

Títol del treball:

Consecució i Validació del Silenciament de *ST3GAL4* en Línies Cel·lulars de Càncer de Pàncrees: Optimització de la Metodologia

Estudiant: Pau Caravaca Fuentes

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: pau.caravaca@gmail.com

Tutor: Sílvia Barrabés Vera

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Sílvia Barrabés Vera

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): silvia.barrabes@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

Resum

El càncer és causat per la divisió i el creixement desproporcionat de cèl·lules que acaben formant un tumor (degut a canvis en l'expressió d'oncogens i gens supressors de tumors). Aquest passa per diferents estadis l'últim dels quals és la metastasi. La metastasi es produeix quan algunes cèl·lules tumorals són capaces de viatjar pels vasos limfàtics o sanguinis i acabar estenent-se en una altra part del cos. Un dels càncers amb més mortalitat és l'adenocarcinoma ductal de pàncrees (PDAC).

S'ha vist que l'antigen glucídic sialil Lewis x (sLe^x) té un paper important en l'adhesió de cèl·lules tumorals a l'endoteli. Sovint està sobreexpressat en les cèl·lules tumorals a causa de la sobreexpressió de la sialiltransferasa ST3GAL IV (que participa en la biosíntesi de l'antigen). El silenciament del gen *ST3GAL4* podria disminuir, doncs, la capacitat metastàtica de cèl·lules de PDAC. La metodologia CRISPR-Cas9 permet l'edició gènica de llocs específics del genoma utilitzant l'endonucleasa Cas9 i un sgRNA complementari a la seqüència diana on es vol realitzar l'edició. L'edició gènica específica mitjançant aquest mètode es pot utilitzar de manera més rutinària que amb altres sistemes, com les ZFN o les TALENs.

Per a realitzar aquest treball s'ha col·laborat dins del projecte de consecució i validació del silenciament de *ST3GAL4* mitjançant la metodologia CRISPR-Cas9, optimitzant i posant a punt alguns processos i passos dins del projecte global. S'han utilitzat mètodes molt diversos tals com el disseny d'encebadors, l'extracció de plasmidis, assajos de supervivència a la blastidina o diferents sistemes de detecció d'edició gènica a partir de la formació d'heterodúplexs.

Finalment ha estat possible complir amb tots els objectius proposats: s'ha verificat la presència de les dianes pels sgRNAs en els productes amplificats pels primers dissenyats, s'han validat i extret els plasmidis que s'utilitzaran per realitzar el silenciament gènica, s'ha trobat la concentració adequada de blastidina per poder realitzar una selecció amb aquest antibiòtic de les cèl·lules que hagin integrat *Cas9* en el seu genoma, i s'ha vist que l'assaig de mobilitat electroforètica d'heterodúplexs és millor que la digestió amb T7EI en quant a rapidesa del mètode.

Resumen

El cáncer es causado por la división y el crecimiento desproporcionado de células que terminan formando un tumor (debido a cambios en la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores). Éste pasa por diferentes estadios el último de los cuales es la metástasis. La metástasis se produce cuando algunas células tumorales son capaces de viajar a través de los vasos linfáticos o sanguíneos i terminar extendiéndose en otra parte del cuerpo. Uno de los cánceres con más mortalidad es el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC).

Se ha visto que el antígeno glucídico sialil Lewis x (sLe^x) tiene un papel importante en la adhesión de células tumorales al endotelio. A menudo está sobreexpresado en las células tumorales a causa de la sobreexpresión de la sialiltransferasa ST3GAL IV (que participa en la biosíntesis del antígeno). El silenciamiento del gen *ST3GAL4* podría disminuir, pues, la capacidad metastásica de células de PDAC. La metodología CRISPR-Cas9 permite la edición génica de sitios específicos del genoma utilizando la endonucleasa Cas9 y un sgRNA complementario a la secuencia diana donde se quiere realizar la edición. La edición génica específica mediante este método, se puede utilizar de modo más rutinario que con otros sistemas, como las ZFN o las TALENs.

Para realizar este trabajo se ha colaborado dentro del proyecto de consecución y validación del silenciamiento de *ST3GAL4* mediante la metodología CRISPR-Cas9, optimizando y poniendo a punto algunos procesos y pasos dentro del proyecto global. Se han utilizado métodos muy diversos como el diseño de cebadores, la extracción de plásmidos, ensayos de supervivencia a la blastidina o diferentes sistemas de detección de edición génica a partir de la formación de heterodúplex.

Finalmente ha resultado posible cumplir todos los objetivos propuestos: se ha verificado la presencia de las dianas para los sgRNAs en los productos amplificados por los cebadores diseñados, se han validado y extraído los plásmidos lentivirales que se utilizaran para realizar el silenciamiento génico, se ha encontrado la concentración adecuada de blastidina para poder realizar una selección con este antibiótico de las células que hayan integrado *Cas9* en su genoma y se ha visto que el ensayo de movilidad electroforética de heterodúplex es mejor que la digestión con T7EI en cuanto a rapidez del método.

Abstract

Cancer is caused by a disproportionate division and growth of cells that end up forming a tumour (due to changes in the expression of oncogenes and tumour suppressor genes). It goes through different stages, the last of which is metastasis. Metastasis occurs when some tumour cells are able to travel through lymphatic or blood vessels and end up spreading in another part of the body. One of the cancers with the highest mortality is pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).

It has been shown that the glucidic antigen sialyl Lewis x (sLe^x) plays an important role in the adhesion of tumour cells to the endothelium. Usually, it is overexpressed in tumour cells because of the overexpression of the sialyltransferase ST3GAL IV (which participates in the antigen biosynthesis). The silencing of the *ST3GAL4* gene could decrease the metastatic capacity of PDAC cells. The CRISPR-Cas9 methodology allows gene edition of specific genome sites using the endonuclease Cas9 and an sgRNA complementary to the target sequence where the edition is to be performed. Specific gene editing using this method can be used more routinely than other existing systems such as ZFNs or TALENs.

In order to carry out this work, I have collaborated in the project of achieving and validating the silencing of *ST3GAL4* using the CRISPR-Cas9 methodology, optimizing and preparing some processes and steps within the overall project. Very diverse methods have been used, such as primer design, plasmid extraction, survival assays to blasticidin or gene editing detection systems based on the formation of heteroduplexes.

Finally it has been possible to accomplish all the proposed objectives: the presence of the sgRNAs targets in the products amplified by the designed primers have been verified, lentiviral plasmids have been validated and extracted in order to perform gene silencing, the adequate concentration of blasticidin has been found in order to select the cells that have integrated *Cas9* in its genome with this antibiotic, and it has been described that the electrophoretic mobility assay of heteroduplexes is better than the T7EI digestion in terms of the speed of the method.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. El Càncer.....	1
1.2. El Càncer de Pàncrees	2
1.3. Glicobiologia i Càncer	3
1.4. Consecució i Validació d'un Silenciament Gènic	5
2. OBJECTIVES	8
3. MATERIALS I MÈTODES	9
3.1. sgRNAs	9
3.2. Línies Cel·lulars	9
3.3. Llista de Plasmidis.....	9
3.4. Disseny de <i>Primers</i>	9
3.5. Extraccions de DNA, RNA i Plasmidis.....	10
3.5.1. DNA I RNA	10
3.5.2. Plasmidis	10
3.6. Síntesi de cDNA.....	11
3.7. Digestió amb Enzims de Restricció	11
3.8. Gels d'Electroforesi.....	12
3.8.1. Electroforesi en Gel d'Agarosa	12
3.8.2. Electroforesi en Gel de Poliacrilamida.....	13
3.9. PCR	13
3.10. Seqüenciació	14
3.11. Formació d'Heterodúplex i Digestió amb T7EI.....	15
3.12. Assaig de Supervivència a la Blastidina	16
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	17
4.1. Disseny i Validació de <i>Primers</i> per Detectar Edició Gènica.....	17
4.2. Validació i Extracció dels Vectors Lentivirals.	19
4.3. Assaig de Supervivència a la Blastidina	21
4.4. Detecció d'Edició Gènica.....	22
4.4.1. Optimització d'Electroforesi de DNA en Gel de Poliacrilamida	22
4.4.2. Assaig de Mobilitat Electroforètica i Digestió amb T7EI	23
4.5. Discussió General.....	24
5. CONCLUSIONS.....	26
6. BIBLIOGRAFIA	27

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El Càncer

Segons el *National Cancer Institute*, s'entenen com a càncers aquelles malalties en les quals algunes cèl·lules del cos es divideixen sense parar i desproporcionadament formant un tumor (o neoplàsia) que s'acaba estenent pels teixits. Els càncers es classifiquen segons el tipus de cèl·lules que l'originen. Per exemple els carcinomes són càncers derivats de cèl·lules epitelials, els sarcomes són càncers derivats de teixit connectiu i els limfomes són càncers derivats de limfòcits [1].

La majoria de casos de càncer es donen a causa de factors ambientals com són el tabac, una dieta desequilibrada, l'alcohol, els rajos ultraviolats o altres agents químics; mentre que entre un 5 i 10% dels casos són per causa genètica [2].

Els factors de risc esmentats tenen la capacitat de provocar mutacions en les cèl·lules, que si no són reparades adequadament poden desembocar en la transformació d'una cèl·lula normal a una tumoral. Això passa quan les mutacions afecten l'expressió d'oncogens (gens que provoquen el creixement i la divisió cel·lular, en aquests casos s'activen) o bé la de gens supressors de tumors (participen en inhibir la divisió cel·lular i afavoreixen l'apoptosi, en aquests casos perden la funció) [3]. Aquests canvis en l'expressió es van acumulant amb el temps, i permeten a les cèl·lules afectades proliferar sense control i formar un tumor, que en el cas de ser maligne pot desembocar a un càncer.

El procés de formació d'un tumor està desglossat en diferents etapes i involucren alteracions complexes en la maquinària de la cèl·lula, de manera que solen passar anys fins que es forma l'anomenat tumor primari [4]. La *Figura 1*, mostra algunes de les capacitats que han de tenir les cèl·lules per ser canceroses [5].







Component	Acquired Capability	Example of Mechanism
	Self-sufficiency in growth signals	Activate H-Ras oncogene
	Insensitivity to anti-growth signals	Lose retinoblastoma suppressor
	Evading apoptosis	Produce IGF survival factors
	Limitless replicative potential	Turn on telomerase
	Sustained angiogenesis	Produce VEGF inducer
	Tissue invasion & metastasis	Inactivate E-cadherin

Figura 1 | Capacitats que adquireixen les cèl·lules canceroses, amb exemples de mecanismes relacionats [5].

Una vegada està format el tumor primari, algunes de les cèl·lules poden abandonar-lo, i viatjar a través dels vasos sanguinis o limfàtics per anar a parar a altres òrgans, formant una metàstasi (Figura 2). Per tal que una cèl·lula cancerosa aconsegueixi arribar a formar una metàstasi, cal que sobrevisqui a l'estrès que pateix al entrar al torrent circulatori i a l'acció del sistema immunitari durant el transport pels vasos, a més de poder mantenir-se i proliferar al lloc metastàtic; cosa que aconsegueix un percentatge molt petit de cèl·lules [6].

