



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio de las funciones de las cohesinas en el síndrome
de Cornelia de Lange (SCdL)

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: López Abellán, Andrea

Tutor/a: Yenush, Lynne Paula

Cotutor/a externo: QUERALT BADIA, ETHELVINA

Director/a Experimental: MARTINEZ MONTAÑES, FERNANDO VICENTE

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Estudio de las funciones de las cohesinas en el síndrome de Cornelia de Lange (SCdL)

Andrea López Abellán



Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Trabajo Final de Grado en Biotecnología

Curso académico 2018/2022

Tutora académica:
Lynne Paula Yenush

Cotutora:
Ethelvina Queralt Badia

Cotutor colaborador:
Fernando Martínez Montañés

Valencia, julio de 2022

Título del proyecto: Estudio de las funciones de las cohesinas en el Síndrome de Cornelia de Lange (SCdL).

Titulación: Grado en Biotecnología

Autora: Dña. Andrea López Abellán

Tutora académica: Prof. Dña. Lynne Paula Yenush

Cotutora: Dña. Ethelvina Queralt Badia

Cotutor colaborador: Fernando Martínez Montañés

Valencia, julio de 2022

Resumen:

El síndrome de Cornelia de Lange (SCdL) es una enfermedad genética rara que afecta a múltiples órganos y sistemas durante el desarrollo. La causa del síndrome se debe a mutaciones heterocigóticas acaecidas durante el desarrollo embrionario, principalmente en el gen NIPBL. NIPBL se requiere para la asociación de cohesina con el ADN y es la subunidad principal del complejo que recluta la cohesina a la cromatina. En pacientes con mutaciones en NIPBL, se ha observado la caída drástica de los niveles transcripcionales de genes relacionados con el desarrollo y la organización del sistema esquelético, pudiendo tener esto relación con las alteraciones del desarrollo y las anomalías de las extremidades características de pacientes con SCdL.

En parte debido a la escasez de muestras de pacientes, se quiere obtener un modelo de la enfermedad *in vitro* mediante la introducción de dos mutaciones en NIPBL encontradas en sendos pacientes con SCdL. Para llevar a cabo la edición génica se trabajó con el sistema CRISPR/Cas9 utilizando un ADN donante sintético que contenía la mutación a editar. Al mismo tiempo, se mutó la secuencia PAM para evitar posteriores cortes del enzima Cas9 y se introdujo un sitio de corte de un enzima de restricción para facilitar el rastreo de los posibles clones positivos. Tras la nucleofección de fibroblastos control, que fue anteriormente realizada en el laboratorio, se ha realizado el rastreo de clones editados genéticamente mediante la técnica de dilución serial limitante, pudiendo validar finalmente si incorporaron la mutación con una reacción de digestión con enzimas específicas. Los clones comprobados hasta el momento han resultado ser todos negativos. De forma paralela, mediante un ensayo *in vitro* de validación de la eficacia de los ARN diseñados para guiar a la endonucleasa Cas9, se ha comprobado que ésta realiza correctamente el corte en sitios específicos del ADN diana.

Por otra parte, se ha visto que NIPBL regula la actividad ATPasa del complejo de cohesinas. En experimentos anteriores del laboratorio se diseñaron plásmidos que contenían la proteína control o NIPBL-Tyr2216Ser, ambas etiquetadas con GST. Tras la expansión y purificación de estos plásmidos, se han nucleofectado células HDF comerciales, extraído su proteína total y se ha realizado un Western Blot (WB) en gel de gradiente, detectando la proteína (316 kDa). Estudios posteriores incluirán la purificación de las proteínas etiquetadas para conocer si la proteína NIPBL-Tyr2216Ser tiene alterada la función reguladora de la actividad ATPasa del complejo de cohesinas.

Palabras clave: SCdL; cohesinas; cohesinopatías; NIPBL; mecanismo de la enfermedad; CRISPR-Cas9; ATPasa

Abstract:

Cornelia de Lange syndrome (CLS) is a rare genetic disease that affects multiple organs and systems during development. The cause of the syndrome is due to heterozygous mutations occurring during embryonic development, mainly in the *NIPBL* gene. *NIPBL* is required for the association of cohesin with DNA and is the main subunit of the complex that loads cohesin on chromatin. In patients with *NIPBL* mutations, a drastic drop in transcriptional levels of genes related to the development and organisation of the skeletal system has been observed, which may be related to the developmental alterations and limb abnormalities characteristic of CdLS patients.

Partly due to the scarcity of patient samples, we want to obtain an *in vitro* model of the disease by introducing two mutations in *NIPBL* found in two CdLS patients. To carry out the gene editing, we worked with the CRISPR/Cas9 system using a synthetic donor DNA containing the mutation to be edited. At the same time, the PAM sequence was mutated to avoid subsequent Cas9 enzyme cuts and a restriction enzyme cut site was introduced to facilitate the screening of potential positive clones. Following nucleofection of control fibroblasts, which was previously performed in the laboratory, gene-edited clones have been screened using the serial limiting dilution technique and finally validated for mutation incorporation with a specific enzyme digestion reaction. The clones tested so far have all been found to be negative. In parallel, an *in vitro* assay to validate the efficacy of the RNA designed to guide the Cas9 endonuclease has shown that it correctly cleaves specific sites on the target DNA.

Moreover, *NIPBL* has been shown to regulate the ATPase activity of the cohesin complex. Earlier experiments in the lab designed plasmids containing either the control protein or *NIPBL*-Tyr2216Ser, both labelled with GST. Following expansion and purification of these plasmids, commercial HDF cells have been nucleofected, their total protein extracted, and a gradient gel western blot (WB) performed, detecting the protein (316 kDa). Further studies will include purification of the labelled proteins to determine whether the *NIPBL*-Tyr2216Ser protein has altered regulatory function of the ATPase activity of the cohesin complex.

Key words: CdLS; cohesiopathies; *NIPBL*; mechanism of the disease; CRISPR-Cas9; ATPase.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a Ethel Queralt por ofrecerme la oportunidad de realizar este proyecto en la Unidad de División Celular y cohesinopatías en el centro de Investigación Biomédica de Valencia (IBV) y por tutorizarme durante todos estos meses con afán. A Fernando Martínez, por haberme tutorizado junto a Ethel con empeño, paciencia y dedicación y hacer que el día a día en el laboratorio fuera más ameno, pero también por haber sido un buen compañero. Al resto de mis compañeros del laboratorio: David, Esther, Malina y Esther por ayudarme siempre que ha hecho falta y ser un buen ejemplo de perseverancia y sacrificio. Os deseo lo mejor de cara al presente y al futuro.

A mis amigos de la universidad, porque sin vosotros todos estos años no habrían sido lo mismo y por ser un respaldo en los momentos más duros de la carrera. Gracias por haber llenado de risas hasta los momentos menos divertidos y por poder llevarme buenos recuerdos de nuestra época universitaria juntos. En especial, gracias a Marta, por haber sido mi apoyo incondicional durante estos últimos dos años, por confiar siempre en mí y ser lo mejor que me llevo de esta carrera.

A mi familia por mostrarme siempre su apoyo y admiración y alentarme siempre hacia conseguir mis objetivos.

A mi padre, que, aunque por desgracia nunca haya estado físicamente, estaría orgulloso de mí.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El síndrome de Cornelia de Lange	1
1.2. Base genética de la enfermedad	1
1.3. El complejo de cohesinas	3
1.3.1. Estructura del complejo de cohesinas	3
1.3.2. Comportamiento dinámico de las cohesinas	4
1.3.3. Funciones de las cohesinas relacionadas con la cohesión	5
1.3.4. Funciones de las cohesinas independientes de la cohesión	6
1.4. Efecto de las mutaciones en NIPBL en la expresión génica en el Síndrome de Cornelia de Lange	7
1.5. Uso de CRISPR/Cas9 para modelar enfermedades en células madre humanas <i>in vitro</i>	9
1.6. Antecedentes	11
1.6.1. Creación de un modelo de la enfermedad mediante CRISPR/Cas9	11
1.6.2. Purificación de NIPBL para estudios funcionales	14
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Descongelación y cultivo de fibroblastos	16
3.2. Aislamiento de clones editados genéticamente por crispr/cas9	16
3.3. Selección de candidatos y pases de fibroblastos	18
3.4. Extracción de ADN genómico	19
3.5. Amplificación de la región de interés de nipbl.....	20
3.6. Purificación del producto de PCR	21
3.7. Digestión enzimática y electroforesis en gel de agarosa	21
3.8. Extracción y purificación de ADN plasmídico mediante maxiprep	21
3.9. Nucleofección DE HDF.....	22
3.10. Extracción y cuantificación de proteína	23
3.11. Western blot.....	24
3.12. Ensayo <i>in vitro</i> de digestión por CRISPR/Cas9.....	25
4. RESULTADOS.....	26

4.1.	Creación de un modelo de la enfermedad mediante CRISPR/Cas9.....	26
4.1.1.	Selección de clones candidatos.....	26
4.1.2.	Validación de los clones candidatos.....	27
4.1.3.	Ensayo <i>in vitro</i> de digestión por CRISPR/CAS9.....	29
4.2.	Purificación de nipbl para estudios funcionales.....	30
4.2.1.	Nucleofección y extracción de proteína.....	30
4.2.2.	Detección de NIPBL por Western Blot	31
5.	DISCUSIÓN.....	33
6.	CONCLUSIONES.....	36
7.	BIBLIOGRAFIA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama representando la correlación entre el genotipo y el fenotipo de los cinco genes causantes del Síndrome de Cornelia de Lange.	2
Figura 2. Fenotipo facial de individuos con el Síndrome de Cornelia de Lange	2
Figura 3. Estructura del complejo de cohesinas	3
Figura 4. Regulación del ciclo celular de las cohesinas	5
Figura 5. Funciones de las cohesinas	7
Figura 6. Modelo para la distribución genómica diferencial de NIPBL y las cohesinas en las células derivadas de pacientes con SCdL	8
Figura 7. Componentes del sistema CRISPR/Cas9	10
Figura 8. Edición mediante CRISPR/Cas9 en función del mecanismo de reparación	11
Figura 9. Diseño del screening del Diseño 1 del CRISPR/Cas9	13
Figura 10. Diseño del screening del Diseño 2 del CRISPR/Cas9	14
Figura 11. Representación esquemática del proceso de expansión de colonias individuales de fibroblastos.	19
Figura 12. Esquema de los procedimientos experimentales de las diferentes líneas del proyecto.	26
Figura 13. Gel de agarosa al 1,5% con los productos de digestión de los candidatos.	28
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa tras la digestión del fragmento editado con Cas ...	30
Figura 15. Detección de NIPBL mediante Western blot.	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutaciones del gen NIPBL en el nucleótido 6647 del cDNA de dos pacientes con SCdL que se trataron de mimetizar mediante la edición génica con CRISPR/Cas9 en células control.	12
Tabla 2. Representación esquemática de la estrategia 1 de dilución seriada de fibroblastos en una placa de 96 micropocillos. Se representa el número de células depositadas en cada pocillo.	16
Tabla 3. Representación esquemática de la estrategia 2 de dilución seriada de fibroblastos en una placa de 96 micropocillos. Se representa el número de células depositadas en cada pocillo.	17
Tabla 4. Representación esquemática de la estrategia 4 de dilución seriada de fibroblastos en una placa de 96 micropocillos. Se representa el número de células depositadas en cada pocillo.	17
Tabla 5. Representación esquemática de la estrategia 3 de dilución seriada de fibroblastos en una placa de 96 micropocillos. Se representa el número de células depositadas en cada pocillo.	17
Tabla 6. Número de placas cultivadas de los diseños 1, 1B y 2 mediante las 4 estrategias propuestas.....	18
Tabla 7. Concentración de ADN y ratios de calidad en las muestras de HDF comerciales tras la extracción con los kits de Zymo-Research y Macherey-Nagel.	19
Tabla 8. Componentes de la mezcla de PCR. Volúmenes y cantidades añadidos por reacción.	20
Tabla 9. Condiciones de la PCR.	20
Tabla 10. Componentes de la reacción de digestión in vitro con la enzima Cas9	25
Tabla 11. Número de candidatos seleccionados de cada estrategia de dilución serial del Diseño 1 de CRISPR/Cas9.	27
Tabla 12. Cuantificación de proteína extraída de las HDF nucleofectadas con los plásmidos y de un control de células HDF nucleofectadas sin plásmido.....	31

ABREVIATURAS

SCdL	Síndrome de Cornelia de Lange
coATS	Acetiltransferasas de cohesinas
NIPBL	Nipped-B-like protein
WAPL	Wings apart-like protein homologue
SMC	Proteína de mantenimiento estructural de los cromosomas
ATP	Adenosina trifosfato
PDS5	Proteína de cohesión de las cromátidas hermanas
CTCF	Factor de unión a CCCTC
TAD	Dominio de asociación topológica (<i>Topologically Associating Domains</i>)
PCDH	Protocadherinas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas
RNP	Complejo ribonucleoproteico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador
sgRNA	ARN de cadena simple (<i>single-guide RNA</i>)
crRNA	ARN CRISPR
tracrRNA	ARN transactivador
pb	Pares de bases
ssODN	Oligodeoxinucleótidos de cadena simple (ADN donante)
NHEJ	Recombinación de extremos no homólogos (<i>Non-Homologous End Joining</i>)
HDR	Recombinación de extremos homólogos (<i>Homology Directed Repair</i>)
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas (<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>)
FBS	Suero bovino fetal (<i>Fetal bovin serum</i>)

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HDF	Fibroblastos dérmicos humanos (<i>Human dermal fibroblast</i>)
RPM	Revoluciones por minuto
H₂O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
SDS	Dodecilsulfato sódico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
WB	Western Blot
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
PBS-T	Tampón Tris-Aceto-EDTA-Tween
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano, (HOCH ₂) ₃ CNH ₂
pH	Potencial hidrogeniónico
PBS	Tampón fosfato salino
μL	Microlitro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
kDa	Kilo Dalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
min	Minutos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL SÍNDROME DE CORNELIA DE LANGE

El síndrome de Cornelia de Lange (SCdL; OMIM 122470, 300590, 610759, 614701, 300882, también conocido como síndrome Brachmann de Lange) es un trastorno raro y genéticamente heterogéneo, autosómico o ligado al cromosoma X que afecta a múltiples órganos y sistemas. El SCdL se caracteriza principalmente por un retraso psicomotor, discapacidad intelectual, rasgos faciales distintivos, retraso del crecimiento prenatal y postnatal, hirsutismo y malformaciones, especialmente de las extremidades superiores. Se estima que la prevalencia es de 0,5-10:100.000, pero se desconoce la prevalencia exacta, ya que es probable que los casos más leves estén infradiagnosticados. El paciente con SCdL clásico es fácilmente reconocible desde el nacimiento por parte de pediatras y genetistas clínicos experimentados, debido a su aspecto craneofacial y de crecimiento, así como las malformaciones de las extremidades. Sin embargo, no todos los individuos con el síndrome exhiben el fenotipo clásico, y la manifestación del trastorno puede variar de leve a grave y con diferentes grados de afectación facial y de las extremidades (Figura 1) (Kline et al., 2018).

1.2. BASE GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD

Desde el punto de vista molecular, cinco genes han sido asociados con el Síndrome de Cornelia de Lange: *NIPBL* (Nipped-B-like protein), *SMC1* (mantenimiento estructural de los cromosomas 1A), *SMC3* (mantenimiento estructural de los cromosomas 3), *RAD21* (homólogo humano del mutante sensible a la radiación de *Schizosaccharomyces pombe* 21) y *HDAC8* (deacetilasa de histonas 8). Todas las mutaciones identificadas en individuos con SCdL afectan a proteínas que forman parte del complejo de cohesinas o sus reguladores. Así pues, junto con el síndrome de Roberts y el síndrome de Warsawbreakage, el Síndrome de Cornelia de Lange pertenece a un grupo de enfermedades denominadas cohesinopatías (Boyle et al., 2015).

Mutaciones en *NIPBL*, *SMC3* y *RAD21* conducen a la forma autosómica dominante de la enfermedad, mientras que los genes causantes de la enfermedad ligada al cromosoma X son *SMC1A* y *HDAC8* (Boyle et al., 2015). Aproximadamente más del 65% de los casos se debe a mutaciones heterocigóticas en *NIPBL* (316 kDa) mientras que mutaciones en los otros cuatro genes representan el 11% de los pacientes. Asimismo, la severidad de la enfermedad parece depender del gen afectado (Figura 1,2).

