



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
PEDECIBA Biología

TESIS DE MAESTRIA
Opción Biología Celular y Molecular

Caracterización de la GalNAc-T13 en cáncer de pulmón humano. Relación con la quimiorresistencia y la agresividad tumoral.

Lic. Patricia Solari

Orientador: Dr. Eduardo Osinaga

Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral
Institut Pasteur de Montevideo

Tribunal

Presidente: Dr. Gustavo Folle

Vocales: Dra. Laura Franco Fraguas

Dr. Alfonso Cayota

14 de noviembre de 2017

Agradecimientos

A Eduardo Osinaga, por haber confiado en mi potencial profesional, por haberme dado la oportunidad de ser parte del proyecto que es base de esta Maestría y por poner a mi disposición todas las herramientas necesarias para ello, contribuyendo a mi crecimiento como investigador.

A Florencia Festari, por haber participado en todo el proceso experimental de mi trabajo, por su ayuda en la corrección de esta tesis y haber estado siempre disponible, actuando como co-tutora, pese a que formalmente no lo fuere.

Gracias a mis padres Elena y Alberto, a mi hermana Francisca por ser mi sostén día a día, por la paciencia de todos ellos y por transmitirme ganas y fuerza para continuar en mi vocación.

A mi esposo Diego, por acompañarme, darme estímulo y apoyarme siempre, y por darme todo el amor del mundo.

A todas mis amigas, que me alentaron siempre y supieron entender todas las veces que tuve que decir “no puedo, estoy con la tesis”.

A Nora Berois por sus valiosos consejos y ayuda en Biología Molecular, de fundamental importancia en el desarrollo de este trabajo.

A Gonzalo Greiff, por su colaboración con el estudio de microarreglos, sin

la cual sería imposible llevar a cabo los análisis relacionados.

A UByPA por la realización de la pasantía, donde aprendí técnicas de Electroforesis Bidimensional, de particular importancia para este trabajo.

A Enrique Barrios por los análisis estadísticos, los que aportaron valor a los resultados de quimiorresistencia/sensibilidad.

A Edgardo Berriel por la realización del experimento *in vivo*, agregando información a este estudio.

A mis compañeros del Laboratorio de Glicobiología por compartir el día a día.

A PEDECIBA, la ANII y la CAP por la financiación de becas.

Resumen

Los cambios en la glicosilación de las proteínas se encuentran entre las alteraciones más frecuentes y complejas observadas en los tumores. Como consecuencia de la O-glicosilación anormal, diversos tipos de cáncer expresan glicanos truncados, dentro de los cuales el antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) es uno de los mejor caracterizados.

Las N-acetilgalactosil-transferasas (GalNAc-Ts) son una gran familia de enzimas que catalizan el primer paso en la biosíntesis de los O-glicanos. Un factor que determina la exposición de algunos antígenos carbohidratos asociados a tumor (TACAs) es la desregulación en la expresión de las diferentes GalNAc-Ts. Por lo tanto, estas enzimas han sido propuestas como posibles marcadores tumorales.

Estudios preliminares de nuestro laboratorio, demostraron mediante inmunohistoquímica que la sobreexpresión de la GalNAc-T13 se relaciona con quimiorresistencia en pacientes con adenocarcinomas de pulmón. Además, se observó recientemente una asociación entre la GalNAc-T13 y la metástasis en un modelo de cáncer de pulmón murino.

Por lo tanto, nuestros estudios experimentales se enfocaron en la evaluación de la quimiosensibilidad de una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549) a la que se le ha mutado la GalNAc-T13 utilizando la metodología de Crispr-Cas9, demostrando que la inhibición de dicha enzima sensibiliza las células contra algunas drogas utilizadas en quimioterapia.

También se observó que la inhibición de la enzima GalNAc-T13 en las células A549, altera el transcriptoma celular, disminuyendo la expresión de genes vinculados a la agresividad e invasibilidad tumoral.

Además, utilizamos un modelo previamente establecido de xenotransplante de células humanas GalNAc-T13 *wt* y GalNAc-T13^{-/-} para la evaluación *in vivo*, encontrando que el desarrollo tumoral de las células *ko* es menor al de las células *wild type*.

Los conocimientos generados en este trabajo abren horizontes hacia la comprensión del rol que cumple la GalNAc-T13 en cáncer de pulmón, los que también pueden ser de utilidad en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico molecular y en el diseño de nuevas terapias.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Cáncer.....	1
1.1.1.	Cáncer de pulmón.....	4
1.1.2.	Quimiorresistencia en cáncer.....	7
1.2.	Glicosilación de proteínas.....	8
1.2.1.	O-glicosilación.....	9
1.2.2.	GalNAc-Ts.....	11
1.2.3.	GalNAc-T13.....	15
1.3.	Glicosilación y cáncer.....	15
1.3.1.	Alteraciones de la O-glicosilación en el cáncer.....	17
1.3.2.	GalNAc-Ts y cáncer.....	18
1.3.3.	GalNAc-T13 en el cáncer.....	20
2.	OBJETIVOS.....	23
2.1.	Objetivo General.....	23
2.2.	Objetivos Específicos.....	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1.	Líneas celulares.....	25
3.2.	Generación de células A549 GALNT13 ^{-/-} utilizando la tecnología de Crispr/Cas9.....	25
3.3.	Análisis de amplicones para detectar indels (IDAA).....	28
3.4.	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	31
3.5.	Electroforesis y Western blot.....	31
3.6.	Inmunofluorescencia.....	33
3.7.	Inmunocitoquímica.....	34
3.8.	PCR a tiempo real para GALNT13.....	35
3.9.	Modelo Animal.....	37
3.10.	Aislamiento de ARN para el análisis por microarreglos.....	39
3.11.	Análisis por microarreglos.....	40
3.12.	Ensayo de Quimiorresistencia de células A549 wt y A549 T13 ^{-/-} mediante MTT.....	44
3.13.	RT-PCR de la GalNAc-T13 y sus variantes de <i>splicing</i>	46
4.	RESULTADOS.....	48
4.1.	Generación de la línea celular A549 GALNT13 ^{-/-} utilizando la tecnología Crispr/Cas9 y su posterior caracterización.....	48
4.2.	Determinar el rol que cumple la GalNAc-T13 en la biología del cáncer de pulmón <i>in vitro</i>	56

4.3.	Determinar el rol que cumple la GalNAc-T13 en la biología del cáncer de pulmón <i>in vivo</i> .	58
4.4.	Determinar si la ausencia de la GalNAc-T13 afecta el perfil de expresión de carbohidrato y el transcriptoma.	61
4.5.	Estudiar la expresión de la GalNAc-T13 y de sus variantes de <i>splicing</i> en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón.	66
5.	DISCUSIÓN.	74
6.	CONCLUSIONES.	82
7.	PERSPECTIVAS	83
8.	REFERENCIAS	86
9.	ANEXO I.	100
10.	ANEXO II	125
11.	ANEXO III	138

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades caracterizadas por una alteración de los procesos que controlan la proliferación, diferenciación y muerte celular, lo que desencadena un crecimiento celular descontrolado y anormal¹. Tradicionalmente se creía que el cáncer se caracterizaba por seis alteraciones esenciales en la fisiología que juntas conllevan a un crecimiento maligno (figura 1): señalización proliferativa sostenida, evasión de mecanismos supresores tumorales, resistencia a la muerte celular, capacidad replicativa inmortal, inducción de angiogénesis, y por último, invasión celular y metástasis². Actualmente existe evidencia significativa que sugiere que dos características biológicas adicionales pueden estar involucradas en la patogénesis de muchos tipos de cáncer: la capacidad para reprogramar el metabolismo celular y la capacidad de evadir el sistema inmune².

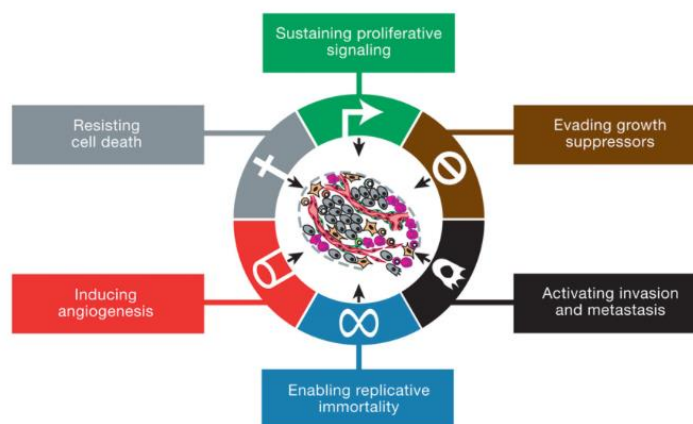
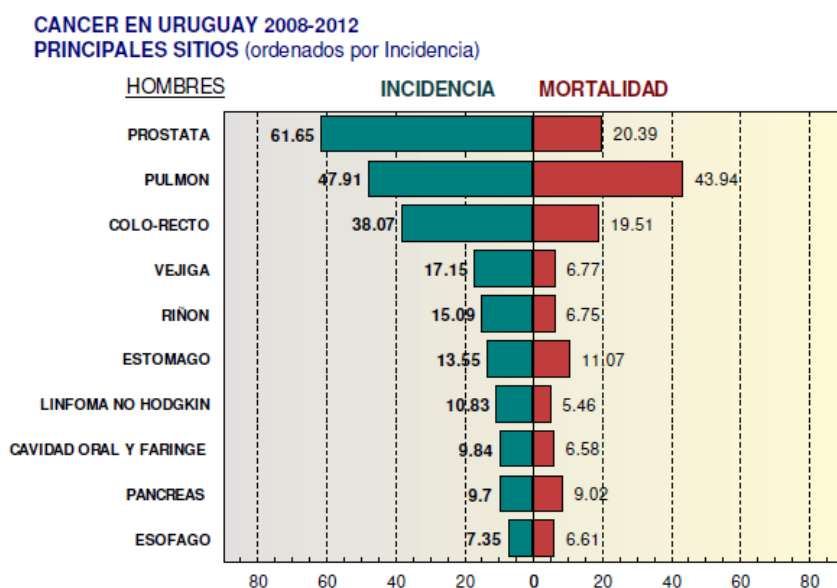


Figura 1 - Capacidades adquiridas durante el desarrollo de los diferentes tipos de cáncer (extraído de²).

Según estimaciones de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) en 2012 hubo 14,1 millones de nuevos casos de cáncer y 8,2 millones de muertes por cáncer en todo el mundo. Se presume que para el 2030 estos números se incrementarán a 21,7 millones de nuevos casos de cáncer y 13 millones de muertes por cáncer debido al crecimiento y envejecimiento de la población³.

En el mundo occidental el cáncer es la segunda causa de muerte, precedida solo por enfermedades cardiovasculares. Como puede observarse en la figura 2, en el Uruguay el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer de mayor mortalidad entre los hombres (el cáncer de próstata es el de mayor incidencia pero con menor mortalidad); mientras que la muerte por cáncer de mama es la de mayor incidencia y mortalidad entre las mujeres⁴.



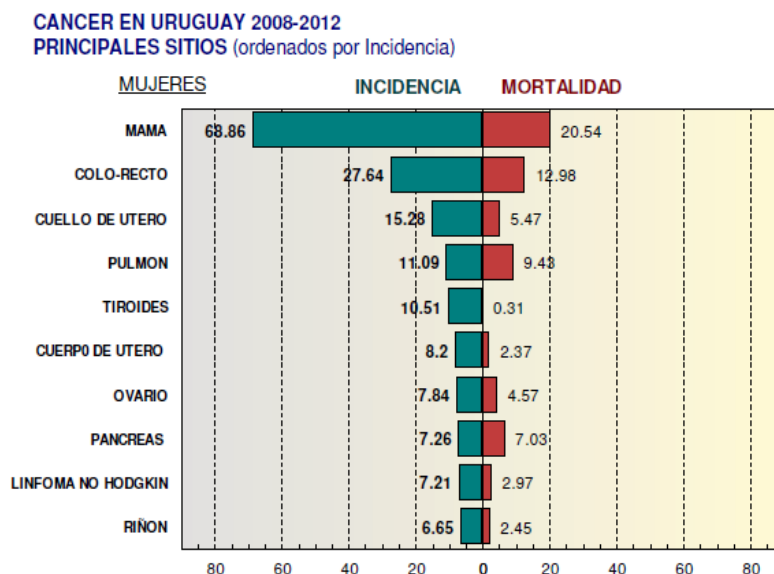


Figura 2 - Cáncer en Uruguay- Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en hombres y mujeres.

El grado de malignidad de una célula cancerosa se ve reflejado en la invasión local y metástasis a distancia que la misma genera. El proceso de invasión y metástasis consiste en una secuencia de cambios patológicos que comienza con invasión local, intravasación de células cancerosas a vasos sanguíneos y sistema linfático, tránsito de estas células por los sistemas circulatorios, seguido por extravasación a través de los vasos en un parénquima distante, formación de pequeños nódulos (micrometástasis), finalizando con el crecimiento de las micrometástasis para formar tumores macroscópicos⁵. Para adquirir el fenotipo invasor la célula sufre numerosas alteraciones moleculares. La alteración mejor caracterizada consiste en la pérdida de la E-caderina, que es una de las moléculas clave en la adhesión celular⁶, lo que facilita el desprendimiento

de células cancerosas del tumor primario^{6,7}. También hay moléculas vinculadas a la migración celular, tales como la N-caderina, las cuales se han visto sobre-expresadas en varios carcinomas invasivos⁷.

1.1.1. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, representando aproximadamente un tercio de todos los diagnósticos y muertes por cáncer⁸.

Basado en las características patológicas, el cáncer de pulmón se puede clasificar en 2 grandes grupos: carcinoma de células pequeñas (SCLC, *small cell lung carcinoma*) o carcinoma de células no pequeñas (NSCLC, *non-small cell lung carcinoma*). El NSCLC representa cerca del 85% de los casos de cáncer de pulmón. Este tipo de cáncer es menos agresivo y tiende a crecer y propagarse más lento que el cáncer de tipo SCLC, el cual es de rápido crecimiento y se disemina rápidamente al torrente sanguíneo y a otras partes del cuerpo⁹. El pronóstico para los pacientes con NSCLC sigue siendo muy malo, con un 15% de supervivencia dentro de los 5 años después del tratamiento^{10,11}. Además, la tasa de recidiva varía de 35% a 50% en los pacientes con NSCLC en etapas tempranas. Después de un tratamiento inicial aparentemente exitoso, el desarrollo de tumores secundarios a menudo conduce a una recaída letal⁹. El NSCLC es clínica e histológicamente diferente al SCLC. Los dos tipos histológicos de NSCLC

más comunes son: carcinoma de células escamosas (SCC) (30%) y adenocarcinoma (ADCA) (40%)¹².

El tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón depende de la histología del tumor. La etapa patológica en la que se encuentra el tumor, es considerada, el factor más importante de pronóstico y es el parámetro más significativo al momento de elegir los tratamientos adyuvantes¹³. Sin embargo, dentro de la misma etapa de la enfermedad, existe una gran variabilidad pronóstica y la sensibilidad a los tratamientos adyuvantes es heterogénea¹⁴.

Con la introducción de los llamados fármacos citotóxicos de tercera generación el tratamiento del NSCLC cambió y la sobrevida global mejoró a unos 8 meses en ensayos clínicos¹⁵. Las drogas de tercera generación más utilizadas en el tratamiento contra el NSCLC son el Paclitaxel, el Docetaxel, el Etopósido y la Gemcitabina, entre otros. Actualmente se utilizan combinaciones de un agente citotóxico de tercera generación tales como la Gemcitabina, la Vinorelbine o el Paclitaxel con un componente de platino (Cisplatino o Carboplatino)¹⁶.

La mayor comprensión de las complejas anomalías moleculares asociadas al cáncer de pulmón ha llevado a una serie de hallazgos importantes que tienen el potencial de impactar directamente en el cuidado del paciente. La identificación de mutaciones en genes importantes y la comprensión de sus efectos en la biología tumoral han suscitado gran interés y se encuentran

en la base de nuevos desarrollos biotecnológicos de posible impacto a nivel terapéutico¹⁷. Ejemplo de esto es el descubrimiento de que ciertas mutaciones en el dominio de la tirosina quinasa del *EGFR* (receptor de factor de crecimiento epidérmico) y los reordenamientos de *ALK* (quinasa del linfoma anaplásico) están fuertemente asociados con una mayor sensibilidad de los tumores de NSCLC a los inhibidores de la tirosina quinasa EGFR (erlotinib y gefitinib)¹⁸ y al inhibidor de la proteína quinasa EML4 - ALK (crizotinib)¹⁹, respectivamente. El estudio de las mutaciones del *EGFR* y de los reordenamientos de *ALK* en NSCLC posibilita la identificación de subconjuntos de tumores con perfiles moleculares que pueden predecir la respuesta a la terapia²⁰, ayudando a desarrollar un tratamiento personalizado.

Por otro lado, un enfoque de inmunoterapia muy prometedor para el tratamiento del cáncer de pulmón es el uso de inhibidores de *checkpoints* inmunológicos. Estos *checkpoints* son cruciales en la regulación negativa del sistema inmune para prevenir la autoinmunidad^{21,22}. Sin embargo, se ha demostrado que el microambiente tumoral se compone de células inmunes disfuncionales y células estromales que utilizan vías inmunoregulatoras para evadir la inmunidad²³. Los ligandos y receptores inhibitorios están comúnmente sobreexpresados en el tumor o en el microambiente tumoral y se pueden bloquear con anticuerpos antagonistas²⁴. Los principales mecanismos de evasión inmune por los tumores que pueden ser clínicamente seleccionados, incluyen las vías

CTLA-4/B7 y PD-1/PD-L1²³. Se ha demostrado en modelos pre-clínicos que la inhibición de estas vías mejoran la respuesta inmune intratumoral^{21,25,26}. El principal mecanismo de escape inmunológico descrito es la vía PD-L1 / PD-1²³. PD-1 es expresado por células T activadas y es un receptor de *checkpoint* inmunológico clave que media la inmunosupresión. Atenúa la señalización del receptor de células T uniéndose a sus ligandos PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC)²⁷. Se piensa que la expresión de PD-L1 en células tumorales inmunitarias e infiltrantes es inducida principalmente por citoquinas Th1 (en particular, interferón- γ) liberadas luego de la infiltración de células inmunes en el tumor^{28,29}. Los ensayos clínicos han producido resultados prometedores evaluando anticuerpos antagonistas dirigidos contra PD-1 expresado en células T antitumorales activadas y su ligando primario PD-L1, expresado en células tumorales y células inmunes dentro del microambiente tumoral. Dos anticuerpos monoclonales que han sido aprobados por la FDA recientemente bloquean a PD-1: nivolumab (OPDIVO®) y pembrolizumab (KEYTRUDA®). Ambos demostraron una respuesta significativa contra el melanoma y el NSCLC³⁰.

1.1.2. Quimiorresistencia en cáncer

La resistencia a los fármacos es un fenómeno bien conocido que se produce cuando las enfermedades no responden a los tratamientos farmacéuticos. Este concepto fue considerado por primera vez cuando las bacterias se volvieron resistentes a ciertos antibióticos. Desde entonces se

han encontrado mecanismos similares en otras enfermedades, incluyendo el cáncer. Aunque muchos tipos de cáncer son inicialmente susceptibles a la quimioterapia, con el tiempo pueden desarrollar resistencia a través de la inactivación, la alteración del blanco y el eflujo del fármaco, la reparación del daño del ADN, la inhibición de la muerte celular y la transición epitelio-mesenquimal (EMT)³¹.

En la actualidad, los agentes quimioterapéuticos son ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer de pulmón. El Cisplatino (DDP), un compuesto a base de platino, es uno de los agentes quimioterapéuticos de primera línea para el tratamiento de NSCLC^{32,33}. Sin embargo, su eficacia se ve limitada por el desarrollo de quimiorresistencia^{34,35}.

Esta resistencia es mediada por múltiples mecanismos, y una extensa evidencia ha demostrado que durante este proceso existe frecuentemente una modulación de las vías que apoyan la supervivencia celular, incluyendo el crecimiento y la proliferación celular, la apoptosis, la reparación del daño del ADN y la endocitosis³⁵.

1.2. Glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas es la modificación post-traducciona l más importante y compleja. Es el proceso por el cual se añade uno o más azúcares a una molécula proteica³⁶. La glicosilación les otorga diferentes

características estructurales y funcionales a las proteínas, confiriéndoles mayor estabilidad ante las modificaciones fisicoquímicas del medio y contribuyendo a su correcto patrón de plegamiento. Las glicoproteínas, una vez sintetizadas, pueden encontrarse en la superficie celular o ser secretadas al medio extracelular, por lo que pueden modular o mediar una gran variedad de eventos durante las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, cruciales para el desarrollo, la diferenciación celular, y otras funciones en los organismos multicelulares complejos³⁷.

Existen dos tipos principales de glicosilación de proteínas dependiendo de donde se adicione el glicano en la cadena polipeptídica: la N-glicosilación y la O-glicosilación. En la N-glicosilación, los glicanos están unidos a las estructuras polipeptídicas a través de enlaces amida con las cadenas laterales de las asparaginas (Asn)³⁸. En la O-glicosilación, los glicanos están unidos mediante enlaces O-glicosídicos con las cadenas laterales de las serinas (Ser), treoninas (Thr), hidroxilisinas (Hyl)³⁹ o tirosinas (Tyr)^{40,41}. Además, la N-glicosilación se lleva a cabo en el retículo endoplasmático rugoso mientras que la O-glicosilación ocurre en el aparato de Golgi⁴².

1.2.1. O-glicosilación

La O-glicosilación de tipo mucina comienza con la formación de un enlace tipo alfa (α) entre una *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) y el grupo hidroxilo

(OH) de un residuo de serina (Ser) o treonina (Thr) presente en el esqueleto polipeptídico, formando lo que se conoce como el antígeno Tn (GalNAc-Thr/Ser). El antígeno Tn puede ser modificado por ácido siálico para formar el antígeno sialil-Tn (STn). La formación del antígeno Tn constituye el paso inicial para la formación de los *cores*, es decir, las estructuras centrales a partir de las cuales ocurre la elongación y/o ramificación de los glicanos dando como resultado estructuras más complejas. La existencia de ocho *cores* diferentes posibles le confieren una importante complejidad estructural a los O-glicanos.

En la mayoría de los tejidos, se adiciona galactosa al antígeno Tn por la *core* 1 sintasa (C1GalT), lo que genera el O-glicano *core* 1 (antígeno T). Por el contrario, en los tejidos colónicos, se adiciona un azúcar diferente, una N-acetilglucosamina (GlcNAc) por la *core* 3 sintasa (C3GnT/β3GnT6), lo que produce el O-glicano *core* 3^{43,44,45,46}.

Los O-glicanos *core* 1 pueden ser inmediatamente cubiertos con ácido siálico por las ST3Gal- y ST6Gal-sialiltransferasas, generando O-glicanos *core* 1 mono- y di-sialilados, respectivamente. Los O-glicanos *core* 1 sialilados son poco comunes en la mayoría de los tejidos normales, pero son comúnmente expresados en los tejidos tumorales. En la mayoría de los tejidos normales, se adiciona GlcNAc a los O-glicanos *core* 1 por las β1,6-N- acetilglucosaminiltransferasas (C2GnT-1, -2 y -3) para producir el O-glicano *core* 2. La isoforma C2GnT2 puede adicionar GlcNAc al O-glicano

core 3, lo que genera el O-glicano *core 4*. La GlcNAc de los O-glicanos *core 2* y *core 4* puede ser posteriormente extendida de muchas formas diferentes [por ejemplo por la adición de galactosa por las enzimas $\beta 4\text{GalT}$ o por la adición de repetidos de polilactosamina (Gal-GlcNAc) por la acción concertada de las enzimas $\beta 4\text{GalT}$ y $\beta 3\text{GnT}$. Por el contrario, la GlcNAc de los O-glicanos *core 3* puede ser extendida sólo por la adición de galactosa por la $\beta 4\text{GalT4}$. Para terminar la O-glicosilación, a todos los O-glicanos se les adiciona ácido siálico por acción de las ST3Gal- y ST6Gal-sialiltransferasas. O-glicanos adicionales se han caracterizado bioquímicamente en diferentes tejidos (*cores 5-8*) y se cree que se generan por la modificación directa del O-glicano naciente aunque aún no se conoce la maquinaria enzimática necesaria para generarlos^{47,48}.

1.2.2. GalNAc-Ts

La O-glicosilación se inicia por una gran familia de polipeptidil N-acetilgalactosaminil (GalNAc)-transferasas (GalNAc-Ts) homólogas (EC 2.4.1.41) que catalizan el primer paso en la biosíntesis, formando el enlace $\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-serina (Ser)/treonina (Thr)}$ sobre las O-glicoproteínas en el aparato de Golgi. Las GalNAc-Ts catalizan la transferencia del azúcar GalNAc desde el UDP-GalNAc al grupo hidroxilo de los residuos de Ser/Thr (y posiblemente Tyr). El gran número de enzimas que controlan el paso inicial hacen que la O-glicosilación sea única entre los diferentes tipos de glicosilación de proteínas. Todos los demás pasos de inicio de los

diferentes tipos de glicosilación de proteínas involucran 1 o 2 isoenzimas o, en el caso de la N- glicosilación, un complejo proteico.

Las GalNAc-Ts se clasifican como miembros de la familia GT27 en la clasificación CAZy de las glicosiltransferasas (<http://www.cazy.org>), que se basa en las similitudes de secuencia y de estructura. Hay disponible un total de 20 entradas de genes de GalNAc- Ts humanos, todos reportados en la literatura. La mayoría de estos genes de GalNAc-Ts codifican enzimas funcionalmente activas^{47,49,50}.

Las GalNAc-Ts comparten la estructura transmembrana de tipo II de las glicosiltransferasas del Golgi con una corta cola citoplasmática N-terminal, una secuencia señal hidrofóbica que sirve como dominio que se inserta en la membrana, una región *stem* de longitud variable y un dominio catalítico globular luminal⁵¹ (figura 3). Las GalNAc-Ts poseen alrededor de 600-800 aminoácidos y son generalmente más grandes y únicas entre las glicosiltransferasas eucariotas porque poseen, además de la unidad catalítica, un dominio lectina C-terminal de tipo ricina (de aproximadamente 120 aminoácidos)^{49,52,53,54}. Ambos dominios están conectados por un *linker* flexible y corto que varía en longitud entre las diferentes isoformas (10-25 aminoácidos)^{52,55,56}.

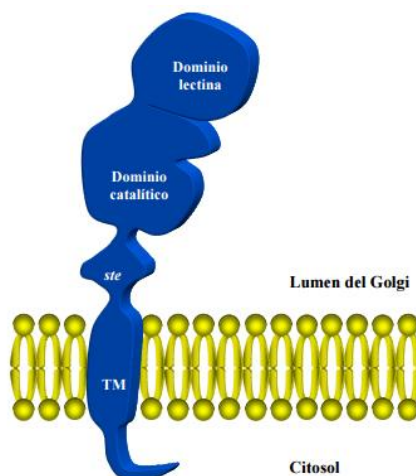


Figura 3 - Representación esquemática de los dominios de las GalNAc-Ts.

