



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Exploración del proteoma en el síndrome de Cornelia de
Lange: Impacto de la disrupción de NIPBL/Scc2 en la
expresión génica.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Fontanet Martinez, Pablo

Tutor/a: Andrés Colás, Nuria

Cotutor/a externo: Queralt Badia, Ethelvina

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Abstract

Cornelia de Lange syndrome (CdLS) is a rare genetic disease characterized by developmental delay, physical abnormalities and growth problems. Most cases are associated with mutations in genes encoding components of the cohesin complex, with NIPBL being the most commonly affected. NIPBL/Scs2 plays a crucial role in loading the cohesin complex into DNA, which is essential for sister chromatid cohesion and regulation of chromatin structure and gene expression.

This study performs a comparative analysis of the proteomic profile of patients with CdLS versus healthy controls, with the aim of identifying differences in the expression of certain genes and proteins that occur in patients. Using advanced techniques such as ChIP-seq and RNA-seq, it has been shown that disruption of NIPBL/Scs2 causes a global redistribution of the cohesin complex throughout the genome, altering its organization and resulting in significant changes in the expression of genes involved in critical biological processes, including embryonic development and cell signaling.

The findings of this study highlight the importance of NIPBL/Scs2 in genomic regulation and gene expression, providing a deeper understanding of the molecular mechanisms underlying CdLS. The identification of differences in proteomic profiling between patients and controls not only improves our understanding of the pathogenesis of the syndrome, but also reveals potential targets for therapeutic interventions to improve the clinical management of affected patients.

Keywords SCdL; cohesins; cohesinopathies; NIPBL; proteome; HOX; differential expression; Western-Blot;

Resumen

El síndrome de Cornelia de Lange (CdLS) es una enfermedad genética rara caracterizada por retraso en el desarrollo, anomalías físicas y problemas de crecimiento. La mayoría de los casos están asociados con mutaciones en genes que codifican componentes del complejo de cohesina, siendo NIPBL el más comúnmente afectado. NIPBL/Scs2 juega un papel crucial en el reclutamiento del complejo de cohesina al ADN, lo cual es esencial para la cohesión de las cromátidas hermanas y la regulación de la estructura de la cromatina y la expresión génica.

Este estudio realiza un análisis comparativo del perfil proteómico de pacientes con CdLS frente a controles sanos, con el objetivo de identificar las diferencias en la expresión de ciertos genes y proteínas que ocurren en los pacientes. Mediante técnicas avanzadas como ChIP-seq y RNA-seq, se ha demostrado que la disrupción de NIPBL/Scs2 provoca una redistribución global del complejo de cohesina a lo largo del genoma, alterando su organización y dando como resultado cambios significativos en la expresión de genes involucrados en procesos biológicos críticos, incluyendo el desarrollo embrionario y la señalización celular.

Los hallazgos de este estudio destacan la importancia de NIPBL/Scs2 en la regulación genómica y la expresión génica, proporcionando una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares subyacentes al CdLS. La identificación de diferencias en el perfil proteómico entre pacientes y controles no solo mejora nuestro entendimiento de la patogénesis del síndrome,

sino que también revela potenciales objetivos para intervenciones terapéuticas, con el fin de mejorar el manejo clínico de los pacientes afectados.

Palabras clave SCdL; cohesinas; cohesinopatías; NIPBL; proteoma; HOX; expresión diferencial; Western-Blot

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar, de todo corazón, mi agradecimiento a Ethel, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su equipo, y a mis compañeros David y Malina por estar siempre allí para ayudar cuando ha hecho falta y darme esperanzas sobre mi futuro incierto y ser unos grandes ejemplos de sacrificio y pasión por su trabajo.

También quería agradecer a mi pareja, por ser un pilar fundamental en mi vida, por haberme apoyado en todo momento a pesar de las dificultades por las que hemos pasado y por ser un ejemplo de superación y fuerza. Estoy muy orgulloso de ti.

Índice general

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Síndrome de Cornelia de Lange	1
1.1.1	Signos y síntomas clínicos	1
1.2	Bases genéticas del Síndrome de Cornelia de Lange	2
1.3	El complejo de cohesinas	3
1.3.1	Estructura del complejo de cohesinas	3
1.3.2	Regulación de la actividad cohesina	5
1.3.3	Función de la cohesina en la división celular	8
1.3.4	Función de la cohesina independiente de la cohesión	9
1.4	NIPBL y su papel en la actividad de la cohesina	12
1.4.1	Funciones de NIPBL	12
1.4.2	Mutaciones de NIPBL en CdLS	12
2	ANTECEDENTES	14
2.1	Impacto de la Disrupción de NIPBL/Sccl en la Expresión Génica	14
2.2	Proteoma de los pacientes de CdLS	17
3	OBJETIVOS	21
4	MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1	Población de estudio	22
4.2	Proteínas de interés en el estudio	22
4.3	Extracción de proteínas	23
4.4	Western Blot	24
5	RESULTADOS	26
5.1	Puesta a punto del sistema Western Blot para las proteínas del análisis	26
5.2	Validación de los datos proteómicos	28
6	DISCUSIÓN	30
7	CONCLUSIÓN	33
8	BIBLIOGRAFÍA	34

Índice de figuras

1.1	Espectro de severidad en el síndrome de Cornelia de Lange	2
1.2	Fenotipo facial de individuos con síndrome de Cornelia de Lange	3
1.3	Estructura del complejo de cohesinas	4
1.4	Regulación de la cohesina a lo largo del ciclo celular	7
1.5	Funciones de la cohesina en la división celular	9
1.6	Funciones de la cohesina dependientes e independientes de su actividad de cohesión	11
1.7	Representación de la estructura tridimensional digitalizada de la proteína NIPBL.	13
2.1	Los genes implicados en el desarrollo y la diferenciación están desregulados en las células derivadas de pacientes con CdLS	16
2.2	Análisis de ontología génica del proteoma en pacientes con Cornelia de Lange, representación de los procesos regulados al alza con respecto a los controles sanos.	18
2.3	Análisis de ontología génica del proteoma en pacientes con Cornelia de Lange, representación de los procesos regulados a la baja con respecto a los controles sanos.	18
2.4	Representación gráfica del total de proteínas expresadas diferencialmente, genes expresados diferencialmente y las coincidencias entre ambos estudios.	19
2.5	Una representación gráfica de Volcano de los cambios en la expresión de proteínas entre el control y los fibroblastos derivados de CdLS.	19
5.1	Comparación de los resultados obtenidos por Western blot para diversos métodos de extracción de proteínas.	26
5.2	Resultados del Western Blot para cada una de las proteínas de ensayo en las 3 réplicas realizadas.	28
5.3	Comparación de la expresión proteica entre pacientes con CdLS y controles sanos.	29

Índice de cuadros

2.1	Análisis de ontología génica de los genes de expresión diferencial en células derivadas de CdLS	20
4.1	Anticuerpos empleados para el ensayo Western Blot	23
5.1	Anticuerpos empleados para el ensayo Western Blot	27

Anejo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables				X
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.	X			

B. Describir brevemente la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

El TFG realizado se alinea con los puntos dedicados a la salud y bienestar, innovación y alianzas para lograr objetivos debido que se trata de un proyecto de investigación básica en la rama sanitaria, donde se busca un resultado novedoso para dar paso a nuevos enfoques para la terapia de los pacientes con el Síndrome de Cornelia de Lange. Para ello, se ha requerido de la colaboración de diversos hospitales para contar con las muestras necesarias para su estudio.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Síndrome de Cornelia de Lange

El Síndrome de Cornelia de Lange (CdLS, OMIM 122470, 300590, 610759, 614701, 300882, también conocido como síndrome de Brachmann de Lange) es una enfermedad genética rara, de herencia heterogénea autosómica dominante o ligada al cromosoma X que afecta a múltiples órganos y sistemas. Esta fue descrita por primera vez en 1933 por la pediatra holandesa Cornelia de Lange (C. de Lange, 1933), pese a que en 1916, el Dr. M. Brachmann describió ya los síntomas en un paciente (Brachmann, 1916), dando ambos lugar al nombre de la enfermedad. Se estima que la prevalencia de la enfermedad es de 0.5-10:100.000, pero se desconoce la prevalencia exacta, puesto que es probable que los casos más leves se encuentren infradiagnosticados (Barisic I et al., 2008). El CdLS se encuentra caracterizado por un retraso en el desarrollo psicomotor y del crecimiento, entre otros problemas médicos.

1.1.1. Signos y síntomas clínicos

El síndrome de Cornelia de Lange (CdLS) es una enfermedad genética rara caracterizada por una combinación distintiva de anomalías físicas, retraso en el desarrollo y otros problemas médicos. Los individuos con CdLS a menudo muestran un desarrollo motor y cognitivo retardado, afectando habilidades como el habla, la marcha y el aprendizaje, con una severidad que varía desde leve hasta profunda. Los rasgos faciales distintivos incluyen cejas arqueadas y unidas (sinofridia), nariz corta con punta ancha y hacia arriba, filtro largo y liso, labio superior delgado y boca de aspecto triste, orejas bajas y malformadas, y microcefalia (cabeza pequeña). Los niños con CdLS a menudo tienen un crecimiento prenatal y postnatal restringido, resultando en baja estatura y bajo peso en comparación con sus pares. También pueden presentarse malformaciones en las extremidades superiores e inferiores, como brazos y manos pequeñas, ausencia de dedos (oligodactilia) o dedos fusionados (sindactilia). Los problemas gastrointestinales son comunes, incluyendo reflujo gastroesofágico, estreñimiento y otros problemas digestivos. Adicionalmente, es común la pérdida auditiva y diversas anomalías oculares, como miopía o estrabismo. En términos de comportamiento, algunos niños con CdLS pueden mostrar conductas autistas, hiperactividad, ansiedad y problemas de conducta (Boyle et al., 2014).

La variabilidad en la severidad del CdLS es considerable; algunos individuos pueden tener síntomas leves y llevar una vida relativamente independiente, mientras que otros pueden presentar discapacidades graves y requerir asistencia constante.

El espectro de severidad se debe, en gran medida, a las diferencias en las mutaciones genéticas que causan el síndrome y a la variabilidad fenotípica que resulta de estas mutaciones. Las variaciones pueden ocurrir incluso entre miembros de la misma familia, lo que subraya la complejidad genética y clínica del CdLS (Figura 1.1).

1 INTRODUCCIÓN

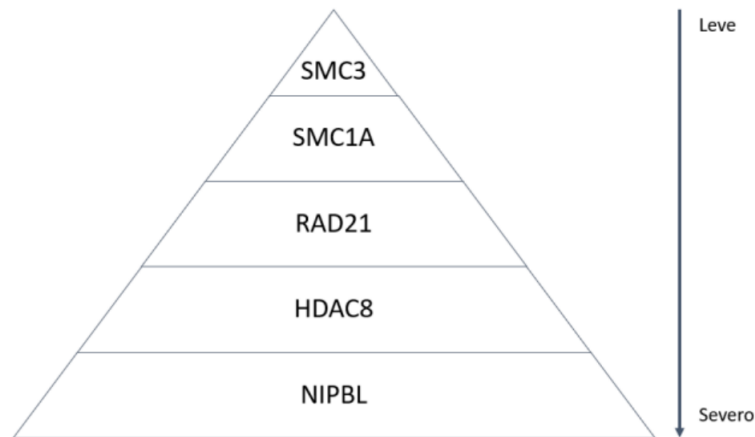


Figura 1.1: **Espectro de severidad en el síndrome de Cornelia de Lange.** Se correlaciona la severidad del fenotipo presentado con la variante de cada uno de los 5 genes conocidos que desencadenan la enfermedad.

1.2. Bases genéticas del Síndrome de Cornelia de Lange

Actualmente, se conocen hasta 5 genes directamente relacionados con el síndrome de Cornelia de Lange: NIPBL (Nipped-B-like protein), SMC1 (mantenimiento estructural de los cromosomas 1A), SMC3 (mantenimiento estructural de los cromosomas 3), RAD21 (homólogo humano del mutante sensible a la radiación de *Schizosaccharomyces pombe* 21) y HDAC8 (deacetilasa de histonas 8). Todas ellas, identificadas en pacientes de CdLS, forman parte del complejo de cohesinas o sus reguladores, por lo que la enfermedad entra dentro de la categoría de las cohesinopatías (Boyle et al., 2014).

