



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Implementación del sistema CRISPR/Cas13 para la degradación del RNA mensajero mutante de ATXN7 de la ataxia espinocerebelosa tipo 7”

T E S I S

Que presenta

IBT MARCO JÁCOME DEL ANGEL

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

EN LA ESPECIALIDAD DE

Genética y Biología Molecular

Directores de la Tesis:

Dr. Jaime García Mena

Dr. Oscar Hernández Hernández

Ciudad de México

Agosto, 2024

Índice general

Agradecimientos	III
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	VII
Notación	VIII
Resumen	IX
Abstract	X
1. Introducción y antecedentes	1
1.1. Ataxia espinocerebelosa tipo 7	1
1.2. Aspectos genéticos de la SCA7	2
1.3. Fisiopatogénesis	3
1.4. Mecanismos moleculares de patogénesis	6
1.5. Estrategias terapéuticas	9
1.6. Sistema CRISPR-Cas13	11
2. Justificación	13
3. Hipótesis	14
4. Objetivos	15
4.1. General	15
4.2. Específicos	15
5. Alcance	16

6. Metodología	17
6.1. Plan de trabajo	17
6.2. Métodos	23
7. Resultados	35
7.1. Caracterización de cultivos de fibroblastos derivados de pacientes con SCA7	35
7.2. Diseño <i>in silico</i> de crRNAs dirigidos al RNA mensajero de <i>ATXN7</i>	37
7.3. Clonación de crRNAs en el plásmido pc0040-LwaCas13a_crRNA y subclonación en el vector pSLQ1651 -sgRNA(F+E)-sgGal4	38
7.4. Determinación de la expresión de Cas13 a partir del vector pC034 - LwCas13a-msfGFP-2A-Blast	44
7.5. Expresión estable de la nucleasa Cas13 en fibroblastos de SCA7 mediante infección lentiviral	46
7.6. Estandarización de la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de transcrito de <i>ATXN7</i> en fibroblastos de SCA7 . . .	52
8. Discusión	53
9. Conclusiones	56
10. Perspectivas	57
11. Bibliografía	58

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo brindado en estos dos años, el cuál me permitió llevar a cabo este proyecto.

Le agradezco profundamente a mis padres Jorge Jácome y Alejandra del Angel, ya que sin su educación, valores, sustento y constante apoyo nada de esto sería posible.

Agradecimientos infinitos a Lore, mi acompañante de vida, la cual estuvo ahí para mí en momentos difíciles, brindándome el apoyo, amor y calidez que me permitieron seguir adelante a pesar de todas las dudas y adversidades.

Agradecerles inmensamente a mis tutores, el Dr. Oscar Hernández y el Dr. Jaime García, por darme la oportunidad de trabajar con ellos y por todo su apoyo, conocimiento y paciencia brindada en este proyecto.

Agradezco a mis asesores, el Dr. José Manuel Hernández y el Dr. Bulmaro Cisneros por su retroalimentación, observaciones y consejos a lo largo de las presentaciones realizadas para este proyecto.

Agradezco inmensamente al M.C. Mauricio Hernández por brindarme todo su apoyo al momento de planear y realizar experimentos, resolver dudas y darme retroalimentación.

Agradecimientos a la Dra. Yessica Tapia por toda su ayuda y paciencia a lo largo de este proyecto, al igual que todos mis compañeros de generación, del Laboratorio de Medicina Genómica del INR-LGII y del CINVESTAV.

Y finalmente, a todas esas personas que estuvieron conmigo estos dos años, les agradezco su amistad, apoyo, compañía y risas; sin ustedes, no hubiera logrado esto.

Índice de figuras

1.	Relación de tamaño de repetidos CAG con edad de inicio de SCA7	3
2.	Conexiones interdependientes entre los tipos de neurona afectados en SCA7	6
3.	Estructura de la proteína ataxina-7	8
4.	Diagrama representativo sobre los efectos de la proteína mATXN7 en el núcleo y citoplasma de la célula afectada . . .	8
5.	Diagrama representativo del sistema CRISPR-Cas13	12
6.	Genotipificación de GM03440 y GM03561.	17
7.	Diseño <i>in silico</i> de crRNAs	18
8.	Clonación de los crRNAs en el plásmido pc0040-LwCas13a_crRNA mediante Golden Gate Assembly	19
9.	Amplificación de los sgRNAs generados en el vector pc0040-LwCas13a_crRNA para su posterior inserción en el vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4	20
10.	Caracterización del plásmido pC034-LwCas13a_msGFP-2A-Blast	21
11.	Generación de vector de transferencia, transducción en fibroblastos y confirmación de la expresión de LwCas13a . .	22
12.	Proceso de estandarización de RT-qPCR para medición de niveles de <i>ATXN7</i>	22
13.	Genotipificación de fibroblastos GM03440 y GM03561 mediante TP-PCR y electroforesis capilar	35
14.	Identificación de la presencia del SNP rs3774729 mediante PCR	36

15. Confirmación de la expresión de <i>ATXN7</i> en líneas celulares 3440 (WT) y 3561 (SCA7) mediante RT-PCR	37
16. Formación adecuada de dúplex CAG, Acc & SNP	39
17. PCR de colonias transformadas	40
18. Confirmación de inserciones de crRNAs CAG, Acc & SNP en vectores	41
19. Secuenciación del plásmido con los diferentes insertos correspondientes a las secuencias de los crRNAs	42
20. Secuenciación de los plásmidos con diferentes sgRNAs insertados	43
21. Digestión enzimática con EcoRI del plásmido pC034 - LwCas13a-msfGFP-2A-Blast	44
22. WB de células HeLa lipotransfectadas con GFP o Cas13-msfGFP	45
23. Fluorescencias de células HeLa transfectadas con msfGFP-Cas13a y eGFP-N1 como control	46
24. Imágenes de fluorescencia de células HEK Lenti-X con vector de LwCas13 y sgRNA CAG	47
25. Curvas de resistencia a Blastidina (arriba) y Puromicina (abajo)	48
26. Fibroblastos infectados lentiviralmente con el vector que expresa el sgRNA CAG	49
27. Microscopia de fluorescencia de fibroblastos infectados lentiviralmente con el vector que expresa la LwCas13a	49
28. Western blot con anticuerpo α -GFP de extractos proteicos de línea de fibroblastos estable que expresa la LwCas13a	50

29. Microscopia de fluorescencia de fibroblastos Cas13 con sgRNAs.	51
30. Microscopia de fluorescencia de fibroblastos Cas13 con sgRNAs.	51
31. Medición de los niveles de <i>ATXN7</i> en líneas celulares 3440 (WT) y 3561 (SCA7) mediante RT-PCR utilizando TBP como gen control.	52

Índice de tablas

1.	Primers utilizados en el proyecto	24
2.	Especificaciones para la reacción de secuenciación	28
3.	Volúmenes para preparación de lipotransfección	32
4.	Resultados de análisis <i>in silico</i> de los crRNAs seleccionados	38
5.	Colonias transformadas	39

Notación

5' LTR	Repetición Terminal Larga
ADCA	Ataxias Espinocerebelosas Autosómico Dominantes
BG	Células gliales de Bergmann
Cas	Proteínas Asociadas a CRISPR
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas
crRNA	ARN de CRISPR
CRX	Cone-rod homeobox protein
DR	Repetidos Directos
GCN5L2	Histona acetiltransferasa KAT2A
IO	Neuronas del Olivo Inferior
mATXN7	ATXN7 mutante
NES	Señal de exportación nuclear
SAGA	Complejo multiprotéico Spt-Ada-Gcn5-acetiltransferas
SCA7	Ataxia espinocerebelosa tipo 7
sgRNA	ARN de guía único
SLN	Señal de localización nuclear
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
PC	Células de Purkinje
PolyQ	Enfermedades poliglutamínicas

Resumen

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es un raro trastorno neurodegenerativo autosómico dominante causado por la expansión de una repetición del trinucleótido CAG en una región codificante del gen *ATXN7*. Actualmente, existe la necesidad de evaluar alternativas terapéuticas contra SCA7 debido a que aún es una enfermedad incurable. Por esta razón, este trabajo tuvo como objetivo la implementación del sistema CRISPR/Cas13 en fibroblastos derivados de pacientes con SCA7 para la evaluación de la degradación del RNA mensajero de *ATXN7*. Inicialmente, mediante el análisis estructural del transcrito *ATXN7* diseñamos sgRNAs dirigidos a 3 regiones diferentes del RNA mensajero: uno dirigido a la región CAG, el cual da lugar al tracto de polyQ en la proteína, un sgRNA dirigido a la región más accesible de acuerdo con la predicción bioinformática, y un sgRNA dirigido a un SNP previamente asociado con la mutación en una población de SCA7. Mediante técnicas de DNA recombinantes cada sgRNAs se clonó en un vector lentiviral, y posteriormente se produjo mediante transducción lentiviral una línea de fibroblastos que expresa establemente la nucleasa LwCas13a. Adicionalmente, la genotipificación del cultivo de fibroblastos permitió confirmar la presencia de la mutación de SCA7, la presencia del SNP asociado con esta región, así como la estandarización de una RT-qPCR específica al transcrito *ATXN7*. En resumen, en este trabajo logramos implementar de manera satisfactoria el sistema CRISPR/Cas13a, el cual podrá ser utilizado para determinar los niveles de transcrito de *ATXN7* y evaluar su efectividad en fibroblastos de SCA7.

Abstract

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is a rare autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by the expansion of a CAG trinucleotide repeat in a coding region of the *ATXN7* gene. Currently, there is a need to evaluate therapeutic alternatives against SCA7 because it remains an incurable disease. For this reason, this work aimed to implement the CRISPR/Cas13 system in fibroblasts derived from SCA7 patients to evaluate the degradation of *ATXN7* messenger RNA. Initially, through structural analysis of the *ATXN7* transcript, we designed sgRNAs targeting three different regions of the messenger RNA: one directed at the CAG region, which gives rise to the polyQ tract in the protein; an sgRNA directed at the most accessible region according to bioinformatic prediction; and an sgRNA directed at an SNP previously associated with the mutation in an SCA7 population. Using recombinant DNA techniques, each sgRNA was cloned into a lentiviral vector, and subsequently, a fibroblast line that stably expresses the LwCas13a nuclease was produced via lentiviral transduction. Additionally, genotyping of the fibroblast culture confirmed the presence of the SCA7 mutation, the presence of the SNP associated with this region, and the standardization of an *ATXN7* transcript-specific RT-qPCR. In summary, in this work, we successfully implemented the CRISPR/Cas13a system, which can be used to determine *ATXN7* transcript levels and evaluate its effectiveness in SCA7 fibroblasts.

1. Introducción y antecedentes

1.1. Ataxia espinocerebelosa tipo 7

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es un raro trastorno neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado por ataxia progresiva y deterioro visual. Forma parte de las Ataxias Espinocerebelosas Autosómico Dominantes (ADCA por sus siglas en inglés) y de las enfermedades poliglutamínicas (PolyQ), que son causadas por la expansión de una repetición del trinucleótido CAG en regiones codificantes (Michalik et al., 2003). En el caso de la SCA7, la expansión ocurre en el gen *ATXN7* en el cromosoma 3p21.1, lo que conduce a la formación de un tracto de poliglutamina tóxico en la proteína ataxina-7. Las ADCA y otros desordenes polyQ tienen herencia autosómica dominante, aparición de los síntomas en edades tempranas o adultas, y degeneración selectiva de tejidos cerebrales. (Niewiadomska-Cimicka & Trottier, 2019). Esto ocurre debido a que la expansión PolyQ provoca que la proteína afectada tenga una ganancia de función tóxica, causando el secuestro de diferentes factores nucleares y proteicos, provocando agregados dentro del núcleo (Zoghbi & Orr, 2000). Los síntomas de la SCA7 generalmente dependen de la edad de aparición de la enfermedad. Las edades de aparición se pueden dividir en dos grupos principales: Edad adulta y edad temprana o niñez (La Spada, 2020). Inicio en la edad adulta:

- Falta de coordinación progresiva causada por ataxia cerebelosa, incluyendo disartria/disfagia, dismetría y disdiadococinesia.
- Distrofia retiniana de cono-bastón con los siguientes aspectos:

- Pérdida de la visión central.
- Defecto del eje tritán (azul/amarillo) en la prueba detallada de la visión del color.
- Cambios maculares en el examen fundoscópico.
- Escotoma paracentral en la prueba del campo visual.
- En el electroretinograma, anomalías de la función del cono, seguidas de anomalías de la función del bastón.

Inicio en la infancia temprana o en la niñez:

- Fracaso en prosperar y pérdida de los hitos motores (pueden ser los primeros hallazgos).
- Rápido deterioro con muerte temprana.
- La ataxia y la pérdida de la visión no son obvias.

1.2. Aspectos genéticos de la SCA7

El número de repeticiones CAG dicta la gravedad de la enfermedad y la edad de aparición, fenómeno conocido como anticipación genética. Un individuo sano tiene menos de 36 repeticiones, mientras que un individuo con 36-55 repeticiones tendrá una aparición de síntomas de leve a moderada en la edad adulta. Un individuo con más de 70 repeticiones tendrá un inicio de los síntomas en la adolescencia, con síntomas más graves y una progresión más rápida de la enfermedad. También existen individuos con más de 100 repeticiones (siendo 460 el mayor número reportado), lo que provoca un inicio de los síntomas desde la infancia, con síntomas mucho más agresivos que generalmente conducen a la muerte

en pocos años (Figura 1) (Michalik et al., 2003; Niewiadomska-Cimicka & Trotter, 2019; van de Warrenburg et al., 2001).

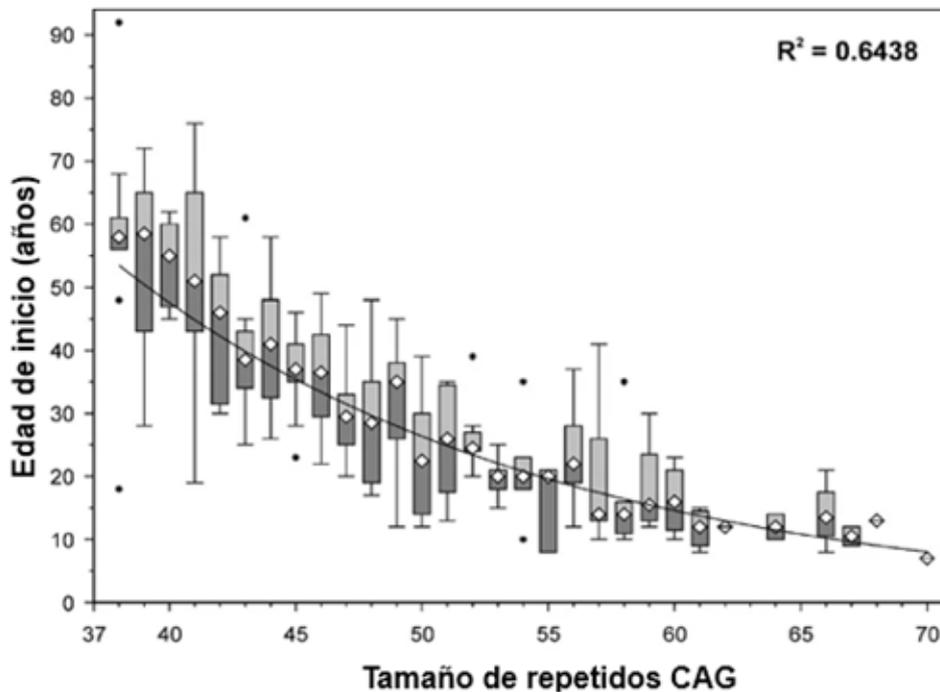


Figura 1: Relación de tamaño de repetidos CAG con edad de inicio de SCA7. Se puede observar que la relación entre cantidad de repetidos y la edad de aparición tiene una relación inversamente proporcional. Modificada de Michalik et al., 2003.

