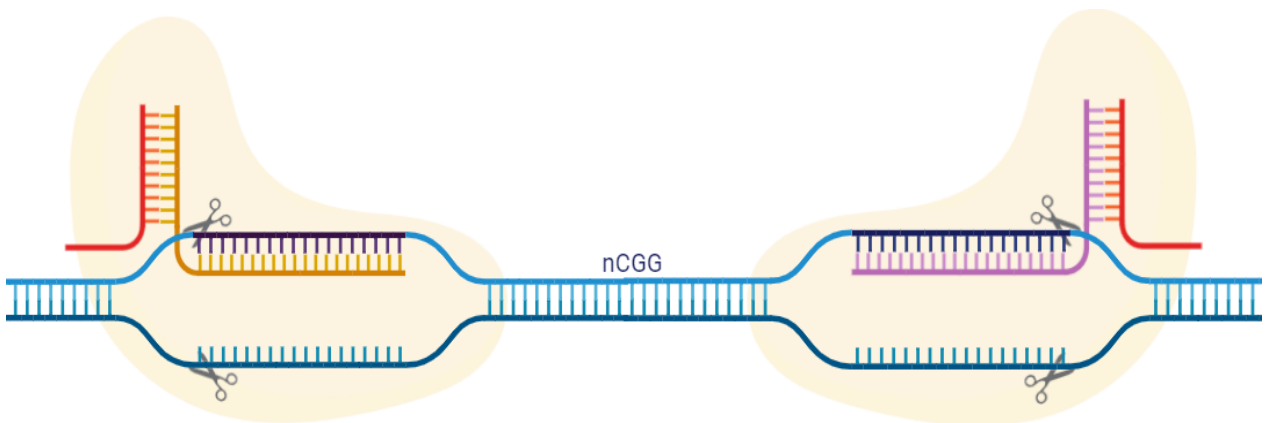




Sección de Biología
Universidad de La Laguna

Diagnóstico genético precoz del Síndrome del X Frágil mediante el sistema CRISPR/Cas9

*Early genetic diagnosis of Fragile X Syndrome using
CRISPR/Cas9 system*



Trabajo de Fin de Grado

Marta Escobar Escobar

Tutorizado por Belinda Rivero Pérez y David Bartolomé Martín

Grado en Biología. Julio 2024.

Índice.

1. Resumen.	3
2. Introducción.	4
2.1. Síndrome del X frágil.	4
2.2. Causa.	4
2.3. Síntomas.	5
2.4. Diagnóstico.	5
2.5. CRISPR/Cas9 como método de diagnóstico.	6
3. Objetivos.	9
4. Materiales y métodos.	9
4.1. Obtención del ADN genómico.	9
4.2. Diseño del clonaje del fragmento de las repeticiones CGG en el plásmido BlueScript II SK(+).	10
4.3. Pasos previos al clonaje.	11
4.3.1. Digestión del ADN genómico.	11
4.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) previa.	11
4.3.3. Purificación de productos de PCR.	13
4.4. Clonaje de las repeticiones CGG en el vector BlueScript II SK(+).	13
4.4.1. PCR con los cebadores del clonaje.	13
4.4.2. Obtención del plásmido BlueScript.	13
4.4.3. Clonaje y transformación bacteriana.	14
4.4.4. Simulación de las repeticiones CGG.	15
4.5. Sistema CRISPR/Cas9.	17
4.5.1. Diseño.	17
4.5.2. Digestión del ADN genómico mediante el sistema CRISPR/Cas9.	18
5. Resultados.	19
5.1. Extracción de ADN genómico.	19
5.2. Digestión del ADN genómico.	20
5.3. Amplificación del fragmento con las repeticiones CGG del gen <i>FMRI</i> .	20
5.4.1. PCR con los cebadores del clonaje.	21
5.4.2. Obtención del plásmido BlueScript.	22
5.4.3. Clonaje y transformación bacteriana.	22
5.3. Sistema CRISPR/Cas9.	25
7. Conclusiones.	30
8. Bibliografía.	31

1. Resumen.

El síndrome del X frágil (SXF) es una enfermedad genética asociada al gen *FMRI*, caracterizada por repeticiones del trinucleótido CGG. Actualmente, el método estándar de diagnóstico es el *Southern blot*, el cual no está al alcance de todos los hospitales. Ese motivo sumado a la variabilidad fenotípica de los niños que padecen el síndrome hace que muchos casos no estén diagnosticando en Canarias. Este estudio exploró el potencial del sistema CRISPR/Cas9 para el diagnóstico molecular del SXF, comenzando previamente con el clonaje de la zona de interés en plásmidos para simplificar la puesta a punto del método. Se implementaron diversas estrategias de PCR, utilizando diferentes métodos de extracción de ADN y condiciones de reacción. No obstante, en ningún caso se obtuvo un resultado eficiente, salvo cuando se optó por el clonaje de tamaños de repeticiones simulados amplificados a partir de un gen diferente. En este trabajo se aplicó el sistema CRISPR/Cas9 para la digestión con genómico, extrayendo el fragmento con las repeticiones, el cual pudo ser visualizado en geles de poliacrilamida. Estos hallazgos sugieren que el sistema CRISPR/Cas9 podría implementarse para la detección temprana y el manejo del SXF, aunque se requieren más investigaciones para validar y optimizar este enfoque, así como su adaptación para la aplicación clínica.

Palabras clave: SXF, *FMRI*, expansión trinucleótidos, CRISPR/Cas9, diagnóstico.

Abstract

Fragile X syndrome (FXS) is a genetic disease associated with the *FMRI* gene, characterized by repeats of CGG trinucleotide. Currently, the standard method of diagnosis is *Southern blot*, which is not available to all hospitals. That reason added to the phenotypic variability of children suffering from the syndrome means that many cases are not being diagnosed in the Canary Islands. This study explored the potential of the CRISPR/Cas9 system for molecular diagnosis of FXS, beginning previously with cloning the area of interest in plasmids to simplify method development. Various PCR strategies were implemented, using different DNA extraction methods and reaction conditions. However, in no case an efficient result was obtained, except when cloning simulated replicate sizes amplified from a different gene was chosen. In this work the CRISPR/Cas9 system was applied for digestion with genomics, extracting the fragment with the repetitions, which could be visualized in polyacrylamide gels. These findings suggest that the CRISPR/Cas9 system could be implemented for the early detection and management of FXS, although more research is needed to validate and optimize this approach, as well as its adaptation for clinical application.

Keywords: FXS, *FMRI*, trinucleotide expansion, CRISPR/Cas9, diagnostic.

2. Introducción.

2.1. Síndrome del X frágil.

En 1943, Martin y Bell identificaron por primera vez un tipo de déficit cognitivo ligado al sexo, el síndrome de Martin-Bell, que afectaba a once hijos de una familia cuyas madres tenían niveles medios de inteligencia (Martin & Bell, 1943). Más tarde, en 1969, Lubs descubrió una constricción cerca del extremo del brazo largo del cromosoma X (Xq27.3) en hombres afectados por discapacidad intelectual y con rasgos faciales característicos. Esta constricción da sensación visual de fragilidad, por lo que acuñó el término “síndrome del X frágil” (Lubs, 1969; Melancia & Trezza, 2018; Ribate Molina, 2007; Protic *et al.*, 2022).

El SXF representa una de las condiciones genéticas más relevantes en el ámbito de la neurogenética, siendo reconocido como la principal fuente hereditaria de discapacidad intelectual y uno de los subtipos más definidos dentro del espectro autista (Romero Espinoza, 2008; Ribate Molina *et al.*, 2010). Esta condición afecta principalmente a varones y se caracteriza por un fenotipo distintivo que es transmitido por mujeres portadoras. El SXF tiene una incidencia estimada de alrededor de 1 de cada 4.000 hombres y 1 de cada 8.000 mujeres (Coffee *et al.*, 2009; Melancia & Trezza, 2018). Su impacto no solo se refleja en la discapacidad intelectual, sino también en una variedad de síntomas que van desde problemas de comportamiento y dificultades en la comunicación hasta trastornos del aprendizaje y del desarrollo (Grupo de Investigación en Retraso Mental de Origen Genético (GIRMOGEN) y Federación Española del Síndrome X Frágil, 2006; Protic *et al.*, 2022).

2.2. Causa.

El SXF es el resultado de una alteración genética específica que involucra la expansión anormal del triplete CGG (citosina-guanina-guanina) en el extremo 5' de la región no codificante del gen *FMRI* (del inglés *Fragile X Mental Retardation 1*). La expansión está correlacionada con una hipermetilación de la zona repetitiva y la isla CpG colindante, lo que resulta en la inhibición de la transcripción del gen y la falta de producción de la proteína FMRP (del inglés *Fragile X Mental Retardation Protein*) (Figura 1) (Ribate Molina *et al.*, 2010; Salcedo-Arellano *et al.*, 2020). Dentro del gen, se encuentran secuencias AGG intercaladas cada 9 o 10 repeticiones CGG (Romero Espinoza, 2008). En individuos afectados, esta expansión supera las 200 repeticiones, lo que conlleva a la metilación completa del gen *FMRI* y a la ausencia de la proteína FMRP (Ribate Molina *et al.*, 2010). Los individuos portadores de la mutación (premutados) presentan entre 55 y 200 repeticiones del triplete CGG, con niveles variables de metilación del gen *FMRI*. Aunque la cantidad de FMRP producida puede ser menor que en individuos no afectados, suele ser

suficiente para permitir un desarrollo neuronal normal (Ribate Molina *et al.*, 2010). Es importante destacar que entre el 20% y el 40% de los individuos con SXF son mosaicos, lo que significa que tienen células con diferentes niveles de metilación del gen *FMRI*. Esto puede dar lugar a la producción de cierta cantidad de FMRP en algunas células, lo que influye en la gravedad y variabilidad de los síntomas (Ribate Molina *et al.*, 2010; Protic *et al.*, 2022).



Figura 1. El gen *FMRI* está compuesto por 17 exones. En el extremo 5' se encuentra la isla CpG, con las repeticiones CGG (Grupo de Investigación en Retraso Mental de Origen Genético (GIRMOGEN) y Federación Española del Síndrome X Frágil, 2006).

2.3. Síntomas.

FMRP es esencial para el transporte y regulación de ARN mensajero (ARNm) a proteínas funcionales, también participa en la captura de hasta un 4% de los ARNm celulares, trasladándolos como complejos proteicos a las dendritas neuronales, lo que influye en la modulación de la traducción y la función sináptica (De Diego Otero *et al.*, 2002). Su disminución o ausencia impacta en la expresión de proteínas y la función cerebral, ya que regula la traducción de ARNm en las sinapsis, siendo clave para la comunicación neuronal. Su déficit conlleva alteraciones en la plasticidad y la comunicación sináptica (Lozano *et al.*, 2016; Tassone *et al.*, 2000; Darnell & Richter, 2012; Salcedo-Arellano *et al.*, 2020).

Las manifestaciones clínicas del SXF son variadas y abarcan una amplia gama de síntomas físicos, conductuales y cognitivos. Entre los síntomas físicos se incluyen características faciales distintivas, como orejas grandes y despegadas, así como problemas de coordinación motora. En cuanto a los síntomas mentales y conductuales, se observan retrasos en el desarrollo del lenguaje y del habla, entre otros (Ribate Molina *et al.*, 2010; Salcedo-Arellano *et al.*, 2020).

2.4. Diagnóstico.

Las técnicas actuales para el diagnóstico molecular del SXF se basan en el estudio del gen *FMRI*, específicamente en el análisis de las repeticiones CGG y el estado de metilación. Para ello, la técnica de diagnóstico por excelencia es el *Southern blot*, que permite conocer el número exacto de repeticiones, junto con estudios de metilación (Grupo de Investigación en Retraso

Mental de Origen Genético (GIRMOGEN) y Federación Española del Síndrome X Frágil, 2006; Ribate Molina *et al.*, 2010; Romero Espinoza, 2008).

Sin embargo, su complejidad, costo y tiempo requerido pueden ser inconvenientes, y en muchos hospitales, como es el caso del Hospital Universitario de Canarias (HUC), donde no se realiza, las muestras deben ser enviadas a la península. Además, no permite distinguir secuencias repetitivas de tamaño pequeño, impidiendo diferenciar entre secuencias normales y premutadas (Romero Espinoza, 2008).