La severidad de los signos y síntomas observados en los pacientes de CdLS varía dependiendo de la variante patogénica del gen, siendo la mutación del gen NIPBL la más frecuente y de mayor gravedad. Alrededor del 65% de los pacientes con el síndrome de Cornelia de Lange cuentan con la mutación en heterocigosis para el gen NIPBL localizada en el cromosoma 5p13, mientras que el resto de genes comprenden alrededor de un 11%. Las mutaciones que afectan directamente a las subunidades del complejo de cohesina, las proteínas SMC (SMC1A y SMC3), generalmente mantienen la pauta de lectura y no afectan a la expresión de la proteína, dando lugar a fenotipos de CdLS más leves, con un deterioro neurocognitivo moderado y escasez de defectos estructurales importantes. Por otra parte, mutaciones en el gen HDAC8, que codifica para una histona deacetilasa ligada al cromosoma X, conducen a la inestabilidad de la proteína y, por tanto, a manifestaciones más severas de la enfermedad, pero sin afectación significativa de las extremidades. En cuanto a las mutaciones en RAD21, componente del complejo de cohesina, dan lugar a una cohesinopatía caracterizada por retraso del crecimiento, anomalías esqueléticas menores y alteraciones faciales, con menor severidad en los problemas cognitivos. (Mannini et al., 2013) (Figura 1.2).

En cuanto a la herencia de la enfermedad, las mutaciones en NIPBL, SMC3 y RAD21 dan lugar a la forma autosómica dominante, mientras que en los genes HDAC8 y SMC1A

conducen a la forma ligada al cromosoma X.

Aunque los mecanismos moleculares de la enfermedad aún no se comprenden completamente, el fenotipo observado en los pacientes indica una desregulación en las funciones de las cohesinas y NIPBL en la estructura de la cromatina, lo cual impacta negativamente en la transcripción génica. Esta hipótesis se ve reforzada por la identificación de mutaciones en genes que codifican reguladores de la cromatina, tales como ANKRD11, KMT2A, AFF4 y BRD4, los cuales están asociados a trastornos similares al síndrome de Cornelia de Lange (García et al. 2015).

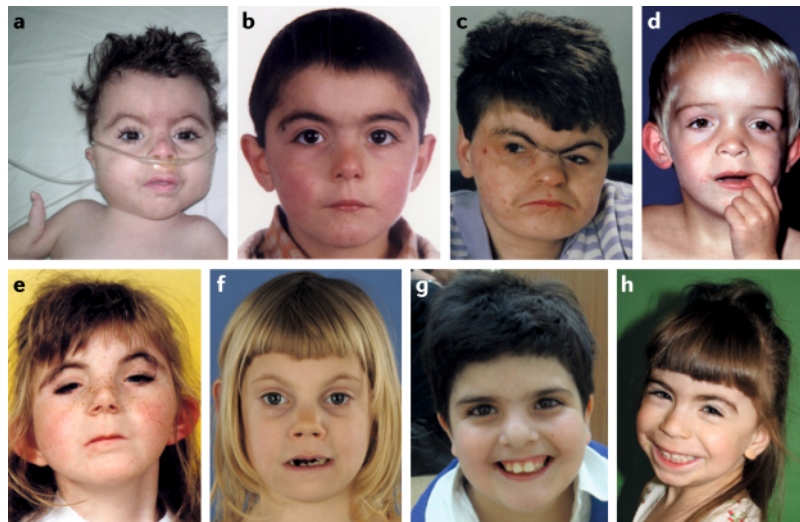


Figura 1.2: **Fenotipo facial de individuos con síndrome de Cornelia de Lange.**a) Fenotipo clásico del síndrome de Cornelia de Lange (CdLS) resultante de una variante NIPBL. b) Fenotipo no clásico del CdLS en un individuo con una variante NIPBL. c) Adulto con el fenotipo clásico (variante NIPBL). d) Fenotipo no clásico en un individuo con una variante SMC1A. e) Fenotipo clásico en un individuo con una variante SMC3. f) Fenotipo no clásico en un individuo con una variante RAD21. g) Fenotipo no clásico en un individuo con una variante HDAC8. h) Fenotipo no clásico en un individuo con una variante ANKRD11. Adaptado de Kline et al. 2018.

1.3. El complejo de cohesinas

1.3.1. Estructura del complejo de cohesinas

La correcta cohesión y plegamiento de los cromosomas contribuye a la correcta segregación cromosómica, reparación de daños en el ADN y la regulación de la expresión génica. Estos procesos de organización cromosómica se encuentran mediados por una familia conservada de complejos proteicos, conocida como complejos del mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC). Estos complejos SMC, junto con sus reguladores, desempeñan un papel crucial en mantener la integridad y funcionalidad del genoma (Xiang et al. 2021). El complejo SMC,

1 INTRODUCCIÓN

llamado cohesina, fue descubierto en levaduras y media la cohesión entre cromátidas hermanas (Guacci et al. 1997). Debido a la importancia de su función, cuentan con una estructura ampliamente conservada, que consiste en 4 subunidades principales en humanos: SMC1A, SMC3, RAD21/SCC1 y STAG1/2 (SA1/2). La estructura central del anillo es un dímero de proteínas SMC (SMC1A y SMC3). Cada subunidad está compuesta por dos dominios globulares: un dominio de cabeza y un dominio de bisagra, conectados por un largo dominio en espiral de aproximadamente 50 nm. Además de las proteínas SMC, la proteína kleinsin RAD21/Scc1 permite el cierre del anillo tripartito, completando el complejo central de la cohesina (Xiang et al, 2021; Ishiguro et al. 2019) (Figura 1.3). Adicionalmente, aunque no es necesaria para mantener la integridad del anillo, la subunidad SA es esencial para la unión de la cohesina a la cromatina y para el correcto funcionamiento del complejo (Losada et al., 2014).

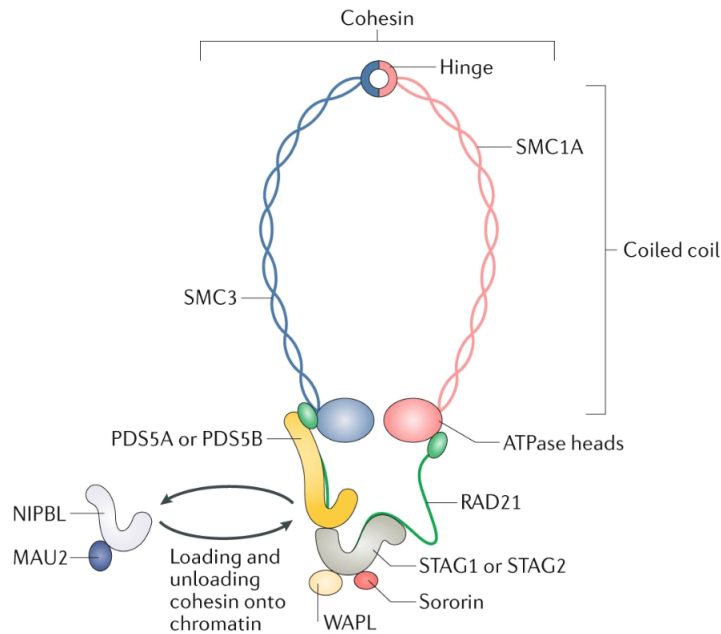


Figura 1.3: **Estructura del complejo de cohesinas.** El complejo de cohesina está compuesto por cuatro subunidades principales: la proteína de mantenimiento estructural de cromosomas 1A (SMC1A), SMC3, el homólogo de la proteína RAD21 de reparación de roturas de doble cadena (RAD21), y la subunidad de cohesina SA-1 (STAG1) o SA-2 (STAG2). Además, hay varios componentes adicionales que regulan principalmente el núcleo del complejo de cohesina. Entre estos se encuentran la proteína NIPBL (nipped-B-like) y el homólogo del factor de cohesión cromatídica MAU2, ambos necesarios para reclutar la cohesina en la cromatina; el homólogo de la proteína wings apart-like (WAPL), los homólogos A de la proteína de cohesión cromatídica hermana PDS (PDS5A) y PDS5B, que son esenciales para eliminar la cohesina de la cromatina; y la sororina, que interviene en el establecimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas. Adaptado de Sedeño Cacciatore et al. 2019.

1.3.2. Regulación de la actividad cohesina

Para el correcto funcionamiento del complejo de cohesina, este cuenta con proteínas accesorias o reguladoras, que le permiten adquirir un comportamiento dinámico.

Pese a que se conoce que el complejo de cohesinas cuenta con la capacidad intrínseca de unirse topológicamente al ADN, la eficiencia del proceso es dependiente de la actividad del heterodímero de proteínas NIPBL/MAU2, también conocido como adherina o kollerina. Este proceso es dependiente de la actividad ATPasa de la cohesina (Kean et al., 2022).

Durante la fase G1 temprana del ciclo celular, la cohesina se asocia a la cromatina gracias a la acción de NIPBL/MAU2. Este heterodímero interactúa con las cuatro subunidades de cohesina y se cree que actúa como un "cable" molecular que transfiere la energía generada por la hidrólisis de ATP, la cual ocurre en los dominios principales de las proteínas SMC1A y SMC3, hacia la región de la bisagra. La región de la bisagra se disocia de manera transitoria, permitiendo así la entrada del ADN (Murayama et al., 2014).

Durante esta fase del ciclo celular, la cohesina se une a una sola cromátida hermana. Tras la replicación del ADN, el anillo de cohesina rodea ambas cromátidas hermanas, manteniéndolas unidas. Este proceso de cohesión se establece mediante la acetilación de dos residuos de lisina en el dominio principal de SMC3, una modificación llevada a cabo por las acetiltransferasas de cohesinas (CoATs) ESCO1 y ESCO2. Además, la proteína sororina se une a PDS5, lo que es crucial para la estabilización del complejo de cohesina (Losada, 2014).

Los complejos de cohesina acetilada, junto con la sororina, se adhieren de manera estable a la cromatina que rodea las dos cromátidas hermanas. Al inicio de la mitosis, la mayoría de las cohesinas se disocian de la cromatina para permitir la correcta resolución y segregación de las cromátidas hermanas durante la anafase. Este proceso de disociación es facilitado por dos factores, WAPL (homólogo de la proteína wings apart-like) y PDS5, que se asocian tanto entre sí, formando un heterodímero, como con la cohesina unida a la cromatina para efectuar esta disociación (Nishiyama et al. 2010).

La cantidad de cohesinas presentes en la cromatina es el resultado de acciones opuestas llevadas a cabo por los complejos NIPBL-MAU2 y PDS5-WAPL. Este mecanismo, conocido como la vía de disociación de la profase, requiere la acción de tres proteínas kinasas (CDK1, AURKB y PLK1) que fosforilan la sororina, induciendo su disociación de PDS5 y permitiendo así que el complejo PDS5-WAPL descargue la cohesina (Nishiyama et al., 2010). De acuerdo con este modelo, se ha propuesto que la unión de la sororina a PDS5 desplaza a WAPL, previniendo su función de descarga o separación de la cromatina.

Una pequeña fracción de cohesinas, especialmente enriquecida en los centrómeros, está protegida de esta disociación por la acción de la shugoshina 1 (SGO1), que se asocia con la proteína fosfatasa 2A (PP2A). El complejo SGO1-PP2A reconoce la sororina unida a la cohesina y antagoniza su fosforilación, manteniendo así la cohesina centromérica intacta (Liu et al., 2013). Esta cohesina centromérica es esencial para la alineación correcta de los cromosomas en la placa metafásica.

Al inicio de la anafase, la activación del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) provoca la degradación de la securina y la activación de la separasa. La separasa corta la subunidad RAD21 de la cohesina residual adherida a la cromatina, destruyendo la integridad del anillo de cohesina y permitiendo la separación de las cromátidas hermanas y su posterior segregación cromosómica.

Los complejos de cohesina que se liberan durante la mitosis pueden ser reutilizados en la

1 INTRODUCCIÓN

fase G1 subsiguiente, una vez que la histona deacetilasa 8 (HDAC8) elimina los grupos acetilo de SMC3 (Figura 1.4).

