



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Obtención de diferentes mutantes *knockout* del lncRNA MALAT1 en la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3

Obtención de diferentes mutantes *knockout* do lncRNA MALAT1 na liña celular de cancro de ovario SKOV-3

Obtaining different knockout mutants of MALAT1 lncRNA in the ovarian cancer cell line SKOV-3

Anahir Franco Gacio

Curso: 2021- 2022. Convocatoria: Xuño

Director: Ángel José Vizoso Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A mi director Dr. Ángel José Vizoso Vázquez, agradecerle su apoyo durante todos estos meses, la paciencia infinita y la confianza que depositó en mí, incluso cuando yo no la tenía. Gracias por sus charlas motivacionales, por la cercanía y por haberme hecho sentir una más del grupo desde el primer momento.

A Mónica, por preocuparse por mí como si fuese mi segunda directora.

A los doctorandos, por haberme acogido y ayudado siempre que lo necesité. En especial a Lidia y Martín, y a Cora, por haber hecho más amenas las largas jornadas de trabajo y considerarme un “pollito” más del grupo

A mi familia, en especial a mis padres, por haberme apoyado siempre y no haberme dejado tirar la toalla nunca. Por la educación que me disteis y los valores que me inculcasteis. A mi hermano, por tratar de animarme todos los días del año. Y gracias a mis abuelos, por haberse sentido siempre orgullosos de su nieta.

A mi pareja, por su paciencia y por estar siempre a mi lado, en los buenos y malos momentos, durante esta etapa de mi vida y las que vendrán. Gracias por la confianza, la comprensión, y por recordarme siempre que puedo conseguir todo lo que me proponga. Gracias por ser casa.

A Esther, Carlota y Lucía, por haberme regalado tantos buenos momentos durante estos seis años. A Carlota, por estar a mi lado desde el minuto uno y no abandonar nunca el barco. Y en especial a Esther, gracias por el vínculo que hemos construido y ser como una hermana.

Por último, agradecer a la AECC haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación en cáncer con la ayuda del Programa Prácticas de Laboratorio de Verano 2021.

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
°C	Grado Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
Bla	<i>Beta-lactamase</i>
CCOC	<i>Clear Cell Ovarian Carcinoma</i>
CDH1/ CDH2	<i>Cadherin-1 / Cadherin-2</i>
CO	Cáncer de ovario
COE	Cáncer de ovario epitelial
CPNM	Carcinoma pulmonar no microcítico
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat – Associated Protein 9</i>
crRNA	<i>CRISPR RNAs</i>
C_t	<i>Cycle Threshold</i>
DECKO	<i>Double Excision Crispr KnockOut</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSBs	<i>Double-Strand DNA Breaks</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetra-Acetic Acid</i>
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
ENOC	<i>Endometrioid Ovarian Carcinoma</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
g	Gramo
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
h	Hora
HDR	<i>Homology-Directed Repair</i>
HGSOC	<i>High-Grade Serous Ovarian Carcinoma</i>
HMGB	<i>High Mobility Group Box</i>
(K)pb	(Kilo) pares de bases
l	Litro
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LGSOC	<i>Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma</i>
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
LTRs	<i>Long-Terminal Repeats</i>
MALAT1	<i>Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1</i>
mg	Miligramo
min	Minuto
miRNA	Micro RNA
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MOC	<i>Mucinous Ovarian Carcinoma</i>
NEAT2	<i>Nuclear Enriched Abundant Transcript 2</i>

ng	Nanogramo
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i>
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
pac	<i>puromycin-N-acetyltransferase</i>
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PES	<i>Polyethersulfone</i>
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>
r.c.f.	<i>Relative centrifugal force</i>
r.p.m.	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SD	<i>Standard deviation</i>
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TALENs	<i>Transcription Activator-like effector nuclease</i>
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Porcentaje volumen a volumen
Wt	<i>Wild Type</i>
ZFN	<i>Zinc-finger nuclease</i>

RESUMEN

El dato más alarmante del cáncer de ovario (CO) es su baja tasa de supervivencia relativa a 5 años, de tan sólo el 30-40%, como resultado de la no disponibilidad de herramientas para su diagnóstico precoz, además de la aparición muy frecuente de recidivas en las pacientes. La detección del tumor en estadios tempranos, junto con el desarrollo de terapias más eficaces, aumentaría dicha tasa hasta valores próximos al 92%. Por tanto, identificar biomarcadores asociados a la etapa temprana del CO, así como dianas terapéuticas específicas, supone un desafío muy importante. En los últimos años los lncRNAs, transcritos no codificantes de proteínas de más de 200 nucleótidos de longitud capaces de regular la expresión génica a diferentes niveles, se han erigido como una nueva y prometedora generación de biomarcadores debido a su expresión diferencial en las células tumorales ováricas respecto a las sanas, su especificidad de tejido y estadio de la enfermedad, y la posibilidad de ser detectados en los fluidos corporales. Especial interés han generado los efectos de la pérdida y/o ganancia de función del lncRNA MALAT1 sobre la capacidad metastásica de las células de CO. Con el objetivo de continuar esta línea de investigación, en el presente proyecto se obtuvieron modelos celulares de ovario mutantes *knockout* de MALAT1 mediante la tecnología de edición genómica CRISPR/Cas9. Así mismo, resultados preliminares en el presente trabajo indican que MALAT1 podría estar implicado en el proceso de metástasis en cáncer de ovario epitelial a través de genes asociados al proceso de transición epitelio-mesenquima como CDH1, CDH2, Vimentina o NF- κ B.

Palabras clave: cáncer de ovario; lncRNAs; MALAT1; tecnología CRISPR/Cas9

ABSTRACT

The most alarming fact about ovarian cancer (OC) is its low 5-year relative survival rate of only 30-40%, as a result of the unavailability of tools for its early diagnosis, in addition to the very frequent occurrence of recurrences in patients. The detection of the tumor in early stages, together with the development of more effective therapies, would increase this rate to values close to 92%. Therefore, identifying biomarkers associated with the early stage of OC, as well as specific therapeutic targets, is a major challenge. In recent years lncRNAs, non-coding transcripts of proteins more than 200 nucleotides long capable of regulating gene expression at different levels, have emerged as a promising new generation of biomarkers due to their differential expression in ovarian tumor cells compared to healthy ones, their tissue and disease stage specificity, and the possibility of being detected in body fluids. Special interest has been generated by the effects of loss and/or gain of function of MALAT1 lncRNA on the metastatic capacity of OC cells. In order to continue this line of research, in the present project, MALAT1 knockout mutant ovarian cell models were obtained using CRISPR/Cas9 genomic editing technology. Likewise, preliminary results in the present work indicate that MALAT1 could be involved in the process of metastasis in epithelial ovarian cancer through genes associated with the epithelial-mesenchymal transition process such as CDH1, CDH2, Vimentin or NF- κ B.

Key words: ovarian cancer; lncRNAs; MALAT1; CRISPR/Cas9 technology

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES EXISTENTES	1
1.1 Cáncer.....	1
1.1.1 Cáncer de ovario	1
1.2 ARN largos no codificantes (<i>Long non-coding RNAs</i> , lncRNAs)	2
1.2.1 MALAT1 (<i>Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1</i>).....	2
1.3 Transición epitelio-mesénquima (<i>Epithelial- mesenchymal transition</i> , EMT)....	3
1.4 Tecnología CRISPR/Cas9 (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat – Associated Protein 9</i>)	3
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Material biológico	6
3.1.1. Cepas bacterianas	6
3.1.2. Líneas celulares humanas.....	6
3.1.3. Vectores plasmídicos	6
3.1.4. Medios de cultivo.....	6
3.2. Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos	6
3.2.1. Técnica de clonaje.....	6
3.2.2. Transformación bacteriana mediante choque térmico	7
3.2.3. Aislamiento y purificación de ADN	7
3.2.4. PCR	7
3.2.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	8
3.2.6. qPCR en tiempo real	8
3.2.7. Cuantificación y evaluación de la pureza de ácidos nucleicos	9
3.3. Técnicas de cultivo celular	10
3.3.1. Transfección e infección	10
3.3.2. Aislamiento de clones por dilución (<i>Single Cell Cloning</i>)	11
3.3.3. Congelación de células.....	11
3.4. Herramientas bioinformáticas	12
3.5. Análisis estadístico	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. Clonaje de los distintos crRNA	13
4.2. Producción y transducción lentiviral.....	14
4.3. <i>Single cell Cloning</i> de líneas celulares <i>knockout</i>	15
4.4. Eficacia de la tecnología CRISPR/Cas9 en la supresión de secuencias genómicas	16
5. CONCLUSIONES	21

6. CONCLUSIONS	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES EXISTENTES

1.1 CÁNCER

Cáncer es un término genérico que abarca una gran diversidad de enfermedades, todas ellas caracterizadas por una multiplicación celular rápida y descontrolada, de tal forma que las células pueden diseminarse e invadir otras partes u órganos del cuerpo (proceso conocido como metástasis).

1.1.1 Cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CO) es uno de los cánceres ginecológicos de mayor letalidad a nivel mundial (Salamini-Montemurri et al., 2020). De hecho, debido a su alta incidencia, representa el octavo tipo de cáncer más habitual entre la población femenina, y los datos recogidos cada año sugieren una tendencia al alza (Braga et al., 2020; Coburn et al., 2017). Se estima que se han diagnosticado aproximadamente 314.000 casos nuevos y que se han producido más de 207.000 muertes relacionadas con esta enfermedad en todo el mundo en 2020 (Sung et al., 2021).

Según el tipo de célula en la que se origina, se diferencia entre cáncer de ovario germinal, estromal y epitelial (COE), siendo este último el de mayor prevalencia, representando en torno al 90% del conjunto de casos diagnosticados (Coburn et al., 2017; Momenimovahed et al., 2019). El COE, a su vez, se divide en cinco subtipos histológicos principales: serosos de alto grado (*High-Grade Serous Ovarian Carcinoma*, HGSOC - incidencia ~70%), endometrioides (*Endometrioid Ovarian Carcinoma*, ENOC - incidencia 10%), de células claras (*Clear Cell Ovarian Carcinoma*, CCOC - incidencia 10%), mucinosos (*Mucinous Ovarian Carcinoma*, MOC - incidencia 3%) y serosos de bajo grado (*Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma*, LGSOC - incidencia <5%) (Brett M. et al., 2017; Momenimovahed et al., 2019). Las diferencias entre ellos radican en su origen celular (la mayor parte parecen formarse fuera del ovario, afectándole de forma secundaria), patogénesis, alteraciones moleculares, pronóstico y factores de riesgo ambientales y genéticos (Brett M. et al., 2017; Salamini-Montemurri et al., 2020). Además, puede definirse una segunda clasificación de los COE: carcinomas de tipo I y de tipo II. Los COE de tipo I son genéticamente estables e incluyen LGSOC, ENOC, MOC y CCOC. Por su parte, el tipo II abarca principalmente HGSOC, pero también carcinosarcomas y tumores indiferenciados; se trata de tumores inestables genéticamente y de curso clínico más agresivo (Abildgaard et al., 2020; Rojas et al., 2016).

El principal desafío que supone el cáncer de ovario, y en particular el COE, es lograr detectarlo de forma precoz. Un elevado porcentaje de pacientes son diagnosticadas cuando la enfermedad ya se encuentra en estadios avanzados, presentando metástasis y una elevada resistencia a la radioterapia y quimioterapia tradicional, derivando en una escasa tasa de supervivencia relativa a 5 años, que se sitúa en torno al 30-40% (Braga et al., 2020; Brett M. et al., 2017). Esta situación se debe a que, al tratarse de una enfermedad sin sintomatología específica, no existen metodologías eficaces y rutinarias para el diagnóstico temprano (Lheureux et al., 2019). En contraste, la detección del tumor localizado (estadio I) implicaría un incremento de dicha tasa hasta valores cercanos al 92% (Brett M. et al., 2017). Por este motivo, surge la necesidad de aplicar nuevos enfoques experimentales orientados a buscar e identificar posibles biomarcadores ligados a la fase temprana del CO, que permitan mejorar su diagnosis y prognosis (Tripathi et al., 2018). Asimismo, es necesario encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan aplicar tratamientos efectivos y personalizados (Abildgaard et al., 2020).

1.2 ARN LARGOS NO CODIFICANTES (*LONG NON-CODING RNAs*, LNCRNAs)

Los lncRNAs constituyen un tipo de transcritos de más de 200 nucleótidos de longitud que se suponen no codificantes de proteínas. En un principio eran considerados “basura” transcripcional, sin función biológica conocida. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que, como resultado de su interacción con el ADN, ARNs y proteínas, regulan la expresión génica a distintos niveles (transcripcional, post-transcripcional y postraduccion), afectando a una amplia variedad de procesos celulares, como la remodelación de la cromatina, el *splicing* alternativo o la impronta genómica, entre otros (Abildgaard et al., 2020; Anastasiadou et al., 2018; Salamini-Montemurri et al., 2020).