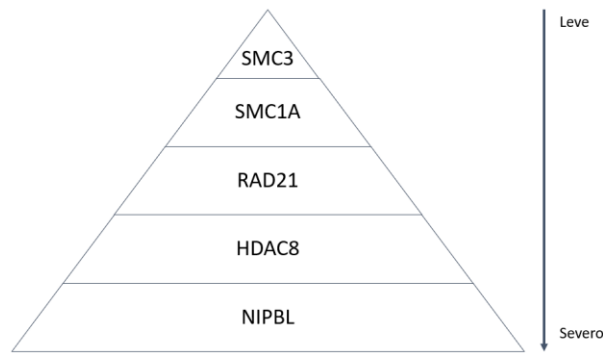


Figura 1. Diagrama representando la correlación entre el genotipo y el fenotipo de los cinco genes causantes del Síndrome de Cornelia de Lange.

Sin embargo, el fenotipo varía incluso en pacientes no relacionados entre sí con la misma mutación, lo que sugiere que hay otros factores genéticos o modificadores. Esto también se apoya por la presencia de diferencias fenotípicas intrafamiliares. Para pacientes con mutaciones en *NIPBL* la severidad del fenotipo parece estar correlacionado con el efecto previsto de la mutación en la proteína. Para el resto de los genes se observa la misma tendencia, pero el número de mutaciones reportadas para estos genes son limitadas en comparación con las de *NIPBL* (Boyle et al., 2015). Las mutaciones en *SMC* (*SMC1A*, *SMC3*) que mantienen la pauta de lectura de las proteínas para las que codifican y no alteran la expresión proteica se asocian generalmente a fenotipos de SCdL más leves, con un deterioro neurocognitivo moderado y menos defectos estructurales importantes. También se han registrado mutaciones ligadas al gen *HDAC8* en aproximadamente el 5% de los individuos. Las mutaciones identificadas conducen a la inestabilidad de la proteína y están presentes en individuos con características clínicas típicas del síndrome de Cornelia, pero sin afectación significativa de las extremidades y con algunas características adicionales que pueden ayudar a diferenciar este grupo de los individuos con SCdL causados por mutaciones en otros genes. Por último, las mutaciones en *RAD21* causan una cohesinopatía que se caracteriza por retraso en el crecimiento, anomalías esqueléticas menores y características faciales que coinciden con los hallazgos de los individuos con SCdL pero pueden tener una afectación cognitiva más leve que cuando la mutación se produce en los genes *HDAC8* o *NIPBL* (Figura 2) (Mannini et al., 2013).



Figura 2. Fenotipo facial de individuos con el Síndrome de Cornelia de Lange a) Fenotipo clásico del SCdL resultado de una variante del *NIPBL*. b) Fenotipo no clásico de un individuo con una variante de

NIPBL. **c)** Adulto con el clásico fenotipo (variante del NIPBL). **d)** Fenotipo no clásico de un individuo con una variante en SMC1A. **e)** Fenotipo clásico en un individuo con una variante en SMC3. **f)** Fenotipo no clásico en un individuo con una variante en RAD21. **g)** Fenotipo no clásico en un individuo con una variante en HDAC8. **h)** Fenotipo no clásico de un individuo con una variante en ANKRD11 (Kline et al., 2018).

Aunque los mecanismos moleculares de la enfermedad no se conocen del todo todavía, el fenotipo de los pacientes sugiere que las funciones de las cohesinas y NIPBL en la estructura de la cromatina está desregulada, afectando así a la transcripción génica. De hecho, mutaciones en genes que codifican reguladores de la cromatina como ANKRD11, KMT2A, AFF4 y BRD4 están asociados también a un desorden similar al del SCDL (García et al., 2021).

1.3. EL COMPLEJO DE COHESINAS

1.3.1. Estructura del complejo de cohesinas

El complejo de cohesinas fue originalmente descubierto como un complejo proteico necesario para la cohesión de las cromátidas hermanas durante la segregación cromosómica, un proceso conservado en todos los organismos eucariotas y esencial para la supervivencia de la célula (Watrín et al., 2016). En humanos, está compuesto de cuatro subunidades que forman una estructura en forma de anillo: SMC1A, SMC3, RAD21 y STAG1/2 (Figura 3).

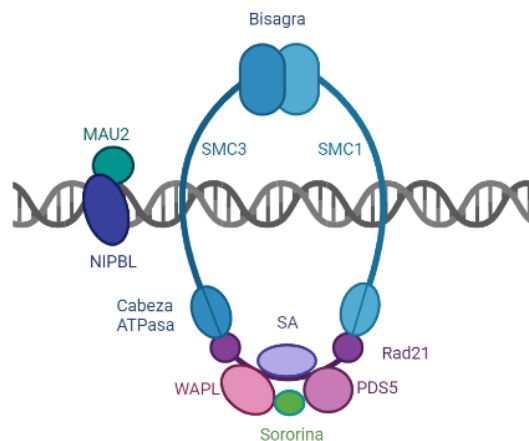


Figura 3. Estructura del complejo de cohesinas. El complejo de cohesinas se compone de 4 subunidades principales: SMC1, SMC3, RAD21 y el antígeno del estroma (SA). Las proteínas SMC son largos polipéptidos que se pliegan sobre sí mismos para formar una estructura similar a una varilla con un dominio bisagra en un extremo y un dominio ATPasa en el otro. SMC1 y SMC3 forman un heterodímero en forma de V e interactúan a través de sus dominios bisagra. Las regiones amino y carboxi-terminal de RAD21 interactúan con los dominios principales de SMC3 y SMC1, respectivamente, formando así un anillo tripartito que envuelve o atrapa la fibra de ADN. La región central de RAD21 se une a SA. Aunque no es necesaria para mantener la integridad del anillo, la subunidad SA es esencial para la unión de la cohesina en la cromatina y para el correcto funcionamiento del complejo. Tres factores (wings apart-like protein homologue (WAPL), PDS5, y la sororina se unen a la cohesina unida a la cromatina y modulan su asociación con ésta. La proteína WAPL y la sororina compiten por la unión a PDS5, aunque WAPL tiene otros sitios de interacción en la cohesina. Texto adaptado de (Losada, 2014).

1.3.2. Comportamiento dinámico de las cohesinas

La integridad del anillo que forman las subunidades principales de las cohesinas es crucial para su asociación topológica con la cromatina. Además, las cohesinas cuentan con proteínas asociadas que actúan como reguladores y se unen a ellas de una forma regulada por el ciclo celular (Figura 4) (Peters & Nishiyama, 2012).

Las cohesinas se unen a la cromatina antes de la replicación del ADN, en vertebrados ya al final de la mitosis, en la telofase (fase G1). Este proceso depende de la actividad ATPasa de las cohesinas y de un heterodímero separado formado por NIPBL/MAU2, también llamado adherina o kollerina (Peters & Nishiyama, 2012). De hecho, una reconstitución bioquímica reciente del proceso de asociación de las cohesinas sobre el ADN indica que las cohesinas tienen la capacidad intrínseca de unirse de forma topológica al ADN, pero que el proceso no es eficiente sin la presencia de NIPBL (Murayama & Uhlmann, 2014). Este heterodímero entra en contacto con las cuatro subunidades de la cohesina y se ha propuesto que quizás funcione como un "eje" molecular para transportar la energía de la hidrólisis de ATP que tiene lugar en los dominios principales de SMC1A y SMC3 a la región bisagra, que se cree que se disocia transitoriamente para permitir la entrada del ADN (Losada, 2014).

Durante la fase G1, las cohesinas se unen a una sola cromátida hermana. Tras la replicación del ADN, el anillo de cohesina rodea las dos cromátidas hermanas y las cohesiona. El establecimiento de la cohesión requiere la acetilación de dos residuos de lisina en el dominio principal de SMC3 por la acción de las acetiltransferasas de cohesinas (CoATs) ESCO1 y ESCO2, así como la unión de la proteína sororina a PDS5. Los complejos de cohesina acetilada unidos a sororina que rodean a las dos cromátidas hermanas se unen de forma estable a la cromatina. Al principio de la mitosis, la mayoría de las cohesinas son disociadas de la cromatina para permitir la eficiente resolución y segregación de las cromátidas hermanas durante la anafase. Dos factores, llamados WAPL (*wings apart-like protein homologue*) y PDS5 se asocian entre sí y con la cohesina unida a la cromatina para disociar la cohesina de la cromatina. Por tanto, la fracción de cohesinas que está presente en la cromatina es el resultado de acciones opuestas de NIPBL-MAU2 y PDS5-WAPL. Este proceso se conoce como la vía de disociación de la profase y requiere la acción de tres proteínas kinasas (CDK1, AURKB y PLK1) que fosforilan a la sororina para que se disocie de PDS5 y de esta forma el complejo PDS5-WAPL pueda descargar las cohesinas (se ha propuesto que la unión de la sororina a PDS5 desplaza a WAPL, previniendo así su acción de descarga o separación de la cromatina).

Una pequeña proporción de cohesinas, mayormente enriquecida en los centrómeros, está protegida de esta disociación por la acción de la shugoshina 1 (SGO1) que está unida a la proteína fosfatasa 2A (PP2A). El complejo SGO1-PP2A reconoce la sororina unida a la cohesina y antagoniza su fosforilación. Esta cohesina centromérica permite la alineación de los cromosomas en la placa metafásica. La activación del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) al inicio de la anafase conduce a la degradación de la securina y a la activación de la separasa. La separasa corta la subunidad RAD21 de la cohesina restante unida a la cromatina, destruyendo así la integridad del anillo y permitiendo la separación de las cromátidas hermanas y la segregación cromosómica. Los complejos de cohesina que se liberan

durante la mitosis pueden reutilizarse en la fase G1 subsiguiente después de que la histona deacetilasa 8 (HDAC8) elimine los grupos acetilo de SMC3 (Losada, 2014).

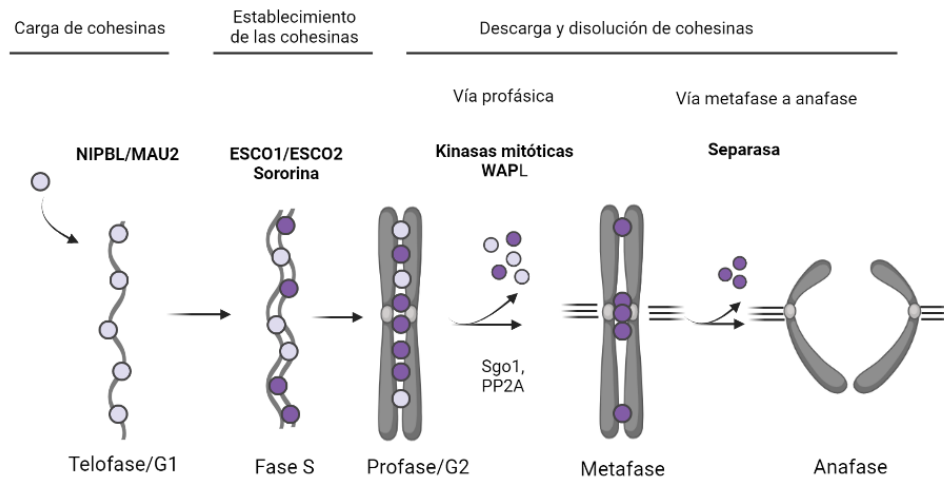


Figura 4. Regulación del ciclo celular de las cohesinas. En vertebrados, los complejos de cohesinas se unen a la cromatina en la salida mitótica de forma dependiente del complejo NIPBL/MAU2. La acetilación de SMC3 por parte de las acetiltransferasas ESCO1/ESCO2 durante la replicación del ADN reclutan a la sororina que contrarresta la actividad anti-establecimiento de WAPL, desencadenando así el establecimiento de la cohesión. La cohesión de las cromátidas hermanas se disuelve durante la mitosis mediante la eliminación completa de los complejos de cohesina de los cromosomas en un proceso de varios pasos. En primer lugar, tiene lugar la disociación de los brazos cromosómicos en la mitosis temprana gracias a la acción de las quinasas mitóticas CDK1, AURKB y PLK1, que promueven la disociación de la sororina y la subsecuente unión de PD5-WAPL. Al mismo tiempo, la shugoshina 1 (SGO1) y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) se acumulan en los centrómeros para contrarrestar los eventos de fosforilación mencionados y evitar la disociación de la cohesina. La cohesina centromérica permanece en la cromatina hasta la anafase, cuando, finalmente, la escisión de RAD21 por la separasa destruye la integridad del anillo de cohesina. Los complejos de cohesina que se liberan durante la mitosis pueden reutilizarse en la fase G1 subsiguiente después de que una cohesina desacetilasa (histona desacetilasa 8 (HDAC8) en las células humanas) elimine los grupos acetilo de SMC3. | (Círculos pequeños); complejos de cohesinas, (Círculos morado claro); complejos de cohesinas que están unidos de forma dinámica al ADN, (Círculos morado oscuro); complejos de cohesinas “cohesivos” que están unidos de forma estable al ADN. Figura y texto adaptados de (Watrín et al., 2016) y (Peters & Nishiyama, 2012).

1.3.3. Funciones de las cohesinas relacionadas con la cohesión

La capacidad de las cohesinas de unirse al ADN les confiere un gran espectro de funciones (Figura 5a). Como se ha explicado anteriormente, las cohesinas aseguran la correcta segregación de los cromosomas. Durante las etapas iniciales de la mitosis, la cohesión promueve una orientación apropiada de los cinetocoros hermanos para facilitar su unión a los microtúbulos de los polos opuestos del huso mitótico. Esto evita la separación de las cromátidas hermanas, que se encuentran bajo las fuerzas de tracción de los microtúbulos del huso, mientras los cromosomas intentan alinearse en la placa metafásica y se adhieren a los dos polos del huso (lo que también se conoce como biorientación de los cromosomas). Durante las fases S y G2, las cohesinas

promueven el reinicio de las horquillas de replicación que se detienen en regiones difíciles de replicar, como los telómeros, y facilitan la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga usando las cromátidas hermanas como molde, evitando así tanto una reparación inexacta como la recombinación entre cromosomas homólogos, lo que llevaría a la pérdida de heterocigosidad (Losada, 2014).

1.3.4. Funciones de las cohesinas independientes de la cohesión

Además de los procesos que garantizan la distribución y la estabilidad del genoma, las cohesinas también participan en otros aspectos de la biología que tienen un gran impacto en la expresión de los genes y que están relacionados con la organización del genoma (Figura 5b). Las cohesinas se unen a la cromatina en sitios específicos del cromosoma, incluyendo centrómeros y promotores de genes altamente transcritos y, a continuación, se transloca a sus sitios de retención final, que son predominantemente posiciones ocupadas por el factor de unión a CCCTC (CTCF) en el caso de los cromosomas humanos, contribuyendo así a la organización topológica del genoma (Garcia et al., 2021). Esta organización está basada en una jerarquía de bucles de cromatina y está detrás de la mayoría de los aspectos del funcionamiento del genoma, incluida la replicación del genoma y la regulación transcripcional de largo alcance (Losada, 2014).

La técnica Hi-C ha permitido la identificación de interacciones de la cromatina de orden superior en todo el genoma (Nishiyama, 2019). En concreto, esta técnica ha conseguido mostrar una organización de las fibras de cromatina en dominios discretos, llamados dominios topológicos (TADs). Los TADs confinan las actividades reguladoras de la transcripción a un dominio específico. Dentro de ese dominio las cohesinas pueden promover la transcripción facilitando la interacción entre un potenciador o “enhancer” y un promotor o bien contribuir a la regulación transcripcional de grupos de genes (Losada, 2014).

Aproximadamente el 60-80% de los sitios donde se unen las cohesinas colocalizan con el factor CTCF y, tanto las cohesinas como el CTCF, se ven enriquecidos en los límites entre TADs, lo que sugiere un papel de estas proteínas en la definición del TAD (Watrín et al., 2016). Las cohesinas se acumulan en sitios activos de inicio de la transcripción en ausencia de CTCF, mientras que la pérdida del complejo de cohesinas suprime la formación de TADs y los bucles asociados, perjudicando la comunicación potenciador-promotor (Garcia et al., 2021) y confirmando así su relevante contribución en la organización del genoma. De hecho, la formación de bucles depende de la actividad ATPasa de las cohesinas, que se piensa que es estimulada por acción de NIPBL. Por tanto, puede que NIPBL tenga un papel notable en el proceso de formación de los bucles de cromatina y los TADs.