También se han desarrollado otras técnicas alternativas. Una de ellas son las técnicas inmunohistoquímicas para estudiar la expresión de la proteína FMRP en tejidos, confirmando la presencia o ausencia de FMRP mediante el uso de anticuerpos específicos. Sin embargo, aún presentan limitaciones, como la incapacidad para distinguir entre individuos normales y premutados (Ribate Molina *et al.*, 2010). Sin embargo, estas técnicas permanecen en el ámbito de la investigación, sin haber penetrado al diagnóstico clínico.

Una intervención temprana en el SXF puede brindar beneficios significativos para los pacientes y sus familias. Actualmente, se están llevando a cabo investigaciones en busca de una terapia molecular que pueda compensar la deficiencia proteica. Mientras tanto, los tratamientos se centran en mitigar los síntomas asociados, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de estos niños (Ribate Molina *et al.*, 2010).

2.5. CRISPR/Cas9 como método de diagnóstico.

El sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein*) fue descrito como un sistema inmunológico adaptativo en bacterias y arqueas frente a infecciones por bacteriófagos y plásmidos conjugados (Jansen *et al.*, 2002). Este sistema está compuesto por segmentos de ADN formados por secuencias cortas repetidas intercaladas con segmentos variables, junto con una secuencia líder adyacente y secuencias codificantes de proteínas Cas (Jansen *et al.*, 2002; Mojica *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2009).

En 1987, se identificaron secuencias repetidas de 29 nucleótidos en el genoma de *Escherichia coli*, consideradas ADN "basura", espaciadas por secuencias distintas de 32 nucleótidos (Ishino *et al.*, 1987). Posteriormente, el español Francisco Mojica observó este mismo tipo de estructura en el genoma de la arqueobacteria *Haloferax mediterranei* (Mojica *et al.*, 1993). Análisis posteriores revelaron que estas secuencias, llamadas "espaciadores", eran complementarias a secuencias de bacteriófagos, lo que sugirió la existencia de un sistema inmune con memoria en bacterias y arqueas (Jansen *et al.*, 2002; Mojica *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2009).

En 2012, E. Charpentier y J. Doudna propusieron trasladar el sistema CRISPR/Cas9 al laboratorio para su aplicación como herramienta de edición genética. Identificaron los elementos necesarios para realizar cortes de ADN específicos *in vitro*, que incluye una molécula de ARNcr (ARN CRISPR), compuesta por entre 18 a 20 pb (pares de bases) específicas y complementarias con el ADN diana; el ARNtracr (ARN transactivador de CRISPR), tramo que sirve como unión tanto al ARNcr como a Cas9; la proteína Cas9, que consta de los dominios, RuvC y HNH, que cortan ADN monocatenario cada una; y la secuencia PAM (del inglés *Protospacer Adjacent Motif*) que confiere especificidad y facilita la unión al ADN diana (Jinek *et al.*, 2012; Asmamaw & Zawdie, 2021).

El complejo ARNtracr:ARNcr, conocido como ARN guía (ARNg), se une a la proteína Cas9, formando un complejo ribonucleoproteico (RNP) que es conducido por complementariedad de bases al sitio específico del ADN diana (Asmamaw & Zawdie, 2021). Además, existe la posibilidad de sustituir el dúplex ARNcr:ARNtracr, por una única molécula, denominada ARNsg (o sgRNA del inglés *single guide RNA*) (Jinek *et al.*, 2012).

El proceso de edición genómica mediante CRISPR/Cas9 se compone de tres etapas: reconocimiento, escisión y reparación. El ARNg, formado por la unión del ARNcr y ARNtracr, unido a Cas9, se dirige a la secuencia objetivo mediante complementariedad de bases del ARNcr. Para que se produzca la unión del ARNcr con la secuencia diana, se debe reconocer la secuencia PAM, que en el caso de Cas9 corresponde con NGG, donde N es cualquier nucleótido (Ceasar *et al.*, 2016; Asmamaw & Zawdie, 2021). Posteriormente, la proteína Cas9 se activa, cortando la cadena complementaria a través del dominio HNH y la no complementaria con el dominio RuvC, generando un corte de doble cadena (DSB) de extremos romos (Figura 2). Finalmente, la maquinaria celular del huésped repara el DSB a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non-Homologous End Joining*) o mediante reparación dirigida por homología (HDR, del inglés *Homology Direct Repair*). NHEJ, activo en todas las fases celulares, une fragmentos de ADN sin una plantilla homóloga, resultando en inserciones o deleciones aleatorias; HDR, activo en las últimas fases del ciclo celular, utiliza una plantilla de ADN homólogo exógeno para insertar o reemplazar la secuencia objetivo (Asmamaw & Zawdie, 2021; Ceasar *et al.*, 2016; Jiang & Doudna, 2017; Liu *et al.*, 2017).

CRISPR/Cas es una técnica muy versátil en la que muchos grupos de investigación en todo el mundo están trabajando desde diferentes perspectivas desde el hallazgo de Doudna y Charpentier. Eso ha hecho que en poco más de una década haya evolucionado considerablemente, desarrollándose diferentes aplicaciones, como para la creación de modelos animales y celulares, mejora genética en agricultura y ganadería, cribado de fármacos, terapia génica y diagnóstico,

entre otros (Cong *et al.*, 2013; Doudna & Charpentier, 2014; Haque *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2017). La versatilidad de las herramientas CRISPR, sumado a la opción de combinarla con métodos ya existentes, confiere una gran flexibilidad en el diseño de una prueba genética para una secuencia concreta (Cong *et al.*, 2013, Mali *et al.*, 2013). Por ejemplo, para la detección de células circulantes de un tumor y, por lo tanto, de alto riesgo de sufrir metástasis, se ha desarrollado un método que combina el corte con el sistema CRISPR/Cas9 con la detección en 3D, en lo que denominaron *nanoflores* de grafeno/AuPtPd (Chen *et al.*, 2020). Con frecuencia la técnica puede simplificarse mediante optimizaciones hasta el nivel deseado según la aplicación. Así, por ejemplo, durante la pandemia, se desarrolló un método para la detección de infecciones por SARS-Cov-2, empleando, en este caso, el sistema CRISPR/Cas13a, visualizando los resultados con la cámara de un teléfono móvil (Fozouni *et al.*, 2021).

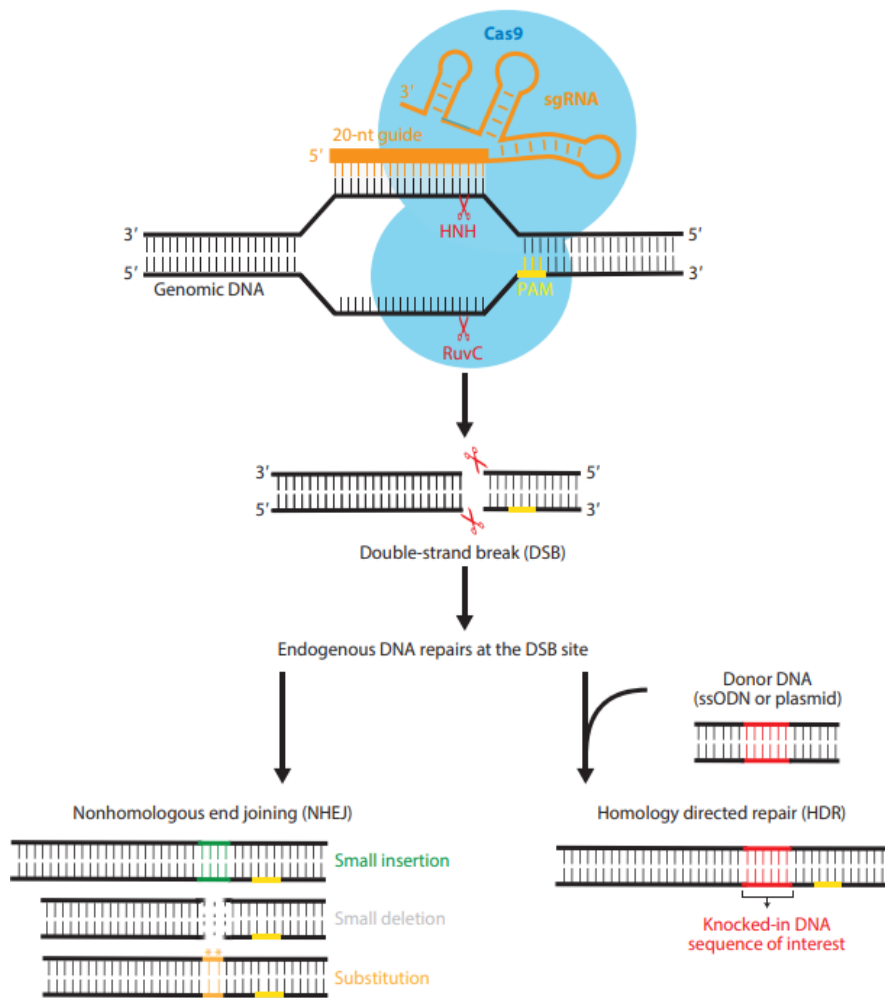


Figura 2. Mecanismo de ingeniería genética mediado por el sistema CRISPR/Cas9 (Jiang & Doudna, 2017).

En este trabajo comenzamos a desarrollar un método de diagnóstico del SXF basado en la tecnología CRISPR/Cas9 que facilite su identificación en clínica. Nuestra hipótesis es que, ya que CRISPR/Cas9 presenta especificidad en base a una secuencia diana, y que el SXF tiene origen genético, se puede diseñar una estrategia que permitirá elucidar, de forma sencilla, el número de tripletes presente.

3. Objetivos.

El objetivo principal es el desarrollo de un método para el diagnóstico genético precoz del SXF basado en el sistema CRISPR/Cas9, que sea más sencillo y de menor costo que las técnicas actuales. La mayor accesibilidad al método permitirá aumentar el número de diagnósticos en Tenerife, realizados en los propios hospitales, acortando el tiempo de espera. Para los niños y niñas con SXF, disponer de un diagnóstico precoz supondrá una mejora en su calidad de vida, pudiendo acceder a los tratamientos y recursos que necesiten para un mejor desarrollo.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Inserción de las repeticiones CGG del gen *FMR1* en el plásmido BlueScript II SK (+).
2. Escisión y visualización del fragmento CGG empleando herramientas del sistema CRISPR/Cas9.

4. Materiales y métodos.

Para la realización de este estudio se empleó ADN genómico de la línea celular HEK293T, línea celular del riñón embrionario humano (*Cellosaurus Cell Line HEK293 (CVCL_0045)*, s. f.).

4.1. Obtención del ADN genómico.

La línea celular HEK293T mantenida en cultivos se trató con 1 ml de tripsina (Biowest, Francia) para separar las células del recipiente que las contenía, incubándolas a 37°C durante 3 minutos. Transcurrido ese tiempo, se neutralizó la tripsina con 5 ml de medio *DMEM High Glucose* (Biowest, Francia) suplementado de suero fetal bovino (10%) (Biowest, Francia) y la mezcla de antibióticos penicilina/estreptomina (1%) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Se centrifugó durante 5 minutos a 500 g, tras lo cual se desechó el medio de cultivo. A partir del pellet de células obtenido, se probaron diferentes métodos de extracción de ADN genómico:

1. Mediante lisis alcalina, se añadieron 60 µl de NaOH 20 mM y se incubó a 95°C durante 30 minutos. Posteriormente se neutralizó con TrisHCl 40mM / EDTA 0,2 mM (pH 8) y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 g, pasando el sobrenadante a un tubo nuevo.
2. Limpieza con fenol-cloroformo del ADN genómico extraído mediante lisis alcalina. Se ajustó el volumen de ADN a 100 µl y se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Tras su centrifugación a 16.000 g durante 5 minutos, la fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo, añadiéndole 1:10 de acetato de sodio 3M (pH 5,2) y dos volúmenes de etanol 100%, seguido de una incubación a -80°C durante 20 minutos. A

continuación, se centrifugó y eliminó el sobrenadante, y se añadieron 500 µl de etanol al 70%. Tras centrifugar, se eliminó el sobrenadante y se disolvió el ADN con agua destilada estéril.

3. Utilizando el kit comercial QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La concentración y pureza de las muestras en cada caso fueron medidas en el espectrómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

4.2. Diseño del clonaje del fragmento de las repeticiones CGG en el plásmido BlueScript II SK (+).

El plásmido BlueScript II SK (+) es un vector de clonaje de uso estándar en el laboratorio, que cuenta con un sitio de clonaje múltiple antecedido por el promotor T7 y el gen de resistencia a la ampicilina (Figura 3).