La corta cola citoplasmática de todas las GalNAc-Ts contiene residuos básicos que pueden estar involucrados en la interacción con los complejos proteicos de anclaje a la membrana del Golgi periférico⁵⁷. Las regiones *stem* son variables en longitud y tienen aproximadamente entre 90 (GalNAc-T1, -T13 y -T16) y hasta 170 aminoácidos (GalNAc-T3, -T8 y -T15) con la excepción de la región *stem* extendida de 470 aminoácidos de la GalNAc-T5. Se cree que las regiones *stem* posicionan al dominio catalítico en el lumen de las cisternas del Golgi, pero resta determinar si tienen otras funciones específicas dado la gran variabilidad que poseen.

La secuencia del *linker* presenta una gran variabilidad en cuanto a su flexibilidad de acuerdo a datos estructurales. El posicionamiento relativo de los dominios catalítico y lectina ha sido atribuido, en parte, a las diferencias en las propiedades de la secuencia del *linker*. Por tanto, la flexibilidad del *linker* puede controlar la orientación relativa de los dominios catalítico y

lectina e influenciar así las especificidades de sustrato mediadas por el dominio lectina de las GalNAc-Ts^{52,55,56,58}.

Las distintas isoformas de GalNAc-Ts se expresan diferencialmente en células y tejidos y se pueden clasificar según si tienen patrones de expresión ubicuo (GalNAc-T1, T2, T7), selecto (GalNAc-T3, T4, T6, T11, T12, T14, T16, T18) o más restringido (GalNAc-T5, T8, T9, T10, T13, T15, T17, T19)⁴⁹. El repertorio de GalNAc-Ts expresado en las células varía con el tipo celular en los tejidos⁵⁹ y en células y tejidos durante la diferenciación, el desarrollo y la maduración^{60,61}. Además, varios estudios han demostrado que la transformación maligna está asociada a cambios sustanciales en la expresión de GalNAc-Ts individuales⁶².

Una característica importante de estas enzimas es la plasticidad en su localización subcelular⁶³. La activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-R) y de la proteína-tirosina quinasa Src, induce el tráfico de las GalNAc-Ts desde el Golgi al RE, específicamente a través de la activación de la maquinaria de transporte COPI. Esto aparentemente resulta en una O-glicosilación más densa con estructuras de O-glicanos inmaduros, especialmente incrementando los niveles intracelulares de Tn⁶³. Esta re-localización de las enzimas parece ser específica de las GalNAc-Ts y no de otras enzimas de la glicosilación^{63,64}.

1.2.3. GalNAc-T13

En este trabajo nos centraremos en la enzima GalNAc-T13 humana, previamente clonada y funcionalmente caracterizada por el grupo de Narimatsu⁶⁵. A nivel de aminoácidos presenta una importante homología con la isoforma GalNAc-T1 (84% de identidad de aminoácidos)⁴⁹. A nivel de la expresión, el transcripto de la GalNAc-T13 está presente en forma muy restringida, siendo casi exclusiva de los tejidos nerviosos (cerebro, cerebelo, corteza cerebral, y cerebro fetal)⁶⁵, aunque también ha sido encontrada en células madre, próstata y páncreas^{66–68}. En los tejidos del sistema nervioso la presencia de la GalNAc-T13 se limita a las neuronas, siendo indetectable en las células gliales. Es de resaltar la especial habilidad de la GalNAc-T13 de glicosilar varios residuos aminoacídicos consecutivos sobre un mismo sustrato, generando *clusters* de Tn⁶⁵.

1.3. Glicosilación y cáncer

La alteración en la glicosilación de las proteínas da lugar a deficiencias funcionales celulares que están implicadas en un número importante de enfermedades humanas como ser las enfermedades autoinmunes, ciertas enfermedades infecciosas y el cáncer, entre otras⁶⁹. La alteración en la glicosilación de las proteínas es una característica que está asociada con

la adquisición de las propiedades que caracterizan al fenotipo tumoral - señalización proliferativa sostenida, evasión de los supresores del crecimiento y de destrucción inmune, inmortalidad replicativa, inflamación tumoral, invasión y metástasis, angiogénesis, mutaciones e inestabilidad genómica, resistencia a la muerte celular y desregulación de la energía celular- y a la inversa (figura 4), la composición de glicanos de las células tumorales puede ser influenciada por dichas características⁷⁰.

Los glicanos anormales expresados por las células tumorales participan en la adhesión celular, en la invasión y en la metástasis⁷¹. Múltiples cambios pueden ocurrir en los glicanos de las células tumorales:

- i) pérdida de expresión o expresión aumentada de ciertas estructuras;
- ii) aparición de estructuras incompletas o truncadas y;
- iii) no tan comúnmente, expresión *de novo* de ciertas estructuras.

Dado que el cáncer es un proceso microevolutivo en donde sólo las células más aptas en una población genéticamente heterogénea sobreviven, es razonable sugerir que estos cambios específicos en los glicanos son seleccionados durante la progresión tumoral.

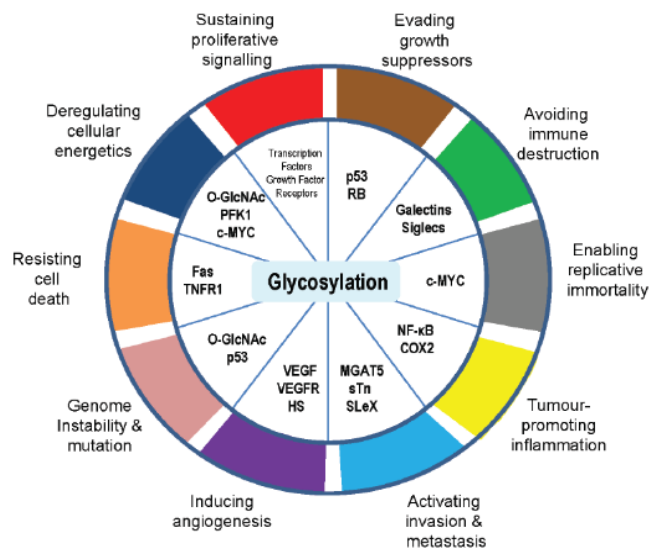


Figura 4 - La glicosilación es una característica que está asociada con la adquisición de las capacidades universales del cáncer. Extraído de⁷⁰.

1.3.1. Alteraciones de la O-glicosilación en el cáncer

Dentro de las alteraciones moleculares más distintivas de las células tumorales se encuentra la elongación incompleta de las cadenas glucídicas con uniones de tipo O. Este fenómeno determina que algunos core queden expuestos en la superficie celular formando antígenos asociados a tumor. Sin ir más lejos, el antígeno Tn (GalNAc-Thr/Ser) y el STn (Neu5Acα2,6GalNAcα1-Ser/Thr), se encuentran en más del 90% de los carcinomas humanos participando en fenómenos de adhesión, migración y proliferación de las células tumorales, razón por la cual han despertado gran interés para su uso en la búsqueda de estrategias terapéuticas y se han realizado numerosos esfuerzos en el desarrollo de inmunoterapias que los involucren⁷².

La expresión de los antígenos Tn y STn en las células tumorales puede tener diversas consecuencias biológicas. Muchos estudios han demostrado una correlación entre la glicosilación alterada y el mal pronóstico en términos de progresión, invasión y metástasis. La expresión de O-glicanos truncados también se correlaciona con la expresión alterada de integrinas y mucinas de la superficie celular, y puede cambiar las propiedades de adhesión de las células⁷³. Además, el antígeno STn expresado sobre mucinas puede inhibir la citotoxicidad inducida por células naturales (NK) dirigida contra células tumorales⁷⁴. En algunos tumores, la expresión de mucinas y su glicosilación alterada se correlaciona con un aumento en la expresión de galectinas, tales como galectina-3⁷⁵ que pueden unirse al antígeno TF (*core 1*), contribuyendo a la extravasación metastásica y a la modulación de la respuesta inmune adaptativa.

1.3.2. GalNAc-Ts y cáncer

La expresión alterada de las GalNAc-Ts puede ser uno de los mecanismos que explican los cambios en la O-glicosilación durante la transformación maligna⁷⁶. De hecho, se ha descrito una desregulación en la expresión de las GalNAc-Ts en muchos tipos diferentes de cáncer, con diferente tendencia dependiendo del contexto tisular y de la isoforma de GalNAc-T⁷⁷.

Solo unos pocos estudios han investigado las consecuencias funcionales de los cambios en el repertorio de GalNAc-Ts, pero queda claro por las funciones ya conocidas de la O-glicosilación específica de sitio⁷⁸ que dichos cambios pueden tener implicancias profundas en el fenotipo de la célula tumoral. Por tanto, es probable que los cambios en el repertorio de GalNAc-Ts sean directamente requeridos por las células tumorales para sus propiedades de crecimiento, invasivas y metastásicas. De hecho, hay evidencias crecientes sobre el importante papel que algunas isoenzimas de GalNAc-Ts juegan en el desarrollo tumoral y en las metástasis⁷⁹. Numerosos estudios basados en diferentes aproximaciones experimentales han sugerido una correlación entre la expresión de la GalNAc-T6 y -T3 con la diferenciación tumoral⁶². Sin embargo, la expresión de la GalNAc-T6 se ha sugerido como factor pronóstico mientras que la de la GalNAc-T3 no^{80,81}. La GalNAc-T12 se expresa en el tejido normal gástrico y colorectal, pero no se expresa en los correspondientes tejidos tumorales⁸². También se encontró una relación entre la expresión de GalNAc-T5 y la supervivencia de pacientes con cáncer gástrico⁸³, así como entre un polimorfismo del gen *GALNT14* y la predicción de respuesta a la quimioterapia en pacientes con hepatocarcinoma⁸⁴. Niveles de expresión aumentadas de GalNAc-T1 y GalNAc-T2 fueron descritos en carcinoma colorrectal en comparación con niveles normales de epitelio del colon⁸⁵. Por otro lado, se encontró que la sobreexpresión del gen *GALNT7* se asocia con carcinogénesis y metástasis en carcinoma escamoso laríngeo

(LSCC)⁸⁶, carcinoma hepatocelular⁸⁷, cáncer de cuello uterino⁸⁸, melanoma superficial (SSM) y melanoma nodular (NM)⁸⁹.

Nuestro equipo también ha efectuado aportes en esta área del conocimiento: a) se ha demostrado que las pacientes con cáncer de mama operable con GalNAc- T6 detectable en la médula ósea tienen peor evolución clínica⁹⁰; b) se ha demostrado que el gen *GALNT13* está 12 veces más expresado en neuroblastos metastásicos comparado con células derivadas del tumor primario en un modelo de xenotrasplante en ratón y que la detección de la GalNAc-T13 en la médula ósea de los pacientes se asocia con una menor supervivencia⁹¹ y c) se comprobó la relación existente entre la expresión de la GalNAc-T9 con tumores menos agresivos en pacientes con neuroblastoma⁹².

1.3.3. GalNAc-T13 en el cáncer

Como expresamos previamente, en un modelo celular de neuroblastoma, nuestro grupo encontró una sobre-expresión de la GalNAc-T13 (12 veces más) en neuroblastos metastásicos malignos comparado con las células derivadas del tumor primario xenotransplantado en ratones *nude*. Además, también se encontró que la expresión de la GalNAc-T13 en la médula ósea está relacionada con un peor pronóstico clínico en los pacientes con neuroblastoma. En este trabajo se pudo concluir también que dichas

isoformas son útiles como marcador informativo para el diagnóstico molecular de la afectación de la médula ósea y para el seguimiento de la enfermedad residual mínima en pacientes con neuroblastoma⁹¹.

Por otra parte, el grupo de Matsumoto identificó a *GALNT13* como un gen cuya expresión se ve aumentada en el carcinoma de pulmón de Lewis en ratón, y que allí esta enzima sintetiza trímeros de Tn sobre la molécula de sindecan-1⁹³. El sindecan-1 glicosilado con el trímero de Tn promueve la adhesión celular dependiente de integrina a la fibronectina lo que induce la fosforilación de FAK (quinasa de adhesión focal) y paxilina, facilitando así la migración celular y por ende la metástasis. El sindecan-1 con el trímero de Tn también forma un complejo molecular con la integrina $\alpha 5 \beta 1$ y con la MMP9 (metaloproteinasa de matriz 9) en microdominios enriquecidos en glicolípidos⁹⁴, lo que incrementa el potencial metastásico⁹⁵. Recientemente, se demostró la correlación entre la alta expresión de la GalNAc-T13 con un peor pronóstico en el cáncer de pulmón humano, lo que sugiere que esta enzima puede representar un factor pronóstico en este tipo de cáncer⁹⁶.

Sumando hallazgos vinculados con la enzima GalNAc-T13, nuestro grupo ha reportado la existencia de 9 variantes de *splicing* alternativas de la GalNAc-T13. Las mismas fueron identificadas durante el clonado de la región codificante de esta enzima a partir de ADNc de diferentes líneas celulares⁹⁷. Además, Nogimori et al. también reportaron la existencia de dos variantes de *splicing* adicionales y encontraron que una de ellas posee

una asociación significativa con un peor pronóstico mientras que otra está relacionada con un mejor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón⁹⁶. Más recientemente, mediante inmunohistoquímica, nuestro grupo comprobó que la sobreexpresión de las GalNAc-T13 se relaciona con quimiorresistencia en pacientes con adenocarcinomas de pulmón (Touyá, D. et. al., artículo en preparación).

A pesar de toda esta información reciente sobre la relación entre la expresión de la GalNAc-T13 y el cáncer de pulmón, aún se conoce poco sobre qué rol cumple esta enzima en la biología de este tipo de cáncer humano. Por ejemplo, sería interesante determinar si existe alguna relación entre la expresión de esta enzima y la quimiorresistencia en adenocarcinoma de pulmón humano.

Para poder analizar el papel que cumple esta enzima en la biología de este tipo de cáncer y la relevancia que tiene para el desarrollo y la progresión del mismo, sería interesante poder caracterizar líneas celulares de cáncer de pulmón que sean *knockout* para el gen *GALNT13* y comparar su biología con la de las células *wildtype* que expresen dicha enzima.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es ampliar el conocimiento existente acerca del papel que cumple la GalNAc-T13 humana en el cáncer de pulmón de células no pequeñas. En particular nos interesa determinar si la expresión de esta enzima está relacionada con diferentes características de la biología tumoral.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Generar una línea celular de cáncer de pulmón *knockout* para *GALNT13* utilizando la tecnología Crispr/Cas9 y caracterizarla
- 2) Determinar el rol que cumple la GalNAc-T13 en la biología del cáncer de pulmón *in vitro*
- 3) Determinar el rol que cumple la GalNAc-T13 en la biología del cáncer de pulmón *in vivo* utilizando un modelo murino y comparando el comportamiento de las células de cáncer de pulmón *wt* y *knockout* para *GALNT13*
- 4) Determinar si la ausencia de la GalNAc-T13 en la línea celular *knockout* para *GALNT13* afecta el perfil de expresión de carbohidratos y el transcriptoma de dicha línea celular

- 5) Estudiar la expresión de la GalNAc-T13 y de sus variantes de *splicing* en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón para intentar correlacionar los perfiles de expresión con determinadas características (quimiorresistencia, invasividad, etc)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Líneas celulares

Las líneas celulares humanas de cáncer de pulmón A549, H1975, H838, H1755, H1703 y H1650 fueron obtenidas de ATCC (*American Type Culture Collections*). Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technologies*) suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10%, 1 mM de piruvato y 2 mM de glutamina. Luego de establecerse la monocapa a 80% de confluencia, se realizó un lavado con PBS estéril y posteriormente las células se despegaron mediante un tratamiento con tripsina al 0,05% en PBS (*Gibco, Grand Island, USA*) durante 5 minutos a 37°C. Luego de lavar las células con PBS estéril, éstas fueron utilizadas tanto para la extracción de ARN como para la preparación de extractos proteicos.

3.2. Generación de células A549 GALNT13^{-/-} utilizando la tecnología de Crispr/Cas9

Los plásmidos Cas9 y ARNg fueron generosamente suministrados por el Prof. Henrik Clausen (Copenhagen Center for Glycomics). El plásmido Cas9 co-expresa la nucleasa Cas9 humana junto con la proteína verde fluorescente (GFP). La secuencia del ARNg para mutar *GALNT13* es:

5'-TTAATACGTGCCCCGTCTTCG-3' (exón 4)

Probamos dos métodos de transfección (Nucleofección con *Amaxa Nucleofector* y *Lipofectamine LTX with Plus Reagent*) y probamos diferentes condiciones (número de células y cantidad de ADN). Finalmente seleccionamos la condición y método que resultaron en una mejor eficiencia de transfección y mayor viabilidad celular (lipofectamina). Brevemente, se plaquearon 4×10^4 células por pocillo en una placa de 24 el día antes de la transfección. El siguiente día, 0.5 µg de plásmido Cas9 y 0.5 µg plásmido ARNg se diluyeron en 100 µL de OptiMEM®, se les adicionó 0,5 µL de PLUS™ Reagent y se incubó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 2 µL de Lipofectamina® LTX a la mezcla anterior y se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente. Se removió el medio de las células y se reemplazó por 0,5 mL de medio DMEM al cual se le agregaron los 100 µL del complejo ADN-Lipofectamina® LTX directamente en cada pocillo. Luego se dejó la placa incubando en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ durante 24 horas.

Las células transfectadas fueron sujetas a la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) dos días después de la transfección para aislar las células con mayor intensidad de fluorescencia

para GFP. Una fracción de esta mezcla de células fue clonada depositando una única célula por pocillo (*single cell deposition*) en placas de 96 y se expandieron para generar líneas celulares clonales. La otra fracción se cultivó por una semana y se realizó el Análisis de Amplicones para Detectar *Indels* (IDAA)⁹⁸ de forma de determinar la eficiencia de mutación. Cada clon expandido se dividió en dos pocillos, cada uno perteneciente a una de 2 placas de 96 pocillos diferentes (una para mantener los clones y la otra para hacer el *screening*). En la placa para el *screening*, los clones fueron lisados dentro de los pocillos con la solución para extracción de ADN *QuickExtract* (*Epicentre*) y posteriormente se analizaron por IDAA. Los clones que presentaron una delección o inserción en ambos alelos (con cambios en el marco de lectura) fueron seleccionados para amplificar por PCR la región mutada y secuenciar dicha región de forma de confirmar las mutaciones. Los *primers* utilizados en este caso fueron T13crispr_Fw y T13crispr_Rev (tabla 1).

Tabla 1 - Lista de *primers* utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' → 3')
T13_EcoRI_His_Fw	CGCGGGAATTTCGATGGGGATCCGAGCAGCCATCATCATCATCAC AGCTCTCTGCTGCCTGC
T13_XhoI_Rev	TCATGTGCCCAAGGTCATGTTCC
T13_784_Fw	CTGAATTTCCGCTGGTATCC
T13_Ex7_Fw	CAATGTGGAGGCTCCTTG
GalNT13_Fw	ACATCTATCCGGACTCCC
GalNT13_Rev	TAGACAACATGGGCC
T13_Δ6_Fw	GGAGACAGAACATTACCTGTCAGA
T13_Δ8_Rev	GATTGGTTTCAACATTTCTTATCTG
T13_Δ39bpEx9_Rev	GTCAGCAGTGTAAAGAAAATACT
T13_Ex11_Rev	TAGGCACCATTTTGTCTTCTT
T13_1393_Rev	GTCAGCAGTGTAAAGAAAATACCTC
T13_Ex7_Rev	GGGATATGATGTAGAAGAAATC
T13_Ex10b_Fw	ACCCACACTCTTCTTCATATAATCACC
β2_M_Fw	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAG
β2_M_Rev	AAGTTGCCAGCCCTCCTAGAGC
T13crispr_Fw	AGCTGACCGGCAGCAAAATTGGGCCACCATTCTGTGTGTTG
T13crispr_Rev	TTGAGTCATAACCCAGGCAGAC
FAMF	AGCTGACCGGCAGCAAAATTG
GAPDH_Fw	TGCACCACCAACTGCTTA
GAPDH_Rev	AGAGGCAGGGATGATGTTT

3.3. Análisis de amplicones para detectar indels (IDAA)

Se utilizó una nueva estrategia, que combina el uso de una forma simple de marcar un amplicón con el alto rendimiento para analizar fragmentos de ADN de la electroforesis capilar automática⁹⁹, para la detección simple y la caracterización de los *indels* (inserción o delección) generados. La estrategia de marcado del amplicón para la evaluación de los tamaños de los productos de PCR fue originalmente introducida por Oetting et al.¹⁰⁰, utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida para resolver diferencias

grandes en el tamaño de los productos. Esto fue mejorado por Schuelke¹⁰¹ utilizando electroforesis capilar para resolver diferencias más pequeñas de hasta ± 2 pb en microsatélites y una estrategia similar también fue utilizada por Mellersh et al.¹⁰². Esto se ha mejorado recientemente con un avance en la resolución de detección que permite la discriminación de diferencias de hasta 1 pb⁹⁸. Los amplicones se marcaron con un fluoróforo realizando una amplificación con 3 *primers*. Por un lado, se utiliza un primer universal marcado en 5' con 6-FAM llamado FAMF (tabla 1) y también dos *primers* que flanquean el sitio donde se espera que ocurra la mutación (el *primer* Fw contiene una extensión de su secuencia que es complementaria a la secuencia del *primer* FAMF) (T13crispr_Fw y T13crispr_Rev, tabla 1)⁹⁸ (figura 5). Rendimientos óptimos del amplicón generado con los 3 *primers* se observaron cuando se utilizó una relación de *primers* 10:1:10 (FAMF:T13crispr_Fw:T13crispr_Rev). La PCR se realizó en 12.5 μ L de volumen final, utilizando AmpliTaq Gold ADN polimerasa (Termo Fisher), 0.25 μ M:0.025 μ M:0.25 μ M (FAMF:Fw:Rev) de los *primers* y un programa en el termociclador que se inicia con 72°C de temperatura de *annealing* y luego desciende 1°C/ciclo hasta 58°C, seguido de 25 ciclos adicionales a 58°C de temperatura de *annealing*. La desnaturalización y la elongación se realizaron a 95°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, respectivamente.

0.5 μ L de la reacción de PCR fueron mezclados con 0.3 μ L del estándar de tamaño LIZ600 (ABI/Life Technologies) y luego se analizó el tamaño de los fragmentos en el Secuenciador Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. La información obtenida se analizó utilizando el Peak Scanner Software V1.0 (ABI/Life Technologies).

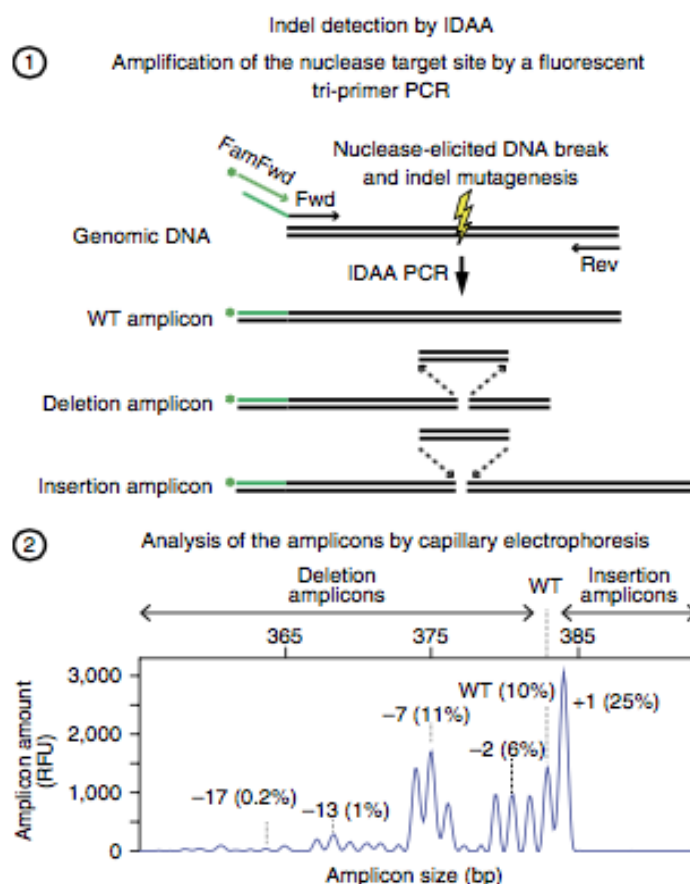


Figura 5 - Representación esquemática de la estrategia IDAA. 1. La tecnología Crispr/Cas9 genera cortes en ambas hebras del ADN que, a través de recombinación no homóloga, introducen *indels* en la región del gen que se quiere mutar. La PCR con 3 *primers* de la región de interés se lleva a cabo utilizando *primers* específicos (Fw y Rev) que flanquean dicha región y un *primer* universal marcado con FAM en su extremo 5' (FAMF) específico para la secuencia que sobresale en 5' del *primer* Fw. La PCR con 3 *primers* resulta en el marcado del amplicón con FAM. 2. Los amplicones marcados con

fluorescencia que contienen los *indels* serán detectados por el análisis de los fragmentos. Los ejes representan la intensidad de fluorescencia (*Relative Fluorescence Units*) y el tamaño del amplicón en pb. Extraído de⁹⁸.

3.4. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ARN total de todas las líneas celulares fue realizada utilizando *TriReagent* (*Sigma-Aldrich*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN fue cuantificado espectofotométricamente a 260 nm y la pureza del mismo se determinó con la relación A260nm/A280nm. La síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa se realizó en una reacción conteniendo 1 µg de ARN total, 200 U de transcriptasa reversa MMLV (Thermo Fisher), 2 µL de 10 mmol/L de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) y 1 µL con 250 ng de hexámeros al azar, 4 µL de buffer RT 5X y 2 µL DTT (ditiotreitól, 100 mM), completando a un volumen final de 20 µL con H₂O destilada libre de RNAsas. La reacción se realizó a 37°C durante 1 hora y luego se incubó a 85°C por 5 minutos de forma de inhibir irreversiblemente a la enzima.

