



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

**Análisis de nuevos mecanismos de resistencia al
tratamiento con cisplatino en carcinomas
epidermoides de cabeza y cuello**

Israel Rivera García

Julio 2024

Trabajo Fin de Máster

Certificado de tutor

D. Juan Pablo Rodrigo Tapia, doctor en medicina, catedrático del área de Otorrinolaringología de la Universidad de Oviedo y director del grupo de investigación en Oncología de Cabeza y Cuello del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA) y del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA)

D. Mónica Álvarez Fernández, doctora en bioquímica, investigadora del grupo de Oncología de Cabeza y Cuello del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA) y del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA)

CERTIFICAN:

Que el graduado en Biología **D. Israel Rivera García** ha realizado bajo su dirección el Trabajo Fin de Máster titulado "**Análisis de nuevos mecanismos de resistencia al tratamiento con cisplatino en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello**", el cual reúne a su juicio las condiciones necesarias de originalidad y calidad para ser admitido como Trabajo Fin de Máster de la Universidad de Oviedo.

Y para que así conste, firman la presente certificación.



Fdo. Juan Pablo Rodrigo Tapia



Mónica Álvarez Fernández

En Oviedo, a 11 de Julio de 2024

Índice

Resumen.....	2
1. Introducción.....	3
1.1. Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC).....	3
1.2. Cisplatino.....	6
1.3. CRISPR-Cas9	8
1.4. Antecedentes.....	10
2. Objetivos.....	14
3. Material y métodos	14
3.1. Clonaje de ARNg en un vector lentiviral	14
3.2. Cultivo de líneas celulares	17
3.3. Producción de lentivirus en HEK293T	18
3.4. Infección de líneas celulares con lentivirus	19
3.5. Extracción de proteínas y Western-Blot.....	19
3.6. Ensayos de viabilidad y determinación de IC50.....	20
4. Resultados y discusión	21
4.1. Búsqueda de datos en CECC en TCGA y Depmap	21
4.2. Generación de plásmidos portadores de ARNg	24
4.3. Generación de líneas KO para los genes seleccionados	24
4.4. Respuesta al tratamiento con cisplatino	27
4.4.1. CCZ1	28
4.4.2. RNMT	30
4.4.3. BRIP1	32
4.4.4. SPIN2A	34
5. Conclusiones.....	36
6. Perspectivas futuras	37
7. Bibliografía.....	38

Resumen

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) se origina en el epitelio estratificado de la cavidad oral, laringe y faringe. Es el sexto cáncer más frecuente en el mundo y su mortalidad es de aproximadamente el 50%. Su tratamiento se basa en la cirugía o radioterapia en los estadios tempranos, mientras que la quimiorradioterapia basada en el cisplatino es el tratamiento de elección en los estadios más avanzados. Los fenómenos de resistencia al tratamiento son frecuentes y una de las principales causas de muerte en este tipo de tumores.

El presente trabajo trata de validar los resultados obtenidos en un *screening* de CRISPR/Cas9 en el cual se identificaron varios genes como posibles candidatos a generar resistencia al tratamiento con cisplatino en CECC. Entre ellos se analizaron los genes SPIN2A, RNMT, CCZ1 y BRIP1, algunos de los cuales ya habían sido relacionados con resistencia al tratamiento en otros tipos de tumores.

Para la validación fue esencial la generación de líneas celulares de CECC deplecionadas para cada uno de estos genes. El proceso de delección de los genes fue comprobado mediante Western Blot. Posteriormente fueron llevados a cabo ensayos de proliferación y viabilidad celular en presencia de cisplatino en cada una de las líneas generadas.

Desafortunadamente, nuestros resultados no han permitido validar de momento ninguno de estos genes como determinantes de resistencia al cisplatino en líneas celulares de CECC. Cabe destacar que la aproximación experimental llevada a cabo se basa en ensayos de viabilidad a corto plazo, por lo que se han comenzado a realizar ensayos clonogénicos de proliferación en las mismas líneas con la intención de reproducir en mayor medida las condiciones experimentales del *screening* y el desarrollo de resistencias a tiempos más largos.

1. Introducción

1.1. Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC)

El carcinoma escamoso o epidermoide de cabeza y cuello (CECC) es el sexto cáncer más frecuente en todo el mundo (Rajendra et al., 2020). Su incidencia es de 600.000 casos y su mortalidad se encuentra alrededor del 50% (Leemans et al., 2018).

Este tipo de neoplasia se origina principalmente en el epitelio estratificado de la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe (**Figura 1**). La gran variedad de estructuras anatómicas en las que puede desarrollarse, así como las diferentes etiologías y cambios moleculares hacen que el CECC sea una entidad muy heterogénea (Leemans et al., 2018).

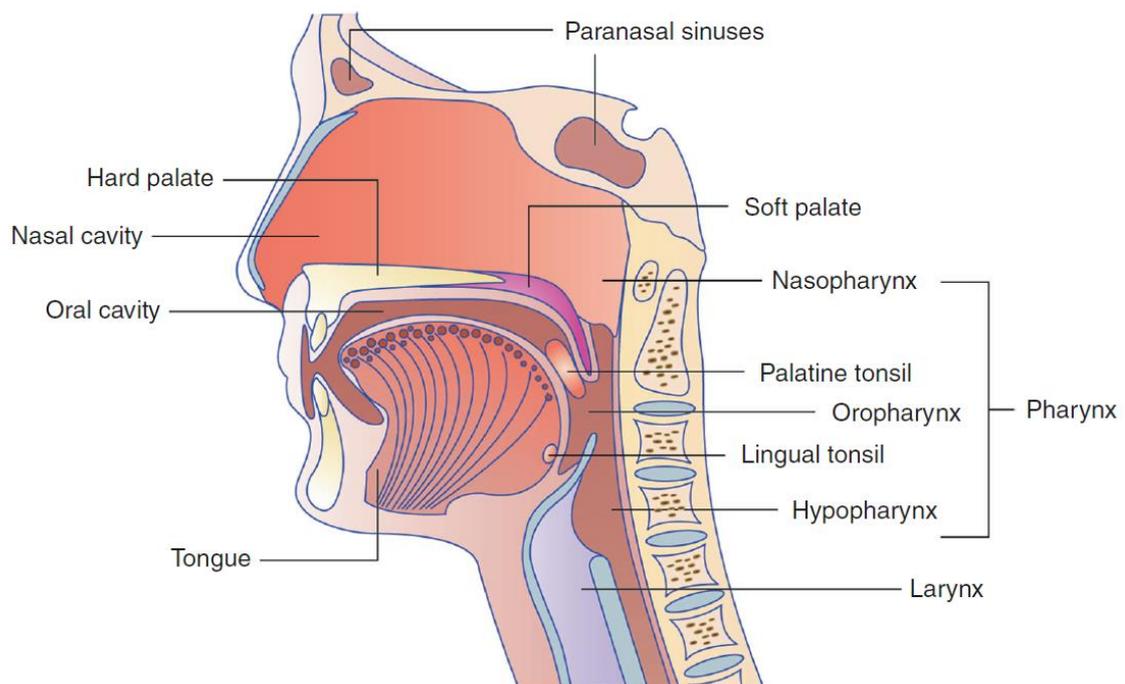


Figura 1. Localizaciones anatómicas de los CECC (Sabatini & Chiocca, 2020)

Su aparición está fuertemente asociada al consumo de tabaco y alcohol, predominantemente en personas de edad avanzada. Sin embargo, en las últimas décadas se ha visto un aumento de los casos en personas jóvenes asociado a la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH) en los carcinomas orofaríngeos. Mientras que los casos asociados a tabaco y alcohol están decreciendo a causa de una disminución en su consumo, los casos asociados a esta infección de transmisión sexual están en aumento.

Actualmente existen vacunas que previenen la infección por este virus, pero debido a un periodo de latencia relativamente largo (10-30 años), no se espera un descenso de la incidencia de CECC causados por el VPH hasta la década de los 60 del siglo XXI (Chow, 2020).

Es de gran importancia el clasificar los carcinomas orofaríngeos según la infección por VPH (positivos y negativos) puesto que diversos estudios determinan que difieren tanto en su presentación clínica como en su perfil molecular. Todo esto deriva en que aquellos CECC orofaríngeos que son VPH positivos presentan un mejor pronóstico y una mejor respuesta al tratamiento (Leemans et al., 2018).

El diagnóstico de los CECC se realiza a través de la historia clínica del paciente, un examen físico, técnicas de imagen y, generalmente, una biopsia del tejido afectado. Los tumores son entonces clasificados según el sistema TNM (Tumor-Nódulos-Metástasis), así como según su localización. En el caso de los tumores orofaríngeos, la nueva clasificación incluye el estado de infección por el VPH, basado en la detección por inmunohistoquímica del marcador p16, cuya positividad se relaciona con infección positiva (Leemans et al., 2018).

El sistema TNM clasifica los tumores en 4 estadios (I, II, III y IV). En el CECC los estadios I y II hacen referencia a tumores más pequeños sin afectación de los ganglios linfáticos, mientras que los estadios III y IV son aquellos en los que el tumor ha invadido los tejidos circundantes y también afectando a los ganglios. Tan solo el estadio IV está definido por la presencia de metástasis a distancia (Chow, 2020).

De entre todas las personas afectadas, el 40% son diagnosticados en estadios poco avanzados de la enfermedad (I y II), mientras que el 60% restante presentan estadios avanzados (III y IV) (Rajendra et al., 2020). El tratamiento de elección en los estadios tempranos es la cirugía o radioterapia (RT) curativas, buscándose siempre la preservación del órgano. En aquellos estadios más avanzados el tratamiento convencional es la combinación de cirugía y quimiorradioterapia (QRT) (Leemans et al., 2018). El CECC presenta fenómenos de recurrencia, tanto local como metastásica, así como segundos tumores primarios. En todos estos casos la enfermedad es más complicada de tratar de manera efectiva (Leemans et al., 2018) y se recurre a tratamientos paliativos basados en quimioterapia (QT) (Leemans et al., 2018). El principal quimioterápico utilizado para el tratamiento del CECC es el cisplatino, el cual se administra en combinación con RT, o

con otros quimioterápicos como 5-fluorouracilo, taxanos o cetuximab (Chow, 2020; Leemans et al., 2018; Rajendra et al., 2020).

La respuesta al tratamiento suele ser positiva en un primer momento, fundamentalmente debido a la incapacidad de las células tumorales de reparar los daños causados en el ADN. A pesar de esta buena respuesta inicial, muchos pacientes presentan resistencias intrínsecas, frecuentes en el cáncer de pulmón, colorrectal y próstata, o adquiridas tras la exposición al fármaco (**Figura 2**). Además, la enfermedad suele recurrir en aproximadamente el 50% de los pacientes, la mayoría de los casos presentándose de manera local, pero también con metástasis a distancia en un 10% de pacientes. Y en aproximadamente el 3% de los casos se da un segundo tumor primario (Galluzzi et al., 2012; Leemans et al., 2018). Todas estas situaciones se caracterizan por el desarrollo de resistencias al tratamiento por parte de las células tumorales (Rottenberg et al., 2021). Junto con su toxicidad ésta es la principal limitación de las terapias basadas en el platino como fármacos de referencia en numerosas neoplasias (Galluzzi et al., 2012).

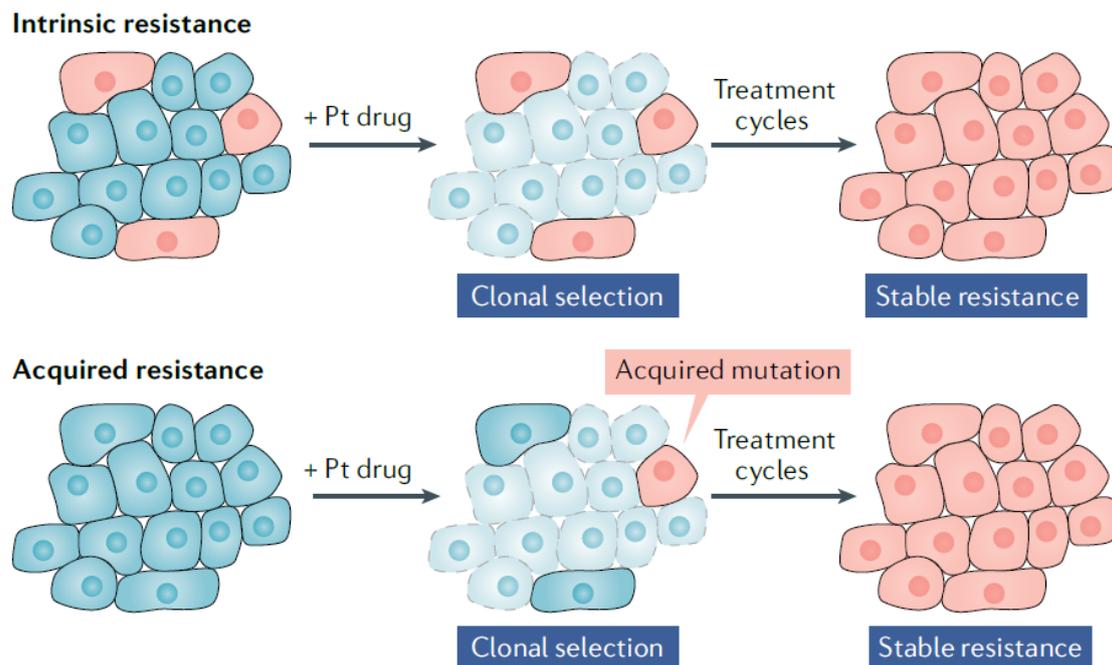


Figura 2. Tipos de resistencia al tratamiento con compuestos de platino en tumores (Rottenberg et al., 2021).

