



Función de las interacciones de las proteínas con bromodominios Brd2 y Brd4 con las proteínas Lyar y Nipbl

Trabajo de tesis realizado por la Licenciada Noelia Luna Peláez en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) para el acceso al título de Doctora en Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, Mayo de 2019

Director de tesis

Mario García Domínguez

Codirector de tesis

José Carlos Reyes Rosa

Tutor de tesis

José María Ortega Rodríguez

Doctoranda

Noelia Luna Peláez

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Regulación de la expresión génica mediante la reorganización de la cromatina	13
1.1. Control transcripcional de la expresión génica	13
1.2. Efectos de la dinámica de la cromatina sobre la expresión génica	14
2. Proteínas BET (Bromodomain and Extra Terminal domain)	16
2.1. Estructura de las proteínas BET	16
2.2. Función de las proteínas BET en la transcripción	17
2.3. Otras funciones de las proteínas BET	19
3. Papel de las proteínas BET en el control del ciclo celular	21
3.1. El ciclo celular	21
3.2. Implicaciones de las proteínas BET en cáncer	23
4. Proteínas BET en el mantenimiento de la pluripotencia	24
4.1. Mantenimiento de la pluripotencia	24
4.2. Función de las proteínas BET en el mantenimiento de la pluripotencia	26
5. Proteínas BET en desarrollo y diferenciación	26
5.1. Proteínas BET en el desarrollo del sistema nervioso	28
6. Nuevas interacciones de las proteínas BET durante el desarrollo	29
6.1. Lyar (Ly-1 antibody reactive clone)	30
6.2. Nipbl	31
OBJETIVOS	37
RESULTADOS	41
BLOQUE I: Estudio del papel de la interacción de las proteínas BET con la proteína Lyar	43
1. Caracterización de la interacción entre las proteínas BET y Lyar	43

ÍNDICE

1.1.	Lyar interacciona exclusivamente con Brd2	43
1.2.	El motivo B es el dominio responsable de la interacción con Lyar	43
1.3.	La región acídica de Brd2 no participa en la interacción con Lyar	45
1.4.	La región C-terminal de Lyar es la responsable de la interacción con Brd2	45
1.5.	La interacción Brd2-Lyar es más estable en condiciones de proliferación	47
2.	Papel de la interacción Brd2-Lyar en la estabilidad de la unión de Brd2 a la cromatina	47
2.1.	Lyar recluta a Brd2 a los promotores de los genes de pluripotencia	48
2.2.	La presencia de Lyar en los promotores es independiente de las proteínas BET	49
3.	Análisis funcional de la interacción entre Brd2 y Lyar	50
3.1.	Lyar actúa como represor de <i>Nanog</i>	50
3.2.	Lyar asegura una correcta diferenciación neuronal	52
3.3.	La interacción Brd2-Lyar es esencial para que el nivel de represión de <i>Nanog</i> durante la diferenciación neuronal sea el adecuado	52
3.4.	La interrupción de la interacción Brd2-Lyar provoca una disminución de la neurogénesis y un aumento de la apoptosis	54
BLOQUE II: Estudio del papel de la interacción de las proteínas BET con la proteína Nipbl y su implicación en al Síndrome de Cornelia de Lange		57
1.	Caracterización de la interacción entre las proteínas BET y Nipbl	57
1.1.	Las proteínas BET interaccionan con Nipbl mediante el dominio ET	57
1.2.	Nipbl interacciona preferentemente con Brd4	58
2.	Análisis transcripcional de la interacción Brd4-Nipbl	60
2.1.	Brd4 y Nipbl regulan conjuntamente la expresión de genes potencialmente relacionados con el Síndrome de Cornelia de Lange	60

2.2. Validación de los cambios de expresión detectados mediante RNA-Seq	61
3. Brd4 y Nipbl se estabilizan mutuamente en los promotores de los genes que regulan conjuntamente	64
3.1. Nipbl se localiza principalmente en las regiones promotoras de los genes	64
3.2. La interrupción de la interacción Brd4-Nipbl afecta al reclutamiento de ambas proteínas a diversos promotores	67
3.3. La deficiencia de NIPBL en células de pacientes de Cornelia de Lange altera la unión de BRD4 a los promotores	70
4. Brd4 y Nipbl aseguran el desarrollo embrionario en <i>Drosophila</i>	71
4.1. Análisis transcripcional en mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i> en los genes ortólogos de <i>Brd4</i> y <i>Nipbl</i>	71
4.2. Interacción génica entre fs(1)h y Nipped-B	72
BLOQUE III: Estudio de la dinámica de Brd2 y Brd4 en los promotores de los genes que cambian su expresión durante la diferenciación neuronal	75
1. Estudio de los cambios de expresión producidos tras la inducción de diferenciación neuronal	75
2. Implicación de Brd2 y Brd4 en los cambios de expresión producidos en diferenciación neuronal	77
3. La presencia de Brd2 y Brd4 en algunos promotores define la inducción y la represión génica en condiciones de diferenciación neuronal	77
DISCUSIÓN	85
1. Brd2 interacciona con Lyar para regular la represión de <i>Nanog</i> durante la diferenciación neuronal	87
2. Brd4 interacciona con Nipbl para regular la expresión de genes potencialmente relacionados con el Síndrome de Cornelia de Lange	90
3. Papel de Brd2 y Brd4 en los cambios transcripcionales que ocurren durante la diferenciación neuronal	93
CONCLUSIONES	97

ÍNDICE

MATERIALES Y MÉTODOS	101
1. MATERIALES	103
1.1. Organismos y condiciones de crecimiento	103
1.2. Vectores de expresión	106
1.3. Oligonucleótidos	106
1.4. Anticuerpos	108
2. MÉTODOS	108
2.1. Manipulación de ácidos nucleicos	108
2.2. Análisis de la expresión génica y de la cromatina	112
2.3. Análisis de proteínas	115
2.4. Análisis de la apoptosis	119
2.5. Análisis estadístico y bioinformático	120
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXOS	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de las proteínas principales y auxiliares del complejo Cohesina	32
Tabla 2. Pacientes de CdLS y donantes sanos de los que se obtuvieron las biopsias	105
Tabla 3. Características de los mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizados	105
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en PCR cuantitativa (expresión y ChIP)	106
Tabla 5. Moléculas de ARN interferente utilizadas	107
Tabla 6. Anticuerpos primarios	107
Tabla 7. Anticuerpos secundarios	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la familia de proteínas BET	17
Figura 2. Esquemas de las funciones estructurales de las proteínas BET	20
Figura 3. Regulación del ciclo celular	22
Figura 4. Ciclo del complejo Cohesina	33
Figura 5. Brd2 interacciona exclusivamente con Lyar mediante el motivo B	44
Figura 6. Caracterización de la interacción entre Brd2 y Lyar	46
Figura 7. Aumento de la solubilidad de Brd2 en ausencia de Lyar	49
Figura 8. Lyar recluta a Brd2 a los promotores de genes de pluripotencia	50
Figura 9. Las proteínas BET no reclutan a Lyar a la cromatina	51
Figura 10. Lyar actúa como represor de <i>Nanog</i>	51
Figura 11. Lyar controla la diferenciación neuronal	53
Figura 12. La interacción Brd2-Lyar asegura la correcta represión de <i>Nanog</i> durante la diferenciación neuronal	55
Figura 13. La interacción Brd2-Lyar afecta a la neurogénesis y provoca apoptosis	56
Figura 14. Las proteínas BET interaccionan con Nipbl mediante el dominio ET	58

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 15. Nipbl interacciona preferentemente con Brd4	59
Figura 16. Bajada de los niveles de proteínas mediante ARN interferente	60
Figura 17. Correlación y solapamiento entre los genes desregulados por los distintos ARN interferentes	62
Figura 18. Categorías funcionales de los genes reprimidos por los distintos ARN interferentes	63
Figura 19. Cateogrías funcionales de los genes reprimidos por <i>siNipbl</i> y <i>esiBrd4</i>	64
Figura 20. Validación de los resultados de RNA-Seq en presencia de <i>esiBrd2</i> , <i>esiBrd4</i> y <i>siNipbl</i>	65
Figura 21. Nipbl localiza principalmente en promotores	66
Figura 22. Perfil de localización de Nipbl en los genes seleccionados	67
Figura 23. Brd4 y Nipbl localizan en los promotores de los genes seleccionados	68
Figura 24. Brd4 y Nipbl se estabilizan mutuamente en los promotores que regulan conjuntamente	69
Figura 25. Flag-Brd4 Δ C afecta a la expresión de los genes <i>Ajap1</i> , <i>Kcnc1</i> , <i>Kcnk3</i> y <i>Rasgef1b</i>	69
Figura 26. La localización de BRD4 en promotores se ve afectada por la deficiencia de NIPBL presente en células de pacientes de CdLS	70
Figura 27. Nipped-B y Fs(1)h regulan la expresión de los ortólogos de <i>Kcnc1</i> y <i>Kcnk3</i> en <i>Drosophila melanogaster</i>	72
Figura 28. Nipped-B y Fs(1)h regulan la expresión de genes implicados en el desarrollo	73
Figura 29. Descendencia esperada y observada del cruce de machos <i>Nipped-B</i> ⁴⁰⁷ y hembras <i>fs(1)h</i> ¹⁸	74
Figura 30. Distribución de los cambios de expresión tras 48 h de tratamiento con AR	76
Figura 31. Categorías funcionales de los genes desregulados tras la inducción de diferenciación neuronal mediante AR	76
Figura 32. Validación de los resultados de RNA-Seq en condiciones de diferenciación neuronal	78

Figura 33. Brd4 controla la expresión de los genes que se reprimen durante la diferenciación neuronal con AR	79
Figura 34. Efecto de los ARN interferentes esiBrd2 y esiBrd4 en la inducción de genes de diferenciación neuronal con AR	80
Figura 35. Brd4 se disocia de los promotores de los genes que se reprimen en condiciones de diferenciación neuronal	81
Figura 36. Reclutamiento de Brd2 y Brd4 a los promotores de los genes que se inducen en condiciones de diferenciación neuronal	82
Figura 37. Modelo de acción de la interacción Brd2-Lyar sobre la expresión de <i>Nanog</i> en condiciones de proliferación y diferenciación neuronal	89
Figura 38. Modelo para el reclutamiento de Nipbl a los promotores mediante Brd4	92
Figura 39. Modelo de la dinámica de Brd2 y Brd4 en los promotores de los genes de proliferación y diferenciación	96

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INTRODUCCIÓN

1. Regulación de la expresión génica mediante la reorganización de la cromatina

1.1. Control transcripcional de la expresión génica

La expresión génica es el proceso mediante el cual a partir de la información contenida en el genoma se obtienen las proteínas o los ARNs codificados, según se trate de una región codificante o de una región no codificante. El primer paso de este proceso es la transcripción del ADN hacia ARN, por lo que se considera el principal punto de control para la regulación de la expresión génica.

El principal agente implicado en la transcripción a ARN mensajero es la ARN polimerasa II, la cual viene auxiliada por una gran variedad de factores de transcripción y cofactores transcripcionales que pueden activar o reprimir la actividad de esta.

Factores de transcripción y cofactores

Los factores de transcripción son proteínas que al poseer dominios de unión al ADN se unen a las regiones promotoras de los genes, aunque también están presentes en regiones cercanas al promotor y en regiones más alejadas denominadas “enhancer”. Los factores de transcripción pueden actuar reclutando directamente a la ARN polimerasa II hacia los promotores o encargarse del reclutamiento de remodeladores de la cromatina o cofactores, carentes de un dominio de unión al ADN, que actúan como co-activadores o como co-represores de la transcripción (Fuda *et al.*, 2009). Estos cofactores suelen ser complejos que modifican post-traduccionalmente a la ARN polimerasa II, a las histonas o a los propios factores de transcripción, favoreciendo o impidiendo la transcripción según el tipo de modificación (Reiter *et al.*, 2017). Algunos de los cofactores más importantes en la transcripción son P-TEFb (positive transcription elongation factor) y Mediator. P-TEFb está compuesto por la Ciclina T y la quinasa CDK9 (Peng *et al.*, 1998) y se encarga de fosforilar a la ARN polimerasa II. Mediator, en cambio, consta de numerosas subunidades que se van intercambiando y su papel más relevante en la transcripción es la estabilización de los bucles promotor-“enhancer”, conectando los

INTRODUCCIÓN

factores de transcripción presentes en ambos elementos reguladores con la ARN polimerasa II (Allen & Taatjes, 2015).

Fases de la transcripción

La transcripción ocurre en tres fases: iniciación, elongación y terminación. En la fase de iniciación la ARN polimerasa II se une a secuencias específicas de los promotores, tras lo cual pasa a un estado de pausa en el que se encuentra bloqueada por los factores negativos de la elongación DSIF y NELF (Palangat *et al.* 2005). Para salir de este estado de pausa la ARN polimerasa II necesita ser fosforilada en residuos de serina de su dominio C-terminal (CTD). Esta fosforilación es llevada a cabo por la quinasa CDK7 del complejo TFIIH y por el factor P-TEFb (Peterlin and Price, 2006). P-TEFb fosforila además a los factores negativos de la elongación DSIF y NELF (Fujinaga *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2006), favoreciendo el inicio de la fase de elongación a lo largo de la cual los genes son transcritos. Finalmente, en la fase de terminación el transcrito se disocia de la ARN polimerasa II y esta se disocia del ADN.

1.2. Efectos de la dinámica de la cromatina sobre la expresión génica

Los genomas de las células eucariotas se encuentran empaquetados dentro del núcleo en una estructura denominada cromatina, en la que el ADN se encuentra enrollado alrededor de los nucleosomas, estructuras formadas por los octámeros de histonas H2A, H2B, H3 y H4 y la histona H1 (Kornberg, 1974).

La cromatina es una estructura dinámica capaz de modular su estado de condensación, permitiendo o bloqueando la accesibilidad de las maquinarias implicadas en los procesos de reparación del ADN, replicación y transcripción. Esta accesibilidad depende directamente de la densidad de nucleosomas en las distintas regiones de la cromatina, que varía debido a la acción de las modificaciones post-traduccionales de histonas, los remodeladores de la cromatina y las chaperonas de histonas (Venkatesh & Workman, 2015).

Modificaciones post-traduccionales de histonas

Al igual que otras proteínas, las histonas pueden sufrir una gran variedad de modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación o ubiquitinación de algunos de sus aminoácidos, aunque las dos primeras son las más comunes en las histonas. La adición o eliminación de estas modificaciones las realizan complejos enzimáticos comúnmente llamados “writers” y “erasers” respectivamente (Azad *et al.*, 2018), que pueden actuar sobre las histonas antes o después de ser ensambladas en los nucleosomas. Estos cambios químicos afectan a la transcripción no solo por su efecto sobre la estabilidad de los nucleosomas abriendo o cerrando la cromatina, sino que además actúan como plataformas de anclaje para una serie de factores, comúnmente llamados “readers” o lectores de la cromatina, que son capaces de reconocerlas.

Remodeladores de la cromatina

Los remodeladores de la cromatina se caracterizan por su actividad ADN translocasa, que altera la afinidad de las histonas por el ADN gracias a un dominio ATPasa presente en todos los remodeladores. Aparte de este dominio, los remodeladores poseen en su estructura dominios adicionales que permiten clasificarlos en cuatro familias: SWI/SNF, ISWI, CHD e INO80 (Tyagi *et al.*, 2016).

Chaperonas de histonas

Las chaperonas de histonas son proteínas encargadas del almacenamiento de las histonas, de su transporte desde el citoplasma hacia el núcleo y de ensamblarlas y desensamblarlas a los nucleosomas (De Koning *et al.*, 2007). Al contrario que los complejos remodeladores de cromatina, no usan ATP, sino que aprovechan los movimientos espontáneos del ADN para desestabilizar los nucleosomas.

La desestabilización de los nucleosomas por cualquiera de estos mecanismos facilita el desplazamiento y cambio de localización de los nucleosomas, así como el intercambio de histonas, en el que pueden incorporarse o eliminarse variantes de histonas. Estas variantes (como H3.3 o H2A.Z) suelen poseer una secuencia de aminoácidos similar a las histonas canónicas; sin embargo, causan suficientes

INTRODUCCIÓN

cambios estructurales en los nucleosomas que hacen que estos sean más o menos estables en su unión al ADN (Weber & Henikoff, 2014).

Los cambios en la estabilidad del nucleosoma provocan cambios en la condensación o apertura de la cromatina y, por consiguiente, también en los niveles de transcripción. Para que todos estos cambios sean locales y no se extiendan por todo el genoma, la cromatina se estructura en dominios de expresión en cuyas fronteras se localizan proteínas “insulator”, entre las que destaca la proteína CTCF, que aíslan unos dominios de otros (Phillips & Corces, 2009).

2. Proteínas BET (Bromodomain and Extra Terminal domain)

2.1. Estructura de las proteínas BET

Las proteínas con bromodominios BET (Bromodomain and Extra Terminal domain) constituyen una familia formada, en mamíferos, por cuatro miembros: Brd2, Brd3, Brd4 y Brdt. La expresión de Brd2, Brd3 y Brd4 es ubicua, mientras que la expresión de Brdt se encuentra restringida a la línea germinal masculina (Shang *et al.*, 2004). Su estructura está muy conservada entre los distintos miembros (**Figura 1**) y consta (de N-terminal a C-terminal) de dos bromodominios en tándem, un motivo B y un exclusivo dominio extraterminal (ET) que las diferencia de otros grupos de proteínas con bromodominios. Los bromodominios BD1 y BD2 están formados por cuatro α -hélices y dos bucles, y son capaces de reconocer residuos de lisinas acetiladas tanto en histonas como en otras proteínas (Gamsjaeger *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2009), aunque se unen principalmente a la histona H4 (Kanno *et al.*, 2004). A pesar de que los bromodominios de los distintos miembros presentan aproximadamente un 80% de similitud (Belkina & Denis, 2012), Brd2 tiene mayor afinidad por las histonas monoacetiladas, principalmente en las lisinas K12, K5 y K14, mientras que Brd4 se une a histonas diacetiladas en las lisinas K5/K12 y K5/K8 (Kanno *et al.*, 2004; LeRoy *et al.*, 2008). El motivo B presenta una estructura “coiled coil”, consistente en la repetición de tres heptámeros que dan lugar a una hélice anfipática (Paillison *et al.*, 2007), seguida de una región básica. Este dominio es

esencial para la homo y heterodimerización de la proteína, estabilizando así su unión a la cromatina y facilitando su asociación a los cromosomas durante la mitosis (García-Gutiérrez *et al.*, 2012). El dominio ET consta a su vez del dominio NET (N-terminal Extra Terminal) y el motivo SEED, rico en residuos de serina, glutámico y aspártico (Florence & Faller, 2001), y es el principal responsable de la interacción con otras proteínas (Rahman *et al.*, 2011). Adicionalmente, exclusivamente en Brd2, se encuentra una región ácida precediendo al motivo B que tiene capacidad de interaccionar con Pleiotrofina (García-Gutiérrez *et al.*, 2014). Por otro lado, Brd4 y Brdt presentan también un dominio CTD (C-Terminal Domain) que se extiende a partir del dominio ET y cuya principal función es la interacción con el factor de elongación pTEFb (Bisgrove *et al.*, 2007).

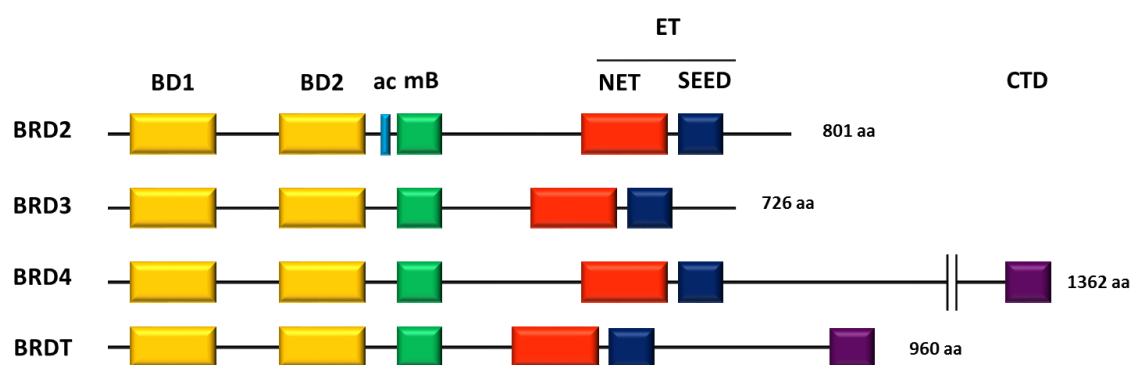


Figura 1. Estructura de la familia de proteínas BET.

La estructura de las proteínas BET consta de dos bromodominios en tándem BD1 y BD2 (amarillo), la región correspondiente al motivo B -mB- (verde) y el dominio ET, que se compone de las regiones NET (rojo) y SEED (azul). En BRD2 aparece la región ácida -ac- (celeste) y en los miembros BRD4 y BRDT se encuentra la región CTD (morado). Los números indican la longitud en aminoácidos (aa) de las proteínas humanas.

2.2. Función de las proteínas BET en la transcripción

Estas proteínas se clasifican como lectoras de la cromatina, ya que reconocen las histonas acetiladas por medio de los bromodominios e interaccionan con distintos reguladores transcripcionales y remodeladores de la cromatina mediante el dominio ET. De este modo, las proteínas BET conectan el estado de la cromatina con

INTRODUCCIÓN

diversos activadores o represores transcripcionales a los que reclutan hacia los sitios en los que deben actuar.

El papel de las proteínas BET en la transcripción consiste en modular la acción de la ARN polimerasa II, pudiendo actuar directamente sobre la polimerasa o de forma indirecta sobre el estado de condensación de la cromatina.

Acciones sobre la ARN polimerasa II

Como se ha comentado antes, la ARN polimerasa II necesita ser fosforilada para salir del estado de pausa inicial y transcribir el ADN. En este sentido, las proteínas Brd4 y Brd2 reclutan mediante su dominio CTD al factor pTEFb, al cual activan para que fosforile los residuos de serina2 de la ARN polimerasa II (Jang *et al.*, 2005; Gaucher *et al.*, 2012). A pesar de carecer de dominio CTD, se ha observado que Brd2 también puede reclutar a la subunidad Cdk9 del factor pTEFb con el mismo fin (Cheung *et al.*, 2017; Fernández-Alonso *et al.*, 2017). Aparte, Brd4 también es capaz de fosforilar por sí misma a la ARN polimerasa II gracias a su actividad quinasa, aunque esta actividad ha sido poco estudiada (Devaiah *et al.*, 2012).

Acciones sobre la cromatina

Las proteínas BET también son capaces de modificar el estado de la cromatina circundante a los sitios en los que se localizan, facilitando de este modo la transcripción. El modelado de la cromatina se lleva a cabo gracias al reclutamiento mediante su dominio ET de diversos remodeladores de la cromatina, aunque las proteínas BET también pueden realizar acciones directas sobre la cromatina.

Brd2, Brd3 y Brd4 actúan como chaperonas de histonas de los nucleosomas acetilados que reconocen, permitiendo el paso de la ARN polimerasa II y el progreso de la elongación (LeRoy *et al.*, 2008; Kanno *et al.*, 2014). Además, se ha propuesto que Brd4 podría poseer una actividad acetiltransferasa que aumenta el estado de acetilación de los nucleosomas y así la accesibilidad de la cromatina (Devaiah *et al.*, 2016).

Este papel sobre la transcripción tiene especial valor debido a que algunos miembros de la familia BET, al contrario que otras proteínas con bromodominios,

permanecen anclados a la cromatina durante el proceso de mitosis (Dey *et al.*, 2003). Esta característica los convierte en marcas epigenéticas, marcando y favoreciendo la transcripción de genes que son necesarios de manera inmediata tras la división celular (Dey *et al.*, 2009). Estos genes varían según el contexto celular en el que se encuentren, ya que las proteínas BET marcan principalmente aquellos genes que permiten el mantenimiento de la identidad celular. Estos contextos en los que participan son muy diversos: inflamación (Belkina & Denis, 2012), mantenimiento de la pluripotencia (Di Micco *et al.*, 2014), diferenciación neuronal (Tsume *et al.*, 2012), eritropoyesis (Stonestrom *et al.*, 2015) o transición epitelio-mesénquima (Andrieu & Denis, 2018); sin embargo, su papel más destacado es el control del ciclo celular. En algunos de estos casos solo participa un miembro específico de la familia, mientras que en otros casos están implicados todos los miembros actuando de manera similar o de manera diferencial.

2.3. Otras funciones de las proteínas BET

Aunque la mayoría de los estudios sobre las proteínas BET se ha centrado en su papel transcripcional, en los últimos años se ha ido indagando en sus efectos sobre la cromatina. Como ya se ha indicado, las proteínas BET provocan cambios locales sobre la cromatina circundante para facilitar la transcripción; sin embargo, estos cambios también tienen efectos en otros procesos.

Efectos en la estructura de la cromatina

Aparte de las acciones locales, las proteínas BET también participan en el mantenimiento de la estructura de la cromatina a nivel de todo el genoma. Es el caso de BRD2 (y en menor medida BRD3), que ocupa sitios en el genoma junto a la proteína “insulator” CTCF responsable de su reclutamiento (**Figura 2A**), aunque BRD2 también puede encontrarse en otras fronteras transcripcionales aislando la expresión de manera independiente de CTCF (Hsu *et al.*, 2017; Cheung *et al.*, 2017). De manera similar, en *Drosophila melanogaster*, la isoforma larga de Fs(1)h (ortólogo de las proteínas BET) también ocupa sitios en el genoma junto a proteínas conocidas por su actividad “insulator” (Kellner *et al.*, 2013). Además de asociarse con CTCF, BRD2 también interacciona con el complejo Cohesina, con quien colabora en

INTRODUCCIÓN

el ensamblaje promotor-“enhancer” (Cheung *et al.*, 2017) (**Figura 2B**). La presencia de las proteínas BET en las fronteras transcripcionales de distintos organismos sugiere que este papel está bastante conservado, y probablemente se deba a la capacidad de dimerización de las proteínas BET mediante su motivo B, lo que les permitiría la formación de bucles para aislar unas regiones de otras (García-Gutiérrez *et al.*, 2012; Hsu & Blobel, 2017).

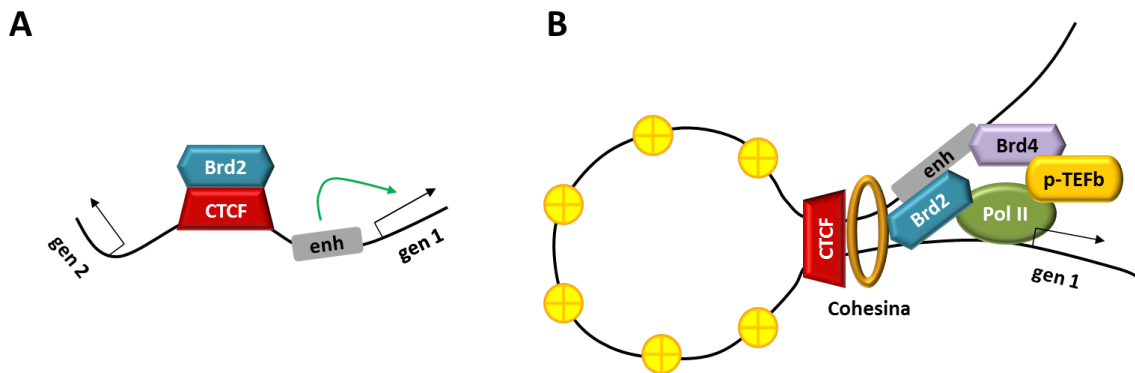


Figura 2. Esquemas de las funciones estructurales de las proteínas BET.

A) Brd2 junto a CTCF (o independientemente) actúa como “insulador” aislando al gen 2 de la acción del “enhancer” (enh). **B)** Brd2 junto a CTCF y el complejo Cohesina facilita la formación del bucle que permite la interacción promotor-“enhancer” facilitando así el reclutamiento de la ARN polimerasa II (Pol II). Brd4 por su parte, recluta al factor pTEFb que fosforila a la Pol II para que lleve a cabo la elongación de la transcripción.

Efectos en la reparación del ADN

La capacidad de las proteínas BET de modificar la cromatina circundante tiene también su efecto en el proceso de la reparación de ADN, afectando a la accesibilidad de la cromatina para la maquinaria de reparación. BRD2 y BRD4 reconocen las acetilaciones en la histona H4 que se producen como consecuencia de la aparición de roturas de doble cadena (Double Strand Brakes-DSB). Su presencia en los sitios de rotura es imprescindible para que se produzca la reparación, ya que se encargan de reclutar a la proteína 53BP1, (Gursoy-Yuzugullu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018) lo que ayuda a estabilizar los complejos de rotura y potencia la ruta de reparación NHEJ (Non Homologous End Joining). Estos datos concuerdan con el hecho de que en algunos tumores como el cáncer de próstata se haya visto correlación entre una alta expresión de las proteínas BET y una mala prognosis (Li *et al.*, 2018), ya que estas

favorecen la progresión del ciclo a pesar de la presencia de daños en el ADN. De manera similar, la función de BRD4 en la ruta de reparación NHEJ resulta esencial durante el proceso de cambio de clase de las inmunoglobulinas (Stanlie *et al.*, 2014).

3. Papel de las proteínas BET en el control del ciclo celular

3.1. El ciclo celular

El ciclo celular se compone de las fases G1 (Gap 1), S (Síntesis), G2 (Gap 2) y M (Mitosis), cuya progresión viene regulada principalmente por una serie de complejos cdk-ciclina y sus respectivos inhibidores (**Figura 3**). Los cdk poseen una actividad quinasa que solo se activa cuando se unen a las ciclinas correspondientes (Pavletich, 1999). En la fase G1 la célula comienza a crecer preparándose para la futura división celular. Para que esta fase avance es necesaria la presencia de los complejos Cdk4-Ciclina D y Cdk6-Ciclina D, que se encargan de inactivar la proteína Retinoblastoma. De este modo el factor E2F queda libre para activar la transcripción de genes implicados en la progresión de ciclo, como Cdk2 y la Ciclina E o proteínas de la maquinaria de replicación del ADN. El complejo Cdk2-Ciclina E actúa en el último tramo de la fase G1, fosforilando también la proteína Retinoblastoma y liberando aún más factor E2F para poder pasar a la fase S (Harbour & Dean, 2000). En la fase S se duplica el ADN y aparece la Ciclina A, que se acompleja con Cdk2 en esta fase y con Cdk1 en la fase G2, fosforilando en ambos casos a la proteína FoxM1, y por tanto activándola. FoxM1 a su vez activa la transcripción de genes necesarios para la fase de mitosis (como la Ciclina B) y la segregación cromosómica. Durante la fase M se forma el complejo Cdk1-Ciclina B, que fosforila igualmente a FoxM1 (Lim & Kaldis, 2013).

Cada uno de los complejos cdk-ciclina comentados actúa en un momento específico del ciclo, y del mismo modo lo hacen sus inhibidores, de los que existen dos familias: INK4, compuesta por los inhibidores p15, p16, p18 y p19; y Cip/Kip, compuesta por los inhibidores p21, p27 y p57. La familia INK4 actúa bloqueando la unión de las

INTRODUCCIÓN

ciclinas a cdk4 y cdk6, mientras que la familia Cip/Kip bloquea la formación de todos los complejos cdk-ciclina (Sher & Roberts, 1999).

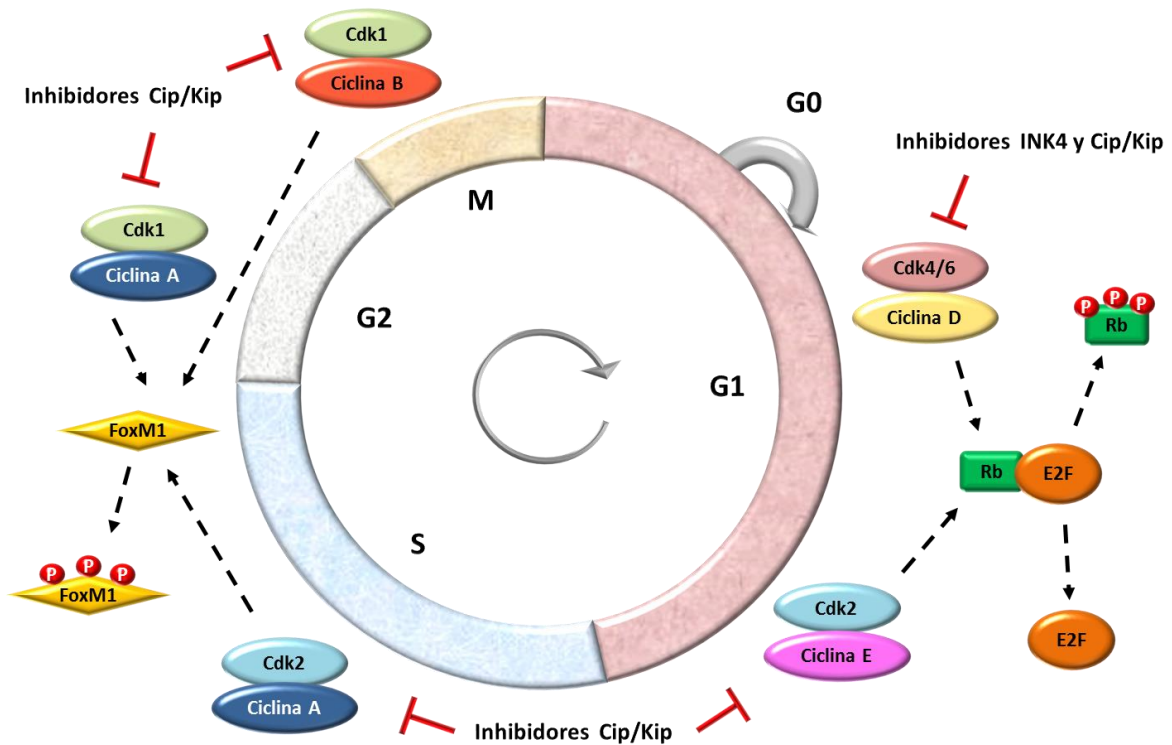


Figura 3. Regulación del ciclo celular.

Durante la fase G1 los complejos Cdk4/6-Ciclina D y Cdk2-Ciclina E fosforilan la proteína Retinoblastoma, liberando el factor de transcripción E2F. E2F permite la transcripción de genes importantes para la síntesis de ADN en la fase S. El factor FoxM1 es fosforilado durante la fase S por el complejo Cdk2-Ciclina A y por el complejo Cdk1-Ciclina A durante la fase G2 para poder activar la transcripción de genes necesarios para la fase M. Del mismo modo, durante la fase M FoxM1 es fosforilado por el complejo Cdk1-Ciclina B para activar la transcripción de genes implicados en la segregación cromosómica. Los inhibidores INK4 actúan solo durante la fase G1, mientras que los inhibidores Cip/Kip actúan a lo largo de todo el ciclo.

La importancia de las proteínas BET en este proceso reside en que, aparte de promover la transcripción en general y con ella el progreso de la fase G1, Brd2 y Brd4 regulan la transcripción de los genes de varios factores determinantes para la progresión del ciclo celular actuando directamente sobre sus promotores. Es el caso de las ciclinas D1 y A2, (García-Gutiérrez *et al.*, 2012; Mochizuki *et al.*, 2008) o c-Myc (Delmore *et al.*, 2011), el cual a su vez reprime al inhibidor p21 (Seoane *et al.*, 2002). Brd2 también activa mediante su actividad quinasa al factor de transcripción E2F,

con el que forma complejos para promover la síntesis de proteínas necesarias para el paso de fase G1 a fase S, entre las que se encuentran varias ciclinas (Peng *et al.*, 2007; Denis *et al.*, 2000). La importancia de las proteínas BET es tal que en un modelo de ratón heterocigótico para Brd4 (*Brd4^{+/-}*) se han observado deficiencias en los procesos de mitosis que podrían ser la causa de las malformaciones durante el desarrollo que ocurren en dicho modelo (Houzelstein *et al.*, 2002).

3.2. Implicación de las proteínas BET en cáncer

El control del ciclo celular tiene mayor relevancia en células cuya tasa de proliferación es muy alta como las células cancerosas, por lo que la función de las proteínas BET tiene un mayor impacto en estos tipos celulares.

