



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

MUTACIONES DE *SPLICING* Y FENOTIPO ASOCIADO EN DOS PACIENTES CON SÍNDROME CORNELIA DE LANGE

Autor

Laura García Mendívil

Directores

Dr. Juan Pié Juste

Dra. Beatriz Puisac Uriol

Unidad de Genética y Genómica funcional
Departamento de Farmacología y Fisiología

Facultad de Medicina

2015

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN/ABSTRACT | 3 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 3. OBJETIVOS | 8 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| 4.1 Historia clínica de los pacientes estudiados..... | 9 |
| 4.2 Gravedad de los pacientes según clasificación de Gillis | 9 |
| 4. 3 Comprobación de la mutación en el DNA genómico..... | 9 |
| 4.3.2 Electroforesis en gel de agarosa | 10 |
| 4.3.3. Secuenciación del exón..... | 11 |
| 4.4 Extracción de RNA | 12 |
| 4.5 Cuantificación del RNA | 13 |
| 4.6 Retotranscripción del RNA..... | 13 |
| 4.7 Identificación de tránscritos aberrantes | 13 |
| 4.8 Cuantificación de la expresión total de <i>NIPBL</i> mediante qPCR..... | 14 |
| 4.8.1. Diseño de primers..... | 15 |
| 4.8.2. Construcción de la curva estándar..... | 15 |
| 4.8.3. qPCR..... | 16 |
| 5. RESULTADOS | 16 |
| 5.1 Historia clínica de los pacientes estudiados..... | 16 |
| 5.2 Gravedad de los fenotipos según clasificación de Gillis | 19 |
| 5.3 Comprobación de la mutación en el DNA genómico | 19 |
| 5.4 Identificación de tránscritos aberrantes | 19 |
| 5.5 qPCR | 20 |
| 6. DISCUSIÓN | 24 |
| 7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS..... | 26 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 27 |
| 9. APÉNDICE | 28 |
| 10. ANEXO 1..... | 29 |

1. RESUMEN

El Síndrome Cornelia de Lange (SCdL) es un trastorno congénito del desarrollo con gran variabilidad fenotípica. Hasta la fecha se han descrito cinco genes asociados con este síndrome, *SMC1A*, *SMC3* y *RAD21* son componentes estructurales del complejo de cohesinas, mientras que *NIPBL* y *HDAC8* son reguladores del mismo. Se estima que aproximadamente el 80% de los pacientes con SCdL presentan mutaciones en *NIPBL*. En este trabajo, se presentan dos nuevas mutaciones de *splicing* en el gen *NIPBL*. Están localizadas en posiciones no canónicas y son las mutaciones intrónicas más profundas descritas hasta el momento. El paciente 1 posee la mutación c.5329-15A>G en el intrón 27 que provoca la pérdida del exón 28 y que mantiene la pauta de lectura. La adenina que resulta mutada podría ser el nucleótido clave en la secuencia del punto de ramificación. El paciente 2 presenta una delección de seis nucleótidos en el intrón 36, c.6344del(-13)_(-8), que da lugar a pérdida del exón 37 y que rompe la pauta de lectura. Esta mutación podría afectar al tracto de polipirimidinas. En el paciente 1 los resultados de la qPCR han mostrado una expresión de mRNA similar al observado en el control. Sin embargo, en el paciente 2 hay casi un 30% de reducción de la expresión de *NIPBL* debido probablemente a la activación de mecanismos de degradación de tránscritos aberrantes (NMD, nonsense mediated decay). Estos resultados apoyarían la idea de que una disminución en los niveles de mRNA por un tránscribo que rompe la pauta de lectura o codifica una proteína truncada, da lugar a un fenotipo más severo que cuando hay mutaciones/transcritos que mantienen la pauta de lectura y que no afectan a los niveles de mRNA.

1. ABSTRACT

Cornelia de Lange syndrome (CdLS) is a congenital developmental disorder with a high grade of phenotypic variability. To date, mutations in five genes have been associated with CdLS: *SMC1A*, *SMC3* and *RAD21* are structural components of cohesin complex, whereas *NIPBL* and *HDAC8* regulate the complex. Currently, it is estimated that about 80% of patients with CdLS have a mutation in the *NIPBL* gene. Here, it is reported two new splicing mutations in the *NIPBL* gene. They are located in noncanonical splicing positions and are the deepest mutations reported to date. Patient 1 carries the mutation c.5329-15A>G in the intron 27 with exon 28 skipping and an in frame aberrant transcript. The mutated adenine could be the key nucleotide of the branch point sequence. Patient 2 carries a six nucleotide deletion on intron 36, c.6344del(-13)_(-8), with an out of frame aberrant transcript. This mutation could affect the polypyrimidine tract. In patient 1, qPCR has shown a similar *NIPBL* mRNA level compared to the control. Whereas in patient 2, qPCR has shown an about 30% reduction of *NIPBL* mRNA level, probably due to the activation of mechanisms to degrade aberrant transcripts (NMD, nonsense mediated decay). These results would support the idea that a reduction in mRNA level, due to an out of frame aberrant transcript, results in a more severe phenotype. And mutations that generate in frame aberrant transcripts result in less severe phenotypes.

2. INTRODUCCIÓN

El Síndrome Cornelia de Lange (SCdL, también llamado el Síndrome Brachmann-de Lange; MIM 122470, 300590, 610759, 614701, 300882) fue descrito inicialmente por Brachmann y posteriormente caracterizado por de Lange, de quien toma su nombre. Se trata de un trastorno congénito de afectación multisistémica caracterizado por dimorfismo facial, alteración del crecimiento, hirsutismo, malformaciones que afectan fundamentalmente a las extremidades superiores y retraso mental, entre otros síntomas (figura 1). La prevalencia de la enfermedad se estima en 0,5-10 de cada 100.000 personas, pero la exacta es desconocida debido a que los casos leves a menudo no son bien diagnosticados.¹



Figura 1. Paciente con el fenotipo facial típico de SCdL²

Cuando un paciente llega a la consulta médica existen diversos criterios que permiten clasificar la gravedad del síndrome. El primer sistema fue desarrollado por la doctora Lynette Gillis y clasifica a los pacientes en función de las malformaciones en las extremidades, el desarrollo físico y las capacidades cognitivas. Tras la evaluación siguiendo estos criterios distinguimos tres grupos: clase I (leve), clase II (moderado) y clase III (severo).³

Posteriormente la doctora Antonie Kline, desarrolló un segundo método más detallado que analiza una gran cantidad de parámetros (peso al nacer, malformaciones, adquisición de habilidades...) que llevan asociados una puntuación en función de la gravedad (en el caso de las malformaciones), o tiempo transcurrido hasta la adquisición de la habilidad (primera palabra, capacidad de andar...). Una vez que se ha realizado este estudio se obtiene una puntuación final, para la que también existen unos baremos, que permiten clasificar al paciente en grave (22 o más puntos), intermedio (de 15 a 22 puntos) o leve (menos de 15 puntos).^{4,5}

Hasta la fecha se han descrito cinco genes diferentes asociados con este síndrome, tres de ellos siguen una herencia autosómica dominante (*NIPBL*, *SMC3* y *RAD21*) y los otros dos son de herencia dominante ligada al cromosoma X (*SMC1A* y *HDAC8*). Por lo que se refiere a su función en el organismo, *SMC1A* (Xp11.2, MIM: 300040), *SMC3* (10q25, MIM: 606062) y *RAD21* (8q24, MIM: 614701) son componentes estructurales del complejo de cohesinas, mientras que *NIPBL* y *HDAC8* (Xq13.1, MIM: 300882) son reguladores del mismo.¹

La severidad de los síntomas está asociada con el gen que resulta alterado, de tal forma que, en orden creciente de gravedad, los genes quedarían ordenados de la siguiente manera: *SMC3*, *RAD21*, *SMC1A*, *HDAC8* y *NIPBL*. Sin embargo, se han visto diferencias en el fenotipo de pacientes no relacionados que presentan la misma mutación, lo cual indicaría la existencia de otros factores genéticos o ambientales que podrían intervenir en el fenotipo. Además esta idea estaría apoyada por las diferencias fenotípicas observadas en los casos familiares.^{4,6}

El complejo de cohesinas (figura 2) está ampliamente expresado en todas las células somáticas y es un elemento esencial en numerosos procesos celulares que incluyen el mantenimiento de la estructura de los cromosomas y su segregación, la regulación transcripcional, la reparación y replicación del DNA, además de intervenir en la unión y segregación de las cromátidas hermanas. Sin embargo, se cree que el SCdL es causado sobre todo por una desregulación transcripcional.⁷

La proteína codificada por *NIPBL* interviene en el proceso de cargar el anillo sobre los cromosomas en la metafase, mientras que *HDAC8* es responsable de la desacetilación de *SMC3* para facilitar la renovación del complejo de cohesinas después de su disociación de las cromatinas durante la profase o anafase. Todas las mutaciones identificadas en el SCdL afectan a proteínas de las cohesinas, de tal forma que junto con el Síndrome Roberts y el Síndrome de Varsovia-, el SCdL pertenece al grupo de enfermedades denominadas cohesinopatías.⁴

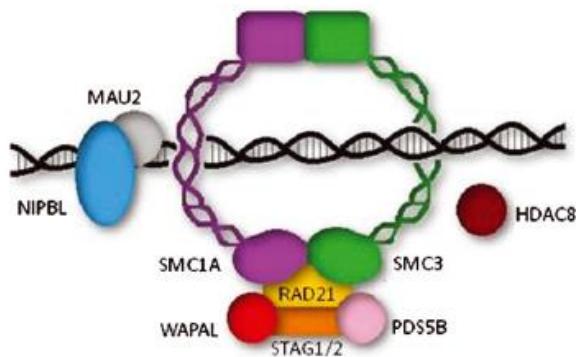


Figura 2. El complejo de cohesinas y sus proteínas asociadas. El complejo está constituido por cuatro subunidades principales, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *STAG1/2*. Hay una serie de proteínas que regulan el funcionamiento de este complejo entre las que destacan *NIPBL* (*Nipped-B-like-protein*) y *HDAC8*.⁴