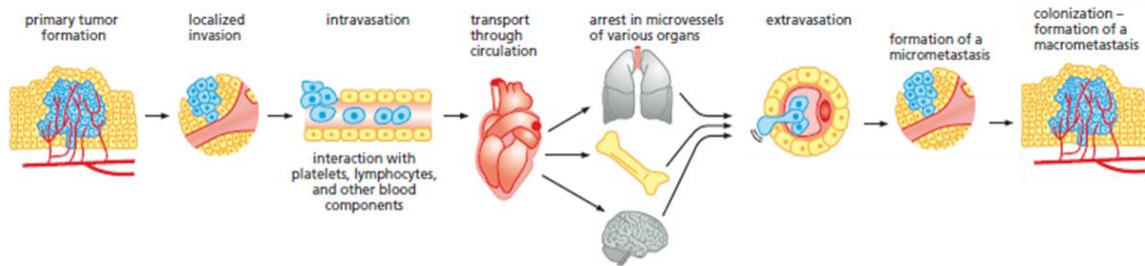


Figura 2 | Procés de formació d'una metàstasi. Les cèl·lules canceroses provinents d'un tumor primari amb angiogènesi realitzen una intravasació (migració transendotelial) en els vasos sanguinis o bé els limfàtics, es transporten per aquests i finalment realitzen una extravasació cap a un altre teixit on formen una micrometàstasi que pot acabar generant una macrometàstasi [4].

Un pas clau en el procés metastàtic és l'adhesió als endotelis abans de l'extravasació, que és possible gràcies en part a la interacció entre les e-selectines dels vasos sanguinis amb els seus lligands: els antigens glucídics sialyl Lewis a (sLe^a) i sialyl Lewis x (sLe^x) i la glicoproteïna de membrana CD44, els quals estan expressats en cèl·lules tumorals [6].

1.2. El Càncer de Pàncrees

El càncer de pàncrees més habitual és l'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC), que comença a les cèl·lules ductals de la part exocrina del pàncrees. Les cèl·lules ductals formen una xarxa de conductes que desemboca al duodè, i s'encarreguen d'afegir mucosa i bicarbonat als enzims digestius que secreten els acins [7].

Degut a canvis en l'expressió de gens com *KRAS*, *CDKN2A* i *TP53* entre d'altres (Figura 3), les cèl·lules ductals poden créixer de forma aberrant i sense control, i formar una neoplàsia intraepitelial pancreàtica (PanIN), que en algun casos pot passar per diferents estadis i acabar desembocant en un adenocarcinoma pancreàtic [7].

Estudiar el càncer de pàncrees és important, i és que, malgrat que afecta tan sols a un 3% de la població (als Estats Units), és la quarta causa de mort per càncer i la supervivència dels afectats per la malaltia al cap de 5 anys de ser diagnosticats és de només el 8% [8]. La meitat dels casos són diagnosticats en estadis avançats (sovint en estadis metastàtics) degut a la falta de símptomes específics en les primeres etapes de la malaltia, cosa que empitjora el pronòstic. A més, està caracteritzat per una ràpida progressió i invasivitat. Per al PDAC en concret i en general pel càncers, les metàstasis suposen el 90% de les morts per càncer [5]; de manera que, a part d'aconseguir un diagnòstic en les etapes inicials, evitar la metàstasi és clau per a la supervivència dels afectats.

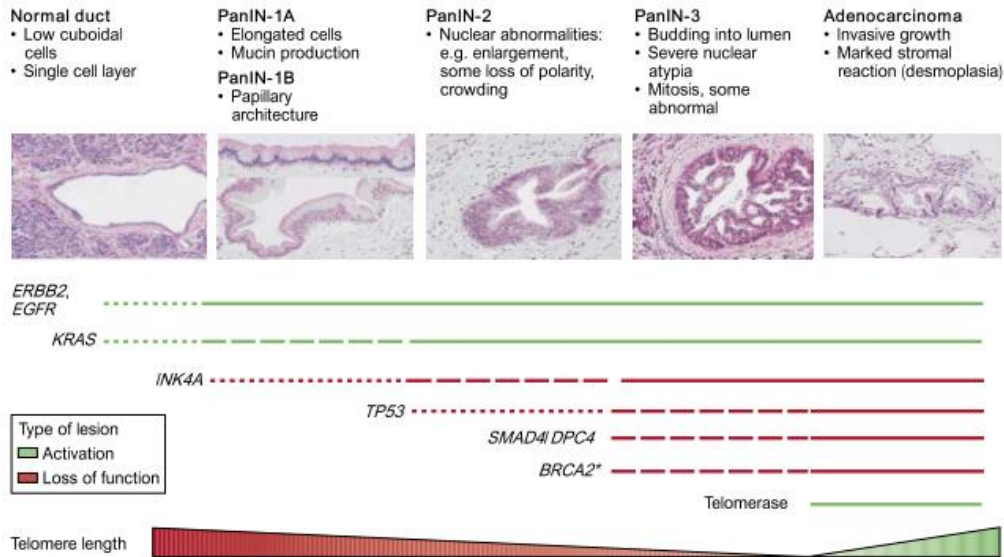


Figura 3. Diferents etapes de la progressió de PanINs precursors a PDAC amb les seves propietats histològiques i les activacions/pèrdua de funció de diferents gens implicats, algunes de les quals s'expliquen a continuació. Es creu que l'activació de KRAS té un paper important en la senyalització autocrina de EGF, i per tant, promou el creixement cel·lular. La inactivació del gen supressor de tumors TP53 permet a les cèl·lules danyades continuar proliferant, sense arribar a l'apoptosi. La inactivació de BRCA2, ajuda a la inestabilitat genètica, resultant en l'acumulació d'aberracions cromosòmiques [7].

1.3. Glicobiologia i Càncer

Els glicans són compostos formats per monosacàrids que, per l'acció combinada de glicosiltransferases i glicosidases, formen macromolècules unides a proteïnes (formant glicoproteïnes) o a lípids (formant glicolípid) [9]. Les principals estructures de glicans es mostren a la Taula 1.

Taula 1 | Tipus i característiques dels glicans

Tipus	Característiques	Lineal/Ramificat	Localització biosíntesi
N-Glicans	Units a residus d'asparagina de la proteïna portadora	Ramificats	Primer al Reticle Endoplasmàtic (ER) seguit de l'Aparell de Golgi (GA)
O-Glicans	Units a residus de serina o treonina	Ramificats	Aparell de Golgi
Glicosaminoglicans (GAG)	Units a residus de serina	Lineals	Pot començar al ER seguit del GA o tan sols al GA
Glicolípid	Units a un lípid portador	Ramificats	

S'ha vist que els patrons de glicosilació estan alterats en cèl·lules canceroses en relació a les sanes. Aquestes alteracions inclouen la sobreexpressió o subexpressió de certes estructures i fins i tot la presència de glicans que normalment tan sols se sintetitzen en teixits embrionaris. Aquestes variacions estan relacionades amb els canvis en els nivells d'expressió d'algunes glicosiltransferases.

Un canvi habitual en la transformació tumoral és l'increment de la sialilació (unió del monosacàrid àcid siàlic en la posició terminal d'estructures glucídiques) per una activitat augmentada de les sialiltransferases, que són les glicosiltransferases que afegeixen residus d'àcid siàlic als glicans i que es troben sovint sobreexpressades en cèl·lules tumorals. Una altra de les alteracions habituals és l'augment de les ramificacions de les estructures glucídiques a causa de l'activitat augmentada de la glicosiltransferasa MGAT5. Aquest augment crea més llocs d'unió pels residus d'àcid siàlic que provoca un augment de la sialilació. A més, l'increment d'activitat de les sialiltransferases pot provocar la sobreexpressió d'alguns epítops associats a cèl·lules canceroses com per exemple sLe^x , sLe^a o àcid polisiàlic (PSA) [9]. La Figura 4 mostra algunes de les alteracions més comunes associades a la transformació tumoral.

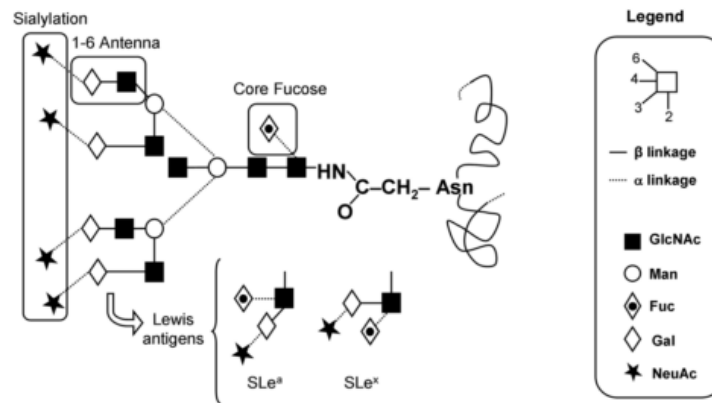


Figura 4 | N-Glicà amb algunes de les alteracions trobades en cèl·lules canceroses. Man: Manosa, Fuc: Fucosa, Gal: Galactosa, NeuAc: Àcid siàlic GlcNAc: N-Acetilglucosamina [10].

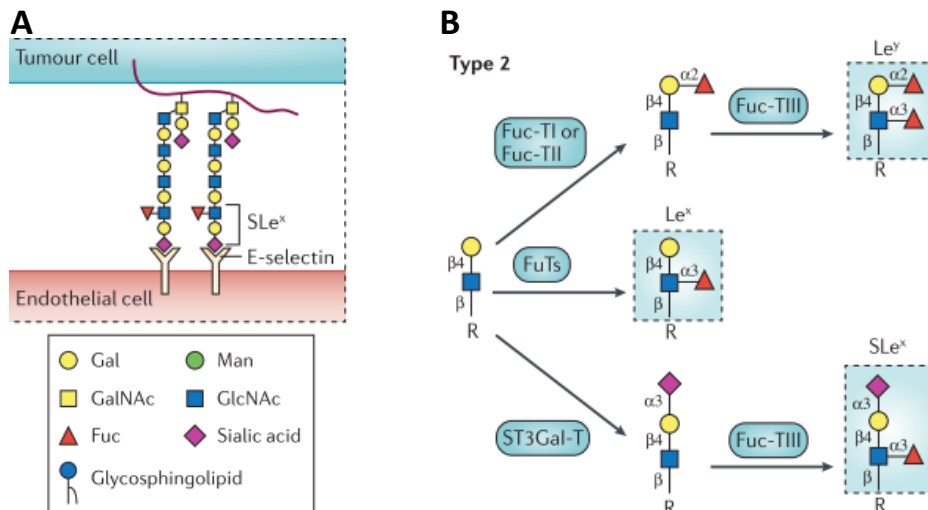


Figura 5 | Els antígens Lewis. A. Unió entre sLe^x i e-selectina entre una cèl·lula tumoral i una endotelial. B. Esquema de la Biosíntesi dels epítops sLe^x , Le^x i Le^y on es veu que la família de sialiltransferases ST3Gal té un paper important en la biosíntesi de sLe^x . Man: Manosa, Fuc: Fucosa, Gal: Galactosa, GalNAc: N-Acetilgalactosamina GlcNAc: N-Acetilglucosamina [11].

Tal i com s'ha comentat, els antigens sLe^x i sLe^a permeten a les cèl·lules tumorals adherir-se a l'endoteli abans de l'extravasació (Figura 5.A), i per tant, promouen la metastasi [10]. Les $\alpha(2,3)$ sialiltransferases ST3Gal III, ST3Gal IV i ST3Gal VI tenen un paper important en la biosíntesi de d'aquests epítops (Figura 5.B). Concretament, ST3Gal IV afegeix un àcid siàlic en les cadenes de tipus (Gal(β 1-3)GalNAc), per acabar formant amb l'ajuda d'una fucosiltransferasa l'antigen sLe^x. El gen *ST3GAL4*, que codifica per la sialiltransferasa ST3Gal IV, sol estar sobreexpressat en teixits de PDAC [12], de manera que el seu silenciament, podria evitar la capacitat metastàtica de les cèl·lules tumorals, com s'ha demostrat ja en leucòcits mieloides humans [13].