Debido a su implicación en estos procesos, cada vez son más los estudios que relacionan la expresión desregulada de los lncRNAs (por sobreexpresión, deficiencia o mutación) con distintas enfermedades, entre ellas diversos tipos de cáncer. En este sentido, se ha sugerido que los lncRNAs desregulados pueden actuar como supresores o promotores de diferentes procesos asociados a los sellos distintivos del cáncer (*The Hallmarks of cancer*), como son la proliferación, crecimiento tumoral *in vivo*, control del ciclo celular, muerte celular, migración, invasión, transición epitelial a mesenquimal, metástasis *in vivo*, angiogénesis y metabolismo celular. Sin embargo, en el caso del CO existen dos características de la célula tumoral que, hasta la fecha, no han sido relacionadas con los lncRNAs, y son el “potencial replicativo ilimitado” y “estabilidad genómica y mutación” (Hanahan & Weinberg, 2011; Marchese et al., 2017; Salamini-Montemurri et al., 2020; Wang et al., 2019; Zhan et al., 2018).

Como resultado de su expresión diferencial en las células tumorales con respecto a los tejidos sanos, los lncRNAs se han erigido como una nueva generación de biomarcadores y posibles dianas terapéuticas específicas de distintos cánceres, entre ellos el CO (Bolha et al., 2017; Gao et al., 2020). Además, el interés que generan entre la comunidad científica se vio incrementado al descubrir que normalmente muestran patrones de expresión específicos de tejido y de estadio de la enfermedad, y que pueden ser detectados en los fluidos corporales (Bolha et al., 2017; Zhan et al., 2018). Según Salamini-Montemurri et al., se han identificado 215 lncRNAs involucrados en el CO, habiéndose demostrado experimentalmente 157 de ellos. Algunos de los más estudiados son HOTAIR, H19, XIST, MEG3, UCA1 y MALAT1, entre otros.

1.2.1 MALAT1 (*Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*)

MALAT1, también conocido como NEAT2 (*Nuclear Enriched Abundant Transcript 2*) es un lncRNA situado en el cromosoma 11q13, cuyo transcrito de mayor longitud alcanza los 8 Kb (Gutschner et al., 2013). Fue identificado por primera vez en 2003 como marcador para el pronóstico de la metástasis y de la supervivencia de pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM) en fase I, al detectarse que aumentos en los niveles de expresión de MALAT1 tenían correlación directa con estadios más avanzados de metástasis y peores tasas de supervivencia (Ji et al., 2003). Posteriormente se vio que MALAT1 se encontraba regulado al alza en el CO y que influía en el tamaño, localización, diferenciación y estadio del cáncer (Bai et al., 2018). Se sabe que modula diversas rutas de señalización celular implicadas en la tumorigénesis, como MAPK/ERK, PI3K/AKT, WNT/ β -catenina y NF- κ B, entre otras (Li et al., 2018). Además, interviene en la regulación génica a nivel transcripcional y post-transcripcional actuando como elemento cis/trans, esponja de miARNs o reclutando proteínas a los *speckles* nucleares (Goyal et al., 2021).

En base a los datos existentes, se cree que MALAT1 podría resultar útil como biomarcador predictivo para el diagnóstico y pronóstico del CO, así como una posible diana terapéutica (Li et al., 2018). Por otro lado, es necesario seguir realizando estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, para ampliar los conocimientos actuales y poder establecer con mayor seguridad el papel que desempeña MALAT1 en esta enfermedad, así como su mecanismo de regulación.

1.3 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (*EPITHELIAL- MESENCHYMAL TRANSITION, EMT*)

La EMT es un proceso celular altamente conservado mediante el cual las células epiteliales polarizadas e inmóviles se transforman en células mesenquimales móviles. Para ello pierden su capacidad de adhesión célula-célula y ganan motilidad. Inicialmente este proceso se asoció a la embriogénesis temprana y, más tarde, se observó su implicación en el inicio del proceso de metástasis (Wang et al., 2019; Zeisberg & Neilson, 2009). Así, se ha sugerido que las células cancerosas epiteliales de los nódulos primarios usan parte del mecanismo molecular de la EMT (normalmente implicado en la formación de fibroblastos adultos) para transformarse en células tumorales metastásicas móviles (EMT de tipo 3). Esta sugerencia se basa en la observación de que determinados procesos experimentados por las células cancerosas epiteliales derivan en una mayor capacidad metastásica, entre ellos la adquisición de marcadores mesenquimales, la sobreexpresión nuclear de β catenina, y la pérdida de moléculas ligadas a la adhesión celular epitelial (Zeisberg & Neilson, 2009).

Estudios previos indican que existen marcadores moleculares ligados a la EMT que, a su vez, se han asociado a MALAT1 en determinados tipos de cánceres. Por tanto, permitirían demostrar de forma indirecta cómo afecta este lncRNA a la EMT. Entre ellos se encuentran CDH1, CDH2, vimentina, HAKKAI, p105, HMGB1 y HMGB2 (Salamini-Montemurri et al., 2020).

CDH1 (*Cadherin-1*), también conocida como E-cadherina, y CDH2 (*Cadherin-2*), también llamada N-cadherina, son proteínas de adhesión celular dependientes de calcio (Meigs et al., 2002). HAKAI es una E3 ubiquitín-ligasa que forma parte del complejo E-cadherina. Su expresión impide el contacto célula-célula e incrementa la endocitosis de E-cadherina y la motilidad de las células (Fujita et al., 2002). La vimentina es una proteína estructural que pertenece a los filamentos intermedios de tipo III y actúa como marcador de células mesenquimales (Challa & Stefanovic, 2011). p105 es una subunidad de NF- κ B, factor de transcripción involucrado en la regulación de distintos procesos biológicos, entre los que se encuentra la tumorigénesis. HMGB1 y HMGB2 pertenecen a la familia *High Mobility Group Box* (HMGB) y son proteínas multifuncionales con distintos papeles en función del compartimento celular, así como del estado redox en el caso de HMGB1; promueven la metástasis y su sobreexpresión se relaciona con el CO, entre otros (Cámara-Quílez et al., 2020).

1.4 TECNOLOGÍA CRISPR/Cas9 (*CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEAT – ASSOCIATED PROTEIN 9*)

En los últimos años, la edición genómica se ha convertido en una herramienta clave para estudiar la función de elementos reguladores no codificantes partícipes del desarrollo del cáncer, como son los lncRNAs (Aparicio-Prat et al., 2015). En la actualidad, la tecnología CRISPR/Cas9 constituye una de las herramientas de ingeniería genómica más importantes. Es la principal alternativa a las técnicas tradicionales, como las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (*Transcription activator-like effector nuclease*, TALENs) o las nucleasas de dedos de zinc (*Zinc-finger nucleases*, ZFN) (Jinek et al., 2013).

Los sistemas CRISPR/Cas de tipo II, que otorgan a las bacterias inmunidad adaptativa frente a virus y plásmidos, fueron los primeros en adaptarse para editar el genoma de células eucariotas (en concreto de mamíferos) (Doudna & Charpentier, 2014; Nishimasu et al., 2014). Presentan dos componentes: el ARN guía (*single guide RNA*, sgRNA) y la enzima endonucleasa no específica Cas9 (Jinek et al., 2013). El sgRNA es una secuencia objetivo que hibrida en una posición genómica concreta, localizada aguas arriba de PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). Está constituido por la fusión sintética de dos ARN no codificantes: el crRNA (*CRISPR RNAs*, secuencia de 20

nucleótidos que determina la diana genómica de Cas9) y el tracrRNA (*trans-activating crRNA*, sirve como elemento de unión entre el crRNA y Cas9). Por su parte, la enzima Cas9 se ensambla al sgRNA y produce cortes en la doble cadena de ADN (*Double-Strand DNA Breaks*, DSBs). Presenta dos dominios de nucleasas: el dominio n terminal tipo RuvC (proteína integrasa del retrovirus) y el dominio tipo HNH (próximo a la parte central de la proteína), que cortan las cadenas de ADN no complementaria y complementaria a la secuencia guía, respectivamente (Jinek et al., 2013; Nishimasu et al., 2014). Los DSBs pueden ser reparados mediante 2 vías: reparación por homología directa (*Homology-Directed Repair*, HDR) o unión de extremos no homólogos (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ). El mecanismo más frecuente es NHEJ, propenso a errores y que genera pequeñas inserciones o deleciones genómicas (*indels*) útiles en experimentos de *knockout* de genes (Chen et al., 2019).

En este proyecto, se usó la tecnología CRISPR/Cas9 para comprobar cuáles son los efectos de la pérdida y/o ganancia de función de MALAT1 sobre la capacidad metastásica de las células de CO a través de la supresión dirigida de dicho lncRNA. Sin embargo, los lncRNAs no pueden eliminarse originando cambios en la pauta de lectura ribosomal a través de un solo sgRNA. Por este motivo, para generar los *knockout* de interés se empleó una pareja de sgRNAs y un sistema CRISPR de doble escisión, lo que se denomina DECKO (*Double Excision CRISPR Knockout*) (Kim et al., 2018).

2. OBJETIVOS

En el estudio funcional de cualquier elemento regulador, independientemente de su naturaleza (proteica, ácido nucleico, etc.), es necesario en muchos casos la reducción o completa depleción celular del mismo, con el fin de realizar estudios comparativos. En este sentido, se propone el uso de la tecnología CRISPR/Cas9 para comprobar cómo afecta la pérdida y/o ganancia de función de MALAT1 a la capacidad metastásica de las células de CO a través de la supresión dirigida de dicho lncRNA. Para ello, en el presente Trabajo de Fin de Grado, desarrollado en el grupo EXPRELA (Regulación de la expresión génica y aplicaciones), se plantean los siguientes objetivos específicos:

- **Obtener mutantes *knockout* en dos líneas celulares de ovario mediante tecnología CRISPR/Cas9.** Para ello se llevó a cabo el clonaje de los distintos crRNA, la producción y transducción lentiviral, y el *Single Cell Cloning* de líneas celulares *knockout*. La eficacia de la supresión genómica se verificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (*Real Time qPCR*) y secuenciación Sanger.
- **Analizar el efecto de los mutantes obtenidos en el objetivo anterior en el proceso de metástasis a través de genes asociados al proceso de EMT mediante ensayos de qPCR en tiempo real.**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Cepas bacterianas

Para la propagación de plásmidos mediante transformación bacteriana se empleó la cepa de *E. coli* ECOSTM Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]) (Yeastern Biotech).

3.1.2. Líneas celulares humanas

Para la obtención de lentivirus mediante transfección se empleó la línea celular humana HEK293(F)T (ATCC CRL-3216, células embrionarias de riñón humano). Para el proceso de infección se utilizaron las líneas celulares humanas SKOV-3 (ATCC HTB-77, línea de cáncer de ovario epitelial) e IOSE-80 hTERT (cedidas por el Dana-Farber Cancer Institute).

3.1.3. Vectores plasmídicos

Para la clonación de las diferentes secuencias crRNA dirigidos a locus genómico único se empleó el plásmido lentiCRISPRv2 (amablemente cedido por Feng Zhang) (Addgene # 52961; <http://n2t.net/addgene:52961>; RRID:Addgene_52961), que proporciona una carga viral en los cultivos casi 10 veces mayor que el original lentiCRISPRv1.

3.1.4. Medios de cultivo

Las células bacterianas se cultivaron en el medio *Luria-Bertani* (LB; con 1% bactotripton, 0,5% extracto de levadura y 0,5% NaCl; Gibco) suplementado con el antibiótico de selección ampicilina (100 µg/µl).

Las líneas celulares humanas se cultivaron en el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; con 4,5 g/l glucosa, L-Glutamina y piruvato de sodio; LONZA) suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) (*Fetal Bovine Serum*, FBS, Gibco,) y los antibióticos penicilina/streptomicina al 1% (v/v) – de ahora en adelante DMEM suplementado normal – en un incubador a 37°C y 5% CO₂ (condiciones estándar) (*CO₂ Incubator MCO-170AICUVH-PE*, Panasonic). A la hora de realizar el proceso de transfección y con el fin de favorecerlo, la incubación se llevó a cabo en este mismo medio, pero sin adición de antibióticos.

3.2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.2.1. Técnica de clonaje

Para la producción de plásmidos lentivirales CRISPR dirigidos a un solo locus genómico se clonó la secuencia objetivo en el plásmido de transferencia lentiCRISPRv2, generando construcciones diferentes: lentiCRISPRv2-5K1sgRNA, lentiCRISPRv2-5K2sgRNA, lentiCRISPRv2-3K1sgRNA y lentiCRISPRv2-3K2sgRNA.