Uno de los cánceres en los que la importancia de las proteínas BET es más patente son los carcinomas NMC (NUT Midline Carcinoma). Estos carcinomas se caracterizan por presentar translocaciones del gen *NUT* (Nuclear Protein in Testis) con los genes *BRD4* o *BRD3*, dando lugar a proteínas de fusión BRD4-NUT o BRD3-NUT que bloquean la diferenciación epitelial favoreciendo la carcinogénesis (French *et al.* 2008). Igualmente, se ha visto que la sobreexpresión de *Brd2* en líneas transgénicas de ratón está asociada al desarrollo de linfomas y leucemia, incrementando la expresión de la ciclina A (Greenwald *et al.*, 2004). Por este motivo, en los últimos años las proteínas BET han sido catalogadas como dianas terapéuticas contra el cáncer y se han ido desarrollando muchas moléculas inhibitoras de interés terapéutico como la molécula JQ1 o las moléculas I-BET. Estas moléculas mimetizan a las lisinas acetiladas y se unen a los bromodominios, bloqueando así la unión de las proteínas BET a la cromatina. De este modo, ambas moléculas han resultado ser eficaces en la actividad antitumoral tanto en tumores sólidos como hematológicos. Entre otros, se ha demostrado que JQ1 es capaz de parar la proliferación de las células de carcinomas NMC y de promover su diferenciación tanto *in vitro* como en modelos de xenoinjertos en ratón (Filippakopoulos *et al.*, 2010). En el caso de las moléculas I-BET, se ha demostrado su capacidad antiinflamatoria, así como su acción antiproliferativa en células leucémicas MLL (Mixed Lineage Leukaemia) induciendo su apoptosis (Nicodeme *et al.*, 2010; Dawson *et al.*, 2010).

INTRODUCCIÓN

Aparte de las numerosas pruebas preclínicas sobre la acción antitumoral de los inhibidores de las proteínas BET, se han realizado varios ensayos clínicos en diversos tipos tumorales, siendo principalmente más eficaces en cánceres hematológicos y en carcinomas NUT. Aunque su capacidad terapéutica es prometedora, el porcentaje de eficacia aún es demasiado bajo comparado con los numerosos problemas encontrados de resistencia al tratamiento y de aparición de reacciones adversas (Stathis *et al.*, 2018).

4. Proteínas BET en el mantenimiento de la pluripotencia

4.1. Mantenimiento de la pluripotencia

Otro tipo celular caracterizado por su alta tasa proliferativa son las células troncales, las cuales aparte de poseer la capacidad de autorrenovación se caracterizan por su estado pluripotente, pudiendo dar lugar a distintos tipos celulares mediante procesos de diferenciación. Las células troncales pueden clasificarse en células troncales embrionarias (ESCs) y células troncales de tejido. Las primeras derivan de la masa celular interna del blastocisto (Thomson *et al.*, 1998) y son capaces de generar todas las líneas celulares del organismo, mientras que las segundas solo pueden generar los tipos celulares del tejido del que forman parte, participando así en la renovación de estos (Montagnani *et al.*, 2016).

Tanto el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación como de la pluripotencia de las ESCs dependen principalmente de los factores de transcripción Oct4, Nanog y Sox2, considerados como el núcleo regulador de la pluripotencia. Estos se localizan tanto en las regiones reguladoras de otros genes implicados en el mantenimiento de la pluripotencia (activando su transcripción) como en genes implicados en la diferenciación hacia las tres líneas germinales (reprimiéndolos). Al mismo tiempo, estos factores se caracterizan por controlar su expresión mutuamente (Young, 2011). Para que estos factores mantengan a las ESCs en estado indiferenciado deben expresarse a unos niveles concretos, ya que un aumento o una disminución en estos valores puede provocar el efecto contrario, llevando a las ESCs

a diferenciarse hacia las distintas líneas germinales (Niwa *et al.*, 2000). Este efecto es debido a que los genes de diferenciación sobre los que se localizan Oct4, Nanog y Sox2 son genes bivalentes, cuyos promotores presentan modificaciones de histonas activadoras y represoras y suelen estar ocupados por la ARN polimerasa II en pausa. De este modo, pequeños cambios en los niveles de Oct4, Nanog y Sox2 son suficientes para activar a la maquinaria de transcripción allí presente y así promover una activación rápida de estos genes.

Junto a los factores Oct4, Nanog y Sox2 actúan, entre otros, una serie de factores de transcripción y cofactores que potencian el mantenimiento de la pluripotencia al actuar sobre las mismas regiones reguladoras en las que estos se localizan. Entre estos factores de transcripción encontramos a Smad1, Stat3, SMAD2/3, Tcf3, c-Myc y PRDM14 (Yeo & Ng, 2013). Smad1 y Stat3 son factores de transcripción activados mediante las rutas de señalización inducidas por BMP4 y LIF respectivamente (Ying *et al.*, 2003), conectando el núcleo regulador de la pluripotencia con las señales del entorno celular. SMAD2/3 lleva a cabo una función análoga en células humanas, en este caso respondiendo a la ruta de señalización Activin/Nodal (Brown *et al.*, 2011). Del mismo modo, Tcf3 actúa junto a Oct4, Nanog y Sox2 en respuesta a la activación de la ruta de señalización Wnt, pasando de formar un complejo represor de la pluripotencia junto a la proteína Groucho a formar un complejo activador junto a la β -catenina (Cole *et al.*, 2008). En el caso de c-Myc, su acción consiste en reclutar al factor pTEFb (Rahl *et al.*, 2010), favoreciendo la elongación de la transcripción de los genes activados por Oct4, Nanog y Sox2. En cuanto a la función de PRDM14 junto al núcleo regulador de la pluripotencia, se ha visto que resulta esencial solo en ESCs humanas, donde actúa regulando directamente al gen *POU5F1*, que codifica para OCT4 (Chia *et al.*, 2010).

Como cofactores, resultan muy relevantes los complejos Mediator y Cohesina. Mediator es un complejo que interacciona con muchos factores de transcripción, entre ellos Oct4, Nanog y Sox2, facilitando la formación de un bucle promotor-“enhancer” en los genes activados por estos. El complejo Cohesina, aparte de ser esencial para el mantenimiento de la estructura de los cromosomas, también

INTRODUCCIÓN

participa en la regulación de la expresión génica, frecuentemente en asociación con el complejo Mediator (Kagey *et al.*, 2010).

4.2. Función de las proteínas BET en el mantenimiento de la pluripotencia

Las proteínas BET también juegan un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia en ESCs, existiendo muchos trabajos que relacionan a las proteínas BET con el mantenimiento de la expresión de los genes del núcleo regulador de la pluripotencia. Se ha observado que Brd4 se encuentra en las regiones reguladoras de los genes *Pou5f1*, *Nanog*, *Sox2* y *c-Myc* junto a Oct4. En el caso de *Nanog*, Oct4 es directamente responsable de la presencia de Brd4 en su promotor (Wu *et al.*, 2015a), quien a su vez se encarga de reclutar al cofactor transcripcional Brg1 (subunidad catalítica del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF) en ESCs de ratón y humanas (Liu *et al.*, 2014). También se ha observado la localización de BRD4 en los llamados “super-enhancer” de *POU5F1* y *PRDM14* (Di Micco *et al.*, 2014), favoreciendo la elongación de la transcripción de estos genes al reclutar directamente al complejo Mediator y a la subunidad CDK9 del factor P-TEFb. En este sentido, las proteínas BET actúan también sobre *Hexim*, un inhibidor del factor pTEFb que aumenta su expresión en presencia de la droga JQ1, indicando que las proteínas BET son indispensables para su represión (Wu *et al.*, 2015a).

5. Proteínas BET en desarrollo y diferenciación

En el desarrollo embrionario el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación son procesos interrelacionados, de manera que fallos en el mantenimiento de la pluripotencia pueden causar una diferenciación aberrante. Las proteínas BET, que controlan el mantenimiento de la pluripotencia, actúan por tanto indirectamente sobre el desarrollo. De hecho, la pérdida de función de *Brd2* y *Brd4* en modelos de ratón causa tales desajustes en el desarrollo que los embriones mueren *in utero* (Houzelstein *et al.*, 2002; Shang *et al.* 2009). Sin embargo, la

importancia de las proteínas BET en el desarrollo no se debe solo a este control indirecto, sino que también proviene del control directo que ejercen sobre las regiones reguladoras de genes relevantes para distintos tipos de diferenciación.

Proteínas BET en diferenciación a meso-endodermo

Las proteínas BET participan en el control de la ruta de señalización Activin/Nodal al situarse tanto Brd2 como Brd4 en las regiones reguladoras de *Nodal* (Fernández-Alonso *et al.*, 2017). Aunque en condiciones de proliferación la presencia de Brd4 en las regiones reguladoras de *Nodal* es mayoritaria respecto a la de Brd2, durante el proceso de diferenciación se invierte la situación. Esto se debe a que en diferenciación disminuyen los niveles de Brd4, por lo que Brd2 ocupa los sitios que han quedado libres. De este modo, Brd4 sería responsable del mantenimiento de la pluripotencia y Brd2 de asegurar la correcta diferenciación hacia el meso-endodermo, mostrando cómo, a pesar de localizarse en el mismo promotor, el distinto repertorio de cofactores con los que interacciona cada miembro hace que lleven a cabo funciones distintas. Este papel de Brd2 en diferenciación coincide con el reclutamiento de este por H2AZ.1 a los promotores de genes bivalentes para poder iniciar la transcripción de genes necesarios para el desarrollo (Surface *et al.*, 2016).

Proteínas BET en hematopoyesis

BRD2 y BRD4 participan activamente en la regulación de la diferenciación hacia distintas líneas celulares durante la hematopoyesis. En un primer trabajo se observó que todas las proteínas BET son reclutadas junto al factor de transcripción GATA1 acetilado (Stonestrom *et al.*, 2015), quien controla gran parte del proceso de maduración eritroide. Sorprendentemente, a pesar de que BRD3 es el miembro de la familia de proteínas BET más presente junto a GATA1, su presencia no es imprescindible para la activación transcripcional de eritropoyesis como BRD2 y BRD4. Igualmente, tanto Brd2 como Brd4 potencian la diferenciación de las células Th17 (linfocitos T-helper) actuando sobre los promotores de genes implicados en este proceso. En este caso Brd2 se encarga de reclutar hacia la cromatina acetilada al factor de transcripción Stat3 acetilado y de facilitar la interacción promotor-“enhancer” junto con CTCF y el complejo Cohesina, mientras que Brd4 se encarga de

INTRODUCCIÓN

reclutar al factor p-TEFb para que la ARN polimerasa II transcriba estos genes (Cheung *et al.*, 2017).

Proteínas BET en el desarrollo del aparato locomotor

Las proteínas BET también participan en el desarrollo del aparato locomotor, participando en procesos de diferenciación como la condrogénesis (Niu *et al.*, 2016) o la miogénesis (Roberts *et al.*, 2017). En este último caso Brd3 y Brd4 se localizan sobre el promotor del gen *Myog* llevando a cabo papeles opuestos, actuando Brd4 como activador de la miogénesis y Brd3 como represor. También se han observado malformaciones craneales en modelos de ratón con pérdida de función heterocigótica para *Brd4* (Houzelstein *et al.*, 2002).

Proteínas BET en la espermatogénesis

Por otro lado, BRDT, cuya mayor expresión se encuentra en los testículos, es vital para el correcto desarrollo del proceso de espermatogénesis, controlando la expresión génica, la organización de la cromatina y el proceso de meiosis en espermatoцитos (Gaucher *et al.*, 2012; Manterola *et al.*, 2018).

5.1. Proteínas BET en el desarrollo del sistema nervioso

Uno de los procesos más estudiados en el contexto de las proteínas BET es el desarrollo del sistema nervioso. Esto se debe a que uno de los fenotipos más evidentes en modelos de ratón con pérdida de función de *Brd2* (Gyuris *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2009) son los problemas en este proceso. Estos fenotipos consisten, entre otros, en deficiencias en el cierre del tubo neural y en reducción del número de células GABAérgicas (Velisek *et al.*, 2011). Igualmente, se ha observado que la pérdida de función de *Brd2a* en un modelo de pez cebra provoca errores en la segmentación del sistema nervioso central (Murphy *et al.*, 2017). Además, se ha observado que la expresión de Brd2 es muy elevada en el sistema nervioso central tanto de ratón como de pez cebra (Crowley *et al.*, 2004; DiBenedetto *et al.*, 2008), lo que sugiere que este miembro de la familia debe tener un papel relevante en su desarrollo.

Algunos trabajos han ido indagando sobre los mecanismos por los cuales las proteínas BET regulan el desarrollo del sistema nervioso. Se ha mostrado que Brd2 es esencial en la salida del ciclo celular y la diferenciación neuronal en células neuroepiteliales, donde mediante su interacción con el factor de transcripción E2F1, frenaría la acción de este favoreciendo el camino hacia la diferenciación (Tsume *et al.*, 2012). Igualmente, se ha visto que en embriones de pollo Brd2 favorece la migración de la cresta neural al mismo tiempo que ejerce un papel represor sobre la diferenciación neuronal. Estos dos efectos se suavizan gracias a la acción antagonista de la proteína Pleiotrofina con la que interacciona, llegando a un equilibrio que hace que la diferenciación ocurra correctamente (García-Gutiérrez *et al.*, 2014). Por lo tanto, generalmente Brd2 participa controlando la neurogénesis mediante la interacción con otras proteínas de efecto antagonístico, de modo que en su ausencia se desregula el proceso de diferenciación neuronal.

Sin embargo, Brd2 no es el único miembro de la familia BET con funciones en el sistema nervioso. Brd4 regula la transcripción en neuronas de genes implicados en la sinapsis, potenciando los procesos de aprendizaje y memoria en ratones (Korb *et al.*, 2015) y Fs(1)h, ortólogo de las proteínas BET en *Drosophila melanogaster* regula la ramificación de las dendritas de las neuronas (Bagley *et al.*, 2014). Además, otro trabajo ha mostrado que todos los miembros de la familia BET actúan reprimiendo la neurogénesis y activando la gliogénesis en progenitores neuronales (Li *et al.*, 2016), aunque el mecanismo de acción no queda claro en este caso.

6. Nuevas interacciones de las proteínas BET durante el desarrollo

El mantenimiento de la pluripotencia y el control de la diferenciación son dos procesos interrelacionados y que resultan clave para el desarrollo embrionario. Teniendo en cuenta el papel tan importante que las proteínas BET tienen en ambos procesos y visto que en su ausencia los embriones no son viables, conocer con qué proteínas interaccionan es necesario para entender mejor su mecanismo de acción.

INTRODUCCIÓN

Con el fin de conocer nuevas interacciones de las proteínas BET en el desarrollo embrionario, en nuestro laboratorio se realizó un escrutinio por doble híbrido usando como cebo una construcción de Brd2 y como presa una librería de ADNc proveniente de un embrión de ratón de 11 semanas (García-Gutiérrez *et al.*, 2012). En este escrutinio se identificaron las proteínas Lyar y Nipbl como nuevas proteínas que interaccionan con las proteínas BET.

6.1. Lyar (Ly-1 antibody reactive clone)

Lyar es una proteína nucleolar identificada por primera vez en linfocitos T de ratón (Su *et al.*, 1993) cuya estructura consiste en un dominio de dedos de cinc (ZF) y tres secuencias de localización nuclear (NLS). En este primer estudio se observó que su expresión es muy abundante en los testículos, concretamente en espermatozoides inmaduros, y en fases embrionarias tempranas. Además, su sobreexpresión en fibroblastos aumenta su capacidad tumorigénica, lo que sugiere que debe tener un papel en la regulación del ciclo celular. A pesar de su alta expresión en espermatozoides, experimentos de pérdida de función llevados a cabo en ratones han demostrado que en ausencia de Lyar la espermatogénesis no se ve afectada, siendo estos ratones totalmente fértiles (Lee *et al.*, 2013).

Gracias a varios estudios en ESCs tanto humanas como de ratón se ha revelado que Lyar se expresa a altos niveles en condiciones indiferenciadas y que su expresión disminuye considerablemente tras la inducción de diferenciación en cuerpos embrioides (Cai *et al.*, 2006). Además, en ausencia de diferenciación el papel de Lyar resulta esencial para el mantenimiento de la identidad celular de las ESCs, manteniendo su capacidad de auto-renovación y su capacidad para diferenciarse (Li *et al.*, 2009). Este papel en el mantenimiento de la pluripotencia proviene en parte de su interacción con la proteína Nucleolina. Esta es una proteína de unión al ARN implicada en la regulación de la biogénesis de ribosomas, esencial para el crecimiento de las ESCs. La interacción con Lyar bloquea la capacidad de auto-procesamiento de Nucleolina, favoreciendo así su función en la proliferación celular (Li *et al.*, 2009). Al igual que Nucleolina, Lyar participa en el procesamiento del ARN pre-ribosómico que tiene lugar en el nucleolo (Miyazawa *et al.*, 2014), pero también

se localiza asociado a los ribosomas del citosol (concretamente formando parte del complejo 60S) favoreciendo así la traducción (Yonezawa *et al.*, 2014). Por otro lado, Lyar también participa en el control de la expresión génica a nivel transcripcional. Su dominio de dedos de cinc no solo le permite unirse al ARN ribosómico sino también al ADN, ejerciendo en estos casos como factor de transcripción con afinidad por la secuencia consenso GGTAT (Ju *et al.*, 2014). En este sentido se ha demostrado su acción represora sobre los genes de la globina fetal humana (*HBG1* y *HBG2*) durante la eritropoyesis, llevada a cabo gracias a su interacción con la metiltransferasa de histonas PRMT5 (Ju *et al.*, 2014). La interacción con PRMT5 permite que Lyar también actúe como represor de genes relacionados con el estrés oxidativo en células de neuroblastoma, favoreciendo así la supervivencia a la apoptosis que suele causar la sobreexpresión de N-Myc en estas células (Sun *et al.*, 2017). Por el contrario, en células de cáncer colorectal, Lyar actúa como activador del gen *LGALS1*, implicado en la capacidad de migración e invasión de estas células (Wu *et al.*, 2015c).

En general los mayores niveles de Lyar aparecen en tipos celulares con alta tasa de proliferación, siendo esta expresión notable en distintas líneas tumorales en cuyos tejidos de origen la expresión es baja (Yonezawa *et al.*, 2014). Por lo tanto, Lyar actúa a distintos niveles favoreciendo el crecimiento y la proliferación celular así como su capacidad de supervivencia e invasividad.

6.2. Nipbl

Nipbl (Nipped B-like) es una proteína que junto a Mau2 forma parte del complejo necesario para cargar la Cohesina a la cromatina. El complejo Cohesina es el encargado de la segregación cromosómica durante la división celular y está compuesto por las subunidades principales Smc1, Smc3, Rad21 y Stag1/2. Smc1 y Smc3 forman un anillo que es estabilizado por Rad21, quien a su vez recluta a Stag1/2 y otras proteínas auxiliares (**Tabla 1**). Estas proteínas auxiliares se asocian a la Cohesina durante distintas fases del ciclo celular, regulando así su función y asegurando la correcta progresión del ciclo (**Figura 4**).

INTRODUCCIÓN

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Smc1	Estructura de la Cohesina
Smc3	Estructura de la Cohesina
Rad21	Estructura de la Cohesina
Stag1/Stag2	Estructura de la Cohesina
Nipbl	Carga de la Cohesina
Mau2	Carga de la Cohesina
Wapl	Descarga de la Cohesina
Pds5a/Pds5b	Descarga de la Cohesina
Esco1/Esco2	Activación de la Cohesina (Acetiltransferasa)
Separasa	Disociación de la Cohesina
Hdac8	Reciclaje de la Cohesina (Deacetilasa)

Tabla 1. Funciones de las proteínas principales y auxiliares del complejo Cohesina.

Nipbl: regulador transcripcional

Tanto Nipbl como otros miembros del complejo Cohesina han sido relacionados con funciones más allá de la segregación cromosómica, siendo en muchos casos esenciales para la regulación transcripcional (Dorsett, 2009) y la reparación del ADN (Ström *et al.*, 2004). El primer papel en transcripción fue descrito en *Drosophila melanogaster*, donde se observó que un mutante en Nipped-B (ortólogo de Nipbl) es incapaz de activar eficientemente la transcripción de genes homeobox (Rollins *et al.*, 1999). También se ha descrito el papel de Nipbl junto a los complejos Cohesina y Mediator en el control de la expresión de los genes *Pou5f1* y *Nanog* en ESCs de ratón, al situarse en sus regiones promotoras y “enhancer” (Kagey *et al.*, 2010).

En la mayoría de los sitios del genoma el complejo Cohesina se localiza junto al “insulator” CTCF, colaborando en el aislamiento de los módulos transcripcionales en los que interaccionan promotores y regiones “enhancer”, regulando así la transcripción (Wendt *et al.*, 2008). En el caso de Nipbl, no se ha demostrado su colocalización con CTCF, por lo que las funciones llevadas a cabo entre Cohesina y CTCF son independientes de Nipbl. Igualmente, Nipbl lleva a cabo la transcripción de muchos genes junto al complejo Cohesina, aunque también es capaz de actuar de manera independiente de este complejo (Zuin *et al.*, 2014; van den Berg *et al.*, 2017). Esta dependencia e independencia del complejo Cohesina varía según el contexto

celular, probablemente debido a las distintas duraciones del ciclo celular y distintas dinámicas del complejo Cohesina existentes entre tipos celulares.

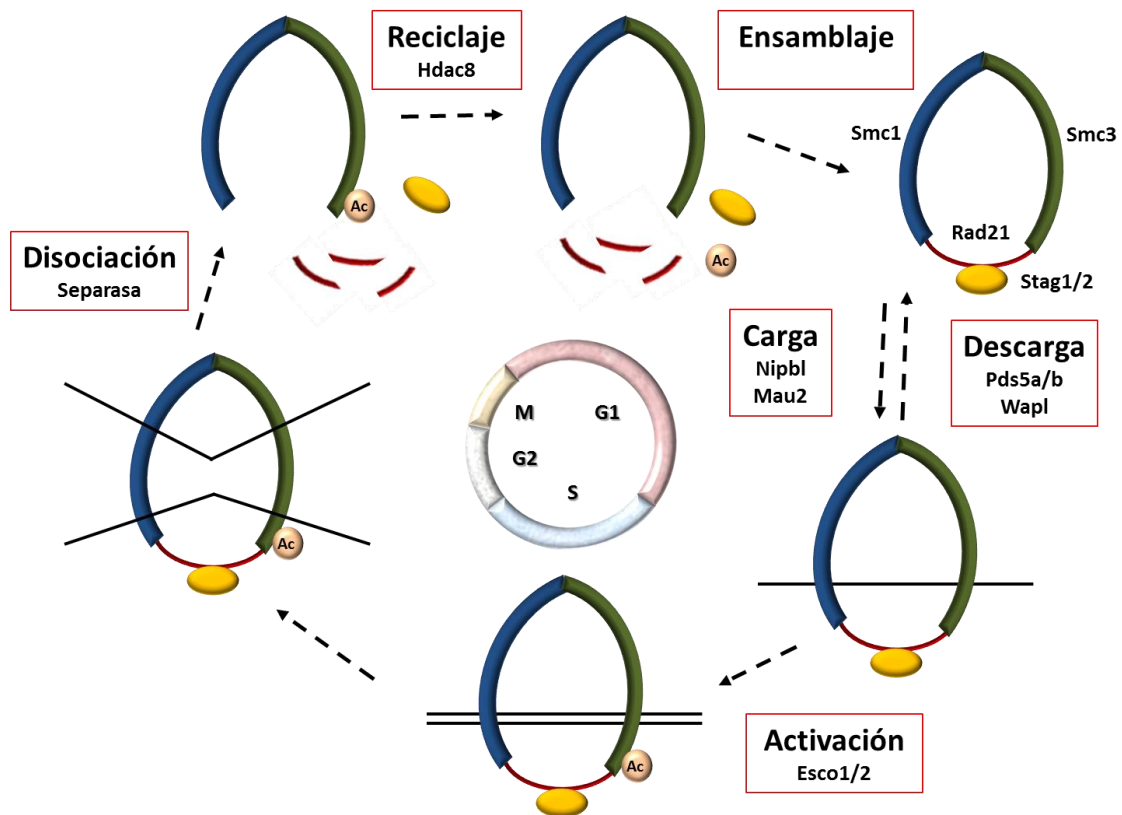


Figura 4. Ciclo del complejo Cohesina

Durante la fase G1 se produce el ensamblaje de Smc1, Smc3, Rad21 y Stag1/2 para dar lugar al complejo Cohesina. Posteriormente Nipbl y Mau2 cargan este complejo al ADN, pero su localización no es suficientemente estable y puede invertirse el proceso debido a la acción de las proteínas Pds5a/b y Wapl. Durante la fase S el complejo es activado mediante la acetilación de Smc3 por parte de la acetiltransferasa Escó1/2. Ya durante la fase M, para que se produzca la segregación cromosómica, la acción de la Separasa disocia al complejo del ADN, permitiendo la separación de las cromátidas hermanas. De este modo, el complejo Cohesina queda libre para que HDAC8 elimine la acetilación de Smc3 de nuevo en G1 y se pueda reutilizar en el siguiente ciclo celular.

Síndrome de Cornelia de Lange. Cohesinopatía ligada a NIPBL

La proteína Nipbl es también muy conocida porque las mutaciones en el gen *NIPBL* en humanos son causantes del 60% de los casos del Síndrome Cornelia de Lange (CdLS). El resto de los casos se debe a mutaciones en los genes *SMC1*, *SMC3*, *RAD21* y *HDAC8* (Deardorff *et al.*, 1993), por lo que este síndrome es catalogado como una cohesinopatía.

INTRODUCCIÓN

Las cohesinopatías son desórdenes del desarrollo que se manifiestan generalmente mediante retraso mental, deformaciones craneofaciales y en el aparato locomotor y deficiencias en varios órganos como el corazón y la región gastro-intestinal. El Síndrome de Cornelia de Lange se debe a mutaciones dominantes (autosómicas o ligadas al cromosoma X) en los genes *SMC1*, *SMC3*, *RAD21*, *NIPBL* y *HDAC8*, produciéndose normalmente *de novo*. Existen casos en los que pacientes con fenotipos similares a los de CdLS (denominados CdLS-like) no presentan mutaciones en ninguno de estos genes, pero sí en otros no relacionados con el complejo Cohesina como *ANKRD11* (Ansari *et al.*, 2014), *AFF4* (Izumi *et al.*, 2015) y *KNMT2* (Parenti *et al.* 2017). Recientemente, durante el desarrollo de esta tesis, se han descrito también varios casos CdLS-like con mutaciones en *BRD4* (Olley *et al.*, 2018), relacionando por primera vez a BRD4 y NIPBL.

Contrariamente a lo que cabría esperar, a pesar de que la carga de la Cohesina se ve afectada en ratones con pérdida de función de *Nipbl* (Remeseiro *et al.*, 2013), solo la función transcripcional que este complejo lleva a cabo resulta alterada, permaneciendo su función en la segregación cromosómica intacta (Newkirk *et al.*, 2017). Este hecho también se ha observado en pacientes de CdLS (Castronovo *et al.*, 2009), donde un cúmulo de cambios leves en la expresión de múltiples genes provocarían los fenotipos de la enfermedad. En general, tanto en células de pacientes de CdLS como en los modelos de ratón, los genes cuya expresión se ve principalmente afectada están relacionados con el desarrollo embrionario (Kawauchi *et al.*, 2013; Mills *et al.*, 2018).

En pez cebra se ha observado cómo la disminución en los niveles de *Nipbl* altera el proceso de gastrulación, afectando a la expresión de genes implicados en la diferenciación hacia el endodermo (*foxa2*) y en la determinación del eje izquierda-derecha (*lefty2*), dando lugar a malformaciones del corazón y del sistema intestinal en los adultos (Muto *et al.*, 2011). Igualmente, estos presentan defectos en el sistema nervioso central y en las extremidades. Los defectos en el sistema nervioso central son causados por una disminución de la ruta de señalización Wnt implicada en su desarrollo (Pistocchi *et al.*, 2013), alteración observada tanto en otros modelos animales como en células de pacientes con CdLS (Avagliano *et al.*, 2017). En cuanto

a las malformaciones de las extremidades, característica típica de CdLS y observada también en un modelo de ratón, son causadas por la disminución de los niveles de expresión de *shha* y de los genes *fgf* (Muto *et al.*, 2014), controlados por Nipbl en sinergia junto al complejo Mediator.

Por último, Nipbl también lleva a cabo una función sinérgica con el factor de transcripción Zfp609 en el desarrollo cerebral del ratón, controlando la expresión de genes implicados en la migración de las neuronas corticales (van den Berg *et al.*, 2017). Ambas proteínas se localizan en los promotores de genes activos junto al complejo Integrator, con el cual interaccionan, que a su vez controla la salida del estado de pausa de la ARN polimerasa II (Gardini *et al.*, 2014).

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

Hasta el momento se ha descrito la relevancia de las proteínas BET en los procesos de mantenimiento de la pluripotencia y de diferenciación neuronal; sin embargo, su función viene en muchos casos definida por las interacciones que llevan a cabo en cada contexto celular y genómico. Los nuevos interactores de las proteínas BET identificados, Lyar y Nipbl, participan en la transcripción afectando tanto al mantenimiento de la pluripotencia como a la diferenciación neuronal. Por lo tanto, nos preguntamos qué importancia tendría la interacción con estas dos proteínas para que las proteínas BET puedan realizar su función. Adicionalmente, también quisimos analizar si existía un papel diferencial entre Brd2 y Brd4 en el control de los cambios de expresión que se producen tras la inducción de la diferenciación neuronal con ácido retinoico.

Por ello, los objetivos de esta tesis fueron:

1. Estudiar el papel de la interacción de las proteínas BET con la proteína Lyar.
2. Estudiar la interacción de las proteínas BET con la proteína Nipbl y su implicación en el Síndrome Cornelia de Lange.
3. Estudiar la dinámica de las proteínas Brd2 y Brd4 en los promotores de los genes que se inducen y se reprimen durante el proceso de diferenciación neuronal.

RESULTADOS

BLOQUE I: Estudio del papel de la interacción de las proteínas BET con la proteína Lyar

1. Caracterización de la interacción entre las proteínas BET y Lyar

Antes de comenzar a estudiar el aspecto funcional de la interacción, consideramos importante realizar una caracterización más profunda sobre la naturaleza de esta. Un mejor conocimiento sobre los dominios de interacción y sobre el contexto en el que esta se realiza fue necesario para un mejor diseño del posterior análisis funcional.

1.1. Lyar interacciona exclusivamente con Brd2

Puesto que el escrutinio de doble híbrido en el que se identificó a Lyar se realizó con un cebo correspondiente a Brd2, quisimos comprobar si el resto de los miembros de la familia BET también interaccionaba con Lyar. Para ello realizamos un ensayo de doble híbrido con las construcciones usadas en el escrutinio (LexA-Brd2 y GAD-Lyar) además de las construcciones cebo LexA-Brd3 y LexA-Brd4. En cada caso se co-transformaron las levaduras con una construcción cebo y la construcción GAD-Lyar, tras lo cual se realizaron diluciones seriadas que se pusieron en cultivo en medio no selectivo y medio selectivo (**Figura 5A**). De este modo, observamos que las levaduras solo crecían en medio selectivo cuando estaban en presencia de Brd2, por lo que la interacción tenía lugar exclusivamente entre Brd2 y Lyar.

1.2. El motivo B es el dominio responsable de la interacción con Lyar

Para la determinación del dominio de Brd2 implicado en la interacción con Lyar realizamos también un ensayo de doble híbrido. Para ello se crearon las construcciones cebo LexA-mB y LexA-ET, correspondientes a las dos mitades de la construcción LexA-Brd2 usada en el escrutinio (**Figura 5B**), y se co-transformaron junto a la construcción presa GAD-Lyar. Las levaduras resultantes fueron cultivadas

RESULTADOS – Bloque I

en condiciones selectivas y no selectivas, pero solo aquellas co-transformadas con LexA-mB fueron capaces de crecer en medio selectivo (**Figura 5C**), señalando a la región del motivo B como la responsable de la interacción con Lyar.

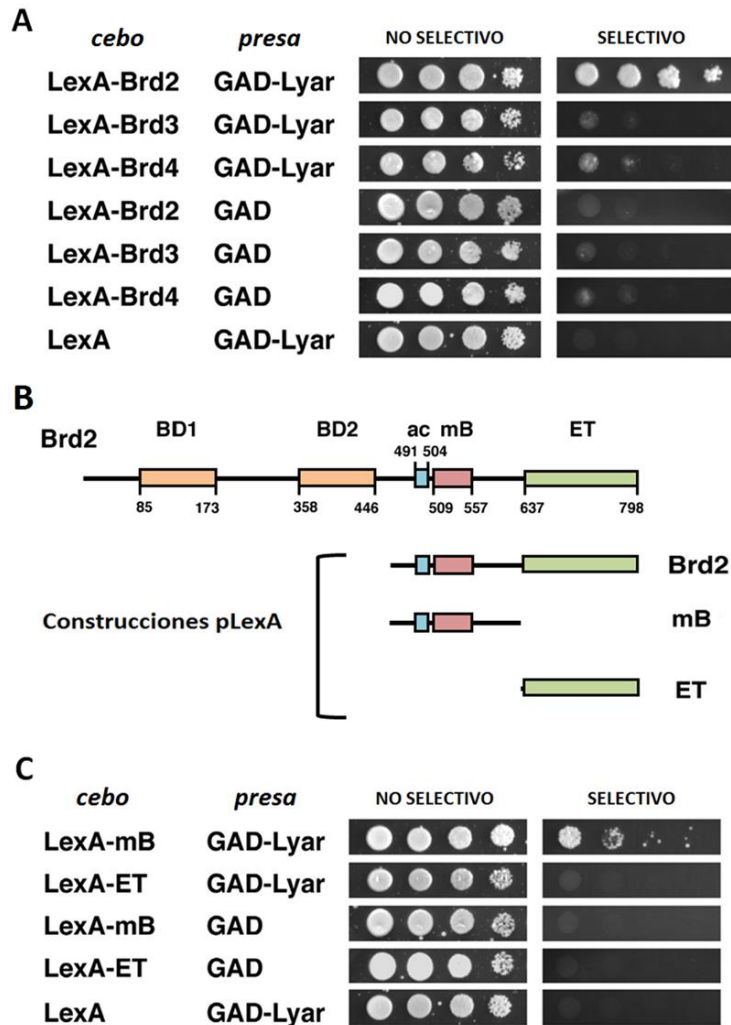


Figura 5. Brd2 interacciona exclusivamente con Lyar mediante el motivo B.

A) Crecimiento en medio selectivo y no selectivo de levaduras portadoras de las construcciones cebo (LexA) y presa (GAD) indicadas. El crecimiento en medio selectivo es indicativo de interacción entre los correspondientes cebo y presa. **B)** Esquema de las construcciones cebo utilizadas para el mapeo del dominio de interacción y su correspondencia con la estructura de Brd2. BD1 (bromodomain 1), BD2 (bromodomain 2), ac (región acídica), mB (motivo B), ET (dominio extra-terminal). Los números indican las posiciones de los aminoácidos. **C)** Crecimiento en medio selectivo y no selectivo de levaduras portadoras de las construcciones cebo (LexA) y presa (GAD) indicadas.

1.3. La región acídica de Brd2 no participa en la interacción con Lyar

A pesar de que la interacción de Brd2 con Lyar se lleva a cabo mediante la región del motivo B, altamente conservada entre los distintos miembros de la familia BET, esta resultó ser exclusiva del miembro Brd2. Por ello, pensamos que esta exclusividad podría deberse a un dominio presente solo en la estructura de Brd2. Se trata de una región acídica (ac) rica en glutámico y aspártico, localizada en posición N-terminal respecto al motivo B y que está presente en la construcción utilizada en el análisis por doble híbrido (**Figura 5B**). Para comprobar nuestra hipótesis realizamos transfecciones en células HEK293T con las construcciones etiquetadas con el epítipo Flag correspondientes a Brd2, Brd2 Δ ac, Brd2 Δ mB y Brd4 (las dos últimas usadas como control negativo de la interacción). Estas fueron a su vez cotransfectadas junto con una construcción de Lyar etiquetada con el epítipo HA. En las distintas muestras inmunoprecipitamos con un anticuerpo anti-Flag y analizamos la coprecipitación de Lyar revelando con un anticuerpo anti-HA. De este modo observamos que Brd2 no interaccionaba con Lyar mediante su región acídica y se confirma tanto que la interacción es exclusiva con el miembro Brd2 como que el motivo B es esencial para que esta ocurra (**Figura 6A**).