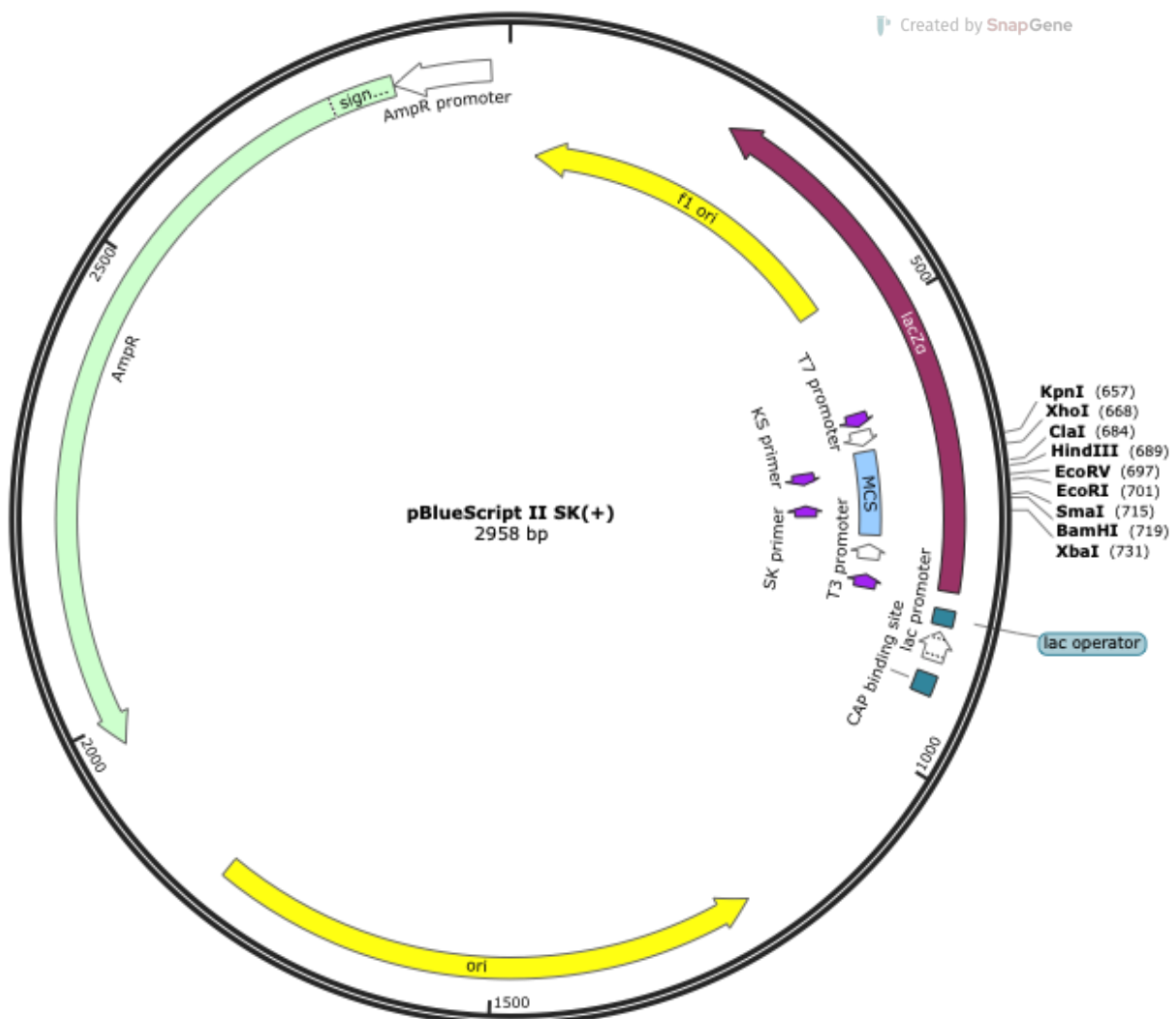


Figura 3. Plásmido BlueScript II SK (+), donde en azul (MCS) se muestra el sitio de clonaje múltiple y en verde la resistencia a ampicilina.

Para el clonaje se decidió introducir el fragmento con las repeticiones en el sitio EcoRI del sitio de clonaje múltiple del vector mediante la técnica In-Fusion® (Takara, Estados Unidos). Para ello, los extremos del vector-inserto deben solapar 15 pb. Para conseguir dicho solapamiento, se diseñaron cebadores específicos a los que se les añadieron colas de 15 nucleótidos homólogos a la secuencia del BlueScript a ambos lados del sitio de corte con EcoRI (Figura 4). Concretamente se emplearon los cebadores mostrados en la Tabla 1.

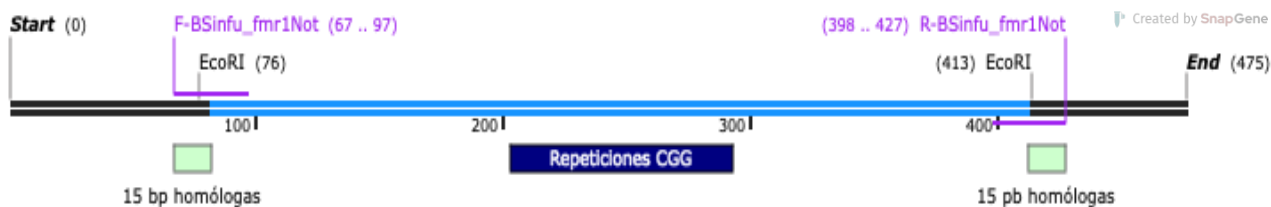


Figura 4. Sitio de inserción en EcoRI de las repeticiones CGG en el plásmido BlueScript, incluyendo unas 120 pb flanqueándolas.

Cebador	Secuencia
F-BSinfu_Not	5'– CTTGATATCGAATTCGCTCAGCTCCGTTTCG–3'
R-BSinfu_Not	5'– GGGCTGCAGGAATTCCTTGTAGAAAGCGCC–3'

Tabla 1. Secuencias de los cebadores específicos para el clonaje.

4.3. Pasos previos al clonaje.

Debido a la complejidad que supone la amplificación del fragmento de *FMRI* que contiene las repeticiones CGG se realizaron pasos previos a la amplificación con los cebadores para el clonaje (Tabla 1) y se probaron diferentes condiciones de la misma.

4.3.1. Digestión del ADN genómico.

Previo a su amplificación, el ADN genómico fue sometido a digestión utilizando la enzima de restricción HindIII-HF, propuesto por Hayward *et al.* (2016), y también las enzimas DpnI y NheI (New Englan Biolab, Estados Unidos), tanto individualmente como juntas. Se utilizaron 600 ng de ADN en un volumen final de 45 μ l de una solución compuesta por Tris-HCl a 50 mmol/L (pH 8,9), MgCl₂ a 1,5 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ a 22 mmol/L, Tritón X-100 al 0,2% y 20 unidades (U) de cada enzima (Hayward *et al.*, 2016). La reacción de digestión se incubó durante 1 hora a 37°C.

4.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) previa.

Antes de realizar la amplificación con los cebadores para el clonaje y tras la digestión con HindIII, se amplificó un fragmento con cebadores de menor tamaño, de 15-20 pb. La PCR se optimizó siguiendo las condiciones indicadas en la Tabla 2, para conseguir los mejores resultados.

Reactivos		PCR 1	PCR 2	PCR 3	PCR 4	PCR 5	PCR 6
Red Taq DNA <i>polimerase</i> (VWR, EE. UU.)		1X					
PfuUltra HotStart PCR <i>master mix</i> (Agilent, EE. UU.)			1X				
Mezcla de PCR ³⁴	Tris-HCl			50 mM (pH 8,9)			
	MgCl ₂			1,5 mM			
	(NH ₄) ₂ SO ₄			22 mM			
	Tritón X-100			0,2 %			
	Cebadores	3,2 μM	3,2 μM	0,67 μM			
	dNTPs			0,27 mM			
	Polimerasa <i>Phusion DNA HF</i> (NEB, EE. UU.)			2,7 U/100 μl			
	Dimetil sulfóxido			2,67 %	5 %	2,67 %	2,67 %
	Betaína					3,3 M	1 M

Tabla 2. Concentraciones de reactivos utilizados en las diferentes condiciones de PCR.

Para llevar a cabo esta PCR se probaron tres parejas de cebadores diferentes, indicadas en la Tabla 3.

Cebador	Secuencia
Not_FraxC	5'-GCTCAGCTCCGTTTTCGGTTTCACTTCCGGT-3'
Not_FraxR4	5'-CTTGTAGAAAGCGCCATTGGAGCCCCGCA-3'
AS-fmr1 F	5'-GCTCCCAGGCCACTTGAAG-3'
AS-fmr1 R	5'-CCGAGCGTGCCCTGG-3'
F-fmr1	5'-CTCTGCAGAAATGGGCGTTC-3'
R-fmr1	5'-TCGCTGGTCTCTCATTTTCA-3'

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados.

En la PCR 1, donde se empleó el reactivo RedTaq se añadieron a la mezcla 15 ng de ADN. Además, se realizó una rampa de temperatura de hibridación de los cebadores, en la que a cada línea del termociclador se le aplicó una temperatura diferente con la finalidad de determinar la que ofreciera un mejor resultado. El programa consistió en: 5 minutos a 95°C; 34 ciclos con 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55-62°C y 30 segundos a 72°C; y 5 minutos a 72°C.

Para las PCR 3-6 se mezclaron 15 μl de la mezcla de reacción y 5 μl del producto de digestión con HindIII. En este caso, se aplicó el programa de temperaturas propuesto por Hayward *et al.*, (2016), una etapa de precalentamiento a 70°C, seguida de 3 minutos a 98°C, 30 ciclos de 30 segundos a 98°C, 64°C durante 30 segundos, 72°C durante 210 segundos; y 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % con tampón TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 10 mM y EDTA 1 mM), y utilizando GelRed 1X (Biotium, Estados Unidos) como agente intercalante. Se empleó como marcador de peso

molecular el PeqGold (VWR, Estados Unidos). La visualización del gel se realizó con el equipo Gel Logic 440 Imaging System (Kodak, Estados Unidos).

4.3.3. Purificación de productos de PCR.

Los productos de PCR que se obtuvieron de forma eficiente y limpia fueron purificados utilizando el kit *NucleoSpin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración y pureza de los productos purificados con el NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

4.4. Clonaje de las repeticiones CGG en el vector BlueScript II SK (+).

4.4.1. PCR con los cebadores del clonaje.

Tomando como molde los amplicones obtenidos y purificados en el apartado anterior, se repitió la amplificación con las concentraciones de la PCR 6 (Tabla 2), en este caso con los cebadores preparados para el clonaje (Tabla 1). Se mantuvieron las condiciones, modificando únicamente la temperatura de hibridación de los cebadores a 58°C. Los productos se analizaron por electroforesis, se purificaron y se midieron según lo descrito en el apartado 4.3.2 y 4.3.3.

4.4.2. Obtención del plásmido BlueScript.

Se comenzó con la transformación de bacterias ultracompetentes Top10 con el plásmido, para la obtención de mayor cantidad, así como para su incorporación a la librería de plásmidos del laboratorio. Se mezclaron 0,5 µl del plásmido con 50 µl del cultivo bacteriano. Se incubó 30 minutos en hielo y se realiza el choque térmico a 42°C durante 30 segundos seguido de otros 2 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 500 µl de medio SOC (*Super Optimal broth + Catabolic repressor*; extracto de levadura 0.5%, triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) precalentado a 37°C y se incubaron en agitación a 220 r.p.m. y 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se sembraron 100 µl del cultivo en placas de LB-agar (Luria-Bertani; extracto de levadura 5g/L, NaCl 10 g/L, triptona 10 g/L, agar 15 g/L) con 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se inoculó una colonia en un matraz con 50 ml de medio LB y 50 µg/ml de ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C en agitación.

Del cultivo se extrajo 1 ml para incorporarlo a la librería de plásmidos del laboratorio, mezclando 500 µl del cultivo con 500 µl de LB con glicerol al 30%, por duplicado; que fueron guardados a -80°C. Del resto del cultivo se purificó el plásmido utilizando el kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las directrices del fabricante. El plásmido fue eluido en 500 µl de tampón Tris-HCl (Tris-HCl 5 mM, pH 8,5) y se determinó su concentración en el NanoDrop™ 2000.

Posteriormente, se procedió a la linealización del plásmido utilizando la enzima EcoRI-HF (New England Biolabs, Estados Unidos). La reacción se realizó en un volumen de 50 μ l, que incluía el tampón de reacción *CutSmart* 1X, 20 U de EcoRI-HF y 5 μ g de ADN plasmídico; y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de 50 minutos, se agregaron 25 U de la enzima Quick CIP (New England Biolabs, Estados Unidos), evitando la unión de los extremos del plásmido mediante su desfosforilación, completando el tiempo de digestión.

