



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Valoración de una nueva aproximación terapéutica para la
Ataxia de Friedreich basada en la edición génica y la
epigenética

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Villalba Lopez, Lucía

Tutor/a: Galindo Orozco, Máximo Ibo

Cotutor/a externo: GONZALEZ CABO, MARIA PILAR

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Valoración de una nueva aproximación terapéutica para la Ataxia de Friedreich basada en la edición génica y la epigenética



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural



INCLIVA | VLC
Biomedical Research Institute

Universitat Politècnica de València (Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural) i Fundació INCLIVA

ALUMNO/A: Lucía Villalba López

TUTOR/A EXTERNO: Pilar González Cabó

TUTOR/A INTERNO: Máximo Ibo Galindo

Curso Académico: 2022-2023

Valencia, 3 de julio de 2023



Valoración de una nueva aproximación terapéutica para la Ataxia de Friedreich basada en la edición génica y en la epigenética.

RESUMEN

La Ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa rara y hereditaria que afecta principalmente al sistema nervioso y causa problemas de coordinación motora. Actualmente, no existe una cura para esta enfermedad y los tratamientos son limitados en su eficacia. Por ello, en este trabajo se estudia una nueva opción terapéutica basada en la edición génica y la epigenética.

Gracias a la edición génica se puede modificar el ADN de forma precisa, lo que permite poder corregir los defectos genéticos responsables de esta enfermedad. En estudios previos se ha demostrado que con la edición génica se puede corregir la mutación específica del gen *FXN* causada por una hiperexpansión de la repetición de tripletes GAA localizada en el primer intrón. Sin embargo, recientemente se ha descubierto una región hipermetilada aguas arriba del exón 1 del gen de la *FXN*, lo que lleva a la represión de la expresión de la proteína frataxina. Por lo que la epigenética también juega un papel importante en la Ataxia de Friedreich.

El objetivo de este trabajo es aplicar la herramienta de edición genética CRISPR/Cas9, teniendo en cuenta las marcas epigenéticas localizadas en la región de la expansión, para conseguir un incremento en la expresión de la proteína frataxina. Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la OMS para el 2030: Salud y Bienestar, Educación de calidad e Industria, innovación e infraestructura.

Palabras clave.

Ataxia de Friedrich; CRISPR-Cas9; edición génica; epigenética; frataxina.

Alumna; Lucía Villalba López

Valencia, 3 julio de 2023

Tutor Externo: Pilar González Cabó

Tutor Académico: Máximo Ibo Galindo

Evaluation of a new therapeutic approach for Friedreich's Ataxia based on gene editing and epigenetics.

ABSTRACT

Friedreich's Ataxia is a rare, inherited neurodegenerative disease that primarily affects the nervous system and causes motor coordination problems. Currently, there is no cure for this disease and treatments are limited in their efficacy. Therefore, a new therapeutic option based on gene editing and epigenetics is being studied in this study.

Thanks to gene editing, it is possible to modify the DNA in a precise way, which makes it possible to correct the genetic defects responsible for this disease. Previous studies have shown that gene editing can correct the specific mutation of the FXN gene caused by a hyperexpansion of the GAA triplet repeat located in the first intron. However, a hypermethylated region upstream of exon 1 of the FXN gene has recently been discovered, leading to repression of frataxin protein expression. Thus, epigenetics also plays an important role in Friedreich's Ataxia.

The aim of this work is to apply the CRISPR/Cas9 gene editing tool, considering the epigenetic marks located in the expansion region, to achieve an increase in frataxin protein expression. This work is related to the following SDGs of the WHO for 2030: Health and Well-being, Quality Education and Industry, Innovation and Infrastructure.

Key words.

CRISPR-Cas9; epigenetics; frataxin; Friedrich's ataxia; gene editing.

AGRADECIMIENTOS

A Pili por brindarme la oportunidad y por confiar en mí para la realización de este trabajo. Gracias por tu dedicación, orientación y consejos compartidos durante toda mi estancia en el laboratorio

A mi familia por apoyarme siempre en todo, por confiar en mí y por recordarme que soy capaz de conseguir todo lo que me proponga. Sin ellos, no me habría convertido en lo que soy ahora. Os quiero.

A mis amigas de la universidad por acompañarme en estos cuatro años de carrera, por su confianza y ánimos. Gracias por todos los momentos inolvidables que hemos vivido y que estoy segura de que seguiremos viviendo.

A mis compañeros del laboratorio por acogerme desde el primer momento y por ayudarme siempre.

ÍNDICE

Índice	V
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	VIII
Abreviaturas	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Ataxia de Friedreich. Patología y síntomas clínicos	1
1.2. Genética molecular de la FRDA	1
1.3. Silenciamiento del gen FXN. Epigenética	3
1.4. Enfoques terapéuticos de la FRDA	4
1.5. Terapia génica en la FRDA	5
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1. Cultivos celulares	8
3.2. Criopreservación. Congelación y descongelación de cultivos celulares ..	9
3.3. Diseño del ensayo CRISPR-Cas9	9
3.4. Protocolo Alt-R CRISPR-Cas9 System	10
3.4.1 Preparación de las células	11
3.4.2. Preparación mixes de RPN-Cas9	12
3.4.2.1 Preparación del RNA	13
3.4.2.2 Preparación del complejo de RPNs	13
3.5. Extracción DNA y cuantificación con el NanoDrop	15
3.6. PCR y electroforesis	15
4. RESULTADOS	18
4.1. Diseño de las sgRNAs y optimización de la estrategia de edición génica	18
4.2. Crecimiento de los linfoblastos tras de la edición génica	18
4.3. Comprobación de la eficacia de la edición génica	19
4.3.1 Diseño de primers	20
4.3.2 Optimización de la PCR	21
5. DISCUSIÓN	25
5.1. Deleción de la región FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA como diana terapéutica de Ataxia de Friedreich	25
5.2. Perspectivas de futuras	27

6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	29
8. ANEXOS	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y mecanismos de silenciamiento del gen <i>FXN</i>	2
Figura 2. Pipeline de los tratamientos de la FRDA	4
Figura 3. Representación de la delección de la repetición del triplete GAA en el intrón 1 del gen <i>FXN</i> con CRISPR-Cas9	6
Figura 4. Representación de la delección de la zona FRDA-DMR y de la repetición GAA en el intrón 1 del gen <i>FXN</i> con CRISPR-Cas9	10
Figura 5. Componentes del sistema CRISPR-Cas9 para dirigir la endonucleasa Cas9 a dianas genómicas.....	11
Figura 6. Representación de la preparación de las células para el protocolo de CRISPR-Cas9	12
Figura 7. Representación de la preparación del ARN y de las RPNs para el protocolo de CRISPR-Cas9.....	13
Figura 8. Diagrama de flujo del protocolo a seguir para comprobar la edición génica de los linfoblastos.....	15
Figura 9. Proceso de escalado de los linfoblastos tras el proceso de edición génica	19
Figura 10. Representación de los resultados que se esperan tras la PCR y la electroforesis para la comprobación de la edición génica	21
Figura 11. Resultado de la PCR realizada con los Primers de Edición que demuestra la edición génica	23
Figura 12. Resultado de la PCR realizada con los Primers Internos 1	24
Figura 13. Representación esquemática de la continuación de la investigación.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos, concentraciones y volúmenes de los reactivos empleados en el protocolo CRISPR-Cas9.....	12
Tabla 2. Volúmenes adicionados para la obtención de las sgRNAs	13
Tabla 3. Volúmenes necesarios para preparar el mix de RPNs	14
Tabla 4. Volúmenes para la preparación de la reacción de nucleofección.....	14
Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados para la PCR de comprobación de la edición génica y sus temperaturas de melting (T _m)	16
Tabla 6. Volúmenes para la preparación del mix de PCR	16
Tabla 7. Programa del termociclador para el protocolo de PCR	17

ABREVIATURAS

- CIBERER** — Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras
- CRISPR-Cas9** — *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats -Associated 9*
- crRNA** — CRISPR RNA
- DMR** — *Differentially Methylated Region*
- DMSO** — Dimetilsulfóxido
- FARA** — *Friedreich's Ataxia Research Alliance*
- FARS** — *Friedreich's Ataxia Rating Scale*
- FBS** — *Fetal Bovine Serum*
- FDA** — *U.S. Food and Drug Administration*
- FRDA** — *Friedreich's Ataxia*
- FXN** — Frataxina
- ICARS** — *International Cooperative Ataxia Rating Scale*
- LCL** — Línea Celular Linfoblastoide
- ODS** — Objetivo de Desarrollo sostenible
- OMS** — Organización Mundial de la Salud
- PBS** — *Phosphate-Buffered Saline*
- RT** — *Room Temperature*
- RPN** — Ribonucleoproteínas
- SARA** — *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*
- sgRNA** — single guide RNA
- TSS** — *Transcription Start Site*
- tracrRNA** — *trans-activating CRISPR RNA*
- WT** — *wild-type*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ataxia de Friedreich. Patología y síntomas clínicos

La Ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad neurodegenerativa que causa daño progresivo tanto al sistema nervioso central como al sistema nervioso periférico. Es la ataxia hereditaria autosómica recesiva más común de aparición temprana en la población caucásica, con una prevalencia de 1/30000 (Pandolfo, 2009; Delatycki & Corben, 2012).

En cuanto a la sintomatología, los primeros síntomas aparecen en la pubertad y aproximadamente 10 o 15 años después del comienzo de los síntomas, los pacientes pierden la movilidad debido a una progresión en la marcha por lo que se quedan en silla de ruedas. Además, la FRDA se ha relacionado con la disartria, la disfagia, el deterioro de la propiocepción, la escoliosis, la diabetes mellitus y las cardiomiopatías (Pandolfo, 2009; Delatycki & Corben, 2012) siendo esta última la causa más frecuente de muerte prematura, entorno al 59% (Kearney et al., 2016).

Hoy en día, no existe una cura definitiva para la FRDA, pero se están estudiando diversos enfoques terapéuticos dirigidos a distintas dianas relacionadas con la patogenicidad de la FRDA (Zesiewicz et al., 2020). Para el estudio y la valoración de la gravedad y la progresión de la ataxia, así como de los déficits neurológicos que provoca, se utilizan una serie de escalas que permiten cuantificar la manifestación clínica de la enfermedad y su impacto en la función neurológica, como la escala SARA (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*). También, se emplea la ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) de forma genérica para todas las ataxias, y de forma específica para la FRDA se emplea la FARS (*Friedreich's Ataxia Rating Scale*) (Bürk et al., 2009).

1.2. Genética molecular de la FRDA

La enfermedad es causada por una mutación en el gen *FXN* (**Figura 1A**) que se localiza en el cromosoma 9q21.11 (Hanson et al., 2019) y presenta 7 exones, numerados del 1 al 4, 5a, 5b y 6. El transcrito mayoritario consiste del exón 1 al 5a, pero también se han descrito en menor medida transcritos del 1 al 5b, cuya función es aún desconocida (Pandolfo, 2009). La mutación que causa la enfermedad consiste en una hiperexpansión bialélica del triplete GAA que se encuentra en el primer intrón del gen *FXN* (Campuzano et al., 1996; Zesiewicz et al., 2020). Este primer intrón contiene aproximadamente 10 kb más los GAA polimórficos. Las repeticiones se encuentran 1.339 pb aguas abajo de la unión entre el exón 1 con el intrón 1 (Li et al., 2020). El gen codifica para la proteína frataxina compuesta por 210 aminoácidos, que es esencial para la función mitocondrial y la producción de energía celular (Pandolfo, 2009) y que interviene en la

homeostasis del hierro en las células (Kim et al, 2011) y en el correcto flujo de calcio desde el retículo endoplásmico y la mitocondria. La hiperexpansión reduce la expresión de la frataxina en los pacientes que padecen esta enfermedad mediante un silenciamiento génico (Herman et al., 2006; Rodden et al., 2021), lo que conduce a una acumulación tóxica de hierro en las mitocondrias dañando diferentes tejidos como el sistema nervioso y el corazón (Kakhlon et al., 2010). De hecho, los individuos enfermos homocigotos presentan niveles de transcripción del gen *FXN* entre un 5-20% en comparación con los individuos sanos (Chutake et al., 2014). Sin embargo, los pacientes portadores de la FRDA que sólo tienen un alelo *FXN* expandido, permanecen asintomáticos y sus niveles de transcripción del gen *FXN* se encuentran alrededor del 50% (Rodden et al., 2021).

Normalmente, los pacientes sanos presentan <30 repeticiones, mientras que las repeticiones asociadas a la enfermedad van desde 40 hasta 1300 tripletes, siendo las más comunes de 600 a 900 tripletes. Además, se ha establecido una correlación directa entre el tamaño de la repetición GAA con la edad de aparición más temprana y con la severidad de la enfermedad (Pandolfo, 2009). También, se ha diferenciado un grupo de pacientes con FRDA cuya expansión presenta <500 tripletes y por ello, presentan niveles de transcripción más elevados, aparición tardía de los síntomas, aumento de la esperanza de vida y progresión de la enfermedad más lenta. Por lo que, incrementando modestamente la expresión del transcrito, ya se pueden obtener beneficios clínicos significativos (Rodden et al., 2021).