1.3. Fisiopatogénesis

SCA7 es diferente de otras enfermedades PolyQ en la afectación específica de la retina. La mácula presenta un fenotipo moteado, se observan alteraciones del epitelio pigmentario y atrofia de fotorreceptores. Más específicamente, la retina presenta pérdida de bastones, conos y células ganglionares, así como migración de las células pigmentadas

hacia las capas retinales (Martin et al., 1994). Aunado a esto, se ha mostrado que las enfermedades PolyQ están asociadas a la formación de inclusiones ubiquitinadas intranucleares neuronales conteniendo al menos una parte de la proteína mutada (Wells, 2011).

De igual manera, en SCA7 la ceguera es inicialmente causada por la degeneración de los conos, los fotorreceptores involucrados en la detección del color, por lo que la detección de los colores se ve fuertemente afectada (discromatopsia asintomática) (La Spada & Fu, 2001). Conforme avanza la enfermedad, los bastones también se ven afectados, causando una distrofia de conos-bastones y finalmente, ceguera total (Enevoldson et al., 1994; Niewiadomska-Cimicka & Trottier, 2019).

En estudios con modelos de ratón que expresan una expansión del tracto polyQ en la retina, se observó una degeneración retinal progresiva e inclusiones nucleares en los bastones (La Spada et al., 2001; Yvert, 2000). Adicionalmente, La Spada et al., logró determinar que el gen CRX (cone-rod homeobox protein) se ve afectado por la expresión de ataxina-7 mutante (mATXN7) (La Spada et al., 2001). El gen *ATXN7* se expresa principalmente en células fotorreceptoras y controla la expresión de muchos genes específicos para fotorreceptores. La mutación en este gen provoca una distrofia de cono-bastón autosómica, mientras que los ratones sin este gen presentan degeneración retinal progresiva, pérdida de funciones visuales y reducciones en los niveles de expresión de genes que son activados por la proteína CRX (Furukawa et al., 1999; La Spada et al., 2001). En el estudio de Yvert et al, se determinó que además de las inclusiones nucleares en bastones, un tracto polyQ expandido en ataxina-7 también genera inclusiones en células de Purkinje, causando disfunción y

degeneración celular (Yvert, 2000).

En tejidos post mortem obtenidos de cerebelos de pacientes con SCA7, se ha observado una marcada disminución de neuronas en la capa de células de Purkinje, del núcleo dentado y de células granulosas (Horton et al., 2012). Además, se ha observado neurodegeneración en estructuras cerebelares como el telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, el bulbo raquídeo y la médula espinal (Martin, 2012). La disminución de las neuronas, más específicamente las células de Purkinje (PC), las neuronas del Olivo Inferior (IO) y las células gliales de Bergmann (BG), puede ser en parte explicada por el proceso de excitotoxicidad que ocurre en las mismas. Este fenómeno patológico ocurre cuando las neuronas reciben una estimulación excesiva en sus receptores debido a una alta cantidad de neurotransmisores como el glutamato. Este exceso de neurotransmisores en el ambiente provoca que altos niveles de iones de calcio (Ca^{2+}) entren a la célula, activando varias enzimas, incluidas las fosfolipasas, endonucleasas, proteasas, etc. que a su vez dañan estructuras celulares como la membrana celular y el ADN (Jaiswal et al., 2009). En el contexto de SCA7, debido a la estrecha relación interdependiente que tienen estos tres tipos de células (PC, IO y BG), cuando una de ellas se ve afectada por la mATXN7, las demás se ven afectadas ya sea por pérdida de soporte trófico, o por la liberación de altas cantidades de factores inflamatorios o excitotóxicos (Figura 2) (Furrer et al., 2011).

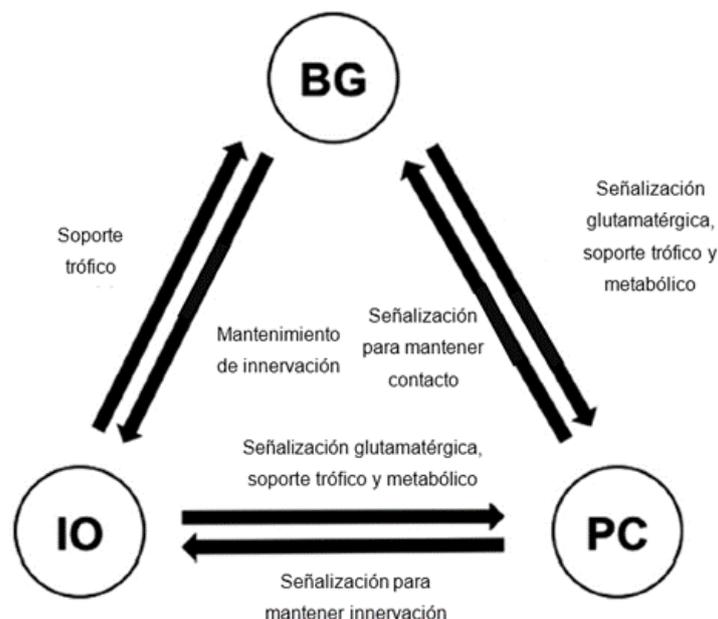


Figura 2: Conexiones interdependientes entre los tipos de neurona afectados en SCA7. BG = Glia de Bergmann, PC = Células de Purkinje, IO = Neuronas de Olivo Inferior. Modificado de Furrer et al., 2011.

1.4. Mecanismos moleculares de patogénesis

El gen *ATXN7* codifica la proteína ataxina-7, una proteína mayormente nuclear que se transporta entre el núcleo y el citoplasma. La caspasa 7 promueve la degradación por autofagia de la mATXN7, sin embargo, debido a la acetilación aberrante de los fragmentos proteolíticos resultantes, estos no se pueden degradar, por lo que ocurre una acumulación de mATXN7 dentro de la célula. Estos fragmentos son lo suficientemente pequeños para entrar al núcleo, pero, al no incluir el dominio de exportación nuclear (NES), no pueden salir del núcleo (Figura 3) (Goswami et al., 2022; Yu, 2015). A su vez, los clastosomas, los cuales están encargados de degradar la mATXN7 mediante proteosomas, se ven

rebasados, causando una acumulación de la mATXN7 en el núcleo. Esta acumulación provoca un fenómeno de secuestro de componentes nucleares, alterando los procesos que se llevan a cabo dentro del núcleo. Uno de los componentes que se ve más afectado es el complejo multiprotéico Spt-Ada-Gcn5-acetiltransferasa (SAGA), el cual es un coactivador transcripcional que se encarga de la remodelación de la cromatina. La ataxina-7 es un componente central de dicho complejo y gracias a su región ZFN, interactúa con otro componente de SAGA, el cual tiene funciones de histona acetiltransferasa: KAT2A (GCN5L2) (Helmlinger, 2004). La unión de mATXN7 con GCN5L2 causa la inactivación de este, evitando la acetilación de la histona H3, y, por lo tanto, previniendo la activación de varios genes, incluidos: *CBP*, *p53* y *RORalpha1* (Palhan et al., 2005). Aunado a esto, debido a que la ataxina-7 ayuda a generar una interacción correcta de los microtúbulos, es posible que su acumulación nuclear provoque bajas cantidades de la ataxina-7 en el citoplasma, provocando una red de microtúbulos inestable (Nakamura et al., 2011). Así mismo, la desregulación del funcionamiento del complejo SAGA provoca que haya una reducida cantidad del pri-miR-124, un miRNA altamente involucrado en la biogénesis de células neuronales y retinales. Este miRNA regula la traducción de los transcritos de *ATXN7*, al mismo tiempo que los transcritos de *ATXN7* regulan la expresión de este miRNA. Por lo tanto, en SCA7, la baja producción de este miRNA provoca un aumento en la expresión de mATXN7, generando menores niveles de dicho miRNA (Figura 4) (Tan et al., 2014).



Figura 3: Estructura de la proteína ataxina-7. Los repetidos CAG ocurren en la región PolyQ. ZFN: Dominio de dedos de Zinc PTM: Modificaciones post-traduccionales NES: Señal de exportación nuclear NLS: Señal de localización nuclear. Modificada de Niewiadomska-Cimicka, A., & Trottier, Y. 2019.

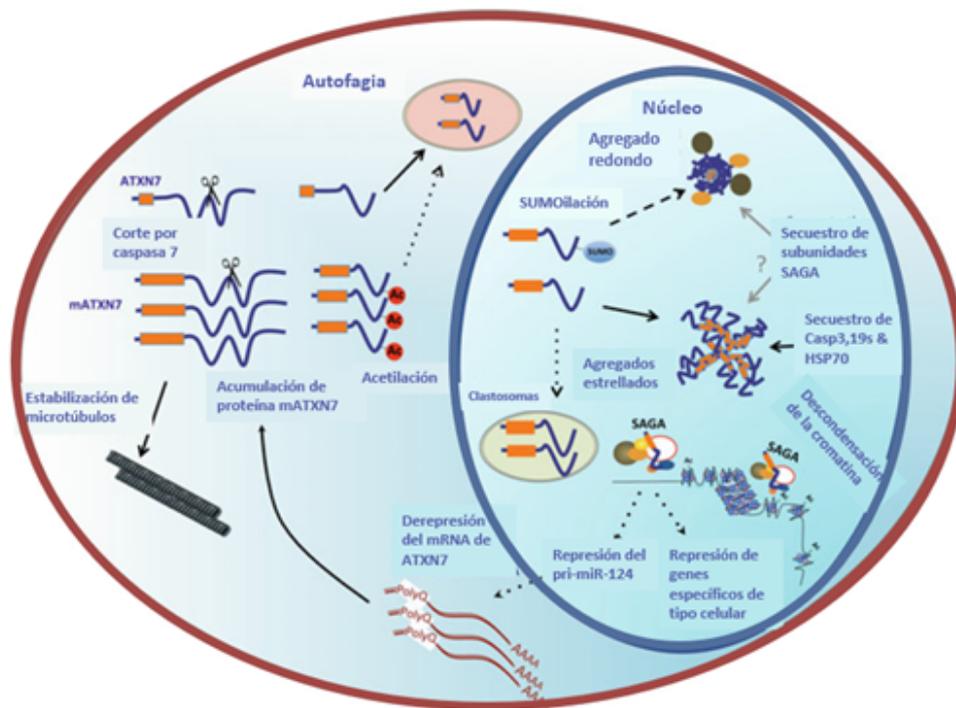


Figura 4: Diagrama representativo sobre los efectos de la proteína mATXN7 en el núcleo y citoplasma de la célula afectada. Modificado de Karam & Trottier, 2018.

1.5. Estrategias terapéuticas

Las enfermedades PolyQ son enfermedades incurables a la fecha, para las cuales existen únicamente tratamientos paliativos. Sin embargo, se han abordado experimentalmente algunas estrategias terapéuticas con diferentes niveles de éxito. Algunas de ellas son las siguientes:

- Administración de ceftriaxona para evitar la degeneración de las células de Purkinje, atrasando la aparición o el avance de la enfermedad (Lee et al., 2008; Niewiadomska-Cimicka & Trottier, 2019).
- Sobreexpresión del factor de crecimiento de hepatocitos, previniendo la contracción en el tamaño de las células de Purkinje (Ieraci et al., 2002; Niewiadomska-Cimicka & Trottier, 2019).
- Aplicación de interferón beta, factor que fomenta la limpieza de mATXN7, mejorando las habilidades motrices en ratones (Chort et al., 2013); Niewiadomska-Cimicka & Trottier, 2019).
- Uso de vectores virales adeno-asociados para introducir miRNAs dirigidos a transcritos de *ATXN7*, reduciendo la cantidad de *ATXN7* expresada y mejorando drásticamente las funciones motrices y estado cerebral (Ramachandran et al., 2014a; Niewiadomska-Cimicka & Trottier, 2019).
- Uso de oligos antisentido (ASOs) y siRNAs para el tratamiento a corto plazo de la enfermedad de Huntington mediante unión de estos al transcrito de *Htt*, previniendo su traducción. Sin embargo, esta terapia requiere una dosis cada 2 meses, por lo que no es una terapia conveniente para el paciente (Evers et al., 2014).

- Uso de shRNAs para terapia a largo plazo de Huntington mediante la unión del shRNA al transcrito de Htt y vectores virales. Esta estrategia resultó tener efectos citotóxicos, por lo que no es una terapia viable (Miniarikova et al., 2018).
- Uso de vectores adeno-asociados para introducir miRNAs dirigidos contra el transcrito de Htt mutante. En este estudio se llegó a la conclusión de que este método de entrega de RNA es seguro y efectivo (Pfister et al., 2018; Miniarikova et al., 2018).
- Uso de siRNAs para reducir la expresión de transcritos de *ATXN7*, disminuyendo la cantidad de mRNA y proteínas en la zona tratada. Sin embargo, los niveles de transcrito de *ATXN7* saludable se ven afectados de manera considerable (Ramachandran et al., 2014b).
- Uso de ASOs para el tratamiento de la degeneración retiniana en SCA7, reduciendo agregados nucleares y mejorando la estructura alterada de las capas celulares. Esta terapia resultó ser efectiva para mejorar el fenotipo ocular, sin embargo, no se observaron cambios sobre la sintomatología neuromuscular (Niu et al., 2018).
- Uso de tecnología CRISPR-Cas13a dirigida contra el mRNA mutante de Htt, mejorando el fenotipo en ratones (Morelli et al., 2022). Esta estrategia resultó ser efectiva en la reducción del transcrito de Htt mutante, por lo que la aplicación de esta estrategia puede ser viable en SCA7.

Mientras que algunas de estas estrategias resultan tóxicas para las células, otras no están dirigidas directamente al alelo mutado, por lo que también reducen la expresión de la proteína wild type. Otras requieren

constantes reaplicaciones del tratamiento, lo cual puede disminuir drásticamente la calidad de vida del paciente.

1.6. Sistema CRISPR-Cas13

El sistema CRISPR-Cas es un sistema de defensa procariótica natural que actúa contra virus y bacterias. Estos sistemas discriminan el material genético foráneo del hospedero, identificándolo y manteniéndolo en forma de matrices CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas) (Collias & Beisel, 2021; Kordyś et al., 2021). A estas secuencias se les llama espaciadores, los cuales están compuestos de regiones repetidas. Estos espaciadores sirven como una biblioteca de infecciones previas, por lo que, al ser infectados por un organismo que se ha identificado previamente, se transcribe la región espaciadora para convertirlo en un ARN CRISPR precursor (pre-crRNA), siendo posteriormente procesado a su forma madura, el ARN CRISPR (crRNA). Este crRNA es una secuencia de ssRNA complementaria al ácido nucleico foráneo, por lo que se puede unir al mismo. Adicional a esta secuencia, se transcribe la secuencia de Repetidos Directos (DR) en conjunto con el crRNA. Este DR es una secuencia específica dependiente del tipo de Cas13 (Proteínas asociadas a CRISPR), la cual será reconocida por dicha proteína. El conjunto de crRNA y DR es llamado ARN de guía única (sgRNA). Después, la proteína Cas 13 se une al sgRNA, formando un complejo que posteriormente reconoce al ácido nucleico foráneo y lo degrada (Figura 5) (Kordyś et al., 2021; Barrangou et al., 2007).

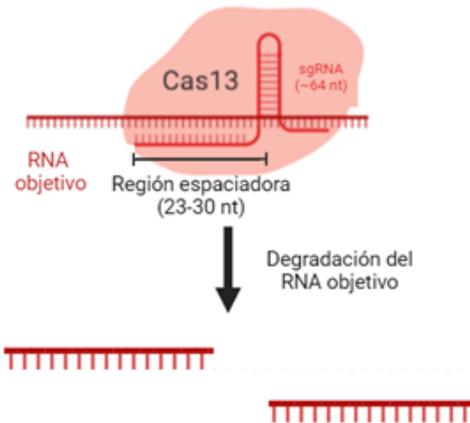


Figura 5: Diagrama representativo del sistema CRISPR-Cas13.