1.4. Consecució i Validació d'un Silenciament Gènic

L'edició gènica a partir del reconeixement de llocs específics del genoma ha estat un handicap per a molts científics. L'ús de les nucleases "dits de zinc" (ZFNs) o les TAL nucleases efectores (TALENs) han resultat efectives a l'hora de reconèixer seqüències en concret i realitzar canvis en llocs específics, però són difícils de dissenyar i verificar, cosa que no permet un ús rutinari d'aquestes tècniques [14].

Els *Clustered regularly interspaced palindromic repeats* (CRISPRs) són, com diu el seu nom, agrupacions de repeticions separades per seqüències curtes que s'han trobat en regions del genoma de bacteris i arqueus. S'ha vist que les seqüències que fan d'espaiadors tenen un origen viral o plasmídic, i són transcrites a RNA. A més, els gens *cas* associats a CRISPR codifiquen proteïnes que funcionen com a nucleases del DNA, de manera que s'ha proposat CRISPR-Cas com a un sistema de defensa adaptatiu d'alguns procarïotes contra invasions exògenes que utilitza RNA antisentit per detectar específicament i inutilitzar material gènic d'invasions de virus i plasmidis. Hi ha diferents tipus de sistemes CRISPR-Cas. En el cas del tipus II, la única proteïna implicada és Cas9 [15].

La metodologia CRISPR-Cas9 (Figura 6) es basa en la utilització de Cas9, que conté dos dominis nucleasa (un HNH i un altre RuvC-like), i és capaç d'introduir talls de doble cadena a seqüències específiques del genoma. El reconeixement de les seqüències es dona gràcies a un RNA guia (sgRNA). L'sgRNA s'encarrega per una banda de detectar per complementarietat de bases el DNA objectiu, i per l'altra adherir-se a Cas9 per permetre que la proteïna realitzi els talls a la seqüència diana. A més, per tal que el sistema funcioni, cal que el DNA objectiu tingui adjacent una seqüència curta anomenada PAM [15].

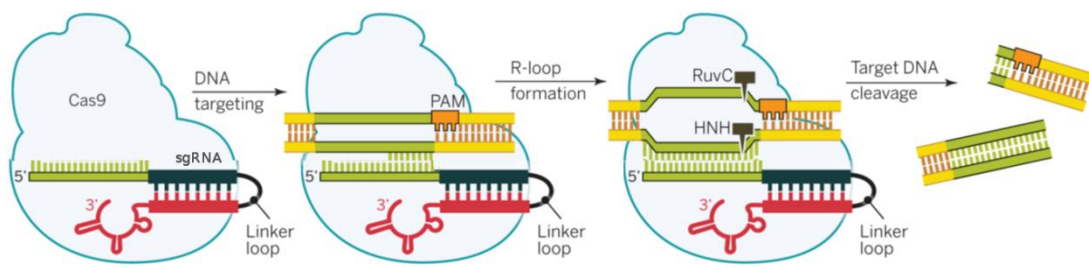


Figura 6| Mecanisme del sistema CRISPR-Cas9 per generar talls de doble cadena [15].

La generació de talls de doble cadena permet activar els mecanismes de reparació del DNA. En el cas que la reparació sigui homòloga, cal la presència d'un motlle exogen amb la seqüència que es vulgui afegir. Pel que fa a la reparació no homòloga hi ha una elevada probabilitat de cometre errors al reparar aquest DNA, de manera que poden aparèixer petites insercions i delecions (*indels*) que solen canviar el marc de lectura o introduir codons *stop* prematurs. D'aquesta manera es poden silenciar gens en tots els nivells, o bé afegir seqüències que siguin d'interès com per exemple un gen reporter [14].

Aquest sistema permet l'edició d'una zona específica del genoma simplement dissenyant una seqüència de 20 nucleòtids que ens interressi (sempre i quan hi hagi una seqüència PAM adjacent a la seqüència diana), cosa que, a diferència dels ZNFs i TALENs, permet treballar més fàcilment amb aquest sistema de manera rutinària.

En aquest treball s'ha col·laborat dins del projecte de realitzar el silenciament de *ST3GAL4* per determinar si així disminueix la capacitat metastàtica de línies cel·lulars de PDAC. Per silenciar el gen, es vol utilitzar la metodologia CRISPR-Cas9. La *Figura 7* mostra un esquema general del projecte.

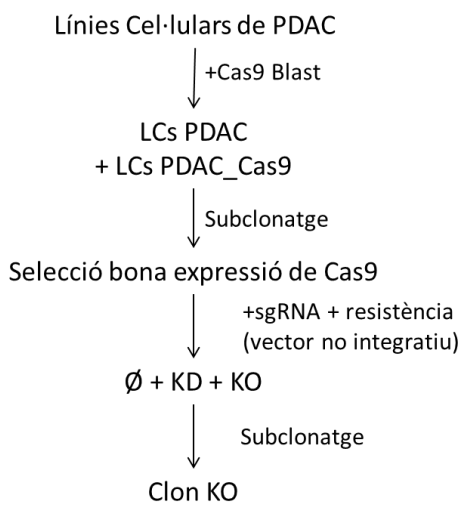


Figura 7 | Esquema del procés que es vol seguir en el projecte. Les línies cel·lulars corresponen a BxPC3 i Capan-1. KD, knockdown (subexpressió); KO, knockout (silenciament).

A grans trets, en primer lloc s'ha d'introduir Cas9 a dues línies cel·lulars. Això es farà a través de la producció de partícules lentivirals que contindran un vector integratiu amb *Cas9* i el gen de resistència a la blasticidina. Es transfectaran les cèl·lules i es seleccionaran amb blasticidina les que hagin integrat *Cas9*. A continuació es realitzarà un subclonatge per seleccionar clons que tinguin una bona expressió de la proteïna Cas9. Tot seguit, s'introduirà un vector no integratiu que contindrà un sgRNA complementari a un exó de *ST3GAL4* i un gen de resistència. Es seleccionaran les cèl·lules que continguin el vector, i finalment es farà un subclonatge per obtenir un clon que tingui *ST3GAL4* silenciats (*Knockout*).

Aquest és tan sols un resum dels passos que s'han de seguir, ja que per avançar en les diferents etapes, cal optimitzar processos, posar a punt protocols i dissenyar eines, alguns dels quals s'han realitzat durant aquest treball.

1.5. Implicacions Ètiques

Treballar amb cèl·lules humanes i editar-les genèticament és i serà motiu de debat. Al cap i a la fi, s'estan utilitzant cèl·lules provinents de teixit d'una persona i s'hi introdueixen canvis en el genoma (encara que sigui *in vitro*, i no s'estigui editant directament una persona) que podrien alterar radicalment el seu funcionament. A vegades, però, cal que siguem un pèl agosarats i centrar-nos en l'objectiu al qual volem arribar. Ara, això no vol dir que haguem de fer les coses amb els ulls tancats. Caldria trobar un equilibri entre abandonar una mica els prejudicis en

quant a treballar en temes com és l'edició gènica sense deixar de ser crítics i conseqüents amb el procés que estem seguint per arribar a l'objectiu.

2. OBJECTIVES

This work involves collaborating in some aspects of the project about implementation and validation of *ST3GAL4* gene silencing using CRISPRCas9 methodology. Specifically, the objectives are:

- To design primers to amplify the exon region of *ST3GAL4* containing the targets for the sgRNAs that have already been designed, and validate their sequence in some PDAC cell lines.
- To verify the acquired lentiviral plasmids and achieve its extraction in order to make them ready for the production of lentiviral particles.
- To find the optimal concentration of blasticidin in different PDAC cell lines to make it possible to select only those cells that contain the gene for blasticidin resistance.
- To optimize DNA electrophoresis in polyacrylamide gel in order to carry out an electrophoretic mobility assay of DNA heteroduplexes.
- To compare two methods to detect gene edition (electrophoretic mobility assay and digestion of heteroduplexes with endonuclease T7EI) and determine the feasibility of each one.

3. MATERIALS I MÈTODES

Alguns dels protocols descrits a continuació han estat optimitzats durant la realització d'aquest treball. Les condicions descrites corresponen al protocol ja optimitzat.

3.1. sgRNAs

Les seqüències dels sgRNA per ST3GAL4 s'han dissenyat amb la *CRISPR design tool* disponible a crispr.mit.edu. Aquestes són 5'AGAAATAATCCTCAAGCCGC3' amb la seqüència PAM 5'AGG 3' [13], amb un score de 88 i 9 llocs *offtarget* localitzats dins de gens; i 5'TCTGCTTACGAGCTGCCCTA3' amb la seqüència PAM 5'TGG 3', amb un score de 81, i 2 llocs *offtarget* localitzats dins de gens.

3.2. Línies Cel·lulars

Les línies cel·lulars humanes utilitzades en aquest treball són Capan-1 i BxPC3, ambdues aïllades de tumors humans. Capan-1, caracteritzada el 1977 [16], és una línia provinent d'una metàstasi al fetge de PDAC. BxPC3, caracteritzada el 1986 [17], és una línia cel·lular provinent d'un PDAC.

3.3. Llista de Plasmidis

Per tal d'obtenir les partícules lentivirals s'han seleccionat els plasmidis de la *Taula 2*. Els plasmidis s'han obtingut del dipòsit Addgene i es troben en cèl·lules transformades *E. coli*. Tots contenen un gen de resistència a l'Ampicil·lina.

Taula 2 | Plasmidis Utilitzats

Plasmidi	Mida	Propietats
Lenticas9-Blast	12860pb	Conté Cas9 i resistència a la Blastidina. Vector Integratiu
psPAX2	10668pb	Gens encarregats de l'emalatge. Vector no Integratiu.
pMD2.G	5824pb	Gens encarregats de l'emolcall lentiviral. Vector no Integratiu

3.4. Disseny de Primers

En aquest treball s'han dissenyat per una banda *primers* que puguin amplificar l'exó de ST3GAL4 on hi ha les seqüències diana dels sgRNA per Capan-1 i BxPC3 (per tal de poder comprovar si hi ha hagut edició gènica mitjançant un assaig de mobilitat electroforètica o una digestió amb la endonucleasa T7), i per l'altra primers que puguin amplificar la zona amb les seqüències diana pels sgRNA en el cDNA de les dues línies cel·lulars.

S'ha utilitzat el Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) per poder dissenyar els *primers*, una eina bioinformàtica basada en el software Primer 3 [18]. La condició que s'ha posat en el software és que els productes de PCR siguin entre 300 i 800 pb. En el cas dels *primers* per al DNA genòmic s'ha tret la seqüència de l'Ensembl (Referència: ENSG00000110080). Per al disseny de *primers* del cDNA, s'ha seleccionat la variant de cDNA de ST3GAL4 número 13 descrita a Ensembl, i un cop seleccionats els primers, s'ha fet un alineament amb totes les variants descrites mitjançant el programa Bioedit per tal de comprovar que els *primers* seleccionats hibriden amb totes elles.