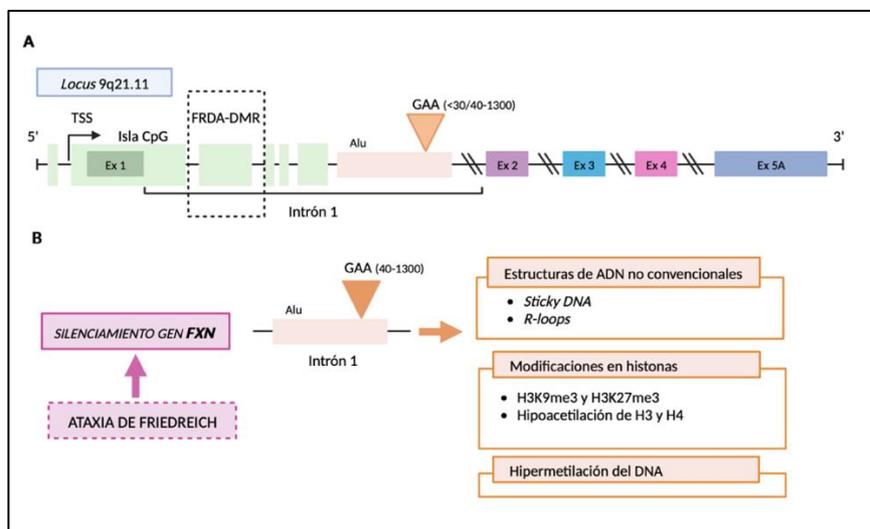


Figura 1. Estructura y mecanismos de silenciamiento del gen *FXN*. (A). La representación esquemática del gen de la *FXN* muestra los cinco exones (Ex 1, Ex 2, Ex 3, Ex 4 y Ex 5A) que corresponden al transcrito más prevalente; en el extremo 3' del sitio de iniciación de la transcripción (TSS) se encuentra la isla CpG (rectángulo verde claro); se muestra la región FRDA-DMR con un rectángulo discontinuo negro y en naranja se encuentra la región Alu con la repetición GAA (triángulo naranja) dentro del intrón 1; y la región FRDA-DMR indicada con un rectángulo discontinuo negro. FRDA-DMR: *Friedreich's Ataxia Differentially Methylated Region* (B). Representación de los diferentes silenciamientos epigenéticos del gen *FXN* (Robles, 2022).

1.3. Silenciamiento del gen *FXN*. Epigenética.

Una de las principales áreas de investigación para el tratamiento de la FRDA es el estudio de los mecanismos de silenciamiento del gen *FXN* (**Figura 1B**), que conducen a una baja expresión de este gen en los pacientes que padecen FRDA.

En primer lugar, se ha descrito que las repeticiones de GAA son capaces de formar estructuras de ADN no convencionales y diferentes de la forma B clásica del ADN (Sakamoto et al., 1999) como triplexes o estructuras de *sticky DNA*, que contribuyen al bloqueo de la maquinaria celular de replicación y transcripción (Mazzara et al., 2020). También se ha visto que pueden formar estructuras de *R-loops* que impiden la unión de la ARN polimerasa II y, por tanto, impiden la elongación de la transcripción (Gerhardt et al., 2016).

Por otro lado, se están estudiando los mecanismos de silenciamiento epigenéticos que también parece ser que provocan el secuestro de la ARN polimerasa II. En los alelos de FRDA, la región que se encuentra aguas arriba de la repetición está asociada con cambios en las histonas que son característicos de genes reprimidos y con una mayor metilación del ADN en comparación con la observada en los alelos normales (Kumari et al., 2011).

En estudios como el de Rodden et al. (2020), se estudia como marca epigenética la hipermetilación del ADN en regiones flanqueantes a la repetición GAA del intrón 1 del gen *FXN*. Estos autores demostraron la existencia de una correlación positiva entre un perfil elevado de metilación de las CpGs ubicadas aguas arriba de la repetición GAA del gen *FXN* en las células derivadas de pacientes con FRDA con un mayor tamaño de la expansión, mayor gravedad del fenotipo enfermo y una edad más temprana de aparición de la enfermedad. Lo que supone que aquellos pacientes que presentan un mejor pronóstico es porque presentan menor cantidad de epialelos metilados mientras que los pacientes con un peor pronóstico y mayor tamaño de las repeticiones presentan una mayor cantidad de epialelos metilados. Además, en este mismo estudio se amplió la zona de análisis corriente arriba de la repetición GAA y se descubrió la existencia de una zona diferencialmente hipermetilada del ADN, a la que se ha descrito como zona DMR (Differentially Methylated Region), ubicada aguas abajo de la isla CpG del gen *FXN* (**Figura 1A**). Esta región se encuentra hipermetilada en más del 90% de los pacientes con FRDA en homocigosis y menos del 10% en los pacientes sanos, mientras que los portadores heterocigotos presentan la mitad de las CpGs de la región FRDA-DMR sin metilar y la otra mitad metilada. Hoy en día, no se conoce con exactitud el mecanismo de regulación del silenciamiento del gen *FXN* mediante esta región FRDA-DMR. Sin embargo, lo único que se sabe con cierta exactitud es que esta región favorece la formación de la heterocromatina y que, por lo tanto, se representa como un obstáculo para el mecanismo de la transcripción del gen de la frataxina.

Asimismo, en un estudio posterior, el de Rodden et al. (2021), se describe también como marca epigenética la desacetilación de las histonas H3 y H4 y la hipermetilación de las histonas (H3K9me3 y H3K27me3), para las cuales se está investigando como una posible opción terapéutica el uso de un inhibidor de la histona de clase I desacetilasa (HDCAi-109) y reactivar así la expresión del gen *FXN*.

1.4. Enfoques terapéuticos de la FRDA

Hoy en día existen diferentes aproximaciones terapéuticas que comparten el mismo objetivo final, el tratamiento de la FRDA. Sin embargo, estas aproximaciones se diferencian en función del mecanismo de acción que siguen o el enfoque del tratamiento, es decir, donde o como actúa el fármaco y/o que herramientas tecnológicas se emplean. Asimismo, también se diferencian en función de la fase de investigación en la que se encuentren ya sea fase pre-clínica, clínica o aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA).

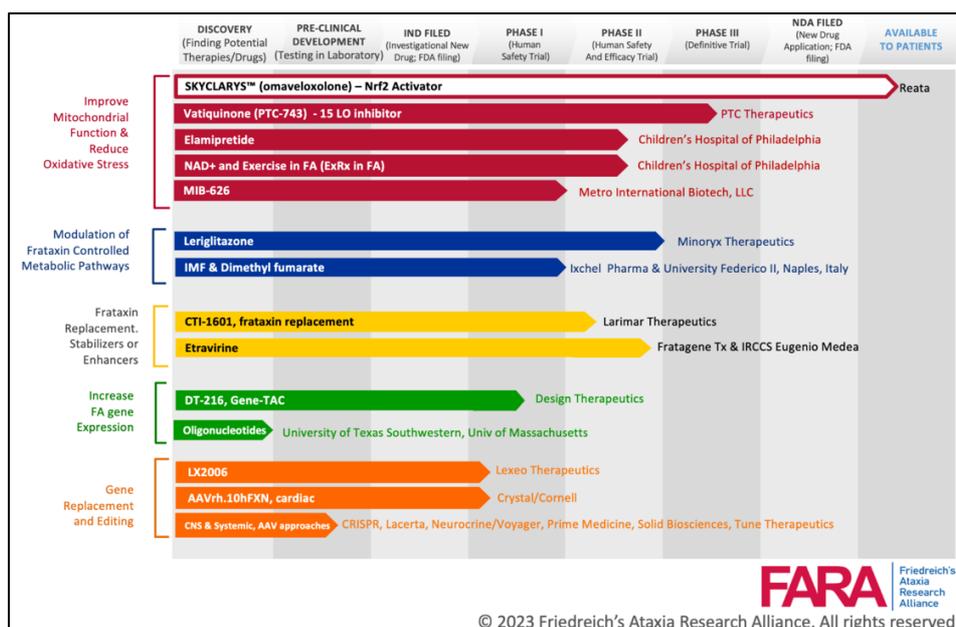


Figura 2. Pipeline de los tratamientos de la FRDA. En el eje horizontal se representa la fase de investigación en el que se encuentran las diferentes terapias y en el eje vertical se dividen los diferentes tratamientos dependiendo de su mecanismo de acción o enfoque terapéutico. Imagen extraída de:

<https://www.curefa.org/research/research-pipeline>

Según la información proporcionada por el sitio web oficial de la FARA (*Friedrich's Ataxia Research Alliance*) (FARA, 2023), el primer y único fármaco aprobado por la FDA es el SKYCLARYS™ (Omaveloxone) desarrollado por la farmacéutica REATA. La función de este fármaco reside en la activación del factor de transcripción Nrf2, puesto que se ha demostrado que

un incremento de este factor puede suponer una mejora de la función mitocondrial reduciendo el estrés oxidativo y previniendo la peroxidación lipídica. Por otro lado, se encuentran terapias en diferentes etapas de la fase clínica como fármacos enfocados a la modulación de las vías metabólicas controladas por la frataxina o el reemplazamiento de esta proteína mediante estabilizadores o enhancers. Por último, entre la fase de laboratorio y la fase clínica se encuentran terapias enfocadas al aumento de la expresión del gen de la frataxina y al reemplazamiento del gen *FXN* mediante edición génica (**Figura 2**).

1.5. Terapia génica en la FRDA

Como la FRDA causa una reducción de la expresión del gen *FXN*, una terapia génica prometedora es la adición del gen mediante vectores virales como lentivirus (LV), herpes simple de tipo I (HSV-1) o adenovirus asociados (AAVs). Estas terapias se han estudiado tanto *in vivo* como *in vitro* en fibroblastos humanos derivados de pacientes que padecen FRDA o en modelos animales como el murino (Sivakumar y Cherqui, 2022). Otro enfoque de terapia génica consiste en la reactivación del gen *FXN* endógeno silenciado (Mazzara et al., 2020), haciendo uso del sistema CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - Associated 9) que induce roturas de doble cadena en el ADN objetivo, que posteriormente serán reparadas por mecanismos de reparación del ADN propios de las células como la reparación dirigida por homología (HDR) o la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Sivakumar y Cherqui, 2022). Este sistema, derivado de un mecanismo de defensa de las bacterias, permite editar el ADN de manera específica, eficiente, rápida y barata (Knight et al., 2015).

Existen diferentes métodos para introducir la unidad funcional del mecanismo de edición CRISPR/Cas9 en las células como, por ejemplo, mediante plásmidos, ARN sintéticos, ribonucleoproteínas (RNPs) o virus lentivirales. Pero actualmente, el mecanismo de introducción más utilizado son las RNPs, formadas por la endonucleasa Cas9 y la sgRNA (single guide RNA), diseñada específicamente para guiar a la Cas9 hacia el sitio de corte (Zhang et al., 2021).

En estudios anteriores realizados en el laboratorio, se utilizó el sistema CRISPR-Cas9 para eliminar la hiperexpansión del triplete GAA en el gen *FXN* de linfoblastos de pacientes con FRDA, para comprobar si la expresión de la frataxina aumentaba con la delección de esta región diana. Para ello, se diseñaron dos sgRNAs que flanqueaban las posiciones 5' y 3' de la región repetitiva ubicada en el intrón 1 (**Figura 3**), para que la enzima Cas9 indujera el corte de doble cadena en el ADN y se eliminara la región diana sin afectar a la secuencia codificante del gen *FXN*. Además, la ventaja de este sistema radica en que con la corrección de un alelo del gen *FXN*, los niveles de frataxina podrían aumentar lo suficiente para poder superar el umbral patológico de estos pacientes, lo que podría conducir a mejoras en los síntomas clínicos. Además, la

expresión del gen *FXN* seguiría bajo el promotor/enhancer endógeno y se podría aplicar para todos los tipos de pacientes de FRDA (Sivakumar y Cherqui, 2022).

En este estudio previo, tras la edición de los linfoblastos y la confirmación con PCR de que estaban correctamente editados, se realizó una extracción de proteínas para determinar los niveles de expresión de la frataxina. Se observó que aproximadamente en el 70% de las líneas celulares derivadas de pacientes con FRDA, la frataxina presentaba unos niveles de expresión mayores tras la edición, pero no iguales a los niveles de expresión de los controles. Sin embargo, en el 30% restante, el nivel de expresión de la frataxina se mantenía constante. Por lo que se llegó a la conclusión de que la hiperexpansión del triplete GAA en el intrón 1 del gen *FXN*, no es la única modificación que regula la expresión de la frataxina. Por ello, es probable que las diferentes marcas epigenéticas descritas anteriormente, tengan un papel muy importante en la regulación de la expresión del gen *FXN* y por tanto en el desarrollo de esta enfermedad.

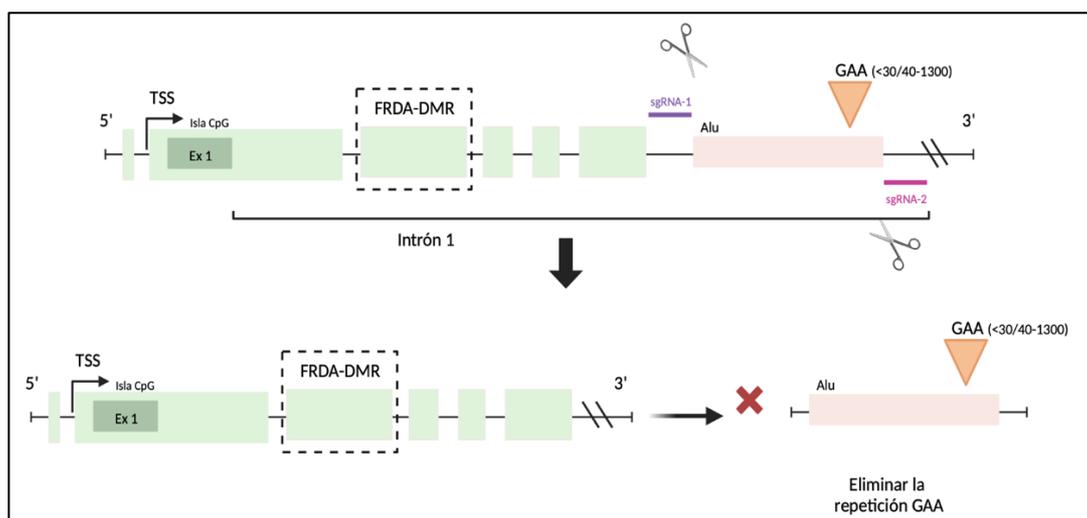


Figura 3. Representación de la delección de la repetición del triplete GAA en el intrón 1 del gen *FXN* con CRISPR-Cas9. En morado y en rosa se representan los sitios de unión de las sgRNAs empleadas para la realización de la edición genética. TSS: *Transcription Start Site*; FRDA-DMR: *Friedreich's Ataxia Differentially Methylated Region*; sgRNA: *single guide RNA*.