1.4. La región C-terminal de Lyar es la responsable de la interacción con Brd2

Una vez identificada la región de Brd2 implicada en la interacción, procedimos a la identificación del dominio estructural de la proteína Lyar responsable de la interacción. Los principales dominios presentes en la estructura de Lyar consisten en un dominio de dedos de cinc (ZF) en posición N-terminal, encargado de la unión al ADN, y una serie de secuencias NLS y un putativo dominio “coiled-coil” en la zona central de la proteína. Por lo tanto, diseñamos las construcciones correspondientes a las regiones N-terminal (Lyar- Δ C) y C-terminal (Lyar- Δ ZF), etiquetadas con el epítipo HA y conservando en ambos casos los dominios NLS y “coiled-coil” (**Figura 6B**). Con estas construcciones y la correspondiente a la proteína completa (Lyar-wt), transfectamos células P19 y realizamos experimentos de inmunoprecipitación usando el anticuerpo anti-Brd2I en los distintos extractos proteicos. La

RESULTADOS – Bloque I

coprecipitación de las distintas versiones de Lyar la observamos revelando con el anticuerpo anti-HA, que mostró que Brd2 no interaccionaba con la construcción Lyar- Δ C, determinando así que para que se produzca la interacción con Brd2 la región C-terminal de Lyar es imprescindible (**Figura 6C**).

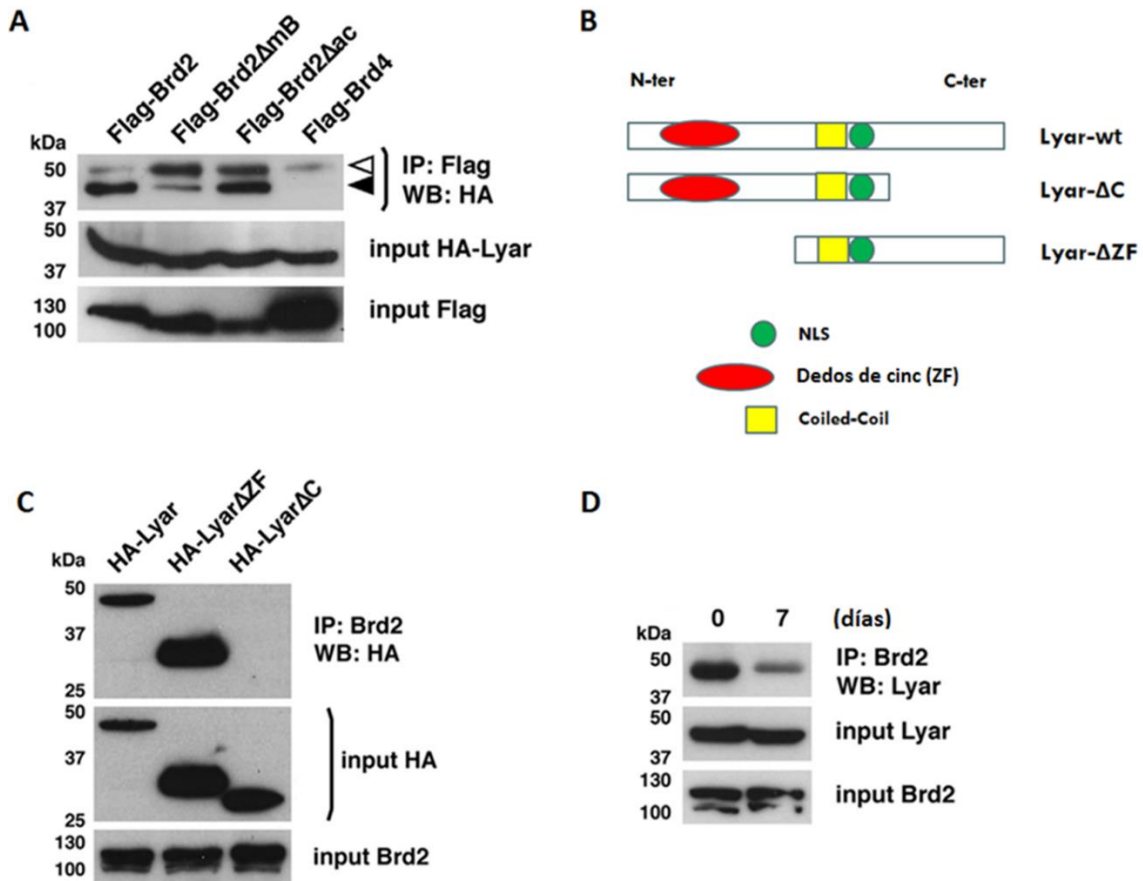


Figura 6. Caracterización de la interacción entre Brd2 y Lyar.

A) Extractos de células HEK293T transfectadas con la construcción HA-Lyar y las correspondientes construcciones etiquetadas con el epítipo Flag fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-Flag. Las proteínas coprecipitadas se revelaron mediante un anticuerpo anti-HA. La flechas blanca y negra indican las bandas correspondientes a la IgG y a Lyar respectivamente. **B)** Esquema de las construcciones HA-Lyar utilizadas para la identificación de su dominio de interacción. **C)** Extractos de células P19 transfectadas con las correspondientes construcciones etiquetadas con el epítipo HA fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-Brd2. Las proteínas coprecipitadas se revelaron mediante un anticuerpo anti-HA. **D)** Extractos de células P19 tratadas con AR los días indicados se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-Brd2. La proteína Lyar endógena se reveló usando un anticuerpo anti-Lyar. **A/C/D)** En todos los casos los inputs corresponden a un 10 % de los extractos inmunoprecipitados.

1.5. La interacción Brd2-Lyar es más estable en condiciones de proliferación

Por último, utilizamos la línea celular P19, procedente de teratocarcinoma de ratón y que conserva características de célula troncal como la pluripotencia (McBurney *et al.*, 1982). Aprovechando la capacidad de las células P19 para diferenciarse hacia neuronas en presencia de ácido retinoico (AR), quisimos analizar si la interacción entre Brd2 y Lyar tenía lugar entre las proteínas endógenas y si esta se conservaba en células diferenciadas. Previamente se había descrito que Lyar es imprescindible para que las células troncales embrionarias mantengan su capacidad de auto-renovación y lleven a cabo una correcta diferenciación hacia las distintas líneas embrionarias (Li *et al.*, 2009). De este modo, queríamos comprobar si la interacción de Lyar con Brd2 podría estar implicada en este proceso. Para ello realizamos un experimento de inmunoprecipitación usando el anticuerpo anti-Brd2I en extractos de células P19 en estado pluripotente y diferenciadas a neuronas (0 días y 7 días de diferenciación respectivamente). Al revelar con el anticuerpo anti-Lyar observamos que la interacción también tenía lugar entre las proteínas endógenas y que a pesar de que ambas proteínas se expresaban al mismo nivel durante el proceso de diferenciación, la interacción entre ambas se veía debilitada al cabo de 7 días (**Figura 6D**). Esto sugiere que el papel que ambas proteínas desempeñan juntas ocurre entre el estado proliferativo y el de una diferenciación temprana.

2. Papel de la interacción Brd2-Lyar en la estabilidad de la unión de Brd2 a la cromatina

Para profundizar en el estudio de la función de la interacción entre estas dos proteínas decidimos disminuir los niveles de cada una de ellas y observar los efectos que esto conllevaba. Una de las estrategias para ello es el uso de moléculas de interferencia, que afectan a los procesos de transcripción o traducción provocando bajadas en los niveles finales de las proteínas. En nuestro caso, procedimos de esta manera y en el momento de validar el funcionamiento de este tipo de moléculas observamos que en extractos de células P19 transfectadas con una molécula shRNA

RESULTADOS – Bloque I

contra *Lyar* (*shLyar*) se producía un aumento significativo de los niveles de Brd2 (**Figura 7A**). Las proteínas BET se caracterizan por estar fuertemente ancladas a la cromatina, de manera que a la hora de obtener extractos proteicos de estas suelen ser necesarios métodos que además relajen la cromatina (como el uso de una alta concentración de sal o de nucleasas). Sin embargo, en los extractos utilizados en estas validaciones no se usaron dichas técnicas, por lo que el aumento de los niveles proteicos de Brd2 en esta condición podría deberse tanto a un aumento de su expresión como a un aumento de su solubilidad.

2.1. Lyar recluta a Brd2 a los promotores de genes de pluripotencia

Como paso siguiente, por lo tanto, decidimos comprobar si la ausencia de Lyar provocaba un aumento en la solubilidad de Brd2. Para ello tratamos células P19 paralelamente con la molécula *shLyar* y la droga JQ1 como control positivo, ya que esta tiene la capacidad de desanclar a las proteínas BET de la cromatina al mimetizar a las lisinas acetiladas por las que tienen afinidad. De este modo, la droga JQ1 consigue que la presencia de las proteínas BET se localice principalmente en las fracciones solubles de los extractos, contrariamente a lo que ocurre en condiciones control. Tras analizar los extractos solubles y cromatínicos de las células tratadas con *shLyar*, determinamos que comparado con las muestras control, en estas condiciones la presencia de Brd2 es mayoritaria en la fracción soluble, aunque su capacidad de despegar a Brd2 de la cromatina no es tan potente como la de la droga JQ1 (**Figura 7B**).

Para corroborar la capacidad de la molécula *shLyar* de disociar a Brd2 de la cromatina decidimos realizar experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con el anticuerpo anti-Brd2N en condiciones de disminución de Lyar y en condiciones control. Como controles experimentales utilizamos también los anticuerpos anti-Lyar (control interno de la bajada de niveles de Lyar) y anti-Brd4 (control de la especificidad de acción). Decidimos analizar el reclutamiento a las regiones promotoras de los genes de pluripotencia *Pou5f1*, *Nanog*, *Prdm14* y *Sox2*, ya que tanto Lyar como las proteínas BET habían sido descritas como relevantes para el mantenimiento de la pluripotencia (Li *et al.*, 2009; Di Micco *et al.*, 2014) y al

promotor del gen de la globina fetal *Hbb-y* (γ -globina) controlado por Lyar (Ju *et al.*, 2014). Analizamos igualmente las regiones promotoras de los genes *Actb* y *Elk3*, en las que está presente Brd2 sin Lyar. De este modo observamos cómo la molécula shLyar provocaba la disociación de Brd2 solo en los promotores en los que ambas proteínas colocalizan, mientras que la unión de Brd4 a estos promotores no se ve alterada en estas condiciones (Figura 8).

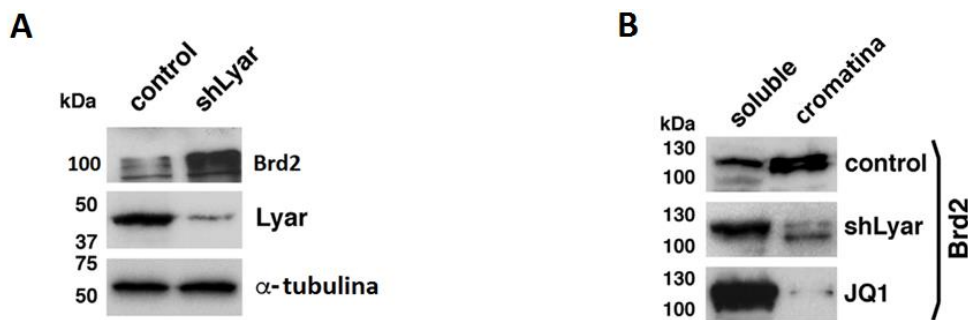


Figura 7. Aumento de la solubilidad de Brd2 en ausencia de Lyar.

A) Extractos de células P19 transfectadas durante 48 h con shLyar o shC (control) fueron analizados por western-blot (20 μ g de proteína total) con los anticuerpos anti-Brd2C, anti-Lyar y anti- α -tubulina (este último como control de carga). **B)** Células P19 transfectadas durante 48 h con shLyar, tratadas 3 h con la droga JQ1 o sin ningún tratamiento (control) fueron sometidas a una extracción proteica por fraccionamiento hipotónico, que dio lugar a una fracción soluble y una fracción cromatínica que fueron analizadas por western-blot con un anticuerpo anti-Brd2.

2.2. La presencia de Lyar en los promotores es independiente de las proteínas BET

Puesto que la presencia de Brd2 es dependiente de Lyar en los promotores en los que colocalizan, nos propusimos comprobar si esta dependencia también existe en el sentido contrario. Para ello realizamos experimentos de ChIP con los anticuerpos anti-Brd2N y anti-Lyar sobre células P19 tratadas con DMSO (control) o la droga JQ1, ya que esta disocia eficientemente a las proteínas BET de la cromatina. Analizamos las regiones promotoras correspondientes a los genes de pluripotencia *Pou5f1*, *Nanog* y *Prdm14* y en ninguno de los casos se observó una variación significativa en la unión de Lyar (Figura 9). De este modo descartamos la posibilidad

RESULTADOS – Bloque I

de que exista un reclutamiento de Lyar a la cromatina dependiente de las proteínas BET.

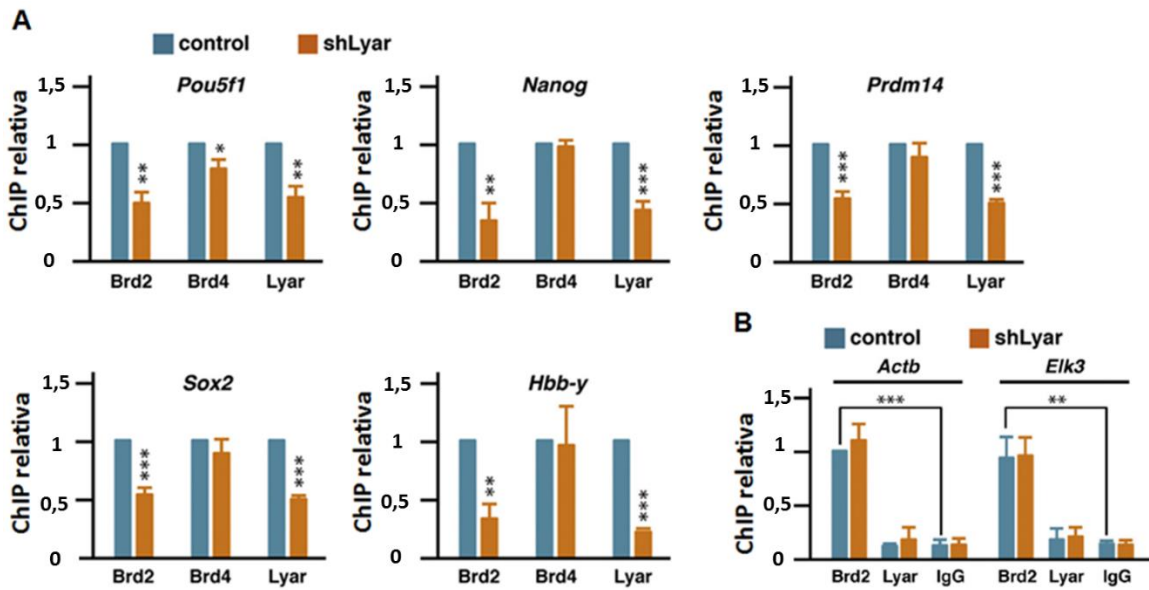


Figura 8. Lyar recluta a Brd2 a los promotores de genes de pluripotencia.

A) Análisis mediante ChIP de la asociación de Brd2, Brd4 y Lyar a los promotores de los genes *Pou5f1* (*Oct4*), *Nanog*, *Prdm14*, *Sox2* y *Hbb-y* (γ -globina) en células P19 transfectadas con sh*Liar* o shC (control) durante 48h. **B)** Análisis mediante ChIP de la asociación de Brd2 y Lyar a los promotores de los genes *Actb* y *Elk3* en células P19 transfectadas con sh*Liar* o shC (control) durante 48 h. **A-B)** Los niveles se relativizaron respecto a los de las células transfectadas con shC o respecto a los niveles de Brd2 en la condición shC (para *Actb* y *Elk3*). Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

3. Análisis funcional de la interacción entre Brd2 y Lyar

3.1. Lyar actúa como represor de *Nanog*

Una vez observado el papel de la interacción Brd2-Lyar en el reclutamiento de Brd2 a las regiones promotoras de una serie de genes, quisimos analizar los efectos que causan la pérdida de una u otra proteína en la expresión de estos genes. Tratamos células P19 con sh*Liar*, la droga JQ1, y sus respectivos controles (shC y DMSO) y observamos que *Nanog* y *Prdm14* son los únicos genes regulados por ambas

proteínas, actuando Lyar como represor transcripcional y las proteínas BET como activadores transcripcionales (Figura 10). Puesto que los cambios transcripcionales sobre *Nanog* fueron mayores, decidimos centrarnos en este gen para los análisis posteriores.

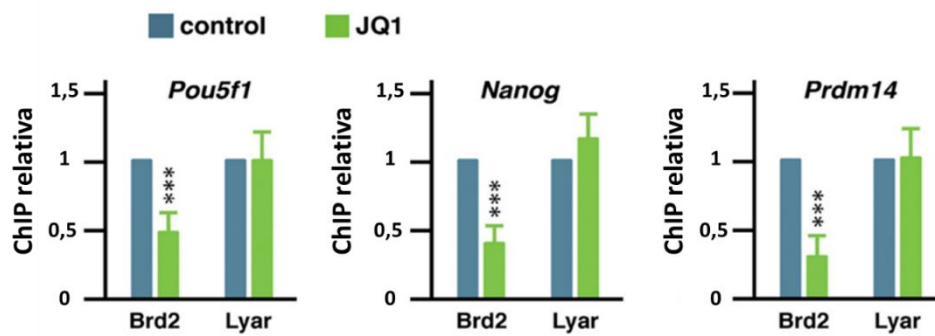


Figura 9. Las proteínas BET no reclutan a Lyar a la cromatina.

Análisis mediante ChIP de la asociación de Brd2 y Lyar a los promotores de los genes *Pou5f1*, *Nanog* y *Prdm14* en células P19 tratadas durante 3 h con DMSO (control) o droga JQ1. Los niveles se relativizaron respecto a los de las células tratadas con DMSO. Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. *** p-valor<0,001.

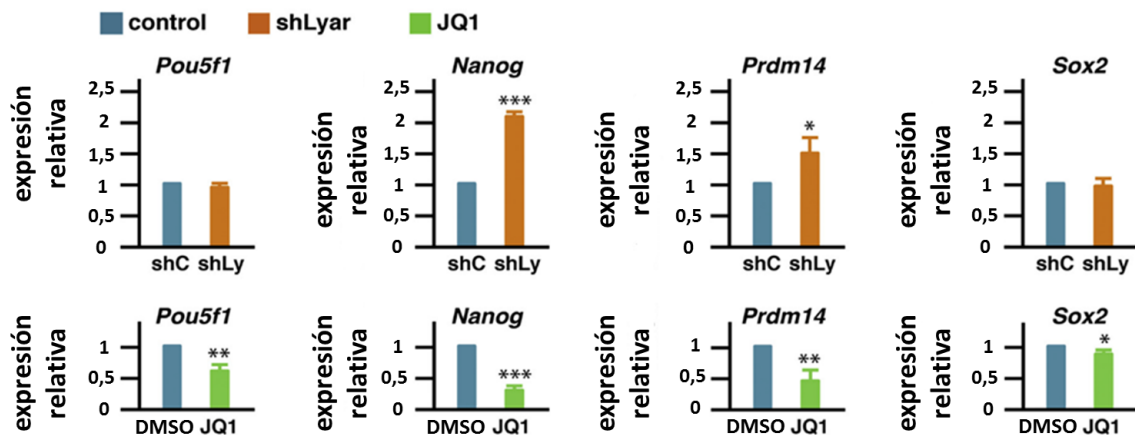


Figura 10. Lyar actúa como represor de *Nanog*.

Expresión relativa de los genes *Pou5f1*, *Nanog*, *Prdm14* y *Sox2* en células P19 transfectadas con shLyar (shLy) o shC durante 48 h o tratadas con la droga JQ1 o DMSO durante 24 h. Los niveles se relativizaron respecto a los de las condiciones control (shC y DMSO respectivamente). Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

3.2. Lyar asegura una correcta diferenciación neuronal

Al ser *Nanog* un gen de pluripotencia, este es reprimido durante la diferenciación neuronal. Para conocer qué efectos tiene la represión que ejerce Lyar sobre *Nanog* en el proceso de diferenciación neuronal analizamos en primer lugar cómo varían sus niveles de expresión a lo largo del proceso. Para ello tratamos las células P19 con ácido retinoico (AR) para inducir la diferenciación neuronal y observamos los niveles de expresión de *Nanog* a distintos tiempos. A 16 h se produjo una disminución de la expresión de un 44 %, a 24 h de un 88 % y a 48 h de un 98 % (**Figura 11A**). Quisimos contrastar estos resultados con datos sobre la presencia de Lyar y Brd2 en el promotor de *Nanog*, por lo que realizamos experimentos de ChIP en células P19 en condiciones de proliferación y tras 48h de tratamiento con RA. Observamos que durante el proceso de diferenciación Brd2 se disociaba del promotor de *Nanog*, mientras que Lyar permanecía unido (**Figura 11B**). De este modo, durante la diferenciación neuronal se pierde la acción activadora de Brd2 sobre la transcripción y se mantiene la acción represora de Lyar, lo que explica la disminución de los niveles de expresión de *Nanog* durante este proceso.

Posteriormente tratamos con AR durante 48 h células P19 previamente transfectadas con sh*Lyar* y sh*C* y analizamos la expresión de *Nanog* y de los genes de diferenciación *Nes* (Nestina), *Sox6* y *Pax6*. Observamos cómo la disminución de los niveles de Lyar hace que la represión de *Nanog* y la inducción de *Nes* (Nestina), *Sox6* y *Pax6* sean menores que las observadas en condiciones normales (**Figura 11C**), destacando la importancia de Lyar para una correcta diferenciación neuronal.

3.3. La interacción Brd2-Lyar es esencial para que el nivel de represión de *Nanog* durante la diferenciación neuronal sea el adecuado

A continuación, quisimos determinar si la interacción de Lyar con Brd2 es importante para lo observado anteriormente, pero como al usar sh*Lyar* bajan los niveles de Lyar y Brd2 se disocia utilizamos dos abordajes adicionales. En primer lugar, hicimos uso de una molécula de interferencia esiRNA contra *Brd2* (*esiBrd2*) (**Figura 12A**) para disminuir los niveles de Brd2 antes de inducir la diferenciación

neuronal. Medimos la expresión de *Nanog* antes y después de la inducción neuronal en presencia de un esiC y de *esiBrd2* y observamos una mayor represión en presencia de bajos niveles de Brd2 (**Figura 12B**). Puesto que la interacción entre Brd2 y Lyar se ve debilitada a 7 días de tratamiento con AR, decidimos elegir tiempos más cortos de tratamiento (16 h y 48 h), equivalentes a una diferenciación temprana, para el estudio de la interacción.

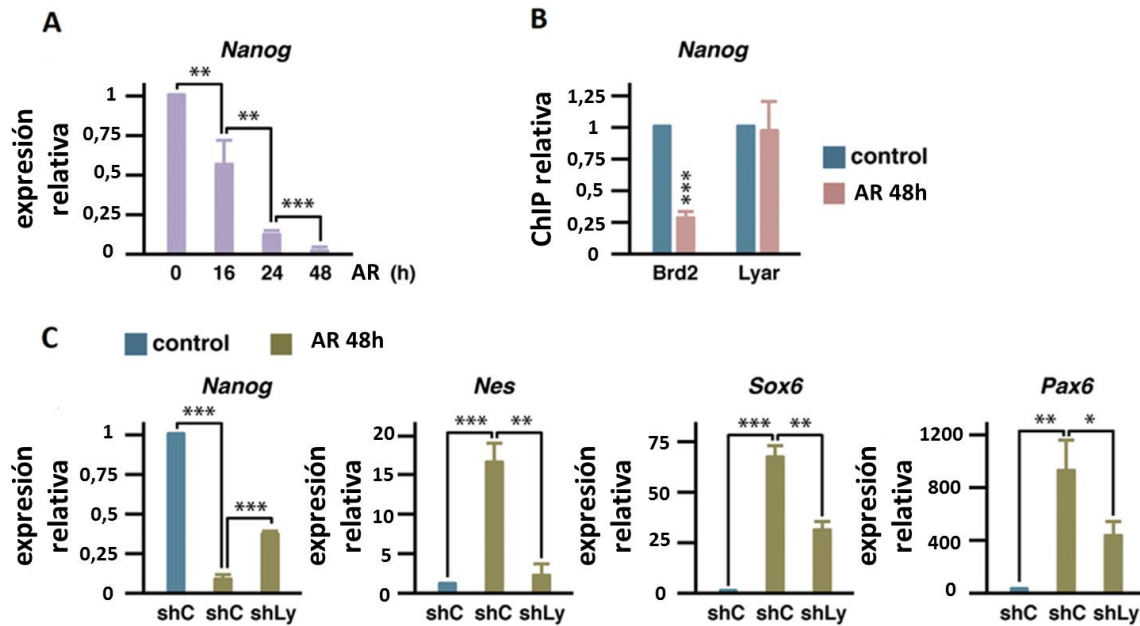


Figura 11. Lyar controla la diferenciación neuronal.

A) Expresión relativa de *Nanog* en células P19 tratadas con ácido retinoico (AR) durante las horas indicadas. Los niveles se relativizaron respecto a la condición 0 h AR. **B)** Análisis por ChIP de la asociación de Brd2 y Lyar al promotor de *Nanog* tras 48 h de tratamiento con AR o en ausencia de tratamiento (control). Los niveles se relativizaron respecto a los de las células sin tratar. **C)** Expresión relativa de los genes *Nanog*, *Nes* (Nestina), *Sox6* y *Pax6* en células P19 transfectadas con *shLyar* (shLy) o shC durante 48 h y posteriormente tratadas o no tratadas con AR otras 48 h. Los niveles se relativizaron respecto a la condición shC sin tratar. **A-C)** Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

El segundo abordaje consistió en la transfección de la construcción Lyar-ΔC. Como hemos mostrado anteriormente (**Figura 6**), esta construcción está afectada en su interacción con Brd2, pero al mantener el dominio ZF de unión al ADN, podría actuar como molécula dominante negativa. Primero comprobamos que Lyar-ΔC

presentaba niveles de unión al promotor de *Nanog* similares a los de Lyar-wt (**Figura 12C**). Además, a diferencia del resto de construcciones provocaba una bajada en los niveles de reclutamiento de Brd2, mientras que los niveles de reclutamiento de Brd4 no se vieron afectados (**Figura 12D**). Al igual que en el caso anterior, analizamos la expresión de *Nanog* antes y después de la inducción de la diferenciación neuronal en presencia de un vector vacío o de Lyar- Δ C y observamos que los niveles de represión fueron mayores en presencia de Lyar- Δ C (**Figura 12E**). Por lo tanto, la interacción entre Brd2 y Lyar es esencial para que en condiciones de diferenciación neuronal *Nanog* se reprima de manera progresiva y no bruscamente.

3.4. La interrupción de la interacción Brd2-Lyar provoca una disminución de la neurogénesis y un aumento en la apoptosis

Además del efecto inmediato sobre los niveles de expresión de *Nanog*, quisimos ver si interrumpir la interacción entre Brd2 y Lyar mediante la sobreexpresión de Lyar- Δ C también tenía efectos sobre la diferenciación. Para ello, transfectamos células P19 con un vector vacío o la construcción Lyar- Δ C y posteriormente las diferenciamos mediante adición de AR. En primer lugar, analizamos la neurogénesis realizando un ensayo de inmunofluorescencia con el marcador de diferenciación Pax6 y observamos que en presencia de Lyar- Δ C el porcentaje de células marcadas fue significativamente menor, indicando una menor capacidad de neurogénesis (**Figura 13A**). También analizamos los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación *Nes* (Nestina), *Sox6* y *Pax6*, los cuales también disminuyeron al interrumpir la interacción entre Brd2 y Lyar (**Figura 13B**).

Por último, puesto que es común que un proceso de diferenciación alterado desemboque en la inducción de la muerte celular (Péguet-Navarro *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2008), medimos también los niveles de apoptosis en ambas condiciones. De esta manera observamos cómo en presencia de Lyar- Δ C los niveles de apoptosis fueron mayores (**Figura 13C**), indicando que la interrupción de la interacción entre Brd2 y Lyar no solo altera el proceso de diferenciación neuronal, sino que también aumenta los niveles de apoptosis.

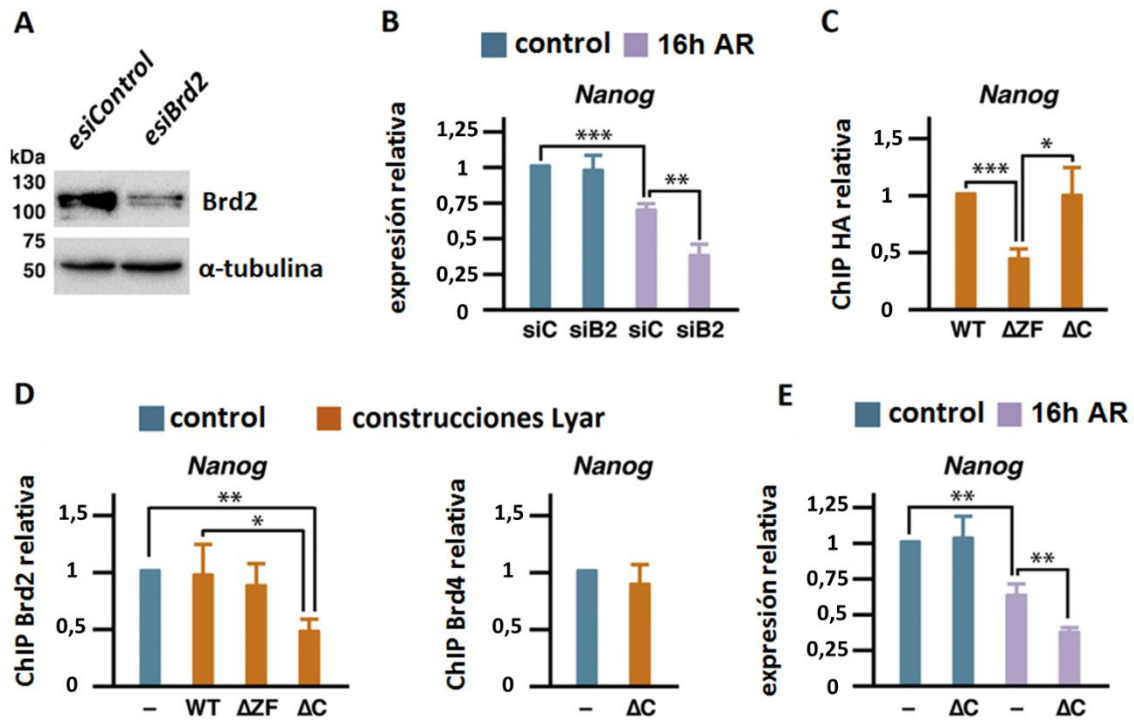


Figura 12. La interacción Brd2-Lyar asegura la correcta represión de *Nanog* durante la diferenciación neuronal.

A) Extractos de células P19 transfectadas con una molécula de interferencia contra *Brd2* (*esiBrd2*) o control (*siC*) durante 72 h fueron analizados mediante western-blot (20 µg de proteína total) con los anticuerpos anti-Brd2C y anti-α-tubulina (este último como control de carga). **B)** Expresión relativa de *Nanog* en células P19 transfectadas con *esiBrd2* (*siB2*) o *siC* durante 72 h y posteriormente tratadas o no tratadas con AR durante 16 h. Los niveles se relativizaron respecto a los de la condición *siC* sin tratar. **C)** Análisis mediante ChIP de la asociación de las distintas construcciones HA de Lyar (WT, ΔZF: sin el dominio dedos de cinc y ΔC: sin el dominio C-terminal) al promotor de *Nanog*. Los niveles se relativizaron respecto a los de la condición WT. **D)** Análisis mediante ChIP de la asociación de Brd2 y Brd4 al promotor de *Nanog* en células transfectadas con las distintas construcciones de Lyar (descritas en C) o un plásmido vacío (-). Los niveles se relativizaron respecto a los de las células transfectadas con el plásmido vacío. **E)** Expresión relativa de *Nanog* en células P19 transfectadas con la construcción Lyar-ΔC o un plásmido vacío (-) durante 24 h y posteriormente tratadas o no tratadas con AR durante 16 h. Los niveles se relativizaron respecto a los de las células transfectadas con el plásmido vacío y sin tratar. **B-E)** Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

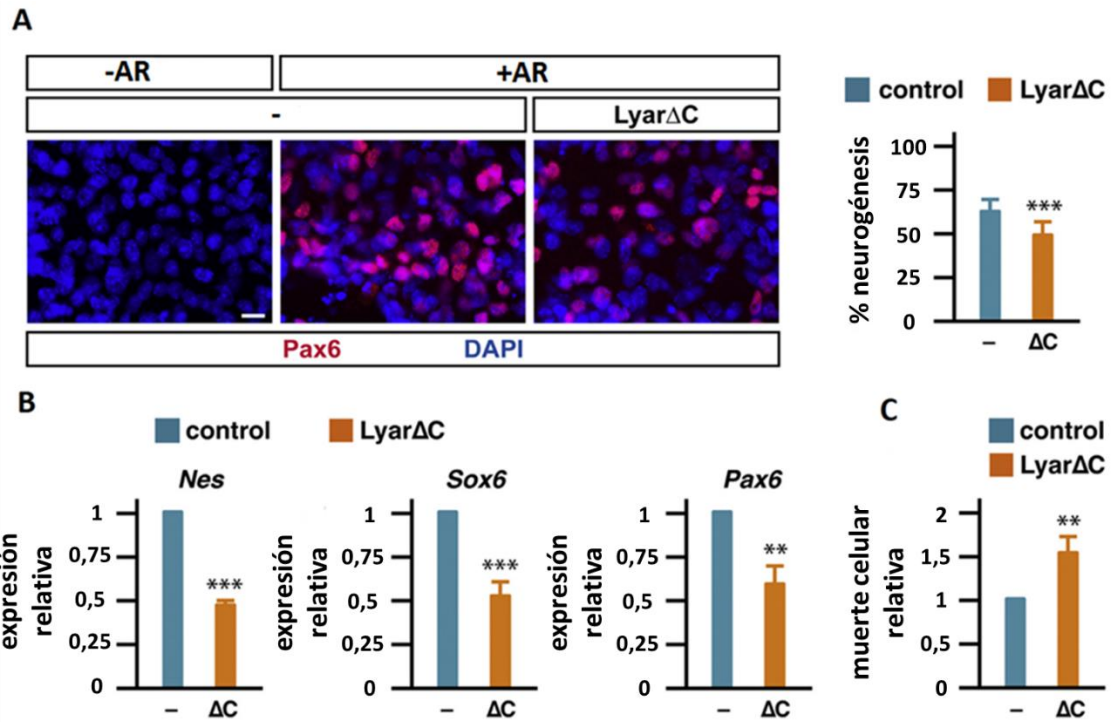


Figura 13. La interacción Brd2-Lyar afecta a la neurogénesis y provoca apoptosis.

A) Inmunofluorescencia de Pax6 en células transfectadas con un vector vacío y no tratadas con AR (-AR) y en células transfectadas con Lyar-ΔC o un vector vacío (-) y tratadas con AR durante 48 h. Barra de escala de 20 μm. El porcentaje de neurogénesis está expresado como la relación de células positivas para Pax6 por células totales. Los niveles se relativizaron respecto a los de las células transfectadas con plásmido vacío y sin tratar. **B)** Expresión relativa de los genes *Nes* (Nestina), *Sox6* y *Pax6* en células P19 transfectadas con Lyar-ΔC o un vector vacío (-) durante 24 h y posteriormente tratadas con AR durante 48 h. **C)** Porcentaje de la población de células en subG1 (células apoptóticas) en células P19 transfectadas con Lyar-ΔC o un vector vacío (-) durante 24 h y posteriormente tratadas con AR durante 48 h. **B-C)** Los niveles se relativizaron respecto a los de las células transfectadas con plásmido vacío. **A-C)** Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

BLOQUE II: Estudio del papel de la interacción de las proteínas BET con la proteína Nipbl y su implicación en el Síndrome de Cornelia de Lange

1. Caracterización de la interacción entre las proteínas BET y Nipbl

En este bloque, igual que en el anterior, decidimos comenzar por caracterizar los dominios de interacción. De este modo obtendríamos información que podría sernos de ayuda a la hora de profundizar en los aspectos funcionales de la interacción.

