



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Modificaciones de la cromatina y splicing alternativo en la terapia de la atrofia muscular espinal: estrategias dirigidas de CRISPR-dCas9 y oligonucleótidos antisentido

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas
Fecha de defensa: 4 de abril 2025

B.Sc. Jose Nicolas Stigliano
Director de Tesis: Dr. Alberto R. Kornblihtt
Consejera de Estudios: Dra. Anabella Srebrow

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-UBA-CONICET); Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular (DFBMC-FCEyN-UBA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), Universidad de Buenos Aires (UBA)

Resumen

La presente tesis aborda de manera exhaustiva el estudio de la regulación del splicing alternativo, con un enfoque en la inclusión del exón 7 del gen *SMN2*, relevante en el contexto de la atrofia muscular espinal (AME). A lo largo de esta investigación, se exploraron múltiples estrategias para modular la inclusión de este exón, empleando tanto tecnologías clásicas como novedosas.

Se llevó a cabo un análisis detallado del impacto de las modificaciones epigenéticas y del estado de la cromatina en el proceso de inclusión del exón 7 en el RNA mensajero maduro. Los experimentos demostraron que la pérdida de metiltransferasas de histonas como G9a y la eliminación de proteínas de heterocromatina como HP1 β aumentan la inclusión del exón 7 y potencian la eficacia de los tratamientos basados en oligonucleótidos antisentido (ASOs). Estos resultados subrayan la importancia del estado de la cromatina en la regulación del splicing y abren la puerta a terapias combinadas que integren moduladores de la cromatina con ASOs para mejorar los resultados terapéuticos. Se emplearon herramientas avanzadas de edición génica, como CRISPR-dCas9, para realizar modulaciones dirigidas de la cromatina sin alterar de manera permanente la secuencia del DNA. La utilización de dCas9 fusionada a activadores transcripcionales como VP64 demostró ser una estrategia eficaz para mejorar la inclusión del exón 7 de *SMN2*, superando las limitaciones de los fármacos pleiotrópicos como los inhibidores de histona deacetilasas (HDACi, e.g., ácido valproico). Esta metodología permite una modulación específica y reversible de los eventos transcripcionales, lo que tiene implicaciones significativas en la búsqueda de terapias personalizadas para la AME y otras enfermedades genéticas. La investigación también se centró en la aplicación de técnicas de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para mapear los cambios en la estructura cromatínica y su relación con los niveles de inclusión del exón 7. Estos análisis revelaron una correlación entre la presencia de marcas epigenéticas asociadas a un estado de cromatina abierta, como la acetilación de lisinas en la histona H3 (H3Kac), la activación del promotor del gen *SMN2* y splicing del exón 7 del mismo, lo que sugiere un vínculo directo entre la regulación epigenética y el procesamiento del RNA mensajero. Además, se comprobó que los tratamientos con oligonucleótidos antisentido (ASOs) inducen modificaciones de la cromatina, las cuales pueden ser moduladas mediante combinaciones de fármacos y herramientas epigenéticas específicas. Paralelamente, el uso de técnicas de captura de conformación cromosómica (3C) permitió identificar interacciones entre la región promotora 5' y la región 3' del gen *SMN2*. Se observó que dichas interacciones se alteraron dinámicamente tras el

tratamiento con ASOs y CRISPR/dCas9-VP64, lo que respalda los efectos observados en la activación transcripcional, splicing y el estado cromatínico en estos tratamientos.

En conjunto, esta tesis propone no sólo un potencial enfoque innovador para el tratamiento de la AME, sino que también revela mecanismos moleculares, hasta el presente desconocidos, que gobiernan las interacciones funcionales y físicas entre cromatina, transcripción y splicing alternativo.

Palabras clave: Splicing alternativo, atrofia muscular espinal (AME), modulación epigenética, cromatina, oligonucleótidos antisentido (ASO), CRISPR-dCas9.

Chromatin modifications and alternative splicing in the treatment for Spinal Muscular Atrophy: targeted approaches of CRISPR-dCas9 and antisense oligonucleotides.

Abstract

This thesis explores the regulation of alternative splicing with a focus on the inclusion of exon 7 of the *SMN2* gene, a critical element in the pathology of spinal muscular atrophy (SMA). By employing a combination of classical and innovative techniques, the research investigates how chromatin modifications and the epigenetic landscape influence splicing and therapeutic efficacy.

Key findings demonstrate that the loss of histone methyltransferases, such as G9a, and the depletion of heterochromatin proteins like HP1 β enhance the inclusion of *SMN2* exon 7 and increase the sensitivity to antisense oligonucleotide (ASO) therapies. These results emphasize the significant role of chromatin state in modulating splicing events and support the potential of combined approaches that integrate chromatin modulators with ASOs for improved treatment outcomes. The study also applied cutting-edge CRISPR-dCas9 technology to achieve targeted chromatin modulation without permanent changes to the DNA sequence. The use of dCas9 fused to transcriptional activators, such as VP64, proved effective in increasing exon 7 inclusion, addressing limitations associated with pleiotropic drugs like HDAC inhibitors (e.g., valproic acid). This approach allows for specific and reversible modulation of transcriptional processes, underscoring its implications for personalized therapies in SMA and other genetic disorders. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were employed to map changes in chromatin structure and link them to *SMN2* exon 7 inclusion. These analyses highlighted the connection between chromatin marks associated with an open chromatin state, such as H3 lysine acetylation (H3Kac), promoter activation, and the splicing of *SMN2* exon 7. Furthermore, the study confirmed that ASO treatment can induce chromatin modifications that can be strategically modulated using specific epigenetic tools and pharmacological agents. Additionally, a chromosomal conformation capture (3C) technique was used to identify interactions between the 5' promoter region and the 3' region of the *SMN2* gene. These interactions were found to be dynamically altered following treatment with ASOs and CRISPR/dCas9-VP64, further supporting the observed effects on transcriptional activation, splicing, and chromatin state. Together, this work proposes not only a

potential novel strategy for the treatment of SMA, but also reveals underlying molecular mechanisms that govern functional interactions between chromatin, transcription and alternative splicing.

Key words: Alternative splicing, Spinal Muscular Atrophy (SMA), Epigenetic modulation, Chromatin, Antisense Oligonucleotides, CRISPR-dCas9.

Agradecimientos

Veni, vidi, laboravi, cecidi, superavi, et vici.

Gesù bambino, who would've thought we'd get this far?

Nací y crecí en Italia, pero mi corazón siempre estuvo en Argentina. Adoro este país. Desde que era muy chico, venía con mi familia cada par de años a pasar dos semanas en las fiestas en Pinamar. Fue ahí donde me enamoré completamente de este lugar. Mientras en Italia, en diciembre, todos se morían de frío, acá era verano, festejábamos Navidad y Año Nuevo en la playa, escuchando pasar al choclero, con asados, dulce de leche y esa calidez única del espíritu argentino que siempre me hizo sentir en casa. Un hermoso quilombo, sin dudas. Los mejores recuerdos de mi infancia están acá, junto a los Villalobos, que me conocen desde que estaba en pañales, me llamaban Pepino y me cantaban: "Cabezón, cabezón, chupete de ballena, sonajero de King Kong".

Primero que nada, gracias totales a todos los que me acompañaron en este viaje lungo e tortuoso, pero anche bellissimo, una montaña rusa de emociones y aventuras, hacer un doctorado en tiempos medio apocalípticos.

Si estás leyendo esto, aunque tu nombre no aparezca explícitamente, quiero que sepas que tocaste mi vida de alguna manera. Estoy profundamente agradecido por haberte conocido y por todos los momentos que compartimos. De corazón, gracias.

A mi familia, por bancarme siempre, incluso cuando no entendían exactamente qué estaba haciendo. Gracias por el amor incondicional, las valijas llenas de contrabando de comida italiana cada vez que volvía a visitar, y los “¿y vos cuándo terminás?”, que dolían ma erano giusti. Por bancarme que me haya ido a vivir a 14 mil kilómetros de distancia, por bancarme que cada dos por tres tenía una cicatriz nueva, o una clavícula de titanio, o una historia de cómo casi la quedo escalando, pedaleando o solo existiendo.

A Monica, Samy, y toda la familia por haberme recibido con los brazos abiertos, hacerme sentir siempre parte de ustedes, y brindarme un verdadero hogar cuando llegué acá. Gracias por el cariño, la calidez y por acompañarme desde el primer día. A Carla por ser la hermana que me adoptó en Argentina desde el primer día.

A ARK, por la guía científica y la libertad para explorar, equivocarme, corregir y crecer. Albert sempre dice che la demostración más grande en un doctorado are not the results but el doctorando. A los 20 años le mandé un mail diciendo que quería ir a hacer una pasantía con él; he gave me the opportunity for an interview, que me hizo tomar un tren de 8 horas de Dundee a Londres para que nos encontráramos en el lobby del hotel donde se estaba hospedando por un meeting, y me llevó (in his pijamas) al breakfast buffet donde hablamos de ciencia. En ese momento admito que no entendí nada, pero tenía ganas de aprender. Tenía tantas ganas que vine a hacer una pasantía de 3 meses en el 2017, volví a hacer otra en el 2018, y después de recibirme en Escocia tomé un pasaje de avión de ida, sin vuelta, a la Argentina para embarcarme en la aventura del doctorado. Gracias por creer en mí, gracias por ayudarme a crecer, por las charlas de ciencia, de la vida y por hablarme de gramática que aun no entiendo. No me pregunten qué es una esdrújula, algo grave o agudo; no sé dónde van los acentos ni por qué. Alberto me lo explicó, pero no entendí o en eso no sé si lo escuché. Pero sigo aprendiendo de vos, y el criterio que me transmitiste me sirvió no solo para ser mejor científico, sino también para todos los aspectos de la vida. Es un honor aprender de vos, anche si a veces volevo tirarmi dal balcone del laboratorio.

Gracias a Lucho, the craziest mad scientist I have ever had the pleasure to meet. Pazzo da legare, si direbbe en italiano, pero brillante como pocos. Gracias por bancarte un pibe de 20 años que tenía muchas ganas de laburar y aprender, pero no sabía una goma. Gracias por enseñarme cómo se hace la rica ciencia y cómo disfrutar intensamente de la vida en el camino.

Gracias a Emi, donde los roles se invirtieron y fue la persona a quien pude transmitir mi conocimiento y criterio, adquirido después de tantos años trabajando en el laboratorio rompiéndome la cabeza contra la pared. Gracias por bancarme y escucharme, gracias por enseñarme también y ordenar el trabajo que hicimos juntos. No hubiese llegado a que este trabajo fuera tan robusto y prolijo sin vos, y siento que realmente nos acompañamos en el camino. Desde que llegaste le decía a la gente que sos un avión. Ya estás más que lista para romperla en tu doc.

Al mio amico Cristobal-le, che hermano, back-to-back logramos sobrevivir esta aventura de 6 años. Nos matamos de risa, sufrimos, nos peleamos, nos fuimos al sur, a la costa, a la plata, nos encontramos en Italia, y pasamos tanto tiempo juntos que veramente sei il fratello che non ho mai avuto. No sería el científico que soy hoy sin vos; hablando tanto de ciencia todos los días, me transmitiste criterio sin siquiera darte cuenta. Te admiré desde un principio y es un honor compartir la vida con vos. Como

decían los chicos en el sur, nunca vi a alguien sonreír tanto en la vida, que me hizo reír porque yo conozco tu cara de laboratorio. Por ahí no era tu cara la que sonreía, pero sí tu alma, y verte me hace sonreír todos los días.

A Aura, la gordita de 4 patas que me conoce como ningún otro ser en este mundo. Empezamos juntos desde que tenías 45 días de vida, crecimos juntos; sos lo mejor que me pasó en la vida. Gracias por bancarme, por estar siempre en casa esperándome y emocionada de verme. Gracias por llevarme a pasear tanto como yo te llevo a vos. Gracias por bancarme los horarios, el mal humor, y por ayudarme a crecer.

A todos mis compañerxs de lab, los que estuvieron desde el principio y los que llegaron dopo: ustedes hicieron que esto fuera soportable, divertido y lleno de risas. Me enseñaron ciencia y cómo hablar español. Grazie mille per los memes, el mate, las charlas post-experimento fallido y el “che, te sobra una calle en el gel de agarosa?” que jamás les voy a dar porque por dios háganse uno, son 5 minutos de laburo. El sentimiento de comunidad que se forma trabajando en el IFIBYNE es un privilegio; de ustedes aprendí un montón. Muchos se fueron, otros llegaron, pero sigue siendo un ambiente que hace transitar el doctorado infinitamente mejor. Gracias por prestarme reactivos cuando los necesitaba, en medio de procesar un volumen exagerado de experimentos sin haber previsto todo lo necesario.

A la reina, por ser la mejor compañera que pude haber pedido. Por haberme bancado tanto, por haber insistido tanto, por cuidarme, por compartir, por no juzgarme, por acompañarme, por adorarme. Soy intenso y apasionado; encontré y perdí l’amore della mia vita 5 veces ya, pero lo que nunca pierdo es la esperanza. Como vos no hay nadie, y vale la pena enfrentar todo lo que tenga la vida para tirar, junto a vos.

A quienes confiaron en mí incluso cuando yo no lo hacía. A quienes me dieron oportunidades, espacio y tiempo. A quienes me abrazaron cuando las cosas no salían. This thesis is as much mine as it is yours.

A Dami, por la bici que me cambió la vida y me transformó en el fixipete que soy hoy, mirando en Facebook Marketplace todo el tiempo para comprar una nueva bici que no puedo pagar, ni necesito, con las 3 que ya tengo. Por compartir tantos momentos lindos, por enseñarme de la vida; que me dejó de querer y me volvió a querer, y en ese proceso aprendí mucho y te valoro un montón.

A Vladimir, por ser el único que confió más que yo mismo en hacer una buena pizza, o mejor, 70 pizzas, en una noche, sin parar, y sin pago. Por acompañarme en los eventos donde nos rompimos cocinando, perdiendo plata pero divirtiéndonos mucho. Gracias por ser el Marasco bueno.

To Evy, who met this 20-year-old man-child trying to sell her tiramisu, y que viste algo en él que ni él había visto. Thank you for giving me the opportunity de mostrar lo que soy capaz de hacer, por darme espacio para brillar, por compartir tu hermosa comunidad conmigo.

A Berta, que me mostraste mucho más que un deporte: me enseñaste un espacio de descarga, crecimiento personal, desafío constante, peligro estimulante y aventura pura. Y a los amigos de escalada, gracias infinitas por cada ascenso compartido, por la confianza absoluta al poner nuestras vidas en las manos del otro, y por los innumerables momentos inolvidables vividos juntos.

A Fefu, por bancarme viviendo en tu monoambiente 3 meses en boston, por hacerme sentir bienvenido en tu familia y por bancarme en mis ideas locas.

A Guishy, mi hermana de la vida. Una persona tan distinta y tan cercana al mismo tiempo. Tuvimos el mismo director y el mismo psicólogo, dos formadores de opinión muy importantes. Nos acompañamos un montón, nos entendimos, nos reimos, nos quejamos, y nos encontramos. Tenes un lugar especial en mi corazón, and you are annoyingly good con todos los idiomas. Admiro tu energía y capacidad de enfrentarte a la vida; y aunque estés lejos se que siempre que nos volvamos a encontrar es como si ni un dia went by.

A Maniche, por las empanadas, los sanguchitos, los asados, el locro, y por tanto más.

A Martin, por acompañarme en el edén y en la vida.

Y a mí, por no abandonar, per resistere, por seguir soñando incluso cuando todo parecía un delirio. Lo logramos, loco.

Grazie mille, gracias, thank you.

El Argentano,

Dr. PP

Publicaciones

Trabajos publicados durante la formación en el laboratorio Kornblihtt

- Stigliano, J. N., Haberland, E., Marasco, L. E., Sousa-Luís, R. and Kornblihtt, A.R. dCas9-targeted intragenic histone acetylation at the SMN2 gene enhances the splicing-correcting ASO therapy of spinal muscular atrophy through gene looping. Manuscrito en preparación
- Marasco, L. E., Dujardin, G., Sousa-Luís R, Liu, Y. H., **Stigliano, J. N.**, Nomakuchi, T., Proudfoot, N. J., Krainer, A. R. and Kornblihtt, A. R. “Counteracting chromatin effects of a splicing-correcting antisense oligonucleotide improves its therapeutic efficacy in spinal muscular atrophy”. **Cell** **185**, 2057-2070 (2022). DOI: 10.1016/j.cell.2022.04.031.
- Fuchs Wightman*, F., Godoy Herz*, M. A., Muñoz*, J. C., **Stigliano***, J. N., Bragado, L., Nieto Moreno, N., Palavecino, M., Servi, L., Cabrerizo, G., Clemente, J., Avaro, M., Pontoriero, A., Benedetti, E., Baumeister, E., Rudolf, F., Remes Lenicov, F., Garcia, C., Buggiano, V., Kornblihtt, A. R., Srebrow, A., de la Mata, M., Muñoz, M. J., Schor, I. E. and Petrillo, E. A DNA intercalating dye-based RT-qPCR alternative to diagnose SARS-CoV-2” **RNA Biology** (2021). DOI: [10.1080/15476286.2021.1926648](https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1926648) ***contribuyeron por igual.**
- Marasco, L. E., **Stigliano, J. N.**, Kornblihtt, A. R.. El Splicing Alternativo y la Cura de la Atrofia Muscular Espinal. **Medicina (Buenos Aires)** **79**, 582-586 (2019). ISSN: [1669-9106](https://doi.org/10.1016/j.medic.2019.05.001)

Patentes

- PM 1545-7 ANMAT, registrada en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (R.P.P.T.M.)
Fecha de presentación: 21 de abril de 2021
Título: Inactivación, transporte y preparación de Ácidos Nucleicos a partir de Muestras biológicas "Producto inscripto en el contexto a la emergencia sanitaria por COVID-19".
Nombre comercial: INACTIV AR.
Inventores: Stigliano, Bragado, Moreno, Palavecino, Servi, Cabrerizo, Clemente, Avaro, Pontoriero, Benedetti, Baumeister, Rudolf, Remes Lenicov, Garcia, Buggiano, Kornblihtt, Srebrow, de la Mata, Muñoz, Schor, Petrillo.

- PCT/US21/41466

Fecha de presentación: 13 de julio de 2021

Título: Compositions for treatment of spinal muscular atrophy

Inventores: Marasco, Krainer, Stigliano y Kornblihtt

- AR20210101963

Instituto Nacional de la Propiedad Intelectual Argentina

Fecha de presentación: 13 de julio de 2021

Título: Composiciones para tratamiento de atrofia muscular espinal

Inventores: Marasco, Krainer, Stigliano y Kornblihtt

Índice de contenidos

Publicaciones	9
Listado de abreviaturas	14
Introducción	17
1.1 El RNA y su rol en la expresión génica.....	17
1.2 Epigenética.....	21
1.3 Importancia de la diversidad transcripcional y el splicing	22
1.4 Procesamiento y maduración del mRNA.....	23
1.4.1 5' Capping	25
1.4.2 Corte y poliadenilación en el extremo 3'	25
1.4.3 Splicing	26
1.5 Organización de la cromatina y su papel en la regulación génica	29
1.6 Modificaciones epigenéticas y sus implicaciones	30
1.7 El rol de la elongación de RNAPII en el splicing alternativo.....	35
1.7.1 Exones Tipo 1 y Tipo 2.....	35
1.8 Modificaciones de cromatina y cinética transcripcional.....	37
1.9 Atrofia muscular espinal (AME)	37
1.10 Rol del número de copias de <i>SMN2</i> en la gravedad de la enfermedad.....	39
1.11 Terapias dirigidas a <i>SMN2</i> para promover la inclusión del exón 7 en el mRNA maduro..	39
.....	39
1.13 Justificación para la terapia combinada del ASO nusinersen y modulación de la cromatina	44
2.1 CRISPR-Cas9 y sus aplicaciones en la regulación génica	46
2.2 Descubrimiento y evolución de CRISPR-Cas9	46
2.3 Impacto de las herramientas CRISPR en la medicina	48
2.4 Transición hacia la regulación génica basada en dCas9	49
2.5 Activación CRISPR (CRISPRa) e interferencia CRISPR (CRISPRi)	49
2.6 Justificación del uso de la tecnología CRISPRa para mejorar la terapia combinada con inhibidores de HDACs y tratamiento con ASOs.....	51
Objetivos	54
Generales	54
Específicos	54
Resultados	56
Capítulo 1	57

1.	Comparación de la potencia y eficacia de distintos oligonucleótidos antisentido (ASOs) en aumentar la inclusión del exón 7 del gen endógeno <i>SMN2</i> en su RNA mensajero maduro en células humanas en cultivo.....	57
2.	Investigación de la eficacia y potencia del ASO1 en células humanas WT y G9a KO	62
3.	La pérdida de expresión de metiltransferasas de histonas provoca cambios globales en los estados de la cromatina	65
4.	La pérdida de marcas de cromatina represiva mejora la inclusión del exón 7 de <i>SMN2</i>	67
5.	La ausencia de expresión de G9a resulta en perfiles reducidos de H3K9me2 a lo largo del gen <i>SMN2</i>	69
6.	Metiltransferasas de histonas adicionales implicadas en el mantenimiento de la marca represiva H3K9me2.....	71
7.	La restauración de la expresión de EHMT2 (G9a) recupera los niveles globales de H3K9me2 e influye en la inclusión de <i>SMN2</i> E7.....	75
8.	La pérdida de expresión de proteínas asociadas a la heterocromatina incrementa la eficacia del efecto de ASO1 sobre la inclusión de <i>SMN2</i> E7.....	77
9.	Oligos "sense" generan la deposición de marcas de metilación de cromatina como los ASOs	79
10.	El efecto de la promoción global de la acetilación de histonas sobre el splicing alternativo de <i>SMN2</i> E7 no es mediado por cambios en los niveles de factores de splicing .	82
Capítulo 2		84
11.	Diseño de una nueva estrategia para el direccionamiento de la acetilación de histonas	84
12.	Confirmación de la especificidad de CRISPR-dCas9 dirigido con RNAs guía al sitio blanco.	88
13.	Potenciación de la inclusión de <i>SMN2</i> E7 tras el tratamiento combinado de ASO1 y dCas9-VP64.....	89
14.	Combinaciones de guías de RNA para dirigir la dCas9-VP64 a múltiples regiones del gen <i>SMN2</i> potencian la inclusión del E7 promovida por ASO1	91
15.	El efecto sobre el splicing del direccionamiento de dCas9-VP64 es debido a la acetilación de histonas	93
16.	Direccionamiento de dCas9-VP64 al promotor	95
17.	Direccionamiento de dCas9-VP64 e inhibición de la inclusión de <i>SMN2</i> E7 por ASO2	97
18.	Investigación del estado de la cromatina tras el tratamiento con dCas9-VP64	99
19.	Efectos de HDACi's y ASOs sobre la actividad del promotor del gen <i>SMN2</i>	101
20.	Activación del promotor del gen <i>SMN2</i> por el direccionamiento de dCas9-VP64 al mismo y a la región del E7	102

21. Confirmación de la especificidad de los efectos transcripcionales de estrategias dirigidas y estrategias pleiotrópicas	104
22. Gene looping: Interacciones entre regiones 5' y 3' del gen <i>SMN2</i> tras el tratamiento con ASO1 y direccionamiento de la dCas9-VP64	105
Discusión	110
Conclusiones	123
Materiales y métodos	126
1. Cultivo celular y tiempos experimentales de transfección	126
2. Transformación bacteriana	127
3. Preparación de plásmidos (Miniprep).....	128
4. Purificación de RNA.....	128
5. Western Blot	128
6. Retrotranscripción (RT) y PCR punto final	129
7. Gel de Poliacrílida para productos de PCR punto final	131
8. Análisis estadístico	132
9. Diseño de RNAs guía	132
10. Plásmidos empleados.....	132
11. Construcción de RNA guía y clonado.	133
12. Preparación de plásmidos a mediana y gran escala	134
13. Control de calidad y cuantificación de DNA plasmídico	134
14. Síntesis de oligonucleótidos antisentido (ASO)	135
15. Línea celular Knockout de G9a	135
16. Línea celular Fibroblastos de paciente de AME 3813.....	135
17. Knockdown mediante RNAi:.....	136
18. Inmunoprecipitación de la cromatina (xChIP) y q-PCR.....	136
19. Captura de Conformación Cromosómica (3C)	137
20. Uso de inteligencia artificial para la redacción del manuscrito	138
20. Listado de primers utilizados en esta tesis.....	140
Bibliografía	144

Listado de abreviaturas

- **3'ss:** Sitio aceptor de splicing
- **5'ss:** Sitio dador de splicing
- **AME:** Atrofia muscular espinal
- **ASO:** Oligonucleótido antisentido
- **cDNA:** DNA copia (proveniente de retrotranscripción de un RNA)
- **FL:** “*full length*” isoforma de tamaño completo
- **Δ7:** Isoforma que carece del exón 7 de SMN2
- **KO:** Knockout
- **KD:** Knockdown
- **E:** Exon
- **I:** Intron
- **ChIP-qPCR:** Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de PCR en tiempo real
- **ChIP-seq:** Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación masiva
- **CRISPR:** Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
- **CRISPRa:** Activación dirigida por CRISPR
- **CRISPRi:** Inhibición dirigida por CRISPR
- **CTD:** Dominio carboxilo-terminal de la RNA polimerasa II (RNAPII)
- **Cas9:** proteína CRISPR asociada
- **dCas9:** Cas9 desactivado (sin actividad nucleasa)
- **SR:** proteínas ricas en serinas y argininas
- **Downstream:** Río abajo
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- **RNA:** Ácido ribonucleico
- **dNTPs:** Desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- **dsRNA:** RNA de doble cadena
- **ESE:** Enhancer de splicing exónico (exonic splicing enhancer)
- **ESS:** Silencer de splicing exónico (exonic splicing silencer)
- **FDA:** Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE.UU. (Food and Drug Administration)
- **HAT:** Acetiltransferasa de histonas

- **HDAC:** Desacetilasa de histonas
- **HMT:** Metiltransferasa de histonas
- **hnRNP:** Ribonucleoproteína nuclear heterogénea
- **ISE:** Enhancer de splicing intrónico (Intronic Splicing Enhancer)
- **ISS:** Silencer de splicing intrónico (Intronic Splicing Silencer)
- **miRNA:** MicroRNA
- **mRNA:** RNA mensajero
- **snRNAs:** RNA nucleares pequeños
- **pb:** Pares de bases
- **PBS:** Buffer salino de fosfato
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **pre-mRNA:** RNA precursor del mensajero
- **PTGS:** Silenciamiento post-transcripcional
- **qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- **RNAi:** RNA de interferencia
- **RNAP:** RNA polimerasa
- **RNAPII:** RNA polimerasa II
- **RT:** Retrotranscripción
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (con SDS)
- **siRNA:** RNA pequeño de interferencia
- **SMA:** Spinal Muscular Atrophy (Atrofia Muscular Espinal AME)
- **snRNP:** Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
- **TF:** Factor de transcripción
- **TGS:** Silenciamiento transcripcional (Transcriptional Gene-Silencing)
- **TSS:** Sitio de inicio de la transcripción
- **Upstream:** Río arriba
- **VPA:** Ácido valproico
- **WB:** Western Blot
- **EHMT1:** euchromatic histone lysine N-methyltransferase 1 (GLP)
- **GLP:** G9a like protein
- **EHMT2:** euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2 (G9a)
- **KO:** Knockout (eliminación de un gen específico)

- **PRDM2:** PR domain containing 2
- **dCas9-VP64:** Cas9 desactivado fusionado con VP64
- **VP64:** cuatro repeticiones tándem del dominio VP16
- **VP16:** dominio transactivador del virus de herpes simples
- **EGFP:** proteína de fluorescencia verde mejorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)
- **3' UTR:** Región no traducida 3'
- **SBF:** Suero bovino fetal
- **TE Buffer:** Tris EDTA buffer
- **3C:** técnica de captura de conformación cromosómica
- **sgRNA:** guía de RNA simple cadena
- **NT:** guía de RNA Non Targeting
- **E7 Pool:** guías de RNA con sitio blanco E7-I7 de *SMN2*
- **Pro-Pool:** guías de RNA con sitio blanco la región promotora de *SMN2*
- **RISC:** (RNA-Induced Silencing Complex) complejo de silenciamiento inducido por RNA.
- **islas CpG:** regiones del DNA con una alta frecuencia de dinucleótidos Citosina-Fosfato-Guanina (CpG).
- **pcDNA:** plásmido de DNA complementario
- **CE50:** Concentración Efectiva 50

En esta tesis se compilan datos e información sobre la atrofia muscular espinal, extraídos de investigaciones realizadas en diversos laboratorios. Se ha optado por mantener algunas figuras originales tomadas de dichas fuentes, sin traducirlas, para preservar la exactitud y el contexto de los resultados presentados.

Introducción

1.1 El RNA y su rol en la expresión génica

El dogma central de la biología molecular, propuesto por Francis Crick por primera vez en 1958, describe el flujo unidireccional de la información génica (Figura I1): del DNA al RNA y de éste a las proteínas. Revolucionaria en su momento, esta visión simplificada ha evolucionado con el tiempo para reflejar un panorama más complejo, donde el RNA desempeña funciones diversas y críticas más allá de ser un simple intermediario. En 1957, Crick especuló sobre la posibilidad de un flujo de información del RNA al DNA, representado como una línea punteada. Aunque esta idea carecía de evidencia experimental en ese momento, fue confirmada en 1970 con el descubrimiento simultáneo de la transcriptasa reversa viral por Howard Temin y David Baltimore, que permite la síntesis de DNA a partir de un molde de RNA (Cobb, 2017)

Este trabajo se centra en el RNA y sus roles regulatorios y funcionales, destacando cómo esta molécula, más allá de su papel tradicional, desempeña funciones críticas en el funcionamiento celular. Asimismo, se exploran las consecuencias de la desregulación de eventos relacionados con el RNA, que pueden resultar en enfermedades graves. Finalmente, se revisan los avances en biología molecular de las últimas décadas, los cuales han transformado las herramientas disponibles para modular la expresión génica y han abierto nuevas posibilidades terapéuticas para el tratamiento de enfermedades genéticas.

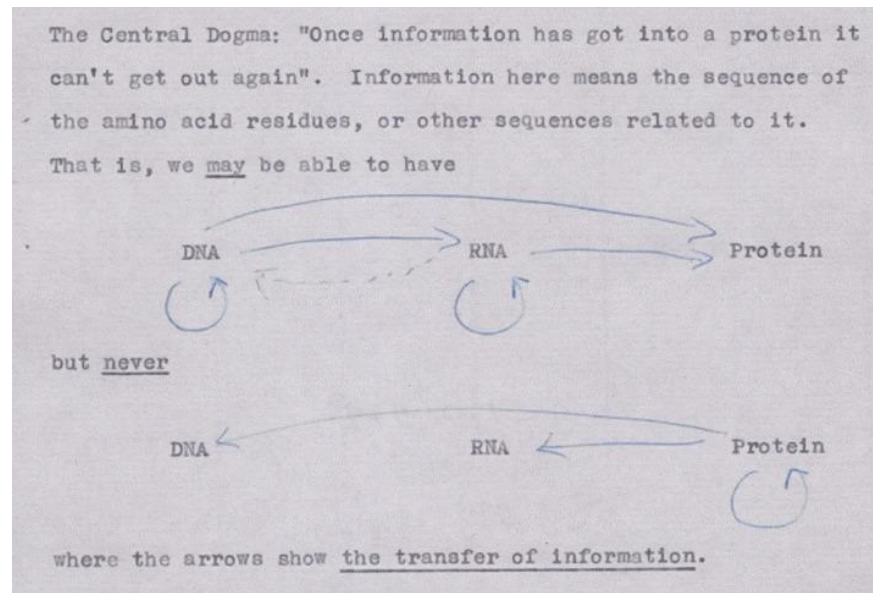


Figura I.1. El dogma central.

Nota no publicada de Francis Crick (1956), que ilustra el dogma central propuesto por Crick en 1958. Este dogma describe el flujo unidireccional de la información genética desde el DNA al RNA y, posteriormente, a las proteínas, sin posibilidad de retroceso. Las líneas azules representan el flujo de información con cuatro opciones consideradas posibles: de DNA a DNA, de DNA a RNA, de RNA a RNA y de RNA a proteína; así como tres opciones consideradas imposibles: de proteína a proteína, de proteína a RNA y de proteína a DNA. La línea punteada que conecta el RNA con el DNA fue posteriormente justificada por Crick como una especulación, sin evidencia experimental que respaldara un flujo de información de RNA a DNA en ese momento.

Figura obtenida de la Wellcome Library, London, disponible en:
<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.2003243>

El ácido ribonucleico (RNA) es fundamental en la transferencia de información genética, la regulación de la expresión genética y diversos procesos celulares. Existen diferentes tipos de RNA con funciones específicas que abarcan desde la codificación de proteínas hasta la regulación y organización celular. La **Figura I.2** muestra ejemplos representativos de distintos tipos de RNA y sus funciones biológicas.

Por ejemplo, los microRNAs (miRNAs) regulan la expresión genética postranscripcional al unirse a los mRNAs y dirigir su degradación o inhibir su traducción, controlando procesos biológicos clave como el desarrollo y la respuesta al estrés. Cambios en los niveles y actividad de los miRNAs han sido asociados a diversas enfermedades, incluido el cáncer, donde la desregulación de estos últimos ocurre a través de múltiples mecanismos, subrayando su papel esencial en la homeostasis celular (Peng & Croce, 2016).

Asimismo, los RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) (Figura I.2) son cruciales para el silenciamiento genético y la regulación de la cromatina, guiando al complejo RISC en la degradación de mRNAs específicos. Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) (Figura I.2) intervienen en el

remodelado de la cromatina, así como en la regulación de la transcripción y el splicing, desempeñando papeles esenciales en procesos como la inactivación del cromosoma X y la pluripotencia celular. Los RNAs circulares (circRNAs) (Figura I.2), gracias a su estructura estable, pueden actuar como esponjas de miRNAs y participan en la regulación transcripcional y el splicing. Por otro lado, los pequeños RNAs nucleares (snRNAs) y los pequeños RNAs nucleolares (snoRNAs) son imprescindibles para el procesamiento del pre-RNA mensajero y la modificación del RNA ribosomal (rRNA) (Figura I.2).

Además, otros tipos de RNAs no codificantes, como los RNAs antisentido (asRNA), los RNAs de enhancers transcripcionales (eRNAs), los RNAs PIWI-interactuantes (piRNAs) y los fragmentos de RNAs de transferencia (tRNAs), destacan la diversidad de funciones que el RNA desempeña en la célula. Estos descubrimientos subrayan que el RNA es un componente esencial en la regulación y diversidad de la expresión génica, actuando en múltiples procesos dentro de una red de interacciones complejas (Daxinger & Whitelaw, 2012; Heard & Martienssen, 2014).

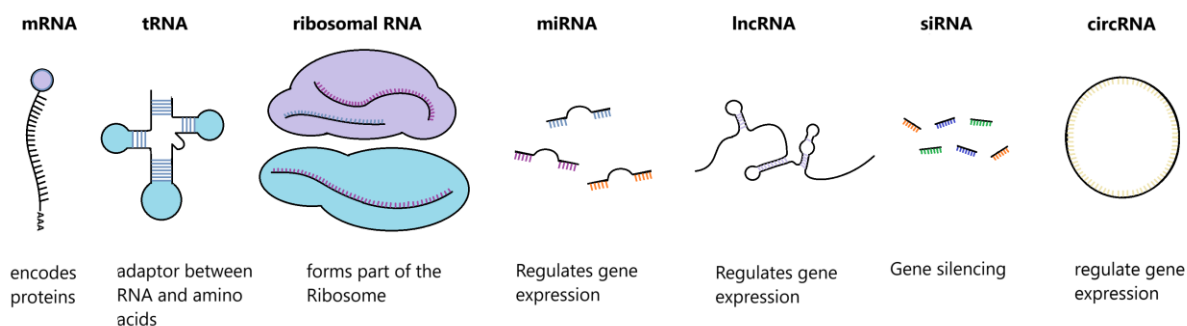


Figura I.2. Diversidad y funciones del RNA.

Representación esquemática de varios tipos de RNA que destacan su diversidad y funciones. De izquierda a derecha: RNA mensajero (mRNA), representado con un "cap" o capuchón 5' (esfera violeta), una secuencia de RNA (línea negra segmentada), y una cola de poli-A al final. Este RNA contiene la información génica necesaria para codificar proteínas. A su derecha, el RNA de transferencia (tRNA), que forma estructuras secundarias y sirve como adaptador entre el RNA y los aminoácidos durante la traducción. A continuación, los RNA ribosomales (rRNA), componentes esenciales de las subunidades ribosomales (en violeta y azul), necesarias para el proceso de traducción. Le siguen los microRNA (miRNA), pequeños fragmentos de RNA con pares de bases coloreados, mostrando una burbuja de no complementariedad en el centro, regulan la expresión génica al unirse a sus sitios blanco. Luego están los RNA largos no codificantes (lncRNA), representados como una línea curva negra con estructuras secundarias. También se incluyen los RNA de interferencia (siRNA), secuencias cortas de RNA con pares de bases coloreados, y finalmente los RNA circulares (circRNA), representados como un círculo negro con nucleótidos amarillos, que desempeñan un papel regulador en la expresión génica.

Revisitando el dogma central, se ha demostrado que el RNA no sólo transfiere información génica, sino que participa activamente en la regulación de la expresión génica y en mecanismos de

retroalimentación que afectan tanto la transcripción como el estado de la cromatina. Investigaciones actuales muestran que RNAs no codificantes como los lncRNAs y miRNAs, así como modificaciones químicas del RNA como la metilación de la posición 6 de las adeninas (m6A), juegan roles clave en la regulación epigenética y la expresión génica (Morris & Mattick, 2014) (Loda & Heard, 2019).

El RNA no sólo influye en cambios en la estructura de la cromatina, sino que también puede participar en la herencia epigenética transgeneracional (TEI), donde experiencias ambientales como el estrés o la dieta alteran marcas epigenéticas que se pueden heredar sin modificar la secuencia del DNA. Esta perspectiva moderna desafía conceptos anteriores como la barrera de Weismann, que establecía una separación estricta entre células somáticas y germinales (Daxinger & Whitelaw, 2012).

La investigación en TEI resalta la complejidad de la regulación génica y la necesidad de expandir la comprensión del dogma central. Estos avances evidencian que el sistema de regulación génica es mucho más dinámico y sofisticado de lo que se pensaba cuando se propuso el dogma central. En este contexto la Figura I.3 sugiere un dogma revisado que incorpora niveles adicionales en el flujo de información génica y su regulación, yendo más allá del dogma central propuesto inicialmente.

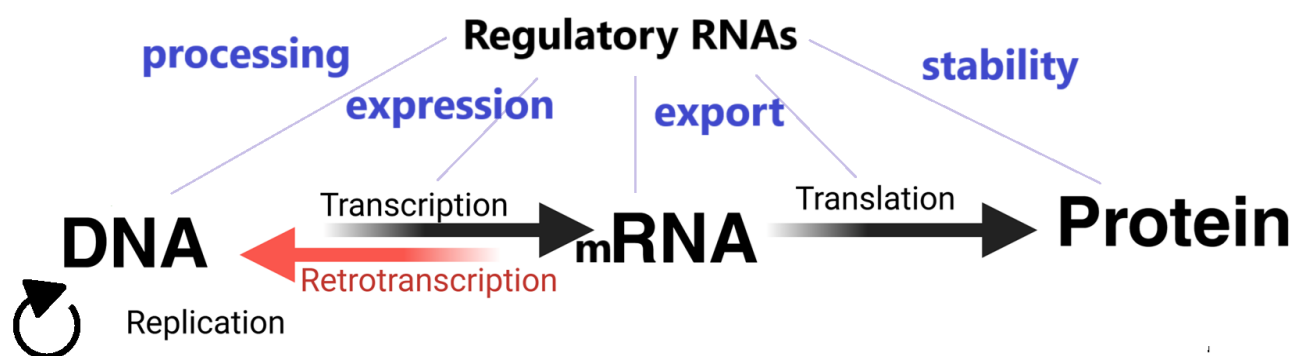


Figura I.3. El Dogma central revisado.

Representación esquemática del dogma central revisado, que incorpora niveles adicionales de complejidad en el flujo de información génica y su regulación, más allá de lo propuesto inicialmente por Francis Crick. Las flechas negras representan el flujo de información clásico: de DNA a DNA, de DNA a mRNA y de mRNA a proteínas. La flecha roja indica el flujo de información de mRNA a DNA, a través del proceso de retrotranscripción, siendo este el aporte más significativo que modificó el dogma desde su formulación original. Las líneas azules destacan la interacción del RNA regulatorio con los distintos procesos involucrados en el flujo de información, señalando en azul algunos de los roles regulatorios que desempeña, como la modulación de la expresión génica, estabilidad del RNA y otros procesos celulares clave.

1.2 Epigenética

En sentido estricto, la epigenética es el conjunto de cambios heredables en la expresión génica que no están determinados por alteraciones en la secuencia de DNA. En sentido amplio, llamamos epigenética a los cambios en la expresión génica que no involucran alteraciones en la secuencia del DNA, sean éstos heredables o no. Estos mecanismos epigenéticos juegan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular, permitiendo que células con el mismo material genético se especialicen en distintos tipos celulares con funciones diversas. Además, la epigenética es crucial para procesos como la inactivación del cromosoma X en mamíferos y el silenciamiento de loci de apareamiento en levaduras (Morris & Mattick, 2014).

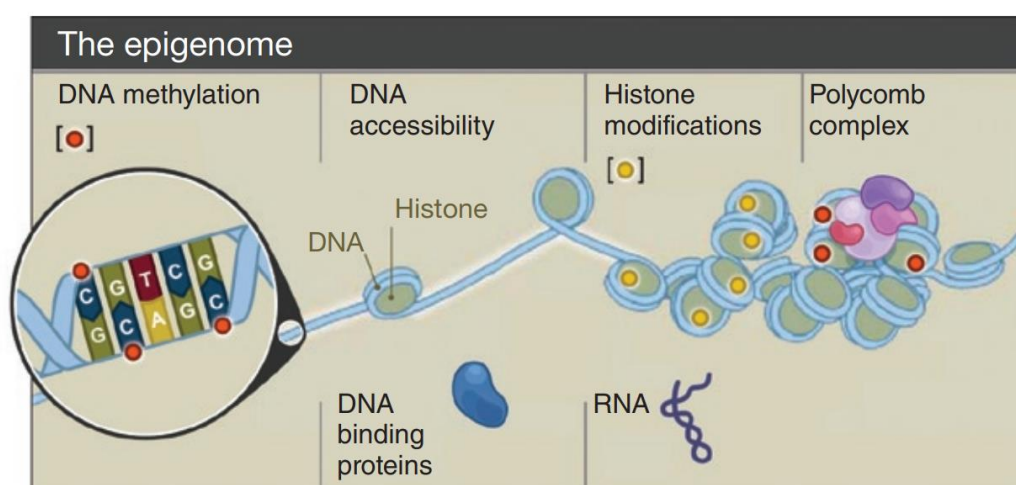


Figura I.4. Organización del epigenoma.

Diferentes capas de regulación epigenética que influyen en la expresión génica y en la estructura de la cromatina. Estas incluyen la metilación del DNA, representada por esferas rojas que simbolizan modificaciones químicas en las bases del DNA (línea azul), capaces de silenciar regiones específicas del genoma; la accesibilidad del DNA, regulada por la interacción entre el DNA y las histonas (esferas verdes), que a su vez está modulada por modificaciones químicas en las colas de las histonas, representadas por esferas amarillas, las cuales influyen en la polaridad y las interacciones entre el DNA y las histonas; y los complejos poliproteicos, como el complejo Polycomb, que modifican activamente la estructura del epigenoma para modular la expresión génica. Tanto proteínas de unión al DNA como algunos RNAs regulatorios tienen la capacidad de unirse al DNA y modular estos componentes epigenéticos y la expresión génica (Bernstein et al., 2010).

La Figura I.4 ilustra las diferentes capas de regulación epigenética que constituyen el epigenoma. Entre los mecanismos epigenéticos se destacan: la metilación del DNA, la modificación de histonas y la acción de RNAs no codificantes. La metilación del DNA, particularmente en las islas CpG cercanas a los promotores de genes, generalmente está asociada con la represión transcripcional. Las modificaciones postraduccionales de las histonas, como la acetilación y metilación, también desempeñan un papel esencial en la estructura de la cromatina y, por ende, en la accesibilidad del

DNA a enzimas y otros factores que participan en la transcripción y en la duplicación. Estas marcas en las histonas actúan como "códigos" que determinan si un gen será activo o inactivo, facilitando o bloqueando el acceso a la maquinaria de transcripción

Además de estas modificaciones químicas, la estructura y organización de la cromatina en el núcleo celular también afectan la expresión génica. La cromatina puede existir en un estado "abierto" (eucromatina) accesible para la transcripción o en un estado "cerrado" (heterocromatina) que limita la actividad transcripcional. Los complejos que modifican la estructura de la cromatina junto con las proteínas específicas que permiten el cambio entre estos estados son esenciales para una regulación génica precisa durante el desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales (Bernstein *et al.*, 2010).

El campo de la epigenética ha generado un gran interés en la investigación biomédica debido a su implicación en diversas enfermedades, como el cáncer, síndromes relacionados con la inestabilidad cromosómica, retraso mental y otras condiciones asociadas con la desregulación de la expresión génica provocada por cambios en marcas epigenéticas, como la metilación del DNA o alteraciones en la arquitectura de la cromatina. Este conocimiento ha dado lugar al desarrollo de nuevos tratamientos para estas patologías. Por ejemplo, el uso de 5-azacitidina como inhibidor de la DNA metiltransferasa ha sido aprobado para el tratamiento del síndrome mielodisplásico y algunas leucemias. Asimismo, estos inhibidores se han utilizado en el tratamiento de hemoglobinopatías al desmetilar promotores de genes de hemoglobina fetal, lo que incrementa su producción y ayuda a corregir la anemia asociada a estas enfermedades. Por otro lado, los inhibidores de deacetilasas de histonas (HDAC), que impiden la remoción de grupos acetilo de las colas de histonas y generan una cromatina más laxa y permisiva, han sido aprobados para el tratamiento de varias enfermedades, entre ellas el linfoma de células T y en síndromes epileptoides. Ejemplos de estos fármacos incluyen vorinostat, romidepsina y belinostat (Egger *et al.*, 2004) (Eckschlager *et al.*, 2017).

1.3 Importancia de la diversidad transcripcional y el splicing

La diversidad transcripcional es clave para la complejidad y funcionalidad de los organismos eucariotas multicelulares. Aunque el número de genes en el genoma humano ronda los 20,000, una cifra comparable a la de invertebrados mucho menos complejos como, por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, la verdadera fuente de diversidad y sofisticación radica en la capacidad de generar múltiples isoformas de mRNA a partir de un único gen mediante procesos como el splicing alternativo. Este

fenómeno permite que un solo gen pueda codificar distintas proteínas, cada una con funciones potencialmente diferentes, contribuyendo a la diversidad proteica que caracteriza a los organismos más complejos.

El splicing, al unir exones de diversas formas, es un mecanismo que no sólo incrementa la cantidad de proteínas que un organismo puede generar, sino que también juega un papel crucial en la regulación de procesos biológicos como la diferenciación celular, el desarrollo y la respuesta a estímulos externos. Esta diversidad es esencial para la adaptación y la especialización celular, ya que permite que distintas células y tejidos expresen diferentes combinaciones de proteínas según el tejido con implicaciones funcionales diversas y en respuestas a señales ambientales. La importancia de este proceso se destaca en el hecho de que en más del 90% de los genes en el genoma humano ocurre algún tipo de splicing alternativo (Pan *et al.*, 2008).

La capacidad de modulación a través del splicing alternativo, en conjunto con otros procesos de modificación co-transcripcional como la poliadenilación, y el capping del extremo 5' del mRNA, permiten que la célula mantenga una complejidad biológica que supera ampliamente la que se podría obtener sólo a partir del número de genes presentes en su genoma. En otras palabras, la complejidad de un organismo se correlaciona más estrechamente con la sofisticación de la regulación génica y la capacidad de producir diversas variantes de mRNA que con la simple cantidad de genes (Bentley, 2014).

1.4 Procesamiento y maduración del mRNA

El procesamiento y la maduración del RNA, (Figura I.5) son etapas esenciales que transforman el pre-RNA mensajero (pre-mRNA) en un mensajero maduro y funcional (mRNA), listo para ser exportado al citoplasma y traducido en proteínas. Estos procesos, que incluyen la adición de un cap en el extremo 5' (capping), la poliadenilación en el extremo 3', y el splicing, ocurren mayormente de manera co-transcripcional, es decir, mientras el RNA es sintetizado. Esto ha sido demostrado mediante la técnica de extensión de Miller, como se observa en la Figura I.5^a. Cada uno de estos pasos desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica y en la generación de diversidad transcripcional (Bentley, 2014).

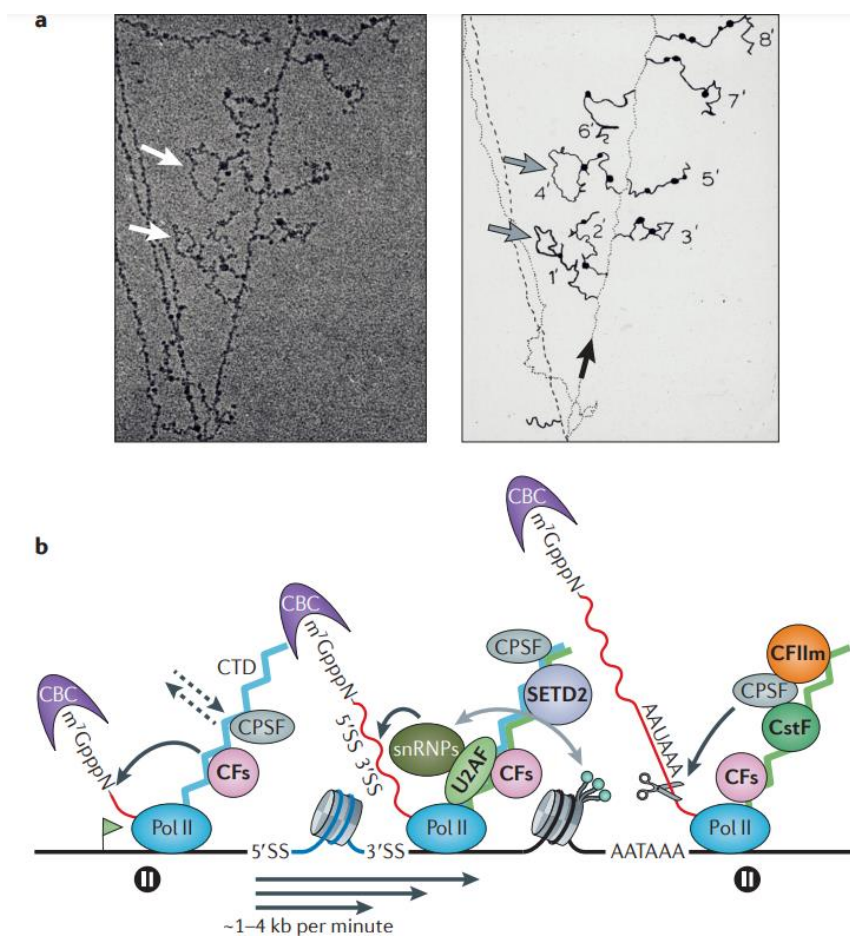


Figura 1.5. Procesamiento del RNA.

