

**Titulo del Trabajo:**

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

**Titulo del Trabajo en Inglés:**

Implementation of the CRISPR/Cas13 System for the Degradation of the Mutant ATXN7 RNA Messenger of Spinocerebellar Ataxia Type 7

**Nombre:** MARCO

**Apellidos:** JÁCOME DEL ANGEL

**ORCID:** <https://orcid.org/0009-0009-3873-6383>

**País de Residencia:** MEXICO

**Área de Investigación:** INVESTIGACIÓN EN SALUD

**Institución a la que Pertenece:** CINVESTAV

**Área de Adscripción:** Genética y Biología Molecular

**Correo Electrónico:** marco.jacome@cinvestav.mx

**Datos de los(as) coautores(as) del Trabajo**

Mauricio Hernández Somilleda, Rocío Suárez Sánchez, José Manuel Hernández Hernández, Oscar Hernández Hernández

Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, MEXICO, mauricio.hernandezs@cinvestav.mx, <https://orcid.org/0009-0009-9298-5890>

Medicina Genómica, INRLGII, MEXICO, srossmary@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5269-7124>

Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, MEXICO, jose.hernandezh@cinvestav.mx, <https://orcid.org/0000-0001-7624-9986>

Medicina Genómica, INRLGII, MEXICO, ohernandez@inr.gob.mx, <https://orcid.org/0000-0001-6388-2459>

**Palabras en Español:**

CRISPR/Cas13, SCA7, lentivirus

**Palabras en Inglés:**

CRISPR/Cas13, SCA7, lentivirus

**Título del Trabajo:**

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

**Título del Trabajo en Inglés:**

Implementation of the CRISPR/Cas13 System for the Degradation of the Mutant ATXN7 RNA Messenger of Spinocerebellar Ataxia Type 7

**Área de Investigación:**

Genética y Biología Molecular

**Introducción:**

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es un raro trastorno neurodegenerativo autosómico dominante caracterizado por ataxia progresiva y deterioro visual. Esta enfermedad ocurre debido a la expansión de repetidos CAG en el gen ATXN7 la cual provoca que la proteína afectada tenga una ganancia de función tóxica, causando el secuestro de diferentes moléculas. Debido a que la SCA7 es una enfermedad incurable, existe la necesidad de desarrollar terapias más efectivas para su tratamiento. Es por esto que este trabajo pretende desarrollar un sistema que degrade el ARN mensajero mutado de SCA7 usando el sistema CRISPR Cas13 en fibroblastos derivados de pacientes con SCA7.

**Objetivo:**

Implementar un método de degradación del ARN mensajero mutante de ATXN7 utilizando el sistema CRISPR/Cas13a a través de un sistema lentiviral

**Metodología:**

Se utilizaron fibroblastos humanos control (GM03440) y de SCA7 (GM03561) adquiridos del Coriell Institute for Medical Research. Mediante PCR se analizó la presencia del SNP rs3774729, previamente asociado con la mutación de SCA7 y se confirmó la presencia de la mutación en los fibroblastos de SCA7 GM03561. Se diseñaron y clonaron en un sistema lentiviral crRNAs dirigidos a 3 diferentes regiones del transcrito de ATXN7: 1) la región de repetidos CAG, 2) la región del SNP rs3774729 y 3) la región más accesible determinada in silico. Al mismo tiempo, se generó una línea estable que expresa la proteína LwCas13a en los fibroblastos GM03561. La expresión de LwCas13a se confirmó mediante fluorescencia y western blot. Finalmente, se infectó dicha línea estable con los vectores que contienen los distintos sgrNAs y se estandarizó una RT-qPCR para la detección de la expresión del transcrito de ATXN7 mutante.

**Resultados:**

Se determinó la presencia del SNP rs3774729 y de la mutación de SCA7 (54 repetidos CAG) en los fibroblastos GM03561 y la ausencia del SNP y de la mutación en los fibroblastos control GM03440. Se ligaron correctamente los 3 crRNAs del sistema de degradación CRISPR/Cas13a en vectores de expresión lentiviral, estas clonaciones se verificaron mediante secuenciación. Adicionalmente, se detectó en el cultivo de fibroblastos GM03561 la expresión de la nucleasa Cas13a luego de la infección lentiviral. También se estandarizó la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de transcrito de ATXN7 en fibroblastos de SCA7.

**Conclusiones:**

Se generaron los componentes del sistema CRISPR/Cas13a mediante expresión lentiviral en una línea de fibroblastos humanos con SCA7. De igual manera, identificamos la presencia del SNP rs3774729 en los fibroblastos GM03561, lo cual nos permitirá evaluar la especificidad del sistema CRISPR/Cas13a sobre el RNA mensajero mutante de SCA7.