1.1. Las proteínas BET interaccionan con Nipbl mediante el dominio ET

Para identificar el dominio de las proteínas BET implicado en la interacción realizamos un ensayo de doble híbrido que resolvimos mediante un ensayo β -galactosidasa. En este ensayo utilizamos la construcción cebo LexA-Brd2 utilizada en el escrutinio, así como cebos equivalentes para Brd3 y Brd4 y los cebos correspondientes a las regiones mB y ET (**Figura 14A**). La presa fue en todo caso la construcción GAD-Nipbl. Las levaduras transformadas con sus correspondientes construcciones cebo y presa se sembraron en placas con medio mínimo, se seleccionaron colonias y se les realizó el ensayo β -galactosidasa para observar qué colonias se coloreaban de azul, indicando qué dos productos interaccionan entre sí. De este modo, observamos que Nipbl interaccionaba con todos los miembros de la familia BET y que el dominio de interacción de estas fue el dominio ET (**Figura 14B**), altamente conservado en la familia.

La identificación del dominio de Nipbl implicado en la interacción se determinó analizando la composición del clon aislado en el escrutinio de doble híbrido, el cual poseía la secuencia correspondiente a la región N-terminal de Nipbl (**Figura 14A**).

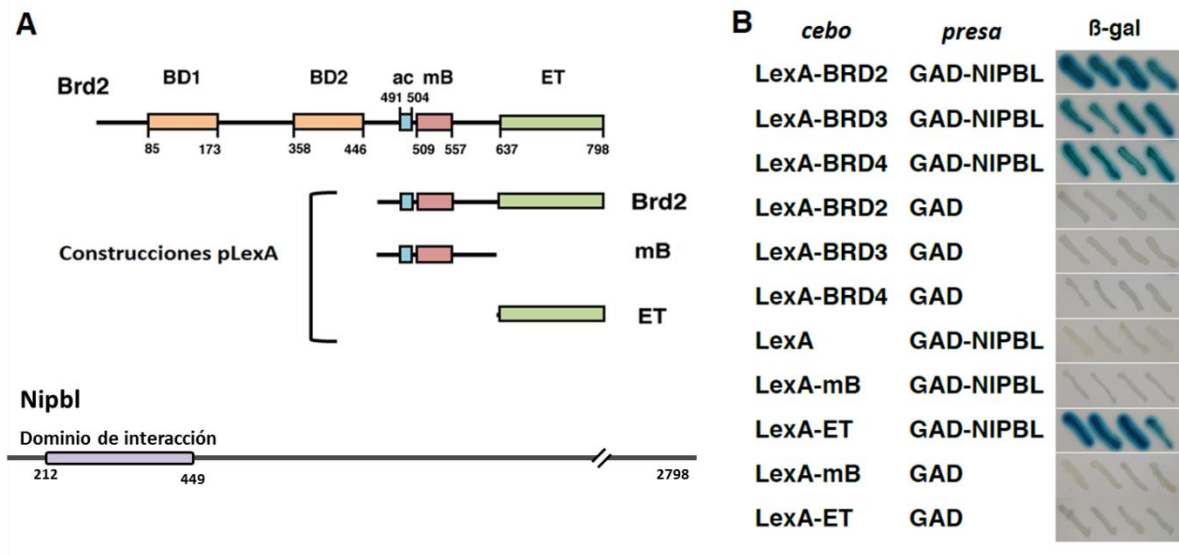


Figura 14. Las proteínas BET interactúan con Nipbl mediante el dominio ET.

A) Esquema de las construcciones cebo utilizadas y su correspondencia con la estructura de Brd2 y estructura del clon correspondiente a Nipbl aislado en el escrutinio. BD1 (bromodomain 1), BD2 (bromodomain 2), ac (región ácida), mB (motivo B), ET (dominio extra-terminal). Los números indican las posiciones de los aminoácidos. **B)** Ensayo β-galactosidasa de las levaduras portadoras de las construcciones cebo (LexA) y presa (GAD) indicadas. La coloración azulada es indicativa de interacción entre los correspondientes cebo y presa.

1.2. Nipbl interactúa preferentemente con Brd4

A continuación, quisimos verificar los resultados anteriores usando las proteínas endógenas, ya que, aunque en la bibliografía existen evidencias de la interacción de Nipbl con las proteínas BET, la información al respecto es poco clara. En un primer trabajo Brd2, pero no Brd4, se relaciona con Nipbl (Cheung *et al.*, 2017), mientras que en otro caso se muestra la relación entre NIPBL y BRD4 en modelos y pacientes CdLS-like (Olley *et al.*, 2018).

Para ello, en primer lugar, comprobamos si Nipbl también era capaz de interactuar con distintos miembros de la familia BET *in vivo*, por lo que realizamos la inmunoprecipitación de la proteína Nipbl presente en extractos de células HEK293T y revelamos por western-blot con los anticuerpos anti-Brd2C y anti-Brd4. Al contrario de lo observado anteriormente, solo hubo coprecipitación de Brd4 (**Figura 15A**),

sugiriendo que Nipbl interacciona preferentemente con este miembro de la familia BET en células de mamífero.

Para confirmar el dominio de interacción, realizamos experimentos de inmunoprecipitación en extractos de células HEK293T transfectadas con construcciones correspondientes a Brd4 y Brd4ΔC (carente de la región C-terminal en la que se encuentra el dominio ET) etiquetadas con el epítipo Flag. La inmunoprecipitación la realizamos con un anticuerpo anti-Flag y revelamos por western-blot con el anticuerpo anti-Nipbl. En este caso solo observamos coprecipitación de Nipbl cuando la proteína Brd4 estaba completa, confirmando así al dominio ET como dominio de interacción (**Figura 15B**).

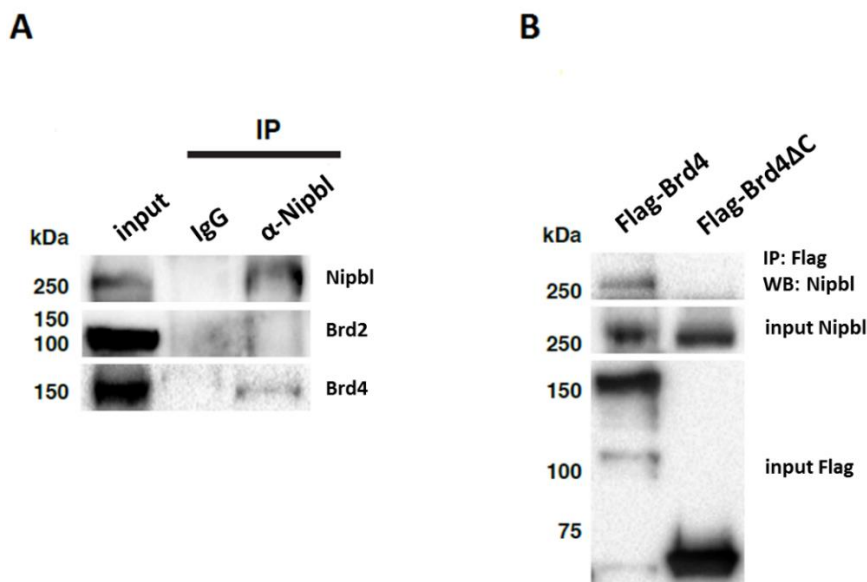


Figura 15. Nipbl interacciona preferentemente con Brd4.

A) Extractos de células HEK293T se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-Nipbl. Las proteínas coprecipitadas se revelaron mediante western-blot con anticuerpos anti-Brd2C y anti-Brd4. **B)** Extractos de células HEK293T transfectadas con las construcciones Flag-Brd4 y Flag-Brd4ΔC se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-Flag. Las proteínas coprecipitadas se revelaron mediante un anticuerpo anti-Nipbl. **A-B)** En todos los casos los inputs corresponden a un 5 % de los extractos inmunoprecipitados.

2. Análisis transcripcional de la interacción Brd4-Nipbl

Puesto que Brd4 y Nipbl han sido descritos como reguladores transcripcionales, quisimos analizar cuáles eran los genes dependientes de cada una de estas proteínas y así determinar si la interacción se traducía en cooperación transcripcional. Para ello, decidimos realizar un análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva de ARN total (RNA-Seq) de células P19 tratadas con las moléculas de ARN interferente *siNipbl*, *esiBrd2*, *esiBrd4* o *siControl*, consiguiendo bajadas en los niveles de las correspondientes proteínas de al menos el 50 % (Figura 16).

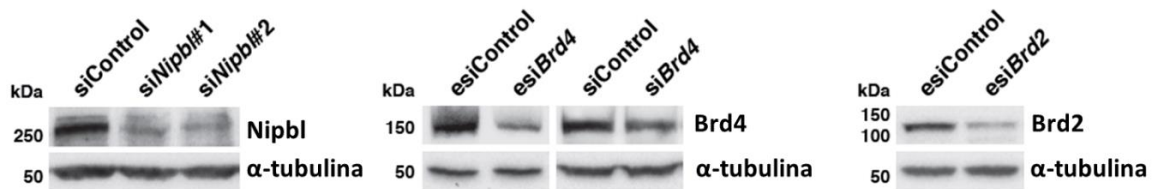


Figura 16. Bajada de los niveles de proteínas mediante ARN interferente.

Extractos de células P19 tratadas con moléculas de ARN interferente se analizaron por western-blot (20 µg de proteína total) con los anticuerpos anti-Nipbl, anti-Brd4, anti-Brd2C y anti-α-tubulina (este último utilizado como control de carga).

2.1. Brd4 y Nipbl regulan conjuntamente la expresión de genes potencialmente relacionados con el Síndrome de Cornelia de Lange

Para el análisis de los datos de RNA-Seq seleccionamos en primer lugar aquellos genes que mostraron cambios transcripcionales con p -valor < 0,05 y $|\text{Log}_2(\text{fold changes})| \geq 0,5$ y obtuvimos 770 genes desregulados con *siNipbl*, 2739 genes desregulados con *esiBrd2* y 945 genes desregulados con *esiBrd4* (Figura 17A, Anexo 1). Los cambios en la expresión génica en presencia de *siNipbl* correlacionaron con los cambios ocurridos en presencia de *esiBrd4* (coeficiente de Pearson=0,33), mientras que no hubo correlación con los cambios observados en presencia de *esiBrd2* (coeficiente de correlación de Pearson=0,045) (Figura 17B). Además, también observamos un solapamiento entre los genes desregulados por *siNipbl* y *esiBrd4*, con un enriquecimiento por encima del azar de 5,9 veces para los genes activados y de 6,2 veces para los genes reprimidos

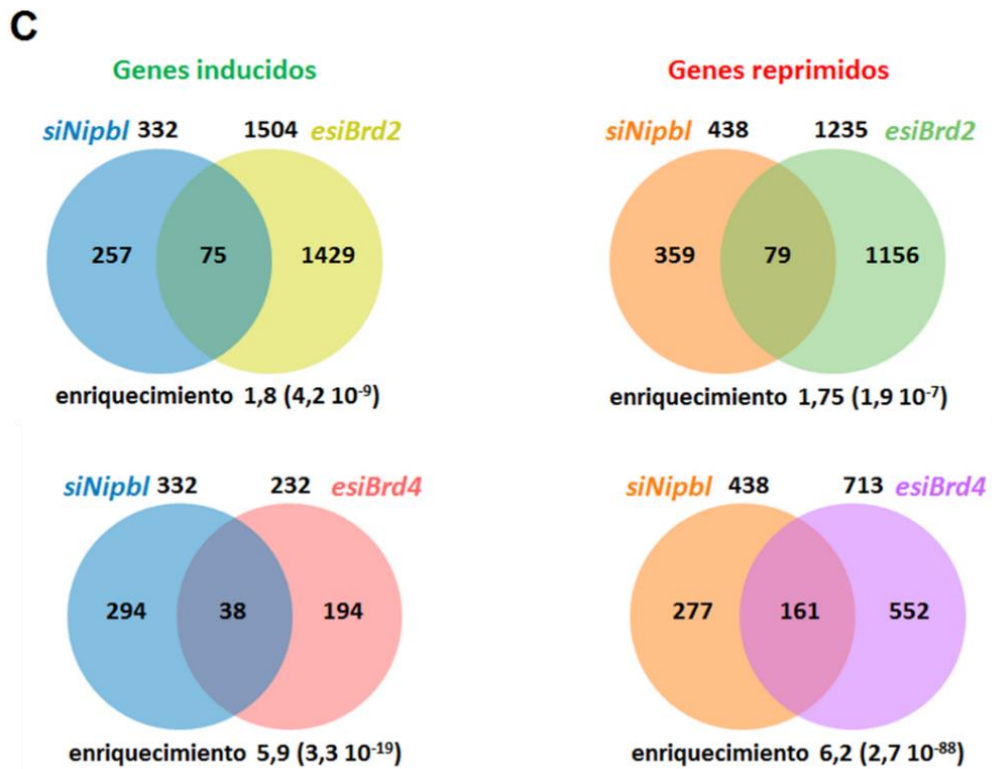
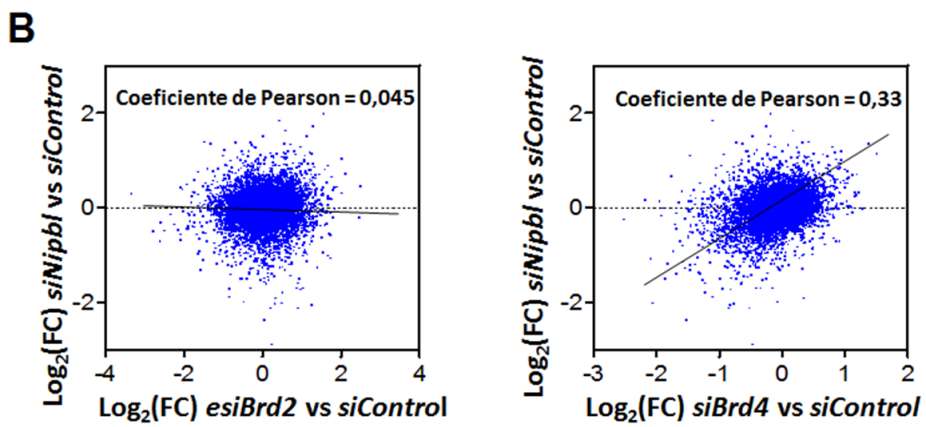
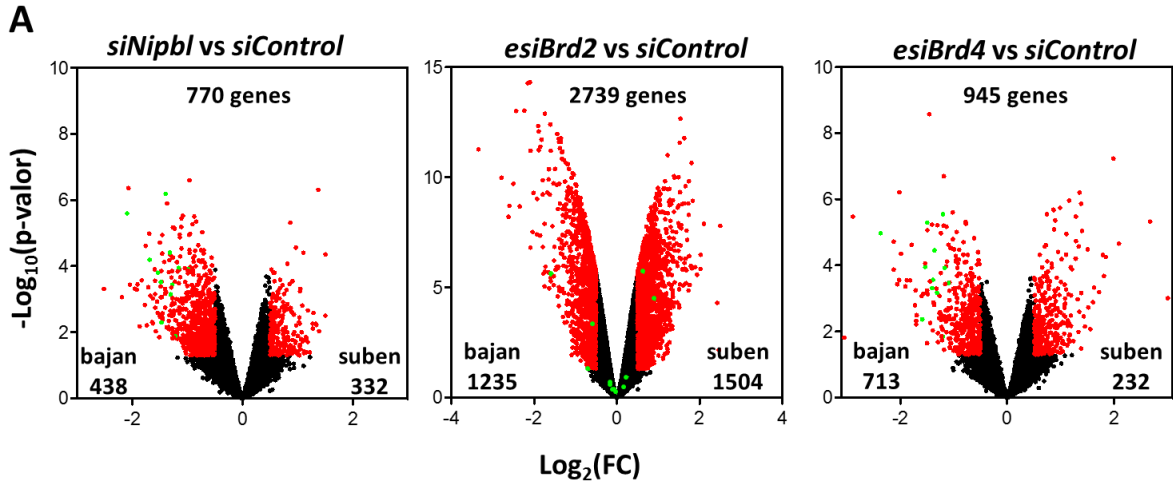
(Figura 17C). Este enriquecimiento, sin embargo, fue menor en el solapamiento de genes desregulados por *siNipbl* y *esiBrd2*.

Analizando más en detalle los genes desregulados, llevamos a cabo un análisis de las categorías funcionales (Gene Ontology -GO-) de estos, apareciendo categorías compartidas entre todas las condiciones analizadas, categorías compartidas dos a dos y categorías exclusivas de cada una (Figura 18). Puesto que anteriormente observamos que el mayor solapamiento se encontraba entre los genes reprimidos tanto por *siNipbl* como por *esiBrd4* volvimos a realizar un análisis de GO sobre este conjunto de genes. En este caso obtuvimos categorías funcionales como “central nervous system development”, “hair follicle development”, “positive regulation of chondrocyte differentiation” y “positive regulation of ossification” (Figura 19), categorías muy interesantes al estar relacionadas con muchos de los fenotipos clásicos del Síndrome Cornelia de Lange (retraso mental, hirsutismo y deformaciones esqueléticas y craneofaciales) (Boyle *et al.*, 2015).

2.2. Validación de los cambios de expresión detectados mediante RNA-Seq

Para estudiar en más profundidad el papel de *Brd4* y *Nipbl* en el control de la regulación transcripcional, decidimos seleccionar 12 genes del conjunto de genes reprimidos por *siNipbl* y por *esiBrd4* (señalados en verde en la figura 17A). Sin embargo, previamente quisimos verificar por PCR cuantitativa los cambios de expresión de estos genes observados por RNA-Seq. Para esta validación utilizamos una segunda molécula de ARN interferente contra *Nipbl* y *Brd4* además de las utilizadas anteriormente (Figura 16). Para todos los genes se confirmaron los niveles de represión transcripcional observados en el RNA-Seq en condiciones de *siNipbl* y *esiBrd4*; sin embargo, el uso de *esiBrd2* causó efectos variables (en su mayoría no significativos) en la expresión de estos genes (Figura 20).

RESULTADOS – Bloque II



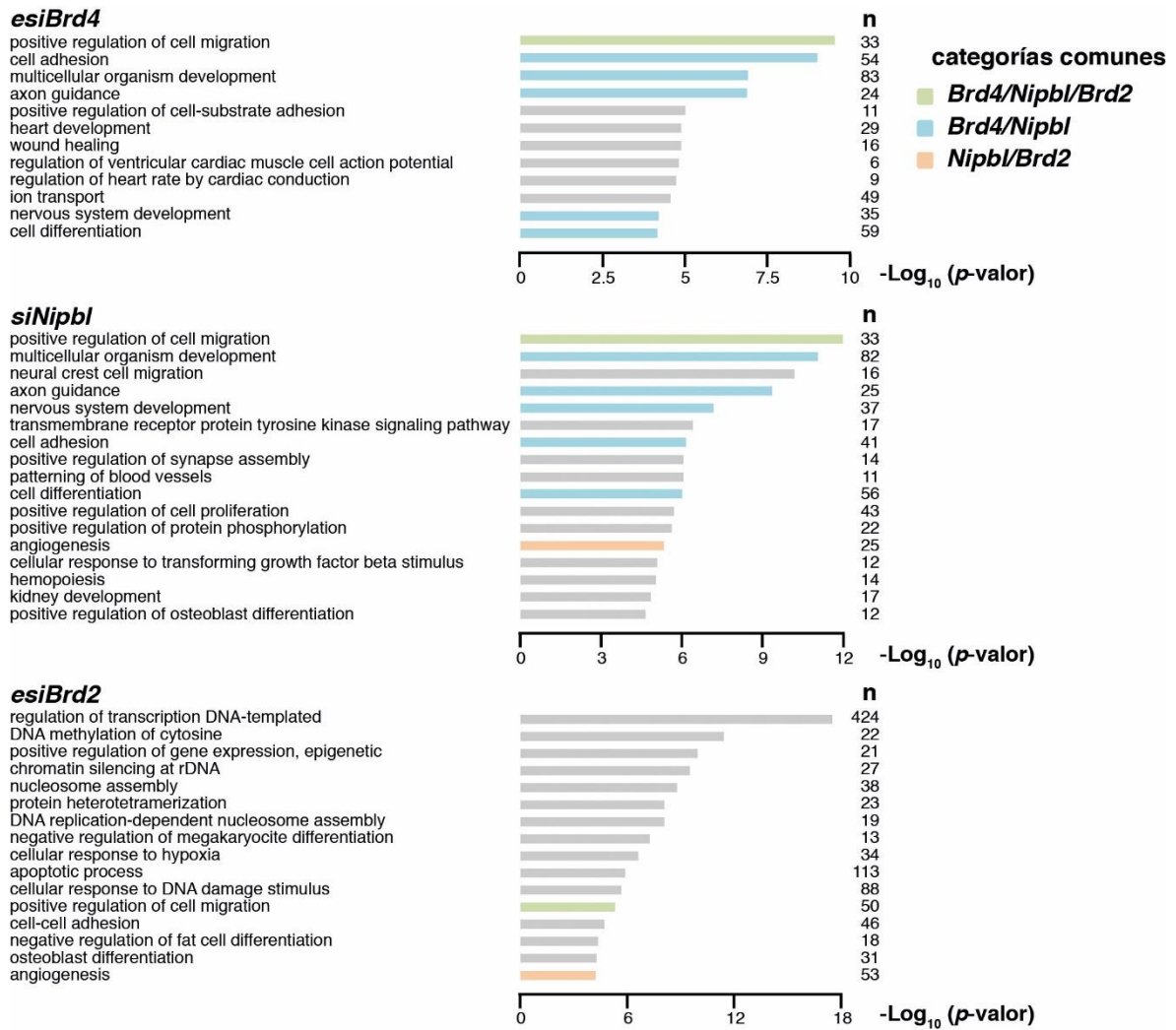


Figura 18. Categorías funcionales de los genes reprimidos por los distintos ARN interferentes.

Categorías de Gene Ontology de los genes desregulados por *siNipbl*, *esiBrd4* y *esiBrd2*. Las categorías comunes entre varias condiciones están indicadas en la leyenda de color. Se seleccionaron genes con cambios de expresión con un *p*-valor de menos de 8×10^{-5} . El número de genes por categoría se muestra en “n”.

Figura 17. Correlación y solapamiento entre los genes desregulados por los distintos ARN interferentes.

A) Volcano plots de los genes desregulados por *siNipbl*, *esiBrd4* y *esiBrd2* respecto a un *siControl*. Los cortes de *p*-valor y fold-change (FC) seleccionados se indican en negro. En verde aparecen genes seleccionados para la validación posterior. **B)** Diagramas de Venn de los solapamientos entre los genes desregulados por los ARN interferentes indicados. Los números de los diagramas indican la cantidad de genes desregulados. El enriquecimiento se determinó mediante un test hipergeométrico, indicando entre paréntesis su *p*-valor.

RESULTADOS – Bloque II

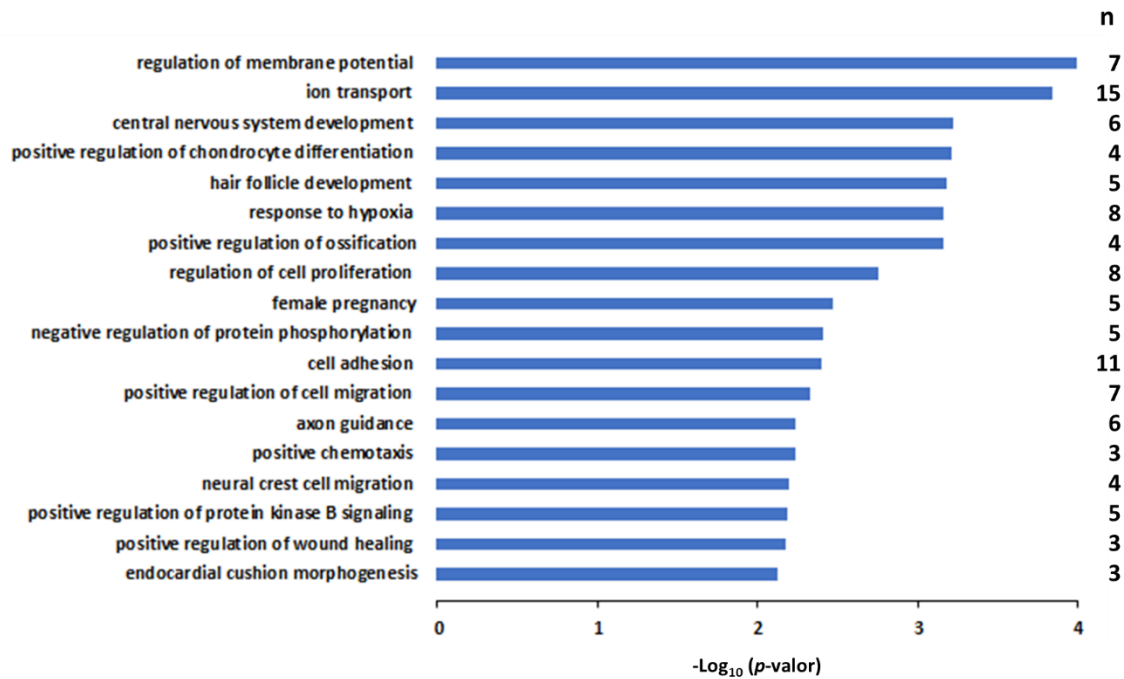


Figura 19. Categorías funcionales de los genes reprimidos por *siNipbl* y *esiBrd4*.

Categorías de Gene Ontology de los genes reprimidos por *siNipbl* y *esiBrd4*. El número de genes por categoría se muestra en “n”.

3. Brd4 y Nipbl se estabilizan mutuamente en los promotores de los genes que regulan conjuntamente

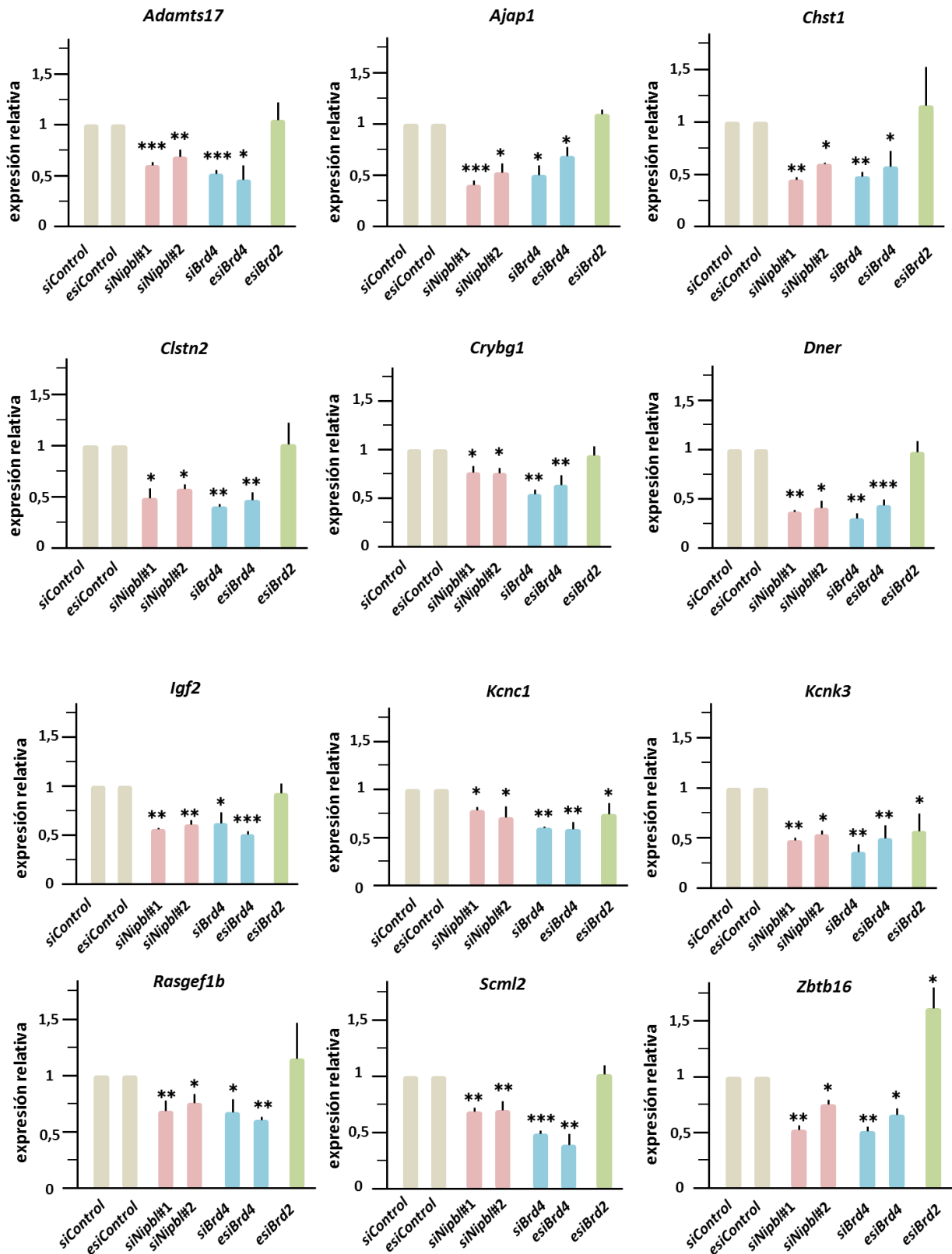
3.1. Nipbl se localiza principalmente en las regiones promotoras de los genes

A continuación, decidimos estudiar la localización de Nipbl en las regiones reguladoras de los genes co-regulados por Nipbl y Brd4. Aunque en la bibliografía la localización de Brd4 aparece asociada a “enhancers” y promotores, con mayor afinidad por los

Figura 20. Validación de los resultados de RNA-Seq en presencia de *esiBrd2*, *esiBrd4* y *siNipbl*.

A) Expresión relativa de 12 genes reprimidos en presencia de *siNipbl* y *esiBrd4*. Se analizó además el efecto de *esiBrd2*. Se validó la represión con los ARN interferentes indicados. Los niveles se relativizaron respecto a los de la condición *siControl* o *esiControl* (según el caso). Se representó la media y la desviación estándar de tres repeticiones experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

denominados “super-enhancers” (Lovén *et al.*, 2013; Di Micco *et al.*, 2014), sobre la localización de Nipbl no existen datos concluyentes al respecto (Kagey *et al.*, 2010; Zuin *et al.*, 2014).



RESULTADOS – Bloque II

Para aclarar este aspecto, realizamos un experimento de inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación masiva (ChIP-Seq) en células P19 en el que identificamos 7191 picos de Nipbl (**Anexo 2**) (correspondientes a 6490 genes), de los cuales un 78 % se localizaba en regiones promotoras (**Figura 21A**). Por lo tanto, pudimos concluir que Nipbl se asocia con mayor frecuencia a promotores que a “enhancers”. Estos datos también nos permitieron determinar que Nipbl se localiza en un 50,3 % de los promotores de los genes desregulados por *siNipbl* y en un 56,5 % de los promotores de los genes reprimidos por *siNipbl* y *esiBrd4* (**Figura 21B**).

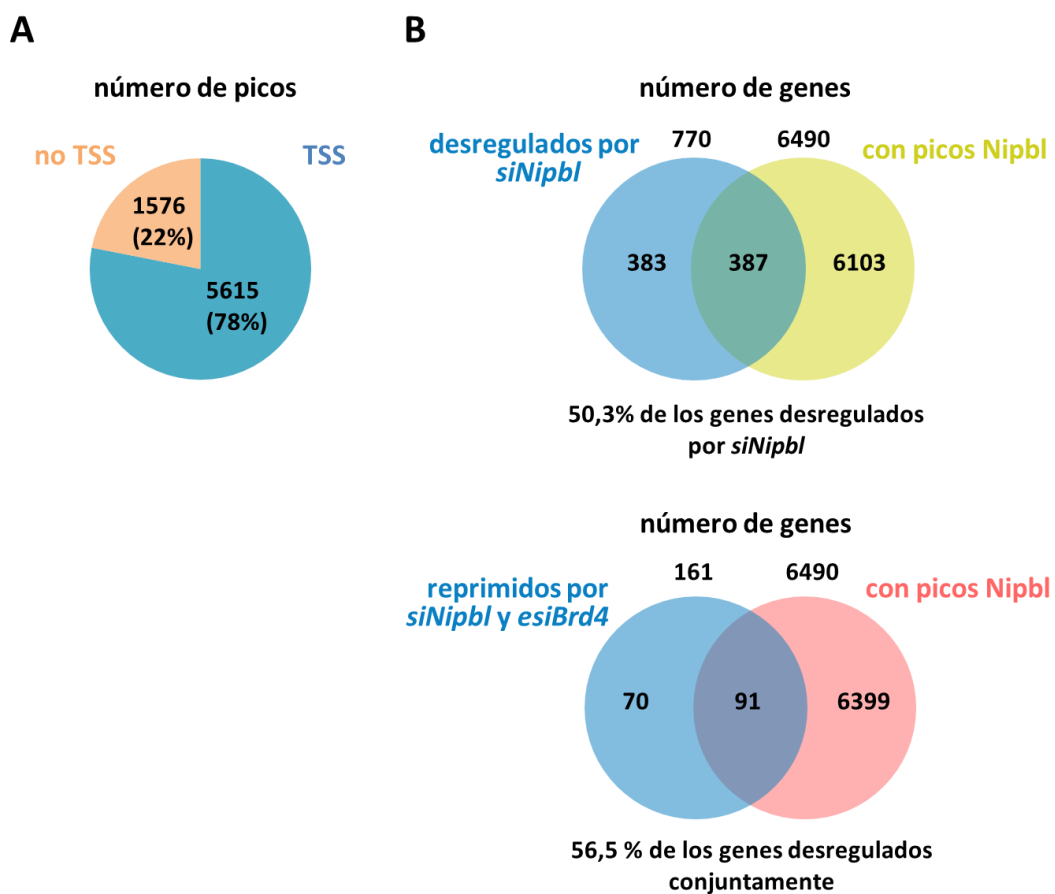


Figura 21. Nipbl localiza principalmente en promotores.

A) Diagrama de sectores indicando el porcentaje de picos de Nipbl situado en regiones TSS (sitios de iniciación de la transcripción) y regiones no TSS. **B)** Diagramas de Venn mostrando el solapamiento entre los genes con picos de Nipbl y los genes desregulados por *siNipbl* o reprimidos por *siNipbl* y *esiBrd4*. El porcentaje se refiere al número total de genes desregulados en cada caso. **A-B)** Los números en los diagramas indican el número de genes en cada condición.

3.2. La interrupción de la interacción Brd4-Nipbl afecta al reclutamiento de ambas proteínas a diversos promotores

Para profundizar en el análisis de la funcionalidad de la interacción entre Brd4 y Nipbl, quisimos ver si la presencia de Brd4 en promotores se veía afectada por la ausencia de Nipbl y viceversa. Para ello, seleccionamos promotores de genes reprimidos por *siNipbl* y *esiBrd4* en los que habíamos observado la localización de Nipbl (**Figura 22**) y comprobamos por ChIP que tanto Brd4 como Nipbl se unían a estos promotores en condiciones control (**Figura 23A**). En este análisis también quisimos observar el efecto de la sobreexpresión de la proteína Flag-Brd4ΔC (con posible efecto dominante negativo), por lo que en primer lugar comprobamos por ChIP que esta mantenía la capacidad de unión a la cromatina (**Figura 23B**).