(a) A la izquierda, micrografía electrónica tipo "Miller spread" que muestra un gen embrionario de *Drosophila melanogaster* en proceso de transcripción. A la derecha, su representación esquemática, que ilustra el procesamiento co-transcripcional del RNA. La micrografía muestra el templado de DNA ocupado por varias moléculas de RNA polimerasa II y sus transcritos nacientes, asociados a proteínas (representadas como esferas negras). Las flechas grises y blancas indican intrones que son eliminados durante el proceso co-transcripcional, mientras que la flecha negra señala la dirección de la transcripción a lo largo del templado de DNA.

(b) Esquema del procesamiento co-transcripcional del mRNA. Se muestra un gen transcripto con múltiples moléculas de RNA polimerasa II, marcando el sitio de inicio de la transcripción con una bandera verde. Las flechas negras curvas representan los procesos de capping en el extremo 5', splicing y poliadenilación en el extremo 3', llevados a cabo por factores asociados a la RNA polimerasa II que actúan sobre el transcripto naciente (en rojo). Factores de capping, procesamiento 3' y terminación se unen directamente a la cola carboxiterminal (CTD) de la RNA polimerasa II (representada en azul). La elongación de la transcripción ocurre a velocidades variables (indicadas con flechas negras rectas), con pausas transcripcionales frecuentes al inicio y al final del transcripto (marcadas con señales de pausa). Durante el ciclo de transcripción, la fosforilación del CTD cambia: los altos niveles de fosfo-serina 5 (en azul) en el extremo 5' facilitan la unión de factores de capping, mientras que los altos niveles de fosfo-serina 2 (en verde) en el extremo 3' favorecen la unión de factores que afectan las marcas de histonas y la estructura de la cromatina y modificadores de histonas, como SETD2, que establece marcas de trimetilación en H3K36 (representadas como esferas verdes). (Bentley, 2014)

1.4.1 5' Capping

La adición de un capuchón o 'cap' en el extremo 5' del pre-mRNA consiste en la incorporación de una 7-metilguanosina a través de un enlace 5'-5' trifosfato. Este proceso, ilustrado en la Figura I.6, protege al mRNA de la degradación por exonucleasas y facilita su reconocimiento por los ribosomas durante la traducción. Además, el cap 5' participa en la regulación de la estabilidad del mRNA y en su exportación eficiente desde el núcleo al citoplasma (Bentley, 2014).

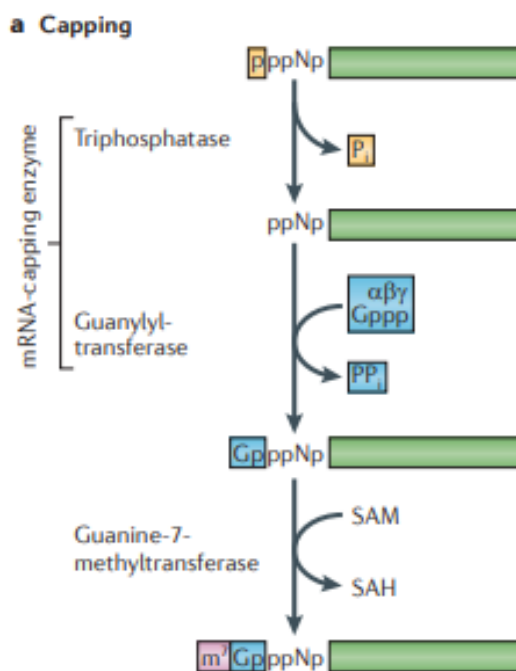


Figura I.6. Proceso de capping en el extremo 5' del pre-mRNA, un paso esencial en el procesamiento co-transcripcional del RNA.

El RNA nascente se muestra en verde, mientras que el GTP y el cap de guanosina (Gp) están representados en azul. En metazoos, la enzima de capping es bifuncional y posee actividades de trifosfatasa y guanililtransferasa, que eliminan el grupo γ -fosfato del transcrito nascente y transfieren un GMP desde el GTP dador, respectivamente. El dador de metilos, S-adenosilmetionina (SAM), se convierte en S-adenosilhomocisteína (SAH) durante este proceso, lo que da como resultado un cap de 7-metilguanosina (mostrado en rosa) que protege el mRNA de endonucleasas (Bentley, 2014).

1.4.2 Corte y poliadenilación en el extremo 3'

La poliadenilación en el extremo 3' del pre-mRNA, ilustrado en Figura I.7, implica el corte del transcrito en una secuencia específica, seguida de la adición de una cola de poliadenosina monofosfato (poli-A). Esta cola poli-A es fundamental para la estabilidad del mRNA, ya que protege contra la degradación enzimática, y también mejora la eficiencia de la traducción al facilitar la circularización no covalente del mRNA y la interacción con los ribosomas. Asimismo, la poliadenilación influye en la exportación del mRNA al citoplasma y en la regulación de su vida media (Bentley, 2014).

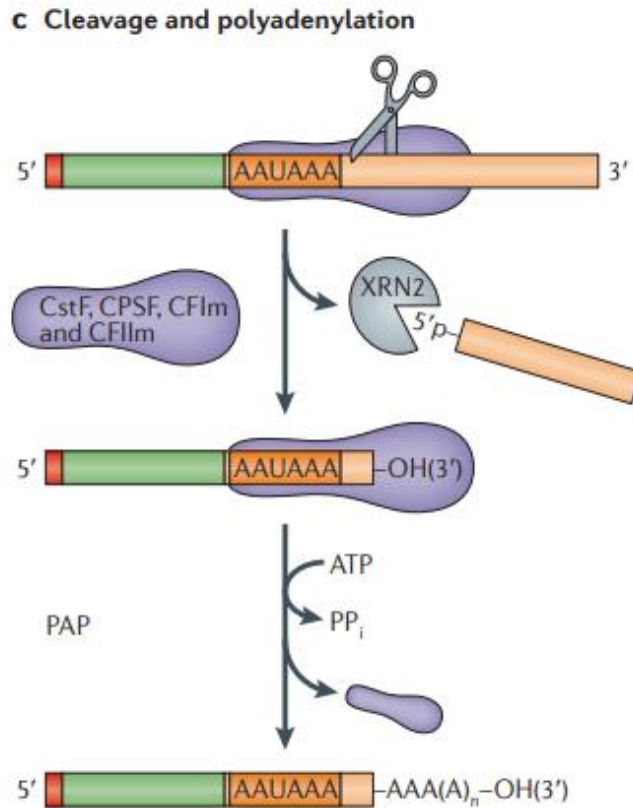


Figura 1.7. Poliadenilación en el extremo 3' del pre-mRNA, un paso crucial en la maduración, estabilidad y exportación del RNA mensajero al citoplasma.

El diagrama muestra cómo el extremo 3' del pre-mRNA se forma mediante un proceso acoplado de corte y poliadenilación. El corte ocurre río abajo de la secuencia consenso (AAUAAA), y es llevado a cabo por un complejo multifactorial (representado en violeta). Este complejo incluye el factor de estimulación de corte (CstF), el factor de especificidad para el corte y la poliadenilación (CPSF), que contiene la endonucleasa responsable del corte, y los factores de corte I y II (CFIIm y CFIIIm). La poli(A) polimerasa (PAP) agrega la cola de poli(A) al extremo 3'. Adicionalmente, el esquema representa la acción de la exonucleasa de RNA 5'-a-3' XRN2, que degrada el RNA río abajo del sitio de corte y facilita la terminación de la transcripción. (Bentley 2014).

1.4.3 Splicing

El proceso de splicing es una etapa clave en la maduración del pre-mRNA y se lleva a cabo de forma mayormente co-transcripcional, es decir, mientras se produce la transcripción por la RNA polimerasa II (RNAPII). Este proceso implica la eliminación de intrones (secuencias no codificantes) y la unión de exones, secuencias que quedarán representadas en el RNA maduro. El splicing es llevado a cabo por el spliceosoma, un complejo ribonucleoproteico compuesto por pequeños RNAs nucleares (snRNAs) y más de 150 proteínas asociadas. Los snRNAs principales que participan en el spliceosoma incluyen U1, U2, U4, U5 y U6, cada uno cumpliendo funciones específicas en el reconocimiento, corte y empalme de los exones.

El proceso de splicing, ilustrado en Figura I.7, se inicia con el reconocimiento del extremo 5' del intrón por el snRNP U1, que se une a la secuencia consenso GU presente en la mayoría de los sitios dadores de splicing. Luego, U2 se asocia con la secuencia de ramificación situada río arriba del extremo 3' del intrón, formando un lazo de estructura de *lariat*. Esta interacción es fundamental, ya que la adenina en el sitio de ramificación juega un papel clave en la reacción de corte y empalme. Una vez ensamblado el spliceosoma completo, los snRNPs U4, U5 y U6 se unen, catalizando la escisión del extremo 5' del intrón y su unión al sitio de ramificación, creando la estructura de *lariat*. Posteriormente, el extremo 3' del intrón es cortado y los exones adyacentes se unen covalentemente (Bentley, 2014).

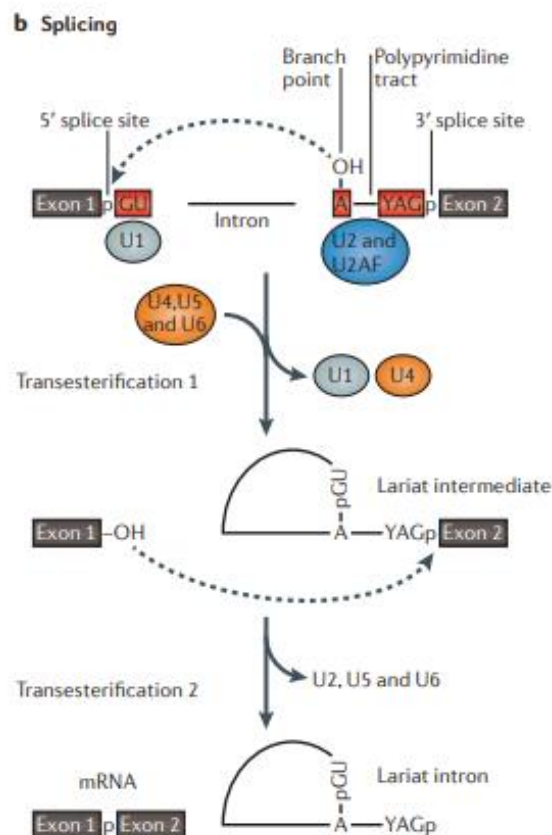


Figura I.8. Proceso de splicing durante la maduración del pre-mRNA.

El diagrama muestra cómo el proceso de splicing elimina un intrón, en forma de un lariat, y liga los exones adyacentes mediante dos reacciones de transesterificación. Los elementos conservados intrónicos necesarios para el splicing están indicados en rojo. También se representan los ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) del spliceosoma U1, U2, U4, U5 y U6, junto con el factor auxiliar U2 (U2AF) necesarias para estos procesos. (Bentley 2014)

El splicing alternativo, ilustrado en la Figura I.9, es una variante de este proceso de splicing, que permite la inclusión o exclusión selectiva de delimitados exones, lo cual contribuye significativamente

a la diversidad del proteoma. Estos mecanismos aumentan ampliamente la capacidad génica codificante en eucariotas, dando lugar a múltiples variantes de mRNA provenientes de un solo gen. Estos eventos ocurren cuando un sitio de splicing es ‘débil’, es decir subóptimo por tener una secuencia parcialmente alejada del consenso, a diferencia de un sitio de splicing ‘fuerte’ que suele resultar en un splicing constitutivo. Así, un sitio débil o subóptimo, es usado en una proporción menor al total de las moléculas de pre-mRNA, generando diferentes proporciones de transcritos de mRNA maduro. Este mecanismo es regulado por elementos en cis, como los "enhancers" y silenciadores exónicos e intrónicos (ESE, ISE, ESS, ISS) del splicing, y por factores en trans, como las proteínas SR y hnRNPs, que se unen a estas secuencias y modulan la inclusión o exclusión de exones (Marasco & Kornblihtt, 2023) (Hua *et al.*, 2007).

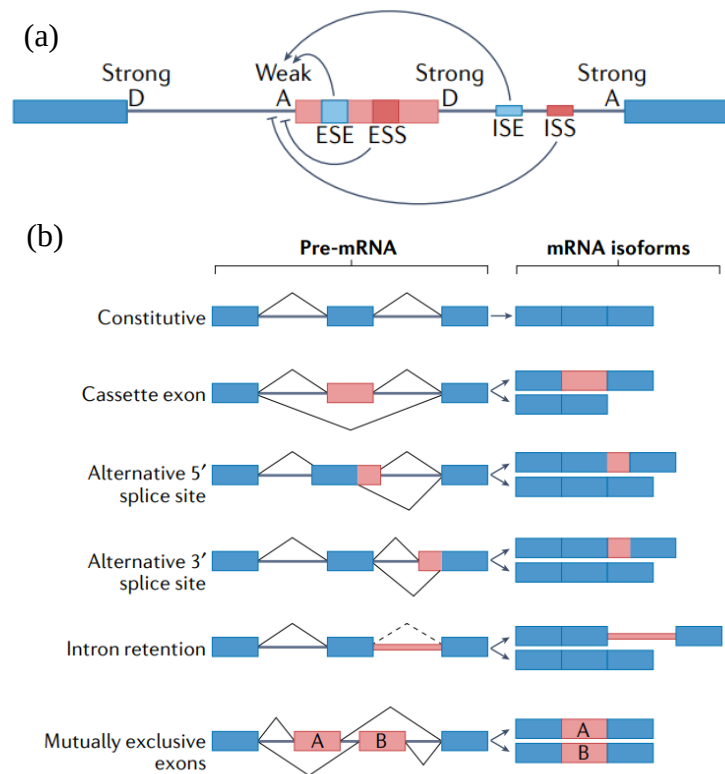


Figura I.9. El proceso de splicing alternativo durante la maduración del pre-mRNA.

(a) Un segmento de pre-mRNA con los elementos en cis que influyen sobre la inclusión del exón tipo cassette (en rosa), el cual presenta un sitio aceptor de splicing subóptimo. Flechas azules indican el efecto sobre el sitio aceptor, donde los potenciadores de splicing exónico e intrónico (en azul) promueven la inclusión del exón, mientras que los silenciadores de splicing exónico e intrónico (en rojo) inhiben la inclusión del exón en el transcripto maduro.

(b) El diagrama ilustra el splicing constitutivo y cinco tipos de splicing alternativo. En la parte superior, se muestra el splicing constitutivo que ocurre debido a la presencia de sitios de splicing óptimos. Sin embargo, también puede darse en casos de sitios de splicing subóptimos si están asociados con "enhancers" de splicing fuertes. (Marasco y Kornblihtt, 2023)

La regulación del splicing es altamente dinámica y está influenciada por varios factores, incluyendo la velocidad de elongación de la RNAPII y las modificaciones de la cromatina. Una elongación más lenta de la polimerasa puede proporcionar una ventana de tiempo mayor para el reconocimiento y la unión de los factores de splicing a sus sitios específicos en el pre-mRNA, promoviendo la inclusión de exones. Por otro lado, una elongación rápida puede favorecer la exclusión de exones débiles que no se reconocen eficazmente en un período corto (Nogués *et al.*, 2003). Este proceso no sólo aumenta la diversidad de proteínas que una célula puede producir, sino que también juega un papel en la regulación de la expresión génica, adaptando la funcionalidad celular a diferentes contextos fisiológicos y de desarrollo.

1.5 Organización de la cromatina y su papel en la regulación génica

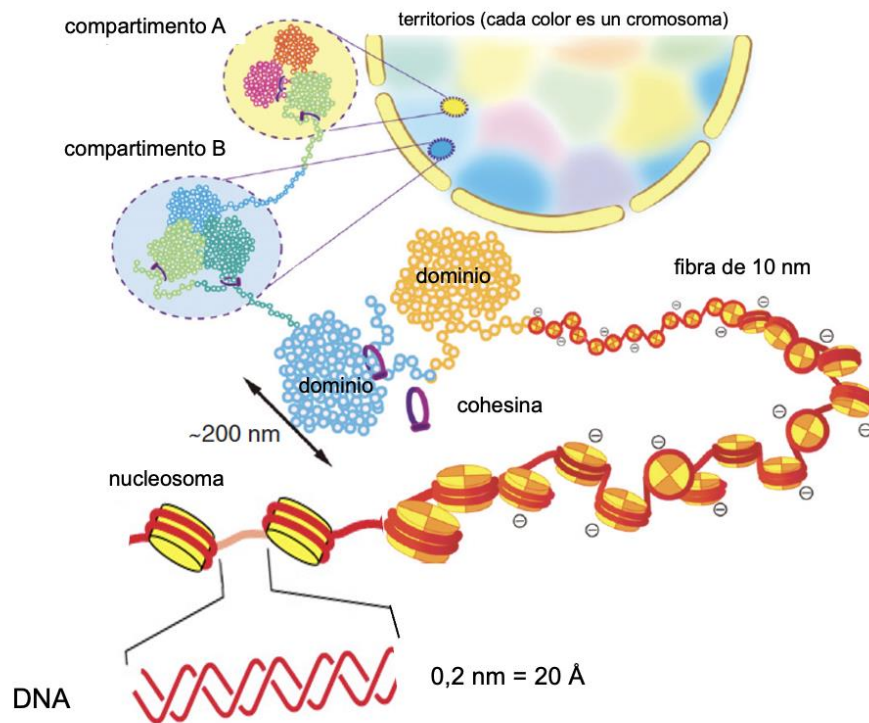


Figura I.10. Niveles de organización de la cromatina en interfase. Representación esquemática que ilustra las distintas capas de empaquetamiento del DNA en la cromatina.

De abajo hacia arriba: el DNA en su forma más simple, como una doble cadena (rojo) organizada en una estructura helicoidal mediante el apareamiento complementario de nucleótidos; el DNA asociado a histonas (tambores amarillos) para formar nucleosomas, que consisten en un octámero de histonas alrededor del cual el DNA se enrolla 1.65 veces, con un diámetro aproximado de 11 nm; los nucleosomas se asocian formando dominios cromatínicos de aproximadamente 200 nm de diámetro, mantenidos por la proteína cohesina; los dominios a su vez se asocian en compartimentos cromatínicos. Como ejemplo, dos compartimentos, denominados A y B, se encuentran dentro de un mismo territorio cromosómico. Cada cromosoma en interfase forma un territorio. Modificado de Maeshima *et al.* (2021).

La accesibilidad del DNA a los factores de transcripción y a la RNA polimerasa II depende de la estructura de la cromatina, que influye directamente sobre la regulación de la expresión génica. La Figura I.10 ilustra los niveles de organización de la cromatina que es una estructura compleja formada por DNA y proteínas histonas, que permite empaquetar el material genético de manera eficiente dentro del núcleo celular. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, compuesto por un octámero de histonas, dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, alrededor del cual se enrollan aproximadamente 147 pares de bases de DNA. Estos nucleosomas se conectan mediante segmentos de DNA ‘linker’ y se organizan para formar estructuras de orden superior que regulan el acceso al material genético (Maeshima *et al.*, 2021).

Las colas N-terminales de las histonas se extienden hacia fuera del nucleosoma y son el blanco de las modificaciones postraduccionales, como la acetilación, metilación, fosforilación y otras. Estas modificaciones pueden cambiar la carga de las histonas, lo que afecta la interacción entre las histonas y el DNA y entre los nucleosomas. Por ejemplo, la acetilación de las lisinas neutraliza la carga positiva de las histonas, reduciendo la atracción electrostática entre las histonas y el DNA cargado negativamente. Este proceso provoca un relajamiento de la cromatina, facilitando el acceso de los factores de transcripción y de la maquinaria de transcripción al DNA, lo cual favorece la transcripción activa.

Estas modificaciones actúan como señales para el reclutamiento de factores que modifican la cromatina y otros complejos reguladores, que pueden fortalecer o debilitar las interacciones entre los nucleosomas y el DNA. Este control dinámico de la estructura de la cromatina es fundamental para la regulación de la expresión génica, ya que determina qué regiones del genoma están accesibles para ser transcritas y cuáles permanecen silenciadas (Venkatesh & Workman, 2015), (Zhou *et al.*, 2011).

1.6 Modificaciones epigenéticas y sus implicaciones

Como se ha mencionado, las histonas son sujetas a diversas modificaciones postraduccionales, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y SUMOilación, principalmente en sus colas N-terminales. Estas modificaciones influyen en la estructura de la cromatina y, en consecuencia, en la expresión génica. Como se mencionó, la acetilación de histonas, realizada por las acetiltransferasas de histonas (HATs), lleva a una estructura de cromatina más abierta y propicia para la transcripción. Por el contrario, las desacetilasas de histonas (HDACs) eliminan los grupos acetilo,

resultando en la compactación de la cromatina y la represión transcripcional (Bannister & Kouzarides, 2011).

Estas modificaciones y la estructura de la cromatina no sólo afectan la transcripción, sino que también impactan procesos co-transcripcionales, como el *splicing* alternativo, contribuyendo así a la diversidad proteica. A diferencia de las mutaciones que alteran la secuencia del DNA, las mutaciones o desregulaciones que ocurren en los procesos epigenéticos son potencialmente reversibles, lo que las convierte en blancos terapéuticos prometedores para el tratamiento de enfermedades epigenéticas. La Figura I.12 ilustra algunos mecanismos moleculares epigenéticos, su relación con enfermedades, y posibles blancos terapéuticos (Allis & Jenuwein, 2016).

Dentro de las desacetilasas de histonas se encuentran las sirtuinas, una familia de deacetilasas de proteínas dependientes de NAD^+ , que desempeñan roles cruciales en diversos procesos celulares. Estas funciones abarcan desde el mantenimiento epigenético hasta la modulación de respuestas al estrés, la reparación del daño al DNA y la regulación del metabolismo celular.

Entre las sirtuinas, SIRT6 se destacó inicialmente como un supresor de la inestabilidad genómica. Esta proteína nuclear, unida a la cromatina, “chromatin bound”, actúa principalmente como una desacetilasa de histonas (HDAC), modulando el panorama epigenético celular en respuesta a la disponibilidad de NAD^+ . Su papel es fundamental en la regulación de la respuesta metabólica de la célula, en el control de la senescencia celular, y la estructura telomérica mediante la desacetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9). En particular, se ha demostrado que SIRT6 reprime la actividad de HIF-1 α , un regulador crítico en la respuesta al estrés nutricional de la célula, a través de la desacetilación de H3K9 en los promotores de genes relacionados con la glucólisis. En modelos de ratones deficientes en SIRT6, se observan fenotipos de hipoglucemia letal, con niveles elevados de captación de glucosa incluso en condiciones normóxicas, es decir, con niveles normales de oxígeno, un fenómeno similar al efecto Warburg observado en células tumorales. Este descubrimiento reveló el rol de SIRT6 como un represor tumoral que regula la glucólisis en células cancerígenas. La ausencia de SIRT6 promueve la tumorigenesis, mientras que la inhibición de la glucólisis en células deficientes en SIRT6 rescata el fenotipo tumorigénico. Estos descubrimientos, junto con la observación de que SIRT6 está desregulada en varios tipos de cáncer, subrayan la importancia de mantener un estado epigenético equilibrado mediante modificaciones cromatínicas para preservar la homeostasis celular

y prevenir estados patológicos (Kugel & Mostoslavsky, 2014; Mostoslavsky *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2010).

La metilación de histonas, otra modificación clave, puede tener un efecto activador o represor sobre la transcripción, dependiendo del residuo de histona específico y el estado de metilación. Por ejemplo, la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3) se asocia con transcripción activa, mientras que la trimetilación de H3K9 y H3K27 se asocia con represión transcripcional y formación de heterocromatina. Estas modificaciones no sólo afectan la estructura de la cromatina, sino que también actúan como señales para el reclutamiento de proteínas remodeladoras de cromatina y otros factores reguladores, determinando la accesibilidad del DNA a la maquinaria transcripcional, ilustrado en la Figura I.11 (Allis & Jenuwein, 2016; Bannister & Kouzarides, 2011).

EHMT2, también conocida como G9a, es una metiltransferasa de histonas de la familia Su(var)-3-9, que cataliza la mono- y di-metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9). Esta enzima está involucrada en varios procesos celulares esenciales. La depleción de G9a es letal durante el desarrollo embrionario en ratones y provoca defectos graves en la diferenciación de células embrionarias, evidenciando que G9a es indispensable para el desarrollo embrionario adecuado.

Además, G9a se ha identificado como un componente clave en el mantenimiento de la pluripotencia. En este contexto, G9a sinergiza con la metilación del DNA para inducir la represión a largo plazo del gen Oct-3/4, un regulador fundamental en la conservación de la pluripotencia.

Por otro lado, otros factores como la proteína de heterocromatina 1 (HP1) son claves en la manutención del estado epigenético de la célula. HP1, involucrada en la manutención de estados represivos de cromatina, es reclutada a los sitios de metilación de histonas tras la acción de G9a. A su vez, HP1 facilita el reclutamiento de las metiltransferasas de DNA (DNMT1), promoviendo la metilación del DNA y reforzando el efecto represivo sobre la expresión de sus genes target (Casciello *et al.*, 2015).

Los trabajos de Fiszbein *et al.*, 2016 demostraron la relación entre esta metiltransferasa de histonas, la diferenciación neuronal y el *splicing* alternativo. G9a presenta dos isoformas generadas por la inclusión o exclusión del exón 10 (+/-E10). La inclusión del exón 10 promueve la localización nuclear de G9a, lo que incrementa los niveles globales de H3K9me2 sin afectar su actividad catalítica.

En estos estudios, se evidenció que la inclusión del exón 10 es indispensable para la diferenciación neuronal y que G9a regula el evento de *splicing* de su propio mRNA para la inclusión del exón 10,

estableciendo un bucle de retroalimentación positiva que refuerza el compromiso celular hacia la diferenciación (Fiszbein *et al.*, 2016).

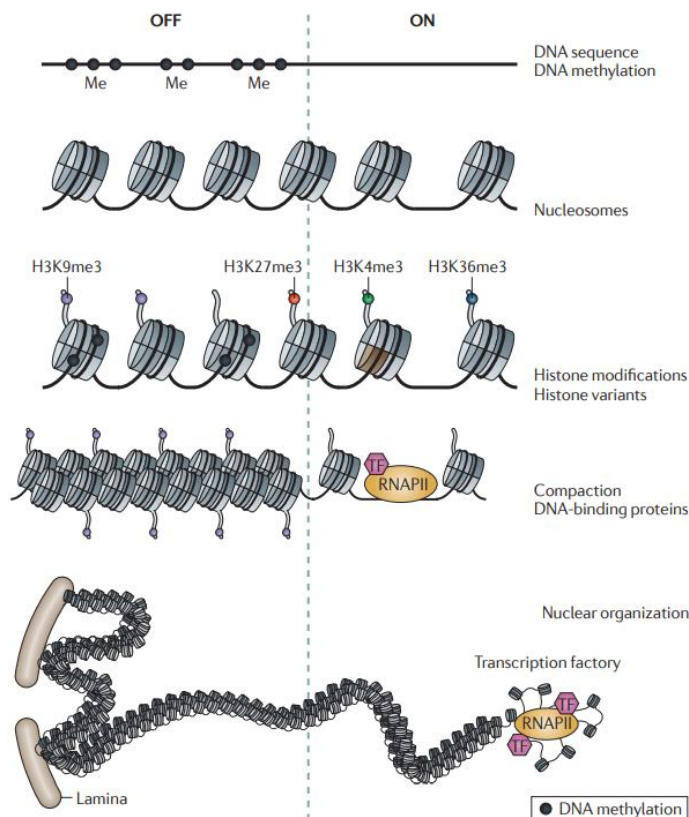


Figura I.11. Niveles de organización de la cromatina en relación con la transcripción en células eucariotas.

En la parte superior, se muestra el DNA (línea negra) con su metilación en residuos de citosina (esferas negras). La presencia de metilación "apaga" la transcripción, mientras que su ausencia la activa. Los nucleosomas están representados como cilindros grises (histonas) envueltos en DNA. Las modificaciones de la cromatina se ilustran como esferas de colores en las colas de las histonas; dependiendo del tipo de modificación, estas pueden tener un efecto inhibitorio (a la izquierda de la línea punteada) o activador (a la derecha). Las variantes de histonas se representan como segmentos de colores distintos dentro de la estructura del octámero de histonas.

En el siguiente nivel, se observa la relación entre la compactación de la cromatina y la transcripción. A la izquierda, la cromatina compacta no permite la unión de la RNA polimerasa II (RNAPII), mientras que a la derecha, el espaciado laxo de la cromatina facilita la unión de la RNAPII y de los factores de transcripción.

En la parte inferior, se ilustra el empaquetamiento de la cromatina en niveles de organización superiores. A la izquierda, la cromatina unida a la lámina nuclear es transcripcionalmente inactiva, mientras que a la derecha, la cromatina activa está asociada con la RNA polimerasa II. Los nucleosomas contienen modificaciones en las histonas, lo que constituye la capa primaria de la estructura de la cromatina.

(Zhou *et al.*, 2010)

Entre los ejemplos de mutaciones epigenéticas asociadas a enfermedades también se encuentran la hipermetilación del promotor del supresor de tumores Von Hippel-Lindau (VHL) en cáncer renal y del gen CDKN2A en varios tipos de tumores. La hipermetilación de promotores puede interrumpir la

regulación transcripcional mediada por factores regulatorios, como los microRNAs, lo que resulta en la sobreexpresión de blancos oncogénicos, como BCL-6. Este proceso contribuye a la activación constitutiva de rutas de señalización que promueven actividades invasivas y metastásicas (Baylin & Jones, 2011).

El término hipermetilación del promotor generalmente hace referencia a modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA en residuos de citosina. Sin embargo, estas modificaciones del DNA y de las histonas suelen actuar en conjunto como previamente mencionado donde marcas epigenéticas como H3K9me o H3K27me3 pueden reclutar metiltransferasas de DNA (DNMTs), que refuerzan estados de cromatina represivos, interrumpiendo así la regulación transcripcional dependiente de factores regulatorios (Rose & Klose, 2014)

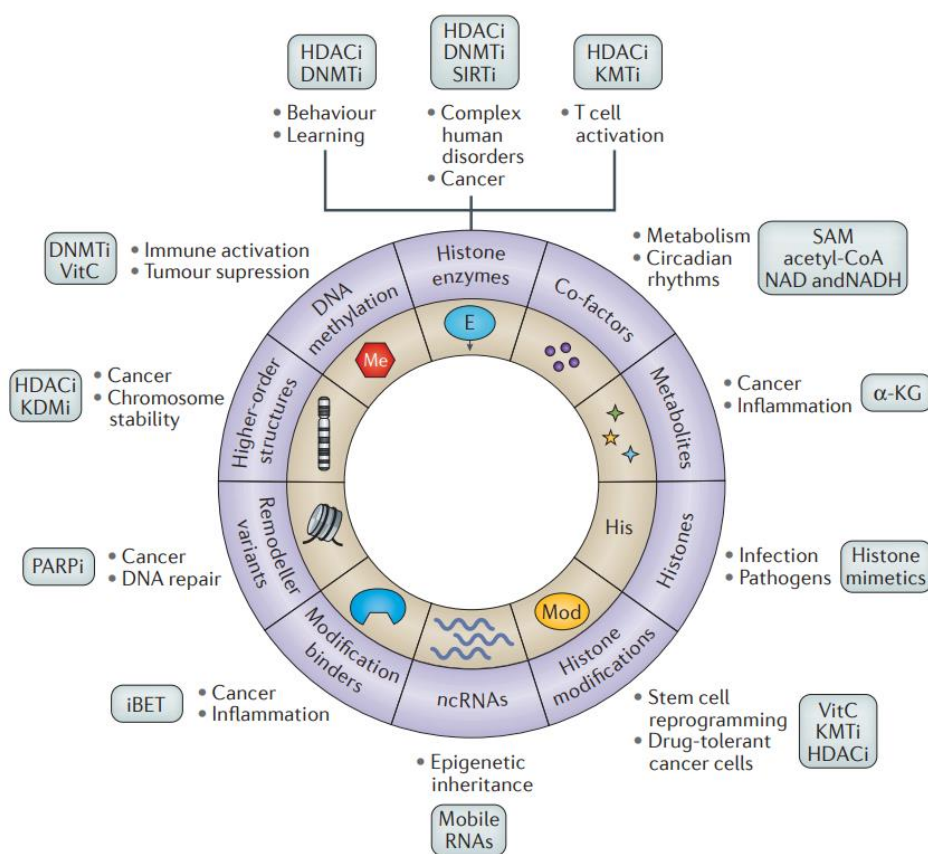


Figura 1.12. Características moleculares distintivas del control epigenético, su relevancia médica y su potencial como blanco terapéutico.

En el centro del círculo (en violeta) se representan los mecanismos epigenéticos clave, como la metilación del DNA, las modificaciones de histonas, entre otros, junto con sus factores asociados, indicados en el círculo marrón. Fuera del círculo se detallan los procesos relacionados con enfermedades causadas por la desregulación de los componentes epigenéticos. Además, en los recuadros grises, se señalan los posibles blancos terapéuticos para intervención farmacológica, destacando su potencial para revertir dichas desregulaciones epigenéticas. (Allis y Jenuwein, 2016)

1.7 El rol de la elongación de RNAPII en el splicing alternativo

La relación entre la elongación transcripcional y el procesamiento del transcripto ocurre a través del acoplamiento entre estos dos eventos. Evidencias como las micrografías electrónicas de embriones de *Drosophila* (Figura I.5) han demostrado que el procesamiento del transcripto puede comenzar incluso antes de que la transcripción haya finalizado, ocurriendo de manera co-transcripcional y formando los característicos ‘loops’ en el transcripto naciente. Además, trabajos como el de Hagen Tilgner han reforzado esta idea, mostrando que la mayoría de los eventos de splicing ocurren de forma co-transcripcional en humanos (Naftelberg *et al.*, 2015; Tilgner *et al.*, 2012).

Existen dos modelos de acoplamiento que explican la relación entre el splicing alternativo y el proceso de transcripción. El modelo de reclutamiento que propone que los factores de splicing son reclutados a sitios transcripcionales via el dominio C terminal (CTD) de la RNA Pol II y que el acoplamiento es mediado por modificadores de la cromatina y coactivadores transcripcionales. El segundo modelo, el modelo cinético, propone que la velocidad de la elongación afecta la disponibilidad de los sitios de splicing en el RNA naciente. Según el modelo cinético la elongación transcripcional mediada por la RNA polimerasa II (RNAPII) es un paso esencial en la expresión génica, ya que determina la velocidad con la que se transcribe el pre-mRNA y en consecuencia afecta su procesamiento.

Por lo tanto, la velocidad de elongación desempeña un papel en la regulación de un subconjunto de eventos de splicing alternativo, ya que influye en la exposición de los sitios de splicing y en la capacidad de los factores de splicing para reconocer y unirse a estos sitios. Una transcripción más lenta incrementa el tiempo durante el cual los sitios de splicing están disponibles, favoreciendo la inclusión de ciertos exones. Por el contrario, una elongación más rápida reduce este tiempo y puede llevar a la exclusión de los mismos exones (Fong *et al.*, 2014; Kornblihtt *et al.*, 2013; Naftelberg *et al.*, 2015; Nogués *et al.*, 2003).

1.7.1 Exones Tipo 1 y Tipo 2

En el contexto del splicing alternativo, los exones se clasifican en dos tipos según su respuesta a la velocidad de elongación de la RNAPII:

Exones Tipo 1: Estos tipos de exones, ilustrados en Figura I.13, comprenden la mayoría de los exones sensibles a la velocidad de elongación de la RNA Pol II, suelen tener un sitio de splicing débil en el extremo 3' y un sitio fuerte en el extremo 5'. La elongación lenta de la RNAPII permite una mayor ventana temporal para que los factores de splicing reconozcan el sitio de splicing débil en el 3' del

exón, lo que favorece su inclusión. Sin embargo, cuando la RNAPII se mueve rápidamente, no da suficiente tiempo para que el sitio débil sea reconocido, y el spliceosoma tiende a usar el sitio fuerte río abajo, lo que resulta en la exclusión del exón. Este comportamiento muestra cómo la velocidad de elongación de la RNAPII afecta la capacidad de reconocer exones con señales débiles (de la Mata *et al.*, 2003).

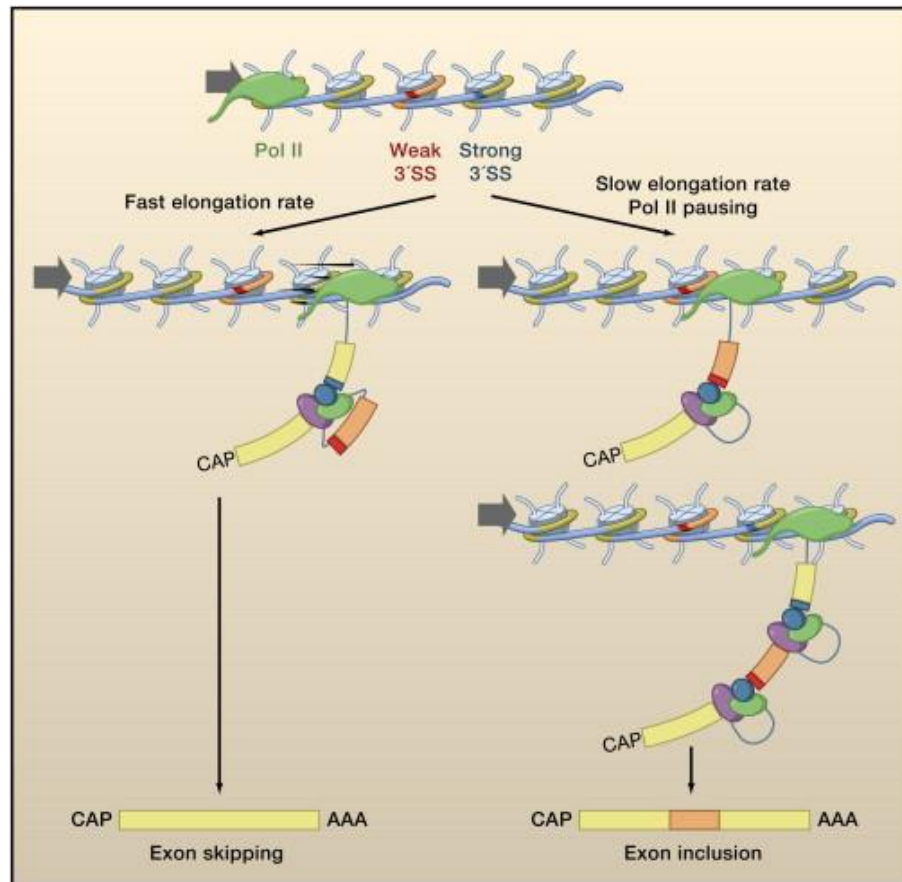


Figura I.13. Exon Tipo I.

Representación esquemática de cómo la elección de splicing alternativo depende de la elongación de la RNA polimerasa II mediante un mecanismo de acoplamiento cinético. La RNAPII se representa en verde, la cromatina compuesta de DNA y histonas en celeste, el sitio 3' de splicing débil (3'SS) en rojo y el sitio 3' de splicing fuerte en azul. Las flechas negras indican los dos posibles mecanismos de splicing dependiendo de la velocidad de elongación de la RNAPII.

A la izquierda, una elongación rápida resulta en la exposición simultánea de la maquinaria de splicing al sitio débil (rojo) y al sitio fuerte (azul) de splicing, donde la competencia para el reclutamiento de factores de splicing (ovales violeta, azul y verdes) da lugar al saltado del exón más débil (rectángulo naranja). A la derecha, una elongación lenta de la RNAPII favorece el reclutamiento de la maquinaria de splicing al exón más débil, lo que resulta en la inclusión del exón. (De Luco *et al.*, 2011).

Exones Tipo 2: A diferencia de los exones tipo 1, los exones tipo 2 generalmente tienen dos sitios de splicing fuertes, pero están regulados por factores de splicing negativos como, por ejemplo, hnRNP A1/A2. En este caso, una elongación rápida de la RNAPII no permite suficiente tiempo para que el

factor inhibidor se una al sitio específico en el pre-mRNA, lo que lleva a la inclusión del exón. Sin embargo, cuando la elongación es lenta, el factor inhibidor puede unirse a su sitio blanco en el pre-mRNA, desplazando a factores de splicing positivos, lo que resulta en la exclusión del exón. El exón 9 del gen CFTR es un ejemplo de exón tipo 2 (Dujardin *et al.*, 2014). Este tipo de exones ha sido identificado en estudios de todo el genoma (Fong *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2009).

1.8 Modificaciones de cromatina y cinética transcripcional

La cinética de elongación de la RNAPII y las modificaciones de cromatina están estrechamente interrelacionadas y juntas desempeñan un papel fundamental en la regulación del splicing alternativo. Las modificaciones de cromatina afectan directamente la velocidad de elongación de la RNAPII y la accesibilidad de los sitios de splicing. En un estado de cromatina abierta, facilitado por la acetilación de histonas, la RNAPII puede transcribir con mayor eficacia y a una velocidad más rápida, lo que favorece la exclusión de exones tipo 1 y la inclusión de exones tipo 2. Por el contrario, cuando la cromatina está más compacta debido a modificaciones como la metilación de histonas o la desacetilación de las mismas, la velocidad de elongación de la RNAPII disminuye, lo que favorece la inclusión de exones tipo 1 y la exclusión de exones tipo 2. En el caso del exón 18 del gen *NCAM*, un exón de tipo 1, la depolarización de células neuronales resulta en el salteado de este exón debido a una hiper acetilación (H3K9ac) en una región interna del gen, alrededor del exón alternativo (Schor & Kornblihtt, 2009).

Se ha demostrado que la modificación de la cromatina mediante inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi) o inhibidores de metiltransferasas puede alterar la dinámica de elongación de la RNAPII. Por ejemplo, los inhibidores de HDAC, como la tricostatina A (TSA) aumentan la acetilación de histonas, promoviendo un estado de cromatina más abierto que facilita la elongación de la RNAPII y que, en consecuencia, puede apoyar la inclusión de exones tipo 2. Estos estudios demuestran cómo la manipulación del estado de la cromatina, junto con la regulación de la velocidad de elongación de la RNAPII, puede tener un impacto significativo en la regulación del splicing alternativo y en la generación de diversidad transcripcional y por lo tanto en la respuesta biológica como diferenciación celular (Schor & Kornblihtt, 2009).

1.9 Atrofia muscular espinal (AME)

La atrofia muscular espinal, AME, (SMA en inglés por spinal muscular atrophy) es una enfermedad neurodegenerativa grave y progresiva que se manifiesta principalmente desde una temprana edad,

caracterizada por la pérdida de funcionalidad de motoneuronas y la subsiguiente atrofia del músculo esquelético. Es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones de pérdida de función o deleciones en el gen *SMN1*, que codifica la proteína SMN (por *survival of motoneurons*), donde "autosómica recesiva" se refiere a la transmisión de la enfermedad en la cual el paciente afectado debe haber heredado los dos alelos no funcionales del gen *SMN1*, uno de cada progenitor. Esta proteína es crucial para la supervivencia de las motoneuronas y el mantenimiento sináptico, entre otras funciones celulares. (Hua *et al.*, 2007)

En particular la proteína SMN está involucrada en múltiples procesos celulares esenciales, como el ensamblaje del spliceosoma y la biogénesis de snRNPs (small nuclear ribonuclear proteins) que son componentes clave de la maquinaria de splicing. Es una proteína que se encuentra en ambos el núcleo y citoplasma y es particularmente importante en axones, dendritas y sinapsis donde su expresión es alta durante el desarrollo y disminuye en el sistema nervioso central en etapas adultas. Cumple un papel clave en la regulación de la traducción de proteínas donde se asocia con ribosomas y regula la disponibilidad de estos para la traducción de RNA mensajeros. Es fundamental para la polarización y maduración de motoneuronas durante el desarrollo y también para su función en etapas adultas. También desempeña un rol en la regulación del citoesqueleto celular mediante su interacción con actina y microtúbulos, destacando su importancia en la morfología y función celular. Esta amplia gama de funciones explica porqué las motoneuronas son particularmente susceptibles a la pérdida de SMN, lo cual resulta en el desarrollo de la atrofia espinal muscular (Chaytow *et al.*, 2018).

El genoma humano contiene una copia casi idéntica de *SMN1*, el gen *SMN2*, también de aproximadamente 30 kpb de longitud y localizada en el cromosoma 5, cuya secuencia difiere en alrededor de 11 nucleótidos de la del gen *SMN1*. Como ambas copias son capaces de codificar una proteína SMN funcional, teóricamente *SMN2* podría compensar la pérdida de *SMN1*. Sin embargo, una diferencia crítica de nucleótido, una mutación de C a T en el exón 7 de *SMN2* (Monani, 2000), resulta en un alto porcentaje de exclusión de este exón en sus transcritos. El salteado del exón 7 da lugar a una proteína SMN truncada e inestable, que se degrada rápidamente, incapaz de cumplir con su función. Como resultado, *SMN2* no logra compensar adecuadamente la pérdida de *SMN1*. Aunque se genera aproximadamente un 20% de proteína SMN de longitud completa a partir de *SMN2*, esta cantidad es suficiente para que el embarazo llegue a término y los afectados nazcan, pero su supervivencia sin tratamiento, en el caso de la forma más grave de la enfermedad, se limita a los

primeros meses de vida, a menos que sean asistidos con ventilación mecánica. La gravedad de la enfermedad depende de la cantidad de proteína SMN intacta que se produce (Hua *et al.*, 2007).

1.10 Rol del número de copias de SMN2 en la gravedad de la enfermedad

El número de copias de *SMN2* en el genoma es uno de los factores más importantes que influye en la gravedad de la AME. La variabilidad en el número de copias de *SMN2* está estrechamente relacionada con la severidad del fenotipo clínico, y esta correlación es crucial para clasificar los diferentes tipos de AME. AME tipo 0 es la forma más severa de la enfermedad, caracterizada por una sola copia del gen *SMN2*, la manifestación prenatal de los síntomas, la necesidad de soporte respiratorio desde el nacimiento, y una expectativa de vida, sin tratamiento, menor a 6 meses.

En individuos con AME tipo I, la forma más común de la enfermedad, generalmente se encuentran sólo 2 copias de *SMN2*. Esto resulta en una producción mínima de proteína SMN, síntomas tempranos y potencialmente mortales, y una expectativa de vida, sin tratamiento, menor a 2 años. Los pacientes con AME tipo I no pueden sentarse ni pararse. En los pacientes con AME tipo II, generalmente se observan 3 copias de *SMN2*, lo que da lugar a una manifestación de la enfermedad de gravedad intermedia. Estos pacientes pueden retener algo de función motora y logran sentarse, pero no pueden pararse ni caminar. En este grupo, los síntomas suelen manifestarse entre los 6 y 18 meses de vida, con una longevidad más prolongada en comparación con los pacientes de tipo I, alcanzando una sobrevivencia de 10 a 40 años. Los pacientes con AME tipo III y tipo IV presentan síntomas más leves. En el caso de AME tipo III, suelen tener entre 3 y 4 copias de *SMN2*, lo que les permite mantener una función motora más preservada. En AME tipo IV, los pacientes presentan más de 4 copias de *SMN2*, lo que contribuye a un inicio más tardío de los síntomas y a una mayor expectativa de vida (Butchbach, 2016).

1.11 Terapias dirigidas a SMN2 para promover la inclusión del exón 7 en el mRNA maduro

La importancia de *SMN2* en la compensación de la deficiencia de *SMN1* ha motivado el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a aumentar la inclusión del exón 7 de *SMN2* en el mRNA maduro y la producción de proteína SMN funcional. Una de estas estrategias es el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO), como nusinersen cuyo nombre comercial es Spinraza. Nusinersen, descubierto y desarrollado por el Dr. Adrian Krainer, es el primer fármaco aprobado por la FDA de los EE.UU. para el tratamiento de la AME; el mecanismo se ve ilustrado en Figura I.14. Nusinersen actúa sobre el pre-mRNA de *SMN2*, bloqueando un silenciador intrónico del splicing localizado en el intrón 7 que impide la inclusión del exón 7. Este tratamiento facilita la inclusión de este exón, mejorando la producción de proteína SMN de longitud completa y compensando parcialmente la falta de *SMN1*. Desde 2016,

nusinersen se aplica por inyección intratecal, es decir por punción lumbar en el líquido cefalorraquídeo, con notables mejoras en la sobrevida y parámetros neuromusculares de los pacientes. Hasta el presente más de 14.000 afectados de distintos tipos de AME han sido tratados con nusinersen en todo el mundo.

(https://www.spinraza.com/content/dam/commercial/spinraza/caregiver/en_us/pdf/getting-acquainted-adult-brochure.pdf)

El grado de inclusión del exón 7 de *SMN2* está regulado por dos secuencias blanco de factores de splicing. La primera es un "enhancer" del splicing exónico (ESE) que une el factor de splicing SRSF1 (antiguamente conocido como SF2/ASF) en el exón 7, favoreciendo su inclusión. La segunda es un "silencer" del splicing intrónico (ISS) presente en el intrón 7, que une los factores de splicing negativos hnRNPA1/A2 y favorece la exclusión del exón. La mutación disruptiva C-T del ESE presente en el gen *SMN2* altera el balance de splicing hacia la exclusión del exón 7.

Por otro lado, el ASO Spinraza/nusinersen al aparearse por complementariedad de bases con la secuencia de unión de hnRNPA1/A2, a través de una inhibición estérica, bloquea la unión de este factor negativo de splicing. Esto restaura el balance del evento de splicing de *SMN2*, favoreciendo la inclusión del exón 7. Estos enfoques terapéuticos han mostrado resultados prometedores al restaurar la producción de proteína SMN funcional en los pacientes con AME, mejorando la salud y la calidad de vida de estos pacientes (Hua *et al.*, 2007).