Por último, la principal razón por la cual se escoge realizar la edición genética en linfocitos de pacientes con FRDA radica en su fácil accesibilidad, lo que facilita la obtención y el trabajo con muestras de diferentes pacientes afectados (Mazzara et al., 2020). De esta manera, es posible comparar el efecto de la edición genética en las células provenientes de cada uno de ellos. En este estudio previo realizado en el laboratorio, se utilizaron un total de 33 muestras, de las cuales 6 correspondieron a personas sanas y 27 a pacientes enfermos de FRDA. Esta cantidad resulta significativa debido a la baja prevalencia de esta enfermedad rara, lo que permite obtener una representación amplia y precisa.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El silenciamiento del gen *FXN* no solo se debe al bloqueo transcripcional producido por la repetición del triplete GAA, sino que también se ven involucrados diferentes mecanismos epigenéticos, entre ellos la región diferencialmente metilada (DMR) ubicada aguas arriba de la repetición del triplete GAA. Así pues, nuestra **hipótesis** es que, si la región intrónica que contiene la expansión del triplete GAA y la región diferencialmente metilada del intrón 1 del gen *FXN*, se logrará aumentar la expresión del gen *FXN* y, en consecuencia, incrementar los niveles de frataxina para reducir los signos y síntomas clínicos asociados a esta enfermedad.

Por ello los **objetivos** que se plantean en este trabajo son:

- La validación de las diferentes guías de RNA diseñadas para la edición génica.
- La comprobación de la edición génica realizada con el sistema CRISPR-Cas9.

Por otro lado, y en relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se pueden establecer las siguientes relaciones con los diferentes objetivos que proponen (Anexo I):

- Relación con el ODS número 3, correspondiente al de Salud y Bienestar, puesto que con este trabajo se estaría estudiando una nueva opción terapéutica para tratar y/o eliminar esta enfermedad rara.
- Relación con el ODS número 4, correspondiente al de Educación de calidad puesto que se está llevando a cabo una investigación científica que proporciona y recoge avances científicos que contribuyen a la mejora del conocimiento que se tiene sobre la FRDA y el gen *FXN*.
- Relación con el ODS número 9, correspondiente al de Industria, innovación e infraestructura, puesto que se impulsa la utilización de técnicas de ingeniería genética avanzadas como el CRISPR-Cas9.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivos celulares

En este trabajo se emplean líneas celulares linfoblastoides (LCLs) obtenidas del Biobanco del CIBERER (<http://www.ciberer-biobank.es>) y pertenecientes a pacientes enfermos de FRDA (80 SI y 92 SI). Por otro lado, como controles se emplean LCLs de pacientes sanos (152 CTRL). Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado del proceso. Ambos tipos de LCLs provienen de muestras de sangre de pacientes obtenidas en el Hospital de La Fe, en las cuales se immortalizaron los linfocitos B mediante la adición al medio de transformación (RPMI 20%FBS, 1% L-Glutamina, 1% penicilina/estreptomicina y ciclosporina 1 µg/mL) el sobrenadante del Virus del Epstein-Barr. Este protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación en medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia con número de orden 2022/173 con fecha 27 de mayo de 2022.

Para trabajar con estos cultivos se utiliza una cabina de seguridad biológica de clase II (Nuair, LabGard® ES AIR, Plymouth, MN, EE.UU.). Se pipetea haciendo uso de micropipetas de diferentes volúmenes (Gilson, Middleton, WI, EE.UU.) y una pipeta automática monitorizada (Gilson, Middleton, WI, EE.UU.) y las células se dejan crecer en frascos de cultivo de 25 cm³ (Termo Fisher Scientific, Rochester, NY, EE.UU.) dispuestos verticalmente, puesto que estas células crecen en condiciones de no adherencia, es decir, en suspensión.

El medio empleado para el crecimiento de estas líneas celulares es RPMI 1640 (Biowest, Nuailé, Francia), al que se le añade un 20% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen Life Technologies Inc., Carlsbad, CA) inactivado a 56°C durante 20 minutos, un 1% de antibiótico (Penicilin-Streptomycin 10000U-10mg/mL stock), un 1% L-glutamina y rojo fenol, que sirve para indicar el pH del medio. El medio ya completo, se almacena en una nevera a 4°C y cuando se utiliza debe depositarse en un baño (OVAN, Badalona, Barcelona, España) a 37°C. En condiciones generales, estos cultivos celulares requieren de una incubadora a 37°C y 5% CO₂, (PHCbi, Wood Dale, IL, EE.UU.), para su correcto crecimiento.

Para realizar un subcultivo, en primer lugar, se recogen todas las células y se disponen en un tubo Falcon (Deltalab, Rubí, Barcelon, España) de 15 mL, para posteriormente centrifugarlo 4 minutos a 1250 rpm en la centrifuga Z 400K Universal Centrifuge (Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Alemania). Se elimina el sobrenadante con una bomba de vacío y pipetas Pasteur, quedándose en el *pellet* las células. Se resuspenden en medio RPMI 20%FBS y se realiza un conteo celular con la cámara de Neubauer y un ensayo de viabilidad con azul tripán. Esto es

necesario puesto que para el crecimiento óptimo de los linfoblastos se deben encontrar en fase exponencial, entorno a una concentración de 500.000 células/mL. Además, gracias al azul tripán podemos diferenciar los linfoblastos viables de los no viables, dado que los que tengan la membrana plasmática dañada, es decir, los no viables, se verán de un color azul, mientras que los que tengan la membrana intacta se verán de color blanco y brillantes. Los linfoblastos son observados con el microscopio de contraste de fases (Leica DFC450 C, Leica Science Lab, Wetzlar, Germany) y después, serán almacenados en la incubadora a 37°C y 5%CO₂.

3.2 Criopreservación. Congelación y descongelación de cultivos celulares.

Para la congelación de los linfoblastos, una vez recogidos en un Falcon y eliminado el sobrenadante, se resuspende el pellet de células en 1 mL de medio de congelación, el cual lleva FBS y un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), que es un crioprotector. Finalmente, este volumen es recogido y transferido a un criovial que se deposita en un tanque de isopropanol Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), y posteriormente es almacenado en un congelador (Froilabo, Collégien, Francia) a -80°C y más tarde, en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C.

Por lo contrario, en el proceso de descongelación el criovial es recogido en hielo seco para posteriormente sumergirlo en un baño a 37°C hasta que se descongele por completo. Al mismo tiempo, se prepara un tubo Falcon con medio RPMI FBS20% nuevo, donde se añade la muestra descongelada, se centrifuga, se elimina el medio, se resuspende en medio RPMI FBS20%, para eliminar así el DMSO y se transfiere a un frasco T25 de cultivo. A las 24 horas, se comprueba el crecimiento celular y se realiza un cambio de medio.

3.3 Diseño del ensayo CRISPR-Cas9

Como el experimento que se pretende realizar en este trabajo es la eliminación de la zona que engloba la región de metilación (FRDA-DMR) ubicada en la región intrónica junto con la hiperexpansión del triplete GAA del exón 1 del gen de la *FXN* (**Figura 4**). Se han diseñado diferentes guías de ARN (sgRNAs) que flanquean estas zonas. Se encuentran dos sgRNAs aguas arriba de la zona DMR del gen de la frataxina y una posterior a la hiperexpansión del triplete GAA, todas ellas seguidas de la secuencia PAM (NGG) imprescindible para que la enzima Cas9, encargada de realizar los cortes en el ADN, pueda realizar su función.

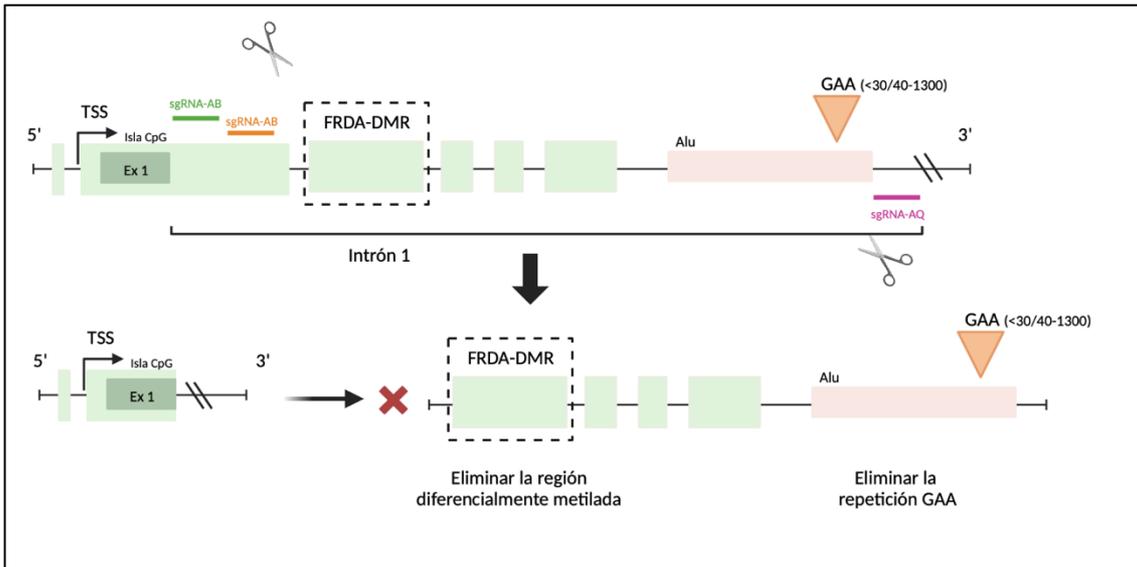


Figura 4. Representación de la delección de la zona FRDA-DMR y de la repetición GAA en el intrón 1 del gen *FXN* con CRISPR-Cas9. En verde, naranja y rosa se representan los sitios de unión de las sgRNAs empleadas para realizar la edición génica (sgRNA-AA/sgRNA-AQ y sgRNA-AB/sgRNA-AQ).

3.4 Protocolo Alt-R CRISPR-Cas9 System

Este protocolo está basado en el Alt-R™ CRISPR-Cas9 System de IDT y consiste en la introducción de complejos ribonucleoproteicos (RNPs), formados por Alt-R CRISPR-Cas9 guide RNA (crRNA:tracrRNA dúplex) y la enzima Cas9, en las células mediante electroporación usando el Lonza® Nucleofector™ System.

De forma más detallada, para la formación de la RNP (**Figura 5A**), primero se diseña la sgRNA específica (sgRNA-AA, sgRNA-AB y sgRNA-AQ) que está formada por dos elementos: el crRNA (CRISPR RNA) y el tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA). El crRNA es un oligonucleótido, de aproximadamente 36 nucleótidos, específico para la región o el gen del genoma que se desea modificar, así como ha de ser complementario a la secuencia de ADN objetivo y debe contener la secuencia PAM correspondiente para que la enzima Cas9 realice su función de corte. Mientras que el tracrRNA es de aproximadamente 67 nucleótidos, se encarga de interactuar con la enzima Cas9 para que el crRNA reconozca la secuencia PAM y ayuda a la formación de un complejo estable. Posteriormente, cuando se mezcla la sgRNA con la enzima Cas9 se forma lo que se denomina complejo ribonucleoproteico o RNP, que posteriormente es introducido introduce en las células mediante un nucleofector (**Figura 5B**). Este aparato genera campos eléctricos que abren los poros celulares y permite que las RNPs entren en las células por un proceso que se denomina electroporación o nucleofección.

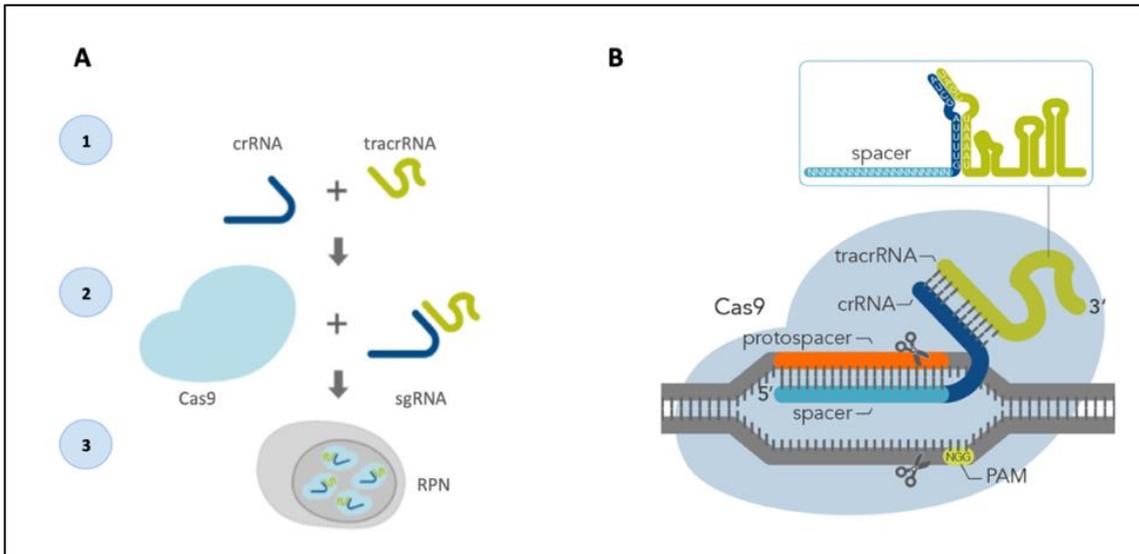


Figura 5. Componentes del sistema CRISPR-Cas9 para dirigir la endonucleasa Cas9 a dianas genómicas. (A). Unión del crRNA y el tracrRNA para formar la sgRNA, posterior mezcla con la enzima Cas9 y formación de la RPN. (B). El complejo de crRNA y tracrRNA hibridan entre sí y forman un complejo con la endonucleasa Cas9 para guiar el corte dirigido del ADN genómico. El sitio de corte se representa por el elemento espaciador (spacer) del crRNA que reconoce aproximadamente 20 nucleótidos de la cadena opuesta al sitio PAM (NGG).