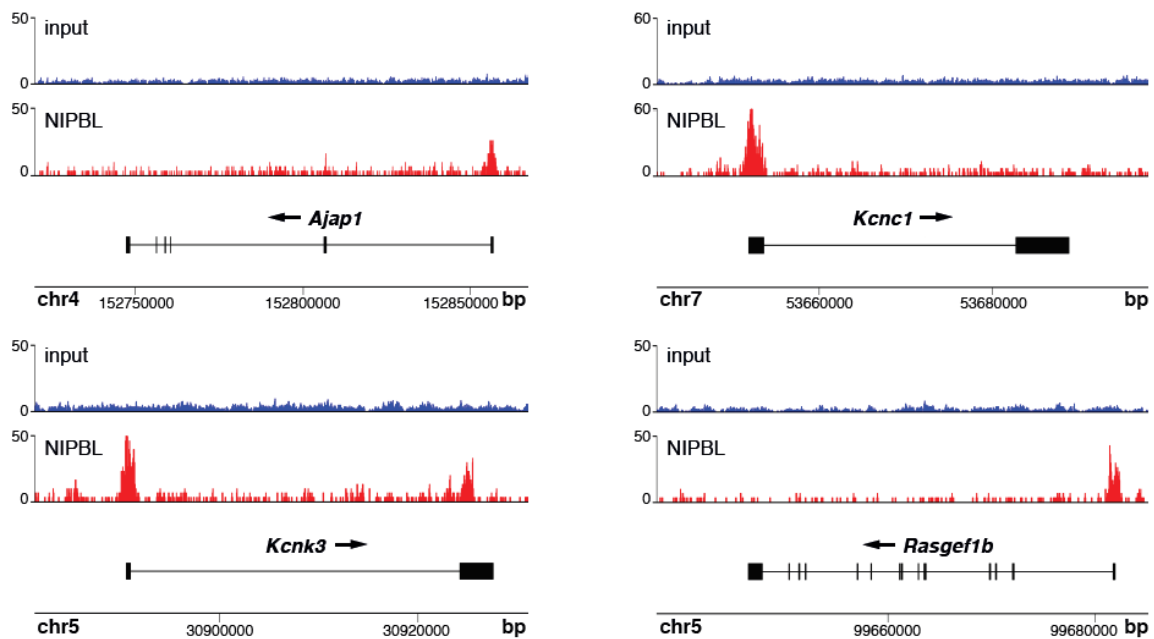


Figura 22. Perfil de localización de Nipbl en los genes seleccionados.

Perfiles de ChIP-Seq indicando la localización de Nipbl en los promotores de los genes *Ajap1*, *Kcnc1*, *Kcnk3* y *Rasgef1b* frente a perfiles de inputs.

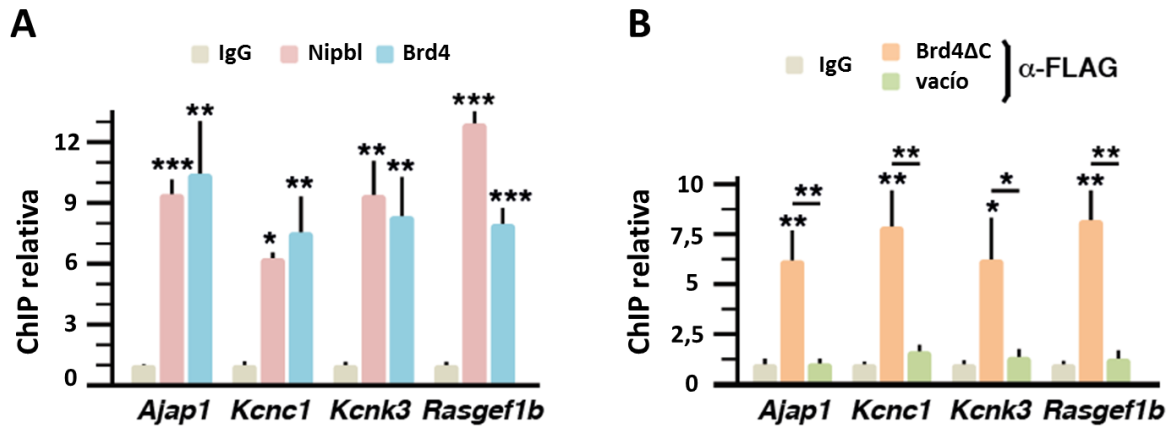


Figura 23. Brd4 y Nipbl localizan en los promotores de los genes seleccionados.

A) Análisis mediante ChIP del reclutamiento de Nipbl y Brd4 a los promotores de los genes *Ajap1*, *Kcnc1*, *Kcnk3* y *Rasgef1b*. Los valores se relativizaron respecto a los obtenidos por una IgG de conejo. **B)** Análisis por ChIP del reclutamiento de la construcción Flag-Brd4ΔC a los promotores de los genes *Ajap1*, *Kcnc1*, *Kcnk3* y *Rasgef1b*. Los valores se relativizaron respecto a los obtenidos por una IgG de ratón. **A-B)** Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

A continuación, tratamos las células P19 con *siControl*, *siNipbl* o *esiBrd4* o las transfectamos con la construcción Flag-Brd4ΔC o un vector vacío, y tras los correspondientes experimentos de ChIP observamos que la presencia de Brd4 y Nipbl en los promotores de los genes *Ajap1*, *Kcnc1*, *Kcnk3* y *Rasgef1b* disminuye cuando las células se tratan con *siNipbl* o *esiBrd4*.

Igualmente, la transfección de la construcción Flag-Brd4ΔC desplazaba de estos promotores a la proteína Brd4 endógena y a la proteína Nipbl con la que interacciona (**Figura 24**), indicando que Brd4 y Nipbl se estabilizan mutuamente en los promotores de los genes que regulan conjuntamente. De hecho, la sobreexpresión de Flag-Brd4ΔC causa cambios en la expresión de estos genes similares a los observados en el RNA-Seq (salvo en *Rasgef1b*) (**Figura 25**).

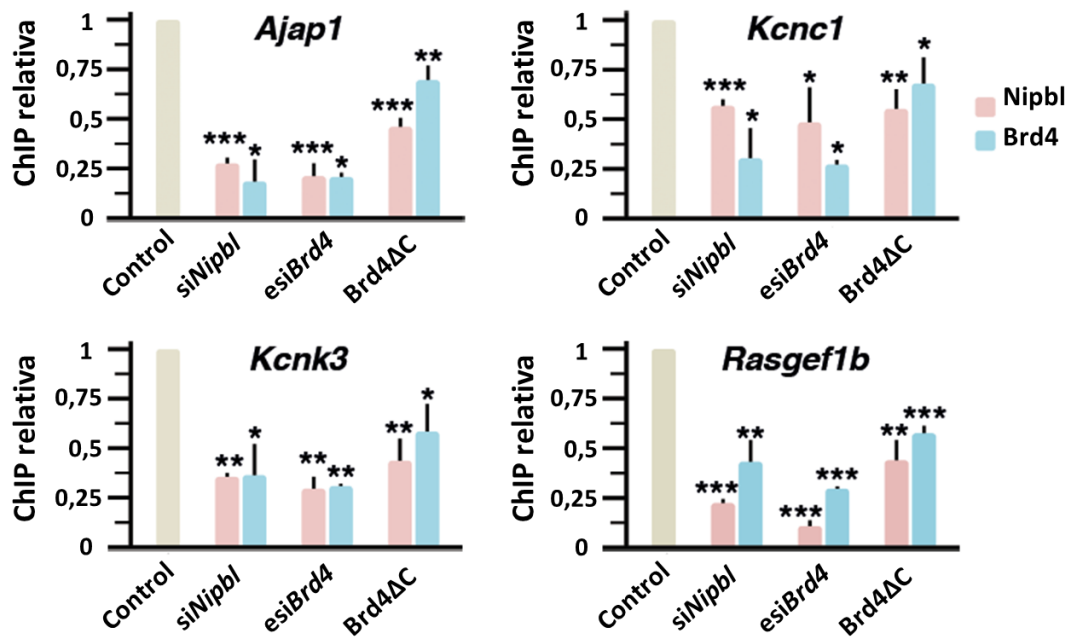


Figura 24. Brd4 y Nipbl se estabilizan mutuamente en los promotores que regulan conjuntamente.

Análisis mediante ChIP de la localización de Brd4 y Nipbl en los promotores de los genes *Ajap1*, *Kcnc1*, *Kcnk3* y *Rasgef1b* en presencia de *siNipbl*, *esiBrd4* y *Flag-Brd4ΔC*. Los niveles se relativizaron respecto a los niveles obtenidos en la condición control (*siControl* o plásmido vacío según el caso) con los mismos anticuerpos. Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

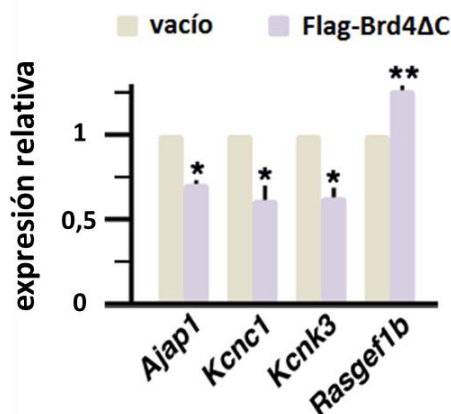


Figura 25. Flag-Brd4ΔC afecta a la expresión de los genes *Ajap1*, *Kcnc1*, *Kcnk3* y *Rasgef1b*.

Expresión relativa de los genes *Ajap1*, *Kcnc1*, *Kcnk3* y *Rasgef1b* en células transfectadas con la construcción *Flag-Brd4ΔC*. Los niveles se relativizaron respecto a los obtenidos en células transfectadas con un plásmido vacío. Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01.

3.3. La deficiencia de NIPBL en células de pacientes de Cornelia de Lange altera la unión de BRD4 a los promotores

Finalmente, puesto que observamos que niveles bajos de Nipbl afectaban a la presencia de Brd4 en los promotores, quisimos comprobar si ocurría lo mismo en células de pacientes de CdLS con mutaciones en *NIPBL* (con menos del 50% de los niveles de NIPBL presentes en individuos sanos). Para ello utilizamos fibroblastos de pacientes portadores de una mutación en *NIPBL* y de individuos sanos usados como control (Tabla 2). Comprobamos por ChIP que BRD4 se asociaba a los promotores de *AJAP1*, *KCNC1* y *KCNK3* en fibroblastos sanos (Figura 26A) y observamos que la presencia de BRD4 en estos promotores disminuía considerablemente en los fibroblastos de pacientes de CdLS (Figura 26B).

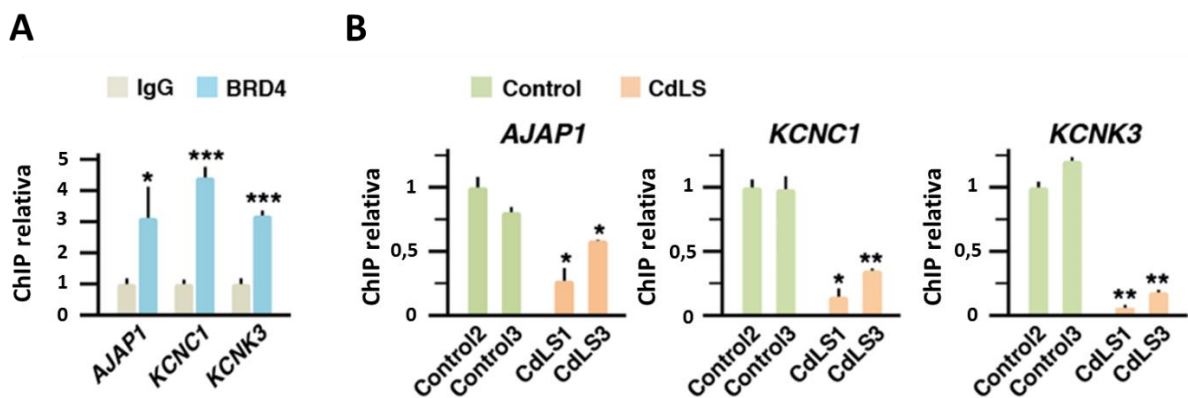


Figura 26. La localización de BRD4 en promotores se ve afectada por la deficiencia de NIPBL presente en células de pacientes de CdLS.

A) Análisis mediante ChIP del reclutamiento de BRD4 a los promotores de los genes *AJAP1*, *KCNC1* y *KCNK3*. Los valores se relativizaron respecto a los obtenidos con una IgG de conejo (Control). Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. **B)** Análisis mediante ChIP del reclutamiento de BRD4 en células de pacientes de CdLS (CdLS1 y CdLS3) con mutaciones en el gen *NIPBL*. Los valores se relativizaron respecto a los obtenidos en células de individuos sanos (Control2 y Control3). Representación de los valores medios y la desviación estándar de dos réplicas experimentales. **A-B)** El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

4. Brd4 y Nipbl aseguran el desarrollo embrionario en *Drosophila*

Las proteínas Brd4 y Nipbl han sido previamente implicadas en el desarrollo embrionario (Houzelstein *et al.*, 2002; Kawauchi *et al.*, 2009), de manera que en modelos de ratón heterocigóticos para *Nipbl* o *Brd4* se han observado problemas de crecimiento y diversas malformaciones que causan la muerte temprana de los individuos.

En este trabajo, además, hemos determinado que la interacción entre Brd4 y Nipbl se encarga de regular transcripcionalmente genes implicados en el desarrollo. Por lo tanto, a la hora de analizar el papel de esta interacción en el desarrollo decidimos utilizar un modelo animal idóneo para el estudio de este proceso, la mosca *Drosophila melanogaster*.

4.1. Análisis transcripcional en mutantes de *Drosophila melanogaster* en los genes ortólogos de *Brd4* y *Nipbl*

En primer lugar, procedimos a analizar los cambios transcripcionales que se producían en los genes *Shaw* y *Task7*, los respectivos ortólogos de los genes *Kcnc1* y *Kcnk3* estudiados en los apartados anteriores. Para ello utilizamos estirpes de *Drosophila melanogaster* con pérdida de función en los genes ortólogos de *Nipbl* y *Brd4*, (*Nipped-B⁴⁰⁷* y *fs(1)h¹⁸* respectivamente), así como una estirpe control (*yw*). Al igual que ocurría en células de mamíferos, los genes *Shaw* y *Task7* disminuyeron su expresión en ambas estirpes mutantes, confirmando que *Nipped-B* y *Fs(1)h* regulan conjuntamente la expresión de estos genes (**Figura 27**).

Igualmente, decidimos analizar la expresión de otros genes implicados en el desarrollo como los genes de pluripotencia *bsh* (*Nanog*) y *SoxN* (*Sox2*), y el gen *wg* (*Wnt1*) implicado en la ruta de señalización Wnt. En estos casos también observamos cómo en los mutantes *Nipped-B⁴⁰⁷* y *fs(1)h¹⁸* la expresión de estos genes disminuía (**Figura 28**), sugiriendo un papel común en su regulación transcripcional. Por el contrario, la expresión del gen *HDAC3* (*Hdac8*) no se vio afectada en ninguno de los mutantes.

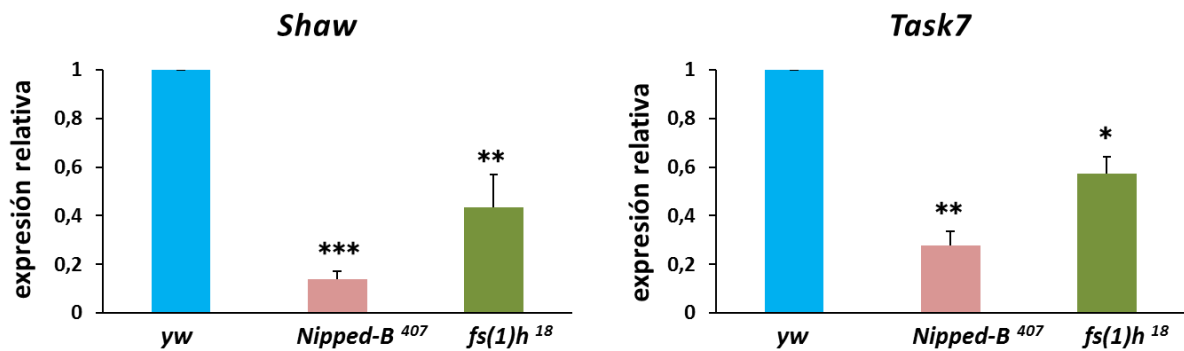


Figura 27. Nipped-B y Fs(1)h regulan la expresión de los ortólogos de *Kcnc1* y *Kcnc3* en *Drosophila melanogaster*.

Expresión relativa de los genes *Shaw* (*Kcnc1*) y *Task7* (*Kcnc3*) en *Drosophila melanogaster*. *yw*: estirpe control, *Nipped-B*⁴⁰⁷ y *fs(1)h*¹⁸: estirpes mutantes. Los niveles se relativizaron respecto a los obtenidos en la estirpe *yw*. Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

4.2. Interacción génica entre *fs(1)h* y *Nipped-B*

Drosophila melanogaster es un buen modelo en el que estudiar la interacción entre dos genes, ya que gracias al corto ciclo de vida de esta especie la obtención de descendencia se produce de manera rápida. Por tanto, decidimos realizar un análisis de interacción génica entre *fs(1)h* y *Nipped-B* mediante el cruce de las dos estirpes mutantes. El gen *fs(1)h* se localiza en el cromosoma 1 (cromosoma X) de la mosca, mientras que *Nipped-B* se localiza en el cromosoma 2. Tanto *Nipped-B*⁴⁰⁷ como *fs(1)h*¹⁸ son mutaciones letales en homocigosis, aunque al estar el gen *fs(1)h* ligado al cromosoma X, la mutación también resulta letal en machos. Ambas estirpes mutantes presentaban un cromosoma “balancer” en el que, además de haber translocaciones que evitan la recombinación entre la versión silvestre y la versión mutada del gen, se encuentran marcadores que ayudan al seguimiento de la segregación del alelo mutante en la descendencia. La estirpe *Nipped-B*⁴⁰⁷ presentaba el “balancer” FM7c (ojos estrechos) y la estirpe *fs(1)h*¹⁸ el “balancer” CyO (alas curvas).

El cruce entre ambas estirpes se llevó a cabo con hembras *fs(1)h¹⁸* vírgenes y machos *Nipped-B⁴⁰⁷* y tras dos semanas se comparó la descendencia producida con los valores esperados. Puesto que la interacción génica solo se podría observar en hembras, solo analizamos la descendencia de estas. De las cuatro combinaciones posibles se obtuvieron 107 hembras y se observó que el porcentaje de moscas con el genotipo correspondiente al doble heterocigoto (*fs(1)h¹⁸/Nipped-B⁴⁰⁷*) fue de un 17,8 %, lejos de lo esperado por herencia mendeliana (25 %). Esto indica que se trata de un genotipo que afecta a la viabilidad más allá de lo que lo hacen las mutaciones simples, lo que sugiere la presencia de interacción génica entre *fs(1)h* y *Nipped-B* (Figura 29).

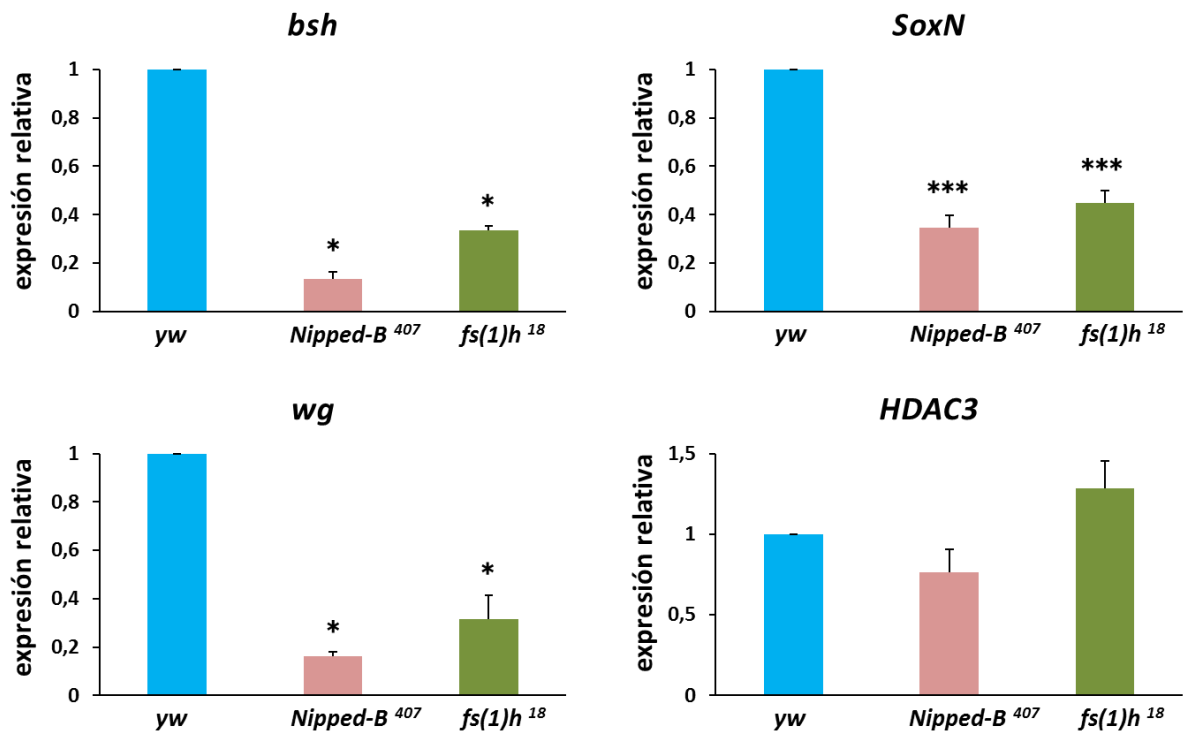


Figura 28. Nipped-B y fs(1)h regulan la expresión de genes implicados en el desarrollo.

Expresión relativa de los genes *bsh* (*Nanog*), *SoxN* (*Sox2*), *wg* (*Wnt1*) y *HDAC3* (*Hdac8*) en *Drosophila melanogaster*. *yw*: estirpe control, *Nipped-B⁴⁰⁷* y *fs(1)h¹⁸*: estirpes mutantes. Los niveles se relativizaron respecto a la estirpe *yw*. Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; *** p-valor<0,001.

RESULTADOS – Bloque II

Descendencia esperada			Gametos macho		
			X		Cromosoma 1
			+ (CyO)	<i>Nipped-B⁴⁰⁷</i>	Cromosoma 2
Gametos hembra	X (FM7c)	+	FM7c / CyO (25%)	FM7c / <i>Nipped-B⁴⁰⁷</i> (25%)	
	X (<i>fs(1)h¹⁸</i>)	+	<i>fs(1)h¹⁸</i> / CyO (25%)	<i>fs(1)h¹⁸</i> / <i>Nipped-B⁴⁰⁷</i> (25%)	
	Cromosoma 1	Cromosoma 2			

Descendencia observada			Gametos macho		
			X		Cromosoma 1
			+ (CyO)	<i>Nipped-B⁴⁰⁷</i>	Cromosoma 2
Gametos hembra	X (FM7c)	+	FM7c / CyO (30,8%)	FM7c / <i>Nipped-B⁴⁰⁷</i> (28%)	
	X (<i>fs(1)h¹⁸</i>)	+	<i>fs(1)h¹⁸</i> / CyO (23,4%)*	<i>fs(1)h¹⁸</i> / <i>Nipped-B⁴⁰⁷</i> (17,8%)**	
	Cromosoma 1	Cromosoma 2			

Figura 29. Descendencia esperada y observada del cruce de machos *Nipped-B⁴⁰⁷* y hembras *fs(1)h¹⁸*.

Tablas con las características posibles de la descendencia, así como la frecuencia esperada y la frecuencia observada (porcentajes en rojo). FM7c: ojos estrechos; CyO: alas curvas; +: versión silvestre del alelo. El análisis estadístico de los mutantes de la descendencia observada respecto a la descendencia silvestre se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01.

BLOQUE III: Estudio de la dinámica de Brd2 y Brd4 en los promotores de los genes que cambian su expresión durante la diferenciación neuronal

Teniendo en cuenta que las proteínas Brd2 y Brd4 están implicadas en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación neuronal y que ambos procesos están relacionados, quisimos estudiar más a fondo el papel de estas dos proteínas en los cambios necesarios para que tenga lugar la transición entre un estado pluripotente y un estado de diferenciación.

Para realizar este estudio hicimos uso de las células P19, línea a la que mediante la adición de ácido retinoico (AR) se le induce el proceso de diferenciación neuronal.

1. Estudio de los cambios de expresión producidos tras la inducción de diferenciación neuronal

En primer lugar, comenzamos analizando los cambios transcripcionales que se producen al tratar las células P19 durante 48 h con AR, tiempo tras el cual las células presentan una diferenciación temprana a neuronas. Para ello, realizamos un análisis transcriptómico mediante RNA-Seq en células P19 en condiciones de proliferación y tras 48 h de tratamiento con AR. Para el análisis de los datos resultantes se seleccionaron aquellos genes que mostraron cambios transcripcionales con p -valor ajustado $< 0,05$ y $|\text{Log}_2(\text{fold changes})| \geq 1$, obteniendo de este modo 732 genes inducidos y 874 genes reprimidos por AR (**Figura 30, Anexo 3**). El análisis de las categorías funcionales (Gene Ontology) de los genes desregulados mostró la inducción de genes relacionados con el desarrollo como “anterior/posterior pattern specification”, “embryonic skeletal system morphogenesis” o “nervous system development” y la represión de genes relacionados con la pluripotencia como “positive regulation of cell proliferation”, “cell adhesion” o “cell fate commitment” (**Figura 31**).

RESULTADOS – Bloque III

Del conjunto de genes desregulados seleccionamos 15 (9 inducidos y 6 reprimidos) para validar por PCR cuantitativa los resultados de RNA-Seq (**Figura 32**).

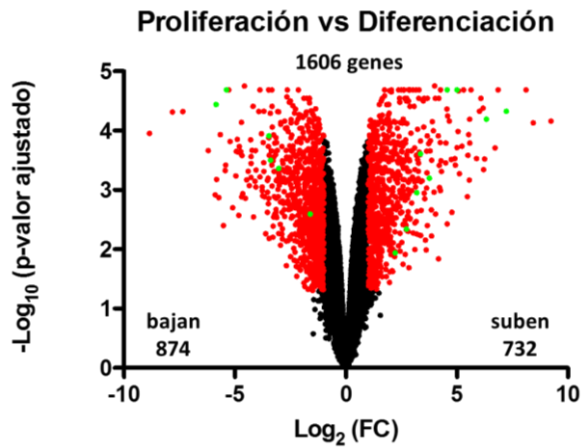
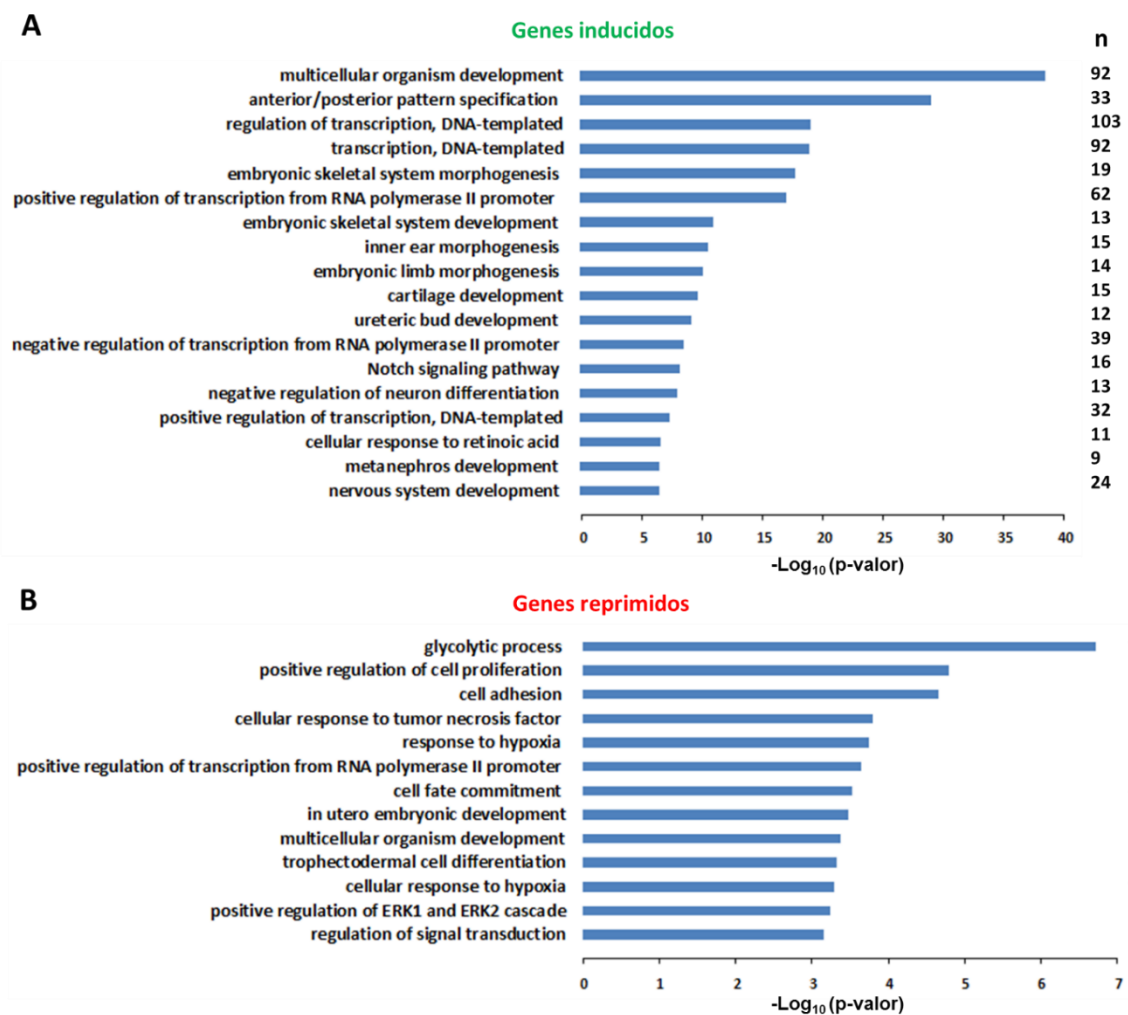


Figura 30. Distribución de los cambios de expresión tras 48 h de tratamiento con AR.

Volcano plot de los genes desregulados tras un tratamiento de 48 h con AR (diferenciación neuronal) respecto a la condición de proliferación. Los cortes de p-valor ajustado y fold-change (FC) seleccionados se indican en negro. En verde aparecen los genes que se seleccionaron para la posterior validación.



2. Implicación de Brd2 y Brd4 en los cambios de expresión producidos en diferenciación neuronal

Una vez validados los cambios de expresión producidos durante la inducción de la diferenciación neuronal, quisimos determinar qué papel jugaban las proteínas Brd2 y Brd4 en estos cambios. Para ello tratamos a las células con ARN interferentes contra *Brd2* (*esiBrd2*) y *Brd4* (*esiBrd4*) antes de inducir la diferenciación con AR. Tras los sucesivos tratamientos, analizamos la expresión de los genes *Nanog*, *Nog* (Noggin), *Pim2*, *Pou5f1*, *T* (Brachyury) y *Zyg11a* (reprimidos tras 48 h de tratamiento con AR) y los genes *Lhx1*, *Nes* (Nestina), *Neurod1*, *Neurog1*, *Nr2f1*, *Sox6* y *Pax6* (inducidos tras 48 h de tratamiento con AR). Pudimos observar que la represión de la mayoría de los genes a 48 h de tratamiento con AR fue de mayor magnitud en presencia de *esiBrd4* (**Figura 33**). Por otro lado, observamos que la inducción de algunos genes de diferenciación neuronal fue de menor magnitud en presencia de *esiBrd2* y de mayor magnitud en presencia de *esiBrd4* (**Figura 34**).

3. La presencia de Brd2 y Brd4 en algunos promotores define la inducción y la represión génica en condiciones de diferenciación neuronal

A continuación, quisimos determinar si los cambios en los niveles de represión o inducción observados durante la diferenciación en presencia de *esiBrd2* y *esiBrd4* se deben a acciones directas de Brd2 y Brd4 sobre el control transcripcional de estos genes.

Figura 31. Categorías funcionales de los genes desregulados tras la inducción de diferenciación neuronal mediante AR.

A) Categorías de Gene Ontology de los genes inducidos tras 48 h de tratamiento con AR. Se seleccionaron genes con cambios de expresión con un p -valor de menos de 3×10^{-7} . **B)** Categorías de Gene Ontology de los genes reprimidos tras 48 h de AR. Se seleccionaron genes con cambios de expresión con un p -valor de menos de 7×10^{-4} . **A-B)** El número de genes por categoría se muestra en “n”.

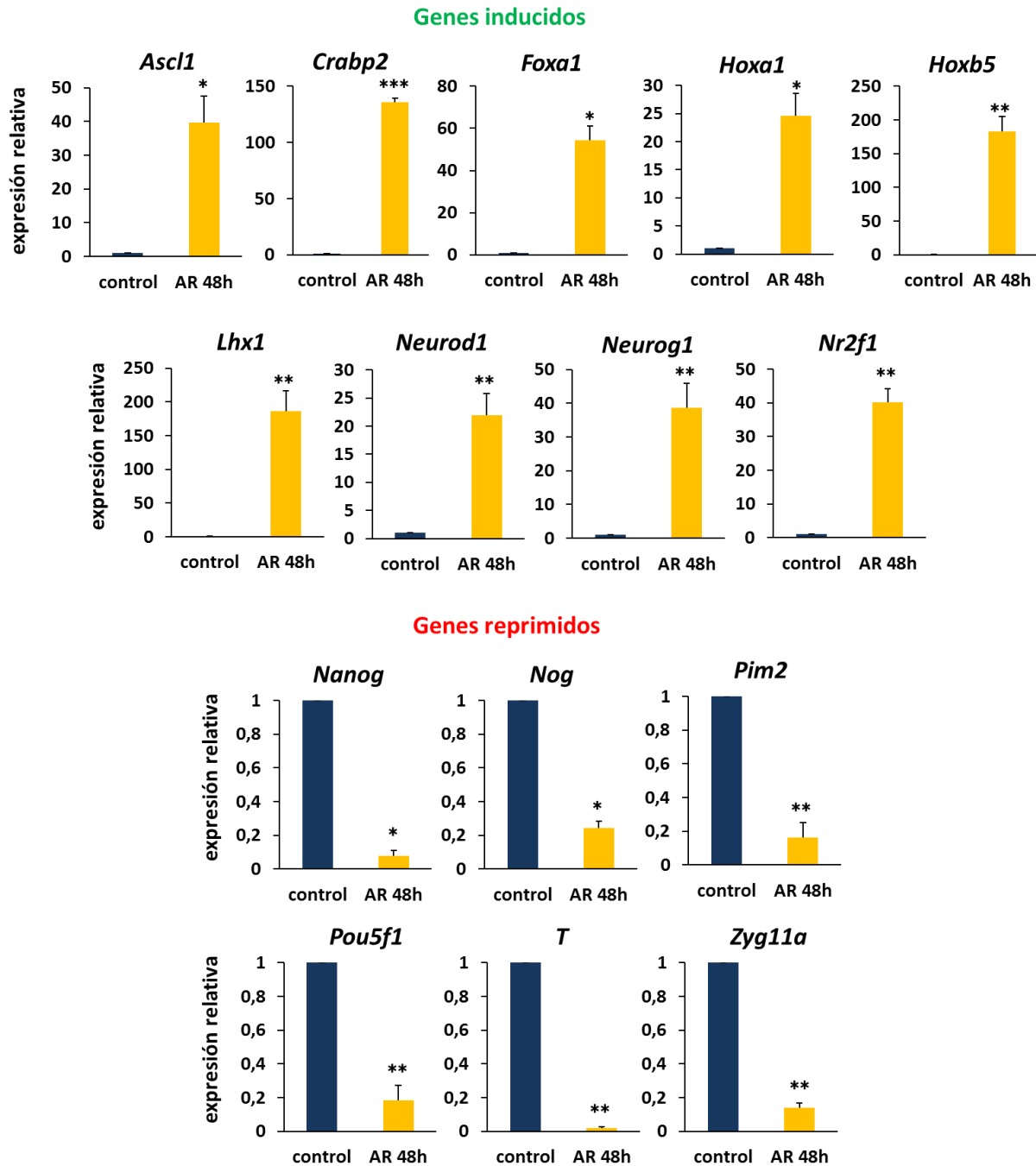


Figura 32. Validación de los resultados de RNA-Seq en condiciones de diferenciación neuronal.

