



Universidad
Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

Primera caracterización funcional de una mutación en un tracto de polipirimidinas del gen NIPBL en un paciente con Síndrome Cornelia de Lange

Autora:

Elena Horna Terrón

Directores:

Juan Pie Juste

Beatriz Puisac Uriol

Grupo de Genética Clínica y Genómica Funcional

Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Medicina

2014/2015

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
1.1. Resumen.....	2
1.2. <i>Abstract</i>	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Síndrome de Cornelia de Lange (SCdL).....	3
2.1.1. Aspectos clínicos.....	3
2.1.2. Genes causales y complejo de cohesinas.....	4
2.1.3. <i>Splicing</i> fisiológico y patológico del gen <i>NIPBL</i>	5
2.2. Estudio funcional del <i>splicing</i> mediante minigenes.....	7
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
4.1. Material.....	9
4.1.1. Caso clínico.....	9
4.2. Métodos.....	10
4.2.1. Análisis de la mutación.....	10
4.2.2. Construcción de minigenes.....	13
4.2.3. Mutagénesis dirigida.....	15
4.2.4. Ensayo <i>in vitro</i> de las mutaciones.....	16
5. RESULTADOS.....	18
5.1. Mutación en DNA genómico.....	18
5.2. Identificación de transcritos aberrantes.....	18
5.3. Análisis mediante minigenes.....	19
6. DISCUSIÓN.....	22
7. CONCLUSIONES.....	23
7.1. Conclusiones.....	23
7.2. <i>Conclusions</i>	23
8. BIBLIOGRAFÍA.....	24
10. ANEXOS.....	26

1. RESUMEN

1.1. Resumen

El Síndrome Cornelia de Lange es un desorden multisistémico caracterizado por rasgos faciales distintivos, retraso mental y de crecimiento, malformaciones en las extremidades, sobre todo superiores, y reflujo gastroesofágico, entre otras afecciones. En la mayoría de los casos, los pacientes presentan mutaciones *de novo* del gen *NIPBL*, que es un elemento regulador del complejo de cohesinas.

El paciente estudiado en este trabajo presentaba la delección c.6344del (-13)_(-8) en el intrón 36 del gen *NIPBL*. Para confirmar dicha mutación se ha realizado un análisis a nivel de DNA, detectando la ausencia de 6 nucleótidos en dicho intrón. Además, mediante RT-PCR del RNA se ha comprobado que esta mutación del intrón 36 se asocia a un transcrito aberrante con pérdida del exón 37, que probablemente codifica una proteína truncada no funcional.

Por medio de la construcción de minigenes ha sido posible estudiar la localización de la mutación c.6344del(-13)_(-8), y demostrar que la eliminación de la secuencia de polipirimidinas del intrón 36 o la sustitución de la misma por una región de purinas provocaba la pérdida del exón 37. Todo ello sugiere que la mutación podría estar afectando al tracto rico en pirimidinas del intrón 36. Esta es la primera vez que se describe una mutación de *splicing* del gen *NIPBL* que afecta a la secuencia rica en polipirimidinas.

1.2. Abstract

Cornelia de Lange Syndrome is a multisystem disorder characterized by distinctive facial features, mental retardation, growth retardation and malformations of extremities, mostly in the uppers, and gastroesophageal reflux, among other diseases. Most of times, the patients show de novo NIPBL mutations, which is a regulatory element of cohesin complex.

The analyzed patient studied in this work had the deletion c.6344del (-13) _ (- 8) in intron 36 of NIPBL gene. To confirm that mutation a DNA analysis has been done, detecting the absence of 6 nucleotides in that intron. Moreover, by RT-PCR of the RNA it has found that this mutation of intron 36 is associated with aberrant transcript loss of exon 37, probably it encodes a non-functional truncated protein.

By minigenes construction we have been able to study the location of mutation c.6344del (-13) _ (- 8), and show that the elimination of the sequence of polypyrimidine of the intron 36 or substituting it by a region purine causes loss of exon 37. All this suggests that the mutation may be affecting the pyrimidine-rich tract of intron 36. This is the first time that a splicing mutation of gene NIPBL affecting polypyrimidine rich sequence described.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Síndrome de Cornelia de Lange (SCdL)

En 1933, la pediatra Cornelia de Lange describió dos niñas que presentaban retraso mental y del crecimiento, anomalías en las extremidades y alteraciones faciales [1] Este nuevo síndrome había sido documentado por el doctor Brachmann en 1916. Por ello, se propuso denominarlo como Síndrome de Brachmann-de Lange (aunque normalmente se le denomina Síndrome de Cornelia de Lange).[2]

El Síndrome Cornelia de Lange (SCdL; OMIM 1227470, 300590, 610759, 614701, 300882)[3, 4] es un desorden multisistémico que puede generarse por herencia familiar siguiendo un patrón autosómico dominante, en el caso de tener mutados los genes *NIPBL*, *SMC3* o *RAD21*; o dominante ligado al cromosoma X, si los genes mutados son *SMC1A* o *HDAC8*. No obstante, en la mayoría de los casos la aparición del síndrome suele ser esporádica y de “novo”. [5]

Aunque la incidencia exacta de SCdL se desconoce, parece afectar a 1:10.000-1:30.000 de los recién nacidos[6, 7], aunque posiblemente estas cifras sean mayores debido a la gran variabilidad clínica y a la subestimación de casos leves. A pesar de todo, debido al reducido número de casos, el síndrome es considerado como una enfermedad rara. [1, 8]

2.1.1. Aspectos clínicos

Los pacientes con SCdL presentan microcefalia y unos rasgos faciales distintivos, tales como cejas juntas (sinofridia) y arqueadas; pestañas largas y finas; pabellones auriculares de implantación baja y rotados hacia atrás; dientes pequeños y ampliamente espaciados (diastema dentario); labio superior fino con comisuras orientadas hacia abajo, paladar hendido y micrognatia (mandíbula muy pequeña); nariz pequeña con puente nasal deprimido y ancho, narinas antevertidas y un *filtrum* (surco subnasal) alargado y prominente.[1, 6, 9]

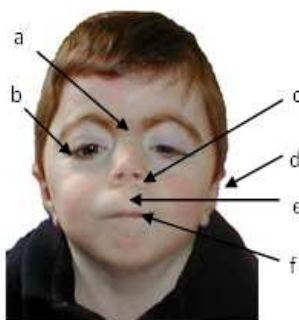


Figura 1. Rasgos faciales distintivos del SCdL. El paciente de la imagen muestra rasgos típicos del Síndrome Cornelia de Lange: (a) sinofridia y cejas arqueadas, (b) pestañas largas y finas, (c) narinas antevertidas y nariz pequeña, (d) orejas de implantación baja, (e) *filtrum* alargado y prominente, (f) labio superior fino. [1]

Las alteraciones en las extremidades son frecuentes y pueden ayudar en el diagnóstico del SdCL. La mayor parte de los pacientes presentan manos y pies pequeños, pero pueden aparecer otras alteraciones de mayor gravedad, tales como acortamiento desproporcionado del primer metacarpo, así como sindactilia (fusión de dos o más dedos entre sí) y braquiclinodactilia del quinto dedo. Las malformaciones más graves se producen en las extremidades superiores, que van desde la oligodactilia

hasta la ausencia completa de antebrazo, con una implantación de los dedos a nivel del codo. Por su parte, las extremidades inferiores se afectan con menor frecuencia que las superiores, siendo la alteración más común una sindactilia parcial del segundo y tercer dedo.[1, 6, 9]



Figura 2. Malformaciones en las extremidades superiores. La imagen muestra una oligodactilia y ausencia de cúbito en las extremidades superiores del paciente. [10]

El síndrome también se caracteriza por un retardo en el crecimiento pre y postnatal, malformaciones musculoesqueléticas, así como retraso mental, teniendo afectadas áreas del desarrollo intelectual, siendo la del lenguaje la más importante. Además, los problemas de comportamiento son frecuentes en estos pacientes [6, 9, 11]

Al tratarse de un síndrome multisistémico, gran parte del organismo se ve afectado. Los pacientes con Cornelia pueden presentar alteraciones de todo tipo del aparato digestivo como estenosis pilórica (estrechamiento del píloro) y reflujo gastroesofágico. Además, los pacientes pueden presentar cardiopatías, malformaciones genitourinarias, anomalías oftalmológicas, pérdida de la audición o hirsutismo (excesivo vello corporal). [1, 6, 9, 10]

2.1.2. Genes causales y complejo de cohesinas

El síndrome de Cornelia de Lange es un trastorno genético que puede aparecer cuando algunos de los siguientes genes aparecen mutados: *NIPBL*, *HDAC8*, *SMC1A*, *SMC3* y *RAD21*. [7, 11-13, 14 9]