1.2. Cisplatino

Entre el 10 y el 20% de los pacientes de cáncer van a recibir quimioterapia basada en el platino en algún momento de su tratamiento (D. Huang et al., 2021). Este fármaco ha demostrado ser efectivo en tumores de todo tipo: carcinomas, sarcomas, linfomas o tumores de células germinales, y es uno de los principales fármacos en el tratamiento de los CECC (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

La primera QT basada en el platino fue el cisplatino (**Figura 3**), aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1978 para el tratamiento del cáncer testicular. A partir de aquí se han desarrollado otros derivados, como el carboplatino y el oxaliplatino, que buscan aumentar los efectos citotóxicos y reducir los efectos secundarios, como su nefrotoxicidad, neurotoxicidad u ototoxicidad (Galluzzi et al., 2012; D. Huang et al., 2021).

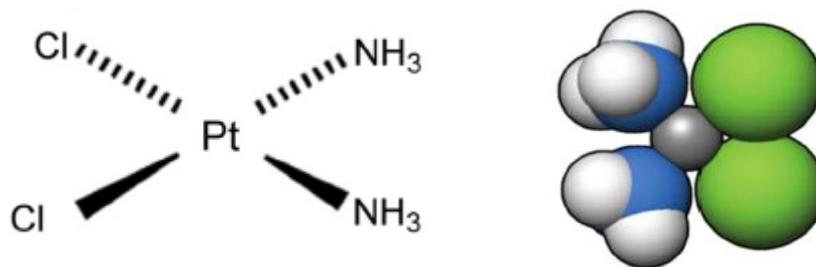


Figura 3. Estructura del cisplatino (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014)

Estos tres fármacos basados en platino son administrados de forma intravenosa diluidos en suero salino, siendo el cisplatino el más utilizado (Galluzzi et al., 2012).

El cisplatino es internalizado por transportadores de membrana, como CTR1, transportador del Cu (Galluzzi et al., 2012). Una vez en el interior de la célula, sus grupos Cl son sustituidos por moléculas de agua, en una reacción espontánea en el citoplasma celular que transforma el compuesto en su forma activa (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). Una vez activo, es capaz de interactuar con numerosos compuestos citoplasmáticos como el glutatión o las metalotioneínas, reduciendo la capacidad reductora del citoplasma y desbalanceando el equilibrio redox hacia una situación de estrés oxidativo (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014). También presenta gran capacidad de unirse al ADN, sobre todo a sus bases púricas, lo que genera alteraciones estructurales

de la doble hebra como puentes cruzados, o permite la unión de proteínas al ADN con el cisplatino como intermediario (**Figura 4**) (D. Huang et al., 2021). Cabe destacar que, aunque sólo el 1% del cisplatino se une al ADN, este daño es la principal causa molecular de su citotoxicidad. Este daño causa un gran estrés celular, activando la respuesta a lesiones en el ADN (DDR: *DNA Damage Response*) y desencadenando la apoptosis de las células tumorales (Galluzzi et al., 2012).

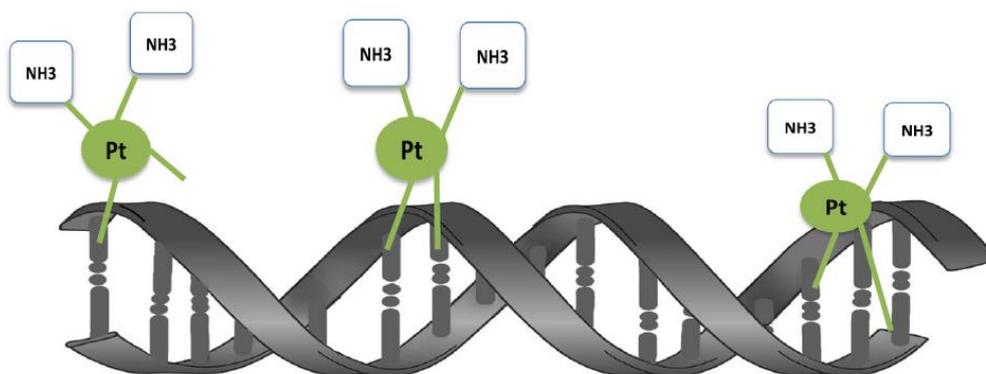


Figura 4. Principal mecanismo de citotoxicidad del cisplatino que muestra cómo se une al ADN formando aductos y puentes intra e intercatenarios. (D. Huang et al., 2021)

Los principales mecanismos de reparación del daño genotóxico inducido por el cisplatino son la recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*) y la vía de anemia de Fanconi, la reparación por escisión de nucleótidos o NER (*nucleotide excision repair*, y la síntesis translesión, que no es un método de reparación en sí mismo, sino un mecanismo de tolerancia a los errores en el ADN que permite a la célula replicar zonas dañadas, evitando así la muerte celular derivada del proceso de activación de la DDR (Galluzzi et al., 2012; Rottenberg et al., 2021). Así, por ejemplo, mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 necesarios para la recombinación homóloga inducen una mayor sensibilidad al cisplatino, y el cáncer testicular de células germinales, el cual presenta alteraciones en NER, muestra gran sensibilidad a las terapias basadas en el platino.

Los mecanismos por los cuales surgen resistencias al cisplatino son muy variados y afectan a multitud de vías, entre las que se encuentran: regulación de su entrada y salida de la célula, almacenamiento y detoxificación; aumento de la reparación del daño al ADN; modificación de los mecanismos de supervivencia; y cambios en el microambiente tumoral (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014; D. Huang et al., 2021) (**Figura 5**).

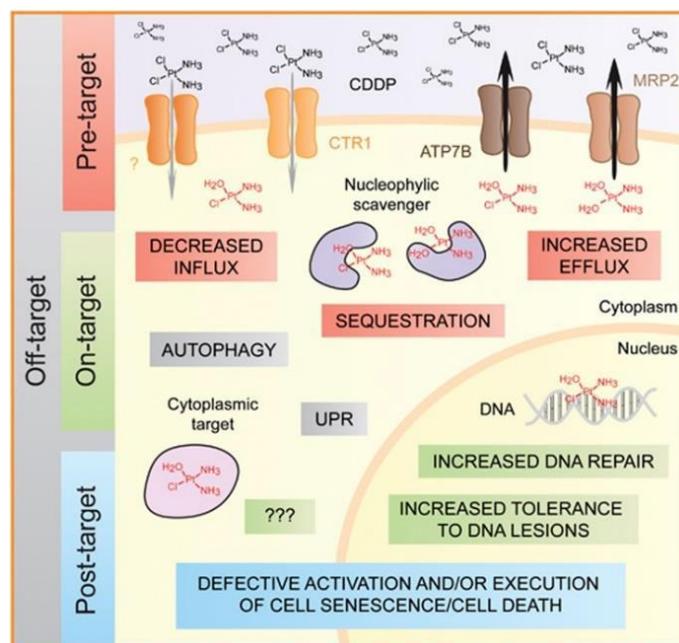


Figura 5. Principales mecanismos generadores de resistencia al cisplatino (Galluzzi et al., 2014).

1.3. CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 aparece de forma natural en los procariontas como sistema de defensa inmune. Su desarrollo como herramienta de edición génica supuso un gran avance en los estudios de funcionalidad de genes. Fue descubierta en 2012 y en la actualidad existen muchos mecanismos de edición basados en esta tecnología (Zhang, 2021a).

Las secuencias CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) son secuencias palindrómicas ampliamente presentes en organismos procariontas (Zhang, 2021b). Las proteínas Cas (*CRISPR associated enzyme*) son endonucleasas capaces de reconocer secuencias del ADN y generar roturas de doble cadena (Schuster et al., 2019). Existen varios tipos y familias de estas enzimas con diferentes motivos de unión o afinidades (Zhan et al., 2019).

A partir de la secuencia CRISPR se genera un ARN guía (ARNg), combinación del ARN dirigido a CRISPR (ARNcr) y el ARN transactivador (ARNtracr) que es capaz de guiar proteínas Cas (Cas9 principalmente), además de producir cambios conformacionales en estas, hacia secuencias específicas de 20 nucleótidos. Estas secuencias vienen marcadas por 2 nucleótidos (NGG o NAG) denominados secuencias PAM (*protospacer adjacent motif*). Cuando se reconocen estas secuencias se producen cortes de doble cadena (DSB: *Double Strand Breaks*) (Makarova et al., 2020; Zhan et al., 2019).

Estas roturas se pueden reparar por unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end-joining*) de manera que se generan pequeñas inserciones o deleciones que pueden producir errores en la pauta de lectura del gen, e inducir la pérdida de su función. Pero también pueden repararse por recombinación homóloga (HDR, *homologous directed repair*), mecanismo que puede utilizarse para recuperar la función génica, y que en ingeniería genética puede aprovecharse para introducir mutaciones concretas (**Figura 6**) (Zhan et al., 2019).

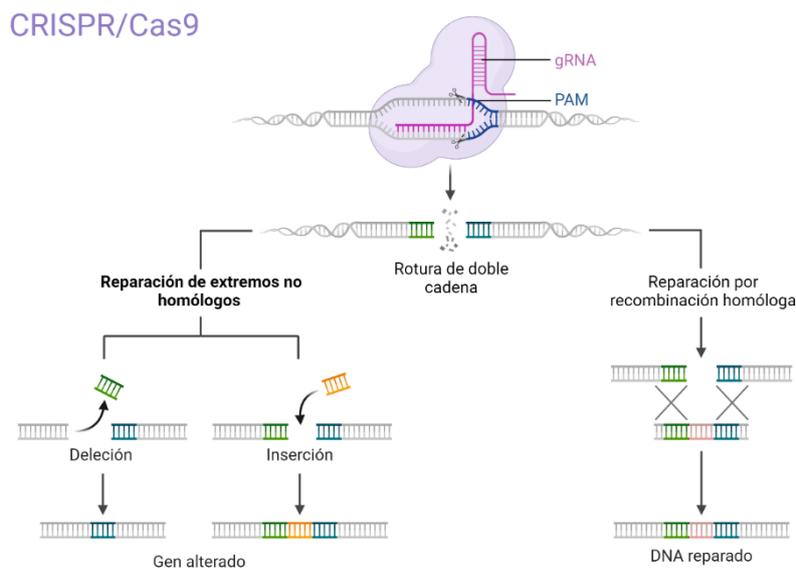


Figura 6. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9. Imagen generada con Biorender.

Actualmente la utilización de *screenings* genéticos basados en esta tecnología está teniendo un papel importante en la identificación de genes con funciones en numerosos procesos, entre los que se encuentra el proceso de carcinogénesis. La utilización de un ARNg asociado a la proteína Cas9 permite modificar de manera específica genes, bien causando su delección o *knockout* (CRISPRko), su activación (CRISPRa) o inactivación (CRISPRi) transcripcional a nivel del promotor, o introduciendo mutaciones mediante modificación de bases (CRISPR *base editing*). Estos *screens* se basan en la modificación de genes o elementos reguladores en grandes grupos bajo unas condiciones en las que solo se produce una afectación por cada célula. Este cultivo celular es entonces sometido a condiciones adversas o selectivas, llevando a la depleción de unos ARNg y enriquecimiento de otros. Esto nos lleva a establecer relaciones entre los genes diana de dichos ARNg y la situación de presión selectiva a la que se han sometido las células. Los

datos se obtienen comparando la abundancia relativa de aquellos ARNg que se han perdido o han permanecido tras la presión selectiva aplicada. Así se obtienen una serie de “hits” o genes candidatos que se asociarán a un fenotipo o respuesta celular concreta (Schuster et al., 2019) (Figura 7).

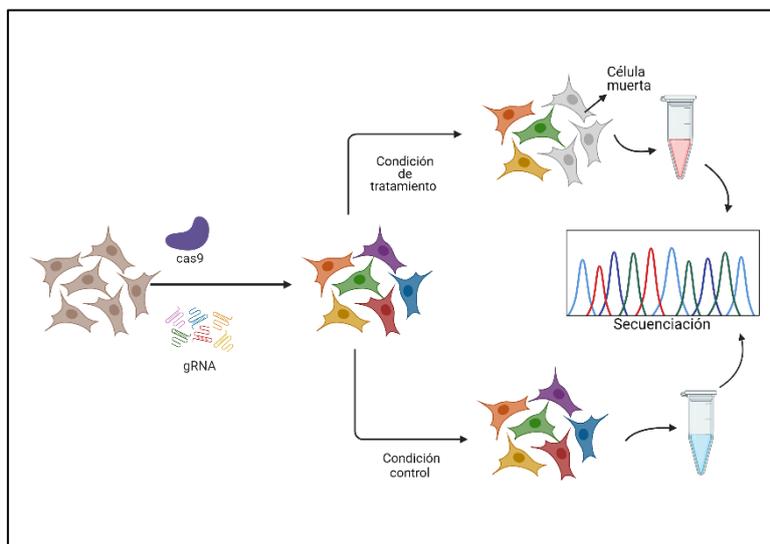


Figura 7. Esquema básico del proceso de un *screening* genético de CRISPR. Imagen generada con Biorender.