Expresión relativa de 10 genes inducidos y 6 genes reprimidos tras un tratamiento de 48 h con AR. Los niveles se relativizaron respecto a los de la condición control (células P19 en proliferación). Se representó la media y la desviación estándar de tres repeticiones experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

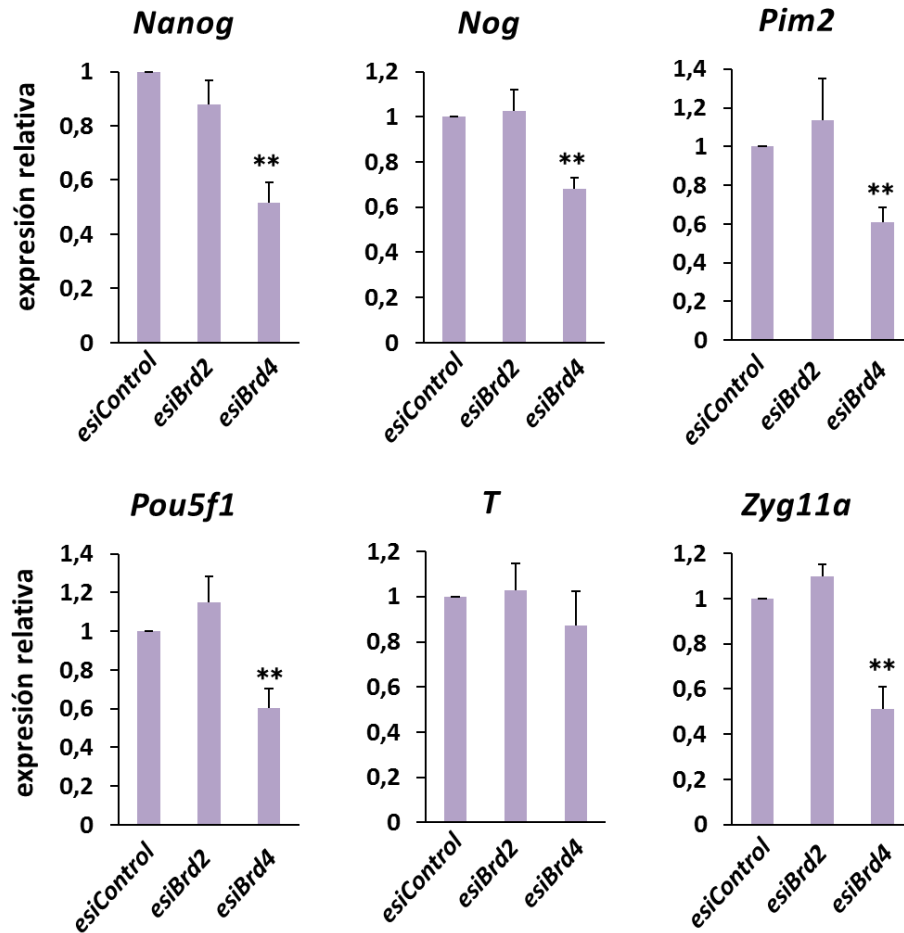


Figura 33. Brd4 controla la expresión de los genes que se reprimen durante la diferenciación neuronal con AR.

Expresión relativa de los genes *Nanog*, *Nog* (Noggin), *Pim2*, *Pou5f1*, *T* (Brachyury) y *Zyg11a* en células transfectadas con los ARN interferentes *esiControl*, *esiBrd2* o *esiBrd4* durante 72 h y posteriormente diferenciadas con AR durante 48 h. Los niveles se relativizaron respecto a los de las células transfectadas con *esiControl*, que a su vez se corresponden con los niveles de represión alcanzados en condiciones normales y mostrados en la figura 32. Se representó la media y la desviación estándar de tres repeticiones experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01.

Para ello, en una primera aproximación analizamos la localización de Brd2 y Brd4 en las regiones promotoras de aquellos genes donde se observaron cambios de expresión con *esiBrd2* o *esiBrd4* estadísticamente significativos respecto a lo que ocurría con *esiControl*. Esta localización la analizamos tanto en células en estado proliferativo (control) como en células tratadas con AR durante 16 h, ya que los cambios en expresión observados a 48 h de AR están relacionados con cambios a nivel de promotor

RESULTADOS – Bloque III

que han ocurrido con anterioridad. Observamos que Brd4 se disociaba un 40-50 % de los promotores de *Nog*, *Pim2*, *Pou5f1* y *Zyg11a* a 16 h de tratamiento con AR, mientras que la localización de Brd2 no mostró ningún cambio estadísticamente significativo (Figura 35). Esto correlaciona con los cambios de expresión observados en condiciones de diferenciación en presencia de *esiBrd2* y *esiBrd4*.

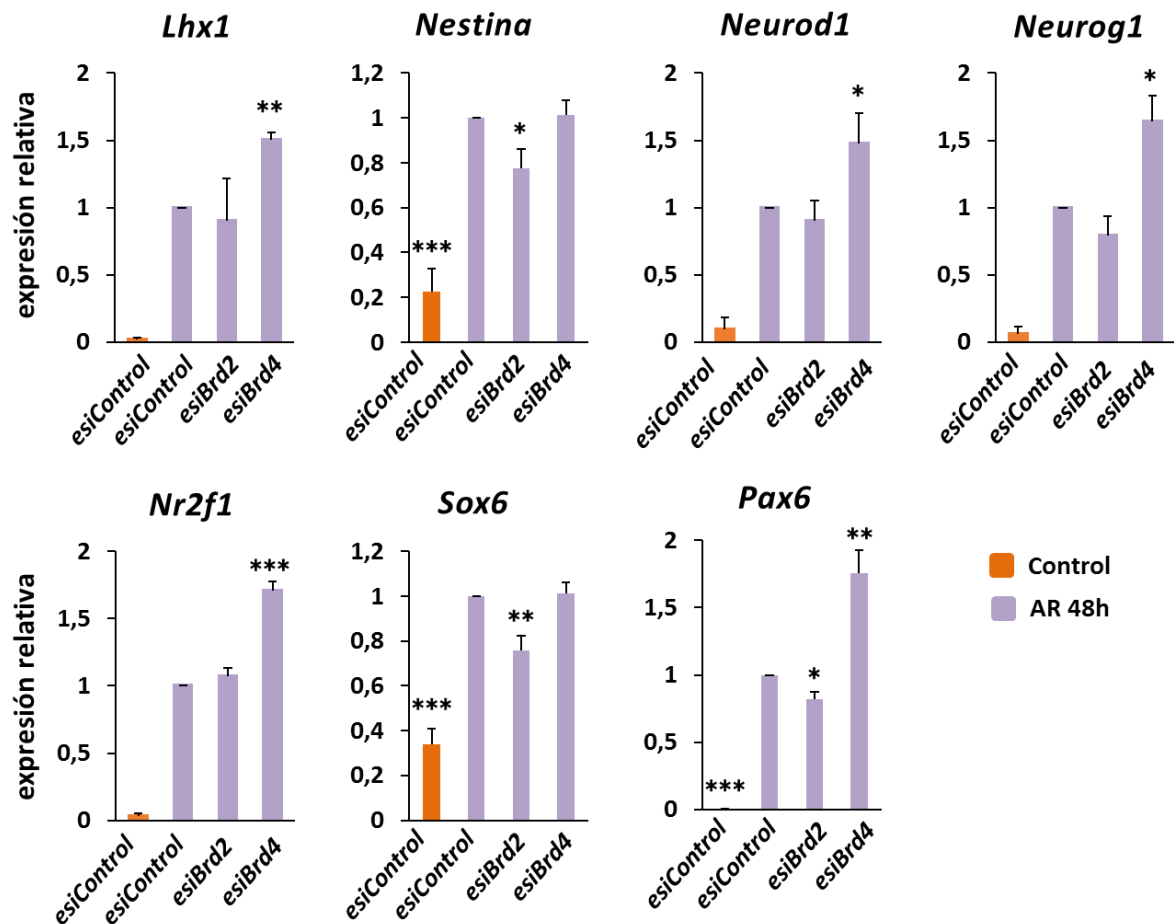


Figura 34. Efecto de los ARN interferentes *esiBrd2* y *esiBrd4* en la inducción de genes de diferenciación neuronal con AR.

Expresión relativa de los genes *Lhx1*, *Nes* (*Nestina*), *Neurod1*, *Neurog1*, *Nr2f1*, *Sox6* y *Pax6* en células transfectadas con los ARN interferentes *esiControl*, *esiBrd2* o *esiBrd4* durante 72 h y posteriormente tratadas (o no) con AR durante 48 h. Los niveles se relativizaron respecto a los de las células transfectadas con *esiControl* y tratadas con AR. Se representó la media y la desviación estándar de tres repeticiones experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

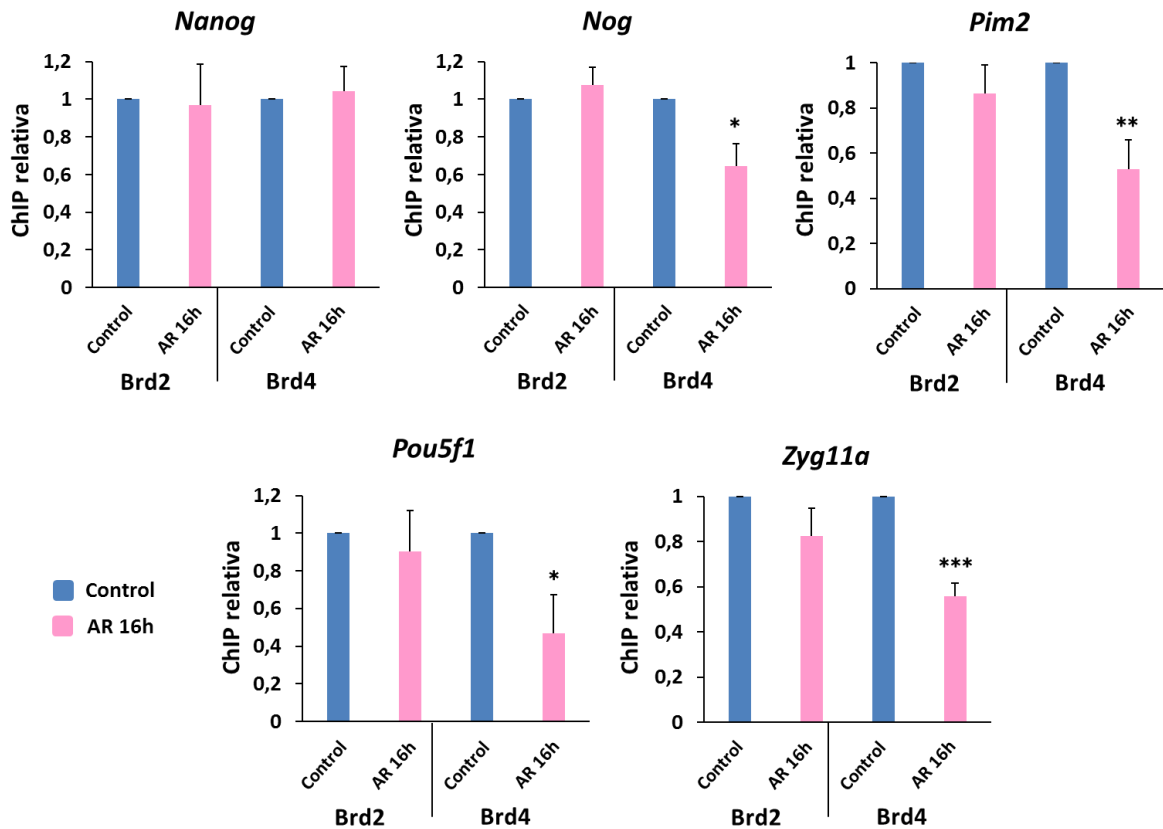


Figura 35. Brd4 se disocia de los promotores de los genes que se reprimen en condiciones de diferenciación neuronal.

Análisis mediante ChIP del reclutamiento de Brd2 y Brd4 a los promotores de los genes *Nanog*, *Nog*, *Pim2*, *Pou5f1* y *Zyg11a* en condiciones de proliferación (control) y tras 16 h de tratamiento con AR. Los valores se relativizaron respecto a los obtenidos en la condición control. Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

En los promotores de los genes que se inducen en diferenciación neuronal con AR observamos que a 16 h de tratamiento con AR en algunos casos aumentaba la presencia de Brd2 y en otros de Brd4, aunque en ningún caso este aumento fue de una gran magnitud (**Figura 36**). El aumento de la presencia de Brd4 tiene lugar en los promotores de *Lhx1* y *Neurog1*, genes que en presencia de *esiBrd4* incrementan sus niveles de inducción, lo que sugiere que la presencia de Brd4 no está directamente relacionada con la expresión de estos genes. El aumento de la presencia de Brd2 ocurre en los promotores de *Neurod1*, *Nr2f1*, *Nes* (Nestina) y *Pax6*. Este incremento no se correlaciona con cambios de expresión en presencia de *esiBrd2* para *Neurod1* y *Nr2f1*,

RESULTADOS – Bloque III

pero sí correlaciona con la disminución de los niveles de inducción de *Nes* y *Pax6*, por lo que Brd2 podría estar actuando como activador de la expresión de estos dos genes. Por último, también observamos que Brd4 se disociaba levemente del promotor de *Nr2f1*, cuya inducción disminuye en presencia de *esiBrd4*, lo que podría indicar que Brd4 actúa como represor de este gen.

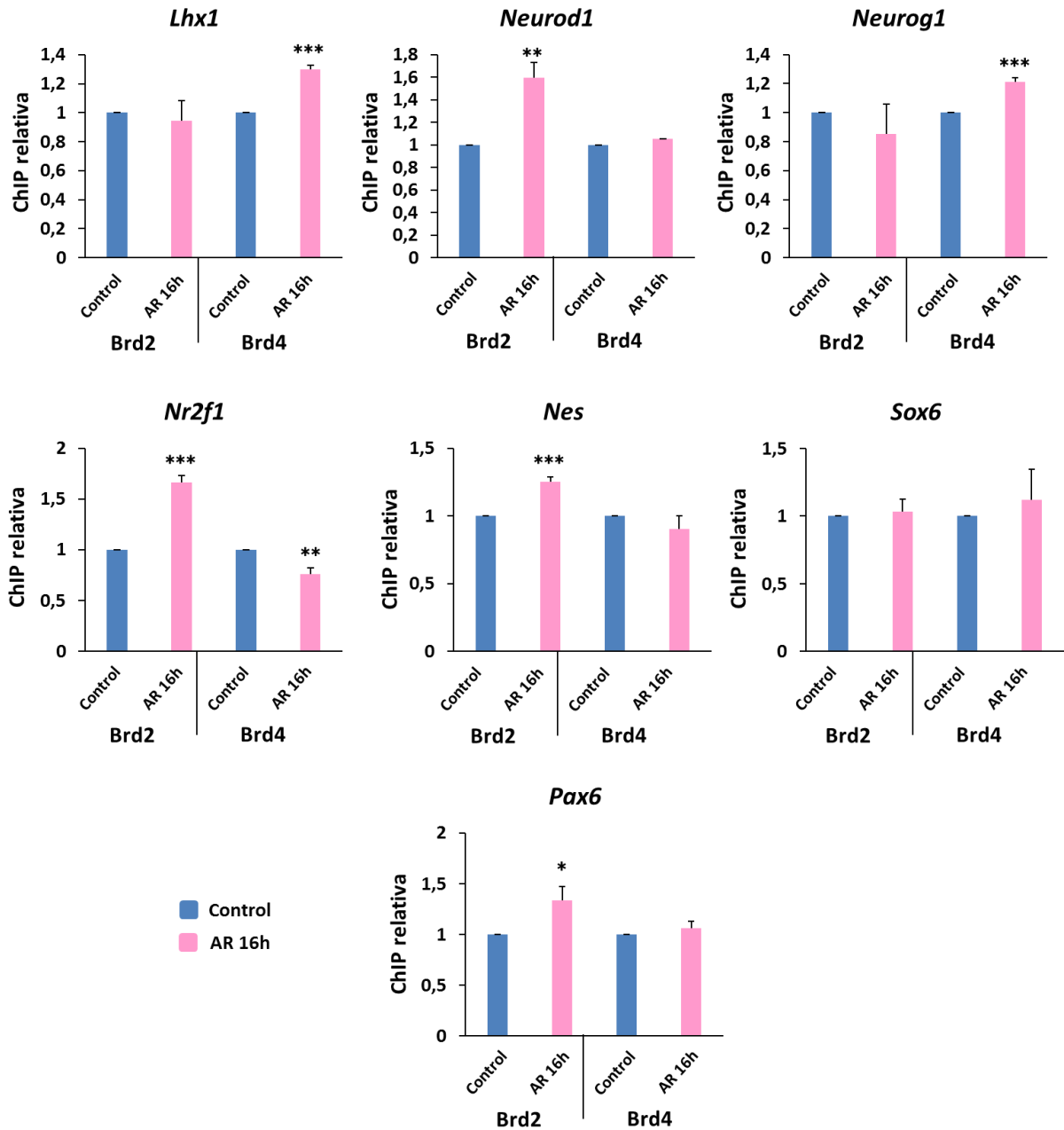


Figura 36. Reclutamiento de Brd2 y Brd4 a los promotores de los genes que se inducen en condiciones de diferenciación neuronal.

Análisis mediante ChIP del reclutamiento de Brd2 y Brd4 a los promotores de los genes *Lhx1*, *Neurod1*, *Neurog1*, *Nr2f1*, *Nes*, *Sox6* y *Pax6* en condiciones de proliferación (control) y tras 16 h de tratamiento con AR. Los valores se relativizaron respecto a los obtenidos en la condición control. Representación de los valores medios y la desviación estándar de tres réplicas experimentales. El análisis de la significancia estadística entre las distintas condiciones se llevó a cabo mediante el test t de Student. * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001.

DISCUSIÓN

1. Brd2 interacciona con Lyar para regular la represión de *Nanog* durante la diferenciación neuronal

En este trabajo hemos descrito por primera vez la interacción entre Brd2 y Lyar, identificada mediante un escrutinio de doble híbrido realizado con una librería procedente de embriones de ratón y confirmada posteriormente mediante inmunoprecipitación de proteínas. En ambos casos la interacción ocurría exclusivamente con Brd2 y no con el resto de los miembros de la familia BET. Este hecho resulta sorprendente, ya que el dominio de interacción, el motivo B, está altamente conservado entre los distintos miembros (García-Gutiérrez *et al.*, 2012), por lo que la exclusividad de la interacción debe ocurrir gracias a pequeñas diferencias en estas secuencias.

El papel de la interacción entre Brd2 y Lyar lo hemos estudiado en el contexto de la diferenciación neuronal, concretamente mediante el uso de la línea celular P19, que tras la adición de ácido retinoico (AR) inicia su diferenciación a neuronas. A pesar de que los niveles de expresión de Brd2 y Lyar se mantienen tras 7 días de tratamiento con AR, se ha observado que la interacción entre ambas se debilita durante la diferenciación neuronal (**Figura 6D**). Esta desestabilización puede deberse a la aparición tras la inducción de la diferenciación neuronal de otras proteínas con afinidad por Brd2 o Lyar. De hecho, sabemos que Pleiotrofina se expresa en células P19 solo tras la inducción de diferenciación con AR y que su interacción con Brd2 provoca la disociación de este último de la cromatina (García-Gutiérrez *et al.*, 2014).

En condiciones de proliferación observamos cómo Lyar recluta a Brd2 y no a Brd4 hacia los promotores de genes de pluripotencia, confirmándose de nuevo la especificidad de la interacción con Brd2. Además de los promotores analizados, es de suponer que Lyar recluta a Brd2 en otras regiones, ya que en el fraccionamiento celular realizado observamos un aumento considerable de la solubilidad de Brd2 cuando se reducen los niveles de Lyar (**Figura 7B**), lo que no sería explicable si este reclutamiento solo tuviese lugar en genes de pluripotencia. En cambio, sí podemos afirmar que este reclutamiento no ocurre en todos los sitios del genoma en los que se localiza Brd2, ya que su asociación a los promotores de *Actb* y *Elk3*, a los que no se une Lyar, no se ve

DISCUSIÓN

alterada tras bajar los niveles de Lyar. La presencia de Lyar en promotores viene determinada por su capacidad de reconocimiento de la secuencia consenso GGTTAT (Ju *et al.*, 2014), secuencia presente en el promotor de *Nanog* y en el resto de promotores analizados en los que el reclutamiento de Brd2 depende de Lyar.

A nivel de expresión esta interacción no parece ser relevante en condiciones de proliferación, ya que tanto la sobreexpresión de la versión truncada de Lyar (con efecto dominante negativo) como la reducción de los niveles de Brd2 no producen cambios en la expresión de *Nanog* (**Figuras 12B y 12E**). Igualmente, a pesar de que en presencia de la molécula *shLyar* el reclutamiento hacia los promotores de pluripotencia de Lyar y de Brd2 se ve disminuido, el nivel de expresión de estos genes no se ve alterado a excepción de *Nanog*, cuya expresión aumenta considerablemente (**Figura 10**). Esto puede deberse a la existencia de factores de transcripción que tienen mayor peso en la regulación de la expresión de estos genes y que permanecen intactos en las condiciones analizadas. En este sentido, se ha descrito, por ejemplo, el papel de Brd4 en la regulación transcripcional de *Pou5f1* (Di Micco *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015a).

En condiciones de diferenciación neuronal, sin embargo, la interacción entre Brd2 y Lyar resulta esencial para su correcto desarrollo. La interrupción de la interacción impide que al inducir la diferenciación neuronal se llegue a los niveles de expresión esperados para los marcadores *Nes*, *Sox6* y *Pax6*, afectando a la neurogénesis y causando un aumento de la apoptosis (**Figura 13**). El primer paso para una correcta inducción de la diferenciación suele ser la represión de todos aquellos genes implicados en la capacidad pluripotente y proliferativa, entre los que se encuentra *Nanog*. Hemos visto que este gen es reprimido por Lyar y que su asociación con Brd2, activador transcripcional, mitiga la acción represora de Lyar en condiciones de diferenciación. En estas condiciones, Brd2 comienza a disociarse del promotor de *Nanog*, pero aún ejerce un efecto positivo sobre la transcripción de este gen. La actividad represora de Lyar se debe a su interacción con la metiltransferasa de histonas PRMT5 (Ju *et al.*, 2014), y el dominio de interacción con esta proteína está también presente en la versión truncada de Lyar. De este modo, tanto al sobreexpresar la versión truncada como al expresar *esiBrd2* se produce una situación en la que la actividad represora de Lyar está presente sobre *Nanog* y la actividad activadora de

Brd2 está ausente (**Figura 37**), ya sea por no poder ser reclutado al promotor de *Nanog* o por no haber niveles suficientes de Brd2 en la célula. Esto causa que la represión sea más rápida de lo normal, por lo que la interacción Brd2-Lyar asegura que se produzca una represión progresiva de *Nanog* y que la diferenciación neuronal se lleve a cabo correctamente.

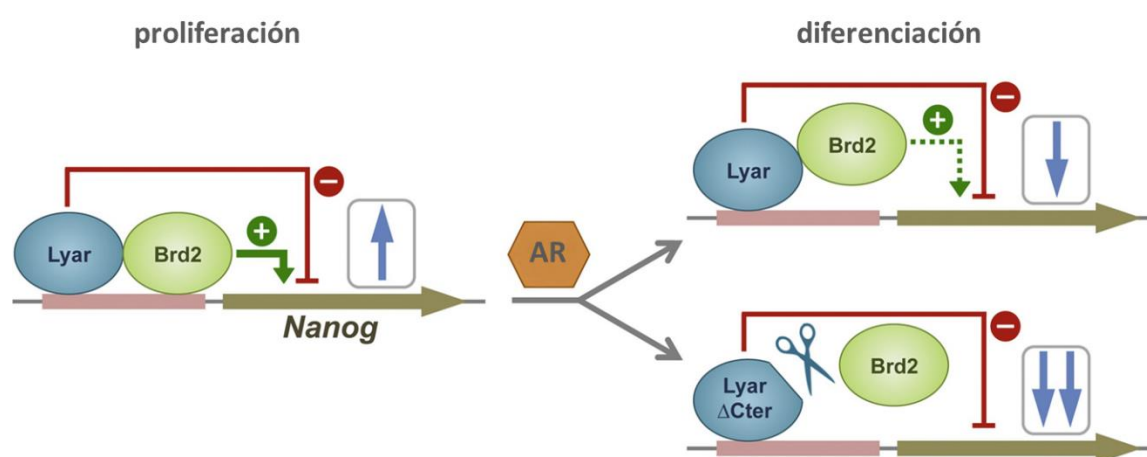


Figura 37. Modelo de acción de la interacción Brd2-Lyar sobre la expresión de *Nanog* en condiciones de proliferación y diferenciación neuronal.

En condiciones de proliferación la acción represora de Lyar y la acción activadora de Brd2 dan lugar a los niveles de expresión basales de *Nanog*. Tras la inducción de la diferenciación neuronal con ácido retinoico (AR) Brd2 se disocia del promotor de *Nanog*, de manera que su acción activadora se debilita frente a la constante acción represora de Lyar, disminuyendo así los niveles de expresión de *Nanog*. Si previamente a la inducción con AR se sobreexpresa la versión truncada de Lyar (carente del dominio de interacción con Brd2), Brd2 no llega a ser reclutado al promotor de *Nanog* y la represión de Lyar gana fuerza desde el momento de la inducción, de manera que los niveles de expresión de *Nanog* son aún menores.

La proteína Lyar ya había sido descrita previamente (Li *et al.*, 2009) como imprescindible para el mantenimiento de la capacidad proliferativa y la capacidad de diferenciación de las células troncales embrionarias (ESCs). Esta función se relacionó con la proteína Nucleolina, implicada en el crecimiento celular y la apoptosis de las ESCs y cuya estabilidad depende de la su interacción con Lyar. Esta interacción explica por qué la ausencia de Lyar causa una disminución de la capacidad de auto-renovación de las ESCs; sin embargo, en estas condiciones las células también sufren una

DISCUSIÓN

diferenciación aberrante que no había sido explicada a nivel molecular hasta el momento.

2. Brd4 interacciona con Nipbl para regular la expresión de genes potencialmente relacionados con el Síndrome de Cornelia de Lange

En este trabajo hemos descrito la interacción entre las proteínas Brd4 y Nipbl así como la función transcripcional de esta. Durante el desarrollo de este estudio apareció otra publicación describiendo esta misma interacción (Olley *et al.*, 2018); sin embargo, en nuestro trabajo detallamos los dominios de interacción implicados, el dominio ET en Brd4 y la región N-terminal en Nipbl. El dominio ET es una región altamente conservada entre los distintos miembros de la familia BET (Florence & Faller, 2001), por lo que *a priori*, tal y como observamos en el ensayo de doble híbrido realizado (**Figura 14B**), cualquier miembro podría ser capaz de interactuar con Nipbl. Contrariamente a lo esperado, al analizar la interacción en células de mamífero, solo pudimos observar interacción de Nipbl con Brd4 (**Figura 15A**). Nuestros resultados indican una interacción predominante con Brd4, pero no descartan que Nipbl interactúe con otros miembros. De hecho, en células Th17 en proceso de diferenciación está descrita la interacción de Nipbl con Brd2 y la ausencia de interacción con Brd4 (Cheung *et al.*, 2017). Esta interacción con Brd2 ejerce un papel en el mantenimiento de la estructura de la cromatina, permitiendo el ensamblaje promotor-“enhancer”, en cambio, la interacción con Brd4 tiene una función más relacionada con la transcripción, por lo que puede que según el contexto celular Nipbl se asocie preferentemente con un miembro u otro dependiendo de las funciones más primordiales a realizar.

En nuestro trabajo hemos visto cómo Nipbl y Brd4 colaboran en la regulación transcripcional de un grupo de genes, estando la mayoría de ellos relacionados con el desarrollo y más concretamente con procesos como el desarrollo del sistema locomotor, del sistema nervioso y del sistema cardiovascular, alterados en individuos que padecen el Síndrome de Cornelia de Lange (**Figura 18**). Esto concuerda con el reciente hallazgo de individuos con fenotipos similares a aquellos con CdLS y que son

portadores de mutaciones puntuales o deleciones en el gen *BRD4* (Olley *et al.*, 2018). Nuestro trabajo, por tanto, aporta por primera vez una explicación molecular para la similitud entre los fenotipos de individuos con CdLS con mutaciones en *NIPBL* e individuos con mutaciones en *BRD4*, ya que ambas mutaciones provocan los mismos niveles de desregulación en este conjunto de genes.

El control transcripcional de *Nipbl* y de *Brd4* se debe a que ambas proteínas se localizan en regiones reguladoras. *Brd4* localiza tanto en promotores como en regiones “enhancer”, aunque en particular se ha detectado una presencia notable en los llamados “superenhancers” (Lovén *et al.*, 2013; Di Micco *et al.*, 2014). En cuanto a la localización de *Nipbl*, en este trabajo hemos determinado que su localización es mayoritariamente a nivel de promotor (**Figura 20**), y que su presencia en estas regiones se ve afectada al disminuir los niveles de *Brd4* y al bloquear la interacción mediante la sobreexpresión de la construcción dominante negativa *Brd4ΔC*. Igualmente, *Brd4* disminuye su presencia en los promotores estudiados cuando los niveles de *Nipbl* disminuyen y cuando se bloquea la interacción (**Figura 23**). Por lo tanto, la interacción entre ambas proteínas es necesaria para que su presencia en los promotores sea estable. Si esta interacción se produce antes de su reclutamiento a la cromatina o *a posteriori* aún se desconoce, aunque según Olley *et al.* no se necesita la unión de *Brd4* a la cromatina para que la interacción con *Nipbl* tenga lugar.

A pesar de que *Nipbl* se localiza preferentemente en promotores, también está presente en “enhancers”. Estudios en *Drosophila melanogaster* han determinado que la presencia de *Nipped-B* (ortólogo de *Nipbl*) en las regiones “enhancer” se ve facilitada por *Fs(1)h* (ortólogo de las proteínas BET), mientras que la presencia de *Nipped-B* en promotores depende principalmente de *MED30* (subunidad del complejo Mediator) (Pherson *et al.*, 2019). Aunque en *Drosophila melanogaster* existe solo una proteína BET (a diferencia de lo que ocurre en vertebrados, donde la evolución ha dado origen a varios miembros con funciones especializadas), estos datos junto a los obtenidos en este trabajo ayudan a dilucidar la composición de los complejos implicados en la regulación génica llevada a cabo por *Brd4* y *Nipbl*. Podemos suponer que *Brd4*, gracias a su capacidad de dimerización (García-Gutiérrez *et al.*, 2012), podría facilitar la formación de un bucle promotor-“enhancer” de modo que un monómero se encuentre

DISCUSIÓN

unido al promotor y otro al “enhancer”. La interacción con Nipbl tendría un papel en facilitar y estabilizar esta estructura, ya que la disminución de los niveles de Nipbl provoca menos presencia de Brd4 en los promotores. En esta estabilización participaría también el complejo Mediator, que es reclutado a “super-enhancers” por Brd4 (Di Micco *et al.*, 2014) e interacciona con Nipbl (Kagey *et al.*, 2010). Por lo tanto, el mantenimiento de esta estructura gracias a la interacción Brd4-Nipbl potenciaría la inducción de los genes que regulan conjuntamente (**Figura 38**).

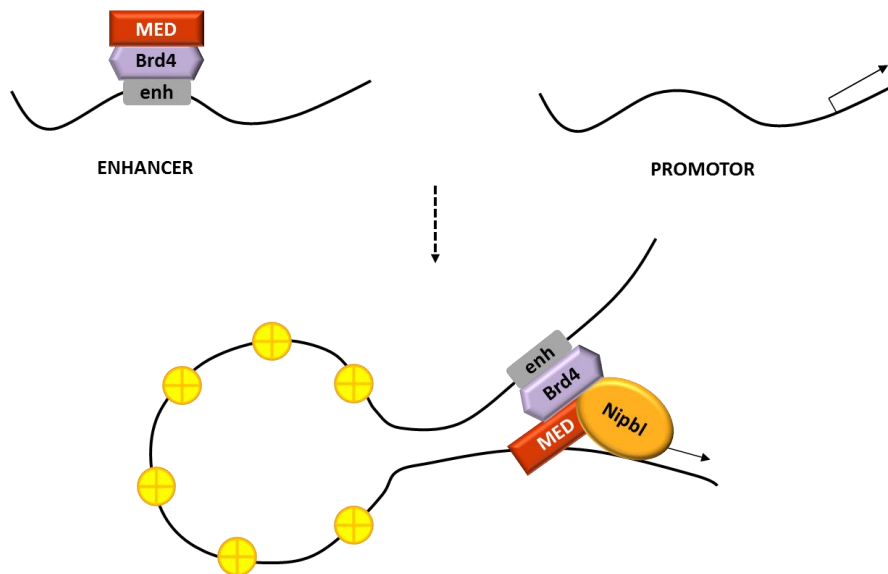


Figura 38. Modelo para el reclutamiento de Nipbl a los promotores mediante Brd4.

En primer lugar, Brd4 se uniría a regiones “enhancer”, hacia donde reclutaría al complejo Mediator. Ambas proteínas favorecen la formación de un bucle para la interacción promotor-“enhancer” y reclutan a Nipbl para el mantenimiento de esta estructura. De este modo, sin Brd4 no se produciría el bucle y sin Nipbl no se mantendría, por lo que Brd4 solo se encontraría en las regiones “enhancer” y Nipbl disminuiría su presencia en los promotores.

El grueso de este trabajo se llevó a cabo en la línea celular P19, que al conservar características de célula troncal como la pluripotencia puede diferenciarse a varios tipos celulares. Puesto que el síndrome CdLS se produce durante el desarrollo, consideramos conveniente el uso de una línea celular no diferenciada. Sin embargo, puesto que esta línea celular tiene sus límites para el estudio de una enfermedad humana, decidimos complementar este estudio con el uso de modelos adicionales para este síndrome.

En primer lugar, utilizamos fibroblastos de pacientes de CdLS con mutaciones en *NIPBL*. Las células de estos pacientes presentan niveles bajos de la proteína NIPBL, y al igual que en células P19, pudimos comprobar cómo la disminución de estos niveles afecta al reclutamiento de BRD4 a los promotores de los genes que regulan conjuntamente (**Figura 25**). También utilizamos la estirpe *Nipped-B⁴⁰⁷* de *Drosophila melanogaster*, previamente utilizada como modelo animal de CdLS (Rollins *et al.*, 1999; Shaaf *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015b) y la estirpe *fs(1)h¹⁸*, mutada en el único miembro de la familia BET presente en moscas. Estas dos estirpes nos permitieron confirmar que tanto *Nipped-B* como *fs(1)h* controlan genes implicados en el desarrollo de la mosca (**Figuras 26 y 27**). Entre estos genes destacan *Shaw*, *Task7* y *wg*, ortólogos de los genes *Kcnc1*, *Kcnk3* y *Wnt1* respectivamente. Los dos primeros son regulados por Brd4 y Nipbl en células P19 tal y como se muestra en este trabajo, mientras que *Wnt1* está implicado en la ruta de señalización Wnt, ruta alterada en otros modelos animales de CdLS (Pistocchi *et al.*, 2013; Avagliano *et al.*, 2017). Adicionalmente, los cruces entre ambas estirpes mutantes resultaron en una disminución de la producción de dobles heterocigotos (**Figura 28**), lo que indica la existencia de interacción génica entre los genes *Nipped-B* y *fs(1)h*. Estos resultados se han visto apoyados recientemente por los datos publicados por Pherson *et al.*, 2019, donde describen cruces entre las estirpes *Nipped-B⁴⁰⁷* y *fs(1)h¹* (estirpe distinta a la utilizada en este trabajo) que también muestran interacción génica entre estos dos genes.

3. Papel de Brd2 y Brd4 en los cambios transcripcionales que ocurren durante la diferenciación neuronal

La importancia de Brd2 y Brd4 en el proceso de diferenciación neuronal se conoce gracias a distintos trabajos anteriores en los que a grandes rasgos Brd2 tendría un papel más enfocado a la salida del ciclo e inducción de la diferenciación (Tsume *et al.*, 2012; Fernández-Alonso *et al.*, 2017), mientras que Brd4 bloquearía la diferenciación mediante su acción positiva sobre la proliferación celular (Di Micco *et al.*, 2014).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados, aunque preliminares, apuntan también en este sentido. Brd4 parece resultar esencial para el mantenimiento de las células en estado proliferativo. Durante la diferenciación neuronal con ácido retinoico (AR) Brd4 se disocia de los promotores de los genes relacionados con proliferación y pluripotencia (**Figura 34**), los cuales al perder una potente señal activadora reprimen su expresión génica (**Figura 31**). Si se induce la diferenciación con AR en ausencia de Brd4, estos genes se reprimen aún más (**Figura 32**), lo que confirma su papel en el mantenimiento de la expresión de estos genes. De los genes analizados, observamos que Brd4, a pesar de regular la expresión de *Nanog* (Liu *et al.*, 2014; Horne *et al.*, 2015), no se disociaba de su promotor a 16 h de tratamiento con AR, por lo que probablemente su disociación se produzca más tardíamente.

