

Títol del treball: Anàlisi del paper de les glicosiltransferases (GT) en el fenotip tumoral de cèl·lules de càncer de pàncrees mitjançant el seu silenciament.

Estudiant: Judit Salvà I Castro

Grau en Biologia

Correu electrònic: juditsalva@gmail.com

Tutor: Anna Massaguer Vall-Llovera

Cotutor*:

Empresa/ Institució: Universitat de Girona;
Facultat de Ciències; Departament de Biologia;
Àrea Bioquímica del Càncer

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Anna Massaguer Vall-Llovera

Nom del cotutor*:

Empresa/Institució: Universitat de Girona; Facultat de Ciències; Departament de Biologia; Àrea Bioquímica del Càncer

Correu (s) electrònic(s): anna.massaguer@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

AGRAÏMENTS

M'agradaria agrair a tot el grup de recerca Bioquímica del Càncer haver-me fet sentir part del grup així com haver-me ajudat en tot moment durant la meva estada al laboratori. En especial, voldria donar les gràcies a la Dra. Sílvia Barrabés i sobretot, a la meva tutora la Dra. Anna Massaguer, per la seva paciència durant tot el projecte i sobretot per haver-me donat l'oportunitat d'aprendre i aplicar múltiples tècniques tant de cultius cel·lulars com de biologia molecular. A la Dra. Anna Massaguer també voldria agrair-li tant l'esforç i el temps que ha dedicat a realitzar correccions en aquest projecte com les seves propostes de millora.

Per últim, voldria agrair especialment a la meva família i amics els ànims i les infusions entre "sessions de TFG". En concret, voldria agrair als meus pares els seus ànims per a seguir endavant i arribar a aconseguir tot allò que em proposi. Sou el meu exemple de determinació i perseverança.

I finalment, gràcies a tu, per haver-me fet costat en tot moment i haver-me animat a continuar treballant. Perquè la distància, quan realment es vol, no es fa tan dura.

Moltes gràcies a tots els que m'heu acompanyat durant aquest projecte.

RESUM

Actualment el càncer és un problema global essent la segona causa de mort als Estats Units. En concret, el càncer de pàncrees (PDAC) és el causant del 7% de les morts per càncer. Les principals problemàtiques del PDAC són el seu diagnòstic tardà i la baixa taxa de supervivència en estadis avançats.

S'ha observat que les cèl·lules tumorals expressen alteracions en els patrons de glicosilació a la seva superfície. Aquests canvis inclouen la sobreexpressió d'alguns antígens glucídics com Sialil-Lewis. Aquests es componen per una molècula d'àcid siàlic enllaçada a l'extrem terminal dels sucres de Lewis (antígens del grup sanguini Lewis). En concret, hi ha dos antígens Sialil-Lewis que se sobreexpressen en cèl·lules tumorals: SLe^x i SLe^a. Aquests són sintetitzats per dos enzims α -2,3-sialiltransferases: ST3Gal III i ST3Gal IV.

En aquest projecte volem analitzar el paper de les glicosiltransferases (ST3Gal III i ST3Gal IV) en el fenotip tumoral de les cèl·lules de càncer de pàncrees. Per a aconseguir aquest objectiu, ens plantegem fer un silenciament genòmic dels enzims utilitzant el sistema CRISPR-Cas9 i comparar el fenotip de les cèl·lules control i les cèl·lules editades. Per a verificar que s'ha fet el silenciament, es vol analitzar els nivells d'expressió dels enzims ST3Gal III i ST3Gal IV a nivell proteic mitjançant la tècnica Western Blot.

Per a realitzar les edicions genòmiques, cal transfectar les cèl·lules *BxPC-3* i *Capan-1* amb vectors que tinguin la nucleasa Cas9 i el sgRNA clonats. Per aquest motiu es van provar diferents reactius liposomals utilitzant vectors de mides diferents conjugats a GFP. Es va optimitzar el protocol per a transfectar les nostres cèl·lules utilitzant un vector de 5.4 kb equivalent al vector amb sgRNA clonat. Per contra, amb el vector de 12.1 kb, equivalent al vector amb Cas9 i sgRNA clonats, es van aconseguir eficiències de transfecció molt baixes. Per aquesta raó, per a fer l'edició es va decidir transfectar els vectors amb sgRNA utilitzant el protocol optimitzat mentre que Cas9 s'haurà d'introduir utilitzant una altra tècnica.

A més, s'ha optimitzat el protocol per a analitzar l'expressió de ST3Gal III utilitzant la tècnica de Western Blot. S'ha determinat utilitzar la solució de bloqueig TBST amb 5% BSA i baixes concentracions d'anticòs secundari per aconseguir membranes que mostrin la banda específica per a ST3Gal III.

Paraules clau: PDAC, ST3Gal III, ST3Gal IV, SLe^x, SLe^a, CRISPR-Cas9.

RESUMEN

Actualmente el cáncer es un problema global siendo la segunda causa de muerte en Estados Unidos. En concreto, el cáncer de páncreas (PDAC) es el causante del 7% de las muertes por cáncer. Las principales problemáticas del PDAC son su diagnóstico tardío y la baja tasa de supervivencia en estadios avanzados.

Se ha observado que las células tumorales expresan alteraciones en los patrones de glicosilación en su superficie. Estos cambios incluyen la sobreexpresión de algunos antígenos glucídicos como Sialil-Lewis. Estos se componen por la presencia de una molécula de ácido siálico en el extremo terminal de los azúcares de Lewis (antígenos del grupo sanguíneo Lewis). En concreto, hay dos antígenos Sialil-Lewis que se sobreexpresan en células tumorales: SLe^x y SLe^a. Estos son sintetizados por dos enzimas α -2,3-sialiltransferasas: ST3Gal III y ST3Gal IV.

En este proyecto se quiere analizar el papel de las glicosiltransferasas (ST3Gal III y ST3Gal IV) en el fenotipo tumoral de las células de cáncer de páncreas. Para conseguir este objetivo, queremos realizar un silenciamiento genómico de las enzimas utilizando el sistema CRISPR-Cas9 y comparar el fenotipo de las células control y las células editadas. Para verificar que se ha realizado el silenciamiento, se quiere analizar los niveles de expresión de las enzimas ST3Gal III y ST3Gal IV a nivel proteico mediante la técnica Western Blot.

Para realizar las ediciones genómicas, es necesario transfectar las células *BxPC-3* i *Capan-1* con vectores que tengan la nucleasa Cas9 y el sgRNA clonados. Por este motivo se probaron diferentes reactivos liposomales utilizando vectores de tamaños diferentes conjugados a GFP. Se optimizó el protocolo para transfectar nuestras células utilizando un vector de 5.4 kb equivalente al vector con sgRNA clonado. Por el contrario, con el vector de 12.1 kb, equivalente al vector con Cas9 y sgRNA clonados, se consiguieron eficiencias de transfección muy bajas. Por esta razón, para realizar la edición se decidió transfectar los vectores con sgRNA utilizando el protocolo optimizado mientras que Cas9 deberá ser introducida utilizando otra estrategia.

Además, se ha optimizado el protocolo para analizar la expresión de ST3Gal III utilizando la técnica de Western Blot. Se ha determinado utilizar la solución de bloqueo TBST con 5% BSA y bajas concentraciones de anticuerpo secundario para conseguir membranas que muestren la banda específica para ST3Gal III.

Palabras clave: PDAC, ST3Gal III, ST3Gal IV, SLe^x, SLe^a, CRISPR-Cas9.

ABSTRACT

Nowadays cancer is a global problem being the second leading cause of deaths in the EEUU. Particularly, the pancreatic cancer (PDAC) causes the 7% of the deaths from cancer. The main problems of the PDAC are its delayed diagnostic and the low rate of survival in the advanced stages.

It has been noticed that tumoral cells express abnormal glycosylation patterns in their surface. These changes include an overexpression of some glucidic antigens like Sialyl-Lewis. These antigens are composed by a Sialic acid molecule linked to the terminal chains of the Lewis sugars (antigens of the Lewis blood group). In fact, there are two types of Sialyl-Lewis antigens that have been observed to be overexpressed in tumoral cells: SLe^x and SLe^a. These antigens are synthesized by two α -2,3-sialyltransferases enzymes: ST3Gal III and ST3Gal IV.

In this project, we want to analyse the role of the glycosyltransferases (ST3Gal III and ST3Gal IV) in the tumoral phenotype of pancreatic cancer cells. To achieve this objective, we want to perform a genomic knock-out of these enzymes using the CRISPR-Cas9 system and compare the phenotype of the control cells with the engineered cells. To verify the knock-out, we want to check the expression of ST3Gal III and ST3Gal IV at the protein level using a Western Blot analysis.

To perform genomic editions, it is necessary to transfect *BxPC-3* and *Capan-1* cells with different vectors that contain the Cas9 nuclease and the sgRNA. For this reason, different liposomal reagents have been tested using different size vectors conjugated with GFP. The transfection protocol has been optimized to transfect our cells using a 5.4 kb vector equivalent to the vector with the sgRNA cloned in it. In contrast, using the 12.1 kb vector, equivalent to the vector with the Cas9 and the sgRNA cloned, we have achieved low transfection efficiencies. For these reasons, to perform the edition it has been established to transfect vectors with the sgRNA using the optimized protocol whereas Cas9 has to be introduced into our cells using another strategy.

In addition, we have optimized the protocol to determine the ST3Gal III expression using the Western Blot technique. It has been established to use the TBST 5% of BSA blocking solution and low concentrations of secondary antibodies to get membranes showing the specific band of ST3Gal III.

Key words: PDAC, ST3Gal III, ST3Gal IV, SLe^x, SLe^a, CRISPR-Cas9.

Índex

1.	INTRODUCCIÓ	- 1 -
1.1.	CÀNCER	- 1 -
1.1.1.	Càncer de pàncrees	- 1 -
1.2.	GLICOBIOLOGIA	- 3 -
1.2.1.	Sialiltransferases (ST) i antígens Sialil-Lewis	- 4 -
1.3.	EDICIÓ GENÒMICA	- 5 -
1.3.1.	Sistema CRISPR-Cas9	- 5 -
2.	OBJECTIUS	- 6 -
3.	METODOLOGIA	- 6 -
3.1.	TÈCNiques DE CULTIUS CEL·LULARS	- 6 -
3.1.1.	Protocol de tripsinització	- 7 -
3.1.2.	Protocol recompte cel·lular amb la cambra de Neubauer	- 8 -
3.1.3.	Criopreservació	- 9 -
3.1.4.	Test micoplasma	- 9 -
3.2.	TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR	- 11 -
3.2.1.	Producció i purificació de vectors amb GFP	- 11 -
3.3.	TÈCNiques DE TRANSFECCIÓ	- 12 -
3.3.1.	Transfecció	- 12 -
3.4.	CITOMETRIA DE FLUX	- 14 -
3.5.	MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA	- 14 -
3.6.	WESTERN BLOT	- 15 -
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	- 16 -
4.1.	TEST MICOPLASMA	- 16 -
4.2.	PRODUCCIÓ I PURIFICACIÓ DE VECTORS AMB GFP	- 17 -
4.3.	TRANSFECCIÓ	- 17 -
4.3.1.	Transfecció utilitzant el reactiu Lipofectamine® 3000	- 17 -
4.3.1.1.	Protocol estàndard	- 17 -
4.3.1.2.	Protocol reverse	- 18 -
4.3.2.	Optimització del protocol de transfecció utilitzant diversos reactius liposomals	- 20 -
4.3.3.	Transfecció utilitzant el vector pSpCas9(BB)-2a-GFP (12.1 kb)	- 23 -
4.3.3.1.	DNA-in@CRISPR	- 23 -
4.3.3.2.	Lipofectamine®3000	- 23 -
4.4.	WESTERN BLOT	- 24 -
5.	DISCUSSIÓ GENERAL	- 26 -
6.	ÈTICA I SOSTENIBILITAT	- 28 -
7.	CONCLUSIONS	- 28 -
8.	REFERÈNCIES	- 29 -

1. INTRODUCCIÓ

1.1. CÀNCER

El càncer actualment és considerat la segona causa de mort als Estats Units (Siegel et al., 2016). Es defineix com un grup de malalties caracteritzades per la proliferació excessiva i descontrolada d'un grup de cèl·lules anomenades tumor o neoplàsia, i la posterior adquisició de capacitat invasiva (American Cancer Society, 2017; National Cancer Institute (NCI), 2017; Organización Mundial de la Salud (OMS), 2017; Siegel et al., 2016). Amb aquesta capacitat invasiva, les cèl·lules són capaces d'abandonar la seva regió d'origen i mitjançant el sistema circulatori o limfàtic colonitzar i proliferar a altres òrgans i teixits sans creant el que es coneix com a metàstasi (National Cancer Institute, 2017; Weinberg, 2007). Per a arribar a parlar de càncer cal que es donin conjuntament els dos fenòmens citats anteriorment (**Figura 1**). En cas de donar-se únicament un creixement anòmal de teixits, o grups cel·lulars, es parla de tumors benignes els quals poden ser extirpats (Muñoz, 1997).

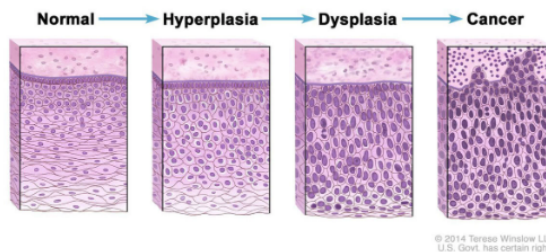


Figura 1. Evolució d'un epitel·li sa fins al creixement i la proliferació descontrolada de les cèl·lules epitelials donant lloc a un tumor. Extret de National Cancer Institute (NCI); www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer.

Tot i la gran diversitat de cèl·lules que formen el cos humà, essent totes elles capaces d'esdevenir tumorals, s'ha observat que el 90% dels tumors són generats a partir de cèl·lules epitelials donant lloc al què es coneix com a *carcinomes* (Weinberg, 2007). Es creu que aquest valor és degut al fet que les cèl·lules epitelials són capaces de mantenir la capacitat de dividir-se durant més temps i que a més, degut a la seva localització, es troben més exposades a possibles agents tòxics que puguin alterar el seu comportament (Muñoz, 1997). Els càncers es poden classificar segons la zona que afecten, segons la tipologia cel·lular i l'estructura del tumor. Pel que fa als tumors epitelials, com el càncer de pàncrees, es poden diferenciar adenomes que són tumors benignes i adenocarcinomes que corresponen a tumors malignes on el terme *adeno* fa referència a un epitel·li secretor (Muñoz, 1997; National Cancer Institute, 2017).

1.1.1. Càncer de pàncrees

En aquest treball ens hem centrat en el càncer de pàncrees degut al seu impacte en la societat essent la causa del 7% de les morts per càncer als Estats Units (Siegel et al., 2016). Aquest òrgan es localitza darrere de l'estómac i morfològicament es pot dividir en: cap, cos i cua. Es troba envoltat per una càpsula poc definida que s'introdueix dins el parènquima donant suport a les cèl·lules funcionals (estroma). A més, hi arriben diversos nervis i vasos limfàtics i sanguinis que proporcionen a l'òrgan les condicions necessàries per a poder realitzar les seves funcions correctament (Asociación Española Contra el Cáncer, 2017; Vegue, 2004). Les principals funcions associades a aquest òrgan són ajudar a la correcta digestió dels aliments (de Braud et al., 2004).

Aquest òrgan es denomina glàndula mixta ja que, histològicament, es divideix en dues regions funcionals: el pàncrees endocrí i el pàncrees exocrí essent aquesta última la més abundant (Vegue, 2004). És important destacar que tot i diferenciar-se dues tipologies cel·lulars amb diferent funcionalitat, aquestes es troben formant una xarxa (Planas et al., 2010). És a dir, no es diferencien dues zones aïllades sinó que les dues tipologies cel·lulars es troben formant agrupacions ("illots") al llarg de l'òrgan (Vegue, 2004). El pàncrees endocrí (1-2% del pàncrees total), situat sobretot a la zona de la cua, s'encarrega de la síntesi d'hormones, com per exemple la insulina o el glucagó que són enviades al sistema circulatori (Planas et al., 2010). La funció de les cèl·lules del pàncrees exocrí (86% del pàncrees total) és la síntesi d'enzims digestius com lipases o l'amilasa. El percentatge restant correspondria al parènquima pancreàtic. S'ha

observat que les cèl·lules exocrines són les més afectades en el càncer de pàncrees. En concret, un 95% dels càncers pancreàtics exocrins són adenocarcinomes (American Cancer Society, 2017; Freitas et al., 2009).

La principal problemàtica associada a l'adenocarcinoma pancreàtic, també conegut com a adenocarcinoma pancreàtic ductal o PDAC, és que normalment es detecta en estadis molt avançats dificultant, o impossibilitant, la seva extracció mitjançant cirurgia o la utilització de tractaments efectius (de Braud et al., 2004; Planas et al., 2010; Wachsmann et al., 2012). Pel que fa als símptomes, en estadis inicials aquests són lleus o bé no es mostren (Freitas et al. 2009). En estadis més avançats es comencen a mostrar diversos símptomes com per exemple orina amb coloració fosca, pell i ulls amb tonalitat groguenca, acidesa estomacal, dolor abdominal o a la part posterior de l'esquena, nàusees i vòmits, pèrdua de pes, i feblesa muscular (Freitas et al., 2009; Hirshberg Foundation for Pancreatic cancer research, 2017). És degut a aquestes característiques que actualment aquest càncer presenta una taxa de mortalitat del 95% i una esperança de vida entre 3 i 10 mesos segons l'estadi en què es trobi (Wachsmann et al., 2012).