1.4. Antecedentes

Previamente a mi incorporación al grupo, se realizó en el laboratorio un *screening* de genoma completo CRISPRko con el fin de identificar posibles genes de resistencia y sensibilidad al tratamiento con quimioterapia de cisplatino en líneas celulares de CECC. Para ello se utilizó una librería lentiviral agrupada de tercera generación (<https://www.addgene.org/pooled-library/yusa-crispr-knockout-human-v1/>), que consiste en 90.709 ARNg dirigidos a un total de 18.010 genes (librería YUSA). Como líneas para llevar a cabo el proceso experimental se eligió la línea LSC-1, generada en el laboratorio y representativa de líneas resistentes al cisplatino en el CECC; y la línea FaDu (Rangan, 1972) como representativa de una línea sensible a este tipo de tratamiento, ambas modificadas genéticamente para expresar de manera constitutiva Cas9. Posteriormente fueron infectadas a baja multiplicidad de infección (para asegurar la incorporación de un único ARNg por célula) con la librería CRISPRko de genoma completo, seleccionadas

con puromicina y tratadas con diferentes dosis de cisplatino: 0 μ M; 0,25 μ M y 1 μ M (Figura 8).

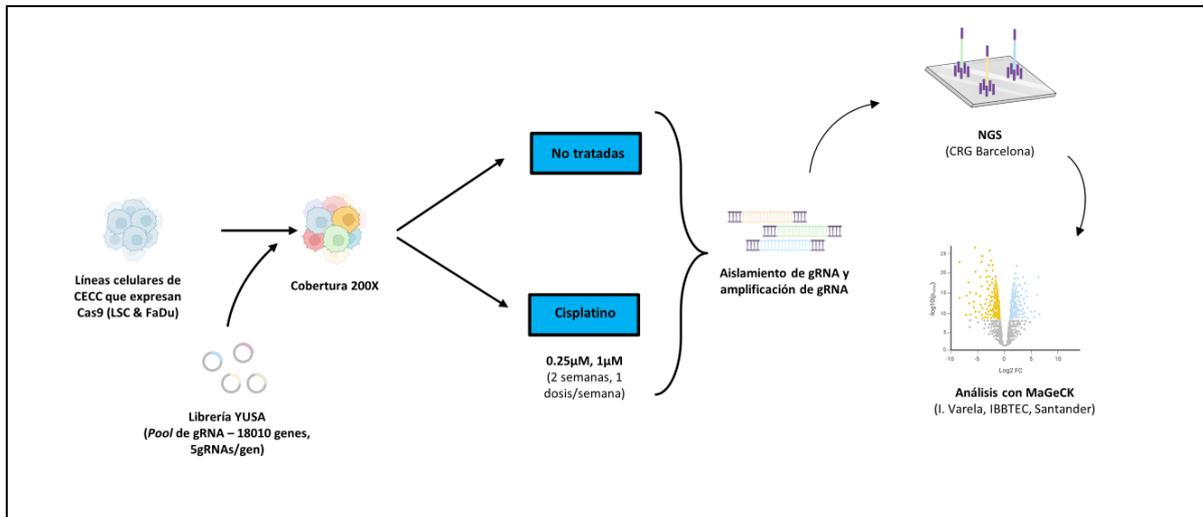


Figura 8. Esquema del *screening* de CRISPR/Cas9 realizado en el laboratorio. Imagen generada con Biorender.

Los ARNg presentes en las células supervivientes al tratamiento fueron amplificados mediante PCR y las librerías obtenidas se secuenciaron en la plataforma Illumina (Figura 9). El análisis de los datos de secuenciación con el programa MaGeCK (W. Li et al., 2014), mediante el cual se estimó la abundancia relativa de cada ARNg en las células tratadas en comparación con las células control, permitió la identificación de posibles genes candidatos de resistencia al cisplatino comunes a ambas líneas celulares (Figura 10).

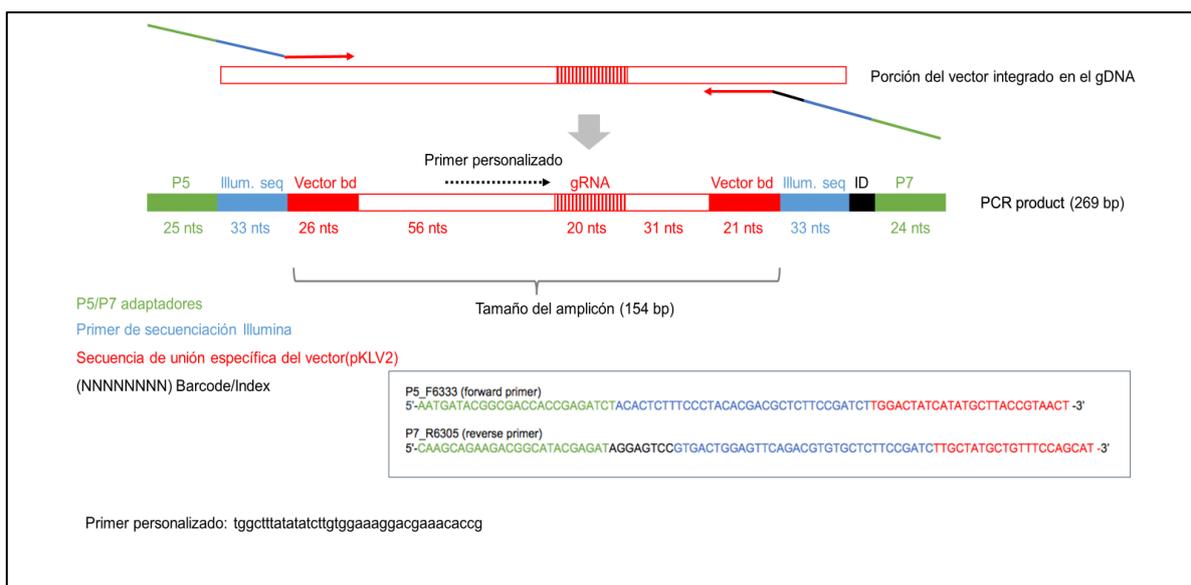


Figura 9: Diseño de la amplificación por PCR de la región del ARNg.

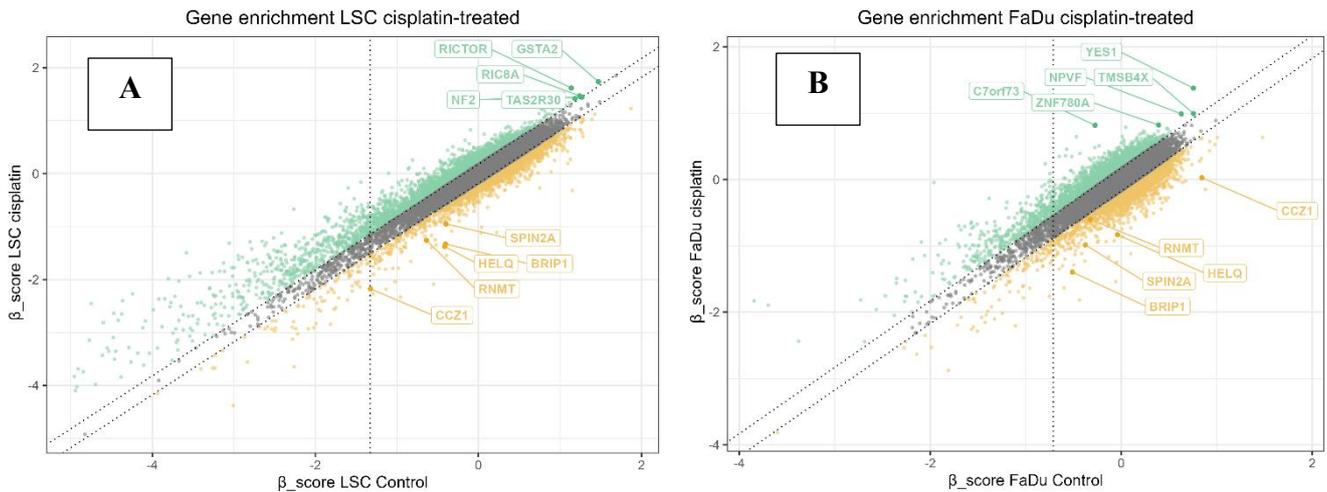


Figura 10. Gráfica de dispersión que muestra los valores del β -score (representación de cada ARNg con respecto a la librería original) de células tratadas con cisplatino frente a aquellas no tratadas en las líneas LSC-1 (A) y FaDu (B) tras un análisis con el algoritmo MLE del programa MaGeCK. Las líneas diagonales hacen referencia a $\pm 1SD$ de las diferencias entre el β -score del tratamiento frente al β -score del control. Los puntos verdes indican aquellos genes cuyo β -score aumenta tras el tratamiento del cisplatino (genes de sensibilidad), mientras que los puntos naranjas se corresponden con aquellos genes cuyo β -score baja tras el tratamiento (genes de resistencia).

También se utilizó la herramienta DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) (D. W. Huang et al., 2009; Sherman et al., 2022) para llevar a cabo un análisis de aquellas rutas en las que estaban implicados los genes de resistencia identificados (**Figura 11**). En ambas líneas celulares los genes identificados se enriquecían en rutas de reparación del daño al ADN y, específicamente, en vías de reparación del tipo de daño inducido por los compuestos de platino, tales la reparación por escisión de nucleótidos o la vía de recombinación homóloga de Anemia de Fanconi.

FADU	LSC
<ul style="list-style-type: none"> • Daño ADN/ Reparación ADN (7.19) • Reparación de puentes cruzados de ADN (4.99) • Anemia de Fanconi (4.99) • Ubiquitinación (3.08) • Ciclo y división celular (2.6) • Unión a ARN (2.16) 	<ul style="list-style-type: none"> • Daño ADN/ Reparación ADN (10.74) • Reparación de puentes cruzados de ADN (3.28) • Anemia de Fanconi(3.28) • Reparación por escisión de nucleótidos (2.52) • Replicación de ADN (2.52) • Ubiquitinación (1.92)

Figura 11. Principales rutas en las que están implicados los genes de resistencia identificados mediante el *screening* de CRISPR/Cas9 en ambas líneas celulares. Resaltadas en negrita vías de reparación específicas asociadas al daño inducido por el cisplatino. Se indica entre paréntesis el factor o score de enriquecimiento obtenido.

Los datos obtenidos aportaban unas listas de genes demasiado amplias para poder trabajar con todos ellos, por lo que se establecieron los siguientes criterios para seleccionar un número limitado de genes candidatos:

- Genes comunes a ambas líneas (FaDu y LSC-1)
- No identificados con anterioridad como genes de resistencia a cisplatino en CECC
- Múltiples ARNg diferencialmente deplecionados en las células tratadas
- Idealmente dianas farmacológicas

Siguiendo los anteriores criterios, de todos los genes cuyos ARNg se deplecionaban específicamente en la condición de tratamiento, se seleccionaron 10 genes candidatos a validar como posibles genes de resistencia al tratamiento con cisplatino (**Tabla 1**).

Gen	Función	Relación con cáncer/cisplatino
HELQ	Helicasa de DNA y reparación de roturas de doble cadena.	Resistencia al cisplatino en ovario (Long et al., 2018) y sarcomas(Takata et al., 2013).
BRIP1	Recombinación homóloga. Anemia de Fanconi.	Resistencia al cisplatino en ovario (Ciccione et al., 2020) y osteosarcoma (Calvo et al., 2021)
SPIN2A	Lector del código de histonas	No hay evidencias
RNMT	RNA-guanina-7-metil transferasa	Cáncer de mama (Dunn et al., 2019).
TRAIP	Interacción con TRAF. E3 ubiquitin ligasa	Ampliamente descrito en cáncer, pero sin relación con resistencias(Almeida et al., 2011; Z. Guo et al., 2020).
POLE4	Subunidad de la polimerasa ϵ	No hay evidencias
CCZ1	Mitofagia y transporte vesicular	No hay evidencias
TMEM133	Activación de GTPasa <i>Rho</i>	No hay evidencias
CKAP2	Estabilización de microtúbulos	Protumorigénico en cáncer de cérvix (L. Guo et al., 2023)
ZNF69	Regulación de la transcripción	No hay evidencias

Tabla 1. Información de los genes candidatos seleccionados. Se muestra la función de cada uno de los genes seleccionados, así como algunos de los principales artículos que los relacionan con cáncer.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la validación de los genes candidatos seleccionados de resistencia a cisplatino identificados en el *screening* genético de genoma completo CRISPRko llevado a cabo en líneas celulares de CECC.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Búsqueda en las bases de datos de la TCGA y Depmap de información asociada a CECC para cada uno de los genes.
- Generación de vectores lentivirales portadores de ARNg específicos para cada candidato.
- Generación de líneas *knock-out* (KO) para cada uno de los genes identificados.
- Análisis del efecto del tratamiento con cisplatino en cada una de las líneas generadas.