En primer lugar, se preparó el vector lentiviral mediante digestión y desfosforilación por la enzima de restricción *BsmBI*, y posterior limpieza utilizando el kit comercial *GeneJET Gel Extraction Kit* de ThermoFisher Scientific siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, se realizó la fosforilación y anillamiento de las parejas de oligos que codifican la región variable de los sgRNAs. Para ello se preparó una mezcla por cada par de cebadores, añadiendo 1 µl de cada uno de los oligos (100 µM), 1 µl de *T4 Ligation Buffer* (NEB) (10X), 6,5 µl de agua y 0,5 µl de *T4 PNK* (NEB M0201S). El *T4 Ligation Buffer* contiene el ATP empleado por la quinasa para fosforilar el ADN. Para contrarrestar la degradación de ATP consecuencia del elevado número de ciclos de congelación-descongelación que experimenta, la mezcla se suplementó con 0,5 µl de ATP. La mezcla de reacción se sometió al siguiente programa de termociclación: (1) primera etapa de 30 min a 37°C; (2) segunda etapa de 5 min a 95°C (anillamiento de los oligos, ya fosforilados, e inactivación de la quinasa); (3) tercera etapa con una rampa de temperatura hasta los 25°C, y un descenso de 5°C/min. A partir de los oligos anillados se preparó una dilución 1:50.

Por último, se prepararon las reacciones de ligamiento con la enzima *Speedy ligasa* (NZYTech), utilizando 50 µg del plásmido lentiCRISPRv2 digerido y una relación molar 1:10 (plásmido:inserto). Asimismo, se preparó un control negativo sustituyendo los oligos por agua. Estas mezclas se dejaron a 4°C durante toda la noche y, posteriormente, 2 h a 25°C.

3.2.2. Transformación bacteriana mediante choque térmico

Con el fin de obtener una cantidad suficiente de ADN plasmídico para la posterior transfección, el producto de clonaje fue transformado en células bacterianas competentes. Tras ser descongeladas, se añadieron 5 µl de las reacciones de ligamiento. Tras 20 min de incubación en hielo, se aplicó un choque térmico a las células a 42°C durante 1 min, manteniéndolas de nuevo en hielo durante 2 min. La etapa de recuperación se llevó a cabo mediante incubación en medio LB a 37°C durante 1 h con agitación (250 r.p.m.). Por último, éstas fueron sembradas en placas selectivas con el antibiótico adecuado (siembra con bolas).

3.2.3. Aislamiento y purificación de ADN

Para realizar la extracción y purificación de ADN plasmídico de las diferentes construcciones a partir de las células bacterianas transformadas para su posterior uso en la transfección, se empleó el kit comercial *PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El ADN plasmídico purificado se almacenó a -20°C hasta su empleo en la transfección.

Por su parte, el aislamiento del ADN plasmídico empleado como molde en reacciones de PCR (*Polymerase Chain reaction*) destinadas a comprobar el éxito de las reacciones de ligamiento (PCR de colonias) se llevó a cabo de forma distinta. Para provocar la lisis bacteriana, se sometieron las suspensiones celulares de los distintos candidatos a 95°C durante 5 min, aplicando a continuación un *vórtex* de 3 s y centrifugando durante 10 min a 13000 r.p.m. (*Heraeus Biofuge*, Thermo Scientific), recogiendo por último el sobrenadante.

La extracción de ADN genómico para su posterior uso como molde en reacciones de PCR se llevó a cabo con el kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (NZYTech) siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

3.2.4. PCR

Tanto para el desarrollo de las PCR de colonias como de ADN genómico se recurrió a *NZYTaq II DNA Polymerase* (NZYTech). En el caso de las PCR de colonias, la mezcla de reacción estándar para las amplificaciones con la *Taq* polimerasa presentó los siguientes componentes: *NZYTaq II Colourless Master Mix* (2X) (NZYTech), cebador *forward* universal (10 µM), cebador *reverse* específico de candidato (100 µM), y ADN plasmídico molde (5 µl), completando con agua

hasta el volumen deseado. En las PCR de ADN genómico, la mezcla fue: *NZYTaq II Colourless Master Mix* (2X) (NZYTech), cebadores (10 μ M) y ADN genómico molde (100 ng), completando con agua hasta el volumen de reacción final requerido. El programa aplicado en el termociclador fue el siguiente:

- PCR de colonias: (1) etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min; (2) 35 ciclos constituidos por una fase de desnaturalización a 95°C durante 30 s, una fase de hibridación de 30 s a 55°C, y una fase de extensión a 72°C durante 45 s; (3) etapa de elongación final a 72°C durante 5 min; (4) conservación a 4°C.
- PCR de ADN genómico: (1) etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min; (2) 35 ciclos constituidos por una fase de desnaturalización a 95°C durante 30 s, una fase de hibridación de 30 s cuya temperatura varía en función de la temperatura de fusión de los cebadores (optimizada mediante gradiente de temperatura en 60°C), y una fase de extensión a 72°C durante 3 min 30 s; (3) etapa de elongación final a 72°C durante 10 min; (4) conservación a 4°C.

La *Tabla 1* muestra los cebadores usados en las reacciones de PCR, los cuales fueron suministrados por Eurofins.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados en las reacciones de PCR.

Nombre	Secuencia
AJVV236f	5'-caccgCCGCAGATCAGAGTGGGCCAC-3'
AJVV237r	5'-aacGTGGCCCACTCTGATCTGCGG-3'
AJVV238f	5'-caccgGGATAGTACACTTCACTCAG-3'
AJVV239r	5'-aacCTGAGTGAAGTGTACTATCC-3'
AJVV240f	5'-caccgCTATTGACCTTATATAGGGA-3'
AJVV241r	5'-aacTCCCTATATAAGGTCAATAG-3'
AJVV242f	5'-caccgGGACGGGGTTCAAATCCCTG-3'
AJVV243r	5'-aacCAGGGATTTGAACCCCGTCC-3'
AJVV295f	5'-TAATAATTCCAGGCACATGGCAATAGAGGC-3'
AJVV296r	5'-CACAAAAGAACCACAACAATTTAGAGCTTCTCC-3'

3.2.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Las muestras de ADN plasmídico y genómico se analizaron a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% y 2%, respectivamente, que fueron preparados usando tampón TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) (Thermo Fisher Scientific). Como tampón de carga se usó *6X NZYDNA Loading Dye* (NZYTech) y como marcador de tamaño molecular *DNA Ladder GeneRuler™ 1kb 0.5 μ g/ μ l, 50 μ g* (Thermo Fisher Scientific). El fluoróforo intercalante que permitió visualizar el ADN fue *GelGreen™* (Biotium). Los geles se revelaron bajo luz UV haciendo uso del fotodocumentador *Chemidoc™ MP Imaging System* (Biorad) y aplicando el programa *Image Lab* (BioRad).

3.2.6. qPCR en tiempo real

El desarrollo de la qPCR en tiempo real requirió una purificación y limpieza previa del ARN total de los candidatos *knockout* seleccionados, así como de las líneas celulares *Wild Type (Wt)*.

Para conseguirlo, primero se lavaron las placas con 10 ml de *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (1X) (DPBS; sin calcio o magnesio; LONZA) y se levantaron las células usando 1 ml de tripsina (Gibco) y 10 ml de medio DMEM suplementado normal para bloquear. El volumen resultante se centrifugó durante 5 min a 500 r.c.f. (*NEYA 16R Bench Top Centrifuge*, Remi) y el *pellet* se lavó con 1 ml de DPBS (1X). Tras resuspender las células y transferirlas a un tubo

Eppendorf, éste se centrifugó durante 5 min a 500 r.c.f. (*1524 Micro centrifuge*, Gyrozen). A continuación, se utilizó con ellas el kit comercial *GeneJET RNA Purification Kit* (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se aplicó el kit comercial *GeneJET RNA Clean-up and Concentration Micro Kit* (ThermoFisher Scientific) para la digestión de las muestras, siguiendo el procedimiento detallado por el fabricante. Previamente al uso de este kit, se prepararon las mezclas de digestión, que contenían el ARN candidato (2 µg), *DNaseI* (3 µl) (ThermoFisher Scientific) y tampón de reacción 10X (5 µl) (ThermoFisher Scientific), completando con agua libre de ARNasas hasta un volumen de 50 µl. El kit comercial se empleó tras incubar las mezclas a 37°C durante ~60 min.

Para detectar el ARNm del lncRNA estudiado, primero se sintetizó ADNc a partir de ARN total de los distintos candidatos y líneas celulares *Wt* (hasta 5 µg), usando para ello el kit comercial *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit, separate oligos* (NZYTECH) según las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso en la qPCR en tiempo real. La mezcla de reacción estándar de qPCR en tiempo real para cada gen presentó los componentes que se muestran a continuación: *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2X)*, *Rox plus* (NZYTECH), cebadores (10 µM) y ADNc molde (1 ng), completando con agua libre de nucleasas hasta el volumen de reacción final requerido. Con el objetivo de facilitar el proceso, primero se prepararon los volúmenes correspondientes de las mezclas de reacción sin el ADNc molde y se distribuyeron 9 µl de la correspondiente mezcla por pocillo, y luego se añadió 1 µl del ADNc molde correspondiente. Se selló la placa y se centrifugó durante 1 min a 1000 r.p.m. (*Centrifuge 5804R*, Eppendorf). La qPCR en tiempo real se llevó a cabo en el equipo *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Las condiciones de termociclación usadas fueron: (1) etapa de activación de la polimerasa a 95°C durante 2 min; (2) 40 ciclos constituidos por una fase de desnaturalización a 95°C durante 5 s y una fase de anillamiento/extensión a 60°C durante 20 s; (3) etapa de curva de desnaturalización/renaturalización constituida por una fase a 95°C durante 15 s, una fase a 60°C durante 1 min y una fase a 95°C durante 15 s.

Con el fin de asegurar la reproducibilidad de las medidas, se realizaron tres réplicas técnicas por cada candidato (o *Wt*) y gen/amplicóntestado. Como control interno se empleó la expresión de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH). Las secuencias de los cebadores utilizados, suministrados por Eurofins, se recogen en la *Tabla 2*.

3.2.7. Cuantificación y evaluación de la pureza de ácidos nucleicos

Para la cuantificación de las muestras de ADN y ARN se midió la absorbancia a 260 nm usando el espectrofotómetro *Eppendorf BioSpectromete® basic* (Eppendorf). Se tuvieron en cuenta los parámetros A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} con el fin de evaluar la pureza del ADN y del ARN.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en las reacciones de qPCR en tiempo real.

Nombre	Gen/Amplicón	Secuencia
GAPDHf GAPDHR	GAPDH	5'-CCTCCTGCACCACCAACT-3' 5'-TGGCAGTGATGGCATGGA-3'
MALATiniciof MALATinicior	MALAT1_A	5'-CGCATTACTAAACGCAGACGA-3' 5'-TTCGCCTTCCCGTACTTCTG-3'
MALATmediof MALATmedior	MALAT1_B	5'-TCTTAGAGGGTGGGCTTTTGT-3' 5'-TCTGCATCTAGGCCATCATACTG-3'
AJVV326f AJVV327r AJVV328f	MALAT1_C (328f/327r) MALAT1_D (326f/327r)	5'-CAGACCCTTCACCCCTCACC-3' 5'-GTTAAGTTTTTCAGCAGTAGGGC-3' 5'-GGATTGGGAACCACTAGTTC-3'
CDH1f CDH1r	CDH1	5'-GGATGTGCTGGATGTGAATG-3' 5'-ACATCAGACAGGATCAGCAGAAG-3'
CDH2f CDH2r	CDH2	5'-GACCATCACTCGGCTTAATG-3' 5'-AACCTTCACACGCAGGATGG-3'
HMGB1f HMGB1r	HMGB1	5'-TCAAAGGAGAACATCCTGGCC-3' 5'-GCTTGTCATCTGCAGCAGTGTT-3'
HMGB2f HMGB2r	HMGB2	5'-GAGCAGTCAGCCAAAGATAAAC-3' 5'-TCCTGCTTCACTTTTGCCCTT-3'
Vimentinf Vimentinr	Vimentin	5'-CAGGAACAGCATGTCCAAATC-3' 5'-GGCAGCCACACTTTCATATTG-3'
HAKKAIf HAKKAIr	HAKKAI	5'-ACAACCAGGGGGAATGAGTC-3' 5'-GGAAGTGGGGTTTGAGAAGG-3'
NF-κB/p105f NF-κB/p105r	NF-κB/p105	5'-GTGACAGGAGACGTGAAGATG-3' 5'-TGAAGGTGGATGATTGCTAAGT-3'

3.3. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

3.3.1. Transfección e infección

Con el fin de obtener lentivirus, se co-transfectó en células HEK293(F)T el plásmido de transferencia lentiCRISPRv2 junto con los plásmidos de empaquetamiento psPAX2 (Addgene # 12260 ;<http://n2t.net/addgene:12260> ;RRID:Addgene_12260) y pMD2.G (Addgene # 12259 ;<http://n2t.net/addgene:12259> ;RRID:Addgene_12259) (amablemente cedidos por Didier Trono). Se realizaron transfecciones individuales, trabajando con 4 plásmidos específicos (lentiCRISPRv2-5K1sgRNA, lentiCRISPRv2-5K2sgRNA, lentiCRISPRv2-3K1sgRNA, lentiCRISPRv2-3K2sgRNA).