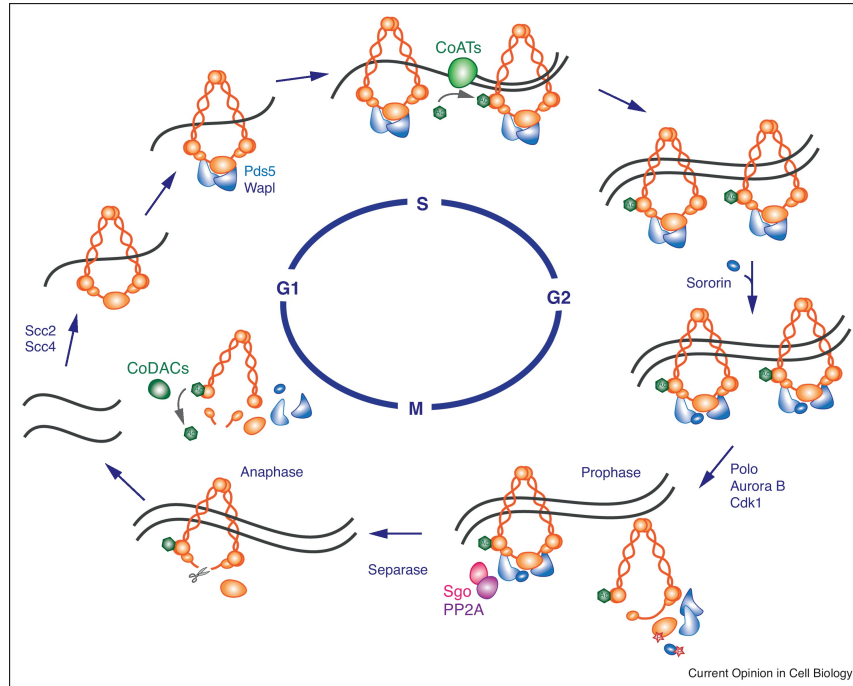


Figura 1.4: **Regulación de la cohesina a lo largo del ciclo celular.** La cohesina es reclutada en la cromatina por Scc2/Scc4 (NIPBL/MAU2) a principios de G1 en las células de vertebrados y a finales de G1 en la levadura. Tras la replicación del ADN, se establece la cohesión entre las cromátidas hermanas. La acetilación de SMC3 por CoATs contrarresta la acción de PDS5-WAPL. La unión de Sororina desplaza a WAPL y estabiliza los complejos cohesivos. En mitosis, la mayor parte de la cohesina se libera de la cromatina en profase por fosforilación de la subunidad SA por Polo y de la Sororina por CDK1, lo que facilita la acción de PDS5-WAPL. Aurora B (AURKB) también interviene en este paso. La fracción de cohesina que permanece en los centrómeros protegida por Sgo-PP2A se escinde al activarse la separasa al inicio de la anafase, permitiendo la separación de las cromátidas hacia polos opuestos del huso mitótico. Una vez que la cohesina es liberada de la cromatina, SMC3 es desacetilada por CoDACs solubles para que pueda ser reutilizada en el siguiente ciclo (Remeseiro y Losada, 2012).

1 INTRODUCCIÓN

1.3.3. Función de la cohesina en la división celular

Tal y como se indica anteriormente, las cohesinas son complejos proteicos esenciales para la estructura y función del ADN en las células eucariotas. Sus funciones dependientes de la cohesión son críticas para varios procesos celulares fundamentales, incluyendo la segregación cromosómica, la reparación del ADN, y el mantenimiento de la estabilidad genómica.

Por una parte, la cohesina permite la cohesión de las cromátidas hermanas durante la mitosis y meiosis, permitiendo el control de la segregación de las cromátidas hermanas durante la división celular a los polos opuestos de la célula en división (Figuras 1.5 y 1.6a). Además, también participa en el ensamblaje del huso mitótico, permitiendo la unión de los microtúbulos con los cinetocoros y manteniendo la unión de las cromátidas sometidas a la tracción de los microtúbulos, mientras se encuentran alineándose en la placa metafásica (Waldman, 2020).

Por otra parte, la cohesina desempeña un papel crucial en la reparación del ADN, especialmente en la reparación de roturas de doble cadena (DSB). Debido a que la cohesina mantiene las cromátidas hermanas próximas, permite la correcta reparación de las DSB mediante recombinación homóloga, donde se emplea la cromátida hermana como molde para reparar la cromátida dañada. Este proceso se inicia con el reconocimiento y procesamiento de la rotura, dando lugar a extremos 3' sobresalientes de cadena sencilla. En este contexto, la cohesina facilita la búsqueda y emparejamiento con la cromátida hermana intacta, permitiendo la síntesis "de novo" por recombinación homóloga, de las cadenas dañadas. Tras ello, los extremos del ADN se ligan y se restaura la integridad del cromosoma (Figura 1.6a).

Aunque la cohesina está más implicada en la recombinación homóloga, también pueden influir en la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), un mecanismo de reparación menos preciso que no requiere un molde homólogo. La cohesina ayudaría a acercar los extremos rotos del ADN, mejorando la eficiencia del proceso de reparación y proporcionando un entorno más estable.

También en la fase S del ciclo celular, la cohesina no solo ayuda a mantener la cohesión de las cromátidas hermanas, sino que también facilita la reparación de daños que ocurren durante la replicación del ADN. Estabiliza las horquillas de replicación, previniendo colapsos que podrían resultar en DSB, y permite el acceso de las proteínas de reparación para corregir errores utilizando la cromátida hermana como molde. La cohesina desempeña un papel protector al facilitar la reparación y estabilización del ADN en estos contextos, previniendo la disociación de las horquillas de replicación y facilitando la señalización y el reclutamiento de factores de reparación al sitio de daño (Figura 1.6a) (Losada, 2014).

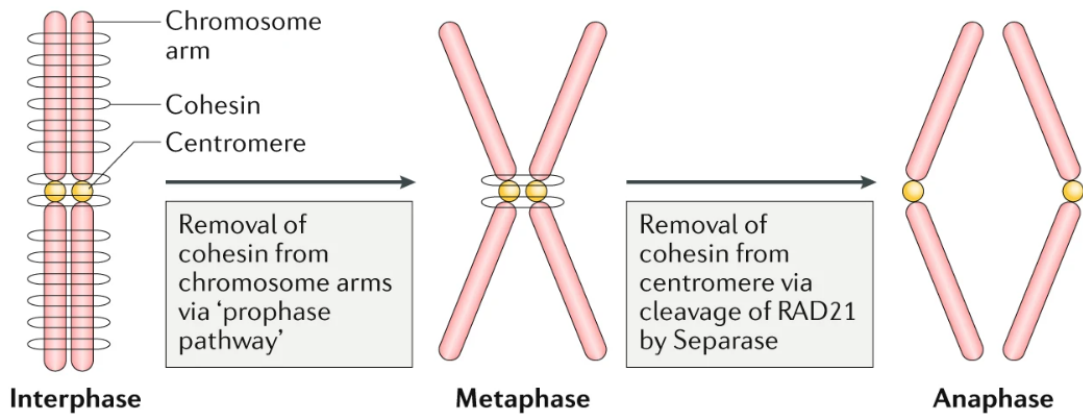


Figura 1.5: **Funciones de la cohesina en la división celular.** La cohesina se recluta inicialmente a la cromatina a finales de la fase G1 y cohesiona las cromátidas replicadas hasta que se retira de los brazos cromosómicos en la profase a través de la fosforilación de la subunidad SA1 o SA2 dependiente de la polo-like quinasa 1 (PLK1), lo que da a los cromosomas en metafase su clásica forma de X. A continuación, la cohesina centromérica es escindida por la separasa, lo que permite que las cromátidas hermanas se separen en la transición de metafase a anafase, dando lugar a la separación de las cromátidas en las células hijas (Waldman, 2020).

1.3.4. Función de la cohesina independiente de la cohesión

Además de su función esencial en asegurar la distribución y estabilidad del genoma, la cohesina también juega roles fundamentales en otros aspectos de la biología celular que tienen un impacto significativo en la expresión génica y la organización del genoma (Figura 1.6b). Estas proteínas se asocian con la cromatina en lugares específicos dentro de los cromosomas, como los centrómeros y los promotores de genes que se transcriben intensamente. Una vez unida, la cohesina se desplaza hacia sus sitios de retención finales, los cuales, en los cromosomas humanos, son en su mayoría ocupados por el factor de unión a CCCTC (CTCF). Este proceso es crucial para la organización topológica del genoma (García et al., 2021).

La organización topológica del genoma depende de una jerarquía de bucles de cromatina, que influye en muchos aspectos del funcionamiento del genoma, incluyendo tanto la replicación del ADN como la regulación transcripcional de largo alcance (Losada, 2014). La técnica Hi-C ha revolucionado nuestra comprensión de estas interacciones al permitir la identificación de interacciones de orden superior en todo el genoma (Nishiyama, 2019). Hi-C ha demostrado que las fibras de cromatina están organizadas en dominios discretos llamados dominios de asociación topológica (TADs). Los TADs son fundamentales porque confinan las actividades reguladoras de la transcripción a un dominio específico, lo que facilita una regulación génica más precisa. Dentro de estos TADs, la cohesina puede facilitar la transcripción al promover la interacción entre un potenciador (*enhancer*) y un promotor, además de contribuir a la regulación transcripcional de conjuntos de genes (Losada, 2014).

El factor CTCF y la cohesina se localizan conjuntamente en aproximadamente el 60-80 %

1 INTRODUCCIÓN

de los sitios de unión, y ambos se encuentran enriquecidos en los límites entre TADs. Esto sugiere que desempeñan un papel crucial en la definición de los TADs (Watrin et al., 2016). En ausencia de CTCF, la cohesina se acumula en los sitios activos de inicio de la transcripción. La pérdida del complejo de cohesina resulta en la supresión de la formación de TADs y de los bucles de cromatina asociados, lo que afecta negativamente la comunicación entre potenciadores y promotores (García et al., 2021). Esta evidencia resalta la importante contribución de la cohesina a la organización del genoma.

La actividad ATPasa de la cohesina es esencial para la formación de bucles de cromatina, y se cree que esta actividad es estimulada por la acción de NIPBL. Por consiguiente, NIPBL puede desempeñar un papel significativo en la formación de los bucles de cromatina y los TADs, subrayando aún más la complejidad y precisión de los mecanismos que regulan la organización estructural del genoma.

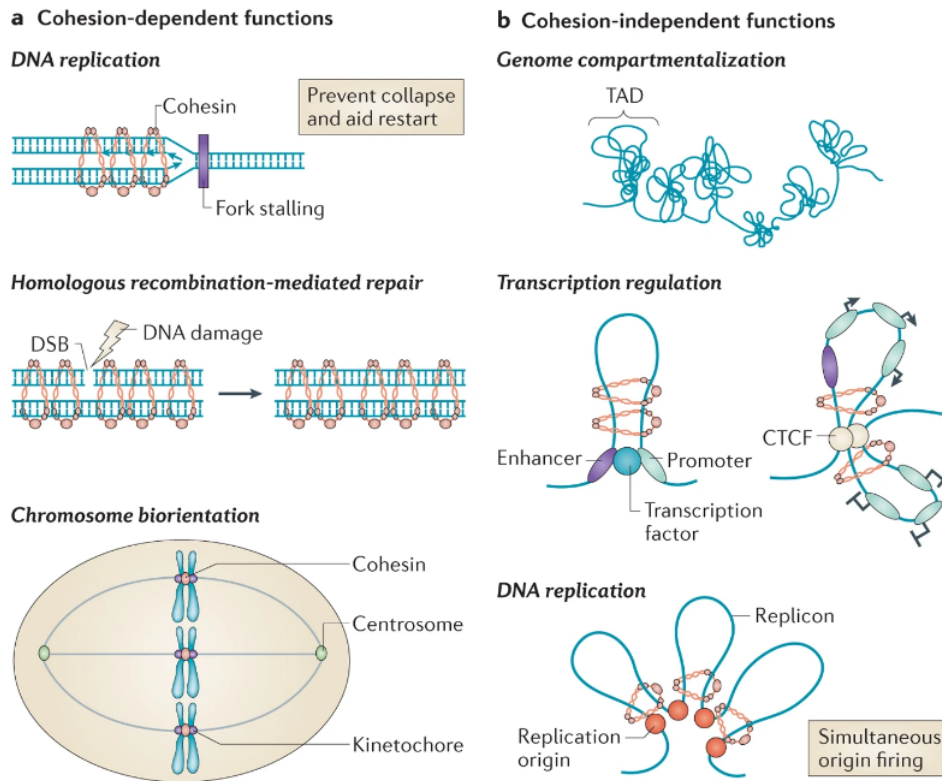


Figura 1.6: **Funciones de la cohesina dependientes e independientes de su actividad de cohesión.** a) Funciones de la cohesina dependientes de la cohesión. En interfase, la cohesina es importante para estabilizar las horquillas de replicación del ADN colapsadas y promover su reinicio. La cohesión también facilita el uso de la cromátida hermana como molde para reparar las roturas de doble cadena (DSB) a través de la reparación mediada por la recombinación homóloga. En la mitosis, la cohesión garantiza la correcta segregación de los cromosomas. Promueve la orientación apropiada de los cinetocoros hermanos para facilitar su unión a los microtúbulos de los polos opuestos del huso y evita la separación de las cromátidas hermanas hasta que todos los cromosomas alcanzan la biorientación. b) Las funciones de la cohesina independientes de la cohesión están relacionadas con la organización del genoma. El genoma está dividido en unidades discretas conocidas como dominios de asociación topológica (TAD) que van de 100 kb a 1 Mb en los mamíferos. Tanto el factor de unión al CCCTC (CTCF) como la cohesina contribuyen a esta organización, probablemente a través de la formación de bucles de cromatina. Los TADs confinan las actividades reguladoras a un dominio específico. Dentro de un dominio, la cohesina puede promover la transcripción facilitando la interacción entre un potenciador y un promotor o contribuir a la regulación transcripcional de grupos de genes. Adaptado de Losada, 2014.