La hipótesis inicial es que el noqueo de los genes identificados como posibles determinantes de resistencia al tratamiento con cisplatino en líneas celulares de CECC (cuyos ARNg se pierden específicamente en las células tratadas) debería aumentar la sensibilidad a dicho tratamiento.

3. Material y métodos

3.1. Clonaje de ARNg en un vector lentiviral

En primer lugar, se seleccionaron las secuencias de dos de los cinco ARNg de la librería utilizada para el *screening*; los dos más representados y que mostraban una mayor variación tras el tratamiento con cisplatino. Y se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes con los adaptadores necesarios para su clonaje en el vector original vacío de la librería, los cuales se compraron a un proveedor comercial (Metabion). Estos deben diseñarse en base a la secuencia presente en la librería y el enzima de restricción utilizado para digerir el vector, en nuestro caso *BbsI*. (**Figura 12**). Los oligonucleótidos utilizados para este trabajo se muestran en la **tabla 2**.

Para realizar la ligación de los ARNg en el plásmido pKLV2 se mezclaron 1µl de la dilución 1:100 de oligos anillados, 100ng de plásmido digerido, 2µl de buffer de ligación (New England BioLabs), 1,5µl de ligasa T4 (New England BioLabs) y H₂O hasta 20µl y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente.

Se transformaron bacterias competentes, en concreto One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* de ThermoFisher Scientific, siguiendo el protocolo de la casa comercial, se plaquearon en LB agar con ampicilina a 100µg/mL y, finalmente, se incubaron a 37°C O/N.

Al día siguiente se inoculó una colonia en 5mL de LB líquido con ampicilina a 100µg/mL, y se incubó a 37°C en un incubador con agitación O/N.

Se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) de Macherey-Nagel siguiendo el protocolo marcado por la casa comercial. La concentración de ADN extraída se cuantificó con Nanodrop, método basado en espectrofotometría.

Finalmente se secuenciaron los plásmidos por el método Sanger para comprobar la correcta inserción de los ARNg en el servicio de secuenciación de la Universidad de Oviedo.

3.2. Cultivo de líneas celulares

Se utilizaron dos líneas celulares: FaDu, una línea de carcinoma epidermoide de faringe (Rangan, 1972); y HEK293T, una línea embrionaria humana de riñón transformada con el antígeno T del virus SV-40 (Tan et al., 2021).

La línea FaDu se utilizó para la generación de líneas celulares KO para cada uno de los genes identificados como posibles dianas de resistencia, mientras que la línea HEK293T se empleó para la generación de partículas virales.

La línea FaDu había sido infectada con un vector lentiviral que contenía la secuencia codificante para la nucleasa Cas9 y un gen de selección frente al antibiótico blasticidina (lentiCas9-blast, plásmido #52962, Addgene).

Ambas se cultivaron en placas de cultivo de 100mm de diámetro (P100) con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, cat #11574486), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific,

cat #11570506), 20 mM de tampón HEPES 1M (Biowest, cat #L0180 - 100), 100 mM de MEM aminoácidos no esenciales (Biowest, cat #X0557 - 100) y con un 1% de penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, cat #11548876).

Las líneas se mantuvieron en incubadores a temperatura constante de 37°C, en ambiente húmedo y con concentraciones de O₂ y CO₂ del 20% y el 5% respectivamente.

3.3. Producción de lentivirus en HEK293T

La generación de virus implica la transfección del material genético necesario para la formación de la partícula viral en la línea celular HEK293T.

El primer paso consiste, un primer día, en plaquear las células para que su confluencia sea de un 50-60%. Al día siguiente, se debe llevar a cabo la transfección con Lipofectamine™ 2000 de *ThermoFisher Scientific* del vector y los plásmidos de empaquetamiento, que codifican para las proteínas necesarias para formar la particular viral.

Utilizamos una ratio ADN: Lipofectamine™ 2000 de 1: 2,5. Por un lado se diluyen 25µL de lipofectamina en 500uL de medio reducido sin suero Opti-MEM™ I. Por otro lado, se mezclan otros 500uL de medio reducido sin suero Opti-MEM™ I con 10 µg de ADN en las siguientes proporciones:

- 4 µg Lentiviral vector (pKLV2)
- 3 µg pMDLg/pRRE (gag/pol): plasmid 12251 (Addgene)
- 1.5 µg pRSV-Rev (Rev): plasmid 12253 (Addgene)
- 1.5 µg pMD2.g (VSVg): plasmid 12259 (Addgene)

Posteriormente el contenido de ambos tubos se mezclará y se incubará a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.

Durante este tiempo se sustituye el medio completo de las HEK 293T por uno que carezca de antibióticos. Finalmente, la mezcla de transfección se pipetea por toda la placa de cultivo. El medio de las células es retirado unas 4-6h después y sustituido por DMEM completo, ahora sí, con antibióticos.

A las 48 y 72 h es momento de recoger los virus producidos y secretados al sobrenadante. Para ello retiramos el medio y lo filtramos con una jeringuilla a través de un filtro de 0,45 µm. Posteriormente hacemos alícuotas de 2mL y lo congelamos a -80°C. Añadimos medio fresco completo y 24h más tarde volvemos a recoger los virus producidos.

3.4. Infección de líneas celulares con lentivirus

Para la generación de líneas KO se infectaron las células FaDu-Cas9 con los vectores virales mediante la adición al cultivo celular de 2mL de sobrenadante viral en presencia de polibreno (Sigma) a una concentración de 4µg/mL para facilitar la transducción.

A las 5 horas este medio de infección se retira y se añade de nuevo medio completo de crecimiento. A partir de este momento se comienza la selección de aquellas células que han sido infectadas de manera efectiva por el plásmido. Para ello se añade puromicina (Sigma) a una concentración de 2µg/mL, y esto se mantiene durante 5 días, refrescando el medio siempre que sea necesario, para garantizar una buena selección. Es el plásmido pKLV2 el que aporta esta resistencia al antibiótico, lo cual nos permite asegurar que sólo sobrevivan las células en las que se ha integrado el genoma lentiviral.

3.5. Extracción de proteínas y Western-Blot

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir del pellet recogido de líneas celulares, el cual fue resuspendido en buffer *Laemmli* 1X (60mM Tris-Cl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol), posteriormente se desnaturalizaron las muestras a 95°C durante 10 minutos.

La cuantificación de la proteína total presente en el extracto se llevó a cabo mediante el Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Las muestras serán entonces separadas mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Protran, Thermo Fisher Scientific). Se cargaron 30 µg de proteína en diferentes geles en función del gen que se pretendía analizar. Para los genes SPIN2A y BRIP1 se utilizó un gel de poliacrilamida al 10%, para el gen CCZ1 un gel de poliacrilamida al 8%, y finalmente, para el gen RNMT se utilizó un gel de gradiente del 4% al 12% (Thermo Fisher Scientific).

Para la detección de las proteínas específicas en la membrana se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anti SPIN2A: *Novogene* (ref: NBP2-83592), dilución 1:500
- Anti RNMT: *Santa Cruz* (ref: sc-517112), dilución 1:500
- Anti BRIP1: *Santa Cruz* (ref: sc-365708), dilución 1:250
- Anti CCZ1: *Santa Cruz* (ref: sc-514290), dilución 1:500
- Anti Cas9: *Sigma* (ref: SAB4200701), dilución 1:10000
- Anti GAPDH: *Sigma* (ref: G8795), dilución 1:10.000

Como anticuerpos secundarios se utilizaron:

- Anti-mouse tagged with peroxidase (1:10.000). *DAKO* (Ref: PO447), *Agilent*. Para CCZ1, BRIP1 y RNMT
- Anti-rabbit tagged with peroxidase (1:10.000). *DAKO* (Ref: PO448), *Agilent*. Para SPIN2A
- IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody (1:10.000). *LI-COR* (Ref: P/N 926-68070). Para la detección de Cas9 y GAPDH

La detección de señal de cada uno de los anticuerpos secundarios fue realizada utilizando el sistema de análisis de imagen Odyssey® Fc (*LI-COR*), mediante detección directa de fluorescencia para β -actina y Cas9, o quimioluminiscencia mediante ECL (ECL plus, *Perkin Elmer*) para los genes de interés.

3.6. Ensayos de viabilidad y determinación de IC50

Se sembraron las células FaDu, 8000 células por pocillo, en una placa de cultivo de 96 pocillos. Cuando la confluencia alcanza el 50-60% se les añadieron diluciones seriadas (factor 5) de cisplatino hasta obtener 6 concentraciones: 0 μ M, 0,032 μ M, 0,16 μ M, 0,8 μ M, 4 μ M y 20 μ M. Cada concentración se ensayó en triplicado.

El tratamiento se mantuvo durante 24 horas. A las 72 horas del tratamiento se llevó a cabo un ensayo colorimétrico de detección de actividad metabólica CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (*Promega*) para evaluar la viabilidad celular, siguiendo el protocolo aportado por la casa comercial.

La absorbancia se midió hasta un máximo de 4 horas utilizando el lector de placas multimodal Synergy HTX (BioTek).

Los datos obtenidos se analizaron con el programa informático GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc.). Para el análisis de los ensayos viabilidad celular y proliferación se transformaron los valores usando las ecuaciones $X=\text{Log}(X)$; $Y=Y/K$ y normalizando los datos frente al control. La IC50 se determinó mediante regresión no lineal ajustando los datos a una curva dosis-respuesta-inhibición de 3 parámetros, eligiendo $\log(\text{inhibidor})$ vs. respuesta normalizada. Esta nos da unas curvas dosis-respuesta que nos muestran el efecto del tratamiento en cada una de las líneas. Se eligieron las medidas de absorbancia tras 2 horas por su mejor ajuste a la curva ($R^2 = 0,95$).

Para el análisis estadístico se realizó el test *one-way* ANOVA, considerando datos no apareados. Se consideraron diferencias significativas aquellas cuyo p-valor era menor de 0,05.

4. Resultados y discusión

4.1. Búsqueda de datos en CECC en TCGA y Depmap

El primer paso que se llevó a cabo fue un análisis *in silico* de la lista de los 10 genes seleccionados. Con esto se esperaba obtener datos que nos ayudaran a priorizar algunos de estos candidatos para comenzar con los ensayos experimentales. Para ello se realizó una búsqueda de los diferentes genes en la base de datos de la TCGA (*The Cancer Genome Atlas Program*) a través de la página UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/>) (Chandrashekar et al., 2017, 2022), en la cual se analizaron los datos de niveles de expresión y curvas de supervivencia asociadas a estos genes específicamente en los CECC (**Tabla 3**).

Por medio de esta primera aproximación se pudo determinar que todos los genes de nuestra lista, excepto el ZNF69, se encuentran sobreexpresados a nivel de ARN en los CECC.

Gen	Nombre alternativo	Expresión	Supervivencia	Respuesta a cisplatino
HELQ	Hel308	Sobreexpresado	Diferencias no significativas	No hay correlación
BRIP1	FANCI	Sobreexpresado	Asociado a buen pronóstico	No hay correlación
SPIN2A	DXF34	Sobreexpresado	Diferencias no significativas	No hay correlación
RNMT	RG7MT1	Sobreexpresado	Diferencias no significativas	No hay correlación
TRAIP	RNF206	Sobreexpresado	Asociado a buen pronóstico	No hay correlación
POLE4		Sobreexpresado	Diferencias no significativas	No hay correlación
CCZ1	C7orf28A	Sobreexpresado	Diferencias no significativas	No hay correlación
TMEM133	ARHGAP42	Sobreexpresado	Diferencias no significativas	No hay correlación
CKAP2	TMAP	Sobreexpresado	Diferencias no significativas	No hay correlación
ZNF69		Sin diferencias	Diferencias no significativas	No hay correlación

Tabla 3. Datos obtenidos tras el análisis *in silico*. En la tabla se muestran el gen con su nombre común y alternativo, así como la alteración y la relación de su expresión con la supervivencia en CECC según los datos de la TCGA, y la relación con la sensibilidad a cisplatino en líneas de CECC según los datos del portal DepMAP.

A pesar de que sus niveles de expresión suelen encontrarse elevados en los tumores frente a tejido sano (**Figura 15**), muy pocos afectan, según datos de la TCGA, a la supervivencia media de los pacientes. Tan solo dos de ellos, a saber, BRIP1 y TRAIP, afectan de manera significativa a este parámetro. En ambos casos su sobreexpresión se relaciona con una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes y podrían ser indicadores de buen pronóstico (**Figura 16**).