Gen	Locus	Proteína
<i>NIPBL</i>	5p 13.2	<i>Nipped-B-like protein</i>
<i>SMC1A</i>	Xp 11.22	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 1A</i>
<i>SMC3</i>	10q 25.2	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 3</i>
<i>RAD21</i>	8q 24.11	<i>Double-strand-break repair protein RAD21 homolog</i>
<i>HDAC8</i>	Xq 13.1	<i>Histone deacetylase 8</i>

Tabla 1. Genes causales de SCdL junto con su locus y la proteína para la que codifican. [1]

Aproximadamente el 80% de los casos de SCdL se deben a mutaciones presentes en *NIPBL*; un 4-6% de los pacientes presentan mutaciones en *SMC1A*; y en torno a un 4% tiene mutado el gen *HDAC8*. Las mutaciones menos frecuentes son las presentes en los genes *SMC3* y *RAD21*, con solo seis y ocho casos reportados, respectivamente. [3]

Aunque la correlación genotipo-fenotipo del Síndrome de Cornelia de Lange todavía no está clara, parece ser que las características fenotípicas graves están presentes sobre todo en paciente con el gen *NIPBL* mutado. [3, 12] Así pues, la relevancia de este gen es clave a la hora de estudiar esta enfermedad. [3, 15-17]

El gen *NIPBL*, al igual que el resto de genes causales de SCdL, pertenece al complejo de cohesinas, un conjunto de proteínas muy conservado que se asocia con los cromosomas de todas las células eucariotas permitiendo la cohesión de las cromátidas hermanas. Asimismo, el complejo asegura una adecuada separación de los cromosomas durante la división celular y está implicado en la reparación del DNA y en la regulación de la expresión génica. [7, 18]

El complejo de cohesinas consta de cuatro subunidades que están dispuestas en una estructura en forma de “anillo”: dos proteínas estructurales pertenecientes a la familia *Structural maintenance of chromosomes* o SMC (SMC1A y SMC3) y dos proteínas de cierre del anillo, RAD21 y SA. [18] SMC1A y SMC3 son proteínas grandes que dimerizan en un extremo para formar un dominio “bisagra”. En su otro extremo, los dominios “cabeza” ATP-asa interactúan con la subunidad RAD21, que se une a SA para mantener el anillo cerrado. [19, 20]

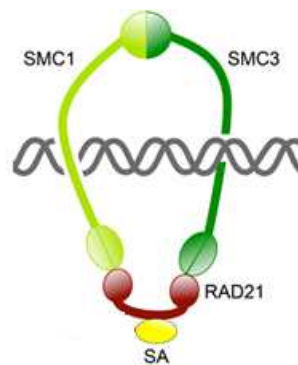


Figura 3. Estructura del anillo de cohesinas. Este complejo está formado por las proteínas estructurales SMC1A y SMC3 y las proteínas RAD21 y SA que cierran el anillo de cohesinas [19]

El complejo cohesinas se carga en la cromatina en fase G1 de la Interfase gracias al heterodímero que forma las proteínas NIPBL y MAU2, ya que interactúan con las cuatro subunidades del anillo y les transmite energía a partir de la hidrólisis de ATP, proceso que tiene lugar en los dominios “cabeza” de SMC1A y SMC3. Estas dos proteínas se disocian transitoriamente para permitir la entrada del DNA en el anillo. [19, 20]

La pérdida de la función del complejo de cohesinas es incompatible con la vida. Sin embargo, las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas estructurales o reguladoras del complejo representan un grupo de trastornos genéticos conocidos como “cohesinopatías”, entre los que se encuentra el Síndrome de Cornelia de Lange. [18, 19]

2.1.3. *Splicing* fisiológico y patológico del gen *NIPBL*

Antes de que una proteína se sintetice, es necesario que el gen que codifica a la misma se transcriba en un pre-mRNA constituido por exones e intrones. Para que el pre-mRNA madure, debe llevarse a cabo un proceso de corte y empalme o “*splicing*”: se produce la eliminación de los intrones que conformaban el gen, además del empalme de los exones para generar una secuencia codificante capaz de traducirse en una proteína funcional.

En proceso de *splicing* se necesita que se unan al pre-mRNA una batería de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) que son ricas en uridinas (U) y se denominan U1, U2, U4, U5, U6. El complejo resultante del ensamblado se denomina espliceosoma, que es capaz de reconocer las secuencias señalizadoras de corte, escindir a los intrones y empalmar los exones, produciendo una molécula de mRNA maduro que podrá traducirse en una proteína.

Los intrones son eliminados del transcrito primario por las snRNP que reconocen las secuencias conservadas dentro del intrón y en los límites con los exones:

- Secuencia GU en el extremo 5' o sitio dador.
- Secuencia AG en el extremo 3' del intrón o sitio aceptor.
- Secuencia o sitio de ramificación, que se localiza en el interior del intrón. Dentro de esta secuencia destaca la adenina central (A), ya que es el punto de ramificación.
- Tracto de polipirimidina (formado casi exclusivamente por citosinas y/o timinas), situado entre el punto de ramificación y el sitio aceptor 3'.

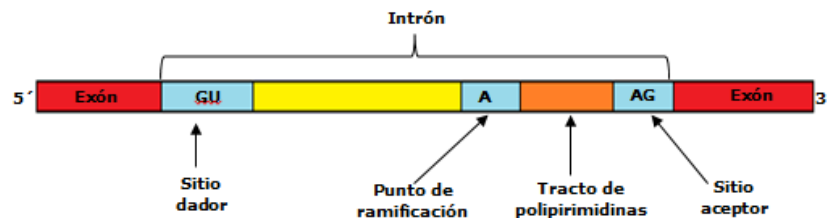


Figura 4. Estructura de un intrón.

Las citadas secuencias intervienen en el *splicing*, proceso que se lleva a cabo en dos etapas. En la primera de ellas, una snRNP reconoce al sitio dador y otra se enlaza al punto de ramificación. El extremo 5' es eliminado y ligado a un nucleótido adenina del sitio de ramificación. Por otro lado, en la segunda etapa se produce el reconocimiento del extremo 3' por parte de otra snRNP y se lleva a cabo el corte en el extremo 3' del intrón, seguido por el empalme de los dos exones. Así se libera el mRNA maduro del espliceosoma. El intrón queda eliminado en forma de lazo y será degradado posteriormente en el núcleo.

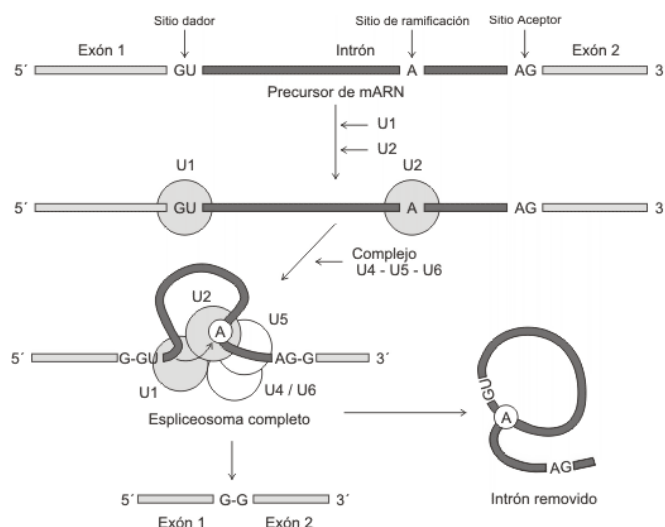


Figura 5. Proceso de *splicing*

El gen *NIPBL* (*Nipped-B like*) se encuentra en la cadena de polaridad positiva (+) del cromosoma 5 de *Homo sapiens*, concretamente en el brazo corto y en posición p13,2. [12] Su tamaño es de 189,655 bp y está constituido por 47 exones 46 intrones y codifica un factor regulador del complejo de las cohesinas, la proteína NIPBL. [21, 22]

Se han encontrado 9 transcritos diferentes de *NIPBL* generados por *splicing* alternativo, pero solo dos de ellos son capaces de generar proteínas funcionales: NIPBL-001 y NIPBL-002. El primero de ellos contiene 10,435 bp y 47 exones, de los cuales, los 46 últimos codifican una proteína de 2,804 aminoácidos; la llamada isoforma A (secuencia canónica). El segundo transcrito posee 8,729 bp, 46 exones (no incluye el exón 47 de la isoforma A) y codifica la isoforma B de la proteína, formada por 2,697 aminoácidos. [4, 23] Ambas isoformas se conservan en los vertebrados y son idénticas desde el aminoácido 1 a 2683, mientras que los extremos C-terminales son diferentes. [4, 23]. Por otro lado, se han identificado cuatro nuevas isoformas generadas por *splicing* fisiológico ($\Delta E10$, $\Delta E12$, $\Delta E33,34$, y B')[4].