Existeixen diversos factors de risc per aquest càncer com per exemple mutacions en oncogenes, l'edat, la dieta o el tabaquisme (de Braud et al., 2004; Freitas et al., 2009; Li et al., 2004). Com s'ha comentat, el pàncrees es troba relacionat amb la digestió dels aliments i per tant, no sembla estrany classificar com a factor de risc la dieta. Tot i no haver-se establert una relació directa, es creu que dietes riques en certs compostos podrien incrementar el risc de desenvolupar neoplàsies (de Braud et al., 2004; Li et al., 2004). Un altre factor de risc és el consum del tabac, descrit com a causant del 30% dels casos de càncer de pàncrees (Freitas et al., 2009). També s'han descrit com a factors de risc condicions laborals on els treballadors es troben exposats a diverses substàncies (p.ex. certs solvents). La diabetis, pancreatitis cròniques, cirrosis i diverses mutacions en oncogenes i gens supressors de tumors són altres factors de risc (de Braud et al., 2004; Freitas et al., 2009; Li et al., 2004).

Un cop s'ha diagnosticat el càncer de pàncrees, s'estudia la situació i l'aspecte del tumor per a determinar en quin estadi es troba. Concretament, s'utilitza el sistema de classificació **TNM** estudiant la mida de la massa de cèl·lules tumorals (T), s'estudia si el tumor s'ha propagat als nòduls limfàtics propers (N) i per últim, en cas d'haver-se produït metàstasi, es determina quins teixits i/o òrgans es troben afectats (M) (Hirshberg Foundation for Pancreatic cancer research, 2017; de Braud et al., 2004). A partir de les categories citades anteriorment, es defineixen 7 estadis pel càncer de pàncrees anant de millors pronòstics (estadi 0) fins a estadis amb els pitjors pronòstics (estadi IV) mostrats a la **Taula 1** (American Cancer Society, 2017; Asociación Española Contra el Cáncer, 2017 ; de Braud et al., 2004).

Taula 1. Estadis del càncer de pàncrees, les seves característiques i la supervivència al cap de 3 i 5 anys.

Estadi	Característiques	Supervivència als 3 anys	Supervivència als 5 anys
0	El tumor es troba a les capes cel·lulars més superficials dels conductes pancreàtics.	-	-
I A	El tumor (\pm 2 cm) es troba al pàncrees i pot ser extirpat localment.	41 %	31 %
I B	El tumor (> 2 cm) es troba al pàncrees i pot ser extirpat localment.	35 %	27 %
II A	El tumor creix fora del pàncrees però no ha arribat a vasos sanguinis ni limfàtics. La majoria no són extirpables i poden ser tractats amb cures pal·liatives. Es pot arribar a extirpar el pàncrees.	24 %	16 %
II B	El tumor creix fora del pàncrees, o a dins, però no ha arribat a vasos sanguinis però sí als nòduls limfàtics propers. Se solen realitzar combinacions de radioteràpia i cures pal·liatives tot i que els tractaments de radioteràpia no tenen efecte sobre la supervivència.	14 %	8 %
III	Els pacients en aquest estadi presenten tumors que no es poden extirpar i invasió local dels vasos sanguinis.	11 %	7 %
IV	Pacient amb metàstasi. Presenten pronòstics poc favorables.	5 %	3 %

1.2. GLICOBIOLOGIA

La glicobiologia s'encarrega de l'estudi de l'estructura, la biosíntesi, la biologia i l'evolució dels sacàrids i les proteïnes que els reconeixen. Aquesta branca de la biologia inclou aspectes com per exemple la química dels carbohidrats, l'enzimologia de la formació i la degradació dels glicans, el reconeixement dels glicans per diverses proteïnes (com per exemple selectines) o el rol dels glicans en diversos sistemes biològics (Varki et al., 2009).

Els carbohidrats són la substància orgànica més abundant produïda pels organismes vius. Inicialment es creia que aquestes molècules només eren utilitzades com a font d'energia i com a materials estructurals però en els darrers anys s'ha descobert que es troben implicades en múltiples funcions cel·lulars. Algunes de les funcions són: actuar com a antígens, participar en processos cel·lulars com per exemple l'adhesió o la motilitat, regular la comunicació entre la cèl·lula i la matriu extracel·lular i entre diverses cèl·lules, actuar com a missatgers, entre altres funcions (Peracaula et al., 2008; Varki et al., 2009). Aquestes molècules es componen d'àtoms d'hidrogen, oxigen i carboni. Les unitats bàsiques que formen els carbohidrats són els monosacàrids (sacàrids) i aquestes es poden enllaçar mitjançant enllaços glicosídics formant el que es coneix com a oligosacàrids (formats per entre 2 i 10 monosacàrids) o polisacàrids (formats per 10 o més monosacàrids) (Brooks et al., 2002; McKee & McKee, 2003).

La gran varietat d'estructures glicosídiques presents a la natura es pot explicar gràcies a la formació i trencament de diferents enllaços glicosídics per part de diversos enzims com per exemple les glicosiltransferases (GT) (Lairson et al., 2008). Les GT són una família d'enzims intracel·lulars i transmembrana relacionats amb la glicosilació de diferents molècules (Brooks et al., 2002; Ünligil & Rini, 2000). Aquests enzims utilitzen com a substrat sucres activats amb grups fosfats, trobant-se normalment en forma de nucleòsids difosfat, transferint-los a sacàrids, proteïnes, lípids, DNA o petites molècules formant el que es coneix com a glicoconjugats (Brooks et al., 2002; Lairson et al., 2008; Ünligil & Rini, 2000). Els glicoconjugats són formats per estructures no glucídiques unides a monosacàrids (pentoses, hexoses, siàlic àcids, entre altres) o polisacàrids. Aquests es troben molt presents a la superfície de les cèl·lules formant el que es coneix com a glicocàlix (Varki et al., 2009).

S'han observat canvis en els patrons de glicosilació en les cèl·lules tumorals com per exemple augments en la presència de les glicosilacions degut a canvis en l'expressió de les glicosiltransferases (Brooks et al., 2002). La presència de glúcids a la superfície cel·lular esdevé crucial en diversos estadis de la progressió tumoral com per exemple en la motilitat cel·lular, relacionada amb la invasió de nous teixits i òrgans, o bé l'adhesió a les cèl·lules endotelials donant lloc a metàstasi augmentant la naturalesa maligna dels tumors (**Figura 2**) (Peracaula et al., 2008).

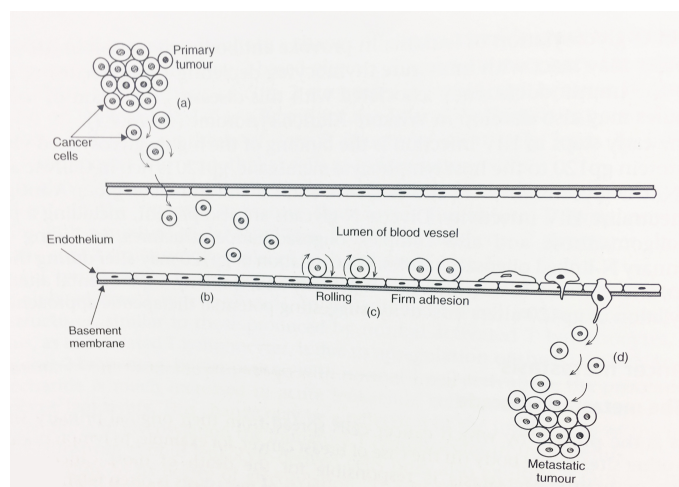


Figura 2. La figura mostra l'entrada de cèl·lules tumorals a un vas sanguini i la següent formació de metàstasi. Extret de Brooks et al., 2002.

1.2.1. Sialiltransferases (ST) i antígens Sialil-Lewis

Dins la família de les glicosiltransferases es destaquen les sialiltransferases (ST) que són enzims intracel·lulars ancorats a la membrana de l'aparell de Golgi (Harduin-Lepers et al., 2001; Pérez-Garay et al., 2010). Aquests enzims addicionen molècules d'àcid siàlic, també anomenades Sia, a partir d'un àcid siàlic activat amb una citidina monofosfat (CMP-Sia) a posicions finals dels carbohidrats que formen part de les glicoproteïnes i dels glicolípid (Pérez-Garay et al., 2010). Els Sia són monosacàrids de 9 carbonis amb càrrega negativa que es troben relacionats per exemple amb la modulació de la interacció amb l'entorn extracel·lular o en la regulació de l'afinitat dels receptors, entre altres funcions (Brooks et al., 2002; Varki et al., 2009). El *N*-acetyl-neuraminic (Neu5Ac) és el Sia més comú. Les ST es poden classificar en tres grups segons l'enllaç que catalitzen entre l'àcid siàlic i els carbohidrats terminals: α -2,6-sialiltransferases, α -2,8-sialiltransferases i α -2,3-sialiltransferases (Pérez-Garay et al., 2010). En aquest projecte ens hem centrat en dos enzims dins del grup α -2,3 sialiltransferasa: β -galactoside α -2,3-sialyl-transferasa 3 (ST3Gal III) i β -galactoside α -2,3-sialyl-transferasa 4 (ST3Gal IV). ST3Gal III es troba codificat al cromosoma 1 (1p34.1) mentre que l'enzim ST3Gal IV es troba codificat al cromosoma 11 (11q24.2) (OMIM, 2014 i 2017 respectivament). Aquests dos enzims s'expressen en la majoria de les cèl·lules adultes en mamífers transferint Sia a galactoses terminals (Varki et al., 2009).

Els antígens de Sialil-Lewis són tetrasacàrids implicats en processos com per exemple l'adhesió cel·lular, la proliferació o la metastasi (Peracaula et al., 2005; Tübel et al., 2012). Aquests antígens deriven dels glicans de Lewis, presents a les cèl·lules sanguínies, als quals se'ls transfereix molècules d'àcid siàlic (Sia) pels enzims α -2,3 sialiltransferases. En aquest projecte ens hem centrat en els epítops Sialil-Lewis^x (SLe^x) i Sialil-Lewis^a (SLe^a) (**Figura 3**) que són formats pels sucres Le^x i Le^a enllaçats a monosacàrids Sia mitjançant l'activitat dels enzims ST3Gal III i ST3Gal IV (Brooks et al., 2002). En concret, SLe^a és sintetitzat preferentment per l'enzim ST3Gal III mentre que la síntesi de SLe^x es relaciona amb la presència de l'enzim ST3Gal IV (Hu et al., 2011; Peracaula et al., 2005; Pérez-Garay et al., 2013).

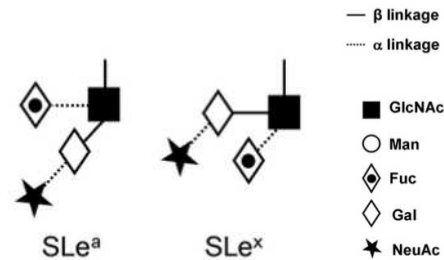


Figura 3. Esquema SLe^a i SLe^x. Figura extreta i modificada de Peracaula, R. et al., 2008.

S'ha observat que aquests epítops se sobreexpressen en múltiples cèl·lules malignes humanes (Takada et al., 1993; Takahashi et al., 2001). La presència d'aquests antígens glucídics a les cèl·lules tumorals s'ha relacionat amb pitjors pronòstics pels pacients que presenten PDAC mostrant menors taxes de supervivència (Nakamori et al., 1999). A més, també s'ha observat que la seva expressió es troba més intensificada en les cèl·lules metastàtiques que en les cèl·lules de tumors primaris (Takada et al., 1993; Pérez-Garay et al., 2013). Aquests antígens han estat descrits com a lligands per a les selectines. Les selectines són uns carbohidrats de membrana, que actuen com a receptors, implicats en la unió entre les cèl·lules de l'endoteli i els leucòcits i la seva extravasació durant processos inflamatoris. Es diferencien les L-selectines (en leucòcits), E-selectines (en cèl·lules endotelials activades per citoquines) i les P-selectines (en cèl·lules endotelials i plaquetes). En concret, s'ha observat que SLe^x presenta afinitat per a interaccionar amb les E-selectines (Takada et al., 1993). D'aquesta manera, les cèl·lules tumorals que sobreexpressen aquests antígens són capaces d'adherir-se als endotelis venosos de la mateixa manera que els leucòcits, podent arribar a altres teixits allunyats del tumor primari (Brooks et al., 2002).

1.3. EDICIÓ GENÒMICA

La capacitat d'editar genomes d'organismes eucariotes ofereix la possibilitat de realitzar investigacions en múltiples camps com poden ser la biomedicina o la biotecnologia. Algunes de les tècniques utilitzables són meganucleases, ZFNs (*zinc-finger nucleases*), TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*) o el sistema CRISPR-Cas9, totes elles basades en la utilització de nucleases (Ran et al., 2013). Les nucleases són enzims capaços de degradar els àcids nucleics a oligonucleòtids (McKee & McKee, 2003). El principi d'acció d'aquestes nucleases és la creació de talls de doble cadena (DSB, en anglès *Double Strain Breaks*) en zones específiques del DNA. En el cas de les meganucleases, ZFNs i TALENs el reconeixement del DNA es realitza per interaccions directes entre aquests enzims i el DNA. En canvi, en el cas de CRISPR-Cas9, la interacció entre el DNA i la proteïna es dona gràcies a un sgRNA (*short guide RNA*) basant-se en el principi d'aparellament de bases de Watson i Crick (Cox et al., 2015; Doudna & Charpentier, 2014).

Les cèl·lules disposen de mecanismes interns per a reparar danys en el DNA: NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*) i HDR (*Homology Directed Repair*). NHEJ és utilitzat quan no hi ha cap seqüència de DNA motlle creant mutacions tipus indel que donen lloc a la inactivació de diversos gens produint proteïnes no funcionals (**Figura 4 A**). HDR en canvi, utilitza seqüències de DNA motlle fent possibles edicions genòmiques molt precises (Cox et al., 2015).

Aquestes tècniques permeten fer edicions en zones concretes del genoma permetent per exemple descobrir la funció de diversos gens, o elements moleculars, en observar les diferències entre els fenotips normals (genomes no editats) i els fenotips mutants (genomes editats) (Cox, et al., 2015). És per aquest motiu que es treballa amb aquesta tecnologia per a determinar quin efecte tenen les glicosiltransferases sobre el fenotip tumoral de les cèl·lules de càncer de pàncrees. En concret, s'utilitza el sistema CRISPR-Cas9 per a silenciar els enzims ST3Gal III i ST3Gal IV.

1.3.1. Sistema CRISPR-Cas9

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) forma part del sistema immunitari adaptatiu de diversos bacteris i arqueus (Ran et al., 2013). Existeixen tres tipus de sistemes CRISPR (I-III) en bacteris, tots ells associats a nucleases Cas (*CRISPR associated system*), repeticions directes, petites seqüències variables de DNA exogen provinent d'infeccions passades (*Protospacers*) i PAMs (*Protospacer adjacent motif*) que són seqüències curtes de DNA reconegudes per les nucleases com a zones de tall (**Figura 4 B**). El conjunt de repeticions i els protoespaiadors són coneguts com a crRNA (CRISPR RNA) (Ran et al., 2013; Sorek et al., 2008).

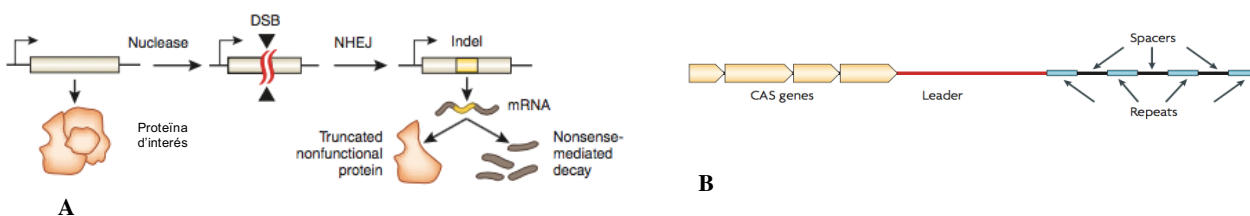


Figura 4. A. Esquema del funcionament de Cas9 creant DSB. B. Esquema del sistema CRISPR. Extret i modificats de Cox, et al., 2015 i Sorek et al., 2008 respectivament.

A l'hora de realitzar edicions genòmiques no són necessaris tots els elements presents al sistema CRISPR en bacteris, sinó que únicament són necessàries la nucleasa Cas9 (derivada de *Streptococcus pyogenes*) i un sgRNA. Aquest últim conté el crRNA (que correspon a una seqüència protoespaiadora de 20 parells de bases) i el tracrRNA (crRNA-transactivador) que interacciona amb el crRNA i la nucleasa permetent la formació del complex sgRNA-Cas9. Un cop format aquest complex, el sgRNA guiarà a Cas9 fins a les seqüències homòlogues al crRNA creant DSB gràcies als dos dominis nucleasa de Cas9. Aquest sistema ens permet editar múltiples regions de DNA (homòlogues als sgRNA), que es trobin properes a elements PAM, utilitzant diversos sgRNA (Cox et al., 2015; Doudna & Charpentier, 2014; Ran et al., 2013).

2. OBJECTIUS

During my thesis, in the group *Bioquímica del Càncer*, the main objective was to evaluate the effect of two glycosyltransferases (ST3Gal III and ST3Gal IV) into the tumoral phenotype of pancreatic cancer cells. To assess the role of these enzymes into the tumoral phenotype of two pancreatic cancer cell lines, we want to knock-out ST3Gal III and ST3Gal IV. To silence these enzymes, we are going to use the CRISPR-Cas9 system. Before silencing these enzymes in our cells, there are many protocols that have to be optimized. My specific aims during my thesis were:

1. To amplify two of the three vectors that we want to use to transfect our cells. We need high amounts of good-quality DNA to use during the transfection assays.
2. To determine if it is possible to introduce the Cas9 nuclease together with the sgRNA into *BxPC-3* and *Capan-1* cells using a single vector and to optimize the transfection protocol to achieve a large number of transfected cells.
3. To optimize the Western Blot protocol to check the expression of the ST3Gal III after the genome editing experiment.