1.4. NIPBL y su papel en la actividad de la cohesina

1.4.1. Funciones de NIPBL

La proteína NIPBL (Nipped-B-like), conocida en levaduras como Scc2 (Sister chromatid cohesion protein 2), es un componente esencial del complejo reclutador de cohesina. Esta proteína desempeña múltiples funciones moleculares críticas para la cohesión de las cromátidas hermanas, la regulación de la transcripción génica y la organización de la estructura del genoma. La función principal de NIPBL/Scc2 es mediar el reclutamiento de la cohesina a la cromatina (García et al. 2021).

NIPBL/Scc2, en asociación con la proteína MAU2 (también conocida como Scc4 en levaduras), forma un complejo que facilita la apertura del anillo de cohesina y su ensamblaje alrededor de las cromátidas hermanas. El mecanismo de actuación incluye el reconocimiento de sitios de carga específicos en el ADN, la inducción de cambios conformacionales en el complejo de cohesina para permitir la apertura del anillo y el encerramiento de las cromátidas hermanas para establecer la cohesión necesaria para la correcta segregación cromosómica durante la mitosis y la meiosis (Ciosk R. et al., 2000).

Además de su papel en la carga inicial de cohesinas, NIPBL/Scc2 es crucial para mantener la cohesión de las cromátidas hermanas a lo largo del ciclo celular. NIPBL/Scc2 contribuye a la estabilización de los complejos de cohesina en la cromatina, evitando su disociación prematura. También interactúa con proteínas como la sororina y PDS5 para reforzar la cohesión de las cromátidas, previniendo su separación hasta el momento adecuado.

NIPBL/Scc2 también participa en la regulación de la transcripción génica, actuando mediante la formación de bucles de cromatina que facilitan la interacción entre los promotores y los potenciadores de genes específicos, modulando así la actividad transcripcional. Este mecanismo implica la colaboración con el complejo de cohesina y CTCF para formar bucles de cromatina que acercan los elementos reguladores y promotores, facilitando la activación o represión de genes según las necesidades celulares (Alonso-Gil D. et al., 2023).

Otra función crucial de NIPBL/Scc2 es la organización de la estructura tridimensional del genoma. Esta organización es vital para la funcionalidad del genoma, incluyendo la regulación de la expresión génica y la replicación del ADN. NIPBL/Scc2 participa en la formación de dominios de asociación topológica (TADs), que son regiones del genoma que auto-interactúan y limitan las interacciones con secuencias fuera del dominio. Estos TADs ayudan a segregar regiones genómicas activas e inactivas, facilitando la regulación precisa de la expresión génica y manteniendo la integridad funcional del genoma (Alonso-Gil et al., 2023).

1.4.2. Mutaciones de NIPBL en CdLS

Tal y como queda expuesto anteriormente, un aspecto central en la etiología del CdLS son las mutaciones en el gen NIPBL, que codifica una subunidad reguladora del complejo de cohesina, y que se encuentran en aproximadamente el 60 % de los pacientes (Mannini et al., 2013).

Las mutaciones en NIPBL abarcan un espectro amplio, incluyendo mutaciones de sentido erróneo, sin sentido, inserciones, deleciones y reordenamientos cromosómicos. Un ejemplo concreto es la mutación c.2473C>T (p.Arg825*), una mutación sin sentido que introduce un codón de parada prematuro, resultando en una proteína NIPBL truncada y no funcio-

1.4 NIPBL y su papel en la actividad de la cohesina

nal. Esta mutación ha sido reportada en múltiples estudios y se asocia típicamente con un fenotipo severo del síndrome (Krantz et al., 2004). Otro ejemplo es la mutación c.4321C>T (p.Arg1441Trp), una mutación de sentido erróneo que cambia un residuo de arginina por triptófano en una posición altamente conservada, alterando la función de la proteína. Esta mutación también se asocia con un fenotipo grave, indicando la importancia crítica de esta región para la función de NIPBL (Tonkin et al., 2004). Además, se han identificado deleciones grandes, como la deleción que abarca desde el exón 10 al 14, resultando en la pérdida de una porción significativa de la proteína y contribuyendo a un fenotipo severo (Deardorff et al., 2007).

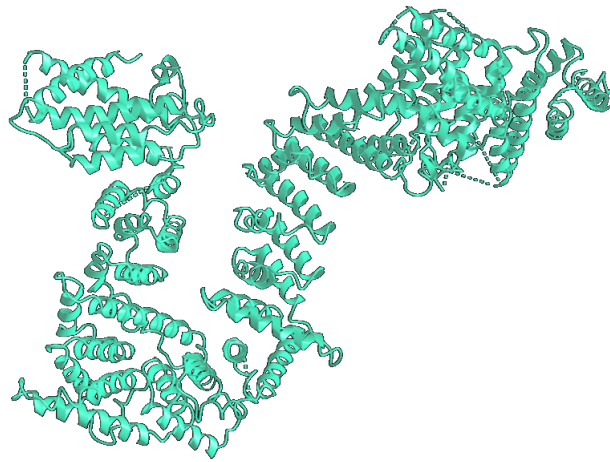


Figura 1.7: **Representación de la estructura tridimensional digitalizada de la proteína NIPBL.** Adaptado de “Cryo-EM structure of human Cohesin-NIPBL-DNA complex without STAG1” (Nebi).

2 ANTECEDENTES

El presente trabajo de investigación se basa en el trabajo de investigación previo del laboratorio, publicado en García et al. en 2021, donde se centran en el estudio de la función de NIPBL/Sc2, y su impacto en la distribución del complejo de cohesinas a lo largo del genoma y la consecuente alteración en la expresión génica.

2.1. Impacto de la Disrupción de NIPBL/Sc2 en la Expresión Génica

El estudio realizado por García et al. (2021) combinó técnicas avanzadas de biología molecular y bioinformática para investigar cómo la disrupción del gen NIPBL/Sc2 afecta la distribución del complejo de cohesinas y la expresión génica en células derivadas de pacientes con Síndrome de Cornelia de Lange. Estos estudios permitieron identificar los efectos de esta disrupción en el genoma y transcriptoma de las células de estudio.

Primero, se obtuvieron y cultivaron células de pacientes con CdLS y controles sanos en condiciones controladas para asegurar una cantidad suficiente de material biológico para los análisis. Posteriormente, se empleó la técnica de ChIP-seq (Inmunoprecipitación de Cromatina seguida de Secuenciación) para mapear la localización del complejo de cohesina en el genoma. Esta técnica involucró la inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina asociados con cohesina mediante anticuerpos específicos, seguida de su secuenciación para identificar las regiones del ADN donde las cohesinas estaban unidas.

A su vez, para analizar los cambios en la expresión génica, se aisló el ARN total de las células y se realizó la secuenciación de alto rendimiento (RNA-seq). De este modo, se cuantificaron los niveles de transcripción de genes en las células de pacientes y controles, proporcionando una imagen completa del transcriptoma.

Los datos obtenidos de ChIP-seq y RNA-seq fueron analizados con herramientas bioinformáticas avanzadas. Los investigadores compararon la distribución de cohesinas y los perfiles de expresión génica entre las muestras de pacientes y controles para identificar diferencias significativas, realizando además análisis de enriquecimiento de vías para determinar qué procesos biológicos estaban afectados por la disrupción de NIPBL/Sc2.

El estudio reveló varios hallazgos importantes. En primer lugar, se observó que la disrupción de NIPBL/Sc2 provocó una redistribución global del complejo de cohesinas a lo largo del genoma. En las células de pacientes con CdLS, las cohesinas mostraron una afinidad reducida por ciertas regiones del ADN, mientras que en otras, la presencia de cohesinas estaba aumentada, sugiriendo que NIPBL/Sc2 es crucial para la correcta localización de las cohesinas en el genoma.

Por otra parte, se observó cómo la redistribución del complejo de cohesina resultó en cambios significativos en la arquitectura cromosómica, específicamente en la formación de

2.1 Impacto de la Disrupción de NIPBL/Scs2 en la Expresión Génica

bucles y dominios topológicamente asociados (TADs), estructuras clave para la regulación de la expresión génica.

Además, el análisis de RNA-seq mostró que la disrupción de NIPBL/Scs2 está asociada con cambios en la expresión de un amplio conjunto de genes. Se identificaron tanto genes con expresión aumentada como disminuida en las células de pacientes con CdLS en comparación con los controles, involucrando procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la señalización celular y la respuesta al estrés (Figura 2.1c). En concreto, se destacaron variaciones significativas en la transcripción de la familia de genes HOX, implicados en la regulación del desarrollo embrionario y responsables de determinar la identidad y la disposición de las estructuras corporales a lo largo del eje antero-posterior (de la cabeza a la cola) (Figura 2.1e).

Los análisis de enriquecimiento de vías revelaron que varias rutas de señalización críticas estaban desreguladas en las células de pacientes con CdLS, destacando aquellas relacionadas con el desarrollo de estructuras corporales, la diferenciación celular y la proliferación, las cuales se encuentran relacionadas con el fenotipo clínico característico observado en los pacientes de CdLS (Figura 2.1b; Tabla 2.1).

2 ANTECEDENTES

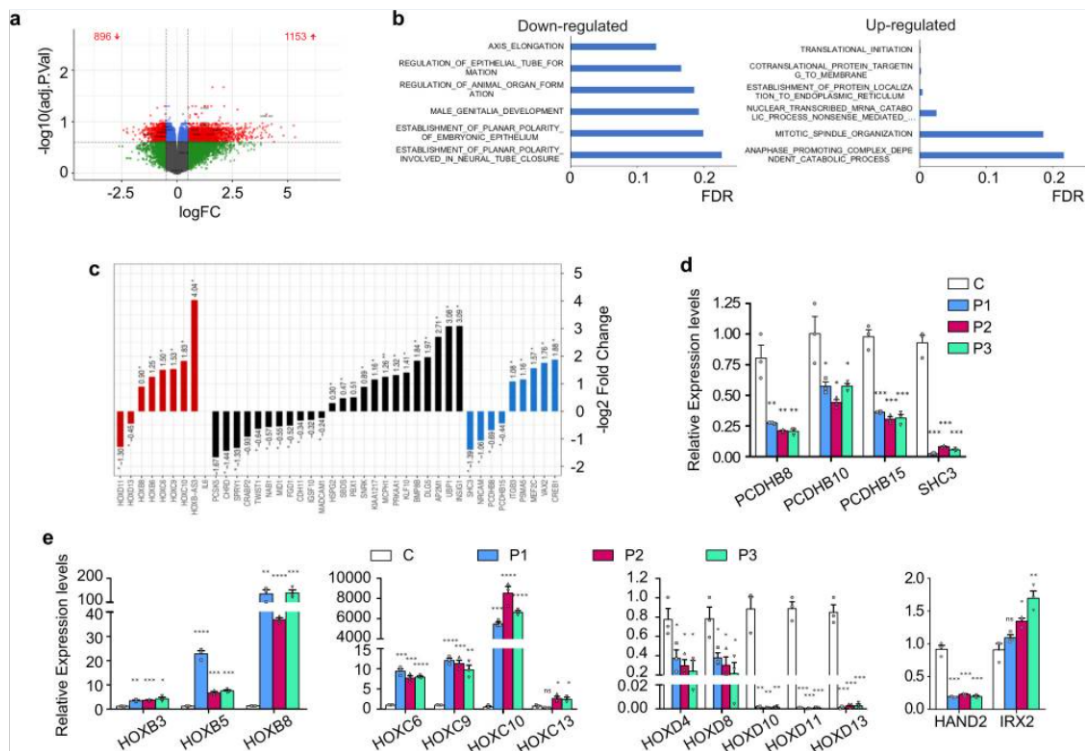


Figura 2.1: Los genes implicados en el desarrollo y la diferenciación están desregulados en las células derivadas de pacientes con CdLS. **a)** Una representación gráfica de Volcano de los cambios en la expresión génica entre el control y los fibroblastos derivados de CdLS. Los genes significativamente regulados a la baja y al alza se indican en rojo. El verde, el azul y el gris muestran genes diferenciales no significativos. **b)** Los análisis de enriquecimiento de ontología genética (GO) revelan procesos biológicos que están regulados negativamente y positivamente en los fibroblastos derivados de CdLS (barras azules). **c)** Representación de los cambios logarítmicos en la expresión de genes relacionados con procesos de desarrollo (barras negras). Los genes implicados en el desarrollo y diferenciación del sistema embrionario están marcados en rojo, los implicados en el desarrollo del sistema nervioso están marcados en azul. Prueba t de Student bilateral no apareada (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). **d)** , **e)** Los niveles de expresión de algunos genes de desarrollo del sistema nervioso (**d**) y genes de desarrollo embrionario (**e**) se analizaron en un control (C, blanco) y en tres fibroblastos derivados de pacientes con CdLS (P1, azul; P2, morado; P3, verde) mediante transcripción inversa-qPCR. Los gráficos muestran la cantidad de transcripción de cada gen en relación con la del control. Las medias y las SEM se calcularon a partir de triplicados biológicos. Prueba t de Student bilateral no pareada (**** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). Adaptado de García et al., 2021.