3.5. Extraccions de DNA, RNA i Plasmidis

3.5.1. DNA I RNA

L'extracció de DNA i RNA per separat està feta per poder comprovar, tant per el DNA genòmic com per el cDNA, que els *primers* dissenyats amplifiquen un producte de PCR amb la mida i seqüència previstes.

L'extracció s'ha fet a partir de llisats de BxPC3 i Capan-1 i s'ha utilitzat el kit comercial AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit de la casa comercial QIAGEN®, que permet purificar simultàniament DNA, RNA i proteïnes.

3.5.2. Plasmidis

L'extracció de plasmidis s'ha realitzat mitjançant *minipreps* (una extracció alcalina que desnatura el DNA genòmic deixa el plasmidi intacte [19]) i *midipreps*. Per a les *minipreps*, s'ha utilitzat el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de la casa comercial Promega®. Per a les *midipreps* s'ha utilitzat el kit comercial QIAGEN® Plasmid Midi Kit, de la casa QIAGEN®.

En el cas de les *minipreps*, s'ha partit de cultius de nit preparats picant una colònia de la placa corresponent en medi LB + ampicil·lina a una concentració de 100 µg/ml, i s'ha deixat *overnight* a 37°C amb agitació de 250 rpm. Per les *midipreps*, el cultiu de nit (LB + ampicil·lina) s'ha realitzat a partir d'una dilució 1/250 d'un cultiu de dia de LB + ampicil·lina d'unes 5 hores amb agitació de 250 rpm a 37°C.

La principal diferència entre les dues tècniques és que en la *midiprep* s'aconsegueix més quantitat de plasmidi. A més, el protocol de la *midiprep* té un últim pas de precipitació del DNA amb isopropanol que permet que l'extracció sigui més pura (Figura 8).

Per quantificar DNA i RNA, s'ha utilitzat l'espectrofotòmetre NanoDrop de la casa Comercial ThermoFisher Scientific®. S'han donat per bones les mostres que marcaven una ratio d'absorbància $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ sense arribar a més de 2 per les mostres de DNA i una $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$ per les de RNA. En el cas de tenir ratios inferiors, indicaria la presència de proteïnes o altres contaminants que absorbeixen a longituds d'ona de 280nm. El rang d'absorbàncies que s'ha donat per quantificable ha estat d'entre 0.1 i 1 unitats d'absorbància. En cas de ser superior, s'han realitzat les dilucions pertinents a les mostres.

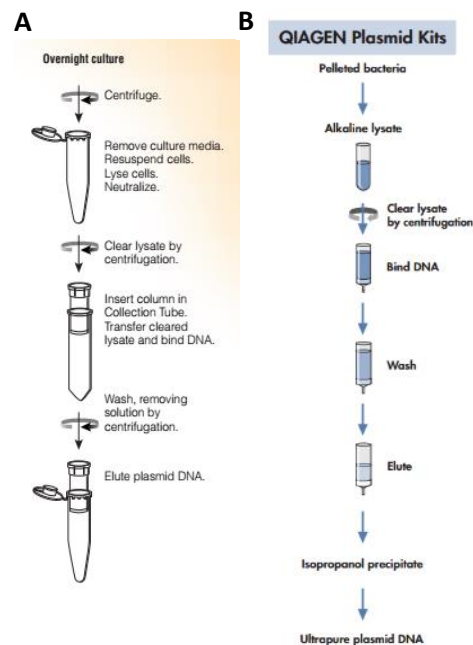


Figura 8| Extraccions de plasmidis. A. Esquema del protocol de miniprep de la casa Promega® B. Esquema del protocol de midiprep de la casa QIAGEN® amb el pas final de precipitació amb isopropanol.

3.6. Síntesi de cDNA

Per a la síntesi de cDNA a partir de RNA s'ha realitzat una RT-PCR, que es basa en l'ús d'encebadors aleatoris (*random primers*) i la transcriptasa reversa per sintetitzar DNA a partir de RNA [20]. Per fer una RT-PCR s'ha preparat una *mix* amb el *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription de la casa comercial Applied Biosystems^(TM) amb les proporcions que s'indiquen a la *Taula 3*.

Taula 3 | Mix 2X per la síntesi de cDNA a partir de RNA

Component	1rx
10X RT <i>Buffer</i>	2 µl
25X dNTP <i>mix</i>	0.8 µl
10X RT <i>Random primers</i>	2 µl
Transcriptasa Reversa	1 µl
Inhibidor de RNases	1 µl
H2O <i>nuclease-free</i>	3.2 µl
Volum final	10 µl

A continuació -per cada mostra- s'han afegit als 10µl de mix 2x, 2µg de RNA en 10µl d'H₂O *nuclease-free*, i s'han col·locat al termociclador amb el programa de la *Taula 4*.

Taula 4 | Programa del termociclador per la síntesi de cDNA

Tª	25°C	37°C	85°C	4°C
Temps	10'	2h	5'	∞

3.7. Digestió amb Enzims de Restricció

Per tal de verificar que els plasmidis que es tenen són els que s'han sol·licitat, s'han realitzat digestions d'aquests amb enzims de restricció.

Els enzims de restricció utilitzats (*Taula 5*) s'han seleccionat en base al mapa de restricció proporcionat per Addgene, on es poden visualitzar les dianes pels enzims, dels plasmidis utilitzats (*Taula 2*). La

Taula 6 mostra el protocol seguit per efectuar les digestions. Un cop preparades, les mostres s'han incubat 2 hores a 37°C per tal que els enzims pugin treballar a la seva temperatura òptima d'activitat. Els enzims i els *buffers* són de la casa New England Biolabs®

Taula 5 | Enzims de restricció utilitzats en els respectius plasmidis

Plasmidi	Enzim de restricció	Buffer
lentiCas9-Blast	XbaI	Buffer 4 + Albúmina (BSA)
	XhoI	Buffer 4 + BSA
psPAX2	MscI	Buffer 4
	EcoRV	Buffer 3 + BSA
pMD2.G	ApaI	Buffer 4 + BSA
	MscI	Buffer 4
Composició dels buffers		
Buffer 1	Bis Tris Propà-HCl 10 mM, MgCl ₂ 10 mM, 100 µg/ml BSA, pH 7.0	
Buffer 2	Tris-HCl 10 mM, MgCl ₂ 10 mM, NaCl 50 mM, 100 µg/ml BSA, pH 7.9	
Buffer 3	Tris-HCl 50 mM, MgCl ₂ 10 mM, NaCl 100 mM, 100 µg/ml BSA, pH 7.9	
Buffer 4	Tris-actetat 20 mM, MgCl ₂ , NaCl 100 mM, 100 µg/ml BSA, pH 7.9	

Taula 6 | Protocol seguit per efectuar les digestions

Component	
BSA	0.5 µl En cas de necessitar-ne l'enzim de restricció.
Buffer	1 µl Depèn de l'enzim, pot ser el Buffer #1, #2, #3 o #4
Enzim	0.4 µl
Plasmidi (DNA)	1µg. 2µg en cas de ser una digestió amb dos enzims
Volum total	10 µl

3.8. Gels d'Electroforesi

3.8.1. Electroforesi en Gel d'Agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa és una tècnica eficient de separar els àcids nucleics de diferents conformacions i mides entre 100pb i 25kb. L'agarosa forma una matriu en el gel que deixa passar amb més facilitat els fragments més petits quan s'aplica una diferència de potencial. A més concentració d'agarosa en el gel, els porus en la matriu del gel són més petits i hi ha més poder resolutiu en fragments de menor mida [21].

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per separar els productes de digestions i productes de les diferents PCR en funció de la mida i conformació seguint el protocol que hi ha a continuació.

Material: Tampó Tris-Borat-EDTA (TBE) 5X (10.8g TrisHCl, 5.5g àcid bòric i 4ml EDTA enrasant amb H₂O MiliQ a 200 ml), SybrSafe 10000X (Invitrogen®), agarosa (Ecogen®), suport de gel d'agarosa, cubeta electroforètica de gel d'agarosa, tampó d'aplicació (TA) 6x (30% v/v glicerol, 0.25% W/v blau de bromofenol, 0.25% w/v xilencianol), DNA ladder (1Kb Plus DNA Ladder de la casa comercial Invitrogen® i GeneRuler DNA Ladder Mix de la casa Fermentas®).

1. Preparar 50 ml de TBE 1X a partir de TBE 5X i afegir la quantitat d'agarosa corresponent al % d'agarosa que es vol tenir (0.4 grams d'agarosa per al 0.8% i 1g d'agarosa per al 2%).
2. Bullir dues vegades al microones per tal d'assegurar-se que l'agarosa es dissol completament.
3. Esperar que el gel quedi tebi i posar 5µl de SybrSafe 10000X i barrejar.
4. Col·locar al suport de gelificació de gel d'agarosa i deixar refredar i gelificar -assegurar-se que les pintes estan col·locades i que el suport està anivellat-.
5. Col·locar el gel a la cubeta d'electroforesi cobert amb tampó TBE 1X.
6. Col·locar les mostres i DNA ladder pertinents amb tampó d'aplicació 6x a les butxaques del gel.

7. Aplicar una diferència de potencial de 90 V entre 1h 15' i 1h 30'.
8. Visualitzar el gel amb transil·luminació Ultraviolada.

3.8.2. Electroforesi en Gel de Poliacrilamida

L'electroforesi en gel de poliacrilamida (on l'acrilamida i la bisacrilamida formen una matriu en el gel) permet separar fragments de DNA de mida petita però amb més poder resolutiu que el gel d'agarosa (el gel de poliacrilamida pot separar fragments que difereixen en mida un 0,1%). Aquesta tècnica s'ha utilitzat per a realitzar assaig de mobilitat electroforètica d'heterodúplex en el qual s'han de poder diferenciar segons la mobilitat electroforètica els heterodúplexs dels homodúplexs [22]. La Taula 7 mostra la recepta per preparar un gel al 8% d'acrilamida.

Taula 7 | Recepta per a un gel al 8% d'acrilamida

Component	Gel d'acrilamida al 8%
40% Acrilamida - Bisacrilamida	2 ml
H ₂ O	6 ml
5X TBE	2 ml
15% Persulfat d'amoni	50 µl
TEMED	9 µl

A continuació es descriu el protocol seguit per a l'electroforesi en gel d'agarosa.

Material: Suport per polimeritzar els gels, vidres per a gel d'1,5mm, cubeta d'electroforesi en gel de poliacrilamida, solució d'acrilamida:bisacrilamida (ThermoFisher Scientific®), TBE 5X, pintes, TA 6X, SybrSafe 10000X, DNA ladder.

1. Polimeritzar el gel al suport (prèviament, assegurar-se que els vidres estan ben posats al suport i comprovar amb aigua destil·lada que el líquid queda retingut pels vidres), i deixar-lo *overnight* a 4°C en TBE 0.5X.
2. Retirar les pintes i col·locar el gel a la cubeta i cobrir amb TBE 0.5X.
3. Carregar les mostres i el ladder amb TA 6X.
4. Aplicar una diferència de potencial de 100 V durant 2 hores.
5. Posar el gel en un recipient amb 50 ml de TBE 0.5X + 5µl de SybrSafe i deixar en agitació durant 20 minuts protegint-lo de la llum.
6. Visualitzar el gel amb transil·luminació ultraviolada.

3.9. PCR

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) estàndard, permet amplificar exponencialment fragments concrets de DNA, encara que es tingui poca quantitat d'àcid nucleic, mitjançant tres passos principals (desnaturalització, *annealing* i extensió), gràcies a la utilització de la TaqPolimerasa (estable a altes temperatures) i una parella de primers (dos fragments curts de DNA que hibriden al voltant del fragment que es vol amplificar) [18].