3. METODOLOGIA

3.1. TÈCNiques DE CULTIUS CEL·LULARS

Es parla de cultiu cel·lular quan després d'extreure cèl·lules d'organismes animals o vegetals, aquestes es fan créixer *in vitro* segons les seves necessitats. Bàsicament es diferencien dos mètodes pels quals es poden obtenir els cultius cel·lulars: disgregant grups de cèl·lules a partir d'òrgans (o teixits) mitjançant mètodes enzimàtics o físics, o bé a partir de línies cel·lulars comercials. Es pot treballar amb cultius primaris (les cèl·lules tot just han estat aïllades del teixit) els quals presenten un nombre de divisions finites o bé, amb línies cel·lulars contínues les quals tenen la capacitat de dividir-se indefinidament com és el cas de les cèl·lules tumorals (Thermo Fisher Scientific, 2015).

Tot i que les diverses línies cel·lulars presenten diferències pel que fa a la seva taxa de creixement i les seves necessitats, tots els cultius cel·lulars comparteixen unes necessitats bàsiques per a sobreviure: presència de factors de creixement, hormones, O₂ i CO₂ (per a mantenir el pH del medi). A més, és molt important regular diversos paràmetres físico-químics com per exemple el pH, pressió osmòtica o la temperatura. Cal treballar sempre en condicions d'esterilitat amb l'objectiu d'evitar possibles contaminacions per part de fongs, bacteris, llevats, virus, micoplasmes, entre altres (Thermo Fisher Scientific, 2015). Així doncs, en treballar amb cultius cal parar especial atenció a què tot el material hagi estat prèviament esterilitzat o bé que sigui d'un sol ús. De la mateixa manera, les zones de treball han de trobar-se netes i estèrils com és el cas de la cabina de cultius (Faster Bio48; Cultek) i el material de treball que es troba a dins seu. Cal assegurar-se que les cèl·lules poden créixer adequadament i que les seves necessitats queden cobertes canviant constantment el medi de creixement i evitant creixements confluents. D'aquesta manera es facilita el creixement cel·lular i s'eviten canvis d'expressió en proteïnes de membrana (Thermo Fisher Scientific, 2015).

En aquest projecte es treballa amb dues línies cel·lulars comercials procedents d'adenocarcinomes de pàncrees humans: *BxPC-3* (CRL-1687™, ATCC®) i *Capan-1* (HTB-79™, ATCC®). A la **Figura 5** s'observen les dues línies cel·lulars mentre s'estava treballant amb elles al laboratori. Les cèl·lules *BxPC-3* són cèl·lules epitelials del pàncrees que creixen adherides i han estat aïllades d'un adenocarcinoma primari (ATCC®). Pel que fa a *Capan-1*, es tracta de nou de cèl·lules epitelials pancreàtiques aïllades d'un adenocarcinoma, concretament d'una metàstasi al fetge (ATCC®). Ambdues línies cel·lulars van ser escollides ja que mostren elevats nivells d'expressió dels antígens glucídics SLe^x i SLe^a.

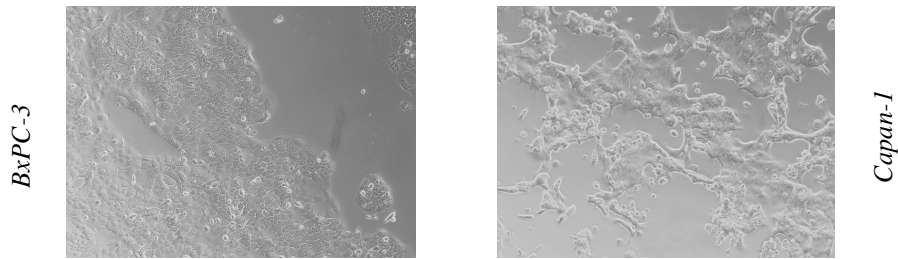


Figura 5. Imatges obtingudes mitjançant microscopi invertit durant la utilització de les cèl·lules (100x).

3.1.1. Protocol de tripsinització

Objectiu

L'objectiu d'aquesta tècnica és aconseguir que les cèl·lules que creixen adherides al flascó es trobin en suspensió per a poder realitzar els procediments bàsics al laboratori de cultius com per exemple preparar plaques, conservar cèl·lules en criotubs o realitzar citometries.

Fonament

Per a obtenir les cèl·lules en suspensió, és indispensable degradar les proteïnes que mantenen a les cèl·lules adherides entre elles i al mateix flascó, les quals són conegudes com a MAC (Molècules d'Adhesió Cel·lular). Aquestes molècules es relacionen amb diverses funcions com poden ser la migració o la proliferació cel·lular. Es poden utilitzar diverses proteases per a degradar aquestes proteïnes com per exemple la tripsina (*Trypsin-EDTA (IX) 0,25%*; Gibco™).

Protocol per flascó T75

1. Eliminar el medi en què es troben les cèl·lules amb una pipeta estèril de vidre connectada a una bomba d'aspiració.
2. Realitzar un rentat amb 10 mL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Lonza), que ens ajudarà a eliminar les possibles restes d'impureses que poden quedar al cultiu.
3. Descartar el tampó utilitzant una altra pipeta estèril.
4. Afegir 4mL de tripsina¹ al flascó i mantenir el flascó 5 minuts dins l'incubador (Function Line, Heraeus Instruments) per tal que l'enzim pugui hidrolitzar les proteïnes a pèptids correctament.
5. Un cop han passat 5 minuts, utilitzar el microscopi invertit (CKX41, Olympus) per a determinar si l'enzim ha actuat correctament. En el cas que les cèl·lules encara es trobin adherides o en agregats, aquestes es poden incubar fins a un màxim de 10-15 minuts en tripsina (exposicions perllongades poden arribar a malmetre les cèl·lules). Si pel contrari, s'observen cèl·lules individuals amb morfologia arrodonida es pot procedir a parar la reacció de tripsinització.
6. Per a parar la reacció s'utilitzen 6 mL medi complet DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Lonza), amb 10% (per a BxPC-3) o 20% (per a Capan-1) de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 1% d'estreptomicina i ampicil·lina i 1% L-glutamina.
7. Un cop parada la reacció, es disposa de 10mL finals on es troben les cèl·lules en suspensió.

Protocol per placa de 24 pouets

1. Aspirar el medi amb una agulla estèril connectada a la bomba d'aspiració.
2. Rentar les cèl·lules amb 500 μ L de DPBS estèril per pou.
3. Aspirar, utilitzant una agulla, el volum de DPBS afegit prèviament.
4. Afegir 200 μ L de tripsina estèril per pou.
5. Incubar la placa 5 minuts a 37°C a l'incubador.
6. Passada la incubació, determinar si les cèl·lules encara es troben adherides mitjançant el microscopi invertit.

¹ Tant la tripsina com els medis complets han d'haver-se escalfat al bany abans de ser utilitzats.

7. Parar la reacció amb 800 μL de medi DMEM complet per pou. El medi canviarà segons quines cèl·lules es tripsinitzin (veure Protocol tripsinització flascó T75).
8. Recollir la suspensió cel·lular de cada pouet en un eppendorf diferent de capacitat 1.5 mL.
9. Centrifugar (Centrifuge 5415R, Eppendorf) les mostres a 4°C a 2600 rpm durant 7 minuts.
10. Un cop s'han centrifugat les cèl·lules, en condicions estèrils, aspirar el sobrenadant amb una agulla connectada a la bomba d'aspiració.
11. Resuspendre el pellet, primer en sec, i després en el volum de medi o tractament desitjat.

3.1.2. Protocol recompte cel·lular amb la cambra de Neubauer

Objectiu

Per a la realització de qualsevol procediment amb cultius cel·lulars és molt important saber de quantes cèl·lules es disposa. En saber el nombre de cèl·lules disponibles és possible fer plaques amb un nombre determinat de cèl·lules i d'aquesta manera poder controlar paràmetres com la confluència cel·lular, aconseguint la més adequada segons l'objectiu que es tingui, o bé fent possible la reproductibilitat dels experiments que es vulguin realitzar. Aquest protocol doncs, és un pas previ molt important per a realitzar qualsevol dels procediments que es realitzen al laboratori de cultius cel·lulars com pot ser preparar plaques o fer criotubs per a congelar cèl·lules.

Fonament

Per a comptar les cèl·lules es poden utilitzar diverses tècniques però en aquest projecte s'ha utilitzat la cambra de Neubauer (Marienfeld-Superior). Aquesta cambra és un portaobjectes especial en el qual hi ha gravades dues quadricules que ens permeten comptar les cèl·lules d'interès. En concret, cada quadricula disposa de 4 quadrants d'1mm² compostos per 16 quadrats de 0.25 mm² quedant un volum d'0.1mm³ on comptem de les cèl·lules (**Figura 6**) (Bastidas, 2009). Per a comptar correctament les cèl·lules és necessari utilitzar un colorant, en aquest cas Trypan Blue. Aquest colorant ens permet diferenciar entre les cèl·lules vives, que presenten formes arrodonides i coloració blanca davant un fons de color blau fosc, de les cèl·lules mortes. Aquestes últimes es mostren com cèl·lules amb morfologies amorfes i amb coloració fosca ja que el colorant és capaç d'introduir-se al seu interior (Sigma-Aldrich[®]).

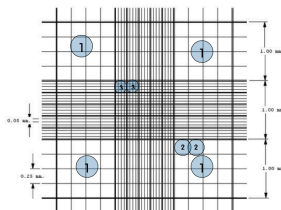


Figura 6. Esquema cambra de Neubauer. Extret de Bastidas, 2009.

Protocol

1. Tripsinitzar les cèl·lules (veure protocol 3.1.1. Protocol de tripsinització).
2. Centrifugar (Centrifuge 5804R, Eppendorf) la mostra de cèl·lules en suspensió, a 1500 rpm 5 minuts a 4°C per disposar del pellet on es troben les cèl·lules de la mostra.
3. Aspirar el medi (sobrenadant) i guardar el pellet.
4. Resuspendre el pellet, primer en sec, i a continuació en nou medi DMEM complet.
5. Obtenir un volum de la suspensió cel·lular per diluir-la en Trypan Blue (0.4%) (Sigma-Aldrich[®]). Normalment s'utilitza una dilució 1:4.
6. Carregar 10 μL de la dilució a la cambra i comptar les cèl·lules vives que s'observen als diversos quadrants amb el microscopi invertit.

En total es disposa de 4 valors a partir dels quals es pot calcular el nombre de cèl·lules per mL i el nombre total de cèl·lules a la mostra aplicant les següents fórmules:

$$\text{Fórmula 1: } \frac{\text{Mitjana cèl·lules per quadrant } \left(\frac{\bar{x}}{4}\right)}{0,1 \text{ mm}^3} \times \frac{1 \text{ mm}^3}{1 \mu\text{L}} \times \frac{10^3 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \times \text{dilució utilitzada} = \frac{\text{cèl·lules}}{\text{mL}}$$

$$\text{Fórmula 2: } \frac{\text{cèl·lules}}{\text{mL}} \times \text{mL de medi complet en que s'ha resuspès el pellet} = \text{cèl·lules totals a la mostra}$$

3.1.3. Criopreservació

Objectiu

Aquesta tècnica permet la conservació de cèl·lules durant llargs períodes de temps. D'aquesta manera, és possible evitar que les cèl·lules hagin de mantenir-se en flascons durant llargs períodes de temps i assegurar la seva bona qualitat (creixement, fenotip, metabolisme, entre altres). A més, en disposar de cèl·lules congelades serà molt més fàcil treballar amb cèl·lules ja utilitzades evitant haver de comprar noves alíquotes a les cases comercials.

Fonament

Aquesta tècnica es basa en la conservació en nitrogen líquid (a aproximadament -196°C) de cèl·lules durant llargs períodes de temps. En mantenir les cèl·lules a baixes temperatures s'atura el metabolisme d'aquestes fins al moment de la descongelació. Amb l'objectiu d'evitar la mort cel·lular, degut als possibles cristalls que es formen durant la congelació, s'utilitzen agents crioprotectors. En aquest cas s'utilitza el DMSO (dimetil sulfòxid) el qual és capaç de penetrar dins la cèl·lula desplaçant l'aigua evitant la formació de cristalls intracel·lulars. Un altre punt clau a l'hora de conservar les cèl·lules és aconseguir que es congelin a poc a poc, disminuint 1°C per minut, per tal d'evitar malmetre-les durant el procés de congelació degut a la formació de cristalls de gel.

Protocol

1. Tripsinitzar les cèl·lules que es volen congelar (veure apartat 3.1.1. *Protocol de tripsinització flascó t75*).
2. Comptar les cèl·lules per a determinar quants criotubs es poden preparar (veure apartat 3.1.2. *Protocol recompte cel·lular amb la cambra de Neubauer*).
3. Un cop es coneix el nombre total de cèl·lules disponibles, posar en un tub el volum de suspensió cel·lular necessària per tal que a cada criotub hi hagi el nombre de cèl·lules desitjades.
4. Centrifugar (Centrifuge 5415R, Eppendorf) els criotubs a 4°C a 2600 rpm durant 7 minuts.
5. Aspirar el sobrenadant amb una pipeta estèril connectada a una bomba d'aspiració.
6. Resuspendre el pellet correctament, primer en sec i posteriorment en FBS amb 10% DMSO.
7. Situar els criotubs al Mr. Frosty™ (Thermo Fisher™ Scientific) el qual ajuda a congelar les cèl·lules a poc a poc. Concretament, s'estima que aquest recipient fa possible que a cada minut la temperatura disminueixi 1°C , quan les cèl·lules estan al congelador de -80°C .
8. Un cop les cèl·lules s'han congelat totalment, traslladar-les al tanc de nitrogen líquid.

3.1.4. Test micoplasma

Objectiu

L'objectiu d'aquesta tècnica és la detecció de contaminació als cultius cel·lulars per micoplasmes. Aquests microorganismes són bacteris els quals no tenen paret cel·lular i són considerats els microorganismes més petits (menys d' $1 \mu\text{m}$) amb capacitat d'autoreplicar-se (Thermo Fisher Scientific, 2015). Aquests microorganismes poden mantenir-se al cultiu cel·lular sense causar mort cel·lular però poden desajustar el metabolisme i el comportament de les cèl·lules. En donar-se casos d'infeccions cròniques per micoplasma, paràmetres com la taxa de proliferació, la densitat o l'aglutinació cel·lular es veurien modificats (Thermo Fisher Scientific, 2015). En cas de resultar la prova positiva, caldrà desinfectar correctament tot el material de treball (cabines, incubadors i material de laboratori) així com descartar totes les línies cel·lulars de les quals es disposa en el moment de l'anàlisi.

Fonament

Es realitzen tests periòdicament per a determinar si els cultius es troben lliures d'aquest tipus de contaminació. Cal disposar de cultius cel·lulars que es trobin com a mínim al 90% de confluència per a realitzar el test. En concret, s'analitzen les mostres de sobrenadant de les línies cel·lulars sospitoses juntament amb un control negatiu (DMEM complet sol) i un control positiu inclòs al kit comercial. A partir de les mostres es realitza una PCR amplificant la regió codificant del gen 16s rRNA del genoma dels micoplasmes observant una banda a aproximadament 270 parells de bases (pb). Addicionalment, el kit utilitzat amplifica una regió de 191 pb que és utilitzada com a control positiu per a assegurar que el procés de PCR s'ha donat correctament.

Protocol

1. Obtenir una mostra de sobrenadant (aproximadament 1 mL) dels cultius cel·lulars.
2. Incubar 100 μ L de cada mostra a 95°C durant 5 minuts al termoblock (Digital Dry Bath Labnet, Accublock™ Labnet International, inc.).
3. Passats 5 minuts, centrifugar les mostres (Centrifuge 5415R; Eppendorf) a màxima velocitat durant 15 segons aproximadament amb l'objectiu d'obtenir una mostra processada. Al pellet hi quedaran les possibles restes cel·lulars les quals no ens interessin per a aquest test.
4. Preparar les mostres per a la realització de la PCR treballant amb gel i sota campana. S'utilitza la *Mix OneStep* on ja es troben tots els elements necessaris per a la realització de la PCR (*Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR*, Minerva biolabs® 2009). Aquesta mix ja es troba preparada, al·liquotada i congelada. S'utilitzen 23 μ L de la *Mix OneStep* juntament amb 2 μ L de cada mostra.
5. Realitzar la PCR. S'utilitza el següent programa:

1 cicle: 94°C per 2 minuts

39 cicles: 94°C per 30 segons

55°C per 30 segons

72°C per 30 segons

Infinit: 4°C

6. Preparar 500 mL de tampó TBE x1.
 - i. Tarar un vas de vidre juntament amb una mosca.
 - ii. Pesar 5.4 g de TRIS.
 - iii. Pesar 2,75 g d'Àcid Bòric.
 - iv. Afegir una mica d'aigua miliQ juntament amb 2mL d'EDTA.
 - v. Enrasar amb aigua miliQ fins a 450 mL i posar la solució a agitar.
 - vi. Un cop dissolta la solució, enrasar amb una proveta a 500 mL
7. Preparar un gel d'agarosa 1.5% (0.75 g agarosa) i addicionar-hi *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (5 μ L) juntament amb tampó TBE 1X (50 mL) (els volums canviaran segons el gruix de gel que es desitgi).
8. En aquest gel, carregar 5 μ L de marcadors moleculars juntament amb 12 μ L de mostra (10 μ L mostra + 2 μ L tampó de càrrega 6X).
9. Fer córrer el gel durant 1 hora a 100V.
10. Quan el gel ha corregut totalment, revelar al transiluminador.

3.2. TÈCNiques DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.2.1. Producció i purificació de vectors amb GFP

Objectiu

Un dels objectius d'aquest projecte és aconseguir transfectar cèl·lules de mamífers amb vectors que continguin la seqüència de Cas9 i el sgRNA escollit. Per a fer-ho cal disposar d'elevades quantitats de tres vectors per a poder realitzar totes les proves de transfecció que siguin necessàries. En concret, es volen amplificar dos vectors dels tres necessaris a partir de petites al·lotes disponibles.

En els experiments de transfecció s'utilitzen tres vectors diferents: *pmaxCloningTM Vector*, *pcDNATM 3.1* i *pSpCas9-(BB)-2a-GFP*. En aquest treball però, únicament s'han amplificat els dos primers vectors citats.