El plásmido linealizado se purificó tanto a partir de producto líquido como a partir de gel después de someterlo a electroforesis. En ambos casos, se empleó el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, y eluyendo en 20 μ l de tampón de elución NE (Tris-HCl 5 mM, pH 8,5). Nuevamente, la cantidad y pureza del purificado fueron medidas en el NanoDrop™ 2000.

4.4.3. Clonaje y transformación bacteriana.

A continuación, se introduce el fragmento de ADN en el plásmido BlueScript. Para ello, se calculó la concentración necesaria de ADN y vector linealizado, empleando la herramienta *In Fusion Molar Ratio Calculator* (Takara, Estados Unidos). Teniendo en cuenta el tamaño del vector (2961 pb) y del inserto (361 pb), se añadieron en la reacción en un ratio 2:1. Se empleó el kit In-Fusion HD Cloning (Takara, Estados Unidos) siguiendo las condiciones del fabricante.

Posteriormente, se llevó a cabo la transformación en las células ultracompetentes XL10-Gold (Agilent, Estados Unidos), siguiendo lo indicado en el apartado 4.4.2., con la diferencia de que se añadieron 2 μ l de la mezcla del clonaje, habiendo añadido previamente 2 μ l de β -mercaptoetanol.

Las colonias obtenidas se sembraron en 5 ml de LB con 50 μ g/ml de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 220 r.p.m. A continuación, los plásmidos fueron extraídos con el kit *NucleoSpin Plasmid Mini* (Macherey-Nagel, Alemania).

Se llevó a cabo la comprobación del clonaje mediante tres formas diferentes:

- A. Análisis de los patrones de restricción con las enzimas NheI y HindIII. Si el clonaje es correcto, la digestión evidenciará dos bandas, una de 277 pb y otra de 3021 pb; si no es así, el plásmido será linealizado por HindIII, observando una banda de 2961 pb. La digestión se lleva a cabo como se comentó en el apartado 4.4.2., pero en un volumen final de 20 μ l, y añadiendo 1 μ g de plásmido.
- B. Mediante PCR empleando cebadores complementarios a los promotores del vector, T3 y T7, que se encuentran flanqueando el sitio de inserción. Se utilizó el reactivo *RedTaq DNA polimerase* al 1X, 0,4 μ mol/L de cada cebador, 1 μ l de ADN y agua

para un volumen de 25 μ l. El programa de amplificación consistió en 5 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos; y un tiempo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

C. Mediante secuenciación, únicamente de los plásmidos seleccionados por los resultados observados en los dos métodos anteriores. Los plásmidos se secuenciaron en la empresa MacroGen SPAIN (Madrid, España), utilizando los cebadores T3 y T7. Los resultados fueron visualizados y analizados con el programa SnapGene (SnapGene, Estados Unidos).

4.4.4. Simulación de las repeticiones CGG.

Debido a la dificultad para amplificar la zona con las repeticiones CGG se diseñó una estrategia de clonaje para simular diferentes tamaños de expansión de tripletes, manteniendo fragmentos del gen *FMRI* corriente arriba y corriente debajo de la zona de expansión. Los fragmentos para la simulación del tamaño de las repeticiones fueron de 45 (135 pb), 55 (165 pb), 200 (600 pb), 300 (900 pb) y 400 (1.200 pb) (Figura 5), tratándose de fragmentos del gen *KCNMA1*, con el que se trabaja rutinariamente en el laboratorio.

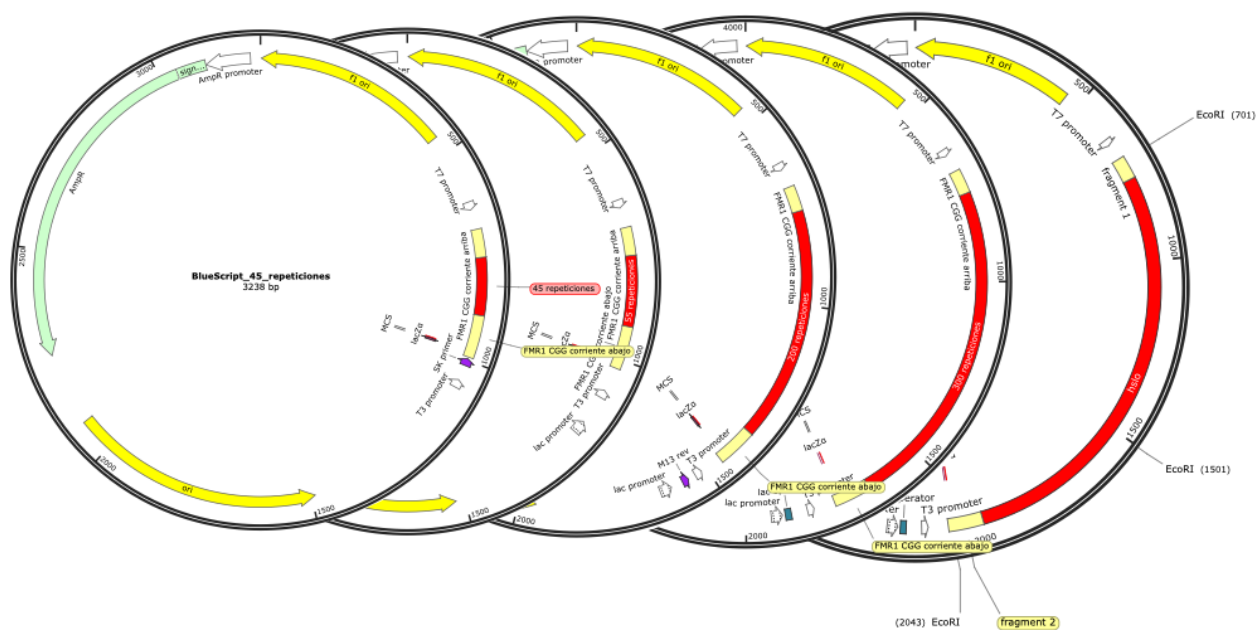


Figura 5. Diseños del clonaje en el plásmidos BlueScript para la inserción de fragmentos que simulan diferentes tamaños de repeticiones CGG (45, 55, 200, 300 y 400), indicados en rojo y flanqueados por segmentos del gen *FMRI* adyacentes a la zona de repeticiones, indicados en amarillo suave.

Se realizó un diseño para clonar en el plásmido BlueScript tres fragmentos siguiendo el método In-Fusion[®]. El vector y el fragmento del gen *KCNMA1* se amplificaron mediante PCR con los cebadores indicados en la Tabla 4, mientras que las zonas del gen *FMRI* adyacentes a las repeticiones se adquirieron directamente en forma de dúplex de ADN (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos), siendo de 66 y 100 pb cada uno. Las PCR se realizaron con el

reactivo PfuUltra HotStart PCR *master mix* 1X, 0,4 μ M de cada cebador, 1 μ l de ADN y agua hasta un volumen de 50 μ l. El programa de amplificación consistió en 1 minuto a 95°C, seguida de 30 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C), y un tiempo de expansión final de 5 minutos a 72°C.

Cebador	Secuencia
F-BS_frag2	5'-GAATTCCTGCAGCCCGGGG-3'
R-BS_frag1	5'-GAATTCGATATCAAGCTTATC-3'
F-hslo_frag1	5'-CCGCCTCTGAGCGGGATGGAGGTGCCGTGCGTC-3'
R-hslo45_frag2	5'-GGGCGCTCGAGGCCCGCAGCACACGGTCCACAGG-3'
R-hslo55_frag2	5'-GGGCGCTCGAGGCCCTGGGCCTCCTTCGTCTT-3'
R-hslo200_frag2	5'-GGGCGCTCGAGGCCCTAAAAATCTCAAACAAG-3'
R-hslo300_frag2	5'-GGGCGCTCGAGGCCCGAGGATGAAGAAGAAGACCATG-3'
R-hslo400_frag2	5'-GGGCGCTCGAGGCCCATGTGGATTGAGGACGGAAC-3'

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para obtener los fragmentos previos al clonaje.

A continuación, tras la purificación de los productos de PCR como se ha explicado previamente, se procedió a la realización del clonaje siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante, manteniendo la proporción vector:inserto 2:1:1:1.

Posteriormente, se realizó este mismo clonaje para el tamaño simulador de 200 repeticiones, modificando algunos pasos. En primer lugar, el plásmido se linealizó por digestión con la enzima EcoRI-HF, como se indicó en el apartado 4.4.2. En segundo lugar, se realizó el clonaje del fragmento lineal dúplex-amplicón-dúplex mediante el método In-Fusion y se comprobó este clonaje en un gel de agarosa. A continuación, la mezcla del clonaje fue purificada y amplificada con los cebadores F_up insert (5'-CTTGATATCGAATTCGCTC-3') y R_down insert (5'-GGGCTGCAGGAATTCCACC-3'). Se emplearon las condiciones de la PCR 2, y un programa de temperaturas de 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72°C 30 segundos, añadiendo un tiempo de extensión final de 7 minutos a 72°C. El producto purificado de esta PCR se clonó nuevamente mediante el método In-Fusion en el vector, siendo en este caso un vector y un inserto, manteniendo las proporciones 2:1.

Con los productos de los respectivos clonajes, se realizó la transformación bacteriana en las células XL10-Gold según el procedimiento descrito en el apartado 4.4.3. Para poder testar mayor número de colonias, se realizó el cribado inicial mediante PCR de colonia. Para ello, se usó para la PCR 1 μ l de una suspensión de una colonia en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se llevó a cabo siguiendo las condiciones de la PCR 1 con los cebadores T3 y T7 (Tabla 3), con el programa de temperaturas: 1 minuto a 98°C, 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C, y 5 minutos finales a 72°C.

Las colonias que mostraron un amplicón del tamaño esperado con la inserción, se recuperaron en placas de LB-agar con 50 µg/ml de ampicilina y se inocularon en LB líquido con 50 µg/ml de ampicilina, para la extracción de plásmidos con el kit *NucleoSpin Plasmid Mini* (Macherey-Nagel, Alemania). Para su comprobación se siguieron los procesos indicados en el apartado anterior.

4.5. Sistema CRISPR/Cas9.

4.5.1. Diseño.

En este trabajo se propone emplear la herramienta CRISPR/Cas9 en el diagnóstico del SXF. Ya que el complejo RNP es capaz de reconocer secuencias diana específicas por complementariedad de bases con el ARNcr, y Cas9 es capaz de realizar un corte de doble cadena 3 pb corriente arriba de la secuencia PAM, se eligió una estrategia para, con dos complejos CRISPR/Cas9, cortar ambos lados de la región de las repeticiones CGG. Con ello se quiere conseguir extraer el fragmento con las repeticiones sin pasar previamente por amplificación mediante PCR (Figura 6).

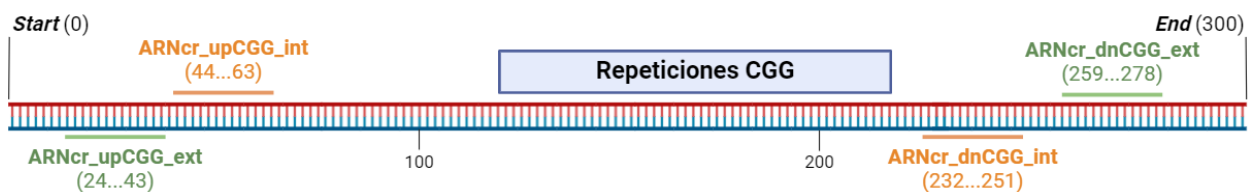


Figura 6. Diagrama de los sitios de reconocimiento y corte del sistema CRISPR/Cas9 en una secuencia con repeticiones CGG.

Para el diseño de los ARNcr se empleó la herramienta *Breaking Cas* (Oliveros *et al.*, 2016). Esta página web aplica un algoritmo que maneja una gran cantidad de variables al mismo tiempo, otorgando una puntuación para cada posible ARNcr. Se seleccionaron aquellas secuencias con la más alta puntuación que reconocen secuencias en las zonas de interés, corriente arriba y debajo de la zona CGG (Tabla 5).

Los demás componentes del sistema CRISPR/Cas9 se adquirieron comercialmente de la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos). En el trabajo se empleó el ARNtracr estándar y otro unido a la molécula fluorescente ATTO550; y una Cas9 de alta fidelidad procedente de *Streptococcus pyogenes* tanto sola como unida a la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*), así como una dCas9 (*dead Cas9*), sin capacidad de corte, pero sí de reconocimiento.