La PCR s'ha utilitzat en aquest treball per amplificar, amb els primers dissenyats, fragments de ST3GAL4 que contenen les seqüències diana pels sgrNA tant en DNA genòmic com en cDNA, i

per amplificar els controls del kit Alt-R™ Genome Editing Detection (Alt-R) de la casa comercial IDT®, en l'assaig heterodúplex.

Per realitzar la PCR cal preparar una *mix* (Taula 8), aplicar la mix a les mostres i finalment posar-les al termociclador de la casa Bio-Rad® model MyCycler amb el programa adequat (Taula 9). Els components de la *mix* són de la casa comercial Biotools®

Taula 8 | Mix per a les PCRs

Components	Mix amplificació de dianes sgRNA (1rx)	Mix amplificació controls assaig heterodúplex (1rx)
10X DNAPol buffer amb MgCl ₂	2 µl	2.5 µl
dNTPs 50 mM	0.5 µl	0.625 µl
Primer Fwd	1 µl	-
Primer Rev	1 µl	-
Taq Polimerasa	0.5 µl	0.625 µl
H ₂ OMiliQ	14 µl	19.75 µl
DNA	1 µl	2 µl (inclou primers)
Volum total	20 µl	25 µl

Taula 9 | Programa de PCR utilitzat al termociclador.

Tª	95°C	95°C	Tªannealing*	68°C	68°C	4°C
Temps	2'	15''	15''	45''	5'	∞
Cicles	1	35			1	1

*Segons els *Guidelines for PCR Optimization with Taq Polymerase* de New England Biolabs® (NEB), la Tª d'annealing ha d'estar 5°C per sota de la T_m més baixa dels dos primers. Ha estat de 54°C per amplificar les dianes de sgRNA (calculat amb la T_m calculator de NEB) i de 64°C per amplificar els controls de l'assaig heterodúplex (la més baixa que recomana el protocol de l'assaig amb heterodúplex).

3.10. Seqüenciació

En aquest treball la seqüenciació s'ha utilitzat per verificar que els productes de PCR dels primers dissenyats per amplificar DNA genòmic i cDNA (part del gen *ST3GAL4*) contenen les seqüències diana dels sgRNA dissenyats.

La seqüenciació ha estat duta a terme en un seqüenciador sanger de la casa Applied Biosystems™ model 3130 de l'àrea de genètica de la UdG. Per analitzar els resultats de la seqüenciació s'han utilitzat els programes FinchTV i Bioedit. Per preparar les mostres cal seguir el següent protocol:

Material: Exonucleasa, fosfatasa alcalina, kit Big Dye®, termociclador, seqüenciador, placa de 96 pous.

- Tractament amb Exonucleasa i fosfatasa alcalina per degradar els primers i altres subproductes -en 10 µl de producte de PCR afegir 2 µl de mix on hi ha 0.03 µl d'exonucleasa, 0.3 µl de fosfatasa i 1.67 µl d'H₂O MiliQ; i incubar 1 hora a 37°C i 15 minuts a 85°C al termociclador.
- Preparar la mix Big Dye® de la casa comercial Applied Biosystems™ (Taula 10) i col·locar les mostres al termociclador amb el programa de la Taula 11.
- Realitzar una precipitació dels productes del termociclador en una placa de 96 pous. Cal afegir a cada pou 2 µl d'EDTA i 2 µl d'Acetat sòdic, a continuació realitzar un pols de centrífuga (és important equilibrar la placa amb una altra amb la mateixa massa), afegir 80 µl d'etanol absolut a

cada pou, deixar 15 minuts a temperatura ambient i centrifugar 45 minuts a 2250g a una temperatura de 4°C. Tot seguit eliminar el sobrenedant centrifugant la placa al revés amb un paper a sota durant 6 segons a 180g, afegir a cada pou 80 µl d'etanol 70% i centrifugar 15 minuts a 1650g. Finalment retirar el sobrenedant centrifugant al revés amb paper a 180g durant 6 segons, afegir 10 µl de formamida a cada pou i guardar a 4°C llest per seqüenciar.

Taula 10 | Mix Big Dye®

Components	1 rx
Producte PCR	3 µl
H₂O MiliQ	3 µl
Primer (o el Forward o el Reverse)*	0.5 µl
Buffer Big Dye®	2.5 µl
Premix Big Dye®	1 µl
*Per a cada mostra del producte de PCR es prepararà mix tant per el <i>Primer Forward</i> com per el <i>Reverse</i>	

Taula 11 | Programa del termociclador amb el mix Big Dye®

Tª	46°C	96°C	50°C	60°C	60°C	4°C
Temps	1'	10''	5''	4'	1'	∞
Cicles	1	26			1	1

3.11. Formació d'Heterodúplexs i Digestió amb T7EI

Els heterodúplexs es formen en desnaturalitzar i hibridar conjuntament fragments de DNA salvatges i editats o mutants [23]. L'endonucleasa T7EI és capaç de reconèixer les zones no complementàries (insercions o delecions de mínim 2 nucleòtids) i tallar els heterodúplexs [24].

En aquest treball s'han format heterodúplex utilitzant els productes de PCR dels controls (A i B) del kit Alt-R per tal de validar la tècnica de mobilitat dels heterodúplexs en gel d'acrilamida en comparació amb l'assaig de digestió amb T7EI. Tot això es fa per tal de posteriorment decidir quin mètode de detecció d'edició gènica s'utilitzarà.

El protocol seguit és el següent:

- Els productes de PCR d'amplificar els controls A i B es barregen per generar homodúplexs (dobles cadenes completament complementàries) i heterodúplexs (*Taula 12*).
- Posteriorment es realitza una rampa decreixent de temperatures (
- Taula 13*) per tal d'afavorir la formació d'heterodúplexs. Per l'assaig de mobilitat electroforètica es corren directament les mostres en un gel de poliacrilamida després d'aquest pas.
- Per realitzar la digestió amb T7EI s'afegeix a cada mostra 2 µl de T7EI (1U/ µl) i s'incuba a 37°C durant 1 hora al termociclador i es corren les mostres en un gel d'agarosa.

Taula 12 | Components necessaris per a la formació d'heterodúplex

Components	Homodúplex (B o A) 1rx	M Heterodúplex (A+B) 1rx
Producte PCR	10 µl	5 µl d'A + 5 µl de B
10X T7EI buffer	2 µl	2 µl
H₂O Nuclease free	6 µl	6 µl
Volum Total	18 µl	18 µl

Taula 13 | Programa del termociclador per a la formació d'heterodúplex

Tª	95°C	95-85°C	85°C	85-25°C	25°C	25-4°C	4°C
Temps o Ramp Rate	10'	-2°C/sec	1'	-0.3°C/sec	1'	-0.3°C/sec	∞

3.12. Assaig de Supervivència a la Blastidina

L'assaig de supervivència a la blastidina s'ha realitzat a les línies cel·lulars BxPC3 i Capan-1 per tal d'obtenir les concentracions òptimes en les quals cap cèl·lula sense el gen de resistència a la blastidina pugui sobreviure, i així poder seleccionar aquelles que hagin adquirit la resistència a aquest antibiòtic (juntament amb *Cas9*) al ser infectades amb les partícules lentivirals preparades en el pas anterior.

Per a aquest assaig, s'ha treballat a la cabina de flux del laboratori de cultius i s'ha seguit el següent protocol:

Materials: Cabina de flux, bomba de buit, medi RPMI, medi DMEM+20%FBS, Blastidina, placa de 96 pous, línies BxPC3 i Capan-1.

Dia -1: En una placa de 96 pous, afegir en cada pou 0.1ml de cèl·lules en el seu medi corresponent (BxPC3 en medi RPMI i Capan-1 en DMEM+20%FBS) amb les densitats adequades tal com indica la *Figura 9*.

[Blastidina] µg/ml	BxPC3						Capan-1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
0 Control	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2,5	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
5	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7,5	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
10	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
12,5	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
15	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
20	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		150000 cèl/ml			250000 cèl/ml			300000 cèl/ml			200000 cèl/ml				

Figura 9 | Disseny de la placa per a l'assaig de supervivència a la blastidina

Dia 0: Retirar el medi amb la bomba de buit i afegir 300µl de blastidina en cada pou a la concentració corresponent segons la *Figura 9*. Les diferents concentracions de blastidina es fan a partir d'una marea a 2mg/ml i es preparen en el medi corresponent segons la línia cel·lular.

Dia 3: Retirar el medi i tornar a tractar les cèl·lules amb les mateixes concentracions de blastidina.

Dia 6: Observar les cèl·lules al microscopi i valorar la supervivència cel·lular respecte els controls. És important observar-les cada dia per tal de fer-ne un millor seguiment.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Disseny i Validació de *Primers* per Detectar Edició Gènica.

Els sgRNAs que es volen utilitzar tenen les seves dianes (segons la base de dades de l'Ensemble) a un exó de ST3GAL4. D'aquesta manera, l'edició gènica mitjançant la metodologia CRISPR-Cas9 podrà tenir un efecte fenotípic. Per validar que les seqüències objectiu dels sgRNAs realment es troben al genoma de les línies cel·lulars utilitzades i en les diferents variants dels seus transcrits, s'han dissenyat diferents parelles de *primers* que amplifiquen l'exò en qüestió. Els *primers* s'han utilitzat per amplificar aquesta regió del genoma i del cDNA per PCR. A més, se n'han seqüenciat els productes de PCR per verificar la presència de les dianes pels sgRNA. Aquests *primers* també serviran per amplificar aquestes seqüències en cèl·lules amb Cas9 integrat i que contenen sgRNA i així poder detectar edició gènica mitjançant una digestió d'heterodúplex amb T7EI o per un assaig de mobilitat electroforètica.

Els parells de *primers* seleccionats i els seus productes (amb les seqüències diana pels sgRNA marcades) es mostren a la Taula 14. Les parelles ST4_S1 i ST4_S2 estan dissenyades per amplificar el DNA genòmic, mentre que ST4_c1 està dissenyada per amplificar cDNA.

