



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Cristina
de la Parte Rodriguez

Tesis doctoral

Estudio de la función de TET2 a
través de sus interactores en
pluripotencia y envejecimiento

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Medicina Molecular

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE TET2 A TRAVÉS DE SUS INTERACTORES EN PLURIPOTENCIA Y ENVEJECIMIENTO

Autor

Cristina de la Parte Rodriguez

Director: Diana Guallar Artal y Miguel Ángel Fidalgo Pérez

Tutor/a: Diana Guallar Artal

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES Y AUTORÍA DE LOS DATOS PRESENTADOS

Cristina de la Parte Rodriguez declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la presente tesis doctoral.

Por la presente, la doctoranda declara la completa autoría de todas las imágenes y figuras mostradas en la tesis.

En Santiago de Compostela, 20 de mayo de 2024

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, la investigación en los grupos de la Dra. Diana Guallar y el Dr. Miguel Fidalgo fue respaldada financieramente por la Agencia Estatal de Investigación (RTI2018-096708-J-I00, PID2022-136608OB-I00/FEDER, BFU2016-80899-P y PID2019-105739GN-I00), además de una ayuda Ramón y Cajal (RYC2019-027305-I) otorgada a la Dra. Guallar. Por otro lado, también fue apoyada por una ayuda de la Xunta de Galicia (ED431F 2022/011) y otra de la Fundación Ramón Areces (CIVP21A7026) concedidas a la Dra. Guallar. A lo largo de este periodo, Cristina de la Parte Rodríguez fue beneficiaria de un ayuda de apoyo a la etapa predoctoral de la Xunta de Galicia (ED481A-2020/187), que incluía una ayuda de movilidad para estancias breves de sus beneficiarios.

AGRADECIMIENTOS

Tras un largo y duro camino aquí estoy, resumiendo en estas páginas lo que han sido estos últimos 5 años. Parecía tan lejano y ahora echando la vista atrás se ha pasado demasiado rápido. Han sido años llenos de momentos bonitos, pero también momentos difíciles. La tesis doctoral ha sido un gran reto intelectual, físico y mental que me ha empujado a mejorar y a lograr una versión de mí misma que me asombra. Creo que la expresión “ha costado sangre, sudor y lágrimas” aplica bastante bien. Pero este camino no lo he recorrido sola, y estas líneas son para agradecer a toda esa gente que me ha guiado, me ha apoyado y animado, o me ha acompañado en estos años.

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, la doctora Diana Guallar y el doctor Miguel Fidalgo por la oportunidad, las enseñanzas y consejos, la paciencia y el trabajo de dirección. Vuestro trabajo como investigadores ha sido una gran inspiración, y vuestro conocimiento me ha guiado a lo largo de estos años hasta alcanzar este manuscrito. Gracias por hacerme mejorar cada día y formarme como investigadora. Gracias a vuestra ayuda y dirección he progresado enormemente como científica en estos años, y he logrado cosas que me parecían impensables. Gracias por todo.

Durante el desarrollo de la tesis he tenido la gran suerte de tener un gran grupo a mi alrededor, con compañeros que puedo llamar amigos. Gracias a Tiago, Vera, Adriana, Lucía, Helena, Adrián, David, Alba, Álex, Cris, Parda y Yara. Vuestro apoyo y ayuda han sido indispensables. Hemos pasado grandes momentos juntos, dentro y fuera del laboratorio, que sin duda han hecho más fáciles estos años. Tiago, es una gran suerte tenerte de compañero y amigo. Eres un ser de luz, tu bondad y amabilidad son indescriptibles. Junto con Germán habéis sido un grandísimo apoyo a lo largo de estos años, especialmente en los momentos más complicados. Gracias por las infinitas horas en la casa del pueblo y las excursiones por Galicia que me han hecho tan feliz a lo largo de esta tesis. Vera, Lucía y Adriana, con vosotras al lado estos años los dramas han sido menos dramas, y habéis hecho que me lleve muchos recuerdos bonitos de esta etapa. Helena además de grandísima ayuda científica y personal, has sido una gran motivación en muchos momentos a lo largo de esta tesis. Adrián, a pesar de que coincidimos poco tiempo en el lab es como si hubieses estado varios años. David eres un gran compañero, siempre atento y dispuesto a ayudar, gracias por tu ayuda inestimable con los análisis bioinformáticos. Alba, gracias por ser un remolino de energía capaz de contagiar a todo el laboratorio.