2.2. Proteoma de los pacientes de CdLS

Una vez determinados los genes con expresión variable de acuerdo con los ensayos genómicos, se deberán corroborar mediante el estudio proteómico, donde se deberán apreciar variaciones significativas en las proteínas que participan en las rutas alteradas en los pacientes de Cornelia de Lange.

De nuevo, se obtuvieron y cultivaron células de pacientes con CdLS y controles sanos en condiciones controladas para asegurar una cantidad suficiente de material biológico para los análisis.

Para analizar los cambios en la expresión de proteínas, se aisló la proteína total de las células y se analizó el proteoma total por espectrometría de masas. De este modo, se cuantificaron los niveles de proteína final en las células de pacientes y controles, proporcionando una imagen completa del proteoma.

Los datos obtenidos fueron analizados con herramientas bioinformáticas avanzadas, y además, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías para determinar los procesos biológicos afectados por la disrupción de NIPBL/Scs2 (Figuras 2.2 y 2.3). Del total de genes con expresión diferencial obtenidas en los estudios genómicos y proteínas con expresión diferencial obtenidas en el estudio proteómico, únicamente coincidieron alrededor de 300 proteínas para ambos estudios (Figura 2.4). Estas son el objeto de estudio del presente trabajo, cuya validación de los resultados proteómicos indicará su participación en el desarrollo de la enfermedad, pudiendo ser dianas terapéuticas para su tratamiento. De nuevo, los genes implicados en el desarrollo y la diferenciación se encuentran desregulados en los pacientes con CdLS (Figura 2.5).

2 ANTECEDENTES

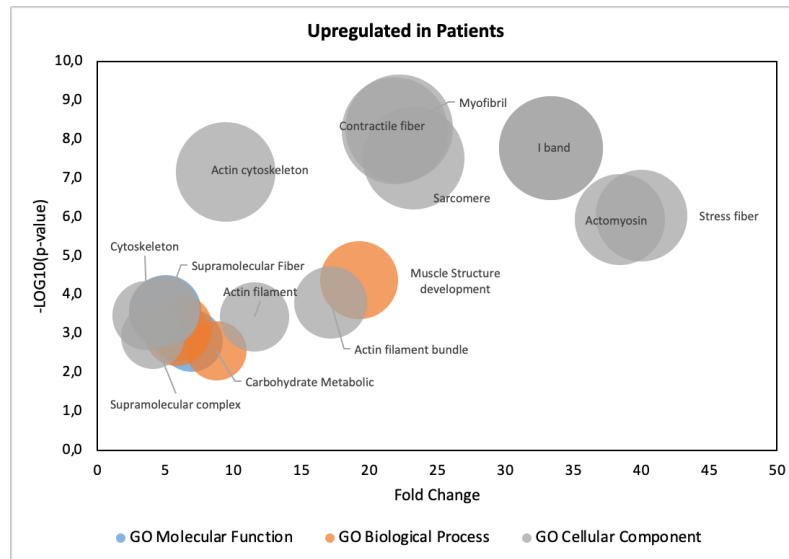


Figura 2.2: Análisis de ontología génica del proteoma en pacientes con **Cornelia de Lange**, representación de los procesos regulados al alza con respecto a los controles sanos. Las funciones diferencialmente expresadas relacionadas con un componente celular se representan en gris. Las funciones representadas en azul indican una función molecular. En cuanto a las funciones representadas en naranja, indican un proceso biológico.

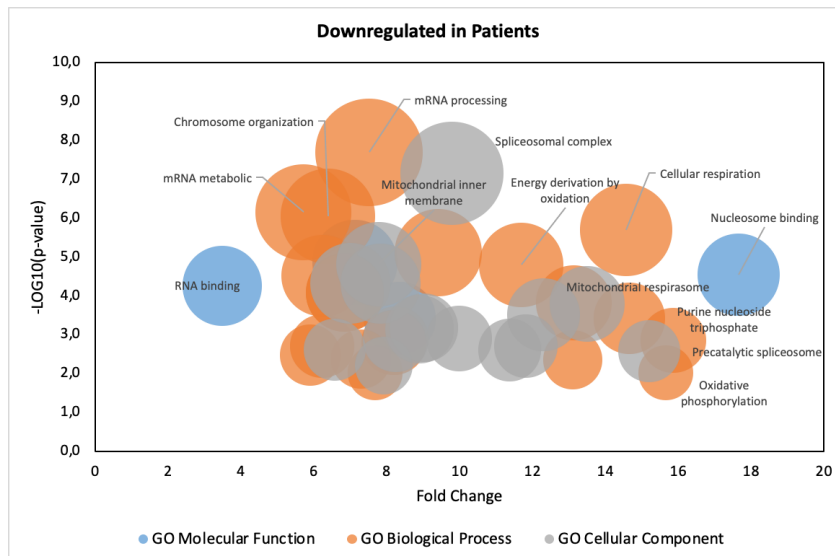


Figura 2.3: Análisis de ontología génica del proteoma en pacientes con **Cornelia de Lange**, representación de los procesos regulados a la baja con respecto a los controles sanos. Las funciones diferencialmente expresadas relacionadas con un componente celular se representan en gris. Las funciones representadas en azul indican una función molecular. En cuanto a las funciones representadas en naranja, indican un proceso biológico.

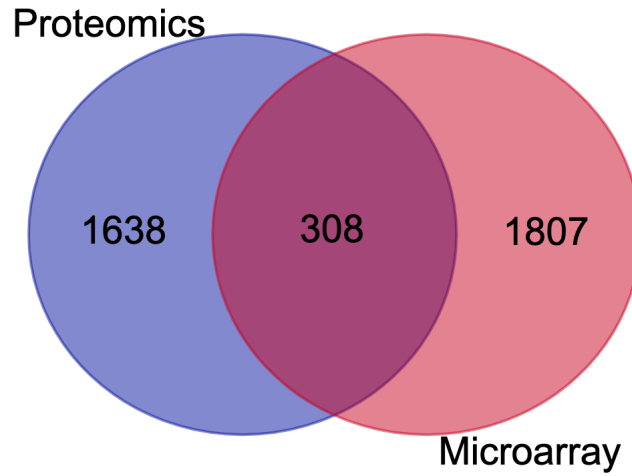


Figura 2.4: Representación gráfica del total de proteínas expresadas diferencialmente, genes expresados diferencialmente y las coincidencias entre ambos estudios.

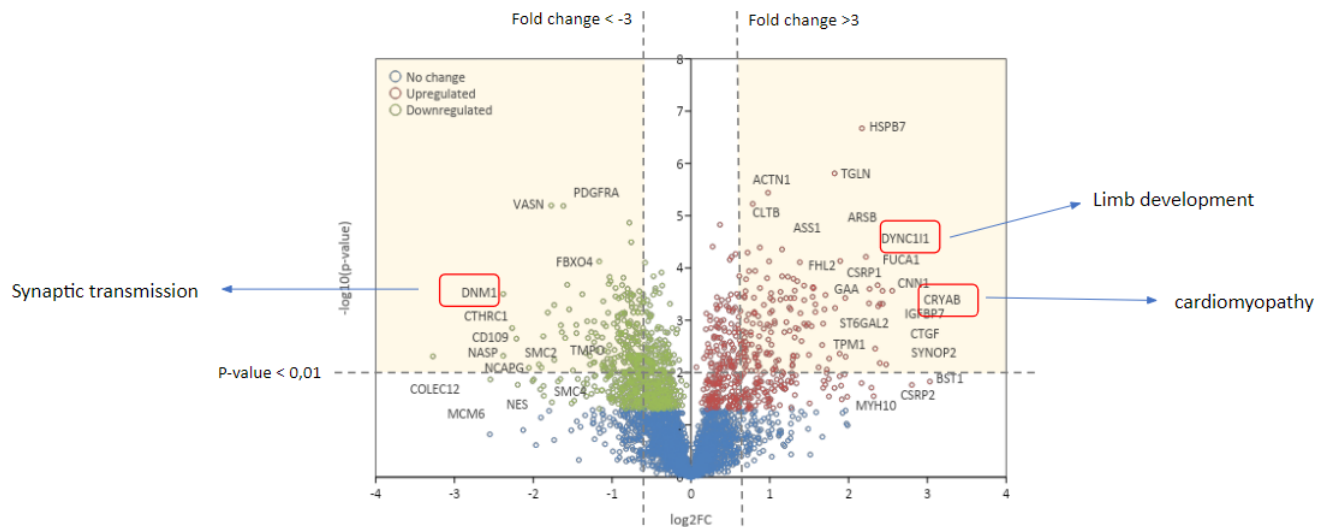


Figura 2.5: Una representación gráfica de Volcano de los cambios en la expresión de proteínas entre el control y los fibroblastos derivados de CdLS. Las proteínas significativamente reguladas a la baja se indican en verde mientras que las reguladas al alza se indican en rojo. El azul muestra proteínas diferenciales no significativas. Se destacan proteínas que participan en procesos relacionados con el desarrollo y diferenciación, como son DNM1, DYNC11 o CRYAB, que participan en la transmisión sináptica, desarrollo de las extremidades y cardiomiopatía respectivamente.

2 ANTECEDENTES

Cuadro 2.1: **Análisis de ontología génica de los genes de expresión diferencial en células derivadas de CdLS.** Se realizó un Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (GSEA) para separar los procesos biológicos regulados al alza y a la baja en pacientes frente a controles. Los valores de log fold change resultantes del análisis DE fueron empleados para clasificar la lista de genes. El software GSEA se ejecutó utilizando 1000 permutaciones de genes y una estadística de enriquecimiento ponderado de genes. Los conjuntos de genes se limitaron a los que contenían entre 15 y 500 genes (4116 conjuntos de genes). Los conjuntos de genes con un valor q de FDR <0,25 se consideraron significativamente enriquecidos.