Los sistemas CRISPR-Cas se clasifican en seis tipos separados en dos clases diferentes. Las clases definen la cantidad de proteínas efectoras que requiere el sistema para funcionar de manera adecuada. En el caso de los sistemas clase 2, solo se requiere una proteína efectora, por lo que son los más utilizados en aplicaciones de biología molecular. El sistema CRISPR-Cas13 es de clase 2 tipo VI, requiere de la nucleasa Cas13 para degradar exclusivamente el ARN blanco, sin degradar regiones no deseadas del genoma en comparación con el sistema CRISPR-Cas9 (Kordyś et al., 2021).

2. Justificación

Debido a que la SCA7 es una enfermedad incurable y los únicos tratamientos que existen a la fecha son paliativos enfocados en mejorar la calidad de vida del paciente, existe la necesidad de desarrollar terapias más efectivas para el tratamiento de esta enfermedad. Es por esto que este trabajo pretende desarrollar un sistema que degrade el ARN mensajero mutado de SCA7 en fibroblastos de pacientes, usando el sistema CRISPR Cas13. El desarrollo de este trabajo permitirá establecer la efectividad *in vitro* del sistema CRISPR Cas13 en el contexto celular de SCA7.

3. Hipótesis

Si se implementa de manera adecuada el sistema CRISPR-Cas13, se podrán reducir los niveles de transcrito de mATXN7 en fibroblastos de pacientes con SCA7.

4. Objetivos

4.1. General

Implementar un método de degradación del ARN mensajero de *ATXN7* utilizando el sistema CRISPR/Cas13a.

4.2. Específicos

1. Caracterizar cultivos de fibroblastos derivados de pacientes con SCA7.
2. Diseñar *in silico* crRNAs dirigidos al RNA mensajero de *ATXN7*.
3. Clonar los crRNAs en el vector de sobreexpresión pc0040-LwaCas13a_crRNA, subclonarlos en el vector de transferencia pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4 y confirmar la integridad mediante PCR y secuenciación tipo Sanger.
4. Determinar la expresión de la nucleasa Cas13 a partir del plásmido pC034 - LwCas13a-msfGFP-2A-Blast.
5. Expresar de manera estable la nucleasa Cas13 en fibroblastos de SCA7 mediante infección lentiviral
6. Estandarizar la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de transcrito de *ATXN7* en fibroblastos de SCA7.

5. Alcance

Este trabajo tiene como metas implementar el sistema CRISPR/Cas13a en un modelo *in vitro* de SCA7. Por una parte, se busca confirmar el genotipo de los fibroblastos de pacientes con SCA7, determinar la expresión de *ATXN7* y determinar la presencia de un SNP asociado con la mutación. Por otro lado, se clonarán crRNAs dirigidos a diferentes regiones del transcrito *ATXN7* y se generarán fibroblastos que expresen de manera estable la proteína LwCas13a. Este proyecto busca sentar las bases de una estrategia terapéutica dirigida a degradar el transcrito mutante de SCA7 en fibroblastos humanos mediante el uso del sistema CRISPR/Cas13a.

6. Metodología

6.1. Plan de trabajo

Mediante PCR, TP-PCR y electroforesis capilar se determinó el número de repetidos CAG en los fibroblastos derivados de individuos sanos (GM03440) y de pacientes con SCA7 (GM03561), y se determinó la presencia del RNA mensajero de ataxina-7 mediante RT-PCR utilizando como referencia *Actina β* . Mediante PCR se analizó la presencia del SNP rs3774729, asociado con SCA7 (Scholefield et al., 2014; Greenberg et al., 2006) (Figura 6).

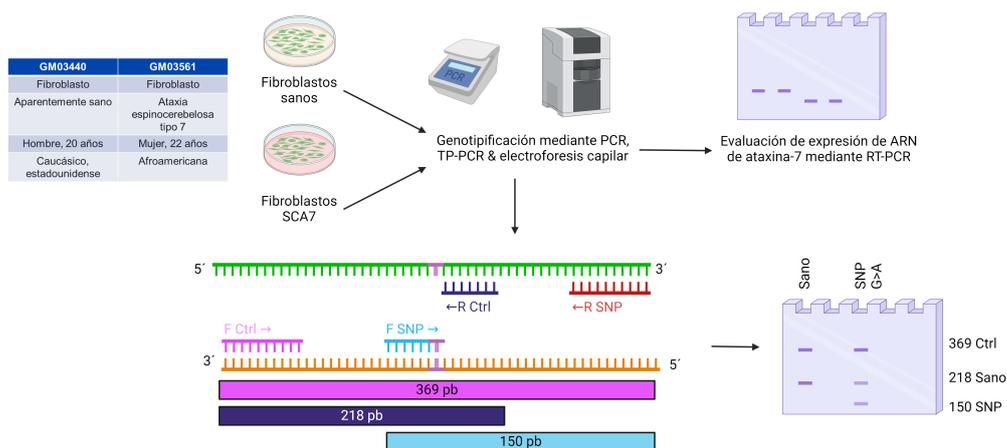


Figura 6: Genotipificación de GM03440 y GM03561. Además de confirmar la presencia de la mutación y evaluar la expresión de ataxina-7 a nivel de RNA, se determinó la presencia del SNP rs3774729 en los fibroblastos GM03561.

Posteriormente, se determinó la accesibilidad y la estructura secundaria del transcrito *ATXN7* para el diseño de los crRNAs utilizando los softwares

RNAfold, RNAs y CASilico (Tafer et al., 2008; Gruerb et al., 2006). Se diseñaron tres diferentes crRNAs: 1) dirigido a la región más accesible, 2) dirigido al SNP rs3774729, 3) dirigido al repetido CAG (Figura 7).

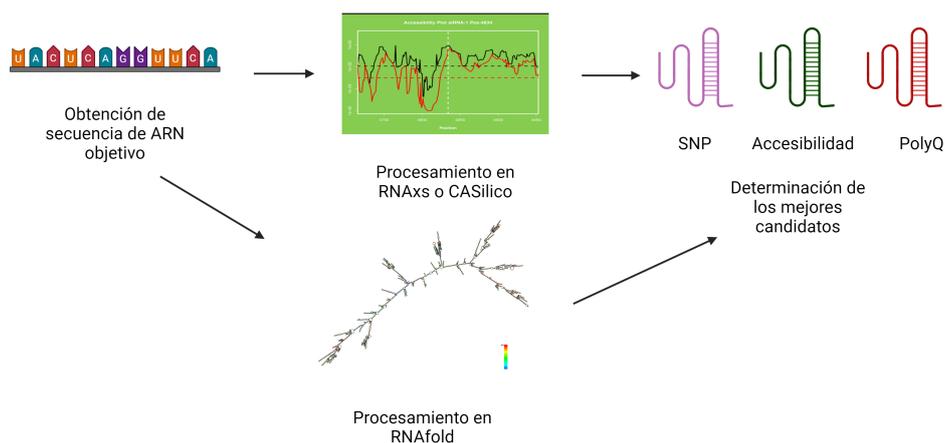


Figura 7: Diseño *in silico* de crRNAs. Se seleccionó a los mejores candidatos mediante la evaluación de 4 parámetros principales: Accesibilidad del RNA de 16 nucleótidos, Asimetría de la secuencia, autoplegabilidad y terminales libres.

La estrategia para la clonación de los crRNAs consistió en la generación de dúplex de ADN y ligación de cada crRNA en el plásmido pc0040-LwaCas13a_crRNA mediante digestión enzimática con la enzima BbsI, y mediante secuenciación tipo Sanger se confirmó la integridad de la secuencia clonada (Figura 8).

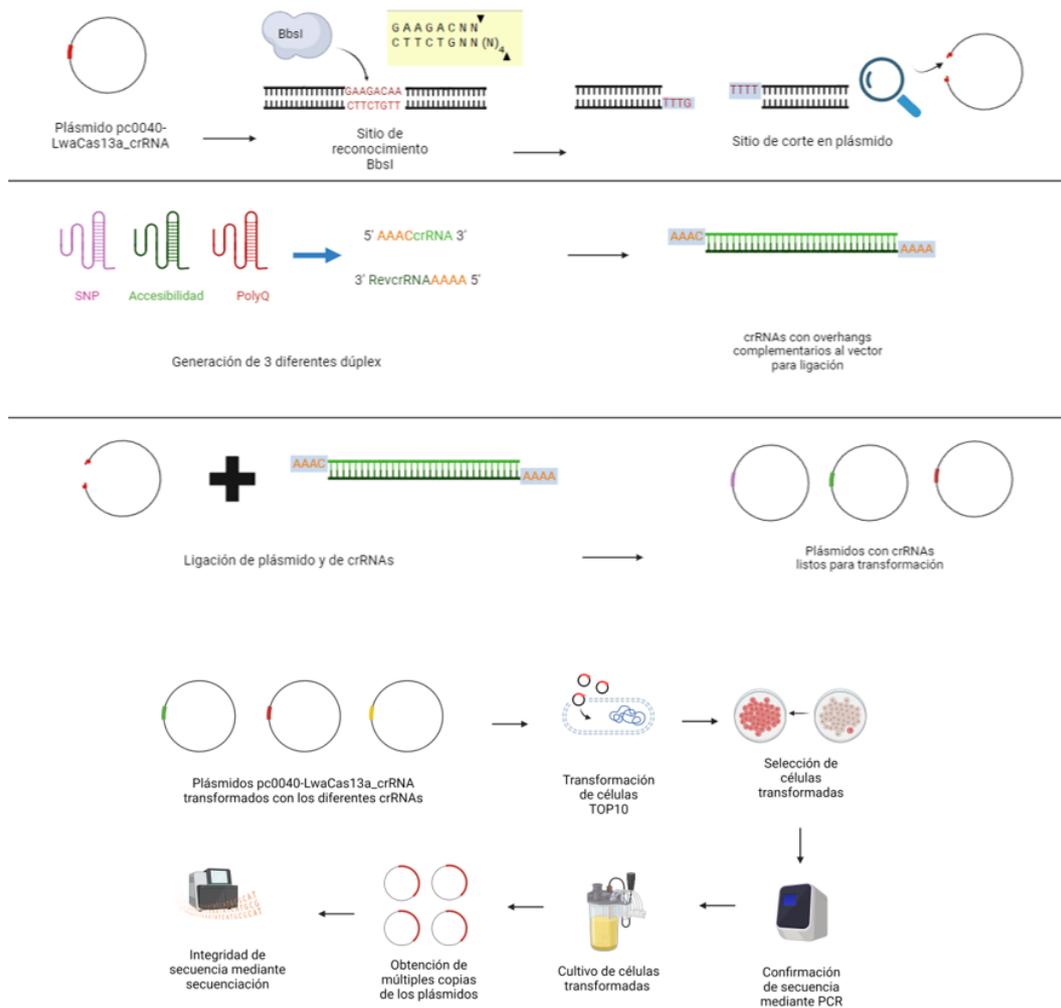


Figura 8: Clonación de los crRNAs en el plásmido pc0040-LwaCas13a_crRNA mediante Golden Gate Assembly. Verificación de la secuencia del plásmido mediante secuenciación de plásmidos aislados mediante MidiPrep.

A continuación, se subclonaron en el vector lentiviral pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4 (vector de transferencia) los sgRNAs generados previamente. Esto se realizó mediante la amplificación por PCR de dichos productos y su posterior digestión y ligación con dicho vector

(Figura 9).

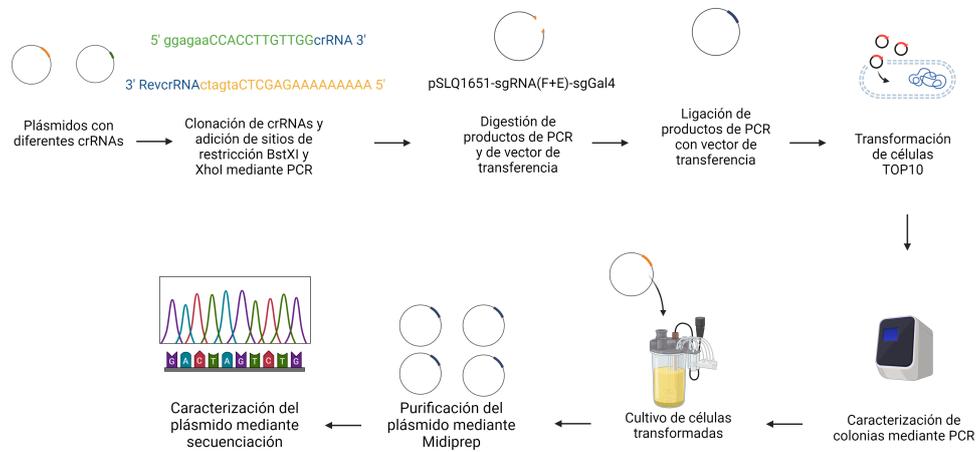


Figura 9: Amplificación de los sgRNAs generados en el vector pc0040-LwCas13a_crRNA para su posterior inserción en el vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4.

Adicionalmente, para cubrir el objetivo 4, el plásmido pC034 - LwCas13a-msfGFP-2A-Blast se caracterizó mediante PCR y digestión enzimática. Posteriormente, tras una transfección transitoria en células HeLa, se evaluó la expresión de la nucleasa LwCas13a mediante Western Blot e inmunofluorescencia (Figura 10).

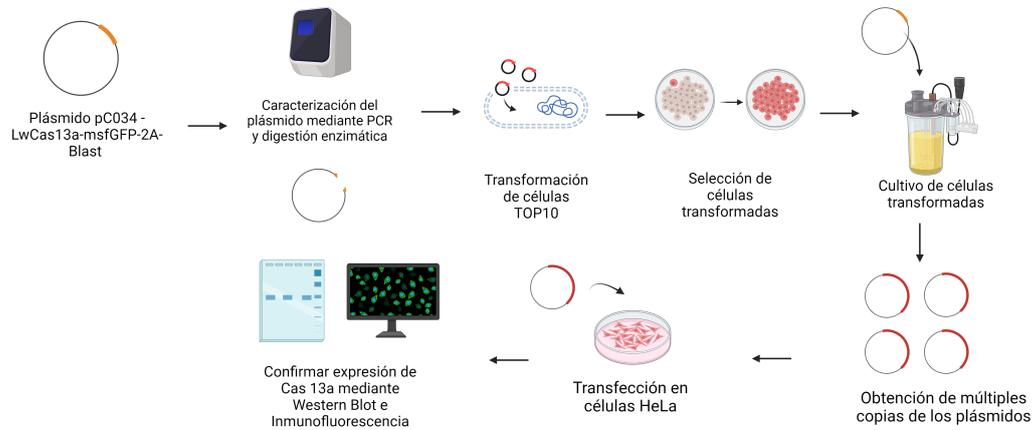


Figura 10: Caracterización del plásmido pC034-LwCas13a_msGFP-2A-Blast.

La generación de partículas virales se realizó mediante cotransfección de los vectores de transferencia (pC034-LwCas13a_msGFP-2A-Blast), de empaquetamiento (psPAX2) y de envoltura (pCMV-VSV-G) a células permisivas Lenti-X. Después, se recuperó del sobrenadante a las partículas virales generadas por dichas células y se transdujeron los fibroblastos GM03561. La expresión de la nucleasa LwCas13a se evaluó mediante fluorescencia y western blot (Figura 11).