Taula 14| Informació dels primers dissenyats i els seus respectius productes

ST4_S1 Fwd	5' CGA GCT GGG ATT GAG GGT TT 3'	Tm: 60.04°C
ST4_S1 Rev	5' AAA AAG TAC CAG GCG GAG GG 3'	Tm: 59.96°C
Llargada del producte: 505pb CGAGCTGGGATTGAGGGTTTACAGTGTGGGGAGTAGATGGAAGAGCAGCTGTGTTGGTGGACATGGGTTAGGTGAAGCCA GGGAGGGGAAGAGAAGGCCCTATAATATTAGTCATGGGCCTAACCTACTTCTGGCATCAAGATTAATTCTGTTCTCATCCCCACC CGGCTTTACCTCTGTGCAGCTACTCCGGGATCAGCCCATCTTCTCGCGCTTGAGGATTATTCTGGGTCAAGACGCCA TCTG CTTACGAGCTGCCCTA TGGGACCAAGGGGAGTGGTAAGTTCTACCCGGCTCGTGGGAACCATGGGCTCACCTGACCACGTT GCTTCCTATTCTCTGCCGTCCAGGCCCAAGTCTGAGCCTGACTCGGGTACCAGGGTACAGGGGAAGAAGAAGGC AGCCAGCGCTCTGAGGAGCAGTGAGGGAGGGCAGGCAGCCTTCAAGTCTGTGTACATCAGTCCCTCCGCTGGTACT TTTT		
ST4_S2 Fwd	5' TGC TGG TAC GGA GTG TTT CC 3'	Tm: 59.97°C
ST4_S2 Rev	5' TAC CCG AGT CAG GCT CAG AA 3'	Tm: 59.96°C
Llargada del producte: 770 pb TGCTGGTACGGAGTGTTCCATGAGGGTGGGTGGGGTAGGGCCTGGGATGTCTCACTGGGCCCTCACCCAGGGAGTGCAGG GGCAGGAAGACCTGGATCCTCAAGGACTTGGGTTCCAAGTGAACCTAAGTGGAGATGATTCTCCCGGCACCTTGGGACCTT CATGCCGTGGGAGAAGGCTTAGGCTGCCTGGAACATGGGTCCCTGGGTCTGACTGGGGCTTCTGCCTCTGTCTTTTTTCTCTC CAGTTTTTATTTCCCATCCCAGAGAAGAAGGAGCCGTGCCTCCAGGGTGAAGCAGAGCAAGGCCTTAAGCTCTTTGGCAA GTAAGTACTTAAGGATGAGGAGGGTAGAGCAGGGCATGGAGCGAGCTGGGATTGAGGGTTTACAGTGTGGGGAGTAGATG GAAAGAGCAGCTGTGTTGGTGGACATGGGTTAGGTGAAGCCAGGGAGGGGAAGAGAAGGCCTTATAATATTAGTCATGGGCCT AACCTACTTCTGGCATCAAGATTAATTCTGTCTCATCCCCACCCGGCTTTACCTCTGTGCAGCTACTCCCGGGATCAGCCCAT CTTCTCGCGCTTGAGGATTATTCTGGGTCAAGACGCCA TCTGCTTACGAGCTGCCCTA TGGGACCAAGGGGAGTGGTAAGTT CCTACCCGGCTCGTGGGAACCATGGGCTCACCTGACCAGTTGCTTCTATTCTCTGCCGTCCAGGCCCAAGTCCAGGTTCC TGAGCTGACTCGGGTA		
ST4_c1 Fwd	5' CTG GTC GTC ATG GTG TGG TA 3'	Tm: 59.39°C
ST4_c1 Rev	5' CCT TTC GCA CCC GCT TCT TA 3'	Tm: 60.67°C
Llargada del producte: 577 pb ATGTGTCCTGCAGGCTGGAAGCTCCTGGCCATGTTGGCTCTGGTCTGGTCTGTCATGGTGTGGTATTCCATCTCCCGGGAAGAC AGTTTTTATTTCCATCCCAGAGAAGAAGGAGCCGTGCCTCCAGGGTGAAGCAGAGCAAGGCCTTAAGCTCTTTGGCAAC TACTCCCGGGATCAGCCATCTTCTCGCGCTTGAGGATTATTCTGGGTCAAGACGCCA TCTGCTTACGAGCTGCCCTA TGGGA CCAAGGGGAGTGAGGATCTGCTCCTCCGGGTGCTAGCCATACCAGCTCCTCCATCCCAAGAACATCCAGAGCCTCAGGTGCC GCCGCTGTGTGGTCTGGGGAACGGGCACCGGCTGCCGAACAGCTCACTGGGAGATGCCATCAACAAGTACGATGTGGTCAT CAGATTGAACAATGCCCAAGTGGCTGGCTATGAGGGTGGTGGTCCAGACCACCATGCGTCTCTTCTACCCTGAATCTGC CCACTTCGACCCAAAGTAGAAAACAACCCAGACACTCCTCGTCTGGT		

Les condicions establertes a l'hora de dissenyar els *primers* han resultat encertades, ja que les tres parelles han amplificat els seus respectius productes de PCR amb les mides previstes tant a Capan-1 com a BxPC3 (*Figura 10*).

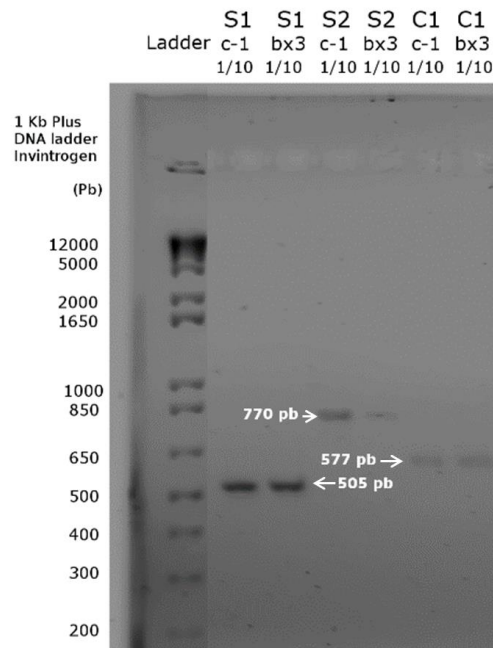


Figura 10 | Gel d'agarosa amb els productes de PCR dels primers dissenyats. La PCR s'ha realitzat per dues quantitats diferents de DNA (sense diluir i dilució 1/10), mostrant-se en la figura tan sols els productes d'amplificació per a DNA diluït 1/10. S1, producte dels primers S1; S2, producte dels primers S2; C1, producte dels primers C1; c-1, línia cel·lular Capan-1; bx3, línia cel·lular BxPC3. En el gel s'indiquen les mides dels productes de PCR al costat de les bandes, assenyalades mitjançant fletxes.

Un cop s'ha validat que els productes de PCR per als *primers* dissenyats són de la mida adequada, s'han seqüenciat els productes de ST4_S1 (S1) i ST4_C1 (C1) per les dues línies cel·lulars. El producte de ST4_S2 (S2) no s'ha seqüenciat perquè s'espera que les dianes pels sgRNAs quedin al final de la seqüència, i segons la *DNA Sequencing Troubleshooting Guide* d'Euofins™, tant els primers com els últims parells de bases seqüenciats a vegades no acaben de sortir clars en la seqüenciació.

Després de visualitzar i rectificar els nucleòtids pertinents a través del software Finch TV, s'ha pogut verificar que els productes d'amplificació dels *primers* S1 i C1 per a les dues línies cel·lulars contenen les seqüències diana per als dos sgRNAs (*Figura 11*). El fet que aquestes es trobin al cDNA (a més de trobar-se al genoma) indica que les dianes estan situades en un exó i que per tant si hi ha edició gènica (ja sigui per canvi en el marc de lectura o per l'addició d'un codó *stop* prematur) hi podrà haver un efecte fenotípic. En el cas que no s'hagués pogut validar la presència de les dianes en el cDNA, podria indicar que aquestes es troben en introns i que per tant si fossin editades probablement no hi hauria un efecte fenotípic.

Realitzant un BLASTn de les seqüències obtingudes amb la base de dades de l'Ensembl, s'ha vist que hi ha un alineament amb el gen *ST3GAL4* de pràcticament el 100% en tots els casos (*Taula 15*).

Així doncs, es donen per vàlids els primers S1 i C1 per tal d'utilitzar es seus productes de PCR per poder detectar edició gènica mitjançant els sgRNAs prèviament dissenyats. La parella S2 també s'ha considerat vàlida, al amplificar un producte amb la mida prevista (770 pb).

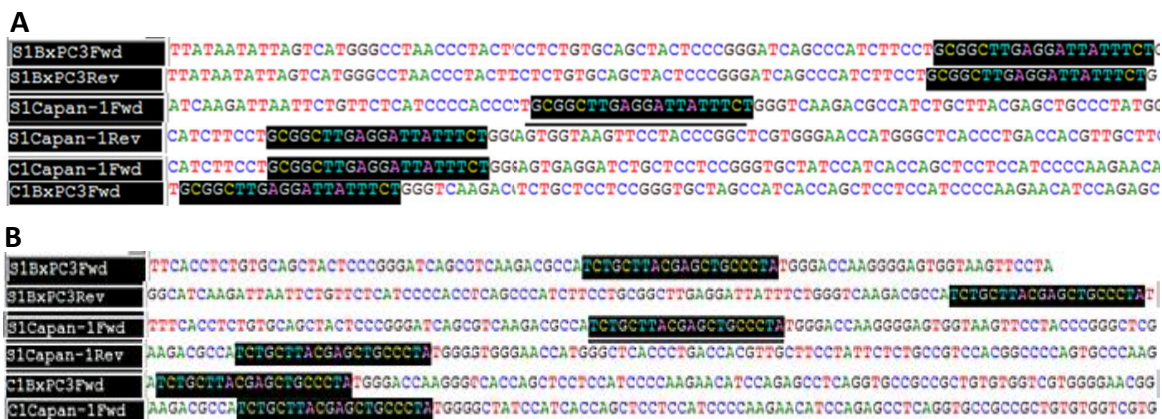


Figura 11 | Zones de les seqüències obtingudes per seqüenciació on es troben marcats les dianes pels sgRNA. Les seqüències han estat tallades per poder mostrar adequadament les dianes. A. Es mostra marcada la diana GCGGCTTGAGGATTATTCTC B: Es mostra la diana TCTGCTTACGCTGCCCTA. Per als productes de C1, tan sols s'han identificat les seqüències diana sense problemes en els productes amplificats amb el primer forward per falta d'una senyal prou clara en les amplificacions amb el primer reverse. Figura extreta de Bioedit.

Taula 15 | Resultats del BLASTn

Seqüència	Gen	% Identitat	e-value*
S1Capan-1Fwd	ST3GAL4	99.01	10 ⁻¹⁵³
S1Capan-1Rev	ST3GAL4	100	4x10 ⁻¹⁴⁴
S1BxPC3Fwd	ST3GAL4	100	4x10 ⁻¹²⁵
S1BxPC3Rev	ST3GAL4	100	0
C1Capan-1Fwd	ST3GAL4	95.24	10 ⁻¹⁶⁷
C1BxPC3Fwd	ST3GAL4	100	4x10 ⁻¹⁴⁶

*L'e-value, segons Ensembl, correspon la probabilitat d'observar els resultats per casualitat.

4.2. Validació i Extracció dels Vectors Lentivirals.

Per tal que BxPC3 i Capan-1 produeixin Cas9 i així poder realitzar edició gènica mitjançant la metodologia CRISPR-Cas9, s'integrarà el vector Lenticas9-Blast (que expressa Cas9, i conté un gen de resistència a la blasticidina) al genoma de les cèl·lules. La integració es farà mitjançant partícules lentivirals que contindran aquest vector. Per produir-les es transfectaran els vectors descrits a l'apartat de material i mètodes en cèl·lules de la línia cel·lular HEK293t (amb una alta eficiència de transfecció) [25].

En aquest treball s'ha verificat per digestió amb enzims de restricció que els vectors dels quals es disposen, són els necessaris per a produir aquestes partícules. Malgrat no assegura-ho al 100%, és una manera ràpida de validar-ho. També s'han extret els vectors (que es troben en

cèl·lules *E.coli* transformades) mitjançant *midipreps* per tal de tenir suficient quantitat de cada vector per transformar les cèl·lules HEK293t i produir les partícules lentivirals.

Les digestions amb enzims de restricció dels vectors (*Figura 12*) han permès verificar que els plasmidis que es tenen són els vectors necessaris per formar les partícules lentivirals.