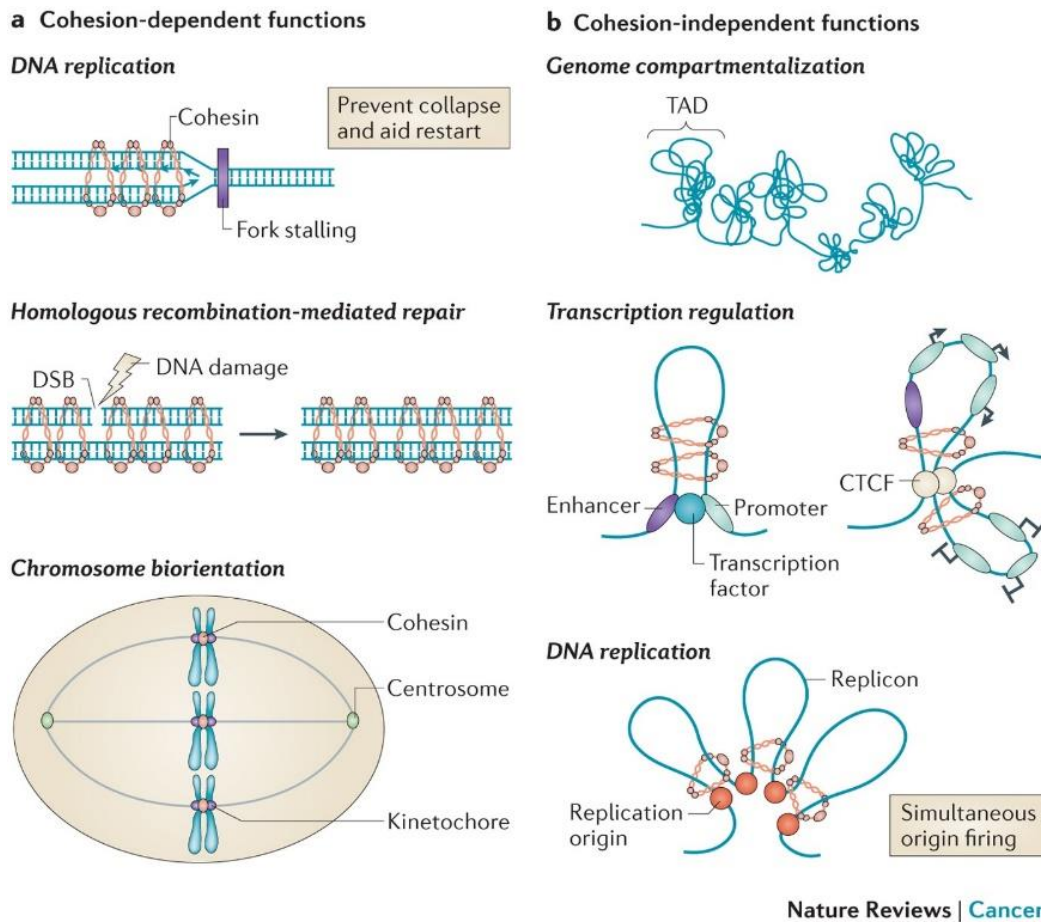


Figura 5. Funciones de las cohesinas. a) Funciones de las cohesinas dependientes de la cohesión. En interfase, la cohesina es importante para estabilizar las horquillas de replicación del ADN estancadas y promover su reinicio. La cohesión también facilita el uso de la cromátida hermana como molde para reparar las roturas de doble cadena (DSB) a través de la reparación mediada por la recombinación homóloga. En la mitosis, la cohesión garantiza la correcta segregación de los cromosomas. Promueve la orientación apropiada de los cinetocoros hermanos para facilitar su unión a los microtúbulos de los polos opuestos del huso y evita la separación de las cromátidas hermanas hasta que todos los cromosomas alcanzan la biorientación. **b)** Las funciones de las cohesinas independientes de la cohesión están relacionadas con la organización del genoma. El genoma está dividido en unidades discretas conocidas como dominios de asociación topológica (TAD) que van de 100 kb a 1 Mb en los mamíferos. Tanto el factor de unión al CCCTC (CTCF) como las cohesinas contribuyen a esta organización, probablemente a través de la formación de bucles de cromatina. Los TADs confinan las actividades reguladoras a un dominio específico. Dentro de un dominio, la cohesina puede promover la transcripción facilitando la interacción entre un potenciador y un promotor o contribuir a la regulación transcripcional de grupos de genes.

1.4. EFECTO DE LAS MUTACIONES EN NIPBL EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL SÍNDROME DE CORNELIA DE LANGE

NIPBL también juega un papel importante en la translocación de las cohesinas a lo largo de las fibras de cromatina. De hecho, se demostró de forma consistente que existe una interacción entre NIPBL y las cohesinas después de su unión al ADN, lo cual sugiere que NIPBL también regula a las cohesinas después de unirse a la cromatina. Además, recientemente se ha

demostrado que para la formación de los bucles de ADN se necesita de la holoenzima formada por las cohesinas y NIPBL, siendo esencial la presencia de NIPBL (Garcia et al., 2021).

El análisis de *chIP-Seq* realizado en nuestro laboratorio (Garcia et al., 2021) mostró que NIPBL se enriquece en regiones de alto contenido en GC (>60%), incluyendo islas CpG. Los promotores, potenciadores o grupos de genes relacionados con el desarrollo son comúnmente regiones ricas en islas CpG. Se observó que NIPBL colocalizaba con islas CpG presentes en las familias génicas implicadas en el desarrollo que son ricas en islas CpG, como los genes *HOX* y *protocadherinas*.

En condiciones normales, las cohesinas se reclutan en los lugares ocupados por NIPBL y se unen a los factores CTCF (que son su destino final) mediante un proceso de traslocación del ADN y formación de bucles de ADN (Figura 6, Control). La formación de estos bucles y la interacción de las cohesinas con la cromatina permiten llevar a cabo la transcripción de un gen o de un grupo determinado de genes, como se ha explicado anteriormente. Sin embargo, en pacientes con *SCdL*, el análisis realizado previamente en nuestro grupo (Garcia et al., 2021) mostró una reducción de la unión de NIPBL en los promotores de fibroblastos derivados de pacientes con *SCdL* (Figura 6, *CdLS*). Esto podría indicar que la proteína NIPBL mutada tiene dificultades para unirse al ADN, mientras que el alelo NIPBL no mutado en los pacientes heterocigotos conserva su capacidad de unirse al ADN. Asimismo, el análisis también mostró que había una mayor cantidad de cohesinas en los sitios ocupados por NIPBL, pero una cantidad menor en los sitios de CTCF. Esto sugiere que la función de holoenzima cohesina-NIPBL para formar los bucles de ADN está afectada y que, por tanto, la traslocación de la cohesina a través del ADN no tiene lugar de la forma esperada en las células de pacientes. La procesividad reducida de la formación del bucle o la incapacidad de extenderse a lo largo de la cromatina podría alterar las interacciones potenciador-promotor y subsecuentemente desregular la expresión génica (Garcia et al., 2021).

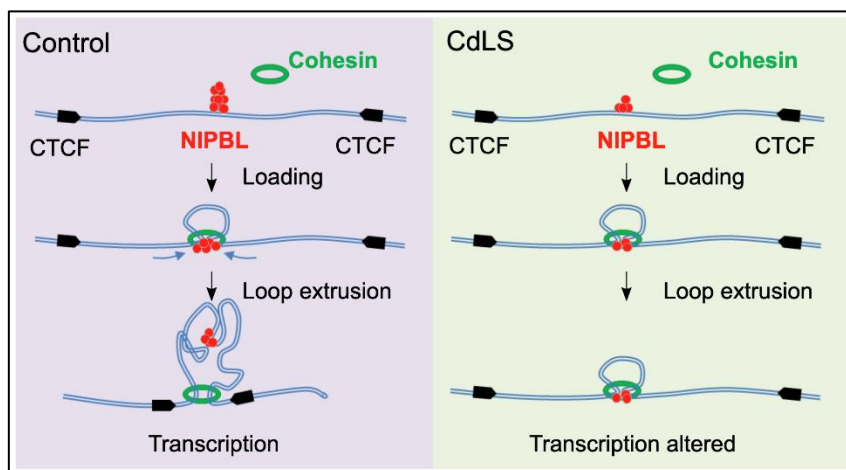


Figura 6. Modelo para la distribución genómica diferencial de NIPBL y las cohesinas en las células derivadas de pacientes con *SCdL*. En condiciones normales, NIPBL (rojo) se enriquece en regiones de alto contenido en GC, incluyendo promotores, potenciadores y grupos de genes. La cohesina (verde) es reclutada en las posiciones ocupadas por NIPBL y alcanza sus sitios finales de cohesina-CTCF (negro) por traslocación del ADN y formación de bucles de extrusión (izquierda). La asociación de la cromatina con

NIPBL está muy reducida en las células derivadas de CdLS. La función defectuosa de NIPBL podría reducir la translocación del ADN de la cohesina y/o la cinética de extrusión del bucle. Los picos de cohesina aumentan en las posiciones ocupadas por NIPBL y se reducen en los sitios de cohesina-CTCF (derecha) (García et al., 2021).

1.5. USO DE CRISPR/CAS9 PARA MODELAR ENFERMEDADES EN CÉLULAS MADRE HUMANAS *IN VITRO*

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) pueden diferenciarse en cualquier célula del cuerpo, lo que abre un enorme potencial de investigación. En combinación con el reciente descubrimiento de las endonucleasas CRISPR/Cas9 en bacterias y su modificación para su uso en la investigación biomédica, estos métodos tienen el potencial de revolucionar el campo de la ingeniería genética y abrir la puerta a la generación de modelos *in vitro* (Freiermuth et al., 2018).

Las iPSCs pueden desarrollarse en prácticamente cualquier tejido del cuerpo humano mediante el suministro de los factores de reprogramación Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc al núcleo de la célula. Cuando las iPSCs son crecidas en cultivo, tienden a agruparse y formar estructuras tridimensionales. Con la introducción de factores bioquímicos específicos, pueden formar organoides, que están compuestos de muchos tipos celulares que mimetizan el ambiente *in vivo* de los tejidos. El estudio con organoides permite realizar un seguimiento de los procesos del desarrollo de tejidos y órganos muy exhaustivo, y, por ende, estudios muy precisos, lo cual no suele conseguirse en estudios *in vivo* en mamíferos (Freiermuth et al., 2018).

El sistema natural de CRISPR/Cas9 es parte del sistema inmune de bacterias y ha sido adaptado para la edición génica. Este sistema utiliza tramos de ADN no codificante, llamadas secuencias repetidas CRISPR, intercaladas con ADN extraño que se incorpora tras la invasión de virus o plásmidos. Estos tramos de secuencias repetidas CRISPR junto con ADN extraño residen en el genoma bacteriano. Los transcritos de estas regiones dan lugar a la formación de ARN CRISPR (crRNA) que contiene una región constante derivada de la secuencia de repetición CRISPR, así como regiones variables del ADN extraño conocidas como secuencias "protoespaciadoras". Estos crRNA hibridan con una segunda molécula de ARN derivada del huésped llamada ARN CRISPR transactivador (tracrRNA), formando un ARN maduro capaz de formar un complejo ribonucleoproteico (RNP) con la endonucleasa Cas9 (Figura 7). La función de la secuencia protoespaciadora es dirigir la nucleasa Cas9 a una secuencia complementaria de ADN, lo que da lugar a un corte de doble cadena en la región diana. Es importante destacar que la escisión sólo puede producirse si el ADN diana contiene una región cercana de 2-6 pares de bases conocida como motivo adyacente al protoespaciador (PAM). El propósito de la secuencia PAM es asegurar que el sistema CRISPR/Cas9 sólo se dirija a ADN exógeno, ya que el genoma de la bacteria huésped no contiene naturalmente secuencias PAM. Este sistema CRISPR/Cas9 de origen natural ha sido alterado para su uso en investigación bioquímica. Específicamente, el crARN-tracrARN ha sido modificado en una sola molécula conocida como ARN de guía única o *single-guide RNA* (sgRNA) que contiene el segmento del tracrARN fusionado con un protoespaciador diseñado específicamente para el experimento. Con esta innovación, solo se requiere introducir la enzima Cas9 purificada junto con el sgRNA y el ADN que se pretende modificar en las células para que

corten el gen de interés (Freiermuth et al., 2018). Sin embargo, actualmente es común trabajar tanto con el formato sgRNA como con el dúplex compuesto por los dos segmentos (crRNA:tracrRNA).

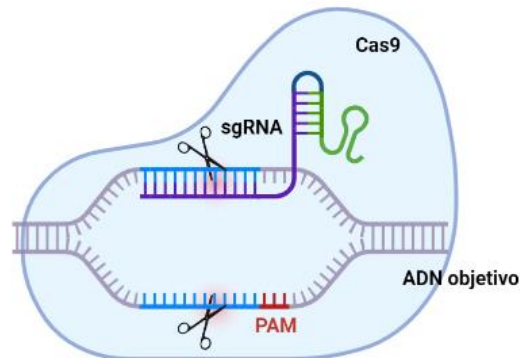


Figura 7. Componentes del sistema CRISPR/Cas9. El sistema CRISPR/Cas9 comprende un ARN guía (ya sea en formato sgRNA o crRNA:tracrRNA) y una nucleasa Cas9, que con conjunto forman un complejo ribonucleoproteico (RNP). El sgRNA está compuesto por dos segmentos: el ARN CRISPR (crRNA) y el ARN transactivador (tracrRNA). La presencia de un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) en el ADN genómico es necesaria para que el sgRNA sea capaz de unirse a la secuencia objetivo. La Cas9 realiza un corte de doble cadena en el ADN (representado por las tijeras). Los mecanismos endógenos de reparación de la célula desencadenados por el corte de doble cadena pueden resultar en el “knockout” de un gen vía mutación que altere el marco de lectura o en el “knock-in” de una secuencia deseada en presencia de un ADN donante. | Morado; crRNA, verde; tracrRNA, azul; secuencia objetivo; rojo: Secuencia PAM.

El sistema CRISPR/Cas9 tiene múltiples usos. Si el objetivo es realizar la interrupción de un gen (*knockout*) para que no se produzca una proteína funcional es necesario que tenga lugar la reparación por extremos no homólogos (NHEJ: *Non-Homologous End Joining*). Si, por el contrario, el objetivo es reemplazar el objetivo con una secuencia diferente (*knock-in*) la célula puede ser dirigida hacia la reparación por homología directa (HDR: *Homology-Directed Repair*) (Figura 8). Para ello es necesaria la introducción en la célula, junto con los componentes CRISPR, de un ADN donante que contiene el cambio deseado y que está flanqueado por regiones de homología. Las células usarán este molde para reparar la secuencia cortada vía recombinación homóloga, incorporando así los cambios deseados en la secuencia objetivo (CRISPR 101 Your Guide to Understanding CRISPR Introduction to Genome Editing, Synthego).

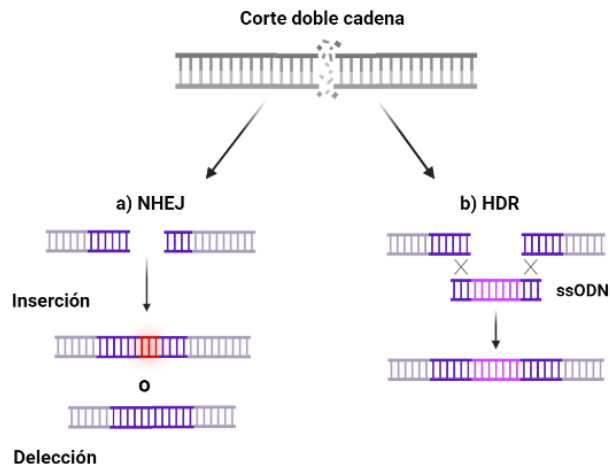


Figura 8. Edición mediante CRISPR/Cas9 en función del mecanismo de reparación. A partir del corte de doble cadena que realiza la nucleasa Cas9 en el ADN, pueden tener lugar dos mecanismos de reparación. **a)** La Reparación por extremos no homólogos (NHEJ) es una vía propensa a errores que a menudo inserta o elimina nucleótidos (indels). **b)** Si la célula dispone de un ADN donante (ssODN) con extremos homólogos y con la mutación deseada, tiene lugar el mecanismo de reparación por homología directa (HDR).