ARNcr	Secuencia
crRNA_upCGG_ext	5'-CACCGGAAGUGAAACCGAAAGUUUUAGAGCUAUGCU-3'
crRNA_dnCGG_ext	5'-GCGGGCUCGGCGCUAGCAGUUUUAGAGCUAUGCU-3'
crRNA_upCGG_int	5'-GAGGGCCGCCUCUGAGCGGGUUUUAGAGCUAUGCU-3'
crRNA_dnCGG_int	5'-AGGUGGGCUGCGGGCGCUCGGUUUUAGAGCUAUGCU-3'

Tabla 5. Secuencias de ARN de los ARNcr del sistema CRISPR.

4.5.2. Digestión del ADN genómico mediante el sistema CRISPR/Cas9.

Se inició la digestión del ADN genómico mediante el sistema CRISPR/Cas9. Para ello, se procedió con la preparación de los ARNg *in vitro*, mezclando ARNcr y ARNtracr en concentraciones equimolares para una concentración final de 50 μ M, requiriendo 8 μ g de cada ARNg por reacción de digestión. Posteriormente, se realizó una incubación de 5 minutos a 95°C, seguida de un enfriamiento hasta la temperatura ambiente.

A continuación, se llevaron a cabo diversas reacciones de digestión de ADN genómico que incluyeron 0,8 μ M de Cas9, tampón de reacción 1X de Cas9 (200 mM HEPES, 1M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1mM EDTA, pH 6,5), 16 μ g de la pareja de ARNg (8 μ g de cada ARNg), y el ADN, utilizando 1, 3 y 5 μ g paralelamente, en un volumen final de 100 μ l, según lo especificado en Kouprina *et al.* (2021). Se empleó tanto ADN genómico sin tratar como genómico previamente digerido con HindIII. Además, por cada concentración de ADN genómico se realizaron en paralelo dos digestiones con CRISPR/Cas9, con dos parejas de ARNg, las exteriores (crRNA_upCGG_ext y crRNA_dnCGG_ext) y las interiores (crRNA_upCGG_int y crRNA_dnCGG_int), por su proximidad a la región de las repeticiones CGG (Figura 6). Estas reacciones se mantuvieron a una temperatura de 37°C durante 4 horas, seguido de una etapa de desactivación de Cas9 a 65°C durante 10 minutos.

Cuando la digestión se realizó en un volumen final de 100 μ l, se cargaron 50 μ l de cada condición en un gel de agarosa MS-8 (Condalab, España) al 1 % en TAE 1X, usando el marcador de peso molecular PeqGold (VWR, Estados Unidos), seguida de una tinción con bromuro de etidio para la observación de los fragmentos de ADN en el equipo Gel Logic 440 Imaging System (Kodak, Estados Unidos). Los restantes 50 μ l de la digestión se cargaron en un gel de poliacrilamida Mini-Protein TBE precast (BioRad, Estados Unidos), junto con el marcador de peso molecular *AmpliSize Molecular Ruler* (BioRad, Estados Unidos). En este caso, se empleó el sistema CRISPR/Cas9 para la detección de las bandas, pero empleando una versión de la enzima Cas9, dCas9, sin actividad endonucleasa, y el ARNtracr marcado con el fluoróforo ATTO550. Para este fin, se prepararon previamente los 4 ARNg mediante la adición equimolar de ARNcr y ARNtracr para obtener una concentración de 10 μ M, seguido de una incubación a 95°C durante 5 minutos y un enfriamiento hasta temperatura ambiente. A continuación, se formó el complejo

RNP combinando 1 μM de cada ARNg, 2 μM de Cas9 y PBS (del inglés *Phosphate-Buffered Saline*) hasta alcanzar un volumen final de 100 μl , incubándolo 10 minutos a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, se añadió PBS hasta un volumen total de 1 ml para alcanzar un volumen suficiente para cubrir el gel y se aplicó al mismo, incubándolo a 37°C durante 3 horas en oscuridad. Al finalizar la incubación, se observó utilizando ChemiDoc MP (BioRad, Estados Unidos), aplicando diferentes filtros de excitación y emisión para detectar la señal del ATTO550. Tras la visualización, se realizó una segunda tinción con bromuro de etidio, de igual forma que en el gel de agarosa.

Además, se realizó un duplicado de la digestión con CRIPR/Cas9, como se ha explicado anteriormente, siendo el volumen final de 50 μl , el cual se cargó en un gel de poliacrilamida Mini-Protein TBE precast (BioRad, Estados Unidos), se trató con la solución compuesta por dCas9 y ARNtracr-ATTO550 y se tiñó con bromuro de etidio para su visualización en el ChemiDoc MP (BioRad, Estados Unidos).

Posteriormente, se realizó una nueva digestión, ajustando el volumen final de la reacción de digestión con CRISPR/Cas9 a 50 μl , para disponer de una muestra más concentrada. En este caso, se siguió el mismo procedimiento explicado previamente, pero utilizando la pareja de ARNcr externos para digerir 3 y 5 μg de ADN genómico sin previa digestión con HindIII. El volumen entero fue cargado en un gel de poliacrilamida Mini-Protein TBE precast (BioRad, Estados Unidos) junto con 3 y 5 μg de ADN genómico sin digerir con CRISPR/Cas9, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. A continuación, se realizó una nueva tinción con el sistema CRISPR/Cas9, esta vez con una solución compuesta por los ARNcr internos, ARNtracr y Cas9-GFP, creando el complejo RNP y la tinción del gel como se indicó previamente. La visualización se llevó a cabo en el ChemiDoc MP (BioRad, Estados Unidos) empleando filtros compatibles con el espectro de excitación y emisión de la GFP.

5. Resultados.

5.1. Extracción de ADN genómico.

La utilización del método de lisis alcalina produjo ADN genómico con una concentración de 126,4 ng/ μl para la línea celular HE293T, con un ratio 260/280 de 1,89. La purificación con fenol-cloroformo obtuvo concentraciones de 231,9 ng/ μl y un ratio 260/280 de 1,74; mientras que, con el kit comercial, con el que se extrajeron dos muestras simultáneamente, se obtuvieron concentraciones de 238,1 ng/ μl y 86,1 ng/ μl , con un ratio 260/280 de 2,13.

5.2. Digestión del ADN genómico.

La digestión con la enzima DpnI no mostró corte del ADN genómico; en contraste, las digestiones con NheI y HindIII, tanto de forma individual como combinadas, mostraron un *smear* o macha correspondiente con la obtención de bandas de distintos tamaños (Figura 7).

Al hacer un estudio *in silico*, se detecta un sitio de corte con NheI interno al fragmento de amplificación, por lo que el ADN genómico digerido con HindIII fue el que se empleó en los siguientes experimentos.

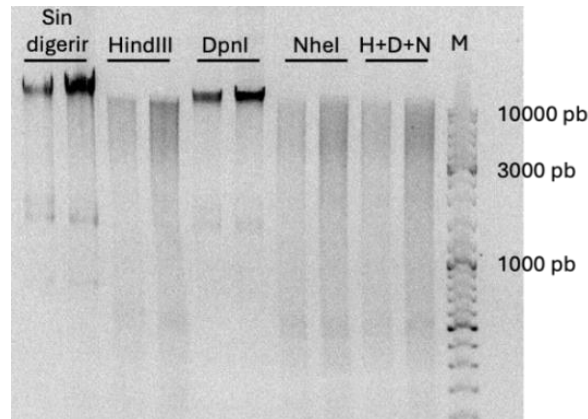


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de análisis de digestión de ADN. "Sin digerir" muestra el ADN no tratado. "HindIII", "DpnI" y "NheI" muestran digestiones con las respectivas enzimas. "H+D+N" es la digestión combinada con HindIII, DpnI y NheI. "M" es el marcador de peso.

5.3. Amplificación del fragmento con las repeticiones CGG del gen *FMRI*.

Inicialmente, se intentó optimizar la PCR 1 empleado el reactivo *RedTaq master mix*, pero cuando se realizó la rampa de temperatura para determinar el valor óptimo de hibridación de los cebadores Not_Frax, no se obtuvo un amplicón claro. Como muestra la Figura 8, las PCR en todas las temperaturas mostraron bandas inespecíficas, siendo imposible detectar el amplicón de interés. Lo mismo ocurrió con las PCR 2 y 3, donde no se consiguió amplificación del fragmento.

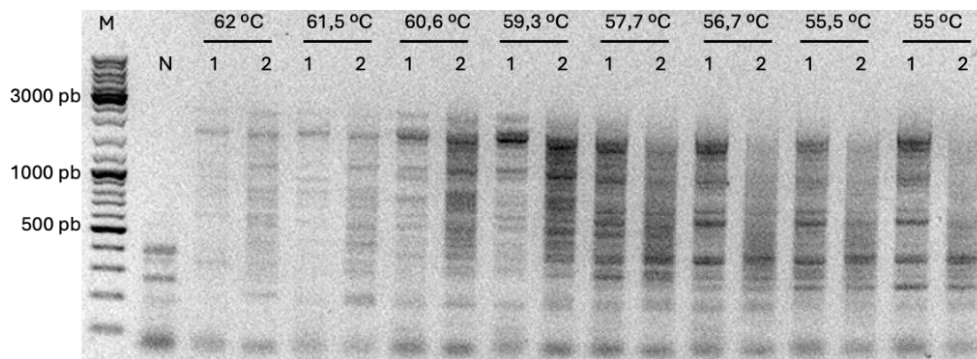


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR 1 con los cebadores Not_Frax con rango de temperatura. El carril "M" es el marcador de peso molecular, "N" es el control negativo y "1" y "2" con dos muestras de genómico HEK293T.

De los cebadores empleados para la amplificación (Tabla 3), los que mejores resultados ofrecieron con las condiciones de la PCR 4 fueron los propuestos en el trabajo de Hayward *et al.*,

(2016), los denominados Not_Frax (Figura 9). Sin embargo, como se observa en la Figura 9, el rendimiento de la PCR fue bajo y la presencia de dímeros de cebadores notable.

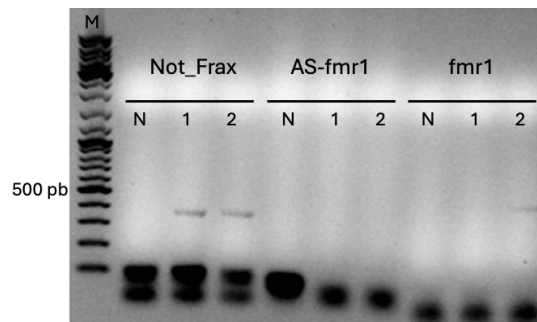


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa con las condiciones de la PCR 4. Los carriles etiquetados como “Not_Frax,” “AS-fmr1” y “fmr1” representan los diferentes cebadores con sus respectivos controles negativos (N) y dos réplicas de la línea celular HEK293T (1 y 2).

Los mejores resultados fueron obtenidos con las condiciones de la PCR 6, que incluye 1M de betaína y 2,67 % de DMSO (Figura 10), aunque no se consiguió eliminar la presencia de dímeros de cebadores.

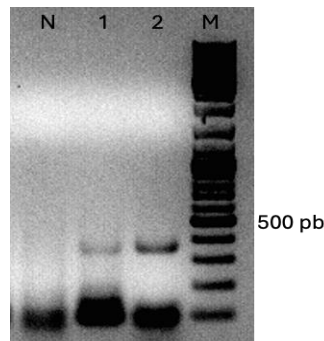


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa con las condiciones de la PCR 6. El carril “N” corresponde al control negativo, mientras que los carriles “1” y “2” muestran las réplicas del experimento. El carril “M” contiene el marcador de peso molecular.

5.4. Clonaje de las repeticiones CGG en el vector BlueScript II SK (+).

5.4.1. PCR con los cebadores del clonaje.

La reamplificación de los amplicones utilizando los cebadores BSinfu_Not con las condiciones de la PCR 6 mostró un perfil degradado en el análisis, sugiriendo una amplificación parcial del ADN (Figura 11). Igualmente, los productos de los carriles 2 y 4 fueron purificados obteniendo concentraciones de 28 ng/μl y 19 ng/μl.

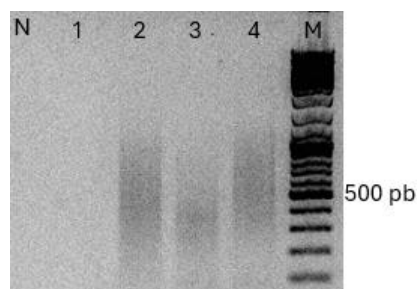


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR con los cebadores del clonaje. El carril “N” corresponde al control negativo, los carriles “1” y “2” presentan muestras reamplificadas de genómico HEK293T sin digerir, “3” y

“4” son muestras reamplificadas de genómico HEK293T digerido con HindIII y el carril “M” es el marcador de peso molecular.