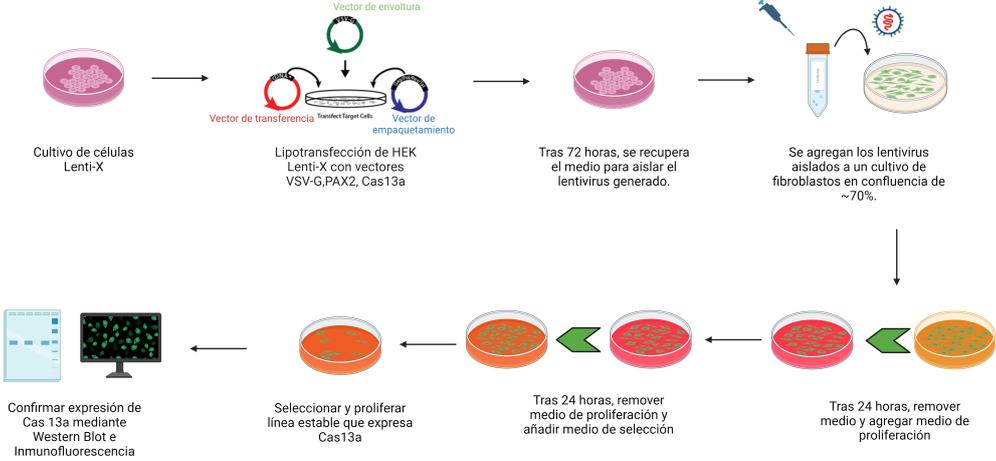


Figura 11: Generación de vector de transferencia, transducción en fibroblastos y confirmación de la expresión de LwCas13a.

Finalmente se estandarizaron las condiciones de RT-qPCR en fibroblastos GM03440 y GM03561 para medir los niveles del RNA mensajero de *ATXN7* utilizando como gen de referencia TBP (Figura 12).

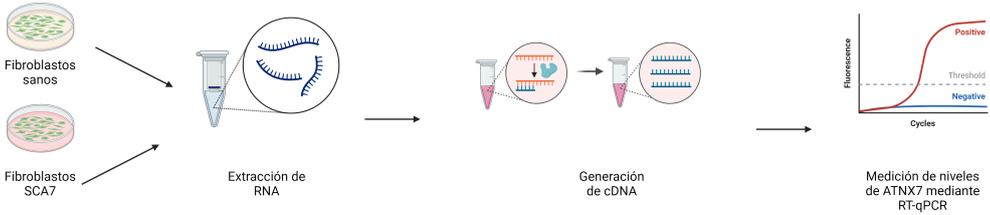


Figura 12: Proceso de estandarización de RT-qPCR para medición de niveles de *ATXN7*.

6.2. Métodos

6.2.1. Cultivo de células

Los fibroblastos GM03440 y GM03561 obtenidos del Instituto Coriell se cultivaron en medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino al 15% y Penicilina (100 U/mL) Estreptomicina (100 μ g/ml) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Las células HeLa y las HEK Lenti-X 293T se cultivaron en medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y Penicilina (100 U/mL) Estreptomicina (100 μ g/ml) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

6.2.2. Ensayos de resistencia a antibióticos (Puromicina y Blastidina)

Se sembraron 2,000 células GM03561 en placas de 48 pozos, 24 h después lavaron las células con PBS y se añadió medio DMEM suplementado con diferentes concentraciones de Puromicina (0.05 - 0.8 ng/ μ l) o Blastidina (2-10 ng/ μ l). Después, se realizó un conteo de células en una Cámara de Neubauer Improved y azul de tripano al 0.4% a los días 1, 3, 5 y 7.

6.2.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa recombinante de la marca Invitrogen. Las mezclas de la reacción consistieron en buffer 1x (20mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl) oligo F/R 10 μ M, MgCl₂ 50 mM en un volumen final de 25 μ l. Los primers utilizados se describen en la Tabla 1.

Tabla 1: Primers utilizados en el proyecto

Nombre	Secuencia	Uso
Fwd Ctrl	GAGCCCTGCTGAATCCATCA	
Rev Ctrl	GTGTTTCATGTGGACATTGTTTAC	
Fwd MutA	TGCCAAAGTGCCAGCCa	Identificación de SNP rs3774729
Rev MutA	ACCAACCAACCCAACCAAACAC	
Acc F	AAACAAGAAGGAAAATACTGAAGTGGGAGGAA	Formación de dúplex
Acc R	AAAATTCCTCCCCTTCAGTATTTTCCTTCTT	Accesibilidad
CAG F	AAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT	Formación de dúplex
CAG R	AAAAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	PolyQ
SNP F	AAACTGTGGACATTGTTCaTGGCTGGCACTTT	Formación de dúplex
SNP R	AAAAAAGTGCCAGCCaTGAACAATGTCCACA	SNP
Pc0040 F	TGGAAAGGACGAAACACCGA	PCR de colonias para confirmar inserción
Pc0040 R	CAGGGTTTTCCCAGTCACGA	
Pc0040 Seq	TTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTT	Secuenciación de vector con inserto de crRNA
Fwd Universal	GGAGAACCACCTTGTTGGGATTTAGACTACCCCAAAAA	Clonación de sgRNAs a plásmido de transferencia para infección lentiviral
R SNP	CTAGTACTCGAGAAAAAGTGCCAGCCATGAACAA	
R Acc	CTAGTACTCGAGAATTCCTCCCCTTCAGTATTTTC	
R CAG	CTAGTACTCGAGAAAGCAGCAGCAGCAGCAG	
qATXN7 F	AAGTGATGCTGGGACAGTCCG	
qATXN7 R	ATTGGCATGTCTTCCCGACA	Ensayo RT-qPCR de ATXN7
TBP F	GCTGTTTAACTTCGCTTCCG	
TBP R	TCCTTGGGTATCTTCACACG	

6.2.4. Triplet repeat primed PCR (TP-PCR)

La caracterización de la expansión de los repetidos CAG en los fibroblastos se realizó por TP-PCR y electroforesis capilar (Magaña et al., 2013). Esta PCR fluorescente multiplex consiste en utilizar primers quiméricos los cuales brindan un amplicón con un tamaño base (dependiendo del tipo de ADCA que este presente en la muestra) que permite determinar la cantidad de repetidos. En el caso de la SCA7, el amplicón base es de 314 pb, a los cuales se le adiciona la cantidad de repetidos CAG. Esta técnica nos permite determinar con precisión la cantidad de repetidos en las muestras utilizadas (Dorschner et al., 2002).

6.2.5. Extracción de proteínas mediante lisis con buffer triple detergente

Tras obtener cultivos confluentes, se hicieron dos lavados con PBS y se añadieron entre 50-80 μ l de Buffer Triple Detergente (50 μ M TrisCL pH 8.0, 150 μ M NaCl, SDS 0.1%, NP40 1%, Desoxicolato de Sodio 0.5%) suplementado con, 1mM PMSF y Complete 1X. Las células se recuperaron por raspado de la caja con gendarme y el extracto se incubó en hielo durante 30 min mezclando cada 5 min., El extracto se clarificó mediante centrifugación a 12,000 g x 3 y se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 mL. El extracto se almacenó a -20°C.

6.2.6. Western Blot

Los extractos proteicos se separaron mediante SDS -PAGE usando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 10%. Posteriormente, la transferencia se realizó en una cámara semi-húmeda con una membrana de PVDF por 25 minutos a 10 V. La membrana se tiñó con Rojo de Ponceau para verificar la transferencia de proteínas. Posteriormente, se realizó el bloqueo de la membrana con leche libre de grasa al 6% por 1 hora. Enseguida, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti GFP (sc 9996) por 1 noche a 4°C diluido 1:300. Al terminar la incubación, se realizaron 3 lavados con 50 ml de TBST, de 5, 10 y 15 minutos, cada uno. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario anti ratón (ab6728) diluido 1:15:000 en leche al 3% por 1 hora a temperatura ambiente. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando ECL de la marca Abcam (ab1334406) y exposición a placas autorradiográficas.

6.2.7. Análisis de la estructura y accesibilidad

Para definir las secuencias a las que el fragmento del spacer del sgRNA va dirigido, se utilizaron dos softwares diferentes: RNAs (Tafer et al., 2008) y CASilico (Asadbeigi et al., 2022).

Para el software de RNAs, la secuencia de RNA de la isoforma *ATXN7a* se cargó a dicho programa. Tras el procesamiento se seleccionaron los crRNAs adecuados (el más accesible al transcrito y que contiene la región con el SNP rs3774729) utilizando el parámetro de Access 16 nts. Posteriormente, se añadieron 6 nucleótidos a cada sentido del crRNA para obtener una secuencia de 28 nucleótidos. Finalmente, se acoplaron las bases complementarias al plásmido pc0040-LwaCas13a_crRNA para la ligación del dúplex que se formó con los crRNAs. En el caso del guía dirigido a la región más accesible, se optó por utilizar la segunda región más accesible, debido al alto contenido de timinas en la región con mayor parámetro de accesibilidad.

Para el software de CASilico en RStudio, se corrió la secuencia de la isoforma *ATXN7a*, pero añadiendo repetidos CAG hasta tener 54 de los mismos en la región de PolyQ. En este caso, se recuperaron los parámetros de accesibilidad del programa tras determinar la secuencia del espaciador del sgRNA.

6.2.8. Formación de dúplex

Se mezclaron 10 μ l de cada oligo (forward y reverse) a partir de diluciones de 150 ng/ μ l preparadas en Buffer de Dúplex (Acetato de potasio 100mM; HEPES 30 mM; pH 7.5). Posteriormente, las soluciones de oligos se incubaron a 95°C durante 10 minutos en un termociclador. Al finalizar este tiempo, para cada dúplex se incubó a $T_m - 5^\circ\text{C}$ por 10 minutos

y finalmente cada dúplex se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez a temperatura ambiente, los dúplex se congelan para su posterior uso. La formación de dúplex se confirmó mediante corrimiento en geles de acrilamida/bisacrilamida al 20% teñidos con SybrSAFE (Invitrogen S33102)

6.2.9. Generación de bacterias calcio competentes

Como primer paso, se preparó el cultivo de células a transformar desde 1 noche antes (1mL de medio LB, a 37°C y 200 rpm), y se incubó de 12-16 horas.

Terminada la incubación, se añadió 1 mL del cultivo a 99 mL de medio LB fresco y se incubó en las mismas condiciones hasta que la DO fue de 0.6. Posteriormente, se separó el medio en diferentes tubos Falcon de 50 mL y se incubó por 20 min en hielo. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 4°C a 4000 rpm por 10 minutos. Después, se desechó el sobrenadante y se aspiró el medio residual. A continuación, se resuspendió cada pastilla en 20 mL de solución 0.1M de CaCl₂ fría y se incubó por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó con las condiciones previas. Finalmente, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las pastillas con 5 mL de solución 0.1M CaCl₂ con 15% glicerol y se almacenaron a -70°C o utilizaron para transformación.

6.2.10. Transformación por choque térmico

Células TOP10 competentes se transformaron mediante choque térmico con 2-10 μ l de plásmido. Después, las bacterias se incubaron en hielo por 30 minutos y posteriormente a 42°C por 90 segundos para incubar nuevamente en hielo por 5 minutos. Posteriormente, las bacterias

se incubaron en medio LB a 37°C con agitación por 1 hora y se sembraron en una placa con medio LB ampicilina a 37°C por 16 hr.

6.2.11. Obtención de plásmido por lisis alcalina

A partir de cultivos bacterianos de 15 ml en medio LB con 100 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina, se inocularon 250 μl de medio en un nuevo cultivo con 50 ml de a 37°C por 16 horas. A partir de este cultivo, el DNA plasmídico se obtuvo siguiendo las indicaciones del kit ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit o del QIAGEN™ Plasmid Midi Kit.

6.2.12. Secuenciación por método de Sanger

Para este método, tras obtener los plásmidos purificados, se utilizaron 200 ng de ADN plasmídico y el kit BigDye siguiendo las instrucción del proveedor en reacciones de 20 μl . Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Tabla 2: Especificaciones para la reacción de secuenciación

Parámetro	Etapa				
	Incubación	Ciclos (30 ciclos)			Refrigeración
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Tasa de cambio		1°C/segundo			
Temperatura	96°	96°	Tm- 5°	60°	4°
Tiempo (mm:ss)	01:00	00:10	00:05	05:00	∞

Los productos de la secuenciación se purificaron en columnas de Zymo-Spin IB, luego de centrifugación a 15,000-16,000 g x 30 segundos se desechó el sobrenadante y se añadieron 300 μl de Sequencing Wash Buffer. Después de un paso de lavado, se añadieron 10 μl de agua inyectable a 42°C y se incubó por 10 minutos. Finalmente, se centrifugó a

15,000-16,000 g x 15 segundos, se añadieron 10 μ l de formamida HiDi al eluyente y el producto se cargó en placas para secuenciar.

6.2.13. Extracción RNA

Se utilizó el kit de extracción de RNA de ZYMO RESEARCH Direct-Zol™ RNA MiniPrep w/TriReagent con Número de catálogo R2051-A. Primero, se utilizó el reactivo de trizol, 350 u 800 μ l para lisar células sembradas en una caja p60 o p100, respectivamente. Posteriormente, se añadió etanol al 96% y se mezcló mediante pipeteo. Se transfirió la muestra una columna y se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos. Se realizó tratamiento con DNAsa, posterior a un lavado de 400 μ l de RNA Wash Buffer. Para ello se preparó una alícuota con 5 μ l de DNAsa (6 U/ μ l) y 75 μ l de DNA Digestion Buffer. Se mezcló por inversión y se añadió a la columna. Tras una incubación de 15 minutos, se añadieron 400 μ l de Direct-zol RNA PreWash y se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos. Se eliminó el eluyente y se repite este paso centrifugando por 1 minuto. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo nuevo, se añadieron 50 μ l de agua libre de RNAsas y se centrifugó en las mismas condiciones. La integridad del ARN se verificó mediante un gel de agarosa al 1% la pureza y el rendimiento se determinaron mediante el uso de un nanodrop.

6.2.14. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó utilizando 500 ng de RNA alicuotado a 10 μ l con agua inyectable. Posteriormente, se mezcló el buffer de Retrotranscripción 10X, mix de dNTPSs (100 mM) 2.5X, Random primers RT 10X, MultiScribe Reverse Transcriptase y agua inyectable. Esta mezcla se llevó a 10 μ l y se añadió a los 10 μ l de RNA (500 ng). Posteriormente,

en un termociclador, se incubó la reacción a 25°C por 10 minutos, después a 37°C por 120 minutos y finalmente a 85°C por 5 minutos.

6.2.15. Digestión enzimática de ADN plasmídico

BbsI

Brevemente, se mezclaron 300-500ng de DNA, 1 μ l de Buffer NEBuffer 2.1 (Tris-acetato 33mM pH 7.9, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM, 0.1 mg/ml de BSA) y 1.5 U de la enzima BbsI.

EcoRI FastDigest

Se mezclaron 2 μ l de buffer 10X Fast Digest, 1 μ l de enzima EcoRI Fast, 1 μ g de ADN a digerir y agua c.b.p. 20 μ l. La incubación se realizó por dos horas y media a 37°C.

BstXI y XhoI

Se mezclaron 2 μ l de NEBuffer 3.1, 1 μ l de enzima BstXI (10 U), 0.5 μ l de Enzima XhoI (10 U), 1 μ g de plásmido a digerir y agua c.b.p. 20 μ l. La incubación se realizó por 12-16 horas a 37°C.

Todos los productos de restricción se evaluaron por corrimiento electroforético a 100 V por 50 minutos en geles de agarosa al 1 % teñidos con SybrSAFE utilizando el ADN no digerido como control.