Comúnmente, el sistema CRISPR se utiliza para modelar enfermedades causadas por defectos genéticos únicos y conocidos, aunque gracias a su versatilidad también es capaz de modelar desórdenes que afectan a más de un gen gracias a su capacidad de manipular varios genes simultáneamente o en cualquier secuencia deseada. Esta aproximación permite un estudio más detallado de la fisiopatología de la enfermedad y también permite realizar intervenciones directas, como ensayos con fármacos, en un modelo que se acerca mucho al tejido *in vivo* humano (Freiermuth et al., 2018). La versatilidad de este sistema lo hace muy útil para construir estos modelos y ha demostrado su eficacia en el estudio de enfermedades muy variadas, como han reportado Choi & Meyerson (2014), Freedman et al. (2015) o Matano et al. (2015).

1.6. ANTECEDENTES

1.6.1. Creación de un modelo de la enfermedad mediante CRISPR/Cas9

En el laboratorio trabajamos principalmente con fibroblastos primarios humanos derivados de pacientes con Cornelia de Lange. Sin embargo, los fibroblastos dermales no son los tejidos más representativos de la enfermedad. Por ello, se quiere obtener células iPSC a partir de los fibroblastos dermales de pacientes. Debido a la pandemia de Covid19, en los últimos años no hemos conseguido muestras frescas de fibroblastos a partir de los cuales poder obtener iPSC. Por ello, como alternativa, nos planteamos obtener un modelo de Cornelia introduciendo la mutación de un paciente ampliamente estudiado en el laboratorio mediante edición génica por CRISPR/Cas9. En primer lugar, se quiere poner a punto la estrategia de CRISPR/Cas9 en fibroblastos dermales (al ser más fácil de trabajar con ellos) para luego pasar a realizarlo en células iPSC control. Para tratar de crear un modelo del Síndrome de Cornelia de Lange en iPSCs se empleó el sistema CRISPR/Cas9. Para llevarlo a cabo, previamente en el laboratorio se realizaron dos diseños que empleaban estrategias diferentes para tratar mimetizar las

mutaciones de dos de los pacientes de los que se disponía (pacientes 1 y 3) en el gen *NIPBL* control. Ambos pacientes tenían la mutación en el mismo nucleótido, el 6647 del cDNA. Las mutaciones de estos pacientes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Mutaciones del gen *NIPBL* en el nucleótido 6647 del cDNA de dos pacientes con SCdL que se trataron de mimetizar mediante la edición génica con CRISPR/Cas9 en células control.

Paciente	Mutación	Cambio introducido
1	Tyr2216Ser	A>C
3	Tyr2216Cys	A>G

Los diseños 1 (paciente1) y 1B (paciente 3) se realizaron siguiendo la misma estrategia, pero cambiando un nucleótido del ADN donante (ssODN). Esta estrategia consistió en introducir una mutación silenciosa CCT→CTT (Serina>Serina) en la secuencia PAM. Por un lado, al mutar esta secuencia se evita el reconocimiento por parte de la Cas9 una vez la mutación deseada ha sido introducida (pues la secuencia PAM desaparece) y, por ende, sucesivos cortes indeseados. En el Diseño 1, se utilizó un ADN donante que incorporaba la mutación del paciente 1 (Tyr2216Ser), mientras que en el Diseño 1B se utilizó un ADN donante que incorporaba la mutación del paciente 3 (Tyr2216Cys). El hecho de poder realizar la misma estrategia para mimetizar la mutación de ambos pacientes se pudo llevar a cabo porque ambos tenían la mutación en el mismo nucleótido, por lo que solo fue necesario sintetizar un nuevo ssODN que en lugar de tener la mutación de paciente 1 tuviera la del paciente 3.

A su vez, al introducir esta mutación silenciosa se introdujo un sitio de restricción (CCTCAG→CTTCAG) para la enzima Acul (Eco57I / Eco57MI) para realizar el posterior rastreo de los clones positivos tras la edición génica. Para analizar los clones, se amplifica por PCR la región del gen *NIPBL* que contiene la región a editar. El fragmento editado que se obtiene tras la amplificación por PCR necesaria para comprobar los clones tiene un tamaño de 609 pb. Si la edición ha sido exitosa, el sitio de restricción habrá sido incorporado y, en teoría, Acul debería cortar en la posición 243 y generar dos fragmentos de 243pb y 366 pb que se visualizan mediante una electroforesis en gel de agarosa (Figura 9).

ssODN1: 120 pb

```
GCCTTTATTTCAGCATCCAAGTCTAATGTTTCGAGCAAGAAGTGAAGAATCTATCTAATAATATTTTATCTGATAAGAAGCTTTCTCAGT  
CAATTTAAAAATACAA GTGTTAAAAAACCTCCAG
```

Amplificón: 609 pb

Secuencia nativa

```
TGCTTCTCTAGGTAAGGCCACCAGCATATTCTTCCAGTCATTTTAAGTTTTAATTTTTTGAATAAAGGAGCCGTTTATATAATTTATTA  
CATATTTATTAATGTTTTATTTAATTTAATATGAATATATGATGAGATTTTTCCCTCTCCCATAGGATTTGCCTTTATTCAGCATCC  
AAGTCTAATGTTTCGAGCAAGAAGTGAAGAATCTATAATAATATTTTATCTGATAAGAAGCTCTCAGTCAATTTAAAAATACAA GTGTT  
AAAAAACCTCCAGACCTACCTACAGAGAAGATACACGTATGCAGCAGGCAGATAGAGACTGTAAGTGAAATATATTTTTAAATTTCA  
TAGCTACATTTATATAATGGCTTTATCTTCTTTAATCTAAATATCTAAATTTCCCTTATTTGTTAGATGAAGAAATTCAGTTAAATAG  
CAGTCCCTATGCTGAGGCTATAGCTGGGCTTTAGCATATTTCTAAATCTCTAAATAGTTTTAAATTTGTATATGTGTGTAACATTA  
ACATTTTGAGGGAGAAAGAGATTATAGTTCTCACTGGGTTCTCAAAGGGCCTCTGACACAGACACA
```

Secuencia knock-in ssODN1

```
TGCTTCTCTAGGTAAGGCCACCAGCATATTCTTCCAGTCATTTTAAGTTTTAATTTTTTGAATAAAGGAGCCGTTTATATAATTTA  
TTAACATATTTATTAATGTTTTATTTAATTTAATATGAATATATGATGAGATTTTTCCCTCTCCCATAGGATTTGCCTTTATTT  
CAGCATCCAAGTCTAATGTTTCGAGCAAGAAGTGAAGAATCTATCTAATAATATTTTATCTGATAAGAAGCTCTCAGTCAATTTAAA  
AATACAA GTGTTAAAAAACCTCCAGACCTACCTACAGAGAAGATACACGTATGCAGCAGGCAGATAGAGACTGTAAGTGAAAT  
ATATTTTAAATTTATAGCTACATTTATATAATGGCTTTATCTTCTTTAATCTAAATATCTAAATTTCCCTTATTTGTTAGAT  
GAAGAAATTCAGTTAAATAGCAGTCCCTATGCTGAGGCTATAGCTGGGCTTTAGCATATTTCTAAATCTCTAAATAGTTTTAA  
AATGTATATGTGTGTAACATTAACATTTTGAGGGAGAAAGAGATTATAGTTCTCACTGGGTTCTCAAAGGGCCTCTGACACA  
GACACAC
```

Figura 9. Diseño del screening del Diseño 1 del CRISPR/Cas9. El ADN donante (ssODN1) incorpora la mutación que se pretende introducir (A>C) y a su vez, una mutación silenciosa en la secuencia PAM (CTT>CCT) que hace desaparecer la PAM una vez se ha producido el corte y la incorporación del ssODN y hace aparecer un sitio de restricción para la enzima AclI. Tras amplificar mediante PCR el fragmento editado (609 pb), teóricamente, AclI debería digerir el cortar en la posición 243 y generar dos fragmentos de 243 pb y 366 pb. El diseño 1B es idéntico al 1 a diferencia de que el ssODN incorpora la mutación A>G en vez de A>C. |Morado: Sitio de unión del sgRNA, Verde oscuro: Primers, Amarillo: Secuencia PAM, Letras rojas: Nucleótidos que se pretenden mutar.

En el Diseño 2, se utilizó una guía de ARN (sgRNA) y ADN donante(ssODN) diferente al de los Diseños 1 y 1B y se trató de mimetizar de nuevo la mutación del paciente 3. Se intentó introducir una mutación silenciosa (Prolina>Prolina) en la secuencia PAM de la misma forma que en el Diseño 1 y 1B. Sin embargo, no se prevenía un segundo corte porque todos los codones que codifican para la Prolina tienen secuencia PAM, por lo que también fue necesario introducir dos mutaciones silenciosas en el ssODN (ADN donante) en la secuencia de unión con el sgRNA para evitar la unión del sgRNA y subsecuentes cortes. En este diseño, al introducir las mutaciones silenciosas en la PAM se creó un sitio de restricción (CAAG→CTAG) para la enzima XspI (Bfal/Mael). De este modo, en caso de haber sido exitosa la edición, la enzima realizaría dos cortes en las posiciones 8 y 108 y se obtendrían dos fragmentos de 8 pb, 172pb y 429 pb. En caso contrario, solo realizaría un corte en la posición 8, lo cual generaría un fragmento grande de 601 pb y otro de 8 pb (Figura 10).

ssODN2: 120 pb

```
CCCATAGGATTTGCCTTTATTTCAGCATCCTAGCTTAATGTTTCGAGCAAGAAGTGAAGAATCTATCTAATAATATTTTATCTGATAA  
GAACTCCTCAGTCAATTTAAAAATACAAGTGTTA
```

Amplificón: 609 pb

Secuencia nativa

```
TGCTTCTCTAGGTAAGGCCACCAGCATATTCTCCAGTCATTTAAGTTTAAATTTTTGAAATAAGGAGCCGTTTATATAATTTA  
TTAACATATTTATTAATGTTTTATTTAATTTAATATGAATATATGATGAGATTTTCCCCTCTCCCATAGGATTTGCCTTTATT  
CAGCATCCAAGTCTAATGTTTCGAGCAAGAAGTGAAGAATCTATCTAATAATATTTTATCTGATAAGAAGTCTCAGTCAATTTAAA  
AATACAAGTGTAAAAAACCTCCAGACCTACCTACAAGAAGAAGATACACGTATGCAGCAGGCAGATAGAGACTGTAAGTAAAAAT  
ATATTTTTAAATTTTCATAGCTACATTTATATATAATGGCTTTATCTCTTTAATCTAAATATCTAAATTTCTTATTTGTTAGAT  
GAAGAAATTCAGTTAAATAGCAGTCTTATGCTGAGGTCTATAGCTGGGCTTTAGCATATTCTTAAATTTCTTAAATAGTTTTAA  
AATTGTATATGTGTGTAACATTAACATTTTGAGGGAGGAAAGAGATTATAGTTCTCACTGGGTTCTCAAASGGGCCTCTGACACA  
GACACAC
```

Secuencia knock-in ssODN2

```
TGCTTCTCTAGGTAAGGCCACCAGCATATTCTCCAGTCATTTAAGTTTAAATTTTTGAAATAAGGAGCCGTTTATATAATTTA  
TTAACATATTTATTAATGTTTTATTTAATTTAATATGAATATATGATGAGATTTTCCCCTCTCCCATAGGATTTGCCTTTATT  
CAGCATCCTAGCTTAATGTTTCGAGCAAGAAGTGAAGAATCTATCTAATAATATTTTATCTGATAAGAAGTCTCAGTCAATTTAAA  
AATACAAGTGTAAAAAACCTCCAGACCTACCTACAAGAAGAAGATACACGTATGCAGCAGGCAGATAGAGACTGTAAGTAAAAAT  
ATATTTTTAAATTTTCATAGCTACATTTATATATAATGGCTTTATCTCTTTAATCTAAATATCTAAATTTCTTATTTGTTAGAT  
GAAGAAATTCAGTTAAATAGCAGTCTTATGCTGAGGTCTATAGCTGGGCTTTAGCATATTCTTAAATTTCTTAAATAGTTTTAA  
AATTGTATATGTGTGTAACATTAACATTTTGAGGGAGGAAAGAGATTATAGTTCTCACTGGGTTCTCAAASGGGCCTCTGACACA  
GACACAC
```

Figura 10. Diseño del screening del Diseño 2 del CRISPR/Cas9. El ADN donante (ssODN2) incorpora la mutación que se pretende introducir (A>C) y a su vez, una mutación silenciosa en la secuencia PAM (CAA>CCT) que no evita posteriores cortes de la Cas9. Por evitarlo, se incorporan dos mutaciones silenciosas en el ssODN en la secuencia de unión con el sgRNA2 (bases de color rojo en el tramo verde → CT). La mutación silenciosa en la PAM hace aparecer un sitio de restricción para la enzima XspI. Tras amplificar mediante PCR el fragmento editado (609 pb), teóricamente, XspI debería cortar en las posiciones 8 y 180 y generar dos fragmentos visibles de 172 pb y 428 pb |Verde: Sitio de unión del sgRNA, Verde oscuro: Primers, Amarillo: Secuencia PAM, Letras rojas: Nucleótidos que se pretenden mutar.

Aproximadamente 106 fibroblastos control se nucleofectaron con la Cas9 True Cut en proteína (250 pmol), el ARN guía (tras el anillamiento del crRNA y el tracrRNA) (300 pmol), y el ADN donante (100 mM). Tras la nucleofección se dejaron crecer una semana y, a partir de aquí fue posible comenzar con las diluciones seriadas.

1.6.2. Purificación de NIPBL para estudios funcionales

Por otra parte, se ha visto que NIPBL regula la actividad ATPasa del complejo de cohesinas. Para estudiar *in vitro* si la proteína NIPBL mutada tiene alterada dicha función, anteriormente en el laboratorio se clonaron plásmidos que contenían la versión *wild-type* y una versión mutada de NIPBL que mimetizaba la mutación del paciente 3 (Tyr2216Ser) y se les introdujo la etiqueta GST para permitir una posterior purificación de la proteína por cromatografía de afinidad. La etiqueta GST permite una purificación y una caracterización funcional más fácil porque promueve la solubilidad de la proteína de interés fusionada a ella.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es crear un modelo de la enfermedad en iPSCs por edición génica con CRISPR/Cas9 a partir de las mutaciones de dos de los pacientes estudiados en el laboratorio. Para ello, previamente se pretende poner a punto el sistema CRISPR/Cas9 en fibroblastos primarios humanos. La edición génica fue previamente realizada en el laboratorio.

Los objetivos específicos son:

- 1- Puesta a punto de la edición génica de *NIPBL* mediante CRISPR en fibroblastos humanos. Se realizará el rastreo de clones positivos para la mutación deseada mediante diversas estrategias de diluciones seriadas (*single-cell seeding*) y técnicas de biología molecular.

En paralelo, se comprobará mediante una prueba de CRISPR/Cas9 *in vitro* si las guías (sgRNA) que se diseñaron son eficaces reconociendo la secuencia específica para la que fueron teóricamente diseñadas.

Por otra parte, como se sospecha que NIPBL estimula la actividad ATPasa de las cohesinas:

- 2- Estudio de la actividad ATPasa de las cohesinas en presencia de modelos *in vitro* de SCdL. En el laboratorio se prepararon anteriormente plásmidos que contienen el gen *NIPBL* no mutado y el gen *NIPBL* que contiene la mutación XX mimética de un paciente con SCdL. Se introducirán las versiones de NIPBL en fibroblastos control para posteriormente purificar y poder realizar ensayos ATPasa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Los fibroblastos dérmicos primarios de individuos con SCdL y de individuos control fueron cedidos por el Dr J.Pie , la Dr A. Latorre-Pellicer, la Dr B. Puisac, y el Dr. F. Ramos del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza. El protocolo de recogida de muestras fue supervisado y aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" de Zaragoza y del Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL). El diseño y la realización del estudio cumplieron con todas las normativas pertinentes relativas a la utilización de participantes en estudios humanos y se llevaron a cabo de acuerdo con los criterios establecidos por la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados previamente y dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio.

Los fibroblastos dermales primarios se crecieron con DMEM conteniendo 10% de suero bovino fetal (FBS). Para preparar el medio, primero se descongeló el FBS a 37°C y se inactivó en un baño a 56°C durante 30 min, agitando ocasionalmente. Para preparar el medio de cultivo DMEM al 10% de suero se partió de 500mL de DMEM al que se le añadieron 54 mL de FBS inactivado + 5 mL de una solución 100x de Penicilina/Estreptomina (Biowest).

