9, below and above this pH range, proteins are hardly detected by Coomassie staining.
5. By 2DE, eight proteins that have the same approximate MW and pI have been detected as carriers of sLe<sup>x</sup> in all the Capan-1 cell lines (scramble and silenced cells), and for all BxPC3 cell lines (scramble and silenced cells) other eight proteins with sLe<sup>x</sup> signal, six of them in common the previously ones detected for Capan-1, were also detected.
6. There is a decrease of sLe<sup>x</sup> signal in carrier proteins from silenced Capan-1 and BxPC3 lines, which in 2DE gels are detected in the range of 35-100kDa, probably due to a low entrance of high molecular weight proteins in the second dimension gel.

## 6. SOSTENIBILITAT I ÈTICA

Actualment, existeixen un gran nombre de projectes enfocats a l'estudi dels mecanismes moleculars del càncer per trobar teràpies per la seva cura. Molts d'aquests projectes requereixen l'aprovació dels comitès d'ètica, sobretot, quan es tracta d'utilitzar mostres humanes i de realitzar assajos amb animals d'experimentació. No obstant, aquest no és el cas del projecte presentat ja que no es manipulen animals ni s'utilitzen mostres humanes, encara que s'ha treballat amb cèl·lules d'origen humà. Les línies cel·lulars utilitzades provenen de col·leccions comercials que s'han obtingut inicialment a partir d'una biòpsia d'un tumor el que ha permès generar poblacions de cèl·lules tumorals, que es poden mantenir de manera indefinida en cultiu. El cultiu d'aquestes cèl·lules es porta a terme en un laboratori de cultius cel·lulars que compta amb el corresponent certificat per treballar amb les línies cel·lulars.

Pel que fa l'àmbit de sostenibilitat d'aquest projecte, cal destacar que tot el material utilitzat en els cultius cel·lulars es disposa en uns bidons especials que gestiona una empresa especialitzada en l'eliminació d'aquests residus. Tanmateix, tots els reactius tòxics i contaminants generats o utilitzats al llarg de les diferents metodologies són abocats en els bidons corresponents seguint els protocols de gestió de residus. Molts d'aquests reactius com són el metanol, el DTT o  $\beta$ -mercaptoetanol són manipulats amb guants sota campana d'extracció de gasos per protecció del personal i per evitar contaminació ambiental.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- American Cancer Society. (2018). *Cáncer de páncreas*. Recuperat el 23 de desembre de 2018 de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pancreas.html>
- Angata, T., & Varki, A. (2002). Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical reviews*, 102 (2), 439-469. doi: 10.1021/cr000407m
- Bassagañas, S. (2014). *Regulation and function of sialyltransferases in pancreatic cancer*. (Tesi doctoral, Universitat de Girona, Catalunya). Recuperat de <https://www.tdx.cat/handle/10803/285783>
- Berkelman, T., & Stenstedt, T. (1998). *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and Methods*. Buckinghamshire: Amersham Biosciences.
- Biorad. (2017). *2-D Electrophoresis for proteomics: A methods and product manual*. USA: Biorad.
- Brooks, S., Dwek, M., & Schumacher, U. (2002). *Functional and Molecular Glycobiology* (1a ed.). Oxford: Garland Science.
- de Braud, F., Cascinu, S., & Gatta, G. (2004). Cancer of pancreas. *Critical reviews in oncology/hematology*, 50 (2), 147-155. doi: 10.1016/S1040-8428(03)00156-2
- Deer, E. L., Gonzalez-Hernández, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., et al. (2010). Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *National institutes of Health*, 39 (4), 425-435. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, J., Mathers, C., Parkin, D., Piñeros, M., et al. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144 (8), 1941-1953. doi: 10.1002/ijc.31937
- Fisher Scientific. (2019). *Brand TM Cambra de Neubauer*. Recuperat el 10 de gener de 2019 de <https://www.fishersci.es/shop/products/neubauer-counting-chambers-4/p-8004312>
- Fogh, J., Fogh, J.M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven culture human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59 (1), 221-226. doi: 10.1093/jnci/59.1.221
- Freitas, D., Fernandes, G., Hoff, P., & Cunha, J. (2009). Medical management of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology*, 3 (9), 223-232. doi:10.1159/000199433
- Fuster, M., & Esko, J. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 5 (7), 526-542. doi: 10.1038/nrc1649
- Guerrero, P.E. (2019). *Glicosilación alterada en cáncer de páncreas: desarrollo de nuevos marcadores y estrategias terapéuticas*. (Tesi doctoral en redacció, Universitat de Girona, Catalunya).
- Hames, B. (1998). *Gel electrophoresis of Proteins: A practical Approach* (3a ed.). Oxford: Oxford University Press.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (5), 646-669. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M., Samyn-Petit, B., Julien, S., & Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83 (8), 727-737. doi: 10.1016/S0300-9084(01)01301-3
- Hejmadi, M. (2010). Spread to other sites (metastasis). *A Introduction to Cancer Biology* (p. 43-46). London: Bookboon.
- Hirshberg Foundation for Pancreatic Cancer Research. (2018). *Symptoms*. Recuperat el 3 de gener de 2019 de <http://pancreatic.org/pancreatic-cancer/about-the-pancreas/symptoms/>
- Kim, YS., Itskowitz, SH., Yuan, M., Chung, Y., Umeyama, K., et al. (1988). Lex and Ley antigen expression in human pancreatic cancer. *Cancer research*, 48 (2), 475-482. Recuperat de <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/48/2/475.full.pdf>
- Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1 (2), 157-162. doi: 10.1038/35101031
- Lairson, L., Henrissat, B., Davies, G., & Withers, S. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions and mechanisms. *Annual review of biochemistry*, 77, 521-555. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322
- Lowry, A.M, Leach, S.D, & Philip, P.A. (2008). *Pancreatic Cancer* (1 ed.). Nova York: Springer.
- Narayanan, S. (1994). Sialic acid as a tumor marker. *Annals of clinical laboratory science*, 24 (4), 376-384. Recuperat de <http://www.annclinlabsci.org/content/24/4/376.full.pdf+html>
- National Cancer Institute. (2015). *What is Cancer?* Recuperat el 2 de febrer del 2019 de <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- OMIM. (2014). *ST3 BETA-GALACTOSIDE ALPHA-2,3-SIALYLTRANSFERASE 4; ST3GAL4*. Recuperat el 26 de desembre del 2018 de <https://www.omim.org/entry/104240?search=ST3Gal4&highlight=st3gal4>
- OMIM. (2017). *ST3 BETA-GALACTOSIDE ALPHA-2,3-SIALYLTRANSFERASE 3; ST3GAL3*. Recuperat el 26 de desembre del 2018 de, a <https://www.omim.org/entry/606494>
- Perez-Garay, M., Arteta, B., Pagès, L., Llorens, R., De Bolòs, C., Vidal-Vanaclocha, F., et al. (2010).  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase ST3Gal III modulates pancreatic cancer cell motility and adhesion in vitro and enhances its metastatic potential in vivo. *PLoS One*, 5 (9), 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0012524
- Pietras, K., & Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, 316 (8), 1324-1331. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.045
- Pinho, S., & Reis, C. (2015). Glycosilation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Review Cancer*, 15 (9), 540-555. doi: 10.1038/nrc3982
- Rabilloud, T., Vuillard, L., Gilly, C., & Lawrence, J. (1994). Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: A general overview. *Cellular and Molecular Biology*, 40 (1), 57-75. Recuperat de <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00435208/document>
- Rademacher, T., Parekh, R., & Dwek, R. (1988). Glycobiology. *Annual review of biochemistry*, 57 (1), 758-838. doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.004033
- Reymond, N., Água, B., & Ridley, A. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 13 (12), 858-870. doi: 10.1038/nrc3628