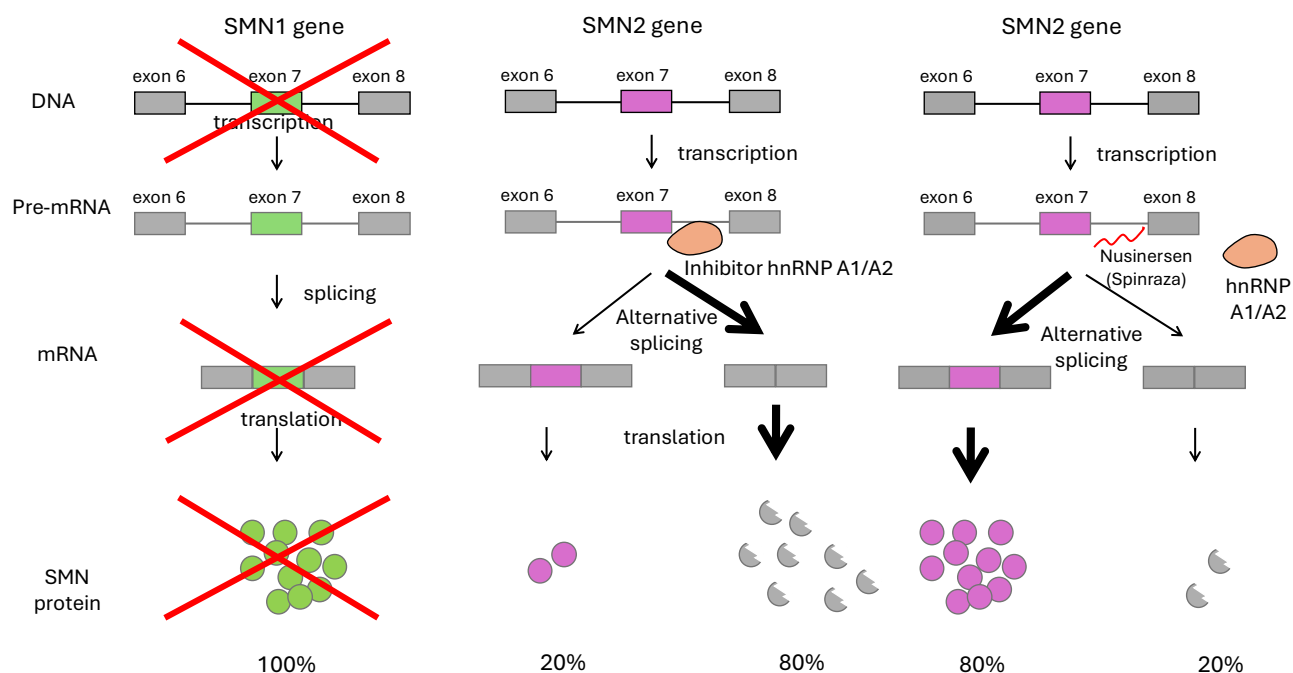


Figura I.14. Representación esquemática del mecanismo de splicing alternativo en la atrofia muscular espinal (AME).

A la izquierda, se muestra un fragmento del gen *SMN1*. Los exones 6 y 8 están representados como rectángulos grises, el exón 7 en verde, y las líneas negras representan los intrones flanqueantes. El mecanismo normal de expresión de este gen consiste en la transcripción de DNA a pre-mRNA (con exones e intrones), el splicing de los intrones (dejando sólo los exones en el mRNA maduro), y la posterior traducción del mRNA a proteína SMN (esferas verdes).

Una X roja representa una pérdida de función causada por una lesión o mutación que impide que el gen *SMN1* se transcriba a pre-mRNA. Como consecuencia, los mecanismos río abajo, como el splicing del pre-mRNA o la traducción del mRNA maduro a proteína SMN, no ocurren.

En el recuadro central, se representa el gen *SMN2*, que es casi idéntico al gen *SMN1*, excepto por mutaciones puntuales en el exón 7 (rectángulo violeta). Estas mutaciones generan un desbalance en el splicing alternativo hacia la exclusión del exón 7 debido a la unión del factor de splicing hnRNP A1/A2 (en naranja) a su sitio blanco en el intrón 7 del pre-mRNA, lo que inhibe la inclusión del exón 7 de *SMN2*. Esto da lugar a que la mayoría (80%) de las proteínas producidas por el gen de *SMN2* carezcan del exón 7, resultando en proteínas truncadas e inestables (esferas grises rotas). Solo el 20% de las proteínas SMN producidas incluyen el exón 7 y son de longitud completa.

A la derecha, se muestra el gen *SMN2* tratado con el ASO Spinraza/nusinersen. Este ASO se une al pre-mRNA en el sitio blanco del factor inhibitorio de splicing hnRNP A1/A2, bloqueando su unión. Esto cambia el balance del splicing alternativo hacia una mayor inclusión del exón 7 en el mRNA, lo que resulta en una mayor cantidad (80%) de proteínas SMN full length y funcionales derivadas del gen *SMN2*.

Otra estrategia aprobada por la FDA en el tratamiento de la atrofia muscular espinal es el fármaco Risdiplam, que, a diferencia del ASO, es una molécula pequeña que promueve la inclusión del exón 7 de *SMN2*, pero cuyo mecanismo no está del todo elucidado. Se sabe que el Risdiplam estabiliza el complejo formado por los snRNP U1 y el sitio 5' de splicing (5'ss) del exón 7 de *SMN2*. Lo que no queda claro es por qué esta molécula es tan específica para el exón 7 de *SMN2*, en comparación con otros exones del genoma humano. Se ha sugerido que la especificidad de Risdiplam en promover la

inclusión del exón 7 de *SMN2* se debe a la unión de la molécula a un segundo sitio blanco de RNA en el exón 7 (Ishigami *et al.*, 2024).

Cabe reflexionar que el tratamiento con nusinersen no es, en términos estrictos, una terapia génica, ya que ni se corrige al gen afectado ni se agrega a las células del paciente copias del gen sano. Es en consecuencia una terapia por oligonucleótidos antisentido correctores del splicing. No obstante, se han desarrollado estrategias terapéuticas claramente identificadas como terapia génica, donde se introduce una copia funcional del gen *SMN1* mediante infección con un adenovirus asociado (AAV), que reemplaza la falta de *SMN1* endógeno lesionado y produce proteína SMN intacta y funcional. Este tipo de terapia, comercializada bajo el nombre de Zolgensma y aprobada por la FDA, utiliza un DNA de cadena simple de *SMN1* introducido a través de un vector viral AAV9. Este vector reemplaza el gen *SMN1* funcional con un DNA episomal que incluye su propio promotor. Zolgensma está aprobado para el tratamiento de todos los tipos de AME en pacientes menores de 2 años. Consiste en una sola inyección intravenosa de efecto sistémico. Sin embargo, está asociada a efectos adversos más graves que las otras terapias descritas y puede causar insuficiencia hepática aguda, respuesta inmunológica sistémica, recuento bajo de plaquetas (trombocitopenia), o microangiopatía trombótica. A diferencia de las terapias con moléculas pequeñas o ASOs, que requieren readministración recurrente, Zolgensma es una terapia permanente. Sin embargo, también es la terapia más cara en el mercado, con un costo de más de 2 millones de dólares por dosis. (<https://www.curesma.org/zolgensma/>)

1.12 Cromatina y regulación transcripcional del splicing del exón 7 de *SMN2*

En los estudios experimentales realizados por Marasco *et al.* (2022) demostramos que la velocidad de elongación de la RNAPII afecta significativamente la inclusión del exón 7 de *SMN2*, y han permitido clasificarlo como un exón de tipo 2, ya que su inclusión depende del tiempo de exposición de la secuencia reguladora a los factores de splicing, particularmente los factores negativos como hnRNP A1/A2. Los experimentos utilizando mutantes de RNAPII lentos mostraron una disminución en la inclusión del exón 7, mientras que los mutantes de RNAPII rápidos favorecieron su inclusión. Estos resultados destacan la importancia de la modulación de la velocidad de elongación de la RNAPII como una estrategia terapéutica potencial para mejorar la inclusión del exón en enfermedades como la atrofia muscular espinal (AME).

En el estudio de Marasco *et al.* (2022) investigamos este mecanismo utilizando una mutante lenta de RNAPII resistente a alfa-amanitina y una RNAPII ‘wild type’ (WT) también resistente a alfa-

amanitina. Mediante el tratamiento de las células con alfa-amanitina para inhibir la RNAPII endógena, el experimento garantizó que sólo se produjeran transcritos generados por la RNAPII transfectada (ya fuera la mutante lenta o la WT). Los resultados mostraron que la mutante lenta de la RNAPII disminuyó la inclusión del exón 7 de *SMN2*, lo que concuerda con la clasificación del exón 7 como exón de tipo 2. Al reanalizar datos de RNA-seq de mutantes de RNAPII rápidas y lentas generados por Fong *et al.* (2014), corroboramos que la mutante lenta de la RNAPII redujo la inclusión del exón 7 de *SMN2*, mientras que la mutante rápida la aumentó.

La capacidad de manipular estos procesos ofrece una vía potencial para terapias dirigidas a enfermedades relacionadas con el splicing alternativo, como la atrofia muscular espinal (AME), donde la regulación precisa del exón 7 de *SMN2* es crucial para la producción de la proteína funcional SMN. Este estudio respaldó el potencial terapéutico de modular la velocidad de la RNAPII para favorecer la inclusión del exón 7 y la producción de proteína SMN, proporcionando una base para combinar la modulación de la cromatina con tratamientos de ASO existentes para lograr una respuesta más efectiva, ilustrado en Figura I.15 (Marasco *et al.*, 2022).

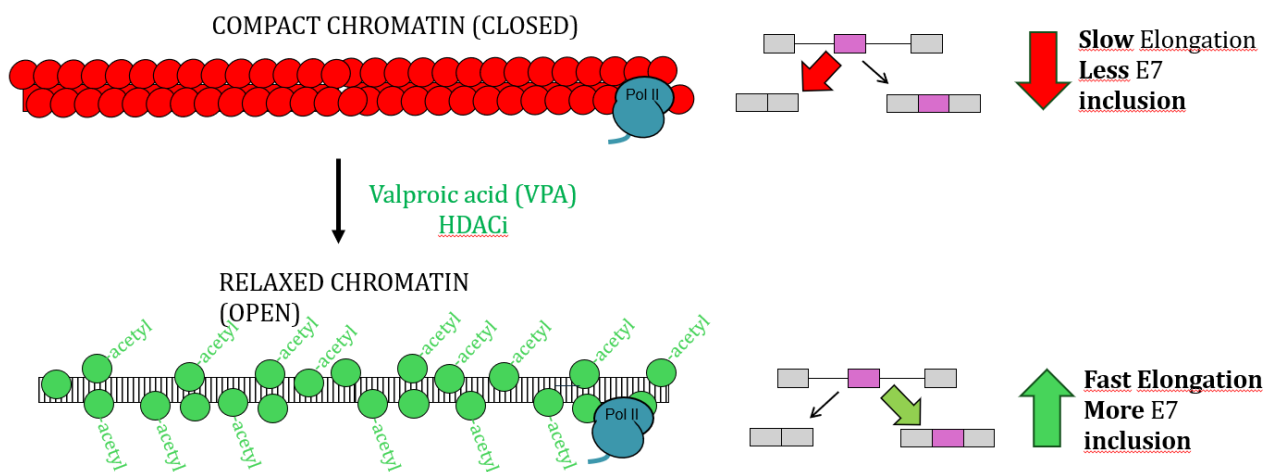


Figura I.15. Representación esquemática de la influencia del estado de la cromatina en la velocidad de elongación de la RNA polimerasa II y su efecto en la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

Racional del uso de inhibidores de HDAC, como el ácido valproico (VPA), para abrir la cromatina, aumentar las tasas de elongación de la RNA pol II y favorecer la inclusión del exón 7 de *SMN2* (E7).

En el recuadro superior, se observa una cromatina compacta (esferas rojas) con la RNA polimerasa II (RNAPII) representada en azul, transcribiendo lentamente. A la derecha, un fragmento del pre-mRNA del gen *SMN2* muestra el exón 7 (rectángulo violeta), los exones flanqueantes (rectángulos grises) y los intrones (líneas negras). La flecha roja indica que, en este caso, la transcripción lenta de la RNAPII favorece la exclusión del exón alternativo E7 (violeta).

En el recuadro inferior, el tratamiento con inhibidores de HDAC (HDACi) como el ácido valproico (VPA) resulta en una cromatina más laxa, con una conformación abierta. Aquí, las histonas acetiladas se representan como esferas verdes, y el DNA (líneas negras) está más expuesto. La RNAPII (en azul) transcribe a una velocidad mayor, lo que favorece la inclusión del exón alternativo E7 (violeta), como se indica con una flecha verde.

1.13 Justificación para la terapia combinada del ASO nusinersen y modulación de la cromatina

La combinación de terapias con oligonucleótidos antisentido (ASOs), como nusinersen, y la modulación de la cromatina ha emergido como una estrategia prometedora para mejorar la inclusión del exón 7 de *SMN2*, una alteración clave en la atrofia muscular espinal (AME). Como se mencionó, nusinersen se une al intrón 7 de *SMN2*, bloqueando la unión de los factores de splicing inhibidores hnRNPA1/A2 y promoviendo la inclusión del exón 7. Sin embargo, los ASOs pueden tener efectos secundarios en la cromatina que interfieren con este proceso. Como demostramos en el estudio de Marasco *et al.* (2022), el ASO1 induce marcas de histonas represivas, como H3K9me2, que promueven un estado de cromatina compacta. Esto resulta en un obstáculo transcripcional que enlentece la elongación de la RNAPII, contrarrestando parcialmente los efectos beneficiosos de nusinersen.

Este descubrimiento subrayó la importancia de la elongación de la RNAPII en el splicing alternativo del exón 7 de *SMN2*. Dado que el exón 7 de *SMN2* es un exón tipo 2, una elongación rápida de la RNAPII favorece la inclusión de este exón, mientras que la elongación lenta facilita su salteado. Las modificaciones cromatínicas que afectan la velocidad de elongación de la RNAPII, como las mediadas por marcas represivas de histonas, pueden, por lo tanto, interferir con el equilibrio de splicing de este exón.

Sobre la base de estos resultados propusimos una terapia combinada ilustrada en Figura I.16, que incorporaba inhibidores de histona desacetilasa (HDACis) como el ácido valproico (VPA) junto con los ASOs. Los HDACis promueven la acetilación de histonas, lo cual abre la cromatina y facilita la elongación de la RNAPII. Al combinar el tratamiento con ASOs y HDACis, demostramos que se elimina el estado represivo de cromatina inducido por los ASOs, permitiendo que la RNAPII avanzara de manera más eficiente a través del exón 7 de *SMN2*. Esta combinación no sólo mejoró la inclusión del exón 7, sino que también aumentó la producción de proteína SMN funcional (Marasco *et al.*, 2022).

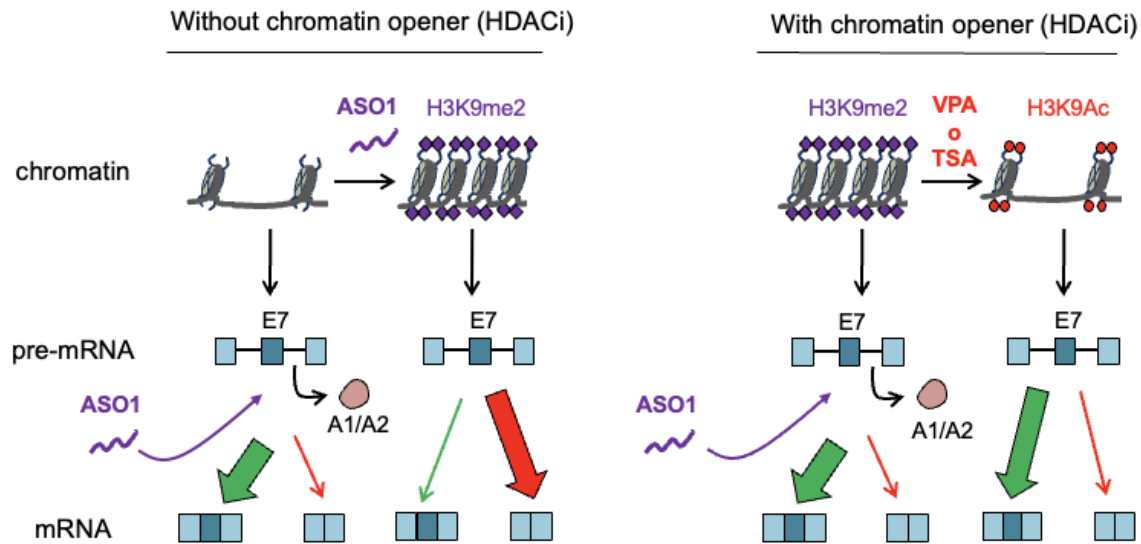


Figura I.16. Representación esquemática del estado de la cromatina tras el tratamiento con ASO1 y con inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi).

Se ilustra el efecto del tratamiento con ASO1 (nusinersen) sin y con HDACi sobre la cromatina y la inclusión del exón 7 de SMN2 (E7), como se describe en Marasco et al. (2022).

En ausencia de HDACi (izquierda), ASO1 tiene dos acciones: a nivel del pre-mRNA desplaza a los factores negativos del splicing hnRNP A1/1 promoviendo la inclusión del exón 7 (flecha verde), mientras que a nivel de la cromatina promueve la metilación de la histona H3 en su lisina 9, lo cual contribuye a inhibir la inclusión del exón 7 por generar un bloqueo a la RNA polimerasa II (flecha roja). En presencia de HDACi como VPA o TSA (derecha), el efecto sobre el pre-mRNA persiste pero la apertura de la cromatina causada por mayor acetilación de histonas libera el bloqueo y una mayor elongación contribuye a mayor inclusión del exón 7 (dos flechas verdes frente a una verde y una roja en la situación de la izquierda).

La potenciación del efecto de nusinersen fue observada tanto en cultivos celulares como en modelos murinos de AME. En los experimentos con ratones, se observó una mayor supervivencia en los animales tratados con ASO1 y HDACi juntos, en comparación con ambos tratamientos por separado, lo que los asemeja más a un ratón *wild type* que carece de la enfermedad. Ensayos de ganancia de peso y pruebas neuromusculares también demostraron una eficacia superior con el tratamiento combinado, en comparación con los tratamientos individuales. Es importante recalcar que, en el caso de los ratones tratados sólo con HDACi, estos murieron a los 7 días de haber nacido, al igual que los ratones tratados con solución salina (control negativo), ya que este tratamiento por sí solo no es suficiente para mejorar la enfermedad. Sin embargo, con una sola administración combinada de ASO1 y HDACi, la mejoría en los animales fue muy evidente en comparación con los tratamientos individuales (Marasco et. al, 2022).

La combinación de ASOs con moduladores cromatínicos ofrece una vía prometedora para superar los obstáculos inducidos por los efectos cromatínicos adversos y potenciar la terapia dirigida al exón 7 de *SMN2*. Este enfoque integrador subraya la importancia de la dinámica de la cromatina y cómo esta puede influir en el splicing alternativo, abriendo nuevas oportunidades para tratamientos de enfermedades relacionadas con la regulación transcripcional.

2.1 CRISPR-Cas9 y sus aplicaciones en la regulación génica

El sistema CRISPR-Cas9, inicialmente descubierto como un mecanismo inmunológico adaptativo en bacterias, ha evolucionado hasta convertirse en una herramienta poderosa para la edición génica. Esta tecnología permite modificaciones precisas en las secuencias de DNA, facilitando el estudio y el tratamiento potencial de diversas enfermedades genéticas. Este sistema consta de dos componentes: una endonucleasa llamada Cas9, por CRISPR-associated-protein, que corta la doble hélice de DNA y una RNA guía (gRNA) que contiene: un segmento de 20 nucleótidos que se unen por complementariedad al sitio blanco de DNA y una estructura secundaria que une específicamente a la Cas9. Una vez que el gRNA se aparea con el sitio blanco de DNA, la Cas9 es reclutada donde genera un corte de la doble cadena de DNA, Figura I.17. (Anders *et al.*, 2014).

2.2 Descubrimiento y evolución de CRISPR-Cas9

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) fueron identificadas por primera vez en el genoma de *Escherichia coli* en 1987 por el investigador japonés Yoshizumi Ishino. Inicialmente, su función era desconocida. El descubrimiento funcional de CRISPR se atribuye al investigador español Francisco Martínez Mojica, de la Universidad de Alicante, quien encontró estructuras similares en el genoma de la arquea *Haloferax mediterranei*. La presencia de estas estructuras en dos dominios evolutivamente distantes sugirió la importancia funcional de los elementos CRISPR.

Mojica observó similitudes entre los elementos descritos en arqueas y las repeticiones de DNA en genomas bacterianos, siendo uno de los primeros en hipotetizar que estos loci incluían fragmentos de DNA foráneo y que eran parte de un sistema inmune en bacterias y arqueas. En 2003, Mojica descubrió que las bacterias contenían fragmentos del genoma de virus que las hacían resistentes a infecciones. Estas secuencias, caracterizadas por ser palindrómicas, repetidas y espaciadas regularmente, fueron interpretadas como un sistema de defensa de los organismos procariotas frente a infecciones virales.

Inicialmente, se asumió que estos sistemas funcionaban mediante un mecanismo de RNA de interferencia. Sin embargo, Marraffini y Sontheimer demostraron que el blanco de la respuesta inmunológica procariota era el DNA foráneo y no el mRNA. En 2005, se confirmó que las secuencias CRISPR formaban parte de un sistema inmunológico adaptativo en bacterias y arqueas, donde almacenan segmentos de DNA viral para reconocer y defenderse contra futuros ataques virales.

Estos descubrimientos sentaron las bases para el desarrollo de CRISPR-Cas9 como una herramienta de edición génica, ilustrado en Figura I.17. En 2012, las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna desarrollaron un método revolucionario que utilizaba el sistema CRISPR-Cas9 para cortar el DNA en sitios específicos, permitiendo ediciones precisas, dando lugar al término “tijeras genéticas”. Estos hallazgos fueron seguidos por el laboratorio de Feng Zhang que publicó el primer protocolo completo que describía como utilizar esta herramienta de principio a fin para la modificación génica en células en cultivo (Ran *et al.*, 2013). Estos avances abrieron nuevas fronteras en la biotecnología y la medicina, llevando a la rápida adopción de CRISPR como una poderosa herramienta de edición génica. Por este logro, Charpentier y Doudna recibieron el Premio Nobel de Química en 2020. (Gostimskaya, 2022; Jinek *et al.*, *Science* 2012).

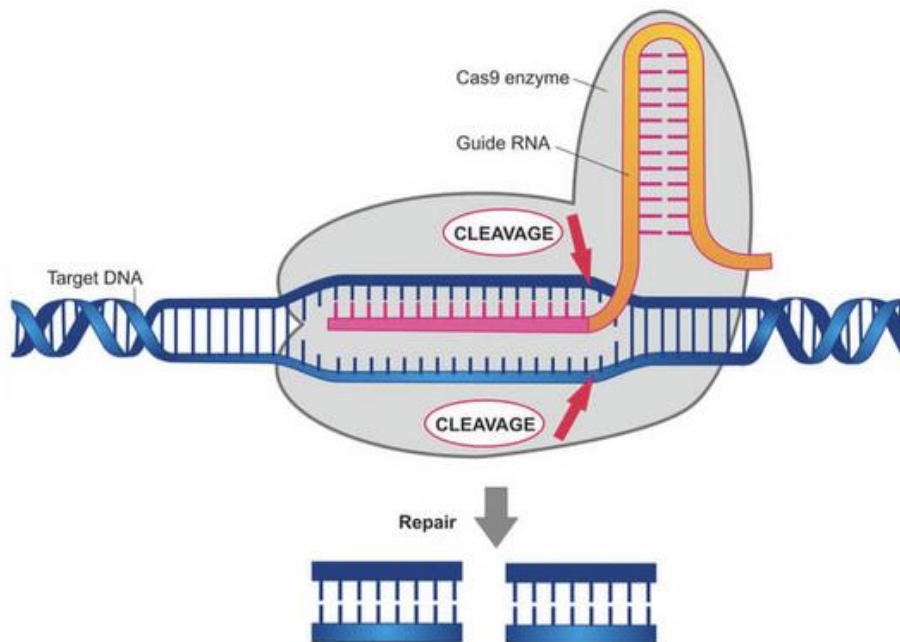


Figura I.17. Representación esquemática del sistema CRISPR-Cas9 y su mecanismo de acción.

El sistema CRISPR-Cas9 utiliza la nucleasa Cas9, dirigida por un RNA guía (gRNA), para localizar y realizar un corte en la doble hélice de DNA mediante complementariedad de bases. En la figura de arriba, la endonucleasa Cas9 se representa en gris y el DNA de doble cadena en azul.

El sistema CRISPR-Cas9 funciona con RNAs guía (gRNA). La porción de la guía que se aparea con la secuencia del sitio blanco del DNA genómico por complementariedad de bases está representada en rosa. La porción de la guía que reconoce y se une a la proteína Cas9, en naranja. Esto permite que la nucleasa Cas9 se cargue en la región blanco y genere un corte en la doble cadena del DNA justo antes de la secuencia de 3 nucleótidos conocida como PAM. figura disponible en: <https://www.novohelix.com/molecular%20biology/crispr-tools>

2.3 Impacto de las herramientas CRISPR en la medicina

El advenimiento de las tecnologías basadas en CRISPR ha revolucionado el potencial de la terapia génica. En particular, la FDA aprobó en diciembre de 2023 la primera terapia basada en CRISPR, denominada Casgevy, para el tratamiento de la anemia falciforme.

La anemia falciforme es una enfermedad autosómica recesiva causada por una mutación puntual en el gen que codifica la hemoglobina (*HBB*), lo que resulta en la malformación de los glóbulos rojos y limita la capacidad de transporte de oxígeno a los tejidos del cuerpo. Casgevy es una terapia génica que utiliza CRISPR/Cas9 para modificar ex vivo las células madre hematopoyéticas de los pacientes. Esta modificación se realiza en el gen *BCL11A*, un factor de transcripción que reprime la expresión de la gamma-globina (γ -globina) y la hemoglobina fetal (*HbF*) en las células eritroides.

Una vez modificadas, las células son trasplantadas de vuelta en el paciente, donde se integran en la médula ósea y aumentan la producción de hemoglobina fetal (*HbF*). Esto mejora el transporte de

oxígeno y previene la formación de glóbulos rojos anómalos en forma de hoz ("sickling"). En particular, Casgevy requiere edición génica *ex vivo* mediante la introducción de ribonucleoproteínas CRISPR/Cas9 a través de electroporación, donde llevado por RNA guías (gRNAs) a su sitio blanco, elimina la expresión de *BCL11A* en las células del linaje eritroide y aumenta los niveles de *HbF*.

Este hito destaca la creciente promesa de las tecnologías CRISPR para tratar enfermedades genéticas y subraya su impacto transformador en la medicina. El sistema CRISPR-Cas9 ha permitido modificaciones génicas precisas en organismos modelo, facilitando avances en la investigación y el desarrollo de estrategias terapéuticas. Estos descubrimientos acercan al campo de la medicina personalizada con el potencial de corregir defectos genéticos (Gostimskaya, 2022) (Fuente: <https://www.casgevyhcp.com/sickle-cell-disease/mechanism-of-action>)

2.4 Transición hacia la regulación génica basada en dCas9

Además, las aplicaciones de CRISPR se están expandiendo más allá de la edición tradicional del genoma, con sistemas como CRISPRa (activación) y CRISPRi (interferencia), que permiten la modulación de la expresión génica a nivel transcripcional. Para ampliar sus aplicaciones más allá de la edición génica, la proteína Cas9 fue modificada mediante mutagénesis a una forma catalíticamente inactiva, conocida como Cas9 "muerta", es decir impedida de cortar al DNA (dCas9, por *dead Cas9*). Mientras que dCas9 conserva su capacidad de unión al DNA, carece de actividad endonucleasa, lo que la hace adecuada para la regulación génica sin inducir mutaciones en el sitio blanco. Este avance permite reutilizar el sistema CRISPR-Cas9 para ejercer un control preciso sobre la expresión génica. Si bien los efectos *off-target* de la Cas9 son una preocupación importante en terapias basadas en CRISPR debido al riesgo de generar cortes de doble cadena que frecuentemente pueden generar translocaciones cromosómicas, la dCas9 tiene la ventaja de no inducir dichos cortes. Además, los estudios han demostrado que la dCas9 no produce efectos *off-target* significativos sobre la transcripción en todo el genoma (*genome-wide*), lo que la convierte en una herramienta más segura para aplicaciones terapéuticas (Chavez *et al.*, 2023).

2.5 Activación CRISPR (CRISPRa) e interferencia CRISPR (CRISPRi)

Al fusionar dCas9 con activadores o represores transcripcionales, se desarrollaron los sistemas CRISPRa y CRISPRi, ilustrados en Figura I.18, para modular la expresión génica. CRISPRa implica el reclutamiento de activadores para aumentar la expresión génica, mientras que CRISPRi emplea

dominios represivos para reducir la expresión de genes blanco. Estos sistemas fueron originalmente descritos por Larson et al. (2013), Qi et al. (2013) y Gilbert et al. (2013).

En el trabajo de Himeda *et al.* (2015), se utilizó un sistema CRISPR-dCas9 fusionado al transactivador VP64 o al represor KRAB para modular el estado cromatínico de una región de microsatélites, el arreglo repetitivo D4Z4 en el cromosoma 4q35. La desregulación epigenética de esta región está relacionada con patologías musculares como la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD). Mediante estas herramientas de CRISPRa y CRISPRi, lograron modular el estado epigenético de manera específica, demostrando el potencial terapéutico del uso de CRISPR-dCas9 en la corrección de la desregulación epigenética asociada a FSHD (Himeda *et al.*, 2016).

Por otro lado, en el trabajo de Stepper *et al.* (2016), se utilizó una dCas9 fusionada a la DNA-metiltransferasa DNMT3a-DNMT3L junto con guías de RNA específicas para dirigir la metilación del DNA de manera precisa y modular la expresión génica sin alterar la secuencia de DNA. Usando esta dCas9-DNMT3a-DNMT3L dirigida a los promotores de los genes *EpCAM*, *CXCR4* y *TFRC*, lograron el silenciamiento epigenético de estos genes y destacaron el potencial terapéutico de esta herramienta de CRISPRi para corregir epimutaciones en estados patológicos (Stepper *et al.*, 2017).

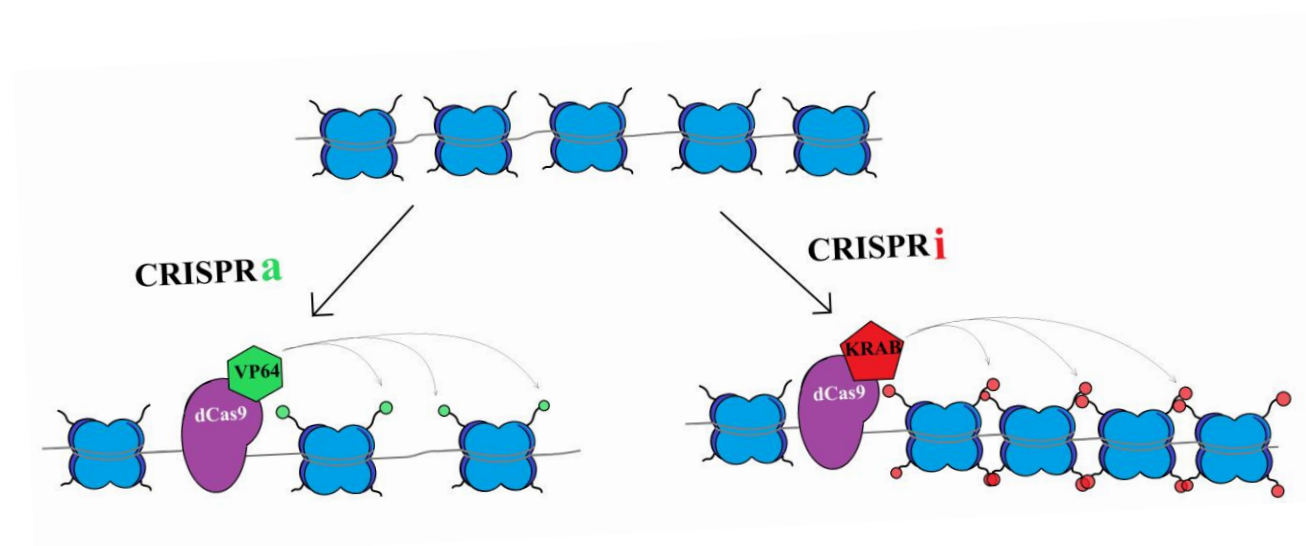


Figura I.18. Modulación transcripcional utilizando CRISPRa y CRISPRi.

En azul, las histonas envueltas en DNA (líneas grises) y las colas de histonas representadas como líneas curvas negras. Izquierda: Representación esquemática de la modulación epigenética utilizando CRISPRa. En violeta, la endonucleasa Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9) está fusionada al dominio transactivador VP64 (hexágono verde), lo que resulta en la deposición (flechas grises) de marcas activadoras de cromatina, como H3K27ac (esferas verdes). Estas marcas están asociadas con la activación de la expresión génica.

Derecha: CRISPRi, donde la dCas9 está fusionada al dominio KRAB, que deposita marcas represivas de cromatina, como H3K9me3 (esferas rojas), relacionadas con la represión de la expresión génica.

2.6 Justificación del uso de la tecnología CRISPRa para mejorar la terapia combinada con inhibidores de HDACs y tratamiento con ASOs

El potencial de utilizar tecnologías basadas en CRISPR para mejorar la terapia combinada previamente descrita de inhibidores de HDAC (HDACis) y tratamiento con ASO1, como lo describe Marasco *et al.* (2022), radica en la capacidad de CRISPRa para modular con precisión el estado cromatínico y, de este modo, influir en los eventos de splicing. Los inhibidores de HDAC, como el ácido valproico (VPA), abren la cromatina de manera global y promueven la inclusión del exón 7 de *SMN2*, lo que puede causar efectos pleiotrópicos sobre la expresión génica en todo el genoma. En contraste, CRISPRa ofrece un enfoque dirigido para modular localmente la estructura de la cromatina en regiones específicas involucradas en la regulación del splicing.

Como se ilustra en la Figura I.19, la estrategia desarrollada en la presente tesis se basa en el uso de CRISPRa para colaborar con el ASO en la promoción de la inclusión del exón 7 de *SMN2* en el mRNA maduro, dirigiéndose específicamente a secuencias intrónicas cercanas a dicho exón, al propio exón 7 y al promotor del gen. Se empleará el uso de una proteína de fusión dCas9-VP64. VP64 es un fuerte activador transcripcional sintético compuesto por cuatro copias del factor de transcripción VP16 del virus herpes simplex. VP64 recluta varios activadores transcripcionales endógenos y entre ellos a la acetil transferasa de histonas p300 endógena.

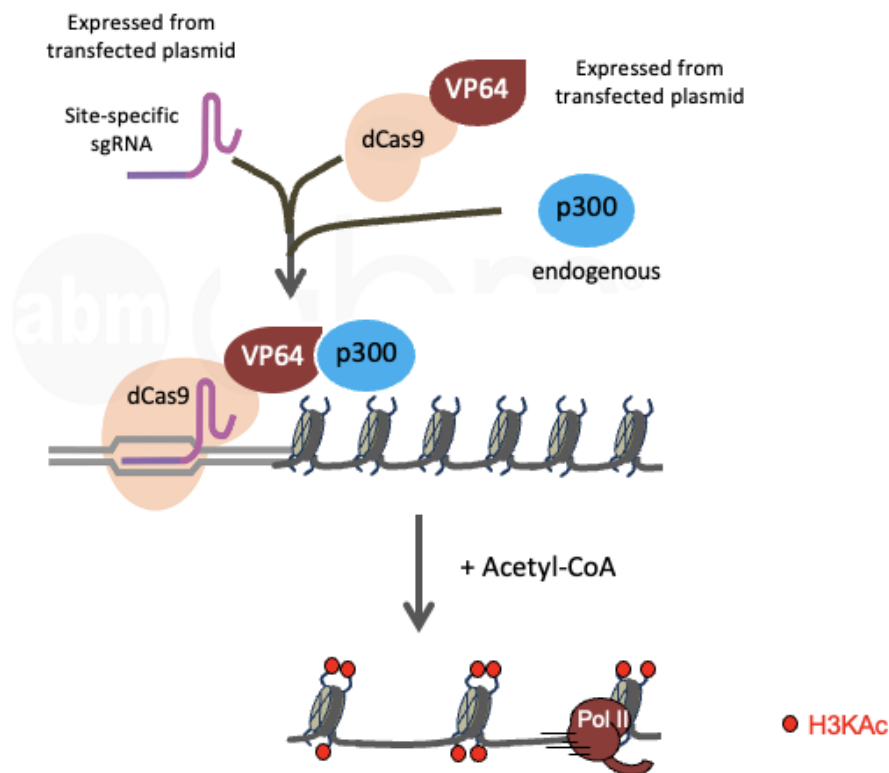


Figura I.19. Estrategia utilizada en esta tesis para promover acetilación de histonas dirigida específicamente a la región del gen SMN2.

Esquema del enfoque de modulación dirigida de la cromatina en el gen SMN2 para mejorar la inclusión del exón 7 (E7) en combinación con ASO, utilizando el sistema CRISPR-dCas9-VP64. La nucleasa catalíticamente inactiva dCas9 es dirigida al sitio blanco mediante sgRNAs y, al estar fusionada con VP64, recluta factores como p300 para promover la acetilación de la cromatina en la región de interés.

En la ilustración, el sgRNA se representa como una línea fucsia ondulada con secuencia complementaria a la hebra de DNA en violeta. La dCas9 aparece en rosa y el dominio transactivador VP64 en marrón. La acetiltransferasa p300 endógena se representa como una esfera azul.

El recuadro central muestra la dCas9-VP64 unida al DNA formando un bucle, donde el sgRNA guía la unión al sitio blanco, facilitando el reclutamiento de p300. En gris se representan las histonas y el DNA.

El recuadro inferior ilustra la acetilación de histonas (H3Kac), representadas como esferas rojas, tras el reclutamiento de p300 por dCas9-VP64. Este proceso genera un estado cromatínico más abierto, favoreciendo una mayor velocidad de elongación de la RNA polimerasa II (RNAPII), representada en marrón.

CRISPRa permite modular las modificaciones cromatínicas de manera específica, aumentando la eficacia del evento de splicing sin afectar otras regiones del genoma. Esto resalta el potencial terapéutico del uso de herramientas de CRISPR/dCas9 en el mejoramiento de tratamientos para enfermedades genéticas, destacando la importancia del estado cromatínico y la modulación epigenética en la patogénesis y tratamiento de estas enfermedades.

Además, se profundiza en los componentes involucrados en la deposición de las marcas cromatínicas depositadas por el tratamiento con ASOs, los cuales pueden ser utilizados como posibles blancos

terapéuticos para mejorar los tratamientos actuales. Esto también sirve como prueba de principio para desarrollar nuevas metodologías en potenciales tratamientos para enfermedades genéticas donde tanto el estado cromatínico como los mecanismos del tratamiento puedan ser aprovechados.

La mayoría de los estudios realizados con herramientas de CRISPRa o CRISPRi han dirigido la dCas9 fusionada a activadores o inhibidores hacia los promotores de genes para activar o reprimir la transcripción. En este trabajo, el enfoque es diferente: el objetivo es dirigir la dCas9-VP64 a regiones intergénicas, alejadas de las zonas promotoras, para modificar el estado cromatínico y regular eventos de splicing alternativos. Este enfoque, que ha sido poco investigado, apoya y amplía el uso de estas herramientas para aplicaciones menos estudiadas, abriendo nuevas posibilidades en el ámbito de la modulación epigenética y la terapia génica

Objetivos

Generales

Los objetivos generales de este trabajo comienzan con profundizar la comprensión de la interacción entre el estado de la cromatina y el splicing alternativo, con un enfoque particular en la atrofia muscular espinal (AME) y el evento de splicing alternativo del exón 7 del gen *SMN2*, que se utilizará como modelo de estudio. Este proyecto se basa en los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, orientados a entender mejor los efectos cromatínicos asociados con las terapias basadas en oligonucleótidos antisentido y su impacto en la estructura de la cromatina.

Se implementará una estrategia innovadora de modificación dirigida de la cromatina con el propósito de mejorar las estrategias combinatorias previamente descritas en Marasco *et al.* (2022) para el tratamiento de la AME, empleando la tecnología de CRISPR-dCas9 como herramienta específica para la modulación del estado cromatínico y la optimización del tratamiento actual con ASOs. Se evaluará la especificidad de las estrategias nuevas y anteriores, aprovechando esta tecnología de CRISPR para modular el estado cromatínico dentro de un gen, con especial enfoque en la modulación de eventos de splicing. A través de esta investigación, se espera proponer nuevas estrategias con potencial terapéutico en la modulación epigenética mediante tratamientos dirigidos.

Específicos

- **Evaluación de los efectos de diferentes ASOs Spinraza/nusinersen sobre el evento de splicing del Exón 7 de *SMN2*:** Comparar la potencia y eficacia de distintos oligonucleótidos antisentido (ASOs) en aumentar la inclusión del exón 7 del gen endógeno *SMN2* en su RNA mensajero maduro en células humanas en cultivo.
- **Investigación sobre el efecto de metiltransferasas de histonas sobre el evento de splicing del E7 de *SMN2*:** Se usarán células G9a KO, deficientes en la metiltransferasa de histonas EHMT2, asociada a un estado de cromatina represivo. Se evaluarán los niveles globales y específicos de marcas de metilación de histonas para investigar su relación con el evento de splicing alternativo del exón 7 del gen *SMN2* y su interacción con el tratamiento con oligonucleótidos antisentido (ASOs).
- **Investigación de otras metiltransferasas y factores de mantenimiento de estados cromatínicos sobre el splicing de *SMN2* E7:** Se explorará el papel de otras metiltransferasas y factores

involucrados en la deposición de marcas de histonas globales y el mantenimiento de estados cromatínicos, para evaluar su relevancia en el evento de splicing del *SMN2*.

- **Exploración de una posible interacción entre el tratamiento con ASOs y el DNA:** se investigará si la deposición de marcas cromatínicas por el tratamiento con el ASO podría ser debido a la interacción del ASO no sólo con el RNA, sino también el DNA; utilizando oligonucleótidos sintéticos que no pegan el RNA para investigar sus efectos sobre la deposición de marcas cromatínicas y el evento de splicing en cuestión.
- **Evaluación del efecto de inhibidores de HDACs (HDACi):** Se analizarán los efectos de drogas pleiotrópicas, como los inhibidores de desacetilasas de histonas, sobre la estructura de la cromatina, la transcripción y su papel en la modulación del evento de splicing asociado a la AME.
- **Uso y evaluación de CRISPR-dCas9 para la modulación de la cromatina:** Se implementarán herramientas innovadoras de CRISPR-dCas9 para modificar el estado cromatínico. A diferencia de su uso convencional en la activación transcripcional (CRISPRa), se enfocarán en regiones intergénicas para modular el splicing alternativo mediante la modificación dirigida de la cromatina. Se evaluará la efectividad y la especificidad de esta estrategia, aprovechando los sistemas endógenos de remodelación de la cromatina con fines terapéuticos y validando su impacto en la modulación del evento de splicing del exón 7 del gen *SMN2*.
- **Análisis de los efectos transcripcionales de la terapia con dCas9-VP64:** Se estudiarán los efectos sobre la transcripción derivados de los diferentes tratamientos aplicados y cómo estos correlacionan con el evento de splicing alternativo que se busca modular, especialmente en el contexto del uso de CRISPR-dCas9.
- **Exploración de posibles interacciones cromosómicas entre regiones 5' y 3' del gen SMN2:** Se investigará si la región promotora (5') del gen *SMN2* interactúa con regiones distantes (3') del mismo para explicar los efectos cromatínicos y transcripcionales que se observaron en trabajos previos en el direccionamiento de los ASOs a su sitio blanco, los cuales también inciden sobre la región promotora.

Resultados

El trabajo presentado en esta tesis se construye sobre décadas de evidencias generadas en nuestro laboratorio acerca de la relación entre el estado de la cromatina, la elongación de la RNAPII y el proceso de splicing alternativo. Asimismo, se fundamenta en la manipulación de conceptos de ciencia básica acumulados para mejorar estrategias terapéuticas que modulan el splicing alternativo (de la Mata *et al.*, 2003; de la Mata *et al.*, 2006; Kadener *et al.*, 2001; Kadener *et al.*, 2002; Schor *et al.*, 2009; Schor *et al.*, 2013; Alló *et al.*, 2009; Alló *et al.*, 2013; Marasco *et al.*, 2022).

En este trabajo, profundizamos en estos conceptos, elucidando componentes clave involucrados en los mecanismos estudiados y empleando nuevas estrategias para corroborar descubrimientos previos en el campo. Asimismo, exploramos cómo el desarrollo de herramientas innovadoras, combinado con un mayor conocimiento de la ciencia básica, puede ofrecer nuevas estrategias para la modulación epigenética con potencial terapéutico.

Nuestra hipótesis se basa en los resultados de Marasco *et al.* (2022), donde demostramos el potencial del tratamiento combinado de AME con oligonucleótidos antisentido (ASO) y HDACi. En este trabajo, utilizamos estrategias específicas, como la dCas9 fusionada al transactivador VP64, para revertir los efectos cromatínicos del tratamiento con ASO1 descritos por Marasco *et al.* (2022) y potenciar el efecto terapéutico del ASO Spinraza/nusinersen.

Esta acumulación de investigaciones, incluido el presente trabajo, evidencia la importancia de la ciencia básica y cómo, a lo largo del tiempo, conduce a descubrimientos con aplicaciones terapéuticas concretas.

Capítulo 1

1. Comparación de la potencia y eficacia de distintos oligonucleótidos antisentido (ASOs) en aumentar la inclusión del exón 7 del gen endógeno *SMN2* en su RNA mensajero maduro en células humanas en cultivo.

Nuestro modelo de estudio es el evento de splicing alternativo que ocurre en el exón 7 de *SMN2* y su respuesta al tratamiento con oligonucleótidos antisentido (ASOs). En un primer instante, el ASO comercial para el tratamiento de la atrofia muscular espinal, conocido como Spinraza/nusinersen, es un oligonucleótido de cadena simple modificado, compuesto por 18 nucleótidos con modificaciones 2'-MOE. Estas modificaciones estabilizan el oligonucleótido, previniendo su degradación por endonucleasas endógenas y aumentando su afinidad por los ácidos nucleicos, lo que permite su correcto apareamiento con el pre-mRNA de *SMN2* y favorece la inclusión del exón alternativo (E7).

En trabajos previos (Marasco *et al.*, 2022), se utilizó un ASO de 20 nucleótidos, denominado ASO1, idéntico a nusinersen pero con 2 bases adicionales de complementariedad, debido a restricciones de patentes con el ASO comercial. En este trabajo, investigamos si el efecto del ASO1 y el de nusinersen son equivalentes en células en cultivo. Además, incluimos en el análisis un ASO genérico tipo nusinersen, producido por una compañía farmacéutica nacional cuya identidad permanece anónima, y un ASO *scramble*, que contiene los mismos nucleótidos que ASO1 pero con una secuencia desordenada (*scrambled*), lo que impide que tenga un sitio blanco en el genoma humano, actuando como control negativo.

Adicionalmente, investigamos los efectos descritos por Marasco *et al.* (2022) para ASO1 y ASO2. El ASO2 (Figura R.1) es un oligonucleótido cuyo sitio blanco se encuentra en el intrón 7, pero río abajo del sitio blanco de hnRNP A1/A2 (el blanco de ASO1). Aunque ASO2 no tiene un efecto directo a nivel de RNA que favorezca la inclusión del exón alternativo, demostramos que ejerce un efecto represivo sobre el estado de la cromatina, inhibiendo la inclusión del exón alternativo de *SMN2* (E7). En conjunto, investigamos los niveles de inclusión del exón alternativo E7 de *SMN2* tras el tratamiento con estos oligonucleótidos modificados, comparándolos con células no tratadas para evaluar los efectos específicos de todos los ASOs sintéticos en cuestión en la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

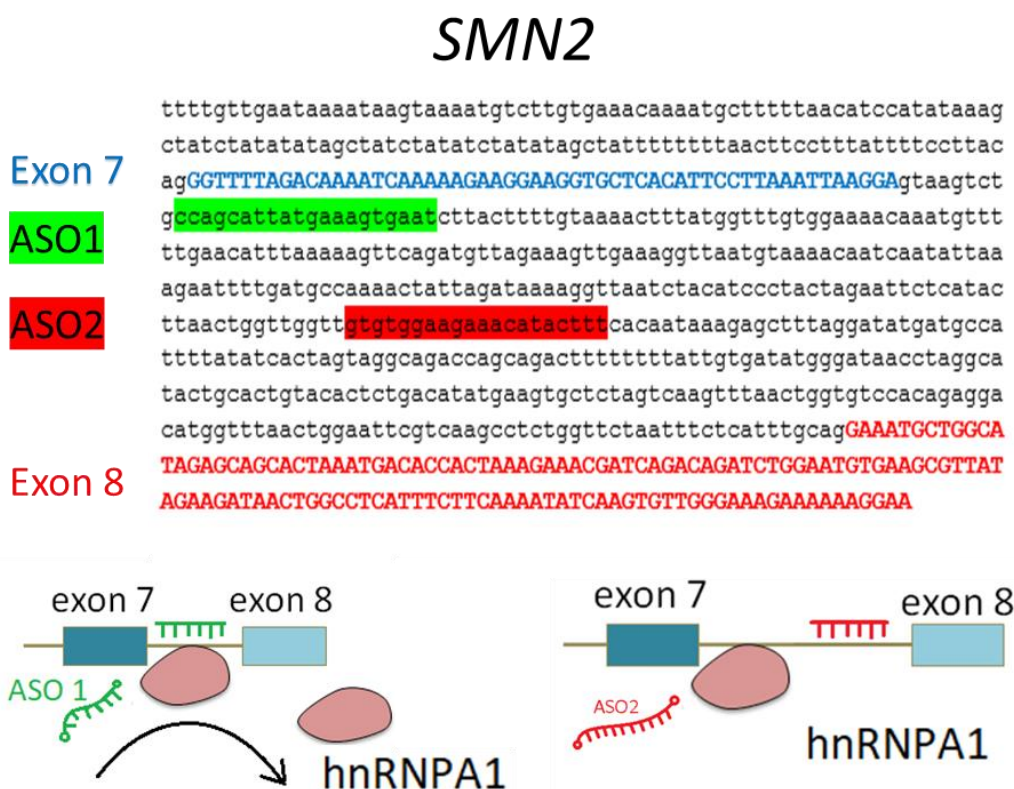


Figura R.1. Representación de los sitios blancos de ASO1 y ASO2 y sus mecanismos de acción.

En el recuadro superior se muestra un fragmento de la secuencia genómica del gen *SMN2*, desde parte del intrón 6 hasta el exón 8. Los nucleótidos correspondientes a secuencias intrónicas se presentan en minúscula, mientras que los de secuencias exónicas están en mayúscula. La secuencia del exón 7 se muestra en azul y la del exón 8 en rojo. En verde se resalta la secuencia blanco de ASO1 dentro del intrón 7, la cual se superpone al sitio blanco del factor represivo de splicing hnRNP A1/A2. Río abajo, en rojo, se resalta la secuencia blanco de ASO2, ubicada cerca del sitio blanco de ASO1, pero sin superposición con el sitio de unión del factor hnRNP A1/A2.

En el recuadro inferior se presenta una representación esquemática de la interacción entre los ASOs previamente descritos y el factor de hnRNP A1/A2. Los exones se ilustran como cajas azules y los intrones como líneas que los conectan. ASO1 se representa como una línea verde con barras, ASO2 en rojo y el factor hnRNP A1/A2 en rosa.