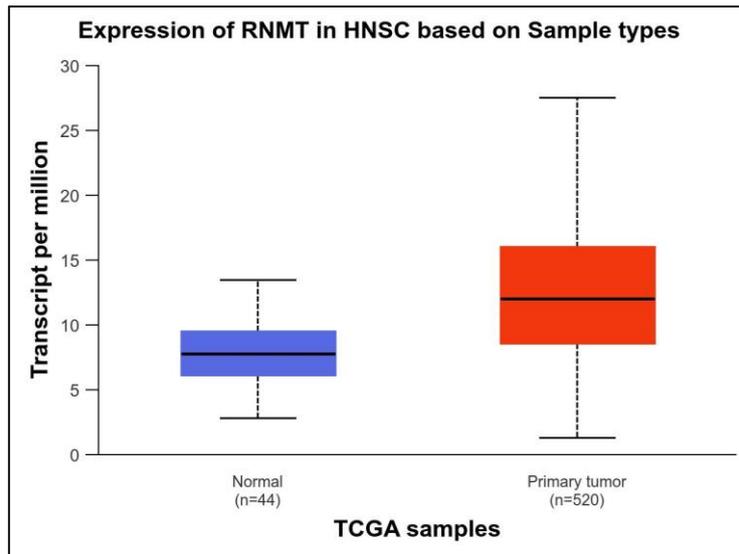


Figura 15. Sobreexpresión de RNMT en CECC. Se muestra un ejemplo de niveles de expresión elevados del gen RNMT en tejidos tumorales de CECC con respecto a tejido sano. Esta sobreexpresión se manifiesta en la mayoría de los genes seleccionados. Fuente: <https://ualcan.path.uab.edu/>

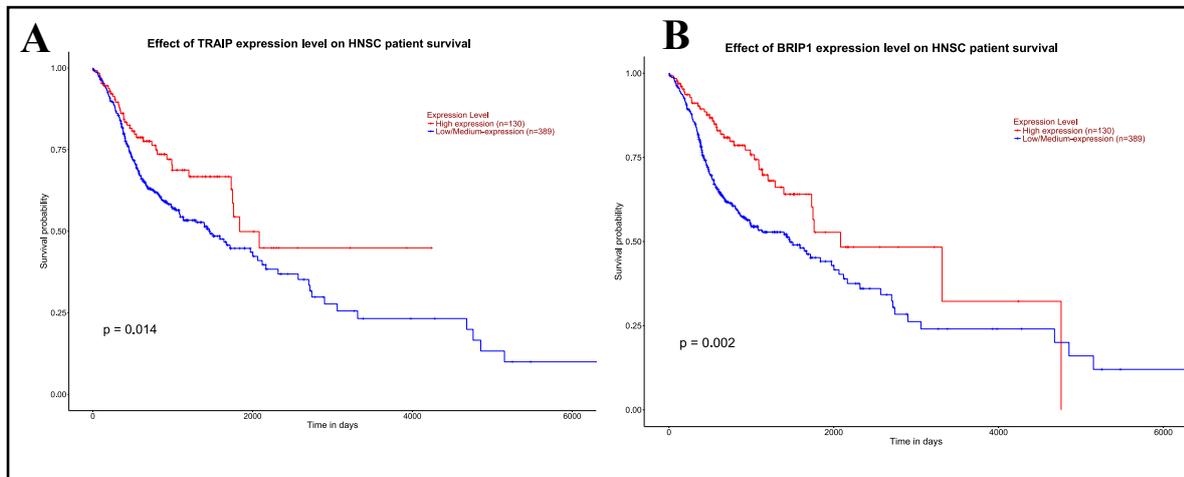


Figura 16. Curvas Kaplan-Meier. En estas dos curvas de supervivencia se muestra como los niveles altos de expresión de TRAI P (A) y BRIP1 (B) se correlacionan con mejoras en la supervivencia de los pacientes con CECC. Fuente: <https://ualcan.path.uab.edu/>

Finalmente se buscó en las bases de datos del portal depmap (<https://depmap.org/port>) (Tsherniak A. et al., 2017) si se había identificado alguna relación de estos genes con el tratamiento clásico de QT en CECC, es decir, el cisplatino; y una respuesta diferencial a este en líneas celulares de CECC. Sin embargo, no se observó relación ninguna entre la

expresión de los genes seleccionados y la respuesta a cisplatino en las líneas de CECC analizadas en Depmap (Tabla 3).

4.2. Generación de plásmidos portadores de ARNg

Para iniciar el proceso de validación de los candidatos, se seleccionaron dos de los cinco ARNg de la librería utilizada para el *screening*; los dos más representados y que mostraban una mayor variación tras el tratamiento con cisplatino. Los oligonucleótidos correspondientes a dichos ARNg se insertaron en el plásmido pKLV2-U6gRNA5(BbsI)-PGKpuro2ABFP-W, el mismo vector de la librería. Todos los clonajes se verificaron mediante secuenciación Sanger llevada a cabo por el servicio de secuenciación de los servicios científico-técnicos de la Universidad de Oviedo.

A través de los datos obtenidos por la secuenciación se compararon los distintos cromatogramas generados con la secuencia del oligonucleótido correspondiente diseñado en base a la librería YUSA y el vector de clonaje, para lo cual se utilizó el programa SnapGeneViewer (Figura 17).

Se pudo comprobar que todas las muestras mandadas a secuenciar se correspondían con las secuencias aportadas por la librería original, de manera que se podía continuar con el proceso de validación de los genes como posibles generadores de resistencia a la quimioterapia con cisplatino.

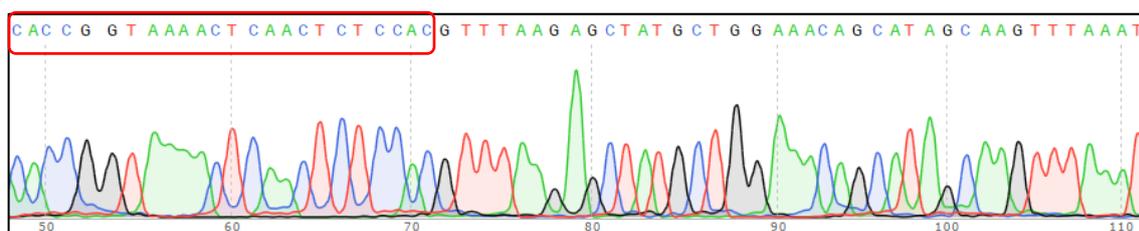


Figura 17. Cromatograma de un ARNg frente a BRIP1-sg2. En rojo queda remarcada la secuencia del oligo que contiene el ARNg obtenida por el proceso de secuenciación, lo cual confirma que el proceso de clonación ha sido el correcto.

4.3. Generación de líneas KO para los genes seleccionados

Como se indica anteriormente se seleccionaron 2 ARNg para cada gen, con la finalidad de validar los resultados en varios ARNg para ser considerados como fiables.

Tras comprobar que los plásmidos clonados se correspondían con las parejas de ARNg seleccionadas para cada gen, se llevó a cabo la generación de partículas lentivirales para cada uno de ellos. Para ello se transfectaron cultivos celulares de la línea HEK293T con el plásmido pKLV2 para cada guía y con los plásmidos de empaquetamiento virales. Posteriormente, la línea celular FaDu que ya expresaba la nucleasa Cas9 se infectó con los lentivirus generados y se seleccionaron las células infectadas con puromicina.

En el momento que la línea celular tiene un ARNg en su genoma y expresa Cas9 es de esperar que se produzca el proceso de modificación genética y ocurra la depleción de la proteína en cuestión. Para comprobar que esto ha sido así se extrajo proteína de los cultivos infectados y seleccionados y se comprobó la presencia de las proteínas correspondientes mediante Western-blot (WB). Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH (Gliceraldehido-3 fosfato-deshidrogenasa). También se comprobaron los niveles de expresión de la nucleasa Cas9 (**Figura 18**).

Cultivos celulares de FaDu fueron infectados con todos los lentivirus portadores del plásmido con cada ARNg, pero solo se verificó mediante WB el KO para aquellos genes de los cuales se disponía de anticuerpo específico.

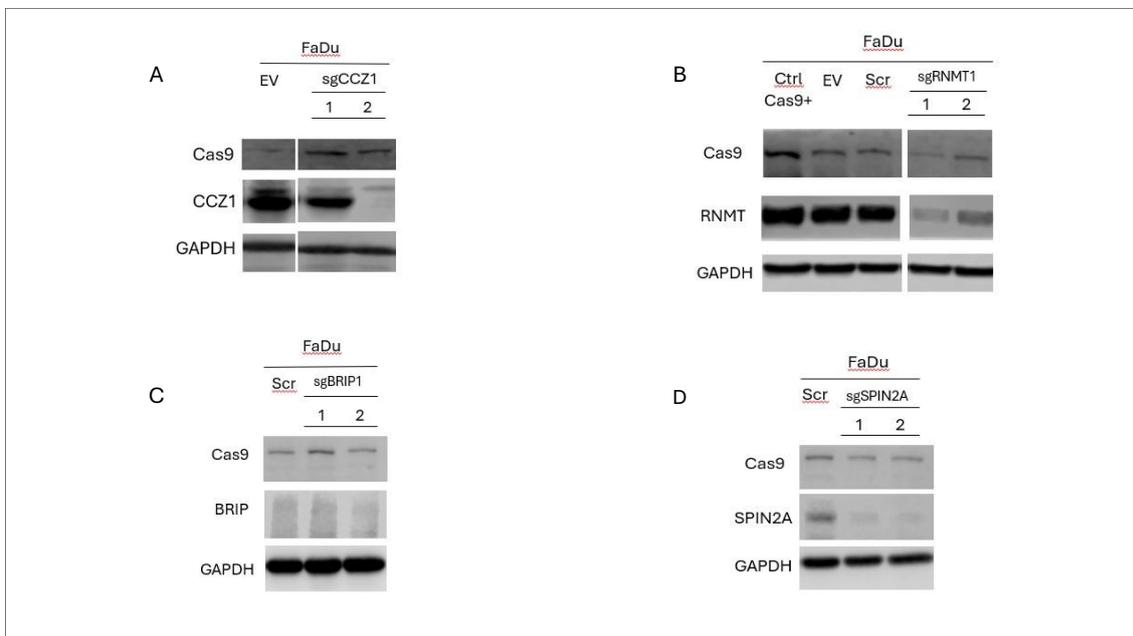


Figura 18: WB de cada una de las proteínas analizadas. En la presente figura se muestran los diferentes WB realizados para comprobar el KO de cada uno de los ARNg probados, dos para cada gen. **A)** WB de la línea FaDu_{CCZ1} (sg1 y sg2) y EV (control). **B)** WB de la línea FaDu_{RNMT1} (sg1 y sg2); EV y Scramble (controles) y Ctrl Cas9 + (muestra control positiva para Cas9). **C)** WB de la línea FaDu_{BRIP1} (sg 1 y sg 2) y Scramble (control). **D)** WB de la línea FaDu_{SPIN2A} (sg 1 y sg 2) y Scramble (control). Se muestran los niveles de la proteína Cas9, y de GAPDH como control de carga en cada uno de los geles.

En la **figura 18A** se muestra el WB realizado para el gen CCZ1. Se utilizó como línea control la FaDu_Cas9_EV, una línea que lleva incorporado el plásmido pKLV2 sin ningún guía insertado en su secuencia. En aquellas líneas modificadas genéticamente para la delección de este gen, se pudo comprobar que el sg1 no produce gran efecto en los niveles de la proteína con respecto al control, aunque sí parece apreciarse una ligera disminución; mientras que el sg2 produce un descenso claro en dichos niveles.

En la **figura 18B** se muestra el WB realizado para la proteína RNMT. Se utilizaron en este caso 3 controles diferentes: a) “Ctrl Cas9 +”, cuya finalidad es la de comparar cuanto expresan nuestras líneas la nucleasa Cas9 en comparación con una línea que sabemos que la expresa en altos niveles, b) FaDu_Cas9_EV, portadora del vector pKLV2 vacío y mencionada anteriormente, y c) FaDu_Cas9_Scramble, células infectadas con el vector pKLV2 conteniendo un guía que no se dirige a ninguna región del genoma. Al comprobar que no había diferencias entre estos dos últimos, a partir de este momento se decidió continuar con el control Scramble por presentar una mayor similitud con las condiciones a analizar. Cabe destacar que su comportamiento es también similar en cuanto a la sensibilidad o resistencia al cisplatino, como veremos en próximos apartados, lo que validaba su elección como control para el resto de ensayos. En cuanto a la proteína RNMT se puede ver con claridad como ambos ARNg han causado un descenso de los niveles proteicos con respecto al control, siendo este descenso más pronunciado con el sg1 que con el sg2.

En la **figura 18C** se trató de comprobar si se habían conseguido generar líneas KO para la proteína BRIP1, pero como se puede observar en la figura no fue posible debido a que el anticuerpo frente a dicha proteína no funcionó. Se realizará de nuevo este experimento con un nuevo anticuerpo en el futuro.

En la **figura 18D** se muestra los niveles de la proteína SPIN2A en las dos líneas generadas, demostrándose que existe una clara depleción de la proteína con respecto al control con ambos ARNg.

En todos los casos se monitorizó la actividad Cas9 para comprobar que la línea expresaba la nucleasa. Esto nos permite saber si, en el caso de no haber noqueo del gen, es por falta de expresión de la maquinaria celular necesaria. Podemos observar en la **figura 18B** que los niveles de nuestras líneas celulares son ligeramente menores que los observados en el

control (Ctrl Cas 9 +), pero con los resultados obtenidos se ha demostrado que son niveles suficientes para generar KO de las proteínas analizadas.