6.2.16. Purificación de ADN a partir del gel de agarosa

El producto digerido se depositó en un gel de agarosa al 1 % utilizando un pozo doble. Las bandas de interés se cortaron sobre el transiluminador de luz UV y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml. El ADN se

purificó con el kit de extracción PureLink de marca InvitroGen o con el kit de StrataPrep DNA Gel Extraction kit de Agilent Technologies. La banda del gel se solubilizó con buffer L3 a 50°C por 10 min, mezclando por inversión el tubo un par de veces cada 3 minutos. Una vez solubilizada la agarosa, se incubó por 15 minutos adicionales a la misma temperatura. Después, se añadió 1 volumen de isopropanol. La mezcla se cargó a una columna y se centrifugó a 12,000 g x 1 min. Este proceso se repitió 3 veces, recuperando el eluyente después de cada repetición y volviéndolo a depositar en la columna. Posteriormente la columna se lavó con 500 μ l de buffer W1. Para remover el buffer, se centrifugó la columna a 12,000 g por 1 minuto, descartando el eluyente. Después, para remover el etanol presente en el buffer W1, se centrifugó la columna a la máxima velocidad por 2 minutos. Finalmente, el ADN se eluyó con 50 μ l de buffer E5 y una centrifugación a 12,000 g por 1 minuto.

6.2.17. Ligación

Las ligaciones se llevaron a cabo con la enzima T4 DNA ligasa marca Thermo Scientific. Para el caso de la ligación del dúplex con el vector pc0040-LwaCas13a_crRNA, se preparó una mezcla con 100 ng del vector linearizado, y ADN del inserto a una relación molar de 1:5, 2 μ l de buffer T4 DNA ligasa, 1 U de ligasa T4 en un volumen total de 20 μ l. La reacción se incubó a 16°C por 1 noche. En el caso de los productos de PCR que contienen los sgRNAs con el vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4 se realizó con 100 ng de vector digerido y con 50 ng de producto de PCR digerido y con 3 U de ligasa T4.

6.2.18. Lipotransfección en células HeLa

Se transfectaron células HeLa sembradas en una caja p60 o en portaobjetos a una confluencia del 80 %. Inicialmente, en tubos separados, se añadieron las siguientes cantidades de OptiMem, Lipofectamina 2000 y ADN::

Tabla 3: Volúmenes para preparación de lipotransfección

	Cubreobjetos		P60	
Tubo 1	OptiMem	75 μ l	OptiMem	150 μ l
	Lipofectamina 2000	1 μ l	Lipofectamina 2000	2.5 μ l
Tubo 2	OptiMem	75 μ l	OptiMem	150 μ l
	Vector ADN	2 μ g	Vector ADN	5 μ g

Posteriormente, se mezcló el contenido de ambos tubos en un Falcon™ de poliestireno de 5 mL con fondo redondo y se dejó incubar por 5 minutos. Tras finalizar la incubación, se añadieron 500 μ l de medio completo al tubo Falcon™, se homogenizó el contenido y, finalmente, se agregó a las células; las cuales se dejaron incubando por 48 horas.

6.2.19. Generación de vector pSLQ1651 -sgRNA(F+E)-sgGal4 con insertos de sgRNAs

Para la generación del vector de transferencia con los diferentes sgRNAs, tras obtener el plásmido pC0040-LwaCas13a crRNA con los distintos crRNAs, se realizaron distintas PCRs para obtener el sgRNA de cada plásmido, añadiendo los sitios de restricción BstXI y XhoI. Posteriormente, se realizó una digestión con estas enzimas a los productos de PCR y al plásmido pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4. Subsecuentemente, se cargaron las digestiones en un gel de agarosa para

purificar las bandas de la digestión. A continuación, se realizó una ligación de estos fragmentos purificados con el del vector digerido y se utilizó dicha ligación para realizar una transformación por choque térmico de bacterias TOP10. Posteriormente se realizaron PCR de colonia para analizar la incorporación del inserto al plásmido y se realizaron cultivos para la extracción del plásmido mediante MidiPrep. Finalmente, se realizaron reacciones de secuenciación para verificar la integridad de la secuencia.

6.2.20. Infección lentiviral de fibroblastos

Primero se cultivaron células HEK LentiX a una confluencia de 90 %. Después, se realizó una lipotransfección con los vectores de envoltura, empaquetamiento y de transferencia en una relación 1:2:3, respectivamente. Se utilizaron 2 μg del vector VSV-G (envoltura), 4 μg del vector PAX2 (empaquetamiento) y 6 μg del vector de transferencia. Para realizar dicha lipotransfección, primero se utilizaron 24 μl de Lipofectamina 3000 (el doble de la cantidad de plásmido total utilizado) en 125 μl de OptiMem. Después, en otro tubo, se añadieron los plásmidos en las cantidades ya mencionadas con 125 μl de OptiMem. Posteriormente se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó por 20-25 min. Posteriormente se goteó la mezcla en la caja con las HEK LentiX cubiertas con medio OptiMem y se dejó incubar por 5 horas. Pasadas las 5 horas, se removió el medio y se añadió medio de proliferación. Tras una incubación de 48-72 horas, se recuperó el medio y se centrifugó a 500 g x 10 min. Después, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, al cual se le añadieron 3 volúmenes de concentrador. Se mezcló por inversión y se dejó incubar a 4°C por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 1,500 g x 45 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con

1/10 del volumen original utilizando DMEM sin suplementar. A esta mezcla se le añadió polibreno para tener una concentración de 7 $\mu\text{g/ml}$. Esta mezcla se le agregó a fibroblastos en confluencia de 70%. Tras 24 horas, se removió el medio y se añadió medio de proliferación. Finalmente, tras 24 horas, se cambió el medio de proliferación por medio de selección con el antibiótico correspondiente.

6.2.21. RT-qPCR

Para la cuantificación de los niveles de expresión de *ATXN7*, se utilizó la siguiente combinación de reactivos para 1 reacción: 6 μl de SYBR Green 2X PCR Master Mix, 0.5 μl de Primer F 10 μM , 0.5 μl de Primer R 10 μM , 1 μl de mezcla de cDNA (25 μg), y 4 μl de agua inyectable. Cada muestra se midió por triplicado con duplicado técnico. Al terminar la preparación de todas las muestras, se utilizó un programa en el termociclador RotorGene de QIAGEN con las siguientes características: 2 min a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización por 5 segundos a 95°C seguido de alineación y extensión por 10 segundos a 60°C. Al terminar los 40 ciclos, se realizaron curvas Melt desde los 50°C hasta los 99°C con un aumento de 1°C en cada paso. Finalmente, los datos se analizaron utilizando el método de delta delta Ct.

7. Resultados

7.1. Caracterización de cultivos de fibroblastos derivados de pacientes con SCA7

7.1.1. Genotipificación de fibroblastos

La genotipificación de los fibroblastos GM03440 y GM03561 se realizó mediante la medición de los repetidos de CAG en el gen de *ATXN7*. Se determinó que los alelos de las células GM03440 tienen 10 y 12 repetidos, mientras que en los fibroblastos GM03561 hay alelos con 8 y 54 repetidos (Figura 13), confirmándose la presencia de repetidos expandidos CAG con lo cual se pueden utilizar las células GM03561 como modelo de estudio de SCA7.

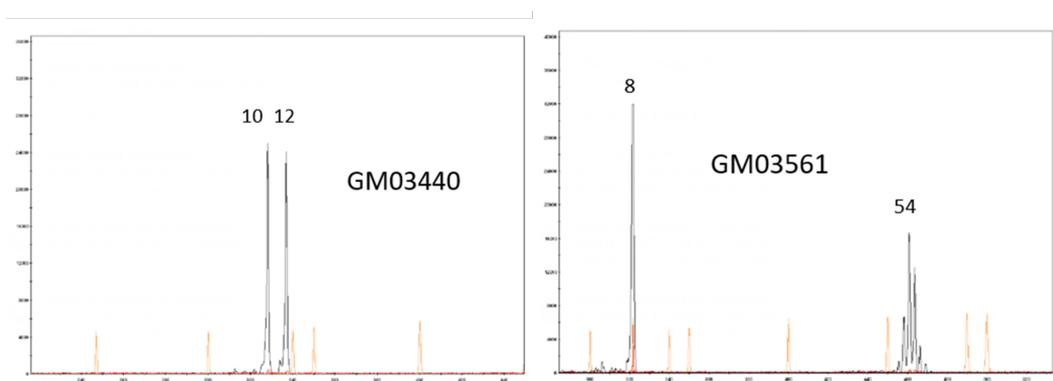


Figura 13: Genotipificación de fibroblastos GM03440 y GM03561 mediante TP-PCR y electroforesis capilar.

Por otro lado, mediante la técnica de tetra primer PCR determinamos la presencia del SNP rs3774729 en los fibroblastos GM03561, ya que se puede observar una banda de 150 pb, cuya amplificación solo es posible

en presencia del SNP en el ADN genómico (Figura 14).

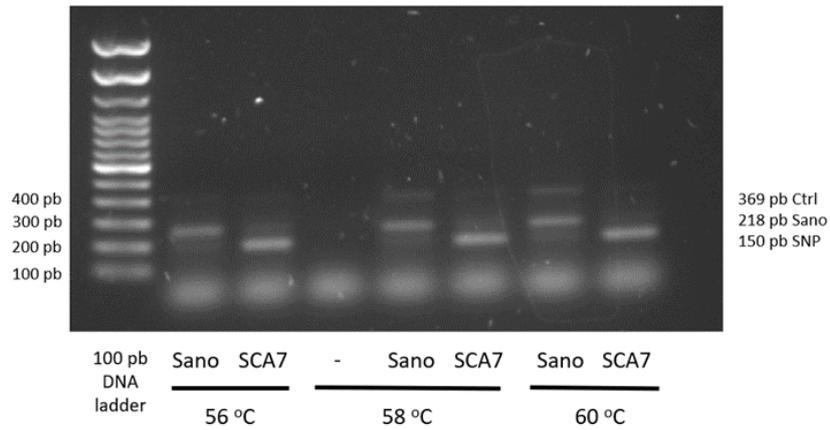


Figura 14: Identificación de la presencia del SNP rs3774729 mediante PCR.

7.1.2. Medición de niveles de expresión de *ATXN7* mediante RT-PCR

Para verificar la expresión de nuestro gen de interés en ambas líneas celulares, se realizó una RT-PCR y se observaron las bandas en los tamaños esperados para *ActB* y *ATXN7* (160 pb y 142 pb, respectivamente).

Tabla 4: Resultados de análisis *in silico* de los crRNAs seleccionados

crRNA	Acc 16 nts	Asimetría	Autoplegabilidad	Terminales libres
SNP	.0268	.75	1	1
Acc	.8729	.75	1	1
PolyQ	.075	.75	.6523	1

7.3. Clonación de crRNAs en el plásmido pc0040-LwaCas13a_crRNA y subclonación en el vector pSLQ1651 -sgRNA(F+E)-sgGal4

7.3.1. Formación de dúplex y transformación

La formación del dúplex a partir de oligos de cadena sencilla, para dar lugar a tres crRNAs distintos: (CAG)₉, dirigido a la región PolyQ; Acc, dirigido a la región de mayor accesibilidad al RNA mensajero; y SNP dirigido a la región donde se encuentra el SNP rs3774729, fue exitosa. Mediante electroforesis en gel de acrilamida al 20% se pudo observar una diferencia en la migración entre los oligonucleótidos de cadena sencilla en comparación con los oligos de doble cadena (Figura 16). A pesar de que los primers de cadena sencilla tienen la misma cantidad de pares de bases que el dúplex, debido a que el dúplex es ADN de doble cadena, su velocidad de migración es más lenta. Por esa razón, se puede observar un retraso en la migración de la banda correspondiente a los dúplex.

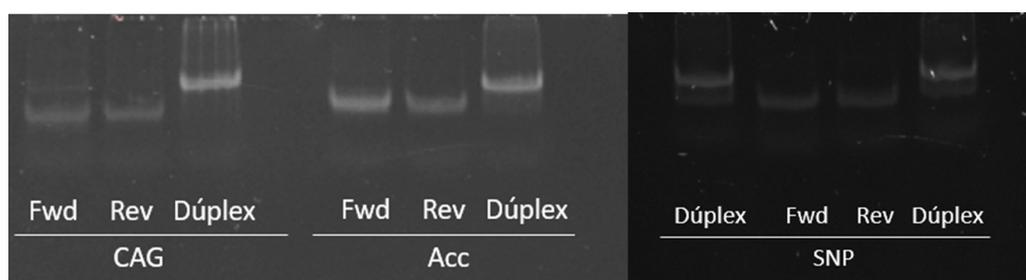


Figura 16: Formación adecuada de dúplex CAG, Acc & SNP.

Posteriormente, cada dúplex se ligó en el plásmido pc0040-LwaCas13a_crRNA y los productos de la ligación se transformaron en bacterias TOP10. En la Tabla 5 se muestra el número de colonias candidatas por cada condición de ligación:

Tabla 5: Colonias transformadas

Inserto	Cantidad al transformar	Volumen de medio en caja	Cantidad de colonias
CAG	5 μ l	50 μ l	0
	10 μ l		2
	5 μ l	150 μ l	15
	10 μ l		3
Acc	5 μ l	50 μ l	0
	10 μ l		4
	5 μ l	150 μ l	2
	10 μ l		11
SNP	10 μ l	150 μ l	13
Plásmido lineal	5 μ l	200 μ l	0
Plásmido cerrado (control de transformación)	5 μ l	50 μ l	+++
Sin antibiótico (control de viabilidad de células competentes)	5 μ l	50 μ l	++++

Posteriormente, se montaron reacciones de PCR con las colonias candidatas seleccionadas para verificar el éxito de la ligación. De acuerdo con el diseño de esta PCR, los fragmentos de amplificación corresponden

con 163bp para la presencia del inserto y 142 bp para un vector sin inserto. Como controles y para tener referencia de los tamaños esperados, se realizó también una PCR para amplificar *ATXN7* y Actina (*ActB*) a partir de cDNA, en la cual los amplicones tienen tamaños de 142 y 160 pb, respectivamente. En la Figura 17 se puede observar que todas las colonias seleccionadas correspondientes al crRNA CAG contienen el inserto deseado, mientras que entre las colonias seleccionadas del crRNA Acc solo una tenía el vector recircularizado, una colonia no amplificó y tres colonias tenían el inserto deseado. Para el crRNA de SNP, solo una colonia tenía plásmido recircularizado y en otras 6 se ligaron correctamente (Figura 17).

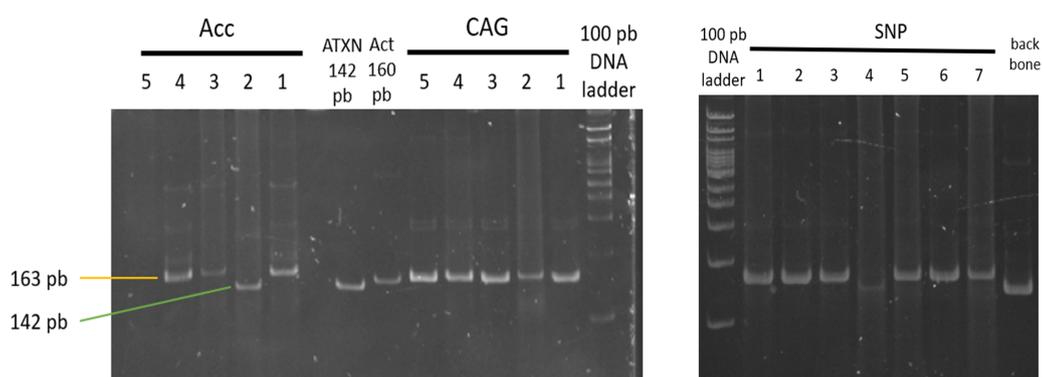


Figura 17: PCR de colonias transformadas.