En primer lugar, se preparó una *Master Mix PEI*, que contenía medio Opti-MEM (Gibco) y PEI (*polyethylenimine*) 1 mg/ml (Sigma-Aldrich), y tantas *Master Mix* ADN como dianas genómicas se tienen. Estas últimas presentaban medio Opti-MEM, 3,2 µg de plásmido pPAX2, 1,6 µg de plásmido pMD2.G y 5 µg del plásmido específico correspondiente. Tras esperar 5 min, se añadió *Master Mix PEI* a cada una de las *Master Mix* ADN, y se incubó 25 min a temperatura ambiente para que el PEI se mezclase con los plásmidos. Entretanto, se cambió el medio de placas HEK293(F)T a medio nuevo DMEM suplementado con FBS (10% v/v), pero sin antibiótico (para facilitar la transfección). Transcurridos los 25 min, se añadió la mezcla PEI/ADN a las placas y se incubaron 48 h en condiciones estándar. Tras este tiempo, se recogió el medio de todas las placas de la misma condición, se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 min a 22°C (*NEYA 16R Bench Top Centrifuge*, Remi), y el sobrenadante con los lentivirus se guardó a 4°C en la nevera. Se añadió medio nuevo (con FBS al 10% v/v, pero sin antibiótico) a las placas y se incubaron en condiciones estándar. El medio se recogió al día siguiente de nuevo (72 h con respecto al día de la transfección) y se centrifugó en idénticas condiciones, guardando los sobrenadantes a 4°C.

Previamente a la infección, los sobrenadantes se filtraron usando filtros de jeringa estériles (PES, 25 mm, 0.45 μm , Scharlab), y fueron divididos en alícuotas en función de las combinaciones de sgRNA deseadas (mezclando 48 h y 72 h), así como del número de placas de las distintas líneas celulares a infectar (SKOV-3 y IOSE-80 hTERT) con cada una de dichas combinaciones.

Tras lavar las células con DPBS (1X), se añadieron las alícuotas con los lentivirus correspondientes y se incubaron las placas en condiciones estándar durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de las placas y se llevó a cabo la segunda infección; la tercera infección se realizó a las 6 h. En los tres casos, las alícuotas fueron suplementadas con polibreno (8 mg/ml, Sigma-Aldrich) en proporción 1:1000, el cual fue filtrado anteriormente con filtros de 0,22 μm de tamaño de poro (Scharlab). Este polímero catiónico neutraliza la repulsión de cargas que existe entre los lentivirus y el ácido siálico de la membrana celular, incrementando así la eficacia del proceso de infección. El cambio a medio DMEM suplementado normal se hizo a las 6 h, lavando previamente las células con DPBS (1X). El período de incubación (condiciones estándar) fue de 48 h. Transcurrido este tiempo, se trataron las células (infectadas y control) con el antibiótico de selección puromicina (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich), añadiendo medio DMEM nuevo suplementado normal. Previamente, se lavaron las placas con DPBS (1X). Se incubaron durante 14 días en condiciones estándar, reforzando el aporte de puromicina tras la primera semana. Finalizado este período de tiempo se cambió el medio a DMEM suplementado normal, pero sin puromicina, con el objetivo de favorecer el crecimiento de los candidatos supervivientes al antibiótico de selección.

3.3.2. Aislamiento de clones por dilución (*Single Cell Cloning*)

En primer lugar, las células supervivientes al tratamiento con puromicina se lavaron con DPBS (1X) y se levantaron con tripsina, bloqueándola con DMEM suplementado normal, añadiendo al menos un volumen el doble de la cantidad de tripsina usada. La suspensión celular resultante se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 5 min (*NEYA 16R Bench Top Centrifuge*, Remi) a 22°C y el *pellet* se resuspendió con DMEM suplementado normal. A continuación, 50 μl de la suspensión celular se mezclaron con azul tripán (ThermoFisher Scientific) en una relación 1:1. Tras un período de espera de 2 min, se realizó el recuento de células con ayuda de un hemocitómetro y se ajustó a 100000 células/ml la concentración de la suspensión celular, empleando DMEM suplementado normal. A partir de esta suspensión se realizó una serie de diluciones con DMEM suplementado normal, añadiendo finalmente 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de la suspensión resultante en placas de cultivo estándar de 96 pocillos, con el objetivo de tener 1 célula/pocillo. Las placas se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% CO_2 hasta observar formación de colonias, interesando aquellas procedentes de una única célula (clones). Tras alcanzar una confluencia ~80%, se hicieron pases de los candidatos de interés a placas de cultivo estándar de 24 pocillos y, posteriormente, a placas de cultivo estándar de 100 mm de diámetro.

3.3.3. Congelación de células

Este procedimiento se aplicó de forma rutinaria durante todo el desarrollo del proyecto. Las células se levantaron con tripsina, desactivada con DMEM suplementado normal, añadiendo al menos un volumen el doble de la cantidad de tripsina empleada. La suspensión celular resultante se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 min a 22°C (*NEYA 16R Bench Top Centrifuge*, Remi). El *pellet* obtenido se resuspendió con medio DMEM suplementado normal. Por último, la suspensión celular se repartió en crioviales, añadiendo a cada uno de ellos medio de congelación de cultivos celulares (*Dimethyl sulfoxide*, DMSO, Sigma-Aldrich) en un ratio 1:1. Los crioviales se almacenaron a -80°C.

3.4. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Para diseñar los oligonucleótidos de las PCR y qPCR en tiempo real se utilizó el programa OligoCalc de Biotoools (<http://biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y la herramienta PrimerQuest™ de IDT (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/primerquest>), respectivamente. Para el diseño de los sgRNA se recurrió al servidor Benchling (<https://www.benchling.com/>). Para hacer los alineamientos múltiples de la secuenciación se empleó el servidor Clustal Omega de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cuantificar el nivel de expresión génica relativa se recurrió al método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001), presentando los resultados como media de tres medidas independientes y su desviación estándar correspondiente. La expresión de MALAT1 en los candidatos potenciales de las líneas celulares usadas se comparó con la del *Wt* correspondiente a través de la prueba t Student. Se asumió que la diferencia era estadísticamente significativa cuando * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ o **** $p \leq 0.0001$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obtención de mutantes *knockout* del lncRNA MALAT1 mediante la tecnología CRISPR/Cas9 implicó las siguientes etapas: clonaje de los crRNA en plásmidos de transferencia lentiviral, producción y transducción lentiviral y, por último, aislamiento de clones celulares individuales portadores de deleciones heterocigotas u homocigotas (Aparicio-Prat et al., 2015).

4.1. CLONAJE DE LOS DISTINTOS CRRNA

La eliminación de secuencias genómicas mediante CRISPR/Cas9 requiere la introducción de sgRNAs y Cas9 en las células diana mediante vectores lentivirales. En este sentido, en el presente proyecto se generaron plásmidos lentivirales CRISPR dirigidos a un solo locus genómico mediante clonaje de los crRNA en el plásmido de transferencia lentiCRISPRv2 (Figura 1). Este vector porta tres casetes de expresión: hSpCas9, el sgRNA quimérico y el gen de resistencia a puromicina (*puromycin-N-acetyltransferase, pac*), flanqueados por las repeticiones terminales largas (*Long-Terminal Repeats, LTRs*). También presenta el gen *Bla* (*beta-lactamase*), que proporciona resistencia a la ampicilina, característica que posibilita la selección de las bacterias transformantes. Además, es susceptible de digestión por la enzima de restricción *BsmBI*.

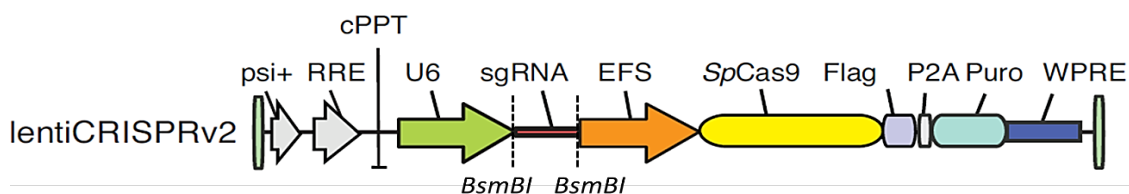


Figura 1. Esquema del plásmido de transferencia lentiCRISPRv2 (Sanjana et al., 2014).

El clonaje se llevó a cabo tal como se describe en el apartado 3.2.1. Se diseñaron cuatro construcciones diferentes destinadas a deletar fragmentos de distinto tamaño del lncRNA objetivo (Figura 2): lentiCRISPRv2-5K1sgRNA y lentiCRISPRv2-5K2sgRNA (cuyo objetivo es eliminar las primeras 5 Kpb de la región genómica de MALAT1), y lentiCRISPRv2-3K1sgRNA junto con lentiCRISPRv2-3K2sgRNA (para suprimir sus últimas 3 Kpb).

Los productos de ligamiento se transformaron en células químicamente competentes *E. coli* ECOSTM Blue (apartado 3.2.2.), bacteria deficiente en sistemas de recombinación, evitando así eventos indeseados por la presencia de secuencias LTR (Sanjana et al., 2014; Shalem et al., 2014). La presencia de las construcciones lentiCRISPRv2-sgRNA en las colonias candidatas se verificó mediante PCR de colonias, comprobando cinco candidatos por construcción. Los resultados obtenidos se examinaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 2). Para el desarrollo de la PCR se usaron los pares de cebadores AJVV236f/AJVV237r (lentiCRISPRv2-5K1sgRNA), AJVV238f/AJVV239r

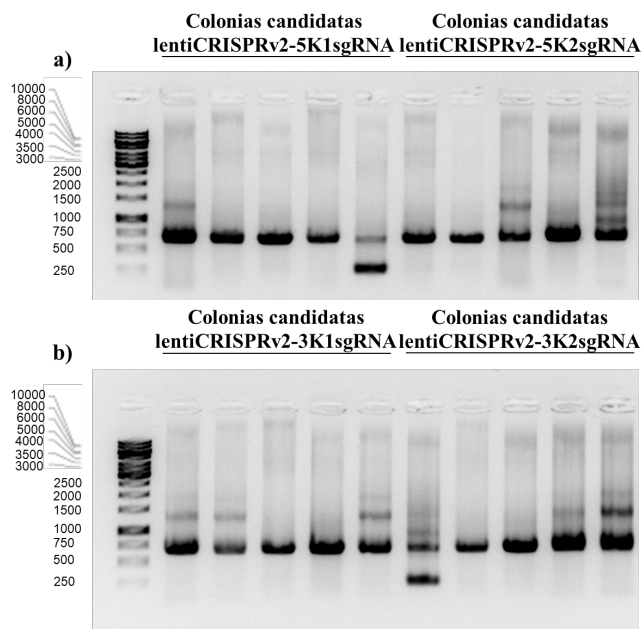


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los insertos de las construcciones lentiCRISPRv2-sgRNA.

(lentiCRISPRv2-5K2sgRNA), AJVV240f/ AJVV241r (lentiCRISPRv2-3K1sgRNA) y AJVV242f/AJVV243r (lentiCRISPRv2-3K2sgRNA) (Tabla 1, Figura 3). Tras aislar y purificar el ADN plasmídico de las colonias positivas, se cuantificó y evaluó su pureza por espectrofotometría. Las muestras de ADN plasmídico purificado fueron empleadas posteriormente en el proceso de transfección.

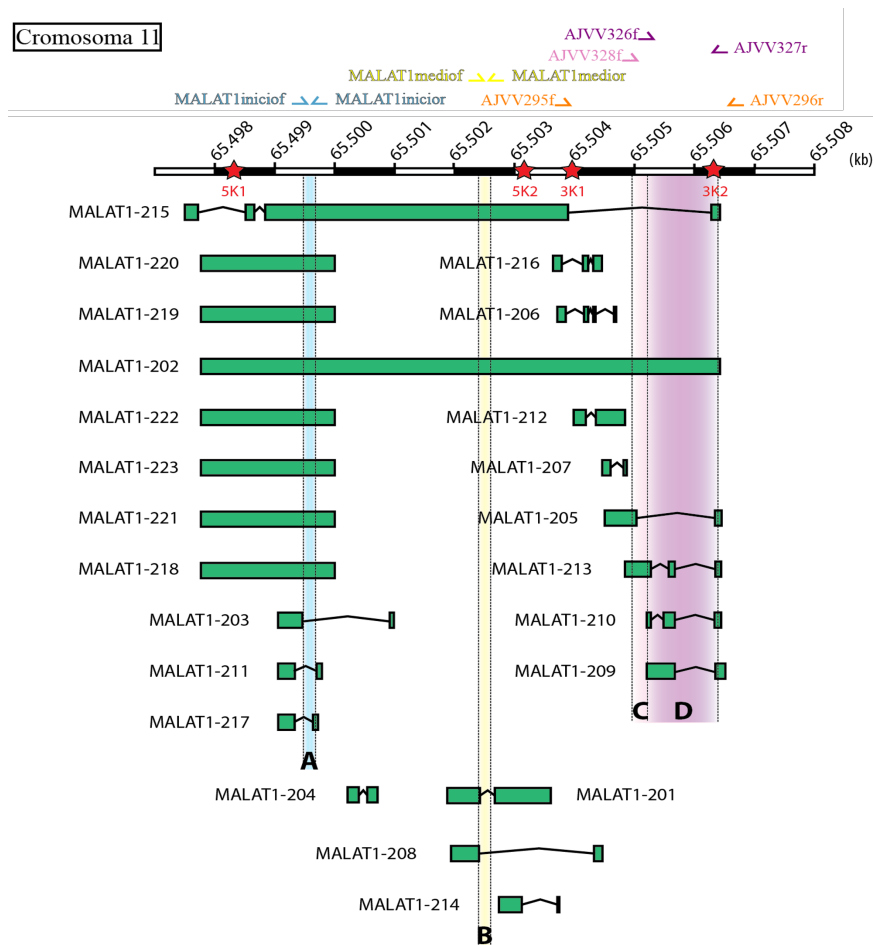


Figura 3. Esquema de la región del genoma donde se localiza MALAT1. Se indican todos los transcritos, así como las posiciones en las que anillan los cebadores empleados a lo largo del proyecto. *Leyenda de los cebadores:* **A** = MALAT1iniciof/MALAT1inicior; **B** = MALAT1mediof/MALAT1medior; **C** = AJVV328f/ AJVV327r; **D** = AJVV326f/AJVV327r; **5K1** = AJVV236f/AJVV237r (lentiCRISPRv2-5K1sgRNA); **5K2** = AJVV238f/AJVV239r (lentiCRISPRv2-5K2sgRNA); **3K1** = AJVV240f/AJVV241r (lentiCRISPRv2-3K1sgRNA); **3K2** = AJVV242f/AJVV243r (lentiCRISPRv2-3K2sgRNA).