Como control de carga se eligió la proteína GAPDH. Esta nos sirve para determinar si la carga de cantidad proteica es la misma en todas las muestras al expresarse de la misma manera en todas las líneas celulares. Como se puede ver en la **figura 18** todas las muestras presentan niveles similares de esta proteína, lo cual demuestra que las alteraciones en los niveles del resto de proteínas se deben al proceso de CRISPR/Cas9ko y no a errores en la carga de la muestra.

4.4. Respuesta al tratamiento con cisplatino

Los genes identificados mediante el *screening* CRISPR/Cas9ko se han identificado como posibles genes causantes de resistencias al cisplatino. Al ser genes asociados a resistencia, según nuestra hipótesis, esperamos que su delección aumente la sensibilidad de las células al tratamiento. Como primera aproximación experimental se decidió llevar a cabo ensayos de viabilidad celular en presencia de cisplatino.

Para ello se sometió a las líneas a un tratamiento de cisplatino a 6 concentraciones diferentes: 0 μM - 0,032 μM - 0,016 μM - 0,8 μM - 4 μM y 20 μM . La exposición a cisplatino se realizó durante 24 horas, asemejándose al régimen de tratamiento que se les da a los pacientes. A las 72h del tratamiento se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico basado en la detección de la actividad metabólica de las células (MTS) (**Figura 19**).

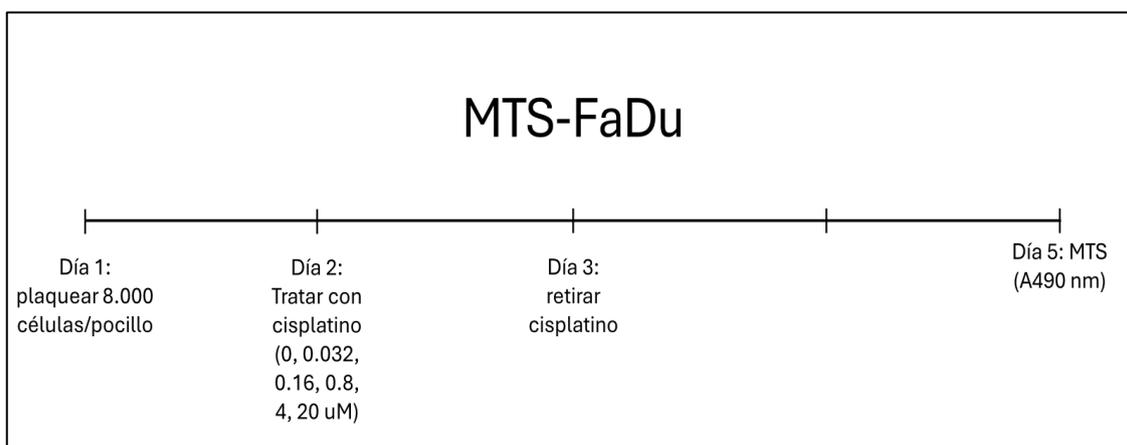


Figura 19. Ensayo de viabilidad (MTS). Esquema experimental.

Paralelamente, se utilizó el mismo ensayo para evaluar la capacidad proliferativa de las diferentes líneas. Para ello se compararon los valores obtenidos en el día final (día 5) del experimento con los valores a día inicial (día 1). Así se obtuvieron valores del incremento en viabilidad en ausencia de cisplatino como medida indirecta de la tasa de crecimiento de cada línea.

4.4.1. CCZ1

Como se puede observar en la **figura18A**, tan solo uno de los 2 guías fue exitoso en el noqueo de este gen, de manera que solo se llevaron a cabo los ensayos de viabilidad celular con la línea que expresaba dicho guía, el sg2.

Este primer experimento también se utilizó para validar el control FaDu_Cas9_Scramble, frente al control FaDu_Cas9_Ev. Para ello se comparó tanto su respuesta a cisplatino como su proliferación en ausencia de este (**Figura 20A**). En ambos casos se puede ver que su comportamiento es muy similar, mostrando una concentración inhibitoria semi-máxima (IC50) muy similar (IC50 EV= 3,035 μ M; IC50 Scramble= 3,012 μ M) y la misma tasa de proliferación (**Figura 20B**).

En presencia de cisplatino (**Figura 20A**), la depleción de CCZ1 parece conferir una ligera resistencia al tratamiento (IC50 CCZ1 KO =3,934 μ M vs IC50 control = 3,035 μ M) al menos en la línea FaDu, en contra de lo esperado según nuestra hipótesis en base a los resultados del screening.

También se evaluó si existían diferencias en el crecimiento entre los controles (EV y Scramble) y la línea deplecionada para CCZ1 (**Figura 20B**). En la Figura 20B se muestra como CCZ1 sg2 presenta una capacidad de proliferación ligeramente más baja que los controles, pero esta no es significativa.

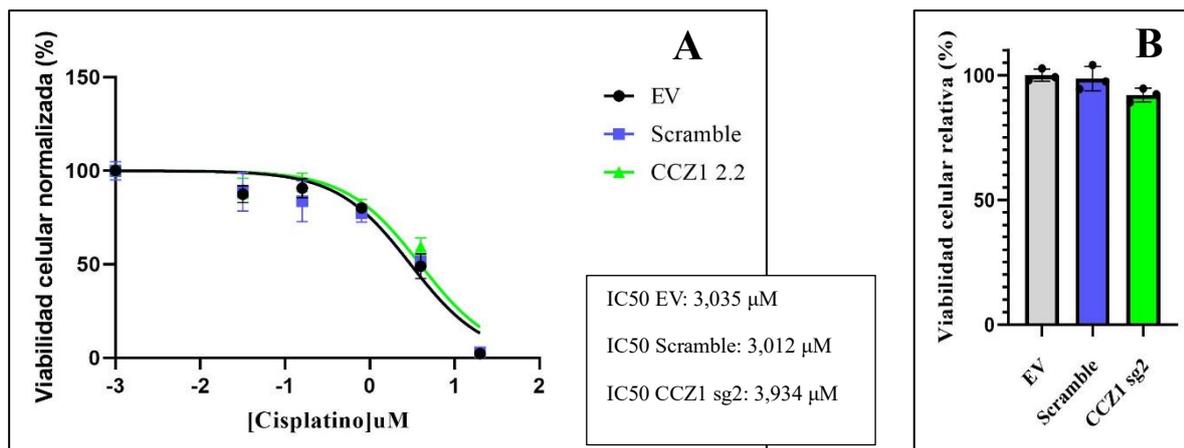


Figura 20. A) Efecto de la depleción de CCZ1 en la respuesta a cisplatino. Curva de dosis-respuesta con 6 concentraciones de cisplatino (0, 0.032, 0.16, 0.4, 4 y 20 μM). Los datos representados en la gráfica corresponden a la viabilidad celular (%) obtenida en función de la absorbancia a 490nm tras la adición de MTS frente al logaritmo de la concentración de cisplatino. Las muestras se analizaron por triplicado. En la gráfica se representa la media + DE de tres réplicas técnicas. “IC50 = concentración inhibitoria semi-máxima, “EV” y “Scramble” = control; “CCZ1 sg2” = FaDu knockout para CCZ. **B) Efecto de la depleción de CCZ1 en la viabilidad celular.** Representación de la viabilidad celular (%) de las líneas FaDu control (EV y Scramble) y CCZ1 knockout (sgCCZ1 sg2) en ausencia de cisplatino. La viabilidad de la línea control se normalizó al 100%. La gráfica representa la media + DE de las tres réplicas técnicas del experimento.

CCZ1 es una proteína que en conjunto con MON1 forma un complejo que participa como intercambiador de guanina (GEF) en la familia de proteínas Rab, los cuales son esenciales para la funcionalidad de proteínas con actividad GTPasa. Las proteínas Rab son claves en el proceso de formación de vesículas de doble membrana y el tráfico de estas dentro de la célula, participando por lo tanto no solo en la endocitosis y la exocitosis, sino también en procesos como la autofagia y la mitofagia. El complejo es activado por Rab5 y activa, a su vez a Rab7, las más conservadas dentro de esta familia de proteínas (Borchers et al., 2021).

El papel de la autofagia en el cáncer es muy complejo, y dependiente de factores como el estadio tumoral, la biología o el microambiente. Muchas evidencias ponen de manifiesto el papel de la autofagia como supresor tumoral en los estadios iniciales del cáncer, pero también facilitando la progresión en las fases tardías de las neoplasias.

Las principales proteínas implicadas en los procesos de autofagia son: las proteínas ATG (*autophagy-related gene*) y los complejos ULK (*UNC-51-like kinase*) y VPS34 (Debnath et al., 2023). El complejo MON1/CCZ1 actúa de intermediario entre todos estos componentes de la ruta autofágica siendo su papel determinante en sus procesos (Vaites et al., 2017).

Aunque el papel del complejo MON1/CCZ1 está muy descrito en el proceso de autofagia, no hay datos que lo relacionen directamente con el proceso tumorigénico o la respuesta al tratamiento, más allá de su sobreexpresión en tumores. Por ejemplo, su relación con la mitofagia puede tener un papel esencial en mantener bajos los niveles de ROS, lo cual es uno de los mecanismos de resistencia al cisplatino según nos explican Galluzzi et al. Por otro lado, el papel de la autofagia tanto en la respuesta al estrés como en los fenómenos de excreción celular pueden ser determinantes en la respuesta al cisplatino. El primero contrarrestando sus efectos y el segundo favoreciendo la eliminación del compuesto en vesículas (Borchers et al., 2021; Debnath et al., 2023; Galluzzi et al., 2012).

El tema es amplio y la relación de la autofagia y el cáncer muy intrincada. La identificación de CCZ1 como candidato a gen de resistencia al cisplatino en los CECC aún debe ser validada por procesos experimentales. Los descubrimientos en autofagia en los últimos años han puesto de manifiesto el papel tan relevante de este proceso celular en el desarrollo de las neoplasias, como nos deja claro Debnath et al. en su revisión, lo que pone de manifiesto la relevancia de poder identificar marcadores moleculares implicados en este proceso y asociados a los tratamientos antitumorales.

4.4.2. RNMT

La respuesta a cisplatino en las células deplecionadas para RNMT se llevó a cabo en las dos líneas generadas ya que ambos ARNg causaban una clara disminución en la expresión de esta proteína (**figura 18B**).

En las condiciones expuestas a cisplatino podemos observar en la **figura 21A** que no se ven diferencias en la viabilidad celular, observándose una IC50 de cisplatino en el control de 2,446 μM equivalente a la obtenida en las líneas deplecionadas para RNMT (2,340 μM para el sg1 y 2,954 μM para el sg2).

Al comprobar su proliferación en ausencia del tratamiento (**Figura 20B**), se puede ver como la disminución de la expresión de la proteína RNMT causa un descenso en la viabilidad o proliferación celular con respecto al control de manera muy significativa (p-valor < 0,0001).

RNMT es una proteína encargada de la metilación del CAP del ARN mensajero (ARNm), el cual participa tanto en el transporte del transcrito al citoplasma como en fenómenos de

splicing o en la traducción proteica (Dunn et al., 2019). Los estudios de Dunn et al. muestran una relación entre una menor expresión del gen y una menor proliferación y aumento de la apoptosis en líneas celulares derivadas de cáncer de mama en las que el gen PIK3CA (subunidad de PI3K) se encuentra sobreactivado (Dunn et al., 2019).

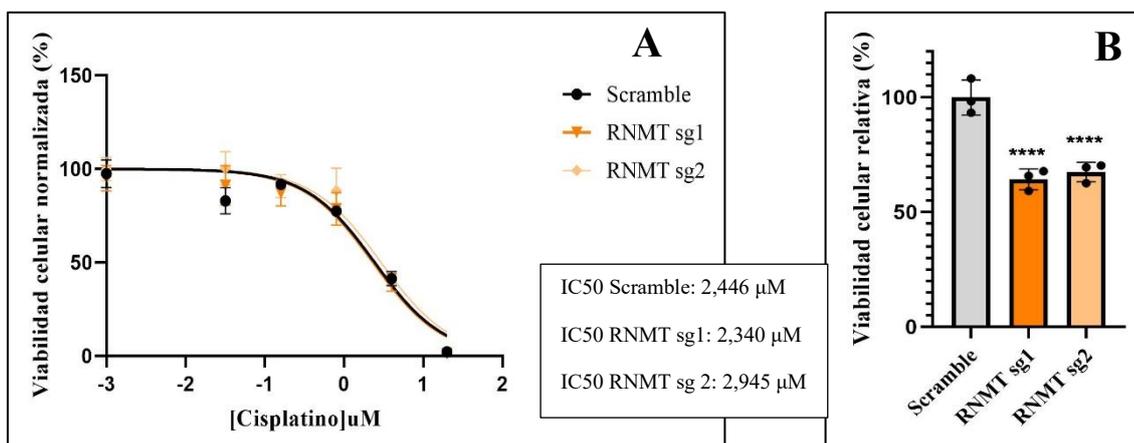


Figura 21. A) Efecto de la depleción de RNMT1 en la resistencia/sensibilidad a cisplatino. Se analizaron 6 concentraciones de cisplatino (0, 0.032, 0.16, 0.4, 4 y 20 μ M). Los datos representados en la gráfica corresponden a la viabilidad celular (%) obtenida en función de la absorbancia a 490nm tras la adición de MTS frente al logaritmo de la concentración de cisplatino. Las muestras se analizaron por triplicado. En la gráfica se representa la media + DE de tres réplicas técnicas. “IC50 = concentración inhibitoria semi-máxima; “Scramble” = control; “RNMT 1” y “RNMT 2” = FaDu knockout para RNMT. **B) Efecto de la depleción de RNMT en la viabilidad celular.** Representación de la viabilidad celular (%) de la línea FaDu control (Scramble) y RNMT knockout (RNMT sg1 y RNMT sg2) en ausencia de cisplatino. La viabilidad de la línea control se normalizó al 100%. La gráfica representa la media + DE de las tres réplicas del experimento.