Se estima que aproximadamente el 80% de los pacientes con SCdL presentan mutaciones en *NIPBL*, incluyendo al 23% de los casos de mosaicismo somático. *NIPBL* está localizado en el cromosoma 5 (5p13.2) y consta de 47 exones. Se han encontrado más de 300 mutaciones a lo largo del gen pero el exón 10 parece ser un punto caliente. Hasta el momento no se han hallado mutaciones en los exones 13 y 16. Este hecho podría sugerir que mutaciones en estas regiones no son toleradas y que los dominios proteicos que estos exones codifican jugarían un papel importante en la funcionalidad de la proteína, aunque esto todavía no ha sido demostrado. Debido a que estos dos exones son los más pequeños del gen *NIPBL*, también es probable que su tasa de mutación sea muy baja.^{8,9}

También existe variedad entre los tipos de mutaciones detectadas hasta el momento: cambio del marco de lectura/*frameshift* (32%), cambio de sentido/*missense*, (26%), sin sentido/*nonsense*, (18%), de *splicing* (17%) e inserciones o delecciones que no alteran el marco

de lectura/*in-frame deletion or insertion* (7%). Porcentajes mucho menores corresponden con *HDAC8* (aproximadamente el 4% de los casos) y el 4-6% para el gen *SMC1A*. De este gen se han descrito 34 mutaciones (82% de tipo cambio de sentido y 18% de delecciones que no modifican el marco de lectura). Sólo seis pacientes han sido hallados con mutaciones en *SMC3* y ocho pacientes en el caso de *RAD21*. Aunque la mayoría de los casos hallados hasta el momento son mutaciones *de novo* también se han descrito algunos casos familiares en *NIPBL*, *SMC1A*, *RAD21* y *HDAC8*.⁸

Debido a la gran cantidad de mutaciones que han sido reportadas para el gen *NIPBL* también existe una gran diferencia entre los fenotipos que presentan estos pacientes. Pese a ello sí que se han encontrado síntomas comunes para todas las mutaciones de este gen. Estos síntomas son: retraso en el crecimiento pre y postnatal, alteraciones en órganos principales (corazón, intestino y aparato urogenital) y afectaciones en las extremidades que van desde clinodactilia hasta la ausencia de antebrazos.⁴

Asimismo se han realizado estudios que han tratado de establecer correlaciones entre el fenotipo de un paciente y el tipo de mutación en *NIPBL* que presenta. Se ha podido establecer que la gravedad de los síntomas sí que está relacionado con el tipo de mutación de tal forma que en orden creciente de gravedad los tipos de mutaciones quedarían ordenados de la siguiente manera: *missense*, *splice site* y *frameshift/nonsense*.⁴

El fenotipo más leve está asociado con las mutaciones de cambio de sentido (*missense*) y su sintomatología se corresponde con retrasos menores en el crecimiento y en las funciones cognitivas, reflujo gastroesofágico y ausencia de alteraciones en las extremidades. Un fenotipo intermedio es el presente en pacientes con mutaciones de *splicing*. Estos pacientes presentan reflujo gastroesofágico, retrasos, desde nivel moderado hasta severo, en el crecimiento y en las capacidades cognitivas, malformaciones en las extremidades e incluso alteraciones en los órganos principales. Los casos más severos están asociados con mutaciones que alteran el marco de lectura y con mutaciones sin sentido (*frameshift* y *nonsense*). Estos pacientes presentan reflujo gastroesofágico, retrasos severos en sus funciones cognitivas y en su crecimiento y alteraciones graves en las extremidades y en órganos principales.⁴

En cuanto al cDNA del gen *NIPBL*, mediante análisis de *Northem-blot*, se pudo confirmar el tamaño del tránscrito de 9,8Kb. Los resultados mostraron además que *NIPBL* está muy expresado en el riñón, tanto en feto como en adulto; en el hígado del feto; y en el adulto además en: corazón, músculo esquelético y timo. Por otra parte, y en contraste, está muy poco expresado, y en algunos casos prácticamente indetectable, en cerebro y pulmón tanto en feto como en adulto; y también apenas detectable en hígado, colon, intestino delgado y leucocitos de adulto.¹⁰

La maduración del mRNA o *splicing* es el proceso por el cual los intrones son eliminados de manera precisa y los exones se unen generando las secuencias codificantes. Existe una maquinaria específica para llevar a cabo el *splicing*, el complejo denominado spliceosoma. Este complejo dinámico está constituido por dos tipos de proteínas, las snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) y los factores de empalme. Otros elementos necesarios para que el proceso de *splicing* se lleve a cabo son un conjunto de señales de secuencia nucleotídica que indican por dónde ha de cortarse el intrón. Entre estas secuencias estarían las secuencias aceptora y donadora del *splicing*, la secuencia rica en pirimidinas y la zona de ramificación.¹¹

El *splicing* alternativo del mRNA permite obtener diferentes isoformas de una proteína a partir de un único gen, permitiendo a los organismos una mayor capacidad de adaptación al

medio. Se ha visto que este proceso puede verse afectado por mutaciones dando lugar a un incorrecto procesamiento del mRNA y obteniéndose tránscritos aberrantes con pérdida de un exón o con inserción de secuencia intrónica.¹¹

En lo que se refiere a las variantes de *splicing* del gen *NIPBL*, se describieron en principio dos posibles isoformas: la isoforma principal (A) constituida por 2804 aminoácidos (exones 2-47) y la otra isoforma (B), 2697 aminoácidos, que no contiene al exón 47 y posee un final extendido del exón 46. Ambas son idénticas hasta el aminoácido 2683 pero sus extremos C-terminales no coinciden. Esta proteína contiene dominios específicos (figura 3) incluyendo al dominio de interacción N-terminal MAU, un dominio rico en glutamina, un dominio predicho de señalización nuclear (NLS), repetición de un undecapéptido y un dominio conservado con cinco repeticiones HEAT que son importantes para la interacción con otras proteínas.^{6,9}

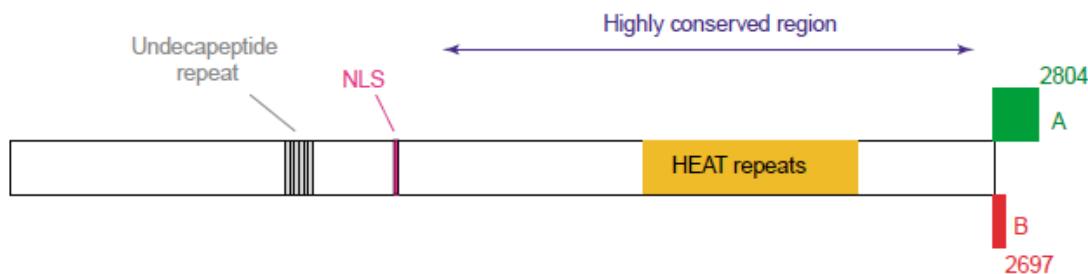


Figura 3. Localización de los principales dominios presentes en *NIPBL*.⁶

Hasta hacía poco sólo se habían aislado estas dos isoformas en tejidos humanos embrionarios pero un estudio reciente ha podido identificar la presencia de cuatro nuevas variante de *splicing* en leucocitos humanos adultos. Una de ellas ha sido denominada isoforma B' ya que es un tránscrito similar a la isoforma B excluyendo al exón 45 lo que da lugar a la rotura en el marco de lectura. Mediante la amplificación sistemática de fragmentos que se solapan se estudió las otras tres nuevas variantes, que presentaban una delección del exón 10 ($\Delta E10$), del exón 12 ($\Delta E12$), y de los exones 33 y 34 ($\Delta E33-34$) respectivamente.¹²

De entre los diferentes tipos de mutaciones que pueden afectar a *NIPBP* las de *splicing* pueden tener consecuencias variables. Lo más frecuente es que se pierda el siguiente exón durante el proceso de *splicing*. Esto se ha visto en mutaciones en nucleótidos canónicos (c.358+1G>A, c.869-2A>G, y c.5328+1G>A). También se han encontrado mutaciones que afectan al tracto de polipirimidinas (c.3856-5delT y c.5329-6T>G).¹²

En otras ocasiones las mutaciones de *splicing* pueden provocar la pérdida parcial del exón por activación de secuencias crípticas. Un ejemplo sería la mutación c.7860+5G>A, que interrumpe la secuencia de *splicing* donadora. En este caso se esperaría la perdida completa del exón debido a que el exón 45 posee una secuencia aceptora débil y su pérdida da lugar al tránscrito B'. Sin embargo, se ha encontrado un tránscrito aberrante con una delección de 33 nucleótidos en el extremo 3' del exón 45.¹²

Aunque se ha descrito que pacientes con mutaciones de *splicing* en *NIPBL* muestran una amplia variabilidad clínica los fenotipos más severos parecen estar asociados con tránscritos aberrantes que rompen la pauta de lectura.¹²

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es caracterizar dos nuevas mutaciones localizadas en las regiones intrónicas flanqueantes del gen *NIPBL*, que podrían estar alterando el *splicing* y generando tránscritos aberrantes. Además, se pretende estudiar las relaciones genotipo-fenotipo de este tipo de mutaciones.