***pmaxCloningTM Vector* (Figura 7 A)** és un vector d'expressió eucariota de 3.4 kb que en ser transfectat a cèl·lules de mamífers permet obtenir l'expressió dels gens que s'hi han clonat. L'hoste escollit per a aquest vector són cèl·lules d'*E.coli*, concretament s'ha utilitzat la soca DH5 α . Les cèl·lules transformades es seleccionen utilitzant brou Luria (*Luria Bertani LB*) amb 30 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina ja que en transformar-se amb aquest vector, aquestes adquireixen resistència a la kanamicina (Lonza). A més, aquest vector porta clonada la seqüència de la proteïna GFP (*Green Fluorescent Protein*) que ens permetrà detectar l'eficiència de transfecció avaluant el nombre de cèl·lules que expressen fluorescència. Aquest vector s'utilitza com a control positiu de transfecció durant els experiments de transfecció.

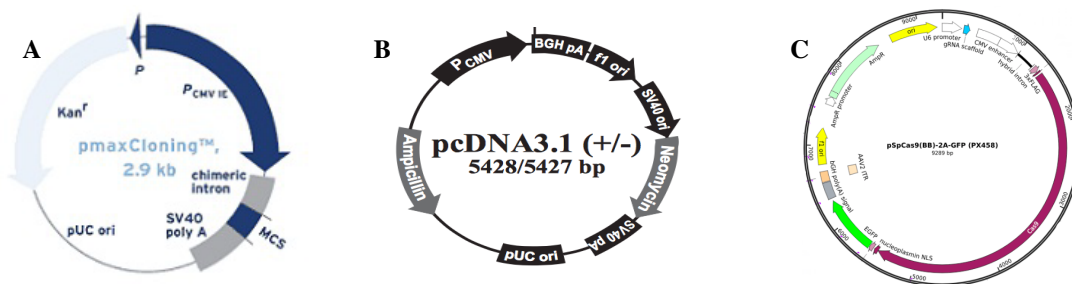


Figura 7. Vectors utilitzats: **A.** *pmaxCloningTM*, **B.** *pcDNATM 3.1* i **C.** *pSpCas9 (BB)-2a-GFP*. Extret de Lonza, InvitrogenTM i addgene respectivament.

Pel que fa a *pcDNATM 3.1* (Figura 7 B), es tracta d'un vector de 5.4 kb utilitzat per a expressar certs gens en les cèl·lules hoste. En aquest cas també s'han transformat cèl·lules d'*E.coli* DH5 α per a amplificar el volum de vector disponible. La selecció de les cèl·lules transformades amb aquest vector es realitza utilitzant brou LB amb 50–100 $\mu\text{g/ml}$ ampicil·lina ja que en aquest vector s'hi troba integrat un gen de resistència a l'ampicil·lina (InvitrogenTM). Aquest vector també porta clonada la seqüència per a la proteïna GFP. S'amplifica aquest vector ja que té una mida semblant al vector que s'utilitzaria en cas de transfectar les cèl·lules únicament amb el sgRNA (*pGS-gRNA-Neo*, GenScript).

Per últim, *pSpCas9 (BB)-2a-GFP* és un vector de 12.1 kb que presenta una mida similar a la que presentaria el vector amb Cas9 i el sgRNA clonats. De nou, porta clonada la seqüència codificant per a la GFP. En transformar-se les cèl·lules bacterianes amb aquest vector, és possible seleccionar-les utilitzant ampicil·lina (100 $\mu\text{g/mL}$) addicionada al brou LB (addgene). Així doncs, aquest vector s'utilitza per a determinar si és possible transfectar les cèl·lules amb els elements necessaris per a l'edició genòmica utilitzant un sol vector.

Fonament

Aquesta tècnica a basa en realitzar un cultiu de nit a partir de cèl·lules d'*E.coli* de la soca DH5 α transformades prèviament amb els vectors *pmaxCloningTM* i *pcDNATM 3.1*. Aquest procediment va ser realitzat prèviament per a altres membres del grup. Així doncs, a partir de les cèl·lules transformades es realitzen cultius de nit per a aconseguir una gran població de cèl·lules clonals que continguin els vectors que es desitgen aïllar. Per a seleccionar únicament les cèl·lules que s'han transformat, aquestes es cultiven en brou LB i antibiòtic (kanamicina o ampicil·lina segons el

vector), la resistència pels quals es troba clonada als vectors d'interès. A partir de les cèl·lules que sobreviuen a l'antibiòtic es realitza una MidiPrep per a extreure el DNA.

Protocol purificació vectors

1. Realitzar cultius de nit amb cèl·lules d'*E.coli* de la soca DH5 α amb l'antibiòtic corresponent.
2. Aïllar dels vectors realitzant una MidiPrep. Per a la correcta purificació dels vectors se segueix el protocol *QIAGEN[®] Plasmid Purification Handbook*. La purificació dels vectors consisteix en la utilització dels reactius inclosos en el kit *QIAGEN[®] Plasmid Purification* tal com s'indica al protocol.
3. Un cop s'han realitzat les extraccions de DNA, analitzar 1 μ L de cada mostra al NanoDrop (NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies) llegint l'absorbància 260 nm. Amb aquesta mesura obtenim 4 valors importants: l'absorbància, la ratio $\frac{260}{280}$, la ratio $\frac{260}{230}$ i ng/ μ L.
4. Un cop purificat el DNA, aquest es conserva a -20°C en un eppendorf i es va descongelant quan es necessita.

3.3. TÈCNiques DE TRANSFECCIÓ

3.3.1. Transfecció

Objectiu

Per tal de silenciar ST3Gal III i ST3Gal IV és necessari introduir el sistema CRISPR-Cas9 a les línies cel·lulars *BxPC-3* i *Capan-1*, en el nostre cas utilitzant tècniques químiques de transfecció. L'objectiu principal d'aquesta tècnica és aconseguir introduir el vector de mida més gran a les nostres cèl·lules. A més, es volen determinar les millors condicions de transfecció per a cada línia cel·lular utilitzant diversos reactius de transfecció i diversos protocols.

Fonament

Existeixen dues estratègies per a introduir el sistema CRISPR-Cas9 a l'interior de les cèl·lules d'interès: introduir el sgRNA i Cas9 per separat o bé treballar amb un vector que inclou ambdós elements integrats (Ran et al., 2013). A l'hora d'introduir el sistema CRISPR-Cas9 a l'interior de les cèl·lules desitjades es poden utilitzar una gran varietat de tècniques classificades com a físiques (p.ex. electroporació), químiques (p.ex. reactius liposomals) o biològiques (p.ex. utilitzant partícules lentivirals) (Keown et al., 1990; Kim & Eberwine, 2010). En concret, en aquest treball ens hem centrat en la utilització de reactius liposomals. Aquests són lípids carregats positivament capaços de formar complexos (liposomes) situant el DNA carregat negativament al seu interior. Els liposomes tenen una càrrega total positiva fent que es puguin adherir a les membranes cel·lulars, les quals presenten una càrrega total negativa, possibilitant la internalització del DNA (Kim & Eberwine, 2010).

Es prova l'eficiència de transfecció de 4 reactius liposomals: *Lipofectmine[®]3000* (Invitrogen[™]), *DNA-in[®]CRISPR* (MTI-Globalstem), *LipoD293[™] DNA In Vitro Transfection Reagent* (SignaGen[®] Laboratories) i *GenJet[™] In Vitro DNA Transfection Reagent for M-PAC Cells* (SignaGen[®] Laboratories). *Lipofectmine[™]3000* és utilitzat per a transfectar diverses línies cel·lulars (Xia et al., 2001; Yamazaki et al., 2000). El reactiu *DNA-in[®]CRISPR* és recomanat per la casa comercial per a transfectar cèl·lules utilitzant vectors de més de 8 kb fent pensar que en utilitzar-lo seria possible transfectar més cèl·lules i introduir el vector més gran. *LipoD293[™]* és recomanat per la casa comercial degut a la seva elevada eficiència a l'hora de transfectar cèl·lules i a la seva baixa toxicitat. Per últim, el reactiu *GenJet[™]*, tot i utilitzar-se per a transfectar línies cel·lulars murines, es va utilitzar ja que la casa comercial ens va indicar que en transfectar línies pancreàtiques era possible obtenir valors d'eficiència de transfecció d'aproximadament el 60%.

Els tres vectors utilitzats per a transfectar les cèl·lules són: *pmaxCloning[™] Vector* de 3.4 kb utilitzat com a control positiu de transfecció, *pcDNA[™] 3.1* de 5.4 kb el qual té una mida similar al vector que s'utilitzarà per introduir el sgRNA dins les cèl·lules i per últim, el vector *pSpCas9(BB)-2a-GFP* d'aproximadament 12.1 kb el qual presenta una

mida similar a la que presentaria el vector amb el sgRNA d'interès i la nucleasa Cas9 clonats. Tots els vectors utilitzats porten clonada la seqüència codificant per a la proteïna GFP per tal de mesurar l'eficiència de transfecció utilitzant la tècnica de citometria de flux.

Protocol

A l'hora de transfectar les cèl·lules s'han utilitzat bàsicament dos protocols: el protocol estàndard, essent aquest el recomanat per cada casa comercial, i el protocol *reverse* el qual es basa en la prèvia tripsinitiació de les cèl·lules. Degut a que els protocols comercials dels diversos reactius són molt similars, es mostra un protocol estàndard general i un protocol *reverse* general per a tots els reactius utilitzats. Les variacions específiques per a cada reactiu utilitzat es mostren a la **Taula 2**.

Taula 2. Indicacions per a transfectar els cultius cel·lulars segons el reactiu utilitzat.

Reactiu	Confluència necessària	Cèl·lules / pou sembrades	Volum DNA/ pou	Volum reactiu/pou	Medi utilitzat
<i>DNA-in@ CRISPR</i>	50-70%	<i>BxPC-3</i> : 1.4 x10 ⁵ cèl·lules/pou <i>Capan-1</i> : 1.6 x10 ⁵ cèl·lules/pou	0.5 µg	1, 1.5, 2 i 3 µL	12.5 µL Opti-MEM® Gibco™
<i>GenJet™</i>	~ 90%	<i>BxPC-3</i> : 1.4 x10 ⁵ cèl·lules/pou <i>Capan-1</i> : 2 x10 ⁵ cèl·lules/pou	1 µg	3µL	50 µL DMEM amb 1% antibiòtics (ampicil·lina i estreptomicina) i 1% L-glutamina ²
<i>LipoD293™</i>	~70-80%	<i>BxPC-3</i> : 1.2 x10 ⁵ cèl·lules/pou <i>Capan-1</i> : 1.8 x10 ⁵ cèl·lules/pou	0.5 µg	1.5 µL	25 µL DMEM amb 1% antibiòtics (ampicil·lina i estreptomicina) i 1% L-glutamina
<i>LipoD293™</i> protocol <i>reverse</i>	~ 95-100%	<i>BxPC-3</i> : 2.4 x10 ⁵ cèl·lules/pou <i>Capan-1</i> : 2.4 x10 ⁵ cèl·lules/pou	<i>LipoD293™</i> <i>reverse</i> : 1µg	<i>LipoD293™</i> <i>reverse</i> : 4 µL	50 µL DMEM amb 1% antibiòtics (ampicil·lina i estreptomicina) i 1% L-glutamina
<i>GenJet™</i> protocol <i>reverse</i>	~ 95-100%	<i>BxPC-3</i> : 2.4 x10 ⁵ cèl·lules/pou <i>Capan-1</i> : 2.4 x10 ⁵ cèl·lules/pou	1 µg	3µL	50 µL DMEM amb 1% antibiòtics (ampicil·lina i estreptomicina) i 1% L-glutamina
<i>Lipofectamine®</i> 3000	~70-90%	<i>BxPC-3</i> : 1.4 x10 ⁵ cèl·lules/pou <i>Capan-1</i> : 1.8 x10 ⁵ cèl·lules/pou	0.5 µg	1.5 i 3 µL	25 µL Opti-MEM® Gibco™

Protocol estàndard general:

1. Canviar el medi de les cèl·lules entre 30 i 60 minuts abans de la transfecció³.
2. Diluir el DNA (els vectors) en medi DMEM sense antibiòtics, sense FBS o en Opti-MEM® segons indica cada casa comercial (**Taula 2**). Realitzar un vòrtex seguit d'un *spin* per assegurar que tots els components interaccionen correctament.
3. Diluir el reactiu liposomal en medi DMEM sense antibiòtics, sense FBS o en Opti-MEM™ segons indica cada casa comercial (**Taula 2**). Realitzar un vòrtex seguit d'un *spin* per assegurar que tots els components interaccionen correctament.
4. Mesclar el DNA diluït amb el reactiu també diluït. Realitzar un vòrtex seguit d'un *spin*.
5. Incubar a temperatura ambient la mescla de DNA-reactiu durant 15 minuts.
6. Un cop incubada la mescla, addicionar el tractament gota a gota al cultiu.
7. Sacsejar la placa de 25 pouets (amb cura) perquè totes les cèl·lules contactin amb el tractament.
8. Al cap de 12-18 hores i ~5 hores post-transfecció, canviar el medi de les cèl·lules tractades amb *LipoD293™* i *GenJet™* respectivament.
9. Determinar l'eficiència de transfecció amb la tècnica de citometria de flux.

Protocol *reverse* general⁴:

5. Trispsinitzar les cèl·lules (veure apartat 3.1.1. Protocol tripsinitiació placa de 24 pous).
6. Un cop es disposa del pellet cel·lular, aquest es resuspèn en sec i posteriorment s'afegeix el volum final de cada tractament (**Taula 2**).

² La casa comercial indica que en treballar amb medi sense FBS (*Fetal Bovine Serum*) es disminueix el risc de toxicitat.

³ En el cas de les cèl·lules tractades amb el reactiu *DNA-in@ CRISPR* serà necessari que el medi DMEM no contingui l'1% d'antibiòtics per a disminuir el risc de toxicitat.

⁴ La preparació dels reactius es realitza tal com s'indica al protocol normal però en aquest cas s'addiciona sobre el pellet cel·lular.

7. Les cèl·lules s'incuben durant 15 minuts amb els tractaments a temperatura ambient. En el cas dels reactius *LipoD293TM* i *GenJetTM*, la casa comercial recomana realitzar aquesta segona incubació a 37°C dins l'incubador.
8. Sembrar les cèl·lules en una nova placa i afegir medi DMEM³ complet fins a un volum final de 500 µL.
9. Al cap de 12-18 hores i ~5 hores post-transfecció canviar el medi de les cèl·lules tractades amb *LipoD293TM* i *GenJetTM* respectivament.
10. Determinar l'eficiència de transfecció amb la tècnica de citometria de flux.

3.4. CITOMETRIA DE FLUX

Objectiu

Aquesta tècnica permet detectar la fluorescència de la proteïna GFP que es troba clonada en tots els vectors utilitzats durant els experiments de transfecció. D'aquesta manera, és possible determinar l'eficiència de transfecció per a cada reactiu, la mida de les cèl·lules, la seva complexitat i la intensitat de fluorescència mitjana de les cèl·lules analitzades.

Fonament

La citometria de flux és un mètode quantitatiu d'anàlisi cel·lular que permet estudiar la morfologia i la bioquímica cel·lular permetent obtenir informació quantitativa a nivell de cèl·lula individual i podent diferenciar diverses poblacions cel·lulars (Orfao et al., 1993).

Aquesta tècnica es basa a fer passar les cèl·lules una per una per davant d'una font lluminosa. L'aparell obté informació sobre la llum dispersada i l'emesa per les cèl·lules en ser excitées pel raig de llum. Els senyals lluminosos són captats pel citòmetre de flux i són traduïts a impulsos elèctrics que arriben a l'ordinador el qual interpreta els resultats (Barrera Ramírez et al., 2004; Shapiro, 2003).

Protocol

Abans d'analitzar les cèl·lules cal preparar-les adequadament. A més, cal observar-les al microscopi invertit per a determinar quin és el seu estat (viabilitat, confluència, entre altres característiques).

1. Per a una placa de 24 pous, descartar el medi DMEM complet amb una agulla estèril connectada a una bomba d'aspiració.
2. Realitzar un rentat amb 500 µL de DPBS estèril per pou.
3. Amb la mateixa agulla es descartar el DPBS.
4. Afegir 200 µL de tripsina per pou i incubar les mostres 5 minuts a 37°C a l'incubador.
5. Passats els 5 minuts, observar de nou les cèl·lules al microscopi invertit. En observar que les cèl·lules ja no es troben adherides al fons del pou i que presenten una morfologia arrodonida, aturar la reacció amb 800 µL de medi complet per pou.
6. Traslladar les suspensions cel·lulars a eppendorfs marcats correctament.
7. Centrifugar els eppendorfs a 2600 rpm a 4°C durant 8 minuts.
8. Resuspendre el pellet, primer en sec i a continuació afegir 300 µL de DPBS amb 1% FBS per eppendorf.
9. Traslladar la mostra a tubs de 5 mL de poliestirè especials pel citòmetre de flux (Falcon[®], A Corning Brand) i mantenir-les en gel fins al moment de ser analitzades.
10. Llegir els resultats amb el citòmetre de flux (BD FACScaliburTM, BD biosciences).

3.5. MICROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA

Objectiu

Amb l'objectiu de complementar els resultats observats mitjançant citometria de flux, s'utilitza la tècnica de microscòpia de fluorescència per a determinar visualment si s'han aconseguit transfectar les cèl·lules utilitzant els diversos vectors. La detecció es realitzarà en observar l'expressió de la proteïna GFP que es troba clonada en tots els vectors utilitzats.

Fonament

Aquesta tècnica es basa en la utilització d'un microscopi òptic (Axio Scope A1, Zeiss) amb una font làser que permet irradiar les cèl·lules a una longitud d'ona 450 nm excitant la proteïna GFP la qual emetrà fluorescència verda. D'aquesta manera, en observar punts amb fluorescència verda es té la certesa que s'ha aconseguit transfectar el cultiu cel·lular. Cal tenir clar que aquest mètode no és quantitatiu ni semi-quantitatiu sinó que, únicament aporta informació sobre si ha estat possible, o no, transfectar les línies cel·lulars amb un vector en concret.