5.4.2. Obtención del plásmido BlueScript.

Tras la transformación del plásmido BlueScript en bacterias ultracompetentes, se extrajo, obteniendo una concentración de 161,6 ng/μl y un ratio 260/280 de 1,98. Tras su linealización con EcoRI, se obtuvo una concentración de 151,0 ng/μl con un ratio de 1,92.

5.4.3. Clonaje y transformación bacteriana.

Tras realizar el clonaje del fragmento con las repeticiones amplificadas a partir de las HEK293T en el plásmido BlueScript se obtuvieron colonias. Se seleccionaron 12 de ellas, de las que se extrajo ADN plasmídico, obteniendo concentraciones superiores a 100 ng/μl. Sin embargo, en la verificación con varias enzimas de restricción no se mostró la presencia del inserto esperado de aproximadamente 300 pb. La digestión con EcoRI reveló la banda correspondiente a diferentes formas del plásmido (circular, lineal y superenrollado) (Figura 12 A). La digestión con HindIII no mostró las bandas esperadas (Figura 12 B), y la digestión con NheI tampoco permitió visualizar la banda del inserto (Figura 12 C). La doble digestión con NheI y HindIII no evidenció la banda del inserto, indicando un plásmido no clonado (Figura 12 D). Además, la PCR con los cebadores T3 y T7 mostró más bandas de las esperadas (Figura 13). La secuenciación de las muestras confirmó la ausencia de inserción, atribuyendo las bandas de diferentes tamaños a duplicados generados por los plásmidos.

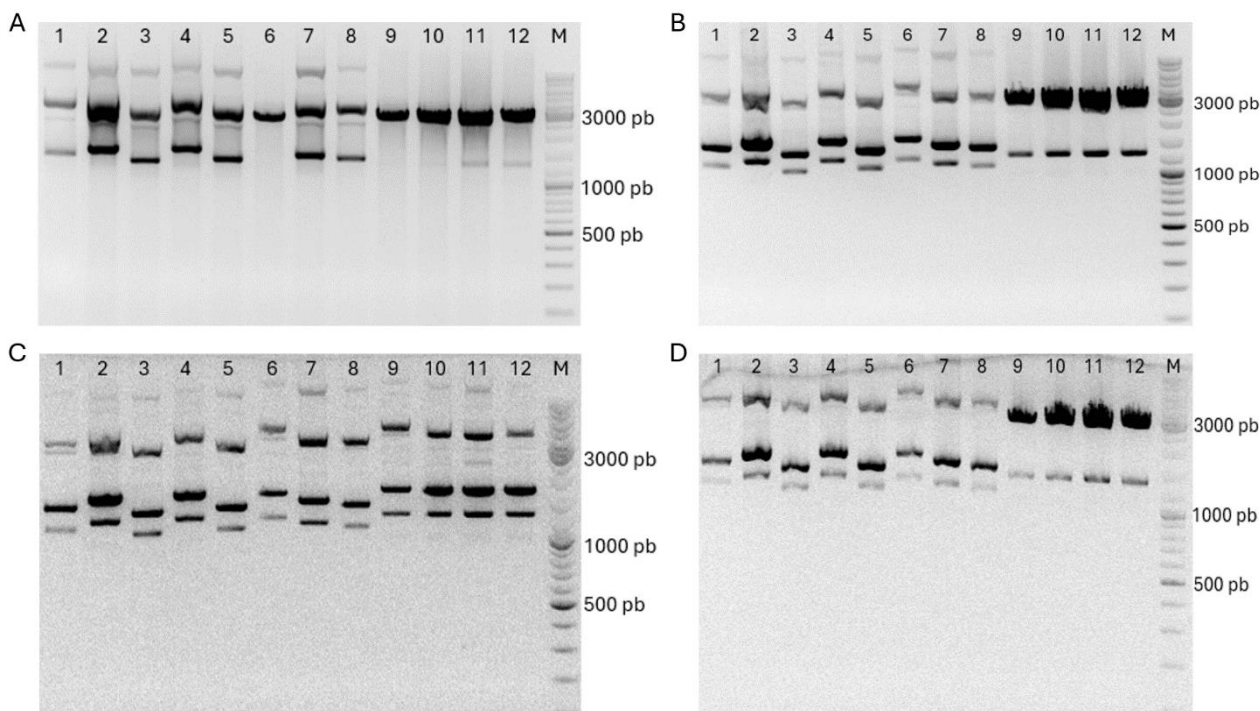


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa para la verificación del clonaje con enzimas de restricción. El carril “M” es el marcador de peso molecular. (A) Electroforesis de la digestión con EcoRI. (B) Electroforesis de la digestión con HindIII. (C) Electroforesis de la digestión con NheI. (D) Electroforesis de la digestión con HindIII y NheI.

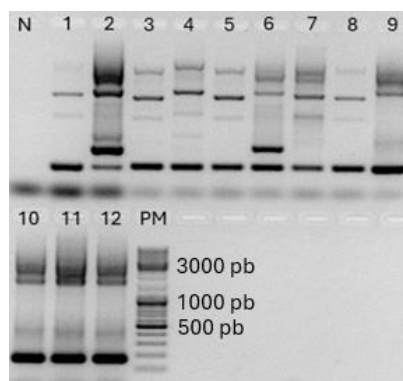


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR con los cebadores T3 y T4. El carril “N” es el control negativo, los carriles “1-12” son las diversas muestras y “PM” es el marcador de peso molecular.

5.4.4. Simulación de las repeticiones CGG.

Las PCR del plásmido y de los diversos fragmentos generaron bandas de amplificación, correspondiendo con los tamaños esperados (Figura 14). Tras su purificación, se obtuvieron las concentraciones mencionadas en la Tabla 6.

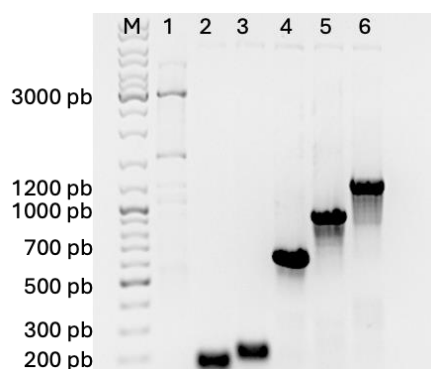


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del clonaje. El carril “M” es el marcador de peso molecular, el “1” es el plásmido BlueScript, el “2” es el fragmento de 45 repeticiones, el “3” es el fragmento de 55 repeticiones, el “4” es el fragmento de 200 repeticiones, el “5” es el fragmento de 300 repeticiones y el “6” es el fragmento de 400 repeticiones.

Fragmento	Concentración
Plásmido BlueScript	172,0 ng/μl
Fragmento de 45 repeticiones (135 nucleótidos)	111,8 ng/μl
Fragmento de 55 repeticiones (165 nucleótidos)	51,6 ng/μl
Fragmento de 200 repeticiones (600 nucleótidos)	141,7 ng/μl
Fragmento de 300 repeticiones (9000 nucleótidos)	220,6 ng/μl
Fragmento de 400 repeticiones (1200 nucleótidos)	152,1 ng/μl

Tabla 6. Concentraciones de los productos de PCR.

Tras el clonaje y transformación, se obtuvieron colonias en todos los tamaños de simulación de repeticiones. En este caso, tras hacer la PCR de colonia con los cebadores T3 y T7, no se observó la presencia del fragmento sin inserción (142 pb), salvo en las muestras 55-10, 400-12, 400-13, 400-19 y 400-20, y una ligera diferencia de tamaño entre las muestras 400-5 y 400-7 (Figura 15). Las concentraciones de ADN plasmídico de las colonias diferenciadas se detallan en la Tabla 7.

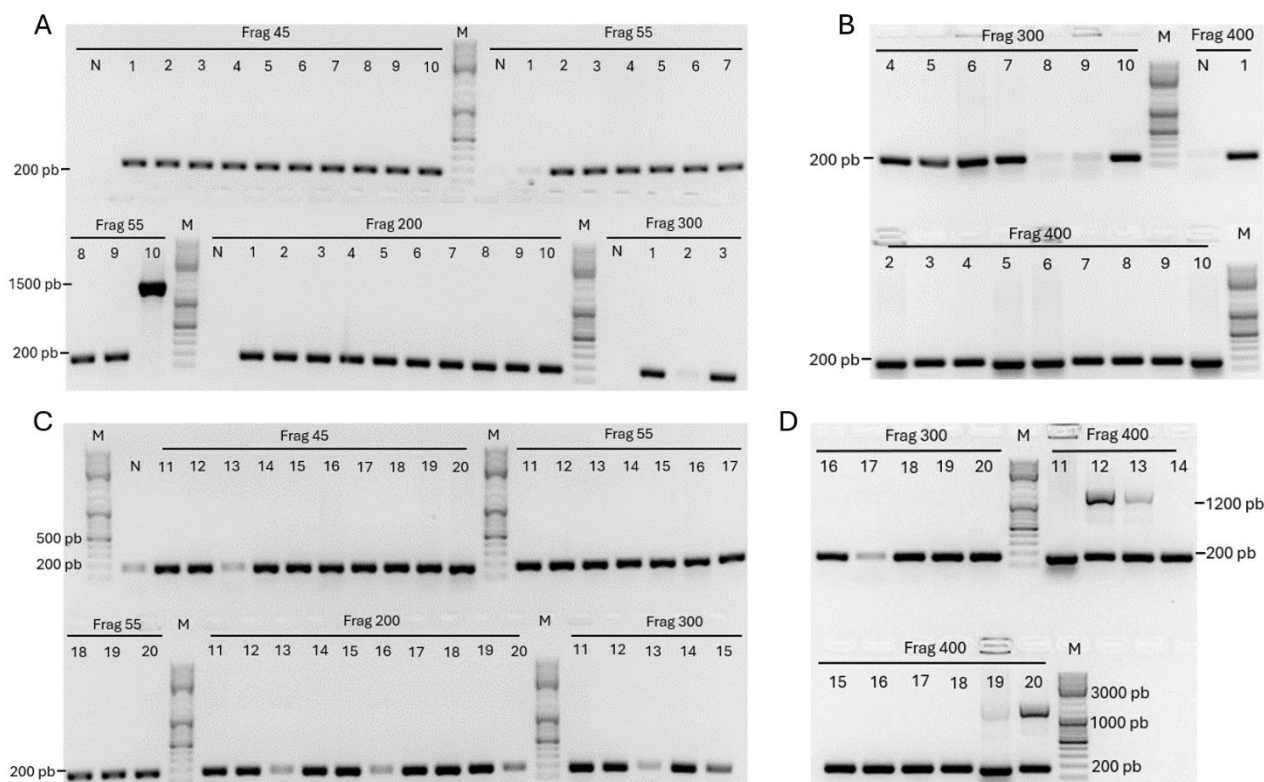


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de las PCR de colonias. El carril “M” es el marcador de peso molecular, el “N” es el control negativo y el “Frag X” es el fragmento del número de repeticiones.

55-10	334,5 ng/μl	400-5	153,7 ng/μl	400-7	237,5 ng/μl	400-12	293,7 ng/μl
400-13	296,2 ng/μl	400-19	379,2 ng/μl	400-20	199,2 ng/μl		

Tabla 7. Concentraciones de ADN plasmídico de las colonias diferenciadas.

La digestión con la enzima EcoRI no reveló la banda correspondiente al inserto de 55 repeticiones, de 307 nucleótidos, sino una banda de mayor tamaño. En el caso de los plásmidos clonados con el fragmento simulando 400 repeticiones, dos de ellos (el 400-13 y el 400-20) mostraron una banda que podría corresponder a dicho inserto (Figura 16). Se enviaron a secuenciar las muestras que mostraron esta banda, pero trataba de una duplicación que había hecho el vector al volver a circularizar.