4.2. PRODUCCIÓN Y TRANSDUCCIÓN LENTIVIRAL

La obtención de lentivirus implicó la co-transfección del plásmido de transferencia lentiCRISPRv2 junto con los plásmidos de empaquetamiento psPAX2 y pMD2.G en células HEK293(F)T. En este proyecto se efectuaron transfecciones con los plásmidos específicos lentiCRISPRv2-5K1sgRNA, lentiCRISPRv2-5K2sgRNA, lentiCRISPRv2-3K1sgRNA y lentiCRISPRv2-3K2sgRNA de manera individual, tal como se indica en el apartado 3.3.1. Una vez obtenidos, recogidos y filtrados los lentivirus, se realizaron las infecciones, tal como se recoge en el mismo apartado. Debido a la dificultad que conlleva el sistema CRISPR/Cas9, fue necesario realizar tres experimentos espaciados en el tiempo. En la Tabla 3 se muestran las líneas celulares humanas testadas, así como los vectores lentivirales con los que fueron infectadas las células en cada experimento (infecciones individuales o combinadas).

Tabla 3. Experimentos de infección realizados durante el proyecto. Se indican las líneas celulares humanas testadas, así como los lentivirus con los que fueron infectadas las células en cada experimento. lentiCRISPRv2-5K1sgRNA=5K1, lentiCRISPRv2-5K2sgRNA=5K2, lentiCRISPRv2-3K1sgRNA=3K1, lentiCRISPRv2-3K2sgRNA=5K2.

Línea celular humana	SKOV-3	IOSE-80 hTERT
Experimento 1	2 placas 5K1+5K2	2 placas 5K1+5K2
	2 placas 3K1+3K2	2 placas 3K1+3K2
Experimento 2	2 placas 5K1+5K2	2 placas 5K1+5K2
	2 placas 3K1+3K2	2 placas 3K1+3K2
Experimento 3	1 placa 5K1+5K2	1 placa 5K1+5K2
	1 placa 3K1, 1 placa 3K2	1 placa 3K1, 1 placa 3K2
	1 placa 5K1, 1 placa 5K2	1 placa 5K1, 1 placa 5K2

La delección de la secuencia objetivo depende del corte simultáneo en dos posiciones en uno o más alelos por la endonucleasa Cas9. Además, dicho corte constituye un evento fortuito con una eficiencia determinada (Aparicio-Prat et al., 2015). Por tanto, cabría esperar que las poblaciones celulares obtenidas tras el proceso de infección presentasen una mezcla de células *Wt* y candidatos *knockout*, tanto heterocigotos como homocigotos. Por este motivo, una vez completada la transducción lentiviral, se usó el antibiótico puromicina para seleccionar las células portadoras del vector lentiCRISPRv2 (pues este contiene el gen *pac*, que confiere resistencia a la puromicina). El tratamiento de células no infectadas SKOV-3 e IOSE-80 hTERT con dicho antibiótico sirvió como control negativo en los diferentes experimentos. Tras un período de incubación de 14 días, se cambió el medio a DMEM suplementado normal sin puromicina para favorecer el crecimiento de los candidatos supervivientes a la etapa de selección.

En el caso del experimento 1, estas condiciones de incubación se mantuvieron durante siete semanas; tras este tiempo, no se detectó crecimiento celular, independientemente de la combinación lentiCRISPRv2-sgRNA. En el experimento 2 se observó que únicamente sobrevivían las células portadoras del inserto combinado 3K1sgRNA + 3K2sgRNA (independientemente de la línea celular). Estos candidatos requirieron de un total de cinco semanas y media para alcanzar la confluencia necesaria para realizar el aislamiento de clones. En el experimento 3 solo se vio supervivencia celular en los candidatos SKOV-3 portadores de los insertos individuales 3K1sgRNA y 3K2sgRNA; dado que tras cinco semanas no habían alcanzado una confluencia suficiente para someterlos al aislamiento de clones, estos candidatos continúan en expansión. Los resultados obtenidos podrían indicar que los sgRNA dirigidos a las primeras 5 Kpb de la región genómica de MALAT1 dan lugar a mutantes no viables.

4.3. SINGLE CELL CLONING DE LÍNEAS CELULARES KNOCKOUT

Existen diversos métodos para aislar células individuales de candidatos supervivientes a la selección con puromicina, siendo el objetivo final la producción de poblaciones celulares derivadas de clones *knockout*.

Dos de las estrategias más usadas para generar clones de células individuales son la clasificación de células activadas por fluorescencia (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS) y el aislamiento de clones mediante dilución (Giuliano et al., 2019). Normalmente la técnica FACS presenta mayor eficacia y requiere menos tiempo debido a su capacidad de detección del fenotipo mediante citometría de flujo, pudiendo aislar directamente células portadoras de delecciones (heterocigóticas u homocigóticas) sin necesidad de genotipado posterior (Liao et al., 2016).

A pesar de su mayor duración temporal, se seleccionó la metodología *Single cell cloning* como alternativa a seguir en el presente proyecto, tal y como se refleja en el apartado 3.3.2. Como se mencionó anteriormente, esta técnica solo se aplicó a las células portadoras del inserto combinado 3K1sgRNA + 3K2sgRNA del experimento 2. Aunque se observó formación de colonias clonales en ambas líneas celulares testadas, los candidatos seleccionados de la línea IOSE-80 hTERT (37) requirieron menos tiempo que los de la línea SKOV-3 (23) para lograr una confluencia ~80% (cuatro semanas frente a diez semanas, respectivamente). Estos 60 candidatos se expandieron primero en placas de cultivo estándar de 24 pocillos durante siete (IOSE-80 hTERT) y tres (SKOV-3) semanas. A continuación, se seleccionaron los candidatos *knockout* con una mayor densidad celular de ambas líneas y se expandieron (por triplicado) en placas de cultivo estándar de 100 mm de diámetro durante ocho (6 candidatos IOSE-80 hTERT: *KO 1 – KO 6*, ambos incluidos) y seis (11 candidatos SKOV-3: *KO 7 – KO 17*, ambos incluidos) semanas, respectivamente.

Transcurrido este tiempo, se purificó el ARN total de estos 17 candidatos, junto con el de las líneas celulares *Wt* (ver apartado 3.2.6), y se cuantificó y evaluó su pureza por espectrofotometría. A partir de estas muestras se sintetizó ADNc (ver apartado 3.2.6.), usado posteriormente como molde para validar la edición genómica mediante qPCR en tiempo real. También se extrajo el ADN genómico de los distintos candidatos, junto con los de las líneas celulares *Wt* (ver apartado 3.2.3.), y se cuantificó y evaluó su pureza por espectrofotometría. Algunas de estas muestras fueron empleadas más tarde como molde para evaluar la eficacia de la tecnología CRISPR/Cas9 en la delección de regiones genómicas mediante PCR convencional.

4.4. EFICACIA DE LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9 EN LA SUPRESIÓN DE SECUENCIAS GENÓMICAS

En primer lugar, se validó la edición genómica de MALAT1 mediante qPCR a tiempo real, tal como se recoge en el apartado 3.2.6. Se quería comprobar si la supresión de la región genómica comprendida entre las regiones 3K1 y 3K2 de MALAT1 (Cromosoma 11: 65.504.069-65.506.165) (*Figura 3*) afectaba a los niveles de transcripción de su ARNm. Además de los controles *Wt*, se evaluó una selección de clones *knockout* (heterocigotos y/u homocigotos) constituida por los candidatos *KO 1 – KO 17* (ambos incluidos). Se usaron los pares de cebadores MALAT1iniciof/MALAT1inicior y MALAT1mediof/MALAT1medior (*Tabla 2, Figura 3*). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente según como se indica en el apartado 3.5. En la *Tabla 4* se muestra un ejemplo de los pasos a seguir para el cálculo del nivel de expresión génica relativa a través del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, su desviación estándar (*Standard Deviation, SD*) y el p-valor obtenidos con los dos pares de cebadores para los distintos candidatos *knockout* se recogen en la *Tabla 5a* y *Tabla 5b* (*Anexos*).

Tabla 4. Ejemplo de los pasos a seguir para calcular los niveles de expresión relativa del ARNm de MALAT1 a través del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. *Caso ejemplo:* análisis estadístico para el candidato *KO 1* de la línea celular IOSE-80 hTERT y el control positivo correspondiente. Niveles de ARNm normalizados con respecto a GAPDH. Amplicón analizado: MALAT1_A.

Línea celular	Amplicón	Muestra	C _t MALAT1_A	C _t GAPDH	ΔC_t	$2^{-\Delta C_t}$	Media $2^{-\Delta C_t}$	Nivel de expresión relativa
IOSE-80 hTERT	MALAT1_A	<i>KO 1</i>	22,629	21,493	1,136	0,455	0,402	0,399
			23,050	21,708	1,342	0,394		
			23,565	22,080	1,485	0,357		
		<i>Wt</i>	23,083	23,130	-0,048	1,034	1,009	1,000
			23,291	23,292	-0,0004	1,000		
			23,761	23,752	0,009	0,994		

Los resultados parecían revelar una delección exitosa de MALAT1 mediante tecnología CRISPR/Cas9 en ambas líneas celulares (*Figura 4a* y *Figura 4b*). Todos los candidatos *knockout* lograron fuertes reducciones en los niveles de ARNm (entre el 60% y casi el 100%) respecto a las células control. Se observó una excepción, el clon *KO 1 para MALAT1_B*, que mostró una disminución moderada de los niveles de ARNm, de en torno al 30%. Cabe señalar que, en general, para un mismo candidato, MALAT1iniciof/MALAT1inicior y MALAT1mediof/MALAT1medior proporcionaron valores similares de reducción de la transcripción, a pesar de diferir en la cantidad de transcritos que pueden detectar (*Figura 3*).