Este objetivo general se subdivide en varios objetivos específicos:

1. Comprobar mediante el estudio de DNA genómico la mutación del gen *NIPBL* de cada paciente.
2. Identificar los tránscritos aberrantes producidos como consecuencia de las mutaciones de *splicing*.
3. Cuantificar la expresión total de mensajeros del gen *NIPBL* y su variación según el tipo de mutación.
4. Establecer relaciones genotipo-fenotipo teniendo en cuenta las características de la mutación y la expresión total de mensajeros.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Historia clínica de los pacientes estudiados

El grupo de investigación dispone de una tabla estandarizada que recoge todas las características fenotípicas que deben ser estudiadas en un paciente que presenta el SCdL. Esta tabla se encuentra en el ANEXO I.

4.2 Gravedad de los pacientes según clasificación de Gillis

Los criterios utilizados en la clasificación clínica de los dos pacientes estudiados son los desarrollados por la doctora Lynette Gillis que establecen una clasificación atendiendo a tres parámetros: malformaciones en las extremidades, desarrollo físico del paciente que se valora teniendo en cuenta los percentiles de peso, altura y perímetro craneal para individuos de la misma edad y sexo; y finalmente, se hace un estudio de las capacidades cognitivas. Teniendo en cuenta a estos tres parámetros los pacientes son clasificados en tres grupos: clase I (leve), clase II (moderado) y clase III (severo).³ (tabla 1).

| | Clase I (leve) | Clase II (Moderado) | Clase III (Severo) |
|--|--|---|---|
| Anomalías en extremidades | No presenta | Defectos parciales, oligodactilia (> de 2 dedos en cada mano) | Afectación severa (< de 2 dedos en cada mano) |
| Desarrollo y habilidades cognitivas | < de 2 años de retraso en la capacidad motora, posee habilidades comunicativas | > de 2 años de retraso en la capacidad motora, limitado desarrollo del lenguaje | Retraso motor profundo, incapaz de hablar |
| Crecimiento | > Percentil 75 | Percentil 25-75 | < Percentil 25 |

Tabla 1. Método de clasificación de pacientes con SCdL de la doctora L.Gillis.

4.3 Comprobación de la mutación en el DNA genómico

Una vez recibidas las muestras de DNA de ambos pacientes se comprueba la mutación asociada a cada uno de los pacientes. Para ello se amplifica el exón correspondiente con la mutación mediante una PCR, se comprueba que se ha producido amplificación con una electroforesis en gel de agarosa y se secuencia el producto de la PCR del correspondiente exón.

4.3.1 Amplificación del exón correspondiente

El proceso de PCR consiste en una serie de 20 a 35 ciclos. Cada ciclo está precedido por un choque térmico a alta temperatura, y seguido por otro paso similar al final del proceso para la extensión de producto final. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de diversos parámetros (enzima usado, concentración de iones divalentes y de los dNTPs, así como la longitud del DNA que se desea amplificar). Existen tres etapas fundamentales dentro de cada ciclo: desnaturación, unión del *primer* y elongación de la cadena. En la desnaturación se produce la separación de las dos hebras del DNA.

La temperatura a la cual se realiza esta etapa depende, de entre otros factores, de la longitud de la cadena. Entonces se producirá la hibridación del *primer* a la hebra del DNA a la que es complementario. Para este paso la temperatura desciende hasta aproximadamente 40-60°C (dependiendo de los *primers* usados en cada caso). Finalmente tiene lugar la elongación de la cadena por parte de la DNA polimerasa mediante la unión de los dNTPs y teniendo como molde a la hebra del DNA original.

El diseño de los *primers* es una etapa fundamental para que la PCR se produzca correctamente. Tienen que ser secuencias cortas, normalmente de dieciocho a veintidós nucleótidos; no deben tener secuencias repetidas o complementarias y su contenido en C+G deber ser aproximadamente del 40%.

La PCR que se usa es la basada en Master Mix. En lugar de tener que adicionar de manera independiente la DNA polimerasa, los dNTPs, el magnesio y el tampón, se añade directamente la Master Mix que ya lleva incluida todos los componentes mencionados. La mezcla que se usa para amplificar cada uno de los exones es la que se muestra en la tabla 2. El programa de PCR usado para todos los exones es el mismo. Consta de 35 ciclos y es el que se muestra en la tabla 3. Se usan controles negativos para garantizar que no se hayan contaminado los reactivos (H₂O, Master Mix...) con DNA de otros pacientes. Estos controles llevan los mismos componentes que una muestra de amplificación a excepción del DNA

| Reactivos | Volumen |
|--------------|---------|
| Master mix | 10μl |
| Agua | 8.5μl |
| Primer F | 0.5μl |
| Primer R | 0.5μl |
| DNA paciente | 0.5μl |

Tabla 2. Mezcla de PCR.

| | Tiempo | Temperatura |
|-------------------|-------------|---------------------------|
| Inicio | 3 minutos | 98°C |
| Desnaturalización | 30 segundos | 96°C |
| Hibridación | 30 segundos | T ^a específica |
| Extensión | 30 segundos | 72°C |
| Extensión final | 5 minutos | 72°C |

Tabla 3. Programa de PCR.

35 ciclos

4.3.2 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar ácidos nucleicos que utiliza unos geles que son polímeros de poliacrilamida o agarosa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Las moléculas de DNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a cinco poseen carga negativa. En los fragmentos de DNA de doble cadena la velocidad de migración es inversamente proporcional a su tamaño.

En el caso de los geles de agarosa, se añade bromuro de etidio, compuesto que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y así se pueden identificar las bandas correspondientes con cada una de las muestras. En cada gel debe cargarse un marcador de pesos moleculares conocidos ya que permitirá calcular el tamaño de las muestras de DNA amplificadas y comprobar si concuerda con el tamaño del exón correspondiente.

El protocolo usado en la electroforesis en gel de agarosa es el siguiente:

1. Pesar la cantidad necesaria de agarosa. Para geles al 1%, se pesan 0.5 g de agarosa y se mezclan con 50mL de tampon TBE 1X.
2. Calentar hasta la completa disolución de la agarosa.
3. Esperar hasta que se enfríe y añadir el bromuro de etidio hasta una concentración final de 0.5 μ g/ml.
4. Verter la disolución sobre la cama que ha sido previamente preparada y que contiene el peine para la formación de los pocillos.
5. Esperar a que se solidifique el gel.
6. Colocar el gel dentro de una cubeta de electroforesis (BioRad) llena de TBE.
7. Mezclar la muestra (problema o marcador de pesos) con azul de bromo fenol (1:1). Este compuesto proporciona densidad y color a la muestra. De esta manera, la muestra se deposita en el fondo de cada pocillo.
8. Correr 30 minutos a 90V y 400mA.

Una vez transcurrido el tiempo, se revelan los geles para lo cual se ilumina con luz UV de longitud de onda 320nm. A la hora de analizar los resultados de la amplificación de cada una de las muestras existen varias situaciones posibles:

- Aparece una única banda cuyo peso se corresponde con el peso del exón de interés. La PCR ha amplificado correctamente el exón.
- Se observa una doble banda. Esto implica que la temperatura no es suficientemente restrictiva y que es necesario repetir la PCR aumentando la temperatura.
- En lugar de una doble banda puede observarse un *smear* (presencia de varias bandas indistinguibles unas de otras que forman un barrido) que también implica que la temperatura es poco restrictiva y que hay que aumentarla.

4.3.3. Secuenciación del exón

Una vez que un exón ha sido amplificado por PCR y se ha comprobado por electroforesis que sólo se ha amplificado la región deseada se puede proceder a la secuenciación de la misma. El servicio de secuenciación no se realiza en este laboratorio sino que las muestras son enviadas a un servicio externo. Antes de mandar a secuenciar las muestras es necesario proceder a la purificación de las mismas. Para ello se somete a las muestras un programa de PCR con *Exosap* (ver tabla 4), un enzima encargado de degradar DNA monohebra. Este enzima va a eliminar los restos de *primer* que puedan quedar y el DNA del paciente que no se haya amplificado correctamente. Las cantidades de las muestras enviadas a secuenciar aparecen en la tabla 5.

| Tiempo | Temperatura |
|-------------------|-------------|
| 45 minutos | 37°C |
| 15 minutos | 80°C |
| ∞ | 4°C |

Tabla 4. Programa de purificación.

| Reactivos | Volumen |
|---------------------------|-------------|
| Agua | 15 μ l |
| Muestra purificada | 0.5 μ l |
| Primer F o R | 0.5 μ l |

Tabla 5. Mezcla que se envía a purificar.

4.4 Extracción de RNA

Una vez que se comprobó en el DNA genómico de cada paciente la mutación asociada, se procedió a verificar si efectivamente estas mutaciones alteraban el proceso de *splicing* y daban lugar a tránscritos aberrantes. La extracción de RNA se hizo con el *PAXgene Blood RNA KIT* que se describe a continuación.

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 350 μ l de tampón (BR1) y vortear hasta que el pellet esté disuelto.
5. Pipetear la muestra a un eppendorf de 1.5ml y añadir 300 μ l de tampón (BR2) y 40 μ l 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 350 μ l de etanol 100%, mezclar por vorteo y centrifugar 1-2 segundos a 4000rpm.
9. Pipetear 700 μ l 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 350 μ l 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 10 μ l de *DNase I* en solución y después 70 μ l de RDD (tampón de digestión).
13. Pipetear los 80 μ l de esta mezcla a la columna y dejarlo 15 minutos a temperatura ambiente.
14. Pipetear 350 μ l de tampón de lavado 1 (BR3) en la columna. Centrifugar 1 minuto a 8000-20000xg. Colocar la columna en un tubo nuevo.
15. Pipetear 500 μ l de tampón de lavado 2 (BR4). Centrifugar 1 minuto a 8000-20000xg. Colocar la columna en un tubo nuevo.
16. Añadir otros 500 μ l 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 25 μ l de tampón de elución (BR5) en la membrana. Centrifugar 1 minuto a 13000rpm.
19. Sobre la misma columna se vuelve a añadir 25 μ l de tampón de elución (BR5).
20. Incubar 5 minutos a 65°C e inmediatamente poner en hielo. Guardar el RNA -80°C.