En el gen *NIPBL* pueden producirse diferentes tipos de mutaciones puntuales: sustituciones, deleciones, inserciones, mutaciones sin sentido y mutaciones en la zona de corte y empalme (*splicing*). Curiosamente, estas últimas pueden dar lugar a muy variados efectos, de los cuales, el más común es la omisión del siguiente exón. [4]

Las mutaciones de corte y empalme se han encontrado tanto en los nucleótidos de las zonas aceptoras y dadoras de *splicing* como en alguno de los tramos de polipirimidinas. A veces, estas mutaciones pueden provocar la pérdida parcial del exón mediante la activación de las secuencias de corte y empalme que estaban ocultas. Asimismo, las mutaciones de *splicing* pueden incluso interrumpir los sitios originales de corte y empalme y generar otros nuevos. [4]

2.2. Estudio funcional del *splicing* mediante minigenes

Los minigenes (*exon-trapping vectors*) son constructos formados por un inserto genómico que se clona en un plásmido que contiene un promotor y una secuencia donadora de *splicing* en posición 5' respecto al inserto y una secuencia aceptora de *splicing* con señales de terminación de la transcripción en 3' respecto del inserto. Es decir, los minigenes contienen un segmento genómico generado a partir del gen de interés que incluye las regiones de *splicing*. Estos segmentos se crean mediante amplificación por PCR, ya sea directamente a partir de DNA genómico o un fragmento de ADN genómico clonado como molde. [24]

El exón que porta la mutación en estudio se clona junto con su secuencia intrónica flanqueante. También se clona el transcrito normal y se transfectan ambas en líneas celulares establecidas para analizar posteriormente el patrón de *splicing* del vector.

Por tanto, este tipo de construcciones se pueden utilizar para confirmar y demostrar la existencia de una mutación de *splicing in vitro* que impide la correcta maduración del mRNA. [25]

3. OBJETIVOS

- 1- Confirmar a nivel del RNA que la mutación c.6344del (-13)_(-8) del gen *NIPBL* provoca un *splicing* aberrante en un paciente con Síndrome Cornelia de Lange.
- 2- Analizar mediante minigenes el mecanismo de *splicing* de la mutación c.6344del (-13)_(-8).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material

El material de partida en este trabajo fue sangre periférica y una muestra de DNA de un paciente con Síndrome de Cornelia de Lange que posee una mutación en el intrón 36 del gen *NIPBL* (c.6344del(-13)₋(-8)).

Por otro lado, como control se usó DNA de un paciente que no poseía mutación alguna en *NIPBL*.

4.1.1. Caso clínico

El paciente estudiado es una niña de 7 años que nació a las 36 semanas de gestación en la que se observó la presencia de diferentes signos característicos de los pacientes con Cornelia de Lange.

Durante la exploración en el período neonatal, la paciente tenía las siguientes características: cejas arqueadas con sinofridia, pestañas largas, puente nasal deprimido con fosas nasales antevertidas, largo y suave surco nasolabial, labio superior delgado e hirsutismo generalizado. Tenía las manos pequeñas con braquimesofalangia V y la restricción de los movimientos del codo. Durante los primeros meses de vida, presentaba un trastorno de la alimentación y la deglución, que actualmente está bajo tratamiento para evitar el reflujo gastroesofágico.

Sistemas/órganos o funciones afectados	Clínica
Cabeza	<ul style="list-style-type: none">• Braquicefalia• Edema en la nuca
Ojos	<ul style="list-style-type: none">• Cejas arqueadas• Sinofridia• Pestañas largas• Ptosis
Nariz	<ul style="list-style-type: none">• Puente nasal deprimido• Narinas antevertidas• <i>Philtrum</i> alargado
Boca	<ul style="list-style-type: none">• Labio superior delgado
Sistema respiratorio	<ul style="list-style-type: none">• Infección del sistema respiratorio superior
Sistema gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none">• Reflujo gastroesofágico• Problemas de alimentación
Extremidades	<ul style="list-style-type: none">• Manos pequeñas con cortos dedos (braquimesofalangia V)• Pies pequeños• No ausencia de brazos o antebrazos• Restricción de los movimientos del codo
Piel	<ul style="list-style-type: none">• Hirsutismo severo
Mental / cognitivo	<ul style="list-style-type: none">• Conducta social problemática (características autistas)
Desarrollo	<ul style="list-style-type: none">• No habla• Comenzó a caminar a los 3.5 años
Parámetros somatométricos	<ul style="list-style-type: none">• Crecimiento lento antes y después del nacimiento

Tabla 2. Caso clínico de la paciente con la mutación c.6344del (-13)₋(-8) en el gen *NIPBL*.



Figura 6. Imágenes de la paciente con la mutación c.6344del (-13)₋(-8) en el gen *NIPBL*.

4.2. Métodos

4.2.1. Análisis de la mutación

Se nos envió al laboratorio una muestra de DNA del paciente para comprobar que padecía la mutación c.6344del (-13)₋(-8).

4.2.1.1. Análisis del DNA genómico

4.2.1.1.1. Amplificación por PCR del exón 37 del gen *NIPBL*

La técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se fundamenta en la propiedad de la enzima *Taq*-polimerasa para replicar hebras de DNA. Esta técnica consiste en ciclos repetitivos de variaciones de temperatura que permiten: la desnaturalización del DNA; hibridación de los cebadores al DNA diana; y elongación de las cadena de DNA formadas. Estas fases constituyen un ciclo de amplificación y cada uno de los productos formados puede usarse de DNA molde para el ciclo siguiente.

En este caso, la PCR se realiza para amplificar el fragmento formado desde el por el exón 37 y las secuencias intrónicas flanqueantes. Las condiciones de PCR se muestran en el *Anexo 1*.

Tras tener la mezcla de reacción completa con todos y cada uno de los reactivos en el interior de tubos eppendorf, se introducen los mismos en un termociclador (Applied Biosystems) para que pueda llevarse a cabo la PCR. Los cambios de temperatura y la duración de cada etapa se muestran en el *Anexo 2*.

4.2.1.1.2. Detección del DNA amplificado

Para determinar si el DNA de cada muestra se ha amplificado y no se han formado dímeros de primer o amplificaciones específicas (*smearing*), se visualiza cada muestra en un gel de agarosa. Este se sintetiza siguiendo el siguiente proceso:

1. Disolver 0.53g de agarosa (2%) en 26.5ml de buffer TBE1X (TRIS + ácido bórico + EDTA).
2. Se calienta la muestra en un microondas hasta su ebullición.
3. Adición de 0.8il de bromuro de etidio (EtBr).
4. Verter la mezcla en un soporte previamente montado ("cama"), colocar un peine y dejar solidificar.

La electroforesis en gel es una técnica que se emplea para separar por tamaños las muestras de DNA, que están cargadas negativamente debido a sus grupos fosfato, con lo en un campo eléctrico migrarán a hacia el polo positivo.

Cuando se aplica una diferencia de potencial, el lugar de la migración vendrá determinado por el tamaño del fragmento de DNA, migrando los fragmentos pequeños más rápido que los grandes. Para conocer el tamaño de los fragmentos se utiliza un marcador de peso molecular de 100pb.

El proceso de electroforesis se detalla a continuación:

1. Llenar la cubeta de electroforesis con Buffer TBE1X
2. Retirar el peine del gel previamente formado.
3. Retirar el gel del soporte o cama y sumergirlo dentro de la cubeta.
4. Cargar en cada pocillo 3µl de muestra junto con 3µl de tampón de carga *Sample Buffer*
5. Constar los electrodos a la cubeta y comenzar el proceso de electroforesis: 90 V, 30 minutos.
6. Transcurrida la electroforesis, sacar el gel de la cubeta y revelarlo en el transiluminador (Gel Doc) para detectar la amplificación de cada uno de los exones.

4.2.1.1.3. *Secuenciación*

Una vez que se comprueba que las muestras con DNA con cada grupo de *primers* se han amplificado, se purifican dichos productos de la PCR por medio de la proteína exosap (ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix)). Esta proteína posee, por un lado, actividad exonucleasa, que degrada las cadenas sencillas de DNA (*primers*); y por otro, actividad fosfatasa, que elimina los grupos fosfato de los nucleótidos de los *primers* impidiendo su renaturalización.

Para llevar a cabo la purificación de los productos de PCR, se añaden a este 5µl de exosap y se introduce la muestra en el termociclador con el programa del *Anexo III*. Tras purificar la muestra, se envían a secuenciar.

El proceso de secuenciación llevado a cabo es de tipo Sanger, método que se basa en la polimerización del DNA y el uso de dideoxinucleótidos (dNTP) que sirven como terminadores de la reacción. El proceso de amplificación por PCR de esta técnica utiliza dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar.