Para descongelar las células que se hallaban en viales en nitrógeno líquido se introdujeron los viales rápidamente en un baño a 37°C sin dejar que se descongelaran del todo. Para terminar de descongelar por completo, se resuspendió suavemente con una pipeta y se pasó todo el contenido del vial a un tubo de 15 mL que contenía 9 mL de DMEM al 10% de FBS. A continuación, se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm y se descartó el sobrenadante por aspiración. El pellet generado se resuspendió cuidadosamente en 1 mL de DMEM al 10% de FBS. Finalmente, las células se sembraron en placas de 100 mm a las que previamente se había añadido 9 mL de DMEM al 10% de FBS. Las placas se incubaron a 37°C en presencia de CO₂.

3.2. AISLAMIENTO DE CLONES EDITADOS GENÉTICAMENTE POR CRISPR/CAS9

Para aislar clones editados por CRISPR/Cas9 se realizaron diferentes estrategias de diluciones seriales, como se muestra en las Tablas 2,3,4 y 5.

Tabla 2. Representación esquemática de la estrategia 1 de dilución seriada de fibroblastos en una placa de 96 micropocillos. Se representa el número de células depositadas en cada pocillo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
B	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
C	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
D	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
E	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
F	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
G	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
H	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1

Tabla 3. Representación esquemática de la estrategia 2 de dilución seriada de fibroblastos en una placa de 96 micropocillos. Se representa el número de células depositadas en cada pocillo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	32	16	8	4	2	1	32	16	8	4	2	1
B	32	16	8	4	2	1	32	16	8	4	2	1
C	32	16	8	4	2	1	32	16	8	4	2	1
D	32	16	8	4	2	1	32	16	8	4	2	1
E	32	16	8	4	2	1	32	16	8	4	2	1
F	32	16	8	4	2	1	32	16	8	4	2	1
G	32	16	8	4	2	1	32	16	8	4	2	1
H	32	16	8	4	2	1	32	16	8	4	2	1

Tabla 4. Representación esquemática de la estrategia 4 de dilución seriada de fibroblastos en una placa de 96 micropocillos. Se representa el número de células depositadas en cada pocillo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200	100	50	25	12,5	6,25	200	100	50	25	12,5	6,25
B	200	100	50	25	12,5	6,25	200	100	50	25	12,5	6,25
C	200	100	50	25	12,5	6,25	200	100	50	25	12,5	6,25
D	200	100	50	25	12,5	6,25	200	100	50	25	12,5	6,25
E	200	100	50	25	12,5	6,25	200	100	50	25	12,5	6,25
F	200	100	50	25	12,5	6,25	200	100	50	25	12,5	6,25
G	200	100	50	25	12,5	6,25	200	100	50	25	12,5	6,25
H	200	100	50	25	12,5	6,25	200	100	50	25	12,5	6,25

Tabla 5. Representación esquemática de la estrategia 3 de dilución seriada de fibroblastos en una placa de 96 micropocillos. Se representa el número de células depositadas en cada pocillo.

	1	2	3	4	5	6
A	80	40	20	10	5	2.5
B	64	32	16	6	4	2
C	32	16	8	4	2	1
D	20	10	5	2.5	1.25	0.6

Para realizar las diluciones seriadas, a partir de una placa de 100 mm con un cultivo de fibroblastos a una confluencia >90%, se retiró el medio, se lavó con 8 mL de PBS, se añadió 2 mL de tripsina y se dejó incubar durante 3-5 min hasta que las células estuvieron despegadas. A continuación, se añadió 8 mL de DMEM con 10% de FBS para neutralizar la tripsina y se centrifugó a 1000 x g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 mL de DMEM 10% de FBS. A continuación, se tomó una alícuota de las células para contarlas en una cámara Neubauer para estimar su concentración. A partir de este dato, se ajustó el volumen para introducir la cantidad deseada de células en la primera columna de la placa (variable según la estrategia) y se completó con medio de cultivo (hasta 200 µl en las placas de 96 y hasta 500 µl en las de 24). El resto pocillos se llenaron con 100 µl de medio en las placas de

96 (Tabla 2,3,4) y con 500 µl en las de 24 (Tabla 5). El medio de cultivo empleado fue DMEM al 15% de FBS.

Para realizar las diluciones seriadas, con una pipeta multicanal, se fue realizando una dilución 1:2 sucesivamente entre pocillos, hasta alcanzar la dilución en la que se espera obtener una única célula en el pocillo. En las estrategias 1 y 3 se realizó la dilución a lo largo de toda la placa, mientras que en la 2 y la 4 se utilizaron las dos mitades de la placa y se imitó en ambas el proceso de dilución. Las placas se incubaron a 37°C.

En total, se realizaron diluciones seriales en un total de 10 placas por cada estrategia (Tabla 6).

Tabla 6. Número de placas cultivadas de los diseños 1, 1B y 2 mediante las 4 estrategias propuestas.

Diseño	Estrategia	Nº placas	TOTAL
1	1	3	10
	2	3	
	3	2	
	4	2	
1B	1	3	10
	2	3	
	3	2	
	4	2	
2	1	3	10
	2	3	
	3	2	
	4	2	

3.3. SELECCIÓN DE CANDIDATOS Y PASES DE FIBROBLASTOS

Los fibroblastos cultivados en el apartado 3.2 se observaron el mismo día y después con asiduidad con un microscopio invertido (Leica DMC 4500) con el fin de encontrar pocillos que contuvieran idealmente una única célula. Los candidatos seleccionados se dejaron crecer hasta que alcanzaron una confluencia alta (> 80%) y se fueron expandiendo en placas más grandes. Para comenzar con el proceso de expansión clonal, se calculó el aumento de superficie que había de las placas de 96 pocillos a las placas de 24. El pase de 96 a 24 suponía un aumento de la superficie (cm²) del pocillo aproximadamente del orden de 5 veces. Con este factor de expansión se asegura una buena expansión y supervivencia de las células. Con un factor más alto existe la posibilidad de que los fibroblastos no crezcan por falta de contacto. El tamaño de la siguiente placa se calculó respetando el mismo factor de expansión respecto a las primeras placas, siendo la placa adecuada la de 6 pocillos. Por tanto, se realizó el proceso de expansión siguiendo el orden 96-24-6 (Figura 11). A partir de placas de 6 pocillos se recogieron las células para realizar la extracción de ADN genómico.

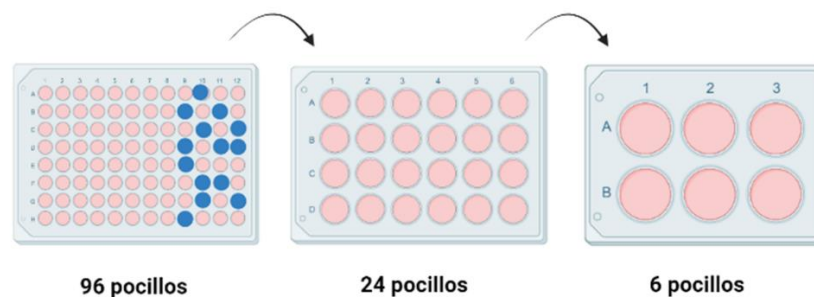


Figura 11. Representación esquemática del proceso de expansión de colonias individuales de fibroblastos. Los candidatos seleccionados en las placas iniciales de 96 o 24 pocillos con las diluciones seriales (azul) se pasaron a una placa más grande siguiendo el orden 96-24-6 una vez hubieron alcanzado una confluencia alta (> 80%) en cada una de ellas.

3.4. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Previamente a empezar con las extracciones de ADN genómico, se compararon los kits de extracción de las casas comerciales Macherey-Nagel y Zymo Research con la finalidad de realizar las extracciones posteriores con aquel que proporcionara mejores resultados.

En primer lugar, se testaron los dos kits con unas células control. La extracción se realizó a partir de células HDF comerciales (Ref.: C-12302, Merck KGaA Darmstadt, Alemania) siguiendo los protocolos proporcionados en los kits Quick DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research) y NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). Se extrajo ADN de 3 muestras diferentes de HDF con cada kit. Tras la extracción, se midió la concentración en Nanodrop (Tabla 7).

Tabla 7. Concentración de ADN y ratios de calidad en las muestras de HDF comerciales tras la extracción con los kits de Zymo-Research y Macherey-Nagel.

Kit de extracción	Muestra	ng/ml	A260/280	A260/230
Zymo-research	1	75,35	1,771	0,594*
	2	79,55	1,678	1,355*
	3	71,4	1,763	1,772*
Macherey-nagel	4	185,2	2,017	2,285
	5	98,4	1,952	2,249
	6	87	1,966	2,242

Como muestran los datos recogidos en la Tabla 7, el kit de Macherey-Nagel ofreció mejores ratios en comparación con el de Zymo-Research. Con los resultados obtenidos se decidió realizar todas las extracciones posteriores de ADN genómico de los fibroblastos candidatos con el kit Nucleospin® Tissue de Macherey-Nagel (protocolo estándar para tejidos humanos o animales y cultivos celulares).

Para realizar las extracciones, se preparó la muestra a partir del cultivo celular de fibroblastos candidatos que se hallaban en placas de 6 pocillos. Para ello, se resuspendieron al menos 10^2 células en un volumen final de 200 μ l del tampón de lisis T1. Se añadieron 25 μ l de solución de

Proteinasa K y 200 μ l del tampón de lisis B3. Se mezclaron con un vórtex y se incubaron las muestras a 70°C durante 10-15 minutos. Para ajustar las condiciones de unión de ADN se añadió 210 μ l de etanol (96%-100%) a la muestra y se agitó vigorosamente en un vórtex. Para la unión del ADN, se colocó una columna de tejido NucleoSpin® en un tubo colector y se aplicó la muestra en la columna. A continuación, se centrifugó durante 1 minuto a 11,000 x g. Se descartó el tubo colector con el fluido que atravesó la columna y se colocó la columna en un nuevo tubo colector. Para lavar la membrana de sílice se realizó un primer lavado en el que se añadió 500 μ l del tampón de lavado BW, se centrifugó durante 5 minutos a 11,000 x g, se descartó el fluido que atravesó la columna y se volvió a colocar la columna de nuevo en el tubo colector. Para el segundo lavado, se añadió 600 μ l de tampón de lavado concentrado B5 a la columna y se siguieron los mismos pasos que en el primer lavado. Para secar la membrana, se centrifugó la columna durante 5 minutos a 11,000 x g. Finalmente, para eluir el ADN se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se añadió 50 μ l de tampón de elución BE. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y a continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 11,000 x g.

3.5. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DE INTERÉS DE NIPBL

Para la amplificación del fragmento de *NIPBL* que contiene la mutación de interés a partir del ADN extraído con las columnas NucleoSpin® se realizó una PCR. Para cada muestra, se realizó la mezcla siguiendo las recomendaciones del fabricante (Nzytech) (Tabla 8) y, posteriormente, se introdujeron las muestras en un termociclador en las condiciones que se recogen en la Tabla 9. Los *primers* directo (FW) y reverso (REV) fueron los siguientes: NIPBL_FW 5'TGCTTCTCTAGGTAAGGCCACCAGC 3' y NIPBL_REV 5'GTGTGTCTGTGTCAGAGGCCCC 3'.

Tabla 8. Componentes de la mezcla de PCR. Volúmenes y cantidades añadidos por reacción.

Componentes	Para 1 reacción
ADN molde	120 ng
Tampón de reacción 10x	5 μ l
MgCl ₂ , 50 mM	2.5 μ l (2.5 mM)
dNTPs mix	1.25 μ l (0.25mM)
Primers (directo y reverso)	1.25 μ l (0.25 μ M)
NZYTaq II (5U/ μ l)	0.5 μ l
H2O libre de nucleasas	Hasta 50 μ l

Tabla 9. Condiciones de la PCR.

Fase	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Anillamiento	61°C	30 segundos	
Extensión	72°C	20 segundos	
Extensión final	72°C	7 minutos	-

3.6. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Los productos de PCR se purificaron haciendo uso del kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). En primer lugar, se añadió 100 µl de tampón NTI a los 50 µl de producto de PCR. A continuación, se colocó una columna NucleoSpin® en un tubo colector de 2 mL y se añadió todo el volumen anterior a la columna para unir el ADN. Se centrifugó durante 30 segundos a 10.000 x g, se descartó el flujo que atravesó la columna y se volvió a colocar la columna en el tubo. La columna se lavó dos veces consecutivas mediante la adición de 500 µl del tampón NT3 y centrifugación durante 30 segundos a 10.000 x g. En ambos pasos se descartó el flujo que atravesó la columna. Para eliminar el tampón NT3 restante de la columna, se centrifugó a 11.000 x g durante 1 minuto, se descartó el tubo colector y se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 mL. Para la elución del ADN se añadieron 30 µl de tampón de elución (NE) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Finalmente, se centrifugó durante 1 min a 11.000 x g y se descartó la columna, quedando así el ADN purificado en el tubo de 1.5 mL.

3.7. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La digestión enzimática de los fragmentos de ADN purificados de los candidatos seleccionados se realizó con las enzimas AclI y BfaI (isoesquímicos de XspI) proporcionadas por New England Biolabs Inc. La reacción con ambas enzimas se realizó en las mismas condiciones. El tampón utilizado para la digestión en todos los casos fue NEBuffer™3 (New England Biolabs). La reacción tuvo lugar durante una hora a 37°C y el mix de digestión consistió en: 5 µL de DNA + 2 µL de tampón NEBuffer™3 (New England Biolabs) + 0.1 µL del enzima correspondiente + 12,9 µL de H₂O libre de nucleasas (volumen total de 20 µL). El volumen de ADN se calculó en función de la concentración obtenida en el gel sabiendo que por cada 1 µg de ADN se ha de añadir 1 µl de enzima.

Para la electroforesis se utilizó un gel de agarosa al 1,5%. Para la preparación de dicho gel se procedió de la siguiente manera: Se prepararon 50 mL de tampón TAE 1X y se añadieron 0,75 g de agarosa SeaKem® LE Agarose (Lonza, Rockland, ME, USA). Después, se calentó la mezcla en un microondas y se añadieron 5 µL del colorante Safeview® (New England Biolabs Inc., Biologicals Ltd, Cambridshire, UK). Se dejó enfriar y gelificar. Una vez preparado el gel, se cargaron 10 µL de cada producto de digestión junto con 2 µL del colorante Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England Biolabs Inc.) y 4 µL del marcador de peso molecular DNAMark™ 50 bp Plus Ladder (G-Biosciences®, Geno Technology Inc., USA).

3.8. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO MEDIANTE MAXIPREP

La extracción del ADN plasmídico se realizó con el kit PureLink® HiPure Plasmid Filter Purification Kits (Invitrogen™ by Life Technologies).

Se descongelaron cultivos de *E.coli* transformadas con los plásmidos E571 y E572 y se plaquearon en LB con 100 µg/mL de ampicilina. A partir de estas placas se hizo un precultivo de 20 mL que creció durante toda la noche a 37°C. Este precultivo se utilizó como inóculo para un nuevo cultivo de 500 mL de LB con ampicilina. Cuando la densidad óptica alcanzó

aproximadamente el valor de 1,5 se procedió a extraer y purificar el ADN plasmídico. En primer lugar, se equilibró la columna añadiendo 30 mL del Tampón de equilibrado (EQ1) directamente en el cartucho de filtración que se encontraba dentro de la columna. Se dejó pasar el tampón a través del filtro por gravedad. Las células se recogieron por centrifugación del cultivo a 4000 x g durante 10 minutos. Se retiró el medio y las células se resuspendieron en 10 mL de Tampón de resuspensión (R3) con RNasa mediante agitación suave, hasta que la suspensión celular fue homogénea. Para lisar las células se añadió 10 mL de Tampón de lisado (L7) y se mezcló suavemente por inversión hasta que la mezcla fue homogénea. El lisado se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadió 10 mL de Tampón de precipitado (N3) y se mezcló inmediatamente por inversión del tubo hasta que la mezcla fue homogénea. Para clarificar la mezcla, se transfirió el lisado a la columna y se dejó filtrar a través de la columna por gravedad. Inmediatamente después de que el lisado dejara de gotear de la columna, se retiró el cartucho de filtración interior y se lavó la columna con 50 mL de Tampón de lavado (W8), descartando el flujo que atravesó la columna. Finalmente, para eluir el ADN plasmídico se colocó un tubo de centrifuga estéril de 50 mL debajo de la columna HiPure Filter Column y se añadió 15 mL de Tampón de elución (E4) a la columna. Se dejó filtrar el tampón por gravedad y cuando el flujo cesó se descartó la columna. El tubo de elución contenía el ADN plasmídico purificado.