3.6. WESTERN BLOT

Objectiu

L'objectiu d'aquesta tècnica és determinar canvis en l'expressió de certes proteïnes. En aquest projecte, la tècnica s'utilitza per a detectar canvis en l'expressió dels enzims ST3Gal III i ST3Gal IV un cop s'ha realitzat el seu silenciament.

Fonament

Aquesta tècnica es basa en la detecció i semi-quantificació de l'expressió de certes proteïnes, a partir de lisats cel·lulars, utilitzant anticossos específics. En concret, un cop realitzada una SDS-PAGE (electroforesis de proteïnes) i una transferència a membranes de PVDF (polímer de polivinildenedifloride), s'incuben les membranes amb anticossos primaris contra les proteïnes d'interès. Aquests anticossos primaris són reconeguts per anticossos secundaris. Aquests darrers, es troben conjugats amb peroxidasa de rave (HRP), en el nostre cas, que oxidarà el seu substrat provocant una reacció quimioluminescent en utilitzar els reactius de revelatge (Immobilon™ Western, Chemiluminescent HRP Substrate; MILLIPORE) permetent-nos determinar la presència de proteïna a la mostra.

Protocol

1. Realitzar lisats a partir de la línia d'interès amb *Laemli* tampó de lisi (1x), en aquest cas amb *BxPC-3*.
 - i. Aspirar el medi de la placa (en aquest cas de 6 pouets).
 - ii. Rentar les cèl·lules amb 500 μ L de DPBS fred per pou.
 - iii. Aspirar el DPBS.
 - iv. Utilitzar 300 μ L tampó lisi per pou i amb l'ajuda d'un *cell scraper* rascar la placa fins a obtenir una mostra amb aspecte gelatinós. Aquesta característica indica que s'ha realitzat el lisat.
 - v. Transferir la mostra a un eppendorf.
2. Agitar els eppendorf durant 10 minuts a temperatura ambient.
3. Bullir les mostres durant 5 minuts a 95 °C.
4. Centrifugar les mostres durant 5 minuts a 5000 rpm.
5. Preparar dos gels de poliacrilamida (al 10%). Deixar polimeritzar.
6. El dia següent, carregar les mostres de lisat al gel i 2.5 μ L de marcador molecular. En cas de no utilitzar-se el mateix dia, les mostres es poden congelar a -20 °C.
7. Realitzar la SDS-PAGE fent córrer els gels a 100V durant dues hores en tampó elució 1x.
8. Preparar tampó de transferència Carbonat-Bicarbonat (C-B) (per 800 mL: 1mL Na₂CO₃ 0.2M, 40 mL NaHCO₃ 0.2 M i 160 mL metanol) i deixar-lo a -20 °C fins a utilitzar-lo.
9. Abans de realitzar la transferència cal preparar les membranes i els gels:
 - Membrana (tots els passos s'han de donar en agitació):
 - i. Exposar-la 20-30 segons en metanol.
 - ii. Posar-la 2 minuts en aigua miliQ.
 - iii. Mantenir les membranes en tampó de transferència fins al moment de la transferència.
 - Gels (en agitació): situar els gels 10-15 minuts en tampó de transferència.
10. Montar la transferència. Assegurar-se de situar una mosca i un bloc de gel a la cubeta.
11. Realitzar la transferència en tampó C-B durant dues hores a 100 V a 4°C.
12. Desmotar la transferència.
13. Realitzar un rentat de 5 minuts amb tampó TBST (per 1L: 10 mL TRIS pH 6.8 1M, 20 mL NaCl 5M, 970 mL aigua miliQ i 0.1% TWEEN®-20 [P1379, Sigma-Aldrich®]).

14. Bloquejar les membranes durant dues hores a temperatura ambient amb TBST amb 5% BSA / 3% llet.
15. Realitzar un rentat de 5 minuts en tampó TBST.
16. Incubar *over night* (O/N) a 4 °C amb 1/8,000 anticòs primari (Abcam 177959; *Rabbit IgG*) en TBST 0.5 % BSA / llet.
17. Realitzar tres rentats de 5 minuts en tampó TBST.
18. Incubar una hora a temperatura ambient amb 1/50,000 i 1/100,000 d'anticòs secundari GaR-Po (Pierce 31460; *Goat anti Rabbit IgG+IgM*).
19. Realitzar cinc rentats de 5 minuts en tampó TBST.
20. Revelar les membranes addicionant 750 μ L de cada reactiu (Immobilon™ Western, Chemiluminescent HRP Substrate; MILLIPORE) deixant incubar les membranes tapades durant 5 minuts.
21. Prendre les imatges (FluorChem™ SP, Alpha Innotech).
22. Rentar les membranes amb aigua destil·lada.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. TEST MICOPLASMA

Abans de començar a treballar amb cèl·lules és molt important assegurar-nos que aquestes es troben lliures de contaminació de micoplasma. Es van analitzar les 5 línies cel·lulars que s'estaven utilitzant en aquell moment al laboratori juntament amb un control negatiu i un control positiu ja inclòs al kit (*Venor® GeM OneStep*; Minerva biolabs® 2009) (**Figura 8**).

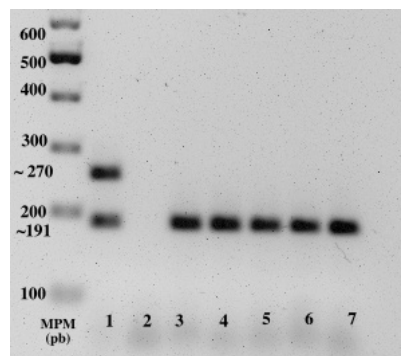


Figura 8. Gel agarosa 1.5 % amb les mostres carregades en el següent ordre: 1. Control positiu del kit; 2. PC3; 3. *Capan-1*; 4. *BxPC-3*; 5. *BxPC-3* Sh5; 6. *BxPC-3* Sh10 i 7. Control negatiu.

El gel d'agarosa mostra els resultats un cop realitzada la PCR. El control positiu (carril 1) mostra clarament dues bandes a 191 i 270 pb aproximadament, mostrant la posició del control intern i de la presència de micoplasma respectivament. D'altra banda, el control negatiu (carril 7) mostra únicament la banda corresponent al control intern a aproximadament 191 pb.

Per a PC3 no s'observa cap banda indicant que la PCR ha estat inhibida i s'ha de repetir el test abans de treballar amb aquesta línia cel·lular. Aquesta inhibició podria ser causada per l'acumulació de substàncies inhibidores de la PCR al medi de cultiu. Abans de repetir el test s'hauria de realitzar una extracció de DNA (Minerva biolabs®, 2009).

En observar la mostres de *BxPC-3* (carril 3), *Capan-1* (carril 4), *BxPC-3* Sh5 (carril 5) i *BxPC-3* Sh10 (carril 6), s'observa una sola banda a aproximadament 191 pb indicant que la PCR s'ha realitzat correctament. En no observar-se cap banda a 270 pb, indicant que no s'ha amplificat la seqüència codificant del gen 16s rRNA, es descarta la presència de micoplasma a les mostres.

Un cop ens hem assegurat que les nostres cèl·lules es troben lliures de contaminació podem començar a experimentar amb elles amb la seguretat que els resultats seran vàlids i reproduïbles a altres laboratoris (Young et al., 2010). Si s'haguessin observat bandes a ~270 pb, s'haurien hagut de descartar totes les línies cel·lulars i treballar amb nous cultius tornant-los a analitzar abans d'utilitzar-los (Minerva biolabs®, 2009; ThermoFisher Scientific, 2015; Young et al., 2010).

4.2. PRODUCCIÓ I PURIFICACIÓ DE VECTORS AMB GFP

A partir dels cultius de nit de les cèl·lules d'*E.coli* transformades amb els vectors *pmaxCloning*TM i *pcDNA*TM 3.1, es van realitzar MidiPreps per a aïllar el DNA. A continuació, el DNA aïllat va ser analitzat utilitzant un NanoDrop per a determinar si les mostres s'havien purificat correctament i podien ser utilitzades (**Taula 3**).

Taula 3. Valors per a l'absorbància, la ratio $\frac{260}{280}$, la ratio $\frac{260}{230}$ i ng/ μ L pels diferents vectors aïllats.

Mostra	Absorbància	Ratio $\frac{260}{280}$	Ratio $\frac{260}{230}$	ng/ μ L
<i>pmaxCloning</i> TM Rèplica 1	0.208	2.99	4.62	10.4
<i>pmaxCloning</i> TM Rèplica 2	6.113	1.91	2.28	305.6
<i>pcDNA</i> TM 3.1 Rèplica 1	22.39 \pm 6.41	1.90 \pm 0.01	2.19 \pm 0.02	1119.3 \pm 320.56
<i>pcDNA</i> TM 3.1 Rèplica 2	12.097	1.89	2.07	604.8

S'analitzen 4 paràmetres de qualitat que ens indiquen si el DNA aïllat es pot utilitzar en els experiments de transfecció. Les ratios $\frac{260}{280}$ i $\frac{260}{230}$ ens indiquen la puresa del DNA aïllat.

Els valors acceptats per la ratio $\frac{260}{280}$ van d'1.8 a 2. Valors inferiors a 1.8 indiquen contaminació per part de proteïnes mentre que valors superiors a 2 indiquen contaminació per RNA (Thermo FisherTM Scientific, 2010). D'altra banda, la ratio $\frac{260}{230}$ mostra contaminació deguda a compostos químics com per exemple EDTA, HCl, entre d'altres. Per aquesta ratio s'accepten valors entre 2 i 2.2 (Thermo FisherTM Scientific, 2010).

En analitzar els valors obtinguts es determina que la mostra "*pmaxCloning*TM Rèplica 1" no és útil per a la realització dels experiments ja que mostra contaminació tant per RNA com per compostos químics, mostrant que el vector no s'ha aïllat correctament. La resta de mostres de DNA mostren valors dins dels paràmetres correctes indicant que els vectors aïllats es poden utilitzar en els següents experiments de transfecció.

4.3. TRANSFECCIÓ

Per a silenciar els enzims ST3Gal III i ST3Gal IV, necessitem que les nostres cèl·lules disposin del sistema CRISPR-Cas9. És per aquest motiu que es va provar de transfectar les cèl·lules utilitzant vectors de diverses mides: *pmaxVector*TM (3.4 kb), *pcDNA*TM 3.1 (5.4 kb) i *pSpCas9(BB)-2a-GFP* (12.1 kb). Per tal d'obtenir el màxim nombre de cèl·lules transfectades es van provar 4 reactius liposomals diferents: *Lipofectamine*TM 3000, *DNA-in@CRISPR*, *LipoD293*TM *DNA In Vitro Transfection Reagent* i *GenJet*TM *In Vitro DNA Transfection Reagent for M-PAC Cells* utilitzant dos protocols diferents. A més, es van realitzar petites modificacions als protocols com per exemple canviar els volums tant de reactiu com de DNA o augmentar el temps d'incubació per a la formació dels liposomes.

4.3.1. Transfecció utilitzant el reactiu *Lipofectamine*[®]3000

El reactiu *Lipofectamine*[®]3000 és un reactiu liposomal utilitzat freqüentment per a transfectar diferents línies cel·lulars (Yamazaki et al., 2000; Xia et al., 2001). És per aquest motiu que es va utilitzar per a transfectar les cèl·lules *BxPC-3* i *Capan-1* provant dos volums de reactiu, 1.5 i 3 μ L, i utilitzant 0.5 μ g dels vectors *pmaxVector*TM i *pcDNA*TM 3.1. Es va provar l'eficiència d'aquest reactiu aplicant tant el protocol estàndard, recomanat per la casa comercial, com el *reverse*.

4.3.1.1. Protocol estàndard

Es va aplicar el protocol estàndard per a tractar cèl·lules *BxPC-3* (**Figura 9**) i *Capan-1* (**Figura 10**) amb l'objectiu d'observar si era possible transfectar un gran nombre de cèl·lules seguint el protocol recomanat per la casa comercial utilitzant els vectors de mida més petita (3.4 i 5.4 kb).

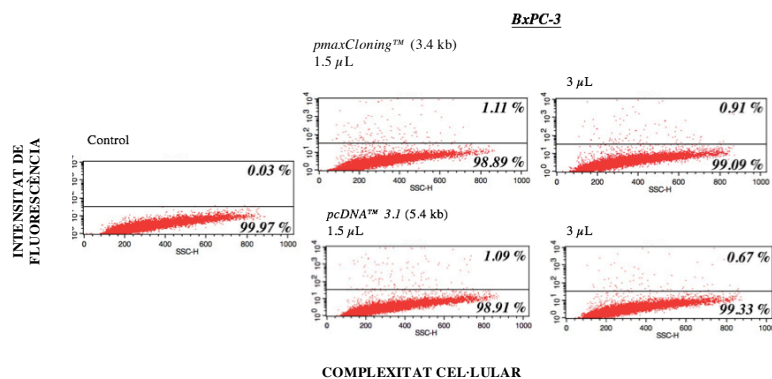


Figura 9. Resultats de transfecció per a *BxPC-3* obtinguts per citometria de flux.

A la **Figura 9** es mostren els gràfics obtinguts en analitzar les cèl·lules de *BxPC-3*. La meitat superior del gràfic mostra el percentatge de cèl·lules amb una intensitat de fluorescència superior a la de les cèl·lules control, el que indica que han estat transfectades i que expressen la proteïna GFP que es troba clonada en els vectors. La meitat inferior dels gràfics mostra la població de cèl·lules no transfectades. La figura mostra que per a aquesta línia cel·lular, aplicant el protocol estàndard, gairebé no s'aconsegueix transfectar les cèl·lules. S'observa un valor màxim de transfecció d'1.11% en utilitzar el vector més petit. A més, semblaria no mostrar-se en el nombre de cèl·lules transfectades en utilitzar majors volums de reactiu.

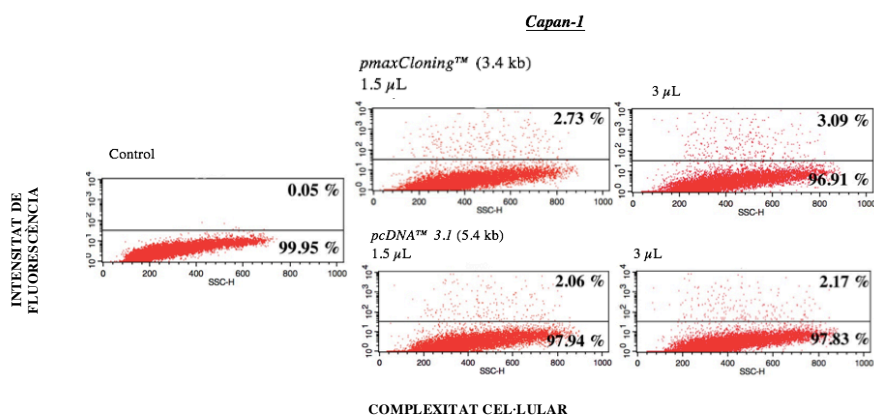


Figura 10. Resultats de transfecció per a *Capan-1* obtinguts per citometria de flux.

A la **Figura 10** es mostren els resultats de transfecció obtinguts per a *Capan-1* en aplicar el protocol estàndard amb el reactiu *Lipofectamine®3000*. En observar els valors de fluorescència es notifica un augment en el percentatge de cèl·lules amb fluorescència (3.09 %) respecte *BxPC-3* (1.11 %) portant a pensar que possiblement aquestes cèl·lules ofereixen menys resistència a l'hora de ser transfectades. Pel que fa als vectors utilitzats, semblaria mostrar-se una major eficiència a l'hora de transfectar les cèl·lules amb el vector més petit (3.4 kb) suportant la hipòtesi que en augmentar la mida del vector s'incrementa la dificultat per a transfectar les cèl·lules. No s'observen diferències destacables en utilitzar dos volums diferents de reactiu.

4.3.1.2. Protocol reverse

Es va aplicar el protocol *reverse* per a transfectar les cèl·lules *BxPC-3* (**Figura 11**) i *Capan-1* (**Figura 12**) amb l'objectiu d'observar si en augmentar la superfície cel·lular en contacte amb el reactiu de transfecció era possible obtenir un major nombre de cèl·lules transfectades.

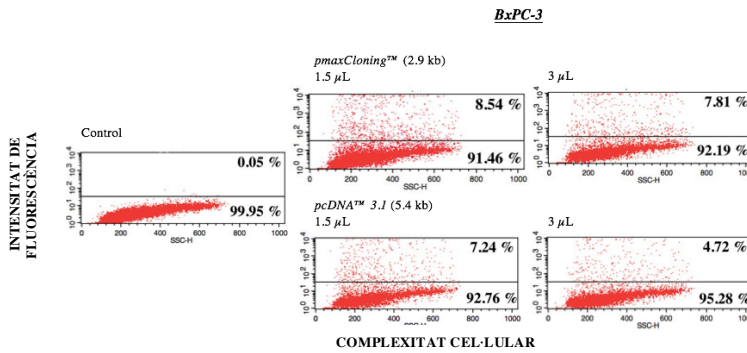


Figura 11. Resultats de transfecció per a *BxPC-3* obtinguts per citometria de flux.

Els resultats obtinguts per citometria per les cèl·lules *BxPC-3* (Figura 11) mostren un augment en el nombre de cèl·lules que presenten fluorescència envers els resultats obtinguts en aplicar el protocol estàndard. En concret, es passa d'un valor màxim de transfecció d'1.11%, aplicant el protocol estàndard, a un 8.54% en aplicar el protocol *reverse* utilitzant el vector *pmaxCloningTM* (1.5 μ L). Semblaria doncs, que per a transfectar aquestes cèl·lules la millor estratègia és aplicar el protocol *reverse*. En aquest cas, s'observa un valor d'eficiència de transfecció similar en utilitzar els dos vectors. De nou, no s'observen diferències en el nombre de cèl·lules transfectades en augmentar el volum de reactiu, sinó que més aviat s'observa una disminució en l'eficiència de transfecció. Un resultat positiu és que, tot i aconseguir poques cèl·lules transfectades, aquestes presenten un valor de fluorescència molt elevat.