A la izquierda, ASO1 (en verde) compete con hnRNP A1/A2 por la unión a su sitio blanco debido a que se superponen las secuencias, lo que favorece la inclusión del exón 7. A la derecha, el ASO2 (en rojo) no solapa con el sitio blanco de hnRNP A1/A2, por lo que no impide la unión del factor represivo y, en consecuencia, no promueve la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

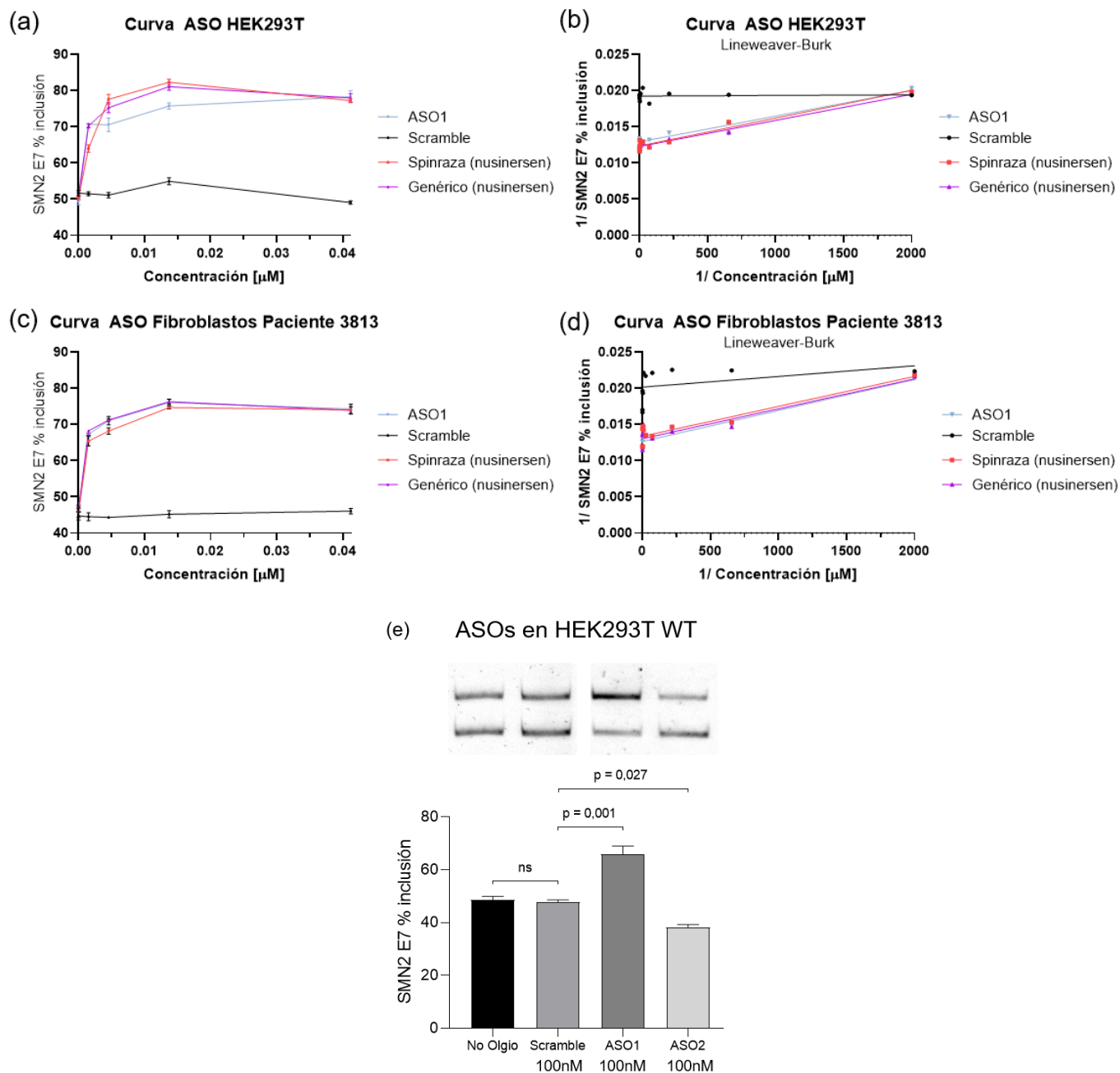


Figura R.2. Eficacia de los diferentes ASOs en la inclusión del exón 7 de SMN2.

(a) Fragmento de la cuantificación de las RT-PCR de punto final obtenidas de la curva de concentración de ASOs (hasta 40 nM) en la línea celular HEK293T WT. El porcentaje de inclusión del exón 7 de SMN2 se muestra en el eje y, mientras que las concentraciones de los oligonucleótidos investigados se presentan en el eje x. Los oligonucleótidos comparados incluyen: el ASO comercial nusinersen/Spinraza (líneas rojas), el ASO scramble (líneas grises) como control negativo, un ASO genérico (líneas violetas) con la misma secuencia que Spinraza, y ASO1 (líneas azules). N = 3 réplicas biológicas. Barras de error = error estándar.

(b) Gráfico de Lineweaver-Burk de la curva de concentración completa (hasta 10 μM de ASO) para las línea celular HEK293T WT, graficada como la inversa del porcentaje de inclusión del exón 7 de SMN2 (1/inclusión) en el eje y frente a la inversa de la concentración del ASO en μM (1/concentración) en el eje x. Extrapolando el punto de corte del eje de las abscisas se obtiene un valor equivalente a la negativa de la inversa de la concentración de ASO que promueve la inclusión del exón 7 en un 50% respecto del máximo de inclusión lográble (CE50). Este cálculo se realizó mediante una aproximación con el método de Lineweaver-Burk.

(c) Cuantificación de las RT-PCR de punto final obtenidas de la curva de concentración de ASOs (hasta 40 nM) en fibroblastos de pacientes con AME (3813). La representación es similar al panel (a), con los mismos ASOs y sus respectivas concentraciones: Spinraza (rojo), scramble (gris), ASO genérico (violeta) y ASO1 (azul). N = 3 réplicas biológicas. Barras de error = error estándar.

(d) Cuantificación de la curva de concentración completa (hasta 10 μ M de ASO) para los fibroblastos de pacientes con AME (3813), graficada como 1/inclusión en el eje y frente a 1/concentración en el eje x. Este análisis sigue el mismo enfoque que en el panel (b) para determinar el CE50, utilizando el método de Lineweaver-Burk.

(e) Comparación de ASO1, ASO2, scramble a 100nM de concentración y transfección sin oligo (No Oligo) en el porcentaje de inclusión del exón 7 de SMN2, basado en los trabajos de Marasco et al. (2022). En el recuadro superior se muestran las bandas de RT-PCR correspondientes a las isoformas de SMN2: FL (incluye el exón 7, ~382 pb) y Δ E7 (exclusión del exón 7, ~328 pb). En el recuadro inferior, un gráfico de barras presenta en el eje x los oligonucleótidos comparados y en el eje y la cuantificación del porcentaje de inclusión del exón 7 de SMN2. Se observa un no cambio en porcentaje de inclusión entre el ASO scramble y el “No oligo”. Un aumento significativo con el tratamiento del ASO1; y una inhibición con el tratamiento de ASO2. N = 3 réplicas biológicas. Barras de error representan error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey. Todas las células fueron transfectadas con los ASOs correspondientes durante 72 horas.

En la Figura R.2a se muestra un fragmento de la curva de concentración de los ASOs Scramble, nusinersen, genérico y ASO1 (hasta 40 nM). Este límite se utiliza porque, a partir de esa concentración, el efecto de los ASOs comienza a saturarse y se genera una meseta que dificulta la visualización clara de las diferencias entre los efectos de los ASOs. El ASO *scramble*, usado como control negativo, no afecta el splicing del exón 7 (E7) de SMN2 a ninguna de las concentraciones investigadas. En contraste, los ASOs Nusinersen, genérico y ASO1 muestran comportamientos equivalentes en las distintas concentraciones evaluadas.

A partir de un nivel basal de inclusión del exón 7 de aproximadamente 50%, el ASO *scramble* no incrementa significativamente este nivel basal. Sin embargo, nusinersen, el ASO genérico y ASO1 incrementan la inclusión del exón 7 siguiendo curvas similares en función de la concentración transfectada, alcanzando una meseta de aproximadamente 80% de inclusión. Esto indica que los tres ASOs tienen potencia y eficacia equivalentes.

Para corroborar estas observaciones, en la Figura R.2b los datos se representaron como la inversa del porcentaje de inclusión (1/% de inclusión) frente a la inversa de la concentración del ASO (1/concentración). Este análisis a través del uso de un modelo de regresión lineal genera rectas de pendiente positiva, donde las pendientes de las tres rectas correspondientes a ASO1, nusinersen y el ASO genérico son equivalentes. El modelo de regresión lineal muestra un R^2 de approx 0.95 para los oligos en cuestión, menos el ASO *scramble*, que no tiene efecto biológico, como esperado, con un R^2 de 0.06. Extrapolando el punto de corte del eje de las abscisas, se determinó el valor CE50, equivalente a la inversa de la concentración de ASO necesaria para alcanzar el 50% del máximo nivel de inclusión

del exón 7. Los valores de CE50 calculados mediante el método de Lineweaver-Burk fueron de 0,40 nM, 0,37 nM y 0,36 nM para ASO1, nusinersen y el ASO genérico, respectivamente.

En la Figura R.2c se repitió la curva de concentración en fibroblastos de pacientes con AME (línea celular 3813). Los resultados confirmaron que los ASOs se comportan de manera equivalente en esta línea celular humana, replicando los resultados observados en las células HEK293T. Nuevamente, extrapolando el punto de corte del eje de las abscisas, se determinó el valor CE50, equivalente a la inversa de la concentración de ASO necesaria para alcanzar el 50% del máximo nivel de inclusión del exón 7 (Figura R.2d). Los valores de CE50 calculados fueron de 0,42 nM, 0,42 nM y 0,43 nM para ASO1, nusinersen y el ASO genérico, respectivamente.

Finalmente, se investigó el efecto del ASO2 descrito en Marasco *et al.* (2022) y se comparó con ASO1, el ASO *scramble*, y una transfección sin oligonucleótido “*no oligo*” en la línea celular de fibroblastos de pacientes 3813. Los resultados corroboraron (Figura R.2e) el efecto potenciador del ASO1 e inhibitorio del ASO2 sobre la inclusión del exón 7 de *SMN2*, previamente descrito en Marasco *et al.* (2022); también mostrando que la transfección con el ASO *scramble* se comporta igual a la transfección sin oligo “*no oligo*” en presencia del vehículo de transfección, lipofectamina. Este efecto se atribuye a los cambios cromatínicos inducidos por el tratamiento con ASOs, que generan un obstáculo físico (*roadblock*) en la elongación de la transcripción. Este mecanismo inhibe la inclusión del exón alternativo E7, ya que el sitio blanco del ASO2 no compite directamente con el factor negativo de splicing hnRNP A1/A2.

Estos primeros resultados confirman observaciones realizadas en trabajos previos, validan la eficacia de un genérico de nusinersen y proporcionan una base sólida para los análisis y experimentos posteriores en el presente trabajo.

2. Investigación de la eficacia y potencia del ASO1 en células humanas WT y G9a KO

En el trabajo de Marasco *et al.* (2022), se describe que el tratamiento con ASO1 genera un efecto cromatínico alrededor de su sitio blanco, donde se deposita la marca represiva de cromatina H3K9me2. Esta marca es contraproducente para la inclusión del exón 7 de *SMN2*, ya que genera un obstáculo para la elongación de la RNAPII, disminuyendo el potencial aumento de inclusión del exón alternativo, clasificado como un exón tipo II. La eliminación de esta marca de metilación de histonas mediante el uso de HDACi demostró remover dicho obstáculo, potenciando la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

Con el objetivo de validar estos trabajos previos, decidimos investigar el papel de una posible metiltransferasa involucrada en este mecanismo. La metiltransferasa de histonas EHMT2 (euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2), conocida como G9a, es ampliamente estudiada por su rol en la metilación de H3K9, particularmente H3K9me2, que tiene importantes implicancias en el control transcripcional (Jenuwein, 2006; Tachibana *et al.*, 2002). Basándonos en trabajos previos de nuestro laboratorio (Fiszbein *et al.*, 2016), que muestran la relación entre G9a y la marca H3K9me2, decidimos investigar si la línea celular HEK293T CRISPR-KO de G9a, que carece de esta metiltransferasa de histonas, responde de manera diferente al tratamiento con ASO1 en términos de la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

Para ello, realizamos una curva de concentración de ASO1 en líneas celulares HEK293T WT y G9a KO para evaluar los efectos de la metilación de histonas sobre la inclusión del exón 7 de *SMN2* tras el tratamiento con ASO1. En la Figura R.3, se observa la cuantificación de la inclusión del exón 7 de *SMN2* a diferentes concentraciones de ASO1 en ambas líneas celulares. Los resultados muestran una mayor inclusión del exón 7 de *SMN2* a bajas concentraciones de ASO1 en la línea celular G9a KO en comparación con la WT. Además, se observa un nivel basal de inclusión más alto en las células G9a KO que en las WT.

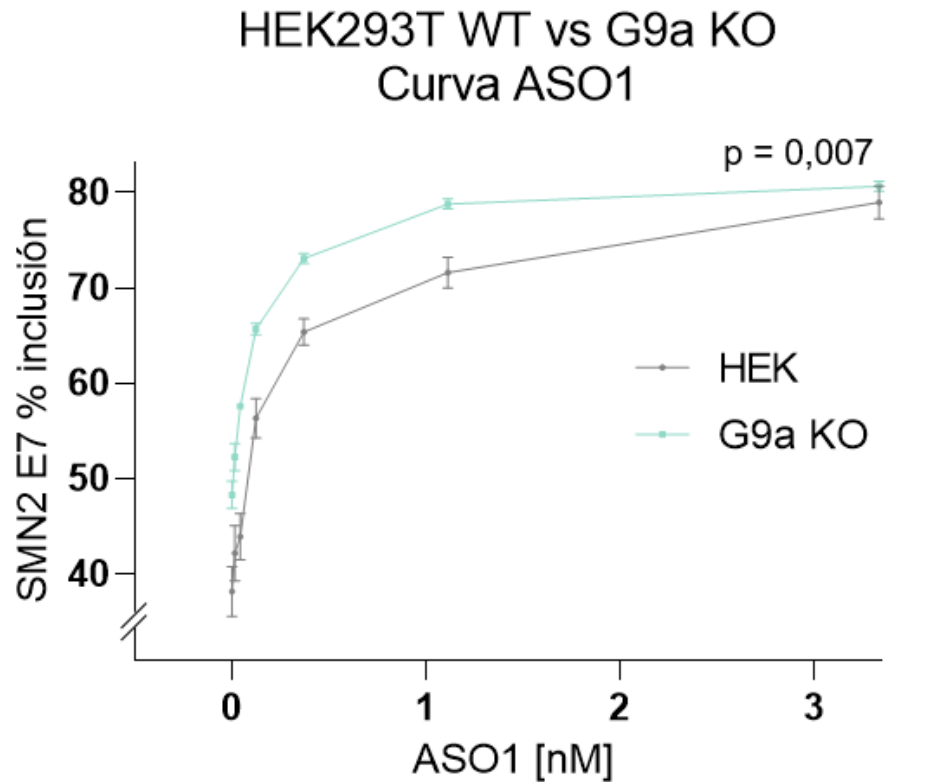


Figura R.3. Curva de concentración de ASO1 en células WT vs. G9a KO.

Curvas de respuesta de ASO1 en células HEK293T WT (negro) y G9a KO (verde agua), evaluadas mediante RT-PCR de punto final. Curva de concentración de ASO1, mostrando la inclusión del exón 7 de SMN2 en función de la dosis. El eje x representa la concentración de ASO1 [nM] y el eje y el porcentaje de inclusión del exón 7 de SMN2. A una concentración de 0 nM, se observa un nivel basal de inclusión de aproximadamente 50% en células WT y 60% en células G9a KO. El aumento de la dosis de ASO1 incrementa la inclusión en ambas líneas celulares hasta alcanzar un efecto saturado a 3 nM, generando un plateau. Las células fueron transfectadas con ASO1 durante 72 horas. N =2 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar.

Una posible explicación para esta diferencia es que, en las células G9a KO, la ausencia de la marca represiva H3K9me2 resulta en un estado cromatínico más laxo, lo que permite una mayor tasa de elongación de la RNAPII, favoreciendo la inclusión del exón 7 de SMN2 tanto en condiciones basales como bajo tratamiento con ASO1. Asimismo, la falta de expresión de esta metiltransferasa podría disminuir el efecto cromatínico del ASO1, favoreciendo aún más la inclusión del exón 7. A altas concentraciones de ASO1, ambas líneas celulares alcanzan un plateau donde se satura el efecto de potenciar la inclusión del exón 7. Esto probablemente se debe a que, en altas concentraciones, el ASO1 satura su principal efecto de competir con el factor represivo de splicing hnRNPA1/A2, haciendo que sus efectos cromatínicos sean menos perceptibles.

Para el análisis de los datos representados en la figura R.3 se realizó un análisis de la curva de dosis-respuesta mediante normalización e interpolación lineal. Se normalizaron los datos de modo que la respuesta basal (0 nM) se define como 0% y la respuesta máxima como 100%. Con este modelo, el 50% del efecto (la mitad del rango dinámico) se interpola en la curva de dosis-respuesta. Así, para las células WT el 50% (un valor de respuesta de aproximadamente 59.63% de inclusión del E7 de *SMN2*) se alcanza a una concentración de ASO1 de 0.213 nM, mientras que para las células G9a KO, el 50% de efecto (alrededor de 66.10% de inclusión del E7) se alcanza a una concentración de 0.138 nM. El análisis se realizó utilizando el modelo “[Agonista] vs. respuesta normalizada – pendiente variable” en GraphPad Prism, fijando el mínimo en 0% y el máximo en 100%. La comparación de las curvas mediante el F-test reveló que el modelo con curvas separadas para cada grupo se ajusta significativamente mejor que un modelo común, lo que indica que las diferencias en el CE50 entre ambos grupos son estadísticamente significativas ($p = 0.007$). Esto sugiere que las células G9a KO son más sensibles al ASO1 que las células WT. En este caso, este enfoque es preferible frente a la transformación clásica de Lineweaver–Burk, ya que la normalización directa evita la subestimación del CE50 cuando el efecto basal difiere entre los dos grupos y refleja de manera más fiel la potencia del ASO1 en el contexto de la inclusión del exón 7 en ambas líneas celulares.

3. La pérdida de expresión de metiltransferasas de histonas provoca cambios globales en los estados de la cromatina

En línea con los resultados previamente descriptos que sugieren que la potencia del tratamiento con ASO1 podría estar influida por el estado cromatínico en células que carecen de la metiltransferasa G9a, responsable de depositar la marca represiva H3K9me2 (Marasco *et al.*, 2022), decidimos investigar las diferencias en las marcas cromatínicas globales entre las células control (WT) y aquellas deficientes en G9a (G9a KO).

Primero, confirmamos que las células G9a KO efectivamente no expresan G9a. Como se muestra en la Figura R.4a, el Western blot reveló dos bandas alrededor de 132 kDa en las células WT, correspondientes a las dos isoformas de G9a (E10+/-) descriptas por Fiszbein *et al.* (2016). En contraste, no se observan bandas en las células G9a KO, confirmando la eliminación de dicha metiltransferasa en estas células.

A continuación, investigamos los cambios globales en las marcas de cromatina como resultado de la pérdida de expresión de G9a. La Figura R.4b muestra que la línea celular G9a KO presenta niveles reducidos de H3K9me2 en comparación con las células WT, en concordancia con nuestra hipótesis de que la ausencia de esta metiltransferasa debería disminuir los niveles de H3K9me2.

Además, la Figura R.4b evidencia que las células G9a KO no sólo tienen menos H3K9me2, sino que estos niveles más bajos de la marca represiva se correlacionan con niveles más altos de H3K9ac, una marca activadora de la cromatina, lo que sugiere una conformación de cromatina más laxa.

Con esta observación, consideramos que la reducción global de H3K9me2 y el aumento de H3K9ac podrían influir en el evento de splicing alternativo de interés, *SMN2* E7, y afectar la respuesta al tratamiento con ASO1, lo que podría explicar las diferencias observadas en el experimento de la Figura R.3.

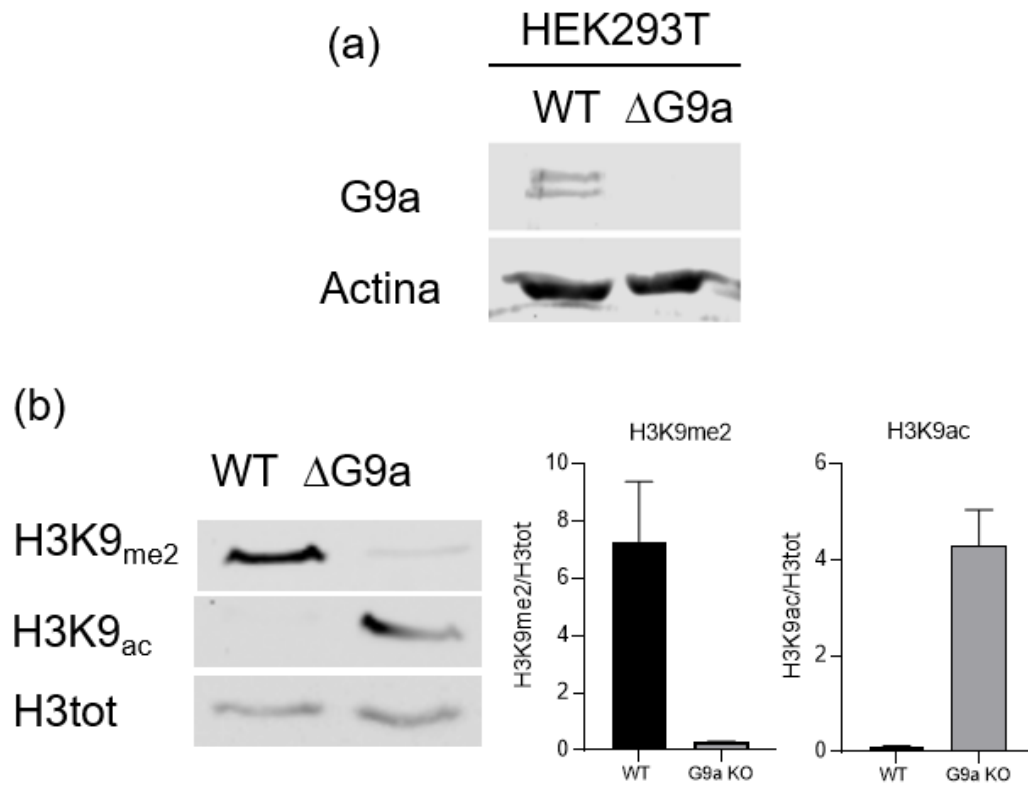


Figura R.4. Cambios en marcas de cromatina en células HEK293T WT y G9a KO.

Análisis por Western blot (izquierda) y cuantificaciones correspondientes (derecha) para evaluar cambios en marcas de cromatina en células HEK293T WT y G9a KO. (a) Western blot contra G9a (~132 kDa) y actina (~42 kDa) como control de carga. Se confirma la ausencia de G9a en células G9a KO. (c) Western blot contra H3 total (~17 kDa, arriba) como control de carga, H3K9me2 (~17 kDa, centro) y H3K9ac (~17 kDa, abajo). Se observa la reducción de la marca de H3K9me2 en células G9a KO junto con un aumento en H3K9ac, lo que sugiere un estado cromatínico más abierto en células G9a KO. N=2 replicas biológicas, barras de error representan el error estándar.

4. La pérdida de marcas de cromatina represiva mejora la inclusión del exón 7 de *SMN2*

Tras observar que la pérdida de expresión de G9a en las células KO se asocia con una disminución de la marca represiva H3K9me2 y un aumento de la marca activadora H3K9ac, decidimos investigar nuevamente cómo estos cambios en el estado global de la cromatina afectan la inclusión del exón 7 (E7) del gen *SMN2* en respuesta al tratamiento con el ASO1.

El análisis de RT-PCR en la Figura R.5 muestra un aumento en la inclusión del exón 7 en las células G9a KO en comparación con las células WT. En un primer instante, observando los niveles basales de inclusión del E7 de *SMN2*, los resultados sugieren que la disminución de la marca represiva H3K9me2 y el incremento de H3K9ac facilitan un entorno de cromatina más permisivo. Para corroborar estos resultados, también tratamos las células con el ASO1 que favorece la inclusión de E7, Spinraza/nusinersen. La Figura R.5 indica que las células G9a KO responden más eficazmente al tratamiento con ASO1, mostrando una mayor inclusión del E7 en comparación con las células WT.

Este resultado confirma nuevamente las observaciones de la Figura R.3, apoyando nuestra hipótesis de que la reducción de marcas represivas y el aumento de marcas activadoras en la cromatina contribuyen a un entorno más favorable para la inclusión del exón alternativo en cuestión, mejorando así la respuesta al tratamiento con ASO1.

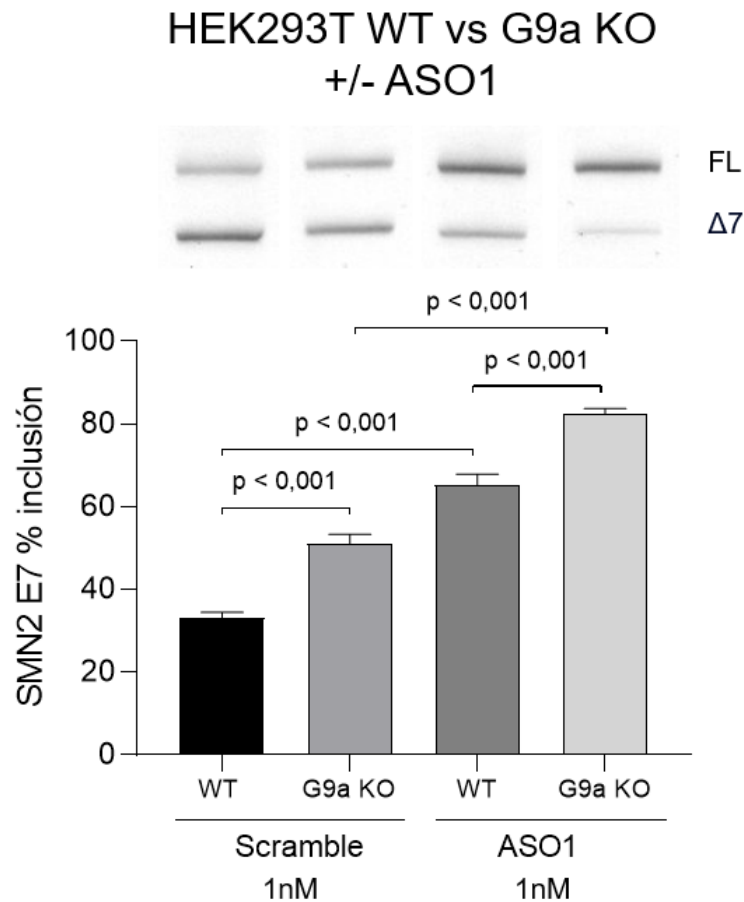


Figura R.5. Efecto de la pérdida de G9a en la inclusión del exón 7 de SMN2.

El análisis de RT-PCR de punto final muestra un aumento en la inclusión del exón 7 en células G9a KO en comparación con WT. (Arriba): recorte de las bandas de un gel de poliacrilamida del producto de PCR representativo al evento de splicing de SMN2, donde la banda superior corresponde al mRNA maduro de SMN2 full length y la banda inferior al mRNA de SMN2 excluyendo el exón 7 (E7-). (Abajo): Cuantificación de las bandas de splicing, representadas como porcentaje de inclusión del exón 7 de SMN2 en el eje X y tratamientos en el eje Y.

En las células WT, el tratamiento control (ASO Scramble 1nM) muestra una inclusión basal del exón 7 de aproximadamente 30%, mientras que en las células G9a KO, el ASO scramble muestra una inclusión basal significativamente mayor, de aproximadamente 45%.

El tratamiento con el ASO1 (Spinraza/Nusinersen) a 1nM de concentración final, aumenta la inclusión del exón 7 de forma significativa tanto en células WT como en células G9a KO. Sin embargo, las células G9a KO tratadas con ASO1 presentan una inclusión significativamente mayor del exón 7 de SMN2 en comparación con las células WT tratadas con la misma concentración de ASO1. Las células fueron tratadas con ASO1 durante 72 horas. N= 3 réplicas biológicas, barras de errores representan el error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de prueba de Tukey.

5. La ausencia de expresión de G9a resulta en perfiles reducidos de H3K9me2 a lo largo del gen *SMN2*

En base a los resultados observados previamente quisimos investigar los cambios específicos en H3K9me2 a lo largo del gen *SMN2* y, para ello, utilizamos una técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con un anticuerpo que reconoce la marca de histona H3K9me2, como se muestra en la Figura R.6. Observamos que las células G9a KO presentan niveles más bajos de H3K9me2 a lo largo del gen *SMN2* en comparación con las células WT, en concordancia con las observaciones de los experimentos previos de Western blot sobre los perfiles globales de H3K9me2.

Confirmamos los resultados de nuestros trabajos previos (Marasco et. al, 2022) que indican que el tratamiento con ASO1 en células WT provoca la deposición de la marca de cromatina represiva H3K9me2. Lo interesante es que también observamos que en las células HEK293T G9a KO, el tratamiento con ASO1 incrementó los niveles de H3K9me2, aunque éstos no alcanzaron los niveles observados en las células WT, mostrando un perfil similar al de las células HEK293T con el tratamiento control. Es interesante notar que los efectos del ASO1 se extienden a lo largo del gen de *SMN2*, con particular énfasis alrededor del sitio blanco del ASO1 y la región promotora del gen, en línea con resultados observados en Marasco et. al., (2022).

Estos resultados apoyan los resultados descriptos previamente y sugieren que, si bien G9a está implicada en la deposición y el mantenimiento de la marca de H3K9me2, no parece ser la única metiltransferasa de histonas responsable de este proceso. También es posible que exista un mecanismo compensatorio en el que, en ausencia de G9a, otras metiltransferasas de histonas depositen H3K9me2 en respuesta al tratamiento con ASO1.

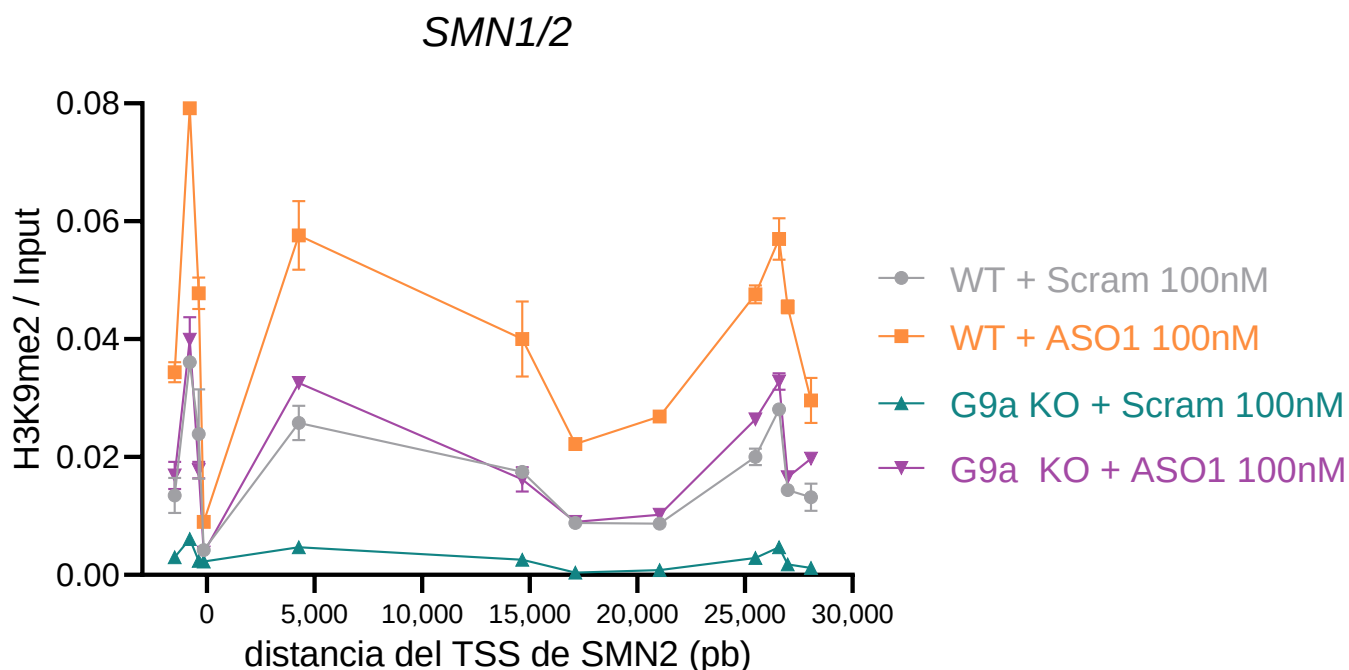


Figura R.6. Análisis de niveles de H3K9me2 en el gen SMN2 mediante ChIP-qPCR.

Análisis de ChIP-qPCR utilizando un anticuerpo contra H3K9me2 en células HEK293T WT y HEK293T G9a KO, tratadas con ASO1 o control (ASO Scramble) a 100nM de concentración final por 72 horas. La qPCR se realizó utilizando amplicones específicos a lo largo del gen SMN2. En el eje X se muestra la distancia en pares de bases desde el sitio de inicio de transcripción del gen SMN2. Células WT (gris) con tratamiento control, mostrando los niveles basales de la marca de metilación de histonas H3K9me2. Células G9a KO (verde agua) con tratamiento control, evidenciando una disminución significativa de la marca represiva H3K9me2 en comparación con las células WT. Células WT tratadas con ASO1 (naranja), donde se observa un aumento en la deposición de H3K9me2 a lo largo del gen SMN2, en concordancia con lo reportado por Marasco et al. (2022). Células G9a KO tratadas con ASO1 (violeta), que muestran un aumento en los niveles de H3K9me2 en comparación con sus niveles basales, aunque sin alcanzar los niveles observados en las células WT tratadas con ASO1. En cambio, estos niveles son comparables a los de las células WT no tratadas. N=2 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar.

Cabe señalar que los genes *SMN1* y *SMN2* están presentes dentro de una región duplicada de 500 kpb en el cromosoma 5 humano. Debido a la identidad de secuencia extremadamente alta entre ellos, los primers utilizados para amplificar segmentos de ChIP-qPCR no se pueden asignar de manera inequívoca a ninguno de los genes *SMN*, por lo que se impone una evaluación en paralelo. De manera diferente, los productos de splicing específicos del gen *SMN2* endógeno humano se pueden identificar en las RT-PCR de punto final porque el exón 8 de *SMN2* contiene un sitio de restricción *DdeI* que está ausente en *SMN1*. Por lo tanto, la RT-PCR seguida de digestión de restricción con *DdeI* distingue los transcritos de *SMN2* y *SMN1* (Parsons et al., 1996). Esta aclaración indica que cuando en un ChIP-qPCR nos referiremos al gen *SMN2*, en realidad los resultados corresponden al "merge" de los genes *SMN1/2*.

6. Metiltransferasas de histonas adicionales implicadas en el mantenimiento de la marca represiva H3K9me2

Para identificar otras metiltransferasas de histonas implicadas en la deposición de la marca cromatínica H3K9me2, utilizamos siRNA (Dharmacon Smartpool) dirigido contra metiltransferasas conocidas, incluyendo GLP (G9a-like protein), Suv39 y PRDM2. Dado que sospechábamos la existencia de mecanismos compensatorios en la metilación de H3K9me2, realizamos el knockdown (KD) de estas enzimas tanto en células de tipo salvaje (WT) como en líneas celulares G9a KO.

En la Figura R.7a, se observa que el KD de GLP redujo los niveles de H3K9me2 en ambos tipos celulares. Esto sugiere que GLP contribuye a la deposición de H3K9me2 de manera independiente o complementaria a G9a, lo cual es consistente con la interacción conocida entre ambas proteínas a través del dominio SET C-terminal (Fiszbein *et al.*, 2016).

Por otro lado, la Figura R.7b muestra que el KD de Suv39 no produjo una disminución significativa en los niveles de H3K9me2 en células WT y hasta se observa un leve aumento en la marca de H3K9me2 en la cuantificación en el panel a la derecha. Sin embargo, en ausencia de G9a, el KD de Suv39 resultó en la abolición completa de esta marca. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo compensatorio en la metilación de histonas y es coherente con los observados en la Figura R.6, donde en líneas G9a KO el tratamiento con ASO1 genera un aumento en los niveles de H3K9me2, asemejándose a los niveles basales observados en células WT.

En la Figura R.7c, se evidencia que el KD de PRDM2 no tuvo un efecto observable en las células WT y mostró un impacto mínimo o nulo en las células G9a KO, lo que indica una contribución secundaria de esta metiltransferasa en la deposición de H3K9me2.

En conjunto, estos resultados respaldan la importancia de estas metiltransferasas en el mantenimiento del estado de la cromatina y sugieren la existencia de mecanismos de compensación entre las diferentes HMTs.

Adicionalmente, la Figura R.7d ilustra el efecto del KD de Suv39 en la inclusión del exón 7 de SMN2, evaluado mediante RT-PCR. En este experimento, los niveles basales de inclusión en la condición control (siRNA contra luciferasa, *siLuc*) mostraron una tendencia similar a la observada en experimentos previos, pero en este caso con diferencias mínimas y no significativas entre células WT

y G9a KO. Sin embargo, al realizar el KD de Suv39, la diferencia en la inclusión del exón 7 se volvió mucho más pronunciada, en consonancia con lo observado en la Figura R.7b respecto a los niveles de H3K9me2. Específicamente, en células WT el KD de Suv39 disminuyó los niveles de inclusión del exón 7, acompañado de un leve aumento en la marca de H3K9me2 a nivel proteico. Por el contrario, en células G9a KO, el KD de Suv39 produjo un leve aumento en la inclusión del exón 7, mientras que a nivel proteico se observó una depleción total de la marca H3K9me2. Estos resultados sugieren que la manipulación de las metiltransferasas de histonas no solo afecta la deposición de H3K9me2, sino que también influye en el splicing alternativo de SMN2, estableciendo un vínculo funcional entre el estado de la cromatina y la regulación del splicing.

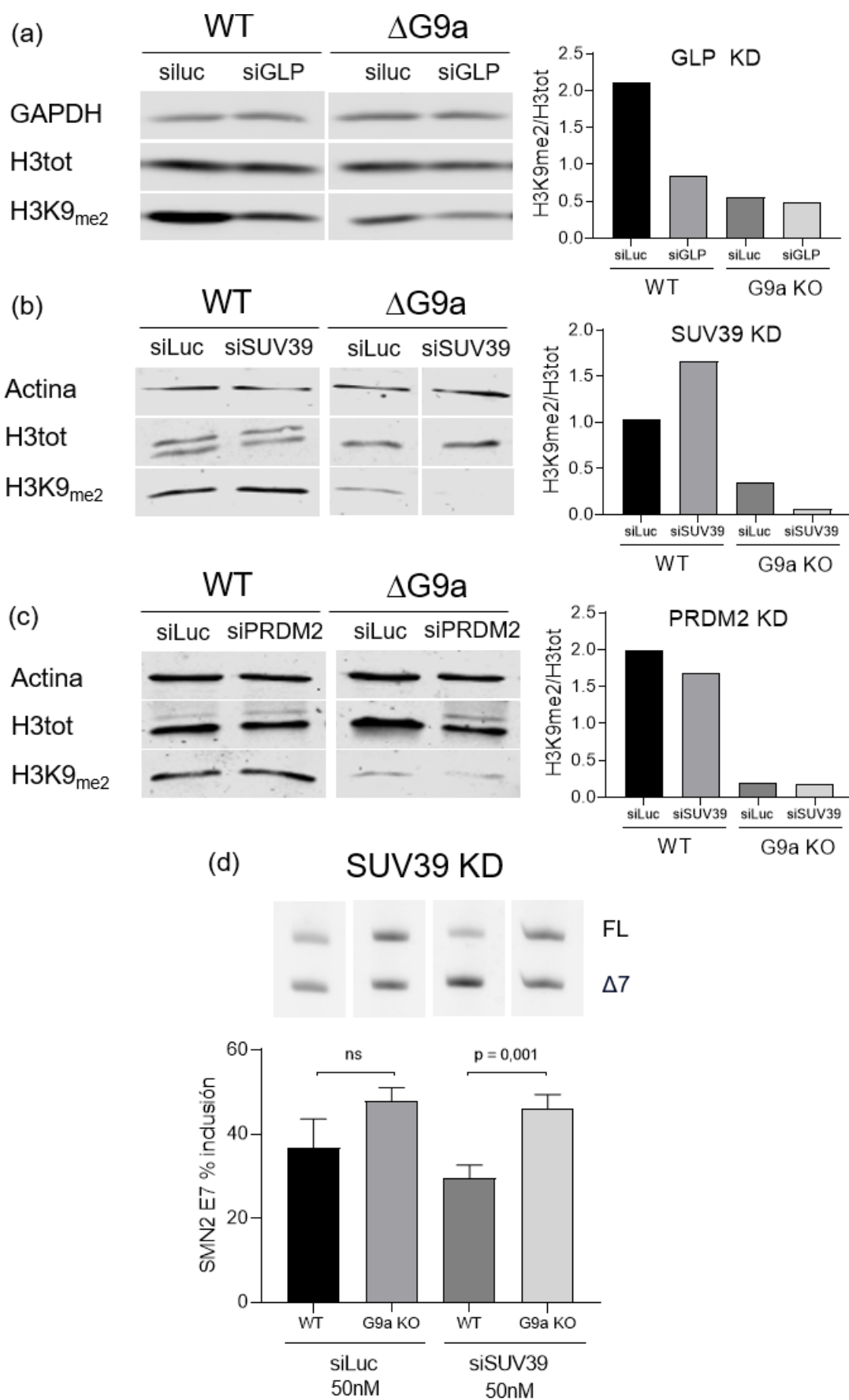


Figura R.7. Knockdown de metiltransferasas de histonas implicadas en la deposición de H3K9me2. Western blot (izquierda) y cuantificación (derecha) para evaluar la contribución de diferentes metiltransferasas a la deposición de H3K9me2. Todos los knockdowns (KD) con siRNAs específicos (Dharmacon SMARTpool) se realizaron a una concentración final de 50 nM durante 96 horas.

(a) Knockdown (KD) de GLP. Se muestra el Western blot con actina (~42 kDa) como control de carga, H3 total (~17 kDa) como segundo control, y la marca represiva H3K9me2 (~17 kDa). Se observa una disminución de H3K9me2 en células G9a KO en comparación con WT, en concordancia con resultados previos. Además, se evidencia una reducción de esta marca en ambas líneas celulares tras el tratamiento con siRNA contra GLP (50 nM; Dharmacon Smartpool).

(b) Knockdown (KD) de Suv39. En el Western blot, se observa que en células WT, el KD de Suv39 no disminuye los niveles globales de H3K9me2. Sin embargo, en células G9a KO, el KD de Suv39 provoca una depleción total de esta marca cromatínica, lo que sugiere un posible mecanismo compensatorio entre diferentes metiltransferasas de histonas (HMTs). **(c)** Knockdown (KD) de PRDM2. Se observa un impacto mínimo o nulo en los niveles de H3K9me2 en ambas líneas celulares, indicando una contribución menor de PRDM2 en la deposición de esta marca cromatínica.

(d) Cuantificación de RT-PCR de splicing en células HEK293T WT vs. G9a KO tras el KD de Suv39. Se realizó cuantificación de RT-PCR para evaluar la inclusión del exón 7 de SMN2 en células HEK293T WT y G9a KO tras el tratamiento con siRNA contra las subunidades H1/H2 de la metiltransferasa Suv39 (50 nM; Dharmacon Smartpool), o un siRNA control contra luciferasa. En la condición control, las diferencias en la inclusión del exón 7 entre WT y G9a KO muestran una tendencia como en línea con experimentos previos pero esa diferencia no muestra ser significativa. Sin embargo, el KD de Suv39 en ambas líneas celulares generó una diferencia muy significativa en los niveles de inclusión del exón 7 de SMN2, con un aumento notable en G9a KO respecto a WT. N=2 replicas biológicas, barras de error representan error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey.

7. La restauración de la expresión de EHMT2 (G9a) recupera los niveles globales de H3K9me2 e influye en la inclusión de *SMN2* E7

A continuación, quisimos investigar si la recuperación de la expresión de la metiltransferasa de histonas G9a en células que carecen de G9a podría restaurar los perfiles globales de H3K9me2 y eliminar la diferencia en la inclusión del exón e (E7) de *SMN2* entre las líneas celulares WT y G9a KO a través de la sobreexpresión de un plásmido que codifica para G9a en células HEK293T G9a KO. La Figura R.8a muestra que la sobreexpresión de G9a en las células G9a KO resulta en la expresión de la proteína G9a, y que los niveles de H3K9me2 aumentan tras la sobreexpresión de G9a.

En la Figura R.8b se observa que la diferencia en la inclusión de *SMN2* E7 entre las líneas celulares WT y G9a KO tratadas con el plásmido control pcDNA es pequeña pero significativa. Sin embargo, con la sobreexpresión de G9a, esa diferencia se elimina. Estos resultados confirman una vez más, la importancia del estado de la cromatina en este evento de splicing alternativo y sugieren que la restauración de la actividad de G9a puede revertir los efectos observados en la inclusión de *SMN2* E7.

En la Figura R.8c, se observa que la sobreexpresión de G9a en células HEK293T G9a KO impide la respuesta al tratamiento con ASO1, en contraste con las células que expresan el plásmido control (*pcDNA*). En este experimento, el aumento en la inclusión del exón 7 de *SMN2*, observado en las células tratadas con ASO1 y el plásmido *pcDNA*, se pierde en las células que sobreexpresan G9a, independientemente de la presencia o ausencia del ASO1.

Estos resultados refuerzan el papel crucial de la metiltransferasa de histonas G9a en la deposición de la marca represiva de cromatina H3K9me2 y su influencia en la inclusión del exón 7 de *SMN2* con y sin el tratamiento con ASO1.

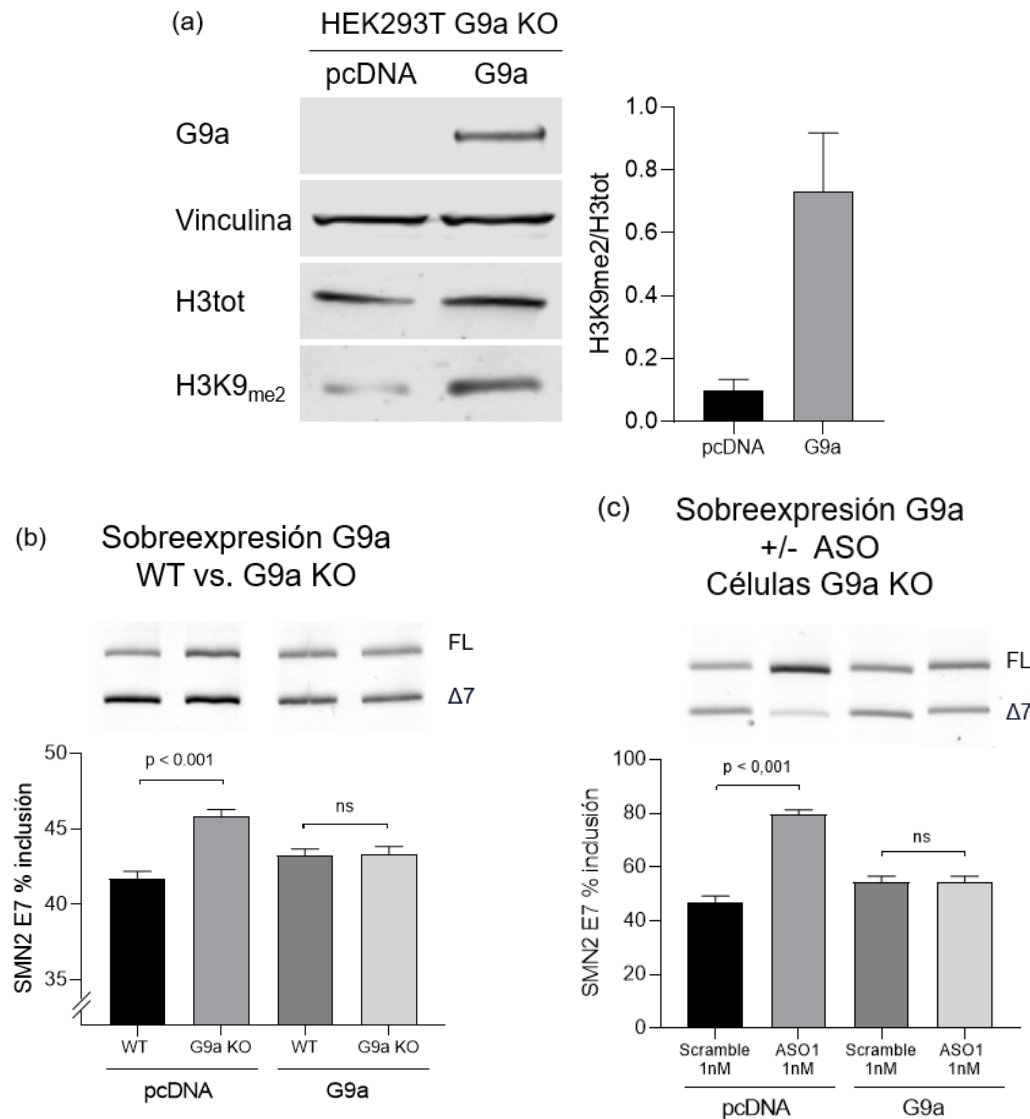


Figura R.8. Rescate de la expresión de la metiltransferasa de histonas G9a nuclear.

(a) Western blot en células HEK293T G9a KO con la sobreexpresión del plásmido que expresa G9a full length (Flag-G9a E10+) o un plásmido control (pcDNA). Se utilizó 500ng de plásmidos transfectados durante 96 horas, y ASOs durante 72 horas a una concentración final de 1nM. La transfección con el plásmido que expresa G9a confirma la restauración de su expresión (panel superior). La vinculina se utilizó como control de carga para proteínas de alto peso molecular, mientras que H3 total (H3tot) se empleó como control de carga para proteínas de bajo peso molecular (panel intermedio). El panel inferior muestra los niveles de H3K9me2, evidenciando la restauración de esta marca de heterocromatina tras la sobreexpresión de G9a en células HEK293T G9a KO, lo que indica la recuperación del perfil global de metilación de H3K9me2. (b) Cuantificación de RT-PCR de punto final, representando los niveles de splicing del exón 7 de SMN2. Se comparó la inclusión del exón 7 de SMN2 entre células WT y G9a KO transfectadas con el plásmido control (pcDNA) o con el plásmido de sobreexpresión de G9a. Los resultados muestran que la sobreexpresión de G9a revierte la diferencia en la inclusión de E7 entre ambas líneas celulares, restaurando los niveles de inclusión a valores comparables a los de las células WT. (c) Cuantificación de RT-PCR de punto final, representando los niveles de splicing del exón 7 de SMN2 en células G9a KO tratadas con el plásmido control (pcDNA) o con el plásmido de sobreexpresión de G9a, en presencia o ausencia de ASO1 1nM o ASO scramble 1nM. Se observa que, en ausencia de G9a (pcDNA), el ASO1 a 1nM aumenta significativamente la inclusión del exón 7. Sin embargo, este aumento se pierde en presencia del plásmido de sobreexpresión de G9a. (b y c) N = 3 réplicas biológicas, barras de error representadas como error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey.