3.4.1 Preparación de las células.

Previamente al día del experimento, se cuentan las células de las diferentes líneas de linfoblastos y se dejan en una concentración de 500.000 células/mL, para que el día del experimento, se encuentren en fase de crecimiento exponencial. El día del experimento, se vuelven a contar, se prepara una alícuota de 300.000 células/pocillo y se resuspenden en medio RPMI completo. Como generalmente se hacen dos pocillos por muestra para tener réplicas, se necesitan un total de 600.000 células de cada línea celular. Posteriormente, el Eppendorf se guarda en el incubador a 37°C 5%CO₂ y se preparan los mixes de RPN-Cas9 (*apartado 3.4.2*).

Una vez preparadas las RPNs, se centrifugan las células durante 7 mins a 100 x g a temperatura ambiente (RT) y se elimina el sobrenadante. Después, se resuspende con cuidado el pellet de células con PBS recalentado en el baño a 37°C. Se centrifuga a RT durante 7 mins a 100 x g y se elimina bien el sobrenadante. Una vez preparadas las RPNs y tras un máximo de 30 minutos, se añaden 20 µL de la Nucleofector™ Solution SF atemperada a RT por cada pocillo de células (en el caso de hacer réplicas, es decir, dos pocillos por línea celular se añaden 40 µL) obteniendo así el mix de células (**Figura 6**). Por otro lado, se prepara una placa de 96 pocillos con 175 µL de medio RPMI 20%FBS en cada pocillo que se va a utilizar y se guarda en el incubador a 37°C y 5% CO₂. Aquí es donde posteriormente se añadirán las células tras el proceso de nucleofección.

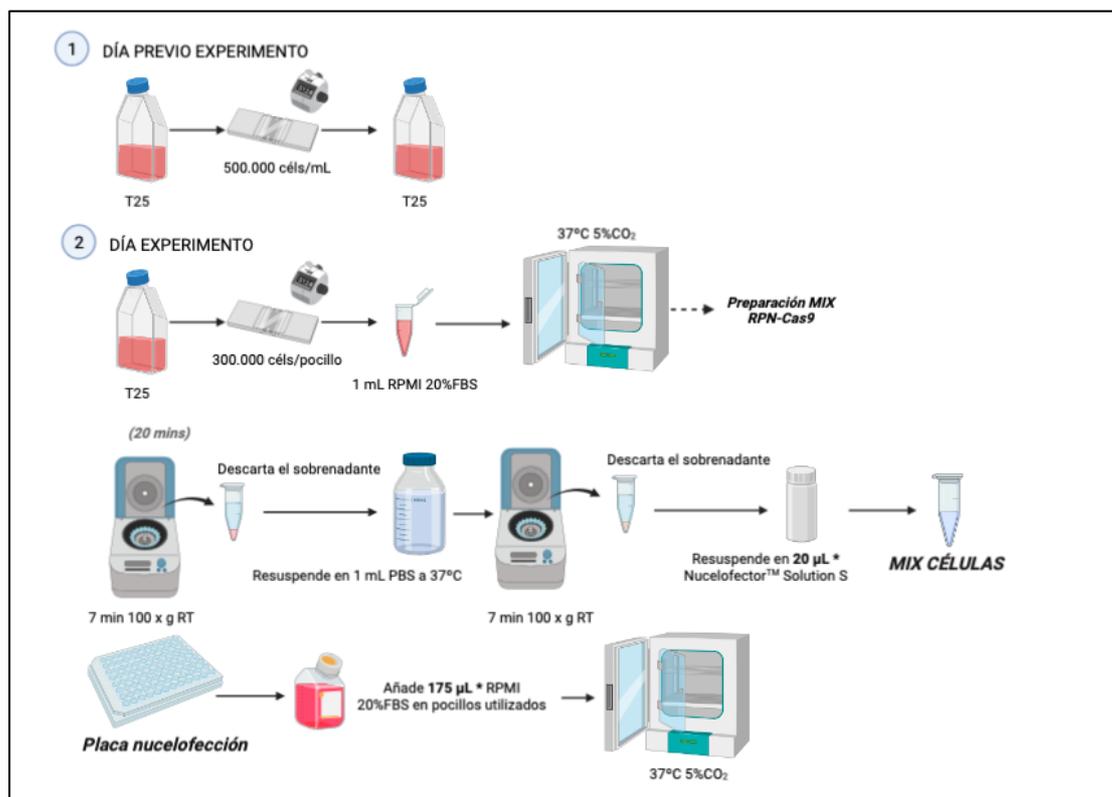


Figura 6. Representación de la preparación de las células para el protocolo de CRISPR-Cas9. *Los volúmenes están calculados para un pocillo de células, si se requieren más pocillos habrá que recalcularlos.

3.4.2 Preparación mixes de RPN-Cas9

Para la preparación de los mixes de RPNs-Cas9, en primer lugar, se preparan las guías de RNA (sgRNA) en Eppendorfs opacos, donde se preparan las guías sgRNA-AA, sgRNA-AB y sgRNA-AQ por separado. Los sitios de hibridación aproximados de las diferentes sgRNAs empleadas se encuentran representados en la Figura 4 y la secuencia, así como el lugar exacto de hibridación está reflejada en el Anexo II. Posteriormente se añadirá la enzima Cas9 y se diluirá con PBS para preparar el mix de RPNs. Los reactivos empleados en este protocolo se reflejan en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos, concentraciones y volúmenes de los reactivos empleados en el protocolo CRISPR-Cas9. Valor de las concentraciones de los reactivos stock, volumen añadido para resuspender los reactivos stock y la concentración final deseada para el comienzo del experimento.

Stock	Volumen para resuspender	Concentración final
2xcrRNA (10 nmol)	50 µL	200 µM
TracrRNA (20 nmol)	100 µL	200 µM
Enhancer (10 nmol)	100 µL	100 µM
Cas 9 (500 µg)	50 µL	10 µg/µL

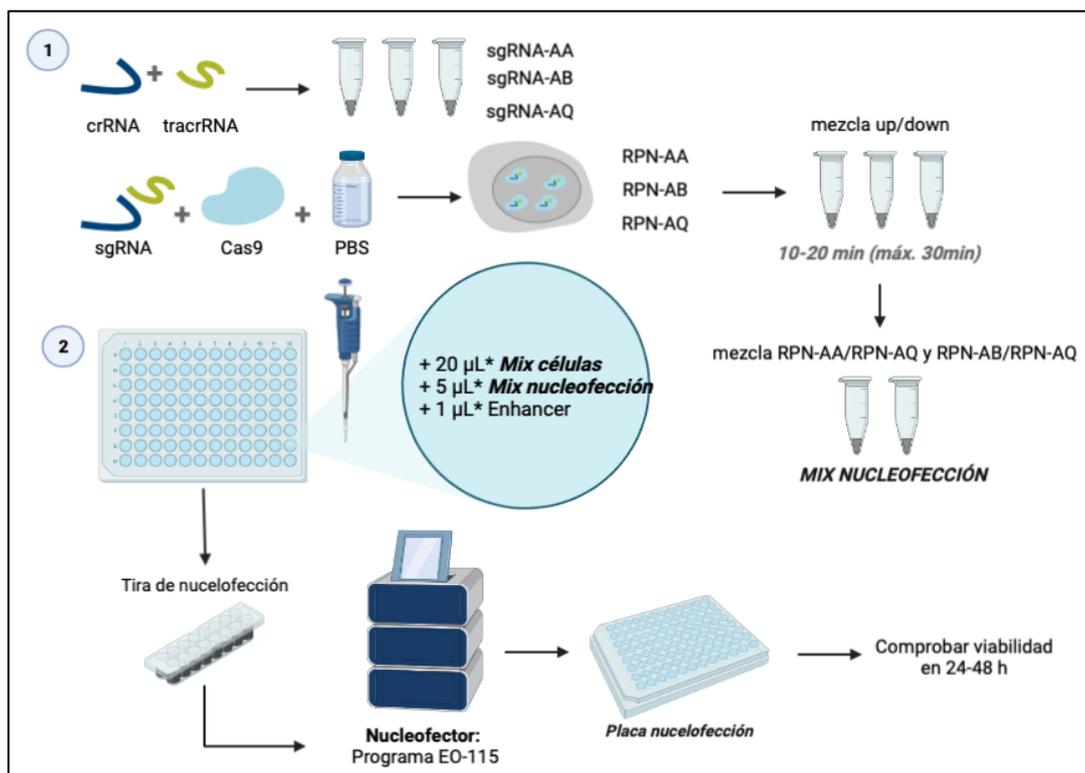


Figura 7. Representación de la preparación del ARN y de las RPNs para el protocolo de CRISPR-Cas9. *Los volúmenes están calculados para un pocillo de células, si se requieren más pocillos habrá que recalcularlos.

3.4.2.1 Preparación del RNA.

En un Eppendorf opaco estéril se mezclan concentraciones equimolares de los oligos de tracrRNA y crRNA (crRNA-AA, crRNA-AB y crRNA-AQ), donde la concentración final es de 100 μM , y da lugar a las diferentes sgRNA (sgRNA-AA, sgRNA-AB y sgRNA-AQ). En la Tabla 2, se representa un ejemplo para un volumen final de 6 μL . Posteriormente, se desnaturalizan las guías sgRNA-AA, sgRNA-AB y sgRNA-AQ durante 5 minutos a 95°C en una incubadora de baño seco (Major Science MD-MINI, MycroDYNE, FL, EE.UU.) y se dejan enfriar a RT.

Tabla 2. Volúmenes adicionados para la obtención de las sgRNAs.

Reactivo	Volumen (μL)
200 μM Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA	3
200 μM Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA	3
Volumen total de sgRNA	6

3.4.2.2 Preparación del complejo de RPNs

Para la formación de las RPNs, es necesario diluir cada sgRNA (sgRNA-AA, sgRNA-AB y sgRNA-AQ) por separado y la enzima Cas9 en PBS recalentado a 37°C, siguiendo los

volúmenes por pocillo que se indican la Tabla 3. Después, se mezcla el conjunto suavemente con la pipeta, dando lugar al complejo de RPNs.

Tabla 3. Volúmenes necesarios para preparar el mix de RPNs. El volumen de mix calculado (5 μ L) es para una única reacción de nucleofección, en el caso de realizar más, hay que escalar estos volúmenes.

Reactivo	Volumen (μ L)
PBS	2,1
Alt-R guide RNA (sgRNA del paso 3.3.2.1)	1,2 (120 pmol)
Alt-R Cas9 enzyme (500 μ g)	1,7 (104 pmol)
<i>Volumen total de RNP</i>	5

Una vez preparada cada RPNs (RPN-AA, RPN-AB y RPN-AQ), se mezcla cada tubo con up/down y se mantiene a RT entre 10-20 minutos, no excediendo un máximo de 30 min. Pasado el tiempo establecido, se mezcla un volumen igual de RPN-AA y RPN-AQ y otro volumen igual de RPN-AB y RPN-AQ, obteniendo el mix de nucleofección (**Figura 7**). Por último, en una placa de 96 pocillos se prepara el mix de células (*apartado 3.3.1*) junto con el mix de nucleofección y por cada uno de los pocillos de nucleofección, se añaden los volúmenes reflejados en la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes para la preparación de la reacción de nucleofección.

Reactivo	Volumen (μ L)
Mix de células (<i>apartado 3.3.1</i>)	20
Mix de nucleofección	5
Enhancer (10 nmol stock)	1
<i>Volumen total de RNP</i>	26

Después, se mezclan bien los diferentes componentes y se reparten 20 μ L en cada pocillo de la tira de nucleofección (SF Cell Line 4D-Nucleofector™ X Kit S, Lonza Bioscience, Rockland, ME, EE.UU.) asegurándose de la posición. Se programa el nucleofector (4D-Nucleofector® Core Unit, Lonza Bioscience, Rockland, ME, EE.UU.) con el programa EO-115 para la transfección de células T humanas y se marcan los pocillos utilizados. Una vez finalizado el programa se recogen las células de la tira de nucleofección con una pipeta y se adicionan en la placa de 96 pocillos con el medio atemperado a 37°C y 5% CO₂. Se guarda en el incubador y se comprueba la viabilidad celular 24-48 horas después.

3.5 Extracción ADN y cuantificación con el NanoDrop

Una vez realizada la edición génica, es necesario realizar una extracción de ADN para posteriormente comprobar mediante una PCR si los linfoblastos han sido correctamente editados (**Figura 8**). La extracción de ADN genómico fue realizada usando el DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Se parte de células en cultivo, las cuales son recogidas en un pellet para el comienzo de la extracción siendo como máximo una concentración de 5×10^6 células/mL. Con este kit finalmente, se eluye el ADN con 200 μ L del tampón AE.

Finalmente, para su cuantificación, se hace uso del NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), el cual aporta los datos de la concentración del ADN extraído, así como los ratios de absorbancia, A260/280 y A260/230, que indican la pureza de la extracción.