Posteriormente, se seleccionó una colonia de cada crRNA que tuvo el vector adecuado y se realizó un cultivo para posteriormente aislar el plásmido mediante MidiPrep. Enseguida se realizó una PCR confirmatoria con cada plásmido purificado (Figura 18). En este gel se observa que la amplificación del plásmido con el crRNA de CAG parece tener un tamaño ligeramente más grande que el de Acc. Creemos que esta diferencia en la migración puede deberse al alto contenido de GC en el crRNA CAG, lo

cual probablemente produce estructuras secundarias más complejas que impiden la migración normal del fragmento amplificado. Sin embargo, se puede concluir que los plásmidos con los crRNAs de Acc, CAG y SNP se amplificaron y purificaron de manera exitosa.

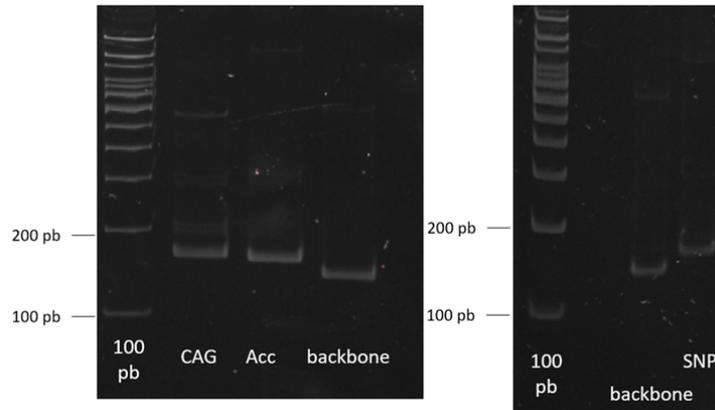


Figura 18: Confirmación de inserciones de crRNAs CAG, Acc & SNP en vectores.

Finalmente, se realizó una secuenciación de tipo Sanger para verificar la identidad del inserto en los plásmidos obtenidos. En estos casos, se puede observar que el inserto de cada plásmido coincide perfectamente con la secuencia esperada, por lo que la clonación de estos crRNAs se realizó de manera exitosa (Figura 19).

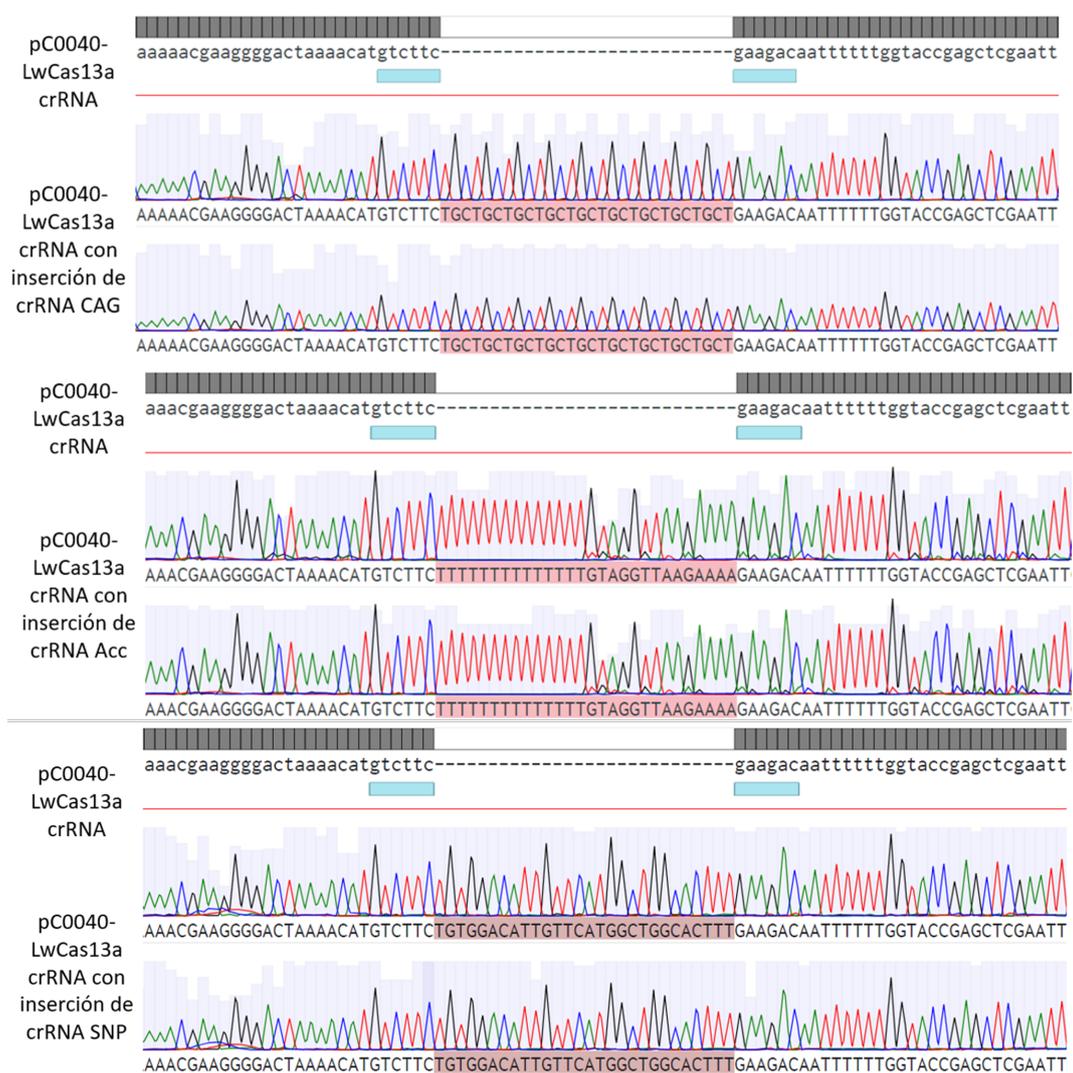


Figura 19: Secuenciación del plásmido con los diferentes insertos correspondientes a las secuencias de los crRNAs.

7.3.2. Generación de vectores lentivirales

Debido a que los vectores generados en el paso anterior no contienen las regiones 5' LTR (Long Terminal Repeat, por sus siglas en inglés) requeridas por los retrovirus para la inserción de secuencias de ADN al genoma, se optó por clonar los diferentes sgRNAs mediante PCR a un

vector que permitiera expresar los sgRNAs en un sistema lentiviral. Tras la amplificación correcta de los sgRNAs, se digirieron tanto los productos de PCR como el vector pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4 para ligar ambos productos. Posteriormente, se procedió a la transformación de bacterias competentes y a la confirmación de la transformación mediante PCR. Finalmente, se secuenciaron los plásmidos obtenidos para verificar la secuencia de los sgRNAs insertados en el vector de expresión lentiviral. La generación de dichos plásmidos fue exitosa, y se confirmó mediante secuenciación (Figura x.). (Figura 20).

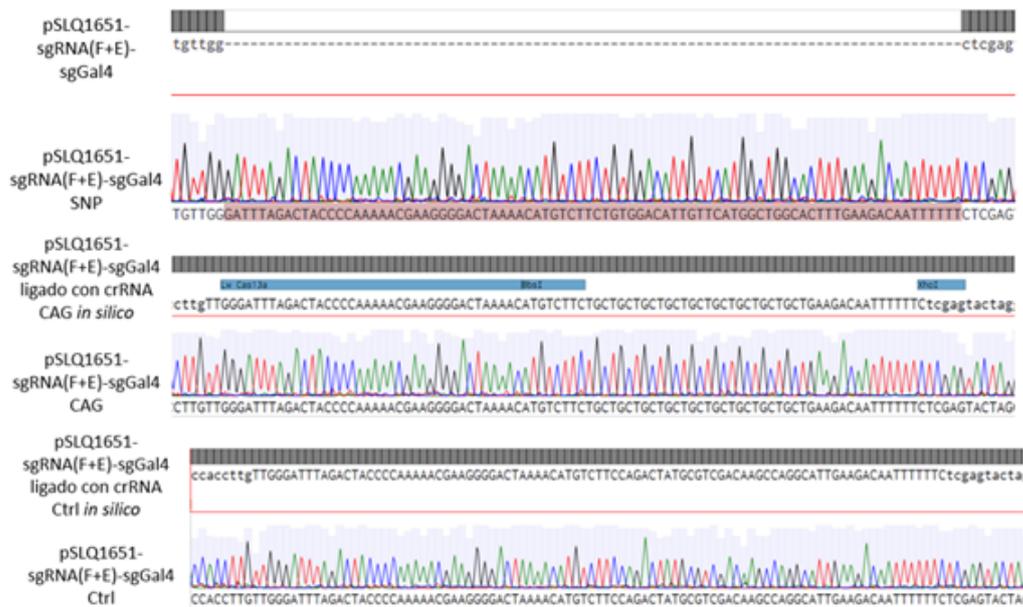


Figura 20: Secuenciación de los plásmidos con diferentes sgRNAs insertados.

7.4. Determinación de la expresión de Cas13 a partir del vector pC034 - LwCas13a-msfGFP-2A-Blast

Primero se realizó una digestión enzimática para comprobar la identidad e integridad del plásmido. Se utilizó la enzima EcoRI, ya que el plásmido tiene dos sitios de corte, con lo cual se generan fragmentos de 1.9 kb y 11.1 kb (Figura 21).

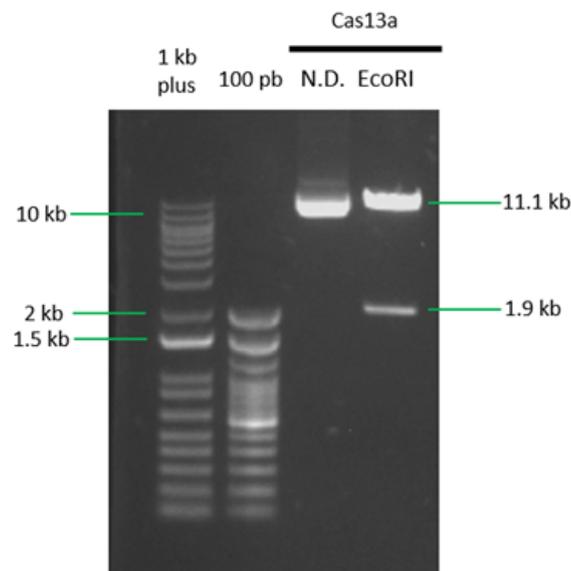


Figura 21: Digestión enzimática con EcoRI del plásmido pC034 - LwCas13a-msfGFP-2A-Blast.

Posteriormente, se realizaron lipotransfecciones en células HeLa para determinar mediante Western blot y microscopía de fluorescencia la expresión de la nucleasa Cas13a fusionada a GFP.

En el Western blot, al utilizar un anticuerpo anti-GFP, pudimos determinar la expresión de la nucleasa Cas13a fusionada a GFP

(LwCas13a-msfGFP), ya que se observa una banda de 171 kDa a partir de extractos proteicos derivados de cultivos transfectados con este plásmido. Por el contrario, observamos una banda de 28kDa a partir de extractos proteicos provenientes de células transfectadas con el plásmido pEGFP-N1 el cual produce solo GFP (Figura 22).

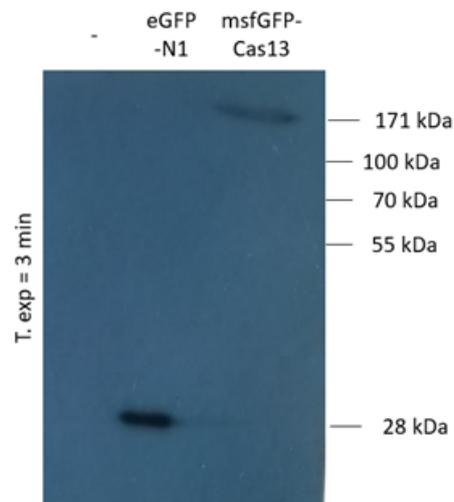


Figura 22: WB de células HeLa lipotransfectadas con GFP o Cas13-msfGFP.

Por su parte, mediante microscopia de fluorescencia se determinó que la Cas13 se expresa correctamente, ya que se observa localizada dentro del núcleo debido a la señal de localización nuclear (NLS) presente en la proteína de fusión con GFP (Figura 23). En contraste, las células transfectadas con el plásmido pEGFP-N1 muestran una señal verde fluorescente tanto en el núcleo como en el citoplasma.

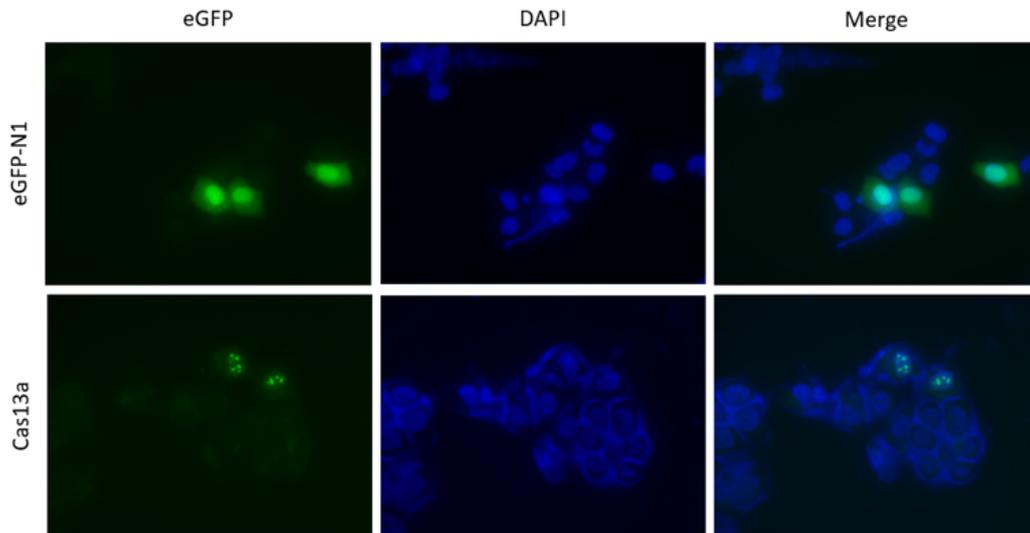


Figura 23: Fluorescencias de células HeLa transfectadas con msfGFP-Cas13a y eGFP-N1 como control.

7.5. Expresión estable de la nucleasa Cas13 en fibroblastos de SCA7 mediante infección lentiviral

Tras la lipotransfección de las células Lenti-X con los vectores para generar las partículas lentivirales, se pudo observar la fluorescencia correspondiente a cada vector, confirmando la expresión de sgRNAs (mCherry) y Cas13 (GFP) en estas células (Figura x.). (Figura 24).

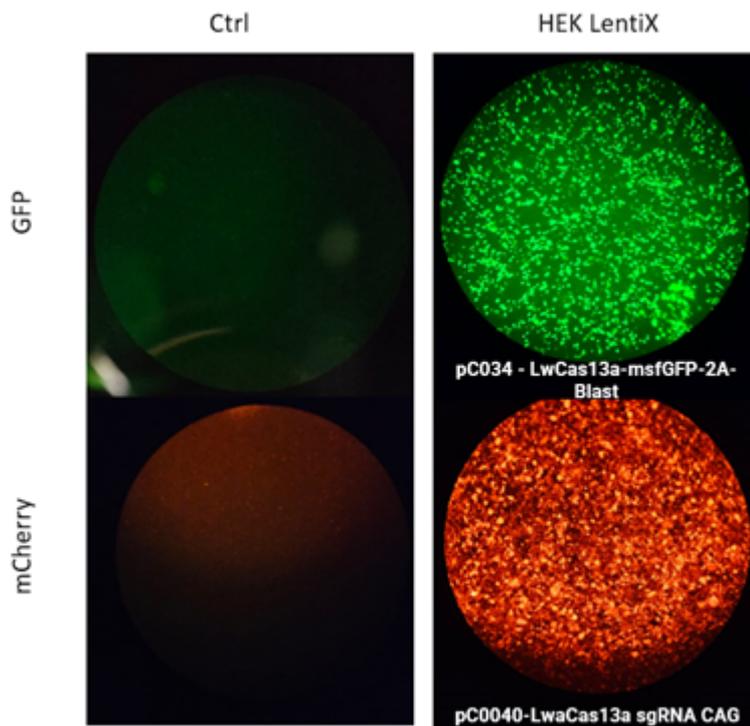


Figura 24: Imágenes de fluorescencia de células HEK Lenti-X con vector de LwCas13 y sgRNA CAG.