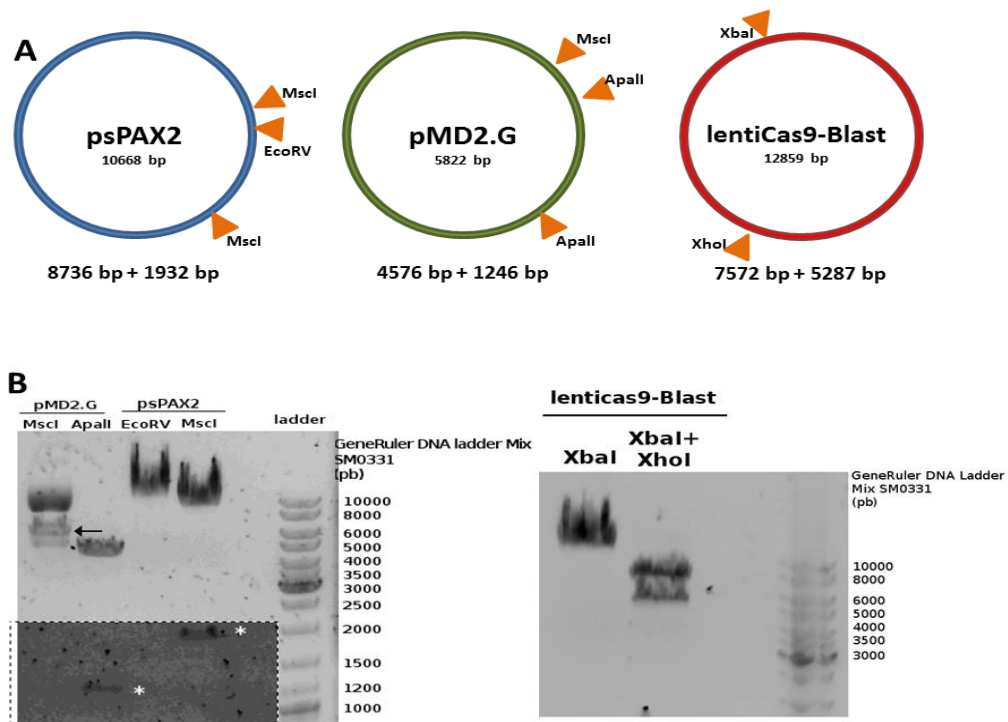


Figura 12 | Vectors necessaris per produir partícules lentivirals. A. Mapes de digestió dels vectors amb la longitud dels productes de la doble digestió a sota. B: Gel d'agarosa amb els productes de digestió. Amb un asterisc es remarquen aquelles bandes que són difícils de visualitzar. Amb una fletxa s'assenyala la banda corresponent a DNA lineal per la digestió de pMD2.G amb MscI.

Per la digestió de pMD2.G amb MscI (on s'esperaria trobar tan sols una banda), se n'observen diverses. La causa podria ser una digestió incompleta del vector. Així doncs, les bandes de més que hi ha correspondrien a les diferents conformacions que pot adoptar un plasmidi (de més mobilitat a menys serien DNA circular oscat, seguit de DNA lineal, superenrotllat, i relaxat). Pel que fa a la digestió de pMD2.G amb ApalI i les de psPAX2 les mides han estat les esperades.

En el cas de la doble digestió de Lenticas9-Blast amb XhoI i XbaI, les mides dels productes han resultat ser més grans que les esperades, i la suma d'aquestes resulta ser major a la mida del vector (el vector té una mida de 12859pb mentre que la suma de les mides dels productes és d'uns 1500pb). Aquest fet pot ser degut a una mala mobilitat electroforètica dels productes de digestió. Malgrat això, i després de consultar amb el proveïdor, s'han donat per vàlids els tres vectors.

A continuació es mostren a la *Taula 16* els resultats de les extraccions dels plasmidis per *midiprep*, quantificats amb Nanodrop®. Els vectors d'aquestes extraccions s'han considerat preparats per transfectar.

Taula 16 | Concentracions i ratios dels vectors lentivirals.

Vector	A _{260/280}	ng/ μ L
Lenticas9-Blast	1.83	1097 ng/ μ l
psPAX2	1.82	1097.5 ng/ μ l
	1.90	1032.5 ng/ μ l
pMD2.G	1.87	627.5 ng/ μ l

En el cas de pMD2.G, s'ha realitzat una precipitació amb etanol extra per acabar purificar el DNA (passant d'una concentració de 1362.5 ng/ μ l amb A_{260/280}=1.75 als valors de la Taula 16).

4.3. Assaig de Supervivència a la Blastidina

Per seleccionar les cèl·lules que hagin integrat *Cas9*, s'utilitzarà la blastidina, ja que el vector Lenticas9-Blast en conté el gen de resistència. Per tal de decidir quina és la millor concentració de blastidina en la qual cap cèl·lula sense el gen de resistència a l'antibiòtic pugui sobreviure, s'han tractat cèl·lules BxPC3 i Capan-1 amb diferents concentracions de blastidina i a continuació s'ha observat la supervivència amb el microscopi.

Visualitzant la supervivència de Capan-1 i BxPC3 al tractament (Figura 13), s'ha determinat que les concentracions òptimes de d'antibiòtic per tal que cap cèl·lula sense el gen de resistència a la blastidina sobrevisqui són de 12.5 μ g/ μ l per a Capan-1 i de 6 μ g/ μ l per a BxPC3.

Per a Capan-1 s'ha provat un rang de concentracions de blastidina d'entre 0 i 20 μ g/ μ l. En canvi, per a BxPC3 s'ha utilitzat un rang d'entre 0 i 20 μ g/ μ l i un d'entre 0 i 12 μ g/ μ l per tal d'obtenir la concentració òptima amb més precisió. Això és degut a que les cèl·lules BxPC3 semblen ser més vulnerables a la blastidina (havent-hi molt poca supervivència a baixes concentracions) a diferència de les Capan-1, que semblen ser més resistents a l'antibiòtic mantenint una supervivència notable a baixes concentracions.

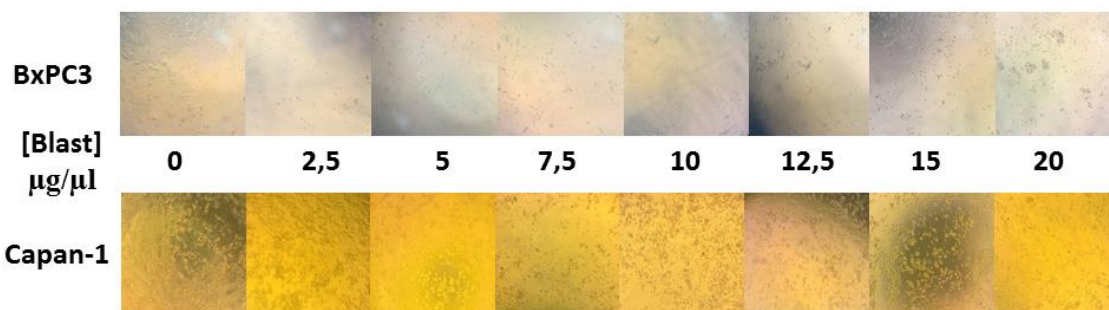


Figura 13 | Imatges de les cèl·lules tractades a diferents concentracions de blastidina al cap de 6 dies de tractament.

4.4. Detecció d'Edició Gènica.

Una vegada les cèl·lules produeixin Cas9 i hagin inserit els sgRNAs, caldrà comprovar si hi ha hagut edició gènica. Hi ha dos mètodes que es poden seguir i que es basen en la formació d'heterodúplexs: L'assaig de mobilitat electroforètica d'heterodúplexs i la digestió d'heterodúplexs amb T7EI. En aquest treball s'han realitzat els dos mètodes amb dos controls d'un *kit* de la casa IDT® basat en la digestió amb T7EI, per tal de comprovar quin és el més adequat per detectar edició gènica.

Quan dues o més seqüències de DNA són pràcticament iguals però difereixen en alguns nucleòtids (o bé hi ha *indels*), i els seu productes de PCR són desnaturalitzats conjuntament i posteriorment hibridats; es poden formar homodúplexs (dues cadenes totalment complementàries que hibriden) o bé heterodúplexs (cadenes complementàries que tenen algun *mismatch* i en les quals es forma una mena de *loop*) [26].

L'assaig de mobilitat electroforètica es basa en la menor mobilitat que tenen els heterodúplexs respecte els homodúplexs en gels de poliacrilamida [22]. Això vol dir que mitjançant una electroforesi amb aquest gel es pot detectar si hi ha hagut edició gènica. Pel que fa a la digestió amb T7EI, aquesta endonucleasa és capaç de reconèixer i tallar heterodúplexs en les cadenes amb 2 o més parells de bases diferents [23], de manera que en un gel d'agarosa es poden visualitzar els productes de la digestió dels heterodúplexs i així detectar edició gènica.

4.4.1. Optimització d'Electroforesi de DNA en Gel de Poliacrilamida

Per poder dur a terme l'assaig de mobilitat electroforètica, s'ha optimitzat l'electroforesi de DNA en gel de poliacrilamida. S'han realitzat diferents proves per a diferents concentracions de poliacrilamida i TEMED, que catalitza la polimerització de l'acrilamida i la poliacrilamida. Com a mostres s'han fet servir diferents quantitats dels *ladders* 1Kb Plus DNA Ladder i GeneRuler DNA Ladder Mix. Alguns dels gels es mostren a la *Figura 14*.

En la *Figura 14.A*, es pot observar que en el gel de poliacrilamida al 15% (malgrat que s'hauria d'haver deixat córrer més de 2 hores) les bandes estan prou clares, a diferència del gel al 8%, en el qual les bandes no acaben de ser del tot precises i sembla que les mostres no han corregut del tot bé. Al gel al 15%, no li ha costat tant de temps polimeritzar com en el cas del gel al 8%. Probablement el fet d'haver-hi més quantitat de poliacrilamida en el gel al 15% ha permès una millor polimerització i, en conseqüència, les mostres han corregut millor. Un augment en la quantitat de TEMED ha permès una millor polimerització del gel i, tal com mostra la *Figura 14.B*, aquest canvi ha resultat en unes bandes molt més clares i precises. Les condicions finals per al gel de poliacrilamida es poden trobar en l'apartat de materials i mètodes.

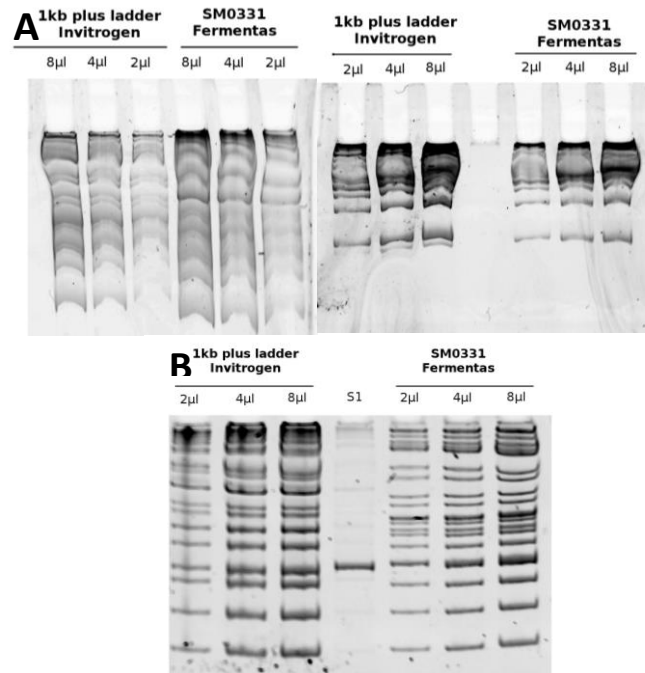


Figura 14 | Gels de poliacrilamida. A: A la dreta gel al 8% , a l'esquerra gel al 15%. Utilitzant 7.5 µl de TEMED en 10 ml de gel. B: Gel al 8% Utilitzant 9 µL de TEMED en 10 ml de gel. S1. Producte d'amplificació dels primers S1.