Downregulated genes				
NAME	SIZE	ES	NOM p-val	FDR q-val
GO_AXIS_ELONGATION	30	-0,6684479		0,12885292
GO_REGULATION_OF_EPITHELIAL_TUBE_FORMATION	18	-0,7756181		0,1659859
GO_CHONDROCYTE_DEVELOPMENT	30	-0,6575674		0,16603169
GO_REGULATION_OF_ANIMAL_ORGAN_FORMATION	37	-0,5755641		0,18566899
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_RHO_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION	32	-0,6539717		0,19572045
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_EPITHELIAL_CELL_DIFFERENTIATION	60	-0,5464879		0,2096403
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_MESENCHYMAL_CELL_PROLIFERATION	25	-0,6623802		0,21004179
GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_INTERLEUKIN_10_PRODUCTION	18	-0,6992185		0,23465733
GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_VITAMIN	30	-0,6213291		0,23852745
GO_KIDNEY_MESENCHYME_DEVELOPMENT	19	-0,6903164	0,002702703	0,24239531
GO_ESTABLISHMENT_OF_PLANAR_POLARITY_OF_EMBRYONIC_EPITHELIUM	17	-0,7012875	0,002747253	0,19933875
GO_LYMPHANGIOGENESIS	15	-0,7596826	0,002857143	0,23817718
GO_SMOOTH_MUSCLE_TISSUE_DEVELOPMENT	22	-0,7045883	0,002906977	0,18820022
GO_REGULATION_OF_WATER_LOSS_VIA_SKIN	28	-0,6244028	0,003003003	0,21334948
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CARTILAGE_DEVELOPMENT	32	-0,5949158	0,003412969	0,22111532
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_EPIDERMIS_DEVELOPMENT	38	-0,5666513	0,003745318	0,22062744
GO_ESTABLISHMENT_OF_PLANAR_POLARITY_INVOLVED_IN_NEURAL_TUBE_CLOSURE	15	-0,7450533	0,005181347	0,22725418
GO_COCHLEA_MORPHOGENESIS	24	-0,6434203	0,005830904	0,19489242
GO_BRANCHED_CHAIN_AMINO_ACID_METABOLIC_PROCESS	25	-0,6265594	0,006269592	0,20241025
GO_MALE_GENITALIA_DEVELOPMENT	23	-0,6472099	0,006309148	0,19277942
GO_BRANCH_ELONGATION_OF_AN_EPITHELIUM	19	-0,6843689	0,008426966	0,22365835
GO_METANEPHRIC_MESENCHYME_DEVELOPMENT	15	-0,7078603	0,012376238	0,21861541

Upregulated genes				
NAME	SIZE	ES	NOM p-val	FDR q-val
GO_TRANSLATIONAL_INITIATION	186	0,6677141		0,00100415
GO_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	101	0,70649254		0,00149344
GO_ESTABLISHMENT_OF_PROTEIN_LOCALIZATION_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM	114	0,6835136		0,0039791
GO_NUCLEAR_TRANSCRIBED_MRNA_CATABOLIC_PROCESS_NONSENSE_MEDIATED_DECAY	119	0,6526558		0,02491821
GO_PROTEIN_LOCALIZATION_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM	142	0,63437		0,04248601
GO_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	200	0,6028843		0,09762804
GO_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION_OF_EXOGENOUS_PEPTIDE_ANTIGEN_VIA_MHC	79	0,65239376		0,10408586
GO_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION_OF_PEPTIDE_ANTIGEN_VIA_MHC_CLASS_I	98	0,6297476		0,13729887
GO_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION_OF_ENDOGENOUS_ANTIGEN	23	0,7702922		0,1576319
GO_NUCLEAR_TRANSCRIBED_MRNA_CATABOLIC_PROCESS	206	0,5899598		0,15863375
GO_MITOTIC_SPINDLE_ORGANIZATION	117	0,6093301		0,18598533
GO_CYTOPLASMIC_TRANSLATION	97	0,62129056		0,19238794
GO_RESPONSE_TO_INTERLEUKIN_12	50	0,6585492		0,20237195
GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_IMMUNITY	17	0,7722237		0,20947562
GO_VIRAL_GENE_EXPRESSION	191	0,5818275		0,2116505
GO_ANAPHASE_PROMOTING_COMPLEX_DEPENDENT_CATABOLIC_PROCESS	82	0,6220927		0,2167282
GO_RNA_CATABOLIC_PROCESS	408	0,54527813		0,23730034
GO_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	197	0,5652017		0,24210757

3 OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es la validación de los datos obtenidos a partir del estudio del proteoma total de células de pacientes con CdLS frente a controles sanos. Para ello, primero se pretende poner a punto la detección por Western Blot para diversas proteínas con expresión diferencial en el análisis proteómico, así como los correspondientes controles de carga.

Los objetivos específicos son:

1. Puesta a punto del análisis por Western Blot en fibroblastos comerciales humanos, concretamente de la línea HDFa (Human Dermal Fibroblasts, adult).

Se buscará obtener las condiciones óptimas del ensayo, teniendo en cuenta las diversas variaciones posibles del protocolo estandarizado (concentración de anticuerpo primario, concentración de anticuerpo secundario, tipo de reactivos de revelado).

2. Ensayo Western-blot para la validación de la expresión significativamente diferencial obtenida en el estudio proteómico global entre células de pacientes de CdLS e individuos sanos.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Población de estudio

Los fibroblastos dérmicos primarios de individuos con SCdL y los fibroblastos dérmicos primarios de individuos de control fueron cedidos por los doctores J. Pie, A. Latorre-Pellicer, B. Puisac y F. Ramos del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza. La recolección de muestras fue supervisada y aprobada por los Comités Éticos de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza, del Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El estudio fue diseñado y ejecutado cumpliendo todas las regulaciones relevantes para el uso de participantes humanos, conforme a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki. Todos los participantes fueron informados previamente y proporcionaron su consentimiento por escrito para participar en este estudio. Los pacientes en este estudio presentan variantes patogénicas en el gen NIPBL. Todas las células se examinaron rutinariamente para detectar micoplasma mediante PCR y se mantuvieron libres de micoplasma. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM + GlutaMAX) con un suplemento de 10 % FBS.

En cuanto a los fibroblastos empleados para la puesta a punto del protocolo Western Blot, se escogieron fibroblastos comerciales de la línea HDFa (Adult Human Dermal Fibroblasts).

4.2. Proteínas de interés en el estudio

El estudio realizado sigue el procedimiento del análisis por Western Blot. Para poder observar variaciones en la expresión proteica de las proteínas de análisis, fueron necesarios los correspondientes controles de carga. Las proteínas de interés fueron escogidas de acuerdo con los datos obtenidos en los análisis globales (Figura 2.4; Tabla 4.1).

1. **Control de carga de proteína total:** se emplearon diversos controles de carga para cuantificar la proteína total cargada en el gel, independientemente de la cohesina. Las proteínas escogidas son la Histona 3, Nucleolina y BRM.
2. **Control de carga de cohesina:** con el fin de descartar variaciones en la cantidad de cohesina total en lugar de proteína total, se emplearon subunidades del complejo de cohesinas como control positivo. Las proteínas escogidas son SMC1A, SMC3 y Rad21.
3. **Proteínas de interés:** basándose en las coincidencias en diferencias de expresión entre el estudio genómico previo y el estudio proteómico global objeto de validación, se escogieron una serie de proteínas con potencial de variación de expresión entre la población sana y enferma. Estas son DYNC11, HOXA11, HOXD11 y DNMI1.

Cuadro 4.1: **Anticuerpos empleados para el ensayo Western Blot** Se reflejan todas las proteínas de interés junto con el peso molecular de cada una de ellas y el tipo de proteína en cuanto a su función en el ensayo Western Blot

Proteína diana	Peso Molecular	Tipo
BRM	181 kDa	Control de proteína total
PdS5B	164 kDa	Proteína de interés
PdS5A	150 kDa	Proteína de interés
SMC1A	143 kDa	Control de cohesina
SMC3	141 kDa	Control de cohesina
DNM1	97 kDa	Proteína de interés
Nucleolina	76 kDa	Control de proteína total
DYNC11	73 kDa	Proteína de interés
Rad21	72 kDa	Control de cohesina
HOXD11	35 kDa	Proteína de interés
CDK1	34 kDa	Proteína de interés
HOXA11	34 kDa	Proteína de interés
H3	15 kDa	Control de proteína total

4.3. Extracción de proteínas

Con el fin de poner a punto la técnica y determinar las condiciones más óptimas de extracción de proteínas, se ensayaron, hasta 5 protocolos diferentes de extracción de proteínas. Las células, congeladas a -80°C , fueron descongeladas lentamente en hielo previo a la extracción de proteínas.

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

Además, se empleó el buffer **M-PER diluido 1:100** en agua destilada, al cual se añadieron los mismos inhibidores de proteasas mencionados. Este buffer no iónico facilitó la solubilización de las proteínas a partir del pellet de células resultante de centrifugar 10 minutos a 2500 nrpm. El pellet es resuspendido al 1:100 en M-PER y mezclado en agitación suave durante 10 minutos. Posteriormente, se realiza una centrifugación a 13,000 rpm durante 15 minutos para obtener lisados celulares clarificados. De nuevo, se descartó el pellet y se transfirió el sobrenadante a un eppendorf de 1.5 mL.

Para evaluar el efecto de la sal en la extracción de proteínas y aumentar la concentración del extracto de proteínas, se preparó una solución de **M-PER diluida 1:1** con agua destilada y 150 mM de NaCl, complementada con inhibidores de proteasas. Esta modificación del

4 MATERIALES Y MÉTODOS

protocolo buscaba mejorar la solubilización y recuperación de proteínas específicas, utilizando condiciones similares de incubación y centrifugación a 13,000 rpm durante 15 minutos en frío.

Como control adicional, se realizó una extracción de proteínas utilizando **M-PER diluido 1:100** en agua destilada sin la adición de inhibidores de proteasas. Este protocolo permitió evaluar la estabilidad de las proteínas en ausencia de protección contra la degradación proteolítica, utilizando condiciones idénticas de incubación y centrifugación a los protocolos anteriores.

Finalmente, se llevó a cabo la extracción de proteínas mediante el método de **SDS-PAGE**. Los tejidos fueron homogeneizados en buffer de carga para SDS-PAGE que incluye Tris-HCl pH 6.8, SDS, glicerol y dithiothreitol fresco (DTT). Después de la homogeneización y desnaturalización de las proteínas mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos, las muestras fueron centrifugadas brevemente (5-10 minutos) para eliminar los restos celulares y se utilizó el sobrenadante para la carga en geles de SDS-PAGE.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo estrictos controles de temperatura y utilizando equipo estéril para prevenir la contaminación cruzada. Los lisados celulares clarificados se almacenaron a -80°C para garantizar la estabilidad de las proteínas hasta el momento del análisis.

4.4. Western Blot

Los extractos proteicos fueron analizados mediante Western Blot empleando 2 tipos de geles: geles en gradiente (NZY Tris-Glycine Precast Gel, 4-15 %, 12 wells) y geles al 8 % (Stacking Gel: 2.082 mL Acrilamida/Bisacrilamida 30 %; 3.125 mL Stacking; 7.292 mL Agua; 62.5 µL PSA; 12.5 µL Temed. Separating: 10 mL Acrilamida/Bisacrilamida 30 %; 9.375 mL Separating; 18.125 mL Agua; 125 µL PSA; 25 µL Temed).

Las muestras independientemente del tipo de extracción empleado, se calentaron a 95°C durante 5 minutos y luego se centrifugaron a 13,000 x g durante 10 minutos para eliminar cualquier residuo antes de la carga en el gel.

Cada muestra, se cargó en el gel para permitir la posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizaron 3 µl de EZ-RUN™ Pre-Stained Rec Protein Ladder 1kb (Thermo-Fisher Scientific) como marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó, siguiendo las indicaciones para los geles comerciales, a 100 V constantes durante 1,5-2 horas y a temperatura ambiente en un buffer de migración compuesto por 100 mM Tris, 100 mM Tricina y 0.1 % SDS (pH 8.3).

Posteriormente, se efectuó la transferencia de proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia en húmedo. Tanto el gel como la membrana se empaparon previamente en un buffer de transferencia 10X (30.3 g Tris, 144.1 g Glicina, 20 % SDS), y se intercalaron firmemente entre esponjas y papel absorbente Whatman® (Fisher Scientific™).

El montaje tipo sándwich se sumergió en un tanque de transferencia que contenía el buffer de transferencia 1X (preparado con buffer de transferencia 10X, agua y metanol) y un bloque de hielo, aplicando una corriente eléctrica constante de 400 mA durante 45 minutos. Este proceso aseguró una transferencia eficiente de las proteínas desde el gel a las membranas, permitiendo la posterior detección de las proteínas de interés mediante la incubación con los anticuerpos específicos.

Tras la transferencia, con el fin de poder visualizar la correcta carga y transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, se realizó una tinción general por Ponceau, durante 10 minutos en agitación. Esta tinción permitió comprobar el estado de la membrana y realizar los cortes necesarios para la incubación con el anticuerpo primario correspondiente a la banda de proteína de ensayo.

Una vez cortada la membrana, la tinción por Ponceau fue lavada empleando PBS-Tween20 (1 mL Tween20, 100 mL PBS 10X, 900 mL H₂O).

Tras ello, la membrana fue bloqueada empleando leche (2 gr Nonfat dried milk powder, PanReac AppliChem; 100 mL PBS-T), a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación.

Los anticuerpos primarios (Tabla 4.1) fueron diluidos inicialmente en una proporción de 1:1000 en solución de leche, con el objetivo de realizar el ensayo. Posteriormente, la concentración de los anticuerpos fue ajustada en función de los resultados obtenidos. Tras el bloqueo de la membrana con leche, se incubó la membrana durante toda la noche con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés.