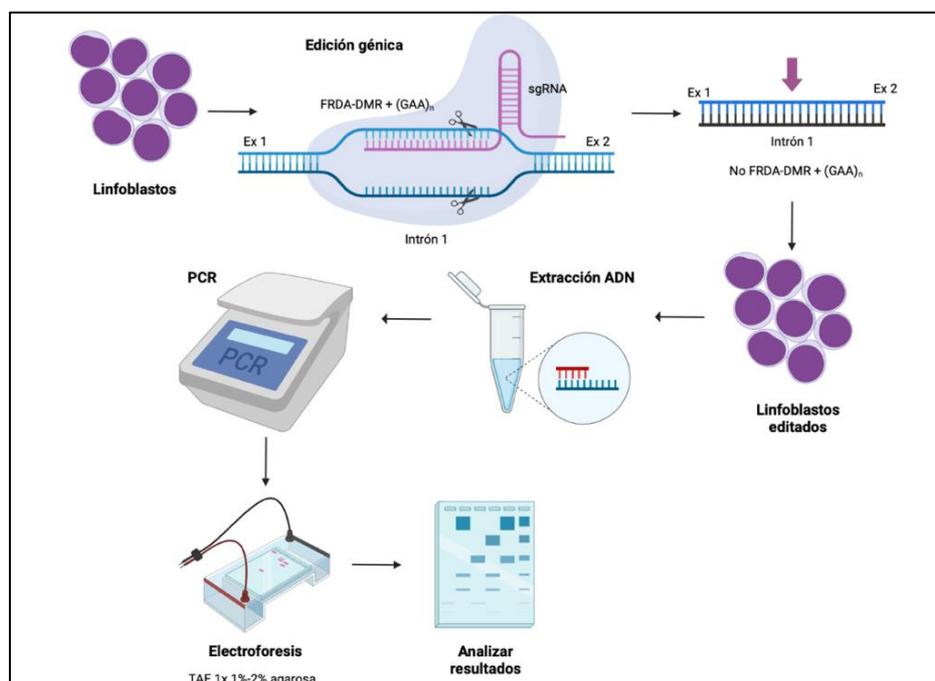


Figura 8. Diagrama de flujo del protocolo a seguir para comprobar la edición génica de los linfoblastos.

3.6 PCR y electroforesis

Con el ADN extraído de los linfoblastos editados, se realiza una PCR con las tres parejas de primers reflejadas en la Tabla 5 y cuyos sitios de hibridación se muestran en el Anexo II. Se realizan tres PCRs para comprobar la edición de las células. La primera pareja de primers (Primers de Edición) consiste en un primer forward que hibrida en una zona aguas arriba de la zona FRDA-DMR y el primer reverse que hibrida en una zona aguas abajo de la hiperexpansión del triplete GAA, por lo tanto, flanquean la zona de edición. Mientras que los primers reverse y forward de las parejas de Primers Internos 1 y 2 hibridan dentro de la zona de hipermetilación e

hiperexpansión que son eliminadas con la edición génica. Esta segunda PCR permite comprobar si la edición se ha producido en todas las células o por el contrario existe un pool de células que no han llegado a ser editadas

Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados para la PCR de comprobación de la edición génica y sus temperaturas de melting (Tm).

Primers edición	FXNIexon1A.dir 5' ACCGACATCGATGCGACC 3' Tm= 58 °C	EditWTqPCRdeletion.rev 5' GTGGAAGCCCAATACGTGGC 3' Tm= 64 °C
Primers internos 1	FXNdeletion.dir 5' ACCCAAAGAATGGCTGTGGG 3' Tm= 62 °C	IntronFXN.rev 5' TCTTGAACTCCGGACCTCAGG 3' Tm= 66 °C
Primers internos 2	WT-editqPCRdeletion.dir 5' CAGGCCACGTCCAAGCC 3' Tm= 58°C	IntronFXN.rev 5' TCTTGAACTCCGGACCTCAGG 3' Tm= 66°C

En cuanto al protocolo de PCR, se prepara la reacción según la Tabla 6, recalculando para el volumen de pocillos que se vayan a utilizar. Se mezcla bien el mix de reacción pipeteando suavemente y se dispensa en los tubos de PCR. Después, se añaden los primers y la muestra de ADN correspondientes a cada pocillo. Se recomienda utilizar una concentración de 50 ng/μL de ADN.

Tabla 6. Volúmenes para la preparación del mix de PCR. El buffer 10X lleva Tris HCl 750 mM (pH 9.0), KCl 500 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM y MgCl₂ 20 mM. *Calculados para un pocillo, si se van a usar más pocillos habrá que recalcular los volúmenes. **Mantener en el congelador a -20°C hasta que se vaya a utilizar.

Reactivo	Volumen (μL)
Agua libre de RNAsas	Volumen restante hasta llegar a 25 μL*
Buffer 10X with MgCl ₂	2,5 μL*
dNTPs (200 μm/μL)	1 μL*
Primers	1 μL primer forward + 1 μL primer reverse
Taq BioTools 1U/μL**	0,5 μL*
Muestra (50 ng/μL)	Volumen para 50 ng/μL
<i>Volumen total por pocillo</i>	<i>25 μL</i>

Posteriormente, se programa el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) de acuerdo con la Tabla 7, se colocan los tubos de PCR y se pone en marcha.

Tabla 7. Programa del termociclador para el protocolo de PCR.

Activación		
94°C	5 min	1 ciclo
Amplificación		
94°C	20 seg	
56°C	30 seg	30 ciclos
72°C	30 seg	
Extensión Final		
72°C	7 min	1 ciclo
Mantenimiento		
4°C	Infinito	

Una vez finalizada la PCR, se cuantifica mediante un gel de agarosa entre un 1,5-2% puesto que el tamaño de las bandas esperado es entre 500-200 pb y disuelto en tampón TAE, al cual se añade la solución de tinción de ácidos nucleicos RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea del Sur). Una vez, realizado el gel, se carga el marcador molecular correspondiente para estimar el tamaño de las bandas obtenidas. Se añade el tampón de carga LB 6X a cada muestra y posteriormente se carga en los pocillos del gel. Posteriormente, se deja correr durante 1 hora a 100 V en el equipo de electroforesis (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU.). Finalizado el tiempo, se revela el gel con el sistema de imagen molecular automático (Amersham ImageQuant™ 500 CYTIVVA).

4. RESULTADOS

4.1. Diseño de las sgRNAs y optimización de la estrategia de edición génica.

En primer lugar, se diseñaron dos sgRNAs diferentes, la sgRNA-AA (CD.Cas9.PJLY3149.AA) y la sgRNA-AB (CD.Cas9.PJLY3149.AB) que hibridan aguas arriba de la región FRDA-DMR y una sgRNA que hibrida en la región posterior a la repetición del triplete GAA, la sgRNA-AQ (CD.Cas9.VSJK3472.AQ) (Anexo II). Estas guías se diseñaron teniendo en cuenta todos aquellos factores que aseguran una buena eficacia en la edición génica como la ubicación de corte, la presencia de una secuencia PAM o el contenido en GC alrededor del 40-60%.

Se realizaron dos ediciones génicas diferentes, la primera utilizando la sgRNA-AA con la sgRNA-AQ y la segunda empleando la sgRNA-AB con la sgRNA-AQ. Gracias a la realización de la edición con dos guías nuevas y diferentes (sgRNA-AA y sgRNA-AB) se puede maximizar la eficacia de la edición, es decir, se puede comprobar cuál de las dos funciona y en caso de que funcionen las dos, se podría estudiar cuál de las dos es la que funciona mejor y no causa efectos *off-target* fuera de la región diana.

Las muestras de las líneas celulares 152 CTRL, 92 SI y 80 SI empleadas para realizar la edición se prepararon el día previo al experimento tal y como se describe en material y métodos para llevar a cabo su transfección con las ribonucleoproteínas específicas para cada edición. Como se realizaron dos réplicas de cada muestra y se realizaron dos transfecciones distintas se necesitaban un total de 1.200.000 células de cada línea celular. Así como se prepararon todos los reactivos de la nucleofección calculando que se utilizaban 4 pocillos por línea celular, lo que sumaba un total de 12 pocillos, de los cuales en la mitad de ellos se realizó la edición génica con las sgRNA-AA/sgRNA-AQ y en la otra mitad con las sgRNA-AB/sgRNA-AQ. Por lo que se necesitaba preparar el doble de la RNP-AQ ya que se utiliza para las dos ediciones.

Por otro lado, la edición génica fue realizada con el método de transfección no-viral del Nucleofector™ Technology de Lonza para células primarias y difíciles de transfectar. Se usó el programa EO-115, específico para células T humanas que presenta una viabilidad tras la transfección del 100% y una eficacia de transfección de aproximadamente el 40% para un volumen final de 20 μL que fue el que se empleó en este trabajo.

4.2. Crecimiento de los linfoblastos tras de la edición génica.

Una vez realizado el proceso de nucleofección y depositados los linfoblastos en una placa de 96 pocillos (P96) con 175 μL de medio RPMI 20%FBS, se dejaron crecer en el incubador a

37°C y 5% CO₂. Durante los días posteriores se observó la confluencia celular para ir añadiendo más medio en caso de que fuera necesario. Además, cuando el volumen del pocillo era máximo y la confluencia elevada, se realizaron diferentes pases a placas con mayor superficie por pocillo, tal y como se refleja en la Figura 9. Una vez alcanzada la placa de 6 pocillos (P6), se recogió todo el volumen del pocillo y se añadió a un tubo Falcon para centrifugarlo y obtener el *pellet* de células, necesario para realizar la extracción de ADN.

Durante este proceso, se observaron diferencias en el crecimiento entre la línea control (152 CTRL) y las líneas pertenecientes a pacientes con FRDA (80 SI y 92 SI), puesto que las primeras crecían con una mayor rapidez que las deficientes en frataxina, ya que una característica de los modelos de FRDA es que se limita el crecimiento celular. Este hecho refleja, muy probablemente, que no todas las células se han editado, que la eliminación de la zona FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA no ha mejorado el nivel de la expresión de la frataxina al mismo nivel que los controles y por eso siguen con un crecimiento lento o que simplemente la delección de esa zona no contribuye significativamente a una mayor expresión de esta proteína.

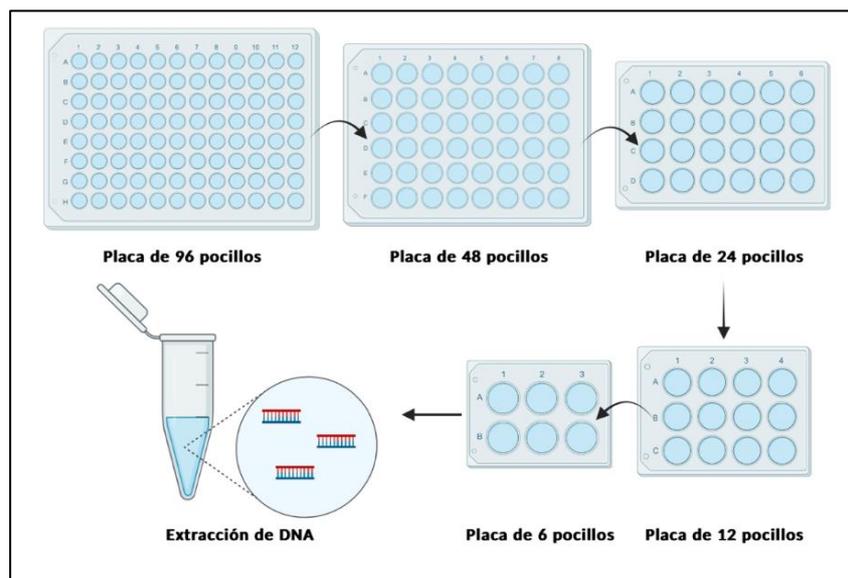


Figura 9. Proceso de escalado de los linfoblastos tras el proceso de edición génica.

4.3. Comprobación de la eficacia de la edición génica.

Para comprobar que la edición génica se ha realizado con éxito, se realizó una PCR con el fin de amplificar la región resultante tras la eliminación de la zona FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA. Por otro lado, también se realizó otra PCR en la que se amplificaba una región perteneciente a la zona que se pretendía eliminar. Debido a que las líneas deficientes en frataxina (80 SI y 92 SI) tienen un crecimiento más lento, en este trabajo solo se ha

podido testar la comprobación de la edición génica en la línea 152 CTRL perteneciente a un paciente sano.

4.3.1 Diseño de primers.

Para el diseño de los primers se tuvieron en cuenta diferentes aspectos entre los cuales destacan: la selección de secuencias lo suficientemente específicas para que solo hibridaran en la región diana, la elección de secuencias con una Temperatura de fusión o melting (T_m) comprendida entre 57 y 66°C y secuencias que presentaran un contenido de GC entorno al 40-60% (Bustin et al., 2020).

Al realizarse dos PCRs distintas que buscan amplificar diferentes tipos de fragmentos, se necesitan dos parejas de primers distintas. La primera PCR realizada es la que mostrará las bandas resultantes de la edición génica, por lo que, a los primers de esta PCR, se les llamará Primers de Edición (Primer FXN 1A.dir + Edit WT qPCR deletion.rev). El primer forward fue diseñado seleccionando una secuencia que cumpliera todos los parámetros descritos anteriormente y que estuviera ubicada aguas arriba de la región FRDA-DMR y de las zonas de hibridación de las guías de ARN (sgRNA-AA y sgRNA-AB). Mientras que el primer reverse fue diseñado aguas abajo de la repetición del triplete GAA y de la zona de hibridación de la guía de ARN, sgRNA-AQ (Anexo II).