La calidad de los ADNcs fue evaluada mediante PCR (*TGradient Biometra*) utilizando los siguientes primers específicos para la β2-microglobulina:

5'- ATGTCTCGCTCCGTG GCCTTAG-3' (Foward)

5'-AAGTTGCCAGCC CTCCTAGAGC-3'(Reverse)

3.5. Electroforesis y Western blot

Los lisados celulares fueron preparados resuspendiendo las células en el

buffer de lisis RIPA 1x que contiene Tris 250 mM (pH 8), NaCl 750 mM, NP-40 5%, Deoxicolato de Sodio 2,5%, SDS 0,5% y 1mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Luego se incubaron las muestras durante 30 minutos a 4°C vortexeando cada 5 minutos, se sonicaron y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos. Se determinó la concentración proteica del sobrenadante por el método del ácido bicinconínico (BCA, Sigma) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Aproximadamente 50 µg de extracto proteico fueron analizados por SDS-PAGE al 12% bajo condiciones de reducción, según los protocolos previamente descriptos¹⁰³.

Los extractos celulares utilizados para las electroforesis bidimensionales (2DE) fueron preparados utilizando un buffer conteniendo 40 mM de Tris base, 7 M de urea, 2 M de tiourea, 4% de CHAPS y 1 mM de PMSF. Entre 60 y 120 µg de proteínas fueron enfocadas isoeléctricamente, sobre gradientes de pH 3 a 11 y 6 a 11, en tiras de 7 cm, usando el siguiente protocolo: 30 minutos a 300 V (*Step and Hold*), 30 minutos a 1000 V (*Gradient*), 1 hora y 20 minutos a 5000 V (*Gradient*) y 2000 V por hora hasta acumular 5000 V (*Step and Hold*). La separación por SDS-PAGE se realizó en geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones reductoras¹⁰³.

La transferencia semi-seca a membranas de nitrocelulosa (*Amersham*) se realizó a 90 V durante 1 hora en un buffer Tris-HCl (25mM, pH 8,3), glicina 192 mM y etanol 20%. Luego de una tinción reversible con *Ponceau* (*Sigma*), las membranas fueron bloqueadas con BSA al 5% en PBS 1X

durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo anti-T13 (T13.5) sin diluir y el anti-Ig de conejo conjugado a peroxidasa diluido en PBS 1X con 0,5% de Tween-20 y 1% de BSA fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente y los lavados se realizaron en PBS 1X con 0,5% de Tween-20. El revelado se realizó con quimioluminiscencia (ECL, Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento, omitiendo el primer anticuerpo.

3.6. Inmunofluorescencia

Las distintas líneas celulares fueron cultivadas hasta un 70% de confluencia sobre cubre objetos circulares, previamente esterilizados, en placas de cultivo de 24 pocillos. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X estéril y luego se fijaron con PFA 4% en PBS 1X durante 20 minutos a 4°C. Las membranas celulares fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0,3% en PBS 1X por 20 minutos a 4°C realizando 3 lavados con PBS 1 X antes y después de la permeabilización y se guardaron las placas con los cubreobjetos a - 20°C.

La inmunofluorescencia se realizó bloqueando con BSA 5% en PBS 1X por 1 hora a temperatura ambiente, luego se incubó con el sobrenadante del anticuerpo primario de ratón anti-GalNAc-T13 producido en nuestro laboratorio sin diluir (T13.5) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos cada uno, se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa 488

(1/500) diluido en BSA 3% + SFB 1%, durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X durante 5 minutos cada uno y se le agregó DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) durante 5 minutos en oscuridad. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se montaron los cubre objetos sobre los portaobjetos utilizando *Mowiol*. Los controles negativos se realizaron con el mismo procedimiento, excepto que se sustituyó el anticuerpo primario por BSA 3% SFB 1%.

3.7. Inmunocitoquímica

Se depositaron las células A549 wt y A549 T13^{-/-} en cubreobjetos mediante *cytospin* (10 minutos a 1500 rpm). Se bloquearon los sitios inespecíficos con suero de cabra al 30% diluido en Tris 50mM pH 7.4, BSA 1% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron las diferentes lectinas: Helix Pomatia (HP) que tiene como motivo de unión la α -N-acetilgalactosamina, Peanut Agglutinin (PNA) la cual se une a Gal- β (1-3)-GalNAc y Conavalina A (ConA) que es una lectina específica de manosa/glucosa a una concentración de 10 μ g/ml en Tris 50 mM pH 7.4, BSA 1% y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con el tampón de lavado (TBST: Tris 50 mM + 9% NaCl + Tween 0,05%) y luego las láminas se incubaron con estreptavidina conjugada a la peroxidasa de rábano (1/1000) diluída en Tris 50 mM pH 7.4, BSA 1% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con el tampón de lavado y se realizó una

incubación de 10 minutos con el crómogeno-sustrato diaminobenzidina (DAKO). Se lavaron las láminas con agua destilada durante 5 minutos y se incubaron con hematoxilina durante 2 minutos. Luego se lavaron con agua corriente durante 10 minutos y se realizaron 10 inmersiones en hidróxido de amonio 37 mM. Se lavaron nuevamente en agua destilada durante 5 minutos y se sumergieron en isopropanol 2 veces durante 5 minutos y luego en xilol una vez durante 5 minutos. Se montaron los portaobjetos con bálsamo de Canadá.

Los controles negativos se realizaron con el mismo procedimiento, excepto que se sustituyó la lectina por Tris 50 mM pH 7.4, BSA 1%.

3.8. PCR a tiempo real para GALNT13

Con el fin de realizar el análisis de expresión relativa del gen que codifica para la glicoenzima GalNAc-T13 en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humano y para las células mutantes GalNAcT13^{-/-}, se realizó una PCR a tiempo real para este gen. La mezcla se preparó utilizando el kit *KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2×) Universal (Kapa Biosystems)* y se analizó la reacción en el termociclador *Eco TM 48 Real Time PCR System*. La especificidad de las secuencias de *primers* para *GALNT13* utilizados y la temperatura de *annealing* óptima para la reacción fueron previamente evaluadas por PCR convencional.

Los valores de expresión fueron normalizados con el gen de referencia que codifica para la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). Para amplificar el gen *GAPDH* se utilizó el juego de *primers* empleado en la PCR convencional cuyo producto de amplificación corresponde a una banda de 177 pb (tabla 1).

La mezcla de reacción para cada PCR fue preparada en un volumen final de 10 µL conteniendo: 5µl del *Master Mix Sybr green* (2x), 0,1 µL de *primer forward* (10 µM), 0,1 µL de *primer reverse* (10 µM), 1 µL de ADNc, y agua miliQ hasta completar el volumen final.

Las condiciones de amplificación para el gen *GALNT13* consistieron en: 2 minutos a 50°C, 3 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos compuestos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 54°C y 20 segundos a 72°C.

Con el fin de conocer cuánto difiere la expresión del gen de la GalNAc-T13 en cada línea celular de cáncer de pulmón humano con respecto a la línea celular A549, se utilizó el método del Ct comparativo o también conocido como el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

El Ct (por su sigla en inglés *Cycle threshold*) es el número de ciclos en que la muestra supera un valor umbral (*threshold*) en la señal de fluorescencia el cual fue determinado (manual o automáticamente) previamente¹⁰⁴. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$\Delta Ct = Ct \text{ línea celular (para el gen } GALNT13) - Ct \text{ muestra de línea celular gen calibrador (} GAPDH)$

Luego se calcula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ de la línea celular A549}$$

Y a continuación:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Se graficó la media entre los dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtenidos para cada muestra (duplicados) considerando el promedio de expresión del gen *GALNT13* de la línea celular A549 como nivel basal de expresión ($y=1$ en el gráfico). Se realizó un control negativo con agua miliQ en lugar de ADNc.

Para detectar la existencia de diferencias significativas entre las medias de la expresión relativa del gen de interés (*GALNT13*) en cada línea celular con respecto a la línea A549 *wt*, se utilizó el test T de *Student* no-pareado de dos colas con un intervalo de confianza del 95%. Se utilizó el *software GraphPad* versión 5.00 para *Windows* (San Diego, California, USA), para la realización de las gráficas y para los cálculos estadísticos.

3.9. Modelo Animal

Para llevar a cabo los experimentos *in vivo*, se emplearon ratones atímicos BALB/c (nu/nu), hembras de 6-8 semanas de vida y procedentes de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut

Pasteur de Montevideo. Éstos fueron mantenidos en un ambiente controlado y estéril, con temperatura entre 19 y 21°C y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los animales fueron alojados en jaulas con filtro y recibieron agua y ración esterilizada, administradas en condiciones *ad libitum*.

Para este ensayo se emplearon seis ratones *nude* para cada línea celular (A549 *wt* y A549 T13^{-/-}). Las células tumorales se diluyeron en PBS estéril a una concentración de 5×10^3 células en 100 μ L, y se inocularon subcutáneamente en los flancos de los ratones (100 μ L por flanco). El volumen tumoral fue medido tres veces por semana desde su aparición visible, calculándose según la ecuación $V = \frac{4}{3} \pi \times L \times W^2$, donde L es el radio mayor del tumor y W el radio menor. Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor en el flanco alcanzó los 150 mm³.

Cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Todos los procedimientos con los animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República y por la Comisión de Ética del Institut Pasteur de Montevideo.

3.10. Aislamiento de ARN para el análisis por microarreglos

Aproximadamente 1.8×10^6 células fueron lavadas con PBS y luego se les agregó 1 mL de *TRIzol* (*Thermo Fisher Scientific*). Las células lisadas en *TriZol* se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . El *TriZol* inhibe la actividad ribonucleasa (RNasa) preservando la integridad del ARN contenido en las muestras. La extracción y purificación de ARN de los dos tipos celulares se realizó en paralelo en el mismo día para minimizar la variabilidad. Básicamente, la extracción con *TriZol* se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ARN obtenido se almacenó a -80°C . La concentración de ARN se calculó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm. Para ello se utilizó un *Nanodrop* (*Thermo*). La integridad del ARN se evaluó mediante el “*RNA Integrity Number*” (RIN)¹⁰⁵, el cual consiste en la medida de la relación de los picos ribosomales 18S y 28S. El RIN disminuye en relación directa al nivel de degradación del ARN. Para dicha evaluación se sometió una alícuota de cada una de las muestras a una separación electroforética en chips micro-fabricados que luego se analizó por fluorimetría en un *Bioanalyzer* (*Agilent*). Se seleccionaron las muestras con un RIN mayor a 8 para su posterior uso.

3.11. Análisis por microarreglos

Se sintetizó ARNc conjugado al fluoróforo Cianina 3 (ARNc-Cy3) a partir de 200 ng de ARN de cada una de las líneas celulares. Para ello se utilizó el kit *Low Input Quick Amp Labeling Kit- One color* (Agilent), siguiendo las especificaciones del fabricante.

(http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G414090040_GeneExpression_OneColor_6.9.pdf)

Básicamente, la reacción comienza con la síntesis de ADNc a partir del ARN total utilizando un *primer* de poli-desoxitimidinas unido a un promotor para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (promotor T7) y una Transcriptasa Reversa (MMLV-RT).

A partir del ADNc obtenido se sintetiza el ARNc con una ARN polimerasa T7 que incorpora Citosina Tri-fosfato (CTP) conjugada al fluoróforo Cy3 en vez de CTP (figura 6). El ARNc-Cy3 obtenido se purificó utilizando el kit *RNA Easy Mini Spin Columns* (Qiagen) siguiendo especificaciones del fabricante. El ARNc-Cy3 purificado se analizó utilizando el *Nanodrop*. Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Concentración de Cy3 (pmol/μL)
- Relación de absorbancia de ARN/proteína (260 nm/280 nm)
- Concentración de ARNc (ng/μL)

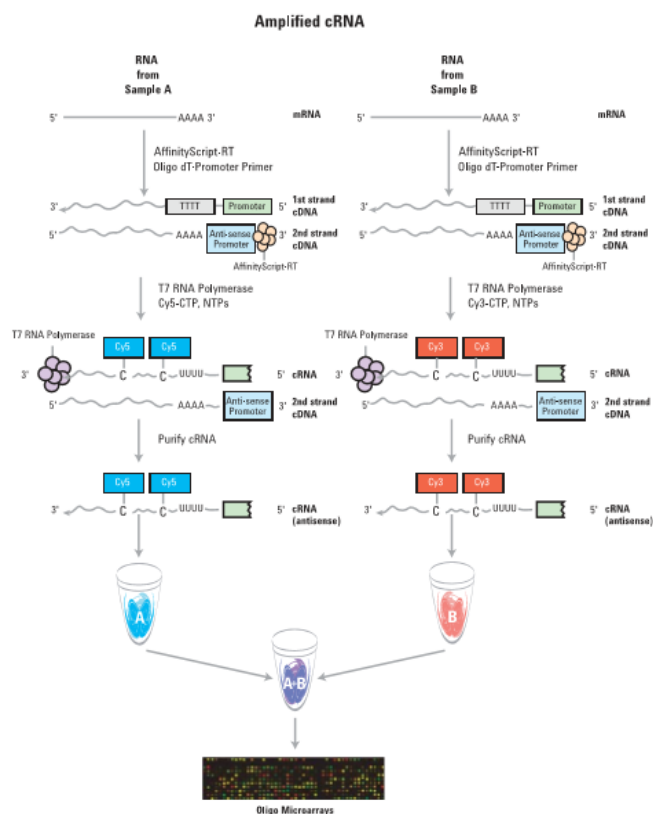


Figura 6 - Diagrama de flujo de obtención del ARNc-Cy3. Extraído de: http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/g4140-90041_one-color_tecan.pdf

Para la hibridación en los microarreglos se utilizaron 1,65 µg de ARNc-Cy3 de actividad específica Cy3 mayor a 9.0 pmolCy3/µg de ARNc-Cy3. La cantidad y la actividad específica del ARNc-Cy3 se determinaron utilizando las ecuaciones 1 y 2 respectivamente (ec. 1, ec. 2). En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las muestras.

$$\mu\text{g de ARNc} = \frac{(\text{concentración de ARN}) \times 30 \mu\text{L (volumen de elución)}}{1000}$$

(ec. 1)

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{concentración de Cy3} \times 1000}{\text{concentración de ARNc}} \quad (\text{ec. 2})$$

Tabla 2 - Concentración y calidad del ARNc-Cy3 obtenido para cada una de las muestras

Muestra	Cy3 (pmol/μl)	Concentración (ng/μL)	ARNc-Cy3 (μg)	Actividad Específica (pmol/μg)	A260/280
A549 T13/- 1	5,88	221,81	6,65	26,51	2,3
A549 T13/- 2	5,98	234,37	7,03	25,52	2,4
A549 T13/- 3	5,63	251,31	7,54	22,40	2,34
A549 T13/- 4	4,73	254,85	7,65	18,56	2,39
A549 1	1,4	114,09	3,42	12,27	2,32
A549 2	1,74	145,22	4,36	11,98	2,33
A549 3	1,82	143,41	4,30	12,69	2,34
A549 4	1,67	142,52	4,28	11,72	2,38

Los análisis de expresión génica se pueden realizar en plataformas de microarreglos de un color (basados en la intensidad) o de dos colores (basados en la relación) dependiendo de la aplicación específica del experimento. Nuestro estudio se llevó a cabo utilizando la plataforma de microarreglos de un color. La alternativa de un solo color brinda la capacidad de comparar la expresión génica obtenida en un microarreglo directamente con la de otro microarreglo para determinar sub o sobre-expresión de un gen.

Para los experimentos de microarreglos se utilizan varios tipos de sondas fluorescentes. Las plataformas de expresión génica de un color de Agilent

utilizan la sonda Cianina 3 (Cy3) debido a que comparada a la Cy5 es menos susceptible a la degradación por factores ambientales como el ozono, el pH, y los solventes orgánicos.

El análisis por microarreglos se realizó utilizando el *SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray Kit* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Se hibridaron un total de 8 arreglos divididos en 4 muestras de A549 wt y 4 muestras de A549 *GALNT13*^{-/-}. La hibridación y los lavados se realizaron siguiendo las especificaciones del fabricante. El escaneo de los portaobjetos de vidrio se llevó a cabo en el *Agilent microarray scanner G2505C* utilizando el ajuste de parámetros por defecto. Los datos en bruto se extrajeron utilizando el *Agilent Feature Extraction Software (FE software-Agilent Technologies)*. Como control de calidad de los microarreglos se utilizó el *Agilent One Color RNA Spike-in kit* (Agilent) y se generó el *Quality Control Report* (QC Report) con el FE software. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la herramienta BRB Versión 4.5.1 (<https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>).

Como se compararon dos grupos (A549 wt y A549 ^{-/-}) se utilizó un test T. El p-valor indica la probabilidad de obtener una diferencia de medias entre los grupos tan alta como la que se observa al azar. Cuanto menos es el valor de p, más significativa es la diferencia entre los grupos. Se estableció un nivel de significación de 0,001. Esto se traduce en que los genes considerados diferencialmente expresados entre las muestras fueron los que presentaron un valor de p menor al 0,001.

3.12. Ensayo de Quimiorresistencia de células A549 *wt* y A549 T13^{-/-} mediante MTT

Para determinar diferencias en la viabilidad celular en presencia de ciertas drogas comúnmente utilizadas en tratamientos quimioterapéuticos para el cáncer de pulmón se realizaron ensayos de MTT. Este ensayo se basa en el hecho de que el compuesto bromuro de 3-(4, 5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio es reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul e insoluble en soluciones acuosas (formazán), lo que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y por tanto su viabilidad. Por tanto, la cantidad de formazán generado, es directamente proporcional al número de células viables¹⁰⁶.

Se sembraron 7.000 células en placas de 96 pocillos en un volumen de 100 μ L por pocillo. Se incubó la placa durante 24 horas en estufa a 37°C y 5% CO₂ para que las células se adhirieran al sustrato. Luego, se realizaron distintas diluciones de cada droga (**Cisplatino**: 0 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 80 μ M y 100 μ M; **Paclitaxel**: 0 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M y 100 μ M; **Carboplatino**: 0 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M y 100 μ M ; **5-Fluorouracilo**: 0 μ M, 0.1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M y 100 μ M; **Carboplatino + Paclitaxel**: 0 μ M, 5 μ M + 5 μ M, 10 μ M + 10 μ M, 20 μ M + 20 μ M, 50 μ M + 40 μ M, 100 μ M + 80 μ M; **Cisplatino + Paclitaxel**: 0 μ M, 20 μ M + 5 μ M, 40 μ M + 10 μ M, 50

$\mu\text{M} + 20 \mu\text{M}$, $80 \mu\text{M} + 40 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M} + 80 \mu\text{M}$). Se descartó el medio de cultivo y se agregó medio fresco con las distintas diluciones de las distintas drogas en un volumen final de $100 \mu\text{L}$. Las células se incubaron a 37°C y $5\% \text{CO}_2$ durante 48 horas.

Posteriormente a la incubación, se descartó el medio de cultivo con las drogas y se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de MTT (Sigma) a $0,5 \text{ mg/mL}$ diluido en medio de cultivo. Se agitó la placa a 150 rpm durante 1 minuto y se incubó en la oscuridad a 37°C y 5% de CO_2 por 4 horas. Luego, se descartó el medio de cultivo con MTT, se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de DMSO a cada pocillo para disolver los cristales y la placa se agitó durante 1 minuto a 150 rpm . Para cuantificar la concentración del producto, se midió la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro (*Multiskan EX, Thermo Scientific*).

La viabilidad se calculó tomando como el 100% de la actividad de la enzima succinato-deshidrogenasa a la absorbancia de los pocillos control (sin droga). Se calcularon los porcentajes de actividad de la enzima en las células tratadas según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Abs x } 100}{\text{Abs C}}$$

donde Abs es la absorbancia de los pocillos de las células tratadas y Abs C es la absorbancia del control.

Luego se realizó un gráfico de porcentaje de actividad enzimática en función de la dosis de cada droga. Los datos utilizados son el promedio de los triplicados y se realizó un test de Wilcoxon para el análisis estadístico.

3.13. RT-PCR de la GalNAc-T13 y sus variantes de *splicing*

Se optimizaron diferentes reacciones de RT-PCR de forma de amplificar fragmentos de la GalNAc-T13 y sus variantes de *splicing*, por medio de una sola ronda de 35 ciclos para amplificar la GalNAc-T13 y la variante Ex10b y *nested* PCR para las variantes Δ Ex9, Δ 39pbEx9, Δ Ex6, Δ Ex6/8, Δ Ex8, Δ Ex6/Ex8/ Δ 39pbEx9, Δ Ex6/ Δ 39pbEx9.

Para amplificar la GalNAc-T13, se adicionó 1 μ L de ADNc para un volumen final de 25 μ L de una mezcla de PCR que contenía 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 400 nM de cada primer (GALNT13-Fw/T13_XhoI_Rev), 200 μ M de dNTPs y 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Fermentas INC, MD). Se realizaron 35 ciclos de la siguiente manera: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C y 1 minuto a 72°C. El producto de PCR analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 2% resultó en una banda de 424pb. Las mismas condiciones, pero con 2 mM de $MgCl_2$ se utilizaron para la amplificación de Ex10b utilizando los pares de *primers* T13_Ex10b_Fw/ T13_Ex11_Rev, con una temperatura de *annealing* de 60°C y un producto de PCR de 270 pb. Se realizó una primera ronda para las 7 variantes restantes, sembrando 1 μ L de ADNc en un volumen final de 25 μ L. La mezcla de PCR contenía 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl,

1.5 mM MgCl₂, 400 nM de cada primer (T13_784_Fw/T13_Ex11_Rev), 200 μM dNTPs y 1 unidad de Taq ADN polimerasa. Se amplificó por 20 ciclos a 59°C de temperatura de *annealing* y el producto de PCR obtenido fue de 820 pb. La segunda ronda se realizó con 25 ciclos para la variante ΔEx9, 30 ciclos para las variantes ΔEx8 y ΔEx6/8, y 35 ciclos para las variantes ΔEx6, Δ39pbEx9, ΔEx6/39pbEx9 y ΔEx6/8/39pbEx9. Se sembró 1 μL del producto de la primera ronda y se realizó la segunda ronda en las mismas condiciones, aunque se utilizó 2 mM de MgCl₂ en el caso de las variantes ΔEx8 y ΔEx9. Los pares de *primers* utilizados fueron: T13_Δ6_Fw/T13_Ex7_Rev (201 pb); T13_Ex7_Fw/T13_Δ8_Rev (197 pb); T13_Ex7_Fw/T13_1393_Rev (336 pb); GalNT13_Fw/ T13_Δ39bpEx9_Rev (131 pb); T13_Δ6_Fw/T13_Δ8_Rev (226 pb) y T13_Δ6_Fw/T13_Δ39bpEx9_Rev (425 y 285 pb) para las variantes ΔEx6, ΔEx8, ΔEx9, Δ39pbEx9, ΔEx6/8, ΔEx6/39pbEx9 y ΔEx6/8/39pbEx9, respectivamente. Los productos de PCR (15 μL) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y se visualizaron directamente luego de la tinción con bromuro de etidio. La identidad de cada banda se confirmó por secuenciado. La secuencia de los *primers* utilizados se muestra en la tabla 1.

4. RESULTADOS

4.1. Generación de la línea celular A549 GALNT13^{-/-} utilizando la tecnología Crispr/Cas9 y su posterior caracterización.

Con el fin de determinar si la expresión de la enzima GalNAc-T13 está relacionada con diferentes características de la biología tumoral y en particular con la quimioresistencia, nos propusimos generar una línea celular tumoral que fuera *knockout* para dicha enzima utilizando la tecnología Crispr/Cas9.

Teniendo en cuenta que la GalNAc-T13 ha sido recientemente implicada en la metástasis del cáncer de pulmón en ratón^{93,94}, ha sido propuesta como factor pronóstico útil en el cáncer de pulmón humano⁹⁶, y se asoció con la quimioresistencia en pacientes con adenocarcinoma de pulmón, elegimos trabajar con la línea celular de cáncer de pulmón humano A549, derivada de un paciente con adenocarcinoma, la cual se ha reportado que expresa dicha enzima (proteinatlas.org). Se probaron diferentes métodos y condiciones de transfección (lipofección y nucleofección) con un plásmido que codificaba para la GFP (pmaxGFP™). Se obtuvieron eficiencias mayores a 70% con la lipofección mientras que con la nucleofección las eficiencias fueron muy bajas y se observó una disminución considerable en la viabilidad celular (figura 7). Por dicho motivo, se eligió el método de lipofección para la realización del *knockout* para GALNT13.

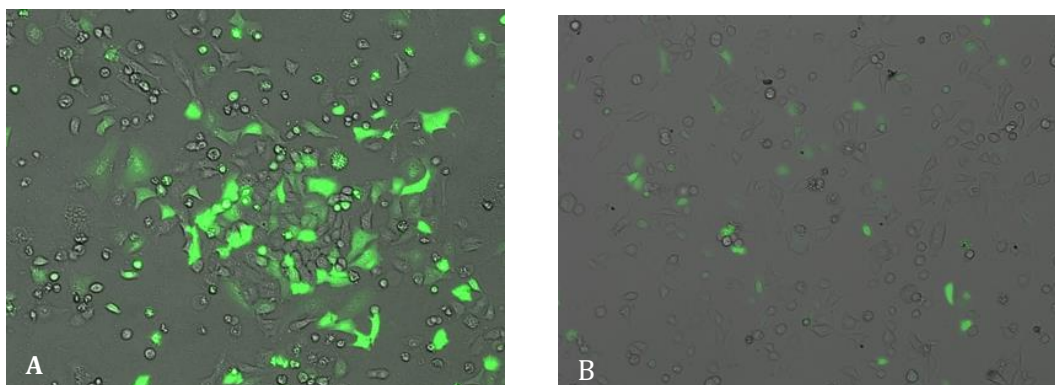


Figura 7 - Microscopía de epifluorescencia de células A549 transfectadas con plásmido que codifica para GFP (pmaxGFP™) luego de 48 horas. A) células transfectadas utilizando lipofectamina. B) células transfectadas por Nucleofección. En ambos casos se utilizó un microscopio de epifluorescencia para visualizar la expresión de GFP y campo claro para la visualización de las células (aumento: 10x).

Las células A549 fueron transfectadas con el par Crispr/Cas9 para mutar *GALNT13*. Como el plásmido Cas9 codifica también para la GFP, se analizó el *pool* de células GFP+ por IDAA y por Inmunofluorescencia para ver la eficiencia de mutación (figura 8). Se seleccionaron las células GFP+ por FACS mediante *single cell deposition* (una célula por pocillo). Cada clon de células GFP+ fue analizado por PCR convencional (para luego secuenciar la región de interés) y por IDAA. Seleccionamos el clon 3 para continuar con el trabajo debido a que presentó inserciones que cambian el marco de lectura en ambos alelos del gen *GALNT13* (figura 9).