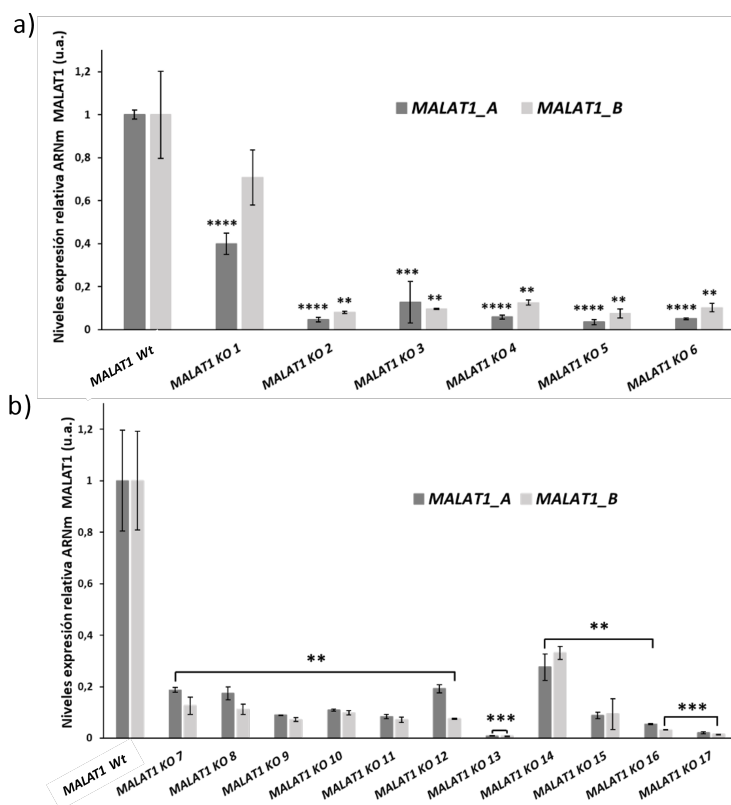


Figura 4. Análisis qPCR en tiempo real de los niveles de expresión relativa del ARNm de MALAT1 en los candidatos *knockout* (a) *KO 1 - KO 6*, ambos incluidos (línea celular IOSE-80 hTERT) y (b) *KO 7 - KO 17*, ambos incluidos (línea celular SKOV-3), y en sus respectivos controles. Amplicones analizados: MALAT1_A y MALAT1_B. Niveles de ARNm normalizados con respecto a GAPDH. Las barras de error señalan la SD de tres réplicas técnicas. Significación estadística: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Posteriormente, se validaron dichos *knockout* MALAT1 a nivel de ADN genómico. Si la reducción de los niveles de ARNm es consecuencia del corte de la Cas9 en la secuencia objetivo, la delección generada podría ser detectada mediante cambios en la longitud de dicha región genómica mediante PCR convencional (apartado 3.2.4.), utilizando cebadores que flanqueen la región eliminada. Junto a los controles, se evaluaron los candidatos *KO 2*, *KO 5*, *KO 6*, *KO 13* y *KO 16*, empleando los cebadores AJVV295f y AJVV296r (*Tabla 1*). Los resultados obtenidos se examinaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (*Figura 5*). En principio, parecen indicar que ningún candidato es portador de la delección, pues el tamaño de esta debería ser 2 Kpb. En consecuencia, si algún clon hubiese experimentado dos cortes por la Cas9 (en uno o ambos alelos) se generaría un fragmento de unas 300 pb (*Figura 6a*). Para tratar de explicar la ausencia de delección en los candidatos, se plantearon diferentes hipótesis. Una de ellas fue que, a pesar de haber co-infectado las células con dos lentivirus (lentiCRISPRv2-3K1sgRNA + lentiCRISPRv2-3K2sgRNA), estas podrían haber integrado únicamente una de las construcciones. También se hipotetizó que, aunque las células portasen el inserto combinado 3K1sgRNA + 3K2sgRNA, una de las guías podía no ser funcional. En ambos casos, se produciría un único corte en el genoma (*Figura*

6b). De este modo, no tendría lugar la disrupción de MALAT1 por delección del fragmento comprendido entre las regiones 3K1 y 3K2, y se obtendría una sola banda en el gel (de ~2,5 Kpb). Por último, cabe la posibilidad de que la región genómica incluida entre 3K1 y 3K2 sufriera un fenómeno de inversión que implicase cambios profundos en el plegamiento de los distintos transcritos de MALAT1, como ya ha sido observado en trabajos previos (Aparicio-Prat *et al.*, 2015).

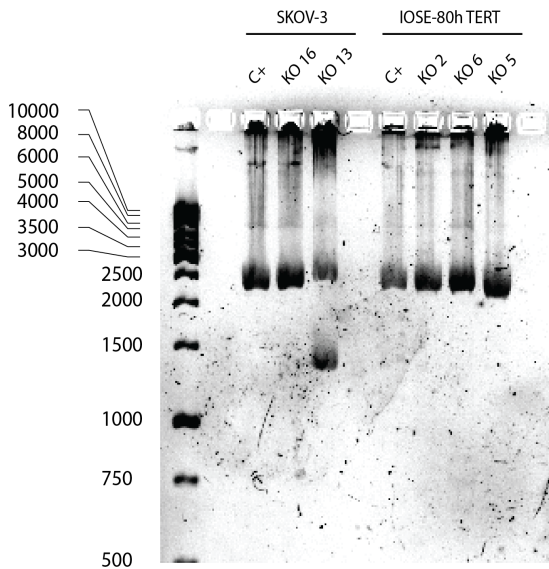


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del ADN genómico de los candidatos *KO 2*, *KO 5*, *KO 6*, *KO 13* y *KO 16*. Como controles positivos se usaron los correspondientes *Wt*.

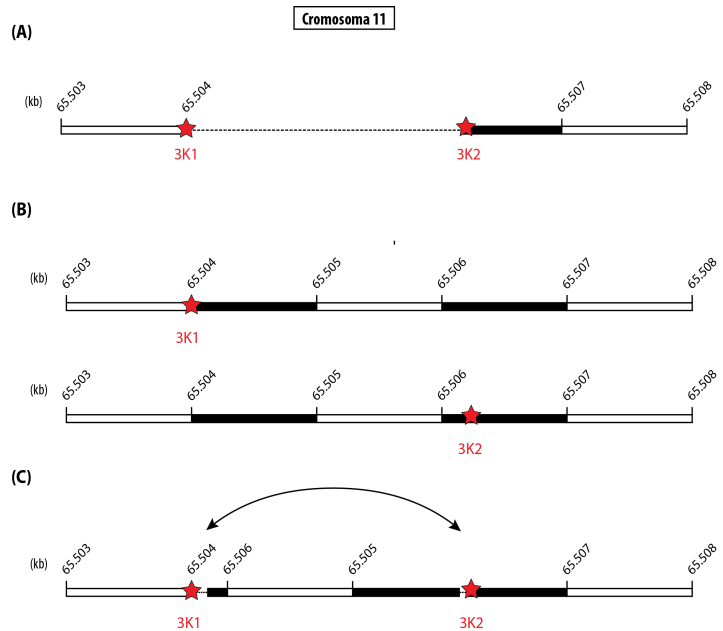


Figura 6. Esquema que teoriza sobre las posibles lesiones producidas en la región genómica de MALAT1. **A)** Delección de la región comprendida entre 3K1 y 3K2 tras la incorporación del inserto combinado 3K1sgRNA + 3K2sgRNA (situación ideal). **B)** Situación si uno de los sgRNAs no se integra o no es funcional. **C)** Situación de inversión tras la delección.

Para tratar de validar alguna de las anteriores hipótesis, se analizaron mediante secuenciación Sanger los productos de PCR convencional de los candidatos *KO 2*, *KO 5*, *KO 6*, *KO 13* y *KO 16*, utilizando de nuevo los cebadores AJVV295f y AJVV296r (Tabla 1). Para ello, las muestras fueron enviadas a las instalaciones de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la UDC.

Los datos obtenidos tras la secuenciación arrojaron resultados dispares. En la región 3K1, ningún candidato de ambas líneas celulares posee un *INDEL* (inserción o delección) posterior a la secuencia PAM, que se producen habitualmente tras escisión por la actividad nucleasa de Cas9, seguida de reparación por el sistema NHEJ (Figura 7a). No obstante, a partir de la posición ~430 nt se observa duplicidad de señales en los electroferogramas (Figura 8a, Anexos), lo que podría estar indicando un fenómeno de inversión entre las regiones 3K1 y 3K2 en uno de los alelos de dichos candidatos (Figura 6c).

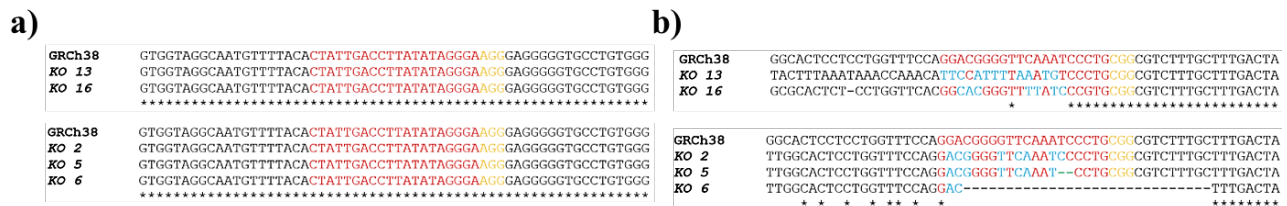


Figura 7. Alineamientos múltiples de los candidatos *knockout KO 13*, *KO 16*, *KO 2*, *KO 5* y *KO 6* en comparación con el genoma de referencia GRCh38 de humanos en la región (a) chr11 65.504.049 – 65.504. 108 y (b) chr11 65.506.128 – 65.506.186. En rojo se indica la zona de anillamiento del crRNA para los sgRNA; naranja, secuencia PAM; azul, mutaciones; -, delección; *, correspondencia.

La secuenciación de la región situada en torno a 3K2 proporcionó resultados diferentes. En la *Figura 7b* se observa que los candidatos de la línea celular SKOV-3 (*KO 13* y *KO 16*) parecen portar una delección de longitud indeterminada en la zona 3K2. Esto se debe a que se obtuvieron de nuevo lecturas de secuencias solapantes en los electroferogramas (*Figura 8b, Anexos*). No obstante, estos resultados también son compatibles con un fenómeno de inversión de la región incluida entre 3K1 y 3K2 (*Figura 6c*). En cuanto a los candidatos de la línea celular IOSE-80 hTERT, el clon *KO 6* es el que mostró la delección más evidente (28 posiciones con respecto al genoma de referencia GRCh38 de humanos) en la región 3K2. Se concluyó que los clones *KO 2* y *KO 5* no estaban mutados de manera significativa, pues el primero no presentó ningún INDEL, y el segundo una delección de dos nucleótidos, con respecto al genoma de referencia (*Figura 7b*). No obstante, también se dieron problemas de duplicidad de señales a partir de la posición ~330 nt (*Figura 8b, Anexos*).

En todos los casos, los electroferogramas reflejaron un alto grado de ambigüedad en la lectura de las secuencias, dificultando la interpretación de los resultados obtenidos. Por este motivo, se concluyó que sería conveniente repetir las secuenciaciones y se propusieron dos estrategias de optimización. La primera consiste en aislar (rescatar) los amplicones observados en el gel de electroforesis de la *Figura 4* previamente a la secuenciación. La segunda opción implicaría clonar los productos de PCR individualmente en un vector plasmídico, y secuenciar dichos clones (Giuliano et al., 2019).

En base a lo expuesto anteriormente, se decidió optimizar la caracterización de los candidatos *KO 6* y *KO 13*, en el sentido de definir de forma más eficaz la región genómica mutada en cada uno de ellos. El clon *KO 6* se seleccionó por ser portador de la delección de mayor tamaño, y el *KO 13* por ser el candidato de la línea SKOV-3 que mostró una reducción más fuerte de los niveles de expresión relativa en las pruebas qPCR en tiempo real (*Figura 4b*).

Para ello se realizaron nuevos experimentos de qPCR en tiempo real (apartado 3.2.6), usando los pares de cebadores AJVV326f/ AJVV328f y AJVV326f/ AJVV327r, que abarcan gran parte de la región comprendida entre 3K1 y 3K2 (*Figura 3*). Aunque el objetivo era tratar de caracterizar mejor a *KO 6* y *KO 13*, también se incluyeron los candidatos *KO 2*, *KO 5* y *KO 16*. Los resultados del análisis estadístico con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (apartado 3.5., *Tabla 4*) se resumen en la *Tabla 6* (*Anexos*). En la *Figura 9* se observa una reducción total de los niveles de expresión relativa de ARNm de MALAT1, independientemente del candidato. Atendiendo a la *Figura 3*, parece que el transcrito MALAT1-202 es el principal responsable de dichos descensos. Esto concuerda con las curvas de naturalización-renaturalización obtenidas, en las que se vio un único pico, indicando la presencia de un solo amplicón.

Actualmente existe poca información y consenso acerca del papel que desempeña MALAT1 en el proceso de metástasis en COE. En este trabajo se intentó hacer una primera aproximación al tema usando genes asociados al proceso de EMT; en concreto, se trabajó con CDH1, CDH2, vimentina, HAKKAI, NF- κ B, HMGB1 y HMGB2, evaluándolos en los candidatos *KO 13* (línea SKOV-3) y *KO 6* (línea IOSE-80 hTERT). MALAT1 podría actuar sobre el proceso metastásico de forma indirecta a través de dichos marcadores moleculares. El análisis estadístico de los datos obtenidos por qPCR en tiempo real (apartado 3.5., *Tabla 4*) se resume en la *Tabla 7* (*Anexos*).

Aunque los resultados obtenidos son preliminares y requieren estudios en mayor profundidad, parece existir un patrón diferente entre la línea celular sana y la cancerosa (*Figura 10*). En el caso de *KO 13*, están activados genes ligados a la EMT, aunque las diferencias con respecto al *Wt* no son estadísticamente significativas en la mayoría de los casos. Se observa que la CDH2 sigue un patrón de expresión similar en ambas líneas; su sobreexpresión indicaría que MALAT1 tiene función oncogénica. Sin embargo, CDH1 muestra un patrón contradictorio. Por otra parte, las proteínas del

grupo HMGB aparecen sobreexpresadas en la línea cancerosa, lo que concuerda con estudios previos (Gao et al., 2017). Según esto, MALAT1 tendría función supresora de la metástasis. Los resultados obtenidos reflejan la necesidad de seguir realizando estudios para poder esclarecer y establecer con mayor seguridad tanto la función como el mecanismo de regulación de MALAT1 en el COE.