En este caso, al amplificar con estos primers las muestras de ADN pertenecientes a las líneas celulares *wild type*, es decir, las que no se han sometido a la edición génica, se debería observar una banda de aproximadamente 1780 pb para las líneas controles (152 CTRL) y una banda de aproximadamente 1780 pb más tres veces el número de repeticiones del triplete GAA que presente el paciente. Para el paciente asociado a la línea celular 80 SI, se observaron 847 repeticiones en ambos alelos del gen *FXN*, mientras que para el paciente relacionado con la línea celular 92 se observaron 414 repeticiones en un alelo y 1114 repeticiones en el otro alelo. Por otro lado, amplificando con estos mismos primers pero en este caso las líneas celulares que sí que han sido sometidas a la edición génica, se esperará encontrar un tamaño de banda más pequeño, aproximadamente de 371 pb y 311 pb dependiendo de la guía que se haya utilizado para la edición, si es la sgRNA-AA o la sgRNA-AB respectivamente (**Figura 10A**). Además, las secuencias y tamaños de las bandas amplificadas que se esperan después de la PCR se encuentran reflejadas en el Anexo III.

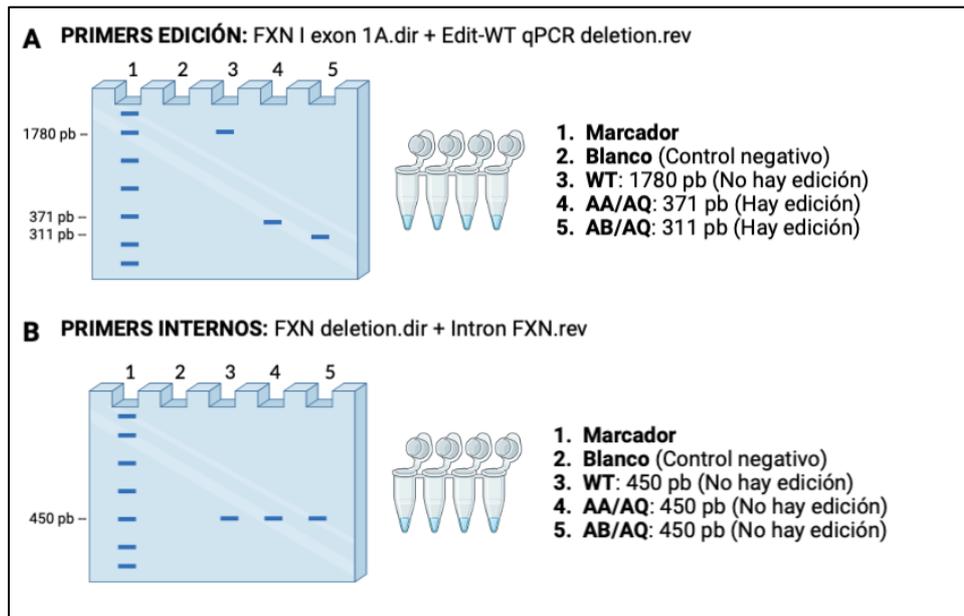


Figura 10. Representación de los resultados que se esperan tras la PCR y la electroforesis para la comprobación de la edición génica. A. Resultados esperados con la utilización de los Primers de Edición. **B.** Resultados esperados con la utilización de los Primers Internos 1. Para ambas figuras, el carril 3 se corresponde con la línea 152 CTRL sin edición, el carril 4 con la línea 152 CTRL editada con las sgRNA-AA/sgRNA-AQ y el carril 5 con la línea 152 CTRL editada con las sgRNA-AB/sgRNA-AQ

La segunda PCR realizada es la que mostrará las bandas correspondientes a los controles internos. Debido a que las bandas de la PCR anterior que prueban que los linfoblastos no están editados son de gran tamaño y, por lo tanto, más difíciles de amplificar, se diseñan unos primers que reúnan todas las características adecuadas y que hibriden en una zona perteneciente al fragmento que se busca delecionar y se denominarán Primers Internos 1 (FXN deletion.dir + intrón FXN.rev) y Primers Internos 2 (WT-edit qPCR deletion.dir + intrón FXN.rev). De manera que, si se observa este fragmento amplificado quiere decir que la edición no se ha realizado correctamente o que parte de la población celular no se ha llegado a editar (**Figura 10B**), ya que como indica el protocolo del sistema de nucleofección empleado, el porcentaje de transfección se encuentra en torno al 40%. Este último caso, se confirmaría si en la primera PCR, la que se realiza con los Primers de Edición, se observan las bandas correspondientes a la edición. Como control positivo, se utilizarán las células sin editar, ya que siempre tendrá que amplificarse el fragmento esperado.

4.3.2 Optimización de la PCR

Una vez diseñados los dos tipos distintos de primers, es necesario realizar diferentes pruebas para poner a punto la reacción y conocer así cuales son las condiciones óptimas con las cuales se obtienen los resultados esperados con una mayor claridad. En primer lugar, se realizó una única PCR utilizando las siguientes parejas de primers: Primers de Edición y Primers internos

2 (**Tabla 5**); en la cual se emplearon las condiciones reflejadas en las Tabla 6 y 7. En esta PCR, se observó una gran inespecificidad, por lo que se decidió variar las diferentes condiciones o parámetros de la PCR para lograr la aparición de las bandas esperadas.

Se determinó que la mejor estrategia consistía en realizar dos PCRs diferentes, cada una utilizando un par de primers distintos. Esto se debe a que los Primers de Edición y los Primers Internos 2 presentan diferencias significativas en sus T_m , lo que podría haber ocasionado dificultades en la hibridación de los primers con el ADN.

Respecto a los cambios realizados para la PCR con los Primers de Edición, se empezó aumentando el tiempo de extensión de 30 segundos a 2 minutos para comprobar si dándole más tiempo a la Taq Polimerasa se conseguía amplificar la banda de 1780 pb ya que la procesividad de la polimerasa es de 1kb/min, pero no se observó ninguna banda amplificada con este tiempo de extensión. Por ello, se optó por volver a reducir el tiempo de extensión a 30 segundos. Por otro lado, para conseguir una mayor especificidad se añadió DMSO al 2%, ya que es un agente que contribuye a la desestabilización de estructuras secundarias del ADN, permitiendo así que los cebadores se unan de manera más específica a su secuencia diana. También, reduce la formación de productos secundarios como dímeros de cebadores. Después de realizar múltiples pruebas, se determinó que la temperatura de hibridación óptima para obtener bandas más nítidas era de 57°C. Además, se decidió aumentar la temperatura de desnaturalización de los primers de 94°C a 96°C para garantizar que no se formaran dímeros de primers. Las condiciones finales de la PCR, así como el programa del termociclador empleado se indican en el Anexo IV.

Con estas condiciones se logró observar claramente las dos bandas esperadas correspondientes a la edición génica con las guías sgRNA-AA/sgRNA-AQ y sgRNA-AB/sgRNA-AQ. Por lo tanto, el resultado obtenido reflejado en la Figura 11 demuestra que la edición génica se realizó correctamente. En el Carril A correspondiente al control negativo, no se observa ninguna banda lo que indica que la reacción de PCR funcionó correctamente. En el carril B correspondiente a la muestra 152 WT sin editar tampoco se observa ninguna banda, debido a que el tiempo de extensión de la PCR no es lo suficientemente largo para la amplificación de fragmentos de esta longitud. En el carril C correspondiente a la muestra 152 AA/AQ (editada con la sgRNA-AA y sgRNA-AQ) se obtiene una banda de aproximadamente 350 pb que se puede inferir que se corresponde con la banda que se espera obtener tras realizar la edición génica con estas sgRNAs (Anexo III). También, se observa en el carril D correspondiente a la muestra 152 AB/AQ (editada con la sgRNA-AB y sgRNA-AQ) una banda de aproximadamente 300 pb que se corresponde con la banda de 311 pb que se esperaría obtener tras la delección de la región FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA con la edición génica. Por lo tanto, estos

resultados de la primera PCR realizada con los Primers de Edición indican que la edición génica se ha llevado a cabo de manera correcta y que el protocolo empleado es efectivo.

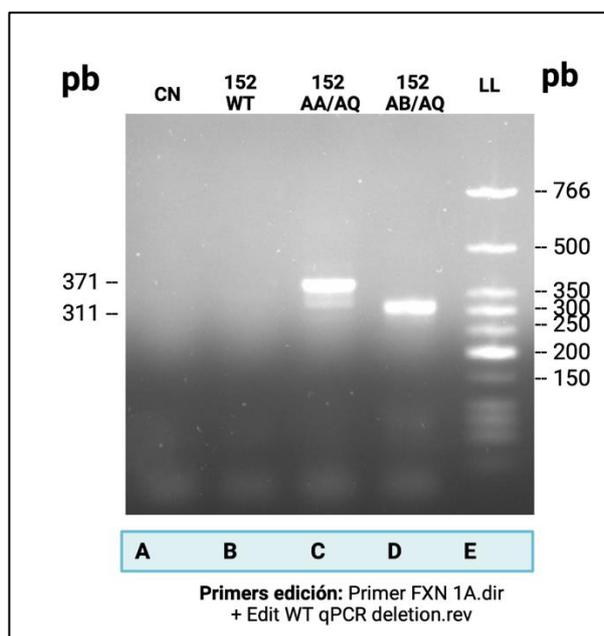


Figura 11. Resultado de la PCR realizada con los Primers de Edición que demuestra la edición génica. El carril A se corresponde con el control negativo; el carril B se corresponde con la línea 152 sin editar; el carril C con la línea 152 editada con las sgRNA-AA/sgRNA-AQ; el carril D se corresponde con la línea 152 editada con las sgRNA-AB/sgRNA-AQ; y el carril E se corresponde con el Low Ladder (LL). En el carril C se observa la banda de 371 pb correspondiente al fragmento amplificado tras la edición con las guías sgRNA-AA/sgRNA-AQ y en el carril D se observa la banda de 311 pb correspondiente al fragmento amplificado tras la edición con las guías sgRNA-AB/sgRNA-AQ.

En cuanto a la PCR de los Primers Internos 2, se mantuvo el tiempo de extensión en 30 segundos, puesto que era suficiente para el tamaño de los fragmentos que se buscaba amplificar. Para reducir el número de bandas inespecíficas se fue aumentando un grado la temperatura de hibridación de los primers hasta dar con aquella en la que el número de bandas se reducía significativamente. Sin embargo, con la pareja de Primers Internos 2, se observó que siempre salían las mismas bandas, lo cual indica que no se lograba aumentar la especificidad del ensayo. Por ello, se decidió probar con la pareja de Primers Internos 1 cuya diferencia de T_m entre el primer forward y reverse era más pequeña (**Tabla 5**), lo que puede suponer una mejor eficiencia para la amplificación. Las condiciones finales que se emplearon para esta PCR quedan reflejadas en el Anexo V, entre las cuales destaca el aumento de la temperatura de desnaturalización de los primers de 94°C a 96°C, la adición de DMSO al 2% y la temperatura de hibridación de los primers a 61°C.

Con ello, los resultados de esta PCR realizada con los Primers Internos 1 se observan en la Figura 12, donde en el carril B se encuentra el control negativo, en el cual no observamos ninguna banda y nos indica que la PCR es válida. Respecto a los carriles C, D y E correspondientes con las muestras 152 WT (no editado), 152 AA/AQ y 152 AB/AQ respectivamente se observa una banda de mayor intensidad de aproximadamente 450pb que se correspondería con la banda de 435 pb, que se espera obtener amplificando con esta pareja de primers. Con esta PCR, se confirma que la edición génica no se ha realizado al 100%, puesto que tanto en la línea celular sin editar (152WT) como en las líneas celulares editadas (152 AA/AQ y 152 AB/AQ) aparecen las bandas de 435 pb que indican que se ha amplificado una región de la zona que se pretendía deletar con la edición génica. Si la edición génica tuviera una eficacia del 100%, esperaríamos esa banda de 450 pb solamente en el carril C, puesto que pertenece a la línea celular sin editar. Sin embargo, al aparecer también en los carriles D y E correspondientes a las líneas celulares editadas, la PCR nos indica que la edición génica no se ha realizado al 100% y que obtenemos un pool de células editadas y no editadas.

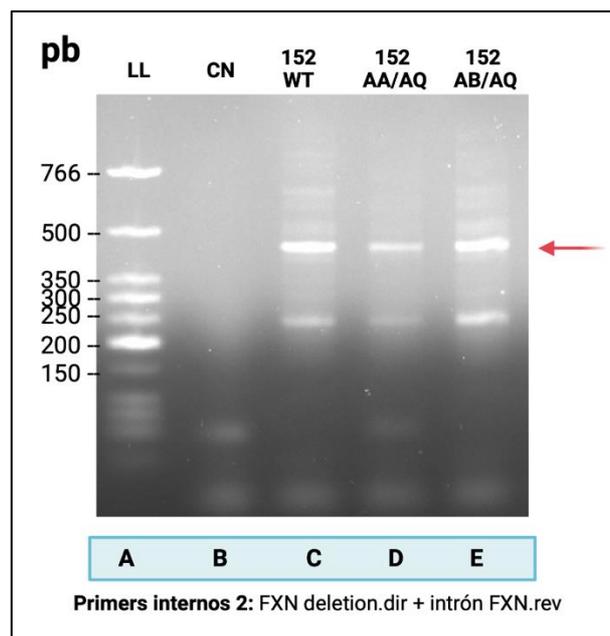


Figura 12. Resultado de la PCR realizada con los Primers Internos 1. El carril A se corresponde con el Low Ladder (LL); el carril B se corresponde con el control negativo; el carril C se corresponde con la línea 152 sin editar; el carril D con la línea 152 editada con las sgRNA-AA/sgRNA-AQ; y el carril E se corresponde con con la línea 152 editada con las sgRNA-AB/sgRNA-AQ. Señalado con una flecha roja, en los carriles C, D y E se observan las bandas de 435 pb correspondientes a la amplificación de un fragmento perteneciente a la región objetivo que se pretende eliminar.