4.2.1.2. *Extracción del RNA*

Por medio del kit PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytiX) se extrae el RNA de leucocitos de sangre periférica para analizarlo posteriormente.

1. Centrifugar el tubo con sangre durante 10 minutos a 400xg.
2. Eliminar el sobrenadante por pipeteo. Añadir 4ml de agua RNAase-free al pellet.
3. Vortear hasta que el pellet se haya disuelto y centrifugar 10 minutos a 4000xg. Descartar el sobrenadante.
4. Añadir 350µl de tampón (BR1) y vortear hasta que el pellet esté disuelto.
5. Pipetear la muestra a un eppendorf de 1.5ml y añadir 300µl de tampón (BR2) y 40µl de proteinasa K. Mezclar por vorteo durante 5 segundos e incubar 10 minutos a 55°C usando un shaker a 400-1400rpm. Después poner el shaker a 65°C.
6. Pipetear el lisado en la columna PAXgene shredder spin column colocada en un tubo de 2ml y centrifugar 3 minutos a máxima velocidad.

7. Transferir el eluido a un nuevo eppendorf.
8. Añadir 350µl de etanol 100%, mezclar por vorteo y centrifugar 1-2 segundos a 4000rpm.
9. Pipetear 700µl de muestra en la columna PAXgene RNA spin column situada en un tubo de 2ml y centrifugar 1 minuto a 13000rpm. Colocar la columna en un nuevo tubo y descartar el usado.
10. Pipetear el resto de la muestra y repetir el proceso anterior.
11. Pipetear 350µl de tampón de lavado 1 (BR3) en la columna. Centrifugar 1 minuto a 13000rpm. Colocar la columna en un tubo nuevo.
12. Añadir en un eppendorf 10µl de DNase I en solución y después 70µl de RDD (tampón de digestión).
13. Pipetear los 80µl de esta mezcla a la columna y dejarlo 15 minutos a temperatura ambiente.
14. Pipetear 350µl de tampón de lavado 1 (BR3) en la columna. Centrifugar 1 minuto a 8000-20000xg. Colocar la columna en un tubo nuevo.
15. Pipetear 500µl de tampón de lavado 2 (BR4). Centrifugar 1 minuto a 8000-20000xg. Colocar la columna en un tubo nuevo.
16. Añadir otros 500µl de tampón de lavado 2 (BR4). Centrifugar 3 minutos a 8000-20000xg. Colocar la columna en un tubo nuevo.
17. Desechar el tubo y poner la columna en un tubo nuevo. Centrifugar 1 minuto a 8000-20000xg.
18. Desechar el tubo y colocar la columna en un tubo de 1.5ml y pipetear 25µl de tampón de elución (BR5) en la membrana. Centrifugar 1 minuto a 13000rpm.
19. Sobre la misma columna se vuelve a añadir 25µl de tampón de elución (BR5).
20. Incubar 5 minutos a 65°C e inmediatamente poner en hielo. Guardar el RNA -80°C.

4.2.1.3. RT-PCR

A partir de 500 ng del RNA extraído, se realiza una transcripción reversa y se forma cDNA de cadena simple usando First Strand Synthesis Kit (Fermentas).

1. Prepara la mezcla 1 (Tabla 3) e incubar 5 minutos a 65°C.
2. Añadir la mezcla 2 (Tabla 4) e incubar: 25°C (5 minutos), 37°C (60 minutos) y 70°C (5 minutos).

Reactivo	Volumen
RNA	1.6 µl
Random hexámeros	1 µl
Agua	8.4 µl

Tabla 3. Mezcla 1 de la RT-PCR

Reactivo	Volumen
Tampón	4 µl
Inhibidor de RNAsa	1 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Transcriptasa reversa	2 µl

Tabla 4. Mezcla 2 de la RT-PCR

4.2.1.4. Identificación de transcritos aberrantes

Para este paciente se amplifican los exones 35-38 (dado que la mutación se encuentra entre los mismos) por medio de los cebadores *forward* sF35 (5'-ATCATCAAATATGGCATGAC-3') y *reverse* sR38 (5'-TAGACCAATGATAGCTTTTG-3'). Cada reacción de amplificación contiene 2 µl de cDNA en una mezcla total de 20 µl.

Los productos amplificados obtenidos se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Las bandas obtenidas se escinden y se purifican con QIAEX Gel Extraction Kit (QIAGEN). Finalmente, su identidad se confirma por secuenciación.

4.2.2. Construcción de minigenes

4.2.2.1. Clonación del exón 37 del gen *NIPBL* en el vector pCR®2.1-TOPO

El proceso de clonación de DNA consta de la inserción de un fragmento de DNA en un vector plasmídico. Para que esta construcción perdure en el tiempo, se amplifique y se obtenga un número elevado de copias, es necesario introducirla en un hospedador apropiado como *E. coli*.

A continuación se comentan los pasos fundamentales de la clonación:

- Amplificación del DNA a estudiar para generar el inserto.
- Fragmentación específica mediante enzimas de restricción, tanto del inserto como del vector en el que se va a clonar.
- Ligación del inserto con el vector para formar el plásmido recombinante.
- Introducción del plásmido recombinante en células receptoras.
- Selección de colonias aisladas que poseen los clones positivos.
- Secuenciación de las colonias positivas.

4.2.2.1.1. Generación del inserto

El inserto que se va a utilizar es el obtenido a partir de la amplificación del exón 37 del gen *NIPBL* junto con sus secuencias intrónicas flanqueantes.

Los *primers* utilizados NM37F (5'-ATTACCTGAGGTCGGGAGTTC-3') y NM37R (5'-GCTGTTGATGTCAACAGTGTGC-3').

Las condiciones de PCR y los reactivos son los mismos que los seguidos en la sección 4.2.1.1.2. (Véase *Anexo I* y *Anexo II*). Además de esta amplificación, se realizan los mismo pasos con DNA genómico de un control sano.

El producto de PCR se visualiza en un gel de agarosa en TBE 1X y como que aparecen bandas inespecíficas, se purifica el producto de PCR desde el gel de agarosa usando el kit comercial Qiaquick Gel Extraction kit de QIAGEN.

4.2.2.1.2. Ligación del inserto con el vector pCR®2.1-TOPO

El vector usado es pCR®2.1-TOPO (Invitrogen) (Véase *Anexo IV*), que es un plásmido que posee extremos 3'- protuberantes con un residuo de timidina. Por medio de este sistema no es necesaria la digestión con enzimas de restricción o el uso de la DNA ligasa.

La *Taq*-polimerasa empleada en la reacción de PCR para generar el inserto posee actividad transferasa terminal y deja una adenina extra en los extremos 3' de los productos, que es complementaria a la timidina protuberante del vector.

La ligación se realiza incubando una mezcla de reacción (Véase *Anexo V*) durante 15 minutos a 25°C y posteriormente se transfiere a baño de hielo.

4.2.2.1.3. *Transformación del vector pCR® 2.1-TOPO recombinante en E. coli XL1 blue*

Se usa la metodología del choque térmico para introducir el vector recombinante en las células. El protocolo seguido se muestra a continuación:

1. Mezclar en un tubo 2µL del vector recombinante y 100µL de células competentes *E.Coli* XL1 Blue.
2. Incubar 30 minutos en hielo.
3. Choque térmico: Calentar la mezcla de reacción a 42° C durante 45 segundos en un baño de agua y seguidamente trasvasarla a hielo 2 minutos.
4. Añadir 300 µL de LB atemperado y estéril.
5. Incubar a 37° C y 150 rpm durante 1 hora y 30 minutos.
6. Sembrar la mezcla anterior en una placa atemperada de LB-Ampicilina suplementada con 40 µl de XGal 20 mg/ml y 10 µl de IPTG 0,5 M.
7. Dejar crecer durante 24 horas a 37°C.

4.2.2.1.4. *Selección de las colonias positivas*

Tras dejar crecer las colonias de *E. coli* XL1 blue, se seleccionan las positivas (las que han incorporado el vector recombinante). El vector pCR® 2.1-TOPO posee su MCS en el medio del gen *LacZ*, por lo que si se ha incorporado el inserto, este gen queda interrumpido. Al inducir la expresión del gen *LacZ* con IPTG y XGal, las colonias adquieren una coloración azul, que pierden en el caso de que se haya interrumpido el gen con el inserto. Así pues, las colonias positivas son las que tienen coloración blanca.

4.2.2.1.5. *Obtención del plásmido recombinante de las colonias positivas*

Se toman las colonias positivas (blancas), se ponen a crecer en 5 ml LB-ampicilina a 37°C O/N y su DNA plasmídico se purifica según el protocolo del kit Ilustra PlasmidPrep Mini Spin Kit de GE Healthcare. Este DNA se envía a secuenciar para confirmar que no se han introducido mutaciones durante el clonaje.