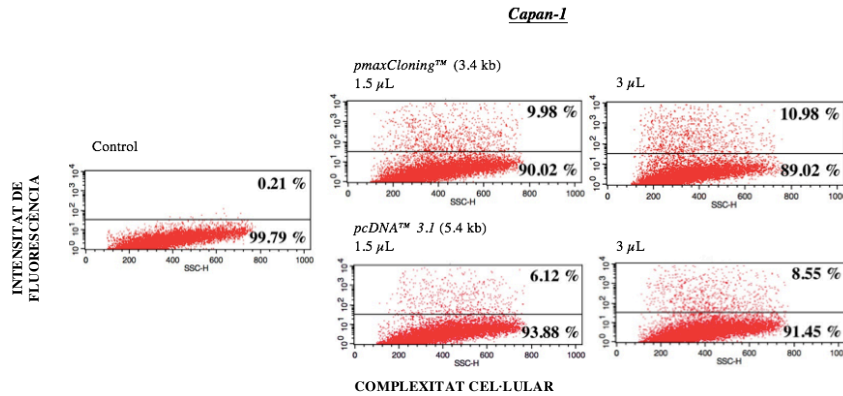


Figura 12. Resultats de transfecció per a *Capan-1* obtinguts per citometria de flux.

La Figura 12 mostra els resultats obtinguts per a les cèl·lules *Capan-1*. En aquest cas, s'observa un valor de fluorescència a les cèl·lules control més elevat del normal (0.21 %) portant a pensar que possiblement la resta de resultats observats no són causats únicament per l'expressió de la GFP sinó també per l'autofluorescència de les cèl·lules analitzades.

En aplicar el protocol *reverse* per a *Capan-1*, s'observen els valors d'eficiència de transfecció més elevats obtinguts fins al moment (10.98 %). Aquest resultat semblaria indicar que la millor estratègia per a transfectar les cèl·lules *Capan-1* és aplicant el protocol *reverse*. De nou, els valors més elevats d'eficiència de transfecció es mostren utilitzant el vector més petit (3.4 kb) arribant a obtenir un 10.98 % de cèl·lules expressant la proteïna GFP. No s'han observat diferències en augmentar el volum de reactiu de transfecció.

Es va utilitzar el microscopi de fluorescència amb l'objectiu de determinar si era possible observar l'expressió de la proteïna GFP degut a la internalització dels vectors *pmaxCloningTM* i *pcDNATM 3.1* aplicant el protocol *reverse* (Figura 13). En concret, les imatges es van prendre a 100x en utilitzar 3 μ L de *Lipofectamine[®] 3000*. Aquestes imatges mostren molt poques cèl·lules expressant fluorescència confirmant de nou, la baixa eficiència de transfecció observada

en utilitzar aquest reactiu. Un resultat destacable però, és que les cèl·lules que expressaven GFP ho feien molt intensament mostrant que realment havien estat transfectades i no es tractava d'autofluorescència de les cèl·lules.

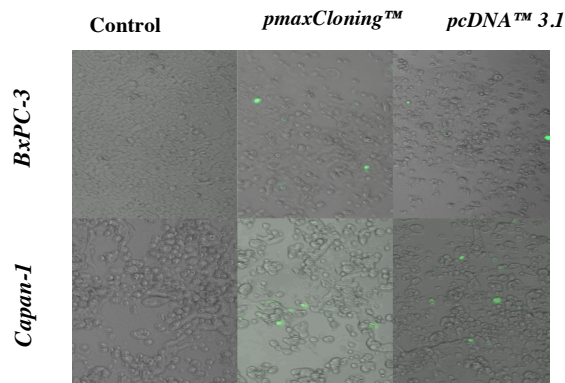


Figura 13. Imatges de microscòpia de fluorescència (100X) obtingudes en utilitzar el reactiu *Lipofectamine*[®] 3000 aplicant el protocol *reverse*.

4.3.2. Optimització del protocol de transfecció utilitzant diversos reactius liposomals

En transfectar les cèl·lules amb els dos vectors més petits, utilitzant el reactiu de transfecció *Lipofectamine*[®]3000, s'ha observat un percentatge molt reduït de cèl·lules transfectades. Degut a aquest resultat, es va decidir provar l'eficiència d'altres reactius liposomals amb l'objectiu d'optimitzar el protocol de transfecció. Per a l'optimització del protocol s'ha utilitzat únicament el vector de 5.4 kb (*pcDNA*[™] 3.1) ja que presenta una mida similar al vector que porta clonada la seqüència de sgRNA (*pGS_gRNA_Neo*, GenScript). S'utilitzarà aquest protocol i aquesta tècnica en el cas que no sigui possible transfectar les cèl·lules amb el vector més gran equivalent al vector que porta clonades les seqüències de Cas9 i el sgRNA. En posar-nos en contacte amb la casa comercial, ens van recomanar tres reactius liposomals assegurant que eren molt eficients per a transfectar cèl·lules utilitzant grans vectors. Els reactius recomanats van ser: *DNA-in*[®]*CRISPR*, *LipoD293*[™] *DNA In Vitro Transfection Reagent* i *GenJet*[™] *In Vitro DNA Transfection Reagent for M-PAC Cells*. Aquests es van provar utilitzant els protocols estàndard i *reverse* sobre les dues línies cel·lulars. A la **Taula 4** es recullen els valors de transfecció obtinguts en utilitzar els 4 reactius liposomals disponibles amb el vector de 5.4 kb. Aquests resultats s'han obtingut mitjançant la tècnica de citometria de flux.

Pel reactiu *Lipofectamine*[®]3000, aplicant el protocol *reverse*, es va provar d'augmentar el volum de DNA (1µg) obtenint resultats d'eficiència de transfecció molt similars (6.89% per *BxPC-3* i 9.51% per a *Capan-1*) als obtinguts en utilitzar 0.5 µd de DNA (5.36% per a *BxPC-3* i 7.89% per a *Capan-1*). Pel mateix reactiu i aplicant el mateix protocol, es va voler provar si en augmentar el temps d'incubació per a la formació dels liposomes, passant de 15 minuts a 30 minuts, era possible augmentar el nombre de cèl·lules transfectades. Es va obtenir un valor lleugerament més elevat només per a les cèl·lules *Capan-1* (10.47%).

Un paràmetre important a determinar és quan observar la fluorescència cel·lular. És a dir, normalment es determinava l'eficiència de transfecció passades 24 hores posttransfecció però es va voler provar si en incubar les cèl·lules durant 48 hores era possible augmentar el nombre de cèl·lules transfectades. S'hipotitzava que, en augmentar el temps d'incubació més cèl·lules serien capaces d'expressar la proteïna GFP. En canvi, no es van observar més cèl·lules expressant fluorescència indicant que, tot i allargar l'exposició al tractament no és possible augmentar l'eficiència de transfecció (2.84% per a *BxPC-3* i 7.46% per a *Capan-1*).

En utilitzar el reactiu *DNA-in*[®]*CRISPR* s'observen valors de transfecció bastant elevats sobretot per a *Capan-1* (valor màxim 14.32%). Per a *BxPC-3* es mostra una clara diferència en aplicar el protocol estàndard (valor màxim 0.14%) o

el reverse (valor màxim 8.13%) mentre que per a *Capan-1* s'obtenen valors bastant similars en aplicar els dos protocols (~14.3%).

Pel que fa als reactius *LipoD293™* i *GenJet™* s'esperava observar un augment molt important en el nombre de cèl·lules transfectades. En canvi, en utilitzar-los es van obtenir valors d'eficiència de transfecció menors als observats en utilitzar els altres reactius tant aplicant el protocol normal com el reverse.

Taula 4. La taula mostra l'eficiència de transfecció per a cada línia cel·lular utilitzant diverses condicions. S'indica el reactiu utilitzat, el volum de reactiu i el volum de DNA utilitzats. En vermell s'indiquen els valors més elevats d'eficiència de transfecció (%) per cada línia cel·lular.

Reactiu utilitzat i protocol	$\mu\text{g DNA}$	$\mu\text{L reactiu}$	Eficiència de transfecció (%)	
			<i>BxPC-3</i>	<i>Capan-1</i>
<i>Lipofectamine®3000</i> protocol estàndard	CTL	CTL	0.03	0.05
	0.5	1.5	1.09	2.73
	0.5	3	0.67	3.09
<i>Lipofectamine®3000</i> protocol reverse	CTL	CTL	0.05	0.21
	0.5	1.5	8.175 ± 1.32	8.31 ± 3.10
	0.5	3	5.355 ± 0.90	7.89 ± 0.93
1	3	6.89	9.51	
<i>Lipofectamine®3000</i> Protocol reverse 30 minuts	0.5	3	6.22	10.47
<i>Lipofectamine®3000</i> Protocol reverse 48 h	0.5	3	2.84	7.46
<i>DNA-in®CRISPR</i> Protocol estàndard	CTL	CTL	0.02	0.15
	0.5	1	-	9.25
	0.5	1.5	-	10.8
	0.5	2	0.4	14.31
	0.5	3	0.14	14.32 ± 0.007
<i>DNA-in®CRISPR</i> Protocol reverse	CTL	CTL	0.02	0.15
	0.5	2	8.13 ± 2.38	11.685 ± 1.59
	0.5	3	4.1	11.26
	1	3	7.49	-
<i>LipoD293™</i> Protocol estàndard	CTL	CTL	0.6	0.06
	0.5	1.5	2.49	4.26
<i>LipoD293™</i> Protocol reverse	CTL	CTL	0.06	0.06
	1	4	4.26	9.43
<i>GenJet™</i> Protocol estàndard	CTL	CTL	0.6	0.06
	0.5	1.5	1.56 ± 0.34	4.67
<i>GenJet™</i> Protocol reverse	CTL	CTL	0.6	0.06
	0.5	1.5	5.45	5.15

En vermell s'indiquen les condicions que han permès obtenir els majors valors de transfecció per les dues línies cel·lulars utilitzades. Per a *BxPC-3* s'obté un valor d'eficiència de transfecció màxima al voltant del 8% tant en utilitzar 1.5 μL de *Lipofectamine®3000* com 2 μL de *DNA-in®CRISPR* amb 0.5 μg de DNA aplicant el protocol reverse. Per a *Capan-1*, s'observa un valor d'eficiència de transfecció al voltant del 14% en utilitzar tant 2 com 3 μL de *DNA-in®CRISPR* aplicant el protocol estàndard. A la **Figura 14** es mostren els gràfics obtinguts mitjançant citometria de flux en utilitzar les millors condicions per a cada línia cel·lular.

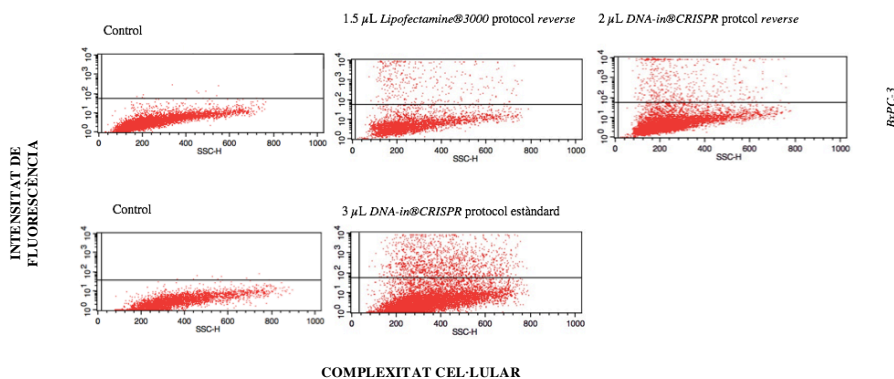


Figura 14. Millors condicions de transfecció per a les cèl·lules *BxPC-3* i *Capan-1*. Resultats obtinguts mitjançant citometria de flux.

Els gràfics mostren que les cèl·lules de *BxPC-3* que han estat transfectades presenten valors de fluorescència molt elevats sobretot en utilitzar 2 μL de *DNA-in®CRISPR*. Pel que fa a *Capan-1* s'observen una gran quantitat de cèl·lules

transfectades però en aquest cas no semblaria observar-se una intensitat de fluorescència tant elevada com per a *BxPC-3* (296.95 per a *BxPC-3* i 130.5 per a *Capan-1*).

A l'hora de determinar quines són les millors condicions de transfecció per a cada línia cel·lular és important obtenir un nombre elevat de cèl·lules transfectades però també que el reactiu utilitzat no presenti una toxicitat gaire elevada. En escollir reactius amb valors de toxicitat elevats es perdrien moltes cèl·lules dificultant l'anàlisi. A la **Taula 5** es recullen els valors de mortalitat observats utilitzant tots els reactius i els dos protocols.

Taula 5. Es mostra el percentatge de mortalitat segons el reactiu i el protocol utilitzats per a cada línia cel·lular.

Reactiu	Mortalitat (%)			
	Protocol normal		Protocol reverse	
	<i>BxPC-3</i>	<i>Capan-1</i>	<i>BxPC-3</i>	<i>Capan-1</i>
Control	<10	<10	< 10	< 10
<i>Lipofectamine</i> [®] 3000	< 10	< 10	30	20
<i>DNA-in</i> [®] CRISPR	< 20	< 20	30	20
<i>LipoD293</i> TM	50	50	60	40
<i>GenJet</i> TM	40	20	40	30

Els valors de mortalitat semblen indicar que les cèl·lules *Capan-1* són menys sensibles als tractaments que *BxPC-3* arribant aquestes últimes a mostrar valors de mortalitat de fins al 60%. Semblaria que aplicant el protocol *reverse* les cèl·lules moren més, sobretot *BxPC-3*. També es va poder observar que, aparentment els reactius més agressius són *LipoD293*TM seguit de *GenJet*TM (**Figura 15**) tot i que des de la casa comercial ens van indicar que el reactiu *LipoD293*TM presentava valors de mortalitat molt baixos.

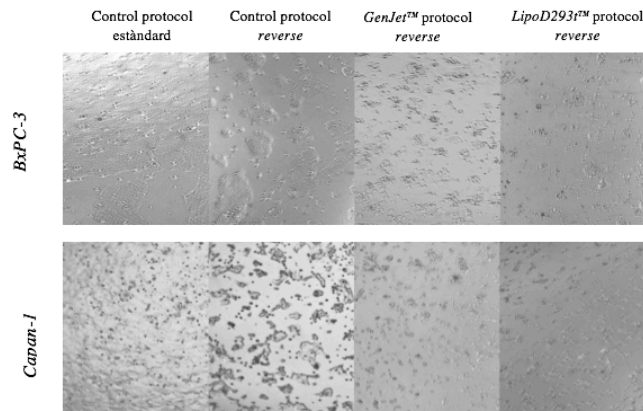


Figura 15. Imatges obtingudes mitjançant el microscopi invertit. Imatges a 40x.

Un cop estudiats els valors de mortalitat obtinguts, s'han pogut determinar les millors condicions de transfecció per a cada línia cel·lular utilitzant el vector de 5.4 kb. En el cas de *BxPC-3* es determina que la millor estratègia de transfecció és utilitzar 1.5 μ L de *Lipofectamine*[®] 3000 aplicant el protocol *reverse* observant un valor d'eficiència de transfecció de 8.17 ± 1.32 %. A més, en utilitzar aquesta estratègia s'observa el major d'intensitat mitjana de fluorescència igual a 918.93.

Pel que fa a *Capan-1*, es determina que les millors condicions per a realitzar la transfecció són utilitzar 2 μ L de *DNA-in*[®] CRISPR aplicant el protocol normal observant una eficiència del 14.31 % i valors de mortalitat inferiors al 20 %. Utilitzant aquesta estratègia es detecta una intensitat mitjana de fluorescència igual a 792.59, que tot i no ser la més elevada es considera correcta.

4.3.3. Transfecció utilitzant el vector *pSpCas9(BB)-2a-GFP* (12.1 kb)

Un cop optimitzat el protocol per a transfectar les cèl·lules utilitzant el vector de 5.4 kb, es va provar de transfectar les cèl·lules utilitzant el vector *pSpCas9(BB)-2a-GFP* de 12.1 kb. Aquest vector presenta una mida similar a la que presentaria el vector amb les seqüències per a Cas9 i el sgRNA clonades, i que s'utilitzaria per a editar el genoma de les nostres cèl·lules. En concret, es volia testar l'eficiència de transfecció en utilitzar *Lipofectamine*[®]3000 i *DNA-in*[®]CRISPR aplicant els protocols normal i *reverse* ja que van ser els reactius i els protocols que van mostrar majors valors d'eficiència de transfecció.

4.3.3.1. *DNA-in*[®]CRISPR

A la fitxa tècnica d'aquest reactiu s'especifica que és recomanat per a transfectar cèl·lules utilitzant vectors de més de 8 kb. És per aquest motiu que es va determinar utilitzar-lo, aplicant tant el protocol estàndard com el *reverse*, esperant aconseguir transfectar les nostres cèl·lules amb el vector de 12.1 kb. Aquest reactiu, tot i haver-se decidit com a òptim per a transfectar *Capan-1*, s'ha provat sobre les dues línies cel·lulars (**Figura 16**).