5. DISCUSIÓN

5.1. Deleción de la región FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA como diana terapéutica de Ataxia de Friedreich.

En el estudio previo realizado en el laboratorio en linfocitos de pacientes con FRDA se demostró que solamente eliminando la hiperexpansión del triplete GAA, no se conseguía aumentar los niveles de frataxina en los linfocitos de todos los pacientes con FRDA empleados en el estudio. Este suceso evidencia la existencia de posibles mecanismos adicionales que regulan la expresión de la frataxina, tales como los mecanismos de silenciamiento epigenéticos del gen *FXN* en los que se incluyen la hipermetilación del ADN y la acetilación o metilación de histonas (**Figura 1B**). En este estudio se valora la posibilidad de que la hipermetilación del ADN, característica de la región FRDA-DMR (Rodden et al., 2020), contribuya a la baja expresión de la frataxina en aquellos pacientes con FRDA cuya expresión no se vio mejorada en el estudio anteriormente realizado. Como se ha descrito con anterioridad, no se conoce con exactitud de qué manera y en qué grado influye la hipermetilación de la región FRDA-DMR al silenciamiento del gen *FXN*. Pero sí que se conoce que su presencia favorece la formación de heterocromatina y, por tanto, se favorece el bloqueo de la elongación transcripcional en FRDA. En estudios anteriores se intentó, pero sin éxito, desmetilar la región FRDA-DMR hipermetilada mediante el tratamiento de células de pacientes con azacitidina y 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina/DAC) o la reducción de la expresión de las ADN metiltransferasas para evitar que el ADN sea metilado (Rodden et al., 2020). Por ello, en este trabajo se pretende delecionar la región FRDA-DMR, para comprobar si de esta manera, se recupera la expresión de frataxina a niveles de personas sanas o por lo menos no patológicas.

Para ello, el primer objetivo del estudio es evaluar si con las sgRNAs diseñadas y el protocolo del CRISPR/Cas9 empleado, se logra la deleción de la zona FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA en el intrón 1 del gen *FXN*. Con los resultados obtenidos, se demuestra la efectividad de la edición génica con las guías sgRNA-AA/sgRNA-AQ y sgRNA-AB/sgRNA-AQ, lo que indica que es una herramienta viable para realizar modificaciones genéticas específicas. Gracias a la validación de estas dos parejas de sgRNAs nos aseguramos de que la edición génica se está dirigiendo correctamente al sitio objetivo del genoma puesto que el tamaño de bandas esperadas y observadas es similar. Además, al haber validado dos parejas de sgRNAs se demuestra la reproducibilidad y la robustez del protocolo de CRISPR-Cas9 empleado, brindando así una mayor confianza en los resultados obtenidos.

En nuestro estudio se ha editado con las diferentes parejas de sgRNAs la línea celular 152 CTRL, y se ha observado que la edición génica no ha sido completa. La realización de la PCR

con los Primers Internos 1, nos confirma que en el conjunto de células sometidas a la edición génica existe un porcentaje que no se ha llegado a editar, bien porque no se han transfectado las ribonucleoproteínas o porque no se ha producido la edición. La cuestión es que se debe conseguir un clon de cada línea celular donde el 100% de las células estén completamente editadas, para poder continuar con el estudio y conseguir el objetivo final del proyecto.

Los siguientes pasos, una vez demostrada la existencia de una población de células editadas y no editadas en nuestra muestra, sería el aislamiento de un clon completamente editado. Para definirlo, se utilizarían las PCRs previamente diseñadas y optimizadas. En el caso de que en la PCR realizada con los Primers de Edición aparezcan las bandas correspondientes con la edición génica y en la PCR realizada con los Primers Internos 1 no aparezca la banda correspondiente a la amplificación de la zona que se pretende delecionar, se puede concluir que el clon se encuentra editado. Finalmente, para comprobar la edición génica de manera definitiva, es necesario secuenciar el clon para verificar si se ha delecionado el fragmento de interés.

Posteriormente, una vez confirmado por secuenciación que el clon se encuentra correctamente editado se realiza una extracción de proteínas y se procede a realizar un *Western Blot* para cuantificar la expresión de frataxina (**Figura 13**). Para comprobar si los niveles de frataxina han aumentado o disminuido tras la edición es necesario extraer también las proteínas de la misma línea celular sin editar. Con ello, el objetivo final es determinar si con la edición génica y, por tanto, la eliminación de la zona FRDA-DMR y la expansión del triplete GAA, se ha logrado aumentar los niveles de frataxina en todas las líneas celulares.



Figura 13. Representación esquemática de la continuación de la investigación. Una vez comprobada la presencia de células editadas en la muestra, se aísla un clon para confirmar su edición mediante PCR y secuenciación. Si se confirma la edición exitosa, se evalúa el nivel de frataxina mediante un Western Blot, comparándolo con la línea celular no editada, para determinar si se ha logrado aumentar la producción de frataxina.

De la misma forma, al eliminar toda la región flanqueada por la región FRDA-DMR y la repetición del triplete GAA, habría que estudiar si se está eliminando también algún promotor o

potenciador que afecte a la transcripción del gen *FXN*. Este gen pertenece al grupo de genes con promotores CpG, lo que implica que carece de la caja TATA, un elemento regulador del promotor, y contiene una isla CpG en las proximidades del TSS (**Figura 1A**). Se ha descrito que tanto el exón 1 como las secuencias del intrón 1 (adyacentes al exón 1) desempeñan un papel importante en el inicio de la transcripción del gen *FXN* ya que aguas abajo del TSS, entre el exón 1 y la región proximal del intrón 1, se encuentran marcas de cromatina típicas de regiones reguladoras/potenciadoras, como la acetilación o metilación de histonas H3 (Li et al., 2020). Por otro lado, se ha descrito en la región ubicada aguas arriba de la repetición GAA del intrón 1 la presencia de diferentes elementos que contribuyen a la actividad promotora del gen *FXN*, como la caja E (Greene et al., 2007) o los sitios de unión a factores de transcripción como el SRF o el TFAP2 (Puspasari et al., 2011). Por lo que habría que comprobar si eliminando esta región objetivo, se pierde algún elemento regulatorio necesario para la transcripción del gen *FXN*.

5.2. Perspectivas de futuro

Si finalmente se observa que con la delección de la región FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA, los niveles de frataxina aumentan en todos los linfocitos de pacientes con FRDA y se mantienen constantes en los linfocitos de pacientes sanos, es realista asumir que la región hipermetilada descrita contribuye al silenciamiento del gen *FXN* y por tanto es una buena diana terapéutica.

Por todo ello, un posible enfoque futuro podría ser el estudio de estas marcas epigenéticas de manera individualizada, para conocer cuáles de ellas son las responsables del silenciamiento del gen *FXN*. Esta propuesta se basa en una edición epigenética mediante CRISPR-dCas9 para eliminar solamente aquellas CpGs metiladas que contribuyan a una menor expresión de la frataxina, en vez de realizar una desmetilación completa de las CpGs como se había realizado en estudios anteriores. Un primer planteamiento para realizar la desmetilación de las CpGs individuales podría basarse en la fusión de la endonucleasa Cas9 inactivada (dCas9) con el dominio catalítico de TET1 (Morita et al., 2016). Sin embargo, como las proteínas TET no son desmetilasas sino dioxigenasas, generan una serie de inconvenientes que conllevan consecuencias transcripcionales poco claras (Spruijij et al., 2013). Por ello, en estudios más recientes se ha demostrado que simplemente con la endonucleasa dCas9 y una sgRNA que contenga la secuencia de la CpG de interés, se puede lograr la desmetilación completa de esta CpG. Puesto que al unirse la dCas9 a la CpG señalada, se bloquea la unión de la enzima DNMT1 encargada de la metilación del ADN, por lo que dicha posición no será susceptible de metilación (Sapozhnikov & Szyf, 2021).

6. CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio ha proporcionado una visión general sobre el planteamiento de un nuevo enfoque para el tratamiento de la Ataxia de Friedreich (FRDA), centrándose específicamente en la metilación del ADN como una marca epigenética relevante en la patogénesis de la enfermedad. En este trabajo se ha demostrado mediante la implantación de técnicas de edición génica, la correcta funcionalidad de diferentes sgRNAs diseñadas para llevar a cabo la delección del fragmento de interés que comprende la región FRDA-DMR y la mutación genética responsable de la FRDA. Además, se ha validado el protocolo de CRISPR-Cas9 empleado para realizar la edición génica.

Finalmente cabe destacar que el estudio de la edición génica y la epigenética en el contexto de la FRDA representa un avance hacia el desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas para esta enfermedad neurodegenerativa. No obstante, es importante destacar que, aunque estas técnicas presentan un gran potencial, todavía existen desafíos que deben abordarse antes de una aplicación clínica.

7. BIBLIOGRAFÍA

BLOOMER, H., KHIRALLAH, J., LI, Y., & XU, Q. (2022). CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein-mediated genome and epigenome editing in mammalian cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 181(114087), 114087. doi:10.1016/j.addr.2021.114087

BÜRK, K., MÄLZIG, U., WOLF, S., HECK, S., DIMITRIADIS, K., SCHMITZ-HÜBSCH, T., ... SCHULZ, J. B. (2009). Comparison of three clinical rating scales in Friedreich ataxia (FRDA): Scales in FRDA. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 24(12), 1779–1784. doi:10.1002/mds.22660

BUSTIN, S. A., MUELLER, R., & NOLAN, T. (2020). Parameters for successful PCR primer design. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2065, 5–22. doi:10.1007/978-1-4939-9833-3_2

CAMPUZANO, V., MONTERMINI, L., MOLTÒ, M. D., PIANESE, L., COSSÉE, M., & CAVALCANTI, F. (1996). Friedreich's ataxia: auto-somal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271, 1423–1427.

CHUTAKE, Y. K., LAM, C., COSTELLO, W. N., ANDERSON, M., & BIDICHANDANI, S. I. (2014). Epigenetic promoter silencing in Friedreich ataxia is dependent on repeat length: Epigenetic Silencing in FRDA. *Annals of Neurology*, 76(4), 522–528. doi:10.1002/ana.24249

DELATYCKI, M. B., & CORBEN, L. A. (2012). Clinical features of Friedreich ataxia. *Journal of Child Neurology*, 27(9), 1133–1137. doi:10.1177/0883073812448230

FARA. (2023). Research pipeline. Recuperado el 23 de junio de 2023, de <https://www.curefa.org/research/research-pipeline>

GERHARDT, J., BHALLA, A. D., BUTLER, J. S., PUCKETT, J. W., DERVAN, P. B., ROSENWAKS, Z., & NAPIERALA, M. (2016). Stalled DNA replication forks at the endogenous GAA repeats drive repeat expansion in friedreich's ataxia cells. *Cell Reports*, 16(5), 1218–1227. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.075

GREENE, E., MAHISHI, L., ENTEZAM, A., KUMARI, D., & USDIN, K. (2007). Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Research*, 35(10), 3383–3390. doi:10.1093/nar/gkm271

HANAUER, A., CHERY, M., FUJITA, R., DRIESEL, A. J., GILGENKRANTZ, S., & MANDEL, J. L. (1990). The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by

mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *The American Journal of Human Genetics*, 46(1), 133–137.

HANSON, E., SHELDON, M., PACHECO, B., ALKUBEYSI, M., & RAIZADA, V. (2019). Heart disease in Friedreich's ataxia. *World Journal of Cardiology*, 11(1), 1–12. doi:10.4330/wjc.v11.i1.1

HERMAN, D., JENSSEN, K., BURNETT, R., SORAGNI, E., PERLMAN, S. L., & GOTTESFELD, J. M. (2006). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nature Chemical Biology*, 2(10), 551–558. doi:10.1038/nchembio815

KAKHLON, O., BREUER, W., MUNNICH, A., & CABANTCHIK, Z. I. (2010). Iron redistribution as a therapeutic strategy for treating diseases of localized iron accumulation This review is one of a selection of papers published in a Special Issue on Oxidative Stress in Health and Disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(3), 187–196. doi:10.1139/y09-128

KEARNEY, M., ORRELL, R. W., FAHEY, M., BRASSINGTON, R., & PANDOLFO, M. (2016). Pharmacological treatments for Friedreich ataxia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(8), CD007791. doi:10.1002/14651858.CD007791.pub4

KIM, E., NAPIERALA, M., & DENT, S. Y. R. (2011). Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Research*, 39(19), 8366–8377. doi:10.1093/nar/gkr542

KNIGHT, S. C., XIE, L., DENG, W., GUGLIELMI, B., WITKOWSKY, L. B., BOSANAC, L., ... TJIAN, R. (2015). Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6262), 823–826. doi:10.1126/science.aac6572

KUMARI, D., BIACSI, R. E., & USDIN, K. (2011). Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in friedreich ataxia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4209–4215. doi:10.1074/jbc.m110.194035

LI, J., LI, Y., WANG, J., GONZALEZ, T. J., ASOKAN, A., NAPIERALA, J. S., & NAPIERALA, M. (2020). Defining transcription regulatory elements in the human frataxin gene: Implications for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 31(15–16), 839–851. doi:10.1089/hum.2020.053

MAZZARA, P. G., MUGGEO, S., LUONI, M., MASSIMINO, L., ZAGHI, M., VALVERDE, P. T.-T., ... BROCCOLI, V. (2020). Frataxin gene editing rescues Friedreich's ataxia pathology in dorsal root ganglia organoid-derived sensory neurons. *Nature Communications*, 11(1), 4178. doi:10.1038/s41467-020-17954-3

MORITA, S., NOGUCHI, H., HORII, T., NAKABAYASHI, K., KIMURA, M., OKAMURA, K., ... HATADA, I. (2016). Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nature Biotechnology*, 34(10), 1060–1065. doi:10.1038/nbt.3658

PANDOLFO, M. (2009). Friedreich ataxia: the clinical picture. *Journal of Neurology*, 256 Suppl 1(S1), 3–8. doi:10.1007/s00415-009-1002-3

PUSPASARI, N., ROWLEY, S. M., GORDON, L., LOCKHART, P. J., IOANNOU, P. A., DELATYCKI, M. B., & SARSERO, J. P. (2011). Long range regulation of human FXN gene expression. *PloS One*, 6(7), e22001. doi:10.1371/journal.pone.0022001

ROBLES RODRÍGUEZ, L. (2022). Papel de las Membranas Asociadas a Retículo Endoplasmático y Mitocondria (MAMs) en la fisiopatología celular de la Ataxia de Friedreich y su relevancia como diana terapéutica.