4.2.2.2. *Subclonaje de los insertos en vectores pSPL3*

El subclonaje es una técnica que consiste en obtener el inserto de un plásmido determinado para introducirlo en otro distinto. Este segundo vector permite reproducir *in vitro* el proceso de *splicing* que sufriría el exón *in vivo*. Los pasos a seguir son:

- Digestión del plásmido pCR® 2.1-TOPO recombinante con *EcoRI* para obtener el inserto.
- Digestión del vector pSPL3 con *EcoRI*.
- Ligación del inserto y el vector pSPL3.
- Transformación del vector pSPL3 recombinante en colonias *E.coli* XL1 blue.
- Selección de las colonias positivas (han incorporado el vector recombinante) por medio de PCR *boiling*, que consiste en realizar una PCR directamente sobre las colonias que han crecido.
- Obtención del DNA plasmídico de las colonias positivas.

En primer lugar, los insertos se escinden del vector recombinante pCR®2.1-TOPO con *EcoRI* (Fermentas) y se extraen con los siguientes reactivos del *Anexo VI*.

La reacción se incuba a 37 °C durante 3 horas y posteriormente se comprueba que la reacción ha transcurrido de manera correcta a través de un gel de electroforesis de agarosa. La banda de interés correspondiente al inserto se purifica con el kit comercial Qiaquick Gel Extraction kit de QIAGEN.

El vector pSPL3 (*Veáse Anexo VII*) se comercializa en forma circular, por lo que para poder introducir el inserto en él debe digerirse previamente con una enzima de restricción que genere extremos cohesivos con el inserto. En este caso, la enzima de restricción utilizada ha sido *EcoRI*, que es la misma con la que se ha digerido el inserto, de la forma que se indica en el *Anexo VIII*.

Para evitar que se produzca la recircularización del vector pSPL3, antes de realizar la ligación se defosforila el vector en 5' con fosfatasa alcalina (TSAP, de Promega). Los reactivos utilizados se muestran en el *Anexo IX*.

El proceso de ligación del inserto y el vector pSPL3 se realiza a 25°C durante 5 min, utilizando DNA ligasa T4 y seguidamente se transfiere la mezcla a baño de hielo. Los componentes de la mezcla de ligación se muestran en el *Anexo X*.

Tras la ligación, se transforma el vector recombinante en E.coli XL1 blue, tal y como se muestra en la *Sección 4.2.2.1.4*. Sin embargo, en este caso, las placas de LB-ampicilina no se les añade ni IPTG ni XGal ya que el vector pSPL3 no posee sistema *LacZ*. Por tanto, se realiza una PCR *boiling* “picando” un número determinado de colonias y sumergiendo cada una en un tubo con los reactivos de la PCR. (Todos los reactivos y condiciones de reacción se muestran en el *Anexo XI* y *Anexo XII*) y, finalmente, dichas colonias se lisan por calor.

Para obtener el DNA plasmídico de las colonias positivas, se “pican” dichas colonias y se ponen a crecer en 5 ml LB-ampicilina a 37°C O/N. El DNA plasmídico obtenido se purifica mediante una miniprep siguiendo el protocolo descrito en el kit Ilustra PlasmidPrep Mini Spin Kit de GE Healthcare.

Para finalizar, se envía a secuenciar el inserto clonado en el DNA plasmídico y así confirmar que no se han introducido mutaciones durante el clonaje.

Todos los minigenes generados se aíslan usando el kit de GenJET Plasmid Miniprep (Fermentas) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y son verificados por secuenciación.

4.2.3. Mutagénesis dirigida

Por medio de mutagénesis dirigida, se pueden generar diferentes minigenes para determinar el tipo de mutación de *splicing* que posee el inserto del propio minigén. Este proceso consta de los siguientes pasos:

- Desnaturalización del plásmido que contiene el gen a mutar y ligación de los oligonucleótidos diseñados para introducir la mutación deseada.
- Extensión de los oligonucleótidos con la enzima de alta fidelidad *Pfu* DNA polimerasa para obtener plásmidos de cadena doble mellados en una de las hebras.

- Tratamiento con *Dpn* I para digerir las hebras metiladas que corresponden al plásmido sin mutar.

Los minigenes control se mutan de manera dirigida a través de QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), sustituyendo las pirimidinas del tracto de polipirimidinas del exón 36 y por purinas, generando de esta forma el minigén mutante PUR.

4.2.3.1. PCR de la mutagénesis dirigida

El DNA que se ha utilizado de molde para la mutagénesis ha sido el plásmido recombinante pSPL3-37WT en la reacción con los *primers* PUR F y PUR R.

Primers	Secuencia
Primer PUR F	5'- attac aaaag attattagGTGCCA-3'
Primer PUR R	5'- TGGCACcctaataa tctttt gtaat -3'

Tabla 5. Secuencia del minigén PUR.

Los reactivos y el programa de PCR utilizados son los que se indican en el *Anexo XIII* y en el *Anexo XIV*.

Los minigenes mutados PUR se aíslan usando el kit de GenJET Plasmid Miniprep (Fermentas) tal y como se lleva a cabo con el resto de minigenes. Finalmente, los son verificados por secuenciación.

4.2.4. Ensayo *in vitro* de las mutaciones

4.2.4.1. Transfección de las células HepG2

Tras la construcción de los minigenes, se verifica si funcionan reproduciendo el *splicing* observado *in vivo*. Para ello, con estos minigenes se transfectan células eucariotas HepG2.

4.2.4.1.1. Cultivo de las células HepG2

Las células HepG2 se deben mantener para su crecimiento a 37°C y atmósfera de 5% CO₂ en el medio de cultivo expuesto en el *Anexo XV*.

4.2.4.1.2. Transfección de las células HepG2

El protocolo de transfección se muestra a continuación:

1. En placas de 6 pocillos, sembrar 4x10⁵ células por pocillo y dejarlas crecer a 37°C durante 24 horas.
2. Transfectar las células HepG2 con 1500 ng de vector recombinante siguiendo el protocolo del kit comercial jetPEI™ DNA Transfection Reagent de Polyplus Transfection™.

4.2.4.2. Extracción de RNA de las células transfectadas y análisis del mismo

4.2.4.2.1. *Recolección de las células transfectadas*

Para recolectar las células transfectadas, se sigue el siguiente protocolo:

1. Lavar cada pocillo con 1 ml de PBS 2 veces.
2. Añadir 0,5 ml de tripsina/EDTA 0,05/0,02% a cada pocillo.
3. Cuando las células se hayan despegado, se debe añadir 1 ml de PBS a las mismas y, posteriormente, trasvasarlas a un eppendorf.
4. Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm y eliminar el sobrenadante.

4.2.4.2.2. *Extracción de RNA*

Para lisar las células transfectadas y extraer su RNA se sigue el protocolo descrito en el kit RNeasy® Protect Mini Kit de Qiagen.

4.2.4.2.3. *Análisis del RNA*

Para analizar el RNA, se lleva a cabo una RT-PCR por medio de 1µg de RNA utilizando el kit First Strand Synthesis Kit (Fermentas).

Una vez que se obtiene el cDNA correspondiente, se realiza una PCR con 5µl de cDNA usando los cebadores específicos del vector pSPL3 SD6 y SA2.

Los reactivos y condiciones de PCR se muestran en el *Anexo XVI* y *Anexo XVII*.

Los productos amplificados se analizan por electroforesis y se envían a secuenciar.

5. RESULTADOS

5.1. Mutación en DNA genómico

Primeramente, se ha verificado la existencia de la mutación c.6344del (-13)_(-8) en el intrón 36 del gen *NIPBL* del paciente. Para ello, se ha realizado una amplificación del exón 37 y sus secuencias intrónicas flanqueantes.

Analizando los resultados, es evidente que la secuencia de nucleótido del gen *NIPBL* del paciente es diferente de la del control y se puede apreciar la ausencia de 6 nucleótidos en la secuencia intrónica 36 del paciente.

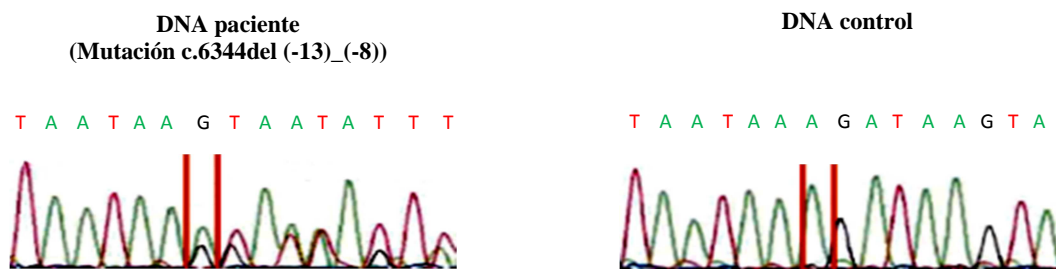


Figura 7. Secuencia de nucleótidos procedentes del gen *NIPBL* del DNA del paciente c.6344del (-13)_(-8) y del DNA control.