4.5 Cuantificación del RNA

El RNA puede cuantificarse directamente en soluciones acuosas midiendo la absorbancia a 260nm. Si la muestra es pura, es decir, si no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas (que absorben a 280nm), la medida espectrofotométrica de la radiación ultravioleta absorbida por las bases es exacta. El cociente de los valores obtenidos a 260nm y a 280nm (A_{260}/A_{280}) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos y es de aproximadamente 2. Con un paso de luz de 10mm y una longitud de onda de 260nm, una absorbancia igual a 1 corresponde aproximadamente a 40 µg/ml de RNA.

Para medir la cantidad de RNA, que se ha aislado de la sangre del paciente, basándose en métodos de espectrofotometría, se utiliza el Nanodrop que permite la medida en un volumen mínimo de muestra. Se utiliza como blanco el tampón TE. Además, para minimizar errores se realizan triplicados de las muestras de los pacientes.

4.6 Retrottranscripción del RNA

La retrotranscripción (RT-PCR) es una técnica que permite sintetizar el DNA complementario a moléculas de RNA usando para ello la enzima transcriptasa reversa. Para obtener el cDNA a partir del RNA se usó el *First Strand cDNA synthesis Kit* (Qiagen). Una vez cuantificado el RNA y ajustado a una concentración de 500ng/20µl se procede con la RT-PCR (los volúmenes de los diferentes reactivos de las mezclas 1 y 2 están ajustados a esta concentración de RNA).

1. Preparar la mezcla 1 (tabla 6) e incubar 5 minutos a 65°C.
2. Añadir la mezcla 2 (tabla 7) e incubar: 25°C 5 minutos, 37°C 60 minutos y 70°C 5 minutos.

| Reactivos | Volumen |
|------------------|---------|
| RNA | 1.6µl |
| Random hexámeros | 1µl |
| Agua | 8.4µl |

Tablas 6. Mezcla 1 de la RT-PCR.

| Reactivos | Volumen |
|-----------------------|---------|
| Tampón | 4µl |
| Inhibidor de RNAsa | 1µl |
| dNTPs 10mM | 2µl |
| Transcriptasa reversa | 2µl |

Tablas 7. Mezcla 2 de la RT-PCR.

El cDNA obtenido va a ser posteriormente amplificado por PCR utilizando *primers* específicos para *NIPBL*.

4.7 Identificación de tránscritos aberrantes

Debido a la localización de las mutaciones el proceso de *splicing* podría verse alterado, pero era necesario comprobar la existencia de tránscritos aberrantes. Se hizo una PCR a partir del cDNA y después se analizó los productos de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa. La mutación del paciente 1 está localizada en el intrón 27. La pareja de *primers* usada amplifica la región comprendida entre los exones 27 y 30 (tabla 8).

| Primer | Secuencia |
|--------|----------------------|
| sF27 | CCGTTTGCCTCAGAGCTTTG |
| sR30 | CTATGACCATAGTCACAG |

Tabla 8. *Primers* usados para amplificar los tránscritos (exones 27-30) en el paciente 1.

En el caso del paciente 2 la mutación se halla en el intrón 36. Se amplifica la región flanqueada por los exones 35 y 38 (tabla 9).

| Primer | Secuencia |
|--------|-----------------------|
| sF35 | CATCATCAAATATGGCATGAC |
| sR36 | CCTCGACAAACATTATTCAC |

Tabla 9. Primers usados para amplificar los tránscritos (exones 35-38) en el paciente 2.

4.8 Cuantificación de la expresión total de *NIPBL* mediante qPCR

Para poder establecer una relación entre los fenotipos observados en los pacientes y la mutación que presentan se ha usado la técnica de qPCR para cuantificar la expresión total del gen *NIPBL*. Esta versión de la PCR surgió para resolver el problema de la cuantificación de la técnica de la PCR tradicional. El hecho de que los datos sean tomados en la fase exponencial del proceso asegura que ningún componente pueda estar limitando el proceso de amplificación.

Los parámetros más importantes de la qPCR (mostrados en la figura 4) son: la línea base (*baseline*) que se corresponde con la fluorescencia basal detectada en los primeros ciclos de la reacción y que se considera como blanco. El umbral (*threshold*) que se define como la fluorescencia estadísticamente significativa y que marca el inicio de la amplificación. Y, finalmente, el parámetro *C_t* se define experimentalmente como el número de ciclos en el que se alcanza el umbral de fluorescencia o *threshold*. Cuanto mayor es la cantidad inicial de DNA, antes se detecta el producto acumulado en el proceso de la PCR, y más bajo es el valor *C_t*.

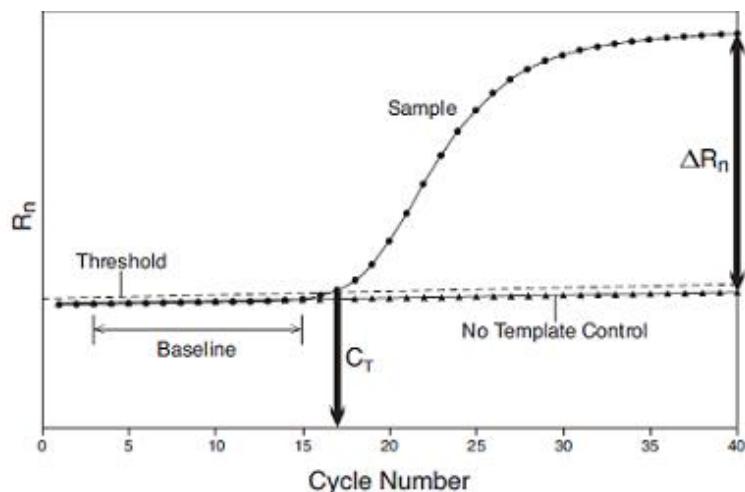


Figura 4. Gráfica que representa la fluorescencia frente al número de ciclos en una qPCR.

El fluorocromo utilizado en este caso es *SYBR-Green* que se une al surco menor del DNA bicatenario, pero no al DNA monocatenario. Al iniciarse la PCR, el aumento de la cantidad de DNA recién sintetizado produce un incremento de la señal fluorescente. Tiene la desventaja de que se une a cualquier producto de doble hebra de DNA ya que se trata de una unión inespecífica.

La cuantificación se basa en obtener una curva estándar absoluta para cada amplicón individual. Para construir esta curva se necesita un estándar adecuado del que se conozca el número exacto de copias.

Una vez obtenido el Ct del gen de la muestra desconocida se procede a la interpolación del valor Ct en la recta patrón. De esta forma se puede calcular el número de copias inicial de una muestra desconocida. Para evitar problemas en la cuantificación se debe normalizar mediante un control interno. Si no se aplicara podría haber variaciones debido a diferencias en la extracción del RNA o por diferencias en la retrotranscripción. Este control interno debe expresarse por igual en todos los tejidos y en todos los estados de desarrollo y no verse afectado por el proceso experimental. En este caso se va a usar el gen *housekeeping GADPH*.

4.8.1. Diseño de primers

La longitud óptima del amplicón para su detección por qPCR está entre 100-150 pares de bases. Esto se debe a que los fragmentos más cortos son amplificados de manera más eficiente, y son más tolerantes a variaciones en las condiciones de la reacción. Las características esenciales para el diseño de *primers* son las indicadas a continuación:

1. Los *primers* deben tener una temperatura de disociación (Tm) de 58-60°C y la Tm de ambos no puede diferir más de 1-2°C.
2. El porcentaje de G+C debe estar entre el 40 y el 60%. Debido a que un exceso de bases púricas incrementaría la temperatura de desnaturación y las interacciones inespecíficas.
3. Se debe evitar que haya varios nucleótidos iguales seguidos, sobre todo guaninas.
4. Las últimas bases del extremo 3' del *primer* no pueden contener más de dos guaninas o citosinas, para evitar la formación de productos inespecíficos; por ejemplo dímeros de *primers*.

| Primer | Secuencia |
|-----------------|----------------------|
| NIPBL4-F | TGGCATGACTGTAGTGCAAC |
| NIPBL4-R | ATTGAAACAAGCCCACACAA |

Tabla 10. *Primers* usados en la qPCR para cuantificar la expresión total de *NIPBL*.

La pareja de *primers* usada (*NIPBL4-F* y *NIPBL4-R*) (tabla 10) amplifica la región comprendida por los exones 35 y 36. Se usa esta pareja porque no se han descrito mutaciones de *splicing* en esta región y van a permitir cuantificar la expresión total de *NIPBL*.

4.8.2. Construcción de la curva estándar

La muestra de partida para la elaboración de la curva estándar usada en la cuantificación de total de *NIPBL* ha sido una muestra de concentración conocida del plásmido pCR2.1TOPO con un inserto de 2526 pares de bases, c.4579-7104, que se corresponde con los exones 22-42 del gen *NIPBL*. En el caso de la cuantificación de *GADPH* se ha clonado el gen completo en el plásmido pCR2.1TOPO.

Como se va a realizar una cuantificación total del *NIPBL* se elige una pareja de *primers* que amplifique el cDNA en una zona que no este sujeta a *splicing* fisiológico o aberrante. Al representar los Cts obtenidos frente al logaritmo del número de copias se obtiene una línea recta. La relación del Ct con el número de copias es inversamente proporcional.