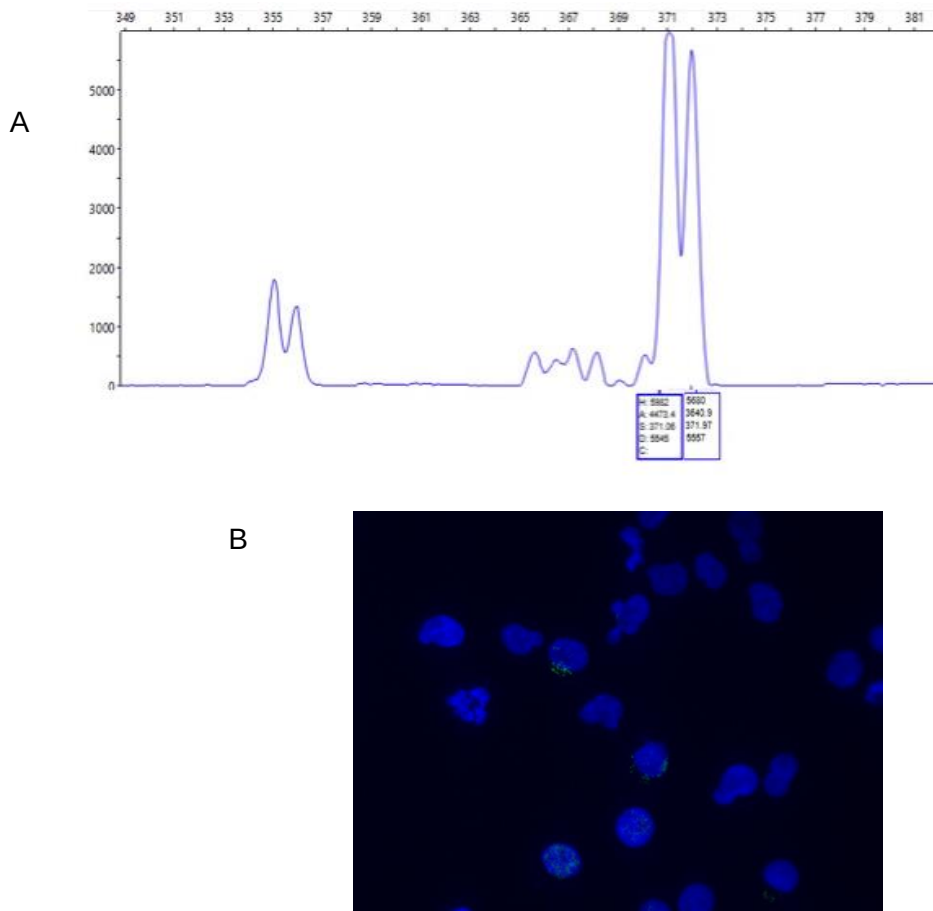


Figura 8 - Análisis del pool de células A549 GFP+ transfectadas con el par Crispr/Cas9 para mutar GALNT13. A) Análisis por IDAA: El tamaño de los *indels* (en pares de bases) se representa sobre cada pico. Debajo de cada pico se representa el tamaño total (en pares de bases) de los amplicones (371 pb y 372 pb). **B)** Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-GalNAc-T13 (T13.5) en *pool* de células GFP+ transfectadas con el par Crispr/Cas9 para mutar GALNT13 (aumento 40x).

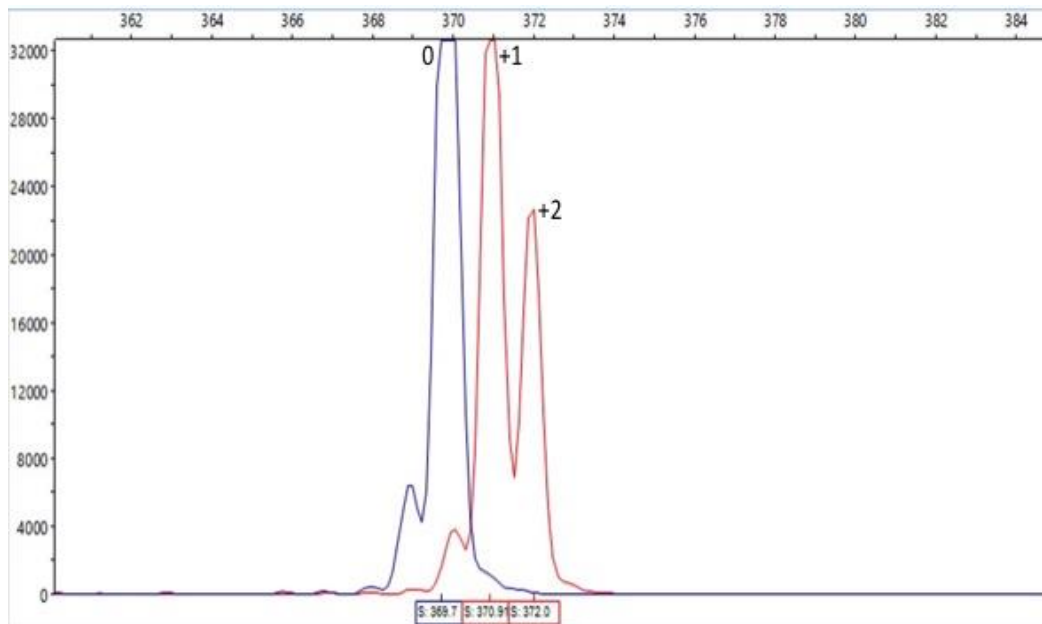


Figura 9 - Análisis por IDAA de A549 wt (en azul) y A549 GALNT13^{-/-} (clon 3) (en rojo). El tamaño de los *indels* (en pares de bases) se representa sobre cada pico. Debajo de cada pico se representa el tamaño total (en pares de bases) de los amplicones (370 pb en el wt y 371 y 372 pb en el clon 3).

Las mutaciones encontradas por IDAA en el clon 3 fueron confirmadas por secuenciado (figura 10). Por lo tanto, se seleccionó el clon 3 para realizar el análisis de quimiosensibilidad *in vitro* y para la caracterización de esta línea celular *ko in vitro* e *in vivo*.

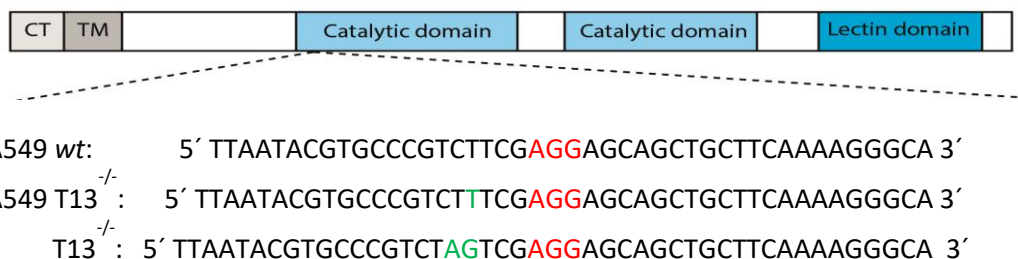
GALNT13

Figura 10 - Representación de los dominios proteicos de la GalNAc-T13 y de las secuencias de ADN donde se introdujeron las mutaciones (en verde). La secuencia PAM (*protospacer adjacent motifs*) se muestra en rojo.

Para corroborar que las mutaciones en el gen *GALNT13* encontradas en el clon 3 se correspondían con una ausencia en la expresión de la enzima comparamos las líneas celulares A549 *wt* y *ko* tanto a nivel de ARNm como de proteína.

Por un lado, se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-GalNAc-T13 (T13.5) generado en nuestro laboratorio. Como se puede observar en la figura 11, las A549 *wt* muestran reactividad con el anticuerpo T13.5. Aunque la marcación no es evidente en todas las células (quizás por los comúnmente bajos niveles de expresión de la enzima), en las células marcadas se observa una marcación perinuclear que es lo que esperamos al tratarse de una enzima residente en el aparato de Golgi. Las A549 *ko* para *GALNT13* no presentaron marcación como era de esperar.

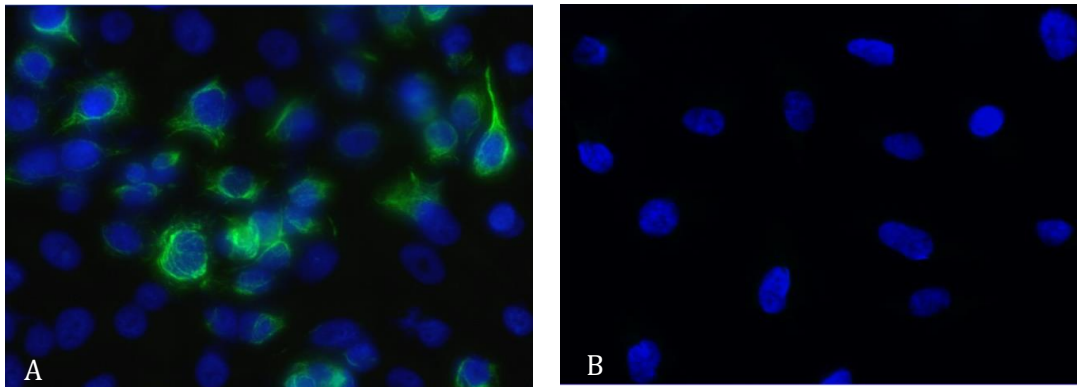


Figura 11 - Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-GalNAc-T13 (T13.5). A) células A549 *wt* y B) células A549 *T13^{-/-}* (aumento: 40x).

Con el fin de confirmar la localización subcelular de la GalNAc-T13 en las células A549 *wt*, se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-T13 (en verde) y con un anticuerpo anti-Giantina (marcador del aparato de Golgi, en rojo). Como se puede observar en la figura 12, existe una co-localización (en amarillo) de ambas proteínas en las células A549 *wt*. Esto confirma la localización subcelular de GalNAc-T13 en el aparato de Golgi.

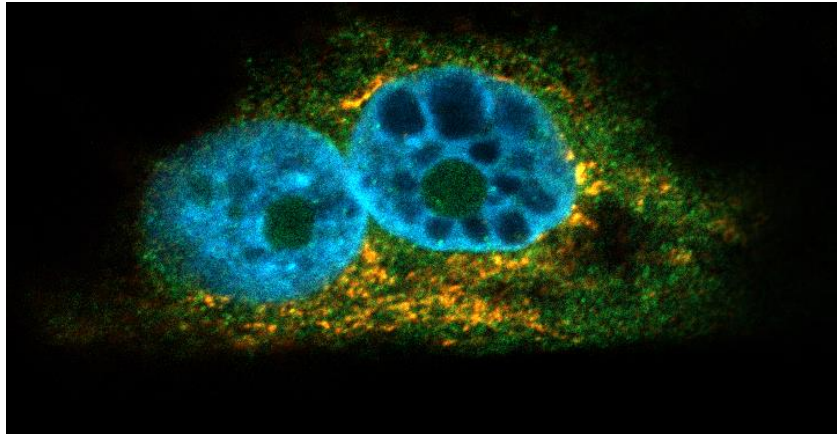


Figura 12 - Inmunofluorescencia en células A549 *wt* con anticuerpo anti-GalNAc-T13 (verde) y anti-Giantina (rojo). Se observa la co-localización en amarillo de la proteína GalNAc-T13 con la Giantina en el aparato de Golgi. La imagen fue tomada en el microscopio confocal Zeiss axio observer Z1 (aumento: 63x).

Por otro lado, se analizaron los extractos de ambas líneas celulares mediante *western blot* utilizando el mismo anticuerpo anti-GalNAc-T13 (T13.5). Como control positivo de la técnica se utilizó una GalNAc-T13 recombinante expresada en células de insecto empleando Baculovirus⁹⁷.

En la figura 13 se muestra la marcación de la proteína GalNAc-T13 recombinante y se observa que su peso molecular es el esperado (64 kDa).

Por otro lado, nos encontramos con que, si bien tanto el extracto proteico de A549 *wt* como el del *ko* reaccionaron con el anticuerpo anti-GalNAc-T13, las bandas obtenidas tienen un peso molecular menor al esperado (por abajo de 55 kDa), por lo que suponemos que las mismas no corresponden a la proteína GalNAc-T13. Esto puede deberse a que esta enzima tiene bajos niveles de expresión y podría no detectarse en un extracto proteico

total. Vale la pena recalcar que el ARNg del Crispr utilizado impide que se generen las variantes de *splicing* reportadas previamente⁹⁷ ya que el *indel* se introduce en el exón 4. Por tanto, estas bandas tampoco pueden representar a las variantes descriptas previamente.

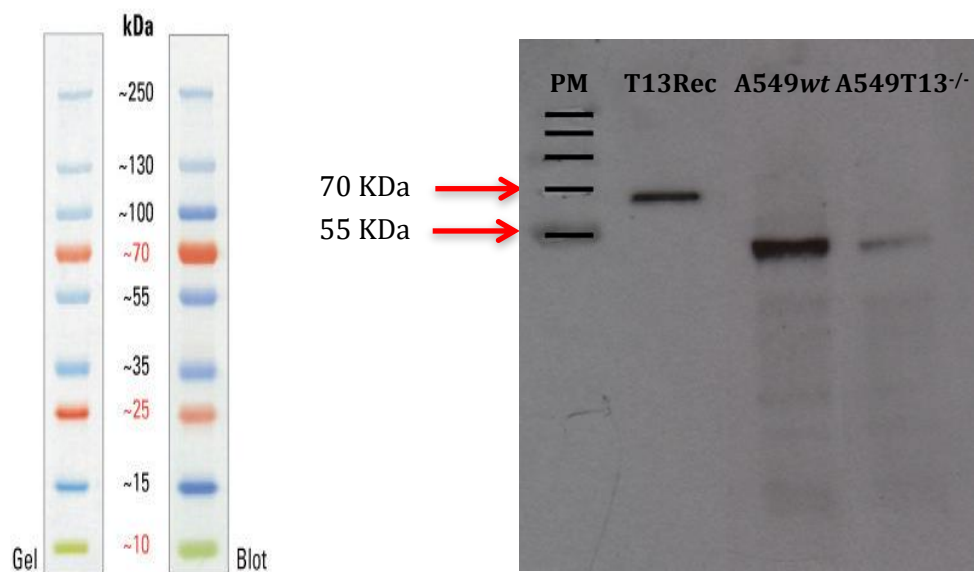


Figura 13 - Western Blot utilizando un anticuerpo anti-GalNAc-T13 en las líneas A549 *wt* y A549 T13^{-/-}.

Con el fin de caracterizar la expresión de GalNAc-T13 a nivel de ARN mensajero en las líneas celulares A549 *wt* y *ko*, se realizó una Real Time PCR utilizando *primers* específicos para amplificar el gen *GALNT13*.

Las diferencias en los niveles de expresión del gen *GALNT13* para A549 *wt* son significativamente mayores a los niveles de expresión de *GALNT13* en A549 T13^{-/-} ($p=0,0001$) (figura 14).

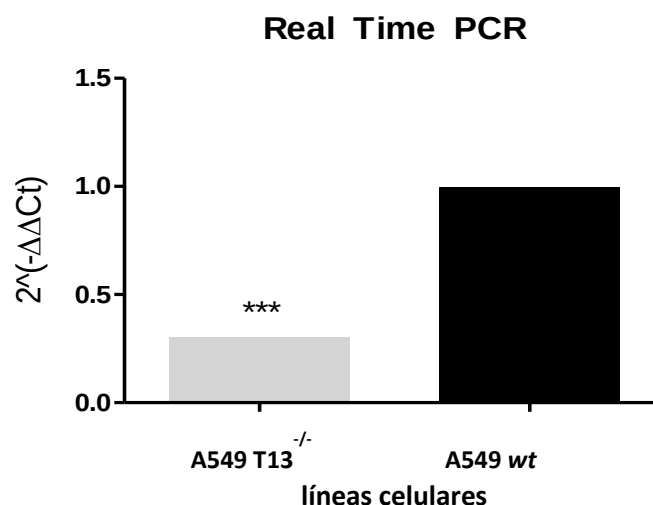
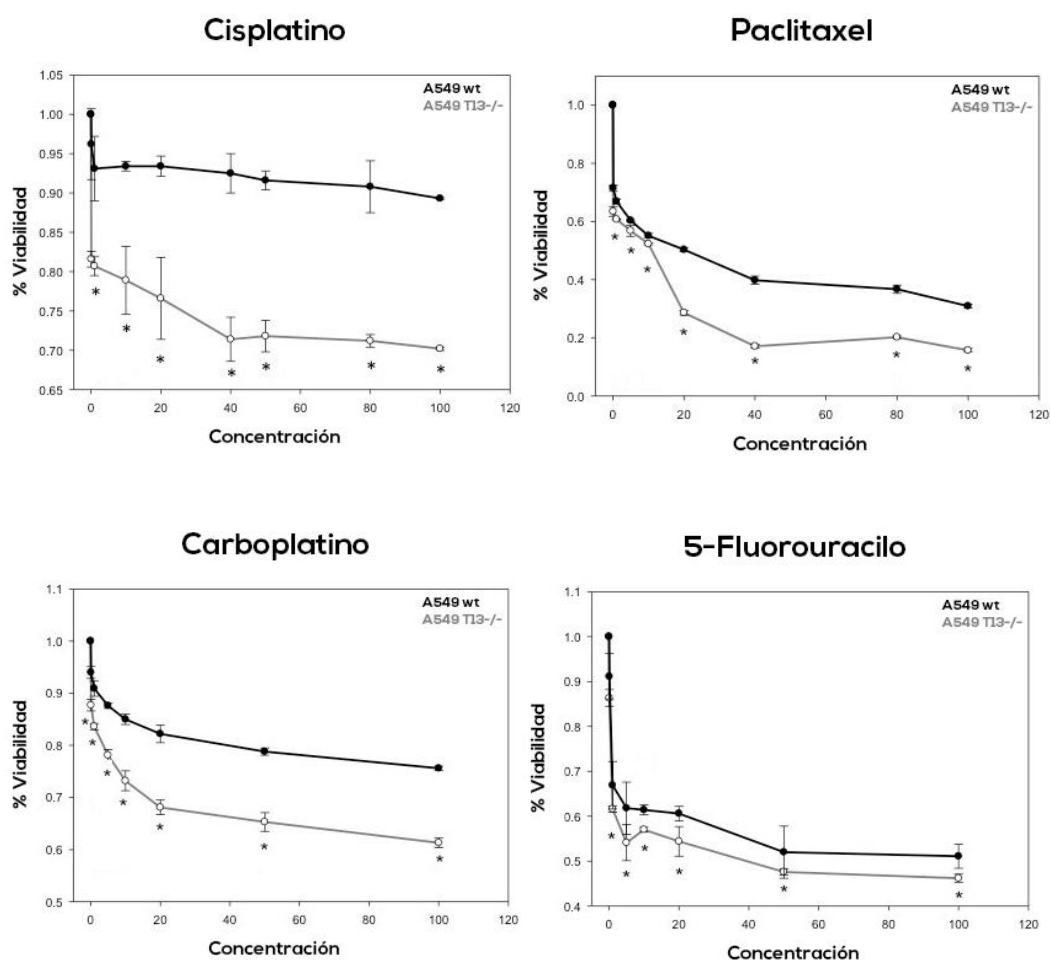


Figura 14 - Niveles de expresión relativa del gen *GALNT13* en líneas celulares A549 wt y A549 T13^{-/-} mediante Real Time PCR. Se utilizó el nivel de expresión del gen *GAPDH* para normalizar los valores de expresión del gen *GALNT13*. Se grafican los resultados del cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtenidos por Real Time PCR.

4.2. Determinar el rol que cumple la GalNAc-T13 en la biología del cáncer de pulmón *in vitro*.

Debido a la reciente observación de que la expresión de GalNAc-T13 en pacientes con adenocarcinomas de pulmón se asocia con resistencia a la quimioterapia (resultados no publicados), se estudió el efecto de varias drogas antitumorales en células que expresan GalNAc-T13 (A549 wt) y en células *knockout* para GalNAc-T13 (A549 T13^{-/-}) mediante el ensayo de MTT *in vitro* con el fin de correlacionar la expresión de GalNAc-T13 con la quimioresistencia. Como se muestra en la figura 13, el Carboplatino, 5-Fluorouracilo y las combinaciones de Carboplatino + Paclitaxel y Cisplatino + Paclitaxel, causaron una reducción significativa en la viabilidad celular de las células que no expresan GalNAc-T13 (A549 T13^{-/-}) en comparación con

las células que expresan GalNAc-T13 (A549 wt) en todas las concentraciones utilizadas. En el caso del Paclitaxel (0-100 μ M), también se observa una disminución significativa en la viabilidad de las células A549 T13^{-/-}, excepto para las concentraciones de 1 y 5 μ M. El Cisplatino también disminuye significativamente la viabilidad celular de las células A549 T13^{-/-} excepto para la concentración de 1 μ M (figura 15). Los valores graficados fueron expresados como el porcentaje de viabilidad celular respecto al control. Los valores son las medias $\pm$ DS. Los datos fueron analizados por el test de *Wilcoxon* ($p < 0,05$).



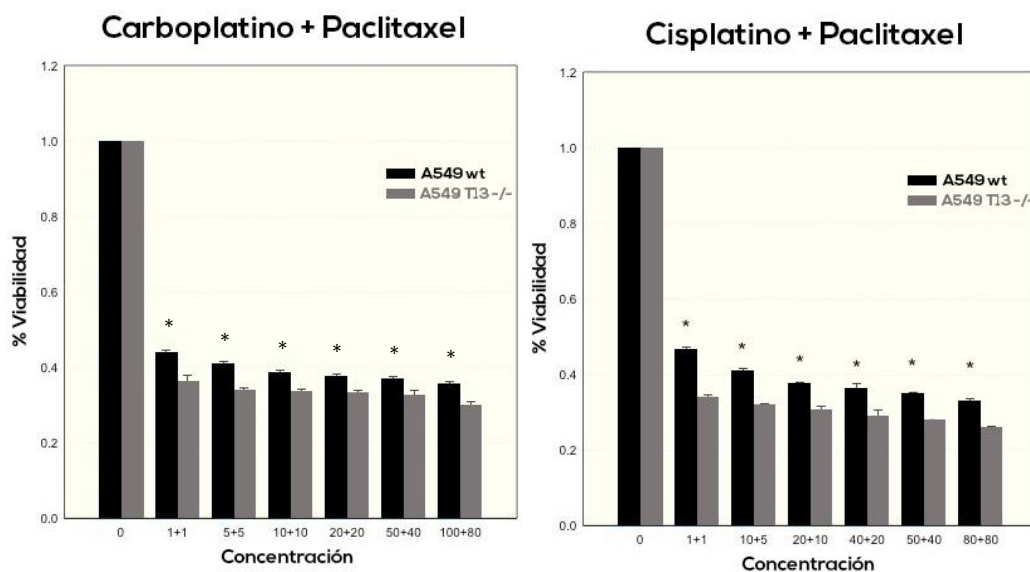


Figura 15 - Análisis de la viabilidad celular mediante MTT. Células A549 wt (en azul) y A549 T13^{-/-} (en rojo) fueron tratadas con diferentes concentraciones de Cisplatino (0.1, 1, 10, 20, 40, 50, 80 y 100 μ M); Carboplatino (0.1, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 μ M); Paclitaxel (0.1, 1, 10, 20, 40, 50, 80 y 100 μ M); 5-Fluorouracilo (0.1, 1, 5, 10, 20, 50 y 100 μ M) y combinaciones de Carboplatino + Paclitaxel (1+1, 5+5, 10+10, 20+20, 50+40, 100+80 μ M) y Cisplatino + Paclitaxel (1+1, 10+5, 20+10, 40+20, 50+40, 80+80 μ M) por 48 horas. Se utilizó la absorbancia del control como 100%. Los valores son las medias $\pm$ DS. Los datos fueron analizados por el test de Wilcoxon ($p < 0.05$).

4.3. Determinar el rol que cumple la GalNAc-T13 en la biología del cáncer de pulmón *in vivo*.

Con el fin de evaluar *in vivo* la relación entre la expresión de la enzima GalNAc-T13 y el crecimiento tumoral, las células A549 wt y A549 GalNAcT13^{-/-} se inocularon por vía subcutánea ($n=4$) en ratones *nude*.

Evaluamos la cinética de crecimiento tumoral, midiendo el tamaño del mismo cada dos días hasta alcanzar un tamaño máximo de 150 mm³.

Como se puede observar en la figura 16, los ratones inyectados con células A549 *wt* desarrollaron tumores más grandes que los ratones inyectados con células A549 T13^{-/-} (figura 17). También se observa que los ratones A549 *wt* desarrollaron tumor a los 22 días mientras que los ratones A549 T13^{-/-} desarrollaron tumor 27 después de la inyección (figura 18). Además, los ratones inyectados con células A549 *wt* desarrollaron entre dos o tres masas tumorales, mientras que los ratones inyectados con las células A549 GalNAc-T13^{-/-} desarrollaron una sola masa tumoral. Estos resultados iniciales sugieren que la inhibición de la enzima GalNAc-T13 disminuye la capacidad de crecimiento tumoral *in vivo* de células de adenocarcinoma de pulmón humano.



Figura 16 - Ratones *nude* inyectados con células A549 *wt* sacrificados a los 99 días post inyección.

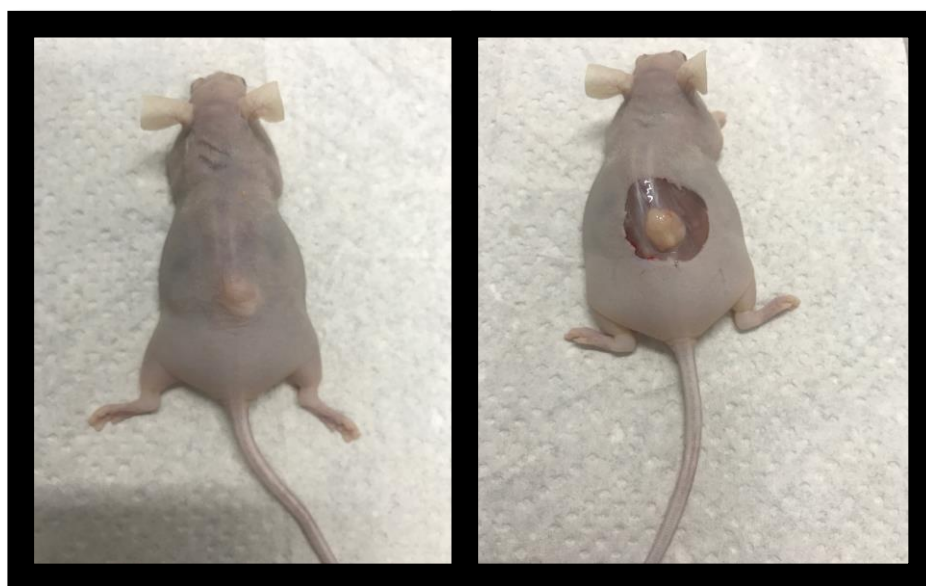


Figura 17 - Ratones *nude* inyectados con células A549 GalNAc-T13^{-/-} sacrificados a los 96 días post inyección.