Posteriormente, se realizaron ensayos de resistencia a Blastidina y a Puromicina para determinar la concentración de selección de los fibroblastos. Con estos ensayos, se determinó que la concentración adecuada para la Blastidina era de 8 ng/ μ l y para la Puromicina de 0.5 ng/ μ l (Figura 25).

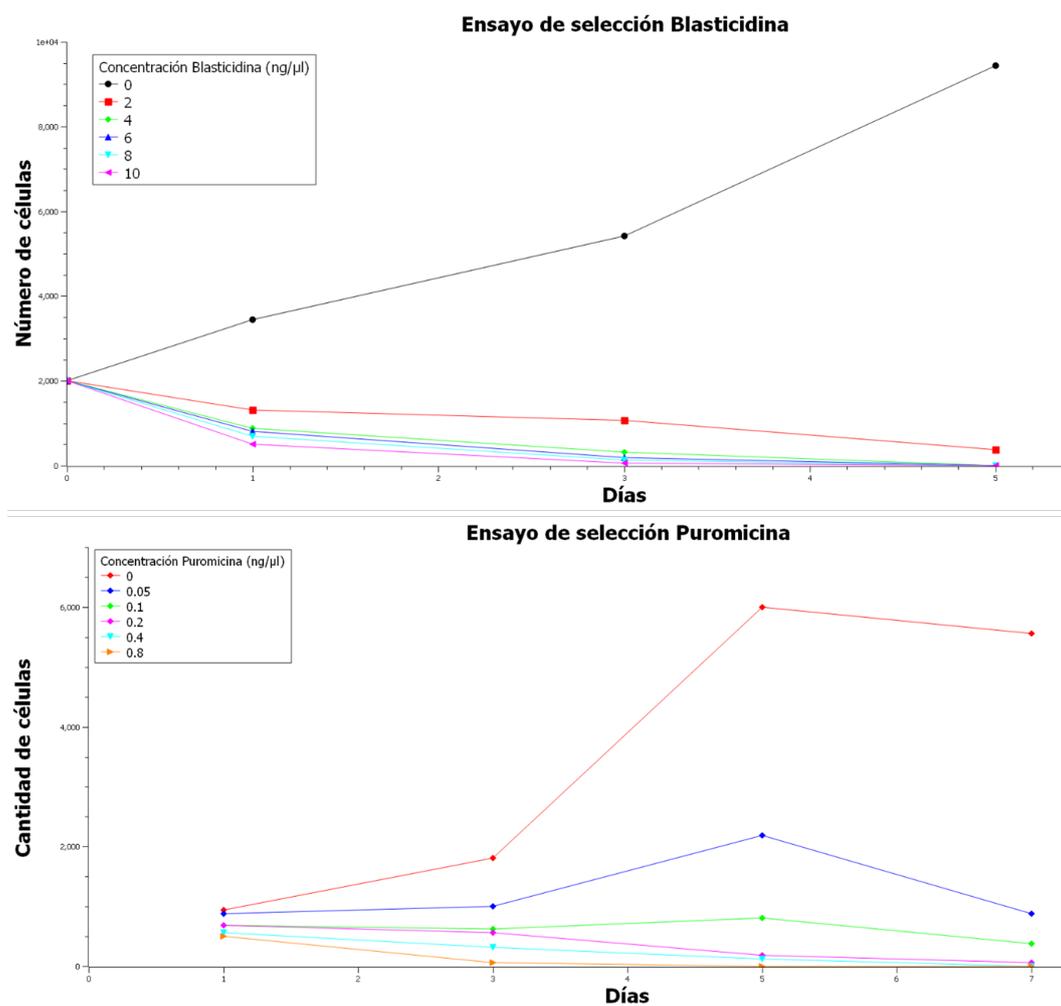


Figura 25: Curvas de resistencia a Blastidina (arriba) y Puromicina (abajo). Se seleccionó la concentración que eliminara al 100 % de las células en un tiempo de 3-5 días.

Tras la infección y selección de los fibroblastos, se pudo observar la misma fluorescencia con el vector que expresa el sgRNA CAG (Figura 24) y con el vector que expresa la LwCas13a (Figura 27).

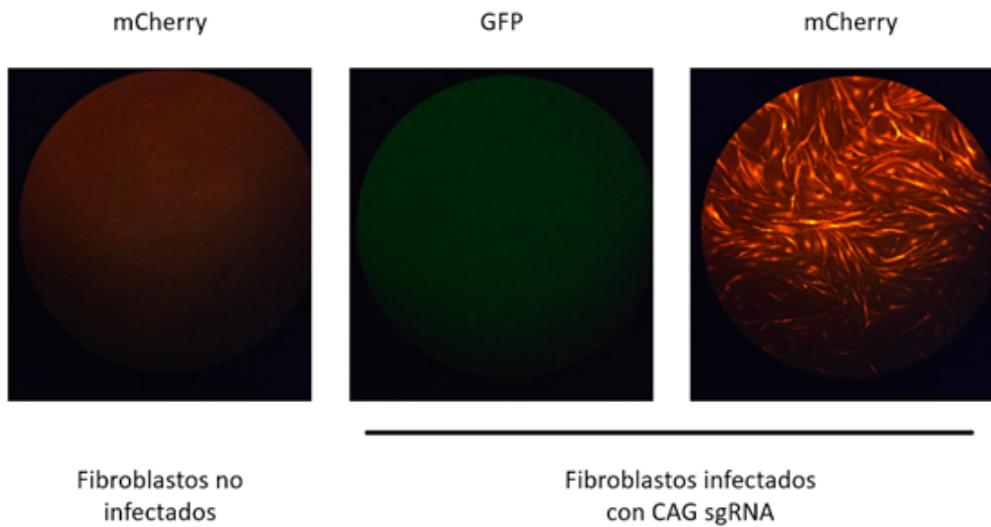


Figura 26: Fibroblastos infectados lentiviralmente con el vector que expresa el sgRNA CAG.

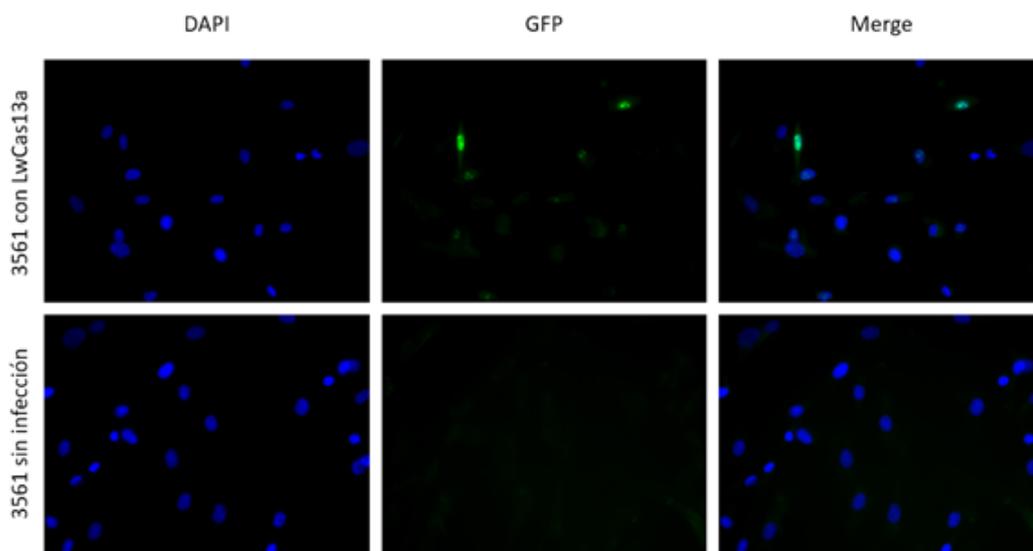


Figura 27: Microscopia de fluorescencia de fibroblastos infectados lentiviralmente con el vector que expresa la LwCas13a. Fibroblastos infectados con el vector pC034 - LwCas13a-msfGFP-2A-Blast (arriba), fibroblastos GM03561 control (abajo).

De igual manera, se realizó un western blot con extractos proteicos de la línea estable que expresa la LwCas13a. En este ensayo pudimos observar la banda en el peso esperado, lo que nos permite determinar que la proteína LwCas13a se está expresando exitosamente en la línea estable (Figura 28).

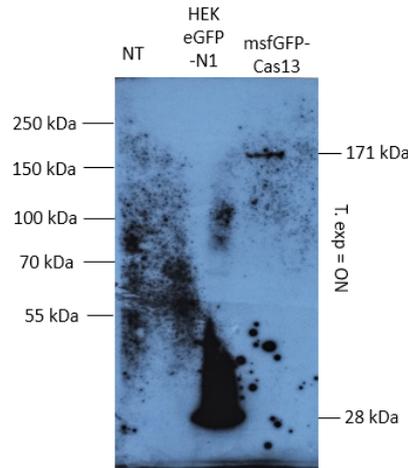


Figura 28: Western blot con anticuerpo α -GFP de extractos proteicos de línea de fibroblastos estable que expresa la LwCas13a. La placa fue revelada tras exposición por una noche.

Finalmente, tras una lipotransfección a las células que expresan la nucleasa Cas13 con los vectores que contienen los sgRNAs, se realizó una fluorescencia y se determinó que los vectores expresan de manera adecuada los sgRNAs (Figura 29).

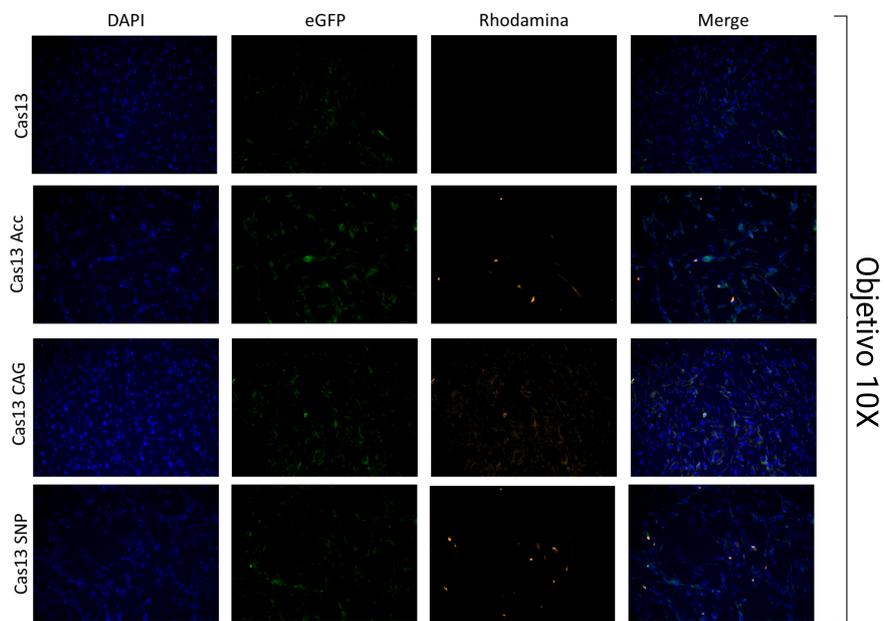


Figura 29: Microscopia de fluorescencia de fibroblastos Cas13 con sgRNAs. Objetivo utilizado: 10X.

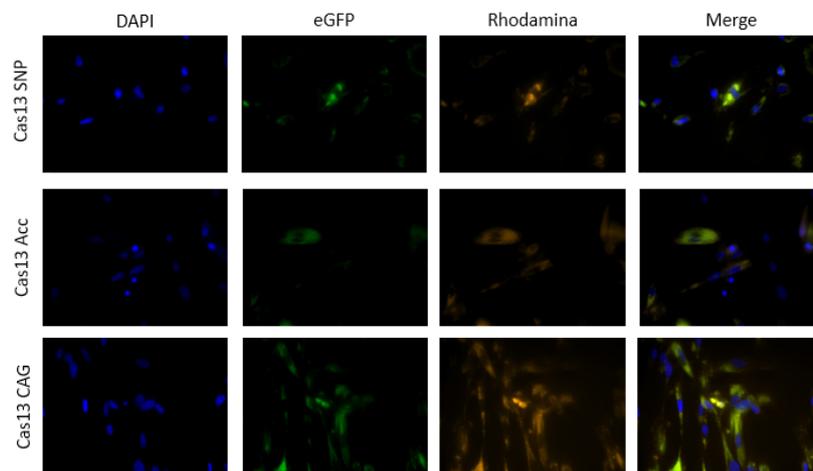


Figura 30: Microscopia de fluorescencia de fibroblastos Cas13 con sgRNAs. Objetivo utilizado: 40X.

7.6. Estandarización de la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de transcrito de *ATXN7* en fibroblastos de SCA7

Para la cuantificación de los niveles de expresión de *ATXN7*, se realizó una RT-qPCR y se utilizó el método de delta delta Ct, utilizando como gen de referencia TBP. En la Figura X se puede observar una tendencia en el aumento de la expresión de *ATXN7* en Los fibroblastos 3561 de SCA7 en comparación con los controles 3440. Estos datos demuestran la estandarización de la reacción de qPCR para analizar posteriormente la eficiencia del sistema CRISPR/Cas13.

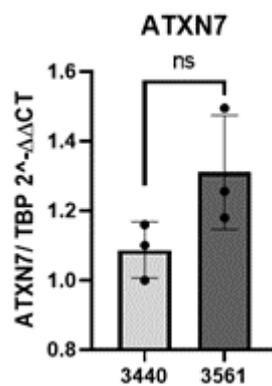


Figura 31: Medición de los niveles de *ATXN7* en líneas celulares 3440 (WT) y 3561 (SCA7) mediante RT-PCR utilizando TBP como gen control.

8. Discusión

Actualmente no existe un tratamiento contra la SCA7, por lo que existe la necesidad de crear terapias más efectivas. Este trabajo tuvo como objetivo la implementación del sistema CRISPR/Cas13 para evaluar la degradación del transcrito de ataxina-7 en fibroblastos derivados de pacientes con SCA7. Así mismo, uno de los objetivos de este proyecto consistió en determinar la presencia de un SNP asociado con la mutación de SCA7, el SNP rs3774729 (Greenberg et al., 2006), con la finalidad de evaluar la degradación alelo específica del transcrito *ATXN7* mutante sin alterar la expresión del alelo wild type.

Varios trabajos han evaluado la degradación de la proteína mutante como estrategia de terapia contra SCA7. Sin embargo, los abordajes enfocados en la proteína dejan intacto al RNA el cual, por evidencia experimental obtenida en nuestro laboratorio, sabemos tiene participación en la patogénesis de la enfermedad al interactuar y secuestrar proteínas que alteran su función influyendo en la pérdida de la homeostasis. En este sentido, nuestro abordaje enfocado en la degradación del RNA adquiere relevancia.