5.2. Identificación de transcritos aberrantes

Para confirmar que la mutación c.6344del (-13)_(-8) del gen *NIPBL* provoca un *splicing* aberrante en el paciente con Síndrome Cornelia de Lange del trabajo, se realizó un estudio a nivel de RNA. Para ello, se desarrolló una extracción de RNA de leucocitos de sangre periférica y, posteriormente, se transformó dicho RNA en cDNA mediante una RT-PCR.

Se realizó una amplificación de los exones 35 a 38 a partir del cDNA del paciente y una muestra control en un gel de electroforesis. Se observaron diferencias entre ambas muestras: la control poseía una banda de 363 bp correspondiente a los exones 36-37-38; mientras que la muestra del paciente presentaba la banda esperada a 363bp, además de otra banda adicional a 208bp.

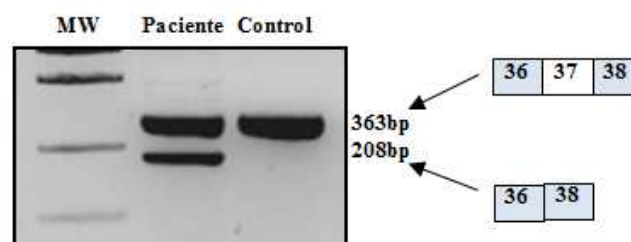


Figura 8. Resultados de la electroforesis del cDNA control y del cDNA del paciente.

Las bandas resultantes se escindieron del gel y se purificaron para poder secuenciarlas. Así pues, observando detenidamente las secuencias de nucleótidos, la banda más ligera de cDNA no poseía el exón 37 debido a la mutación c.6344del (-13)_(-8) presente en el intrón 36 del gen *NIPBL*.

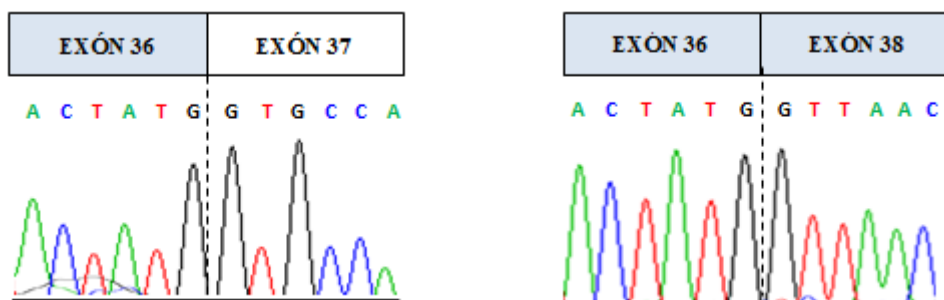


Figura 9. Secuencias Sanger procedentes de la banda a 363bp y la banda a 208bp. A la izquierda está representada la secuencia sin ninguna mutación. La figura de la derecha representa la secuencia de nucleótidos de la muestra del paciente, en la que se observa la falta del exón 37 del gen *NIPBL*.

5.3. Análisis mediante minigenes

Para analizar el mecanismo de *splicing* por el que se produce la pérdida del exón 37 se llevó a cabo un estudio con minigenes. Los insertos de los minigenes procedían del exón 37 (y sus secuencias intrónicas flanqueantes) de gen *NIPBL* del DNA de paciente y un DNA control. Una vez obtenidos los insertos, se cortaron con la enzima *EcoRI*, al igual que los vectores utilizados para facilitar el proceso de clonaje en el vector pSPL3.

Tras la ligación en el plásmido pSPL3 y su posterior transformación en las células competentes *E.coli* XL1blue, se comprobó si las colonias que habían crecido eran positivas por medio de una PCR *boiling* utilizando los *primers* NM37F y NM37R.

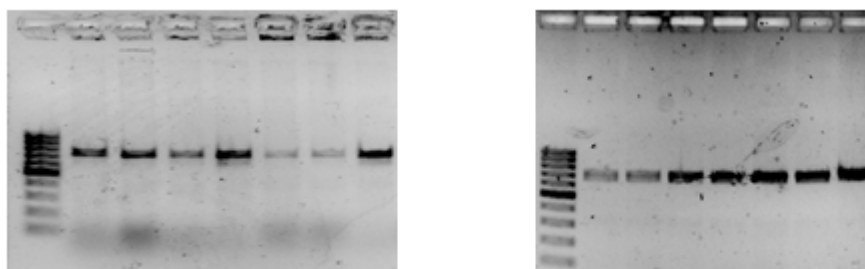


Figura 10. Electroforesis donde se observa el resultado de la PCR *boiling*, donde se observan las colonias positivas por medio de una banda a 700 pb correspondiente a la amplificación del inserto con los *primers* NM37F Y NM37R. El gel de la izquierda representa la PCR *boiling* de las colonias que han insertado el minigén 37WT; el de la derecha, las colonias de la de las colonias que han incorporado el minigén 37DEL.

El DNA plasmídico se purificó mediante una miniprep y se envió a secuenciar para comprobar si cada plásmido posee la secuencia correcta. Así pues, se obtienen tres tipos de minigenes: los 37WT, los 37DEL y los PUR.

La secuencia del producto de PCR 37WT control determinaba la presencia del exón 37, dado que no poseía mutación alguna en la región intrónica 36.

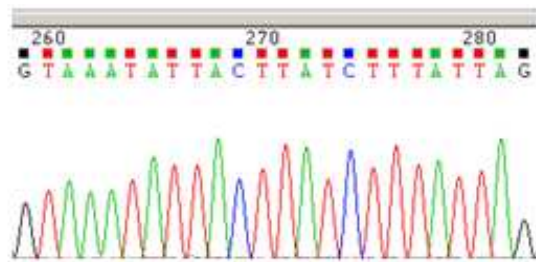


Figura 11. Secuencia Sanger de la muestra 37WT.

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR 37DEL, como procedían del paciente, presentaban la delección de las 6 pares de bases presentes en la mutación c.6344del (-13)_(-8) en el intrón 36 del gen *NIPBL*.

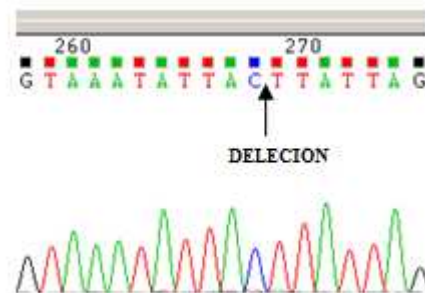


Figura 12. Secuencia Sanger de la muestra 37DEL.

Las secuencias PUR presentaban la mutación de las pirimidinas de la región analizada del intrón 36 por purinas, tal y como mostraba su secuencia de nucleótidos.

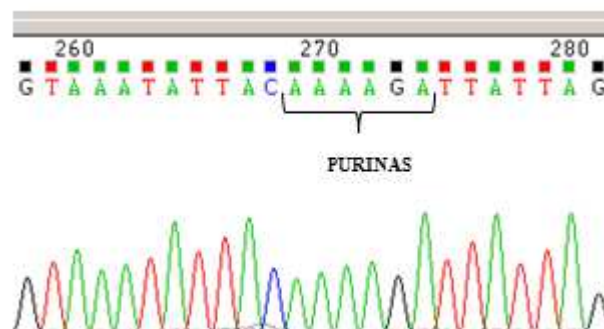


Figura 13. Secuencia Sanger de la muestra PUR.

Tras la construcción de los minigenes, se verificó si funcionan reproduciendo el *splicing* observado *in vivo*. Para ello, con estos minigenes se transfectaban células eucariotas HepG2, se recogían las células, se extraía su RNA y una vez que se obtenía el cDNA correspondiente, se realizaba una PCR con 5µl de cDNA usando los cebadores específicos del vector pSPL3 SD6 y SA2.

En este experimento, en la muestra procedente del minigén WT, se apreciaron dos bandas: una a de 423 bp y otra de 268 bp (que no poseía el exón 37). La banda a 423bp se correspondía con el minigén completo que había logrado incorporar el inserto del exón 37. La eficacia de inserción de dicho exón fue totalmente efectiva, ya que en el gel se visualizaba la banda a 268bp correspondiente al plásmido sin inserto.