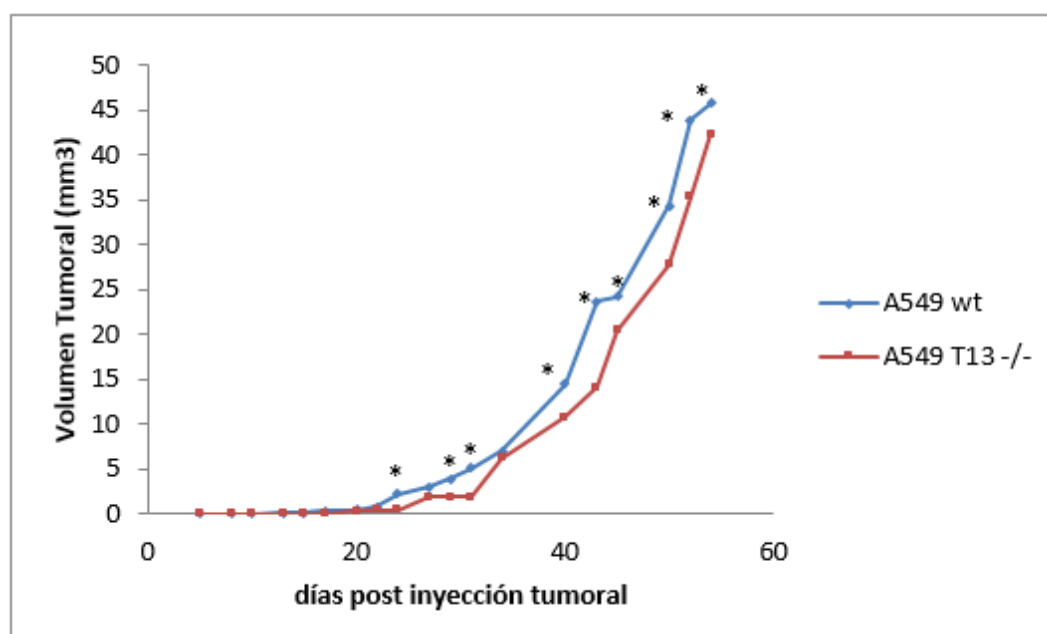


Figura 18 - Crecimiento del volumen tumoral en el tiempo a partir de la inyección de células A549 wt y A549 T13^{-/-} en ratones *nude*. Cada punto representa el promedio. (n=4, p < 0.05 mediante test de Wilcoxon.)

4.4. Determinar si la ausencia de la GalNAc-T13 afecta el perfil de expresión de carbohidrato y el transcriptoma.

Por un lado, se estudió el perfil de los carbohidratos de ambas líneas celulares mediante lectinas conjugadas a biotina. Para ello se utilizaron las lectinas Helix Pomatia (HP) que tiene como motivo de unión la α -N-acetilgalactosamina, Peanut Agglutinin (PNA) la cual se une a Gal- β (1-3)-GalNAc y Concanavalina A (ConA) que es una lectina específica de manosa/glucosa.

Se puede observar en la figura 19, que tanto A549 *wt* como A549 *ko* fueron negativas para la Concanavalina A y positivas para Peanut Agglutinin y Helix Pomatia. Sin embargo, se observa una marcación más intensa en las células *wild type* para ambas lectinas biotiniladas comparadas con las células *ko*.

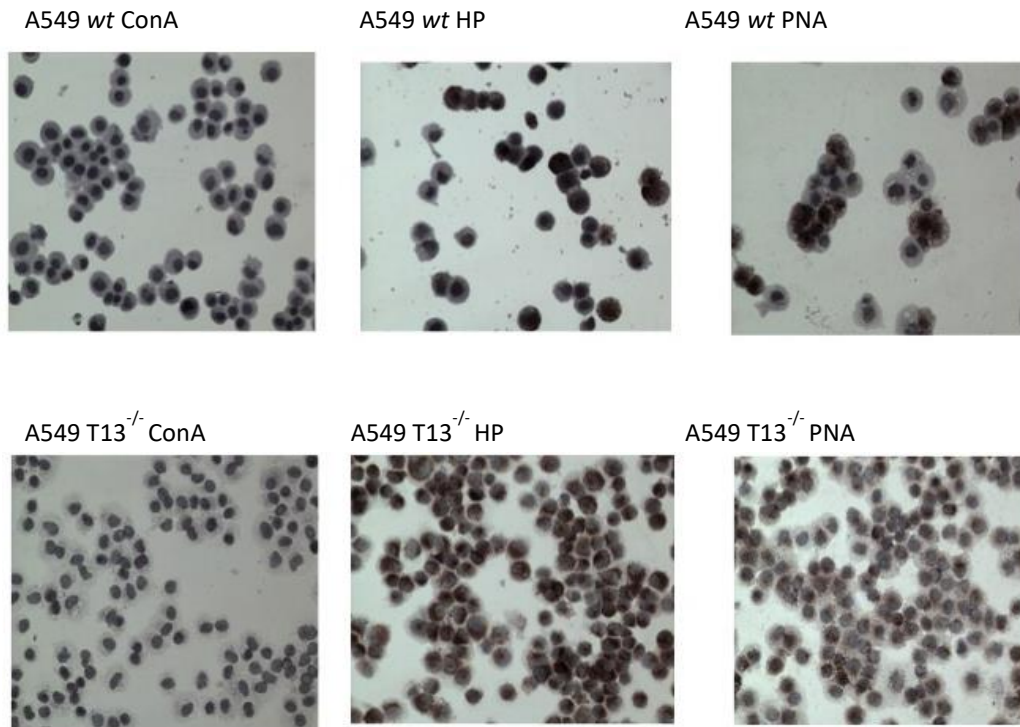


Figura 19 - Evaluación del perfil de carbohidratos en A549 wt y A549 T13^{-/-} mediante lectinas biotiniladas. Se utilizaron las lectinas Concavalina A (ConA), Helix Pomatia (HP) y Peanut Agglutinin (PNA) en células A549 wt (imagen superior) y A549 T13^{-/-} (imagen inferior). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio óptico (aumento: 20x).

Con el fin de comparar los patrones de expresión génica entre A549 wt y A549 T13^{-/-}, se realizó un análisis por microarreglos utilizando 4 réplicas de cada línea celular.

De los 37.424 genes analizados, identificamos 2.014 genes (5,4%) diferencialmente expresados con un $p < 0,001$ y con un FDR (*false discovery rate* de 0,05). Se analizaron los 2.014 genes diferencialmente expresados, de los cuales 276 (13,7%) presentaron diferencias en la expresión mayores a 10 (*fold change* (FC>10)), en las células A549 T13^{-/-}.

De los 276 genes que presentaron un FC mayor a 10 entre A549 *wt* y A549 T13^{-/-}, 174 (63%) se encontraron sobreexpresados (Anexo I) y 102 (37%) subexpresados (Anexo II) en las células A549 *wild type* respecto a las A549 T13^{-/-}. Por lo tanto, la mayoría de los genes que presentaron diferencias significativas mayores a 10 cambios en la expresión en las células A549 T13^{-/-} correspondieron a genes subregulados.

A partir de los genes diferencialmente expresados en las células A549 T13^{-/-} (p<0.001) se realizó un análisis de los genes involucrados tanto en la O-glicosilación como en la N- glicosilación. En la tabla 3 se muestran los genes más significativos involucrados en la glicosilación.

Tabla 3 - Lista de genes correspondientes a enzimas implicadas en la O y N glicosilación.

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 <i>wt</i>	Geom mean of intensities in A549 T13 ^{-/-}	Fold-change	Name	Symbol
0,000002	0.00127	15.13	1.2	12.63	Homo sapiens polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 13 (GALNT13), transcript variant 1, mRNA [NM_052917]	GALNT13
2.08e-05	0.00286	12986.32	3155.63	4.12	Homo sapiens ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2 (ST6GAL2), transcript variant 1, mRNA [NM_032528]	ST6GAL2

Resultados

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 ^{-/-}	Fold-change	Name	Symbol
0,00007	0.00458	93.4	1514.04	0.062	Homo sapiens polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 16 (GALNT16), transcript variant 2, mRNA [NM_020692]	GALNT16
0.0001028	0.00555	1013.98	292.5	3.47	Homo sapiens ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2 (ST6GAL2), transcript variant 1, mRNA [NM_032528]	ST6GAL2
0.0001295	0.00637	1289.22	6204.37	0.21	Homo sapiens polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 18 (GALNT18), mRNA [NM_198516]	GALNT18
0.0001352	0.0065	1709.44	3328.12	0.51	Homo sapiens UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase , polypeptide 1 (B4GALT1), mRNA [NM_001497]	B4GALT1
0.0002514	0.009	129.83	19.2	6.76	Homo sapiens ST6 (alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminidase alpha-2,6-sialyltransferase 2 (ST6GALNAC2), mRNA [NM_006456]	ST6GALNAC2
0.0004193	0.0115	7036.32	2223.57	3.16	Homo sapiens UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase , polypeptide 4 (B4GALT4), transcript variant 1, mRNA [NM_212543]	B4GALT4

Resultados

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 <i>wt</i>	Geom mean of intensities in A549 T13 ^{-/-}	Fold-change	Name	Symbol
0.0004225	0.0116	229.66	65.94	3.48	Homo sapiens ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6 (ST3GAL6), transcript variant 1, mRNA [NM_006100]	ST3GAL6
0.0004727	0.0123	792.77	424.83	1.87	Homo sapiens UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase , polypeptide 4 (B3GALT4), mRNA [NM_003782]	B3GALT4
0.000594	0.0138	4203.47	8548.48	0.49	Homo sapiens polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 10 (GALNT10), mRNA [NM_198321]	GALNT10
0.0009032	0.0175	787.73	413.85	1.9	Homo sapiens UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7 (B3GNT7), mRNA [NM_145236]	B3GNT7

Los resultados obtenidos indican que el perfil transcripcional de las células A549 T13^{-/-} exhibe diferencias considerables respecto a las células A549 *wt*.

Además, se observa que el gen *GALNT13* no se está expresando en la línea mutada A549 T13^{-/-}, y sí está presente en la línea A549 *wt*, (figura 20). Estos datos confirman nuevamente que la mutación fue realizada con éxito.

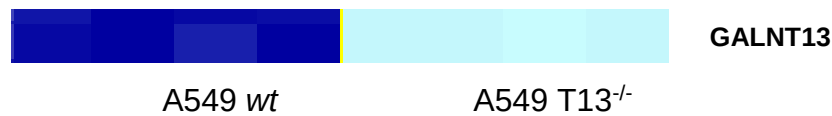


Figura 20- Representación gráfica (*heatmap*) de la expresión génica de GALNT13 analizada con los microarreglos. El azul oscuro representa sobreexpresión y la celeste subexpresión en células A549 *wt* y A549 T13^{-/-} con un $p < 0.001$.

4.5. Estudiar la expresión de la GalNAc-T13 y de sus variantes de *splicing* en diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón.

Se analizó la expresión de la GalNAc-T13 tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína en diversas líneas celulares de cáncer de pulmón humano.

Primero, se analizó mediante Real Time PCR utilizando *primers* específicos para amplificar el gen *GALNT13* en las líneas celulares A549 *wt*, H1650, H1755, H1703, H1975 y H838.

Como se observa en la figura 21, las líneas celulares H838 y H1975 no expresan el gen *GALNT13*. Sin embargo, los niveles de expresión del gen *GALNT13* en la línea celular H1755 son mayores que los niveles de expresión en A549 *wt* mientras que la expresión en las líneas celulares H1703 y H1650 son menores que en A549 *wt*.

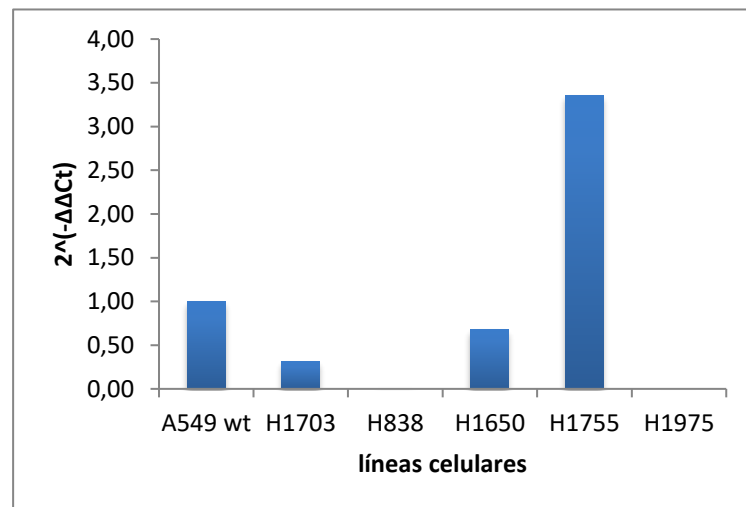


Figura 21 - Análisis de los niveles de expresión relativa del gen *GALNT13* en las líneas celulares A549 wt, H1703, H838, H1650, H1755 y H1975 mediante Real Time PCR. Se utilizó el nivel de expresión del gen *GAPDH* para normalizar los valores de expresión del gen *GALNT13*. Se grafican los resultados del cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtenidos por Real Time PCR.

Luego, se analizó la expresión de GalNAc-T13 a nivel de proteína en las mismas líneas celulares de cáncer de pulmón humano. Para esto se realizó un *Western Blot* y una inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-GalNAc-T13 (T13.5).

Los resultados del Western Blot muestran que hay una banda tenue en el carril correspondiente a la línea celular H1650 y una banda más tenue aún en H1975 (figura 22) con un peso molecular menor al esperado (por abajo de 55 kDa) como se observó anteriormente para las líneas A549 y A549 T13^{-/-}.

En la figura 23 se observa que solo las células A549 wt muestran marcación por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo T13.5 (anti-GalNAc-T13). El resto de las líneas celulares estudiadas no presentaron reactividad.

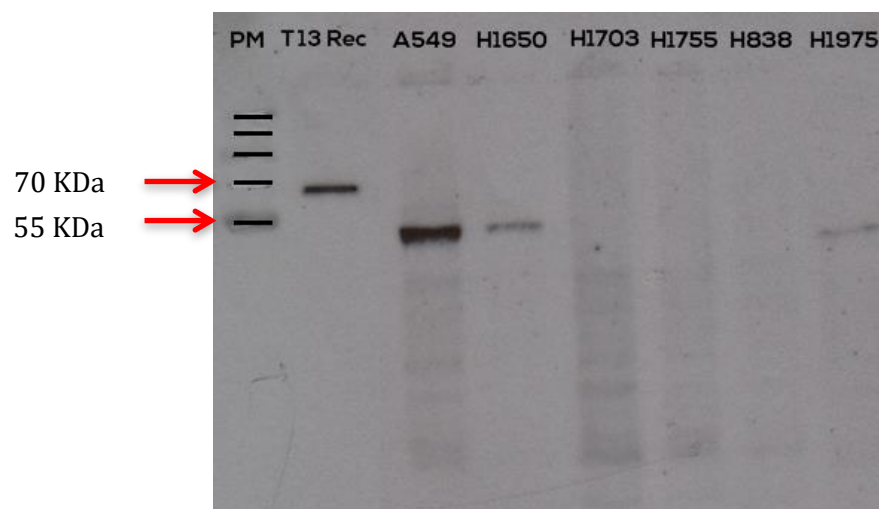


Figura 22 - Western Blot con un anticuerpo anti-GalNAc-T13 a partir de extractos de las líneas celulares A549 *wt*, H1650, H1703, H1755, H838 y H1975. La GalNAc-T13 recombinante (T13 Rec) se utilizó como control positivo de la técnica.

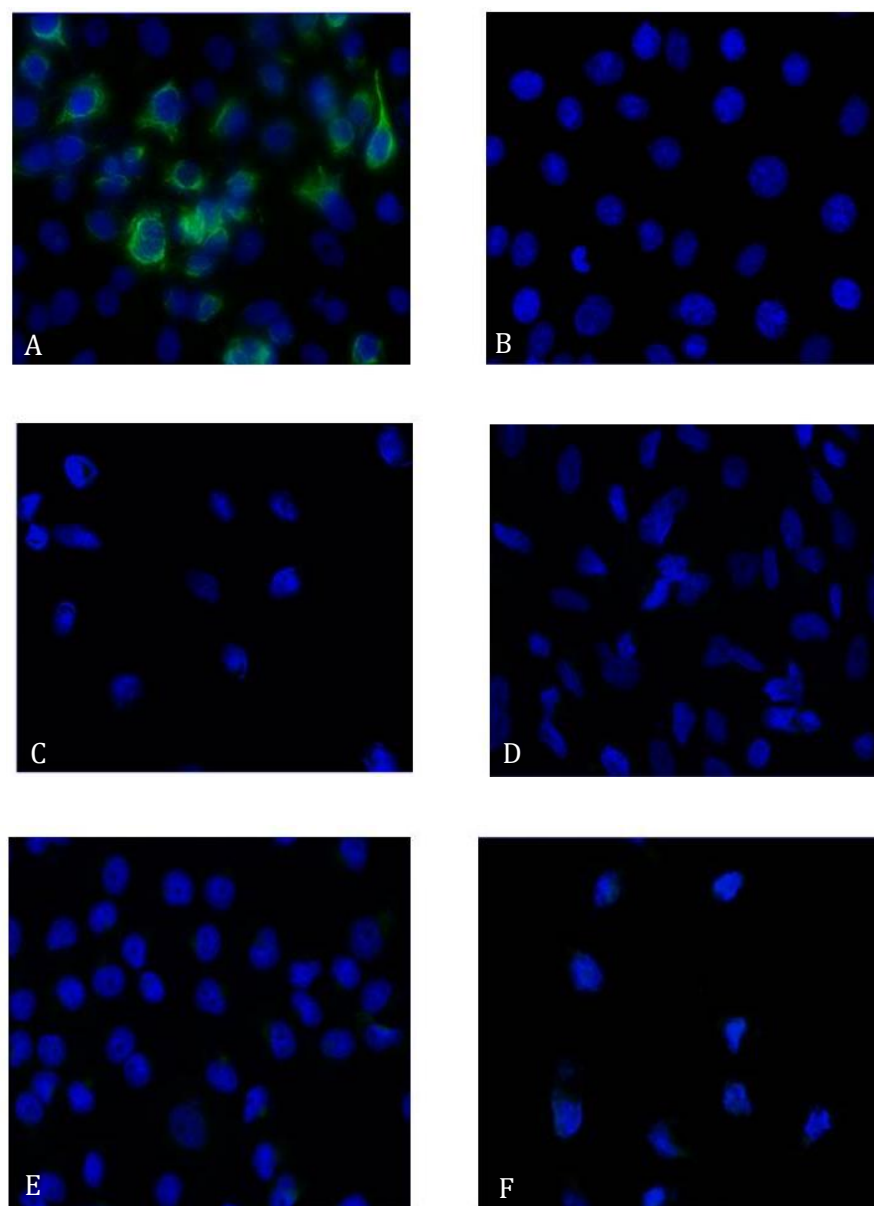


Figura 23- Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-GalNAc-T13 (T13.5). A) A549 wt, B) H1650, C) H1703, D) H1755, E) H838 y F) H1975 (aumento: 40x)

Se estudió la expresión de las variantes de *splicing* de la GalNAc-T13 en las líneas celulares H1650, H1755, H1703, H1975, A549 wt y BM como control positivo, utilizando un conjunto de *primers* diseñados específicamente para cada variante (tabla 1).

A partir de este estudio se pudo observar que la línea H1703 expresa Δ Ex6, Δ Ex9, Δ 39pbEx9, Δ Ex6/8, Δ Ex8, Δ Ex6/8/39pbEx9 y Ex10b. La línea celular H1755 expresa Δ Ex6, Δ Ex9, Δ 39pbEx9, Δ Ex8 y Ex10b. La línea celular H1650 expresa Δ Ex8, Δ Ex6/8/39pbEx9 y Ex10b. Se observó que la línea celular A549 expresa todas las variantes mientras que la línea celular H1975 no expresan ninguna (figura 24 y tabla 4).

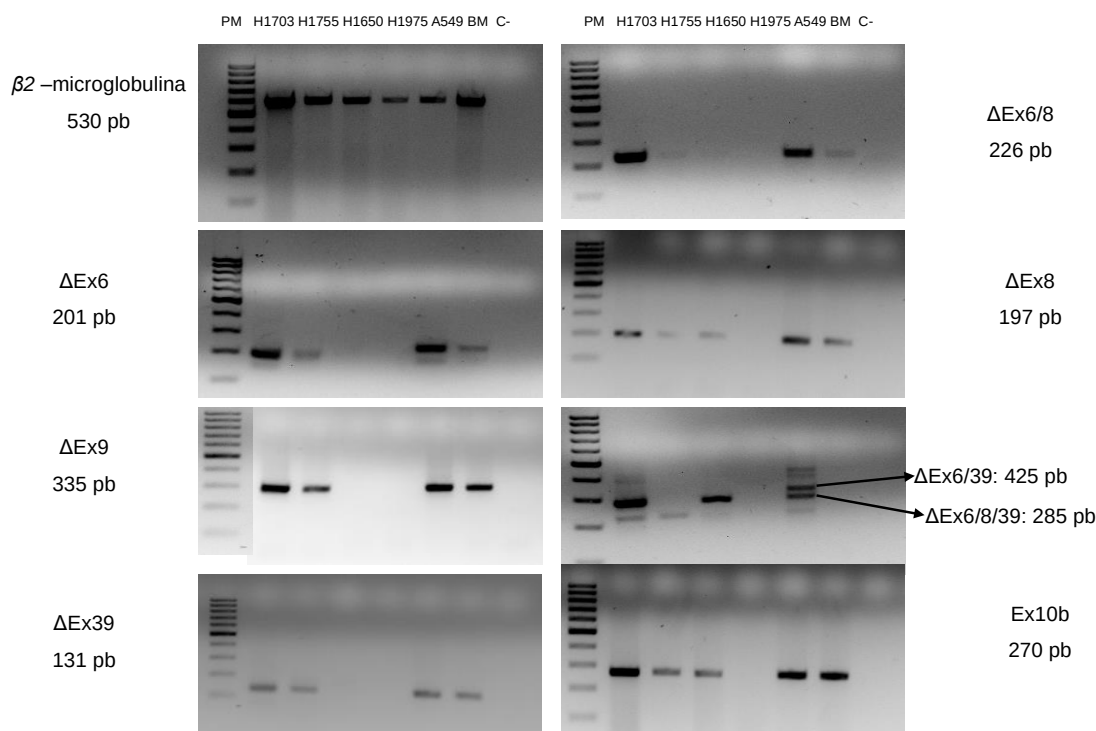


Figura 24 - RT-PCR de la GalNAc-T13 y sus variantes de *splicing* en 7 líneas celulares de adenocarcinoma humano. PM: marcador de peso molecular (100 bp *DNA Ladder*, NEB), C -: control negativo (agua), H1703: NCI-H1703 (línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano; NSCLC estadio 1), H1755: NCI-H1755 (línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano; NSCLC estadio 4, derivada de metástasis (hígado)), H1650: NCI-H1650 (línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano, estadio 3B), H1975: NCI-H1975 (línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano; NSCLC), A549 (línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano). El gen de la β 2M (β 2-microglobulina) se amplificó para verificar la calidad del ADNc.

Tabla 4 - Expresión de las variantes de splicing en cada línea celular.

El ✓ corresponde a la expresión y el ✗ corresponde a la ausencia de expresión.

	H1703	H1755	H1650	H1975	A549
ΔEx6	✓	✓	✗	✗	✓
ΔEx9	✓	✓	✗	✗	✓
Δ39pbEx9	✓	✓	✗	✗	✓
ΔEx6/8	✓	✗	✗	✗	✓
ΔEx8	✓	✓	✓	✗	✓
ΔEx6/39pbEx9	✗	✗	✗	✗	✓
ΔEx6/8/39pbEx9	✓	✗	✓	✗	✓
Ex10b	✓	✓	✓	✗	✓

En base a estos resultados, nos preguntamos qué ocurre a nivel de la expresión de las proteínas. Varios estudios han sugerido que la GalNAc-T13 se encuentra en niveles muy bajos en los tejidos normales, inclusive en las neuronas. Young et al. realizaron un estudio por *Real Time* PCR de 14 GalNAc-Ts, revelando que esta enzima se expresa principalmente en el cerebro, y en mucho menor nivel en pulmón y colon⁶¹. Nos propusimos como objetivo demostrar la existencia de las distintas isoformas a nivel de proteína mediante electroforesis bidimensional teniendo en cuenta los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de cada una de ellas. Inicialmente se realizaron varios intentos de separación a partir de 60 µg de extracto de la línea celular A549 sin detectar proteínas por *Western Blot* con el anticuerpo T13.5. Sin embargo, cuando se duplicó la cantidad de proteína sembrada, se obtuvo un patrón de *spots* de peso molecular similar al de las bandas obtenidas en el *Western blot* monodimensional con el anticuerpo T13.5 (figura 25). Si bien los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de

los *spots* detectados no coinciden con ninguna de las variantes de *splicing* reportadas⁹⁷, pensamos que podrían existir otras variantes de *splicing* a nivel de proteína aún no identificadas. Cada uno de estos *spots* fue aislado y analizado por espectrometría de masa, sin embargo, los resultados no coincidieron con la GalNAc-T13 ni con ninguna de sus variantes de *splicing*.

A pesar de que en esta primera aproximación el resultado no fue el esperado, y probablemente esto pueda explicarse por los bajos niveles de expresión de esta enzima, consideramos que es fundamental continuar con este trabajo. Una estrategia alternativa sería intentar purificar a la GalNAc-T13 y a sus variantes por cromatografía de afinidad a partir del extracto de A549 o realizar la electroforesis bidimensional partiendo de un extracto enriquecido en proteínas del aparato de Golgi.

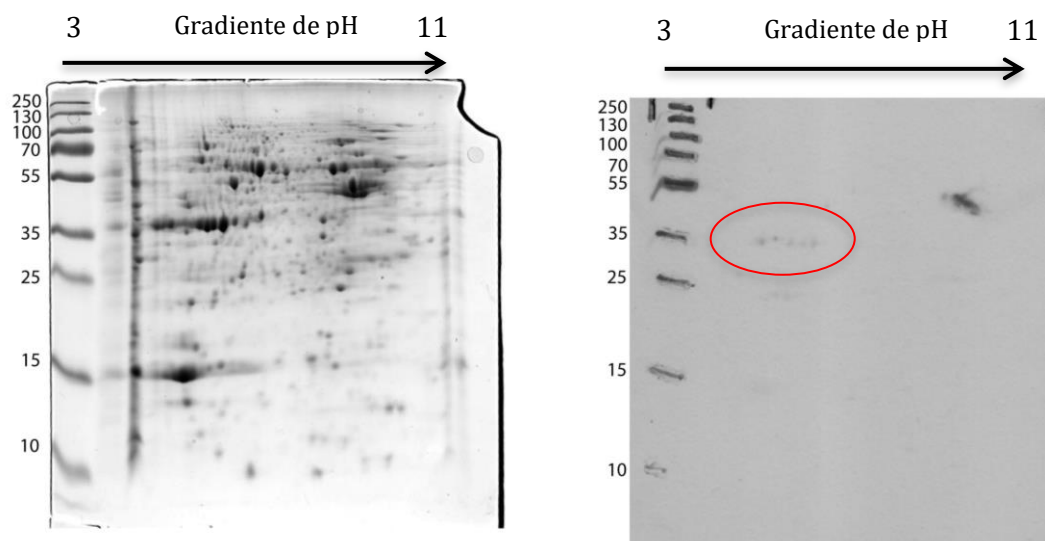


Figura 25 - Electroforesis bidimensional (gel de poliacrilamida al 12% y gradiente de pH 3-11) de la línea celular A549 wt. A) Tinción del gel con comassie coloidal y B) Western blot con el anticuerpo policlonal anti-T13.

5. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha desarrollado un enorme progreso en el conocimiento de la biología del cáncer y de los cambios moleculares que ocurren durante la transformación maligna. Sin embargo, la cantidad de alteraciones genéticas y fenotípicas, así como la gran heterogeneidad que presenta un mismo tumor, sin duda dificulta el diseño de estrategias terapéuticas.

Como se ha mencionado anteriormente, gran parte de la O-glicosilación celular está dirigida a producir una serie de estructuras que comienzan con el enlace covalente entre una N-acetilgalactosamina (GalNAc) y las serinas y treoninas de las proteínas celulares^{107,108}. Esta vía enzimática es iniciada por una familia de GalNAc transferasas (GalNAc-Ts) y continua con el agregado de otros azúcares de forma secuencial a los residuos de GalNAc por la acción de otras glicosiltransferasas presentes en el aparato de Golgi, contribuyendo así al gran repertorio de O-glicanos en una célula dada^{109,110}. La alteración en la glicosilación es un rasgo característico de las células tumorales¹¹¹. Las propiedades biológicas, fisiológicas e inmunológicas de las células tumorales son completamente influenciadas por estos cambios⁷⁰, y existen muchas expectativas en esta área para la generación de nuevas estrategias terapéuticas.

En relación con el cáncer de pulmón, la observación de la expresión de antígenos de O- glicosilación incompleta¹¹² condujo a la hipótesis que la expresión de GalNAc-Ts pudiera encontrarse alterada en estos tumores.

Nuestro grupo de investigación ha observado que la expresión de GalNAc-T13 en pacientes con adenocarcinomas de pulmón se asocia con resistencia a la quimioterapia¹¹³ (Touyá, D. et. al., artículo en preparación). Además, identificamos 9 variantes de *splicing* de la GalNAc-T13⁹⁷. Por otro lado, en modelos de adenocarcinoma de pulmón murino, se evidenció una asociación entre la sobre-expresión de la GalNAc-T13 y el desarrollo de metástasis⁹⁴. Poco se conoce en relación a la expresión/inhibición de esta enzima y sus variantes de *splicing* con la quimioresistencia/quimiosensibilidad en adenocarcinomas, lo que motivó el principal objetivo del presente trabajo.

También nos propusimos determinar si la expresión de la enzima GalNAc-T13 está relacionada con diferentes características de la biología tumoral. En particular ¿existen diferencias en el comportamiento de una línea celular que expresa GalNAc-T13 de su misma línea que no la exprese?

Para esto, se realizó el silenciamiento de dicho gen mediante Crispr/Cas9 en células A549. A partir del estudio por IDAA de uno de los clones seleccionados se observó que la mutación fue realizada con éxito. Esto fue comprobado por secuenciación. En particular, se insertó una T en un alelo y AG en el otro alelo (figura 10).

A nivel del mensajero, por *Real Time* PCR observamos que logramos una fuerte atenuación de la expresión del ARNm, probablemente debido a una

vía de degradación del ARN mensajero conocida como degradación del ARN mensajero mediada por mutación terminadora (*Non-sense Mediated Decay*) la cual limita la expresión de los transcritos que poseen codones de terminación prematuros¹¹⁴. También observamos una completa abolición de la expresión de la proteína como se muestra en el resultado de inmunofluorescencia. En el *Western blot* el resultado no está claro. En el extracto de la línea A549 *wt* obtenemos una banda bien marcada pero que no es del tamaño esperado. Esta banda es casi imperceptible en el extracto proveniente de la línea T13^{-/-}. Existen varias posibilidades. Una sería que la proteína sea muy minoritaria (como ya se ha reportado previamente) y que no sea detectable por *Western blot*. La otra posibilidad es que la GalNAc-T13 presente una modificación post-traducciona que impida que sea reconocido el epítipo contra el cual se generó el anticuerpo. El mismo fue producido en nuestro laboratorio mediante la inmunización de ratones –Balb/c con péptidos sintéticos (correspondientes a secuencias no presentes en otras GalNAc-Ts). Se ha reportado previamente que otras glicosiltransferasas transmembrana de tipo II están O-glicosiladas en sus regiones *stem*¹¹⁵. Incluso se ha reportado que otras GalNAc-Ts humanas están O-glicosiladas en dicha región, como es el caso de la GalNAc-T5¹¹⁶. En ambos casos deberíamos pensar entonces, que el anticuerpo está reconociendo de forma inespecífica alguna otra proteína. Esto no es muy probable dada la marcación característica del Golgi (perinuclear y granular y que co-localiza con la marcación de la Giantina) que se obtiene en la

inmunofluorescencia (figura 12)¹¹⁷ salvo que la proteína reconocida sea otra proteína residente de este compartimento. Otra posibilidad es que la banda que se obtiene de menos de 55 kDa sea una variante de *splicing*, aunque su peso molecular no corresponde con ninguna de las reportadas previamente⁹⁷. Por último, podría ser que la GalNAc-T13 sufra algún tipo de modificación post-traducciona que lleve a una reducción en su peso molecular. Cuando eliminamos la porción stem y transmembrana de la proteína, el peso molecular de la misma es de 51.5 kDa, aproximadamente el mismo peso que el que se observa en el *Western Blot* (< 55 kDa). Por lo tanto, podría ser que se clivara en la región *stem* y quedara soluble. Cualquiera sea el caso debemos intentar identificar la proteína que está siendo reconocida por el anticuerpo por espectrometría de masa.

En los últimos años se han reportado varios trabajos respecto a la quimioresistencia/sensibilidad en cáncer de pulmón tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, Xiaohong Pan y colaboradores (2013) mostraron que la inhibición de la autofagia podría sensibilizar a las células A549 a la apoptosis dependiente de caspasa inducida por 5-Fluorouracilo mediante la estimulación de la formación de ROS¹¹⁸. Paul Zarogoulidis y colaboradores (2015) mostraron que la expresión de los microARNs MiR-205 y MiR-218 está relacionada con la quimioresistencia al Carboplatino y la regulación de la apoptosis vía Mcl-1 y Survivina en células de adenocarcinoma de pulmón (A549 y H1975)¹¹⁹. Además, Gao et al. (2016)

mostraron que el silenciamiento de la fibronectina 1 aumenta la sensibilidad a Cisplatino en células A549¹²⁰.

En este trabajo, demostramos que el silenciamiento del gen *GALNT13* en células A549 aumenta la sensibilidad a varias drogas utilizadas en el tratamiento contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas como son el Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel y sus combinaciones: Cisplatino + Paclitaxel y Carboplatino + Paclitaxel. Estos resultados son de gran relevancia y pueden constituir un gran aporte en la medicina personalizada ya que sugieren fuertemente que la GalNAc-T13 es un nuevo marcador asociado a la quimioresistencia en pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Resta investigar cuáles son las vías moleculares involucradas en la disminución de la viabilidad de las células GalNAc-T13 *knockout*.

Los resultados *in vivo* mostraron que los ratones inyectados con A549 T13^{-/-} desarrollan una menor masa tumoral comparado con los ratones inyectados con A549 *wt*. Igualmente, habría que aumentar la cantidad de ratones por grupo para afirmar este resultado. Por otro lado, sería interesante administrarles drogas quimioterapéuticas a ratones inyectados con A549 T13^{-/-} y con A549 *wt* y evaluar el tamaño tumoral y sobrevida luego del tratamiento.

Los resultados de inmunocitoquímica con lectinas biotiniladas mostraron que las células A549 *wt* tienen una mayor marcación con Helix Pomatia (HP) y Peanut Agglutinin (PNA), las cuales se unen a los antígenos Tn y core 1 respectivamente, mientras que las células A549 T13^{-/-} muestran una

marcación más tenue (figura 19). Por un lado, esto nos estaría indicando que las células A549 *wt* expresan una mayor cantidad de antígenos asociados a tumor (Antígeno Tn, Core 1) que las células T13 *ko*. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* ya que tanto el antígeno Tn como el antígeno T se han asociado con la agresividad tumoral^{94,121}. Por otro lado, podemos concluir que la GalNAc-T13 no es la única isoforma involucrada en la síntesis de estas estructuras ya que sólo observamos una reducción parcial en la expresión de las mismas (figura 19). Quizás, este enzima esté involucrada en la O-glicosilación específica de sitio de un determinado sustrato que sea esencial en la biología del cáncer de pulmón (Festari, Tesis de Doctorado, 2016).

Los resultados obtenidos con los microarreglos indican que el perfil transcripcional de las células A549 T13^{-/-} exhibe diferencias considerables respecto a las A549 *wt*. Se encontró que aproximadamente el 5% de los genes estudiados se encuentran regulados de manera diferencial en las células A549 T13^{-/-} en comparación a las A549 *wt*. De este 5%, la mayoría de los genes están subexpresados en las células A549 T13^{-/-} (54,4%).

En la línea celular A549 T13^{-/-}, se observa un aumento de la expresión de las otras GalNAc-Ts (GalNAc-T10, T16 y T18) y la disminución significativa de la GalNAc-T13. Este aumento de expresión de las otras GalNAc-Ts podría estar relacionado con un intento de compensar la ausencia de expresión de la GalNAc-T13. A su vez, también se observa una disminución en la expresión de otras glicosiltransferasas que están

implicadas en la elongación de los O-glicanos (por ejemplo: ST3Gal6, ST6GalNAc2 y β 3GalT4).

También existe una disminución en la expresión de la carboxipeptidasa D (CPD) en las células A549 T13^{-/-}. La CPD es una metaloproteína unida a membrana (también se encuentra en forma soluble¹²² que cliva las argininas C-terminales que van a ser luego convertidas en óxido nítrico por el óxido nítrico sintasa, entre otras funciones), lo que regula una gran cantidad de procesos celulares, incluyendo la progresión tumoral^{123,124}. Recientemente se ha demostrado que existe una alta expresión de CPD en el cáncer de pulmón humano maligno y metastásico y que la expresión de CPD se correlaciona positivamente con el grado del tumor¹²⁵. Por dicho motivo, se considera esta proteína como un biomarcador potencial en este tipo de cáncer. Recientemente, en la tesis de Doctorado de la Dra. Festari (Festari, tesis de Doctorado, 2016) se encontró mediante una estrategia glicoproteómica que esta enzima es O-glicosilada específicamente por la GalNAc-T13. La ausencia de la GalNAc-T13 podría estar de alguna manera influyendo en la expresión de dicho gen.

Otro gen que disminuyó su expresión al inhibir la GalNAc-T13 fue *EMB* (*Embigin*). Recientemente se identificó a la *EMB* como una proteína de unión a galectina-3 que participa en los procesos asociados a metástasis¹²⁶.

Recientemente se ha reportado que existe una relación entre el aumento en los niveles de fosfolipasa C β 1 (PLCB1) y la carcinogénesis¹²⁷. Li et. al

demostraron que la sobreexpresión de PLCB1 en células de hepatocarcinoma celular promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis, probablemente mediante la activación de la señalización de ERK, mientras que el silenciamiento de PLCB1 reduce la viabilidad celular *in vitro*¹²⁵. En este caso se observa que cuando no está la GalNAc-T13, la expresión de los genes EMB y PLCB1 disminuye.

Debido a la abundancia de variantes de splicing en los eucariotas superiores, es probable que muchos procesos biológicos, incluyendo los que desencadenan el desarrollo tumoral, sean regulados por la expresión relativa de isoformas de splicing de múltiples genes¹²⁸. En concordancia con esto, encontramos que varias líneas celulares de adenocarcinoma expresaron un grupo de transcritos alternativos. Se pudo observar que la línea H1975 que no expresa GalNAc-T13 *wt*, tampoco expresó ninguna de las variantes estudiadas. Esto se puede relacionar con la baja agresividad que tiene esta línea celular. Por otro lado, la línea celular H1703 es similar a la A549 *wt* ya que expresa todas las variantes de *splicing* menos una. Las variantes de *splicing* Δ Ex8 y Ex10b, pueden estar relacionada con la agresividad tumoral ya que se expresa en todas las líneas estudiadas menos en la H1975.

Será de suma importancia evaluar en un futuro si las variantes de *splicing* reportadas por nuestro grupo poseen algún valor pronóstico en el cáncer de pulmón.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la expresión de GalNAc-T13 se relaciona con la quimioresistencia en un tipo de adenocarcinoma de pulmón humano *in vitro*.

Este estudio confirma que la inhibición de la enzima GalNAc-T13 en adenocarcinoma de pulmón humano, altera el transcriptoma celular disminuyendo la expresión de genes vinculados a la agresividad e invasibilidad tumoral y sensibiliza las células contra drogas comunmente utilizadas en la quimioterapia.

Con los estudios *in vivo* realizados exploramos las funciones biológicas potenciales de la GalNAc-T13, encontrando una diferencia entre el crecimiento tumoral de las células *wt* y *ko*. De dicho estudio, surge que el desarrollo tumoral de las células GalNAc-T13 *ko* es menor que el de las células *wt*.

Aunque claramente se necesitan estudios posteriores para poder evaluar las funciones celulares, los resultados obtenidos en este trabajo de maestría confirman la hipotesis inicial de que la expresión de GalNAc-T13 está relacionada con un peor pronóstico en adenocarcinoma de pulmón.

7. PERSPECTIVAS

✓ Analizar la expresión de GalNAc-T13 y sus diferentes variantes de *splicing* en diferentes líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humano a nivel de proteína. Intentamos realizar esto mediante electroforesis bidimensional y subsiguiente *western blot* con el anticuerpo T13.5. Si bien obtuvimos algunos *spots* en el *western blot*, los mismos no correspondían a GalNAc-T13 o sus variantes de *splicing*, probablemente debido a los bajos niveles de expresión de esta enzima (y de sus variantes) que no permiten su detección por este procedimiento. Además, los niveles de expresión de las variantes de *splicing* pueden incluso ser menores. Intentaremos enriquecer los lisados celulares totales por cromatografía de afinidad y/o inmunoprecipitación y evaluar si se puede identificar alguna variante. También podemos intentar hacer un fraccionamiento subcelular para enriquecer la muestra con proteínas del Golgi.

✓ Sería interesante poder estudiar el comportamiento de células A549 resistentes a Cisplatino, Paclitaxel y Carboplatino y realizar el mismo análisis de viabilidad mediante MTT.

✓ Introducir y expresar GALNT13 en las células A549 *wt* mediante Crispr/Cas9 para determinar si la sobreexpresión de esta enzima está relacionada con la quimioresistencia y para estudiar las diferentes

características de la biología tumoral.

✓ Analizar la relación entre la expresión de la GalNAc-T13 y la agresividad tumoral *in vitro* (proliferación, adhesión, migración, invasión) e *in vivo* (metástasis) para evaluar el número de metástasis hepáticas.

✓ Analizar la eficacia de las drogas antitumorales en tumores primarios generados con las líneas A549 *wt* y A549 *ko* mediante tratamiento quimioterápico con Carboplatino y Paclitaxel individuales y asociados en ratones *nude*, comparando la velocidad de crecimiento tumoral entre ambos tipos celulares tratados con los fármacos.

✓ Ampliar las características de biología tumoral determinando si la ausencia de la GalNAc-T13 en la línea celular *knockout* para GALNT13 afecta el glicofenotipo.

✓ Validar algunos de los genes cuya expresión disminuye en A549 T13^{-/-} según los datos del microarreglo, que están implicados en la agresividad tumoral y quimioresistencia (por ejemplo: CPD, EMB y PLCB1).

✓ Realizar un análisis del perfil de glicanos con lectinas mediante inmunohistoquímica, en los tejidos tumorales retirados de la inoculación de células A549 *wt* y A549^{-/-} en los ratones *nude*.

✓ Estudiar el comportamiento de las demás líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón humano que se utilizaron en este trabajo y relacionarlas con las diferentes variantes de *splicing* de la GalNAc-T13 con la quimiosensibilidad y agresividad para identificar al menos una variante de *splicing* asociada con estos procesos.

8. REFERENCIAS

1. Stewart, B. W. & Wild, C. P. World cancer report 2014. *World Health Organization*. 1–2 (2014).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Ferlay, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer*. **11**, (2013).
4. Comisión Honoraria de Lucha contra el cáncer. *Registro Nacional de Cáncer 2* (2011).
5. Talmadge, J. & Fidler, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research* **70**, 5649–5669 (2010).
6. Berx, G. & Roy, F. Van. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 1. a003129. 10.1101/cshperspect.a003129 (2009).
7. Cavallaro, U. & Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and IG-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer* **4**, 118–132 (2004).
8. Ferlay, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* **127**, 2893–2917 (2010).
9. Zakaria, N., Yusoff, N. M., Zakaria, Z., Lim, M. N. & Baharuddin, P. J. N. Human non-small cell lung cancer expresses putative cancer stem cell markers and exhibits the transcriptomic profile of multipotent cells. *BMC Cancer* **15:84** 1–16 (2015).
10. Jemal, A. *et al.* Cancer Statistics, 2009. *CA: Cancer Journal for Clinicians* **59**, 225–249 (2009).
11. Jemal, A. *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and

- tobacco control. *Journal of the National Cancer Institute* **100**, 1672–1694 (2008).
12. Beasley, M. B., Brambilla, E. & Travis, W. D. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Seminars Roentgenology* **40**, 90–97 (2005).
 13. Goldstraw, P. *et al.* Non-small-cell lung cancer. *Lancet* **378**, 1727–1740 (2011).
 14. Alifano, M. & Damotte, D. Prognostic value of LIPC in non-small cell lung carcinoma. *Cell Cycle* **12**, 417–421 (2013).
 15. Schiller, J. H. *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non–small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine* **346**, 92–98 (2002).
 16. Reck, M., Heigener, D. F., Mok, T., Soria, J. & Rabe, K. F. Series Lung Cancer 1 Management of non-small-cell lung cancer : recent developments. *Lancet* **382**, 709–719 (2013).
 17. Pao, W. & Girard, N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncology* **12**, 175–180 (2011).
 18. Gao, G. *et al.* Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor therapy is effective as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with mutated EGFR: A meta-analysis from six phase III randomized controlled trials. *International Journal of Cancer* **131**, (2012).
 19. Shaw, A. T. *et al.* Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncology* **12**, 1004–1012 (2011).
 20. Mok, T. S. K. Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. *Nature Reviews Clinical Oncology* **8**, 661–668 (2011).
 21. Anagnostou, V. K. & Brahmer, J. R. Cancer Immunotherapy : A Future Paradigm Shift in the Treatment of Non – Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* **21**, 976–985 (2015).

Referencias

22. Korman, A. J., Peggs, K. S. & Allison, J. P. Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy. *Advances in Immunology* **90**, 297-339 (2006).
23. Sanmamed, M. F. & Chen, L. Inducible Expression of B7-H1 (PD-L1) and Its Selective Role in Tumor Site Immune Modulation. *Cancer Journal* **20**, 256–261 (2014).
24. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* **12**, 252–264 (2012).
25. Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *PNAS* **6**, 2–6 (2002).
26. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
27. Paterson, A. M. *et al.* The PD-L1:B7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells in vivo. *Journal of Immunology* **187**, 1097–1105 (2011).
28. Akbay, E. A. *et al.* Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discovery* **3**, 1-17 (2013).
29. Chen, N. *et al.* Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology* **10**, 910–923 (2015).
30. Diesendruck, Y. & Benhar, I. Novel immune check point inhibiting antibodies in cancer therapy-Opportunities and challenges. *Drug Resistance Updates* **30**, 39–47 (2017).
31. Housman, G. *et al.* Drug Resistance in Cancer : An Overview. *Cancers* **6**, 1769–1792 (2014).
32. Judson, I. & Kelland, L. R. New Developments and Approaches in the Platinum Arena. *Drugs* **59**, 29–36 (2000).

Referencias

33. Reed, J. C. Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of Clinical Oncology* **17**, 2941–2953 (1999).
34. Rosell, R., Lord, R. V. N., Taron, M. & Reguart, N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **38**, 217–227 (2002).
35. Shen, D., Pouliot, L. M., Hall, M. D. & Gottesman, M. M. Cisplatin Resistance : A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews* **64**, 706–721 (2012).
36. Burchell, J. M., Mungul, A. & Taylor-Papadimitriou, J. O-linked glycosylation in the mammary gland: Changes that occur during malignancy. *Journal Mammary Gland Biology Neoplasia* **6**, 355–364 (2001).
37. Lanctot, P. M. *et al.* Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT₁ receptor. *Biochemical Journal* **390**, 367–376 (2005).
38. Kornfeld, R. & Kornfeld, S. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* **54**, 631–664 (1985).
39. Robert, G. & Spiro, M. D. Glycoproteins: Their Biochemistry, Biology and Role in Human Disease. *The New England Journal of Medicine* **281**, 1043–4056 (1969).
40. Halim, A. *et al.* Tyrosine Glycosylations of Amyloid Precursor Protein / Amyloid B -Peptides in Human Cerebrospinal Fluid. *PNAS* **108**, 11848–11853 (2011).
41. Steentoft, C. *et al.* Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease–glycoengineered Simple Cell lines. *Nature Methods* **8**, 977–982 (2011).
42. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition. Molecular Biology* (2002).
43. Ju, T. & Cummings, R. D. A unique molecular chaperone Cosmc

- required for activity of the mammalian core 1. *PNAS* **99**, 16613–16618 (2002).
44. Ju, T., Aryal, R. P., Stowell, C. J. & Cummings, R. D. Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum – localized molecular chaperone Cosmc. *The Journal of Cell Biology* **182**, 531–542 (2008).
 45. Aryal, R. P., Ju, T. & Cummings, R. D. The Endoplasmic Reticulum Chaperone Cosmc Directly Promotes in Vitro Folding of T-synthase. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 2456–2462 (2010).
 46. Aryal, R. P., Ju, T. & Cummings, R. D. Tight Complex Formation between Cosmc Chaperone and Its Specific Client Non-native T-synthase Leads to Enzyme Activity and Client-driven Dissociation. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 15317–15329 (2012).
 47. Gill, D. J., Clausen, H. & Bard, F. Location, location, location: New insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends in Cell Biology* **21**, 149–158 (2011).
 48. Tian, E. & Hagen, K. G. Ten. Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation. *Glycoconjugate Journal* **26**, 325–334 (2009).
 49. Bennett, E. P. *et al.* Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* **22**, 736–756 (2012).
 50. Tran, D. T. & Hagen, K. G. Ten. Mucin-type O -Glycosylation during Development. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 6921–6929 (2013).
 51. Paulson, J. C. & Colley, K. J. Glycosyltransferases structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 17615–17618 (1989).
 52. Fritz, T. A., Raman, J. & Tabak, L. A. Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc:polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *Journal of Biological*

- Chemistry* **281**, 8613–8619 (2006).
53. Hazes, B. The (QxW)₃ domain: a flexible lectin scaffold. *Protein Science* **5**, 1490–501 (1996).
 54. Imberty, a, Piller, V., Piller, F. & Breton, C. Fold recognition and molecular modeling of a lectin-like domain in UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Protein Engineering* **10**, 1353–6 (1997).
 55. Fritz, T. A., Hurley, J. H., Trinh, L.-B., Shiloach, J. & Tabak, L. A. The beginnings of mucin biosynthesis: The crystal structure of UDP-GalNAc:polypeptide -N-acetylgalactosaminyltransferase-T1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15307–15312 (2004).
 56. Lira-Navarrete, E. *et al.* Dynamic interplay between catalytic and lectin domains of GalNAc-transferases modulates protein O-glycosylation. *Nature Communications* **6**, 6937 (2015).
 57. Smith, R. D. & Lupashin, V. V. Role of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex in protein glycosylation. *Carbohydrate Research* **343**, 2024–2031 (2008).
 58. Kubota, T. *et al.* Structural Basis of Carbohydrate Transfer Activity by Human UDP-GalNAc: Polypeptide α -N-Acetylgalactosaminyltransferase (pp-GalNAc-T10). *Journal of Molecular Biology* **359**, 708–727 (2006).
 59. Mandel, U. *et al.* Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: Immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology* **9**, 43–52 (1999).
 60. Kingsley, P. D., Hagen, K. G., Maltby, K. M., Zara, J. & Tabak, L. A. Diverse spatial expression patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase family member mRNAs during mouse development. *Glycobiology* **10**, 1317–23 (2000).

61. Young, W. W., Holcomb, D. R., Ten Hagen, K. G. & Tabak, L. A. Expression of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isoforms in murine tissues determined by real-time PCR: A new view of a large family. *Glycobiology* **13**, 549–557 (2003).
62. Ramzan, M., Hussain, M., Hoessli, D. C. & Fang, M. N - acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget* **7**, 54067-54081 (2016).
63. Gill, D. J., Chia, J., Senewiratne, J. & Bard, F. Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *Journal of Cell Biology* **189**, 843–858 (2010).
64. Chia, J., Tham, K. M., Gill, D. J., Bard-Chapeau, E. A. & Bard, F. A. ERK8 is a negative regulator of O-GalNAc glycosylation and cell migration. *eLife* **2014**;3:e01828 (2014).
65. Zhang, Y. *et al.* Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc alpha-serine/threonine antigen. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 573–84 (2003).
66. Lash, A. E. *et al.* SAGEmap: A public gene expression resource. *Genome Research* **10**, 1051–1060 (2000).
67. Siddiqui, A. S. *et al.* A mouse atlas of gene expression: large-scale digital gene-expression profiles from precisely defined developing C57BL/6J mouse tissues and cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 18485–18490 (2005).
68. Velculescu, V. E. *et al.* Analysis of human transcriptomes. *Nature Genetics* **23**, 387–388 (1999).
69. Jiménez Martínez, M. D. C. *et al.* Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* **15**, 39–47 (2002).