El ADN se precipitó mediante la adición de 10.5 mL de isopropanol al tubo de elución. Seguidamente, se centrifugó el tubo a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se repitió el paso anterior de centrifugación, pero durante 5 minutos. Finalmente, se dejó secar al aire el pellet durante 10 minutos y se resuspendió en 200 µL de Tampón TE.

3.9. NUCLEOFECCIÓN DE HDF

Los plásmidos que contenían NIPBL-GST *wild-type* (E571) y NIPBL-Y2216S-GST (E572) purificados en el apartado anterior fueron utilizados para nucleofectar fibroblastos dérmicos humanos (HDF) comerciales. Como control negativo se nucleofectó una muestra de HDF sin plásmido. La nucleofección se realizó siguiendo el protocolo Amaxa™ 4D-Nucleofector™ Protocol for Human Dermal Fibroblasts proporcionado por la casa comercial Lonza Group Ltd.

Las HDF de las que se partió se cultivaron en unas condiciones de cultivo de al menos 5×10^4 células/25 cm² de placa y el cambio de medio se realizó 2-3 veces por semana. Cuando las células alcanzaron 90% de confluencia, se realizó un pase a placas de 150 mm y se dejaron crecer dos días. Para recoger las células se retiró el medio de cultivo y se lavó las células una vez con 12 mL de HBSS. Para recoger las células, se incubó las células durante aproximadamente 1-3 minutos a 37°C con 5 mL de tripsina. Para neutralizar la tripsina, se añadió 10 mL de TNS una vez más del 90% de las células se hubieron despegado. A continuación, se cogió una alícuota de las células para medir su densidad celular mediante su recuento en una cámara Neubauer. Seguidamente, se centrifugó el número requerido de células ($0.5-1 \times 10^6$ por cada placa) a 90 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante por completo. Posteriormente, se resuspendió el pellet cuidadosamente en el volumen requerido de la solución 4D-Nucleofector™ (100 µl por cada $0.5-1 \times 10^6$ células) y se dividió la suspensión celular en tubos de 1.5 mL de acuerdo con el número de muestras. Se añadió aproximadamente 2 µg de cada

plásmido en cada tubo con las células y se transfirió todo el volumen a las cubetas de 100 μ l proporcionadas por el kit (Nucleocuvette™ Vessels).

Las cubetas se introdujeron rápidamente en la unidad X del 4D-Nucleofector™. El programa seleccionado fue el DT-130. Tras la finalización del programa, se retiró cuidadosamente cada una de las cubetas del sistema y se dejaron incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se resuspendió las células con 500 μ l de medio DMEM precalentado y se mezcló las células pipeteando suavemente arriba y abajo dos o tres veces con las pipetas proporcionadas en el kit. Finalmente, se transfirió todo el volumen de las cubetas a una placa de 6 pocillos previamente preparada con 1 mL de DMEM al 10% de FBS precalentado. La placa se depositó en el incubador a 37°C con un porcentaje de CO₂ del 5%.

3.10. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Para realizar el extracto proteico de las HDF nucleofectadas se recogió las células de la placa de 6 pocillos. Para ello, se aspiró el medio, se lavó con 12 mL de PBS 1X frío y se recogieron las células con 1 mL de PBS 1X frío y con un raspador. Las células se centrifugaron en un tubo de 15 mL a 4°C y a 1000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células se transfirieron a un tubo de 1.5 mL con 1 mL de PBS 1X y se centrifugó de nuevo de la misma forma que la vez anterior. Se retiró el sobrenadante y se congeló el pellet.

Para lisar las células, estas se resuspendieron en 70 μ l tampón NET (50 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40) fresco con inhibidores de proteasas. Para preparar 1 mL de tampón NET se mezcló 50 μ l Tris-HCl (pH=8), 107.15 μ l NaCl, 50 μ l NP-40 Surfactant-Amps™ (Thermo Scientific™), 10 μ l EDTA y 782.85 μ l de H₂O. Para preparar el cóctel de inhibidores se adicionó una pastilla de cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche) en 2 mL de H₂O. De estos 2 mL se pipetearon 40 μ l para añadirlos en 1 mL de tampón NET. Además de la pastilla, al mL de tampón se adicionó 4.2 mM de leupeptina, 300 nM de aprotinina, 2.9 mM de pepstatina y 250 μ M de PMSF. Las muestras se sonicaron durante 25 segundos para evitar tener una elevada viscosidad y se centrifugaron a 4°C y a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el pellet y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL.

La cantidad de proteína se valoró mediante el método de Bradford. Para preparar la solución de Bradford, se mezcló 100 mg de colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 con 50 mL de etanol al 95% y 100 mL de ácido fosfórico al 85%. Se mezcló hasta que el colorante se disolvió por completo y se añadió 850 mL de H₂O estéril.

Para realizar la recta de calibrado, se prepararon 4 tubos de 1.5 mL con 800 μ l de H₂O y 200 μ l de solución de Bradford 5X. A cada tubo se añadió 0, 2, 4 y 6 μ l de BSA (1 mg/mL) y se incubaron durante 5 minutos. Se preparó el espectrofotómetro a 595 nm, se realizó el blanco con el tubo a la concentración de 0 mg/mL de BSA y se midió la absorbancia de las muestras estándar.

Para medir la cantidad de proteína de la muestra, se preparó un tubo 1.5 mL con 800 μ l de H₂O y 200 μ l de solución de Bradford 5X y se le añadió 3 μ l del extracto proteico correspondiente

(E571, E572, HDFs negativas). La cantidad de proteína se calculó a partir de la recta de calibrado anteriormente obtenida midiendo la absorbancia de la muestra a 595 nm.

3.11. WESTERN BLOT

Para detectar NIPBL a partir de los extractos proteicos mediante Western Blot (WB), se utilizó un gel de gradiente Mini-Protean TGX (4-15%) de Bio-Rad Laboratories, Inc. Para ello, previamente se añadió a las muestras solución de carga SDS 2X (1M Tris/HCl (pH= 6.8), 20% SDS, 100% glicerol, 20g de azul de bromofenol, H₂O). Se mezclaron 800 µl de solución de carga junto con 200 µl de DTT fresco (1X) y de ahí se tomaron 75 µl, que se añadieron a los 75 µl de proteína más tampón NET que se obtuvieron en el apartado anterior. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 95°C y, posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 12.000 x g para no cargar suciedad en el gel. El gel se cargó con aproximadamente 35 µg de cada muestra y estas se cargaron por duplicado para, posteriormente, poder transferir a dos membranas que se incubarán con dos anticuerpos diferentes. Como marcador de peso molecular se utilizaron 3 µl de EZ-RUN™ Pre-Stained Rec Protein Ladder 1kb (Thermo-Fisher Scientific). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 80V durante los 20 primeros minutos y a 120V durante 1.5 horas a temperatura ambiente y en presencia de un tampón de migración (100 mM Tris, 100 mM Tricina, 0.1% SDS, pH 8.3). A continuación, se realizó una transferencia gel-membrana en medio húmedo: el gel y la membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) se mojaron en tampón de transferencia 10X (30.3g Tris, 144.1g Glicina, 20% SDS) y se intercalaron y fijaron firmemente entre esponjas y papel absorbente Whatman® (Fisher Scientific™). Las membranas fueron pretratadas con metanol para activarlas durante 10-20 segundos, después se sumergieron en agua durante 2 segundos y, finalmente fueron sumergidas en el tampón de transferencia. El montaje tipo sándwich se sumergió en el tanque de transferencia que contenía el tampón de transferencia (tampón de transferencia 10X, agua, metanol) y un bloque de hielo, donde se aplicó una corriente eléctrica a un amperaje constante de 400mA (electrotransferencia) durante 1 hora.

La membrana se cortó por la mitad y ambas partes se bloquearon con PBS-Tween-20 y leche (0,1% Tween-20, 1X PBS, 5% leche en polvo) y se incubaron en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas las membranas, cada una se incubó con un anticuerpo distinto. La primera de ellas se incubó con el anticuerpo primario anti-GST de cabra (GE Healthcare) a una dilución 1:1000 en cámara fría durante toda la noche. Posteriormente, se llevaron a cabo tres lavados consecutivos de 10 minutos en PBS-T a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-cabra (Abcam) en PBST con 0.5% de leche durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Tras el tiempo de incubación, se volvieron a realizar los tres lavados consecutivos de la misma forma que la vez anterior y se reveló la membrana añadiendo 500 µL de SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific, USA). La segunda membrana se incubó con el anticuerpo primario de rata anti-IDN3 [KT55] (Abcam) a una dilución 1:500 y se incubó durante toda la noche en cámara fría y en agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados consecutivos de la misma forma que con la primera membrana y se incubó con el anticuerpo

secundario de cabra anti-rata marcado con HRP (Abcam) a una dilución 1:10.000. Para el revelado de la membrana se añadió 500 µl de ECL Select™ Luminol Solution (Amersham™, Cytiva).

3.12. ENSAYO *IN VITRO* DE DIGESTIÓN POR CRISPR CAS9

Para realizar la validación *in vitro* de la digestión del gen diana se combinó el protocolo Alt-R™ CRISPR-Cas9 System de la casa comercial Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) junto con el protocolo Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems User Manual de Takara Bio USA, Inc. Para poder llevar a cabo la prueba, primero fue necesario amplificar la región de *NIPBL* de 609 pb que contenía la secuencia de interés. Para ello, se seleccionaron ADN genómicos de candidatos del Diseño 1 de buena calidad y se realizó la PCR de la misma forma que en el apartado 3.5.

El siguiente paso fue formar el dúplex de sgRNA. Se mezcló 1 µl de crRNA (100 µM) (Integrated DNA Technologies, IDT) con 1 µl de tracrRNA (100 µM) (IDT) en un tubo de 1.5 mL y se completó con agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen total de 10 µL y una concentración final de 10 µM. El dúplex se calentó a 95°C durante 5 minutos y transcurrido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se formó el complejo ribonucleoproteico (RNP) mediante la mezcla de 1 µL de sgRNA (10 µM) con 1.6 µL de Cas9 (62 µM) y 8.8 µL de PBS (1X). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. La reacción de digestión *in vitro* con la enzima Cas9 se realizó con los componentes de la Tabla 10 y tuvo lugar a 37°C durante 1 hora. Para liberar a la Cas9 del sustrato, se añadió 2 µL de proteinasa K (10 mg/mL) a la reacción y se dejó incubar a 56°C durante 10 minutos. Finalmente, para eliminar el RNA previamente a cargar el gel de agarosa se trató la mezcla con 0,5 µL de RNAsa (5 µg) a 37°C durante 30 minutos.

Tabla 10. Componentes de la reacción de digestión *in vitro* con la enzima Cas9

Componente	Volumen para 1 reacción
Cas9 RNP 1 µM	1,5 µL
ADN sustrato (100 nM)	1,5 µL
Tampón NE 3*	1,5 µL
BSA 15X	1,5 µL
Agua libre de nucleasas	9 µL
Volumen total	15 µL

*Tampón NE3(1X): 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7.5

Para la electroforesis se utilizó un gel de agarosa al 2,5%. Para la preparación de dicho gel se procedió de la siguiente manera: Se prepararon 50 mL de tampón TAE 1X y se añadieron 1.25 g de agarosa SeaKem® LE Agarose (Lonza, Rockland, ME, USA). Después, se calentó la mezcla en un microondas y se añadieron 5 µL del colorante Safeview® (New England Biolabs Inc., Biologicals Ltd, Cambridshire, UK). Se dejó enfriar y gelificar. Una vez preparado el gel, se cargaron los 15

μL de cada producto de digestión junto con 3 μL del colorante Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England Biolabs Inc.). Como marcador de peso molecular se usaron 3 μL del marcador DNAMark™ 50 bp Plus Ladder (G-Biosciences®, Geno Technology Inc., USA) y 3 μL del marcador Hyperladder™ 1kb (Ref. BIO-33053, Ecogen SL).

4. RESULTADOS

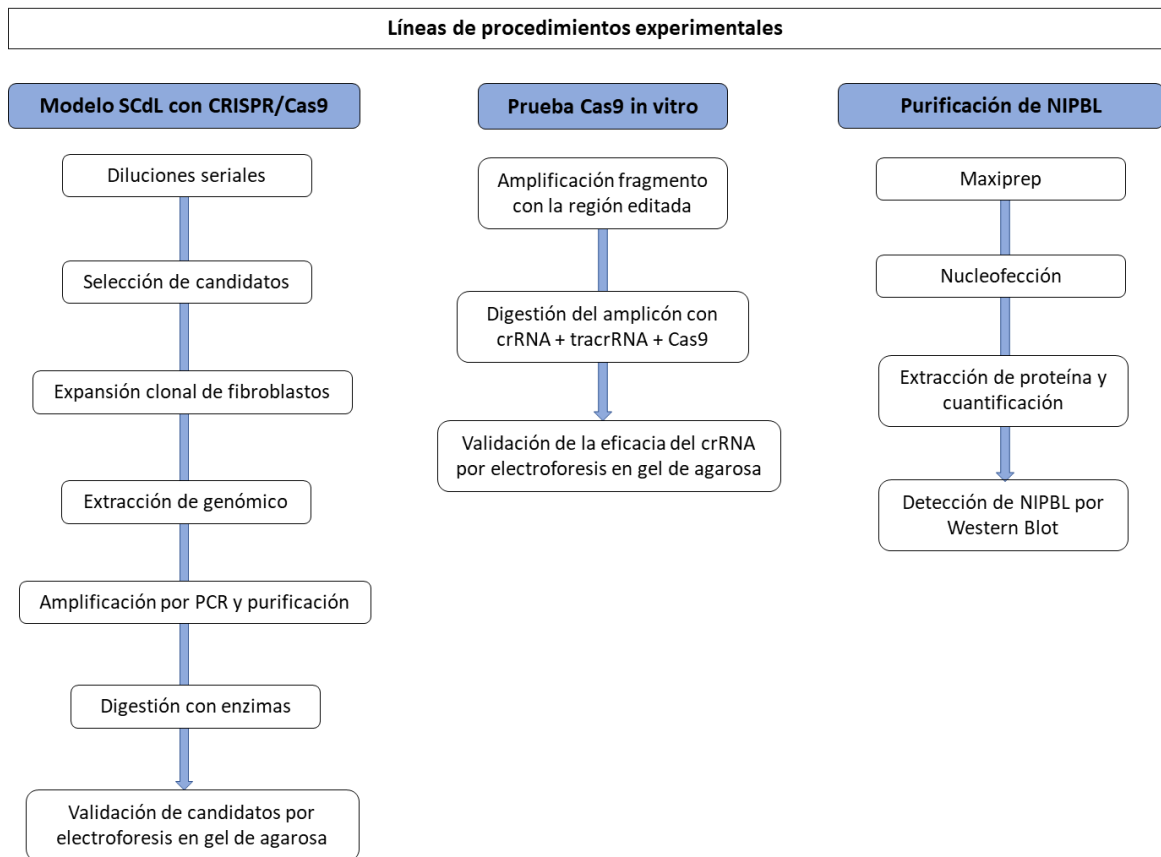


Figura 12. Esquema de los procedimientos experimentales de las diferentes líneas del proyecto.

4.1. CREACIÓN DE UN MODELO DE LA ENFERMEDAD MEDIANTE CRISPR/CAS9

4.1.1. Selección de clones candidatos

A partir de los fibroblastos preseuntamente editados mediante CRISPR/Cas9, se realizaron diluciones seriales para conseguir aislar células individuales (*single-cell seeding*) a partir de las cuales obtener colonias que, en principio, o son positivas para la mutación deseada o bien son negativas. Las diluciones se realizaron siguiendo cuatro estrategias diferentes, partiendo tanto de placas de 96 micropocillos como de placas de 24 y se observaron ese mismo día y después con asiduidad en el microscopio en busca de los pocillos que contenían las células individuales.

Los clones que se seleccionaron para las expansiones clonales y la comprobación de la edición génica mediante la digestión enzimática fueron aquellos que habían crecido a partir de un único fibroblasto. También se seleccionaron cuando se observó que venían de un par de células, asumiendo que podrían estar editadas solo la mitad de las células. Para el Diseño 1, en total, se seleccionaron 44 candidatos (Tabla 11).

Tabla 11. Número de candidatos seleccionados de cada estrategia de dilución serial del Diseño 1 de CRISPR/Cas9.

Estrategia	Nº candidatos
1	11
2	17
3	5
4	11
TOTAL	44

La selección de candidatos de los Diseños 1B y 2 todavía está en curso, puesto que se realizó a continuación de comprobar todos los candidatos del Diseño 1. Sin embargo, hasta ahora se ha realizado la expansión clonal de algunos candidatos hasta alcanzar las placas de 6 pocillos, donde se encuentran creciendo actualmente.