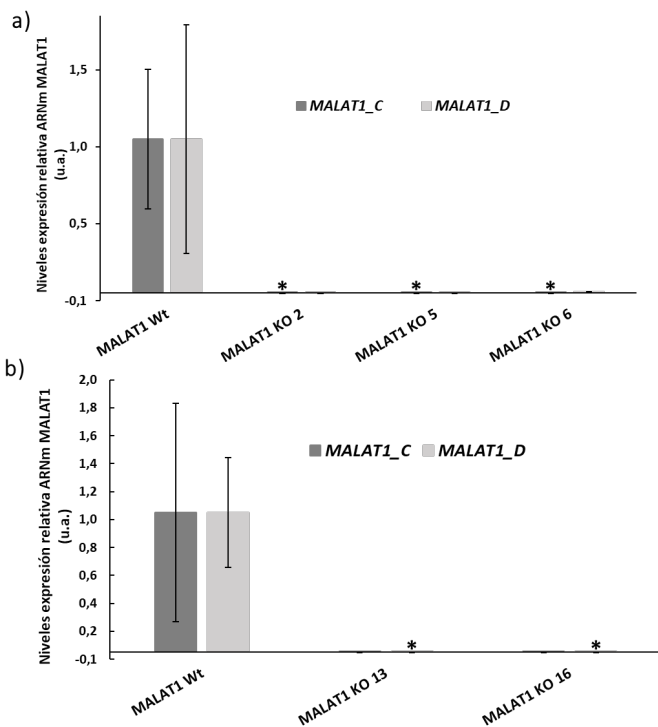
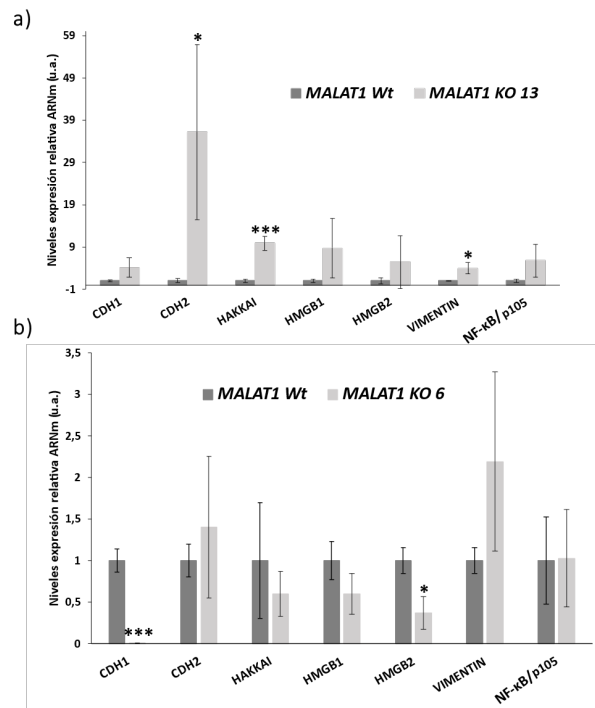


Figura 10. Análisis qPCR en tiempo real de los niveles de expresión relativa del ARNm de los genes CDH1, CDH2, HAKKAI, HMGB1, HMGB2, Vimentin y NF- κ B/p105 en el candidato (a) KO 13 (línea SKOV-3) y (b) KO 6 (línea IOSE-80 hTERT) y en sus respectivos controles: Niveles de ARNm normalizados respecto a GAPDH. Las barras de error señalan la SD de tres réplicas técnicas. Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Figura 9. Análisis qPCR en tiempo real de los niveles de expresión relativa del ARNm de MALAT1 en los candidatos *knockout* (a) KO 2, KO 5 y KO 6 (línea celular IOSE-80 hTERT) y (b) KO 13 y KO 16 (línea celular SKOV-3) y en sus respectivos controles. Amplicones analizados: MALAT1_C y MALAT1_D. Niveles de ARNm normalizados con respecto a GAPDH. Las barras de error señalan la SD de tres réplicas técnicas. Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.



5. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos y atendiendo a los objetivos específicos propuestos, se concluye lo siguiente:

- Los vectores lentivirales lentiCRISPRv2-3K1sgRNA y lentiCRISPRv2-3K2sgRNA, dirigidos a las últimas 3Kpb de la región genómica de MALAT1, han permitido obtener *knockouts* del lncRNA MALAT1 en la línea celular sana IOSE-80 hTERT y en la de cáncer de ovario epitelial SKOV-3.
- Los vectores lentivirales lentiCRISPRv2-5K1sgRNA y lentiCRISPRv2-5K2sgRNA, destinados a deletar las primeras 5 Kpb de la región genómica de MALAT1, parecen originar mutantes no viables.
- La validación de una selección de *knockouts* a nivel de ADN genómico y posterior secuenciación Sanger sugiere que la edición genómica podría no haber ocurrido de forma precisa. Se propone un posible fenómeno de inversión entre las regiones 3K1 y 3K2 en uno de los alelos de dichos candidatos.
- Los ensayos de qPCR en tiempo real con cebadores que abarcan la práctica totalidad de la región comprendida entre 3K1 y 3K2 sugieren que el transcrito MALAT1-202 es el principal responsable de las reducciones en los niveles de expresión génica detectados.
- Los ensayos de qPCR en tiempo real realizados para analizar el efecto de los mutantes *knockout* en el proceso de metástasis a través de genes asociados al proceso de EMT sugieren que MALAT1 está implicado en el proceso metastásico en COE. Sin embargo, no proporcionan un consenso en cuanto a su función como oncogén o supresor de tumores.

Debido a la duración limitada del presente proyecto y a la dificultad que conlleva la tecnología de edición genómica empleada, no se ha podido caracterizar en profundidad el efecto de la pérdida y/o ganancia de función de MALAT1 sobre la capacidad metastásica de las células de COE mediante la supresión dirigida de dicho lncRNA. De cara a continuar en esta línea de investigación, se propone realizar el *Single Cell Cloning* de los candidatos con el inserto individual 3K1 y 3K2. En cuanto a la secuenciación, se proponen dos estrategias de optimización: por un lado, rescate de los amplicones del gel de electroforesis y, por otro, clonación de los productos de PCR de manera individual en un vector plasmídico y posterior secuenciación clonal.

6. CONCLUSIONS

In view of the results obtained and attending to the specific objectives proposed, we conclude the following:

- Lentiviral vectors lentiCRISPRv2-3K1sgRNA and lentiCRISPRv2-3K2sgRNA, targeting the last 3Kpb of the MALAT1 genomic region, have allowed obtaining MALAT1 lncRNA knockouts in the healthy cell line IOSE-80 hTERT and in the epithelial ovarian cancer cell line SKOV-3.
- The lentiviral vectors lentiCRISPRv2-5K1sgRNA and lentiCRISPRv2-5K2sgRNA, targeting the first 5 Kpb of the MALAT1 genomic region, appear to give rise to nonviable mutants.
- Validation of a selection of knockouts at the genomic DNA level and subsequent Sanger sequencing suggests that genomic editing may not have occurred accurately. A possible inversion phenomenon between the 3K1 and 3K2 regions in one of the alleles of these candidates is proposed.
- Real-time qPCR assays with primers spanning virtually the entire region between 3K1 and 3K2 suggest that the MALAT1-202 transcript is primarily responsible for the reductions in gene expression levels detected.
- Real-time qPCR assays performed to analyze the effect of knockout mutants on the metastatic process through genes associated with the EMT process suggest that MALAT1 is involved in the metastatic process in COE. However, they do not provide a consensus as to its function as an oncogene or tumor suppressor.

Due to the limited duration of the present project and the difficulty involved in the genomic editing technology employed, it has not been possible to characterize in depth the effect of loss and/or gain of function of MALAT1 on the metastatic capacity of EOC cells by targeted deletion of this lncRNA. In order to continue this line of research, it is proposed to perform single cell cloning of the candidates with the 3K1 and 3K2 single insert. Regarding sequencing, two optimization strategies are proposed: on the one hand, rescue of the amplicons from the electrophoresis gel and, on the other hand, cloning of the PCR products individually in a plasmid vector and subsequent clonal sequencing.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abildgaard, C., Do Canto, L. M., Steffensen, K. D., & Rogatto, S. R. (2020). Long non-coding RNAs involved in resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, *9*, Article 1549. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01549>
- Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2018). Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *18*(1), 5–18. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99>
- Aparicio-Prat, E., Arnan, C., Sala, I., Bosch, N., Guigó, R., & Johnson, R. (2015). DECKO: Single-oligo, dual-CRISPR deletion of genomic elements including long non-coding RNAs. *BMC Genomics*, *16*, Article 846. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2086-z>
- Bai, L., Wang, A., Zhang, Y., Xu, X., & Zhang, X. (2018). Knockdown of MALAT1 enhances chemosensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin through inhibiting the Notch1 signaling pathway. *Experimental Cell Research*, *366*(2), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.03.014>
- Bolha, L., Ravnik-Glavač, M., & Glavač, D. (2017). Long noncoding RNAs as biomarkers in cancer. *Disease Markers*, 2017, Article 6218353. <https://doi.org/10.1155/2017/7243968>
- Braga, E. A., Fridman, M. V., Moscovtsev, A. A., Filippova, E. A., Dmitriev, A. A., & Kushlinskii, N. E. (2020). LncRNAs in ovarian cancer progression, metastasis, and main pathways: ceRNA and alternative mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8855. <https://doi.org/10.3390/ijms21228855>
- Brett M., R., Jennifer B., P., Thomas A., S. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine*, *14*(1), 9–32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>
- Cámara-Quílez, M., Barreiro-Alonso, A., Vizoso-Vázquez, Á., Rodríguez-Belmonte, E., Quindós-Varela, M., Lamas-Maceiras, M., & Cerdán, M. E. (2020). The HMGB1-2 ovarian cancer interactome: The role of HMGB proteins and their interacting partners MIEN1 and NOP53 in ovary cancer and drug-response. *Cancers*, *12*(9), Article 2435. <https://doi.org/10.3390/cancers12092435>
- Challa, A. A., & Stefanovic, B. (2011). A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(18), 3773–3789. <https://doi.org/10.1128/MCB.05263-11>
- Chen, M., Mao, A., Xu, M., Weng, Q., Mao, J., & Ji, J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Letters*, *447*, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017>
- Coburn, S. B., Bray, F., Sherman, M. E., & Trabert, B. (2017). International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype. *International Journal of Cancer*, *140*(11), 2451–2460. <https://doi.org/10.1002/ijc.30676>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), Article 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E. M., Behrens, J., Sommer, T., & Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature Cell Biology*, *4*(3), 222–231. <https://doi.org/10.1038/ncb758>
- Gao, D., Lv, A. E., Li, H. P., Han D. H., Zhang Y. P. (2017). LncRNA MALAT-1 elevates HMGB1 to promote autophagy resulting in inhibition of tumor cell apoptosis in multiple myeloma. *Journal of Cellular Biochemistry*, *118*(10), 3341–3348. <https://doi: 10.1002/jcb.25987>

- Gao, N., Li, Y., Li, J., Gao, Z., Yang, Z., Li, Y., Liu, H., & Fan, T. (2020). Long non-coding RNAs: The regulatory mechanisms, research strategies, and future directions in cancers. *Frontiers in Oncology*, *10*, Article 598817. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.598817>
- Giuliano, C. J., Lin, A., Girish, V., & Sheltzer, J. M. (2019). Generating single cell-derived knockout clones in mammalian cells with CRISPR/Cas9. *Current Protocols in Molecular Biology*, *128*, Article e100. <https://doi.org/10.1002/cpmb.100>
- Goyal, B., Yadav, S. R. M., Awasthee, N., Gupta, S., Kunnumakkara, A. B., & Gupta, S. C. (2021). Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of long non-coding RNA MALAT1 in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1875*(2), Article 188502. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188502>
- Gutschner, T., Hämmerle, M., & Diederichs, S. (2013). MALAT1 — a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. *Journal of Molecular Medicine*, *91*(7), 791–801. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1028-y>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P. M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W. E., Serve, H., & Müller-Tidow, C. (2003). MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, *22*(39), 8031–8041. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206928>
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, *2*, Article e00471. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>
- Kim, J., Piao, H.-L., Kim, B.-J., Yao, F., Han, Z., Wang, Y., Xiao, Z., Siverly, A. N., Lawhon, S. E., Ton, B. N., Lee, H., Zhou, Z., Gan, B., Nakagawa, S., Ellis, M. J., Liang, H., Hung, M.-C., You, M. J., Sun, Y., & Ma, L. (2018). Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nature Genetics*, *50*(12), 1705–1715. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0252-3>
- Lheureux, S., Braunstein, M., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *69*(4), 280–304. <https://doi.org/10.3322/caac.21559>
- Li, Z.-X., Zhu, Q.-N., Zhang, H.-B., Hu, Y., Wang, G., & Zhu, Y.-S. (2018). MALAT1: a potential biomarker in cancer. *Cancer Management and Research*, *10*, 6757–6768. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S169406>
- Liao, X., Makris, M., & Luo, X. M. (2016). Fluorescence-activated *Cell Sorting for Purification of Plasmacytoid Dendritic Cells from the Mouse Bone Marrow*. *Journal of Visualized Experiments*, *117*, Article 54641. <https://doi.org/10.3791/54641>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Marchese, F. P., Raimondi, I., & Huarte, M. (2017). The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biology*, *18*(1), Article 206. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1348-2>
- Meigs, T. E., Fedor-Chaiken, M., Kaplan, D. D., Brackenbury, R., & Casey, P. J. (2002). $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ negatively regulate the adhesive functions of cadherin. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(27), 24594–24600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201984200>
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., & Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the