8. La pérdida de expresión de proteínas asociadas a la heterocromatina incrementa la eficacia del efecto de ASO1 sobre la inclusión de *SMN2* E7

Tras los resultados recolectados en los experimentos previos y la importancia del estado cromatínico en la respuesta de splicing del E7 de *SMN2*, nos preguntamos si otros componentes relacionados con el mantenimiento del estado represivo de la cromatina podían influir en nuestro evento de splicing alternativo en respuesta al tratamiento con el ASO1. Para ello, nos enfocamos en la proteína de heterocromatina HP1 β , un represor transcripcional que se une directamente a H3K9 metilada y contribuye al mantenimiento del estado de heterocromatina.

La hipótesis de este experimento fue que, con una menor expresión de HP1 β , el tratamiento con ASO1, que induce la deposición de H3K9me2, debería verse disminuido en su capacidad de mantener un estado de cromatina represiva, mejorando así los niveles de inclusión del exón 7 de *SMN2*. Efectivamente, en la Figura R.9a se observa que las células en las que los niveles de HP1 β han sido reducidos mediante siRNA (Smartpool Dharmacon) son más sensibles al tratamiento con ASO1, mostrando un aumento en los niveles de inclusión de E7 en comparación con las células tratadas con el control. La Figura R.9b muestra la eficiencia del knockdown de HP1 β , que redujo la expresión en aproximadamente un 50%. Estos resultados, en conjunto, respaldan aún más la importancia de la dinámica de la cromatina y su interacción con el splicing alternativo en el contexto del tratamiento con ASO1, sugiriendo que la modulación de proteínas asociadas a la heterocromatina puede potenciar la eficacia del tratamiento.

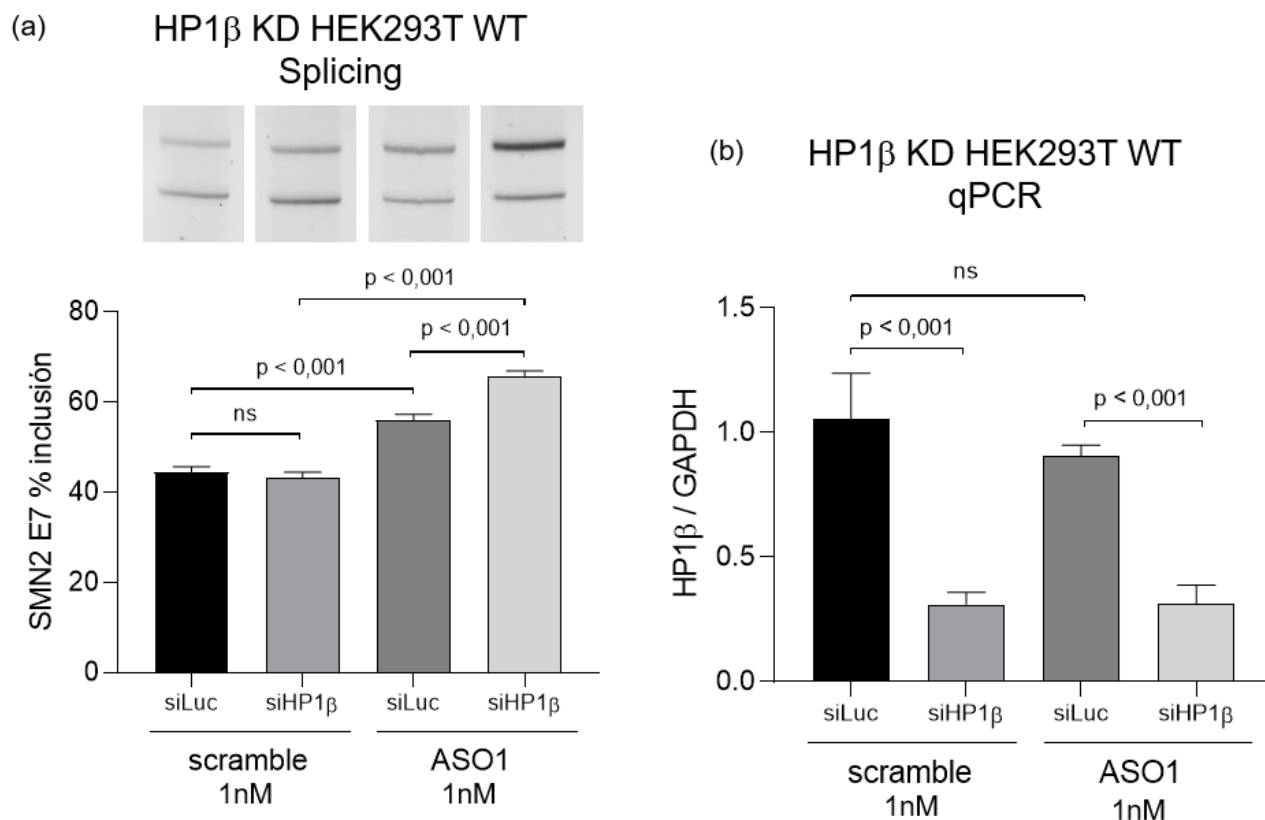


Figura R.9. Efecto del knockdown de HP1 β en la inclusión del exón 7 de SMN2.

Todos los knockdowns (KD) con siRNAs específicos (Dharmacon SMARTpool) se realizaron a una concentración final de 50 nM durante 96 horas. (a) arriba: recorte representativo de las bandas de RT-PCR de splicing, mostrando la inclusión (FL, full length) y exclusión (Δ E7) del exón 7 de SMN2. abajo: cuantificación del porcentaje de inclusión de E7, evidenciando un incremento significativo en la inclusión del exón 7 en células con knockdown de HP1 β tratadas con ASO1 o ASO scramble, a 1nM de concentración final, lo que indica una mayor sensibilidad al tratamiento con el ASO1 en comparación con el control. (b) Análisis de qPCR para verificar la eficiencia del knockdown de HP1 β , normalizado con el gen de referencia GAPDH, confirmando una reducción aproximada del 50% en la expresión de HP1 β en las células tratadas con siRNAs dirigidos contra HP1 β . Estos resultados sugieren que la reducción de HP1 β potencia la respuesta al tratamiento con ASO1. N=3 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey.

9. Oligos "sense" generan la deposición de marcas de metilación de cromatina como los ASOs

Después de observar la importancia del estado de la cromatina en relación con el splicing alternativo y la inclusión del exón 7 de *SMN2* en respuesta al tratamiento con ASO1, decidimos investigar si los efectos cromatínicos del tratamiento con ASO1 podrían deberse a que el ASO se une no sólo al RNA blanco, sino también al DNA, dado que la secuencia blanco del ASO es idéntica tanto para el mRNA de *SMN2* como para una de las hebras del DNA del mismo.

Para abordar esta cuestión, diseñamos oligonucleótidos con las secuencias complementarias tanto al ASO1 como al ASO2, a los que denominamos *Sense Oligos* (SO). Éstos tienen la capacidad, por complementariedad de bases, de aparearse al DNA, pero no al RNA. Esto se debe a que, según un reanálisis de los resultados de POINT-seq publicados en el trabajo de Marasco *et al.* (2022), no hay transcripción antisentido del gen *SMN2* en células HEK293T que pudiera justificar un apareamiento del SO a un RNA antisentido.

Al tratar las células con estos SOs, investigamos si estos oligos son capaces de generar la misma marca represiva H3K9me2 observada con el tratamiento con los ASOs y si esto afecta el splicing del exón 7 de *SMN2*. Nos centramos en el ASO2 y su secuencia complementaria SO2, porque en el trabajo de Marasco *et al.* (2022), demostramos que el ASO2 genera la deposición de la marca represiva H3K9me2 de manera similar al ASO1, pero no compite con el sitio blanco de hnRNPA1/A2 en el intrón 7 del pre-mRNA y, por ende, no aumenta la inclusión del exón 7 de *SMN2*, sino que la disminuye a través de la deposición de esta marca de cromatina represiva.

En la Figura R.10a, se observa que a nivel del RNA, la transfección con SO2, cuya secuencia es complementaria a la de ASO2, inhibe la inclusión del exón 7 de *SMN2* de manera similar a la transfección con ASO2 demostrada previamente. Este novedoso resultado sugiere que el efecto inhibitorio de la inclusión producido por SO2 podría ser causado por la promoción de una marca local de silenciamiento. En efecto, como se muestra en la Figura R.10b, la transfección con SO2 también induce la deposición de la marca represiva H3K9me2 alrededor de su sitio blanco, exón 7 de *SMN2*, como la transfección con ASO2, descrito previamente en Marasco *et al.* (2022). Cabe destacar que el efecto, tanto del ASO2 como del SO2, también se observa en la región promotora del gen de *SMN2* (figura R.10c) en línea con los resultados observados con ambos el ASO1 y el ASO2 en este trabajo y el de Marasco *et al.* 2022.

Estos resultados constituyen una primera evidencia de que los ASOs pueden aparearse no sólo con el mRNA o pre-mRNA, sino también con DNA de cadena simple, lo que podría explicar los efectos cromatínicos observados con su tratamiento. Estos efectos son similares a los descritos por Alló *et al.* (2009), donde se observó que el tratamiento con otros tipos de oligonucleótidos pequeños, como los siRNAs, también genera marcas represivas de cromatina y modifica eventos de splicing alternativo. Sin embargo, en el caso de los siRNAs, Alló *et al.* (2009) demostraron que el apareamiento generador de la marca de silenciamiento sólo ocurre a nivel del RNA.

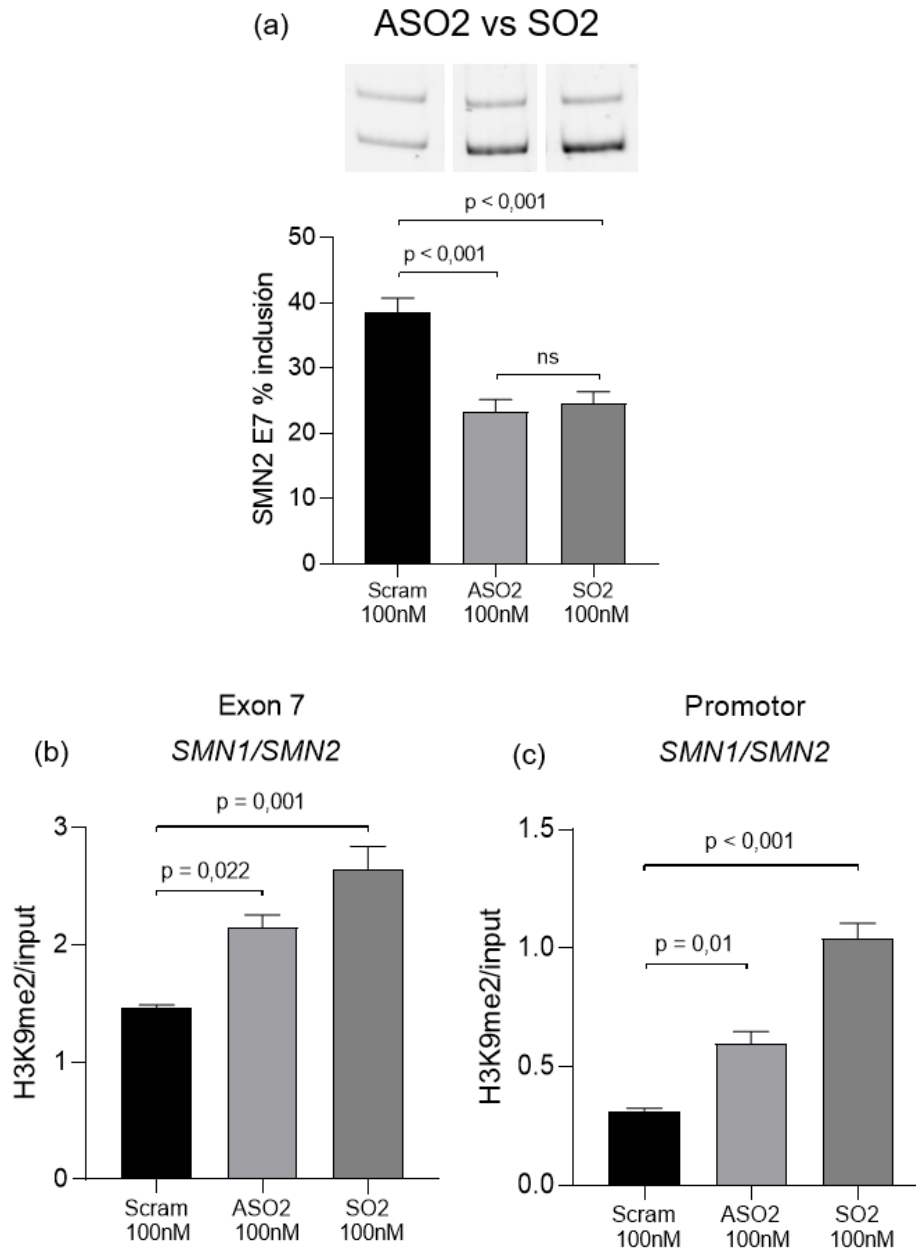


Figura R.10. El tratamiento con SOs genera los mismos efectos que los ASOs a nivel de la cromatina y el RNA.

(a) Análisis de RT-PCR de punto final, con los recortes de las bandas de splicing de SMN2 E7 en los recuadros superiores y su cuantificación en la parte inferior. En el eje x se representan los diferentes tratamientos con oligonucleótidos: Scramble (CTL), ASO2, y su secuencia complementaria SO2, todo a una concentración final de 100nM durante 72 horas. En el eje y, se muestra el porcentaje de inclusión del exón 7 de SMN2. N = 2, con barras de error representadas como error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey.

(b) Análisis de ChIP-qPCR dirigido a la marca represiva H3K9me2 en los tratamientos con Scramble (Scram), ASO2 y SO2 a una concentración final de 100nM durante 72 horas. En el eje x se indica la región del gen SMN2 interrogada (exón 7), y en el eje y, la señal de H3K9me2 normalizada al input. N=2 replicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey (c) Mismo experimento de ChIP-qPCR que en (b), interrogando la región promotora de SMN2. Se observa que el tratamiento con SO2 induce la deposición de la marca represiva de cromatina H3K9me2 tanto en su región blanco (intrón 7) como en el promotor de SMN2. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey.

10. El efecto de la promoción global de la acetilación de histonas sobre el splicing alternativo de *SMN2* E7 no es mediado por cambios en los niveles de factores de splicing

Para cerrar este capítulo de la tesis, decidimos investigar los efectos del ácido valproico (VPA), utilizado previamente para modular el estado de la cromatina y potenciar el tratamiento con ASO1 en la inclusión del exón 7 de *SMN2* (Marasco *et al.*, 2022). Nos enfocamos en los cambios globales de la cromatina y en la expresión de factores de splicing de interés relacionados con este evento de splicing alternativo. VPA es un inhibidor de desacetilasas de histonas (HDACi) que impide la remoción de residuos de acetilo en las histonas, resultando en una conformación de cromatina más laxa y promoviendo la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

Dado que VPA es una droga pleiotrópica, nos preguntamos si los efectos observados en trabajos previos podrían deberse no sólo a cambios en el perfil cromatínico de nuestro gen de interés, sino también a alteraciones en la expresión de los factores de splicing involucrados en este evento. Estos cambios podrían ser consecuencia de modificaciones cromatínicas globales o de modificaciones postraduccionales inducidas por el tratamiento con VPA.

Para abordar esta pregunta, realizamos un estudio temporal tras el tratamiento con VPA y analizamos mediante Western blot las marcas de cromatina represiva (H3K9me2) y activadora (H3K9ac), así como los factores de splicing hnRNPA1/A2 y SF2/ASF. SF2/ASF es un factor de splicing positivo cuyo sitio de unión se pierde en la mutación C→T del exón 7 de *SMN2*, la diferencia clave entre *SMN1* y *SMN2*, y la razón por la cual el exón 7 de *SMN2* se excluye en gran medida del mRNA maduro. Por otro lado, hnRNPA1/A2 es un represor de splicing que se une río abajo del exón alternativo, en el intrón 7, y cuya unión inhibe la inclusión del exón 7 de *SMN2* cuando el sitio de unión de SF2/ASF está ausente. Esto resulta en la exclusión del exón alternativo. Cabe destacar que el sitio blanco de hnRNPA1/A2 es el mismo que el del ASO1 y, al aparearse con el mismo, impide la interacción del factor represor hnRNPA1/A2, aumentando así la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

La Figura R.11 muestra que, como era esperable, la marca activadora H3K9ac aumenta con el tiempo en respuesta al tratamiento con VPA. Simultáneamente, la marca de cromatina represiva H3K9me2 disminuye con el tiempo tras el tratamiento con VPA. Esto es consistente con la idea de que VPA abre la cromatina promoviendo la velocidad de elongación de la RNAPII y elimina la marca represiva

inducida por el tratamiento con ASO1, como demostramos en Marasco *et al.* (2022), potenciando el efecto del ASO1 en la promoción de la inclusión del E7 de *SMN2*.

Asimismo, la Figura R.11 muestra que el tratamiento con VPA no afecta la abundancia de los factores de splicing SF2/ASF o hnRNPA1/A2, lo que respalda la hipótesis de que los efectos que describimos previamente en Marasco *et al.* (2022) se deben principalmente a los cambios en el estado de la cromatina *en cis*, y no a alteraciones en la expresión de los factores involucrados en este evento de splicing alternativo que pudieran actuar *en trans*.

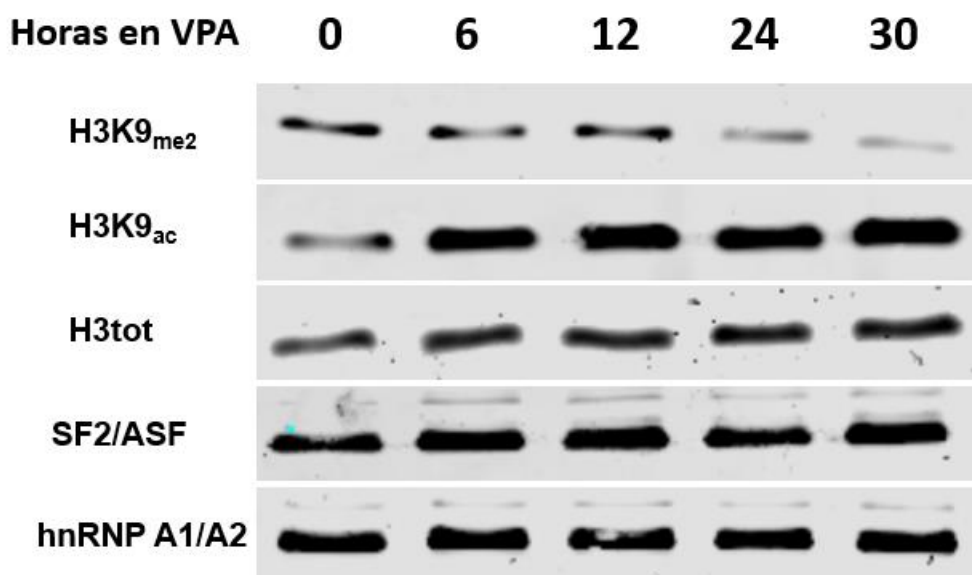


Figura R.11. El tratamiento con VPA modifica las marcas de cromatina sin afectar la expresión de los factores de splicing involucrados en la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

Western blot tras el tratamiento con VPA a 10mM a distintos tiempos (0, 6, 12, 24 y 30 horas). Se muestran, de arriba hacia abajo, los niveles de la marca represiva H3K9me2, la marca activadora H3K9ac, e histona H3 total como control de carga; además de los factores de splicing positivo SF2/ASF y negativo hnRNPA1. Se observa que, tras el tratamiento con VPA, la marca represiva H3K9me2 disminuye progresivamente con el tiempo, mientras que la marca activadora H3K9ac aumenta. Por otro lado, tanto el factor positivo de splicing SF2/ASF como el factor negativo hnRNPA1/A2 no muestran cambios en respuesta al tratamiento con el VPA, lo que sugiere que los efectos observados en la inclusión del exón 7 de *SMN2* se deben a modificaciones en el estado de la cromatina y no a alteraciones en la expresión de los factores de splicing.

Capítulo 2

11. Diseño de una nueva estrategia para el direccionamiento de la acetilación de histonas

En la segunda parte de este proyecto decidimos emprender una nueva estrategia para dirigir específicamente la acetilación de histonas al gen *SMN2*. Como se observó en la figura R.11 el VPA es una droga pleiotrópica que provoca cambios globales en el estado de la cromatina. Por otro lado, el tratamiento con ASO1 es altamente específico y sin efectos *off target* significativos como se describió previamente en Marasco *et al.* (2022). El fundamento detrás del uso de un enfoque dirigido para la modificación de la cromatina es corroborar que los efectos cooperativos observados entre el tratamiento con ASO1 y VPA se deben a la acetilación específica del gen *SMN2* y no a cambios en la cromatina en otras partes del genoma. Además, el uso de VPA podría tener efectos no deseados sobre la regulación de otros genes u otra parte del genoma, y aunque sean pequeños, como se mencionó en Marasco *et al.* (2022), una estrategia dirigida ofrece poder prevenir estos efectos *off target*.

Con un enfoque dirigido, buscamos modular el estado de la cromatina de *SMN2* de manera específica y potenciar el tratamiento con ASO1 en la inclusión de *SMN2* E7. Para lograrlo, utilizamos una CRISPR dCas9 proporcionada por la Dra. Reini de Luco, del Instituto Curie de París, Francia (Segelle *et al.*, 2022). Como mencionado en la introducción, dCas9 es una proteína Cas9 catalíticamente inactiva que no puede cortar la doble hélice de DNA, pero que es capaz de ser reclutada a su sitio blanco mediante RNAs guía (sgRNAs). Esta dCas9 se fusionó previamente con el dominio transactivador VP64, compuesto por cuatro repeticiones en tándem del dominio transactivador VP16 del virus del herpes simplex. Esta proteína de fusión es capaz de reclutar factores de transcripción endógenos, como la histona acetiltransferasa p300, para acetilar específicamente la región de interés y será utilizada en este trabajo con el particular objetivo de modular el estado cromatínico específicamente alrededor del evento de splicing del exón 7 de *SMN2* (Figura R.12).

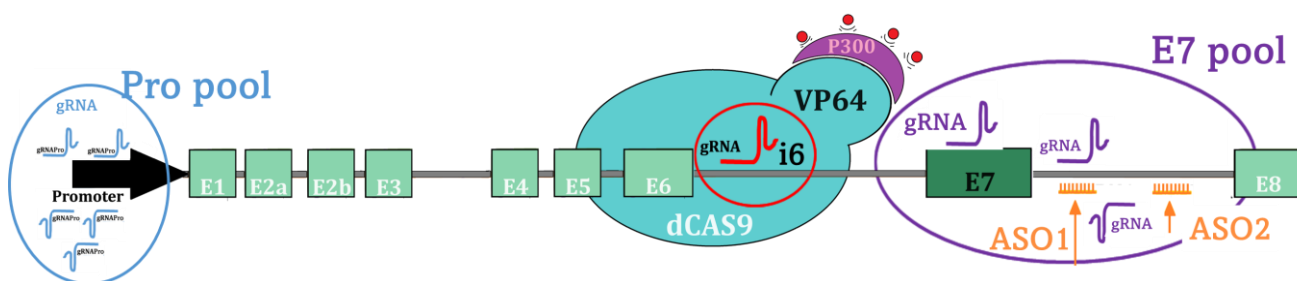


Figura R.12. Esquema de la estrategia de modulación cromatínica dirigida a SMN2.

Diseñamos RNAs guía (sgRNAs) para reclutar dCas9-VP64 (en azul) a distintas regiones del gen SMN2: río arriba del exón 7, dentro del propio exón 7 y río abajo de este. La proteína de fusión dCas9-VP64 recluta la acetiltransferasa endógena p300 (en violeta), encargada de acetilar la región de interés. Se incluyeron guías para ambas hebras del DNA, así como otras dirigidas al promotor de SMN2 con el fin de validar la activación transcripcional e investigar el efecto sobre el splicing alternativo del exón 7.

La flecha negra a la izquierda representa el promotor, los exones se ilustran con recuadros verde agua, y los intrones con líneas grises que los conectan. Los RNAs guía (gRNA) se muestran como líneas onduladas de diferentes colores, mientras que el ASO1 aparece en naranja junto con su sitio blanco. Las guías gRNA en azul apuntan al promotor; las guías violetas se dirigen al exón 7 y al intrón 7; y la guía roja se ubica río arriba del exón 7, en el intrón 6.

La dCas9-VP64 es conocida como una herramienta de activación CRISPR (CRISPRa), comúnmente utilizada para la activación transcripcional en regiones promotoras. En nuestro enfoque, utilizamos esta herramienta para dirigir regiones intragénicas cercanas al evento de splicing alternativo del gen SMN2 con el fin de modular la dinámica de la cromatina y potenciar el tratamiento con ASO1 en la inclusión de SMN2 E7. Realizamos transfecciones transitorias del plásmido dCas9-VP64 (Figura R.13) y co-transfecciones con un plásmido que expresa la guía de RNA (Figura R.14) y el tratamiento con ASO1. Investigamos los efectos en la dinámica de la cromatina y el splicing alternativo para validar la efectividad y especificidad de este tratamiento.

Para esta estrategia, diseñamos RNAs guía (sgRNAs) cuyos correspondientes segmentos de DNA clonamos en el vector LentiGuide Puro del laboratorio de Zhang (Sanjana *et al.*, 2014), que ha sido optimizado para la expresión de sgRNAs en células eucariotas. Decidimos generar guías de RNA que dirigieran dCas9 a diferentes regiones del gen SMN2: río arriba del exón 7 en el intrón 6, en el propio exón 7, y río abajo en el intrón 7. Diseñamos guías para ambas hebras sentido y antisentido del DNA, y también decidimos generar RNA guías con sitio blanco a la región promotora del gen SMN2, para validar el uso convencional de esta herramienta en la activación transcripcional.

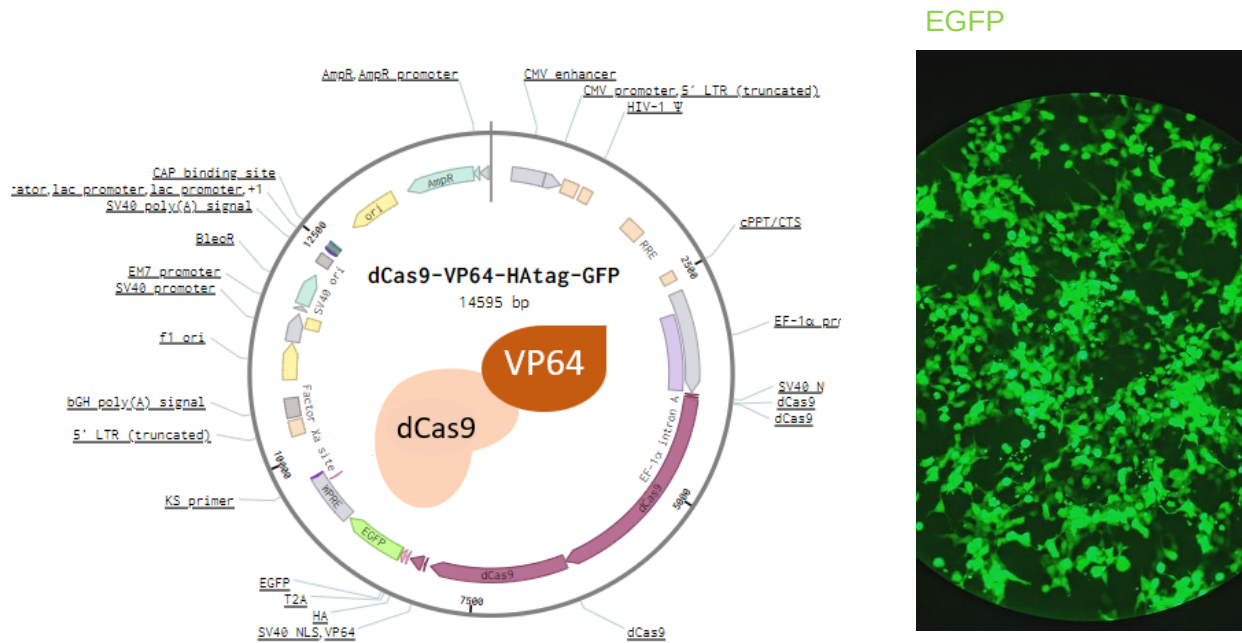
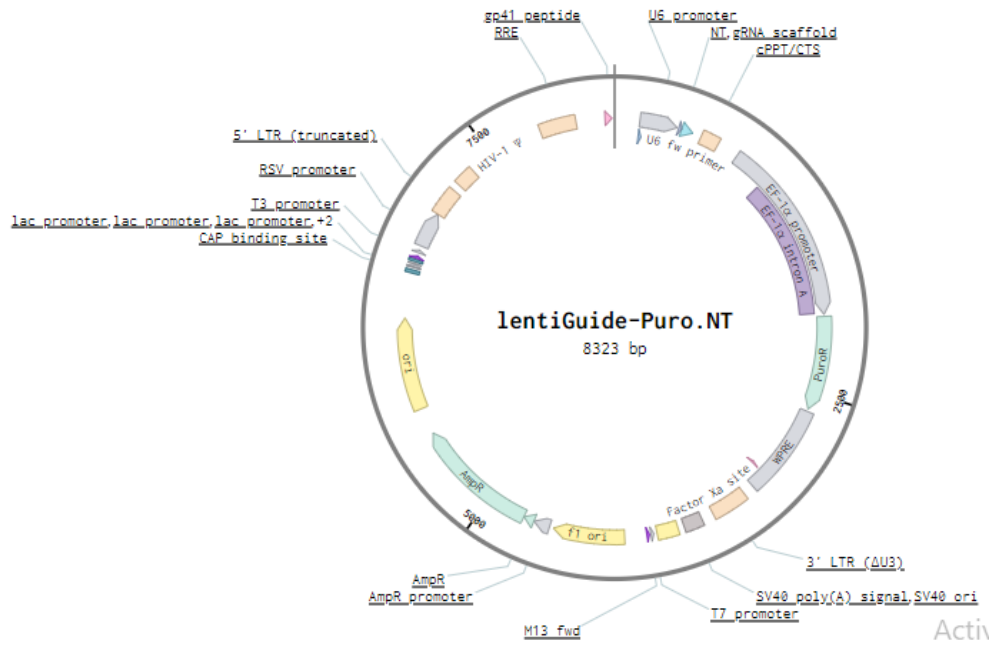


Figura R.13. Esquema del plásmido de transfección dCas9-VP64 y su expresión transitoria en células en cultivo. A la izquierda, se muestra el plásmido dCas9-VP64-EGFP utilizado en este trabajo, con diversas anotaciones relevantes. El dominio transactivador VP64 está fusionado a la proteína dCas9, seguido por el reportero fluorescente EGFP, el cual se encuentra bajo el mismo promotor que dCas9, pero no está fusionado a esta proteína, ya que se ha incorporado un linker T2A, lo que permite que ambos genes se transcriban como una única unidad de mRNA pero se traduzcan en dos proteínas separadas. A la derecha, se presenta una imagen de la fluorescencia verde observada mediante microscopía de fluorescencia tras la transfección transitoria con el plásmido, tomada 96 horas después de la transfección. Esta imagen es un ejemplo de los controles de rutina realizados en nuestros experimentos para confirmar la expresión de la herramienta de dCas9-VP64.



Dead Cas9 (dCas9)-VP64 strategy

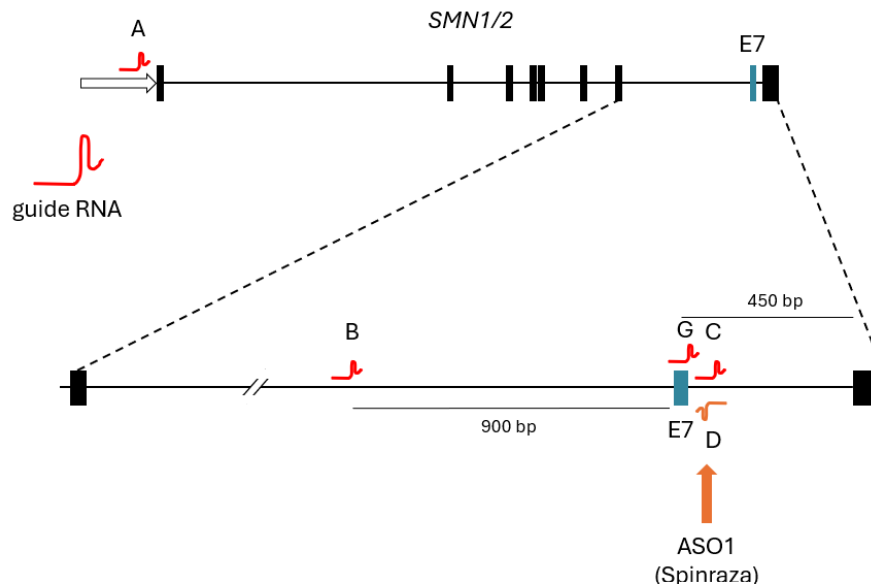


Figura R.14. Esquema del plásmido para la construcción de guías y representación esquemática de los sitios blanco de las guías diseñadas para dirigir la estrategia de dCas9-VP64 al gen SMN2

En la parte superior, se muestra el plásmido LentiGuide-Puro, proveniente del laboratorio de Zhang, con sus respectivas anotaciones utilizadas para la construcción de las guías. En la parte inferior, se presenta una representación esquemática del gen completo SMN2, junto con una ampliación de la región de interés en torno al evento de splicing del exón 7. Se diseñaron sgRNAs para dirigir dCas9-VP64 a regiones específicas: río arriba del exón 7 (B) (en el intrón 6), dentro del exón 7 (G) y río abajo (C y D) (en el intrón 7). Los sgRNAs abarcan ambos sentidos de la cadena de DNA, y se incluyeron guías dirigidas al promotor de SMN2 (A).

12. Confirmación de la especificidad de CRISPR-dCas9 dirigido con RNAs guía al sitio blanco.

En primer lugar, investigamos la especificidad de la estrategia con dCas9. Para ello, realizamos un experimento de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-qPCR) utilizando un anticuerpo que reconoce Cas9. Tal como se observa en la figura R.15, tras el tratamiento con dCas9 y una guía específica (denominada Guía B), cuyo sitio blanco se localiza en el intrón 6 de *SMN2* (aproximadamente 900 pb río arriba del exón 7) se detecta un marcado pico de señal de Cas9 en la región correspondiente al blanco de dicho gRNA. No se observaron picos significativos de Cas9 en otras regiones del gen *SMN2*. Como control usamos un RNA guía non-targeting (Guía NT), cuya secuencia no tiene sitio blanco en el genoma humano y, por lo tanto, no dirige la dCas9 a la cromatina.

Estos resultados demuestran la especificidad de esta herramienta para dirigir dCas9 a loci de interés de manera precisa, lo que representa un enfoque más específico en comparación con el tratamiento con VPA descrito previamente.

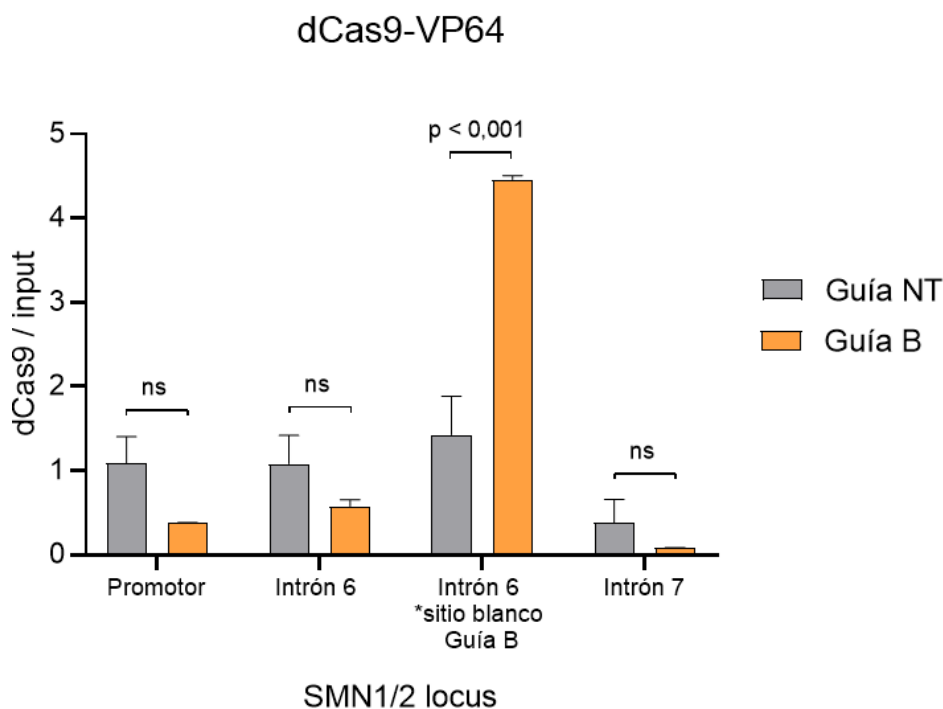


Figura R.15. Confirmación de la especificidad de CRISPR-dCas9 en el sitio blanco de *SMN2*.

Se muestra un ensayo de ChIP-qPCR con anticuerpo anti-Cas9, cuya señal se normalizó respecto al input. Se comparan los tratamientos con dCas9-VP64 y una guía de control "non targeting" (NT, en gris) y la guía específica (Guía B, en naranja). La secuencia blanco de Guía B se localiza en el intrón 6, aproximadamente 900 pb río arriba del exón 7 en *SMN2*. Se observa un pico de señal en el intrón 6 con Guía B, mientras que no se observan picos significativos en otras regiones del gen. Estos resultados confirman la precisión de dCas9-VP64 al dirigir la actividad a un sitio blanco específico mediante Guía B, en comparación con la Guía NT. Las células fueron transfectadas con plásmidos correspondientes durante 96 horas. N = 2 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico se realizó empleando un Anova de dos factores.

13. Potenciación de la inclusión de *SMN2* E7 tras el tratamiento combinado de ASO1 y dCas9-VP64.

A continuación, nos propusimos investigar los efectos de dirigir dCas9-VP64 al gen *SMN2* sobre el splicing del exón 7 (E7). Para validar estos efectos, utilizamos varios RNAs guía específicos: uno dirigido al intrón 6 de *SMN2* (guía B, Figura R.16a), otro dirigido al intrón 7 en la hebra sentido, superpuesta a la secuencia complementaria al blanco del ASO1 (guía C, Figura R.16b), y un RNA guía que se superpone con la secuencia blanco del ASO1 en la hebra antisentido (guía D, Figura R.16c). En los tres experimentos empleamos un RNA guía non-targeting (Guía NT) como control negativo.

Observamos que la expresión de dCas9-VP64 sola, direccionada con varios RNAs guía no fue suficiente para promover la inclusión de E7 en el mRNA de *SMN2*, mientras que el tratamiento con ASO1 solo incrementó significativamente dicha inclusión. Sin embargo, en el tratamiento combinado, el direccionamiento específico de dCas9-VP64 incrementó significativamente el nivel de inclusión de E7 causado por ASO1, en comparación con cada tratamiento de forma individual. Este resultado sugiere un efecto sinérgico sobre el splicing del exón 7 de *SMN2*, distinto del efecto aditivo descrito previamente en Marasco *et al.* (2022) con VPA.

Resulta interesante destacar que, en el caso de la Guía B, el tratamiento en ausencia de ASO1 ejerza un pequeño efecto inhibitorio en el splicing de E7. Especulamos que la dCas9 podría enmascarar la secuencia al unirse a la cromatina, bloqueando así el acceso de algún factor de transcripción o de splicing de este evento en cuestión. Estos resultados subrayan la relevancia de la modulación cromatínica dirigida para potenciar los tratamientos con ASO1 y su impacto en la inclusión del exón 7 de *SMN2*.

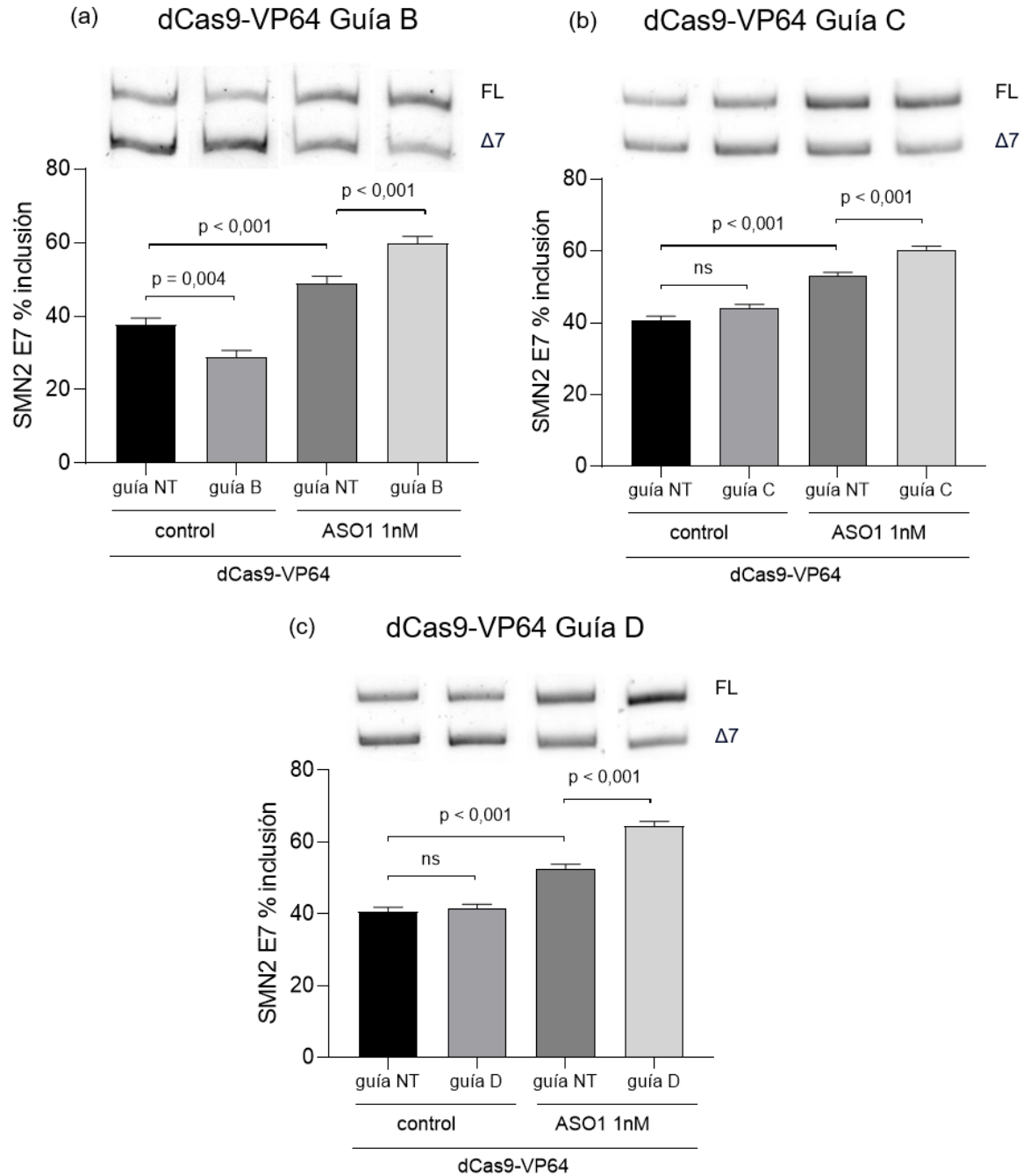


Figura R.16. Potenciación del efecto del ASO1 sobre la inclusión del exón 7 de SMN2 mediante la estrategia dirigida con dCas9-VP64.

Se muestra un análisis por RT-PCR de punto final para evaluar el splicing del exón 7 (E7) de SMN2. En el eje y, se representa el porcentaje de inclusión del exón 7, mientras que en el eje x, se indican las distintas condiciones de tratamiento. Se utilizó dCas9-VP64 en combinación con varias guías específicas: (a) Guía B, dirigida al intrón 6; (b) Guía C, dirigida al intrón 7 en la hebra sentido, superpuesta a la secuencia complementaria al blanco del ASO; y (c) Guía D, superpuesta al blanco del ASO1 en la hebra antisentido. Como control, se empleó una guía non-targeting (NT), que no presenta blanco en el genoma humano. En todas las condiciones se observa un efecto sinérgico entre la combinación de guías específicas y ASO1 a una concentración final de 1nM en potenciar el efecto en la inclusión del E7 de SMN2. Las células fueron transfectadas con los plásmidos correspondientes durante 96 horas y con ASO1 durante 72 horas. N=3 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey.

14. Combinaciones de guías de RNA para dirigir la dCas9-VP64 a múltiples regiones del gen *SMN2* potencian la inclusión del E7 promovida por ASO1

En el siguiente paso de la investigación, decidimos explorar los efectos de agrupar RNAs guía que dirigen dCas9-VP64 a diversos sitios cercanos de manera simultánea, con el fin de investigar si el reclutamiento de más dCas9-VP64 alrededor de nuestro sitio de interés (*SMN2* E7) produciría un efecto más fuerte en la inclusión del exón 7 de *SMN2* que el observado con guías individuales. La lógica detrás de esta estrategia radica en que, al emplear múltiples RNAs guía, se podría reclutar una mayor cantidad de dCas9-VP64 y, en consecuencia, obtener un efecto más pronunciado.

Efectivamente, al transfectar la misma cantidad total de RNA guía, pero distribuyéndola entre varias secuencias, un “Pool Exon 7” (Figura R.17a), conformado por las guías C y D (dirigidas al intrón 7) y la guía G (con blanco en el exón 7), observamos que la combinación de estas guías junto con el tratamiento con ASO1 desencadenó el efecto potenciador más fuerte registrado hasta el momento en la inclusión de *SMN2* E7 usando esta estrategia de CRISPR/dCas9-VP64 (Figura R.17b).

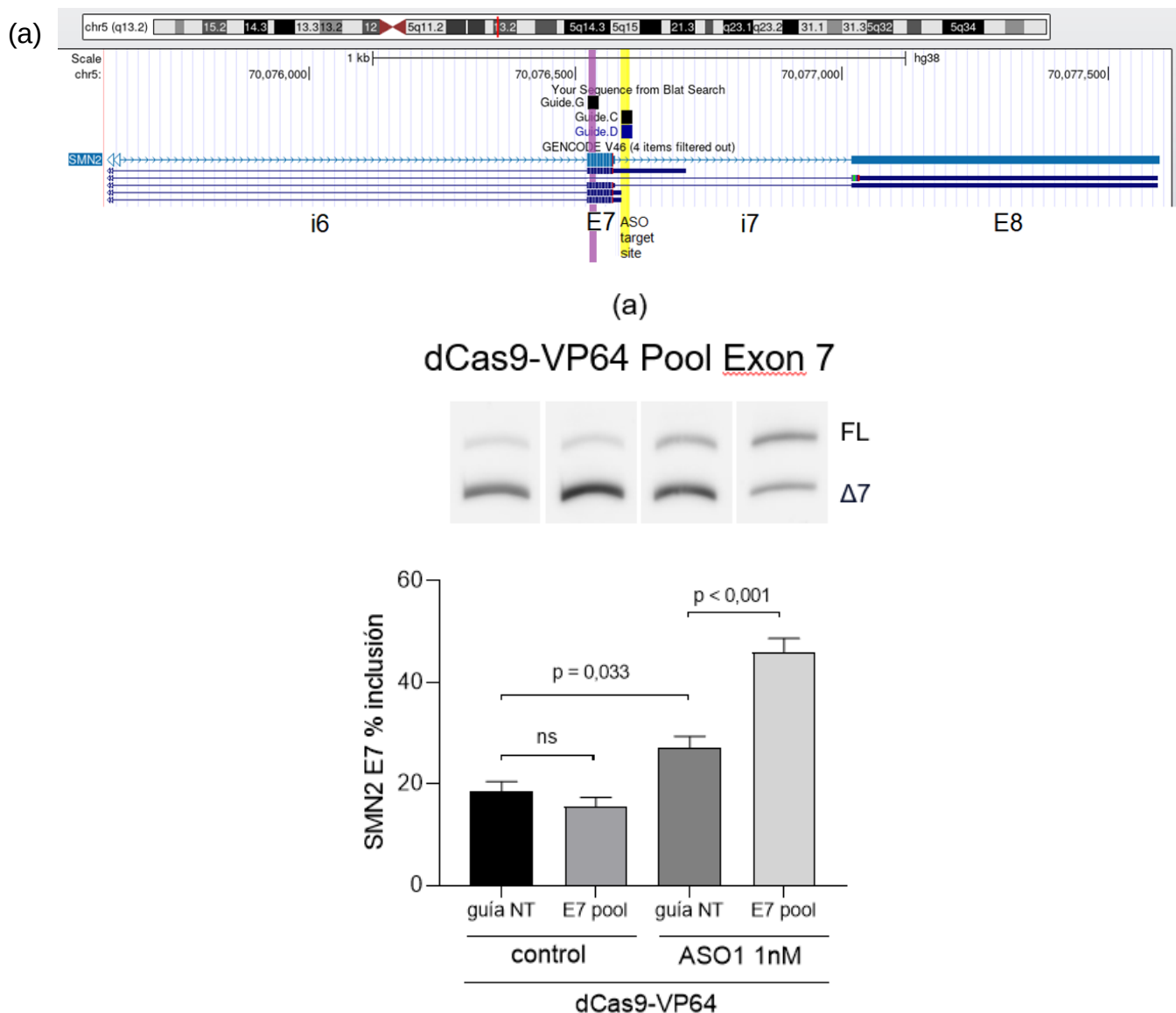


Figura R.17. Pool de RNAs guía dirigidas al Exon 7 de SMN2 potencia el efecto del ASO1 sobre la inclusión del exón 7.

(a) Representación esquemática de los sitios blanco del Pool E7 en SMN2, obtenida del UCSC Genome Browser. Para potenciar la inclusión del exón 7 de SMN2, se agruparon RNAs guía dirigidos a varias regiones alrededor del exón 7, con el objetivo de reclutar una mayor cantidad de dCas9-VP64 al sitio de interés.

(b) Análisis por RT-PCR de punto final utilizando el Exon 7 Pool (compuesto por guías C, D y G) o una guía de control non-targeting (NT), en combinación con el ASO1 o control a una concentración final de 1nM por 72 horas. Las células fueron transfectadas con plásmidos durante 96 horas y con ASO1 durante 72 horas. En la parte superior, se muestran recortes de las bandas correspondientes a los productos de PCR para la inclusión y exclusión del exón 7; en la parte inferior, se presenta su cuantificación. Se observa un efecto potenciador en la inclusión de E7, superior al observado previamente en experimentos con guías individuales. N=3 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey.

15. El efecto sobre el splicing del direccionamiento de dCas9-VP64 es debido a la acetilación de histonas

En el próximo paso de nuestra investigación, nos propusimos evaluar si la abolición de la acetilación de histonas mediante la inhibición de acetiltransferasas endógenas con el inhibidor selectivo CBP30 podría eliminar los efectos combinatorios del tratamiento con dCas9-VP64 y ASO1. La racionalidad detrás del uso de este inhibidor de P300 radica en que se ha descrito que, entre los factores reclutados por dCas9-VP64, se encuentra la acetiltransferasa de histonas P300 (Konermann *et al.*, 2015).