Después de la incubación nocturna de las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo primario, se llevaron a cabo tres lavados consecutivos utilizando PBS-T, con una duración de 10 minutos cada uno. Posteriormente, las membranas se incubaron nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación, utilizando un anticuerpo secundario que reconociera al anticuerpo primario empleado. Exceptuando el caso de la nucleolina, donde se utilizó un anticuerpo anti-ratón, el resto de las proteínas fueron incubadas con un anticuerpo anti-conejo (Tabla 4.1).

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se procedió a realizar tres lavados adicionales de 10 minutos cada uno, utilizando PBS-T y manteniendo la agitación. Una vez completados los lavados, los resultados fueron revelados utilizando el sistema ImageQuant LAS 4000 mini. Los reactivos de revelado utilizados fueron ECL Select Peroxide Solution y ECL Select Luminol Solution, empleados en proporción 1:1.

5 RESULTADOS

5.1. Puesta a punto del sistema Western Blot para las proteínas del análisis

Tras realizar y comparar los múltiples métodos de extracción de proteínas mencionados anteriormente, los resultados experimentales destacan a la extracción mediante SDS-PAGE con DTT como el método más efectivo y sencillo de los ensayados. Las muestras tratadas con SDS-PAGE mostraron una mayor calidad en la resolución de las bandas, con una señal más nítida y definida en comparación con las obtenidas mediante las variantes que empleaban los tampones M-PER o NET. Además, este método facilitó la obtención de proteínas de mayor integridad, lo que se tradujo en una mejor capacidad para detectar y cuantificar las proteínas de interés.

Estas observaciones sugieren que el método de extracción con SDS-PAGE no solo es el método más eficiente para la extracción de proteínas en este contexto específico, sino que también simplifica el proceso experimental, reduciendo la necesidad de pasos adicionales y minimizando el riesgo de degradación proteica. Por lo tanto, se seleccionó como el método estándar para la extracción de proteínas en los experimentos posteriores, asegurando la reproducibilidad y fiabilidad en la validación de los datos proteómicos obtenidos en el estudio del síndrome de Cornelia de Lange (Figura 5.1; Tabla 5.1).

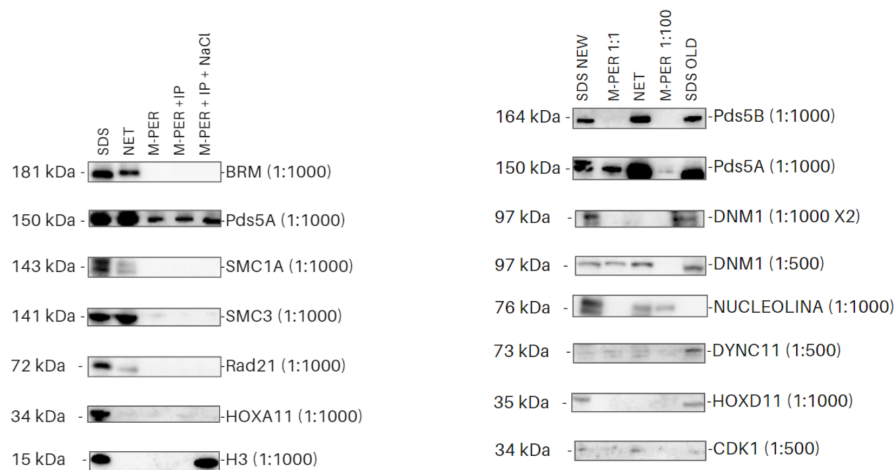


Figura 5.1: **Comparación de los resultados obtenidos por Western blot para diversos métodos de extracción de proteínas.** Todas las extracciones partieron de una alícuota de fibroblastos comerciales de la línea HDFa. Las condiciones de carga y revelado fueron idénticas para cada una de las metodologías.

5.1 Puesta a punto del sistema Western Blot para las proteínas del análisis

Cuadro 5.1: **Concentraciones de los anticuerpos empleados para el ensayo Western Blot** Se reflejan todas las proteínas de interés junto con el peso molecular de cada una de ellas, la concentración de anticuerpo primario empleado y la concentración de anticuerpo secundario.

Proteína diana	Peso Molecular	Concentración Anticuerpo 1º	Concentración Anticuerpo 2º
BRM	181 kDa	1:1000	1:10000
PdS5B	164 kDa	1:1000	1:10000
PdS5A	150 kDa	1:1000	1:10000
SMC1A	143 kDa	1:1000	1:10000
SMC3	141 kDa	1:1000	1:10000
DNM1	97 kDa	1:500	1:10000
Nucleolina	76 kDa	1:1000	1:20000
DYNC11	73 kDa	1:500	1:10000
Rad21	72 kDa	1:1000	1:10000
HOXD11	35 kDa	1:1000	1:10000
CDK1	34 kDa	1:500	1:10000
HOXA11	34 kDa	1:1000	1:10000
H3	15 kDa	1:1000	1:10000

5 RESULTADOS

5.2. Validación de los datos proteómicos

Para confirmar la validez de los datos proteómicos obtenidos en este estudio, se realizó el ensayo de Western Blot por triplicado, lo que asegura la reproducibilidad y la fiabilidad de los resultados obtenidos. La realización del ensayo en triplicado permite minimizar el impacto de posibles variaciones experimentales, ofreciendo una base estadística sólida para la interpretación de los resultados (Figura 5.2).

Tras el procesamiento y análisis cuantitativo de imágenes de Western Blot, los datos fueron normalizados empleando como referencia los controles de carga, permitiendo comparar de manera precisa las expresiones de las proteínas de interés entre las muestras de pacientes con CdLS y los controles sanos.

Una vez normalizados los datos, se calcularon las medias y desviaciones estándar para cada grupo experimental (Figura 5.3) y se realizó un análisis estadístico para determinar la significancia de las diferencias observadas, calculando el p-valor.

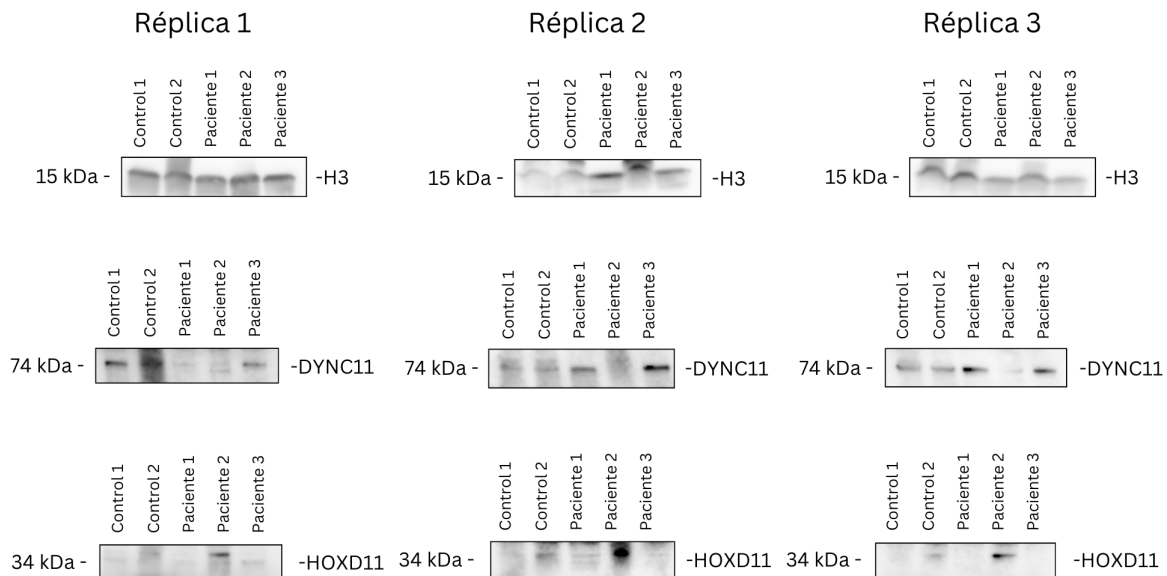


Figura 5.2: Resultados del Western Blot para cada una de las proteínas de ensayo en las 3 réplicas realizadas.

5.2 Validación de los datos proteómicos

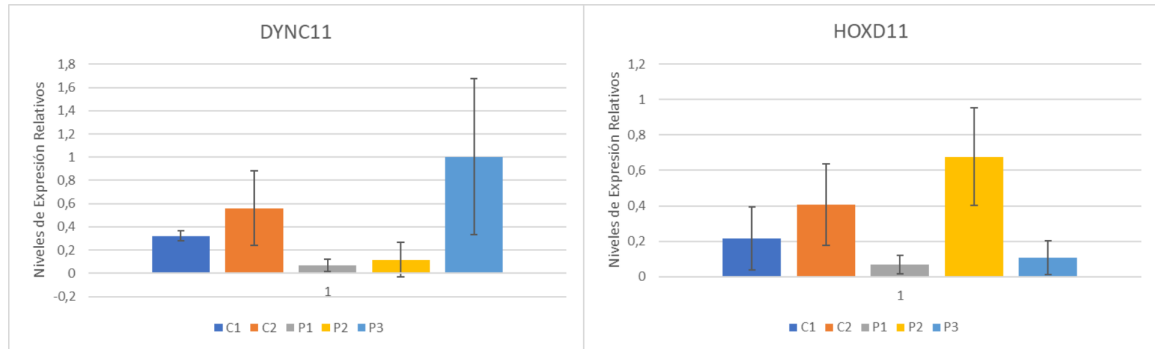


Figura 5.3: **Comparación de la expresión proteica entre pacientes con CdLS y controles sanos.** El gráfico de barras muestra las medias y desviaciones estándar de la expresión proteica de DYNC11 y HOXD11, normalizadas con respecto a los controles de carga. Debido a las grandes diferencias entre el Paciente 2 y los Pacientes 1 y 3, este fue excluido en el análisis estadístico. El p-valor obtenido para ambos genes fue de 0.7743 y 0.2843. De acuerdo con el criterio convencional, las diferencias de expresión no son estadísticamente significativas.

6 DISCUSIÓN

El trabajo previo realizado por el grupo de investigación dirigido por la doctora Ethel Queralt y que queda resaltado en los antecedentes del presente trabajo, sugiere que las mutaciones patogénicas de NIPBL en pacientes de Cornelia de Lange da lugar a la afectación de sus funciones independientes de la división celular, como la regulación de la topología de la cromatina por la formación de bucles de DNA. Esta disfunción estaría afectando a la expresión de algunas familias de genes, que estarían directamente relacionadas con los síntomas de la enfermedad. Con el fin de desarrollar la hipótesis propuesta, se realizaron estudios genómicos que demostraron variaciones significativas con respecto a individuos sanos, medidas en concentración de mRNA, para diversos genes implicados en el desarrollo físico y mental. Por otro lado, en el presente trabajo se lleva a cabo un estudio proteómico para determinar si las diferencias encontradas a nivel genómico se ven también representadas en el proteoma de los pacientes con CdLS, ampliando nuestra comprensión de la enfermedad, los mecanismos afectados y determinando posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de los síntomas más devastadores de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio no mostraron las diferencias esperadas en la expresión proteica entre los pacientes con Síndrome de Cornelia de Lange y los controles sanos. A pesar de los esfuerzos realizados, varios factores limitantes contribuyeron a la obtención de resultados que no coinciden con las hipótesis planteadas inicialmente.

En primer lugar, la inespecificidad de los resultados obtenidos, junto con la incapacidad de detección en alguna de las muestras, son un indicativo de la necesidad de emplear anticuerpos validados, con una mayor especificidad y umbral de detección. El empleo de anticuerpos no validados ha podido influir en los resultados obtenidos para las proteínas de interés.

Además, la traducción de los resultados obtenidos en la fase de puesta a punto utilizando fibroblastos comerciales no fue directa ni consistente cuando se aplicó a los fibroblastos derivados de muestras de pacientes y controles. La calidad en la detección de las proteínas mediante Western Blot observada en la fase preliminar no se replicó en las muestras clínicas, lo que sugiere que existen variaciones intrínsecas entre estos dos tipos celulares y que los anticuerpos no cuentan con la especificidad necesaria para su empleo en muestras más complejas. Los fibroblastos comerciales, aunque útiles para la optimización de protocolos, pueden no reflejar con precisión las características biológicas de los fibroblastos obtenidos de pacientes con CdLS, lo que compromete la validez de la extrapolación de estos resultados.

La falta de consistencia en los resultados también podría estar relacionada con la heterogeneidad clínica y genética de los pacientes con CdLS, que presentan un espectro amplio de síntomas y mutaciones. Esta variabilidad fenotípica puede influir en la expresión proteica y generar resultados divergentes que no fueron detectados o correctamente interpretados en este estudio debido a las limitaciones de tiempo y metodología.