Después se toma una muestra de cDNA del paciente y se realiza la cuantificación de la expresión total tanto de *NIPBL* como de *GADPH* (utilizando las mismas parejas de *primers* usadas para las rectas patrón). Si el valor de expresión de *GADPH* no está dentro de los estándares de expresión (su expresión no varía debido a su condición de *housekeeping*), esto indicaría que los valores de expresión del gen *NIPBL* no serían válidos y habría que repetir el proceso. Una vez obtenida la concentración del gen *NIPBL* se normaliza este valor mediante el cociente del Ct de *NIPBL* y el Ct de *GADPH*. Esta normalización se aplica en los dos pacientes y en el control para poder así estudiar posteriormente como varía la expresión.

4.8.3. qPCR

La qPCR se ha realizado usando el *SYBR Green Mastermix KIT* (Applied Biosystems), que incluye concentraciones optimizadas de dNTPs, tampón con el marcador *SYBER Green*, MgCl₂ y *AmpliTaqGold* DNA polimerasa. La mezcla usada para 25μl y el programa de PCR usado se muestran en las tablas 11 y 12 respectivamente.

El programa de PCR utilizado incluye una etapa final de disociación compuesta por tres pasos a distintas temperaturas y tiempos. Esta etapa permite comprobar la identidad del fragmento amplificado mediante el parámetro temperatura de *melting* o de disociación (Tm), que es específico para cada uno de los productos. Se realizaron triplicados de las muestras de ambos pacientes con el fin de minimizar errores.

| Reactivos | Volumen |
|------------------------------|-------------|
| <i>SYBR Green Master mix</i> | 12.5μl |
| <i>Primer R</i> | 100 nM |
| <i>Primer F</i> | 100 nM |
| cDNA paciente | 25 ng (1μl) |
| H₂O miliQ | c.s.p 25μl |

Tabla 11. Mezcla de PCR.

| Tiempo | Temperatura | |
|-------------|-------------|--|
| 10 minutos | 95°C | |
| 15 segundos | 95°C | |
| 1 minuto | 60°C | |
| 15 segundos | 95°C | |
| 20 segundos | 60°C | |
| 15 segundos | 95°C | |

} 40 ciclos

Tabla 12. Programa de la qPCR.

5. RESULTADOS

5.1 Historia clínica de los pacientes estudiados

Los dos pacientes fueron evaluados por médicos especialistas y las características clínicas más relevantes se indican en las tablas 13 y 14. Las fotos de ambos pacientes donde aparecen los rasgos característicos del Síndrome se muestran en las figuras 5 y 6.



Figura 5. Paciente 1.



Figura 6. Paciente 2.

| Paciente 1 | Hallazgo clínico |
|--------------------------|--|
| SEXO | Masculino |
| RAZA | Caucásico |
| NARIZ | Puente nasal deprimido Las narinas no están antevertidas Philtrum largo y liso |
| OJOS | Cejas arqueadas Pestañas largas No hay miopía No hay obstrucción en el conducto lacrimal |
| BOCA | Labio superior delgado No presenta micrognatia No tiene la boca en carpeta ni el paladar hendido Los dientes no son pequeños ni están muy separados |
| CABEZA | La línea de inserción de cabello posterior no es baja |
| OREJAS | Las orejas no son de baja implantación No están rotadas posteriormente |
| RESPIRATORIO | No hay apnea No presenta infecciones recurrentes |
| CARDIOVASCULAR | No hay cardiopatía congénita |
| GASTROINTESTINAL | No hay reflujo gastroesofágico patológico Problemas de alimentación en la infancia |
| GENITOURINARIO | No hay malformaciones renales |
| EXTREMIDADES | No hay reducción de extremidades Manos pequeñas pero no pies pequeños No hay clinodactilia en el quinto dedo No hay ausencia de brazos o antebrazos No tiene limitación de movimiento en el codo |
| PIEL | No presenta hirsutismo Cutis marmorata |
| SNC | Pituitaria pequeña Alta tolerancia al dolor Alteraciones del sueño |
| MENTAL/ COGNITIVO | Ligera discapacidad intelectual |

| | | |
|-----------------------|--|--------|
| DESARROLLO | Ligero retraso en el desarrollo del lenguaje | |
| | Primera palabra a los 18 meses | |
| | Capacidad motora reducida | |
| | Capacidad de caminar de manera autónoma a los 18 meses | |
| NACIMIENTO | Peso al nacer | 3260 g |
| | Longitud al nacer | 50 cm |
| | Perímetro cefálico | 34 cm |
| DATOS ACTUALES | Edad de la valoración | 7 años |
| | Peso | 19 kg |
| | Talla | 112 cm |

Tabla 13. Características clínicas del paciente 1.

| Paciente 2 | Hallazgo clínico | |
|--------------------------|--|--------|
| SEXO | Femenino | |
| RAZA | Caucásica | |
| NARIZ | Puente nasal deprimido y narinas antevertidas Philtrum largo y liso | |
| OJOS | Cejas arqueadas Pestañas largas Ptosis Sinofris | |
| BOCA | Labio superior delgado | |
| CABEZA | Braquicefalia La línea de inserción de cabello anterior es baja | |
| CUELLO | Baja línea de inserción del cabello posterior | |
| RESPIRATORIO | Infecciones del sistema respiratorio superior | |
| GASTROINTESTINAL | Reflujo gastroesofágico patológico Problemas de alimentación en la infancia Alimentación por sonda hasta los cinco años No es capaz de masticar | |
| EXTREMIDADES | Manos y pies pequeños Dedos cortos Movimientos limitados del codo | |
| PIEL | Hirsutismo severo Cutis marmorata | |
| SNC | Pituitaria pequeña Alta tolerancia al dolor Alteraciones del sueño Ni hipertonia ni hipotonía | |
| MENTAL/ COGNITIVO | Dificultad de aprendizaje No habla | |
| DESARROLLO | Capacidad de caminar de manera autónoma a los 3,5 años Problemas de comportamiento | |
| NACIMIENTO | Peso al nacer | 2130 g |
| | Longitud al nacer | 43 cm |
| | Perímetro cefálico | 30 cm |

Tabla 14. Características clínicas del paciente 2.

5.2 Gravedad de los fenotipos según clasificación de Gillis

Aplicando el método de Gillis para la clasificación de los pacientes con SCdL, el paciente 1 se incluiría en la clase I (fenotipo leve). Aunque presenta un ligero retraso en el desarrollo, posee habilidades comunicativas y su retraso en la capacidad motora es inferior a 2 años. Además carece de anomalías en las extremidades. Sin embargo el paciente 2 no es capaz de masticar, tiene ausencia de habilidades comunicativas (no habla) y presenta un retraso severo de las capacidades motoras (incapacidad de andar hasta los 3.5 años). Por todo ello, el paciente 2 quedaría incluido en la clase III (fenotipo severo).

5.3 Comprobación de la mutación en el DNA genómico

El paciente 1 posee una mutación en heterocigosis situada en el intrón 27 por la cual en la posición c.5329-15 se observa que en lugar de una adenina hay una guanina (figura 7).

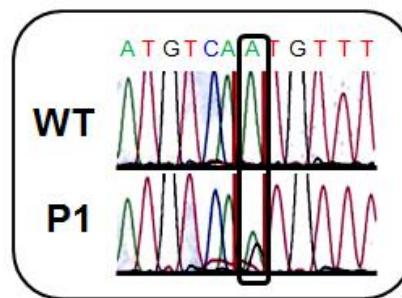


Figura 7. Secuencia del DNA genómico del paciente 1. En la posición c.5329-15 del intrón 27 se observa el cambio de adenina por guanina.

En uno de los alelos del paciente 2 se ha producido una delección de seis pares de bases en la posición c.6344del(-13)_(-8) del intrón 36 (figura 8).

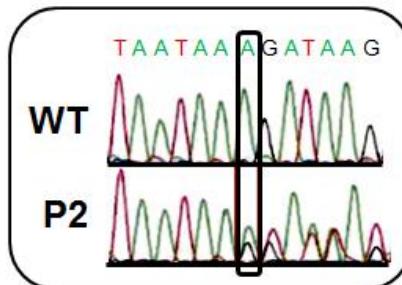


Figura 8. Secuencia del DNA genómico del paciente 2. Se ha producido una delección de 6pb en la posición c.6344del(-13)_(-8) del intrón 36.

5.4 Identificación de tránscritos aberrantes

Tras la retrotranscripción para obtener el cDNA, se hizo una PCR usando *primers* que amplificaran una región que flanquea a la mutación y ver si se alteraba el proceso de *splicing*.

En el paciente 1 se amplificó la región comprendida por los exones 27-30. En la electroforesis en gel de agarosa se observan dos tránscritos, el *wild type* de 634 pb y otro de 535 pb que se corresponde con la pérdida del exón 28 (figura 9). La pérdida de este exón de 33 aminoácidos no altera el marco de lectura.

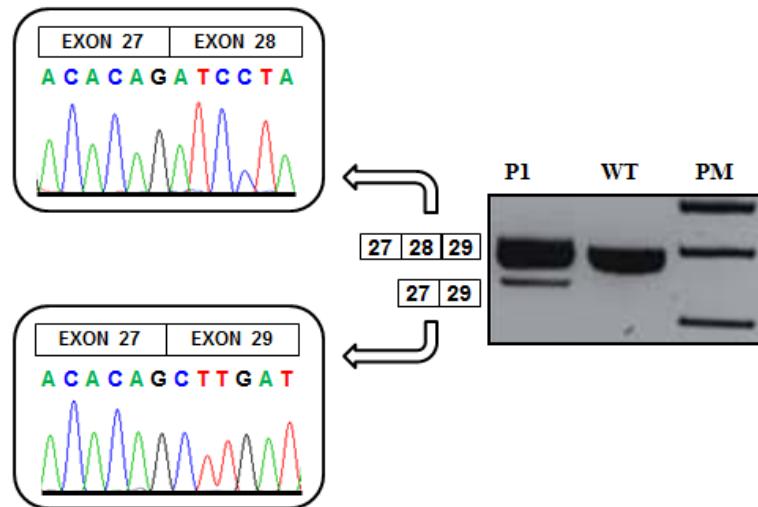


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del cDNA del paciente 1. Se observa la presencia del tránscrito *wild type* (WT) pero también hay un tránscrito aberrante que carece del exón 28. También se muestran las secuencias de estos dos tránscritos.