4.1.2. Validación de los clones candidatos

Los candidatos del Diseño 1 se fueron expandiendo de placas de 96 a 24 y de estas a placas de 6 pocillos. Cuando finalmente las células alcanzaron una confluencia alta en las placas de 6 pocillos, se recogieron y se realizó una extracción de su ADN genómico, que sirvió como molde para la amplificación por PCR del fragmento de *NIPBL* de 609 pb donde se trató de incorporar la mutación. Finalmente, se realizó la reacción de digestión con la enzima Acul. Teóricamente, Acul debe cortar el fragmento de 609 pb al reconocer el sitio de restricción de la secuencia PAM mutada y generar dos fragmentos de 243pb + 366 pb.

En todos los casos, se realizó una comprobación de la PCR mediante un gel de agarosa, y solo se realizó la digestión de aquellos candidatos para los que la PCR había sido positiva y se visualizaba una buena banda en el gel, pues, de no ser así, tampoco se conseguirían visualizar las bandas tras la digestión. La PCR fue positiva para todos los candidatos de las estrategias 2 y 4, por lo que se realizó la digestión de todos ellos y para el 80% de los candidatos de las estrategias 1,3. Los resultados de las digestiones realizadas se pueden observar en la Figura 13.

En ningún caso se consigue ver dos bandas que representen los fragmentos generados por *AcuI* (243 pb + 366 pb). Sin embargo, en todos ellos se encuentra una banda de unos 600 pb, que se corresponde con el fragmento de *NIPBL* de 609 pb que previamente se amplificó por PCR, lo cual en principio significa que el amplicón no ha sufrido el corte esperado por el enzima y que, por tanto, son candidatos negativos que no han incorporado la mutación deseada.

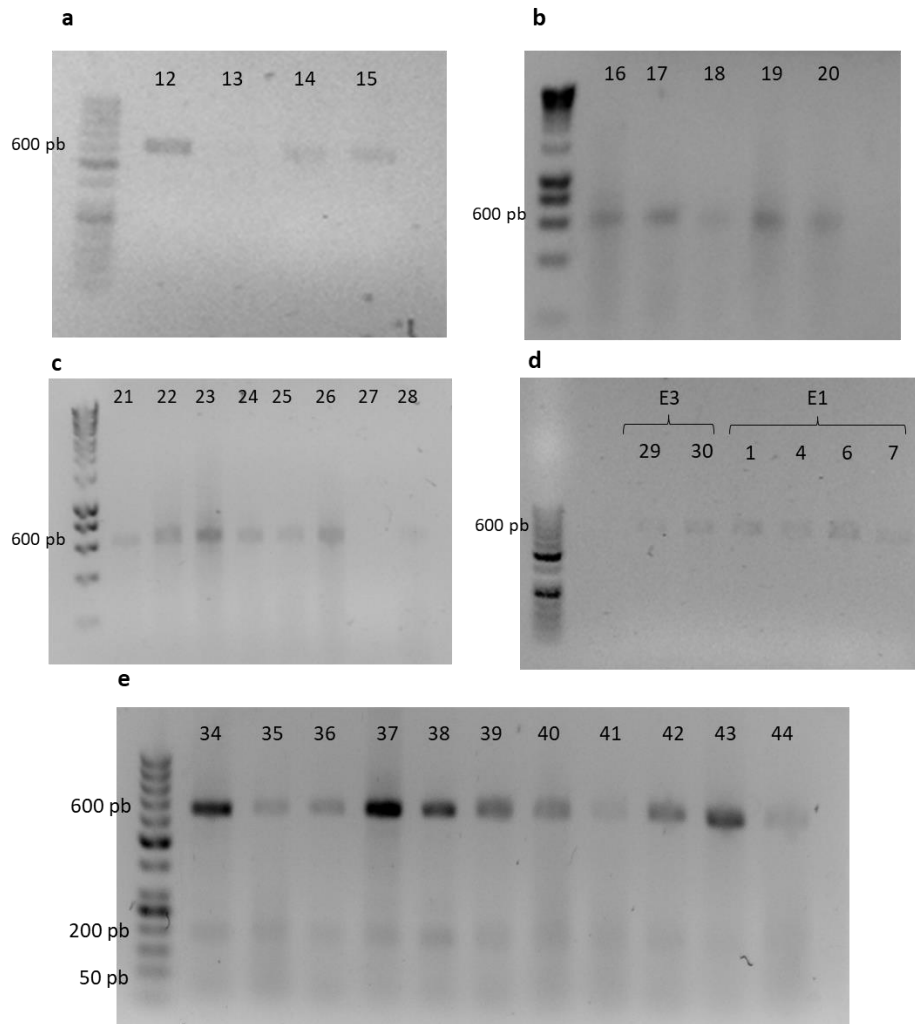


Figura 13. Gel de agarosa al 1,5% con los productos de digestión de los candidatos. Tras amplificar el fragmento de *NIPBL* de 609 pb a partir del ADN genómico de los candidatos seleccionados se realizó la reacción de digestión con el enzima *AcuI*. **a,b,c)** Resultados de la digestión de los candidatos seleccionados de la estrategia 2. Se cargaron 5 μ L del producto de digestión. **d)** Resultados de la digestión de los candidatos seleccionados de las estrategias 1 y 3. Se cargaron 10 μ L del producto de digestión. **e)** Resultados de la digestión de los candidatos seleccionados de la estrategia 4. En general, las bandas se ven difuminadas o traslúcidas, pero todas ellas aparecen a un tamaño de aproximadamente 600 pb, que se corresponde con el amplicón sin cortar de 609 pb. En la Figura 11e se aprecian dos bandas por debajo de la banda que se corresponde con el amplicón de 609 pb. Sin embargo, los tamaños, de 200 pb y 50 pb no se corresponden con los tamaños de los fragmentos esperados (243 pb + 366 pb), por lo que es probable que se trate de contaminación o sean productos de degradación del ADN. En ningún caso se observan dos fragmentos que sugieran que ha habido un corte por parte del enzima.

4.1.3. Ensayo *in vitro* de digestión por CRISPR/CAS9

Las guías (sgRNA) que se utilizan en los experimentos de CRISPR/Cas9 se diseñan *in silico* utilizando programas informáticos. Sin embargo, la eficacia de estas guías no está asegurada *in vivo*. El hecho de no obtener ningún clon positivo para la mutación deseada del Diseño 1 (apartado 4.1.2) sugirió que quizás las guías no estaban funcionando de forma eficiente al no reconocer su secuencia objetivo, por lo que la Cas9 no sería capaz de realizar el corte y quizás por eso ningún candidato era positivo. Por esta razón, se recurrió a una técnica novedosa para comprobar *in vitro* si las guías diseñadas funcionaban bien. A grandes rasgos, la técnica consiste en mezclar un fragmento de ADN que contenga la región objetivo, donde ha de cortar la Cas9, junto con el ARN guía (crRNA:tracrRNA) y la Cas9 y realizar una digestión a 37°C. De esta forma, si el ARN guía es eficaz, la Cas9 es capaz de realizar un corte y generar dos fragmentos que se pueden visualizar mediante una electroforesis en gel de agarosa. En nuestro caso, se amplificó el fragmento de 609 pb que contenía la región editada. Para ello, se partió de un ADN genómico de buena calidad de un candidato del Diseño 1. Este fragmento se mezcló con el crRNA diseñado de forma específica para la edición génica deseada (Apartado 1.6), el tracrRNA (que es siempre constante), la Cas9, tampón NE y BSA. Se incubó a 37°C durante 1 hora y posteriormente se trató con proteinasa K y RNAsa. Como control negativo de la reacción se empleó el amplicón de 609 pb sin la Cas9. Como control positivo se amplificó un fragmento de ADN de 1kb del genoma de *C.Elegans* y se incubó a 37°C con su respectivo ARN guía (validado previamente y cedido amablemente por José Pérez-Martin (Unidad de División celular y Desarrollo)). Cuando la proteína Cas9 corta este amplicón de 1kb genera dos fragmentos de aproximadamente 500pb. Los resultados tras la electroforesis en gel de agarosa muestran cómo se ha producido corte tanto con el sgRNA del Diseño 1 (sgRNA1) como con el sgRNA del Diseño 2 (sgRNA2). Con el sgRNA1 se aprecian dos bandas a unos tamaños de aproximadamente 250 pb y 359 pb, mientras que con el sgRNA2 los tamaños aproximadamente son de 185 pb y 424 pb. Estos tamaños son muy similares al tamaño esperado por el corte de los enzimas de restricción Acul (243pb + 366pb) y Xspl (172 pb + 429 pb). Esto se explica porque la Cas9 corta a una distancia de unos 3-4 nucleótidos aguas arriba de la PAM y, el sitio de restricción de los enzimas se encuentra en la secuencia PAM en el Diseño 1 y a una distancia de un par de nucleótidos de la PAM en el Diseño 2. Por lo tanto, es esperable que los fragmentos que se generan tengan tamaños prácticamente idénticos. El control positivo, como se esperaba, ha generado dos fragmentos de 500 pb, que como poseen la misma posición en el gel exhiben el doble de intensidad que las bandas de los fragmentos generados. El control negativo, como era de esperar, no ha sufrido corte y presenta su tamaño inicial de 609 pb (Figura 14).

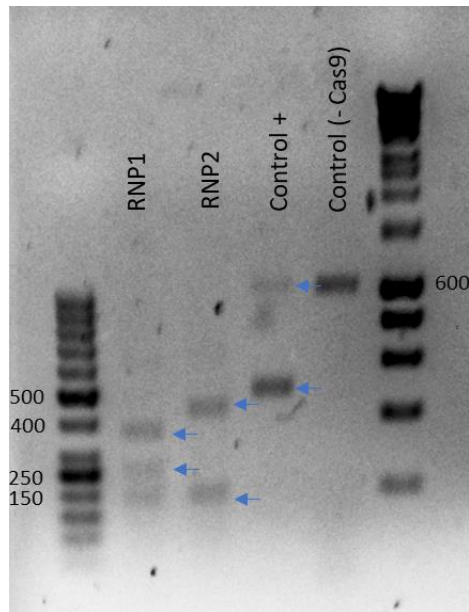


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa tras la digestión del fragmento editado con Cas9. Carril 1: Marcador de peso molecular de 50 pb. Carril 2 (RNP1): Se observan dos fragmentos generados por la Cas9 al digerir en presencia del ARN guía 1 que se corresponden con un tamaño aproximado de 250 pb y 359 pb. Carril 3 (RNP2): Se observan dos fragmentos generados por la Cas9 al digerir en presencia del ARN guía 2 que se corresponden con un tamaño aproximado de 185 pb y 424 pb. Carril 4 (control +): Se aprecia una banda muy tenue de un tamaño de 1kb que corresponde con el amplicón no cortado por Cas9. Asimismo, se observa una banda de un tamaño de 500 pb resultado del corte del fragmento de 1kb en dos fragmentos de 500pb, por lo que tiene una mayor intensidad que las bandas de los carriles 2 y 3. Carril 5 (control - Cas9): Como no se introdujo Cas9, no ha habido corte y el amplicón inicial de 609 pb es el que se corresponde con la única banda visible a la altura de 600 pb. Carril 6: Marcador de peso molecular de 1kb. |RNP1: Cas9 + sgRNA1, RNP2: Cas9 + sgRNA2.

4.2. PURIFICACIÓN DE NIPBL PARA ESTUDIOS FUNCIONALES

4.2.1. Nucleofección y extracción de proteína

Para tratar de purificar NIPBL para realizar ensayos ATPasa, se partió de plásmidos previamente construidos con NIPBL *wild-type* y NIPBL-Y22165S, ambos etiquetados con GST. La etiqueta GST se añadió para facilitar la purificación de NIPBL mediante resinas de glutatión o mediante anticuerpos anti-GST. Los plásmidos se extrajeron y purificaron a partir de un cultivo de *E.Coli* mediante una maxiprep. Con los plásmidos purificados se realizó una nucleofección de células HDF comerciales. La Nucleofección™ es un sistema de electroporación comercial patentado creado por Amaxa, y propiedad de Lonza que utiliza cubetas estériles desechables para facilitar la electroporación. Amaxa ha desarrollado una variedad de tampones específicos para las células que están diseñados para permitir la máxima transfección mientras se reduce la muerte celular. Además de los tampones específicos para las células, el sistema Nucleofector™ viene preprogramado con una variedad de programas específicos para diferentes líneas celulares que varían el voltaje, la frecuencia y la duración del pulso. Este sistema ha ganado gran popularidad ya que el Nucleofector™ es capaz de transfectar muchas células comúnmente difíciles de transfectar, incluyendo varias células progenitoras y células madre, lo cual lo hace una

herramienta muy útil y atractiva para realizar técnicas tanto *in vitro* como *in vivo* en comparación con otros métodos físicos de introducción no vírica de genes (Mellott et al., 2013). Además, la nucleofección como su nombre indica, introduce los fragmentos de ADN directamente al núcleo donde se va a expresar.

Tras la nucleofección, las células se recogieron 8 horas después para evitar la pérdida de la proteína, ya que es el momento de expresión máxima de la proteína, como se determinó en experimentos previos en el laboratorio. Las células se observaron en el microscopio y se vio que se habían adherido bien a la placa y presentaban una confluencia alta y una viabilidad elevada.

El propio kit de nucleofección proporcionaba un plásmido con GFP que actúa como control positivo para poder comprobar la eficiencia de la nucleofección. No obstante, previamente se comparó nuestro plásmido con NIPBL no mutado con el plásmido control. El resultado fueron eficiencias similares (90-100%) para ambos, por lo que no se realizó un control positivo de la nucleofección, ya que el propio NIPBL no mutado sirvió como control.

Una vez recogidas las células, se realizó una extracción de proteína y se cuantificó siguiendo el método de Bradford. Los resultados de la cuantificación se recogen en la Tabla 12.

Tabla 12. Cuantificación de proteína extraída de las HDF nucleofectadas con los plásmidos y de un control de células HDF nucleofectadas sin plásmido.

Muestra	mg/mL	µg totales
E571 (NIPBL-GST)	1.817	121.74
E572(NIPBL-Y2216S-GST)	1.43	96
Control -	2.8	190.4

4.2.2. Detección de NIPBL por Western Blot

Con el extracto de proteína purificada se realizó una electroforesis de proteínas en un gel SDS-PAGE de gradiente (4-15%). Como muestras se cargaron los extractos de proteína obtenidos a partir de las HDF nucleofectadas con los plásmidos *NIPBL* mutado y *NIPBL* no mutado. Como control negativo se partió del extracto proteico de células HDF nucleofectadas sin plásmido. Se cargaron 35 µg de cada muestra en el gel. Las muestras se cargaron por duplicado (6 pocillos de muestras cargados en total). Tras la electroforesis, se realizó una transferencia en húmedo del gel a una membrana de PVDF. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se cortó por la mitad, quedando así una réplica de cada una de las 3 muestras en cada membrana, y se procedió a incubar cada una de ellas con los anticuerpos primarios correspondientes. Como *NIPBL* estaba etiquetado con GST se incubó con un anticuerpo anti-GST en una de las membranas. La otra se incubó con un anticuerpo que reconoce específicamente a *NIPBL*.

Los resultados sugieren que la nucleofección se llevó a cabo con éxito y fue posible sobreexpresar *NIPBL* en las células HDF. Como muestran los resultados de la Figura 15, fue posible detectar NIPBL al incubarlo con el anticuerpo anti-GST, y se confirmó su presencia mediante la incubación con el anticuerpo KT55, que reconocía directamente a NIPBL. El control negativo sirvió para constatar que lo que se detectaba era NIPBL y no proteínas inespecíficas (Figura 15).

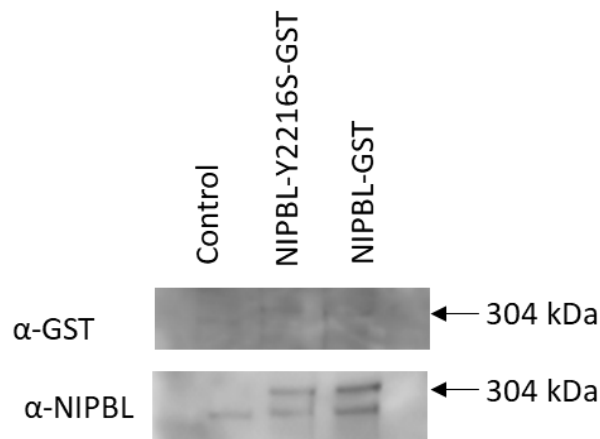


Figura 15. Detección de NIPBL mediante Western blot. Tras realizar un SDS-PAGE con los extractos de proteína de las muestras nucleofectadas, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. En la membrana incubada con el anticuerpo anti-GST se observan bandas a aproximadamente 304 kDa, que corresponde al peso molecular de una de las variantes de NIPBL. La presencia de NIPBL se vuelve a confirmar mediante la presencia de bandas también a 304 kDa en la membrana incubada con el anticuerpo KT55. El control negativo constató que lo que se detectó era NIPBL y no eran bandas inespecíficas.