- Reymond, M.A., Sánchez, J.C., Hughes, G.J., Günther, K., Riese, J., Tortola, S., et al. (1977). Standardized characterization of gene expression in human colorectal epithelium by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 18 (15), 2842-2848. doi: 10.1002/elps.1150181520
- Satomura, Y., Sawabu, N., Takemori, Y., Ohta, H., & Watanabe, H. (1991). Expression of various sialylated carbohydrate antigens in malignant and nonmalignant pancreatic tissues. *Pancreas* 6(4) , 448-558.
- Siegel, R., Miller, K., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 65 (1), 5-29. doi: 10.3322/caac.21254.
- Simpson, R. (2010). Rapid coomassie blue staining of protein gels. *Cold Spring Harbor protocols*, 2010 (4), 1-2. doi: 10.1101/pdb.prot5413
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantification of protein. *Methods in Enzymology*, 182 (1), 50-68. doi: 10.1016/0076-6879(90)82008-P
- Strober, W. (2001). Tryptan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*, 21 (1), A3B1-A3B2 doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21
- Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., et al. (1993). Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer research*, 53 (2), 354-361. Recuperat de <http://cancerres.aacrjournals.org/content/53/2/354.full-text.pdf>
- Tan, M., Nowak, N., Loo, R., Ochi, H., Sandberg, A., Lopez, C., et al. (1986). Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer investigation*, 4 (1), 15-23. doi: 10.3109/07357908609039823
- Tennant, D., Durán, R., Boulahbel, H., & Gottlieb, E. (2009). Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis*, 30 (8), 1269-1280. doi: 10.1093/carcin/bgp070
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *Overview of Cell Lysis and Protein Extraction*. Recuperat el 11 de gener de 2019 de <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-cell-lysis-and-protein-extraction.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2010). *Thermo Scientific Pierce Protein Assays Technical Handbook*. Recuperat el 4 de maig de 2019 de <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602063-Protein-Assay-Handbook.pdf>
- Uniprot Consortium. (2019). *Uniprot*. Recuperat el 2 de maig de 2019 de <https://www.uniprot.org/>
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., et al. (2009). *Essentials of Glycobiology*. (2a ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vegue, J. (2004). *Atlas de histología y organografía microscòpica* (2 ed.). Madrid: Editorial medica panamericana.
- Vicent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet*, 378 (9791), 607-620. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0

Wachsmann, M., Pop, L., & Vitetta, E. (2012). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Investigative Medicine*, 60 (4), 643-663. doi: 10.2310/JIM.0b013e31824a4d79

Wang, P. (2005). Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases. *Journal of Cancer Molecular*, 1 (2), 73-81. Recuperat de [https://www.researchgate.net/profile/Peng-Hui\\_Wang/publication/228653807\\_Altered\\_glycosylation\\_in\\_cancer\\_Sialic\\_acids\\_and\\_sialyltransferases/links/00b4951db37ed9cc03000000/Altered-glycosylation-in-cancer-Sialic-acids-and-sialyltransferases.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Peng-Hui_Wang/publication/228653807_Altered_glycosylation_in_cancer_Sialic_acids_and_sialyltransferases/links/00b4951db37ed9cc03000000/Altered-glycosylation-in-cancer-Sialic-acids-and-sialyltransferases.pdf)

Weinberg, R. (2007). *The biology of cancer* (1 ed.). Nova York: Garland Science.