70. Munkley, J. & Elliott, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* **7**, 1–12 (2016).
71. Baldus, S. E., Engelmann, K. & Hanisch, F. G. MUC1 and the MUCs: A family of human mucins with impact in cancer biology. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **41**, 189–231 (2004).
72. Ju, T. *et al.* Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *Proteomics - Clinical Applications* **7**, 618–631 (2013).
73. Paszkiewicz-Gadek, A., Porowska, H., Lemancewicz, D., Wolczynski, S. & Gindzienski, A. The influence of N- and O-glycosylation inhibitors on the glycosylation profile of cellular membrane proteins and adhesive properties of carcinoma cell lines. *International Journal of Molecular Medicine* **17**, 669–674 (2006).
74. Ogata, S., Maimonis, P. J. & Itzkowitz, S. H. Mucins Bearing the Cancer-associated Sialosyl-Tn Antigen Mediate Inhibition of Natural Killer Cell Cytotoxicity¹. *Cancer Research* **52**, 4741-4746 (1992).
75. Byrd, J. C. & Bresalier, R. S. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **23**, 77–99 (2004).
76. Hanisch, F. G. O-glycosylation of the mucin type. *Biological Chemistry* **382**, 143–149 (2001).
77. Huang, M. J. *et al.* Knockdown of GALNT1 suppresses malignant phenotype of hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR signaling. *Oncotarget* **6**, 5650–65 (2015).
78. Schjoldager, K. T. B. G. & Clausen, H. Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing - Deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1820**, 2079–2094 (2012).
79. Beaman, E. M. & Brooks, S. A. The extended ppGalNAc-T family and their functional involvement in the metastatic cascade. *Histology*

- and Histopathology* **29**, 293–304 (2014).
80. Li, Z. *et al.* Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 expression in pancreatic cancer is an independent prognostic factor indicating better overall survival. *British Journal of Cancer* **104**, 1882–1889 (2011).
 81. Berois, N. *et al.* UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **54**, 317–28 (2006).
 82. Guo, J.-M., Chen, H.-L., Wang, G.-M., Zhang, Y.-K. & Narimatsu, H. Expression of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-12 in gastric and colonic cancer cell lines and in human colorectal cancer. *Oncology* **67**, 271–6 (2004).
 83. He, H. *et al.* Clinical significance of polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase-5 (GalNAc-T5) expression in patients with gastric cancer. *British Journal of Cancer* **110**, 2021–2029 (2014).
 84. Yeh, C.-T. *et al.* A single nucleotide polymorphism on the GALNT14 gene as an effective predictor of response to chemotherapy in advanced hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* **134**, 1214–24 (2014).
 85. Kohsaki, T. *et al.* Expression of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isozymes T1 and T2 in human colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology* **35**, 840–8 (2000).
 86. Li, W. E. I., Ma, H. & Sun, J. I. microRNA-34a / c function as tumor suppressors in Hep-2 laryngeal carcinoma cells and may reduce GALNT7 expression. *Molecular Medicine Reports* **9**, 1293–1298 (2014).
 87. Shan, S. W. *et al.* Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7 and vimentin in different signal pathways. *Journal of Cell Science* **126**,

- (2013).
88. Peng, R.-Q. *et al.* MicroRNA-214 suppresses growth and invasiveness of cervical cancer cells by targeting UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 14301–9 (2012).
 89. Rose, A. E. *et al.* Integrative genomics identifies molecular alterations that challenge the linear model of melanoma progression. *Cancer Research* **71**, 2561–2571 (2011).
 90. Freire, T. *et al.* UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells. *International Journal of Cancer* **119**, 1383–1388 (2006).
 91. Berois, N. *et al.* ppGalNAc-T13: A New Molecular Marker of Bone Marrow Involvement in Neuroblastoma. *Clinical Chemistry* **52**, 1701–1712 (2006).
 92. Berois, N. *et al.* GALNT9 gene expression is a prognostic marker in neuroblastoma patients. *Clinical Chemistry* **59**, 225–233 (2013).
 93. Matsumoto, Y. *et al.* Pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **419**, 7–13 (2012).
 94. Matsumoto, Y. *et al.* Trimeric Tn antigen on syndecan 1 produced by ppGalNAc-T13 enhances cancer metastasis via a complex formation with integrin $\alpha 5 \beta 1$ and matrix metalloproteinase 9. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 24264–24276 (2013).
 95. Zhang, Q. *et al.* Metastatic potential of mouse Lewis lung cancer cells is regulated via ganglioside GM1 by modulating the matrix metalloproteinase-9 localization in lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 18145–18155 (2006).
 96. Nogimori, K. *et al.* Increased expression levels of ppGalNAc-T13 in

- lung cancers: Significance in the prognostic diagnosis. *International Journal of Oncology* **49**, 1369–1376 (2016).
97. Festari, M. F. *et al.* Revisiting the human polypeptide GalNAc-T1 and T13 paralogs. *Glycobiology* **27**, 140–153 (2017).
 98. Lonowski, L. A. *et al.* Genome editing using FACS enrichment of nuclease-expressing cells and indel detection by amplicon analysis. *Nature Protocols* **12**, 581–603 (2017).
 99. Andersen, P. S., Jespersgaard, C., Vuust, J., Christiansen, M. & Larsen, L. A. Capillary electrophoresis-based single strand DNA conformation analysis in high-throughput mutation screening. *Human Mutation* **21**, 455–465 (2003).
 100. Oetting, W. S. *et al.* Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* **30**, 450–458 (1995).
 101. Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature of Biotechnology* **18**, 233–234 (2000).
 102. Mellersh, C. S., Pettitt, L., Forman, O. P., Vaudin, M. & Barnett, K. C. Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts. *Veterinary Ophthalmology* **9**, 369–378 (2006).
 103. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 104. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature Protocols* **3**, 1101–1108 (2008).
 105. Schroeder, A. *et al.* The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* **7**, 3 (2006).
 106. Mosmann, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63 (1983).
 107. Van Den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A. & Opdenakker, G.

- Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 151–208 (1998).
108. Wang, Y., Agrwal, N., Eckhardt, A. E., Stevens, R. D. & Hill, R. L. The acceptor substrate specificity of porcine submaxillary UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase is dependent on the amino acid sequences adjacent to serine and threonine residues. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 22979–22983 (1993).
109. Brockhausen, I., Yang, J. - M, Burchell, J., Whitehouse, C. & Taylor- Papadimitriou, J. Mechanisms Underlying Aberrant Glycosylation of MUC1 Mucin in Breast Cancer Cells. *European Journal of Biochemistry* **233**, 607–617 (1995).
110. Schachter, H. & Brockhausen, I. The biosynthesis of branched O-glycans. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **43**, 1–26 (1989).
111. Tsuboi, S., Hatakeyama, S., Ohyama, C. & Fukuda, M. Two opposing roles of O-glycans in tumor metastasis. *Trends in Molecular Medicine* **18**, 224–232 (2012).
112. López-Ferrer, A., Barranco, C. & De Bolós, C. Differences in the O-glycosylation patterns between lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* **118**, 749–755 (2002).
113. Berois, N., Touyà, D., Varangot, M. & Osinaga, E. A novel method to detect resistance to chemotherapy in patients with lung cancer. International Patent Application PCT/US2013/051904. (2013).
114. Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* **96**, 307–310 (1999).
115. Steentoft, C. *et al.* Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO Journal* **32**, 1478–1488 (2013).
116. Campos, D. *et al.* Probing the O-Glycoproteome of Gastric Cancer

- Cell Lines for Biomarker Discovery. *Molecular and Cellular Proteomics* **14**, 1616–1629 (2015).
117. Röttger, S. *et al.* Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *Journal of Cell Science* **111**, 45–60 (1998).
 118. Pan, X. *et al.* Autophagy Inhibition Promotes 5-Fluorouraci-Induced Apoptosis by Stimulating ROS Formation in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. *PLoS ONE* **8**(2): e56679 (2013).
 119. Zarogoulidis, P. *et al.* MiR-205 and miR-218 expression is associated with carboplatin chemoresistance and regulation of apoptosis via Mcl-1 and Survivin in lung cancer cells. *Cellular Signalling* **27**, 1576–1588 (2015).
 120. Gao, W., Liu, Y., Qin, R., Liu, D. & Feng, Q. Silence of fibronectin 1 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **476**, 35–41 (2016).
 121. Varki, A., Kannagi, R. & Toole, B., Stanley, P. Essentials of Glycobiology 3rd Edition. Glycosilation Changes in *Cancer* 1–11 (2009).
 122. Song, L. & Fricker, L. D. Tissue distribution and characterization of soluble and membrane-bound forms of metallocarboxypeptidase D. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 28884–28889 (1996).
 123. Jin, T. *et al.* SiRNA-targeted carboxypeptidase D inhibits hepatocellular carcinoma growth. *Cell Biology International* **37**, 929–939 (2013).
 124. Thomas, L. N., Merrimen, J., Bell, D. G., Rendon, R. & Too, C. K. L. Prolactin- and testosterone-induced carboxypeptidase-D correlates with increased nitrotyrosines and Ki67 in prostate cancer. *Prostate* **75**, 1726–1736 (2015).
 125. Li, J., Zhao, X., Wang, D., He, W. & Zhang, S. Up-regulated

- expression of phospholipase c, $\beta 1$ is associated with tumor cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *OncoTargets and Therapy* **9**, 1697–1706 (2016).
126. Dange, M. C. *et al.* Mass spectrometry based identification of galectin-3 interacting proteins potentially involved in lung melanoma metastasis. *Molecular BioSystems* (2017).
 127. Fiume, R. *et al.* Phospholipase c beta 1 (PLCb1) in acute myeloid leukemia (AML): a novel potential therapeutic target. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* **1**, 6321 (2014).
 128. Relógio, A. *et al.* Alternative splicing microarrays reveal functional expression of neuron-specific regulators in Hodgkin lymphoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 4779–4784 (2005).

9. ANEXO I

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
< 1e-07	< 1e-07	1.25	89.78	0,014	Homo sapiens peroxidasin-like (PXDNL), mRNA [NM_144651]	PXDNL
< 1e-07	< 1e-07	187.2	1.31	142,38	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8A, member 2 pseudogene 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:39662] [ENST00000420453]	-
< 1e-07	< 1e-07	166.5	1.29	129,52	Homo sapiens taxilin gamma pseudogene, Y-linked (TXLNGY), transcript variant 2, non-coding RNA [NR_045129]	TXLNGY
< 1e-07	< 1e-07	347	1.2	289,62	Homo sapiens dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8), transcript variant 1, mRNA [NM_203447]	DOCK8
< 1e-07	< 1e-07	19479.54	1.44	13487,1	Homo sapiens ribosomal protein S4, Y-linked 2 (RPS4Y2), mRNA [NM_001039567]	RPS4Y2
< 1e-07	0.000312	98.68	1.2	82,36	Homo sapiens testis-specific transcript, Y-linked 15 (non-protein coding) (TTY15), long non-coding RNA [NR_001545]	TTY15

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0,0000001	0.000312	763.77	1.2	637,46	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked (USP9Y), mRNA [NM_004654]	USP9Y
0,0000001	0.000312	2337.53	113.07	20,67	Homo sapiens sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1 (SULT2B1), transcript variant 1, mRNA [NM_004605]	SULT2B1
0,0000001	0.000312	89.4	1.2	74,61	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit (CACNB2), transcript variant 1, mRNA [NM_000724]	CACNB2
0,0000002	0.000468	421.52	1.4	300,59	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked (EIF1AY), transcript variant 1, mRNA [NM_004681]	EIF1AY
0,0000003	0.000561	393.08	1.29	304,85	taxilin gamma pseudogene, Y-linked [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18473] [ENST00000593000]	TXLNGY
0,0000003	0.000561	25.01	1.2	20,87	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 1571 (LINC01571), long non-coding RNA [NR_110916]	LINC01571

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0,0000005	0.000693	1206.18	1.53	786,2	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, Y-linked (DDX3Y), transcript variant 2, mRNA [NM_004660]	DDX3Y
0,0000005	0.000693	1780.23	70.73	25,17	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 3 (SERPINA3), mRNA [NM_001085]	SERPINA3
0,0000006	0.000774	42.27	1.2	35,28	Homo sapiens family with sequence similarity 133, member A (FAM133A), transcript variant 2, mRNA [NM_173698]	FAM133A
0,0000007	0.000819	31.8	1.2	26,54	Homo sapiens mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene) (MAL2), mRNA [NM_052886]	MAL2
0,0000009	0.000842	1313.61	130.45	10,07	Homo sapiens asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1), transcript variant 1, mRNA [NM_001671]	ASGR1
1.2e-06	0.000956	151.25	1.2	126,24	Homo sapiens transmembrane protein 45B (TMEM45B), mRNA [NM_138788]	TMEM45B

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
1.3e-06	0.000993	1067.45	1.47	723,97	Homo sapiens schlafen family member 11 (SLFN11), transcript variant 1, mRNA [NM_001104587]	SLFN11
1.4e-06	0.00101	22720.22	2.07	10964,3	Homo sapiens ribosomal protein S4, Y-linked 1 (RPS4Y1), mRNA [NM_001008]	RPS4Y1
0,000002	0.00127	15.13	1.2	12,63	Homo sapiens polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13 (GALNT13), transcript variant 1, mRNA [NM_052917]	GALNT13
3.1e-06	0.00153	14.92	1.37	10,93	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 1158 (LINC01158), long non-coding RNA [NR_037883]	LINC01158
3.2e-06	0.00154	36.56	1.42	25,71	Homo sapiens integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide) (ITGAL), transcript variant 1, mRNA [NM_002209]	ITGAL
5.3e-06	0.00189	764.43	23.89	32	Homo sapiens neuropeptide Y receptor Y1 (NPY1R), mRNA [NM_000909]	NPY1R
5.9e-06	0.00193	47467.69	109.93	431,81	Homo sapiens keratin 19, type I (KRT19), mRNA [NM_002276]	KRT19

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
6.1e-06	0.00193	660.41	34.23	19,29	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
8.5e-06	0.00208	1445.85	7.73	187,07	Homo sapiens keratin 19 pseudogene 2 (KRT19P2), non-coding RNA [NR_036685]	KRT19P2
1.03e-05	0.00228	1612.58	152.28	10,59	Homo sapiens colorectal cancer associated 2 (COLCA2), transcript variant 3, mRNA [NM_001136105]	COLCA2
1.08e-05	0.00228	16345.92	1586.01	10,31	Homo sapiens notch 3 (NOTCH3), mRNA [NM_000435]	NOTCH3
1.12e-05	0.00232	73.71	1.45	50,69	Homo sapiens schlafen family member 13 (SLFN13), mRNA [NM_144682]	SLFN13
1.14e-05	0.00232	689.33	46.87	14,71	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
1.17e-05	0.00235	31.12	1.2	25,98	Homo sapiens protocadherin 20 (PCDH20), mRNA [NM_022843]	PCDH20
1.19e-05	0.00237	1540.18	138.7	11,1	Homo sapiens colorectal cancer associated 2 (COLCA2), transcript variant 3, mRNA [NM_001136105]	COLCA2

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
1.19e-05	0.00237	5071.2	394.35	12,86	Homo sapiens PYD and CARD domain containing (PYCARD), transcript variant 1, mRNA [NM_013258]	PYCARD
1.5e-05	0.00255	645.84	29.68	21,76	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
1.6e-05	0.00264	52.89	2.06	25,64	Homo sapiens netrin 1 (NTN1), mRNA [NM_004822]	NTN1
1.7e-05	0.00273	901.16	67.81	13,29	Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (LGALS4), mRNA [NM_006149]	LGALS4
1.8e-05	0.00275	271.92	24.81	10,96	Homo sapiens coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator) (F7), transcript variant 1, mRNA [NM_000131]	F7
1.81e-05	0.00275	1687.85	9.07	186,07	Homo sapiens PTPN13-like, Y-linked 2 (PRY2), mRNA [NM_001002758]	PRY2
1.84e-05	0.00277	134.14	5.65	23,74	LNCipedia lincRNA (lnc-ZMAT4-3), lincRNA [lnc-ZMAT4-3:4]	lnc-ZMAT4-3

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
1.94e-05	0.00279	712.51	39.63	17,98	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
2.24e-05	0.0029	177.54	6.93	25,62	Homo sapiens sciellin (SCEL), transcript variant 1, mRNA [NM_144777]	SCEL
2.28e-05	0.00291	614.34	37.26	16,49	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
2.3e-05	0.00291	19.04	1.37	13,86	LNCipedia lincRNA (lnc-TRIML1-3), lincRNA [lnc-TRIML1-3:10]	lnc-TRIML1-3
2.38e-05	0.00293	135.42	1.3	104,28	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 4 (MAPK4), transcript variant 1, mRNA [NM_002747]	MAPK4
2.53e-05	0.00301	206.65	14.26	14,49	Homo sapiens caudal type homeobox 2 (CDX2), mRNA [NM_001265]	CDX2
2.53e-05	0.00301	1312.34	50.96	25,75	Homo sapiens myosin IA (MYO1A), transcript variant 2, mRNA [NM_005379]	MYO1A

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
2.91e-05	0.00317	17080.56	1147.25	14,89	Homo sapiens solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 7 (SLC7A7), transcript variant 3, mRNA [NM_001126106]	SLC7A7
2.92e-05	0.00317	8347.86	89.42	93,36	Homo sapiens breast carcinoma amplified sequence 1 (BCAS1), mRNA [NM_003657]	BCAS1
2.95e-05	0.00318	6820.96	14.82	460,28	Homo sapiens neurotensin (NTS), mRNA [NM_006183]	NTS
3.04e-05	0.00325	1554.05	139.65	11,13	Homo sapiens colorectal cancer associated 2 (COLCA2), transcript variant 3, mRNA [NM_001136105]	COLCA2
3.23e-05	0.00333	762.27	49.56	15,38	Homo sapiens regulator of cell cycle (RGCC), mRNA [NM_014059]	RGCC
3.31e-05	0.00333	1103.48	107.77	10,24	Homo sapiens RAB37, member RAS oncogene family (RAB37), transcript variant 3, mRNA [NM_175738]	RAB37
3.31e-05	0.00333	55.49	1.2	46,31	Homo sapiens SOX21 antisense RNA 1 (head to head) (SOX21-AS1), long non-coding RNA [NR_046514]	SOX21-AS1

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
3.34e-05	0.00333	47.09	1.42	33,26	Homo sapiens gap junction protein, beta 4, 30.3kDa (GJB4), mRNA [NM_153212]	GJB4
3.39e-05	0.00334	11157.31	42.15	264,69	Homo sapiens scavenger receptor class A, member 5 (SCARA5), mRNA [NM_173833]	SCARA5
3.73e-05	0.0035	632.15	22.45	28,16	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 993 (LINC00993), long non-coding RNA [NR_104061]	LINC00993
3.91e-05	0.00359	3596.12	222.81	16,14	Homo sapiens EPS8-like 3 (EPS8L3), transcript variant 1, mRNA [NM_139053]	EPS8L3
4.07e-05	0.00369	683.85	42.15	16,22	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
4.09e-05	0.00369	1777.74	90.48	19,65	Homo sapiens v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (ERBB3), transcript variant 1, mRNA [NM_001982]	ERBB3
4.17e-05	0.00372	765.89	60.82	12,59	Homo sapiens iroquois homeobox 2 (IRX2), transcript variant 1, mRNA [NM_033267]	IRX2

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
4.65e-05	0.00388	351.77	1.65	213,57	Homo sapiens taxilin gamma pseudogene, Y-linked (TXLNGY), transcript variant 1, non-coding RNA [NR_045128]	TXLNGY
4.7e-05	0.00389	2067.52	60.44	34,21	Homo sapiens ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (ENTPD2), transcript variant 1, mRNA [NM_203468]	ENTPD2
4.7e-05	0.00389	48.92	1.3	37,71	Homo sapiens family with sequence similarity 153, member B (FAM153B), mRNA [NM_001265615]	FAM153B
0,00005	0.00397	588.1	33.44	17,59	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
5.05e-05	0.00398	307.63	25.34	12,14	Homo sapiens RAR-related orphan receptor C (RORC), transcript variant 1, mRNA [NM_005060]	RORC
5.11e-05	0.00398	1460.56	134.09	10,89	Homo sapiens colorectal cancer associated 2 (COLCA2), transcript variant 3, mRNA [NM_001136105]	COLCA2
5.26e-05	0.00402	1410.59	126.66	11,14	Homo sapiens colorectal cancer associated 2 (COLCA2), transcript variant 3, mRNA [NM_001136105]	COLCA2

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
5.44e-05	0.0041	1363.65	27.14	50,25	Homo sapiens breast carcinoma amplified sequence 1 (BCAS1), mRNA [NM_003657]	BCAS1
5.64e-05	0.00419	369.12	2.01	183,79	Homo sapiens uroplakin 1B (UPK1B), mRNA [NM_006952]	UPK1B
5.79e-05	0.00422	1321.62	116.76	11,32	Homo sapiens colorectal cancer associated 2 (COLCA2), transcript variant 3, mRNA [NM_001136105]	COLCA2
6.21e-05	0.00432	61.31	1.48	41,49	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 1146 (LINC01146), long non-coding RNA [NR_046094]	LINC01146
6.22e-05	0.00432	93.26	1.46	63,9	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12638] [ENST00000382893]	UTY
7.16e-05	0.00461	649.12	37.41	17,35	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
7.22e-05	0.00463	282.9	12.34	22,93	Homo sapiens maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase) (MGAM), mRNA [NM_004668]	MGAM

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
7.22e-05	0.00463	771.01	49.83	15,47	Homo sapiens PDZ domain containing 1 (PDZK1), transcript variant 1, mRNA [NM_002614]	PDZK1
7.73e-05	0.00474	328.83	1.59	206,25	Homo sapiens cell migration inducing protein, hyaluronan binding (CEMIP), transcript variant 3, mRNA [NM_018689]	CEMIP
8.03e-05	0.00486	31.4	1.42	22,17	Homo sapiens solute carrier family 44, member 4 (SLC44A4), transcript variant 1, mRNA [NM_025257]	SLC44A4
8.95e-05	0.00515	98.89	2.04	48,5	Q14754_HUMAN (Q14754) ORFII, partial (4%) [THC2714876]	Inc-AL353698.1-1
9.03e-05	0.00518	1334.94	122.58	10,89	Homo sapiens colorectal cancer associated 2 (COLCA2), transcript variant 3, mRNA [NM_001136105]	COLCA2
9.55e-05	0.00534	4302.3	2.56	1682,39	Homo sapiens family with sequence similarity 224, member A (non-protein coding) (FAM224A), long non-coding RNA [NR_002161]	FAM224A
0.000103	0.00555	365.13	16.75	21,8	Homo sapiens PDZ domain containing 3 (PDZD3), transcript variant 2, mRNA [NM_024791]	PDZD3

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0001031	0.00555	549.28	19.94	27,55	Homo sapiens phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific) (PLCB1), transcript variant 1, mRNA [NM_015192]	PLCB1
0.000108	0.00569	30.26	1.2	25,26	Homo sapiens POU class 2 associating factor 1 (POU2AF1), mRNA [NM_006235]	POU2AF1
0.0001083	0.0057	531.72	14.17	37,53	Homo sapiens glutamate-rich 4 (ERICH4), mRNA [NM_001130514]	ERICH4
0.0001099	0.00574	2651.69	52.22	50,78	Homo sapiens transmembrane 4 L six family member 5 (TM4SF5), mRNA [NM_003963]	TM4SF5
0.0001125	0.00581	1177.79	55.58	21,19	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 993 (LINC00993), long non-coding RNA [NR_104061]	LINC00993
0.0001191	0.00606	218.08	1.99	109,39	Homo sapiens neuropeptide Y receptor Y2 (NPY2R), mRNA [NM_000910]	NPY2R
0.000121	0.00611	3388.37	174.02	19,47	Homo sapiens tubulin polymerization-promoting protein family member 3 (TPPP3), transcript variant 1, mRNA [NM_016140]	TPPP3

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0001222	0.00616	212.85	1.61	132,19	Homo sapiens myocardial infarction associated transcript (non-protein coding) (MIAT), transcript variant 1, long non-coding RNA [NR_003491]	MIAT
0.0001246	0.00622	582.63	28.3	20,59	Homo sapiens engulfment and cell motility 1 (ELMO1), transcript variant 1, mRNA [NM_014800]	ELMO1
0.0001246	0.00622	519.79	34.88	14,9	Homo sapiens alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), mRNA [NM_001622]	AHSG
0.0001267	0.00629	36.3	1.64	22,15	Homo sapiens shroom family member 2 (SHROOM2), mRNA [NM_001649]	SHROOM2
0.0001379	0.00658	1356.45	119.06	11,39	Homo sapiens colorectal cancer associated 2 (COLCA2), transcript variant 3, mRNA [NM_001136105]	COLCA2
0.0001394	0.00661	199.71	3.07	65,06	Homo sapiens olfactory receptor, family 51, subfamily E, member 1 (OR51E1), mRNA [NM_152430]	OR51E1
0.000145	0.00674	388.07	17.18	22,59	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein (APBB1IP), mRNA [NM_019043]	APBB1IP

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0001464	0.00675	1759.54	11.08	158,73	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 152 (C9orf152), mRNA [NM_001012993]	C9orf152
0.0001487	0.00682	1869.83	145.38	12,86	Homo sapiens keratin 4, type II (KRT4), mRNA [NM_002272]	KRT4
0.0001602	0.00707	191.13	18.78	10,18	LNCipedia lincRNA (lnc-GPR65-1), lincRNA [lnc-GPR65-1:14]	lnc-GPR65-1
0.0001605	0.00707	2311.86	27.03	85,54	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein (APBB1IP), mRNA [NM_019043]	APBB1IP
0.0001626	0.00709	398.9	17.41	22,91	Homo sapiens rhomboid, veinlet-like 2 (Drosophila) (RHBDL2), mRNA [NM_017821]	RHBDL2
0.0001633	0.00709	28.21	1.2	23,54	Homo sapiens uncharacterized LOC100507387 (LOC100507387), long non-coding RNA [NR_038402]	LOC100507387
0.0001694	0.00722	38.24	1.53	24,93	Homo sapiens unc-13 homolog C (C. elegans) (UNC13C), mRNA [NM_001080534]	UNC13C
0.0001701	0.00724	27.67	1.99	13,92	Homo sapiens BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2 (BACH2), transcript variant 1, mRNA [NM_021813]	BACH2

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0001739	0.00733	1663.97	44.87	37,08	Homo sapiens cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine) (CDH17), transcript variant 1, mRNA [NM_004063]	CDH17
0.0001766	0.00738	108.26	1.52	71,36	Homo sapiens phosphoglucomutase 5 (PGM5), mRNA [NM_021965]	PGM5
0.0001778	0.00742	44.97	1.2	37,53	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC100507403 (LOC100507403), ncRNA [XR_426301]	LOC100507403
0.0001851	0.00759	36.67	1.2	30,61	Homo sapiens SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3 (SRGAP3), transcript variant 1, mRNA [NM_014850]	SRGAP3
0.0001861	0.0076	569.92	41.69	13,67	Homo sapiens peroxidasin (PXDN), mRNA [NM_012293]	PXDN
0.0001873	0.0076	359.57	27.87	12,9	Homo sapiens coiled-coil domain containing 3 (CCDC3), transcript variant 1, mRNA [NM_031455]	CCDC3
0.0001914	0.00772	22.82	1.2	19,05	Homo sapiens protocadherin beta 6 (PCDHB6), transcript variant 1, mRNA [NM_018939]	PCDHB6