En la muestra del minigén 37DEL, que poseía la delección c.6344del (-13)₍₋₈₎, no se apreció banda alguna a 423bp (no contiene el exón 37), pero sí la de 268pb (producto sin el inserto del exón 37).

Por su parte, la muestra procedente del minigén mutante (minigén PUR) mostró un patrón de *splicing* similar al que ha tenido lugar en el minigén de la delección c.6344del (-13)₍₋₈₎, 37DEL.

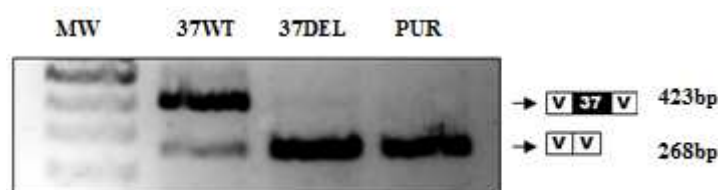


Figura 14. Resultados de la electroforesis de los constructos de minigenes.

Para corroborar la inserción del inserto 37, se secuenciaron las muestras de cDNA obtenidas. Se comprobó que el 37 WT había incorporado el exón 37 y que el 37DEL no tenía dicho exón.

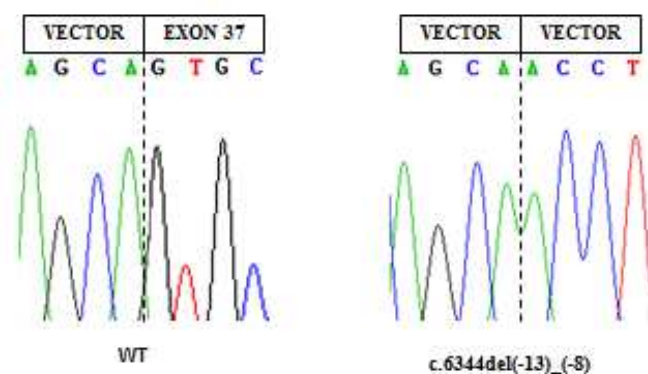


Figura 15. Secuencias Sanger de las muestras de cDNA 37 WT (a la izquierda) y 37DEL (a la derecha).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se muestra la caracterización funcional de una mutación de *splicing* en un paciente con SCdL. Esta mutación intrónica en el gen *NIPBL* se localizan fuera de las secuencias donadoras y aceptoras de *splicing*.

Según la clasificación de Gillis el fenotipo del paciente puede calificarse como severo, con rasgos craneofaciales evidentes incluso en el periodo neonatal, malformaciones en las extremidades, retrasos graves de crecimiento y de la psicomotricidad, además de braquicefalia.

A partir del DNA genómico se comprobó que al paciente diagnosticado poseía una mutación en el intrón 36 del gen *NIPBL*, una delección de 6 nucleótidos (c.6344del (-13)_(-8)) que podría estar implicada en la generación de un *splicing* aberrante de este gen.

Por otro lado, con objeto de confirmar si la mutación daba lugar a un transcrito aberrante, se llevó a cabo un estudio de RNA extraído de sangre periférica y se comprobó que se producía un transcrito con pérdida del exón 37. Esta delección daba lugar a la ruptura del marco de lectura, con lo que la proteína codificada resultaba probablemente truncada y justificaba la aparición del SCdL.

Analizando las secuencias de nucleótidos, se pudo observar que la mutación no estaba en la zona conservada del intrón. De hecho, no afectaba ni al sitio aceptor, ni en al donador del intrón 36. Hay que decir que la mayoría de las mutaciones de *splicing* se hallan en dichas zonas. Estudiando a fondo la secuencia nucleotídica, se postuló que la mutación podría estar situada en el tracto de polipirimidinas del intrón 36 del gen *NIPBL*, debido a que la zona de la mutación era rica en pirimidinas.

Para poder confirmar que c.6344del (-13)_(-8) se trataba de una mutación de *splicing* se llevó a cabo un estudio con minigenes. Este tipo de constructos son muy útiles para demostrar eventos de *splicing* ligados a la pérdida o ganancia de reguladores específicos. Además, una vez demostrado la producción del *splicing in vivo*, este modelo permite replicarlo *in vitro* y estudiarlo mediante cambios introducidos por mutagenesis dirigida [24].

La aplicación del modelo de minigenes al estudio del paciente demostró que la mutación era de *splicing* y que provocaba la pérdida del exón 37. Además, sugería que la mutación afectaba al tracto rico en pirimidinas. Posteriormente, se planteó por mutagénesis dirigida la sustitución por bases púricas de la región rica en pirimidinas pero sin la base mutada. Este constructo produjo en el modelo de minigenes la pérdida del exón 37, reforzando la idea de que la mutación afectaba al tracto rico en pirimidinas.

A pesar de que todavía no ha sido definida una secuencia consenso específica de este tramo, se sabe que se requiere un número mínimo de pirimidinas y que es muy importante también su composición. Aunque las mutaciones más comunes conocidas son las transversiones de pirimidinas a purinas, en nuestro caso la mutación parece que afectaría más a la longitud de la secuencia. [24, 26]

En resumen, el estudio de este paciente con SCdL ha permitido caracterizar por primera vez una mutación en el intrón 36 del gen *NIPBL* que no afecta a la región donadora o aceptora de *splicing* y que probablemente produce una reducción del tracto rico en pirimidinas del intrón. Esta mutación en la que se pierden 6 nucleótidos generaría la pérdida del exón 37, dando lugar a una proteína truncada de *NIPBL* que justificaría la aparición del SCdL.

7. CONCLUSIONES

7.1. Conclusiones

- 1- Se demuestra que la mutación c.6344del (-13)_(-8) provoca un *splicing* aberrante del gen *NIPBL* con pérdida del exón 37 y ruptura del marco de lectura de la proteína codificada.
- 2- La localización de la mutación c.6344del (-13)_(-8) en el modelo de minigenes provoca un *splicing* aberrante análogo al encontrado *in vivo*.
- 3- La eliminación de la secuencia de pirimidinas donde se localiza la mutación, o su sustitución por bases púricas sin la base mutada en el modelo de minigenes, provoca la pérdida del exón, sugiriendo que la mutación afecta al tracto rico en pirimidinas.

7.2. Conclusions

- 1- *The mutation c.6344del (-13)_(-8) causes an aberrant splicing of NIPBL gene with loss of the exon 37 frameshift rupture of the encoded protein.*
- 2- *The location of the mutation c.6344del (-13)_(-8) in the minigenes origins an aberrant splicing minigenes similar to that found in vivo.*
- 3- *The elimination of the sequence of pyrimidines where the mutation is located or its substitution by purines bases without the mutated base in the minigenes model causes loss of exon, suggesting that the mutation affects the pyrimidine-rich tract.*