Si bien esta línea no se encuentra mutada de manera general en los CECC, si es una mutación *driver* en los CECC HPV+ (Leemans et al., 2018). Esto no quiere decir que no esté presente en los demás CECC, en los cuales la mutación en el EGFR es frecuente, y este receptor participa en la activación de numerosas vías de señalización implicadas en el cáncer, y entre ellas la vía de PI3K/Akt (D. Huang et al., 2021).

Evidencias demuestran, en cánceres como el de ovario, y en CECC, que una mayor expresión de esta vía se asocia a mayor resistencia al cisplatino (D. Huang et al., 2021). Además, la formación del CAP y su interacción con numerosos reguladores del ciclo como E2F, MYC o CDK1 hacen que la actividad de RNMT sea clave durante la regulación del ciclo celular, lo cual es esperable tenga grandes efectos en el cáncer (Dunn et al., 2019).

Si pensamos en que la mayor actividad de la vía PI3K se asocia con resistencia al tratamiento con cisplatino y, como demuestran Dunn et al., esta activación es más dependiente de la metilación de CAP por parte de RNMT, es posible que una delección de este gen conlleve un descenso en la actividad de PI3K y, por lo tanto, un aumento en la sensibilidad de las líneas celulares que expresan menos niveles de RNMT.

En cuanto a nuestros resultados, sí hemos visto un descenso en la proliferación de las células con RNMT deplecionada como comenta Dunn et al. en su estudio. Sin embargo, no se han podido ver diferencias de sensibilidad a cisplatino como resultado del noqueo de este gen. Es posible que el experimento sea demasiado a corto plazo y se necesiten tiempos más largos tras el tratamiento para ver el efecto.

4.4.3. BRIP1

En la **figura 18C** se muestra como el análisis por WB no fue concluyente para observar las diferencias en los niveles de proteína de BRIP1 entre el control y las líneas modificadas por CRISPR/Cas9. A pesar de todo, esta proteína es interesante debido a su descripción previa como marcador de resistencia en cáncer de ovario y por su papel en la reparación del ADN como componente de la vía de anemia de Fanconi (Ciccone et al., 2020). Es de interés recordar que uno de los principales mecanismos de resistencia al cisplatino es una mayor capacidad de reparación de los daños en el ADN, de manera que es lógico pensar que BRIP1 puede ser una proteína relacionada con la resistencia al tratamiento en los CECC (Galluzzi et al., 2014).

Debido a todo esto, y a pesar de no saber si las células eran KO, se decidió proceder con ensayos de respuesta a cisplatino en las líneas generadas, a modo de “pseudocontrol positivo”.

En la **Figura 22A** se muestra la curva de respuesta al cisplatino, en la cual se puede ver como la sensibilidad al tratamiento es muy similar entre el control ($IC_{50}=1,440 \mu M$) y BRIP1 sg2 ($IC_{50}=1,581 \mu M$). Sin embargo, BRIP1 sg1 es ligeramente más sensible ($IC_{50}=1,155 \mu M$) con respecto al control, en concordancia con nuestra hipótesis.

Las diferencias en proliferación en las condiciones sin tratamiento se muestran en la **Figura 22B**, en la que no se observan diferencias significativas salvo un ligero incremento en BRIP1 sg1. Esta mayor capacidad de proliferación puede explicar su

menor IC50 puesto que el cisplatino tiene mayor capacidad citotóxica en las células más proliferativas.

De nuevo, es posible que el sg1 sí haya funcionado y que se nos esté mostrando ese ligero descenso en la viabilidad celular en presencia de cisplatino, pero que los tiempos del experimento sean demasiado cortos para poder observar este efecto de manera clara.

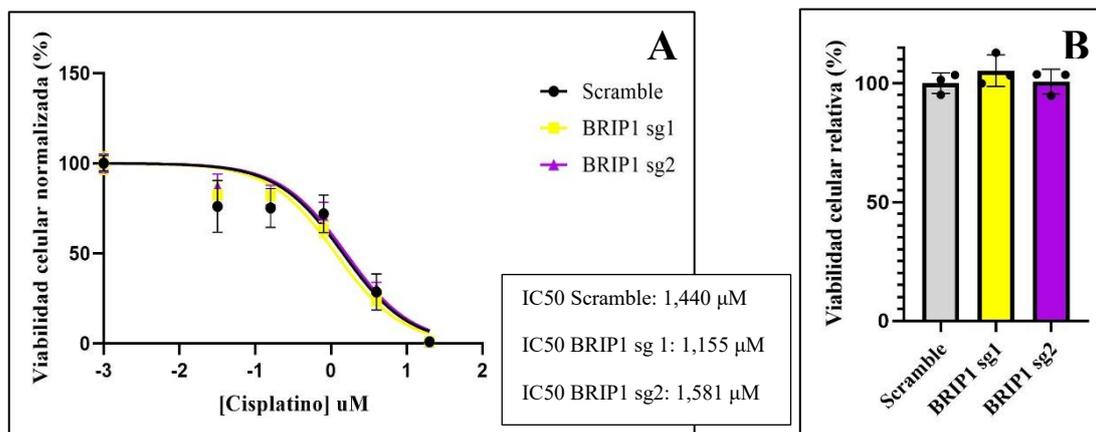


Figura 22. A) Efecto de la depleción (sin verificar) de BRIP en la resistencia/sensibilidad a cisplatino. Se analizaron 6 concentraciones de cisplatino (0, 0.032, 0.16, 0.4, 4 y 20 μM). Los datos representados en la gráfica corresponden a la viabilidad celular (%) obtenida en función de la absorbancia a 490nm tras la adición de MTS frente al logaritmo de la concentración de cisplatino. Las muestras se analizaron por triplicado. En la gráfica se representa la media + DE de tres réplicas técnicas. “IC50 = concentración inhibitoria semi-máxima; “Scramble” = control; “BRIP1 sg1” y “BRIP1 sg2” = FaDu knockout para BRIP. **B) Efecto de la depleción de BRIP (sin verificar) en la viabilidad celular.** Representación de la viabilidad celular (%) de la línea FaDu control (Scramble) y BRIP knockout (BRIP1 sg1 y BRIP1 sg2) en ausencia de cisplatino. La viabilidad de la línea control se normalizó al 100%. La gráfica representa la media + DE de las tres réplicas del experimento.

BRIP1, también denominada FANCI, es una proteína con actividad helicasa que interacciona con BRCA1. Su papel es fundamental en la recombinación homóloga y estabilidad cromosómica. Mutaciones en este gen se han relacionado con cánceres como el cáncer colorrectal, de ovario o de endometrio, asociadas a fenómenos de predisposición, recurrencias y gravedad (Liu et al., 2023).

En los experimentos llevados a cabo por Ciccone et al., se analizaron líneas CHO de ovario de hámster, y en estos experimentos se pudo observar que una deleción de este gen causa descensos en la velocidad de proliferación, así como un aumento en los daños del ADN. Todo esto deriva, como se muestra en el artículo, en una mayor sensibilidad tanto al cisplatino como al carboplatino (Ciccone et al., 2020).

También se muestran evidencias de que este noqueo se asocia a sensibilidad a quimioterápicos en los estudios de Wirth et al., en los cuales se utilizaron xenoinjertos

derivados de pacientes de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). En estas investigaciones se ve como la delección del gen de BRIP deriva una mayor sensibilidad a quimioterápicos como la ciclofosfamida (Wirth et al., 2022). El mecanismo de acción de esta es similar al del cisplatino, generando puentes cruzados entre las hebras del ADN (Emadi et al., 2009). Es posible que, al compartir mecanismos de acción, esta sensibilidad se observe también frente al cisplatino.

Debido a todas las evidencias en varios estudios se esperaba que el noqueo de este gen fuera causante de una mayor sensibilidad al tratamiento. La falta de verificación del noqueo no nos permite saber si la falta de efecto se debe a un fallo en el proceso de CRISPR/Cas9. Otras posibilidades es que este gen no sea causante de sensibilidad en la línea FaDu de CECC; o bien que el ensayo de viabilidad se esté llevando a cabo en tiempos demasiado cortos, que no permitan el desarrollo de resistencias.

4.4.4. SPIN2A

Tras comprobar el noqueo del gen SPIN2A (**Figura 18D**) se llevó a cabo el ensayo de viabilidad en presencia de cisplatino con las líneas generadas (**Figura 23A**), observándose un ligero aumento de la IC50 en las líneas deplecionadas para la proteína SPIN2A (3,163 μ M para el sg1 y 3,040 μ M para el sg2 frente a 2,446 μ M en el control).

En ausencia de tratamiento el noqueo de este gen causaba un marcado descenso de la viabilidad celular con respecto al control, con un p-valor de 0,0083 para SPIN2A sg1 y 0,0009 para SPIN2A sg2 (**Figura 23B**). Esto puede explicar ese ligero incremento en la resistencia al tratamiento, ya que la actividad del cisplatino es dependiente de la proliferación, de manera que una menor proliferación de los KO para SPIN2A podría resultar en una menor sensibilidad al cisplatino, de nuevo en contra de lo esperado según nuestra hipótesis de partida.

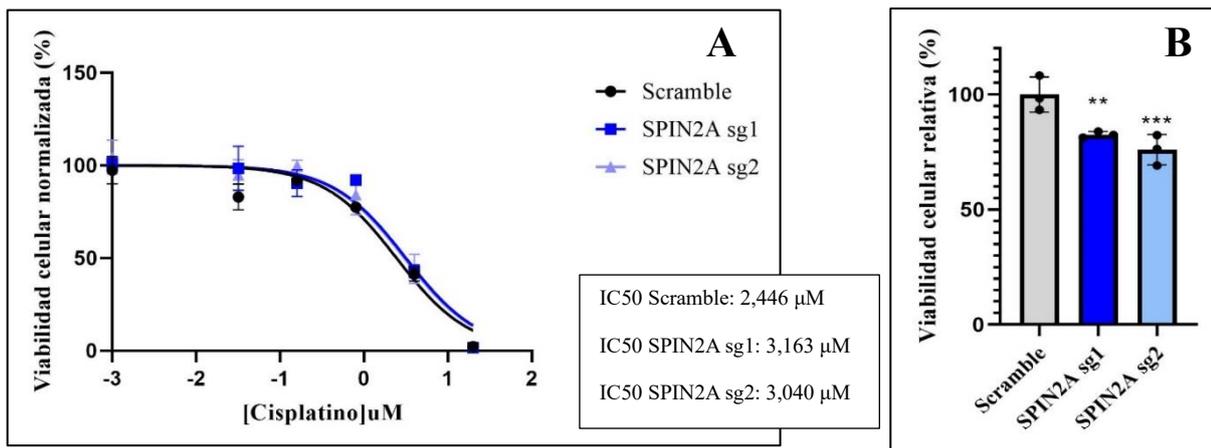


Figura 23. A) Efecto de la depleción de SPIN2A en la resistencia/sensibilidad a cisplatino. Se analizaron 6 concentraciones de cisplatino (0, 0.032, 0.16, 0.4, 4 y 20µM). Los datos representados en la gráfica corresponden a la viabilidad celular (%) obtenida en función de la absorbancia a 490nm tras la adición de MTS frente al logaritmo de la concentración de cisplatino. Las muestras se analizaron por triplicado. En la gráfica se representa la media + DE de tres réplicas técnicas. “IC50 = concentración inhibitoria semi-máxima; “Scramble” = control; “SPIN2A sg1” y “SPIN2A sg2” = FaDu knockout para SPIN2A. **B) Efecto de la depleción de SPIN2A en la viabilidad celular.** Representación de la viabilidad celular (%) de la línea FaDu control (Scramble) y SPIN knockout (SPIN2A sg1 y SPIN2A sg2) en ausencia de cisplatino. La viabilidad de la línea control se normalizó al 100%. La gráfica representa la media + DE de las tres réplicas del experimento.

SPIN2A es una proteína de la familia de las spindilinas. Esta familia está formada por 5 miembros (SPIN1, 2A, 2B, 3 y 4) cuya estructura y funcionalidad es muy similar. Su función es la de lectores de la metilación de histonas, lo cual tiene grandes efectos tanto en el ciclo celular como en la transcripción proteica (Fagan et al., 2019; Fletcher et al., 2002).

El miembro más estudiado y conocido de esta familia es SPIN1, cuya sobreexpresión se ha visto relacionada con numerosos cánceres como el de mama, ovario o colon al participar en vías de señalización frecuentemente alteradas en la carcinogénesis como son la de Wnt, PI3K/Akt, RET o p53 (Fagan et al., 2019; Li et al., 2021). Algunos ejemplos relevantes en los CECC son las vías de Wnt o p53 ambas frecuentemente mutadas en estos cánceres (Leemans et al., 2018).