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0001921	0.00772	4431.26	232.34	19,07	Homo sapiens RAB37, member RAS oncogene family (RAB37), transcript variant 3, mRNA [NM_175738]	RAB37
0.0001922	0.00772	245.14	11.01	22,26	Homo sapiens rhomboid, veinlet-like 2 (Drosophila) (RHBDL2), mRNA [NM_017821]	RHBDL2
0.0002397	0.00879	462.45	44.1	10,49	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 1146 (LINC01146), long non-coding RNA [NR_046094]	LINC01146
0.0002501	0.00898	1755.59	112.15	15,65	Homo sapiens dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 2 (DACT2), transcript variant 1, mRNA [NM_214462]	DACT2
0.0002654	0.00916	160.92	1.76	91,23	Homo sapiens zinc finger protein, Y-linked (ZFY), transcript variant 1, mRNA [NM_003411]	ZFY
0.0002669	0.00916	31.33	1.45	21,65	BROAD Institute lincRNA (XLOC_I2_006131), lincRNA [TCONS_I2_00011673]	XLOC_I2_006131
0.0003026	0.00979	56.24	1.63	34,59	PREDICTED: Homo sapiens WAS/WASL-interacting protein family member 1-like (LOC100129098), mRNA [XM_001714893]	LOC100129098

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0003048	0.00983	460.79	27.84	16,55	Homo sapiens VAC14 antisense RNA 1 (VAC14-AS1), long non-coding RNA [NR_034083]	VAC14-AS1
0.0003128	0.00997	123.17	10.91	11,29	Homo sapiens coagulation factor X (F10), mRNA [NM_000504]	F10
0.0003447	0.0105	1480.82	28.26	52,41	Homo sapiens guanine deaminase (GDA), transcript variant 2, mRNA [NM_004293]	GDA
0.0003575	0.0107	707.71	18.38	38,51	Homo sapiens fibrinogen alpha chain (FGA), transcript variant alpha-E, mRNA [NM_000508]	FGA
0.00036	0.0107	588.5	39.86	14,77	Homo sapiens neuregulin 2 (NRG2), transcript variant 3, mRNA [NM_013982]	NRG2
0.0003645	0.0107	93.22	6.92	13,47	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 675 (LINC00675), long non-coding RNA [NR_036581]	LINC00675
0.0003685	0.0108	2224.14	10.74	207,13	Homo sapiens embigin (EMB), mRNA [NM_198449]	EMB
0.0003686	0.0108	7617.39	128.37	59,34	Homo sapiens glypican 6 (GPC6), mRNA [NM_005708]	GPC6
0.0003702	0.0108	682.8	2.57	265,21	Homo sapiens phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific) (PLCB1), transcript variant 2, mRNA [NM_182734]	PLCB1

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0003825	0.011	696.66	35.51	19,62	Homo sapiens grainyhead-like 3 (Drosophila) (GRHL3), transcript variant 2, mRNA [NM_198173]	GRHL3
0.0003914	0.0112	8615.17	40.69	211,72	Homo sapiens fibrinogen beta chain (FGB), transcript variant 1, mRNA [NM_005141]	FGB
0.0003923	0.0112	2587.38	243.5	10,63	Homo sapiens transmembrane channel-like 5 (TMC5), transcript variant 3, mRNA [NM_024780]	TMC5
0.0004065	0.0114	1068.12	103.87	10,28	Homo sapiens glutathione S-transferase alpha 5 (GSTA5), mRNA [NM_153699]	GSTA5
0.0004401	0.0118	81.72	5.3	15,42	Homo sapiens potassium channel, inwardly rectifying subfamily J, member 8 (KCNJ8), mRNA [NM_004982]	KCNJ8
0.0004527	0.0121	2618.98	208.33	12,57	Homo sapiens ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G) (ANK3), transcript variant 1, mRNA [NM_020987]	ANK3
0.0004602	0.0121	1091.94	14.31	76,3	Homo sapiens carbonic anhydrase VIII (CA8), mRNA [NM_004056]	CA8
0.0004615	0.0121	925.76	73.25	12,64	Homo sapiens mucin 13, cell surface associated (MUC13), mRNA [NM_033049]	MUC13

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0004724	0.0123	189.01	18.12	10,43	Homo sapiens neuropeptide Y receptor Y5 (NPY5R), mRNA [NM_006174]	NPY5R
0.0004784	0.0123	189.21	2.04	92,81	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked (USP9Y), mRNA [NM_004654]	USP9Y
0.0004836	0.0123	56.57	1.28	44,3	Homo sapiens 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F, G protein-coupled (HTR1F), mRNA [NM_000866]	HTR1F
0.0004893	0.0124	473.14	31.21	15,16	Homo sapiens rhomboid, veinlet-like 2 (Drosophila) (RHBDL2), mRNA [NM_017821]	RHBDL2
0.0005022	0.0127	497.11	27.05	18,38	Homo sapiens carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3), transcript variant 1, mRNA [NM_001815]	CEACAM3
0.0005081	0.0128	315.75	24.87	12,7	Homo sapiens RAP1 GTPase activating protein 2 (RAP1GAP2), transcript variant 1, mRNA [NM_015085]	RAP1GAP2
0.0005135	0.0129	159.62	3.13	51,01	Q73RJ0_TREDE (Q73RJ0) Conserved domain protein, partial (5%) [THC2695224]	Inc-MAP9-2

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0005302	0.013	528.53	33.35	15,85	Homo sapiens hepatic leukemia factor (HLF), mRNA [NM_002126]	HLF
0.000532	0.0131	80.65	1.71	47,1	Homo sapiens plexin A2 (PLXNA2), mRNA [NM_025179]	PLXNA2
0.0005322	0.0131	476.91	24.62	19,37	Homo sapiens carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3), transcript variant 2, mRNA [NM_001277163]	CEACAM3
0.0005349	0.0131	636.4	4.77	133,42	Homo sapiens testis-specific transcript, Y-linked 15 (non-protein coding) (TTY15), long non-coding RNA [NR_001545]	TTY15
0.0005511	0.0133	15.95	1.28	12,46	Homo sapiens uncharacterized LOC440173 (LOC440173), long non-coding RNA [NR_027471]	LOC440173
0.0005617	0.0134	159.85	1.2	132,77	Homo sapiens integral membrane protein 2A (ITM2A), transcript variant 1, mRNA [NM_004867]	ITM2A
0.0005758	0.0136	223.02	13.13	16,99	Homo sapiens aquaporin 3 (Gill blood group) (AQP3), mRNA [NM_004925]	AQP3
0.0005983	0.0139	418.61	2.33	179,94	Homo sapiens BPI fold containing family B, member 1 (BPIFB1), mRNA [NM_033197]	BPIFB1

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0005996	0.0139	1010.12	26.79	37,71	Homo sapiens lysine (K)-specific demethylase 5D (KDM5D), transcript variant 2, mRNA [NM_004653]	KDM5D
0.0006084	0.0139	5089.23	81.07	62,78	Homo sapiens fibrinogen alpha chain (FGA), transcript variant alpha, mRNA [NM_021871]	FGA
0.0006087	0.0139	100.9	2.8	36,09	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 2, mRNA [NM_022970]	FGFR2
0.0006149	0.014	46.72	1.82	25,71	Homo sapiens ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked (UTY), transcript variant 3, mRNA [NM_007125]	UTY
0.0006158	0.014	222.33	3.65	60,88	Homo sapiens glypican 6 (GPC6), mRNA [NM_005708]	GPC6
0.0006303	0.0142	97.43	7.58	12,86	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5 (SERPINA5), mRNA [NM_000624]	SERPINA5
0.0006672	0.0147	303.9	23.27	13,06	Homo sapiens selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1), transcript variant 1, mRNA [NM_005410]	SEPP1

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0006718	0.0148	146.07	11.72	12,46	Homo sapiens furry homolog (Drosophila) (FRY), mRNA [NM_023037]	FRY
0.0007014	0.0152	225.13	14.84	15,17	AGENCOURT_89030 05 NIH_MGC_141 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6389455 5', mRNA sequence [BU590318]	Inc-ZMAT4-3
0.0007327	0.0156	142.43	2.8	50,87	Homo sapiens serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3 (SPTLC3), mRNA [NM_018327]	SPTLC3
0.0007345	0.0156	142.99	2.14	66,69		-
0.0007396	0.0157	33.89	2.01	16,83	Homo sapiens B-box and SPRY domain containing (BSPRY), mRNA [NM_017688]	BSPRY
0.0007447	0.0157	241.65	16.73	14,44	Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 12 (SAMD12), transcript variant 1, mRNA [NM_001101676]	SAMD12
0.0007537	0.0158	870.27	66.89	13,01	Homo sapiens FERM domain containing 3 (FRMD3), transcript variant 2, mRNA [NM_001244959]	FRMD3
0.0007547	0.0158	1398.92	12.65	110,58	Homo sapiens villin 1 (VIL1), mRNA [NM_007127]	VIL1

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0007819	0.0162	33.67	2.07	16,25	Homo sapiens cDNA FLJ26086 fis, clone RCT05358. [AK129597]	FLJ26086
0.000787	0.0162	1015.23	6.29	161,48	Homo sapiens ankyrin repeat domain 30A (ANKRD30A), mRNA [NM_052997]	ANKRD30A
0.0008633	0.0171	82848	7176.86	11,54	Homo sapiens S100 calcium binding protein P (S100P), mRNA [NM_005980]	S100P
0.000868	0.0171	417.45	3.25	128,61	HSU33822 TXBP181 {Homo sapiens} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (17%) [THC2524341]	-
0.00087	0.0172	32.56	1.64	19,84	Homo sapiens cDNA FLJ25713 fis, clone TST05089. [AK098579]	LOC100509780
0.0009092	0.0176	308.27	30.69	10,04	Homo sapiens selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1), transcript variant 1, mRNA [NM_005410]	SEPP1
0.0009147	0.0176	136.08	2.34	58,03	Homo sapiens EPB41L4A antisense RNA 2 (head to head) (EPB41L4A-AS2), long non-coding RNA [NR_027706]	EPB41L4A-AS2
0.0009483	0.0179	273.79	20.48	13,37	Homo sapiens coagulation factor VII (serum prothrombin conversion accelerator) (F7), transcript variant 1, mRNA [NM_000131]	F7

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13 -/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0009557	0.018	731.67	4.66	156,85	Homo sapiens embigin (EMB), mRNA [NM_198449]	EMB
0.0009797	0.0183	270.49	24.02	11,26	Homo sapiens selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1), transcript variant 1, mRNA [NM_005410]	SEPP1

10. ANEXO II

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
< 1e-07	< 1e-07	1.25	89.78	0,014	Homo sapiens peroxidasin-like (PXDNL), mRNA [NM_144651]	PXDNL
< 1e-07	0.000312	1.25	169.9	0,0074	Homo sapiens collagen and calcium binding EGF domains 1 (CCBE1), mRNA [NM_133459]	CCBE1
2,00E-07	0.000468	10.67	2834.78	0,0038	Homo sapiens integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61) (ITGB3), mRNA [NM_000212]	ITGB3
8,00E-07	0.000842	16.58	7770.27	0,0021	Homo sapiens IGF-like family member 3 (IGFL3), mRNA [NM_207393]	IGFL3
1.1e-06	0.000915	38.24	5047.57	0,0076	Homo sapiens family with sequence similarity 49, member A (FAM49A), mRNA [NM_030797]	FAM49A
1.1e-06	0.000915	1.25	227.65	0,0055	Homo sapiens carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1 (CHST1), mRNA [NM_003654]	CHST1
1.6e-06	0.00109	290.4	3107.85	0,093		-
1.9e-06	0.00123	159.2	4467.2	0,036	Homo sapiens phosphotyrosine interaction domain containing 1 (PID1), transcript variant 1, mRNA [NM_017933]	PID1

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
2.1e-06	0.00129	232.95	13651.39	0,017	Homo sapiens EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1), transcript variant 2, mRNA [NM_001039348]	EFEMP1
2.1e-06	0.00129	68.14	1431.1	0,048	Homo sapiens GLI pathogenesis-related 1 (GLIPR1), mRNA [NM_006851]	GLIPR1
3.3e-06	0.00154	186.43	3190.24	0,058	Homo sapiens lipoma HMGIC fusion partner (LHFP), mRNA [NM_005780]	LHFP
3.7e-06	0.00167	1.64	94.15	0,017	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 520 (LINC00520), transcript variant 1, long non-coding RNA [NR_026796]	LINC00520
3.8e-06	0.00169	1.25	104.21	0,012	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]	PTX3
4.4e-06	0.00177	154.22	2481.95	0,062	LNCipedia lincRNA (lnc-IGFL3-1), lincRNA [lnc-IGFL3-1:1]	lnc-IGFL3-1
4.5e-06	0.00177	113.79	1995.88	0,057	Homo sapiens alpha-fetoprotein (AFP), mRNA [NM_001134]	AFP
5,00E-06	0.00187	2734.29	37919.81	0,072	Homo sapiens protein kinase C, delta binding protein (PRKCDBP), mRNA [NM_145040]	PRKCDBP

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
5.4e-06	0.00191	54.01	758.56	0,071	Homo sapiens potassium channel, voltage gated subfamily E regulatory beta subunit 4 (KCNE4), mRNA [NM_080671]	KCNE4
6,00E-06	0.00193	618.3	31267.9	0,02	Homo sapiens interleukin 11 (IL11), transcript variant 1, mRNA [NM_000641]	IL11
7.2e-06	0.00207	143.42	1688.03	0,085		-
8.2e-06	0.00208	1.25	101.12	0,012	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]	PTX3
8.2e-06	0.00208	201.08	4464.45	0,045	Homo sapiens MOB kinase activator 3B (MOB3B), mRNA [NM_024761]	MOB3B
9.1e-06	0.00217	1.52	20.85	0,073	Homo sapiens carboxypeptidase O (CPO), mRNA [NM_173077]	CPO
9.2e-06	0.00217	319.88	4035.71	0,079		-
9.2e-06	0.00217	19.09	407.77	0,047	Homo sapiens small muscle protein, X-linked (SMPX), transcript variant 1, mRNA [NM_014332]	SMPX
9.5e-06	0.00219	34.46	934.41	0,037		-
9.6e-06	0.0022	55.64	784.63	0,071	Homo sapiens myosin, light chain 9, regulatory (MYL9), transcript variant 2, mRNA [NM_181526]	MYL9
1.5e-05	0.00255	69.64	752.62	0,093	Homo sapiens FERM domain containing 5 (FRMD5), transcript variant 2, mRNA [NM_032892]	FRMD5

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
1.56e-05	0.00259	1.25	94.94	0,013	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]	PTX3
1.94e-05	0.00279	218.19	4976.58	0,044	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3 (SERPINB3), mRNA [NM_006919]	SERPINB3
1.97e-05	0.00281	236	2408.91	0,098	Homo sapiens ZMIZ1 antisense RNA 1 (ZMIZ1-AS1), transcript variant 1, long non-coding RNA [NR_024431]	ZMIZ1-AS1
2.63e-05	0.00306	18.24	3050.85	0,006	Homo sapiens transmembrane protein 233 (TMEM233), mRNA [NM_001136534]	TMEM233
2.74e-05	0.00312	5.98	62.08	0,096		-
2.8e-05	0.00314	9.39	250.02	0,038	Homo sapiens actin, gamma 2, smooth muscle, enteric (ACTG2), transcript variant 1, mRNA [NM_001615]	ACTG2
3.25e-05	0.00333	1.25	32.11	0,039	Homo sapiens oxidation resistance 1 (OXR1), transcript variant 1, mRNA [NM_018002]	OXR1
3.35e-05	0.00333	20.53	265.75	0,077	Homo sapiens chromosome 8 open reading frame 31 (C8orf31), transcript variant 1, mRNA [NM_173687]	C8orf31

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
3.37e-05	0.00333	17.7	750.18	0,024	LNCipedia lincRNA (lnc-GLI2-1), lincRNA [lnc-GLI2-1:1]	lnc-GLI2-1
3.43e-05	0.00336	1.25	163.54	0,0076	Homo sapiens teneurin transmembrane protein 2 (TENM2), mRNA [NM_001122679]	TENM2
3.65e-05	0.00348	1.54	75.81	0,02	Homo sapiens formyl peptide receptor 2 (FPR2), transcript variant 1, mRNA [NM_001462]	FPR2
4.19e-05	0.00372	55.72	1322.59	0,042	Homo sapiens sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2 (SULT1C2), transcript variant 2, mRNA [NM_176825]	SULT1C2
4.72e-05	0.00389	204.62	3244.92	0,063	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24865] [ENST00000369425]	GPAM
4.94e-05	0.00396	1.52	18.85	0,081	PREDICTED: Homo sapiens FLG antisense RNA 1 (FLG-AS1), misc_RNA [XR_108352]	FLG-AS1
5.59e-05	0.00417	20.7	295.57	0,07	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC102724479 (LOC102724479), ncRNA [XR_427436]	LOC102724479

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
5.7e-05	0.00421	2042.03	24896.01	0,082	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1 (LYPD1), transcript variant 1, mRNA [NM_144586]	LYPD1
5.93e-05	0.00425	164.14	3866.43	0,042	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4 (SERPINB4), transcript variant 1, mRNA [NM_002974]	SERPINB4
6.01e-05	0.00426	1.25	17.53	0,071	T cell receptor beta constant 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12156] [ENST00000610439]	-
6.36e-05	0.00432	16.96	230	0,074	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101928173 (LOC101928173), transcript variant X2, ncRNA [XR_245039]	LOC101928173
7,00E-05	0.00458	93.4	1514.04	0,062	Homo sapiens polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 16 (GALNT16), transcript variant 2, mRNA [NM_020692]	GALNT16
7.02e-05	0.00458	778.63	10379.31	0,075	Homo sapiens glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (GPAM), transcript variant 2, mRNA [NM_020918]	GPAM

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
7.09e-05	0.00461	14.92	389.53	0,038	Homo sapiens runt-related transcription factor 2 (RUNX2), transcript variant 1, mRNA [NM_001024630]	RUNX2
8.67e-05	0.00504	46.33	586.45	0,079	Homo sapiens neutrophil cytosolic factor 2 (NCF2), transcript variant 1, mRNA [NM_000433]	NCF2
8.71e-05	0.00504	1.68	19.49	0,086	Homo sapiens carboxypeptidase O (CPO), mRNA [NM_173077]	CPO
9.1e-05	0.00519	1.45	264.8	0,0055	Homo sapiens fibroblast activation protein, alpha (FAP), transcript variant 1, mRNA [NM_004460]	FAP
9.83e-05	0.00543	1.25	14.6	0,086	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC100507521 (LOC100507521), ncRNA [XR_110911]	LOC100507521
9.96e-05	0.00547	598.74	7361.26	0,081	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1 (LYPD1), transcript variant 1, mRNA [NM_144586]	LYPD1
0.0001005	0.00549	1.25	63.3	0,02	Homo sapiens Src-like-adaptor (SLA), transcript variant 1, mRNA [NM_001045556]	SLA
0.0001413	0.00665	124.74	1283.07	0,097	Homo sapiens cell cycle exit and neuronal differentiation 1 (CEND1), mRNA [NM_016564]	CEND1

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0001424	0.00666	32.27	2320.2	0,014	Homo sapiens immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1 (IGFN1), mRNA [NM_001164586]	IGFN1
0.0001494	0.00682	22.84	352.77	0,065	Homo sapiens guanylate binding protein 1, interferon-inducible (GBP1), mRNA [NM_002053]	GBP1
0.0001617	0.00709	1.25	39.37	0,032	Homo sapiens extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific (ECM2), transcript variant 1, mRNA [NM_001393]	ECM2
0.0001819	0.00754	32.26	2964.07	0,011	Homo sapiens SLAM family member 7 (SLAMF7), transcript variant 1, mRNA [NM_021181]	SLAMF7
0.0001866	0.0076	2.54	111.42	0,023	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]	PTX3
0.0001897	0.00767	5.64	115.83	0,049	Homo sapiens keratin 34, type I (KRT34), mRNA [NM_021013]	KRT34
0.0001963	0.0078	1.58	21.22	0,074	Homo sapiens integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor) (ITGA4), mRNA [NM_000885]	ITGA4

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0002044	0.00795	1.88	126.81	0,015	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]	PTX3
0.0002088	0.00803	4.44	67.34	0,066	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, R (PTPRR), transcript variant 1, mRNA [NM_002849]	PTPRR
0.0002263	0.00852	2.05	162.22	0,013	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, R (PTPRR), transcript variant 1, mRNA [NM_002849]	PTPRR
0.0002369	0.00875	21.41	805.76	0,027	Homo sapiens snail family zinc finger 2 (SNAI2), mRNA [NM_003068]	SNAI2
0.00026	0.00913	1.66	26.72	0,062	Homo sapiens tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), mRNA [NM_000550]	TYRP1
0.0002606	0.00913	22.39	245.15	0,091	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1 (LYPD1), transcript variant 1, mRNA [NM_144586]	LYPD1
0.0002769	0.00935	1.25	14.65	0,085	Homo sapiens carboxypeptidase O (CPO), mRNA [NM_173077]	CPO
0.0002806	0.0094	1.56	17.43	0,09	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4639754, partial cds. [BC023608]	-

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0002907	0.00955	1.89	51.92	0,036	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101928958 (LOC101928958), ncRNA [XR_241872]	LOC101928958
0.000293	0.0096	96.12	1041.83	0,092	Homo sapiens integrin, alpha 11 (ITGA11), mRNA [NM_001004439]	ITGA11
0.0002993	0.00975	25.01	783.64	0,032	Homo sapiens MOB kinase activator 3B (MOB3B), mRNA [NM_024761]	MOB3B
0.0003019	0.00979	49.34	656.95	0,075	Homo sapiens KIAA1462 (KIAA1462), mRNA [NM_020848]	KIAA1462
0.0003142	0.00997	2.18	324.38	0,0067	Homo sapiens phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A (PPAPDC1A), mRNA [NM_001030059]	PPAPDC1A
0.0003223	0.0101	19.94	916.34	0,022	Homo sapiens carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1 (CHST1), mRNA [NM_003654]	CHST1
0.0003256	0.0102	1.25	153.9	0,0081	Homo sapiens collagen, type XIII, alpha 1 (COL13A1), transcript variant 5, mRNA [NM_080801]	COL13A1
0.0003417	0.0104	1.86	23.9	0,078	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 1191 (LINC01191), long non-coding RNA [NR_034128]	LINC01191

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0004065	0.0114	1.25	17.01	0,073	LNCipedia lincRNA (lnc-PRICKLE2-3), lincRNA [lnc-PRICKLE2-3:1]	lnc-PRICKLE2-3
0.0004247	0.0116	13.73	283.76	0,048	LNCipedia lincRNA (lnc-PDE4D-1), lincRNA [lnc-PDE4D-1:1]	lnc-PDE4D-1
0.0004259	0.0117	1.85	54.86	0,034	Homo sapiens uncharacterized LOC101927845 (LOC101927845), long non-coding RNA [NR_125427]	LOC101927845
0.0004261	0.0117	123.08	1526.21	0,081	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 26 (CCL26), mRNA [NM_006072]	CCL26
0.0004311	0.0117	17.91	208.52	0,086	Homo sapiens LYPLAL1 antisense RNA 1 (head to head) (LYPLAL1-AS1), long non-coding RNA [NR_038845]	LYPLAL1-AS1
0.0004586	0.0121	1.84	22.6	0,081	Homo sapiens carboxypeptidase O (CPO), mRNA [NM_173077]	CPO
0.0004609	0.0121	1.55	29.23	0,053	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC340581 (RP3-473B4.3), misc_RNA [XR_244539]	LOC340581
0.0004704	0.0122	17.61	196.63	0,09	Homo sapiens phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha (PDE6A), mRNA [NM_000440]	PDE6A

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0004737	0.0123	40	3818.17	0,01	Homo sapiens interleukin 6 (IL6), mRNA [NM_000600]	IL6
0.0005212	0.013	38.16	440.9	0,087	Homo sapiens solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15 (SLC6A15), transcript variant 1, mRNA [NM_182767]	SLC6A15
0.0005262	0.013	754.9	23850.88	0,032	Homo sapiens atypical chemokine receptor 3 (ACKR3), mRNA [NM_020311]	ACKR3
0.0005446	0.0132	1.25	19.03	0,066	Homo sapiens oxidation resistance 1 (OXR1), transcript variant 1, mRNA [NM_018002]	OXR1
0.0005544	0.0133	176.37	1936.5	0,091	calpain 15 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11182] [ENST00000567216]	CAPN15
0.0006588	0.0146	1.61	19.72	0,082	Homo sapiens long intergenic non-protein coding RNA 961 (LINC00961), long non-coding RNA [NR_024283]	LINC00961
0.0007485	0.0158	32.13	419.01	0,077	Homo sapiens V-set and transmembrane domain containing 4 (VSTM4), transcript variant 1, mRNA [NM_001031746]	VSTM4

Parametric p-value	FDR	Geom mean of intensities in A549 wt	Geom mean of intensities in A549 T13-/-	Fold-change	Name	Symbol
0.0007693	0.016	3.44	118.01	0,029	Homo sapiens MOB kinase activator 3B (MOB3B), mRNA [NM_024761]	MOB3B
0.0007739	0.0161	18.08	200.92	0,09	Homo sapiens pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8 (PSG8), transcript variant 2, mRNA [NM_001130167]	PSG8
0.0007899	0.0162	2.25	36.09	0,062	601566084F1 NIH_MGC_21 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3840837 5', mRNA sequence [BE735115]	-
0.0008129	0.0165	2.19	111.87	0,02	Homo sapiens pentraxin 3, long (PTX3), mRNA [NM_002852]	PTX3
0.0008669	0.0171	1.94	87.54	0,022	Homo sapiens calponin 1, basic, smooth muscle (CNN1), mRNA [NM_001299]	CNN1
0.0008966	0.0174	13.85	177.77	0,078	Homo sapiens ADAMTS-like 1 (ADAMTSL1), transcript variant 4, mRNA [NM_001040272]	ADAMTSL1
0.0009194	0.0176	1.9	184.15	0,01	Homo sapiens collagen, type XIII, alpha 1 (COL13A1), transcript variant 5, mRNA [NM_080801]	COL13A1
0.0009634	0.0181	88.92	1194.71	0,074	Homo sapiens sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2 (SULT1C2), transcript variant 2, mRNA [NM_176825]	SULT1C2

11. ANEXO III

Trabajo con contenido afin a la presente Tesis de Maestría