En mi tercer año, tuve la inmensa suerte de hacer una estancia de 3 meses en Ciudad de México. Aunque corta, fue una experiencia extraordinaria. Disfruté inmensamente de la oportunidad de trabajar en algo completamente nuevo, así como de explorar un país y una cultura que me han encantado y que siempre recordaré con especial cariño. Me gustaría agradecer al doctor Julián Valdés, por la oportunidad, por acogerme en su laboratorio durante ese tiempo, por la inmensa hospitalidad y amabilidad. Trabajar en tu laboratorio fue enriquecedor científica y personalmente. Gracias a todo el lab por acogerme tan bien, en especial a Itzel, Mariana y Jaqui, me hicisteis sentir como en casa. Nallely, estaré eternamente agradecida contigo, por acompañarme dentro y fuera del laboratorio. Gracias por tu ayuda cuando llegué y estaba tan perdida, y gracias por tantísimos momentos juntas. Siempre tendréis una amiga y una casa en España.



Alba, eres como mi hermana desde hace más de media vida. Es tan especial conseguir objetivos juntas y ver dónde hemos llegado. Gracias por alegrarte siempre de mis logros como si fuesen tuyos. Eres la mejor amiga que se puede tener, eres amistad y lealtad y solo puedo agradecerte por estar a mi lado siempre.

María, has sido un grandísimo apoyo desde que te conocí, y le doy gracias al destino por juntarnos una y otra vez, primero en Ljubljana, luego en Santiago y ahora en Bilbao. Gracias por acompañarme siempre y animarme a *acer la cencia*.

Julia y Raquel con vosotras empecé mi aventura por Santiago, y qué bonito que tantos años después todo siga así. Os admiro muchísimo como científicas, pero más aún como amigas.

A mis nuevos compañeros de Biofísica. Habéis vivido/sufrido estos últimos meses de tesis conmigo, gracias por animarme cuando más lo he necesitado y hacerme reír hasta cuando no tenía ganas. Espero que esta sea la primera de muchas celebraciones juntos.

Por último y más importante, gracias a mi familia. Vosotros sois todo lo que importa en la vida; los valores, el amor y la unión. Mi casa siempre estará junto a vosotros, da igual en qué esquina del mundo me encuentre. A mis hermanos, que siempre habéis sido un modelo a seguir para mí. Somos tan distintos que parece que cada uno de nosotros somos de un planeta diferente, y, aun así, siempre estamos los unos para los otros. Gracias por guiar siempre mis pasos, y ser un referente para mí. A mis padres, por ser el viento bajo mis alas. Siempre me habéis apoyado en cada una de mis decisiones, habéis secado mis lágrimas y me habéis levantado en cada caída. Me enseñasteis la importancia del esfuerzo y el trabajo duro, y a tener la determinación de lograr mis objetivos y mis sueños. Vosotros me habéis impulsado a llegar hasta aquí, y sin vuestro apoyo constante y paciencia inagotable nada de esto habría sido posible. Todos mis logros son también vuestros. Sois las personas que más admiro en la vida, por vuestro trabajo duro, los valores que me habéis inculcado, y por vuestro amor y cariño. Y a mi compañero de vida, Ismael. Gracias por estar a mi lado día a día, celebrando los buenos momentos y dándome la mano frente a los momentos menos buenos. Tu ánimo, tu apoyo y tu paciencia a lo largo de este camino, especialmente en los últimos meses, han sido absolutamente indispensables. Juntos somos el mejor equipo y cualquier aventura es mucho más fácil juntos. Familia, no tengo palabras para describir lo muchísimo que os quiero y lo importantes que sois en mi vida.