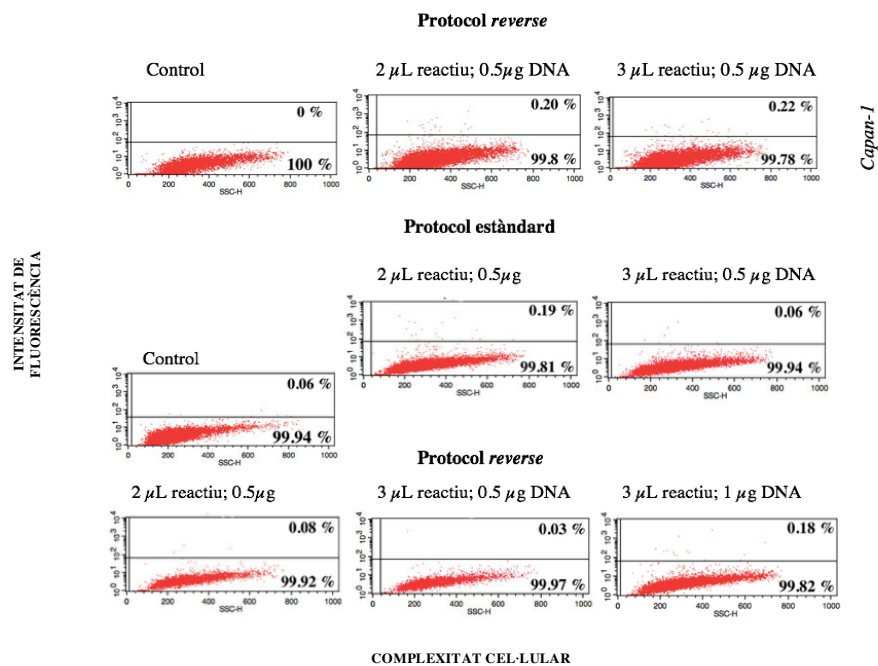


Figura 16. Resultats de transfecció utilitzant el reactiu *DNA-in*[®]CRISPR: per a *Capan-1* aplicant el protocols *reverse* i *BxPC-3* aplicant els protocols estàndard i *reverse*.

En estudiar els resultats de transfecció en utilitzar el reactiu *DNA-in*[®]CRISPR s'observa que, tot i indicar-se el seu ús per a transfectar cèl·lules utilitzant vectors grans, no és possible transfectar ni un 1% de les cèl·lules *BxPC-3* ni *Capan-1* utilitzant el en vector de 12.1 kb. Així doncs, considerem que en utilitzar aquest reactiu no és possible transfectar les cèl·lules amb el vector *pSpCas9(BB)-2a-GFP*.

4.3.3.2. *Lipofectamine*[®]3000

A continuació, es va decidir provar l'eficiència del reactiu *Lipofectamine*[®]3000 amb l'objectiu de determinar si en utilitzar aquest producte era possible aconseguir cèl·lules transfectades amb el vector *pSpCas9(BB)-2a-GFP*. En aquest cas, es va aplicar el protocol *reverse* amb 0.5 i 1 μg de DNA variant el temps d'incubació a l'hora de formar-se els liposomes utilitzant sempre 1.5 μL de reactiu (**Figura 17**).

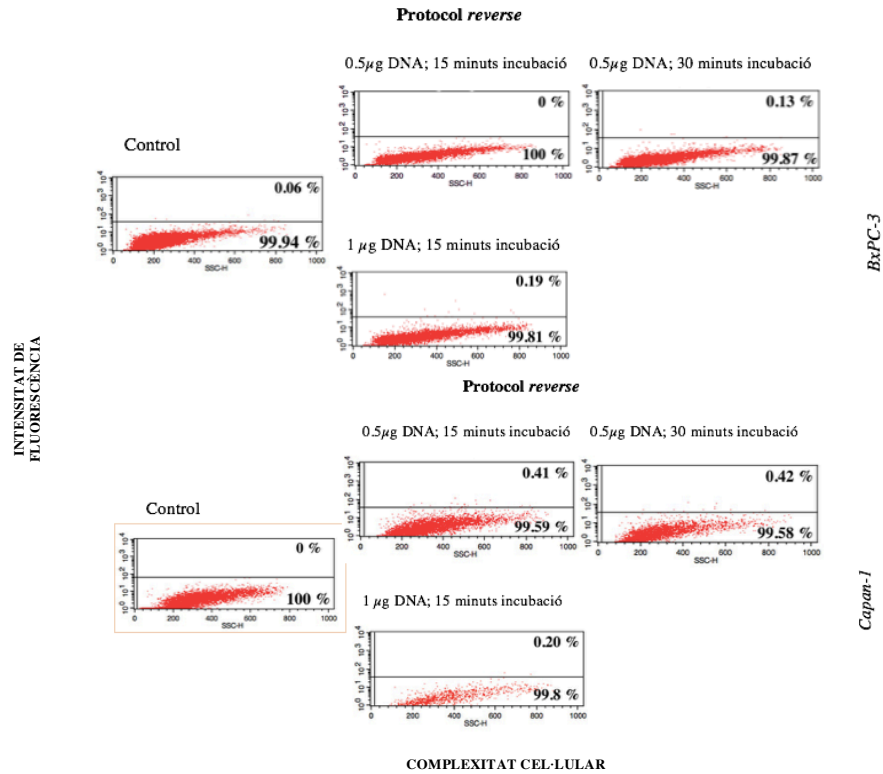


Figura 17. Resultats de transfecció utilitzant el reactiu *Lipofectamine*[®]3000 per a *Capan-1* i *BxPC-3* aplicant el protocol *reverse*.

Pel que fa al reactiu *Lipofectamine*[®]3000, s’observen uns resultats similars als observats en tractar les cèl·lules amb *DNA-in*[®]*CRISPR* aplicant el protocol *reverse* obtenint poques cèl·lules de *BxPC-3* transfectades (valor màxim 0.19 utilitzant els dos reactius). En canvi, per a *Capan-1*, tot i no arribar a l’1% d’eficiència de transfecció, sí que es mostra un increment en el nombre de cèl·lules transfectades (valor màxim 0.42 %) en tractar-les amb 1µg de DNA i 1.5 µL de *Lipofectamine*[®]3000.

De nou, es van observar les cèl·lules mitjançant microscòpia de fluorescència per a determinar si havíem estat capaços de transfectar-les. Els resultats de microscòpia van corroborar els valors de citometria de flux, ja que no es van observar cèl·lules transfectades que expressessin la GFP.

4.4. WESTERN BLOT

Una vegada silenciats els gens ST3Gal III i ST3Gal IV mitjançant edició genòmica, és molt important determinar el nivell d’expressió dels enzims a nivell proteic, per determinar si ha estat possible silenciar-los. Aquesta comprovació es fa mitjançant la tècnica Western Blot. Per a observar correctament l’expressió d’aquests enzims és molt important determinar les millors condicions per a la realització d’aquesta anàlisi. Els paràmetres a optimitzar són: escollir el millor tampó de bloqueig, determinar la quantitat de mostra a carregar al gel, la millor dilució d’anticòs i determinar si l’anticòs secundari utilitzat presenta inespecificitats. En aquest treball ens hem centrat en l’optimització del Western Blot per a la determinació del nivell d’expressió de l’enzim ST3Gal III.

A la **Figura 18** es mostren tres membranes mitjançant les quals s’han testat quatre condicions: concentració d’anticòs secundari (1/100,000 o 1/50,000), especificitat de l’anticòs secundari, dues solucions de bloqueig (TBST amb 5% BSA [*Bovine Serum Albumin*] o TBST amb 3% llet) i volum de mostra carregada. L’enzim ST3Gal III presenta un pes molecular d’aproximadament 42 kDa (codi Q11203; UniProtKB, 2017). Així doncs, s’espera observar una banda molt propera a la banda equivalent a 43 kDa. Cada imatge (A, B o C) correspon a una membrana sencera: la mitja

membrana esquerra mostra els resultats en incubar amb anticòs primari i secundari mentre que la mitja membrana dreta mostra els resultats en incubar únicament amb anticòs secundari.

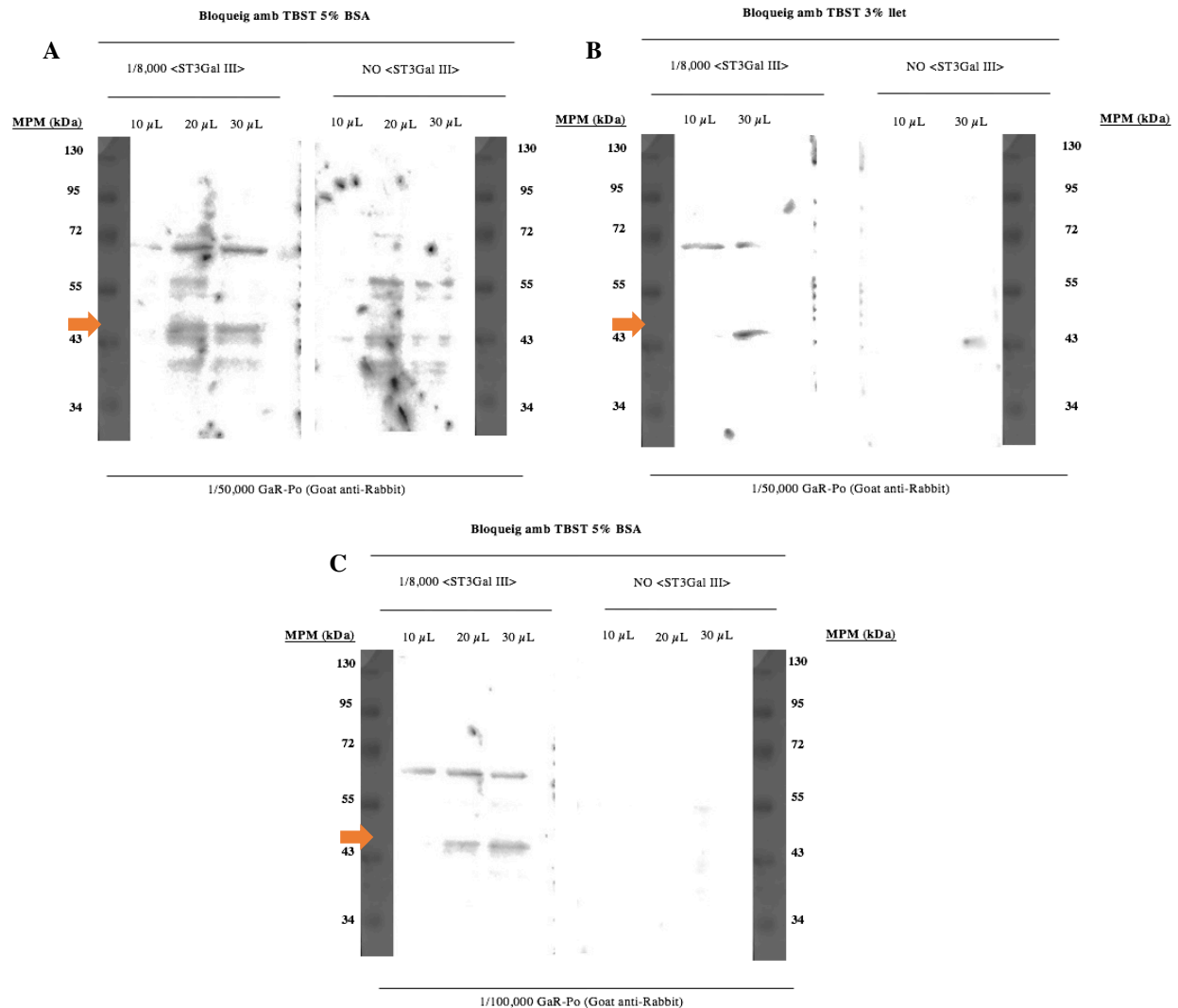


Figura 18. Resultats obtinguts mitjançant la tècnica WB detectant l'expressió de l'enzim ST3Gal III. **A)** Membranes bloquejades amb 5% BSA; dilució 1/8,000 anticòs anti-ST3Gal III i dilució 1/50,000 GaR-Po. **B)** Membranes bloquejades amb 3% llet; dilució 1/8,000 anticòs anti-ST3Gal III i dilució 1/50,000 GaR-Po. **C)** Membranes bloquejades amb 5% BSA; dilució 1/8,000 i dilució 1/100,000 GaR-Po. Les fletxes indiquen les bandes d'interès.

Concentració anticòs secundari *Goat anti-Rabbit*

Les membranes A i C han estat bloquejades amb la mateixa solució de bloqueig, TBST amb 5% BSA, però s'han incubat amb dues concentracions diferents d'anticòs secundari GaR-Po (*Goat anti-Rabbit*). En comparar les dues membranes es mostra clarament que en treballar amb dilucions més petites d'anticòs secundari (membrana A) s'obtenen resultats molt inespecífics mostrant una membrana molt saturada on no es poden diferenciar clarament bandes a 43 kDa (pes equivalent al pes de l'enzim ST3Gal III). En canvi, en observar la membrana C es mostren bandes únicament a aproximadament 72 kDa (no determinada) i una banda a aproximadament 43 kDa corresponent a la presència de la proteïna ST3Gal III. Així doncs, semblaria que en treballar amb l'anticòs secundari més diluït és possible obtenir millors resultats mostrant una membrana amb menys bandes inespecífiques.

Especificitat anticòs secundari *Goat anti-Rabbit*

A l'hora de determinar si el nostre anticòs secundari és l'adequat per a detectar l'anticòs primari anti-ST3Gal III, s'ha incubat una meitat de la membrana únicament amb anticòs secundari. Així doncs, si el nostre anticòs secundari és

l'adequat únicament reconeixerà l'anticòs primari a la meitat esquerra de la membrana mentre que a la meitat dreta no s'hauria d'observar cap banda. A la membrana A s'observen bandes a les dues meitats, essent incubades amb anticòs primari o no respectivament. Aquest resultat ens indicaria que l'anticòs secundari utilitzat no és l'adequat ja que és capaç de reconèixer antígens inespecífics en una membrana on no hauria de reconèixer cap epítotop. En canvi, a la membrana B en utilitzar la mateixa dilució d'anticòs no s'observen els mateixos resultats d'inespecificitat indicant que possiblement la solució utilitzada per a bloquejar les membranes ha pogut influir en aquests resultats. Per últim, en utilitzar majors dilucions d'anticòs secundari (1/100,000), mostrades a la membrana C, no es mostren resultats d'inespecificitat.

Solució de bloqueig

Les membranes A i B han estat bloquejades respectivament amb TBST 5% BSA i TBST 3% llet. S'observa una clara diferència entre elles pel que fa al soroll de fons. En discutir la concentració de l'anticòs secundari més adequada ens plantejàvem si el soroll de fons observat a la membrana A podia ser degut a la solució de bloqueig utilitzada. Així doncs, en estudiar aquestes dues membranes semblaria indicar-se que en utilitzar una dilució 1/50,000 de GaR-Po la millor opció és utilitzar la solució de tampó amb llet.

Volum de càrrega

Als gels A i C es van carregar 10, 20 i 30 μL de mostra, mentre que al gel B es van carregar únicament 10 i 30 μL de mostra. En observar les membranes es determina que carregant 10 μL de mostra no és possible detectar la nostra proteïna d'interès. És a partir de 20 μL en què es comença a observar banda detectant l'expressió de l'enzim ST3Gal III. Cal tenir en compte però que aquestes conclusions són vàlides en sembrar 600,000 cèl·lules per pou el dia abans del lisat i per a la línia *BxPC-3*. En canviar la quantitat de cèl·lules lisades i el volum de tampó de lisi utilitzat el volum de mostra necessari per a observar la banda a aproximadament 43 kDa pot variar.

5. DISCUSSIÓ GENERAL

Gràcies a la confirmació, mitjançant un test de micoplasma, que les nostres línies cel·lulars es troben lliures de contaminació es van poder realitzar tots els experiments amb elles sense necessitat de comprar o descongelar noves alíquotes cel·lulars.

A continuació, era molt important disposar d'un volum adequat dels diversos vectors per a poder realitzar totes les proves de transfecció. A més però, calia que el DNA amplificat es trobés en les concentracions indicades per les cases comercials (0.5-5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) i que es trobés correctament purificat. Només en una de les mostres es va observar una purificació poc eficient (*pMaxCloningTM* Rèplica 1) havent-la de descartar. La resta de mostres purificades van poder-se utilitzar per a realitzar totes les proves de transfecció adequadament.

Pel que fa als experiments de transfecció, s'ha observat que les nostres línies cel·lulars ofereixen moltes dificultats a l'hora de ser transfectades tal com altres autors ja han descrit en els seus treballs (Chen et al., 1998; Luo et al., 2009; Wang et al., 2002). Alguns autors mostren en els seus treballs que en utilitzar el vector *pcDNATM 3.1* (5.4 kb) per a transfectar *Capan-1*, utilitzant el reactiu *LipofectamineTM*, eren capaços d'observar un 10% de fluorescència (Xia et al., 2001). Aquest valor és molt superior als observats durant aquest treball aplicant el protocol normal (~2%) però bastant similars als observats en utilitzar el protocol *reverse* (10.50%). Una diferència interessant és la ratio DNA:reactiu utilitzada per a aquests autors essent 1:5, un volum de reactiu superior a l'indicat per la casa comercial (1:3). En consultar els treballs d'altres autors que transfecten les mateixes línies cel·lulars que nosaltres, observem que utilitzen unes ratios DNA:reactiu molt superiors als indicats per les diverses cases comercials (com per exemple 1:5 o 1:7) (Song et al. 2011; Xia et al., 2001). Aquesta informació porta a pensar que possiblement en utilitzar majors volums de reactiu es podria obtenir un major nombre de cèl·lules transfectades. Paral·lelament però, s'hauria de realitzar un assaig de supervivència per a observar com reaccionen les cèl·lules en augmentar el volum de reactiu.

S'ha pogut observar que altres autors també han estat capaços de transfectar correctament cèl·lules de la línia cel·lular *BxPC-3* utilitzant vectors de 5.4 kb però no han mostrat amb quins valors d'eficiència de transfecció (Guillemet et al., 2003; Zhu et al., 2012). Els resultats observats, juntament amb la bibliografia consultada, ens indicarien que utilitzant un vector de 5.4 kb seria possible introduir el sgRNA d'interès a l'interior de les nostres cèl·lules.

Pel que fa al vector més gran (12.1 kb), en testar els reactius *Lipofectamine[®]3000* i *DNA-in[®]CRISPR*, es determina que no és possible transfectar les nostres línies cel·lulars utilitzant un sol vector d'aquesta mida ja que no s'arriba a obtenir ni un 0.5% d'eficiència de transfecció. Aquest resultat ens indicaria doncs, que no és possible transfectar les cèl·lules amb un sol vector que contingui tots els elements del sistema CRISPR-Cas9 junts donant-se una expressió transitòria de Cas9 i el sgRNA. Degut a aquests resultats, es creu que la millor estratègia per aconseguir que les nostres cèl·lules disposin de la maquinària necessària per a editar el seu genoma és clonar la seqüència de Cas9 i el sgRNA en diferents vectors fent dos passos de transfecció consecutius. En el cas de l'enzim Cas9 (codi Q99ZW2; UniProtKB, 2017), en tractar-se d'una proteïna bastant gran, caldria utilitzar vectors de mides grans per a transfectar les nostres línies cel·lulars, trobant-nos de nou amb la dificultat de transfectar cèl·lules amb vectors de mides elevades. Per a introduir aquest enzim seria adequat provar altres tècniques de transfecció.