En el caso del paciente 2, se amplificó la región situada entre los exones 36 y 38. La electroforesis en gel de agarosa muestra el tránscrito *wild type* de 363 pb y otro de 208 pb que se corresponde con la delección del exón 37 (figura 10). La pérdida del exón 37 altera la pauta de lectura y daría lugar a la aparición de un codón stop 11 aminoácidos después.

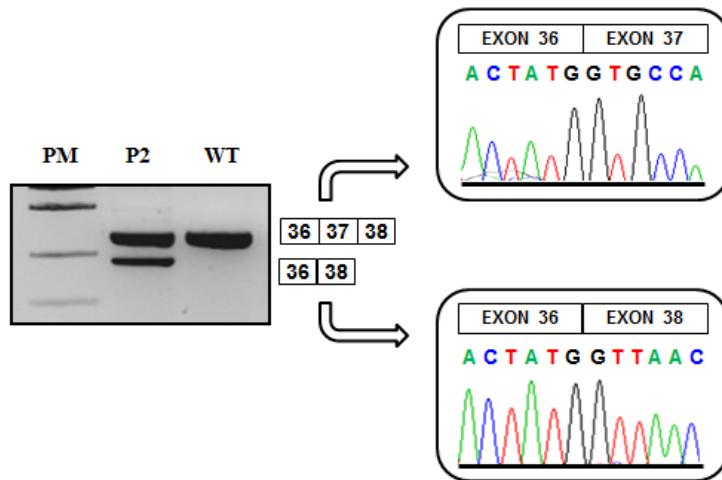


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa del cDNA del paciente 2. Además del tránscrito *wild type* (WT) también se observa el tránscrito aberrante que carece del exón 37. También se muestra las secuencias de ambos tránscritos.

5.5 qPCR

Para la cuantificación total de *NIPBL* se ha obtenido una curva estándar que permite relacionar el Ct con el número de copias. Como se explicó en el apartado de Materiales y Métodos, la curva se ha construido a partir de diluciones seriadas de un estándar con un número de copias conocidas. En la figura 11 se representa la recta de calibrado obtenida para *NIPBL*. Las diluciones seriadas de la curva estándar del gen *NIPBL* son: 1.43×10^2 ; 1.43×10^3 ; 1.43×10^4 ; 1.43×10^5 y 1.43×10^6 número de copias.

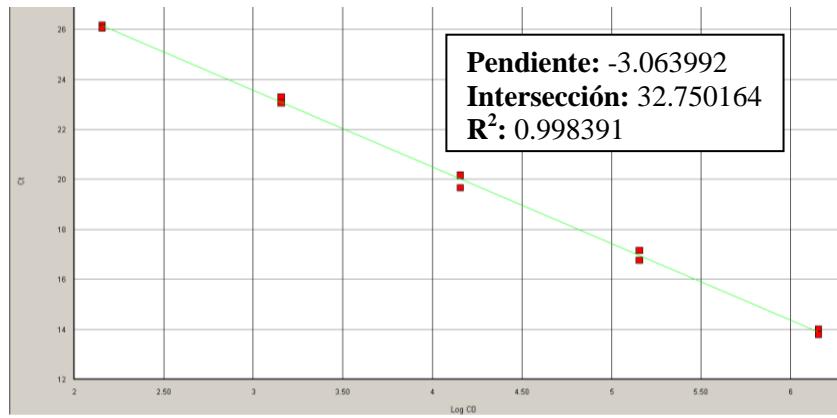


Figura 11. Curva estándar de la expresión total de *NIPBL* (Ct frente a logaritmo número de copias).

En la figura 12 se muestra la recta patrón correspondiente con *GADPH*, control interno que va a permitir la normalización de los resultados. Las diluciones seriadas realizadas son: 3.41×10^2 ; 3.41×10^3 ; 3.41×10^4 ; 3.41×10^5 y 3.41×10^6 número de copias.

De todas las diluciones se han hecho duplicados. Las curvas muestran una alta linearidad, $R^2 > 0.99$, y la eficiencia de la PCR viene dada por la pendiente de la recta cuyo valor debe estar en el rango (-4,-3) como sucede en ambos casos.

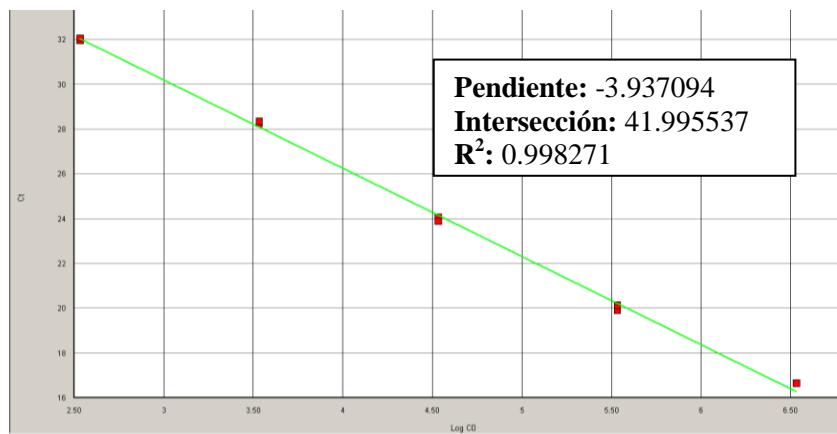


Figura 12. Curva estándar de la expresión del *GADPH* (Ct frente a logaritmo número de copias).

Para cada paciente se ha obtenido una curva de amplificación por qPCR en la que se ha determinado el valor Ct. A continuación se muestran los resultados obtenidos para el paciente 1 (figura 13, la gráfica correspondiente con el paciente 2 sería análoga). Se han realizado quintuplicados de las muestras de cada paciente para minimizar errores.

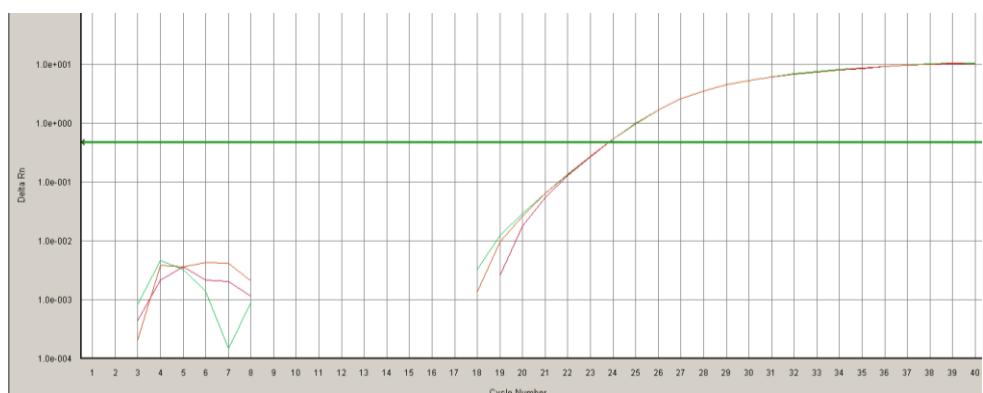


Figura 13. qPCR del gen *NIPBL* en el paciente.

Se puede verificar que se ha producido un único producto durante la amplificación mediante las curvas de disociación. Para obtenerlas se somete el producto de PCR a un incremento paulatino de la temperatura, y se observa la variación de fluorescencia conforme se produce la desnaturalización de la doble hebra del DNA. Aparece un pico, característico de cada amplicón, a su temperatura de disociación, que dependerá de su tamaño y composición de nucleótidos. De esta manera se puede ver si hay un único producto. Si aparecieran dos picos querría decir que se ha producido algún error a lo largo del ensayo y se están amplificando dos productos diferentes.

En las curvas de disociación de las muestras de ambos pacientes se observa un único pico, lo cual indica que en cada muestra solo se ha cuantificado un único producto. Se está estudiando la expresión total del gen *NIPBL* mediante el fluorocromo *SYBR-Green* que se une a ambos tránscritos independientemente de que haya mutación o no. En la figura 14 se puede observar la curva de disociación obtenida en el paciente 1. La curva del paciente 2 sería análoga a la del paciente 1.

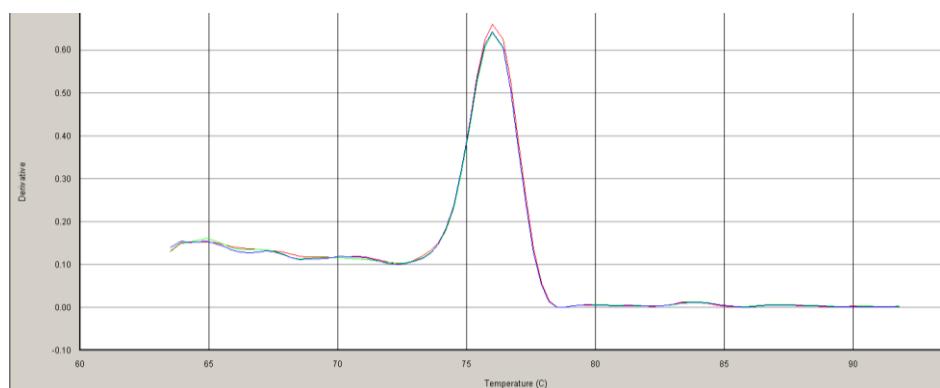


Figura 14. Curva de disociación de la muestra del paciente 1. Se observa un solo pico lo cual indica que hay un único producto de amplificación.