En cuanto al posible control de Brd4 sobre los genes de diferenciación neuronal, no parece que se trate de un control directo, ya que Brd4 solo aumenta su localización en los genes *Lhx1* y *Neurog1*, genes que se inducen con AR, pero que en ausencia de Brd4 aumentan sus niveles de inducción (**Figura 33**). Por lo tanto, Brd4 no estaría actuando como activador de estos genes, y el aumento de los niveles de inducción podría ser una consecuencia indirecta de la mayor represión de los genes de pluripotencia. De hecho, en otras publicaciones se menciona cómo el uso de moléculas *siBrd4* o de la droga JQ1 provoca la inducción de marcadores de diferenciación neuronal como *Pax6* y *Nes* al alterar estas moléculas la capacidad de auto-mantenimiento de las células troncales embrionarias (Liu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015a). Aparte, Brd4 también se disocia del promotor del gen *Nr2f1*, inducido con AR y que en presencia de la molécula *esiBrd4* incrementa sus niveles de inducción. Este resultado sugiere que Brd4 podría estar actuando como un represor, de manera que su disociación durante la diferenciación liberaría a *Nr2f1* de su represión. Sin embargo, según nuestros datos (**Anexo 1**) *Nr2f1* no se induce en presencia de la molécula *esiBrd4*, lo que descartaría un papel represor de Brd4.

Por otro lado, Brd2 no parece ser esencial para la represión de los genes de pluripotencia, ya que su localización no cambia a 16 h AR de los promotores de estos genes y el uso de la molécula *esiBrd2* no modifica los niveles de represión génica (**Figuras 32 y 34**). Sin embargo, a pesar de estos resultados, sabemos que la molécula

esiBrd2 sí es afectada a los niveles de represión de *Nanog* durante la inducción de la diferenciación neuronal con AR. De hecho, en el primer bloque de este trabajo vimos cómo a 48 h de tratamiento con AR Brd2 se disociaba del promotor de *Nanog* facilitando la actividad represora de Lyar (**Figura 11B**) y cómo a 16 h de tratamiento con AR la disminución de su presencia en el promotor, debido a la bajada de los niveles de Brd2 o a la expresión de Lyar- Δ C causaba una mayor represión de sus niveles de expresión (**Figuras 12B y 12E**). Por lo tanto, no podemos descartar que en otros de los genes analizados Brd2 pueda ejercer un papel relevante que haya quedado oculto debido a los tiempos experimentales elegidos.

Sobre los genes de diferenciación neuronal, Brd2 sí parece tener un papel más claro. Su localización aumenta a 16 h de tratamiento con AR en los promotores de *Neurod1*, *Nes*, *Nr2f1* y *Pax6* (**Figura 35**), aunque solo los genes *Nes* y *Pax6* se ven afectados en su expresión por la ausencia de Brd2 durante la inducción con AR (**Figura 33**). En estos dos genes Brd2 podría estar actuando como activador transcripcional, mientras que en *Neurod1* y *Nr2f1*, puede que el efecto transcripcional no se observe a 48 h de adición de AR sino a tiempos más tempranos no contemplados. En el caso de *Sox6*, a pesar de que Brd2 no modifica su localización en este promotor, sí se observan efectos en sus niveles de inducción cuando se diferencian las células en presencia de la molécula *esiBrd2*, lo que podría deberse a un efecto indirecto mediado por algún activador reclutado por Brd2.

Actualmente, este estudio sobre el papel de Brd2 y Brd4 en los cambios transcripcionales que tienen lugar durante la diferenciación neuronal se encuentra en una fase preliminar que nos ha permitido orientar los siguientes pasos a tomar. En general hemos visto que Brd4 tiene un papel activador en los promotores de los genes de pluripotencia y proliferación; papel que abandona cuando se reciben las señales de diferenciación neuronal. En cuanto a Brd2 no parece que tenga un gran efecto sobre los genes de pluripotencia, pero sí en la inducción de genes de diferenciación (**Figura 39**). Sin embargo, habría que analizar lo que ocurre a 16 h con AR en ausencia de Brd2, ya que parece que la presencia de Brd2 podría ser esencial a tiempos más tempranos en los que se decide el paso de proliferación a diferenciación, tal y como se ha visto en

DISCUSIÓN

varias ocasiones (Surface *et al.*, 2016; Fernández-Alonso *et al.*, 2017; Luna-Peláez *et al.*, 2018).

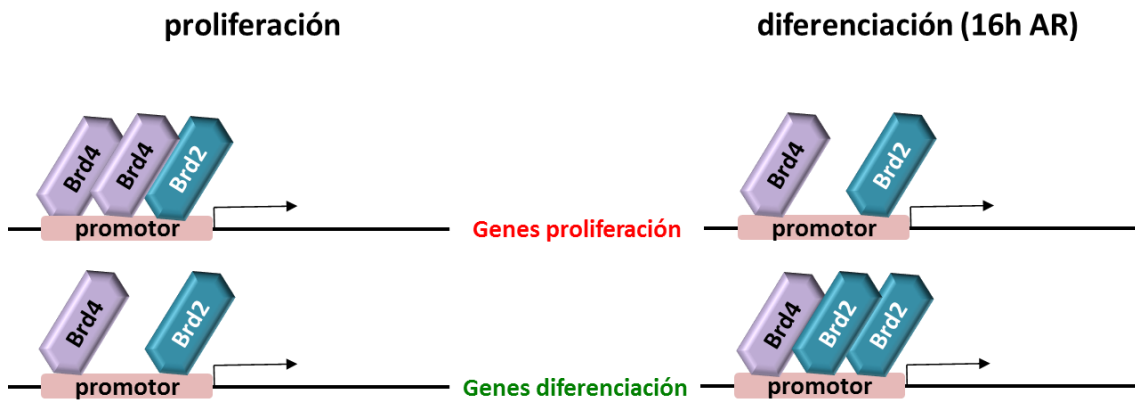


Figura 39. Modelo de la dinámica de Brd2 y Brd4 en los promotores de los genes de proliferación y de diferenciación.

Durante los primeros instantes de la diferenciación neuronal con AR, Brd4 se disociaría de los promotores de los genes de proliferación y pluripotencia mientras que Brd2 permanecería sin cambios en estos promotores. En los promotores de los genes de diferenciación aumentaría la presencia de Brd2 mientras que la presencia de Brd4 no variaría considerablemente.

Para clarificar estos datos sería de ayuda la realización de un análisis de ChIP-Seq de Brd2 y Brd4 en condiciones de proliferación y tras 16 h y 48 h de tratamiento con AR. Esto permitiría conocer con mejor precisión la dinámica de estas proteínas en las regiones reguladoras, tanto promotoras como “enhancers”. Los datos obtenidos podrían explicar algunos de los casos analizados en los que no se observan cambios de localización a nivel de promotor. Igualmente, sería interesante realizar un análisis mediante RNA-Seq de células diferenciadas en presencia de moléculas *esiBrd2* y *esiBrd4*, para así detectar una mayor cantidad de genes implicados en la diferenciación neuronal que puedan estar regulados por Brd2 y Brd4.

CONCLUSIONES

1. La interacción de Lyar con las proteínas BET se produce exclusivamente con el miembro Brd2 y está mediada por el dominio C-terminal de Lyar y el motivo B de Brd2.
2. La interacción entre Brd2 y Lyar se produce en condiciones de proliferación y se va debilitando progresivamente durante la inducción a diferenciación neuronal con ácido retinoico.
3. Lyar recluta a Brd2 hacia el promotor de *Nanog* (y a otros promotores de genes de pluripotencia) para asegurar los niveles adecuados de represión que ocurren tras la inducción de la diferenciación neuronal.
4. La interacción entre Brd2 y Lyar asegura que la diferenciación neuronal se produzca correctamente, evitando la inducción de apoptosis que tiene lugar si la diferenciación es aberrante.
5. La interacción entre Nipbl y las proteínas BET está mediada por el dominio ET de las proteínas BET y por la región N-terminal de Nipbl. Aunque la interacción potencialmente tiene lugar con todos los miembros de la familia BET, existe una preferencia por el miembro Brd4.
6. Nipbl y Brd4 se estabilizan mutuamente en los promotores de los genes que regulan conjuntamente. Estos genes están relacionados con distintos aspectos del desarrollo afectados en pacientes con el Síndrome Cornelia de Lange (CdLS).
7. La interacción entre Brd4 y Nipbl y sus efectos en el desarrollo de los individuos se ha confirmado tanto en células de pacientes con CdLS como en *Drosophila melanogaster*.
8. En el proceso de diferenciación neuronal temprana Brd4 se disocia de algunos promotores de genes de pluripotencia y proliferación, lo que correlaciona con la represión de estos genes y la inducción indirecta de genes de diferenciación.

CONCLUSIONES

9. En el proceso de diferenciación neuronal temprana Brd2 permanece en los promotores de genes de pluripotencia y proliferación y aumenta su presencia en algunos promotores de genes de diferenciación, asegurando el correcto paso de un estado pluripotente a un estado de diferenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Organismos y condiciones de crecimiento

1.1.1. Bacterias

Se utilizó la estirpe DH5 α de *Escherichia coli* como herramienta de clonaje de ADN. Su cultivo se realizó en medio LB (Luria-Bertani), suplementado con los antibióticos ampicilina (100 μ g/mL) o kanamicina (50 μ g/mL) según el transformante a seleccionar. La incubación se realizó a 37 °C con agitación orbital constante a 200 rpm para los cultivos líquidos.

LB: 10 g/L de NaCl, 10 g/L de bacto-triptona y 5 g/L de extracto de levadura. Añadir 15 g/L de bacto-agar para la obtención de medio sólido.

1.1.2. Levaduras

Para el ensayo de doble híbrido se utilizó la estirpe NMY51 de *Saccharomyces cerevisiae* provista en el kit DUALhybrid Kit (Dualsystems Biotech). Su cultivo se realizó en medio rico YPAD (MP Biomedicals) o en medio mínimo SD-His-Leu-Trp (MP Biomedicals) suplementado con histidina y adenina. La incubación se llevó a cabo a 30 °C con agitación orbital constante a 200 rpm para los cultivos líquidos.

YPAD: 20 g/L de glucosa, 20 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura y adenina sulfato 0,1 g/L. Añadir 20 g/L de bacto-agar para la obtención de medio sólido.

SD-His-Leu-Trp: 20 g/L de glucosa, 5 g/L de sulfato de amonio y 1,7 g/L de base nitrogenada de levadura y suplementado con una mezcla de aminoácidos (excepto histidina, leucina y triptófano). Añadir 20 g/L de bacto-agar para la obtención de medio sólido.

1.1.3. Líneas celulares de mamífero

Las líneas celulares utilizadas fueron las células de ratón P19, las células humanas HEK-293T y fibroblastos humanos procedentes de biopsias de donantes sanos y pacientes del Síndrome de Cornelia de Lange.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células P19

La línea celular P19 proviene de un teratocarcinoma de ratón y posee características pluripotentes, pudiéndose diferenciar a neuronas mediante la adición de ácido retinoico (AR) y a cardiomiocitos mediante la adición de DMSO (McBurney et al., 1982). Estas células se cultivaron en medio α -MEM (α -modified Minimum Essential Medium), provisto inicialmente de ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos y L-glutamina (HyClone), y suplementado con un 7,5 % (v/v) de suero de ternera recién nacida (NCS), un 2,5 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 μ g/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina.

Para diferenciar las células P19 hacia neuronas se utilizaron dos protocolos de diferenciación: en suspensión y en adherencia. El protocolo en suspensión dura 7 días y permite la obtención de neuronas diferenciadas. En este caso, las células se cultivaron durante 4 días en placas no adherentes con medio α -MEM suplementado con 5 % (v/v) de FBS y 1 μ M de AR (medio de diferenciación), al cuarto día se pasaron a placas adherentes (con el medio normal de cultivo), donde se mantuvieron durante los 3 días siguientes. El protocolo en adherencia dura 3 días y permite obtener células en un estado de diferenciación temprana. Con este protocolo las células se sembraron en adherencia y al día siguiente se les cambió el medio por medio de diferenciación, que se mantuvo durante 2 días.

Los tratamientos con la droga JQ1 (Sigma-Aldrich) se realizaron a una concentración final de 1 μ M.

Células HEK293T

La línea celular humana HEK293T consiste en células transformadas provenientes del riñón embrionario y fue usada para la sobreexpresión de proteínas en experimentos de inmunoprecipitación. Estas células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) provisto inicialmente de L-glucosa, L-glutamina, bicarbonato sódico y piruvato sódico (Sigma-Aldrich), y suplementado con un 10 % (v/v) de FBS, 100 μ g/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina.

Fibroblastos humanos

Los fibroblastos utilizados provienen de biopsias de piel de dos donantes sanos y dos pacientes del Síndrome de Cornelia de Lange (CdLS) con mutaciones en *NIPBL* (**Tabla 2**). Todas las muestras se usaron tras la obtención de un consentimiento informado y fueron obtenidas gracias a la colaboración de la Dra. Valentina Massa (Università degli Studi di Milano). Estas células se cultivaron en medio RPMI- 1650 (Roswell Park Memorial Institute) provisto inicialmente con L-glutamina (EuroClone) y suplementado con un 10 % (v/v) de FBS, 100 µg/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina.

Paciente	Sexo	Edad	Score clínico	Mutación en <i>NIPBL</i>
CdLS 1	H	4	23 (severo)	Deleción (5329_5427del)
CdLS 3	M	24	24 (severo)	Cambio de sentido (5566A>G)
Control 2	H	13	-	-
Control 3	M	11	-	-

Tabla 2. Pacientes de CdLS y donantes sanos de los que se obtuvieron las biopsias.

Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C y en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

1.1.4. *Drosophila melanogaster*

Mutantes de la mosca *Drosophila melanogaster* en los genes *Nipped-B* (ortólogo de *Nipbl*) y *fs(1)h* (ortólogo de *Brd4*) fueron utilizados para analizar la viabilidad del doble heterocigoto (**Tabla 3**). Estos mutantes se realizaron en un fondo silvestre (estirpe *yw*) y fueron adquiridos en Bloomington *Drosophila* Stock Center (Indiana University). Los stocks de las moscas se mantuvieron a 25 °C en tubos con papilla compuesta de harina de maíz, levadura, agar y melaza.

Mutante	Sexo	Letalidad	Balancer y características asociadas
<i>Nipped-B</i> ⁴⁰⁷	Machos	En homocigosis	CyO (alas curvas)
<i>fs(1)h</i> ¹⁸	Hembras	En homocigosis Machos no viables	FM7c (ojos estrechos)

Tabla 3. Características de los mutantes de *Drosophila melanogaster* utilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cruce entre mutantes se seleccionaron hembras vírgenes *fs(1)h¹⁸* y se cruzaron con machos *Nipped-B⁴⁰⁷*. Se realizaron tres cruces en triplicado en los que había 8 hembras vírgenes y 4 machos por tubo. Tras dos semanas en crecimiento se observó y cuantificó la descendencia.

1.2. Vectores de expresión

Los vectores de expresión utilizados en la transfección de células de mamífero se basaron en el vector pAdRSV-S, en el cual se clonaron los distintos ADNc fusionados a un epítipo Flag o HA. En el caso del plásmido *shLyar* se clonó la secuencia 5'-CAGAGATGCCGATCACTAA-3' en el vector pTER (Oligoengine).

Los vectores de expresión utilizados en el ensayo de doble híbrido se basaron en los plásmidos pLexA-N y pGAD-HA (Dualsystems Biotech) para las construcciones cebo y presa respectivamente.

1.3. Oligonucleótidos

Expresión ratón	FW	RV
<i>Adamts17</i>	AGCGCTGCAAAGTAGTGACA	GGTCTCCACTGTGTGTTTCGT
<i>Ajap1</i>	GCACAACGGAGCCTTCCA	GAGCGCAGCGATGACCAT
<i>Chst1</i>	GCTTCCGCCTCTCCTATGAC	GGCCGGATTCTTCAGTTCCT
<i>Clstn2</i>	TTGATGCCACCAACTCAACTG	ACCTGCTCATAGCGGTTTCATG
<i>Crybg1</i>	AAGTCCGACGGCAGGATCTA	GACCATGGCTTCCCACACTT
<i>Dner</i>	CACCCAGGAGCCTGACATAA	GCATTCCCACAGGCAACATC
<i>Igf2</i>	GCTTGTTGACACGCTTCAGT	AAGCAGCACTCTCCACGAT
<i>Kcnc1</i>	CATCTGGGCGCTGTTTCGA	GTTGTGATGGAGACCAGGATGAA
<i>Kcnk3</i>	CTTCGCCATCACCGTCATCA	GCGCGTAGAACATGCAGAAC
<i>Nanog</i>	CCTCAGCCTCCAGCAGATGC	CCGCTTGCACTTCATCCTTTG
<i>Nestina</i>	GATCGCTCAGATCCTGGAAG	TCAGGAAAGCCAAGAGAAGC
<i>Pax6</i>	TACCAGTGTCTACCAGCCAAT	TGCACGAGTATGAGGAGGTCT
<i>Pou5f1</i>	CCAATCAGCTTGGGCTAGAG	CTGGGAAAGGTGTCCCTGTA
<i>Prdm14</i>	GCATCCTGGTTCCCACAGAG	CTGCAGAACACGCCAAAGTG
<i>Rasgef1b</i>	TGGGTCTCTGGAAGCCCTTA	GAGCTCGTACGGATGCATGA
<i>Smcl2</i>	CCCGAGACATCTTCCCAGTT	GTTCTTCTTTTGGCCTTGGT
<i>Sox2</i>	GAGTGGAAACTTTTGCCGAGA	GAAGCGTGTACTTATCCTTCTTCAT
<i>Sox6</i>	CAGCGTTCTGTCATCTCAGC	CTCCCTTCGTCAGGTTATG
<i>Zbtb16</i>	GACGCACTACAGGGTTCACA	GGGCAGTATCCGTGCAGAT
<i>RpLp</i>	CCAGGCTTTGGGCATCAC	CTCGCTGGCTCCCACCTT

Expresión mosca	FW	RV
<i>arm</i>	TCTGCTGCAACGAAACAACG	CTGCATCCGAAAGATTGCGG
<i>bsh</i>	AGAAACGCGGTGAAAAGTGC	TGTTGCGACGGATGTTTGTG
<i>HDAC3</i>	TATGGACTTCTACCGGCCA	CCTGGTGCTCAGGGAGAAG
<i>Shaw</i>	TTTCCAGCCCCGAAAAGTTGG	TTGCTTGCGGAGAACCAAAC
<i>SoxN</i>	CCATACCGTTCTGCTTCGAT	CCCGTAATTGGCAACAGTTT
<i>Task7</i>	GCTGAGCTTGGTCTTCATCC	TCTCTTGGCATCCTCTGCTT
<i>wg</i>	TGTTGTGTCCCATGATTGCC	TGCGTATGCCGATATTGCTG
<i>rpl32</i>	ACAGGCCCAAGATCGTGAAG	CTTGCGCTTCTTGAGGAGA
ChIP	FW	RV
<i>Ajap1</i>	ACTCAAGCCCAGTGC GGTTA	CTCGGTAGGTGGGCAAAGTTT
<i>Gamma-globina</i>	CAGGCTGACCAATAGCTTCA	TGCTAGAAGTGGTGGCCTTT
<i>Kcnc1</i>	GCAGCTGACCTTCCCCTAAA	CGGTATCATCTCAGCGGGAAA
<i>Kcnk3</i>	TCGCCGGCTCCTTCTACTT	GCGGAGTGTAGTTACCGATGGT
<i>Nanog</i>	ATAGGGGGTGGGTAGGGTAG	CCCACAGAAAGAGCAAGACA
<i>Pou5f1</i>	TTGAAGTGTGGTGGAGAGTGCT	TGCACCTTTGTTATGCATCTGCCG
<i>Prdm14</i>	GCATATACCCTACCCGCTTTC	CAAACGGATTGGAGGTTGAT
<i>Rasgef1b</i>	GCAAGTGCTTCGTGGTTCTT	GTAATACCGGCTCGACTCGTT
<i>Sox2</i>	CCTAGGAAAAGGCTGGGAAC	GTGGTGTGCCATTGTTTCTG
<i>AJAP1</i>	CCAGGGCCAGATGGAAGAG	AAGTTTGCCGAGAAGGGTCTTT
<i>KCNC1</i>	CCACAGCCACTTCGACTATGAC	CTTGCCCGTGCGGTAGTAG
<i>KCNK3</i>	CGCCGGCTCCTTCTACTTC	CGAGCCGTTACCGATGGT

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en PCR cuantitativa (expresión y ChIP).

siRNA	Secuencia	Referencia
<i>esiBrd2</i>		MISSION esiRNA EMU067621
<i>siBrd4</i>	GAGAAGGACAAGAAGGAAA	
<i>esiBrd4</i>		MISSION esiRNA EMU051511
<i>siNipbl#1</i>	GCGAUUAACCCGUCUUGUU	SASI_Mm02_00351489
<i>siNipbl#2</i>	GGAAGAUUGGUAGCUUGUA	SASI_Mm02_00351487
<i>siC (Luciferase)</i>	CGUACGCGGAUACUUCGA	
<i>esiC (Luciferase)</i>		MISSION esiRNA EHUFLUC

Tabla 5. Moléculas de ARN interferente utilizadas

1.4. Anticuerpos

Anticuerpo	Antígeno	Huésped	Uso	Referencia
Anti-Flag M2	Péptido Flag (DYKDDDDK)	Ratón monoclonal	WB (1:2000) ChIP (3 µL)	Sigma-Aldrich (F1804)
Anti-HA	Péptido HA (YPYDVPDYA)	Rata monoclonal	WB (1:2000) ChIP	Roche (3F10)
Anti-α-Tubulina	Proteína completa	Ratón monoclonal	WB (1:10000)	Sigma-Aldrich (T9026)
Anti-Brd2C	aa 698-780	Conejo policlonal	WB (1:1000)	Producido en el laboratorio

MATERIALES Y MÉTODOS

Anti-Brd2I	aa 164-274	Conejo policlonal	IP (5 µL)	Producido en el laboratorio
Anti-Brd2N	aa 50-651	Conejo policlonal	ChIP (20 µL)	Producido en el laboratorio
Anti-Brd4	aa 1312-1362	Conejo policlonal	WB (1:2000) ChIP (3 µL)	Bethyl (A301-958A)
Anti-Lyar	Proteína completa	Conejo policlonal	WB (1:3000) ChIP (3 µL)	Millipore (AB4344)
Anti-Nipbl	aa 1025-1075	Conejo policlonal	WB (1:3000) ChIP (3 µL)	Bethyl (A301-799A)
Anti-Histona H3 acetilada en K27	aa 1-100	Conejo policlonal	ChIP (2 µL)	Abcam (ab4729)
Anti-Histona H3 trimetilada en K4	RT _{me3} KQT	Conejo monoclonal	ChIP (3 µL)	Millipore (17-614)
Anti-Pax6	Proteína parcial	Ratón monoclonal	IF (1:50)	DSHB (AB_528427)

Tabla 6. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Conjugado	Huésped	Uso	Referencia
Anti-IgG ratón	HRP	cabra	WB (1:10000)	Sigma-Aldrich (A4416)
Anti-IgG conejo	HRP	cabra	WB (1:10000)	Sigma-Aldrich (A6154)
Anti-IgG rata	HRP	cabra	WB (1:10000)	Sigma-Aldrich (A9037)
Anti-IgG ratón	Cy3	burro	IF (1:400)	Jackson IR (715-165-150)

Tabla 7. Anticuerpos secundarios.

2. MÉTODOS

2.1. Manipulación de ácidos nucleicos

2.1.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN tanto de células como de moscas se realizó mediante el kit RNeasy mini Kit (QIAGEN), usando tratamiento con DNAsa I según las indicaciones del fabricante. La cuantificación del producto final se realizó con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

2.1.2. Retrotranscripción

La conversión de ARN a ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo mediante el uso del kit iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo siempre de 1 µg de ARN.

2.1.3. PCR

Para la amplificación de los fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el termociclador TC3000 (Techne) y la ADN polimerasa Q5 High-Fidelity (New England Biolabs). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µL con 20-50 ng de ADN, 10 µL del tampón Q5 5X, desoxirribonucleótidos a 200 µM, oligonucleótidos a 0,5 µM y 0,5 µL de enzima. Los oligonucleótidos, diseñados mediante el programa Primer3Plus según el interés de cada amplificación, fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. Las condiciones de reacción se realizaron según las recomendaciones del fabricante de la enzima.

2.1.4. Manipulación enzimática

Para la creación de nuevos plásmidos se utilizó la ligasa T4 (Promega) uniendo los insertos amplificados por PCR con los vectores previamente desfosforilados por la fosfatasa alcalina (Roche). Las digestiones con endonucleasas tanto de los insertos como de los vectores se realizaron con las correspondientes enzimas de restricción (Fermentas y New England Biolabs). En todo caso se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.1.5. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis de las moléculas de ADN se llevó a cabo en el sistema horizontal Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad), en geles de agarosa 0,7-2 % (m/v) en TBE 0,5X y con 5 µg/mL de bromuro de etidio. El porcentaje del gel varió según el tamaño de los fragmentos a analizar. A las muestras de ADN se les añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga

MATERIALES Y MÉTODOS

antes de cargarlas en el gel junto al marcador de peso molecular 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen). La visualización se realizó en el transiluminador Universal Hood II (Bio-Rad).

TBE 0,5X: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM pH 8.

Tampón de carga: 0,25 % (m/v) de azul de bromofenol, 0,25 % (m/v) de xileno-cianol y 30 % (v/v) de glicerol.

2.1.6. Transfecciones de líneas celulares de mamífero

Las transfecciones transitorias en células P19 y células HEK293T se realizaron siguiendo las indicaciones de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en el caso de plásmidos y de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) en el caso de ARNs interferentes. Para transfecciones de más de 24 h se cambiaron los medios de transfección a las 6 h.

2.1.7. Transformación de levaduras

Biomasa correspondiente a la estirpe NMY51 de *Saccharomyces cerevisiae* se puso en crecimiento en medio YPAD, en agitación y a 30 °C. Un día después se midió la D.O. a 546 nm y se diluyó hasta que quedase a 0,3, dejándolo crecer hasta que alcanzase el valor de 0,6. Tras centrifugar 5 min a 700 g se resuspendió el precipitado en agua Milli-Q (1/5 del volumen inicial del cultivo) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El precipitado resultante se resuspendió en TE/LiAc (1/10 del volumen inicial del cultivo) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 100 µL de TE/LiAc. A este volumen se le añadieron 600 µL de PEG/TE/LiAc, 5 µL de ADN de esperma de salmón y al menos 100 ng de ADN plasmídico antes de incubarlo 45 min a 42 °C. Tras centrifugar 5 min a 700 g se resuspendieron los precipitados en 100 µL de una solución 0,9% (v/v) NaCl y se sembraron en placas con medio mínimo.

TE/LiAc: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM y acetato de litio (LiAc) 0,1 M.

PEG/TE/LiAc: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, LiAc 0,1 M y 40 % (m/v) de polietilenglicol (PEG).

2.1.8. Transformación de bacterias

Se mezclaron bacterias *E. coli* DH5 α con 100-500 ng de ADN plasmídico y se sometieron a choque térmico para su transformación. Tras 15 min en hielo, la mezcla se incubó 75 s a 42 °C seguido de 2 min más en hielo. Finalmente se añadió 1 mL de LB a la mezcla y tras al menos 1 h de incubación a 37 °C para que se expresasen las resistencias, se incubaron a 37 °C en LB líquido o sólido con sus respectivos antibióticos.

2.1.9. Amplificación y purificación de plásmidos

La amplificación de plásmidos se llevó a cabo mediante transformación bacteriana del plásmido de interés y la posterior incubación durante unas 16 h a 37 °C. El volumen del cultivo fue de 2 mL o 100 mL de LB con antibiótico según se quisiera amplificar a pequeña escala o a gran escala.

La purificación de cultivos a pequeña escala (miniprep) se realizó mediante choque térmico. En primer lugar, se centrifugó el cultivo 1 min a 16000 g y se resuspendió en 350 μ L de solución STET. Se añadieron 25 μ L de solución de lisozima y se incubó en un baño a 50 °C durante 1 min. Posteriormente, se centrifugó 5 min a 16000 g y se eliminó el precipitado viscoso resultante con un palillo de dientes estéril. El sobrenadante se trató con un 450 μ L de isopropanol y 35 μ L de AcNa 3 M y se dejó 5 min a temperatura ambiente para precipitar el ADN. Se centrifugó 5 min a 16000 g, se lavó el precipitado con etanol 70 ° y se volvió a centrifugar 2 min a 16000 g. El precipitado final se resuspendió en 50 μ L de Tris-HCl 10 mM (pH 8). Posteriormente se usó el kit Favorprep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen) para eliminar las impurezas restantes antes de ser enviadas para su secuenciación a Stabvida.

La purificación de cultivos a gran escala (midiprep) se realizó mediante el uso del kit DNA-midi GT Plasmid DNA Purification Kit (iNTRON Biotechnology) según las instrucciones del fabricante. Tras el paso de precipitación, se precipitó de nuevo el ADN, resuspendiendo el precipitado en 450 μ L de agua Milli-Q y añadiendo 900 μ L de etanol absoluto y 45 μ L de AcNa 3 M. Se dejó 30 min a -20 °C y se centrifugó 10 min a 16000 g. Se lavó el precipitado con 500 μ L de etanol 70 ° y se volvió a centrifugar 5 min

MATERIALES Y MÉTODOS

a 16000 g. Por último, se resuspendió el precipitado en 100 μ L de Tris-HCl 10 mM (pH 8).

Solución STET: 8 % (m/v) de sacarosa, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 50 mM y 5 % (m/v) de Tritón X-100.

Solución de Lisozima: 10 mg/mL de Lisozima en Tris-HCl 50 mM pH 8.

2.2. Análisis de la expresión génica y de la cromatina

2.2.1. PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa se realizó en el termociclador ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y con el sistema Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo con los ciclos predeterminados por el fabricante, mediante el programa *Standard Curve* para los experimentos de ChIP y *Relative Standard Curve* para los experimentos de expresión (usando como referencia el gen *RpLp0*). Para los experimentos de ChIP se utilizaron 2 μ L del ADN eluido y para los experimentos de expresión 2 μ L de una dilución 1/3 del ADNc. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por el programa Primer3Plus y sintetizados por Sigma-Aldrich, siendo su eficiencia siempre del 90-105 %. Las secuencias se muestran en la **Tabla 4**.

2.2.2. RNA-Seq

Los ARNs extraídos se enviaron a la Unidad de Genómica de CABIMER para su secuenciación con el sistema NextSeq500 (Illumina) con los parámetros HIGH-Output y lecturas single-end de 75 pares de bases. Las librerías se prepararon siguiendo el TruSeq Stranded TOTAL RNA kit (Illumina), excluyendo los ARN ribosómicos.

Los datos obtenidos se filtraron en primer lugar mediante el programa FSTQ Toolkit v1.0.0 y posteriormente se alinearon al genoma de referencia de ratón mm9 mediante el paquete Rsubread v.1.28.1 de Bioconductor. El análisis de las diferencias en expresión génica se llevó a cabo con los paquetes voom/limma v.3.34.9 y edgeR

v.3.20.9 de Bioconductor. Se tuvieron en cuenta los genes que mostraron más de una lectura por millón en más de dos réplicas biológicas.

2.2.3. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La fijación de las proteínas a la cromatina se realizó añadiendo al medio de cultivo (10 mL) una solución de fijación con formaldehído durante 10 min, tras lo que se añadieron 733 μ L de glicina 2 M durante 5 min para parar la reacción. Tras dos lavados con PBS se recogieron las células con un rascador y centrifugando 5 min a 3000 g y a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 2,5 mL de tampón de lisis 1 y tras 10 min de incubación en hielo se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. De este modo precipitan los núcleos celulares, los cuales se resuspendieron en 1 mL de tampón de lisis 2 antes de sonicar en hielo usando el baño Bioruptor (Diagenode). Se sometieron a 8 ciclos (15 ciclos para fibroblastos humanos) de pulsos de 30 segundos a máxima potencia seguidos de 30 segundos de pausa. Posteriormente se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se conservó el sobrenadante (cromatina). Una alícuota de cromatina se trató con proteinasa K (Roche) y se incubó a 65 °C para al día siguiente purificar el ADN mediante fenol-cloroformo y así cuantificarlo y valorar la calidad del sonificado migrándolo en un gel de agarosa al 1,2 % (m/v).

La inmunoprecipitación de la cromatina se llevó a cabo con 30 μ g de cromatina diluida 1/10 en tampón de ChIP que se incubó en rotación a 4 °C con 3 μ g de anticuerpo hasta el día siguiente. Los complejos anticuerpo-proteína-ADN se precipitaron incubando 30 μ L de proteína A/G conjugada a bolas magnéticas (equilibradas en tampón de ChIP) durante 2 h en rotación a 4 °C. Posteriormente, mediante el uso de una gradilla magnética se realizaron lavados sucesivos de los complejos con 500 μ L de tampón de lavado 1, tampón de lavado 2, tampón de lavado 2 y dos lavados con TE 1X. A continuación, los complejos se eluyeron con 50 μ L de tampón de elución y se incubaron 10 min a 65 °C, recuperando 40 μ L a los que se les añadieron otros 80 μ L de tampón de elución para incubar a 65 °C hasta el día siguiente. Al mismo tiempo se incubó 1/10 de la cromatina utilizada en la ChIP en un volumen final de 120 μ L de tampón de elución, que sería utilizado posteriormente como input. De este modo se separaron los complejos proteína-ADN, así como de las bolas magnéticas en el caso de la ChIP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Finalmente, al día siguiente se trataron input y ChIP con proteinasa K durante 1 h a 37 °C (para degradar las proteínas presentes) y se limpiaron usando el kit ChIP DNA Clean & Concentrator (Zymo Research), eluyendo en 25-60 µL.

Solución de fijación: Hepes 35 mM pH 8, NaCl 70 mM, EDTA 0,7 mM pH 8 y 11 % (v/v) formaldehído.

Tampón de lisis 1: Pipes 5 mM pH 8, KCl 85 mM, 0,5 % (v/v) NP-40 y Complete Protease Inhibitor Cocktail 1X (Roche).

Tampón de lisis 2: 1 % (m/v) SDS, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,1 y Complete Protease Inhibitor Cocktail 1X.

Tampón de ChIP: 0,01 % (m/v) SDS, 1,1 % (v/v) Tritón X-100, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM pH 8,1, NaCl 167 mM y Complete Protease Inhibitor Cocktail 1X.

Tampón de lavado 1: 0,1 % (m/v) SDS, 1 % (v/v) Tritón X-100, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,1 y NaCl 150 mM.

Tampón de lavado 2: 0,1 % (m/v) SDS, 1 % (v/v) Tritón X-100, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,1 y NaCl 500 mM.

Tampón de lavado 3: LiCl 0,25 M, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (m/v) deoxicolato de sodio, EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM pH 8,1.

TE 1X: Tris-HCl 10 mM pH 8,1 y EDTA 1 mM.

Tampón de elución: 1 % (m/v) SDS y TE 1X.

2.2.4. ChIP-Seq

Las muestras se enviaron a GENECORE (EMBL Genomics Core Facility) para su secuenciación en el sistema HiSeq 2000 (Illumina) con lecturas de single-end de 50 pares de bases. Los datos obtenidos se alinearon al genoma de ratón de referencia mm9 mediante el paquete Rsubread v.1.28.1 de Bioconductor. La llamada de los picos respecto a los inputs se realizó con MACS2 v.2.1.1, seleccionando aquellos con un $-\log(q\text{-valor})=15$ y $mfold=5$. La anotación de los picos se realizó mediante el paquete ChIPPeakAnno de Bioconductor.

2.3. Análisis de proteínas

2.3.1. Ensayo de doble híbrido en levaduras

Este ensayo se llevó a cabo con el kit DUALhybrid Kit (Dualsystems Biotech), provisto de plásmidos pLexA-N (cebo) y pGAD-HA (presa). El plásmido pLexA-N codificaba para un dominio de unión al ADN y para el aminoácido triptófano, mientras que el plásmido pGAD-HA codificaba para un dominio de transactivación y para el aminoácido leucina. Distintas combinaciones de plásmidos cebo y presa se co-transformaron en la estirpe NMY51, donde si ambas proteínas interactúan se reconstituye un factor de transcripción capaz de activar la transcripción de los genes *LacZ* e *HIS3* (codificante para el aminoácido histidina). Las levaduras co-transformadas se sembraron en placas con medio mínimo (SD-Leu-Trp) donde tras incubar a 30 °C se seleccionaron colonias para la realización de un ensayo β -galactosidasa. Cuando la señal obtenida en este ensayo fue demasiado débil para su evaluación se procedió a realizar diluciones seriadas de las levaduras transformadas (estando la dilución más concentrada a una D.O. igual a 4 a 600 nm) y se sembraron como gotas en medio mínimo y en medio selectivo (SD-His-Leu-Trp). Solo las levaduras transformadas con un plásmido cebo y un plásmido presa cuyos productos interactúan fueron capaces de crecer en el medio selectivo al activar la síntesis de la histidina.