RODDEN, L. N., CHUTAKE, Y. K., GILLIAM, K., LAM, C., SORAGNI, E., HAUSER, L., ... BIDICHANDANI, S. I. (2021). Methylated and unmethylated epialleles support variegated epigenetic silencing in Friedreich ataxia. *Human Molecular Genetics*, 29(23), 3818–3829. doi:10.1093/hmg/ddaa267

RODDEN, L. N., GILLIAM, K. M., LAM, C., LYNCH, D. R., & BIDICHANDANI, S. I. (2021). Epigenetic heterogeneity in friedreich ataxia underlies variable FXN reactivation. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 752921. doi:10.3389/fnins.2021.752921

RODRÍGUEZ, L. R., CALAP-QUINTANA, P., LAPEÑA-LUZÓN, T., PALLARDÓ, F. V., SCHNEUWLY, S., NAVARRO, J. A., & GONZALEZ-CABO, P. (2020). Oxidative stress modulates rearrangement of endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and calcium dysregulation in a Friedreich's ataxia model. *Redox Biology*, 37(101762), 101762. doi:10.1016/j.redox.2020.101762

SAKAMOTO, N., CHASTAIN, P. D., PARNIEWSKI, P., OHSHIMA, K., PANDOLFO, M., GRIFFITH, J. D., & WELLS, R. D. (1999). Sticky DNA. *Molecular Cell*, 3(4), 465–475. doi:10.1016/s1097-2765(00)80474-8

SAPOZHNIKOV, D. M., & SZYF, M. (2021). Unraveling the functional role of DNA demethylation at specific promoters by targeted steric blockage of DNA methyltransferase with CRISPR/dCas9. *Nature Communications*, 12(1), 5711. doi:10.1038/s41467-021-25991-9

SIVAKUMAR, A., & CHERQUI, S. (2022). Advantages and limitations of gene therapy and gene editing for friedreich's ataxia. *Frontiers in Genome Editing*, 4, 903139. doi:10.3389/fgeed.2022.903139

SPRUIJT, C. G., GNERLICH, F., SMITS, A. H., PFAFFENEDER, T., JANSEN, P. W. T. C., BAUER, C., ... VERMEULEN, M. (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*, 152(5), 1146–1159. doi:10.1016/j.cell.2013.02.004

ZESIEWICZ, T. A., HANCOCK, J., GHANEKAR, S. D., KUO, S.-H., DOHSE, C. A., & VEGA, J. (2020). Emerging therapies in friedreich's ataxia. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 20(12), 1215–1228. doi:10.1080/14737175.2020.1821654

ZHANG, S., SHEN, J., LI, D., & CHENG, Y. (2021). Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics*, 11(2), 614–648. doi:10.7150/thno.47007

8. ANEXOS

Anexo I. Objetivos de desarrollo sostenible



Producido en colaboración con **TROLLBÄCK + COMPANY** | TheGlobalGoals@trollback.com | +1.212.529.1010
Para cualquier duda sobre la utilización, por favor comuníquese con: dpicampaigns@un.org

Anexo II. Fragmento de la posición nucleotídica 5190 a la 8080 del gen *FXN* [REF]. Se representa en mayúsculas el exón 1 (5190-5385) cuya CDS va desde la posición (5221 a la 5385) y en minúsculas parte del intrón 1; resaltado en azul se marca la zona aproximada de metilación (FRDA-DMR); resaltado en amarillo, verde y rosa se marca la secuencia guía sgRNA-AA, sgRNA-AB y sgRNA-AQ respectivamente; subrayado en negro se marca la secuencia PAM; de color rojo y subrayado se marca la secuencia de los primers FXN I exon 1A.dir y Edit WT qPCR deletion.rev respectivamente; en color morado y subrayado se marca la secuencia del primer Wt-edit qPCR deletion.dir; en color azul y subrayado se marca la secuencia del primer Intron FXN.rev; en en color amarillo y subrayado se marca la secuencia del primer Deletion FXN.dir; y por último, marcada con una llave se muestra la zona que se busca delecionar, que contiene la región FRDA-DMR y la hiperexpansión del triplete GAA.

```

AGGGCGGAGCGGGCGGCAGACCCGGAGCAGCATGTGGACTCTCGGGCGCCGCGCAGTAGCCGGCCTCCTGGC
GTCACCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGACCCTCACCCGGGTCCCGCGGCCGCGCAGAGTTGGCCCCACTCTGCGG
CCGCCGTGGCTGCGCACCGACATCGATGCGACCTGCACGCCCGCCGCGCAgtaagtatccgcgccgggaa
cagccgcgggcccgcacgcccgcgggcccgcacgcgcgcgcctcgccagggaggccgcgcacgcggggctcg
ctccgggtacgcgcgctggactagctcaccgccctctctcagggcgcccgccggaagcggccttgcaac
tcccttctctggttctccgggtgcatttacactggcttctgctttccgaaggaaggggacattttgtcc
tgcggtgagactgcggtcaaggcacgggcgaaggcagggcaggctggtggaggggaccggttccgaggggt
gtgcggtgtctccatgcttgtcacttctctgcgataacttgtttcagtaataataatagatggtatctgct
agtatatacacataacataatgtgtgtgtctgtgtgtatctgtatatagcgtgtgtgtgtgtgtgtgt
gcgcgcacgggcccgcgcacacctaataatttcaaggctggatTTTTTgaacgaaatgctttcctggaacg
aggtgaaacttcagagctgcagaatagctagagcagcagggccctggctTTTggaaactgacccgacctt
tattccagattctgccccactccgcagagctgtgtgaccttggggattcccctaacctctctgagacgtgg
ctttgttttctgtaggagaagataaaggtagcgcaccttttgcggacctggtgtgaggattaaatgggaat
aacatagataaagtcttcagaacttcaaattagttccctttcttctcttgggggtacaaagaaatactg
accagttacgccacggcttgaaaggaggaaacccaaagaatggctgtggggatgaggaagattcctcaagg
ggaggacatggtatTTaatgagggtcttgaagatgccaaggaagtggtagagggtgtttcacgaggaggaa
ccgtctgggcaaaggccaggaaggcgaaggggatcccttcagagtggctggtacgccgatgtattagggg
agatgaaagaggcaggccacgtccaagccatatttgtgttctctccgagtttgtactttaggcttgaact
tcccacacgtgtattttggcccacattgtgttgaagaaactttgggattggttgcagtgcttaaaagtta
ggacttagaaaatggatttctggcaggacgcgggtggctcatgccataatctcagcactttgggaggccta
ggaagtggtatcacctgaggtccggagttcaagactaacctggccaacatggtgaaaccagtatctactaa
aaaatacaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaagaagaagaagaagaaataaagaaaagttagccgggctgtgtctg
cgcgctgtaatccagctactccagaggctgcggcaggagaatcgcttgagcccgggaggcagaggttgca
ttaagccaagatcgccaatgcactccggcctggcgacagagcaagactccgtctcaaaaaataataataa
taataaaaaataaaaaataaaatggatttccagcatctctggaaaaataggcaagtgtggccatgatggg
cttagatctcctctaggaagcagacatttattacttggcttctgtgactatctgagctgccacgtattgg
gcttccacccctgctgtgtggacagcatgggtgtcagcagagttgtgtttgtttgtttttgtttttgagaca
gagtttccctctgttggccaggctggagtgcagtggctcagt

```

Anexo III. Tamaño y fragmentos generados tras la amplificación por PCR con los Primers de Edición (Primer FXN 1A.dir+ Edit WT qPCR deletion.rev). La edición génica usando las guías sgRNA-AA y sgRNA-AQ dan lugar al primer fragmento de la figura de un tamaño aproximado de 376 pb, mientras que la edición génica usando las guías sgRNA-AB y sgRNA-AQ dan lugar al segundo fragmento de la figura de un tamaño aproximado de 311 pb. Por otro lado, se muestra el tamaño y los fragmentos generados tras la amplificación por PCR con los Primers Internos 2 (WT-edit qPCR deletion.dir + intrón FXN.rev) que se corresponde con un tamaño de 238 pb y con los primers internos 1 (FXN deletion.dir + intrón FXN.rev) que se corresponde con un tamaño de 435 pb.

Fragmento Primers Edición con las guías sgRNA-AA/sgRNA-AQ de 376 pb

ACCGACATCGATGCGACCTGCACGCCCGCCGCGCAgtaagtatccgcgccgggaacagccgcgggcccgcac gccgcgggcccgcacgcccgcacgcctgcgcagggaggccgcgcacgcccgggtcgctccgggtacgcgcgc tggactagctcaccgcgctccttctcagggcgcccgccggaagcggccttgaactcccttctctggt **tct cccggttgcaattacactgg**cttctgcttccgaagaaaaggggacattttgtcctgcggt **gcgactgcgg gtcaaggcactagatctcctctaggaagc**agacatttattacttggtctctgtgcactatctgagct **gcca cgtattgggcttccac**

Fragmento Primers Edición con las guías sgRNA-AB/sgRNA-AQ de 311 pb

ACCGACATCGATGCGACCTGCACGCCCGCCGCGCAgtaagtatccgcgccgggaacagccgcgggcccgcac gccgcgggcccgcacgcccgcacgcctgcgcagggaggccgcgcacgcccgggtcgctccgggtacgcgcgc tggactagctcaccgcgctccttctcagggcgcccgccggaagcggccttgaactcccttctctggt **tct cccggttgcaattacactagatctcctctaggaagc**agacatttattacttggtctctgtgcactatctga gct **gccacgtattgggcttccac**

Fragmento Primers Internos 2 de 238 pb

caggccacgtccaagccatatttgggtgctctccggagtttgactttaggcttgaacttcccacacgtgt tatttggcccacattgtgttgaagaaactttgggattggttgccagtgtttaaagttaggacttagaaaa tggatttctctggcaggacgcggtggctcatgccataatctcagcactttgggaggcctaggaaggtggatc acctgaggtccggagttcaaga

Fragmento Primers Internos 1 de 435 pb

acccaaagaatggctgtggggatgaggaagattcctcaagggaggacatggtattttaatgagggctttaa gatgccaaggaagtggtagagggtgttccagaggaggaaaccgtctgggcaaaggccaggaaggcggaaagg gcatccctcagagtggctggtacgcccagatgtattaggggagatgaaagagg caggccacgtccaagccat atttgggtgctctccggagtttggactttaggcttgaacttcccacacgtgttatttggcccacattgtgt ttgaagaaactttgggattgggtgccagtgctttaaagttaggacttagaaaatggatttctctggcaggacg cgggtggctcatgccataatctcagcactttgggaggcctaggaaggtggatc acctgaggtccggagttca aga

Anexo IV: Condiciones óptimas de la PCR para los Primers de Edición (Primer FXN 1A.dir+ Edit WT qPCR deletion.rev). **A.** Volúmenes para la preparación del mix de PCR. *Calculados para un pocillo, si se van a usar más pocillos habrá que recalcular los volúmenes. **B.** Programa del termociclador optimizado para el protocolo de PCR.

A

Reactivo	Volumen (μL)
Agua libre de RNAsas	Volumen restante hasta llegar a 25 μL*
Buffer 10X with MgCl ₂	2,5 μL*
dNTPs (200 μm/μL)	1 μL*
Primers	1* μL primer forward + 1* μL primer reverse
DMSO	0,5 μL*
Taq BioTools 1U/μL	0,5 μL*
Muestra (50 ng/μL)	Volumen para 50 ng/μL
<i>Volumen total por pocillo</i>	<i>25 μL</i>

B

Activación		
96°C	5 min	1 ciclo
Amplificación		
96°C	20 seg	
57°C	30 seg	30 ciclos
72°C	30 seg	
Extensión Final		
72°C	7 min	1 ciclo
Mantenimiento		
4°C	Infinito	

Anexo V: Condiciones óptimas de la PCR para los Primers Internos 1 (FXN deletion.dir + intrón FXN.rev).

A. Volúmenes para la preparación del mix de PCR. *Calculados para un pocillo, si se van a usar más pocillos habrá que recalcular los volúmenes. **B.** Programa del termociclador optimizado para el protocolo de PCR.

A

Reactivo	Volumen (μL)
Agua libre de RNAsas	Volumen restante hasta llegar a 25 μL *
Buffer 10X with MgCl_2	2,5 μL *
dNTPs (200 $\mu\text{m}/\mu\text{L}$)	1 μL *
Primers	1 μL * primer forward + 1 μL * primer reverse
Taq BioTools 1U/ μL	0,5 μL *
Muestra (50 ng/ μL)	Volumen para 50 ng/ μL
<i>Volumen total por pocillo</i>	<i>25 μL</i>

B

Activación		
96°C	5 min	1 ciclo
Amplificación		
96°C	20 seg	
61°C	30 seg	30 ciclos
72°C	30 seg	
Extensión Final		
72°C	7 min	1 ciclo
Mantenimiento		
4°C	Infinito	