En la Figura R.18a, se observa la inclusión del exón 7 de *SMN2* tras la estrategia de dCas9-VP64, utilizando una guía control non-targeting (NT) o el Pool E7 de guías de RNA, con y sin tratamiento con ASO1, todo en presencia de DMSO, el vehículo control del inhibidor CBP30. En ausencia de CBP30, el Pool E7 ejerce un efecto sinérgico con el tratamiento con ASO1, como se ha observado en experimentos previos, potenciando la inclusión del exón 7 de *SMN2* (Figura R.18a). Sin embargo, en presencia del inhibidor de P300, dicho efecto sinérgico se pierde (Figura R.18b).

Estos resultados indican que el efecto de VP64 sobre el splicing alternativo del E7 de *SMN2* es debido a su capacidad de promover la acetilación de histonas y no a la activación transcripcional debida al reclutamiento de otros factores que no promueven acetilación. Como control de estos experimentos, en la Figura R.18c, se observa una disminución en las marcas de acetilación global de histonas a nivel proteico tras el tratamiento con el inhibidor selectivo de P300, y en particular de la acetilación de la lisina 27 de la histona H3, blanco característico de P300.

En conjunto, estos resultados subrayan la importancia de la acetilación mediada por acetiltransferasas como P300 en el mantenimiento del estado cromatínico que contribuye al potenciamiento del tratamiento combinado sobre el evento de splicing alternativo del exón 7 de *SMN2*.

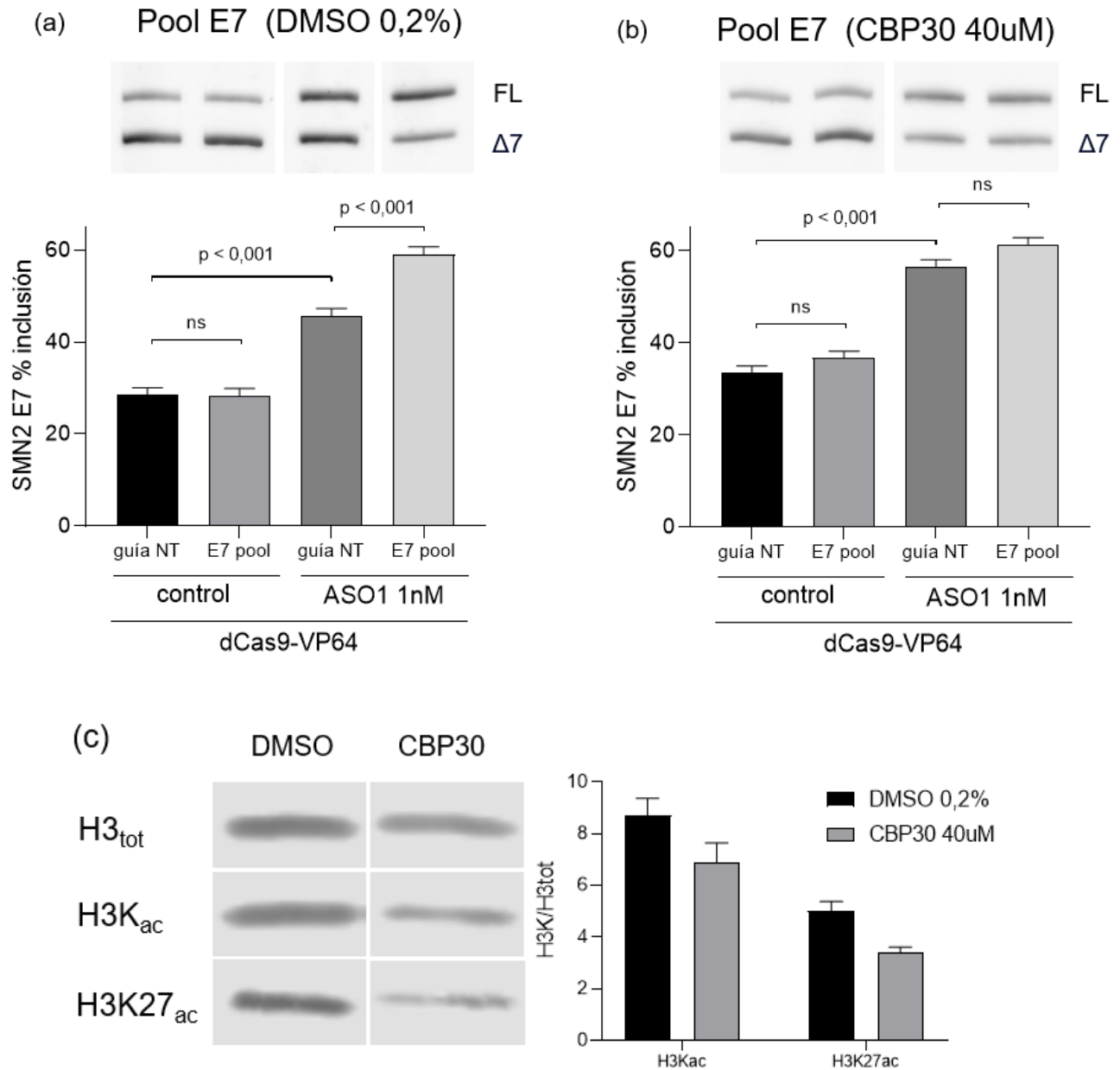


Figura R.18. La inhibición de la acetilación mediante inhibidores selectivos de acetiltransferasas, como CBP30, bloquea el efecto potenciador de la estrategia dCas9-VP64 en combinación con el ASO1 y genera cambios cromatínicos globales

Cuantificación mediante RT-PCR de punto final de la inclusión del exón 7 de SMN2. (a) Células tratadas con dCas9-VP64, utilizando la guía NT o el Pool E7, con y sin ASO1 (1nM), en presencia de 0.2% DMSO. Las células fueron transfectadas con plásmidos durante 96 horas y con ASO1 durante 72 horas. (b) Las mismas condiciones experimentales, pero con el inhibidor selectivo de p300 CBP30 a una concentración de 40 μ M. Se observa un efecto sinérgico entre Pool E7 + ASO1 en la inclusión del exón 7 en la figura (a), el cual se pierde en presencia de CBP30 (b), resaltando el papel crítico de las acetiltransferasas en este proceso. (c) Recorte de western blot (izquierda) y su cuantificación (derecha) tras el tratamiento con el inhibidor CBP30 o el vehículo control (DMSO 0.2%). Los resultados muestran una disminución en los niveles globales de H3Kac bajo el tratamiento con el inhibidor, con una reducción específica en la marca H3K27ac, la cual está asociada con la actividad de p300 y enhancers N=3 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey.

16. Direccionamiento de dCas9-VP64 al promotor

Posteriormente, decidimos investigar si el direccionamiento de dCas9-VP64 a la región promotora mediante RNAs guía podría también potenciar la inclusión de E7, teniendo en cuenta que la estrategia CRISPRa se utiliza normalmente para activación transcripcional al direccionar la dCas9-VP64 a regiones promotoras. En la Figura R.19a se muestra el “Pro Pool” de RNAs guía diseñados para varias zonas cercanas al sitio de inicio de la transcripción (TSS). En la figura R.19b se observa que, incluso sin ASO1, el Pro Pool incrementa la inclusión de E7 de *SMN2*. Asimismo, se observa un efecto adicional cuando se combina con el tratamiento con ASO1, como sucede con el Pool E7 (Figura R.18).

Resulta interesante notar que, en el caso del direccionamiento al promotor (Figura R.19), se observa una tendencia similar a la descrita para el tratamiento con VPA en trabajos anteriores (Marasco *et al.*, 2022) en cuanto a la inclusión del E7 de *SMN2*. En este experimento, la dCas9-VP64 dirigida al promotor ejerce un efecto por sí sola y en combinación con ASO1 se genera un efecto aditivo. Esto sugiere que la modificación del estado cromatínico en la región promotora puede influir indirectamente en el procesamiento del RNA transcripto. Este impacto podría manifestarse mediante la alteración de la velocidad de elongación y el reclutamiento de factores de transcripción y splicing, de forma distinta o complementaria a la que se logra al dirigir la dCas9-VP64 a la región cercana al exón 7.

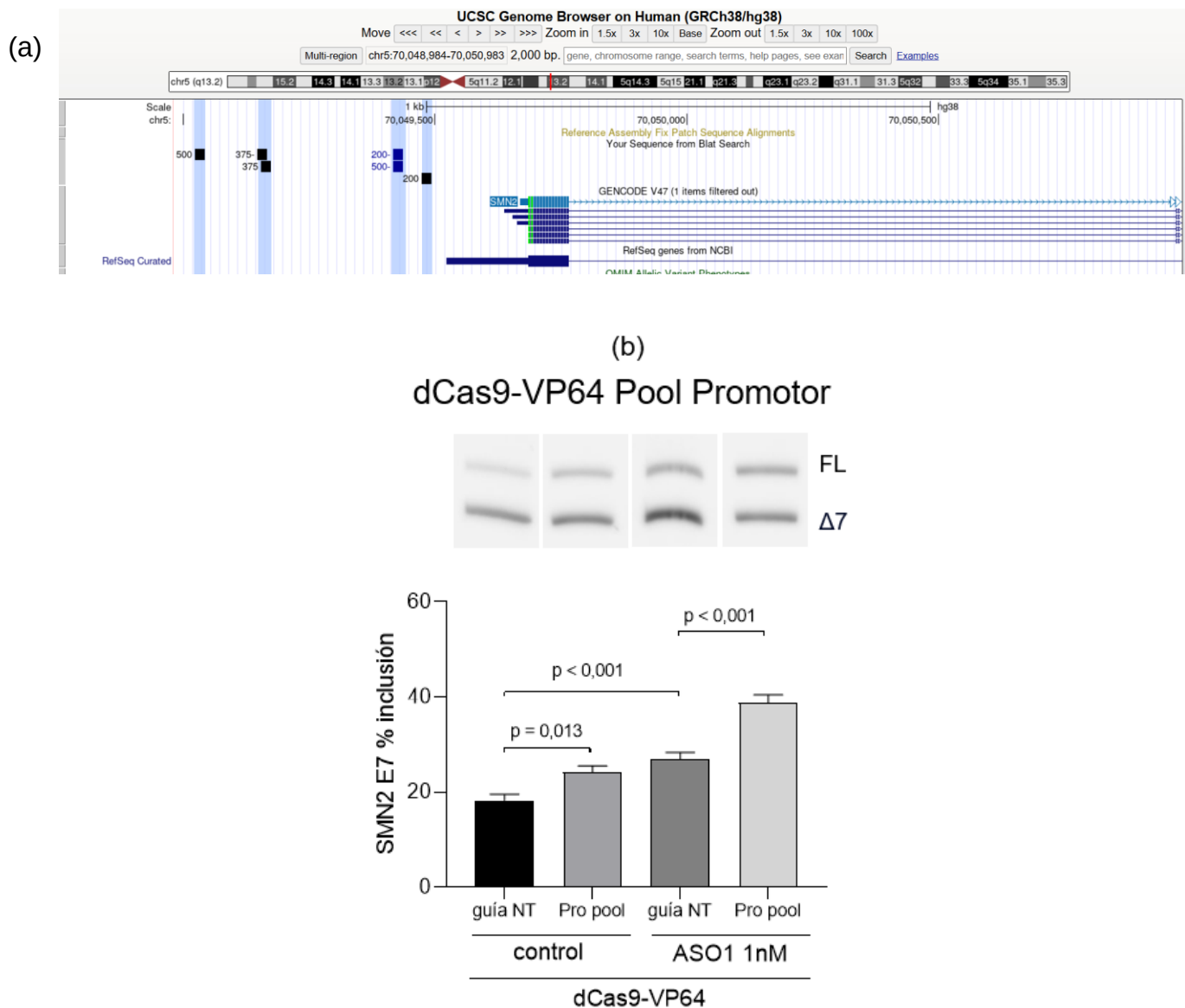


Figura R.19. Pool de RNAs guía dirigidas al promotor de SMN2 potencia el efecto del ASO1 sobre la inclusión del exón 7 (a) Representación esquemática de los sitios blanco del Pro Pool en SMN2 (guías 200+, 200-, 375+, 375-, 500+, 500- donde los números representan las coordenadas del sitio blanco respecto al TSS de SMN2), obtenida del UCSC Genome Browser. Para potenciar la inclusión del exón 7 de SMN2, se agruparon RNAs guía dirigidos a varias regiones alrededor de la zona promotora, con el fin de lograr un mayor reclutamiento de dCas9. (b) RT-PCR punto final del experimento usando el pool de guías direccionadas al promotor de SMN2. El Pro Pool en combinación con el ASO1 a una concentración final de 1nM, mostró un efecto potenciador significativo en la inclusión de E7, además de evidenciar un efecto potenciador por sí solo. Las células fueron transfectadas con plásmidos durante 96 horas y con ASO1 durante 72 horas. N=3 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey.

17. Direccionamiento de dCas9-VP64 e inhibición de la inclusión de SMN2 E7 por ASO2

Como se mencionó previamente, el ASO2 es un oligonucleótido antisentido (ASO) cuyo sitio blanco se encuentra río abajo del sitio blanco del ASO1 (Spinraza/nusinersen), sin superponerse con la secuencia de unión de hnRNPA1/A2. Este sitio blanco, localizado en el intrón 7 de *SMN2*, genera el mismo efecto represivo a nivel cromatínico que el ASO1 sin el desplazamiento de hnRNPA1/A2 y resulta en una inhibición de la inclusión del exón 7 de *SMN2* (Marasco *et al.*, 2022; Figuras R.2e y R.10a). La utilización de este segundo ASO, ASO2, tiene como objetivo desacoplar los efectos de los ASOs sobre el RNA de aquéllos sobre la cromatina, permitiendo una caracterización más detallada de los mecanismos cromatínicos asociados al uso de ASOs. En el siguiente experimento quisimos investigar si nuestra estrategia de CRISPR-dCas9-VP64 podría revertir los efectos inhibitorios del ASO2 sobre el splicing de *SMN2* E7 como esperado en el caso del tratamiento con HDACi's como VPA.

En la Figura R.20a comprobamos que el tratamiento con VPA aumenta la inclusión de *SMN2* E7, el ASO2 la inhibe, y en combinación estos tratamientos se anulan para restaurar la inclusión de E7 a los niveles basales. En la Figura R.20b, se observa que con nuestra estrategia de dCas9-VP64 y un solo RNA guía que dirige cercana al exón 7 de *SMN2* (Guía B), obtenemos efectos parecidos al experimento con VPA mostrado en la Figura 20a. La guía B por si sola, a diferencia del VPA, en este caso no genera un efecto significativo sobre la inclusión del exón 7 de *SMN2*, pero sí en combinación con el ASO2, donde restaura los niveles basales de inclusión, contrarrestando los efectos inhibitorios del ASO2. Estos resultados respaldan el uso de la estrategia dirigida de dCas9-VP64 para mitigar los efectos cromatínicos del tratamiento con ASOs que promuevan metilación de histonas y, por lo tanto, mejorar la inclusión de *SMN2* E7.

Cabe destacar que en experimentos previos se observó que el direccionamiento de dCas9-VP64 mediante la guía dirigida cercana al E7, guía B, generó una pequeña pero significativa disminución en el splicing de *SMN2* E7 *per se*, requiriéndose su combinación con ASO1 para potenciar la inclusión del exón. En contraste, en este experimento se observa que el direccionamiento de la dCas9-VP64 con la misma guía no generó cambios significativos en la inclusión de *SMN2* E7 de forma independiente. Pensamos que esta variabilidad en los efectos de dCas9-VP64 *per se* puede deberse a pequeñas variaciones en las condiciones experimentales (por ejemplo, eficiencia de transfección, niveles de expresión o estado cromatínico basal) que permitan que estas diferencias marginales alcancen un umbral suficiente para influir en el splicing de manera significativa.

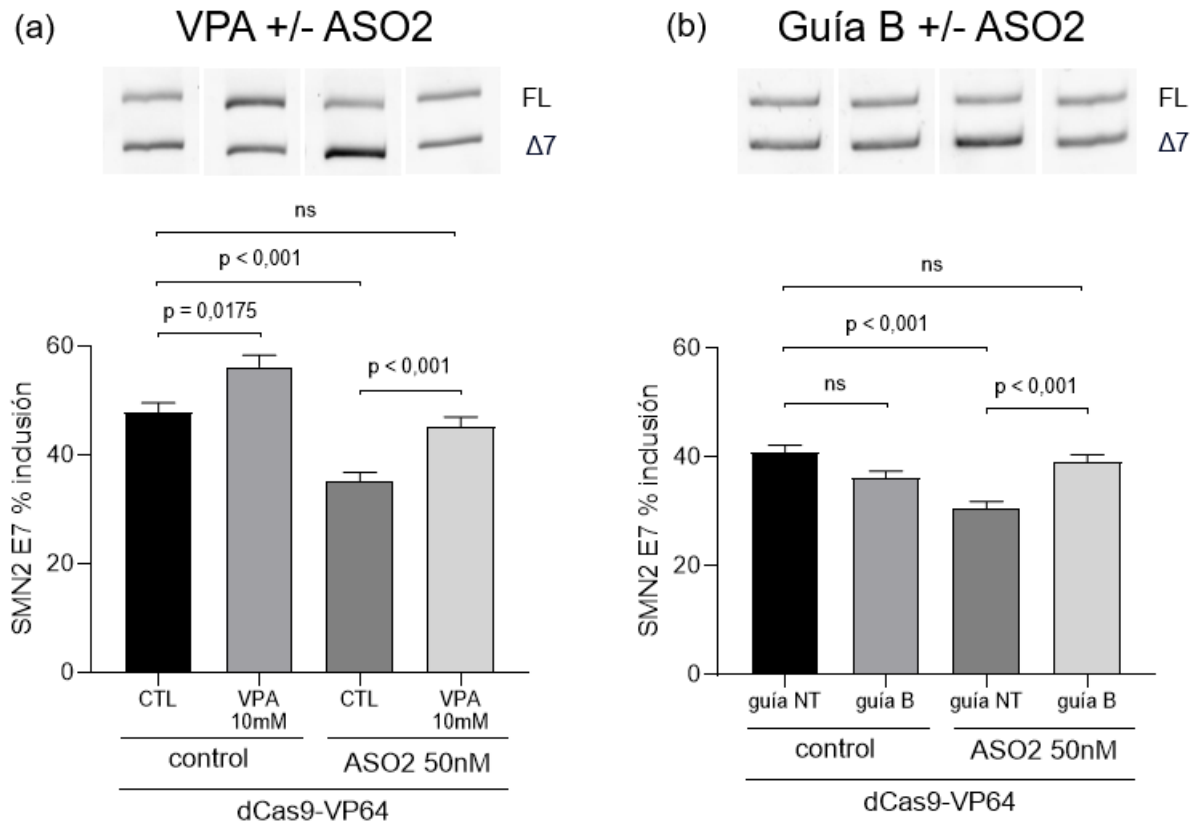


Figura R.20. La estrategia con VPA y dCas9-VP64 revierte los efectos inhibitorios del ASO2 sobre la inclusión del exón 7 de SMN2.

Se presenta un análisis por RT-PCR de punto final del evento de splicing de SMN2 E7. Las imágenes superiores muestran las bandas correspondientes a la inclusión (FL) y exclusión del exón 7 ($\Delta 7$), y en la parte inferior se observa su cuantificación. (a) El tratamiento con VPA a 10mM por 24 horas incrementa la inclusión de SMN2 E7, mientras que el ASO2 a una concentración final de 50nM la inhibe. La combinación de ambos tratamientos restaura la inclusión del E7 a niveles basales. Las células fueron transfectadas con ASO2 o control durante 72 horas. (b) Estrategia de dCas9-VP64 y una única guía de RNA (guía B) versus una guía non targeting (guía NT). No se observa un efecto con la guía B por si sola, se observa una inhibición de la inclusión con el ASO2 a 50nM por si solo y la combinación de ASO2 y guía b restauran los niveles basales de inclusión del E7 como observado en el caso del VPA. Las células fueron transfectadas con plásmidos durante 96 horas, con ASO1 durante 72 horas y tratadas con VPA por 24 horas. N=3 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores con distribución beta seguido de un test de Tukey.

18. Investigación del estado de la cromatina tras el tratamiento con dCas9-VP64

El siguiente paso en nuestra investigación fue corroborar los cambios cromatinicos específicos del gen de *SMN2* tras la estrategia de direccionamiento de dCas9-VP64. Para esto, realizamos un experimento de inmunoprecipitación de cromatina seguido de qPCR (ChIP-qPCR) utilizando un anticuerpo que reconoce varias marcas de acetilación de H3 (H3 acetil K9 + K14 + K18 + K23 + K27). Utilizamos la Guía B con sitio blanco cercano al E7 de *SMN2* y una guía non-targeting en presencia y ausencia de tratamiento con ASO1.

En la Figura R.21a, se observan niveles más altos de marcas de H3Kac en el intrón 7 de *SMN2*, en una región próxima al sitio blanco de la guía B y el ASO, tras la expresión de dCas9-VP64 junto con la guía específica B, en comparación con las células tratadas con una guía non-targeting (NT). En la Figura R.21b, se muestran los niveles de H3Kac en la región promotora del gen *SMN2*. Es interesante notar que el direccionamiento de dCas9-VP64 con la guía B también aumenta la acetilación en esta región. En contraste, el tratamiento con el ASO1 no tiene efecto significativo sobre la acetilación de esta marca *per se*, pero en el tratamiento combinado con ASO1 anula el aumento de acetilación observado con la guía B. La Figura R.21c muestra el patrón de acetilación en un gen no relacionado con el evento de splicing de interés, *MYOD*, tras el tratamiento con la estrategia de dCas9-VP64. Se confirma que no hay cambios significativos en la acetilación de histonas en este gen, lo que sugiere que el efecto del tratamiento es específico para las modificaciones de cromatina en *SMN2*.

Por otro lado, las Figuras R.20d y R.20e presentan el patrón de acetilación en el intrón 7 y en el promotor de *SMN2* tras el tratamiento con VPA, permitiendo comparar los perfiles de acetilación de esta estrategia general con la estrategia específica basada en dCas9-VP64. Los resultados indican que, como en la estrategia de dCas9-VP64, el VPA también aumenta la acetilación de H3Kac en estas regiones.

Estos experimentos demuestran que el direccionamiento de dCas9-VP64 al gen *SMN2* induce la deposición de marcas de histonas asociadas con una conformación de cromatina abierta. Es particularmente interesante que, según el análisis por ChIP-qPCR, la deposición de esta marca se extiende más allá del sitio blanco de la guía utilizada. Se observan niveles más altos de H3Kac tanto en la región de splicing de *SMN2* E7 como en su promotor, lo que plantea el interrogante de cómo los efectos de esta estrategia específica pueden extenderse cromatínicamente hasta el promotor del gen.

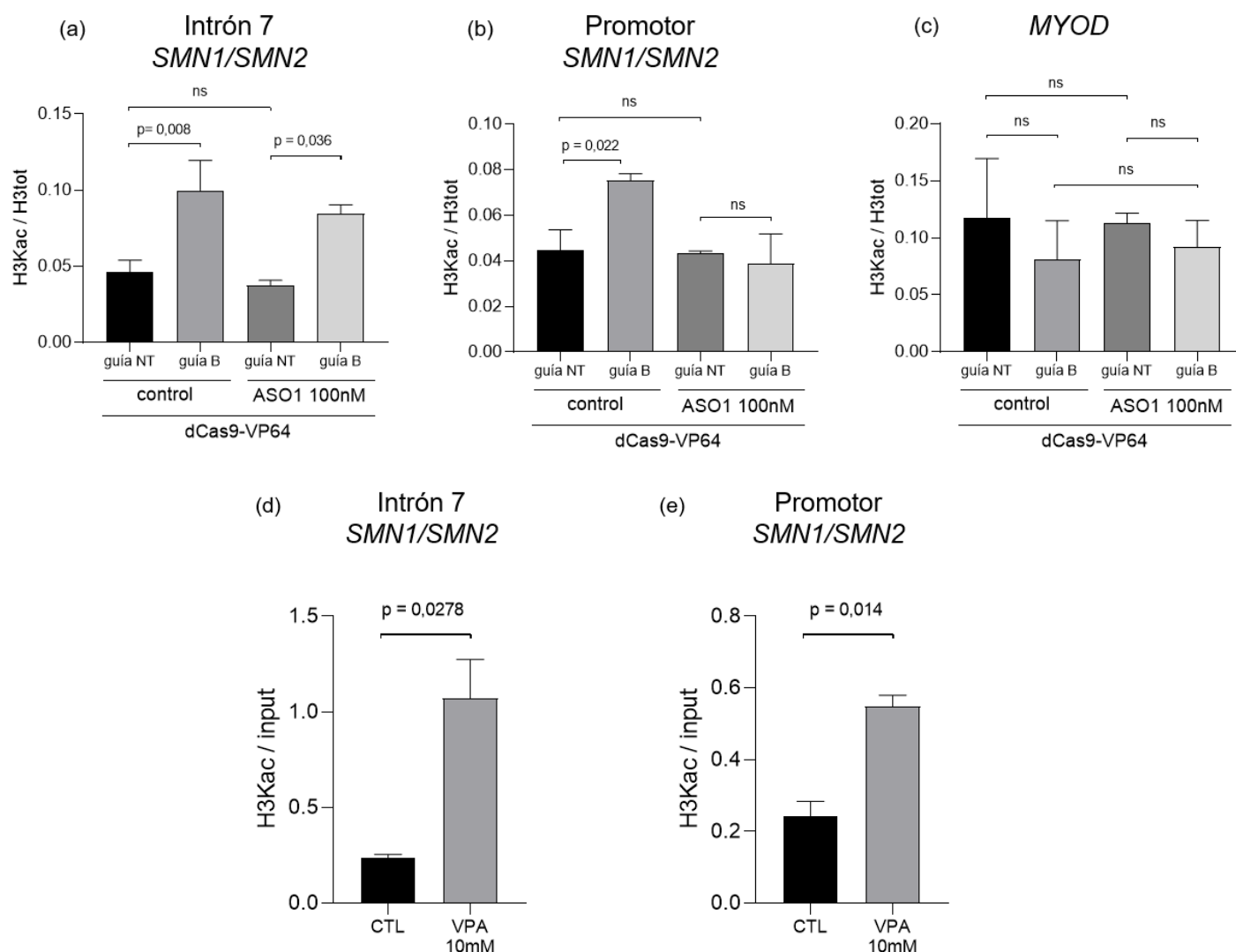


Figura R.21. La estrategia de dCas9-VP64 induce cambios cromatínicos asociados a un estado más abierto.

ChIP-qPCR con anticuerpo anti-H3Kac, que reconoce múltiples marcas de acetilación en la histona 3 (H3K9, K14, K18, K23 y K27), (a) en la región de splicing del intrón 7 de SMN2 en células tratadas con dCas9-VP64, utilizando la guía B o una guía non-targeting (NT), en presencia y ausencia de ASO1 a una concentración final de 100nM. Se observa un incremento de H3Kac en esta región con la guía B en comparación con la guía NT, y una leve disminución tras el tratamiento con ASO1.

(b) analizando la región promotora de SMN2. Se observa un aumento de H3Kac tras el tratamiento con dCas9-VP64 y la guía B. No se detecta un efecto sobre la acetilación con el ASO (guía NT + ASO1), mientras que la combinación de guía B + ASO1 anula el aumento de acetilación inducido por la guía B.

(c) Señal de H3Kac en el gen no relacionado MYOD, donde no se detectan cambios significativos, lo que confirma la especificidad de la estrategia dCas9-VP64 para el gen SMN2.

(a)(b) y (c) Las células fueron transfectadas con plásmidos durante 96 horas y con ASO1 durante 72 horas. N=3 réplicas biológicas, barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante un ANOVA de dos factores seguido de un test de Tukey.

(d) ChIP-qPCR en células tratadas con VPA 10mM o control, por 24 horas, analizando la región del intrón 7 de SMN2. Se observa un aumento de H3Kac tras el tratamiento con VPA, similar al observado con dCas9-VP64 y guías dirigidas al sitio blanco.

(e) ChIP-qPCR del mismo experimento que en (d), evaluando la región promotora de SMN2. Se observa un aumento en H3Kac tras el tratamiento con VPA. N = 2 réplicas biológicas; las barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante un t-test de una cola para muestras independientes.

19. Efectos de HDACi's y ASOs sobre la actividad del promotor del gen *SMN2*

La siguiente pregunta que surgió en base a nuestros resultados fue investigar cuales son los efectos de la activación transcripcional y su relación con la inclusión de *SMN2* E7 en respuesta a nuestras varias estrategias descritas en este trabajo. Esta pregunta surge del hecho que al sistema CRISPRa, como se mencionó antes, se lo utiliza normalmente para dirigirlo a regiones promotoras y activar la transcripción, a diferencia del uso que se le ha dado en este proyecto, donde nos enfocamos en dirigir regiones intragénicas alejadas del TSS para modular la cromatina con fines de modificar el splicing alternativo.

Para comenzar, investigamos los efectos en la activación transcripcional tras el tratamiento con ASO1 y VPA (Figura R.22). Utilizando pre-mRNA como indicador de activación transcripcional, observamos cómo estos tratamientos cambian la abundancia de pre-mRNA (no procesado) a través de qPCR, empleando primers que se unen a los límites exón 1-intrón 1, tratando nuestro RNA con DNasa y usando controles adecuados para eliminar la contaminación de DNA de nuestros resultados. A concentraciones suficientes para tener efectos sobre el splicing alternativo del E7 (1 nM), el ASO1 no produce cambios en la activación del promotor. Por el contrario, el tratamiento con VPA, ya sea en ausencia o en presencia de ASO1, incrementa la actividad del promotor.

Estos resultados sugieren que VPA tiene un efecto activador sobre la transcripción, lo cual era esperado, pero que en estas condiciones el ASO no lo tiene. Es importante destacar que trabajos previos de Uriostegui-Arcos *et al.* (2023) observaron cambios en la expresión del gen *SMN2* tras el tratamiento con Spinraza en este evento de splicing alternativo. Sin embargo, estos autores analizaron mRNA maduro usando primers de unión exón-exón y concentraciones mucho más altas de ASOs (>200 nM). Por lo tanto, las condiciones de ambos estudios son suficientemente diferentes como para que ambas observaciones sean válidas.

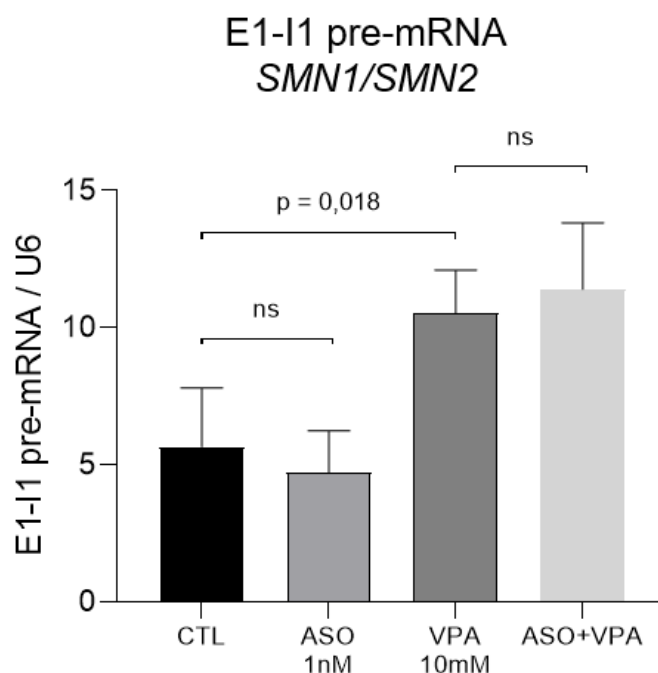


Figura R.22. El uso de HDACi aumenta la activación transcripcional del gen SMN2.

Señal de RT-qPCR del pre-mRNA de SMN2 en la unión E1-i1 sobre un gen control (U6). La cuantificación de pre-mRNA permitió evaluar la activación transcripcional tras el tratamiento con ASO y VPA. A bajas concentraciones de ASO1 (1nM), suficientes para modificar el splicing, no se observaron cambios significativos en la abundancia de pre-mRNA; sin embargo, el tratamiento con VPA a 10mM mostró un aumento significativo en el pre-mRNA, sugiriendo un efecto de activación del promotor de SMN2. Las células fueron transfectadas con ASO1 durante 72 horas y tratadas con VPA durante 24 horas N = 4 réplicas biológicas; las barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante un ANOVA de dos factores seguido de un test de Tukey.

20. Activación del promotor del gen SMN2 por el direccionamiento de dCas9-VP64 al mismo y a la región del E7

El próximo paso de nuestra investigación fue evaluar si la estrategia de CRISPR-dCas9 podía activar la transcripción, aumentando los niveles de pre-mRNA de SMN2. Para eso, utilizamos guías con sitio blanco en la región promotora ("Pro Pool") y también dirigimos la dCas9-VP64 al exón 7 mediante el "E7 Pool" de RNAs guía. Mediante RT-qPCR, observamos en las Figuras R.23a y R.23b que tanto el direccionamiento a la región promotora de SMN2 como al exón 7 aumentó los niveles de pre-mRNA de SMN2, lo cual es consistente con la activación de la transcripción y con los resultados obtenidos en experimentos previos.

Estos resultados sugieren que la modulación de la cromatina en el exón 7 podría influir en la regulación de la región promotora, lo que podría deberse a interacciones estructurales entre diferentes regiones

del gen *SMN2*. Especulamos que la región promotora (5') del gen podría estar interactuando con regiones cercanas al sitio corte y poliadenilación (pA), dado que en el caso de *SMN2*, el exón 7 se encuentra aproximadamente a 26 kpb río abajo del sitio de inicio de la transcripción (TSS), pero a sólo 1 kpb río arriba del sitio de pA.

Esta idea es consistente con el modelo de gene looping, donde podría explicar por qué un tratamiento dirigido al final del gen, que afecta el exón 7, podría influir en el promotor ubicado río arriba a aproximadamente 26 kpb (ver más abajo sección 22). Evidencias experimentales en la literatura han demostrado la existencia de estas interacciones entre las regiones 5' y 3' de los genes en la regulación transcripcional, demostrando que la formación de loops puede facilitar mayores niveles de transcripción y regular la direccionalidad de la misma (Tan-Wong *et al.*, 2012).

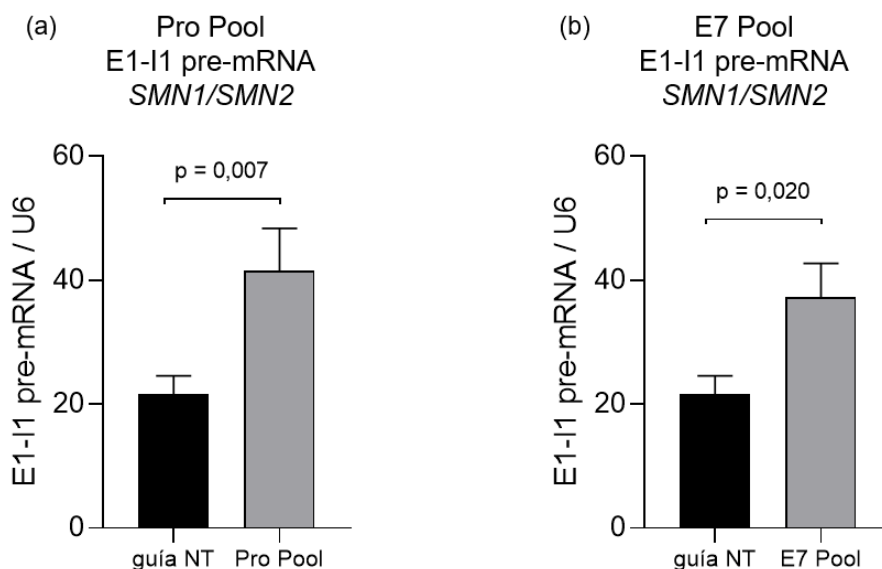


Figura R.23. La estrategia de dCas9-VP64 aumenta la activación transcripcional del gen de *SMN2*.

RT-qPCR de pre-mRNA de *SMN2* tras el direccionamiento con CRISPR-dCas9. La dCas9-VP64 fue dirigida a la región promotora de *SMN2* (a) (Pro Pool) y al exón 7 (b) (E7 Pool) usando guías específicas, o un control non targeting. Se observó un aumento en los niveles de pre-mRNA de *SMN2* en ambas estrategias, consistente con la activación del promotor, en concordancia con resultados previos. Las células fueron transfectadas con 2 ug de plásmido total en un multiwell de 12 pocillos durante 96 horas $N = 6$ réplicas biológicas; las barras de error representan el error estándar. Análisis estadístico mediante un t-test de una cola para muestras independientes.x

21. Confirmación de la especificidad de los efectos transcripcionales de estrategias dirigidas y estrategias pleiotrópicas

Finalmente, quisimos confirmar la especificidad de los efectos transcripcionales de las estrategias dirigidas y pleiotrópicas mencionadas en este trabajo. Para ello, realizamos RT-qPCR (Figura R.24) y analizamos los cambios en la expresión a nivel del RNA del gen que codifica al snRNA U6 (transcripto por la RNA polimerasa III) respecto de la expresión, también a nivel del mRNA del gen GAPDH tomado como "housekeeping gene". Nuestro razonamiento fue que un promotor de naturaleza completamente diferente al del gen *SMN2* (transcripto por la RNA polimerasa II) no debería ser afectado ni por el ASO1 ni por el sistema CRISPR dCas9-VP64, pero sí por la acetilación global producida por VPA. En efecto, observamos que todas las estrategias dirigidas, en presencia o ausencia de ASO1, no cambiaron la abundancia de RNA de U6. Sin embargo, el tratamiento VPA provocó un aumento en la expresión de U6, lo cual es consistente con la naturaleza pleiotrópica de VPA, una droga que provoca cambios globales en la estructura de la cromatina y, por ende, afecta la abundancia de mRNA de genes no relacionados.

Estos resultados corroboran que las estrategias dirigidas con dCas9-VP64 son específicas para el gen *SMN2* y no alteran la transcripción de genes no relacionados, mientras que el tratamiento con VPA, debido a sus efectos globales, puede influir en la transcripción de otros genes en el genoma.

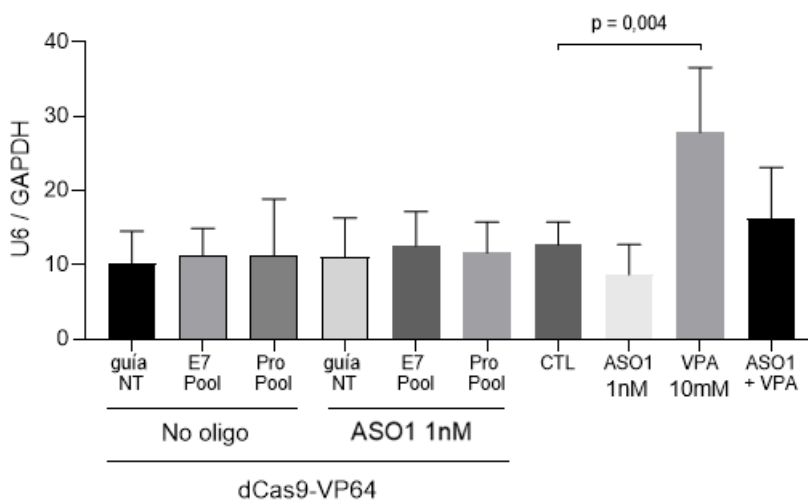


Figura R.24. Las estrategias de dCas9-VP64 no cambian la abundancia de genes no relacionados.

Expresión del promotor del gen U6 estimada por RT-qPCR de su RNA respecto de la expresión del gen GAPDH bajo diversos tratamientos. Se evaluaron VPA $\pm$ ASO1, así como la estrategia CRISPR-dCas9-VP64 $\pm$ ASO1 dirigida al E7 Pool, la guía NT de control y el Pro Pool. Se observa que las estrategias dirigidas no afectan la abundancia relativa de pre-mRNA genes no relacionado a *SMN2* (U6 vs GAPDH), mientras que VPA a una concentración de 10mM sí, consistente con su efecto pleiotrópico de este último. Las células fueron transfectadas con plásmidos durante 96 horas, con ASO1 durante 72 horas y tratadas con VPA durante 24 horas. N = 4 replicas biológicas, barras de error

22. Gene looping: Interacciones entre regiones 5' y 3' del gen *SMN2* tras el tratamiento con ASO1 y direccionamiento de la dCas9-VP64

Hasta el momento, hemos recopilado y analizado resultados previamente publicados por nuestro laboratorio junto con nuevos datos generados en esta tesis sobre los efectos cromatínicos y el splicing alternativo con relación al exón 7 de *SMN2*, al tratamiento con ASO1 y a estrategias de modulación del estado de la cromatina. En este proceso, algunas observaciones inesperadas han abierto nuevas preguntas, ampliando el alcance del estudio.

Desde el trabajo de Marasco et al. (2022) en el que demostramos que tanto el ASO1 como ASO2 inducen la deposición de marcas de metilación de histonas (H3K9me2) en su sitio blanco, ubicado en la región cercana al exón 7, observamos que esta disposición de marcas cromatínicas se extiende a lo largo del gen de *SMN2* y particularmente en la región cercana al exón 7 y en la región promotora del mismo gen. En la Figura R.3 y R.10, confirmamos este resultado, sugiriendo una posible interacción entre estas regiones lejanas. Además, estos resultados se respaldan con experimentos de ChIP-qPCR de histona acetilada (Figura R.21), donde observamos que esta marca (H3Kac), opuesta a la metilación de H3K9me2, disminuye en la región promotora en presencia de ASO cuando tratamos con la estrategia de dCas9-VP64 y la guía B con sitio blanco cercano al exón alternativo E7.

Otro resultado relevante (Figura R.23) es que el direccionamiento de dCas9-VP64 al exón 7 de *SMN2* genera una activación del promotor, localizado aproximadamente 26 kpb río arriba del sitio blanco de dCas9-VP64. A su vez, el direccionamiento de dCas9-VP64 al promotor de *SMN2* afecta la inclusión del exón 7, lo cual refuerza la hipótesis de que existen interacciones funcionales entre estas regiones distales bajo los diferentes tratamientos evaluados.

Para explorar esta hipótesis, implementamos la técnica de captura de la conformación cromosómica 3C-qPCR, que permite evaluar interacciones espaciales entre regiones distantes del genoma. Esta técnica se basa en la fijación del DNA genómico mediante *crosslinking*, seguida de digestión enzimática y ligación, lo que genera fragmentos quiméricos que reflejan contactos espaciales entre secuencias genómicas distantes.

Utilizando un primer ‘ancla’ en la región promotora de *SMN2*, interrogamos su interacción con diferentes regiones del gen, incluyendo el intrón 1, el exón 7, la región 3’ ‘*downstream*’ y una región ~2 kpb río arriba del TSS, descrita por Boda *et al.* (2012) que contiene un *enhancer* capaz de activar la transcripción de *SMN2*. En los casos donde estas regiones se encuentran en proximidad física como consecuencia de interacciones a distancia, se forman fragmentos quiméricos detectables mediante qPCR.

Tratamos células HEK293T con dCas9-VP64 bajo condiciones control (guía non-targeting) y evaluamos los efectos del tratamiento con ASO1, el pool de RNA guías con sitio blanco cercano al exón 7 (E7 Pool gRNAs) y el pool de RNA guías con sitio blanco en el promotor de *SMN2* (Pro Pool gRNAs). En la Figura 25a, se presenta el análisis 3C con un esquema del gen *SMN2* y las regiones interrogadas. En el panel superior, se observa en gris la interacción basal sin direccionamiento de la dCas9 (NT gRNA) y en violeta la interacción en presencia de ASO1. Encontramos un aumento relativo en la interacción entre el promotor y las regiones distales del gen, particularmente en la región 3’, lo que sugiere una conexión funcional entre estos elementos. Esto podría explicar por qué ASO1, cuyo blanco se encuentra hacia el 3’ del gen, promueve metilación de H3K9 en la región promotora (Figuras R.6 y R.10c). Se observa que ASO1 no promueve interacción entre el promotor y su enhancer.

En el panel intermedio, se muestran los efectos del direccionamiento de dCas9-VP64 al exón 7 (E7 Pool gRNAs, en naranja), observándose un incremento en la interacción del promotor con la región 3’ de manera significativa. Esto podría explicar por qué el direccionamiento de dCas9-VP64 al exón 7 aumenta la activación del promotor, como se muestra en la Figura R.23b.

Finalmente, en el panel inferior, evaluamos el efecto del direccionamiento de dCas9-VP64 al promotor (Pro Pool gRNAs, en azul). Aquí observamos un incremento en la interacción con la región 3’, el exón 7 y el intrón 6, lo que podría explicar por qué la activación de la región promotora puede modular splicing alternativo del E7 a larga distancia. También detectamos un aumento en la interacción con la región *enhancer* situada río arriba del promotor, lo que refuerza la idea de que la apertura de la cromatina en el promotor facilita estas interacciones, con posibles implicaciones en la regulación de la transcripción y el splicing río abajo.

En la Figura R.26, se presentan los efectos de la interacción entre el promotor y la región 3’ tras el tratamiento con dCas9-VP64 direccionado al exón 7 (E7 Pool gRNAs), en presencia y ausencia de

ASO1. Se observa que tanto el direccionamiento de dCas9-VP64 como el tratamiento con ASO1 incrementan la interacción entre el promotor y la región 3', con un efecto potenciador y altamente significativo cuando ambos tratamientos se combinan.

En conjunto, estos resultados respaldan la existencia de interacciones funcionales entre el promotor y regiones distales del gen *SMN2*, proporcionando un marco mecanístico que explica los efectos observados en la deposición de marcas epigenéticas, la regulación del splicing bajo diferentes tratamientos y la activación transcripcional.

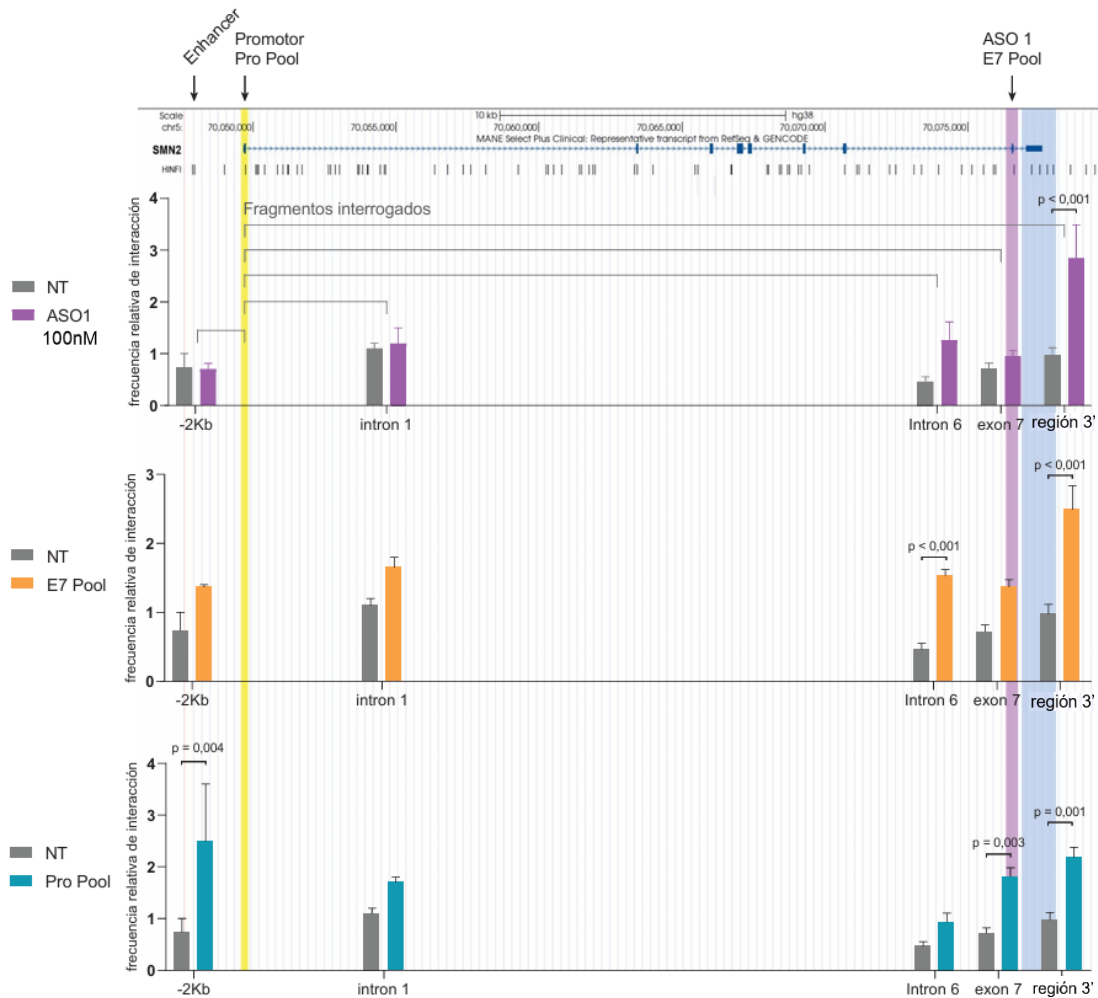


Figura R.25. Las interacciones entre el promotor de SMN2 y el resto del gen.

Análisis de 3C-qPCR En la parte superior, se muestra un recorte del UCSC Genome Browser con el gen SMN2 y sus regiones adyacentes, incluyendo 2 kpb río arriba y río abajo del gen. Los rectángulos azules representan los exones, mientras que las líneas azules con flechas indican los intrones.

Debajo de esta representación, se muestran los sitios de corte de la enzima HINFI utilizados en el experimento. En amarillo, se resalta la región ancla, correspondiente al promotor de SMN2, donde se utilizó el primer forward. Las líneas grises indican las regiones interrogadas en relación con el promotor, y los primers reverse fueron diseñados en estas regiones y combinados con la primera ancla.

En el gráfico superior, el eje Y representa la señal de 3C-qPCR expresada en términos de abundancia relativa de la quimera en comparación con un gen housekeeping que no contiene el sitio de corte HINFI. El eje X indica la posición genómica de las interacciones evaluadas. Las barras grises representan la señal obtenida en la condición control con RNA guía non-targeting (NT), mientras que las barras violetas representan la abundancia relativa de interacción tras el tratamiento con ASO1 a 100nM concentración final. Se observa que ASO1 aumenta la interacción entre el promotor y las regiones I6, E7 y la región 3', con un efecto particularmente pronunciado en esta última. No se detectan cambios significativos en la región 2 kpb río arriba del TSS de SMN2.

En el panel intermedio, se muestra el efecto del tratamiento con E7 Pool en naranja. Se observa que el direccionamiento de dCas9-VP64 a la región cercana al exón 7 de SMN2 genera un aumento en la interacción, especialmente con la región 3'. También se registran incrementos menores en la interacción entre el promotor y la región 2 kpb río arriba del TSS, así como con el intrón 1 de SMN2.