SPIN1 también se ha asociado a fenómenos de resistencia a QT y RT (Li et al., 2021). Por ejemplo, los estudios de Chen et al. demuestran que una menor expresión de este gen se asocia con una mayor sensibilidad al tratamiento en líneas celulares de cáncer de mama con doxorubicina, agente intercalante del ADN (Chen et al., 2016).

Como se ha comentado, los miembros de esta familia presentan estructuras y funciones similares. Esto hace más que probable que los efectos observados en algunos de sus miembros, principalmente SPIN1, sean ampliables a los demás miembros de la familia, al menos en sus funciones más esenciales (Fagan et al., 2019; Fletcher et al., 2002).

En el caso de SPIN2, el estudio de Fletcher et al. muestra que su sobreexpresión se asocia a un arresto celular en G2/M que deriva en un descenso en la proliferación celular, pero no explora el posible efecto en la respuesta a platino. Es por tanto de interés continuar con los ensayos de respuesta al tratamiento con cisplatino en las líneas KO de este gen.

Finalmente, es importante destacar que la IC50 esperada para los controles es de en torno a 2 μ M. Esta aparece más elevada en los controles de viabilidad frente al tratamiento para el gen CCZ1 y disminuida en aquellos controles utilizados en el ensayo con el gen BRIP1. Como se ha comentado con anterioridad, el efecto del cisplatino es dependiente de factores como la confluencia y de la capacidad de proliferación de las células. El cisplatino es un compuesto que afecta al ADN (Rottenberg et al., 2021), de manera que cualquier evento que afecte a la replicación puede disminuir su eficacia. Una menor proliferación, bien basal o derivada de una excesiva confluencia celular pueden, al menos en teoría, disminuir su efectividad y aumentar la IC50 de las líneas. A esto debemos añadir la superficie por la cual el fármaco puede ser captado, una menor confluencia aumenta la superficie celular en contacto con el fármaco, de manera que este será internalizado en mayor cantidad. En definitiva, estas variaciones en las IC50 pueden deberse a diferencias en la confluencia derivadas del proceso de sembrado o diferencias en parámetros externos de cada experimento concreto. Por ejemplo, durante el ensayo de BRIP se pudo observar cierta muerte celular basal y pérdida de adhesión, lo cual puede explicar una menor concentración del fármaco necesaria para eliminar el 50% de las células en cultivo.

5. Conclusiones

- La delección de los genes CCZ1, RNMT y SPIN2A no tiene un efecto sensibilizante al cisplatino en la línea FaDu de CECC. Por el contrario, la depleción de CCZ1 y SPIN2A induce un ligero aumento en la resistencia a dicho tratamiento.
- La delección de los genes RNMT y SPIN2A reduce significativamente la tasa de crecimiento de la línea celular de CECC FaDu.

6. Perspectivas futuras

Hasta la fecha no se han podido validar ninguno de los candidatos identificados y seleccionados del *screening* de CRISPR/Cas9, si bien sólo se ha llevado a cabo una réplica biológica del ensayo de respuesta a cisplatino para cada gen analizado. También es importante mencionar que solo se han realizado experimentos con 4 de los 10 candidatos y en una única línea celular, lo que aún mantiene la esperanza de validar alguno de los otros genes candidatos de resistencia identificados en los próximos experimentos.

Curiosamente, algunos de los genes identificados ya habían sido descritos como causantes de fenómenos de resistencia al cisplatino en otros tipos de cáncer, tales como BRIP1, si bien en este caso, al no funcionar el anticuerpo, la ausencia del efecto esperado podría deberse a que no haya habido depleción. Otra posibilidad es que los ensayos de viabilidad realizados sean a muy corto plazo, por lo que se han iniciado ensayos de formación de colonias en estas mismas líneas, las cuales se mantendrán en cultivo durante dos semanas. En cada una de estas dos semanas se les dará un pulso de cisplatino de 24 horas a las mismas concentraciones que los ensayos de viabilidad mostrados en el presente texto. A las dos semanas las células serán fijadas y teñidas con cristal violeta y se medirá el área ocupada en el pocillo como medida de proliferación para obtener las correspondientes IC50. Se espera que estos experimentos a largo plazo, los cuales son más similares al proceso experimental llevado a cabo para realizar el *screening* inicial, nos aporten datos más concluyentes sobre el efecto que estos genes pueden tener en la respuesta a cisplatino en CECC.

7. Bibliografía

- Almeida, S., Ryser, S., Obarzanek-Fojt, M., Hohl, D., & Huber, M. (2011). The TRAF-interacting protein (TRIP) Is a regulator of keratinocyte proliferation. *Journal of Investigative Dermatology*, *131*(2), 349–357. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.329>
- Borchers, A. C., Langemeyer, L., & Ungermann, C. (2021). Who's in control? Principles of rab gtpase activation in endolysosomal membrane trafficking and beyond. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 220, Issue 9). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.202105120>
- Calvo, J. A., Fritchman, B., Hernandez, D., Persky, N. S., Johannessen, C. M., Piccioni, F., Kelch, B. A., & Cantor, S. B. (2021). Comprehensive mutational analysis of the BRCA1-associated DNA helicase and tumor-suppressor FANCD1/BACH1/BRIP1. *Molecular Cancer Research*, *19*(6), 1015–1025. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-20-0828>
- Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B. V. S. K., & Varambally, S. (2017). UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia (United States)*, *19*(8), 649–658. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>
- Chandrashekar, D. S., Karthikeyan, S. K., Korla, P. K., Patel, H., Shovon, A. R., Athar, M., Netto, G. J., Qin, Z. S., Kumar, S., Manne, U., Crieghton, C. J., & Varambally, S. (2022). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia (United States)*, *25*, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>
- Chen, X., Wang, Y. W., Xing, A. Y., Xiang, S., Shi, D. B., Liu, L., Li, Y. X., & Gao, P. (2016). Suppression of SPIN1-mediated PI3K–Akt pathway by miR-489 increases chemosensitivity in breast cancer. *Journal of Pathology*, *239*(4), 459–472. <https://doi.org/10.1002/path.4743>
- Chow, L. Q. M. (2020). Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, *382*(1), 60–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1715715>
- Ciccione, M. A., Adams, C. L., Bowen, C., Thakur, T., Ricker, C., Culver, J. O., Maoz, A., Melas, M., Idos, G. E., Jeyasekharan, A. D., Matsuo, K., Roman, L. D., Gruber, S. B., & McDonnell, K. J. (2020). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase induces synthetic lethality in BRIP1 deficient ovarian epithelial cells. *Gynecologic Oncology*, *159*(3), 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.09.040>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 740, pp. 364–378). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Debnath, J., Gammoh, N., & Ryan, K. M. (2023). Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 24, Issue 8, pp. 560–575). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00585-z>
- Dunn, S., Lombardi, O., Lukoszek, R., & Cowling, V. H. (2019). Oncogenic PIK3CA mutations increase dependency on the mRNA cap methyltransferase, RNMT, in breast cancer cells. *Open Biology*, *9*(4). <https://doi.org/10.1098/rsob.190052>

- Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 6, Issue 11, pp. 638–647). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>
- Fagan, V., Johansson, C., Gileadi, C., Monteiro, O., Dunford, J. E., Nibhani, R., Philpott, M., Malzahn, J., Wells, G., Faram, R., Cribbs, A. P., Halidi, N., Li, F., Chau, I., Greschik, H., Velupillai, S., Allali-Hassani, A., Bennett, J., Christott, T., ... Oppermann, U. (2019). A Chemical Probe for Tudor Domain Protein Spindlin1 to Investigate Chromatin Function. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(20), 9008–9025. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00562>
- Fletcher, B. S., Dragstedt, C., Notterpek, L., & Nolan, G. P. (2002). Functional cloning of SPIN-2, a nuclear anti-apoptotic protein with roles in cell cycle progression. *Leukemia*, 16(8), 1507–1518. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402557>
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. In *Oncogene* (Vol. 31, Issue 15, pp. 1869–1883). <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., & Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future. In *Cell Death and Disease* (Vol. 5). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.428>
- Guo, L., Li, C., Guo, J., Qiu, J., & Hua, K. (2023). CKAP2 promotes cervical cancer progression by modulating the tumor microenvironment via NF- κ B signaling. In *Am J Cancer Res* (Vol. 13, Issue 6). www.ajcr.us/
- Guo, Z., Zeng, Y., Chen, Y., Liu, M., Chen, S., Yao, M., Zhang, P., Zhong, F., Jiang, K., He, S., & Yuan, G. (2020). TRAIIP promotes malignant behaviors and correlates with poor prognosis in liver cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109857>
- Huang, D., Savage, S. R., Calinawan, A. P., Lin, C., Zhang, B., Wang, P., Starr, T. K., Birrer, M. J., & Paulovich, A. G. (2021). A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. In *Oncogene* (Vol. 40, Issue 46, pp. 6395–6405). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02055-2>
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Leemans, C. R., Snijders, P. J. F., & Brakenhoff, R. H. (2018). The molecular landscape of head and neck cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 18, Issue 5, pp. 269–282). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.11>
- Li, D., Guo, J., & Jia, R. (2021). Histone code reader SPIN1 is a promising target of cancer therapy. In *Biochimie* (Vol. 191, pp. 78–86). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.09.002>
- Li, W., Xu, H., Xiao, T., Cong, L., Love, M. I., Zhang, F., Irizarry, R. A., Liu, J. S., Brown, M., & Liu, X. S. (2014). MAGECK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biology*, 15(12), 554. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0554-4>

- Liu, Y., Wu, X., Feng, Y., Jiang, Q., Zhang, S., Wang, Q., & Yang, A. (2023). Insights into the Oncogenic, Prognostic, and Immunological Role of BRIP1 in Pan-Cancer: A Comprehensive Data-Mining-Based Study. *Journal of Oncology*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/4104639>
- Long, J., Zhu, J. Y., Liu, Y. Bin, Fu, K., Tian, Y., Li, P. Y., Yang, W. Q., Yang, S. Y., Yin, J. Y., Yin, G., & Zhang, Y. (2018). Helicase POLQ-like (HELQ) as a novel indicator of platinum-based chemoresistance for epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 149(2), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.03.006>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnyš, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., ... Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 2, pp. 67–83). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Rajendra, A., Noronha, V., Joshi, A., Patil, V. M., Menon, N., & Prabhash, K. (2020). Palliative chemotherapy in head and neck cancer: balancing between beneficial and adverse effects. In *Expert Review of Anticancer Therapy* (Vol. 20, Issue 1, pp. 17–29). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14737140.2020.1708197>
- Rangan, S. R. S. (1972). A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 29(1), 117–121. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197201\)29:1<117::AID-CNCR2820290119>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197201)29:1<117::AID-CNCR2820290119>3.0.CO;2-R)
- Rottenberg, S., Disler, C., & Perego, P. (2021). The rediscovery of platinum-based cancer therapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 21, Issue 1, pp. 37–50). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00308-y>
- Schuster, A., Erasmus, H., Fritah, S., Nazarov, P. V., van Dyck, E., Niclou, S. P., & Golebiewska, A. (2019). RNAi/CRISPR Screens: from a Pool to a Valid Hit. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 1, pp. 38–55). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.002>
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216–W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- Takata, K. I., Reh, S., Tomida, J., Person, M. D., & Wood, R. D. (2013). Human DNA helicase HELQ participates in DNA interstrand crosslink tolerance with ATR and RAD51 paralogs. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3338>
- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
- Tsherniak A., Vazquez F, Montgomery PG, Weir BA, Kryukov G, Cowley GS, Gill S, Harrington WF, Pantel S, Krill-Burger JM, Meyers RM, Ali L, GGoodale A, Lee Y, Jiang G, HHSiao J, Gerath WFJ, Howell S, M. E., Ghandi M, ... Hahn WC. (2017, July 27). *DepMap*. Defining a Cancer Dependency Map .

- Vaites, L. P., Paulo, J. A., Huttlin, E. L., & Harper, J. W. (2017). *Systematic Analysis of Human Cells Lacking ATG8 Proteins Uncovers Roles for GABARAPs and the CCZ1/MON1 Regulator C18orf8/RMCI in Macroautophagic and Selective Autophagic Flux*. <https://doi.org/10.1128/MCB>
- Wirth, A. K., Wange, L., Vosberg, S., Henrich, K. O., Rausch, C., Özdemir, E., Zeller, C. M., Richter, D., Feuchtinger, T., Kaller, M., Hermeking, H., Greif, P. A., Senft, D., Jurinovic, V., Bahrami, E., Jayavelu, A. K., Westermann, F., Mann, M., Enard, W., ... Jeremias, I. (2022). In vivo PDX CRISPR/Cas9 screens reveal mutual therapeutic targets to overcome heterogeneous acquired chemo-resistance. *Leukemia*, *36*(12), 2863–2874. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01726-7>
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 55, pp. 106–119). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001>
- Zhang, B. (2021a). CRISPR/Cas gene therapy. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 236, Issue 4, pp. 2459–2481). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.30064>
- Zhang, B. (2021b). CRISPR/Cas gene therapy. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 236, Issue 4, pp. 2459–2481). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.30064>