2.3.2. Ensayo de la actividad β -galactosidasa

Se seleccionaron 4 colonias de cada transformación y se sembraron en placas con medio mínimo (SD-Leu-Trp) y se dejaron incubar durante 48 h a 30 °C. Posteriormente, para cada placa se prepararon 5 mL de una solución de agar 1 % (m/v) y 5 mL de una solución de fosfato potásico 1M pH 7 a la que se le añadieron 600 μ L de NN'-dimetilformamida y 100 μ L de SDS 10 % (m/v). Ambas soluciones se pusieron a 50 °C y se mezclaron, añadiendo 100 μ L de X-Gal 4 % (m/v) disuelto en NN'-dimetilformamida. Por último, se vertieron suavemente sobre las placas 10 mL de la mezcla obtenida, se dejaron solidificar y se incubaron a 30 °C en oscuridad. Para observar el resultado fue necesario esperar entre 30 min y 12 h, de manera que aquellas colonias co-transformadas con plásmidos cuyos productos interactúan se colorearon de azul al inducirse la expresión del gen *LacZ*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Solución de fosfato potásico 1M pH 7: 174,2 g/l de K₂HPO₄ y 136,1 g/l de KH₂PO₄.

2.3.4. Extracción de proteínas solubles

Los precipitados obtenidos tras recoger las células en PBS 1X y centrifugar 5 min a 200 g se resuspendieron en tampón no desnaturizante para extraer las proteínas solubles. Posteriormente se centrifugaron 5 min a 16000 g y la concentración de proteínas del sobrenadante se cuantificó mediante el método Bradford (Bradford, 1976). Para esta cuantificación se utilizó el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) y una recta de calibrado de cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

Tampón no desnaturizante: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% (v/v) Tritón X-100, EDTA 1 mM y Complete Protease Inhibitor Cocktail 1X.

2.3.5. Extracción de proteínas unidas a la cromatina

Para la extracción de proteínas fuertemente unidas a la cromatina se utilizó la enzima bit-nucleasa (Biotool.com) que fragmenta el ADN dejando libres las proteínas asociadas. Las células (recogidas en PBS 1X y centrifugadas 5 min a 200 g) se resuspendieron en tampón bit-nucleasa, se les añadió un 1% (v/v) de la enzima y se incubaron 1 h a 37 °C. Posteriormente se centrifugaron 5 min a 16000 g y el sobrenadante obtenido se cuantificó mediante el método Bradford.

Tampón Bit-nucleasa: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% (v/v) Tritón X-100, MgCl₂ 2 mM y Complete Protease Inhibitor Cocktail-EDTA free 1X (Roche).

2.3.6. Extracción fraccional de proteínas

Para la obtención de extractos fraccionados de proteínas se utilizó una adaptación del protocolo descrito en Wysocka et al., 2001. Las células (recogidas en PBS 1X y centrifugadas 5 min a 200 g) se resuspendieron en tampón A y se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación en N₂ líquido. Tras centrifugar 5 min a 1300 g, se guardó el sobrenadante (S1) y se resuspendió el precipitado en tampón B dejándolo 30 min en hielo. Se centrifugó 5 min a 1700 g, se guardó el sobrenadante (S2) y el

precipitado se resuspendió en tampón RIPA y se sometió a varios ciclos de agitación en vórtex y hervido a 95 °C. Tras centrifugar 1 min al máximo se guardó el sobrenadante como la fracción cromatínica. Los sobrenadantes S1 y S2 se unieron para formar la fracción soluble. Las concentraciones de proteína de cada fracción se midieron por el método Bradford.

Tampón A: Hepes 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM y Complete Protease Inhibitor Cocktail 1X.

Tampón B: EDTA 3 mM, EGTA 0,2 mM, DTT 1 mM y Complete Protease Inhibitor Cocktail 1X.

Tampón RIPA: Tris-HCl 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 1 % (v/v) Tritón X-100, EDTA 1 mM, 0,1 % (m/v) SDS, 1 % (m/v) deoxicolato de sodio y Complete Protease Inhibitor Cocktail 1X.

2.3.7. Inmunoprecipitación de proteínas

Se incubó 1 mg de extracto proteico con 3 µg de anticuerpo en un volumen de al menos 500 µL de tampón (el usado para la extracción de proteínas) y se dejó rotando a 4 °C hasta el día siguiente. Un 10 % del extracto se reservó como input. Los complejos anticuerpo-proteína se precipitaron incubando 30 µL de proteína A/G conjugada a bolas magnéticas (equilibradas en el tampón de extracción) durante 2 h a 4 °C. Posteriormente, mediante el uso de la gradilla magnética se lavaron los complejos con 500 µL de tampón y se eluyeron en 20 µL de Laemmli 2X e incubando 10 min a 95 °C. Las proteínas inmunoprecipitadas y los inputs se migraron en un gel SDS-poliacrilamida y se analizaron por western-blot.

Tampón Laemmli 4X: Tris-HCl 125 mM pH 6,8, 4% (m/v) SDS, 20 % (v/v) glicerol, 10 % (v/v) β-mercaptoetanol y 0,15 % (m/v) azul de bromofenol.

2.3.8. Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida

La separación de proteínas por peso molecular se realizó mediante el método de electroforesis en geles discontinuos de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970). Se utilizó el sistema vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), donde se acoplaron geles constituidos por un gel concentrador en la parte superior y un gel separador en la parte

MATERIALES Y MÉTODOS

inferior. El porcentaje de acrilamida del gel separador varió del 7 % (v/v) al 15 % (v/v) según el peso molecular de las proteínas de interés. Las muestras se prepararon en tampón Laemmli 1X y se hirvieron 3 min a 95 °C antes de cargarlas en el gel y migrarlas a 200V durante 45-60 min. Junto a las proteínas se migró el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

Gel concentrador: Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, 4 % (v/v) acrilamida (acrilamida y bis-acrilamida 29:1) 0,1 % (m/v) SDS, 0,1 % (m/v) amonio persulfato (APS) y 0,05 % (v/v) TEMED.

Gel separador: Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, 7-15 % (v/v) acrilamida (acrilamida y bis-acrilamida 29:1), 0,1 % (m/v) SDS, 0,1 % (m/v) APS y 0,05 % (v/v) TEMED.

Tampón Laemmli 4X: Tris-HCl 125 mM pH 6,8, 4% (m/v) SDS, 20 % (v/v) glicerol, 10 % (v/v) β-mercaptoetanol y 0,15 % (m/v) azul de bromofenol.

Tampón de migración: Tris 25 mM, glicina 192 mM y 0,1 % (m/v) SDS.

2.3.9. Western-blot

Los geles SDS-poliacrilamida se transfirieron a membranas de PVDF Amersham Hybond P 0,2 μm (GE Healthcare) mediante transferencia húmeda o semiseca. La transferencia húmeda se realizó para proteínas mayores de 100 kDa en el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) a 20 V durante 16 h. Para proteínas de menos de 100 kDa se realizó una transferencia semiseca de 30 min a 25 V usando el Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Tras la transferencia las membranas se incubaron en una solución de bloqueo durante 1 h en agitación y posteriormente se incubaron a 4 °C hasta el día siguiente con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo (diluciones según recomendaciones del fabricante). Las membranas se lavaron tres veces en agitación con solución de lavado (10 min por lavado) antes de incubarlo durante 1 h en agitación con los anticuerpos secundarios (conjugados a HRP) diluidos 1:10000 en solución de lavado. Las membranas se volvieron a lavar tres veces (5 min por lavado) antes de revelar mediante quimioluminiscencia usando el kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). La detección y cuantificación de la señal luminiscente se llevó a cabo en el sistema ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Tampón de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0,1 % (m/v) SDS y 20 % (v/v) metanol.

Solución de bloqueo: 5 % leche (m/v) en solución de lavado.

Solución de lavado: PBS 1X con 0,1 % (v/v) Tween-20.

2.3.10. Inmunofluorescencia de células para Pax6

Las células, sembradas en placas de 12 pocillos cubiertas con lamelas de vidrio esterilizadas, se fijaron en PBS con PFA 4 % (m/v) durante 10 min. Tras tres lavados con PBS se colocaron las lamelas en una cámara húmeda, de manera que se cubriese su superficie con solo 100 μ L. A continuación, las células se trataron durante 10 min con una solución de permeabilización, se realizó un lavado y se trataron con solución de bloqueo durante 30 min. El anticuerpo primario anti-Pax6 (diluido 1:50 en solución de bloqueo) se incubó durante 1 h, y tras cuatro lavados se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón-Cy3 (diluido 1:400 en solución de lavado) durante 30 min. Tras cuatro nuevos lavados se incubaron las células con una solución de DAPI 0,1 μ g/ μ L en solución de lavado durante 10 min. Tras un lavado con agua Milli-Q se montaron las lamelas en cubreobjetos con ayuda del medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories) y se sellaron con laca de uñas. La adquisición de las imágenes se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia DM6000 (Leica-Microsystems).

Solución de permeabilización: PBS 1X con 0,5 % (v/v) Tritón X-100.

Solución de lavado: PBS 1X con 0,1 % (v/v) Tritón X-100.

Solución de bloqueo: PBS 1X con 0,5 % (v/v) Tritón X-100 y 10 % (v/v) suero de burro.

2.4. Análisis de la apoptosis

Las células (recogidas en PBS 1X y centrifugadas 5 min a 200 g), se fijaron gota a gota con etanol 70 ° y se incubaron a 4 °C durante 30 min. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X centrifugando 5 min a 1000g y se resuspendieron en 500 μ L de solución de tinción. A continuación, se incubaron en oscuridad y a 37 °C durante 30 min y se añadió 1 mL de PBS 1X antes del análisis por citometría. El análisis de la apoptosis se llevó a cabo mediante la medición de la población celular en subG1 en un citómetro BD FACSCalibur (BD Biosciences) con el programa CellQuest Pro (BD Biosciences).

MATERIALES Y MÉTODOS

Solución de tinción: PBS 1X con 200 µg/mL de RNAsa A y 10 µg/mL de yoduro de propidio.

2.5. Análisis estadístico y bioinformático

El tratamiento de los datos se realizó con el programa Microsoft Excel, mientras que el análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Prism 5.0a. En los gráficos se representó el valor de la media \pm el valor de la desviación estándar, proviniendo la media de tres réplicas experimentales.

El análisis de la significancia entre las diferencias se realizó mediante el test t de student con un intervalo de confianza del 95 %. La significancia entre muestras se indicó de la siguiente manera: * p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001. La significancia de los solapamientos en los diagramas de Venn se analizó mediante test hipergeométrico realizado en R.

Como herramientas bioinformáticas se utilizaron:

- Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) para el diseño de los oligonucleótidos usados en PCR convencional y PCR cuantitativa.
- Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) para la creación de diagramas de Venn.
- DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) para el análisis de ontología de genes (GO).
- Bioconductor (www.bioconductor.org) para los diversos análisis de los datos obtenidos en técnicas de secuenciación masiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen BL & Taatjes DJ (2015) The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 155-166.
- Andrieu GP & Denis GV (2018) BET Proteins Exhibit Transcriptional and Functional Opposition in the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Mol Cancer Res* 16: 580-586.
- Ansari M, Poke G, Ferry Q, Williamson K, Aldridge R, Meynert AM, Bengani H, Chan CY, Kayserili H, Avci S *et al.* (2014) Genetic heterogeneity in Cornelia de Lange syndrome (CdLS) and CdLS-like phenotypes with observed and predicted levels of mosaicism. *J Med Genet* 51: 659-568.
- Avagliano L, Grazioli P, Mariani M, Bulfamante GP, Selicorni A & Massa V (2017) Integrating molecular and structural findings: Wnt as a possible actor in shaping cognitive impairment in Cornelia de Lange syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 12: 174.
- Azad GK, Swagatika S, Kumawat M, Kumawat R & Tomar RS (2018) Modifying Chromatin by Histone Tail Clipping. *J Mol Biol* 430: 3051-3067.
- Bagley JA, Yan Z, Zhang W, Wildonger J, Jan LY & Jan YN (2014) Double-bromo and extraterminal (BET) domain proteins regulate dendrite morphology and mechanosensory function. *Genes Dev* 28: 1940-1956.
- Bisgrove DA, Mahmoudi T, Henklein P & Verdin E (2007) Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13690-13695.
- Boyle MI, Jespersgaard C, Brøndum-Nielsen K, Bisgaard AM & Tümer Z (2015) Cornelia de Lange syndrome. *Clin Genet* 88: 1-12.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brown S, Teo A, Pauklin S, Hannan N, Cho CH, Lim B, Vardy L, Dunn NR, Trotter M, Pedersen R *et al.* (2011) Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem Cells* 29: 1176-1185.
- Cai J, Chen J, Liu Y, Miura T, Luo Y, Loring JF, Freed WJ, Rao MS & Zeng X (2006) Assessing self-renewal and differentiation in human embryonic stem lines. *Stem Cells* 24: 516-530.
- Chia NY, Chan YS, Feng B, Lu X, Orlov YL, Moreau D, Kumar P, Yang L, Jiang J, Lau MS *et al.* (2010) A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature* 468: 316-320.

BIBLIOGRAFÍA

- Choi CW, Chung YJ, Slape C & Aplan PD (2008) Impaired differentiation and apoptosis of hematopoietic precursors in a mouse model of myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 93: 1394-1397.
- Castronovo P, Gervasini C, Cereda A, Masciadri M, Milani D, Russo S, Selicorni A & Larizza L (2009) Premature chromatid separation is not a useful diagnostic marker for Cornelia de Lange syndrome. *Chromosome Res* 17: 763-771.
- Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH & Young RA (2008) Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 22: 746-755.
- Crowley T, Brunori M, Rhee K, Wang X & Wolgemuth DJ (2004) Change in nuclear-cytoplasmic localization of a double-bromodomain protein during proliferation and differentiation of mouse spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res Dev Brain Res* 149: 93-101.
- Dawson MA, Prinjha RK, Dittmann A, Giotopoulos G, Bantscheff M, Chan WI, Robson SC, Chung CW, Hopf C, Savitski MM *et al.* (2011) Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature* 478: 529-533.
- Deardorff MA, Noon SE & Krantz ID (1993-2018) Cornelia de Lange Syndrome. Academic Press: Cambridge, MA, USA. ISBN 9780080450469.
- De Koning L, Corpet A, Haber JE & Almouzni G (2007) Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol* 14: 997-1007.
- Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastiris E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J *et al.* (2011) BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146: 904-917.
- Devaiah BN, Lewis BA, Cherman N, Hewitt MC, Albrecht BK, Robey PG, Ozato K, Sims RJ 3rd & Singer DS (2012) BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 6927-6932.
- Devaiah BN, Case-Borden C, Gegonne A, Hsu CH, Chen Q, Meerzaman D, Dey A, Ozato K & Singer DS (2016) BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. *Nat Struct Mol Biol* 23: 540-548.
- Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T, Ozato K (2003) The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8758-8763.

- Dey A, Nishiyama A, Karpova T, McNally J & Ozato K (2009) Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol Biol Cell* 20: 4899-4909.
- Dibenedetto AJ, Guinto JB, Ebert TD, Bee KJ, Schmidt MM & Jackman TR (2008) Zebrafish brd2a and brd2b are paralogous members of the bromodomain-ET (BET) family of transcriptional coregulators that show structural and expression divergence. *BMC Dev Biol* 8: 39.
- Di Micco R, Fontanals-Cirera B, Low V, Ntziachristos P, Yuen SK, Lovell CD, Dolgalev I, Yonekubo Y, Zhang G, Rusinova E *et al.* (2014) Control of embryonic stem cell identity by BRD4-dependent transcriptional elongation of super-enhancer-associated pluripotency genes. *Cell Rep* 9: 1-14.
- Dorsett D (2009) Cohesin, gene expression and development: lessons from *Drosophila*. *Chromosome Res* 17: 185-200.
- Fernandez-Alonso R, Davidson L, Hukelmann J, Zengerle M, Prescott AR, Lamond A, Ciulli A, Sapkota GP & Findlay GM (2017) Brd4-Brd2 isoform switching coordinates pluripotent exit and Smad2-dependent lineage specification. *EMBO Rep* 18: 1108-1122.
- Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I *et al.* (2010) Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468: 1067-1073.
- Florence B & Faller DV (2001) You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* 6: D1008-18.
- French CA, Ramirez CL, Kolmakova J, Hickman TT, Cameron MJ, Thyne ME, Kutok JL, Toretsky JA, Tadavarthy AK, Kees UR *et al.* (2008) BRD-NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells. *Oncogene* 27: 2237-2242.
- Fuda NJ, Ardehali MB & Lis JT (2009) Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* 461: 186-192.
- Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T & Peterlin BM (2004) Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* 24: 787-795.
- Gamsjaeger R, Webb SR, Lamonica JM, Billin A, Blobel GA & Mackay JP (2011) Structural basis and specificity of acetylated transcription factor GATA1 recognition by BET family bromodomain protein Brd3. *Mol Cell Biol* 31: 2632-2640.

BIBLIOGRAFÍA

- García-Gutiérrez P, Mundi M & García-Domínguez M (2012) Association of bromodomain BET proteins with chromatin requires dimerization through the conserved motif B. *J Cell Sci* 125: 3671-3680.
- García-Gutiérrez P, Juárez-Vicente F, Wolgemuth DJ & García-Domínguez M (2014) Pleiotrophin antagonizes Brd2 during neuronal differentiation. *J Cell Sci* 127: 2554-2564.
- Gardini A, Baillat D, Cesaroni M, Hu D, Marinis JM, Wagner EJ, Lazar MA, Shilatifard A & Shiekhattar R (2014) Integrator regulates transcriptional initiation and pause release following activation. *Mol Cell* 56: 128-139.
- Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Hery P, Jounier S, Depaux A, Vitte AL *et al.* (2012) Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 31: 3809-3820.
- Greenwald RJ, Tumang JR, Sinha A, Currier N, Cardiff RD, Rothstein TL, Faller DV & Denis GV (2004) E mu-BRD2 transgenic mice develop B-cell lymphoma and leukemia. *Blood* 103: 1475-1484.
- Gursoy-Yuzugullu O, Carman C & Price BD (2017) Spatially restricted loading of BRD2 at DNA double-strand breaks protects H4 acetylation domains and promotes DNA repair. *Sci Rep* 7: 12921.
- Gyuris A, Donovan DJ, Seymour KA, Lovasco LA, Smilowitz NR, Halperin AL, Klysik JE & Freiman RN (2009) The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1789: 413-421.
- Harbour JW & Dean DC (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14: 2393-2409.
- Horne GA, Stewart HJ, Dickson J, Knapp S, Ramsahoye B & Chevassut T (2015) Nanog requires BRD4 to maintain murine embryonic stem cell pluripotency and is suppressed by bromodomain inhibitor JQ1 together with Lefty1. *Stem Cells Dev* 24: 879-891.
- Houzelstein D, Bullock SL, Lynch DE, Grigorieva EF, Wilson VA & Beddington RS (2002) Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Mol Cell Biol* 22: 3794-3802.
- Hsu SC, Blobel GA (2017) The Role of Bromodomain and Extraterminal Motif (BET) Proteins in Chromatin Structure. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio* 82: 37-46.
- Hsu SC, Gilgenast TG, Bartman CR, Edwards CR, Stonestrom AJ, Huang P, Emerson DJ, Evans P, Werner MT, Keller CA *et al.* (2017) The BET Protein BRD2 Cooperates with CTCF to Enforce Transcriptional and Architectural Boundaries. *Mol Cell* 66: 102-116.

- Huang B, Yang XD, Zhou MM, Ozato K & Chen LF (2009) Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA. *Mol Cell Biol* 29: 1375-1387.
- Izumi K, Nakato R, Zhang Z, Edmondson AC, Noon S, Dulik MC, Rajagopalan R, Venditti CP, Gripp K, Samanich J *et al.* (2015) Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin. *Nat Genet* 47: 338-344.
- Jang MK, Mochizuki K, Zhou M, Jeong HS, Brady JN & Ozato K (2005) The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 19: 523-534.
- Ju J, Wang Y, Liu R, Zhang Y, Xu Z, Wang Y, Wu Y, Liu M, Cerruti L, Zou F *et al.* (2014) Human fetal globin gene expression is regulated by LYAR. *Nucleic Acid Res* 42: 9740-9752.
- Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, Ebmeier CC, Goossens J, Rahl PB, Levine SS *et al.* (2010) Mediator and Cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467: 430-435.
- Kanno T, Kanno Y, Siegel RM, Jang MK, Lenardo MJ, Ozato K (2004) Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol Cell* 13: 33-43.
- Kanno T, Kanno Y, LeRoy G, Campos E, Sun HW, Brooks SR, Vahedi G, Heightman TD, Garcia BA, Reinberg D *et al.* (2014) BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones. *Nat Struct Mol Biol* 21: 1047-1057.
- Kawauchi S, Calof AL, Santos R, Lopez-Burks ME, Young CM, Hoang MP, Chua A, Lao T, Lechner MS, Daniel JA *et al.* (2009) Multiple organ system defects and transcriptional dysregulation in the Nipbl(+/-) mouse, a model of Cornelia de Lange Syndrome. *PLoS Genet* 5: e1000650.
- Kellner WA, Van Bortle K, Li L, Ramos E, Takenaka N, Corces VG (2013) Distinct isoforms of the Drosophila Brd4 homologue are present at enhancers, promoters and insulator sites. *Nucleic Acids Res* 41: 9274-9283.
- Korb E, Herre M, Zucker-Scharff I, Darnell RB & Allis CD (2015) BET protein Brd4 activates transcription in neurons and BET inhibitor Jq1 blocks memory in mice. *Nat Neurosci* 18: 1464-1473.
- Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868-871.

BIBLIOGRAFÍA

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee B, Jin S, Choi H, Kwon JT, Kim J, Jeong J, Kwon YI & Cho C (2013) Expression and function of the testis-predominant protein LYAR in mice. *Mol Cells* 35: 54-60.
- LeRoy G, Rickards B & Flint SJ (2008) The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol Cell* 30: 51-60.
- Li H, Wang B, Yang A, Lu R, Wang W, Zhou Y, Shi G, Kwon SW, Zhao Y & Jin Y (2009) Ly-1 antibody reactive clone is an important nucleolar protein for control of self-renewal and differentiation in embryonic stem cells. *Stem Cells* 27: 1244-1254.
- Li J, Ma J, Meng G, Lin H, Wu S, Wang J, Luo J, Xu X, Tough D, Lindon M *et al.* (2016) BET bromodomain inhibition promotes neurogenesis while inhibiting gliogenesis in neural progenitor cells. *Stem Cell Res* 17: 212-221.
- Li X, Baek G, Ramanand SG, Sharp A, Gao Y, Yuan W, Welti J, Rodrigues DN, Dolling D, Figueiredo I *et al.* (2018) BRD4 Promotes DNA Repair and Mediates the Formation of TMPRSS2-ERG Gene Rearrangements in Prostate Cancer. *Cell Rep* 22: 796-808.
- Lim S & Kaldis P (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140: 3079-3093.
- Liu W, Stein P, Cheng X, Yang W, Shao NY, Morrissey EE, Schultz RM & You J (2014) BRD4 regulates Nanog expression in mouse embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Cell Death Differ* 21: 1950-1960.
- Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI & Young RA (2013) Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 153: 320-334.
- Luna-Peláez N & García-Domínguez M (2018) Lyar-mediated recruitment of Brd2 to the chromatin attenuates Nanog downregulation following induction of differentiation. *J Mol Biol* 430: 1084-1097.
- Manterola M, Brown TM, Oh MY, Garyn C, Gonzalez BJ & Wolgemuth DJ (2018) BRDT is an essential epigenetic regulator for proper chromatin organization, silencing of sex chromosomes and crossover formation in male meiosis. *PLoS Genet* 14: e1007209.
- McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK & Anderson PJ (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* 299: 165-167.

- Mills JA, Herrera PS, Kaur M, Leo L, McEldrew D, Tintos-Hernandez JA, Rajagopalan R, Gagne A, Zhang Z, Ortiz-Gonzalez XR & Krantz ID (2018) NIPBL+/- haploinsufficiency reveals a constellation of transcriptome disruptions in the pluripotent and cardiac states. *Sci Rep* 8: 1056.
- Miyazawa N, Yoshikawa H, Magae S, Ishikawa H, Izumikawa K, Terukina G, Suzuki A, Nakamura-Fujiyama S, Miura Y, Hayano T *et al.* (2014) Human cell growth regulator Ly-1 antibody reactive homologue accelerates processing of preribosomal RNA. *Genes Cells* 19: 273-286.
- Mochizuki K, Nishiyama A, Jang MK, Dey A, Ghosh A, Tamura T, Natsume H, Yao H & Ozato K (2008) The bromodomain protein Brd4 stimulates G1 gene transcription and promotes progression to S phase. *J Biol Chem* 283: 9040-9048.
- Montagnani S, Rueger MA, Hosoda T, Nurzynska D (2016) Adult Stem Cells in Tissue Maintenance and Regeneration. *Stem Cells Int* doi: 10.1155/2016/7362879.
- Murphy T, Melville H, Fradkin E, Bistany G, Branigan G, Olsen K, Comstock CR, Hanby H, Garbade E & DiBenedetto AJ (2017) Knockdown of epigenetic transcriptional co-regulator Brd2a disrupts apoptosis and proper formation of hindbrain and midbrain-hindbrain boundary (MHB) region in zebrafish. *Mech Dev* 146:10-30.
- Muto A, Calof AL, Lander AD & Schilling TF (2011) Multifactorial origins of heart and gut defects in nipbl-deficient zebrafish, a model of Cornelia de Lange Syndrome. *PLoS Biol* 9: e1001181.
- Muto A, Ikeda S, Lopez-Burks ME, Kikuchi Y, Calof AL, Lander AD & Schilling TF (2014) Nipbl and mediator cooperatively regulate gene expression to control limb development. *PLoS Genet* 10: e1004671.
- Newkirk DA, Chen YY, Chien R, Zeng W, Biesinger J, Flowers E, Kawauchi S, Santos R, Calof AL, Lander AD *et al.* (2017) The effect of Nipped-B-like (Nipbl) haploinsufficiency on genome-wide cohesin binding and target gene expression: modeling Cornelia de Lange syndrome. *Clin Epigenetics* 9: 89.
- Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U, Beinke S, Dewell S, Chung CW, Chandwani R, Marazzi I, Wilson P, Coste H *et al.* (2010) Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468: 1119-1123.
- Niu N, Shao R, Yan G & Zou W (2016) Bromodomain and Extra-terminal (BET) Protein Inhibitors Suppress Chondrocyte Differentiation and Restrain Bone Growth. *J Biol Chem* 291: 26647-26657.
- Niwa H, Miyazaki J & Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372-376.

BIBLIOGRAFÍA

- Olley G, Ansari M, Bengani H, Grimes GR, Rhodes J, von Kriegsheim A, Blatnik A, Stewart FJ, Wakeling E, Carroll N *et al.* (2018) BRD4 interacts with NIPBL and BRD4 is mutated in a Cornelia de Lange-like syndrome. *Nat Genet* 50: 329-332.
- Paillisson A, Levasseur A, Gouret P, Callebaut I, Bontoux M, Pontarotti P & Monget P (2007) Bromodomain testis-specific protein is expressed in mouse oocyte and evolves faster than its ubiquitously expressed paralogs BRD2, -3, and -4. *Genomics* 89: 215-223.
- Palangat M, Renner DB, Price DH & Landick R (2005) A negative elongation factor for human RNA polymerase II inhibits the anti-arrest transcript-cleavage factor TFIIS. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15036-15041.
- Parenti I, Teresa-Rodrigo ME, Pozojevic J, Ruiz Gil S, Bader I, Braunholz D, Bramswig NC, Gervasini C, Larizza L, Pfeiffer L *et al.* (2017) Mutations in chromatin regulators functionally link Cornelia de Lange syndrome and clinically overlapping phenotypes. *Hum Genet* 136: 307-320.
- Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk2, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287: 821-828.
- Péguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D & Portoukalian J (2003) Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 170: 3488-3494.
- Peng J, Zhu Y, Milton JT & Price DH (1998) Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* 12: 755-762.
- Peng J, Dong W, Chen L, Zou T, Qi Y & Liu Y (2007) Brd2 is a TBP-associated protein and recruits TBP into E2F-1 transcriptional complex in response to serum stimulation. *Mol Cell Biochem* 294: 45-54.
- Peterlin BM & Price DH (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* 23: 297-305.
- Pherson M, Misulovin Z, Gause M & Dorsett D (2019) Cohesin occupancy and composition at enhancers and promoters are linked to DNA replication origin proximity in *Drosophila*. *Genome Res* doi: 10.1101/gr.243832.118.
- Phillips JE & Corces VG (2009) CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137: 1194-1211.
- Pistocchi A, Fazio G, Cereda A, Ferrari L, Bettini LR, Messina G, Cotelli F, Biondi A, Selicorni A & Massa V (2013) Cornelia de Lange Syndrome: NIPBL haploinsufficiency downregulates canonical Wnt pathway in zebrafish embryos and patients fibroblasts. *Cell Death Dis* 4: e866.

- Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, Sharp PA & Young RA (2010) c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* 141: 432-445.
- Rahman S, Sowa ME, Ottinger M, Smith JA, Shi Y, Harper JW, Howley PM (2011) The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Mol Cell Biol* 31: 2641-2652.
- Reiter F, Wienerroither S & Stark A (2017) Combinatorial function of transcription factors and cofactors. *Curr Opin Genet Dev* 43: 73-81.
- Remeseiro S, Cuadrado A, Kawauchi S, Calof AL, Lander AD & Losada A (2013) Reduction of Nipbl impairs cohesin loading locally and affects transcription but not cohesion-dependent functions in a mouse model of Cornelia de Lange Syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1832: 2097-2102.
- Roberts TC, Etxaniz U, Dall'Agnesse A, Wu SY, Chiang CM, Brennan PE, Wood MJA & Puri PL (2017) BRD3 and BRD4 BET Bromodomain Proteins Differentially Regulate Skeletal Myogenesis. *Sci Rep* 7: 6153.
- Rollins RA, Morcillo P, Dorsett D (1999) Nipped-B, a Drosophila homologue of chromosomal adherins, participates in activation by remote enhancers in the cut and Ultrabithorax genes. *Genetics* 152: 577-593.
- Seoane J, Le HV & Massagué J (2002) Myc suppression of the p21 (Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419: 729-734.
- Shaaf CA, Misulovin Z, Gause M, Koenig A, Gohara DW, Watson A & Dorsett D (2013) Cohesin and Polycomb Proteins Functionally Interact to Control Transcription at Silenced and Active Genes. *PLoS Genet* 9: e1003560.
- Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wang X, Wolgemuth DJ (2004) Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes *Brd2*, *Brd3*, *Brd4*, and *Brdt* in the mouse testis. *Gene Expr Patterns*, 4: 513-519.
- Shang E, Wang X, Wen D, Greenberg DA & Wolgemuth DJ (2009) Double bromodomain-containing gene *Brd2* is essential for embryonic development in mouse. *Dev Dyn* 238: 908-917.
- Sherr CJ & Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512.
- Stanlie A, Yousif AS, Akiyama H, Honjo T & Begum NA (2014) Chromatin reader Brd4 functions in Ig class switching as a repair complex adaptor of nonhomologous end-joining. *Mol Cell* 55: 97-110.

BIBLIOGRAFÍA

- Stathis A & Bertoni F (2018) BET Proteins as Targets for Anticancer Treatment. *Cancer Discov* 8: 24-36.
- Stonestrom AJ, Hsu SC, Jahn KS, Huang P, Keller CA, Giardine BM, Kadauke S, Campbell AE, Evans P, Hardison RC *et al.* (2015) Functions of BET proteins in erythroid gene expression. *Blood* 125: 2825-2834.
- Ström L, Lindroos HB, Shirahige K & Sjögren C (2004) Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol Cell* 16: 1003-1015.
- Su L, Hershberger RJ & Weissman IL (1993) LYAR, a novel nucleolar protein with zinc finger DNA-binding motifs, is involved in cell growth regulation. *Genes Dev* 7: 735-748.
- Sun Y, Atmadibrata B, Yu D, Wong M, Liu B, Ho N, Ling D, Tee AE, Wang J, Mungrue IN *et al.* (2017) Upregulation of LYAR induces neuroblastoma cell proliferation and survival. *Cell Death Differ* 24: 1645-1654.
- Surface LE, Fields PA, Subramanian V, Behmer R, Udeshi N, Peach SE, Carr SA, Jaffe JD & Boyer LA (2016) H2A.Z.1 Monoubiquitylation Antagonizes BRD2 to Maintain Poised Chromatin in ESCs. *Cell Rep* 14: 1142-1155.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS & Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1545-1547.
- Tsume M, Kimura-Yoshida C, Mochida K, Shibukawa Y, Amazaki S, Wada Y, Hiramatsu R, Shimokawa K & Matsuo I (2012) Brd2 is required for cell cycle exit and neuronal differentiation through the E2F1 pathway in mouse neuroepithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 762-768.
- Tyagi M, Imam N, Verma K & Patel AK (2016) Chromatin remodelers: We are the drivers!! *Nucleus* 7: 388-404.
- van den Berg DLC, Azzarelli R, Oishi K, Martynoga B, Urbán N, Dekkers DHW, Demmers JA & Guillemot F (2017) Nipbl Interacts with Zfp609 and the Integrator Complex to Regulate Cortical Neuron Migration. *Neuron* 93: 1-14.
- Velíšek L, Shang E, Velíšková J, Chachua T, Macchiarulo S, Maglakelidze G, Wolgemuth DJ & Greenberg DA (2011) GABAergic neuron deficit as an idiopathic generalized epilepsy mechanism: the role of BRD2 haploinsufficiency in juvenile myoclonic epilepsy. *PLoS One* 6: e23656.
- Venkatesh S & Workman JL (2015) Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 178-189.

- Weber CM & Henikoff S (2014) Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes Dev* 28: 672-682.
- Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T *et al.* (2008) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* 451: 796-801.
- Wysocka J, Reilly PT & Herr W (2001) Loss of HCF-1-chromatin association precedes temperature-induced growth arrest of tsBN67 cells. *Mol Cell Biol* 21: 3820-3829.
- Wu T, Pinto HB, Kamikawa YF & Donohoe ME (2015a) The BET family member BRD4 interacts with OCT4 and regulates pluripotency gene expression. *Stem Cell Reports* 4: 390-403.
- Wu Y, Gause M, Xu D, Misulovin Z, Schaaf CA, Mosarila RC, Mannino E, Shannon M, Jones E, Shi M *et al.* (2015c) Drosophila Nipped-B Mutants Model Cornelia de Lange Syndrome in Growth and Behavior. *PLoS Genet* 11: e1005655.
- Wu Y, Liu M, Li Z, Wu XB, Wang Y, Wang Y, Nie M, Huang F, Ju J, Ma C *et al.* (2015c) LYAR promotes colorectal cancer cell mobility by activating galectin-1 expression. *Oncotarget* 6: 32890-32901.
- Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T & Handa H (2006) P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol Cell* 21: 227-237.
- Yeo JC & Ng HH (2013) The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res* 23: 20-32.
- Ying QL, Nichols J, Chambers I & Smith A (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115: 281-292.
- Yonezawa K, Sugihara Y, Oshima K, Matsuda T & Nadano D (2014) Lyar, a cell growth-regulating zinc finger protein, was identified to be associated with cytoplasmic ribosomes in male germ and cancer cells. *Mol Cell Biochem* 395: 221-229.
- Young RA (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144: 227-235.
- Zuin J, Franke V, van IJcken WFJ, van der Sloot A, Krantz ID, van der Reijden MIJA, Nakato R, Lenhanrd B & Wendt KS (2014) A Cohesin-independent role for Nipbl at promoters provides insights in CdLS. *PLoS Genet* 10: e1004153.

ANEXOS

Los siguientes documentos son tablas de Excel que se pueden consultar en los archivos adjuntos:

Anexo 1. Tabla con todos los genes desregulados en las condiciones *siNipbl*, *esiBrd2* y *esiBrd4*.

Anexo 2. Tabla con todos los picos de Nipbl obtenidos por ChIP-Seq.

Anexo 3. Tablas con todos los genes desregulados en las condiciones *siNipbl*, *esiBrd2* y *esiBrd4*.