En el panel inferior, se presentan los resultados obtenidos tras el tratamiento con dCas9-VP64 y un pool de guías de RNA dirigidas al promotor de SMN2 (Pro Pool, en azul). Se observa un incremento en la interacción con las regiones I6, E7 y la región 3', así como un fuerte aumento en la región 2 kpb río arriba del TSS de SMN2 y un leve aumento en el intrón 1. Las células fueron transfectadas con ASO1 durante 72 horas y con plásmidos correspondientes durante 96 horas. N = 1 replica biológica con un promedio de la señal de 2-7 amplicones por región interrogada que levantan las quimeras en cuestión. Barras de error representan el error estándar entre los amplicones que levantan las mismas regiones. Análisis estadístico mediante un ANOVA de dos factores seguido de un test de comparaciones múltiples de Sidak.

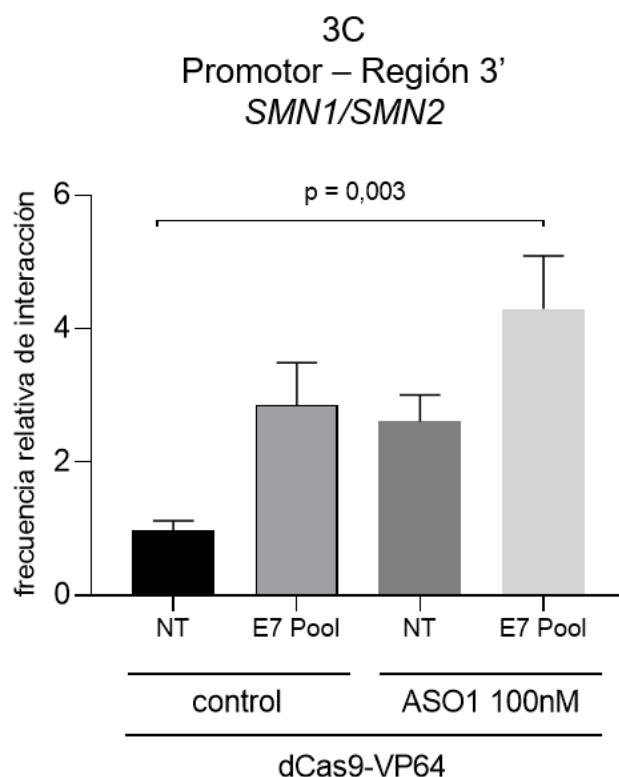


Figura R.26. Las interacciones entre el promotor de SMN2 y la región 3' tras el tratamiento combinado de dCas9-VP64 direccionado al E7 de SMN2 y el ASO1.

Análisis de 3C-qPCR tras la estrategia combinada de dCas9-VP64 y ASO1. En el eje Y se representa la abundancia relativa de interacción entre el promotor y la región 3' de SMN2. De izquierda a derecha se muestra la condición control con dCas9-VP64 y una guía non-targeting, el tratamiento con E7 Pool de guías de RNA, el ASO1 a una concentración final de 100nM, y el tratamiento combinado de E7 Pool + ASO1. Ambos tratamientos E7 pool y ASO1 por separado incrementan la interacción entre el promotor y la región 3' sin llegar a un umbral significativo. Sin embargo, el tratamiento combinado con dCas9-VP64 dirigido al exón 7 (E7 Pool) y ASO1 genera un aumento aún mayor en la interacción entre estas regiones que llega a un umbral altamente significativo. Las células fueron transfectadas con ASO1 durante 72 horas y con plásmidos correspondientes durante 96 horas N = 1 réplica biológica representando el promedio de 5 amplicones que levantan la quimera promotor- región 3' interrogada. Análisis estadístico mediante un ANOVA de dos factores seguido de un test de Tukey.

Discusión

La presente tesis se centra en profundizar los mecanismos subyacentes a la atrofia muscular espinal (AME) y su tratamiento, desarrollando estrategias innovadoras para mejorar la terapia mediante la modulación del estado cromatínico que potencie la inclusión del exón 7 del gen *SMN2*. A partir de los resultados de Marasco *et al.* (2022), comenzamos explorando la combinación de oligonucleótidos antisentido (ASO) con el ácido valproico (VPA), dos fármacos que ya cuentan con aprobación de la FDA y otras agencias internacionales para indicaciones distintas. En este trabajo, proponemos una prueba de concepto con edición epigenética específica mediante la estrategia CRISPR-dCas9, con el objetivo de profundizar en la relación entre cromatina y splicing alternativo.

A pesar de que el uso de VPA en ensayos clínicos para AME no mostró beneficios significativos en el estudio CARNI-VAL (Swoboda *et al.*, 2010), la evidencia reciente que presentamos en Marasco *et al.* (2022) indica que su combinación con el ASO Spinraza/nusinersen potencia la inclusión del exón 7 de *SMN2* más allá de lo observado con ambos tratamientos por separado, tanto en células humanas en cultivo como en ratones, mejorando la supervivencia, el crecimiento y la función neuromuscular en estos últimos. Este descubrimiento demuestra que, incluso terapias que por sí solas no fueron exitosas, pueden desempeñar un nuevo rol cuando se implementan en combinación con otras estrategias basadas en el entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes.

El desarrollo de opciones terapéuticas para la AME ha avanzado de manera extraordinaria en las últimas décadas. Desde que Lefebvre *et al.* (1995) identificaron que en casi todos los pacientes (98.6%) existía una delección o mutación en el gen *SMN1*, de posición telomérica en el cromosoma 5, y que el gen centromérico *SMN2* del mismo cromosoma presentaba un defecto de splicing responsable de la producción de una proteína truncada, se sentaron las bases para entender la progresión de la AME. En 1999, los trabajos de Monani *et al.* y Lorson & Androphy (2000) revelaron la mutación de un nucleótido clave que resultaba en la exclusión del exón 7 de *SMN2*. Esto consolidó la base molecular para comprender la enfermedad y abrió el camino a la investigación sobre moléculas y estrategias capaces de restaurar la expresión funcional de SMN (Lefebvre *et al.*, 1995; Lorson *et al.*, 1999; Lorson & Androphy, 2000; Monani, 2000).

Menos de 10 años después de los primeros estudios sobre oligonucleótidos antisentido (Hua *et al.*, 2007, 2008, 2010; Passini *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2006), la FDA aprobó en 2016 el uso de Spinraza/

nusinersen (FDA, 2020), marcando un punto de inflexión en el tratamiento de la AME. Posteriormente, en 2019, se aprobó la primera terapia génica para AME, Zolgensma, una introducción sistémica del gen *SMN1* mediante un vector viral, desarrollada por Novartis y reconocida como el tratamiento más costoso del mundo. En 2020, se añadió Risdiplam (Evrysdi) como nueva alternativa basada en moléculas pequeñas, también capaz de favorecer la inclusión del exón 7 de *SMN2* (www.curesma.org). Estas opciones, surgidas de investigaciones de ciencia básica, han transformado la forma de abordar la AME y han mejorado significativamente la calidad de vida de muchos pacientes.

En este contexto, la investigación de nuestro laboratorio busca ampliar el arsenal terapéutico. Con base en la evidencia acumulada en los últimos 30 años y en el conocimiento detallado de los mecanismos moleculares de la AME, así como de la relación entre la cromatina y el splicing, planteamos la combinación del ASO Spinraza/nusinersen y VPA como una estrategia prometedora (Marasco *et al.*, 2022). En esta tesis exploramos el uso de CRISPR-dCas9 para regular la expresión de *SMN2* a través de la modulación epigenética y del splicing alternativo. Aunque esta aproximación presenta desafíos adicionales para su traslado a la clínica, aporta un mejor entendimiento de la biología subyacente y abre la puerta a futuras terapias basadas en la edición epigenética.

La importancia de la investigación básica en este campo queda demostrada por la rapidez con la que han surgido y se han aprobado nuevas opciones terapéuticas para la AME, apenas una década después de los primeros trabajos con oligonucleótidos antisentido. Estas iniciativas, en conjunto, amplían el panorama de tratamiento para la AME y destacan cómo la manipulación precisa de los mecanismos de splicing y de la regulación génica puede revertir los defectos fisiopatológicos de la enfermedad. Con ello, se refuerza la idea de que los esfuerzos traslacionales, nutridos por la ciencia básica, son indispensables para impulsar tanto nuestro entendimiento de la enfermedad como el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas.

En las estrategias de tratamiento para enfermedades genéticas como la AME, es fundamental destacar las diferencias entre los tipos de terapias, ya que cada una ofrece beneficios particulares y conlleva sus propias dificultades. Las terapias génicas, como Zolgensma, implican cambios permanentes en la información genética del paciente, al introducir una copia funcional de *SMN1* en sus células. La ventaja de este tipo de intervención es que se administra en una sola dosis intravenosa, con el potencial de corregir la enfermedad de manera permanente. Sin embargo, las limitaciones no son menores: el costo supera los 2 millones de dólares, lo que dificulta su accesibilidad y no garantiza el éxito en todos

los casos. Además, dada la naturaleza de la AME y su progresión degenerativa, el tratamiento está aprobado únicamente para pacientes menores de 2 años, lo que restringe su aplicación en un amplio porcentaje de la población afectada. También se han reportado efectos adversos importantes ligados a la administración viral sistémica, con casos de lesiones hepáticas graves que pueden ser mortales, respuestas inmunológicas sistémicas, trombosis y recuento bajo de plaquetas (Jablonka *et al.*, 2022). Por otro lado, dado que la expresión de la proteína SMN está altamente regulada durante el desarrollo, existe el riesgo de desregulación del mismo tras la sobreexpresión con este sistema. En modelos murinos se ha observado que la sobreexpresión viral puede producir efectos indeseados al interferir con mecanismos de procesamiento de RNA. Estudios de Van Alstyne *et al.* (2021) muestran que la sobreexpresión a largo plazo de la proteína SMN asociada a la terapia génica AAV9-SMN, se vincula con disfunción motora relacionada con la pérdida de sinapsis propioceptivas y neurodegeneración causada por la agregación de SMN en el citoplasma de las motoneuronas, secuestrando componentes de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs). Esto produce desregulación transcripcional global, neuroinflamación y respuestas del sistema inmune innato. Por lo tanto, la sobreexpresión prolongada de SMN interfiere en la regulación del RNA y conduce a perfiles patogénicos relacionados con la AME a través de mecanismos tóxicos de ganancia de función. Estos descubrimientos subrayan los peligros asociados a realizar cambios permanentes en la expresión génica mediante terapias génicas (Jablonka *et al.*, 2022; Van Alstyne *et al.*, 2021).

La alternativa a estas terapias génicas consiste en generar cambios no permanentes en la expresión génica, mediante estrategias, en el caso de la AME, como el ASO Spinraza/nusinersen o el Risdiplam. La gran ventaja de estos tratamientos es que, al no generar modificaciones permanentes, su administración puede iniciarse o suspenderse según la necesidad clínica, permitiendo un mejor control y una adaptación en respuesta a eventuales efectos adversos y desarrollo de la enfermedad. Risdiplam es el más reciente de los tres tratamientos disponibles en ser aprobado por la FDA. Esta molécula pequeña estabiliza la unión de U1 (snRNP) al sitio 5' de splicing (5'ss) del exón 7 de *SMN2*, incrementando su inclusión en el transcripto maduro de *SMN2*. Entre sus ventajas se destaca su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que puede administrarse por vía oral, a diferencia de nusinersen, que requiere inyecciones intratecales. Se ha demostrado que Risdiplam aumenta los niveles de SMN no solo en el sistema nervioso central, sino también en órganos periféricos en dos modelos murinos de AME. Esta estrategia reduce la pérdida de motoneuronas y la progresión de la patología, pero también conlleva riesgos. Aunque es una molécula bastante específica,

se han detectado *off-targets* que alteran el splicing de genes involucrados en procesos biológicos críticos (STRN3, FOXM1, APLP2, MADD, SLC25A17), efectos que siguen bajo investigación. Además, su costo anual se estima en 380 mil dólares (Schouten & Love, 2015).

En el caso del ASO Spinraza/nusinersen, se trata de un oligonucleótido modificado de 18 pares de bases que, al igual que Risdiplam, no genera cambios permanentes en la expresión del gen blanco. Una de sus ventajas es que demostró una marcada mejoría clínica en los pacientes tratados en comparación con el grupo control, lo que motivó la finalización temprana de su primer ensayo clínico, su aprobación y la realización de varios ensayos posteriores exitosos. En todos ellos se observaron efectos positivos en diferentes grupos de pacientes con AME, abarcando un rango etario mucho más amplio que el indicado para la terapia génica Zolgensma. Sin embargo, su principal desventaja radica en la vía de administración: se aplica por punción lumbar en el líquido cefalorraquídeo y requiere un procedimiento hospitalario ambulatorio cada cuatro meses. Además, su costo de aproximadamente 125 mil dólares por inyección, unos 375 mil dólares anuales por paciente de por vida, sigue siendo muy elevado (Jablonka *et al.*, 2022), aunque se encuentran vigentes acuerdos entre la empresa Biogen y las autoridades gubernamentales de salud de varios países, incluida la Argentina, la cual ha reducido el costo que deben afrontar los seguros médicos y las prepagas en aproximadamente un 50%.

El punto de partida de este trabajo se remonta a 2015, cuando la organización de familias de pacientes con AME en Argentina (FAME) se acercaron al Dr. Alberto Kornblihtt, director de esta tesis, para solicitar ayuda en la búsqueda de mejores alternativas terapéuticas. En ese momento, el ASO Spinraza/nusinersen aún no había sido aprobado y pasarían varios años antes de que estuviera accesible mediante planes de salud en Argentina. Con el conocimiento acumulado sobre los mecanismos moleculares básicos que gobiernan los eventos de splicing alternativo, nuestro grupo se propuso estudiar esta enfermedad, y aprovechando la experiencia colectiva de años de investigación, planteamos en el trabajo de Marasco *et al.* (2022) una posible terapia combinada que mostraba resultados prometedores al potenciar el efecto de la terapia con ASO Spinraza/nusinersen. Al mismo tiempo, descubrimos efectos moleculares subyacentes al uso del ASO que no solo aportan a nuestro entendimiento de esta enfermedad y su tratamiento, sino que a todos los tratamientos que involucran el uso de un ASO.

En una segunda etapa, en el laboratorio del Dr. Kornblihtt, asesoramos a dos compañías farmacéuticas distintas en la validación de ASOs genéricos tipo Spinraza/nusinersen (Figura R.2). A través de

ensayos funcionales en células humanas de pacientes con AME, demostramos que estos compuestos son igualmente eficaces que el ASO Spinraza/nusinersen para incrementar la inclusión del exón 7 de *SMN2*, con el objetivo de producir un fármaco nacional más económico y accesible a los pacientes en Argentina. Estos logros ayudan a más pacientes al tratamiento que necesitan y sólo fue posible gracias a la colaboración interdisciplinaria entre investigación básica a nivel mundial, las familias de pacientes con AME y la industria farmacéutica nacional.

No obstante, la mayor parte de la investigación se centra en los mecanismos moleculares de la enfermedad y en el desarrollo de tratamientos, sin un contacto muy directo con los pacientes. Por ello, a continuación, se discuten los resultados obtenidos en este trabajo principalmente en el contexto de experimentación original.

El rol de las metiltransferasas de histonas en el mantenimiento del perfil epigenético global y la respuesta al tratamiento con ASO1

Trabajos previos de nuestro laboratorio proporcionan amplia evidencia sobre la dinámica de la elongación transcripcional por la RNAPII y el estado de la cromatina, así como su influencia en el proceso de splicing alternativo (Alló *et al.*, 2009; de la Mata *et al.*, 2003; de la Mata & Kornblihtt, 2006; Kadener *et al.*, 2001, 2002; Kornblihtt *et al.*, 2013; Marasco *et al.*, 2022; Schor & Kornblihtt, 2009).

El exón alternativo E7 de *SMN2* se identificó en trabajos previos como un exón de “tipo 2”, cuya inclusión se ve favorecida cuando aumenta la velocidad de elongación transcripcional. Este descubrimiento sentó las bases para explorar la manipulación del estado cromatínico como forma de potenciar la inclusión del exón 7 de *SMN2* en combinación con el tratamiento con ASO1 (la forma del ASO Spinraza/nusinersen utilizada regularmente en nuestro grupo). De hecho, descubrimos un efecto cromatínico subyacente al mismo tratamiento con ASO1, cuyos efectos secundarios contraproducentes se revertían al utilizar inhibidores de desacetilasas de histonas como el VPA (Marasco *et al.*, 2022).

El estado de la cromatina, determinado por modificaciones post-traduccionales como la acetilación y la metilación de histonas, define la accesibilidad del DNA y la eficiencia de los procesos de transcripción y splicing. En el caso del exón 7 de *SMN2* un estado de cromatina más abierto, en línea con una elongación transcripcional más rápida aumenta la inclusión del exón 7 de *SMN2*. Estos

descubrimientos subrayan la importancia de la interacción entre el estado de la cromatina y la maquinaria de splicing, y reafirma que la modulación epigenética es un factor crucial en la regulación de la inclusión de exones.

En este trabajo decidimos profundizar en varios componentes implicados en el mantenimiento del estado cromatínico, como las metiltransferasas de histonas G9a, GLP, SUV39 y PRDM2. Nos centramos principalmente en la metiltransferasa G9a (EHMT2) y demostramos que su ausencia provoca una disminución global de la marca represiva H3K9me2 y un aumento en la marca activadora H3K9ac, lo que sugiere un estado cromatínico más permisivo. Esto se corrobora tanto al nivel global (Figura R.4) como en la región local de *SMN2* (Figuras R.6), relacionándose con una mayor inclusión del exón 7 tanto en condiciones basales como bajo el tratamiento con ASO1 (Figuras R.3, R.5, R.7 y R.8). Destacamos también la importancia de la redundancia entre distintas metiltransferasas, ilustrando la complejidad de la regulación epigenética celular (Figura R.7).

Asimismo, observamos que la eliminación de proteínas relacionadas con el mantenimiento de heterocromatina como HP1 β incrementó la sensibilidad al tratamiento con ASO1, mejorando la inclusión del exón 7 de *SMN2* (Figura R.9). HP1 β se asocia tradicionalmente con la formación de heterocromatina y la represión transcripcional, por lo que su ausencia favorece un estado cromatínico más permisivo para un splicing más favorable para la inclusión del E7 de *SMN2*. Esto sugiere que la modulación de proteínas asociadas a la heterocromatina puede impactar directamente en la accesibilidad del DNA y en la dinámica de elongación de la RNAPII.

También demostramos una primera evidencia de que los ASOs se pueden unir no solo al RNA sino también a la hebra de DNA que comparte la misma identidad de secuencia. En Figura R.10 mostramos cómo un ASO con secuencia complementaria al ASO2 (SO2) produce efectos al nivel de cromatina e influye sobre la inclusión del exón 7 de *SMN2* tanto como el ASO2, pero sin posibilidad de unirse al RNA porque no hay transcripto de RNA antisentido al que unirse.

Estos descubrimientos brindan un entendimiento más profundo de cómo las modificaciones epigenéticas inciden en la estructura de la cromatina y en la regulación del splicing, abriendo posibilidades terapéuticas que combinen la modulación de la cromatina con el uso de ASOs. Sin embargo, el resultado de que oligonucleótidos modificados químicamente de secuencia "sense" puedan tener los mismos efectos cromatínicos que los tradicionales ASOs merece ubicarlos en un status particular en el listado de los efectos citoplásmicos y nucleares de ácidos nucleicos pequeños

usados en estrategias terapéuticas. La Tabla D.1 se propone esclarecer el estado del arte del tema, incluyendo los aportes publicados y no publicados de nuestro laboratorio.

Ácido nucleico pequeño	Compartimiento celular	Se aparea con	Consecuencia	¿Afecta splicing alternativo?	Cita
siRNA (hebra guía)	Citoplasma	mRNA maduro	Degradación del mRNA	No	Revisado en Filipowicz <i>et al.</i> (2005)
	Núcleo	RNA transcrito a nivel el promotor	Deposición de marca silenciadora de histonas (H3K9me2) / inhibición de la iniciación de la transcripción	No	Morris <i>et al.</i> (2004)
		pre-mRNA río abajo del promotor	Deposición de marca silenciadora de histonas (H3K9me2) /bloqueo a la elongación de la transcripción	Sí	Alló <i>et al.</i> (2009)
ASO*	Citoplasma	mRNA maduro	Bloqueo de la traducción	No	Revisado en Egli & Manoharan (2023)
	Núcleo	pre-mRNA río abajo del promotor	Inhibición del splicing o corrección de splicing alternativo	Sí	Hua <i>et al.</i> (2008)
			Deposición de marca silenciadora de histonas (H3K9me2) /bloqueo a la elongación de la transcripción	Sí	Marasco <i>et al.</i> (2022)
		¿Hebra "sense" del DNA?	¿Deposición de marca silenciadora de histonas (H3K9me2) /bloqueo a la elongación de la transcripción?	¿Sí?	Inferido pero no demostrado en esta tesis
SO*	Núcleo	Hebra "anti sense" del DNA	Deposición de marca silenciadora de histonas (H3K9me2)/bloqueo a la elongación de la transcripción	Sí	Esta tesis

El asterisco indica que tanto el oligonucleótido antisentido (ASO) como el con sentido (SO) se encuentran modificados químicamente para protegerlos de la degradación por nucleasas. No podemos asegurar que los efectos inferidos o demostrados en esta tesis ocurran también con ASOs y SOs no modificados químicamente.

Especificidad de tratamientos con ASOs vs. HDACi

El ASO Spinraza/nusinersen, un oligonucleótido antisentido modificado de 18 bases, es altamente específico para su sitio blanco. Por lo tanto, no se han descrito *off-targets*, y gracias a la complementariedad de bases con una secuencia silenciadora del intrón 7 del pre-mRNA de *SMN2*, enmascara el sitio de unión del represor de splicing hnRNPA1/A2 y promueve la inclusión del exón 7. Por el contrario, el ácido valproico (VPA) actúa como un inhibidor de desacetilasas de histonas (HDACi), promoviendo una conformación más laxa de la cromatina de forma inespecífica. La combinación ASO1 y VPA, por lo tanto, agrupa un tratamiento altamente específico como el ASO con otro pleiotrópico como el HDACi.

En figura R.11 demostramos como el VPA tiene efectos globales sobre marcas cromatínicas, aumentando, como es de esperar, la marca activadora H3K9ac relacionada a un estado eucromatínico más abierto, pero simultáneamente disminuyendo, de manera inversa, la marca represiva H3K9me2 relacionada a un estado heterocromatínico. Mostramos que, a pesar de estos efectos globales sobre el estado de la cromatina, la abundancia de los reguladores positivos (SF2/ASF, o sea, SRSF1) y negativos (hnRNPA1/A2) involucrados en el evento de splicing del E7 del gen *SMN2* no se ven afectados, sugiriendo que el efecto del VPA no es debido a cambios en la abundancia de factores de splicing que actúan *en trans*.

Aun así, en el trabajo de Marasco *et al.* (2022) se encontraron cambios moderados en la expresión génica y en el splicing alternativo al analizar el transcriptoma global por RNA-Seq: apenas 69 genes de 29.000 transcritos analizados variaron significativamente tras el tratamiento con VPA, y ninguno cambió en respuesta al ASO1. Además, VPA alteró únicamente un 0.06% de los patrones de splicing alternativo, aunque este valor se obtuvo aplicando un criterio estricto de cambios mayores al 30% en el porcentaje de inclusión en el mRNA maduro de exones alternativos. Con el fin de buscar una modulación más específica de la cromatina y confirmar que los efectos observados en el trabajo de Marasco *et al.* (2022) se debían a cambios epigenéticos específicos al gen de *SMN2*, en este trabajo exploramos el uso de CRISPR/dCas9-VP64, una tecnología que permite la edición epigenética dirigida al locus de *SMN2* para modificar la cromatina específicamente y potenciar el efecto del ASO para mejorar la inclusión del exón 7.

El uso de CRISPR-dCas9

La tecnología CRISPR-Cas9 ha revolucionado la biología molecular al posibilitar la modificación precisa de la expresión génica con una multitud de variantes de estas herramientas que han sido desarrolladas sobre su base. CRISPR/dCas9 ofrece la ventaja de modificar la expresión génica sin cambios permanentes en la secuencia de DNA y por lo tanto no es parte de las terapias génicas, como sí lo es la terapia de CRISPR/Cas9 usada recientemente con éxito para el tratamiento de la anemia falciforme. CRISPR/dCas9 utiliza una versión inactiva de Cas9 (dCas9) fusionada a dominios funcionales, como VP64, para activar la transcripción de genes específicos. En este estudio, se aplicó CRISPR-dCas9-VP64 para dirigir la activación transcripcional en regiones intragénicas de *SMN2*, mejorando así la inclusión del exón 7 (varios resultados y sus controles en Figuras R.15, R.16, R.17 y R.18. Esto ofrece un enfoque más específico que los moduladores pleiotrópicos de la cromatina y abre nuevas posibilidades para la intervención terapéutica.

Es interesante observar que las herramientas disponibles para la modulación génica y epigenética están creciendo de forma exponencial. La aprobación de CRISPR/Cas9 para el tratamiento de la anemia falciforme mediante edición *ex vivo* de células madre hematopoyéticas demostró el potencial de esta tecnología para enfermedades previamente incurables (Gostimskaya, 2022). Sin embargo, todavía no existe un tratamiento aprobado que use CRISPR/dCas9 para la modulación epigenética en patologías humanas, y su aplicación terapéutica con administración repetida enfrenta obstáculos prácticos principalmente por la introducción del gran tamaño de la macromolécula dCas9 o su secuencia codificante.

No obstante, el aspecto más alentador radica en la posibilidad de aprovechar la propia maquinaria endógena de la célula. En el caso de dCas9-VP64, la misma recluta factores transcripcionales y en particular a la acetiltransferasa endógena P300, provocando la acetilación específica de la región de interés, guiada por guías de RNA (gRNA). Como se muestra en la Figura R.18, el uso de un inhibidor selectivo de P300 (CBP30) inhibe el efecto sinérgico entre dCas9-VP64 y ASO1 en la inclusión del exón 7 de *SMN2*, evidenciando el papel crucial de la maquinaria endógena P300 en esta estrategia.

Este trabajo también refuerza la idea de que los sistemas CRISPR-dCas9 pueden usarse más allá de la activación o inhibición de promotores, subrayando cómo estos modificadores epigenéticos se pueden utilizar para la modulación de eventos transcripcionales como el splicing alternativo, un aspecto de la herramienta poco explorado en la literatura.

En conjunto, estos tipos de descubrimientos destacan el potencial de reorientar la maquinaria celular para modular la expresión génica a nivel transcripcional de manera altamente específica. Además, este enfoque hace parte de una creciente variedad de herramientas, incluyendo los oligonucleótidos modificados (como el ASO) que interfieren con las maquinarias de regulación de expresión génica, así como sistemas de CRISPRa/CRISPRi, y Cas19 que permite la edición específica del RNA. El uso de estas herramientas que no implican modificaciones permanentes a la información genética, representa un importante avance hacia una medicina más personalizada, permitiendo adaptar los tratamientos según las necesidades específicas de cada paciente y en el momento preciso en que se requieran.

Activación del promotor y su relación con el splicing

La elongación de la RNAPII y la activación transcripcional están íntimamente relacionadas con el splicing alternativo. La velocidad de la RNAPII influye en la ventana temporal para que los factores de splicing reconozcan y se unan a los sitios aceptores y dadores de splicing, lo que puede afectar la inclusión o exclusión de un exón. Como ya se indicó, un estado de cromatina abierta facilita una elongación rápida de la RNAPII, lo que inhibe la inclusión de ciertos exones “tipo 1” con sitios dadores de splicing más débiles río arriba de sitios de splicing más fuertes (modelo “first come, first served”). Sin embargo, en el caso de la inclusión de exones “tipo 2”, como el exón 7 de *SMN2*, el evento de splicing depende de un equilibrio delicado entre la velocidad de elongación de la RNAPII y la acción de factores de splicing negativos como hnRNPA1/A2. El exón 7 de *SMN2* se comporta de manera inversa a los exones tipo 1, donde en este caso una mayor velocidad de elongación aumenta la inclusión del exón.

En este trabajo, exploramos la activación del promotor mediante inhibidores de HDAC (como el ácido valproico) y la tecnología CRISPR-dCas9. Resulta interesante notar que en el direccionamiento al promotor con la estrategia de dCas9-VP64, se observa una tendencia similar a la descrita para el tratamiento con VPA en nuestro trabajo anterior (Marasco *et al.*, 2022) en cuanto a la inclusión del E7 de *SMN2* (Figura R.19) y la abundancia de pre-mRNA del mismo (Figura R.24a). En estos experimentos, la dCas9-VP64 dirigida al promotor ejerce un efecto por sí sola y, en combinación con ASO1, se genera un efecto aditivo en la inclusión del exón 7 de *SMN2*; a diferencia del direccionamiento de esta herramienta a la zona cercana al exón 7, donde en casi todos los casos la

dCas9-VP64 no tiene un efecto por sí sola, y sólo en combinación con el ASO se produce un efecto sinérgico que aumenta la inclusión del exón 7.

Esto sugiere que la modificación del estado cromatínico en la región promotora puede influir indirectamente en el procesamiento del RNA transcripto, posiblemente mediante la alteración de la velocidad de elongación de RNAPII, el reclutamiento de factores de transcripción y splicing; de forma distinta o complementaria a la que se logra al dirigir la dCas9-VP64 a la región cercana al exón 7. Esto se respalda en las observaciones de figura R.23 donde ambos direccionamientos al promotor o el E7, activan al promotor.

Además, cabría la posibilidad de que la modificación de la cromatina en el promotor pudiera afectar la interacción promotor-enhancer, constituyendo un posible mecanismo adicional de regulación transcripcional de *SMN2*. Estudios recientes han demostrado que las interacciones entre promotores y enhancers no son estáticas, sino que dependen de la actividad transcripcional y la dinámica de la RNA polimerasa II (Bellofatto & Wilusz, 2011). En este contexto, la reestructuración cromatínica inducida por dCas9-VP64 podría facilitar el acceso de factores transcripcionales que estabilicen la interacción entre el promotor de *SMN2* y su enhancer, lo que a su vez reforzaría la transcripción del gen y la inclusión del exón 7 (Wang *et al.*, 2022).

En línea con esto, se ha identificado un posible elemento enhancer ubicado aproximadamente a 2 kpb río arriba del sitio de inicio de transcripción de *SMN2* (Boda *et al.*, 2004). La activación del promotor mediante dCas9-VP64 podría modular la accesibilidad y funcionalidad de este enhancer, promoviendo interacciones más frecuentes y eficientes con el promotor de *SMN2*. Esto es consistente con modelos recientes que sugieren que la transcripción en curso influye en la estabilidad y frecuencia de los contactos promotor-enhancer (Barshad *et al.*, 2023). En conjunto, estos resultados reforzarían la idea de que la modificación epigenética del promotor de *SMN2* no sólo impacta la transcripción local, sino que también reconfiguraría la organización espacial del locus *SMN*, favoreciendo un entorno transcripcional que favorezca la inclusión del exón 7.

Los resultados del direccionamiento de la acetilación de histonas al promotor y su activación transcripcional coinciden con resultados originales de nuestro laboratorio. En Cramer *et al.* (1997) nuestro grupo demostró que el tipo de promotor, y no su fuerza, determinaba el grado de inclusión de un exón alternativo expresado desde un minigén. Más adelante, Nogués *et al.* (2002) demostraron que distintos factores de transcripción dirigidos a un mismo promotor promueven distintos niveles de

inclusión de un exón alternativo codificado. Por último, Kadener *et al.* (2002) comprobaron que el splicing alternativo es regulado por enhancers que regulan a un dado promotor a través del control de la tasa de elongación de la RNA polimerasa II.

Interacciones entre regiones 3' y 5' del gen *SMN2* regulan su expresión génica a través de *looping*

A lo largo de esta investigación, hemos acumulado evidencia de que los tratamientos específicos, tanto con ASO1 como con nuestra estrategia de CRISPR-dCas9-VP64, generan efectos en el splicing, el estado cromatínico y la activación transcripcional, no sólo en su sitio blanco, sino también en regiones distales. En el trabajo de Marasco *et al.* (2022) y en la Figura R.10b, se observa que el tratamiento con ASO2 también induce la deposición de la marca represiva de la cromatina H3K9me2 en el promotor de *SMN2*, a pesar de que esta región se encuentra aproximadamente 26 kilobases río arriba de su sitio blanco. En este estudio, también observamos que el aumento de H3K9me2 correlaciona con una disminución en la marca activadora H3Kac en la misma región entre el tratamiento dCas9-VP64 y la guía B +/- ASO (Figura R.21b).

Además, el direccionamiento de dCas9-VP64 al exón 7 de *SMN2* (Figura R.23) genera una activación del promotor del mismo gen, y el direccionamiento de la misma herramienta al promotor altera el splicing del exón 7. Ambos efectos ocurren en regiones distales a sus respectivos sitios blancos, lo que nos llevó a plantearnos si existían interacciones físicas entre estas regiones localizadas en los extremos del gen. En las Figuras R.25 y R.26, confirmamos estas interacciones a través de la metodología 3C-qPCR, validando nuestra hipótesis.

Observamos que el tratamiento con ASO1 aumenta la interacción entre la región distal del gen *SMN2* y su promotor, lo que puede explicar la deposición de H3K9me2 en esta última región cuando se transfecta ASO1. De manera similar, el direccionamiento de dCas9-VP64 al exón 7 de *SMN2* también incrementa la interacción entre estas regiones distales, lo que respalda el efecto de activación del promotor observado en nuestros experimentos. Asimismo, observamos que el direccionamiento de dCas9-VP64 al promotor de *SMN2* aumenta la interacción con regiones distales del gen, explicando el impacto en el splicing del exón 7, a pesar de que esta región se encuentra alejada del sitio blanco de las guías de RNA que reclutan dCas9-VP64.

Este fenómeno es análogo a los mecanismos descritos para elementos enhancer-promotor, en los cuales secuencias distales al promotor establecen interacciones físicas que modulan la transcripción y

el splicing en regiones río abajo. Nuestros resultados en la Figura R.25 muestran que el direccionamiento de dCas9-VP64 a la región promotora de *SMN2* aumenta la interacción con la región enhancer descrita por Boda *et al.* (2012), lo que es consistente con la hipótesis de que la modulación del estado cromatínico del promotor favorece su interacción con el enhancer y contribuye a la regulación transcripcional de *SMN2*.

En conjunto, estos descubrimientos refuerzan los resultados presentados en esta tesis y sustentan las hipótesis de esta investigación. Además, se apoyan en observaciones previas de nuestro laboratorio y de otros grupos de investigación, como el del Dr. David Bentley, quien observó que el pausado de la RNAPII en las regiones 5' y 3' de los genes está asociada con factores de procesamiento de pre-mRNA; que este pausado podría facilitar interacciones entre promotores y regiones de terminación, acercando físicamente estas regiones para regular la transcripción (Glover-Cutter *et al.*, 2008). Estos resultados subrayan la complejidad de las interacciones dentro de una célula viva, donde las dinámicas espaciales de la cromatina no se limitan a modelos lineales de interacciones entre efectores y sitios blancos, sino que reflejan una red tridimensional altamente organizada de regulación génica.

Importancia de la modulación dirigida y perspectivas futuras

Esta investigación demuestra que la modulación del estado cromatínico y la activación transcripcional dirigida pueden ser estrategias eficaces para optimizar la inclusión de exones en contextos de splicing alternativo como la AME. La combinación de ASOs con tecnologías de edición epigenética CRISPR-dCas9-VP64 permite intervenciones más precisas que los enfoques basados en fármacos de amplio espectro. Aun así, siguen existiendo desafíos técnicos, sobre todo en la entrega eficiente de los sistemas CRISPR-dCas9 a las células y tejidos del organismo. Aunque esto limita su aplicación terapéutica inmediata, el progreso continuo en el desarrollo de nuevas herramientas y métodos promete superar dichas barreras.

En resumen, el aprovechamiento de la tecnología CRISPRa para complementar los tratamientos con HDACi y ASOs presenta una estrategia prometedora para refinar los efectos terapéuticos sobre el splicing en la AME. Este enfoque podría conducir a mejores resultados al ofrecer una modulación más precisa y específica del estado cromatínico, asegurando una mayor inclusión del exón 7 de *SMN2* y aumentando la producción de SMN. La integración de CRISPRa con terapias existentes ejemplifica el potencial de las herramientas de edición génica en la medicina moderna y su capacidad para proporcionar terapias de precisión para enfermedades genéticas como la AME.

Conclusiones

- **Eficacia de ASO1 y alternativas terapéuticas:**

Se confirmó el efecto potenciador del ASO1, equivalente a Spinraza/nusinersen, y de un ASO genérico colaborativo con una compañía farmacéutica nacional, ofreciendo una alternativa terapéutica más económica e igualmente efectiva para pacientes en Argentina.

- **Efectos cromatínicos de ASOs y ASO2:**

Se evidenció el efecto cromatínico de los ASOs y el efecto inhibitorio del ASO2 sobre la inclusión del exón 7 de SMN2.

- **Rol de la metiltransferasa EHMT2 (G9a):**

Se confirmó la importancia de la metiltransferasa EHMT2 (G9a) en el mantenimiento de la marca represiva H3K9me2, ya que las células G9a KO presentan una cromatina más abierta, mayor inclusión basal del exón 7 y una respuesta potenciada al tratamiento con ASO1.

- **Colaboración de GLP y Rol compensatorio de Suv39:**

Se demostró que, además de G9a, la metiltransferasa GLP colabora en la deposición de H3K9me2 y que Suv39 ejerce un rol compensatorio, evidenciando interacciones entre metiltransferasas que mantienen el estado cromatínico global.

- **Importancia de factores de heterocromatina (HP1):**

Se mostró la relevancia de factores asociados a la heterocromatina, como HP1, en la eficacia del tratamiento con ASO1.

- **Capacidad de los ASOs para unirse al DNA:**

Se aportó la primera evidencia de que los ASOs pueden unirse al DNA, ya que los oligonucleótidos sense, dirigidos a la hebra complementaria no transcrita del gen, generan efectos cromatínicos similares a los observados con los ASOs.

- **Efectos globales del VPA en las marcas de histonas:**

Se comprobó que el tratamiento con VPA modifica globalmente las marcas de histonas, incrementa H3K9ac y disminuye H3K9me2 sin alterar la abundancia de factores de splicing, lo que apoya que su efecto sobre el splicing de SMN2 se debe a la modificación de la cromatina en cis.

- **Estrategia CRISPR-dCas9-VP64 para modificar la cromatina:**

Se diseñó una estrategia específica para modificar la cromatina utilizando el sistema CRISPR-dCas9-VP64 y sgRNAs dirigidos a varias regiones del gen SMN2.

- **Especificidad del enfoque CRISPR-dCas9-VP64:**

Se demostró que el uso de esta estrategia es altamente específico en su localización y efecto sobre la cromatina.

- **El direccionamiento del CRISPR-dCas9-VP64 cercana al Exon7 de SMN2 genera deposición de marca de acetilación de histona H3Kac**

Se mostró que direccionar la CRISPR-dCas9-VP64 efectivamente acetila la región cercana al exón 7 de SMN2 y esa acetilación es específica al gen de *SMN2*.

- **Sinergia CRISPR-dCas9-VP64 y ASO1 mediada por p300:**

Se evidenció que la combinación de CRISPR-dCas9-VP64 con ASO1 genera un efecto sinérgico en la inclusión del exón 7, que es abolido por un inhibidor de la acetilasa de histonas p300.

- **Reversión de efectos inhibitorios inducidos por ASO2:**

Se mostró que la estrategia con CRISPR-dCas9-VP64 puede revertir los efectos inhibitorios sobre la inclusión de SMN2 inducidos por ASO2.

- **Efecto activador transcripcional del VPA en pre-mRNA:**

Se confirmó que el tratamiento con VPA incrementa la abundancia del pre-mRNA de *SMN2*; a concentraciones bajas (1 nM) que afectan el splicing, el ASO1 no modifica el pre-mRNA, mientras que VPA lo aumenta significativamente, evidenciando un efecto activador transcripcional.

- **Activación transcripcional mediante CRISPR-dCas9 en promotor y exón 7:**

La estrategia CRISPR-dCas9, dirigida tanto al promotor (Pro Pool) como al exón 7 (E7 Pool) de SMN2, incrementa los niveles de pre-mRNA, sugiriendo la activación del promotor; además, el efecto del E7 Pool indica que la modulación cromatínica en el exón 7 puede influir en la regulación del promotor mediante interacciones estructurales (gene looping).

- **Especificidad transcripcional de estrategias dirigidas:**

Las estrategias dirigidas con dCas9-VP64, tanto solas como en combinación con ASO, mantienen la especificidad transcripcional al no alterar la abundancia de pre-mRNA en genes no relacionados (U6 y GAPDH), en contraste con el efecto global del VPA, confirmando la precisión de la activación dirigida en SMN2.

- **Aumento en las interacciones (gene looping) entre secuencias 5' y 3' del gen *SMN2* mediante tratamientos específicos con ASO1 o dCas9-VP64:**

Los tratamientos con ASO1 o el direccionamiento de dCas9-VP64 tanto a la región del exón 7 como al promotor de *SMN2* generan un aumento en las interacciones entre las regiones promotoras y las secuencias 3' distales del gen. Este fenómeno podría explicar varios de los efectos observados, incluyendo la deposición de metilación en el promotor de *SMN2* inducida por los ASOs, la activación transcripcional del promotor tras el tratamiento con dCas9-VP64 E7 pool, y el impacto sobre el splicing del exón 7 al dirigir dCas9-VP64 específicamente al promotor de *SMN2*.

Materiales y métodos

1. Cultivo celular y tiempos experimentales de transfección

Las células HEK293T (wild-type y G9a knockout) o células de fibroblastos de paciente de AME 3813 se cultivaron en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina, a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Todas las líneas celulares utilizadas se mantuvieron entre los pasajes 5 y 15 para garantizar consistencia experimental. Para la mayoría de los ensayos, las células se sembraron en placas de 12 pocillos (multiwell de 12) a una densidad de 150.000 células por pocillo. En los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), se utilizó un formato de placa de 10 cm, sembrando aproximadamente 1.8×10^6 células por placa, manteniendo las mismas condiciones de cultivo y tiempos experimentales.

La transfección se realizó en medio DMEM completo. Para preparar la mezcla de transfección, tanto el DNA plasmídico como el reactivo Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) se diluyeron por separado en Opti-MEM (Gibco) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se mezclaron en una proporción 1:1 y se incubaron durante 15 minutos adicionales para permitir la formación de complejos liposoma-DNA. La mezcla fue aplicada gota a gota sobre las células en cada pocillo o placa. El medio fue reemplazado al día siguiente. Todos los tratamientos y sus respectivos controles fueron realizados en paralelo, y los tiempos de transfección se mantuvieron constantes entre condiciones para asegurar comparabilidad experimental.

Cronograma experimental general:

- **Día 0:** Siembra de células (150.000 por pocillo en placas de 12 pocillos, o 1.8×10^6 por placa de 10 cm).
- **Día 1 (24 h post-siembra):**
 - En experimentos con plásmidos de dCas9-VP64: transfección de 2 µg totales de DNA por pocillo (formato 12-well) o 20 µg por placa de 10 cm, en una proporción molar 6:1 entre *lentiGuide-Puro* (Addgene #52963) y *dCAS9-VP64_GFP* (Addgene #61422).
- **Día 2 (48 h post-siembra):**
 - En experimentos con plásmidos de dCas9-VP64: transfección de oligonucleótidos antisentido a la concentración correspondiente.
- **Día 4 (24 h antes de la cosecha):** En los experimentos correspondientes, se agregó ácido valproico (VPA; Sigma-Aldrich) al medio completo a una concentración final de 10 mM. Las

células se incubaron con VPA por aproximadamente 24 horas antes de la recolección, siguiendo el esquema experimental descrito por Marasco et al., 2022.

- **Día 5 (72 h post-ASO / 96 h post-plásmidos):** Recolección de células para extracción de RNA (TRIzol, Invitrogen), proteínas (buffer de Laemmli), o preparación de cromatina (en ensayos ChIP) y 3C.

En los experimentos de silenciamiento génico, se transfectaron siRNAs SMARTpool (Dharmacon) a una concentración final de 50 nM utilizando Lipofectamina 2000 y se incubaron durante 96 horas antes de su procesamiento.

En los ensayos de sobreexpresión de G9a, se transfectaron 500 ng del plásmido *Flag-G9a E10+* (pcDNA3 backbone) por pocillo, utilizando Lipofectamina 2000. En los casos correspondientes, se co-transfectaron ASOs (100 nM) en simultáneo. Las células fueron recolectadas 72 horas después.

Cada condición experimental fue repetida al menos tres veces de forma independiente, manteniendo tiempos y condiciones constantes para garantizar la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados.

En los experimentos en los que no se transfectaron plásmidos, los oligonucleótidos antisentido (ASO1, ASO2 y Scramble) se transfectaron a las 24 horas post-siembra. Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo, y las células fueron recolectadas 72 horas después de la transfección de ASO, siguiendo el mismo cronograma experimental empleado en el resto de los ensayos con tratamiento con ASOs, lo que permitió mantener condiciones comparables entre todas las condiciones analizadas.

2. Transformación bacteriana

Para la transformación bacteriana, se utilizaron células competentes de *E. coli* NEB Stable y se realizó la transformación mediante electroporación. Las células competentes preparadas fueron descongeladas en hielo y se mezclaron con 1-2 μ l de DNA plasmídico en una microcentrífuga preenfriada. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm previamente enfriada y se sometió a una descarga eléctrica a 2.5 kV, 25 μ F y 200 Ω en un electroporador. Inmediatamente después de la electroporación, se añadieron 950 μ l de medio SOC precalentado a 37°C a la cubeta, y se transfirió todo el contenido a un tubo de cultivo estéril. La mezcla se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante 1 hora para permitir la recuperación y expresión de los genes de resistencia antibiótica. Posteriormente, se sembraron alícuotas de 100-200 μ l en placas de agar LB que contenían el antibiótico adecuado, y las placas se incubaron a 37°C durante 16-18 horas para permitir el crecimiento de las colonias.

transformadas. Las colonias obtenidas se seleccionaron para análisis posteriores y confirmación de la presencia del plásmido correcto.

3. Preparación de plásmidos (Miniprep)

Se utilizó el protocolo del Kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN para la purificación de DNA plasmídico. Brevemente, se cultivaron bacterias transformadas durante la noche y se centrifugaron 1–5 ml de cultivo para obtener un sedimento celular. Las células se resuspendieron en 250 µl de Buffer P1, seguido de la adición de 250 µl de Buffer P2 y la mezcla mediante inversión hasta que la solución se aclaró. Posteriormente, se añadieron 350 µl de Buffer N3 y se mezcló de inmediato por inversión. La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se aplicó a la columna QIAprep. Se realizaron lavados con 0.5 ml de Buffer PB y 0.75 ml de Buffer PE, eliminando los residuos mediante centrifugación. Finalmente, el DNA se eluyó con 50 µl de Buffer EB y se cuantificó utilizando espectrofotómetro Nanodrop y/o el sistema de fluorescencia Qubit para obtener mediciones precisas de la concentración de DNA.

4. Purificación de RNA

La purificación de RNA se realizó utilizando 500 µl de TRIzol (Invitrogen) por pocillo en una placa de 12 pocillos, manteniéndolo a temperatura ambiente durante 5 minutos para homogeneizar. Tras la adición de 100 µl de cloroformo, se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 15 minutos y se transfirió la fase acuosa a tubos limpios. La precipitación con isopropanol se dejó a -20°C por al menos 1 hora, seguida de una centrifugación a 12000 g por 15 minutos. El pellet resultante se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 7600 g por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, el pellet se dejó secar al aire durante 10 minutos y se resuspendió en agua Milli-Q. La concentración de RNA se determinó con el espectrofotómetro Nanodrop y la calidad se verificó en un gel de agarosa al 1% en TBE, corriendo a 140V durante 15 minutos.

5. Western Blot

Las muestras de proteínas se prepararon utilizando un buffer de lisis específico, el Cracking Buffer 2X, que contiene TRIS-HCl pH 6.8, β-mercaptoetanol, SDS y glicerol, con azul de bromofenol para facilitar la visualización. Las células se lavaron con PBS y se añadieron aproximadamente 100 µL de Cracking Buffer 2X por pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos, incubándose a 95 °C durante 5-10 minutos y centrifugándose brevemente para eliminar restos celulares. Los geles de poliacrilamida

se prepararon de acuerdo al peso molecular de las proteínas de interés, empleando un gel separador y un gel concentrador, y se montaron en el módulo de corrida con Buffer de Corrida 1X, corriéndose las muestras a 200 V junto con un marcador de peso molecular. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante un cassette de transferencia ensamblado con esponjas y papeles de filtro empapados en Buffer de Transferencia 1X, realizándose la transferencia a 100 V durante 90 minutos con refrigeración en hielo. Las membranas se bloquearon en leche al 5% en TTBS durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación, incubándose overnight con anticuerpos primarios diluidos en la misma solución de bloqueo. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TTBS y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos durante 45-60 minutos, protegiendo las membranas de la luz para mantener la señal fluorescente. Finalmente, las membranas se revelaron en el sistema Odyssey (LI-COR) a 700 y 800 nm, permitiendo la visualización de las bandas de interés, y la cuantificación de las señales se llevó a cabo con el software Image Studio para la interpretación de los resultados.

6. Retrotranscripción (RT) y PCR punto final

La retrotranscripción de RNA a cDNA se llevó a cabo usando el protocolo de la M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó una reacción de 20 μ L con 1 ng-5 μ g de RNA total. Los componentes incluyeron Oligo (dT)₁₂₋₁₈ como primer y una mezcla de dNTPs (10 mM cada uno). La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente, se añadieron 4 μ L de buffer de primera hebra 5X, 2 μ L de DTT 100 mM y 1 μ L de RNaseOUT, seguido de 1 μ L (200 U) de M-MLV RT. La reacción se incubó a 37°C por 50 minutos y se inactivó a 70°C por 15 minutos.

Para la amplificación de cDNA, se utilizó Taq DNA Polymerase de Inbio Highway S.A., siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla de reacción consistió en 5 μ L de buffer 10X, 1.5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de primers de amplificación (10 μ M cada uno), 0.4 μ L de Taq polimerasa (5 U/ μ L), y 2 μ L de cDNA en un volumen final de 50 μ L.

Primers Splicing SMN2 E7 “SMN2 mRNA”

5'-AAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTG-3' y 5'-TCTGATCGTTTCTTTAGTGGTGTC-3'.

La amplificación y el análisis de los productos de PCR digeridos con la enzima de restricción *DdeI* (ver Figura 1) se realizaron como se describe en Lorson *et al.* (1999). Los productos de PCR, digeridos o no con *DdeI* según el caso, fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6 % (p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización y cuantificación con el programa Image J. Siempre se analizaron un mínimo de tres réplicas biológicas, cada una por triplicado técnico. Las muestras de cada experimento de RT-PCR se procesaron juntas en el mismo gel.

Cálculo del % de inclusión del E7

I_o = intensidad de la banda del gel de RT-PCR.

B_g = background = intensidad de un área del gel que no contenga bandas de la misma forma y tamaño que una banda.