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Matthew A Deardorff, M., PhD, Dinah M Clark, MS, and Ian D Krantz, MD., *Cornelia de Lange Syndrome*. GeneReviews® [Internet], 2011.
2. OMIM, *NIPPED-B-LIKE; NIPBL*. 2015.
3. Ramos, F.J., et al., *Clinical utility gene card for: Cornelia de Lange syndrome*. Eur J Hum Genet, 2014.
4. Teresa-Rodrigo, M.E., et al., *Functional characterization of NIPBL physiological splice variants and eight splicing mutations in patients with Cornelia de Lange syndrome*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(6): p. 10350-64.
5. Borck, G., et al., *NIPBL mutations and genetic heterogeneity in Cornelia de Lange syndrome*. J Med Genet, 2004. **41**(12): p. e128.
6. Gil MC, R.M., Ramos FJ, *Síndrome de Cornelia de Lange*. Protoc diagn ter pediutr., 2010. **1:1-12**.
7. Wierzbza, J., et al., *Cornelia de Lange syndrome with NIPBL mutation and mosaic Turner syndrome in the same individual*. BMC Med Genet, 2012. **13**: p. 43.
8. Orphanet, P.d.i.d.e.r.y.m.h. *Síndrome de Cornelia de Lange*. 2015 [cited April 2015; Available from: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=ES&Expert=199.
9. Reference, G.H. *Cornelia de Lange syndrome*. 2015 [cited April 2015]; Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/cornelia-de-lange-syndrome>.
10. Krantz, I.D., et al., *Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of Drosophila melanogaster Nipped-B*. Nat Genet, 2004. **36**(6): p. 631-5.
11. Baquero-Montoya, C., et al., *Severe ipsilateral musculoskeletal involvement in a Cornelia de Lange patient with a novel NIPBL mutation*. Eur J Med Genet, 2014. **57**(9): p. 503-9.
12. Kuzniacka, A., et al., *Spectrum of NIPBL gene mutations in Polish patients with Cornelia de Lange syndrome*. J Appl Genet, 2013. **54**(1): p. 27-33.
13. Mei, L., et al., *Two novel NIPBL gene mutations in Chinese patients with Cornelia de Lange syndrome*. Gene, 2015. **555**(2): p. 476-80.
14. Nolen, L.D., et al., *Regional chromatin decompaction in Cornelia de Lange syndrome associated with NIPBL disruption can be uncoupled from cohesin and CTCF*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(20): p. 4180-93.
15. Mannini, L., et al., *Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in Cornelia de Lange syndrome*. Hum Mutat, 2013. **34**(12): p. 1589-96.
16. Russo, S., et al., *Intragenic and large NIPBL rearrangements revealed by MLPA in Cornelia de Lange patients*. Eur J Hum Genet, 2012. **20**(7): p. 734-41.
17. Borck, G., et al., *Father-to-daughter transmission of Cornelia de Lange syndrome caused by a mutation in the 5' untranslated region of the NIPBL Gene*. Hum Mutat, 2006. **27**(8): p. 731-5.
18. Barbero, J.L., *Genetic basis of cohesinopathies*. Appl Clin Genet, 2013. **6**: p. 15-23.
19. Horsfield, J.A., C.G. Print, and M. Monnich, *Diverse developmental disorders from the one ring: distinct molecular pathways underlie the cohesinopathies*. Front Genet, 2012. **3**: p. 171.
20. Losada, A., *Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(6): p. 389-93.
21. Genecards, *Nipped-B Homolog (Drosophila)*. 2015.
22. NCBI, *NIPBL Nipped-B homolog (Drosophila) [Homo sapiens (human)]*. 2015.
23. Ensembl. *Gene: NIPBL ENSG00000164190*. 2015 [cited April 2015]; Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000164190;r=5:36876861-37066515.
24. Cooper, T.A., *Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements*. Methods, 2005. **37**(4): p. 331-40.
25. Desviat, L.R., B. Perez, and M. Ugarte, *Minigenes to confirm exon skipping mutations*. Methods Mol Biol, 2015. **867**: p. 37-47.
26. Roscigno, R.F., M. Weiner, and M.A. Garcia-Blanco, *A mutational analysis of the polypyrimidine tract of introns. Effects of sequence differences in pyrimidine tracts on splicing*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11222-9.a

9. APÉNDICE

A	Adenina
Ap^r	Marcador de resistencia a ampicilina
ATP	Adenosin trifosfato
bp	<i>Base pairs</i> (pares de bases)
C	Citosina
SCdL	Síndrome de Cornelia de Lange
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementario)
CO₂	Dióxido de carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Nucleotide triphosphate</i> (nucleótido trifosfato)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRI</i>	Enzima de restricción <i>EcoRI</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetraacético)
EtBr	Bromuro de etidio
F	<i>Primer Forward</i> (Cebador directo)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (suero fetal bovina)
G	Guanina
g	Gramos
H₂O	Agua
HDAC8	<i>Histone deacetylase 8</i> (Histona deacetilasa 8)
HepG2	<i>Hepatocellular carcinoma cells G2</i> (Células G2 de carcinoma hepatocelular)
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
l	Litros
M	Molaridad
MAU2	<i>MAU2 chromatid cohesion factor homolog</i> (factor de cohesión homólogo MAU2)
MCS	<i>Multiple cloning site</i> (sitio de clonaje múltiple)
mg	Miligramos
MgCl₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
MW	<i>Molecular Weight</i> (Marcador de peso molecular)
μl	Microlitros
mM	Milimolar
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensajero)
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
NIPBL	<i>Nipped-B-like</i>
O/N	<i>Overnight</i> (toda la noche)
ng	Nanogramos

NIPBL	<i>Nipped-B-like</i>
O/N	<i>Overnight</i> (por la noche)
°C	Grados centígrados
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampón fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pmol	Picomoles
R	<i>Primer Reverse</i> (Cebador reverso)
RAD21	RAD21
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)
SA	Secuencia aceptora
SA	<i>Stromatic antigen</i> (antígeno estromático)
SD	Secuencia donadora
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i> (mantenimiento estructural de los cromosomas)
SMC1	<i>Structural Maintenance of Chromosomes 1</i> (mantenimiento estructural de los cromosomas 1)
SMC3	<i>Structural Maintenance of Chromosomes 3</i> (mantenimiento estructural de los cromosomas 3)
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein</i> (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas)
T	Timidina
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<i>Buffer</i> TRIS+ácido bórico+EDTA
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Uridina
U/ml	Unidad de actividad enzimática por mililitro
V	Voltios
WT	<i>Wild-type</i>
XGal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
μg	Microgramos
μl	Microlitros

10.5. Anexo V

Reactivo	Volumen
Inserto adenilado	3 µl
Solution Salt	1 µl
pCR® 2.1-TOPO	1 µl

Tabla 9. Reactivos de la ligación del inserto con el vector pCR® 2.1-TOPO.

10.6. Anexo VI

Reactivo	Volumen
pCR® 2.1-TOPO recombinante	10 µl
Buffer 10X	2 µl
<i>Eco</i> RI 10 U/µl	2 µl
H ₂ O	6 µl

Tabla 10. Reactivos de la mezcla de reacción para la digestión del vector recombinante pCR®2.1-TOPO.

10.7. Anexo VII

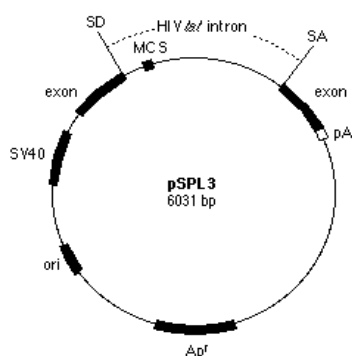


Figura 17. Vector pSLP3.

10.8. Anexo VIII

Reactivo	Volumen
pSPL3	5 µl
Buffer 10X	1 µl
<i>Eco</i> RI 10 U/µl	2 µl
H ₂ O	3 µl

Tabla 11. Reactivos de la mezcla de reacción para la digestión del vector pSPL3.

10.9. Anexo IX

Reactivo	Volumen
pSPL3 digerido	15 µl
TSAP	1 µl
Buffer 10X	2 µl
H ₂ O	2 µl

Tabla 12. Reactivos necesarios para defosforilar el vector pSPL3.

10.10. Anexo X

Reactivo	Volumen
Inserto	9 µl
pSPL3 defosforilado	1 µl
Buffer 2X	10 µl
DNA ligasa	1 µl

Tabla 13. Componentes de la mezcla de ligación del exón 37 del gen *NIPBL* al vector pSPL3.

10.11. Anexo XI

Reactivo	Cantidad
PCR MasterMix 2X	10 µl
<i>Primer</i> NM37F (20pmol/µl)	1 µl
<i>Primer</i> NM37R (20pmol/µl)	1 µl
DNA	1 colonia
H ₂ O	8 µl

Tabla 14. Reactivos de la PCR *boiling*.

10.12. Anexo XII

Etapas	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicio	1	98° C	3'
Desnaturalización	25	96° C	30''
Hibridación		57° C	30''
Extensión		72° C	40''
Extensión final	1	72° C	5'

Tabla 15. Condiciones de reacción de la PCR *boiling*.

10.13. Anexo XIII

Reactivo	Volumen
Buffer 10X	5 µl
pSPL3	1.5 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
dNTPs	1 µl
H ₂ O	39.5 µl
Pfu Turbo® DNA polimerasa	1 µl

Tabla 16. Componentes de la reacción de PCR para la mutagénesis dirigida.

10.14. Anexo XIV

Etapas	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicio	1	98° C	1'
Desnaturalización	12	96° C	30''
Hibridación		58° C	30''
Extensión		68° C	6' 30''
Extensión final	1	68° C	5'

Tabla 17. Condiciones de la reacción de PCR para la mutagénesis dirigida.

10.15. Anexo XV

Componentes	Concentración
DMEM	1 X
FCS inactivado por calor	10 %
Penicilina	100 U/ml
Estreptomicina	100 µg/ml

Tabla 18. Componentes del medio de cultivo para las células HepG2.

10.16. Anexo XVI

Reactivo	Volumen
PCR MasterMix 2X	10 µl
SD6 20 pmol/µl (5'- CTGAGTCACCTGGACAACC-3')	0.5 µl
SA2 20 pmol/ µl (5'- ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC-3')	0.5 µl
cDNA	5 µl
H ₂ O	4 µl

Tabla 19. Componentes de la reacción de PCR para visualizar el patrón de *splicing*.

10.17. Anexo XVII

Etapas	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
Inicio	1	98° C	3'
Desnaturalización	40	96° C	30''
Hibridación		55°C	30''
Extensión		72° C	40''
Extensión final	1	72° C	5'

Tabla 20. Proceso de PCR para visualizar el patrón de *splicing*.