De igual manera, el uso de softwares para determinar las secuencias de crRNAs como RNAs y CASilico nos permite obtener los mejores candidatos evaluando un conjunto de 4 parámetros relevantes para el funcionamiento adecuado del sistema. Estos softwares de predicción estructural han sido utilizados en varios trabajos publicados, por lo que su efectividad ha sido comprobada en otros estudios independientes (Tafer et al., 2008; Asadbeigi A et al. 2022).

El sistema CRISPR/Cas13, como una herramienta de degradación de

RNA, se ha utilizado exitosamente en trabajos previos. Por ejemplo, se ha implementado dicho sistema de manera efectiva *in vivo* utilizando modelos murinos de la enfermedad de Huntington, utilizando sgRNAs dirigidos a la región PolyQ, logrando reducir drásticamente los niveles de expresión de RNA y en consecuencia de la proteína mutante. Interesantemente, este trabajo demostró también que el uso de la estrategia CRISPR/Cas13 dirigida a los repetidos CAG no afecta de manera significativa los niveles de expresión de otros elementos repetitivos de trinucleótidos como CUG (Morelli et al., 2023).

En nuestro conocimiento, el presente trabajo representa la primera vez que se implementa el sistema CRISPR/Cas13 dirigido al transcrito de *ATXN7* de manera lentiviral en fibroblastos con SCA7. El método de infección lentiviral nos permite estudiar de manera más sencilla la efectividad del sistema CRISPR/Cas13, ya que las líneas estables expresan los componentes de manera permanente, evitando la necesidad de otros métodos como nucleofecciones, partículas inorgánicas, electroporación o lipotransfecciones para suplementar las células con los componentes del sistema. Por ejemplo, las lipotransfecciones, que son muy complicadas de realizar de manera efectiva y en altos porcentajes en fibroblastos (Kucharski et al., 2021), ya no son necesarias, ya que la línea estable generada en este proyecto expresa la proteína Cas13 de manera permanente.

En este trabajo se implementó de manera exitosa el sistema CRISPR/Cas13 en fibroblastos de pacientes con SCA7. Se generó una línea estable de dichos fibroblastos que expresan la proteína LwCas13a. Esta línea estable permitirá estudiar la efectividad de dicho sistema tras analizar los niveles de expresión del transcrito mutante de SCA7 mediante

RT-qPCR tras la transducción de los sgRNAs clonados en el sistema lentiviral. Es importante resaltar que en este trabajo también hemos identificado la presencia del SNP rs3774729 en los fibroblastos de SCA7 GM03561, el cual se ha asociado con la presencia de expansión de los repetidos CAG en un grupo de pacientes con SCA7, lo cual nos permitirá determinar si el uso de un sgRNA dirigido a esta región puede resultar en la degradación alelo específica del transcrito mutante. En este momento, aún no hemos evaluado la efectividad del sistema, sin embargo, hemos implementado y estandarizado todos sus componentes por lo que consideramos que el sistema está listo para poder evaluarse. Consideramos que este sistema puede ser de gran relevancia ya que representa una alternativa de terapia contra la SCA7.

9. Conclusiones

Se identificó el SNP rs3774729 en fibroblastos derivados de pacientes con SCA7.

Se diseñaron in silico 3 crRNAs dirigidos a diferentes regiones del RNA mensajero de *ATXN7*.

Se clonaron exitosamente los sgRNAs en el vector lentiviral pSLQ1651-sgRNA(F+E)-sgGal4

Se generó un cultivo de fibroblastos GM03561 con expresión estable de la nucleasa Cas13 a través de infección lentiviral.

Se estandarizó la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de transcrito de *ATXN7* en fibroblastos de SCA7.

Se generaron los componentes del sistema de degradación del ARN mensajero de *ATXN7* utilizando el sistema CRISPR/Cas13a.

10. Perspectivas

El siguiente paso para verificar la eficacia de este sistema de degradación es medir mediante RT-qPCR los niveles de expresión del transcrito ATXN7 transduciendo los crRNAs en los fibroblastos que expresan establemente la nucleasa LwCas13a, ambos elementos del sistema CRISPR/Cas13 ya generados en este trabajo. De manera relevante, de acuerdo con nuestro diseño, además de evaluar la disminución del transcrito de ataxina-7, se puede determinar la efectividad de degradación alelo específica al utilizar el crRNA dirigido al SNP rs3774729, el cual se ha asociado con la mutación de SCA7.

11. Bibliografía

- Asadbeigi, A., Norouzi, M., Vafaei Sadi, M. S., Saffari, M., & Bakhtiarizadeh, M. R. (2022). CaSilico: A versatile CRISPR package for in silico CRISPR RNA designing for Cas12, Cas13, and Cas14. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 957131. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.957131>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Collias, D., & Beisel, C. L. (2021). CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20633-y>
- Chort, A., Alves, S., Marinello, M., Dufresnois, B., Dornbierer, J.-G., Tesson, C., Latouche, M., Baker, D. P., Barkats, M., El Hachimi, K. H., Ruberg, M., Janer, A., Stevanin, G., Brice, A., & Sittler, A. (2013). Interferon beta induces clearance of mutant ataxin 7 and improves locomotion in SCA7 knock-in mice. *Brain*, 136(6), 1732–1745. <https://doi.org/10.1093/brain/awt061>
- Dorschner, M. O., Barden, D., & Stephens, K. (2002). Diagnosis of five spinocerebellar ataxia disorders by multiplex amplification and capillary electrophoresis. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 4(2), 108–113. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60689-7](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60689-7)
- Enevoldson, T. P., Sanders, M. D., & Harding, A. E. (1994). Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. A clinical and genetic study of eight families. *Brain*, 117(3), 445–460.

<https://doi.org/10.1093/brain/117.3.445>

- Evers, M. M., Tran, H.-D., Zalachoras, I., Meijer, O. C., den Dunnen, J. T., van Ommen, G.-J. B., Aartsma-Rus, A., & van Roon-Mom, W. M. C. (2014). Preventing formation of toxic N-terminal huntingtin fragments through antisense oligonucleotide-mediated protein modification. *Nucleic Acid Therapeutics*, *24*(1), 4–12. <https://doi.org/10.1089/nat.2013.0452>
- Furrer, S. A., Mohanachandran, M. S., Waldherr, S. M., Chang, C., Damian, V. A., Sopher, B. L., Garden, G. A., & La Spada, A. R. (2011). Spinocerebellar ataxia type 7 cerebellar disease requires the coordinated action of mutant ataxin-7 in neurons and glia, and displays non-cell-autonomous Bergmann glia degeneration. *The Journal of Neuroscience*, *31*(45), 16269–16278. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4000-11.2011>
- Furukawa, T., Morrow, E. M., Li, T., Davis, F. C., & Cepko, C. L. (1999). Retinopathy and attenuated circadian entrainment in CRX-deficient mice. *Nature Genetics*, *23*(4), 466–470. <https://doi.org/10.1038/70591>
- Goswami, R., Bello, A. I., Bean, J., Costanzo, K. M., Omer, B., Cornelio-Parra, D., Odah, R., Ahluwalia, A., Allan, S. K., Nguyen, N., Shores, T., Aziz, N. A., & Mohan, R. D. (2022). The molecular basis of spinocerebellar ataxia type 7. *Frontiers in Neuroscience*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.818757>
- Greenberg, J., Solomon, G., Vorster, A., Heckmann, J., & Bryer, A. (2006). Origin of the SCA7 gene mutation in South Africa: Implications for molecular diagnostics. *Clinical Genetics*, *70*(5), 415–417. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00680.x>

- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), W70–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Helmlinger, D. (2004). Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Human Molecular Genetics*, 13(12), 1257–1265. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh139>
- Horton, L. C., Frosch, M. P., Vangel, M. G., Weigel-DiFranco, C., Berson, E. L., & Schmahmann, J. D. (2012). Spinocerebellar ataxia type 7: Clinical course, phenotype–genotype correlations, and neuropathology. *The Cerebellum*, 12(2), 176–193. <https://doi.org/10.1007/s12311-012-0412-4>
- Ieraci, A., Forni, P. E., & Ponzetto, C. (2002). Viable hypomorphic signaling mutant of the met receptor reveals a role for hepatocyte growth factor in postnatal cerebellar development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 15200–15205. <https://doi.org/10.1073/pnas.222362099>
- Jaiswal, M. K., Zech, W.-D., Goos, M., Leutbecher, C., Ferri, A., Zippelius, A., Carri, M. T., Nau, R., & Keller, B. U. (2009). Impairment of mitochondrial calcium handling in a MTSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neuroscience*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-64>
- Karam, A., & Trottier, Y. (2018). Molecular mechanisms and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia type 7. *Polyglutamine Disorders*, 197–218. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_9
- Kordyś, M., Sen, R., & Warkocki, Z. (2021). Applications of the versatile CRISPR-CAS13 RNA targeting system. *WIREs RNA*, 13(3). <https://doi.org/10.1002/wrna.1694>

- La Spada AR. Spinocerebellar Ataxia Type 7. 1998 Aug 27 [Updated 2020 Jul 23]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1256/>
- La Spada, A. R., Fu, Y.-H., Sopher, B. L., Libby, R. T., Wang, X., Li, L. Y., Einum, D. D., Huang, J., Possin, D. E., Smith, A. C., Martinez, R. A., Koszdin, K. L., Treuting, P. M., Ware, C. B., Hurley, J. B., Ptáček, L. J., & Chen, S. (2001). Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron*, *31*(6), 913–927. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00422-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00422-6)
- Lee, S.-G., Su, Z.-Z., Emdad, L., Gupta, P., Sarkar, D., Borjabad, A., Volsky, D. J., & Fisher, P. B. (2008). Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(19), 13116–13123. <https://doi.org/10.1074/jbc.m707697200>
- Magaña, J. J., Tapia-Guerrero, Y. S., Velázquez-Pérez, L., Cerecedo-Zapata, C. M., Maldonado-Rodríguez, M., Jano-Ito, J. S., Leyva-García, N., González-Piña, R., Martínez-Cruz, E., Hernández-Hernández, O., & Cisneros, B. (2013). Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: Epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clinical Genetics*, *85*(2), 159–165. <https://doi.org/10.1111/cge.12114>
- Martin, J.-J. (2012). Spinocerebellar ataxia type 7. *Handbook of Clinical Neurology*, 475–491. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-51892-7.00030-9>

- Martin, J. -J., Krols, L., Ceuterick, C., Van Broeckhoven, C., Van Regemorter, N., Hayer-Delatte, F., Brucher, J.-M., de Barsy, T., Szliwowski, H., Evrard, P., Tassignon, M.-J., Smet-Dieleman, H., & Willems, P. J. (1994). On an autosomal dominant form of retinal-cerebellar degeneration: An autopsy study of five patients in one family. *Acta Neuropathologica*, *88*(4), 277–286. <https://doi.org/10.1007/bf00310370>
- Michalik, A., Martin, J.-J., & Van Broeckhoven, C. (2003). Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *European Journal of Human Genetics*, *12*(1), 2–15. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201108>
- Miniarikova, J., Evers, M. M., & Konstantinova, P. (2018). Translation of microrna-based Huntingtin-lowering therapies from preclinical studies to the Clinic. *Molecular Therapy*, *26*(4), 947–962. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.02.002>
- Morelli, K. H., Wu, Q., Gosztyla, M. L., Liu, H., Yao, M., Zhang, C., Chen, J., Marina, R. J., Lee, K., Jones, K. L., Huang, M. Y., Li, A., Smith-Geater, C., Thompson, L. M., Duan, W., & Yeo, G. W. (2022). An RNA-targeting CRISPR–CAS13D system alleviates disease-related phenotypes in Huntington’s disease models. *Nature Neuroscience*, *26*(1), 27–38. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01207-1>
- Nakamura, Y., Tagawa, K., Oka, T., Sasabe, T., Ito, H., Shiwaku, H., La Spada, A. R., & Okazawa, H. (2011). Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network. *Human Molecular Genetics*, *21*(5), 1099–1110. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr539>
- Niewiadomska-Cimicka, A., & Trottier, Y. (2019). Molecular targets and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia type 7.

- Neurotherapeutics, 16(4), 1074–1096.
<https://doi.org/10.1007/s13311-019-00778-5>
- Niu, C., Prakash, T. P., Kim, A., Quach, J. L., Huryn, L. A., Yang, Y., Lopez, E., Jazayeri, A., Hung, G., Sopher, B. L., Brooks, B. P., Swayze, E. E., Bennett, C. F., & La Spada, A. R. (2018). Antisense oligonucleotides targeting mutant ataxin-7 restore visual function in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. *Science Translational Medicine*, 10(465).
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap8677>
- Palhan, V. B., Chen, S., Peng, G.-H., Tjernberg, A., Gamper, A. M., Fan, Y., Chait, B. T., La Spada, A. R., & Roeder, R. G. (2005). Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8472–8477.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503505102>
- Pfister, E. L., DiNardo, N., Mondo, E., Borel, F., Conroy, F., Fraser, C., Gernoux, G., Han, X., Hu, D., Johnson, E., Kennington, L., Liu, P., Reid, S. J., Sapp, E., Vodicka, P., Kuchel, T., Morton, A. J., Howland, D., Moser, R., ... Aronin, N. (2018). Artificial mirnas reduce human mutant Huntingtin throughout the striatum in a transgenic sheep model of Huntington's disease. *Human Gene Therapy*, 29(6), 663–673.
<https://doi.org/10.1089/hum.2017.199>
- Ramachandran, P. S., Boudreau, R. L., Schaefer, K. A., La Spada, A. R., & Davidson, B. L. (2014). Nonallele specific silencing of ataxin-7 improves disease phenotypes in a mouse model of SCA7. *Molecular Therapy*, 22(9), 1635–1642. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.108>
- Ramachandran, P. S., Bhattarai, S., Singh, P., Boudreau, R. L., Thompson, S., LaSpada, A. R., Drack, A. V., & Davidson, B. L. (2014). RNA

- interference-based therapy for spinocerebellar ataxia type 7 retinal degeneration. *PLoS ONE*, 9(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095362>
- Scholefield, J., Watson, L., Smith, D., Greenberg, J., & Wood, M. J. (2014). Allele-specific silencing of mutant ataxin-7 in SCA7 patient-derived fibroblasts. *European Journal of Human Genetics*, 22(12), 1369–1375.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.39>
- Tafer, H., Ameres, S. L., Obernosterer, G., Gebeshuber, C. A., Schroeder, R., Martinez, J., & Hofacker, I. L. (2008). The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nature Biotechnology*, 26(5), 578–583. <https://doi.org/10.1038/nbt1404>
- Tan, J. Y., Vance, K. W., Varela, M. A., Sirey, T., Watson, L. M., Curtis, H. J., Marinello, M., Alves, S., Steinkraus, B. R., Cooper, S., Nesterova, T., Brockdorff, N., Fulga, T. A., Brice, A., Sittler, A., Oliver, P. L., Wood, M. J., Ponting, C. P., & Marques, A. C. (2014). Cross-talking noncoding RNAs contribute to cell-specific neurodegeneration in SCA7. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(11), 955–961.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2902>
- van de Warrenburg, B. P. C., Frenken, C. W. G. M., Ausems, M. G. E. M., Kleefstra, T., Sinke, R. J., Knoers, N. V. A. M., & Kremer, H. P. H. (2001). Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: The infantile phenotype. *Journal of Neurology*, 248(10), 911–914.
<https://doi.org/10.1007/s004150170082>
- Wells, R. D., & Ashizawa, T. (Eds.). (2011). *Genetic Instabilities and Neurological Diseases*, Second Edition (2nd ed.). Academic Press.
- Yu, X. (2015). *Studies of polyglutamine expanded Ataxin-7 toxicity* (PhD dissertation, Department of Neurochemistry, Stockholm University).

Retrieved from <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:su:diva-121116>

Yvert, G. (2000). Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, 9(17), 2491–2506. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.17.2491>

Zoghbi, H. Y., & Orr, H. T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1), 217–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.217>