I_c = intensidad corregida = $I_o - B_g$

$$\% \text{ inclusión} = \frac{I_c \text{ banda de inclusión}}{I_c \text{ banda inclusión} + I_c \text{ banda exclusión}} \times 100$$

Estrategia utilizada para cuantificar la inclusión del exón 7 en el RNA mensajero maduro

Debido a la alta similitud de secuencia entre los genes *SMN1* y *SMN2*, los productos de PCR que resultan de utilizar los primers descritos en 3.3 no permiten distinguir los mensajeros de uno u otro gen (Figura 1, izquierda). La existencia de un cambio de base que genera un sitio de restricción para la enzima *DdeI* (CTNAG) en el exón 8 del gen *SMN2* permite que, después de digerir los productos de PCR con *DdeI*, puedan separarse en geles de poliacrilamida nativo 2 bandas específicas para *SMN2* de 382 y 328 pares de bases (pb) respectivamente, que corresponden, también respectivamente, a los eventos de inclusión y exclusión del exón 7 de *SMN2* (Figura M.1, derecha). Son estas bandas (óvalo rojo) cuya intensidad cuantificamos mediante el programa Image J permitiéndonos establecer el porcentaje de inclusión del exón 7 en cada condición ensayada.

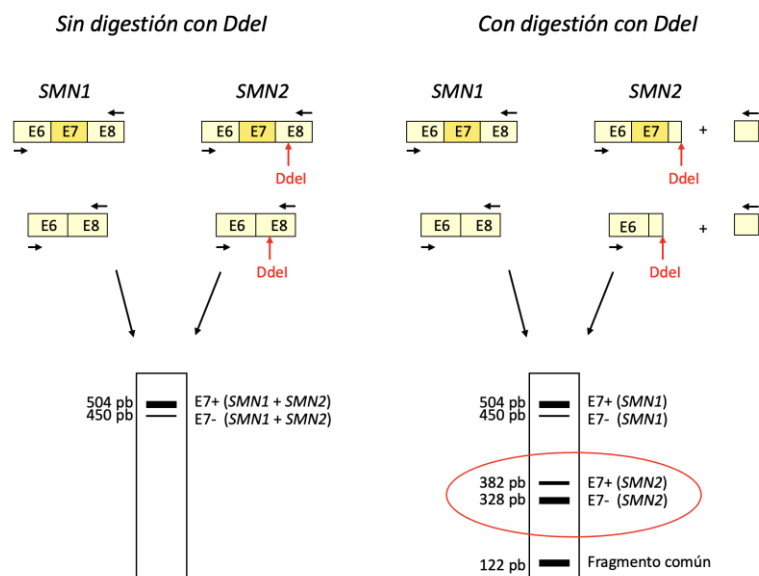


Figura M.1

Los resultados de % de inclusión de exón 7 en el RNA mensajero maduro en función de la concentración de ASO transfectedo se grafican.

7. Gel de Poliacrilamida para productos de PCR punto final

Para el análisis de los productos de PCR, se prepararon geles de poliacrilamida utilizando una mezcla de acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 30%, agua destilada, y buffer TBE 5X, junto con APS al 10% y TEMED para iniciar la polimerización. La solución de gel se vertió entre los vidrios con separadores y se dejó gelificar completamente antes de montar el sistema en la cuba de electroforesis, la cual se llenó con TBE 1X en los compartimientos superior e inferior. Los pocillos se lavaron con una pipeta Pasteur para garantizar su limpieza antes de cargar entre 15 y 20 µl de las muestras de PCR, previamente mezcladas con buffer de carga 10X. La corrida se realizó a una potencia constante de 15 watts durante 1 hora y 20 minutos. Al finalizar, el gel se retiró y se sumergió en una solución de bromuro de etidio (40 µl de una solución de 10 mg/ml en 100 ml de agua destilada) durante 20 minutos. Posteriormente, se enjuagó con agua destilada y las bandas se visualizaron en un transiluminador de UV, lo que permitió una identificación clara de los productos de splicing sin necesidad de isótopos radiactivos.

8. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos de los resultados obtenidos, se utilizó R Studio. Se realizaron pruebas ANOVA de una o dos vías, seguidas de comparaciones múltiples corregidas mediante el método de Bonferroni para evaluar las diferencias significativas entre las condiciones experimentales. En los casos en los que sólo se compararon dos grupos, se empleó la prueba T-TEST, considerando un criterio de significancia estadística de $p < 0.05$.

La cuantificación de las bandas de splicing obtenidas por RT-PCR se realizó mediante el software FIJI (Image J), calculando la relación de inclusión y exclusión de los exones. Esta cuantificación permitió obtener medidas precisas de la eficiencia del splicing en diferentes condiciones experimentales. Además, se utilizó R Studio para llevar a cabo los análisis estadísticos, con un script que incluyó la prueba de Shapiro-Wilk para la evaluación de la normalidad de las variables y la prueba de Levene para la homogeneidad de varianza.

Se planteó un modelo lineal general (lm) para analizar el impacto de las variables explicativas en la relación de inclusión/exclusión del evento de splicing en cuestión, evaluando los residuos y generando gráficos de dispersión para validar los supuestos del modelo. La representación de los resultados incluyó gráficos de error y diagramas de dispersión generados en GraphPad Prism 9, mostrando las medias y las desviaciones estándar, así como las comparaciones de emmeans. Este enfoque proporcionó un análisis detallado y riguroso de los datos, asegurando una interpretación precisa de los experimentos cuantitativos.

9. Diseño de RNAs guía

El diseño de las guías de RNA se realizó siguiendo el protocolo del laboratorio de Zhang, utilizando herramientas bioinformáticas para identificar secuencias-objetivo específicas en el genoma. Se empleó el UCSC Genome Browser para visualizar y seleccionar regiones genómicas de interés, asegurando la especificidad y eficiencia de las guías. Posteriormente, las secuencias candidatas se evaluaron con el CRISPR-Cas9 gRNA Design Checker de Integrated DNA Technologies (IDT) para analizar su potencial de unión y minimizar posibles efectos fuera del objetivo. Este enfoque integrado garantizó la selección de guías de RNA óptimas para los experimentos de dCas9.

10. Plásmidos empleados.

Para la clonación de RNA guía dirigidos a regiones específicas del genoma, se utilizó el plásmido lentiGuide-Puro (Addgene #52963), el cual permite la expresión de RNA guía bajo el promotor U6 y

selección mediante puromicina. La expresión de la nucleasa muerta dCas9 fusionada al dominio activador transcripcional VP64 se realizó mediante el plásmido dCAS9-VP64_GFP (Addgene #61422), que coexpresa dCas9-VP64 y GFP mediante una secuencia 2A, bajo el control del promotor EF1 α . Ambos plásmidos fueron cotransfectados en pocillos de placas de 12 pocillos utilizando Lipofectamine 2000 (Life Technologies), con un total de 2 μ g de DNA por pocillo en una proporción molar 6:1 (plásmido guía : plásmido dCas9), correspondiente aproximadamente a 1.5 μ g del plásmido guía y 0.5 μ g del plásmido dCas9. Las células fueron incubadas por 96 horas post-transfección antes de su procesamiento.

Para los ensayos de sobreexpresión de G9a, se utilizó un plásmido de origen murino codificante para G9a con inclusión del exón 10 (Flag-G9a E10+), clonado en el backbone pcDNA3. Esta construcción fue originalmente reportado por Fiszbein et al., 2016, y gentilmente provisto por los doctores Slimane y Shinkai. Se transfectaron 500 ng de plásmido por pocillo en placas de 12 pocillos, también utilizando Lipofectamine 2000, y se incubaron las células durante 72 horas antes del análisis.

11. Construcción de RNA guía y clonado.

Para la construcción de guías de RNA, se siguió un protocolo basado en las metodologías de Zhang *et al.* Se comenzó con la digestión del vector lentiviral, como el LentiGuide-Puro, utilizando la enzima de restricción BsmBI en presencia de FastAP para desfosforilar los extremos. La mezcla de digestión contenía 5 μ g de vector, 3 μ l de BsmBI, 3 μ l de FastAP, 6 μ l de buffer FastDigest 10X, 0.6 μ l de DTT 100 mM y se completó con agua destilada hasta un volumen total de 60 μ l. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se realizó una purificación en gel del fragmento de mayor tamaño (~9 kpb) utilizando un kit QIAquick para eliminar el fragmento de relleno de ~2 kpb. Paralelamente, se prepararon los primers guía (100 μ M cada uno) y se aparearon mediante una reacción de fosforilación y desnaturalización en un termociclador con una mezcla que incluía 1 μ l de cada oligo, 1 μ l de buffer de ligación T4 10X, 6.5 μ l de agua destilada y 0.5 μ l de T4 PNK. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, seguida de una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos y un enfriamiento gradual a 25°C. Los oligos alineados se diluyeron 1:200 antes de la ligación. La reacción de ligación incluyó 50 ng de vector digerido, 1 μ l del dúplex de oligos, 5 μ l de buffer de ligación 2X Quick Ligase y agua destilada hasta un volumen final de 10 μ l, a la que se añadió 1 μ l de Quick Ligase. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La transformación se realizó en cepas bacterianas Stbl3 debido a la presencia de LTRs en los vectores, y las placas se incubaron a 37°C

durante 16 horas. Las colonias obtenidas se seleccionaron y confirmaron mediante secuenciación Sanger para asegurar la inserción correcta del RNA guía en el vector. Este enfoque permite la producción de plásmidos que expresan las guías de RNA usadas en este trabajo.

12. Preparación de plásmidos a mediana y gran escala

Para la preparación de plásmidos a mediana y gran escala, se utilizaron kits de maxiprep de QIAGEN, siguiendo los pasos recomendados por el fabricante. Las colonias de cultivo bacteriano se centrifugaron a 6000 x g durante 15 minutos a 4 °C para recolectar el pellet de bacterias. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 10 ml de Buffer P1 que contenía RNasa A, seguido de la adición de 10 ml de Buffer P2 y una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente para lisar las células. Se añadió 10 ml de Buffer P3 preenfriado para neutralizar la solución, y la mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos.

La solución se centrifugó a $\geq 20,000$ x g durante 30 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se aplicó a una columna QIAGEN-tip 500 previamente equilibrada con Buffer QBT. Las impurezas se eliminaron lavando la columna con 2 x 30 ml de Buffer QC. El DNA plasmídico se eluyó con 15 ml de Buffer QF y se precipitó con 10.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a $\geq 15,000$ x g durante 30 minutos a 4 °C y se lavó con 5 ml de etanol al 70%. Finalmente, el pellet de DNA se secó al aire durante 5-10 minutos y se resuspendió en un volumen adecuado de buffer TE o Tris·Cl pH 8.5.

13. Control de calidad y cuantificación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit con el reactivo Quant-iT dsDNA BR (Invitrogen), un método basado en fluorimetría que permite la cuantificación específica de DNA, evitando interferencias por RNA contaminante. Para confirmar la calidad del DNA plasmídico, se realizaron cortes con enzimas de restricción y se analizaron las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v, verificando el patrón de bandas esperado.

Adicionalmente, el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) se empleó para medir la concentración y la pureza del DNA. Este equipo mide la absorbancia de la muestra en un rango de 190-840 nm y calcula la concentración de DNA a partir de la absorbancia a 260 nm. También evalúa la pureza de la muestra en relación con proteínas (relación 260/280) y contaminantes como fenol o

sales (relación 260/230). La ventaja de este método es que requiere sólo 1 µL de muestra sin el uso de reactivos adicionales.

Para asegurar la calidad del DNA, una alícuota se corrió en un gel de agarosa al 1% y, cuando fue posible, se utilizaron otras alícuotas digeridas con enzimas de restricción que generaron fragmentos de tamaño conocido. Esto permitió verificar la integridad y el tamaño esperado del DNA plasmídico.

14. Síntesis de oligonucleótidos antisentido (ASO)

Se emplearon los mismos oligonucleótidos antisentido (ASOs) descritos en investigaciones previas, con las secuencias y modificaciones correspondientes. En esta tesis, se utilizaron los siguientes ASOs: ASO1, con la secuencia 5'-ATTCACCTTTCATAATGCTGG-3'; un control con siete mutaciones en la secuencia 5'-AATCATTTGCTTCATACAGG-3'; y ASO2, con la secuencia 5'-AAAGTATGTTTCTTCCACAC-3'. Todos los oligonucleótidos estaban modificados químicamente con 2'-O-metoxietil y un esqueleto de fosforotioato y fueron adquiridos de IDT. Adicionalmente, se usó un oligonucleótido modificado con 2'-OMe y esqueleto de fosforotioato, con una secuencia similar a la de ASO1, 5'-AUUCACUUUCAUAAUGCUGG-3', que se compró a TriLink. Todos los oligonucleótidos se disolvieron en agua destilada Milli-Q.

15. Línea celular Knockout de G9a

La línea celular HEK293T CRISPR KO de G9a fue donada de trabajos previos del laboratorio Kornblihtt (Fiszbein et al., 2016) y el KO fue confirmado en este trabajo por Western Blot que no expresa la metiltransferasa G9a. En los experimentos en los que se utilizó esta línea celular, se sembró el mismo número de células que en los cultivos HEK293T wild-type (150.000 células por pocillo en un multiwell de 12 para los experimentos de RT-PCR o western blot, o 1.8×10^6 células en una placa de 10 cm para los experimentos de ChIP), utilizando células de pasajes similares para asegurar la comparabilidad entre condiciones experimentales.

16. Línea celular Fibroblastos de paciente de AME 3813

Los fibroblastos utilizados provienen de la línea celular GM03813, adquirida del Coriell Cell Repositories (Camden, Nueva Jersey, EE. UU.; <https://catalog.coriell.org/>). Esta línea fue derivada de un paciente masculino con diagnóstico de atrofia muscular espinal tipo II, portador de una delección homocigota del gen *SMN1* (ausencia de exones 7 y 8) y con tres copias del gen *SMN2*. Las células fueron cultivadas según las recomendaciones del proveedor.

17. Knockdown mediante RNAi:

Para llevar a cabo el knockdown de los genes GLP, SUV39, PRDM2 y HP1 β , se emplearon siRNAs ON-TARGETplus SMARTpool de Dharmacon. Estos SMARTpools consisten en una mezcla de cuatro siRNAs diseñados para dirigirse a diferentes sitios dentro del gen de interés, aumentando la eficacia del silenciamiento y reduciendo los efectos fuera del objetivo. La transfección de los siRNAs se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando reactivos de transfección optimizados para asegurar una entrega eficiente y minimizar la toxicidad celular. Las células se incubaron con los siRNAs durante 96 horas para permitir un silenciamiento efectivo de los genes objetivo.

Como control negativo, se utilizó un siRNA no específico dirigido contra una secuencia que no tiene homología con ningún gen humano conocido, lo que permitió evaluar los efectos específicos del knockdown y descartar posibles efectos no específicos. La eficacia del knockdown se evaluó mediante qPCR para cuantificar la reducción en los niveles de mRNA de los genes objetivo y Western Blot para analizar la disminución en la expresión proteica correspondiente. Estas metodologías confirmaron la eficiencia del silenciamiento y su impacto en las rutas biológicas investigadas.

18. Inmunoprecipitación de la cromatina (xChIP) y q-PCR

Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizaron en células HEK293T, utilizando aproximadamente 1×10^7 células por condición, correspondientes a una placa de cultivo de 10 cm confluyente. El protocolo experimental previo a la fijación fue análogo al utilizado en los ensayos con dCas9-VP64.

En cada placa de 10 cm, se sembraron aproximadamente 1.8×10^6 células. A las 24 horas, se transfectaron 15 μ g de plásmido *lentiGuide-Puro* (Addgene #52963) para la expresión de RNA guías y 5 μ g del plásmido *dCAS9-VP64_GFP* (Addgene #61422), utilizando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. A las 24 horas posteriores a la transfección de plásmidos, se transfectó el oligonucleótido antisentido ASO1 a una concentración final de 100 nM.

72 horas después de la transfección de ASO1 (96 horas post-transfección de plásmidos), las células se fijaron en formaldehído al 0.5% durante 10 minutos a temperatura ambiente para entrecruzar (crosslinking) los complejos proteína-DNA. El entrecruzamiento fue detenido con la adición de glicina a una concentración final de 0.125 M durante 5 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS

frío, se recolectaron por raspado, y se procesaron inmediatamente para la lisis célula y preparación de la cromatina.

En el caso del experimento de ChIP realizado en células HEK293T G9a KO, no se emplearon plásmidos, y se transfectaron directamente los oligonucleótidos antisentido (ASO1 y Scramble) a las 24 horas de la siembra, a una concentración final de 100 nM. Las células se incubaron durante 72 horas post-transfección de ASO, siguiendo las mismas condiciones que en los demás experimentos con ASOs, y luego se procedió al crosslinking como se describió previamente.

El proceso de lisis se hizo en dos pasos: primero, con un buffer de lisis I para aislar los núcleos y, luego, con un buffer de lisis II para lisar los núcleos y liberar el contenido nuclear.

La inmunoprecipitación se llevó a cabo en un buffer de IP compuesto por 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 15 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.01% SDS y un cóctel de inhibidores de proteasas. Se utilizaron 8 µg de cromatina junto con 2 µg de anticuerpo específico o el anticuerpo de control IgG. Anti-H3K9me2 (1 µg, Abcam ab1220), Anti-H3 (2 µg, Abcam ab1791), H3K9Ac (2 µg, Abcam ab4441), Anti-Histone H3 (acetyl K9 + K14 + K18 + K23 + K27) (2 µg, Abcam ab47915). Las muestras inmunoprecipitadas se lavaron secuencialmente con buffers de baja sal (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), alta sal (20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), un buffer de cloruro de litio (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato sódico), y se completó con lavados con buffer TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). La elución de la cromatina se realizó en un buffer de SDS al 1% y NaHCO₃ 100 mM, y el crosslinking se revirtió durante la noche a 65 °C.

El DNA recuperado fue purificado mediante el protocolo QIAquick PCR de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó usando un espectrofotómetro Nanodrop o un fluorómetro Qubit. Los análisis de qPCR se llevaron a cabo utilizando el colorante intercalante SYBR Green y una curva estándar generada en paralelo para normalizar los datos mediante regresión lineal. Primers usados se encuentran en la tabla 1.

19. Captura de Conformación Cromosómica (3C)

Los experimentos de Captura de Conformación Cromosómica (3C) se realizaron en células HEK293T, utilizando aproximadamente 1×10^7 células por condición, correspondientes a una placa de cultivo de 10 cm confluyente. El protocolo experimental fue análogo al utilizado en los ensayos con dCas9-VP64. En cada placa de 10 cm, se sembraron aproximadamente 1.8×10^6 células. A las 24 horas, se transfectaron 15 µg de plásmido *lentiGuide-Puro* (Addgene #52963) para la expresión de RNA guías

y 5 µg del plásmido *dCAS9-VP64_GFP* (Addgene #61422), utilizando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. A las 24 horas posteriores a la transfección de plásmidos, se transfectó el oligonucleótido antisentido ASO1 a una concentración final de 100 nM.

Las células fueron recolectadas 72 horas después de la transfección de ASO1 (96 horas post-transfección de plásmidos). Para ello, se tripsinizaron (0.25% tripsina, 37 °C, 5 min), se resuspendieron en medio DMEM suplementado con 10% FBS, y se centrifugaron ($400 \times g$, 3 min). El pellet celular se resuspendió en PBS con 10% FBS (500 µL por 1×10^7 células) para su posterior procesamiento en el protocolo de 3C.

Para la fijación, se incubaron con formaldehído al 0.5% (10 min, temperatura ambiente), se inactivó con glicina 0.125 M (5 min, hielo) y se centrifugó (225 g, 8 min, 4 °C).

Las células se lisaron en buffer frío (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, inhibidores de proteasas), incubando en hielo (10 min) y centrifugando (400 g, 5 min, 4 °C). El pellet se resuspendió en buffer Cutsmart 1.2× con SDS al 0.3% (37 °C, 1 h, 900 rpm), se neutralizó con Triton X-100 al 2% (37 °C, 1 h, 900 rpm) y se tomó una alícuota de 10 µL para evaluar la digestión. Se añadió HINF1 (1000 U) y se incubó (37 °C, overnight, 900 rpm). Posteriormente, se inactivó el SDS (0.3%, 65 °C, 25 min, 900 rpm), los núcleos se ligaron en buffer de ligación 1.15× con Triton X-100 al (2%, 37 °C, 1 h) y 100 U de ligasa (16 °C, 4 h; temperatura ambiente, 30 min).

Para la reversión del crosslinking, se trató con proteinasa K (10 mg/mL, 65 °C, overnight), seguido de RNasa A (10 mg/mL, 37 °C, 30–45 min), extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol (−80 °C, 1 h). Tras centrifugación (2200 g, 45 min, 4 °C) y lavado con etanol al 70%, el pellet se resuspendió en 200 µL de agua.

La eficiencia de digestión se evaluó mediante qPCR comparando muestras sin digerir y digeridas con primers específicos en sitios de restricción.

20. Uso de inteligencia artificial para la redacción del manuscrito

Realizar un doctorado en Argentina fue una experiencia sumamente enriquecedora para mi formación académica, ya que me impulsó a desarrollar una comprensión profunda de los conceptos científicos y aplicarlos de manera estratégica. Sin embargo, el español es mi tercer idioma, que aprendí a hablar en una etapa adulta. Por lo tanto, la comunicación, nomenclatura y escritura fue un importante desafío con el cual me enfrenté a lo largo de mi doctorado, que culmina con la escritura de este trabajo, extenso y técnico.

Para afrontar esta dificultad, recurrí al uso de un modelo lingüístico de inteligencia artificial, ChatGPT, que resultó una herramienta de gran utilidad. No sólo me ayudó a generar un manuscrito más fluido y estructurado, sino que también me enseñó a redactar en español de manera más clara y organizada. A lo largo del proceso de escritura, y tras numerosas interacciones con este modelo lingüístico, fui incorporando estilos de redacción más coherentes y aprendiendo a estructurar mejor las oraciones para transmitir conceptos con mayor precisión.

El impacto de esta herramienta en mi capacidad de escritura en español es notable y ha sido clave en la evolución de mi expresión escrita durante la elaboración de este trabajo.

20. Listado de primers utilizados en esta tesis

Nombre	Forward	Reverse
SMN2 mRNA	AAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTG	TCTGATCGTTTCTTTAGTGGTGTC
SMN2pre RNA	CGGGTTTGCTATGGCGATGAG	GGCTGCGGAAGGAGAGTTGG
SMN2 minigene	CCTTCATATTCCAGTTCTCTTG	TACCTGTAACGCTTCACATTCC
SMN_36	CAAATGTGGGAGGGCGATAACC	TTCTGGGAGCGGAACAGTACG
SMN_38	GGCTCACTACAACCTCCTC	TTCAGATTATTCTCCTCCATTCC
SMN_51	TCCTTACAGGGTTTTAGACAAAATC	CATAATGCTGGCAGACTTACTCC
SMN_50	GCTCAGGTGATCCAACGTCTC	CGTGGTGGCTCAGGCTAGG
SMN_138	ACATATAAGCCATTTAGCAACCC	GAACTCCTGACCTCGTAATCC
SMN_139	GAGACCAGCCTACACAATATGC	CCGCCTCAACCTCCCAAG
SMN_140	CCGAAACCCCGTCTCTACTAAATAC	AAGCGATCCTCCACCTCAG
SMN_141	AATGTAGTATGGTTCTGTGTCTC	GTTTGCTCAAGGTAGTCTGG
SMN_42	TTTATCTCCCTCCCGCTATTC	AATCTCTTTGAGTCTTAGTTTCCC
SMN_46	TCTCTTGATGATGCTGATGC	AGATGCTGAGTGATTACTTACC
SMN_135	GCAAGGCAAGGCATTACAG	CCTGAGCAATAGAGTGAGACC
SMN_136	CACTGTGCCTAGCCTGAG	GGATCACTTGAGACCTGGAG
SMN_93	ACTGGTTGGTTGTGTGGAAG	AGTCTGCTGGTCTGCCTAC
MYOD_1	ACAGTGGGTGGGCATTACAG	GAGCGGTGGCGACAGTAG
MYOD_2	TCTCTGCCGCTTGGGTTG	CATAGAAGTCGTCCGTTGTGG
GAPDH_1	CTCTCTCCCATCCCTTCTCC	TTGCCAAGTTGCCTGTCC
GAPDH_2	ATGAATGGGCAGCCGTTAG	TCGCTCCACCTGACTTCC
hnRNPA1_1	GCATCGTTAAAGTCTCTCTTCACC	CTCCTCAGGCTCTCATCAGTTG
hnRNPA1_2	TGGCATTAAAGAAGACACTGAAG	TCAAAGGTTACAAAGGCAAAGC
Gapdh	GAATGGGAAGCTTGTCATCAACGG	CCGTTCAGCTCTGGGATGACCTTG
HP1b	GGAGCACAATACTTGGGA	CGGCACTGTTTGAGAAAT
PP_CRISPR_UCSC_1.f w	CACCGATCTGTAAAAGACTGAGGTG	AAACCACCTCAGTCTTTTACAGATC
PP_CRISPR_UCSC_2.f w	CACCGGCCTCCAAAAGTGCAAGGCA	AAACTGCCTTGCACTTTTGAGGCC C

PP_CRISPR_UCSC_3.fw	CACCGCAATTGAATGGTAGATAGAG	AAACCTCTATCTACCATTCAATTGC
PP_CRISPR_UCSC_4.fw	CACCGAACTCTGTAGAGGTAATATG	AAACCATATTACCTCTACAGAGTTC
PP.Pro200(+).fw	CACCGatataacacagtgaaatgaa	AAACttcatttcactgtgttatatC
PP.Pro200(-).fw	CACCGagagcctcgccctgtcgtc	AAACgagcgacagggcgaggctctC
PP.pro375b(-).fw	CACCGagtaggagcttacatttact	AAACagtaaatgtaagctcctactC
PP.pro375b(+).fw	CACCGgcttacatttacttttccaa	AAACttggaaaagtaaatgtaagcC
PP.pro500b(-).fw	CACCGgctctgtcgtcagagtgcag	CAAActgcactctgacgacagagcC
PP.pro500b(+).fw	CACCGcaaacaacaaataaggttgg	CAAACcaacctattttgtgtttgC
PP_CRSPR_1.f	CACCGTTTAGACAAAATCAAAAAGA	AAACTCTTTTTGATTTTGTCTAAAC
PP_CRSPR_2.f	CACCGGACAAAATCAAAAAGAAGGA	AAACTCCTTCTTTTTGATTTTGTCC
PP_CRSPR_3.f	CACCGatttaaaattaggccggcg	AAACcgccggcctaatttttaaatC
PP_CRSPR_4.f	CACCGtaaaaattaggccggcgtgg	AAACccacggccgctaatttttaC
PP_CRSPR_5.f	CACCGactggaattcgtaagcctc	AAACgaggcttgacgaattccagtC
PP_CRSPR_6.f	CACCGctcaggtgatccaactgtct	AAACagacagttggatcacctgagC
PP_CRSPR_7.f	CACCGcaactgcctcaccaccgtgc	AAACgcacgggtgtgaggcagttgC
PP_CRSPR_8.f	CACCGgtaatcccaactactcacgt	AAACacgtgagtagttgggattacC
PP_CRSPR_9.f	CACCGcccaactactcacgtgggtg	AAACcaccacgtgagtagttgggC
PP_CRSPR_10.f	CACCGtgcttgaacccgatagcag	AAACctgctatccgggttcaagcaC
PP_CRSPR_11.f	CACCGaatgtatgtgaggcgtatg	AAACcatagcctcacatacttC
PP_CRSPR_12.f	CACCGcaactgcctcaccaccgtgc	AAACgcacgggtgtgaggcagttgC
PP_CRSPR_13.f	CACCGtgtaatcccaactactcacg	AAACcgtgagtagttgggattacaC
PP_CRSPR_14.f	CACCGcagaatctaactgttgaca	AAACtgtccaccagtttagattctgC
PP_CRSPR_15.f	CACCGatgttacagaatctaactgg	AAACccagtttagattctgtaacatC
PP_CRSPR_16.f	CACCGTACTTAACTGGTTGGTTGTG	AAACCACAACCAACCAGTTAAGTAC
PP_CRSPR_17.f	CACCGtcagatgttagaaagttgaa	AAACttcaacttttaacatctgaC
PP_CRSPR_18.f	CACCGtgccaaaactattagataaaagg	AAACtttatctaagttttggcaC
PP_CRSPR_19.f	CACCGgcattatgaaagtgaatctt	AAACaagattcactttcataatgcC
PP_CRSPR_20.f	CACCGAGTTTAACTGGTGTCCACAG	AAACCTGTGGACACCAGTTAAACTC

PP_CRSPR_21.f	CACCgATTGTGATATGGGATAACCT	AAACAGGTTATCCCATATCACAAT C
PP_CRSPR_22.f	CACCgAAGTATGAGAATTCTAGTAG	AAACCTACTAGAATTCTCATACTTC
PP_CRSPR_23.f	CACCgACTTCCTTTATTTTCCTTAC	AAACGTAAGGAAAATAAAGGAAG TC
PP_CRSPR_24.f	CACCgCCTAGCCTGAGCCACCACGC	AAACGCGTGGTGGCTCAGGCTAGG C
PP_CRSPR_25.f	CACCGAAGATTCACCTTCATAATGC	AAACGCATTATGAAAGTGAATCTT C
PP_CRSPR_26.f	CACCGCTTACTTTTGTA AAACTTTA	AAACTAAAGTTTTACAAAAGTAAG C
PP_CRSPR_27.f	CACCGAGTGCAAGGCAAGGCATTACA GG	AAACGTAATGCCTTGCCTTGCACTC
U6 snRNA	CTCAAAAAATTGGTTTAAGACTCAGA	CTCGCTTCGGCAGCACA
3'UTR_A	GGCGGAAGTCGTCACTCTTA	TTTCTGCAGGGTTGCCATTAAC
3'UTR_B	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	ACTGAGCTAGTTCTCTGGCTT
3'UTR_C	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	AAAGCCACCACACTACCTGG
3'UTR_D	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	GGCCACCGTACTGTTCCG
3'UTR_E	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	ACCACACTACCTGGCTGGAT
3'UTR_F	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	ACTGAGCTAGTTCTCTGGCTT
3'UTR_CTL1	AAAGCCACCACACTACCTGG	ACAGCTGTGGCTGTAGAACA
3'UTR_CTL2	ACCACACTACCTGGCTGGAT	CAGCTGTGGCTGTAGAACAGA
3'UTR_CTL3	ACTGAGCTAGTTCTCTGGCTT	TGGCAACCCTGCAGAAAAGT
E7_CTL1	AGGAGTAAGTCTGCCAGCAT	TCTTCCACACAACCAACCAGT
E7_CTL2	AAGGAGTAAGTCTGCCAGCAT	CTTCCACACAACCAACCAGT
E7_CTL3	TAAGGAGTAAGTCTGCCAGCAT	TCTTCCACACAACCAACCAG
exon 7_A	GGCGGAAGTCGTCACTCTTA	CATAATGCTGGCAGACTTACTCC
exon 7_B	ACCACTCGTAGAAAGCGTGA	TTAAGGAGTAAGTCTGCCAGCAT
exon 7_C	GGGCGATAACCACTCGTAGAA	CATAATGCTGGCAGACTTACTCC
exon 7_D	GGCGGAAGTCGTCACTCTTA	CATAATGCTGGCAGACTTACTCC
exon 7_E	ACCACTCGTAGAAAGCGTGA	TTAAGGAGTAAGTCTGCCAGCAT
exon 7_F	GGGCGATAACCACTCGTAGAA	CATAATGCTGGCAGACTTACTCC

exon 7_G	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	CATAATGCTGGCAGACTTACTCC
exon 7_H	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	AAGGAGTAAGTCTGCCAGCAT
exon 7_I	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	ATTAAGGAGTAAGTCTGCCAGC
exon 7_J	CGGGTTTGCTATGGCGATG	CATAATGCTGGCAGACTTACTCC
intron 1_A	GGCGGAAGTCGTCACCTCTTA	TTCAGATTATTCTCCTCCATTCC
intron 1_B	CGGGTTTGCTATGGCGATG	TTCAGATTATTCTCCTCCATTCC
intron 1_C	GGCGGAAGTCGTCACCTCTTA	TTCAGATTATTCTCCTCCATTCC
intron 1_D	CGGGTTTGCTATGGCGATG	TTCAGATTATTCTCCTCCATTCC
intron 3_A	CGGGTTTGCTATGGCGATG	AATCTCTTTGAGTCTTAGTTTCCC
intron 3_A	CGGGTTTGCTATGGCGATG	AATCTCTTTGAGTCTTAGTTTCCC
intron 6_A	GGCGGAAGTCGTCACCTCTTA	AGATGCTGAGTGATTACTTACC
intron 6_B	ACCACTCGTAGAAAGCGTGA	AGATGCTGAGTGATTACTTACC
intron 6_C	CGGGTTTGCTATGGCGATG	AGATGCTGAGTGATTACTTACC
intron 6_D	GGCGGAAGTCGTCACCTCTTA	AGATGCTGAGTGATTACTTACC
intron 6_E	CGGGTTTGCTATGGCGATG	AGATGCTGAGTGATTACTTACC
intron 6_F	CGGGTTTGCTATGGCGATG	AGATGCTGAGTGATTACTTACC
PRO_CTL1	GGCGGAAGTCGTCACCTCTTA	ATCGACTTGATGCTGTCCCG
PRO_CTL2	CGGGTTTGCTATGGCGATGA	CGGAAGAAGGGTGCTGAGAG
PRO_CTL3	GTA CTGTTCCGCTCCCAGAA	ATAGGGAGACTGCACTGGCT
Pro-1.8kpb_A	CGGGTTTGCTATGGCGATG	ATTTATTTGTTTGAGATGGAGTCG
Pro-1.8kpb_B	TCACTCTTAAGAAGGGACGGG	ATTTATTTGTTTGAGATGGAGTCG
Pro-1.8kpb_C	CGGGTTTGCTATGGCGATG	ATTTATTTGTTTGAGATGGAGTCG

Tabla 1: Listado de primers utilizado en este trabajo.

Bibliografía

- Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016a). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487–500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
- Alló, M., Buggiano, V., Fededa, J. P., Petrillo, E., Schor, I., de la Mata, M., Agirre, E., Plass, M., Eyra, E., Elela, S. A., Klinck, R., Chabot, B., & Kornblihtt, A. R. (2009a). Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(7), 717–724. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1620>
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569–573. <https://doi.org/10.1038/nature13579>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barshad, G., Lewis, J. J., Chivu, A. G., Abuhashem, A., Krietenstein, N., Rice, E. J., Ma, Y., Wang, Z., Rando, O. J., Hadjantonakis, A.-K., & Danko, C. G. (2023). RNA polymerase II dynamics shape enhancer–promoter interactions. *Nature Genetics*, 55(8), 1370–1380. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01442-7>
- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome—Biological and translational implications. *Nature Reviews. Cancer*, 11(10), 726–734. <https://doi.org/10.1038/nrc3130>
- Bellofatto, V., & Wilusz, J. (2011). Transcription and mRNA Stability: Parental Guidance Suggested. *Cell*, 147(7), 1438–1439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.002>

- Bennett, C. F., Krainer, A. R., & Cleveland, D. W. (2019). Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Neuroscience*, 42(Volume 42, 2019), 385–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050501>
- Bentley, D. L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews Genetics*, 15(3), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nrg3662>
- Bernstein, B. E., Stamatoyannopoulos, J. A., Costello, J. F., Ren, B., Milosavljevic, A., Meissner, A., Kellis, M., Marra, M. A., Beaudet, A. L., Ecker, J. R., Farnham, P. J., Hirst, M., Lander, E. S., Mikkelsen, T. S., & Thomson, J. A. (2010). The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1045–1048. <https://doi.org/10.1038/nbt1010-1045>
- Boda, B., Mas, C., Giudicelli, C., Nepote, V., Guimiot, F., Levacher, B., Zvara, A., Santha, M., LeGall, I., & Simonneau, M. (2004). Survival motor neuron SMN1 and SMN2 gene promoters: Identical sequences and differential expression in neurons and non-neuronal cells. *European Journal of Human Genetics*, 12(9), 729–737. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201217>
- Butchbach, M. E. R. (2016). Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3, 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00007>
- Cartegni, L., & Krainer, A. R. (2003). Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nature Structural Biology*, 10(2), 120–125. <https://doi.org/10.1038/nsb887>
- Casciello, F., Windloch, K., Gannon, F., & Lee, J. S. (2015). Functional Role of G9a Histone Methyltransferase in Cancer. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00487>

- Chavez, M., Chen, X., Finn, P. B., & Qi, L. S. (2023). Advances in CRISPR therapeutics. *Nature Reviews Nephrology*, 19(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00636-2>
- Chaytow, H., Huang, Y.-T., Gillingwater, T. H., & Faller, K. M. E. (2018). The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 75(21), 3877–3894. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2849-1>
- Cobb, M. (2017). 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLOS Biology*, 15(9), e2003243. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003243>
- Cramer, S. C., Nelles, G., Benson, R. R., Kaplan, J. D., Parker, R. A., Kwong, K. K., Kennedy, D. N., Finklestein, S. P., & Rosen, B. R. (1997). A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke. *Stroke*, 28(12), 2518–2527. <https://doi.org/10.1161/01.str.28.12.2518>
- d’Ydewalle, C., Ramos, D. M., Pyles, N. J., Ng, S.-Y., Gorz, M., Pilato, C. M., Ling, K., Kong, L., Ward, A. J., Rubin, L. L., Rigo, F., Bennett, C. F., & Sumner, C. J. (2017). The Antisense Transcript *SMN-AS1* Regulates SMN Expression and Is a Novel Therapeutic Target for Spinal Muscular Atrophy. *Neuron*, 93(1), 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.033>
- Daxinger, L., & Whitelaw, E. (2012). Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Reviews. Genetics*, 13(3), 153–162. <https://doi.org/10.1038/nrg3188>
- de la Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., & Kornblihtt, A. R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular Cell*, 12(2), 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.001>

- de la Mata, M., & Kornblihtt, A. R. (2006). RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(11), 973–980. <https://doi.org/10.1038/nsmb1155>
- de la Mata, M., Lafaille, C., & Kornblihtt, A. R. (2010). First come, first served revisited: Factors affecting the same alternative splicing event have different effects on the relative rates of intron removal. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(5), 904–912. <https://doi.org/10.1261/rna.1993510>
- Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Colin, M., & Buée, L. (2014). Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: Relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, 14. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017a). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1414. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457–463. <https://doi.org/10.1038/nature02625>
- Egli, M., & Manoharan, M. (2023). Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 51(6), 2529–2573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>
- FDA. (2020, March 24). *FDA approves first drug for spinal muscular atrophy*. FDA; FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-spinal-muscular-atrophy>

- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A., & Pillai, R. S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3), 331–341.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.05.006>
- Fiszbein, A., Giono, L. E., Quaglino, A., Berardino, B. G., Sigaut, L., von Bilderling, C., Schor, I. E., Enriqu  Steinberg, J. H., Rossi, M., Pietrasanta, L. I., Caramelo, J. J., Srebrow, A., & Kornblihtt, A. R. (2016). Alternative Splicing of *G9a* Regulates Neuronal Differentiation. *Cell Reports*, 14(12), 2797–2808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.063>
- Fiszbein, A., Godoy Herz, M. A., Gomez Acuña, L. I., & Kornblihtt, A. R. (2017b). Interplay Between Chromatin and Splicing. In *Chromatin Regulation and Dynamics* (pp. 191–209). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803395-1.00008-3>
- Fong, N., Kim, H., Zhou, Y., Ji, X., Qiu, J., Saldi, T., Diener, K., Jones, K., Fu, X.-D., & Bentley, D. L. (2014). Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II elongation rate. *Genes & Development*, 28(23), 2663–2676. <https://doi.org/10.1101/gad.252106.114>
- Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013 Jul 18;154(2):442–51.
- Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J., & Bentley, D. L. (2008). RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(1), 71–78. <https://doi.org/10.1038/nsmb1352>
- Gostimskaya, I. (2022a). CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Moscow)*, 87(8), 777–788.
<https://doi.org/10.1134/S0006297922080090>
- Heard, E., & Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell*, 157(1), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>

- Himeda, C. L., Jones, T. I., & Jones, P. L. (2016). CRISPR/dCas9-mediated Transcriptional Inhibition Ameliorates the Epigenetic Dysregulation at D4Z4 and Represses DUX4-fl in FSH Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy*, 24(3), 527–535.
<https://doi.org/10.1038/mt.2015.200>
- Hua, Y., Sahashi, K., Hung, G., Rigo, F., Passini, M. A., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2010). Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes & Development*, 24(15), 1634–1644. <https://doi.org/10.1101/gad.1941310>
- Hua, Y., Vickers, T. A., Baker, B. F., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2007). Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biology*, 5(4), e73. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050073>
- Hua, Y., Vickers, T. A., Okunola, H. L., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2008). Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *American Journal of Human Genetics*, 82(4), 834–848.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.01.014>
- Ishigami, Y., Wong, M. S., Martí-Gómez, C., Ayaz, A., Kooshkbaghi, M., Hanson, S. M., McCandlish, D. M., Krainer, A. R., & Kinney, J. B. (2024). Specificity, synergy, and mechanisms of splice-modifying drugs. *Nature Communications*, 15(1), 1880.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-46090-5>
- Jablonka, S., Hennlein, L., & Sendtner, M. (2022). Therapy development for spinal muscular atrophy: Perspectives for muscular dystrophies and neurodegenerative disorders. *Neurological Research and Practice*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s42466-021-00162-9>
- Jenuwein, T. (2006). The epigenetic magic of histone lysine methylation: Delivered on 6 July 2005 at the 30th FEBS Congress in Budapest, Hungary. *The FEBS Journal*, 273(14), 3121–3135.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05343.x>

- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816–21.
- Kadener, S., Cramer, P., Nogués, G., Cazalla, D., De La Mata, M., Fededa, J. P., Werbajh, S. E., Srebrow, A., & Kornblihtt, A. R. (2001). Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing. *EMBO Journal*, 20(20), 5759–5768. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.20.5759>
- Kadener, S., Fededa, J. P., Rosbash, M., & Kornblihtt, A. R. (2002a). Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8185–8190. <https://doi.org/10.1073/pnas.122246099>
- Konermann, S., Brigham, M. D., Trevino, A. E., Joung, J., Abudayyeh, O. O., Barcena, C., Hsu, P. D., Habib, N., Gootenberg, J. S., Nishimasu, H., Nureki, O., & Zhang, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583–588. <https://doi.org/10.1038/nature14136>
- Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., & Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: A pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(3), 153–165. <https://doi.org/10.1038/nrm3525>
- Kugel, S., & Mostoslavsky, R. (2014). Chromatin and beyond: The multitasking roles for SIRT6. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(2), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.002>
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., & Zeviani, M. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80(1), 155–165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3)

- Lim, S. R., & Hertel, K. J. (2001). Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 45476–45483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107632200>
- Loda, A., & Heard, E. (2019). Xist RNA in action: Past, present, and future. *PLoS Genetics*, 15(9), e1008333. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008333>
- Larson MH, Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc*. 2013 Nov;8(11):2180–96.
- Lorson, C. L., & Androphy, E. J. (2000). An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Human Molecular Genetics*, 9(2), 259–265. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.259>
- Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., & Wirth, B. (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6307–6311.
- Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R., & Misteli, T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*, 144(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.056>
- Maeshima, K., Iida, S., & Tamura, S. (2021a). Physical Nature of Chromatin in the Nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(5), a040675. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040675>
- Marasco, L. E., Dujardin, G., Sousa-Luís, R., Liu, Y. H., Stigliano, J. N., Nomakuchi, T., Proudfoot, N. J., Krainer, A. R., & Kornblihtt, A. R. (2022). Counteracting chromatin effects of a splicing-correcting antisense oligonucleotide improves its therapeutic efficacy in spinal muscular atrophy. *Cell*, 185(12), 2057–2070.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.031>
- Marasco, L. E., & Kornblihtt, A. R. (2023b). The physiology of alternative splicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(4), 242–254. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00545-z>

- Monani, U. R., Sendtner, M., Coover, D. D., Parsons, D. W., Andreassi, C., Le, T. T., Jablonka, S., Schrank, B., Rossol, W., Prior, T. W., Morris, G. E., & Burghes, A. H. M. (2000). The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*^{−/−} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*, 9(3), 333–339. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.333>
- Morris, K. V., & Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews. Genetics*, 15(6), 423–437. <https://doi.org/10.1038/nrg3722>
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., Mills, K. D., Patel, P., Hsu, J. T., Hong, A. L., Ford, E., Cheng, H.-L., Kennedy, C., Nunez, N., Bronson, R., ... Alt, F. W. (2006). Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315–329. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>
- Muñoz, M. J., Pérez Santangelo, M. S., Paronetto, M. P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J. J., Bird, G., Bentley, D., Bertrand, E., & Kornblihtt, A. R. (2009). DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell*, 137(4), 708–720. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.010>
- Naftelberg, S., Schor, I. E., Ast, G., & Kornblihtt, A. R. (2015). Regulation of Alternative Splicing Through Coupling with Transcription and Chromatin Structure. *Annual Review of Biochemistry*, 84(Volume 84, 2015), 165–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034242>
- Nieto Moreno, N., Giono, L. E., Cambindo Botto, A. E., Muñoz, M. J., & Kornblihtt, A. R. (2015). Chromatin, DNA structure and alternative splicing. *FEBS Letters*, 589(22), 3370–3378. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.002>

- Nogués, G., Kadener, S., Cramer, P., de la Mata, M., Fededa, J. P., Blaustein, M., Srebrow, A., & Kornblihtt, A. R. (2003). Control of alternative pre-mRNA splicing by RNA Pol II elongation: Faster is not always better. *IUBMB Life*, 55(4–5), 235–241. <https://doi.org/10.1080/1521654031000119830>
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J., & Blencowe, B. J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*, 40(12), 1413–1415. <https://doi.org/10.1038/ng.259>
- Passini, M. A., Bu, J., Richards, A. M., Kinnecom, C., Sardi, S. P., Stanek, L. M., Hua, Y., Rigo, F., Matson, J., Hung, G., Kaye, E. M., Shihabuddin, L. S., Krainer, A. R., Bennett, C. F., & Cheng, S. H. (2011). Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. *Science Translational Medicine*, 3(72), 72ra18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001777>
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013 Feb 28;152(5):1173–83.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rose, N. R., & Klose, R. J. (2014). Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(12), 1362–1372. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.007>

- Sanjana, N. E., Shalem, O., & Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*, 11(8), 783–784. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>
- Schor, I. E., & Kornblihtt, A. R. (2009). Playing inside the genes: Intragenic histone acetylation after membrane depolarization of neural cells opens a path for alternative splicing regulation. *Communicative & Integrative Biology*, 2(4), 341–343. <https://doi.org/10.4161/cib.2.4.8550>
- Schouten, A., & Love, J. (2015). Proposal for the inclusion of Risdiplam in the WHO model list of essential medicines for the treatment of spinal muscular atrophy. (WHO). https://cdn.who.int/media/docs/default-source/essential-medicines/2023-eml-expert-committee/applications-for-addition-of-new-medicines/a40_risdiplam.pdf?sfvrsn=16d9d918_2#:~:text=made%20accessible%20if%20available%20at,if%20available%20at%20affordable%20prices.
- Segelle, A., Núñez-Álvarez, Y., Oldfield, A. J., Webb, K. M., Voigt, P., & Luco, R. F. (2022). Histone marks regulate the epithelial-to-mesenchymal transition via alternative splicing. *Cell Reports*, 38(7), 110357. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110357>
- Singh, N. K., Singh, N. N., Androphy, E. J., & Singh, R. N. (2006). Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Molecular and Cellular Biology*, 26(4), 1333–1346. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.4.1333-1346.2006>
- Splicing activates transcription from weak promoters upstream of alternative exons | Nature Communications*. (n.d.). Retrieved February 17, 2025, from <https://www.nature.com/articles/s41467-023-39200-2>
- Stepper, P., Kungulovski, G., Jurkowska, R. Z., Chandra, T., Krueger, F., Reinhardt, R., Reik, W., Jeltsch, A., & Jurkowski, T. P. (2017). Efficient targeted DNA methylation with chimeric

- dCas9–Dnmt3a–Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 45(4), 1703–1713.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1112>
- Swoboda, K. J., Scott, C. B., Crawford, T. O., Simard, L. R., Reyna, S. P., Krossschell, K. J., Acsadi, G., Elsheik, B., Schroth, M. K., D’Anjou, G., LaSalle, B., Prior, T. W., Sorenson, S. L., Maczulski, J. A., Bromberg, M. B., Chan, G. M., & Kissel, J. T. (2010). SMA CARNI-VAL Trial Part I: Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial of L-Carnitine and Valproic Acid in Spinal Muscular Atrophy. *PLoS ONE*, 5(8), e12140.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012140>
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., & Shinkai, Y. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & Development*, 16(14), 1779–1791. <https://doi.org/10.1101/gad.989402>
- Tan-Wong, S. M., Zaugg, J. B., Camblong, J., Xu, Z., Zhang, D. W., Mischo, H. E., Ansari, A. Z., Luscombe, N. M., Steinmetz, L. M., & Proudfoot, N. J. (2012). GENE LOOPS ENHANCE TRANSCRIPTIONAL DIRECTIONALITY. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6107), 671–675.
<https://doi.org/10.1126/science.1224350>
- Tilgner, H., Knowles, D. G., Johnson, R., Davis, C. A., Chakraborty, S., Djebali, S., Curado, J., Snyder, M., Gingeras, T. R., & Guigó, R. (2012). Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome Research*, 22(9), 1616–1625.
<https://doi.org/10.1101/gr.134445.111>
- Uriostegui-Arcos, M., Mick, S. T., Shi, Z., Rahman, R., & Fiszbein, A. (2023). Splicing activates transcription from weak promoters upstream of alternative exons. *Nature Communications*, 14(1), 3435. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39200-2>

- Van Alstyne, M., Tattoli, I., Delestrée, N., Recinos, Y., Workman, E., Shihabuddin, L. S., Zhang, C., Mentis, G. Z., & Pellizzoni, L. (2021). Gain of toxic function by long-term AAV9-mediated SMN overexpression in the sensorimotor circuit. *Nature Neuroscience*, 24(7), 930–940. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00827-3>
- Venkatesh, S., & Workman, J. L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3), 178–189. <https://doi.org/10.1038/nrm3941>
- Wang, K., Escobar, M., Li, J., Mahata, B., Goell, J., Shah, S., Cluck, M., & Hilton, I. B. (2022). Systematic comparison of CRISPR-based transcriptional activators uncovers gene-regulatory features of enhancer–promoter interactions. *Nucleic Acids Research*, 50(14), 7842–7855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac582>
- Zhong, L., D’Urso, A., Toiber, D., Sebastian, C., Henry, R. E., Vadysirisack, D. D., Guimaraes, A., Marinelli, B., Wikstrom, J. D., Nir, T., Clish, C. B., Vaitheesvaran, B., Iliopoulos, O., Kurland, I., Dor, Y., Weissleder, R., Shirihai, O. S., Ellisen, L. W., Espinosa, J. M., & Mostoslavsky, R. (2010a). The Histone Deacetylase SIRT6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1 α . *Cell*, 140(2), 280. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.041>
- Zhou, V. W., Goren, A., & Bernstein, B. E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews. Genetics*, 12(1), 7–18. <https://doi.org/10.1038/nrg2905>