Para cada uno de los pacientes se han obtenido los valores Ct para *NIPBL* y para *GADPH*. Se realizaron cinco mediciones para cada una de las muestras obtenidas de los pacientes. Mediante la interpolación de estos valores en las rectas de calibrado se ha podido obtener el número de copias de los dos genes (*NIPBL* y *GADPH*) de ambos pacientes. Finalmente para poder comparar los niveles de expresión se han tomado muestras de cinco voluntarios sanos, se ha obtenido un pool con sus DNA y se ha cuantificado la expresión de ambos genes. Para normalizar los valores se ha calculado el cociente entre ambos valores (copias *NIPBL*/copias *GADPH*). Los datos obtenidos se muestran en las tablas 15, 16 y 17.

| | Ct <i>NIPBL</i> | Ct <i>GADPH</i> | Copias <i>NIPBL</i> | Copias <i>GADPH</i> | <i>NIPBL/GADPH</i> |
|--------------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| P1 | 23,44 | 24,7 | 1093 | 24712 | 0,0034 |
| P1 | 23,42 | 24,53 | 1109 | 27295 | 0,0312 |
| P1 | 23,39 | 24,46 | 1135 | 28436 | 0,0300 |
| P1 | 22,98 | 24,25 | 1545 | 32152 | 0,0369 |
| P1 | 23,37 | 24,45 | 1152 | 28603 | 0,0309 |
| Media | 23,29 | 24,48 | 1224 | 28145 | 0,0434 |

Tabla 15. Expresión de ambos genes en el paciente 1.

| | Ct <i>NIPBL</i> | Ct <i>GADPH</i> | Copias <i>NIPBL</i> | Copias <i>GADPH</i> | <i>NIPBL/GADPH</i> |
|--------------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| P2 | 24,61 | 25,18 | 454 | 18663 | 0,0090 |
| P2 | 24,08 | 25,26 | 676 | 17810 | 0,0140 |
| P2 | 24,12 | 25,33 | 656 | 17095 | 0,0142 |
| P2 | 23,95 | 25,04 | 746 | 20256 | 0,0136 |
| Media | 24,07 | 24,73 | 682 | 24282 | 0,0104 |

Tabla 16. Expresión de ambos genes en el paciente 2.

| | Ct <i>NIPBL</i> | Ct <i>GADPH</i> | Copias <i>NIPBL</i> | Copias <i>GADPH</i> | <i>NIPBL/GADPH</i> |
|----------------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Control | 24,61 | 25,18 | 454 | 18663 | 0,0090 |
| Control | 24,08 | 25,26 | 676 | 17810 | 0,0140 |
| Control | 24,12 | 25,33 | 656 | 17095 | 0,0142 |
| Control | 23,95 | 25,04 | 746 | 20256 | 0,0136 |
| Media | 24,07 | 24,73 | 682 | 24282 | 0,0104 |

Tabla 17. Expresión de ambos genes en la muestra control.

A la normalización del valor de expresión obtenida para el control se le ha asignado el 100% de la expresión. En el paciente 1 se obtuvo una expresión del 95,2% y en el paciente 2 del 71,3%. Mientras que no se detectan cambios en los niveles de mRNA de *NIPBL* en el paciente 1 (P1=95,2%, SD=1,4%) hay una disminución de aproximadamente el 30% de los niveles de mRNA de *NIPBL* medidos en el paciente 2 (P2= 71,3%, SD=1,4%). (Figura 15).

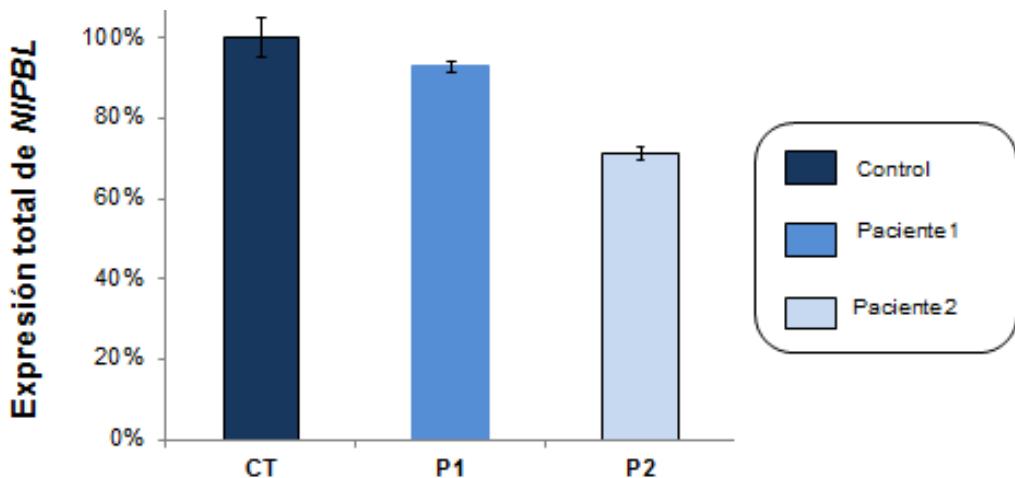


Figura 15. Expresión total de *NIPBL* en ambos pacientes y en el control.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se presentan dos nuevas mutaciones de *splicing* en el gen *NIPBL* en dos pacientes con Síndrome Cornelia de Lange. Están localizadas en posiciones no canónicas y son las mutaciones intrónicas más profundas descritas hasta la fecha en el gen *NIPBL*.

El paciente 1 posee la mutación c.5329-15A>G en el intrón 27 que provoca la pérdida del exón 28. La adenina que resulta mutada podría ser el nucleótido clave en la secuencia del punto de ramificación. Por un lado, está situada quince nucleótidos *upstream* del sitio aceptor de *splicing*, y por otro lado, los nucleótidos próximos a la adenina se corresponden con la secuencia consenso YNYYRAY, donde Y es una pirimidina, N significa cualquier nucleótido, R es una purina y la A es una adenina clave en el proceso de *splicing*. Dentro de las mutaciones que afectan a la secuencia de ramificación, la mutación de la adenina es el evento más frecuente.¹³

El paciente 2 presenta una delección de seis nucleótidos en el intrón 36, c.6344del(-13)_(-8), que da lugar a la delección del exón 37. Esta mutación podría afectar al tracto de polipirimidinas debido a que está situada *upstream* de la secuencia aceptora y cinco de los seis nucleótidos delecionados son pirimidinas.¹⁴ Aunque todavía no se ha definido una secuencia consenso, sí que se ha reportado que es necesario un mínimo del tracto de polipirimidinas, y que tanto su tamaño como su composición, contribuyen a la eficiencia del proceso de *splicing*.¹⁵ Aunque el evento más frecuente es el cambio de pirimidinas por purinas,¹⁶ esta mutación afectaría a la longitud de la secuencia.

Normalmente, las mutaciones “*frameshift*” en *NIPBL* dan lugar a proteínas truncadas que resultan en haploinsuficiencias, y han sido asociadas con fenotipos severos. Por otro lado, se piensa que las mutaciones “*missense*” y las delecciones que no rompen el marco de lectura provocan proteínas alteradas y están asociadas a fenotipos más leves.^{9,17}

En el caso del paciente 1 la mutación c.5329-15A>G da lugar a un tránscribo aberrante con delección del exón 28 que mantiene la pauta de lectura. Los resultados de la qPCR han mostrado un nivel de expresión total de *NIPBL* similar al observado en el control. Sin embargo, en el paciente 2, la mutación c.6344del(-13)_(-8) da lugar a un tránscribo aberrante con delección del exón 37 que rompe el marco de lectura. En este caso, los resultados de la qPCR muestran casi un 30% de reducción en la expresión total de *NIPBL*, debido probablemente a la activación de mecanismos que disminuyen la cantidad de mRNA mediante la degradación de tránscritos aberrantes (NMD, nonsense mediated decay).¹⁸ Se ha reportado que en las mutaciones de *NIPBL* que llevan asociadas haploinsuficiencia hay aproximadamente un 70% de actividad residual,¹⁹ lo cual podría explicar el mecanismo de patogenicidad del paciente 2.

Atendiendo a las características clínicas, aunque ambos pacientes presentan manifestaciones típicas del SCdL, el paciente 1 muestra un fenotipo más leve que el paciente 2 que tiene un retraso grave del crecimiento. El paciente 1 muestra un fenotipo más leve sin restricción del crecimiento intrauterino, y un ligero retraso postnatal de altura y peso. Además padece problemas de alimentación pero no hay reflujo gastroesofágico, tiene ligeras anomalías en las extremidades y su retraso en el crecimiento es leve. En contraste, el paciente 2 muestra un fenotipo mucho más severo, con rasgos craneofaciales evidentes incluso en el periodo neonatal, malformaciones en las extremidades, retrasos graves del crecimiento y de la psicomotricidad, además de microcefalia profunda.

Estas características clínicas de los pacientes podrían apoyar los resultados moleculares. Cuando se observa una disminución de los niveles de mRNA de *NIPBL* por un tránscrito que rompe la pauta de lectura o codifica una proteína truncada, el fenotipo resultante es más severo que cuando hay mutaciones/transcritos que mantienen la pauta de lectura y no afectan a los niveles totales de mRNA

En este trabajo, además se aportan evidencias de que las variantes intrónicas que no alteran las secuencias aceptores y donadoras de *splicing* pueden dar lugar a tránscritos aberrantes de *NIPBL*, con lo que estas mutaciones deben examinarse cuidadosamente antes de considerarlas no relevantes para la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

1. Se confirma que las mutaciones c.5329-15A>G y c.6344del(-13)_(-8) que no afectan a secuencias conservadas donadoras y acceptoras de intrón son mutaciones de *splicing*.
2. Se demuestra que las mutaciones c.5329-15A>G y c.6344del(-13)_(-8) producen tránscritos aberrantes con delecciones de los exones 28 y 37 respectivamente.
3. La mutación de *splicing* con pérdida del exón 37 causa un tránsrito aberrante con ruptura del marco de lectura que se asocia a una disminución de mensajeros y a un fenotipo severo.
4. La mutación de *splicing* con pérdida del exón 28 causa un tránsrito aberrante con conservación del marco de lectura y sin disminución de mensajeros que se asocia a un fenotipo leve.