4.4.2. Assaig de Mobilitat Electroforètica i Digestió amb T7EI

La Figura 15.A mostra un esquema del protocol seguit per la formació i detecció d'heterodúplexs. Abans de procedir amb la formació d'heterodúplexs, cal amplificar els controls A i B mitjançant una PCR. Aquesta PCR s'ha realitzat amb la polimerasa de Biotools® mentre que el protocol de Alt-R recomana l'ús de la DNA polimerasa KAPA HiFi HotStart. Pel que fa a les proporcions de la mix i les condicions de la PCR, s'han fet de dues maneres: Utilitzant les proporcions i condicions que proposa el protocol d'Alt-R i fent servir les proporcions i condicions optimitzades pel grup de recerca (veure a l'apartat de materials i mètodes) però adequant les proporcions de la mix a 25 µl finals i havent-hi 2 µl de mostra. De la primera manera no s'han pogut obtenir productes de PCR, mentre que de la segona sí (Figura 15.B). Així doncs, s'ha seguit amb la formació d'heterodúplexs.

L'assaig de mobilitat electroforètica dels heterodúplexs ha funcionat (Figura 15.C), ja que s'observa tan sols una banda en el cas de la mostra amb homodúplex amb la mida prevista - 686pb- i tres bandes en el cas de la mostra amb heterodúplexs (una corresponent a l'alçada de 686pb corresponent als homodúplexs formats i la resta corresponents als heterodúplexs, que per la seva conformació no han avançat tant en el gel). Pels heterodúplexs s'observen dues bandes per les diferents conformacions que poden adquirir (de tipus protuberància o de tipus bombolla) [26].

Pel que fa a la digestió amb T7EI (*Figura 15.D*) es pot dir que també ha funcionat: No hi ha hagut digestió en la mostra amb homodúplexs ja que el producte és de la mateixa mida que el de la PCR (*Figura 15.B*), mentre que en el cas de la mostra amb heterodúplexs es pot veure que hi ha bandes corresponents als productes de la digestió dels heterodúplexs a més de la banda pertanyent als homodúplexs sense digerir.

D'aquesta manera, es pot confirmar que tant l'assaig de mobilitat electroforètica com la digestió amb T7EI es poden utilitzar per detectar edició gènica. El primer mètode, però, és més ràpid ja que no cal digerir els heterodúplexs, a més que no cal disposar de la T7EI.

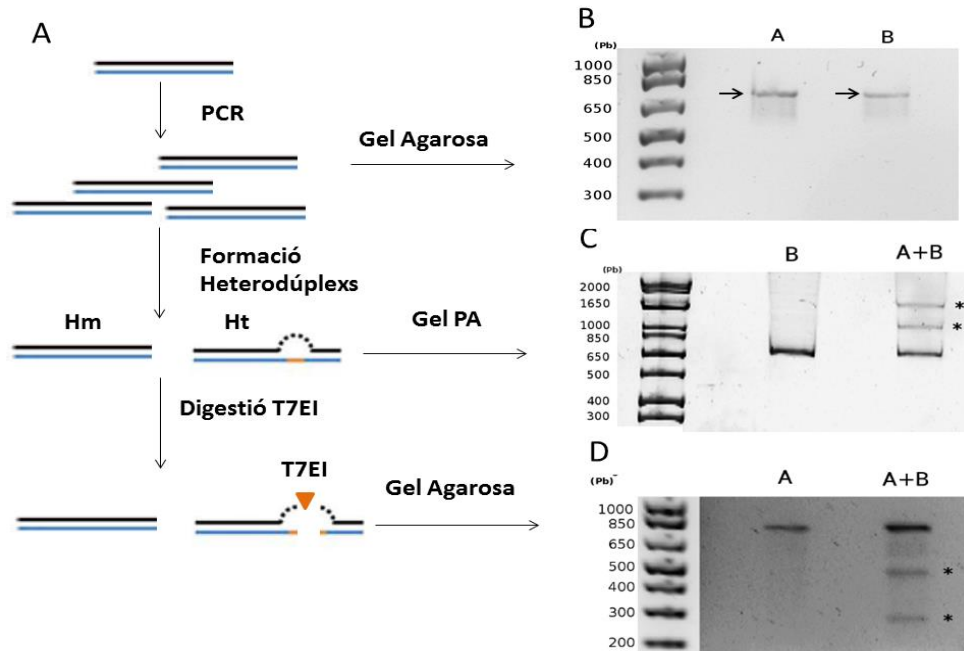


Figura 15 | Assajos de validació de l'edició genòmica A. Esquema del procés seguit per validar quin és el millor mètode d'edició gènica. B. Gel d'agarosa amb els productes de PCR C. Productes de l'assaig de mobilitat electroforètica en gel de poliacrilamida. C. Gel d'agarosa amb els productes de digestió amb T7EI. Els asteriscs remarquen els heterodúplexs. Les fletxes dels gels indiquen els productes de PCR. En els Gels, A, B i A+B indiquen els controls que s'han utilitzat (el control A, el control B o els dos).

4.5. Discussió General

Posant en conjunt els resultats obtinguts, amb els *primers* dissenyats s'ha vist que les dianes dels sgRNAs que s'han dissenyat es troben al genoma i al mRNA tant de BxPC3 com de Capan-1. Això demostra que les dianes estan situades a en un exó del gen *ST3GAL4* i que per tant, quan s'hi realitzi edició gènica mitjançant la metodologia CRISPR-Cas9 serà possible que es noti fenotípicament, probablement perquè un canvi en el marc de lectura o la introducció d'un codó stop generaran una proteïna no funcional o bé que ni es tradueixi.

En quant als vectors lentivirals s'ha pogut verificar mitjançant digestions amb enzims de restricció que són correctes, i s'han pogut purificar mitjançant *midipreps*. Per tant, estan llestos per produir partícules lentivirals (que continguin *Cas9*) mitjançant la línia cel·lular

HEK293T (de fàcil transfecció). Amb aquestes partícules es transfectaran BxPC3 i Capan-1 de manera que s'integrarà *Cas9* al genoma.

Pel que fa a l'assaig de supervivència a la blasticidina, s'ha vist que BxPC3 és més sensible a l'antibiòtic que Capan-1. I és per això que la concentració òptima de blasticidina per poder seleccionar aquelles cèl·lules que hagin introduït *Cas9* i el gen de resistència a l'antibiòtic és de 12.5 µg/µl per a Capan-1 i de 6 µg/µl per a BxPC3.

A més, s'ha verificat (després d'optimitzar l'electroforesi de DNA en gel de poliacrilamida) que l'assaig de mobilitat electroforètica separa correctament els heterodúplexs dels homodúplexs i que és un mètode més ràpid (ens estalviem l'últim pas de digestió) i barat (no cal comprar l'enzim T7EI) que la digestió d'heterodúplexs mitjançant l'endonucleasa T7EI.

5. CONCLUSIONS

Considering the methodology used and the results obtained, in order to assist in the project for the implementation and validation of *ST3GAL4* gene silencing using CRISPR-Cas9 methodology, we can conclude that all objectives are fulfilled. These are:

- The designed primers are able to amplify the *ST3GAL4* exon and the presence of the chosen sgRNA's targets have been corroborated.
- Lentiviral plasmids have been checked and extracted so they are ready to form lentiviral particles.
- The optimal concentrations of blasticidine have been found in order to select only those cells that have acquired the antibiotic resistance having integrated the vector LentiCas9-Blast.
- Finally, the electrophoretic mobility assay of heteroduplexes has been validated (after optimizing DNA electrophoresis in polyacrylamide gel). Both mobility assay and endonuclease digestion with T7EI can detect heteroduplexes, and therefore gene edition, but the first method is faster and cheaper.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] National Cancer Institute, Understanding Cancer 2015, Consultat per última vegada el 5 de maig de 2017, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- [2] Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., et al., Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* 2008, 25, 2097-2116.
- [3] Knudson, A.G., Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2001, 1, 157-162.
- [4] Weinberg, R.A., *The Biology of Cancer 2nd edition*, Garland Science, New York 2014.
- [5] Hanahan, D., Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100, 57-70.
- [6] Reymond, N., D'Água, B.B., Ridley, A.J., Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2013, 13, 858-870.
- [7] Bardeesy, N., DePinho, R., Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer* 2002, 2, 897-909.
- [8] Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., Cancer Statistics , 2017. *CA Cancer J. Clin.* 2017, 0, 1-24.
- [9] Dube, D.H., Bertozzi, C.R., Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 477-488.
- [10] Peracaula, R., Barrabés, S., Sarrats, A., Rudd, P.M., De Llorens, R., Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis. Markers* 2008, 25, 207-218.
- [11] Pinho, S.S., Reis, C.A., Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015, 15, 540-555.
- [12] Pérez-Garay, M., Arteta, B., Llop, E., Cobler, L., et al., α 2,3-Sialyltransferase ST3Gal IV promotes migration and metastasis in pancreatic adenocarcinoma cells and tends to be highly expressed in pancreatic adenocarcinoma tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013, 45, 1748-1757.
- [13] Mondal, N., Buffone, A., Stolfa, G., Antonopoulos, A., et al., ST3GAL-4 is the primary sialyltransferase regulating the synthesis of E-, P-, and L-selectin ligands on human myeloid leukocytes. *Blood* 2015, 125, 687-696.
- [14] Sánchez-Rivera, F.J.J.T., Application of the CRISPR in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* 2015, 15, 387-395.
- [15] Doudna, J.A., Charpentier, E., The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-.)*. 2014, 346, 1258096-1-1258096-9.
- [16] Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T., One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J.Natl.Cancer Inst.* 1977, 59, 221-226.
- [17] Tan, M.H., Nowak, N.J., Loor, R., Ochi, H., et al., Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest.* 1986, 4, 15-23.

- [18] Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., Yang, C.-H., Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol. Lett.* 2013, 35, 1541-1549.
- [19] Bimboim, H.C., Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979, 7, 1513-1523.
- [20] Bustin, S.A., Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000, 25, 169-193.
- [21] Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., Kim, Y.H., Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* 2012, 1-5.
- [22] Chen, J., Zhang, X., Wang, T., Li, Z., et al., Efficient detection, quantification and enrichment of subtle allelic alterations. *DNA Res.* 2012, 19, 423-433.
- [23] Vouillot, L., Thelie, A., Pollet, N., Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3* 2015, 5, 407-415.
- [24] Mean, R.J., Pierides, A., Deltas, C.C., Koptides, M., Modification of the enzyme mismatch cleavage method using T7 endonuclease I and silver staining. *Biotechniques* 2004, 36, 758-760.
- [25] Merten, O.-W., Hebben, M., Bovolenta, C., Production of lentiviral vectors. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 2016, 3, 1-14.
- [26] Nataraj, A.J., Olivos-Glander, I., Kusakawa, N., Highsmith, W.E., Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 1999, 20, 1177-1185.