- world: epidemiology and risk factors. *International Journal of Women's Health*, *11*, 287–299. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, *156*(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Rojas, V., Hirshfield, K., Ganesan, S., & Rodriguez-Rodriguez, L. (2016). Molecular Characterization of epithelial ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), Article 2113. <https://doi.org/10.3390/ijms17122113>
- Sabol, M., Calleja-Agius, J., Di Fiore, R., Suleiman, S., Ozcan, S., Ward, M. P., & Ozretić, P. (2021). (In)Distinctive role of long non-coding RNAs in common and rare ovarian cancers. *Cancers*, *13*(20), Article 5040. <https://doi.org/10.3390/cancers13205040>
- Salamini-Montemurri, M., Lamas-Maceiras, M., Barreiro-Alonso, A., Vizoso-Vázquez, Á., Rodríguez-Belmonte, E., Quindós-Varela, M., & Cerdán, M. E. (2020). The challenges and opportunities of lncRNAs in ovarian cancer research and clinical use. *Cancers*, *12*(4), Article 1020. <https://doi.org/10.3390/cancers12041020>
- Sanjana, N. E., Shalem, O., & Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*, *11*(8), 783–784. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>
- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G., & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, *343*(6166), 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tripathi, M. K., Doxtater, K., Keramatnia, F., Zacheaus, C., Yallapu, M. M., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2018). Role of lncRNAs in ovarian cancer: defining new biomarkers for therapeutic purposes. *Drug Discovery Today*, *23*(9), 1635–1643. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.04.010>
- Wang, J., Lu, A., & Chen, L. (2019). LncRNAs in ovarian cancer. *Clinica Chimica Acta*, *490*, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.12.013>
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Review series personal perspective Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1429–1437. <https://doi.org/10.1172/JCI36183.protected>
- Zhan, L., Li, J., & Wei, B. (2018). Long non-coding RNAs in ovarian cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *37*(1), Article 120. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0793-4>

ANEXOS

Tabla 5. Análisis estadístico de los niveles de expresión relativa del ARNm de MALAT1 mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en los candidatos *knockout* (a) *KO 1-KO 6*, ambos incluidos (línea celular IOSE-80 hTERT) y (b) *KO 7-KO 17*, ambos incluidos (línea celular SKOV-3), y en el control positivo correspondiente. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (nivel de expresión relativa), SD, y p-valor (Test t). Niveles de ARNm normalizados con respecto a GAPDH. Amplicones analizados: MALAT1_A y MALAT1_B.

a)		IOSE-80 hTERT					
		MALAT1_A			MALAT1_B		
Muestra	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	SD $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Test t	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	SD $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Test t	
<i>KO 1</i>	0,399	0,049	4,02E-05	0,708	0,128	1,02E-01	
<i>Wt</i>	1,000	0,021		1,000	0,202		
<i>KO 2</i>	0,046	0,010	2,30E-07	0,080	0,005	1,41E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,021		1,000	0,202		
<i>KO 3</i>	0,127	0,098	1,10E-04	0,095	0,002	1,50E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,021		1,000	0,202		
<i>KO 4</i>	0,058	0,009	2,36E-07	0,125	0,012	1,71E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,021		1,000	0,202		
<i>KO 5</i>	0,035	0,012	2,58E-07	0,076	0,021	1,41E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,021		1,000	0,202		
<i>KO 6</i>	0,050	0,004	1,71E-07	0,102	0,020	1,57E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,021		1,000	0,202		
b)		SKOV-3					
		MALAT1_A			MALAT1_B		
Muestra	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	SD $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Test t	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	SD $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Test t	
<i>KO 7</i>	0,187	0,008	1,98E-03	0,126	0,034	1,48E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 8</i>	0,174	0,024	1,90E-03	0,111	0,020	1,33E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 9</i>	0,089	0,002	1,28E-03	0,072	0,007	1,11E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 10</i>	0,108	0,005	1,39E-03	0,098	0,008	1,24E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 11</i>	0,083	0,008	1,25E-03	0,071	0,010	1,11E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 12</i>	0,192	0,016	2,03E-03	0,076	0,003	1,13E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 13</i>	0,009	0,001	9,27E-04	0,008	0,001	8,59E-04	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 14</i>	0,276	0,052	3,43E-03	0,332	0,025	3,93E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 15</i>	0,088	0,013	1,28E-03	0,094	0,060	1,45E-03	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 16</i>	0,054	0,002	1,11E-03	0,032	0,001	9,45E-04	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		
<i>KO 17</i>	0,020	0,004	9,68E-04	0,014	0,001	8,81E-04	
<i>Wt</i>	1,000	0,195		1,000	0,192		

Tabla 6. Análisis estadístico de los niveles de expresión relativa del ARNm de MALAT1 mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ en los candidatos *knockout* (a) *KO 2*, *KO 5* y *KO 6* (línea celular IOSE-80 hTERT) y (b) *KO 13* y *KO 16* (línea celular SKOV-3), y en su correspondiente control positivo. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (nivel de expresión relativa), SD, y p-valor (Test t). Niveles de ARNm normalizados con respecto a GAPDH. Amplicones analizados: MALAT1_C y MALAT1_D.

a)	IOSE-80 hTERT					
	MALAT1_C			MALAT1_D		
Muestra	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t
<i>KO 2</i>	1,98E-04	3,88E-05	1,87E-02	6,77E-04	5,36E-04	8,07E-02
<i>Wt</i>	1,000	0,453		1,000	0,745	
<i>KO 5</i>	1,68E-04	7,99E-05	1,87E-02	8,14E-04	1,27E-03	8,08E-02
<i>Wt</i>	1,000	0,453		1,000	0,745	
<i>KO 6</i>	1,74E-04	1,68E-05	1,87E-02	6,84E-03	3,09E-03	8,20E-02
<i>Wt</i>	1,000	0,453		1,000	0,745	
b)	SKOV-3					
	MALAT1_C			MALAT1_D		
Muestra	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t
<i>KO 13</i>	5,84E-04	5,11E-04	9,05E-02	3,72E-06	4,75E-06	1,16E-02
<i>Wt</i>	1,000	0,779		1,000	0,393	
<i>KO 16</i>	1,44E-03	4,91E-04	9,07E-02	9,23E-05	7,60E-05	1,16E-02
<i>Wt</i>	1,000	0,779		1,000	0,393	

Tabla 7. Análisis estadístico de los niveles de expresión relativa del ARNm de los genes CDH1, CDH2, HAKKAI, HMGB1, HMGB2, Vimentin y p105 mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ en los candidatos *knockout* *KO 13* (línea celular SKOV-3) y *KO 6* (línea celular IOSE-80 hTERT), y sus respectivos controles positivos. Se muestran los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, SD, y p-valor (Test t). Niveles de ARNm normalizados con respecto a GAPDH.

	CDH1			CDH2		
	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t
<i>KO 13</i>	4,134	2,316	8,00E-02	36,188	20,672	4,21E-02
<i>Wt</i>	1,000	0,232		1,000	0,468	
<i>KO 6</i>	0,006	0,003	2,71E-04	1,402	0,856	4,72E-01
<i>Wt</i>	1,000	0,143		1,000	0,196	
	HAKKAI			HMGB1		
	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t
<i>KO 13</i>	9,854	1,671	8,52E-04	8,719	6,996	1,29E-01
<i>Wt</i>	1,000	0,354		1,000	0,448	
<i>KO 6</i>	0,600	0,270	4,06E-01	0,601	0,247	1,08E-01
<i>Wt</i>	1,000	0,695		1,000	0,227	
	HMGB2			Vimentin		
	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	SD $2^{-\Delta\Delta C_t}$	Test t
<i>KO 13</i>	5,431	6,246	2,89E-01	3,970	1,392	2,10E-02
<i>Wt</i>	1,000	0,672		1,000	0,055	
<i>KO 6</i>	0,370	0,198	1,21E-02	2,192	1,080	1,31E-01
<i>Wt</i>	1,000	0,154		1,000	0,154	

Muestra	p105		
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	SD $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Test t
<i>KO 13</i>	5,738	3,935	1,06E-01
<i>Wt</i>	1,000	0,348	
<i>KO 6</i>	1,028	0,589	9,54E-01
<i>Wt</i>	1,000	0,529	

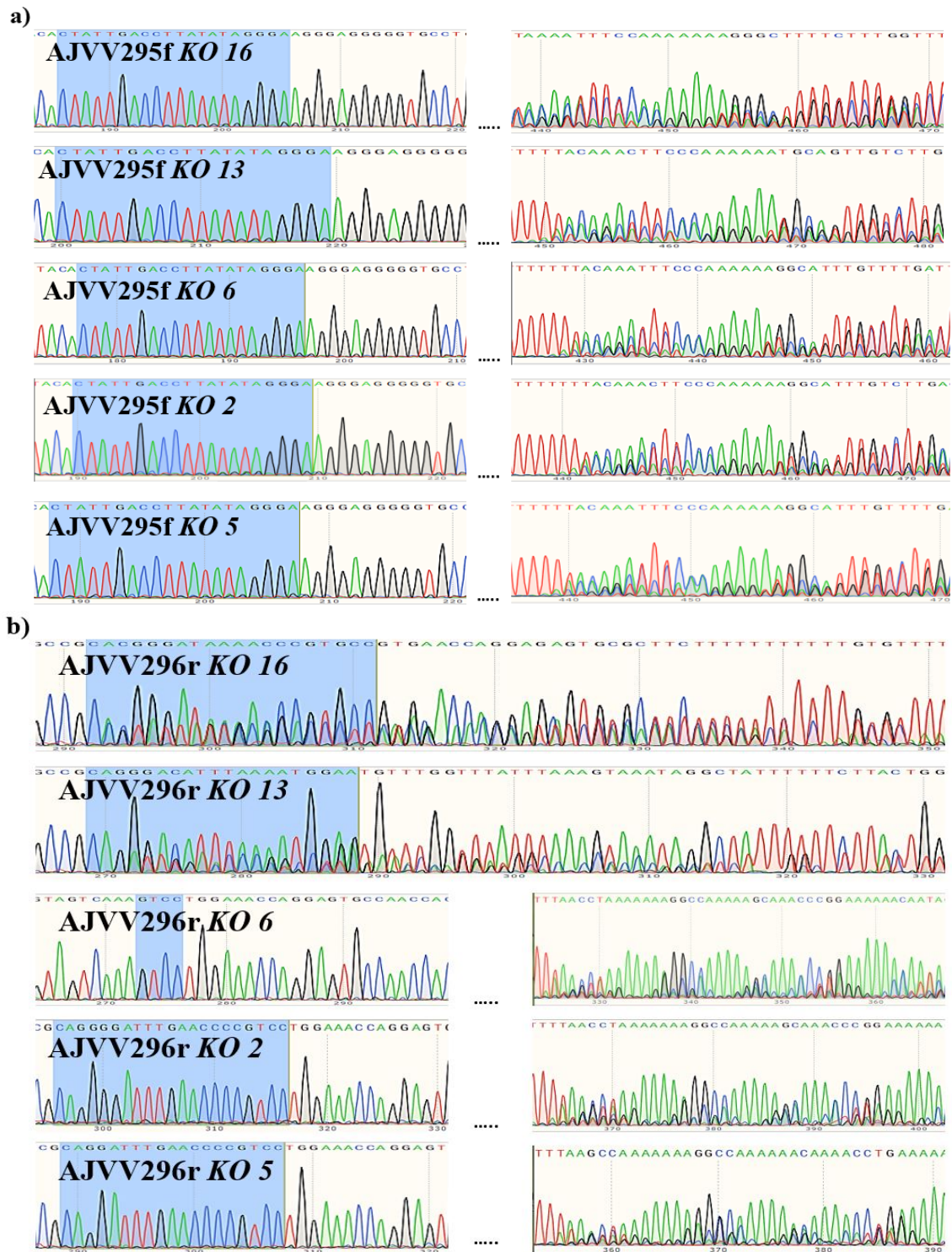


Figura 8. Electroferogramas resultado de la secuenciación de los candidatos *KO 16*, *KO 13*, *KO 6*, *KO 2* y *KO 5* para las regiones (a) 3K1 (usando el cebador AJVV295f) y (b) 3K2 (usando el cebador AJVV296r). Se muestra la región reconocida por el crRNA de los sgrNAs, y ~ 30 nt a partir del punto de inicio de la duplicidad de