7. CONCLUSIONS

1. It is confirmed that both mutations c.5329-15A>G and c.6344del(-13)_(-8) are splicing mutations and neither of them are located in canonical splicing positions.
2. It is reported that the two mutations c.5329-15A>G and c.6344del(-13)_(-8) generate aberrant transcripts with the skipping of exons 28 and 37.
3. The splicing mutation with exon 37 deletion generates an out of frame aberrant transcript associated with a reduction of mRNA level and a severe phenotype.
4. The splicing mutation with exon 28 deletion generates an in frame aberrant transcript associated with a reduction of mRNA level and results in a mild phenotype.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Mei, L., Liang, D., Huang, Y., Pan, Q. & Wu, L. Two novel NIPBL gene mutations in Chinese patients with Cornelia de Lange syndrome. *Gene* **555**, 476–480 (2015).
2. Deardorff, M. a *et al.* Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 485–494 (2007).
3. Gillis, L. a *et al.* NIPBL mutational analysis in 120 individuals with Cornelia de Lange syndrome and evaluation of genotype-phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 610–623 (2004).
4. Boyle M.I., Jespersgaard C., Brøndum-Nielsen K., Bisgaard A.-M., T. & Z. Cornelia de Lange syndrome. *Clin. Genet.* (2014).
5. Kline, A. D. *et al.* Cornelia de Lange syndrome: Clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. *Am. J. Med. Genet. Part A* **143A**, 1287–1296 (2007).
6. Strachan, T. Cornelia de Lange Syndrome and the link between chromosomal function, DNA repair and developmental gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 258–264 (2005).
7. Solomon, D. a., Kim, J. S. & Waldman, T. Cohesin gene mutations in tumorigenesis: From discovery to clinical significance. *BMB Rep.* **47**, 299–310 (2014).
8. Ramos, F. J. *et al.* Clinical utility gene card for: Cornelia de Lange syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 1–4 (2014). doi:10.1038/ejhg.2014.270
9. Linda Mannini, Francesco Cucco, Valentina Quarantotti, Ian D. Krantz, and A. & Musio. Mutation Spectrum and Genotype–Phenotype Correlation in Cornelia de Lange Syndrome. *Hum Mutat* (2013).
10. Tonkin, E. T. *et al.* LETTERS NIPBL , encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B , is mutated in Cornelia de Lange syndrome. **36**, 636–641 (2004).
11. Puisac Uriol, B. Variantes de splicing y estructura tridimensional de la enzima HMG-CoA liasa humana. (Zaragoza, 2004).
12. 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.* **15**, 10350–10364 (2014).
13. Bishop, D. F. *et al.* Congenital erythropoietic porphyria: A novel uroporphyrinogen III synthase branchpoint mutation reveals underlying wild-type alternatively spliced transcripts. *Blood* **115**, 1062–1069 (2010).
14. Sébillon, P., Beldjord, C., Kaplan, J. C., Brody, E. & Marie, J. A T to G mutation in the polypyrimidine tract of the second intron of the human beta-globin gene reduces in vitro splicing efficiency: evidence for an increased hnRNP C interaction. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3419–3425 (1995).
15. Roscigno, R. F., Weiner, M. & Garcia-Blanco, Mariano, a. A Mutational Analysis of the Polypyrimidine Tract of Introns. *J. Biol. Chem.* **268**, 11222–11229 (1993).
16. Lewandowska, M. a. The missing puzzle piece: Splicing mutations. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 2675–2682 (2013).
17. Pié, J. *et al.* Mutations and variants in the cohesion factor genes NIPBL, SMC1A, and SMC3 in a cohort of 30 unrelated patients with Cornelia de Lange syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A* **152**, 924–929 (2010).
18. Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 89–99 (2004).
19. Liu, J. *et al.* Transcriptional dysregulation in NIPBL and cohesin mutant human cells. *PLoS Biol.* **7**, e1000119 (2009).

9. APÉNDICE

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| A | Adenina |
| cDNA | DNA codificante |
| C | Citosina |
| c.s.p | Cantidad suficiente para |
| cm | Centímetro |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxirribonucleótidos-trifosfatos |
| et al | Y otros |
| g | Gramo |
| G | Guanina |
| Kb | Kilobase |
| mA | Miliamperio |
| mM | Milimolar |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanómetro |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PM | Peso molecular |
| Primer F | <i>Primer</i> forward |
| Primer R | <i>Primer</i> reverse |
| pb | Pares de bases |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-PCR | Retrotranscripción |
| SCdL | Síndrome Cornelia de Lange |
| SNC | Sistema nervioso central |
| T^a | Temperatura |
| T | Timina |
| TBE | Tris, borato y EDTA |
| TE | Tris:EDTA 10:1 |
| Tm | Temperatura de disociación |
| UV | Ultravioleta |
| V | Voltio |
| WT | <i>Wild type</i> |
| µl | Microlitro |
| °C | Grado centígrado |

10. ANEXO 1

A continuación se muestra la tabla estandarizada que los médicos especialistas usan para evaluar a los pacientes con SCdL (tabla 18).

| FECHA | IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE | |
|------------------|--|-------------------------------------|
| | HALLAZGOS CLINICOS | RESPONDA SI/ NO o descripción breve |
| | SEXO | |
| | EDAD | |
| | FECHA DE NACIMIENTO | |
| CRANEO | MICROCEFALIA | |
| | BRAQUICEFALIA | |
| | LINEA DE INSERCIÓN DEL CABELLO ANTERIOR BAJA | |
| | EDAD DE CIERRE DE LA FONTANELA ANTERIOR | |
| | OTRAS | |
| OJOS | CEJAS ARQUEADAS | |
| | SINOFRIDIA | |
| | PESTAÑAS LARGAS | |
| | PTOSIS | |
| | MOPIA | |
| | OBSTRUCCION DEL CONDUCTO LACRIMAL | |
| | OTROS | |
| NARIZ | PUENTE NASAL DEPRIMIDO | |
| | NARINAS ANTEVERTIDAS | |
| | PHILTRUM LARGO Y LISO | |
| BOCA | LABIO SUPERIOR DELGADO | |
| | BOCA EN CARPA | |
| | PALADAR ALTO | |
| | PALADAR HENDIDO | |
| | ANOMALIAS DENTALES | |
| | MICROGNATIA | |
| | OTROS | |
| ORL | HIPOACUSIA/ SORDERA | |
| | OTITIS/ SINUSITIS/ AMIGDALITIS | |
| | A REPETICIÓN | |
| CUELLO | LINEA DE INSERCIÓN DE CABELLO POSTERIOR BAJA | |
| CARDIOVASCULAR | CARDIOPATIA CONGENITA | |
| PULMONAR | APNEAS | |
| | INFECCIONES RESPIRATORIAS RECURRENTES | |
| | OTRAS | |
| GASTROINTESTINAL | REFLUJO GASTROESOFAGICO PATOLO | |
| | PROBLEMAS CON LA | |

| | | |
|------------------------------|--|--|
| | ALIMENTACION/SUCCIÓN | |
| GENITOURINARIO | MALFORMACIONES RENALES | |
| | REFLUJO VESICOURETERAL | |
| EXTREMIDADES | MALFORMACIONES UTERINAS/OVARIOS | |
| | CRIPTORQUIDIA | |
| | HIPO/EPISPADIAS | |
| | OTROS | |
| | MANOS PEQUEÑAS | |
| | INSERCIÓN PROXIMAL DEL PULGAR | |
| | CLINODACTILIA DEL 5º DEDO | |
| | PLIEGUE PALMAR UNICO | |
| | PIES PEQUEÑOS | |
| | SINDACTILIA DE LOS DEDOS DEL PIE | |
| | DEFECTOS DE REDUCCION DE EXTREMIDADES | |
| | LIMITACION PARA EL MOVIMIENTO DE LOS CODOS | |
| | OTROS | |
| PIEL | HIRSUTISMO | |
| | CUTIS MARMORATA | |
| | OTROS | |
| SNC | ANOMALIAS ESTRUCTURALES EN SNC (ECO, TAC, RNM) | |
| | CONVULSIONES | |
| | OTRAS | |
| MENTAL / COGNITIVO | DISCAPACIDAD INTELECTUAL | |
| | ALTERACIONES DE COMPORTAMIENTO/PERSONALIDAD | |
| DESARROLLO | DESARROLLO DEL LENGUAJE | |
| | EDAD PRIMERA PALABRA | |
| | DESARROLLO MOTOR | |
| | EDAD SENTARSE SOLO | |
| | EDAD CAMINAR SOLO | |
| DATOS ANTROPOMETRICOS | EDAD GESTACIONAL | |
| NACIMIENTO | PESO AL NACER (g) | |
| | LONGITUD AL NACER (cm) | |
| | PERIMETRO CEFALICO (cm) | |
| DATOS ACTUALES | EDAD DE LA VALORACIÓN | |
| | PESO (kg) | |
| | TALLA (cm) | |
| | PERIMETRO CEFALICO (cm) | |
| DATOS GENÉTICOS | GEN AFECTADO | |
| | MUTACION/ VARIANTE | |

Tabla 18. Tabla estandarizada para evaluar a los pacientes con SCdL.