La finalidad de purificar NIPBL para poder realizar ensayos ATPasa tiene como objetivo demostrar si las mutaciones en NIPBL asociadas al SCdL afectan a su capacidad de estimular la actividad ATPasa del complejo de cohesinas y, por tanto, de formar TADs y bucles que tienen un papel importante en la regulación y la transcripción génica. En nuestro caso, ahora que hemos detectado la presencia de NIPBL en las células nucleofectadas, el siguiente paso sería proceder con la purificación de la proteína.

5. DISCUSIÓN

El trabajo previo realizado por el grupo de la Doctora Ethel Queralt sugirió que la proteína NIPBL mutada en pacientes con SCdL afecta a la capacidad de la holoenzima NIPBL-cohesinas de formar bucles afectando a la organización de la cromatina. NIPBL regula la actividad ATPasa de las cohesinas, que es indispensable para la correcta formación de los bucles y, subsecuentemente, para la regulación de la transcripción génica. Para desarrollar esta hipótesis se pretendía medir la actividad ATPasa de proteínas NIPBL *wild-type* y NIPBL-Y2216S mimética de un paciente. Para llevar a cabo los ensayos ATPasa, el primer paso es purificar las proteínas NIPBL control y mutadas. Dos plásmidos marcados con GST que contenían NIPBL *wild-type* y NIPBL-Y2216S estaban disponibles en el laboratorio. Con estos plásmidos purificados, se realizó una nucleofección de HDF comerciales y una extracción de proteína para realizar un Western Blot (WB). La detección de NIPBL en el WB es solo el primer paso para la purificación de la proteína. Este experimento se realizó previamente en el laboratorio con el mismo plásmido, pero con la etiqueta GFP en vez de GST y nunca se llegó a detectar la proteína NIPBL ni por Western Blot ni por microscopía de fluorescencia. Ahora, por primera vez tenemos un sistema en el que se puede detectar la proteína NIPBL y se puede proceder a su purificación.

Sin embargo, recientemente se ha realizado un estudio por Panarotto et al. para demostrar si los defectos en la formación de bucles podrían contribuir al SCdL. En el estudio se seleccionaron seis mutaciones diferentes en NIPBL y por una parte se analizó su capacidad para estimular la actividad ATPasa de las cohesinas en presencia y ausencia de ADN del fago lambda. Por otra parte, se realizó un ensayo de reconstitución *in vitro* para analizar los efectos de estas mutaciones en la formación de bucles, en el cual esta función de las cohesinas y NIPBL puede ser analizada por microscopía de fluorescencia de reflexión interna total. En general, los resultados muestran que algunas de las mutaciones en NIPBL que han sido identificadas en pacientes con SCdL causan defectos en la extrusión del bucle y, por tanto, sugieren que las deficiencias en este proceso pueden contribuir a la etiología del síndrome. Además, se ha observado que el ADN estimula las actividades ATPasas de todos los complejos mutantes de cohesina-NIPBL, lo cual muestra que éstos aún pueden interactuar con el ADN. Estos resultados sugieren que al menos algunas mutaciones de NIPBL interfieren en la extrusión del bucle directamente, en lugar de afectar simplemente a la unión de las cohesinas en el ADN (Panarotto et al., 2022). Aunque las mutaciones con las que se ha realizado el estudio no son las mismas que la que posee nuestro NIPBL mutante (Y22165S), es muy probable que tanto esa mutación como las otras con las que trabajamos en el laboratorio muestren comportamientos parecidos. Por esta razón, aunque ya se haya comprobado que algunas mutaciones en NIPBL afectan a la actividad ATPasa y, por tanto, a la formación de TADs y bucles, sería conveniente seguir realizando estos estudios con el resto de mutaciones en NIPBL asociadas a la enfermedad.

Una limitación de los estudios que se centran en el SCdL es la cantidad disponible de muestras, ya que es una enfermedad rara. Además de la falta de biomarcadores de diagnóstico prenatal para identificar el síndrome, hay restricciones, de acuerdo con normas éticas, para obtener muestras de tejido embrionario, lo que lleva a tener que realizar estudios celulares posteriores,

que son el único método prenatal factible para diagnosticar las disfunciones del complejo de cohesinas (Usha & Dhanlaxmi, 2014). Por otra parte, mutaciones en *NIPBL* y otras subunidades del complejo de cohesinas causan anomalías esqueléticas graves, pudiéndose diagnosticar la enfermedad en los estadios tempranos del embarazo. Los casos moderados y leves de la enfermedad que no cursan con deformaciones en manos y brazos suelen ser diagnosticados después del nacimiento de acuerdo con sus características anomalías del desarrollo y las características faciales comunes a los pacientes con SCDL (Bose & Gerton, 2010). Debido a esta falta generalizada de muestras disponibles, una de las líneas experimentales de este proyecto ha centrado su atención en tratar de conseguir un modelo de la enfermedad. Para ello se ha empleado el sistema CRISPR/Cas9 para tratar de introducir las mutaciones miméticas de dos pacientes en fibroblastos control. La principal limitación de esta línea experimental ha sido el método de rastreo mediante dilución serial limitante (*single-cell seeding*). Hoy por hoy, son muchos los laboratorios que utilizan esta técnica para aislar células individuales a partir de la dilución de una suspensión celular. Debido a la distribución estadística de las células en la suspensión, el número de células en una muestra altamente diluida puede ser tan bajo como una sola célula por alícuota, cuando la suspensión se divide en pequeños volúmenes (alícuotas). Este proceso se denomina dilución limitante y es bien conocido desde hace décadas para la producción de cultivos celulares monoclonales. Esta técnica es muy simple de llevar a cabo con técnicas de pipeteo estándar, además de ser un método relativamente barato, pero no es muy eficiente debido a la probabilidad de conseguir una única célula en una alícuota es de naturaleza estadística (Gross et al., 2015). Además, hay que tener en cuenta que las diluciones seriales limitantes son propensas a altas tasas de falsos positivos y a la exclusión de células de interés (Yu et al., 2020). Actualmente, existen otras técnicas que, aunque pueden ser más caras ofrecen mejores resultados en el aislamiento de células individuales, como la citometría de flujo o la microfluídica. Sin embargo, previamente en el grupo ya se realizó un experimento de CRISPR/Cas9 separando las células por citometría de flujo (Sorter), y las células se murieron tras pasar por el citómetro. Por ello, tuvimos que recurrir a la estrategia de dilución seriada.

Otra limitación que presenta la estrategia es la dificultad que presentan los fibroblastos de crecer de forma individual. Los fibroblastos producen matriz extracelular (MEC), que principalmente se compone de laminina, colágeno, elastina, proteoglicanos y fibronectina. La MEC desempeña un papel regulador clave, ya que orquesta la señalización, las funciones, las propiedades y la morfología de las células. Varios procesos y funciones celulares, entre ellos la proliferación y supervivencia de las células se ven afectados por determinados componentes de la matriz. Por tanto, la falta de matriz extracelular y otros componentes señalizadores dificultan que un único fibroblasto pueda proliferar y sobrevivir, pues no es posible imitar de forma fiel su comportamiento en su entorno natural *in vivo*. Sin embargo, en el laboratorio previamente se había puesto a punto el crecimiento de células individuales utilizando básicamente dos metodologías. Por un lado, se subía la cantidad de suero al 15% y, por otro lado, se utilizaba un sobrenadante de un medio de cultivo de fibroblastos en crecimiento (que contiene los elementos excretados al medio). En estos ensayos, se determinó que los fibroblastos individuales crecían mejor en medio con suero al 15% y es lo que se ha utilizado en este trabajo.

Otro problema base ha sido que no fue posible comprobar la eficiencia de la nucleofección realizada anteriormente en el laboratorio con los componentes de CRISPR/Cas9 o de la edición génica. Sin embargo, esto es una limitación de la técnica difícil de mejorar. La única solución es repetir la nucleofección aumentando las cantidades de Cas9 y ADN, aunque ya se utilizan en exceso. Esto se suma a las limitaciones que presenta la técnica de las diluciones seriales limitantes porque es posible que la eficiencia fuera baja. Con una cantidad baja de clones positivos, se disminuirían considerablemente las probabilidades de encontrar clones positivos mediante la técnica de la dilución seriada limitante, las cuales son bajas ya de por sí por el principio de la técnica. La eficiencia del CRISPR/Cas9 varía entre 1-30% en experimentos previos en el laboratorio. Cuando la eficiencia es cercana al 30% es más fácil de identificar los positivos. Cuando la eficiencia es baja, hay que analizar un número mayor de clones para poder identificar los positivos. Por lo que puede ser que no hayamos analizado un número suficiente alto de clones para encontrar los positivos.

El hecho de no encontrar ningún clon positivo de todos los comprobados hizo sospechar que quizás los ARN guía que forman parte del sistema CRISPR/Cas9 no estaban reconociendo de forma efectiva su secuencia específica para guiar a la Cas9 al sitio de corte que se tiene por objetivo, lo que significaría que habría que rediseñar estas guías y volver a empezar desde el principio con el proyecto. No obstante, los resultados obtenidos mediante la digestión *in vitro* con la Cas9 muestran que tanto el ARN guía del Diseño 1 como del Diseño 2 funcionan bien, por lo que se descarta que este sea el motivo por el que no se han encontrado clones positivos, siendo más probable que se deba a una baja eficiencia en la nucleofección inicial, a un número bajo de clones rastreados, o a que los enzimas de restricción no digieran el amplicón editado de 609 pb. Los enzimas de restricción sabemos que son capaces de cortar ADN plasmídico (datos no mostrados), pero se podría testar si son capaces de cortar al ADN donante que se ha utilizado en la nucleofección para tener un control positivo de la digestión.

Los clones del diseño 1B y 2 todavía se encuentran en estado de expansión clonal, aunque actualmente se encuentran en placas de 6 pocillos y próximamente será posible recoger las células y comenzar con los siguientes pasos del procedimiento experimental.

Todos estos resultados obtenidos a partir del procedimiento experimental con CRISPR/Cas9 indican que en caso de no obtener clones positivos de los diseños 1B y 2 habría que volver a empezar desde el principio con las diluciones seriadas optimizando el proceso. Otra opción sería repetir de nuevo la nucleofección modificando la cantidad de los componentes del sistema CRISPR/Cas9. Consiguiendo una eficiencia alta se aumentarían las probabilidades de encontrar algún clon positivo tras las diluciones seriadas. A su vez, se ha asumido que las enzimas digieran de forma eficiente, pero en caso de no ser así, este podría ser otro motivo por el cual no se encontrara ningún clon positivo. Sería conveniente secuenciar una representación de los clones candidatos para comprobar si al menos alguno de ellos es portador de la mutación y se está dando por hecho que todos los analizados hasta el momento son negativos cuando realmente podrían no serlo.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

- 1- La nucleofección de células con plásmidos que contienen *NIPBL wild-type* y mutado es un sistema efectivo para sobreexpresar NIPBL y hemos conseguido detectar NIPBL etiquetado con GST. El siguiente paso sería obtener una mayor cantidad de proteína para proceder con la purificación de esta.
- 2- Los ARN guías que fueron diseñados para la edición génica de fibroblastos control mediante CRISPR/Cas9 han demostrado ser efectivas reconociendo *in vitro* su secuencia específica.
- 3- En caso de no obtener ningún clon positivo del resto de estrategias, sería necesario optimizar o rediseñar el procedimiento experimental para la edición génica con CRISPR/Cas9 y el posterior proceso de rastreo de las células editadas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Bose, T., & Gerton, J. L. (2010). Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 189, Issue 2, pp. 201–210). <https://doi.org/10.1083/jcb.200912129>
- Boyle, M. I., Jespersgaard, C., Brøndum-Nielsen, K., Bisgaard, A. M., & Tümer, Z. (2015). Cornelia de Lange syndrome. In *Clinical Genetics* (Vol. 88, Issue 1, pp. 1–12). <https://doi.org/10.1111/cge.12499>
- Choi, P. S., & Meyerson, M. (2014). Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4728>
- CRISPR 101 Your Guide to Understanding CRISPR Introduction to Genome Editing.* (n.d.).
- Freedman, B. S., Brooks, C. R., Lam, A. Q., Fu, H., Morizane, R., Agrawal, V., Saad, A. F., Li, M. K., Hughes, M. R., Werff, R. vander, Peters, D. T., Lu, J., Baccei, A., Siedlecki, A. M., Valerius, M. T., Musunuru, K., McNaghy, K. M., Steinman, T. I., Zhou, J., ... Bonventre, J. v. (2015). Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9715>
- Freiermuth, J. L., Powell-Castilla, I. J., & Gallicano, G. I. (2018). Toward a CRISPR Picture: Use of CRISPR/Cas9 to Model Diseases in Human Stem Cells In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 62–68. <https://doi.org/10.1002/jcb.26162>
- Garcia, P., Fernandez-Hernandez, R., Cuadrado, A., Coca, I., Gomez, A., Maqueda, M., Latorre-Pellicer, A., Puisac, B., Ramos, F. J., Sandoval, J., Esteller, M., Mosquera, J. L., Rodriguez, J., Pié, J., Losada, A., & Queralt, E. (2021). Disruption of NIPBL/Sccl in Cornelia de Lange Syndrome provokes cohesin genome-wide redistribution with an impact in the transcriptome. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24808-z>
- Gross, A., Schoendube, J., Zimmermann, S., Steeb, M., Zengerle, R., & Koltay, P. (2015). Technologies for single-cell isolation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 8, pp. 16897–16919). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms160816897>
- Kline, A. D., Moss, J. F., Selicorni, A., Bisgaard, A. M., Deardorff, M. A., Gillett, P. M., Ishman, S. L., Kerr, L. M., Levin, A. v., Mulder, P. A., Ramos, F. J., Wierzba, J., Ajmone, P. F., Axtell, D., Blagowidow, N., Cereda, A., Costantino, A., Cormier-Daire, V., FitzPatrick, D., ... Hennekam, R. C. (2018). Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 19, Issue 10, pp. 649–666). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0031-0>
- Losada, A. (2014). Cohesin in cancer: Chromosome segregation and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 14(6), 389–393. <https://doi.org/10.1038/nrc3743>

- Mannini, L., Cucco, F., Quarantotti, V., Krantz, I. D., & Musio, A. (2013). Mutation Spectrum and Genotype-Phenotype Correlation in Cornelia de Lange Syndrome. *Human Mutation*, 34(12), 1589–1596. <https://doi.org/10.1002/humu.22430>
- Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., Watanabe, T., Kanai, T., & Sato, T. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*, 21(3), 256–262. <https://doi.org/10.1038/nm.3802>
- Mellott, A. J., Forrest, M. L., & Detamore, M. S. (2013). Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. In *Annals of Biomedical Engineering* (Vol. 41, Issue 3, pp. 446–468). <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0678-1>
- Murayama, Y., & Uhlmann, F. (2014). Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature*, 505(7483), 367–371. <https://doi.org/10.1038/nature12867>
- Nishiyama, T. (2019). Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 58, pp. 8–14). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.11.006>
- Panarotto, M., Davidson, I. F., Litos, G., Schleiffer, A., & Peters, J.-M. (2022). *Cornelia de Lange syndrome mutations in NIPBL can impair cohesin-mediated DNA loop extrusion.* <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Peters, J. M., & Nishiyama, T. (2012). Sister chromatid cohesion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011130>
- Usha, D., & Dhanlaxmi, S. (2014). Mutational screening and prenatal diagnosis in Cornelia de Lange syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 64(1), 27–31. <https://doi.org/10.1007/s13224-013-0450-y>
- Watrín, E., Kaiser, F. J., & Wendt, K. S. (2016). Gene regulation and chromatin organization: Relevance of cohesin mutations to human disease. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 37, pp. 59–66). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.12.004>
- Yu, B., Zhang, J., Zeng, Y., Li, , Xiangdong, L., & Editors, W. (1255). Single-cell Sequencing and Methylation Methods and Clinical Applications. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. <http://www.springer.com/series/5584>