Alguns autors com per exemple Kim & Eberwine (2010), indiquen en els seus treballs que les tècniques químiques de transfecció, com és la utilització dels nostres reactius, són menys eficaces que les tècniques biològiques utilitzant virus per a transfectar les cèl·lules d'interès. Aquesta informació aporta la possibilitat de provar de transfectar les nostres cèl·lules amb tècniques biològiques per a comprovar si realment és possible obtenir majors valors d'eficiència de transfecció. Per exemple, a l'hora d'introduir l'enzim Cas9 podrien utilitzar-se partícules lentivirals. Aquestes partícules derivades de diversos virus, com per exemple VIH-1, permeten introduir grans seqüències de DNA (o cDNA) a l'interior de les cèl·lules d'interès (Kafri et al., 2000; Philippe et al., 2006). Aquesta introducció es pot fer de forma no integrativa o integrativa (com per exemple les derivades de VIH-1) que permeten integrar la seqüència de Cas9 al genoma de les cèl·lules hoste (Philippe et al., 2006).

Per últim, s'ha pogut optimitzar el protocol de Western Blot per a detectar l'expressió de l'enzim ST3Gal III. En realitzar aquesta tècnica és molt important bloquejar adequadament la membrana per a disminuir al màxim el soroll de fons observable. Aquest bloqueig moltes vegades es realitza amb BSA o bé amb llet desnatada diluïts en TBST per tal reduir el nombre de zones inespecífiques d'unió dels anticossos (MacPhee, 2010; Mahmood & Yang, 2012). Alguns autors recomanen testar les dues solucions de bloqueig, tal com s'ha realitzat en aquest projecte, per a determinar quina és la més adequada segons el tipus de membrana que s'utilitza i la proteïna que es vol detectar (MacPhee, 2010). En bloquejar amb la solució de llet desnatada, es treballa amb múltiples proteïnes presents en la llet mentre que en bloquejar amb BSA es bloqueja únicament amb una proteïna purificada reduint el nombre de reaccions creuades. Tot i que a la bibliografia no es mostra una clara preferència, en els nostres resultats s'ha pogut observar que quan l'anticòs secundari està poc diluït la millor opció és treballar amb solució de bloqueig amb 3% llet (Kiwamoto et al., 2014; Cui et al., 2016). Pel que fa a la utilització d'anticòs secundari, s'observa que GaR-Po (IgG + IgM) és una bona opció però utilitzant elevades dilucions d'aquest (1/100,000). En observar la membrana amb aquesta dilució i bloquejada amb TBST 5% BSA, s'ha determinat que eren les dues millors condicions ja que a la membrana no s'observava soroll de fons. Per últim, s'ha pogut observar que amb les condicions del listat utilitzades no és possible detectar l'expressió de la proteïna en carregar menys de 20 μ L de mostra indicant que s'han de carregar majors volums de lisat cel·lular.

6. ÈTICA I SOSTENIBILITAT

Degut a la gran incidència que presenta el càncer en la societat actual, no és estrany que es realitzin múltiples projectes que tenen per a objectiu entendre el funcionament i el desenvolupament de les cèl·lules tumorals. En aquest projecte no s'experimenta directament amb animals sinó que es treballa amb cèl·lules d'origen humà adquirides a ATCC® (*American Type Culture Collection*). El gran avantatge de treballar amb cèl·lules d'origen comercial és que a partir d'una petita mostra adquirida, per exemple a partir d'una biòpsia, és possible aconseguir poblacions cel·lulars molt grans permetent realitzar múltiples estudis arreu del món. En tractar-se de cèl·lules tumorals, aquestes presenten taxes de proliferació molt elevades fent possible la contínua disponibilitat de cèl·lules al laboratori. És a dir, gràcies a persones que s'han sotmès a petites intervencions, com són les biòpsies, és possible disposar de biblioteques de cèl·lules ben caracteritzades per a experimentar. D'aquesta manera és possible evitar que noves persones s'hagin de sotmetre a intervencions i també s'evita l'ús de models animals per a aïllar les cèl·lules per a poder-hi experimentar.

Pel que fa al material utilitzat al laboratori de cultius, en estar en contacte amb cèl·lules tumorals i reactius de transfecció, cal que s'elimini correctament mitjançant la incineració per part d'una empresa externa a la universitat. De la mateixa manera, el material que ha estat en contacte amb les cèl·lules d'*E.coli* transfectades és esterilitzat i incinerat. Per últim, per a la realització del Western Blot s'utilitzen compostos com per exemple el β -mercaptoetanol o el metanol els quals han de ser manipulats sota campana d'extracció per a evitar molèsties en treballar al laboratori i per evitar contaminació ambiental. En utilitzar tampons amb aquests productes, aquest són descartats en bidons especials els quals posteriorment són correctament gestionats.

7. CONCLUSIONS

- Two vectors of interest (*pmaxVectorTM* and *pcDNATM 3.1* vectors) have been amplified and then isolate obtaining high amounts of good quality DNA. Therefore, this result allows us to perform the transfection assays, since we got purified DNA in the concentration required in the reagents protocol.
- The transfection protocol with liposomal reagents has been optimized for the 5.4 kb vector expressing GFP. Using the *Lipofectamine[®]3000* and *DNA-in[®]CRISPR* reagents we were able to transfect 8% of the *BxPC-3* cells and 14% of the *Capan-1* cells.
- With liposomal reagents only a low percentage of cells have been transfected with the 12.1 kb vector showing that it is not possible to transfect the sgRNA and the Cas9 nuclease together using a single vector. Due to this result, we decided that the best protocol is to transfect the cells with the 5.4 kb encoding sgRNA. To introduce the Cas9 it will be necessary to test other strategies like employing lentiviral particles.
- We have optimized the Western Blot conditions to properly determine the expression of the ST3Gal III in our cell lines. We have established that the optimal conditions are to use TBST with 5% of BSA as blocking solution and a 1/100,000 dilution of the GaR-Po secondary antibody. In addition, we have established the minimal amount of the sample to detect a specific band corresponding to ST3Gal III expression.

8. REFERÈNCIES

- Addgene. Informació sobre el vector *PSPcas9 (BB)-2a-GFP*. Informació comercial recuperada el 5 de juliol del 2017 de: www.addgene.org/48138/.
- American Cancer Society. *Cancer of pancreas*. Recuperat el 12 de juny de 2017 de: www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pancreas.html.
- Asociación Española Contra el Cáncer (*aecc*) data actualització 21 de juny del 2017. Recuperat el 21 de juny del 2017 de: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdep pancreas/Paginas/Pronóstico.aspx>
- ATCC®. Informació línia cel·lular *BxPC-3 (CRL-1687™)*. Informació recuperada el 10 de maig del 2017 de: www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Tissue/Pancreas/CR L-1687.aspx?geo_country=es.
- ATCC®. Informació línia cel·lular *Capax-1 (HTB-79™)*. Informació recuperada el 10 de maig del 2017 de: www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-79.aspx?geo_country=es.
- Barrera Ramírez, L., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Sainz Espuñes, T. D. R., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42-55.
- Bastidas, O. (2009). Technical note—Neubauer chamber cell counting. Recuperat el 20 abril del 2017. de: www.researchgate.net/publications/PublicPostFileLoader.html?id=53c6a939d4c11856478b45d2&key=89353f79-aa75-4e19-8161-d900619b728d
- de Braud, F., Cascinu, S., & Gatta, G. (2004). Cancer of pancreas. *Critical reviews in oncology/hematology*, 50(2), 147-155.
- Brooks, S. A., Dwek, M. V., & Schumacher, U. (2002). *Functional and Molecular Glycobiology*. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- Chen, P. L., Chen, C. F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z. D., & Lee, W. H. (1998). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 5287-5292.
- Cox, D. B. T., Platt, R. J., & Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine*, 21(2), 121-131.
- Cui, H. X., Wang, H., Wang, Y., Song, J., Tian, H., Xia, C., & Shen, Y. (2016). ST3Gal III modulates breast cancer cell adhesion and invasion by altering the expression of invasion-related molecules. *Oncology reports*, 36(6), 3317-3324.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096.
- Freitas, D., Femandes, G. D. S., Hoff, P. M., & Cunha, J. E. (2009). Medical management of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology*, 9(3), 223-232.
- Guillermet, J., Saint-Laurent, N., Rochaix, P., Cuvillier, O., Levade, T., Schally, A. V., Pradayrol, L., Buscail, L., Susini, C., & Bousquet, C. (2003). Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1), 155-160.
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S., & Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83(8), 727-737.
- Hirshberg Foundation for Pancreatic Cancer Research*. Recuperat el 10 maig del 2017 de: <http://pancreatic.org/pancreatic-cancer/about-the-pancreas/symptoms>.
- Hu, H., Eggers, K., Chen, W., Garshasbi, M., Motazacker, M. M., Wrogemann, K., Kahrizi, K., Tzschach, A., Hosseini, M., Bahman, I., Hucho, T. & Mühlhoff, M. (2011). ST3GAL3 mutations impair the development of higher cognitive functions. *The American Journal of Human Genetics*, 89(3), 407-414.
- Kafri, T., Van Praag, H., Gage, F. H., & Verma, I. M. (2000). Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Molecular Therapy*, 1(6), 516-521.
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8), 3173-3178.
- Kiwamoto, T., Brummet, M. E., Wu, F., Motari, M. G., Smith, D. F., Schnaar, R. L., Zhu, Z., & Bochner, B. S. (2014). Mice deficient in the ST3gal3 gene product $\alpha 2, 3$ sialyltransferase (ST3Gal-III) exhibit enhanced allergic eosinophilic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(1), 240-247.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual review of biochemistry*, 77.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., & Abbruzzese, J. L. (2004). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 363(9414), 1049-1057.
- Lonza. Informació sobre el vector *pmaxCloning™ vector*. Informació comercial recuperada el 30 de maig del 2017 de: www.lonza.com/products-services/bio-research/transfection/nucleofector-kit-accessories/pmaxcloning.aspx.
- Luo, G., Jin, C., Long, J., Fu, D., Yang, F., Xu, J., Yu, X., Chen, W., & Ni, Q. (2009). RNA interference of MBD1 in BxPC-3 human pancreatic cancer cells delivered by PLGA-poloxamer nanoparticles. *Cancer biology & therapy*, 8(7), 594-598.
- MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 61(2), 171-177.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429.
- McKee, T., & McKee, J. R. (2003). *Bioquímica: la base molecular de la vida* (3a ed.). Madrid: McGraw-Hill S.A./Interamericana de España.
- Minerva biolabs® (2009). *Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR*. Recuperat el 10 de maig del 2017 de: <http://dnagdansk.com/media/Products/VenorGeM%20manual.pdf>.
- Muñoz, A. (1997). *Cáncer: genes y nuevas terapias* (Vol. 2). Madrid: Editorial Hélice.
- Nakamori, S., Nishihara, S., Ikehara, Y., Nagano, H., Dono, K., Sakon, M., Narimatsu, H. & Monden, M. (1999). Molecular mechanism involved in increased expression of sialyl Lewis antigens in ductal carcinoma of the pancreas. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 18(3), 425-432.
- National Cancer Institute (NCI), NIH Turning Discovery Into Health. Recuperat el 12 de juny de 2017 de: www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer
- OMIM (2017). Informació gen ST3Gal III (codi 606494). Informació recuperada el 14 de maig de: www.omim.org/entry/606494
- OMIM (2014). Informació gen ST3Gal IV (codi 104240). Informació recuperada el 14 de maig de: www.omim.org/entry/104240?search=ST3Gal4&highlight=st3gal4
- Orfao, A., Ciudad, J., López, A., López-Berges, M.C., Vidriales, B., Macedo, A., González, M. & San Miguel, J. F., et al (1993). *La citometría de flujo en el diagnóstico clínico. Servicio General de Citometría*. Universidad de Salamanca,

Peracaula, R., Tabarés, G., López-Ferrer, A., Brossmer, R., de Bolós, C., & de Llorens, R. (2005). Role of sialyltransferases involved in the biosynthesis of Lewis antigens in human pancreatic tumour cells. *Glycoconjugate journal*, 22(3), 135-144.

Peracaula, R., Barrabés, S., Sarrats, A., Rudd, P. M., & de Llorens, R. (2008). Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Disease markers*, 25(4-5), 207-218.

Pérez-Garay, M., Arteta, B., Pagès, L., De Llorens, R., De Bolós, C., Vidal-Vanaclocha, F., & Peracaula, R. (2010). α 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), e12524.

Pérez-Garay, M., Arteta, B., Llop, E., Cobler, L., Pagès, L., Ortiz, R., Ferri, M.J., de Bolós, C., Figueras, J., de Llorens, R., Vidal-Vanaclocha, F. & Peracaula, R. (2013). α 2, 3-Sialyltransferase ST3Gal IV promotes migration and metastasis in pancreatic adenocarcinoma cells and tends to be highly expressed in pancreatic adenocarcinoma tissues. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(8), 1748-1757.

Philippe, S., Sarkis, C., Barkats, M., Mammeri, H., Ladroue, C., Petit, C., Mallet, J., & Serguera, C. (2006). Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47), 17684-17689.

Planas, J. M. M., Ortega, A. S., Bueno, J. M. G., & Castillejo, C. R. (2010). *Avances en cáncer de páncreas, del laboratorio a la clínica*. Recuperat el 10 de maig de: www.aecc.es/Comunicacion/publicaciones/Documents/Avances%20en%20el%20cancer%20de%20pancreas.pdf.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308.

Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry* (2003). (4a ed). Nova Jersey: John Wiley & sons, Inc. Publications.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.

Sigma-Aldrich®. Informació sobre Trypan Blue. Informació recuperada el 10 de maig de: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t6146?lang=es®ion=ES&gclid=Cj0KEQjwLufKBRDYrLzrY3dy88BEiOAPLr4XVAAzZKLIXOWLWAsBujXzIGulgCukeTJJ2C9Zf30UaAorP8P8HAQ.

Song, K., Li, Q., Jiang, Z. Z., Guo, C. W., & Li, P. (2011). Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3B1, a novel epithelial-mesenchymal transition inducer in pancreatic cancer. *Cancer biology & therapy*, 12(5), 388-398.

Sorek, R., Kunin, V., & Hugenholtz, P. (2008). CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 181-186.

Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M., & Kannagi, R. (1993). Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer research*, 53(2), 354-361.

Takahashi, S., Oda, T., Hasebe, T., Sasaki, S., Kinoshita, T., Konishi, M., Ueda, M., Nakahashi, C., Ochiai, T. & Ochiai, A. (2001). Overexpression of sialyl Lewis x antigen is associated with formation of extratumoral venous invasion and predicts postoperative development of massive hepatic metastasis in cases with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathobiology*, 69(3), 127-135.

Thermo Fisher Scientific (2015). *Cell Culture Basics Handbook*. Recuperat el 10 de maig del 2017 de: www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/promotions/global/images/aai-2015/aaipdfs/GibcoCellCultureBasicsHandbook.pdf.

Thermo Fisher Scientific (2010). *NanoDrop 1,000 & 8,000*. Fitxa tècnica recuperada el 12 de juny del 2017 de: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>.

Thermo Fisher Scientific. Informació sobre el vector *pcDNA™ 3.1vector*. Informació comercial recuperada el 30 de maig del 2017 de: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pcdna3_1_man.pdf.

Tübel, J., Saldamli, B., Wiest, I., Jeschke, U., & Burgkart, R. (2012). Expression of the tumor markers sialyl Lewis A, Sialyl Lewis X, Lewis Y, Thomsen-Friedenreich antigen, galectin-1 and galectin-3 in human osteoblasts in vitro. *Anticancer research*, 32(5), 2159-2164.

UniProtKB (2017). Informació sobre Cas9 (codi Q99ZW2). Informació recuperada l'10 de juliol del 2017 de: www.uniprot.org/uniprot/Q99ZW2

UniProtKB (2017). Informació sobre ST3Gal III (codi: Q11203). Informació recuperada l'1 de juliol del 2017 de: www.uniprot.org/uniprot/Q11203.

Ünligil, U. M., & Rini, J. M. (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Current opinion in structural biology*, 10(5), 510-517.

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., & Etzler, M. E. (2009). *Essentials of Glycobiology*. (2a ed.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vegue, J. B. (2004). *Atlas de histología y organografía microscòpica* (2a ed.). Madrid: Editorial medica panamericana.

Wachsmann, M. B., Pop, L. M. & Vitetta, E. S. (2012). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Investigative Medicine*, 60(4), 643-663.

Wang, S. C., Shao, R., Pao, A. Y., Zhang, S., Hung, M. C., & Su, L. K. (2002). Inhibition of cancer cell growth by BRCA2. *Cancer research*, 62(5), 1311-1314.

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

Xia, F., Taghian, D. G., DeFrank, J. S., Zeng, Z. C., Willers, H., Iliakis, G., & Powell, S. N. (2001). Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8644-8649.

Yamazaki, Y., Nango, M., Matsuura, M., Hasegawa, Y., Hasegawa, M., & Oku, N. (2000). Polycation liposomes, a novel nonviral gene transfer system, constructed from cetylated polyethylenimine. *Gene therapy*, 7(13), 1148.

Young, L., Sung, J., Stacey, G., & Masters, J. R. (2010). Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature protocols*, 5(5), 929-934.

Zhu, L., Qin, H., Li, P. Y., Xu, S. N., Pang, H. F., Zhao, H. Z., Li, D.M., & Zhao, Q. (2012). Response gene to complement-32 enhances metastatic phenotype by mediating transforming growth factor beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell line BxPC-3. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(1), 29.