Por otra parte, se observa como la muestra del paciente número 2 sigue un patrón de expresión contrario a lo esperado, destacando frente al resto de pacientes. Estas diferencias

de expresión también pueden deberse a diferencias en la procedencia de las células empleadas, al no haber consenso en la metodología de muestreo.

Otro aspecto importante a considerar es la técnica de Western Blot utilizada en este estudio. Aunque es una herramienta ampliamente utilizada para la detección de proteínas, su dependencia de anticuerpos específicos y la necesidad de condiciones experimentales óptimas para cada proteína pueden haber contribuido a los resultados inconsistentes. Además, la falta de tiempo para ajustar y validar adecuadamente las condiciones para cada proteína de interés probablemente influyó en la calidad de los datos obtenidos.

Añadido a las dificultades descritas, también se deben tener en cuenta las propias limitaciones del estudio.

En primer lugar, el tamaño de la muestra utilizada fue relativamente pequeño, lo que puede limitar la potencia estadística del estudio y la capacidad para detectar diferencias más sutiles en la expresión proteica entre los grupos de pacientes con CdLS y los controles sanos. Un número limitado de muestras puede incrementar la susceptibilidad a variaciones aleatorias y reducir la representatividad de la población afectada por el síndrome. Pese a tratarse de una enfermedad rara, lo cual dificulta la obtención de muestras para su análisis, futuros estudios deberían considerar la inclusión de cohortes más amplias y diversas, lo que permitiría una evaluación más robusta y generalizable de las alteraciones proteómicas asociadas con el CdLS.

Además, la heterogeneidad clínica y genética entre los pacientes con CdLS representa otra limitación importante. El CdLS es un síndrome con manifestaciones clínicas altamente variables, y las mutaciones en NIPBL pueden resultar en fenotipos de distinta severidad. Esta variabilidad puede influir en la expresión proteica y complicar la identificación de patrones consistentes entre diferentes individuos. Es necesario realizar estudios adicionales que estratifiquen a los pacientes según características clínicas y genéticas específicas, permitiendo así comprender mejor cómo diferentes mutaciones y presentaciones clínicas afectan el perfil proteómico.

Así como la heterogeneidad entre los pacientes de CdLS puede haber afectado a los resultados del estudio, las diferencias dentro del grupo de muestras empleadas como control también da lugar a problemas a la hora de realizar las comparaciones entre muestras y obtener los estadísticos que validarían los resultados obtenidos. De acuerdo con los resultados descritos en la figura 5.3, la mayor variabilidad encontrada se observa dentro del grupo de los controles, muestras que son obtenidas de pacientes sanos y que deberían dar lugar a resultados similares.

Por otra parte, las fuentes de las muestras utilizadas, específicamente los fibroblastos dérmicos, también pueden presentar limitaciones en cuanto a la extrapolación de los resultados a otros tipos de tejidos. Dado que el CdLS afecta múltiples sistemas y órganos, las alteraciones proteómicas observadas en fibroblastos pueden no reflejar completamente los cambios presentes en otros tejidos relevantes, como el sistema nervioso central o el sistema cardiovascular. La inclusión de diferentes tipos celulares y tejidos en futuros análisis proteómicos proporcionaría una visión más completa de los mecanismos moleculares subyacentes al síndrome.

En términos metodológicos, aunque el Western Blot es una técnica ampliamente utilizada y confiable para la detección y cuantificación de proteínas, presenta ciertas limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad. La detección de proteínas de baja abundancia o con modificaciones postraduccionales puede ser desafiante, y la dependencia de anticuerpos específicos puede introducir sesgos si estos no son completamente específicos o si presentan

6 DISCUSIÓN

reactividad cruzada.

Asimismo, la naturaleza transversal del estudio proporciona una instantánea estática de las alteraciones proteómicas, sin abordar cómo estas pueden variar en diferentes etapas del desarrollo o progresión de la enfermedad. Estudios longitudinales que monitoreen los cambios en la expresión proteica a lo largo del tiempo serían valiosos para entender la dinámica de la enfermedad y la evolución de las alteraciones moleculares asociadas.

Finalmente, factores ambientales y epigenéticos, que pueden influir significativamente en la expresión génica y proteica, no fueron considerados en este estudio. Elementos como la dieta, el estrés, la exposición a toxinas y otros factores externos pueden modular la expresión proteica y potencialmente interactuar con las mutaciones genéticas presentes. Investigaciones futuras deberían incorporar la evaluación de estos factores para obtener una comprensión más integral de cómo interactúan con las alteraciones genéticas en el CdLS.

Sin embargo, a pesar de que los resultados no cuentan con suficiente poder estadístico para su aprobación, la tendencia observada para los pacientes 1 y 3 sí sigue el patrón esperado, con una mayor expresión frente a los controles para la proteína codificada por el gen *DYNC11* y menor expresión para la proteína codificada por el gen *HOXD11*. Los resultados no concluyentes pueden deberse al número limitado de muestras estudiadas, así como a la amplia variación dentro de las muestras empleadas como control.

Reconocer y abordar estas limitaciones es esencial para orientar futuras investigaciones y mejorar la comprensión de los mecanismos patogénicos del CdLS. La implementación de estudios con diseños más complejos y métodos analíticos avanzados contribuirá a validar y expandir los hallazgos presentados, acercándonos cada vez más a estrategias diagnósticas y terapéuticas más efectivas para los pacientes afectados por este síndrome.

7 CONCLUSIÓN

Este estudio, centrado en la exploración del perfil proteómico en pacientes con Síndrome de Cornelia de Lange, ha enfrentado varios desafíos que han impactado en la obtención de resultados concluyentes. A pesar de los esfuerzos realizados, los resultados no mostraron las diferencias esperadas en la expresión proteica entre los pacientes y los controles sanos, lo que subraya la complejidad de este tipo de investigaciones y la importancia de considerar diversas variables experimentales.

Las dificultades encontradas, como la falta de tiempo suficiente para la optimización de los ensayos y la variabilidad en la traducción de los resultados obtenidos con fibroblastos comerciales frente a los fibroblastos derivados de pacientes, han proporcionado valiosas lecciones para futuros estudios. Estas limitaciones han revelado que la obtención de resultados fiables y reproducibles requiere no solo de un diseño experimental sólido, sino también de un marco de tiempo adecuado que permita realizar los ajustes necesarios y validar los métodos empleados.

Aunque los resultados no corroboraron las hipótesis iniciales, el estudio ha resaltado la importancia de utilizar modelos celulares que reflejen de manera más precisa las condiciones clínicas reales. La discrepancia observada entre los resultados obtenidos con fibroblastos comerciales y los de pacientes subraya la necesidad de desarrollar y aplicar métodos que consideren las características específicas de las muestras clínicas. Este hallazgo es crucial para mejorar la interpretación de los datos y para avanzar en la investigación sobre CdLS.

Además, la experiencia adquirida sugiere que la combinación de técnicas proteómicas tradicionales, como el Western Blot, con enfoques más avanzados, como la espectrometría de masas, podría ofrecer una visión más completa y precisa de los cambios proteómicos asociados al CdLS. La implementación de estas técnicas complementarias en futuros estudios permitirá una cuantificación más precisa y una mejor identificación de las proteínas involucradas en la patogénesis de la enfermedad.

A pesar de los resultados no concluyentes, los conocimientos adquiridos sobre las limitaciones técnicas y metodológicas son un paso adelante en la búsqueda de una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares subyacentes al CdLS. Estos aprendizajes proporcionan una base sólida para la mejora de los enfoques experimentales y para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas más efectivas en el futuro. Aunque aún queda mucho por descubrir, este trabajo ha establecido una base crítica para las investigaciones venideras, que podrán construir sobre las lecciones aprendidas y avanzar hacia una mejor comprensión y tratamiento del Síndrome de Cornelia de Lange.

8 BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Gil, D., Cuadrado, A., Giménez-Llorente, D., Rodríguez-Corsino, M., Losada, A. (2023). Different NIPBL requirements of cohesin-STAG1 and cohesin-STAG2. *Nature Communications*, 14(1), 1326. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36900-7>

Barisic, I., Tokic, V., Loane, M., Bianchi, F., Calzolari, E., Garne, E., Wellesley, D., Dolk, H.; EUROCAT Working Group. (2008). Descriptive epidemiology of Cornelia de Lange syndrome in Europe. *American Journal of Medical Genetics A*, 146A(1), 51-59. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.320>

Brachmann, W. (1916). Ein Fall von symmetrischer Monodaktylie durch Ulnadefekt, mit symmetrischer Flughautbildung in den Ellenbeugen, sowie anderen Abnormalitäten. *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, 84, 225-235.

Boyle, M. I., Jespersgaard, C., Brøndum-Nielsen, K., Bisgaard, A. M., Tümer, Z. (2015). Cornelia de Lange syndrome. *Clinical Genetics*, 88(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/cge.12499>

Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., Shevchenko, A., Nasmyth, K. (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Molecular Cell*, 5(2), 243-254. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80420-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80420-7)

de Lange, C. (1933). Sur un type nouveau de degenerescence (typus Amstelodamensis). *Archives de Médecine des Enfants*, 36, 713-719.

Garcia, P., Fernandez-Hernandez, R., Cuadrado, A., Coca, I., Gomez, A., Maqueda, M., Latorre-Pellicer, A., Puisac, B., Ramos, F. J., Sandoval, J., Esteller, M., Mosquera, J. L., Rodriguez, J., Pié, J., Losada, A., Queralt, E. (2021). Disruption of NIPBL/Scc2 in Cornelia de Lange Syndrome provokes cohesin genome-wide redistribution with an impact in the transcriptome. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24808-z>

Guacci, V., Koshland, D., Strunnikov, A. (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell*, 91, 47-57. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)80008-8)

Ishiguro, K. I. (2019). The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes to Cells*, 24(1), 6-30. <https://doi.org/10.1111/gtc.12652>

Kean, C. M., Tracy, C. J., Mitra, A., Rahat, B., Van Winkle, M. T., Gebert, C. M., Noeker, J. A., Calof, A. L., Lander, A. D., Kassiss, J. A., Pfeifer, K. (2022). Decreasing Wapl

dosage partially corrects embryonic growth and brain transcriptome phenotypes in *Nipbl*^{+/-} embryos. *Science Advances*, 8(48), eadd4136. <https://doi.org/10.1126/sciadv.add4136>

Kline, A. D., Moss, J. F., Selicorni, A., Bisgaard, A. M., Deardorff, M. A., Gillett, P. M., Ishman, S. L., Kerr, L. M., Levin, A. V., Mulder, P. A., Ramos, F. J., Wierzba, J., Ajmone, P. F., Axtell, D., Blagowidow, N., Cereda, A., Costantino, A., Cormier-Daire, V., FitzPatrick, D., ... Hennekam, R. C. (2018). Diagnosis and management of Cornelia de Lange syndrome: first international consensus statement. *Nature Reviews Genetics*, 19(10), 649-666. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0031-0>

Liu, H., Rankin, S., Yu, H. (2013). Phosphorylation-enabled binding of SGO1-PP2A to cohesin protects sororin and centromeric cohesion during mitosis. *Nature Cell Biology*, 15, 40-49. <https://doi.org/10.1038/ncb2637>

Losada, A. (2014). Cohesin in cancer: Chromosome segregation and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 14(6), 389-393. <https://doi.org/10.1038/nrc3743>

Mannini, L., Cucco, F., Quarantotti, V., Krantz, I. D., Musio, A. (2013). Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation in Cornelia de Lange syndrome. *Human Mutation*, 34, 1589-1596. <https://doi.org/10.1002/humu.22430>

Murayama, Y., Uhlmann, F. (2014). Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature*, 505, 367-371. <https://doi.org/10.1038/nature12867>

Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A. A., Mechtler, K., Peters, J. M. (2010). Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell*, 143(5), 737-749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.031>

Nishiyama, T., Sykora, M. M., Huis in 't Veld, P. J., Mechtler, K., Peters, J. M. (2013). Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 13404-13409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305020110>

Remeseiro, S., Losada, A. (2013). Cohesin, a chromatin engagement ring. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(1), 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.013>

Sedeño Cacciatore, Á., Rowland, B. D. (2019). Loop formation by SMC complexes: turning heads, bending elbows, and fixed anchors. *Current Opinion in Genetics Development*, 55, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.04.010>

Waldman, T. (2020). Emerging themes in cohesin cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 20, 504-515. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0270-1>

Xiang, S., Koshland, D. (2021). Cohesin architecture and clustering in vivo. *Elife*, 10, e62243. <https://doi.org/10.7554/eLife.62243>