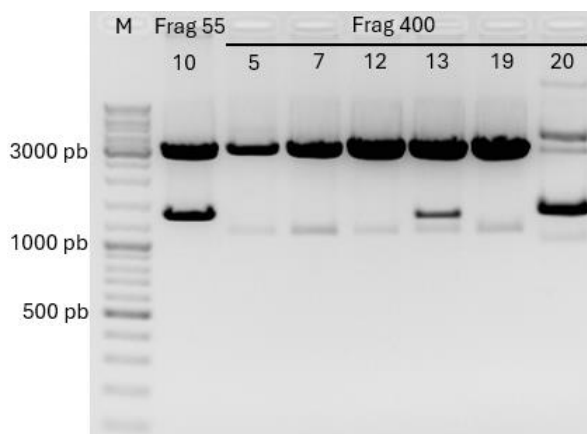


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión EcoRI. El carril “M” es el marcador de peso molecular.

En la segunda estrategia que simula el tamaño de las repeticiones CGG, llevada a cabo inicialmente en el caso de 200, se comprobó la unión lineal In-Fusion del fragmento dúplex *FMRI*-amplicón *KCNMA1*-dúplex *FMRI* en un gel de agarosa (Figura 17).

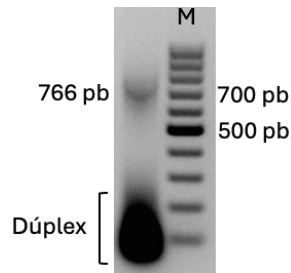


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del resultado del clonaje en el que se muestra una banda del tamaño esperado, así como una mancha entre las 100 y 200 pb correspondientes con los dúplex de ADN correspondientes con los fragmentos corriente arriba y corriente abajo de la zona de expansión de trinucleótidos. El carril “M” es el marcador de peso molecular.

En este caso, la PCR mostró en 28 de 37 colonias el fragmento esperado de 908 pb (Figura 18). Mediante secuenciación se comprobó que la inserción se realizó correctamente.

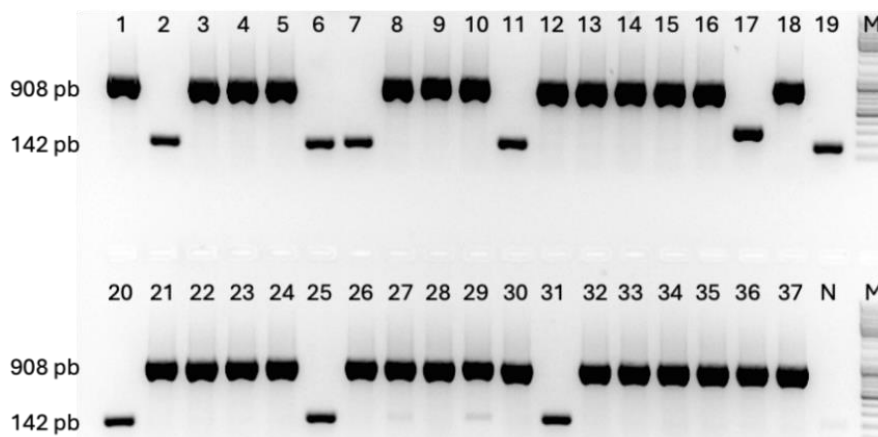


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR realizada con los cebadores T7 y T3 que producen un amplicón de distinto tamaño si hay o no inserción, 908 pb y 142 pb en cada caso, respectivamente. El carril “M” es el marcador de peso molecular.

5.3. Sistema CRISPR/Cas9.

Cuando se realizó la digestión de ADN genómico con el sistema CRISPR/Cas9 en un volumen de 100 μ l y se cargó la mitad en un gel de agarosa, solo se observó señal en las muestras con 5 μ g de ADN (2,5 μ g reales). Sin embargo, no se observaron fragmentos de menor tamaño, correspondientes con la extracción del fragmento de las repeticiones con el sistema CRISPR/Cas9 (Figura 19). La otra mitad cargada en el gel de poliacrilamida no pudo visualizarse por fallos en el gel.

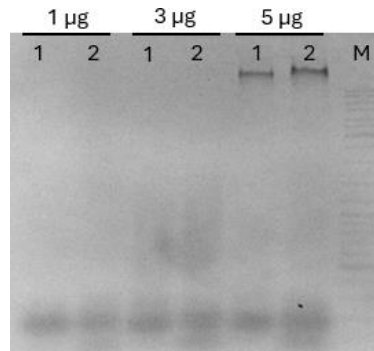


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de ADN genómico con el sistema CRISPR/Cas9. El carril “M” es el marcador de peso molecular, el “1” son las muestras digeridas con las ARNg externas y el “2” son las muestras digeridas con las ARNg internas.

En la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con la digestión por CRISPR/Cas9 en un volumen final de 50 μ l, cargando el volumen total, se detectó señal tras su tratamiento con bromuro de etidio en todas las muestras, pero no previamente a la tinción, tras el tratamiento con el sistema CRISPR/Cas9 con el ARNcr-ATTO550. En este caso, se observó la banda del ADN genómico y una banda de menor tamaño, alrededor de 200 pb, que podría coincidir el fragmento de las repeticiones extraído con CRISPR/Cas9 (Figura 20).

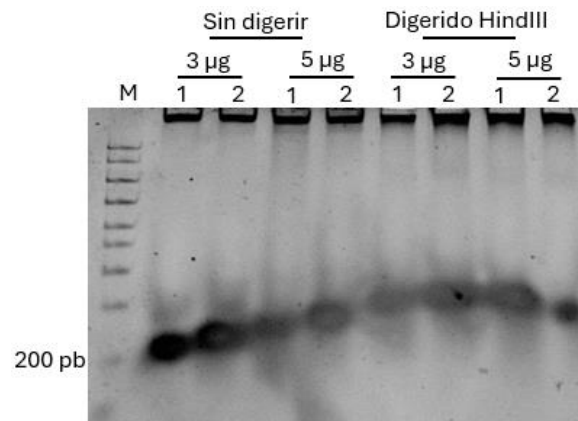


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la digestión de ADN genómico con el sistema CRISPR/Cas9. El carril “M” es el marcador de peso molecular, el “1” son las muestras digerida con las ARNg externas y el “2” son las muestras digeridas con las ARNg internas.

Al repetir este experimento, añadiendo ADN genómico sin tratar con CRISPR/Cas9, tras una primera tinción con bromuro de etidio se observó nuevamente el genómico y la banda de menor tamaño (Figura 21), confirmando los resultados anteriores. En el caso del ADN genómico sin tratar, no se observó la banda de menor tamaño.

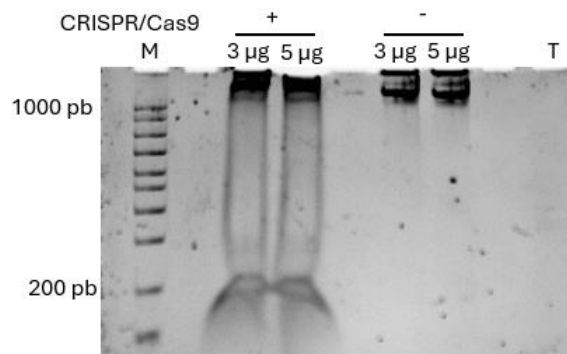


Figura 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la digestión de ADN genómico con el sistema CRISPR/Cas9. El carril "M" es el marcador de peso molecular, "T" es el tampón de carga. Los carriles a la izquierda ("+") muestran el ADN digerido con el sistema CRISPR/Cas9, mientras que los carriles a la derecha ("-") muestran el ADN genómico sin digerir (control negativo).

El mismo gel se trató posteriormente con el sistema CRISPR/Cas9-GFP, y se visualizó en el ChemiDoc MP aplicando el filtro para la fluoresceína isotiocianato, cuyo espectro de excitación y emisión solapa en gran medida con el de la GFP. Se detecta en este caso una señal que coincide con la obtenida con la tinción con bromuro de etidio, detectando tanto el genómico como la banda de menor tamaño, siendo menos intensa esta última (Figura 22).

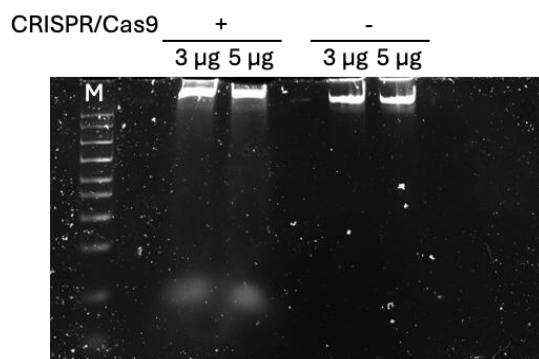


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida visualizado con el ChemiDoc MP de los resultados de la digestión del ADN genómico con el sistema CRISPR/Cas9. El carril marcado con "M" corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles a la izquierda ("+") muestran el ADN digerido con el sistema CRISPR/Cas9, mientras que los carriles a la derecha ("-") muestran el ADN genómico sin digerir (control negativo).

6. Discusión.

El síndrome del X frágil es una condición genética que ha sido objeto de intensa investigación en los últimos años debido a su complejidad y las implicaciones clínicas asociadas. Aunque se han realizado avances significativos, persisten desafíos importantes que requieren gran atención y análisis. La prevalencia en Canarias dista mucho de la esperada (Coffee *et al.*, 2009; Melancia & Trezza, 2018), según el último informe de Enfermedades Raras del Servicio Canario de Salud (SCS, 2022). En dicho informe, realizado con datos del 2018, se recoge la existencia de solo 11 casos, que si lo relacionamos con la población de Canarias en ese año (2,177 millones de habitantes) muestra una prevalencia de 1/198.000. Uno de los principales motivos por el que no se está detectando es el desconocimiento de la población sobre este síndrome, el cual se ve agravado por la diversidad de síntomas que pueden mostrar los niños que lo padecen. Sin duda, otro de los motivos para la realización del diagnóstico es su dificultad. La técnica por excelencia para ello es el *Southern blot* y nuestros hospitales no disponen de personal y equipo especializado para su realización, por lo que las muestras son derivadas a otros hospitales en la península ibérica, aumentando los tiempos de espera. Por ese motivo, se ha planteado la optimización de un método de diagnóstico del SXF empleando la herramienta CRISPR/Cas9, que sea más sencillo, barato y rápido; y que, a largo plazo, pueda establecerse como método de diagnóstico precoz.

La optimización de las condiciones de PCR para la amplificación específica de las repeticiones CGG del gen *FMRI* representó uno de los principales retos encontrados. A pesar de las diversas estrategias implementadas, como la modulación de la concentración de DMSO y la selección de diferentes cebadores, los resultados fueron inconsistentes. La baja eficiencia de amplificación puede atribuirse a la complejidad estructural de la región CGG, caracterizada por su alta repetitividad, lo que conlleva a la formación de estructuras secundarias y a las modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN (Ribate Molina *et al.*, 2010). Por este motivo, no se emplea la PCR como método de diagnóstico en clínica. Además, la inclusión de betaína en la PCR mejoró los resultados obtenidos, pero no garantizó una amplificación con mayor rendimiento que permitiera disponer de una cantidad e integridad suficiente para clonar el fragmento.

Los resultados obtenidos en el proceso de clonaje del fragmento de ADN en el plásmido BlueScript revelaron dificultades adicionales en la manipulación y transformación del ADN, probablemente derivados del bajo rendimiento de la PCR. Se observó un perfil de degradación de ácidos nucleicos en lugar de una banda clara durante la reamplificación del fragmento de ADN para su inserción en el plásmido. Una posible causa para la obtención de una mancha y no una banda es la acumulación de errores de la polimerasa al copiar la zona de repetición CGG. Aunque se procedió con la transformación bacteriana y se obtuvieron colonias, las pruebas con enzimas de restricción no confirmaron la presencia del inserto, sugiriendo un proceso de clonaje infructuoso, en el que el propio vector recircularizó.

El interés en amplificar el fragmento con las repeticiones y clonarlo en un vector reside en disponer de plásmidos que simulen la zona del gen *FMRI* al que va a ir dirigido el sistema CRISPR/Cas9 para extraer el fragmento con las repeticiones. El trabajo en el laboratorio con plásmidos es más fácil que con genómico, tanto por su sencillez como por la facilidad para obtener grandes cantidades con buena calidad. En este trabajo se pretendía poner a punto el método de diagnóstico empleando plásmidos, para a continuación trasladarlo al ADN genómico. Sin embargo, la amplificación del fragmento con los tripletes de nucleótidos no se obtuvo de forma eficiente para poder clonarlo en el vector. Debido a esta dificultad, se optó por diseñar un clonaje con un fragmento de un gen diferente que simulara el tamaño de las repeticiones CGG. Este fragmento se obtuvo amplificando secuencias de diferentes tamaños del gen *KCNMA1*, pero flanqueado por las regiones del gen *FMRI* adyacentes a las repeticiones. Se mantuvieron estas regiones de *FMRI* para poder dirigir a ellas posteriormente el sistema CRISPR/Cas9 y extraer el fragmento. Inicialmente el clonaje del vector más los tres fragmentos no fue satisfactorio, lo cual no deja de ser un resultado posible, ya que no es una estrategia sencilla; tanto por tratarse de tres

fragmentos, como porque dos de ellos eran dúplex de pequeño tamaño, 66 y 100 pb, siendo el límite para este tipo de clonajes 50 pb. Además, se comprobó que el vector, inicialmente abierto mediante PCR, recircularizó nuevamente en las colonias obtenidas. Sin embargo, la segunda estrategia abordada en la que se unieron los tres fragmentos con el mismo kit In-Fusion, se amplificó por PCR el resultado del clonaje y se realizó un segundo clonaje de un vector con un inserto, consiguió el objetivo. No obstante, esta estrategia fue realizada inicialmente para la simulación de 200 repeticiones, por lo que deberá repetirse para el clonaje de los otros fragmentos.

Al plantear esta estrategia se realizó un diseño para disponer de fragmentos que simularan el tamaño de repeticiones clave para el diagnóstico del SXF. El tamaño de 45 repeticiones (135 pb) marca el límite considerado normal, 55 repeticiones (165 pb) indica el margen superior de la considerada zona gris o intermedia, el fragmento de 200 repeticiones (600 pb) marcaría la entrada en el SXF y se añadió un fragmento de 400 repeticiones (1200 pb) para disponer de alguna indicación de tamaño dentro del número de repeticiones que ya conducen a la enfermedad. Por lo tanto, al disponer de estas construcciones, no solo se dispondrá de plásmidos con los que probar las estrategias de diagnóstico de forma más sencilla, sino que funcionará a modo de marcador de peso molecular, indicando los tamaños clave para el diagnóstico, en todos los casos posibles.

Finalmente, se propuso utilizar el sistema CRISPR/Cas9 como una alternativa prometedora para el diagnóstico del SXF. El sistema CRISPR/Cas9 ofrece la capacidad de realizar cortes específicos en el ADN, lo que permite la extracción del fragmento con las repeticiones sin pasar por un paso de amplificación, identificando de forma precisa el número de repeticiones CGG en el gen *FMRI*. Además, este sistema es altamente eficiente y accesible, lo que lo convierte en una herramienta atractiva para el diagnóstico molecular. También se debe tener en cuenta que es un sistema que puede adaptarse a formatos portátiles como tiras de diagnóstico, lo cual lo hace más interesante (Fozouni *et al.*, 2021). Para ello, se abordó la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 con diversas guías de ARN para la digestión del ADN genómico, logrando extraer la región CGG en el gen *FMRI* mediante la digestión del ADN genómico y visualizarlo en geles de poliacrilamida. La detección fue más sensible cuando se empleó bromuro de etidio para la tinción del ADN, frente al marcaje con los sistemas dCas9/ATTO550 y CRISPR/Cas9-GFP. Al cargar ADN genómico sin tratar con el sistema CRISPR/Cas9 junto al tratado (Figura 21), se descartó la posibilidad de que el fragmento de menor tamaño extraído y observado previamente (Figura 20) se deba a algún artefacto de ADN o a señal del azul de bromofenol contenido en el tampón de carga, el cual, además, migra a la altura de 300 pb. Además, se observó que fue suficiente 3 µg de ADN genómico sin digerir para

visualizar el fragmento, lo cual es importante tener en cuenta para seleccionar el tipo y cantidad de muestra que se necesitaría para la aplicación del test en clínica. Sin embargo, es necesario la realización de más pruebas de control como la utilización de los plásmidos con la inserción de los diferentes tamaños clonados y añadir la mezcla de digestión formada por CRISPR/Cas9 sin la adición de ADN.

Es importante destacar que este estudio representa un paso inicial en el desarrollo de un método de diagnóstico basado en CRISPR/Cas9. Se requiere una validación adicional utilizando muestras clínicas reales analizadas mediante un diseño simple ciego y una optimización de los protocolos experimentales para garantizar la precisión y fiabilidad del método. Además, se deben abordar cuestiones éticas y regulatorias relacionadas con la aplicación clínica de la tecnología CRISPR/Cas9 en el diagnóstico genético y el uso de muestras humanas.

7. Conclusiones.

Con lo expuesto en este estudio, se han llegado a las siguientes conclusiones:

1. La región de las repeticiones CGG del gen *FMRI* es difícil de amplificar debido a la complejidad estructural que presenta, caracterizada por su alta repetitividad, formación de estructuras secundarias y metilación.
2. Las construcciones que portan las zonas del gen *FMRI* adyacentes a las repeticiones CGG flanqueando fragmentos que simulan tamaños clave de la expansión de trinucleótidos resultan útiles tanto en el desarrollo del método de diagnóstico como para la creación de un marcador de repeticiones clave en el síndrome.
3. El sistema CRISPR/Cas9 podría ser una herramienta útil de diagnóstico molecular para la extracción del fragmento genómico clave en el síndrome del X frágil.
4. Tres microgramos de ADN genómico extraído y sin digestión previa con HindIII parece suficiente para la visualización con tinción de bromuro de etidio del fragmento nCGG en geles de poliacrilamida.
5. El estudio proporciona evidencia preliminar del potencial del sistema CRISPR/Cas9 como una herramienta de diagnóstico para el SXF. Si se desarrolla y valida adecuadamente, este enfoque podría mejorar significativamente la detección temprana y el manejo de esta enfermedad genética, beneficiando a los pacientes y sus familias. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para llevar este método desde el laboratorio hasta la práctica clínica.

The following conclusions were drawn from this study:

1. The region of the CGG repeats of the *FMRI* gene is difficult to amplify due to its structural complexity, characterized by its high repeatability, formation of secondary structures and methylation.
2. Constructions carrying *FMRI* gene zones adjacent to CGG repeats flanking fragments that simulate key sizes of trinucleotide expansion are useful both in developing the diagnostic method and in creating a marker for key repeats in the syndrome.
3. The CRISPR/Cas9 system could be a useful molecular diagnostic tool for extracting the key genomic fragment in fragile X syndrome.
4. Three micrograms of genomic DNA extracted and undigested with HindIII appears sufficient for the etidium bromide stain visualization of the nCGG fragment in polyacrylamide gels.
5. The study provides preliminary evidence of the potential of the CRISPR/Cas9 system as a diagnostic tool for XSD. If properly developed and validated, this approach could significantly improve early detection and management of this genetic disease, benefiting patients and their families. However, more research is needed to bring this method from laboratory to clinical practice.

8. Bibliografía.

- Asmamaw, M., & Zawdie, B. (2021). Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics: targets & therapy*, 15, 353–361. <https://doi.org/10.2147/BTT.S326422>
- Cearas, S. A., Rajan, V., Prykhozij, S. V., Berman, J. N., & Ignacimuthu, S. (2016). Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(9), 2333–2344. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.009>
- Cellosaurus cell line HEK293 (CVCL_0045). (s. f.). https://www.cellosaurus.org/CVCL_0045
- Chen, M., Wu, D., Tu, S., Yang, C., Chen, D., Xu, Y. 2020. CRISPR/Cas9 cleavage triggered ESDR for circulating tumor DNA detection based on a 3D graphene/AuPtPd nanoflower biosensor. *Biosens Bioelectron* 173: 112821.
- Coffee, B., Keith, K., Albizua, I., Malone, T., Mowrey, J., Sherman, S. L., & Warren, S. T. (2009). Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *American journal of human genetics*, 85(4), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.09.007>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Darnell, J. C., & Richter, J. D. (2012). Cytoplasmic RNA-binding proteins and the control of complex brain function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(8), a012344. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012344>
- De Diego Otero, Y., Severijnen, L. A., van Cappellen, G., Schrier, M., Oostra, B., & Willemsen, R. (2002). Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Molecular and cellular biology*, 22(23), 8332–8341. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.23.8332-8341.2002>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Fozouni, P., Son, S., Díaz de León-Derby, M., Knott, G. J., Gray, C. N., D'Ambrosio, M. V., Zhao, C., Switz, N. A., Kumar, G. R., Stephens, S. I., Boehm, D., Tsou, C. L., Shu, J., Bhuiya, A., Armstrong, M., et al. 2021. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell* 184(2): 323-33.
- Grupo de Investigación en Retraso Mental de Origen Genético (GIRMOGEN) y Federación Española del Síndrome X Frágil. (2006). Síndrome X Frágil: Libro de consulta para familiares y profesionales. Madrid: Ed. Real Patronato sobre Discapacidad.

- Haque, E., Taniguchi, H., Hassan, M. M., Bhowmik, P., Karim, M. R., Śmiech, M., Zhao, K., Rahman, M., Islam, T. 2018. Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects, and Challenges. *Front Plant Sci* 9: 617.
- Hayward, B. E., Zhou, Y., Kumari, D., & Usdin, K. (2016). A Set of Assays for the Comprehensive Analysis of FMR1 Alleles in the Fragile X-Related Disorders. *The Journal Of Molecular Diagnostics/ The Journal Of Molecular Diagnostics*, 18(5), 762-774. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.06.001>
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-33.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46, 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (New York, N.Y.), 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kouprina, N., Kim, J. H., & Larionov, V. (2021). Highly Selective, CRISPR/Cas9-Mediated Isolation of Genes and Genomic Loci from Complex Genomes by TAR Cloning in Yeast. *Current protocols*, 1(8), e207. <https://doi.org/10.1002/cpz1.207>
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta pharmaceutica Sinica*. B, 7(3), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.01.002>
- Lozano, R., Azarang, A., Wilaisakditipakorn, T., & Hagerman, R. J. (2016). Fragile X syndrome: A review of clinical management. *Intractable & rare diseases research*, 5(3), 145–157. <https://doi.org/10.5582/irdr.2016.01048>
- Lubs, H. A. (1969). A marker X chromosome. *American Journal of Human Genetics*, 21, 231-244.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* (New York, N.Y.), 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Martin, J. P., & Bell, J. (1943). A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 6(3-4), 154-157.
- Melancia, F., & Trezza, V. (2018). Modelling fragile X syndrome in the laboratory setting: A behavioral perspective. *Behavioural brain research*, 350, 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.042>
- Mojica, F. J. M., et al. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174-182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J. M., et al. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733-740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- Mojica F.J.M, Juez G, Rodriguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, 9(3), 613–621.
- Oliveros, J. C., et al. (2016). Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W267–W271. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw407>
- Protic, D. D., Aishworiya, R., Salcedo-Arellano, M. J., Tang, S. J., Milisavljevic, J., Mitrovic, F., Hagerman, R. J., & Budimirovic, D. B. (2022). Fragile X Syndrome: From Molecular Aspect to Clinical Treatment. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 1935. <https://doi.org/10.3390/ijms23041935>
- Ribate Molina, M. P. (2007). Estudio de la expresión de la proteína FMRP en raíz de cabello: valor diagnóstico en el síndrome X frágil. Tesis de maestría, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
- Ribate Molina, M. P., Pié Juste, J., & Ramos Fuentes, F. J. (2010). Síndrome de X Frágil. *Protoc diagn ter pediatri*, 1, 85-90.
- Romero Espinoza, P. (2008). Expresión de la proteína FMRP en pacientes mexicanos con síndrome X-frágil (Tesis de licenciatura). Universidad de Ciencias Biológicas, Zapopan, Jalisco, México.
- Salcedo-Arellano, M. J., Dufour, B., McLennan, Y., Martinez-Cerdeno, V., & Hagerman, R. (2020). Fragile X syndrome and associated disorders: Clinical aspects and pathology. *Neurobiology of disease*, 136, 104740. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104740>
- Servicio Canario de Salud. (2022). Estrategia de enfermedades raras de Canarias 2022-2026. Disponible en <https://www3.gobiernodecanarias.org/sanidad/scs/contenidoGenerico.jsp?idDocument=778a51b8-17bb-11ed-8a1a-1b6e6a9a9edd&idCarpeta=61e907e3-d473-11e9-9a19-e5198e027117>
- Tassone, F., & cols. (2000). Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 66, 6-15.

Agradecimientos.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera significativa a la realización de este Trabajo de Fin de Grado. En primer lugar, deseo agradecer a mis tutores, Belinda y David. Su orientación experta y paciencia han sido pilares fundamentales en cada etapa de este proyecto. Por otro lado, expresar mi gratitud a mis amigos por el apoyo emocional y académico durante estos cuatro años. Y, por último, a mi familia, por su amor, paciencia y apoyo incondicional.