Me siento afortunada de haber tenido tanta gente a mi lado a lo largo de este camino para ayudarme y apoyarme. Os quiero y os admiro. Gracias por hacerlo posible.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	12
2. RESUMO	14
3. ABSTRACT.....	16
4. INTRODUCCIÓN	18
4.1 ENVEJECIMIENTO Y REJUVENECIMIENTO.....	19
4.1.1 Características del envejecimiento.....	19
4.1.2 Modelos para el estudio del envejecimiento	20
4.1.3 Estrategias de rejuvenecimiento	22
4.1.3.1. Reprogramación somática celular	22
4.1.4 El estado celular pluripotente como paradigma de estado celular joven	23
4.2 REGULACIÓN EPIGENÉTICA Y EPITRANSCRIPTÓMICA EN EL ENVEJECIMIENTO	24
4.2.1 Alteraciones epigenéticas asociadas al envejecimiento	24
4.2.2 Alteraciones epitranscriptómicas asociadas al envejecimiento	27
4.3 FAMILIA DE PROTEÍNAS TET	29
4.3.1 Funciones de las proteínas TET	30
4.3.2 TET2 y 5-hidroximetilcitosina.....	30
4.3.2.1. Funciones de TET2 en ADN y ARN	31
4.3.2.2. Papel de TET2 y 5-hidroximetilcitosina en pluripotencia <i>in vitro</i> y diferenciación celular	31
4.3.2.3. TET2 y 5-hidroximetilcitosina en envejecimiento y rejuvenecimiento	32
4.4 COMPLEJO INTEGRATOR	34
4.4.1 Estructura del complejo Integrator.....	34
4.4.2 Funciones del complejo Integrator.....	36
4.4.3 Alteración de la función del complejo Integrator y enfermedad	36
4.4.4 Modularidad del complejo. Funciones independientes del complejo Integrator	37
4.4.5 INTS4.....	37
5. OBJETIVOS.....	38
6. MATERIAL Y MÉTODOS	40
6.1 REACTIVOS Y KITS	41
6.2 LÍNEAS CELULARES	41
6.3 CULTIVO CELULAR.....	42
6.3.1 Derivación de fibroblastos de orejas y colas de ratón.....	42
6.3.2 Cultivo celular.....	42

6.4 CLONAJE	43
6.4.1 Clonaje de regiones codificantes de proteínas en plásmidos PiggyBac.	43
6.4.2 Clonaje de shARNs en vectores lentivirales pLKO	43
6.4.3 Clonaje de guías de ARN para CRISPR/Cas9	44
6.5 TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN DE ADN	45
6.5.1 Transformación bacteriana	45
6.5.2 Extracción de ADN plasmídico.....	45
6.6 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	45
6.7 PRODUCCIÓN DE VIRUS Y TRANSDUCCIÓN.....	46
6.7.1 Generación de partículas virales.....	46
6.7.2 Transducción de células de mamífero	46
6.8 GENERACIÓN DE LÍNEAS KNOCK-OUT MEDIANTE CRISPR/CAS9	47
6.9 GENOTIPADO	47
6.9.1 Aislamiento de ADN genómico	47
6.9.2 Genotipado por PCR	47
6.10 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS	48
6.10.1 Extracción de ARN.....	48
6.10.2 Generación de ADN complementario	48
6.10.3 Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)	48
6.10.4 Entrecruzamiento e inmunoprecipitación seguida de qPCR (CLIP-qPCR).....	48
6.10.5 Espectrometría de masas	49
6.10.6 Secuenciación masiva de ARN y análisis	50
6.10.7 Análisis de ontología génica y vías de señalización KEGG	51
6.10.8 Análisis de enriquecimiento génico (GSEA)	51
6.11 ANÁLISIS DE PROTEINAS	51
6.11.1 Extracción de proteína.....	51
6.11.2 Fracciones proteicas subcelulares	51
6.11.3 Inmunoprecipitación de proteína.....	51
6.11.4 Western blot	52
6.11.5 Cuantificación de intensidad de señal	53
6.11.6 Deshibridación de la membrana	53
6.11.7 Inmunocitoquímica.....	53
6.11.8 Cuantificación de intensidad de fluorescencia y de morfología nuclear.....	54
6.12 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR.....	54

6.12.1 Proliferación por conteo.....	54
6.12.2 Ensayo de competición por citometría de flujo	54
6.13 TINCIÓN CON FOSFATASA ALCALINA	54
6.14 ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS	55
6.15 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CON ÁCIDO RETINOICO.....	55
6.16 ANÁLISIS DE CICLO CELULAR.....	55
6.17 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	56
6.18 C. elegans.....	56
6.18.1 Cepas.....	56
6.18.2 Cultivo y manejo.....	56
6.18.3 Sincronización.....	56
6.18.4 iARN en C. elegans.....	57
6.18.5 Ensayos de estrés por calor	57
6.18.6 Ensayos de fertilidad.....	57
6.18.7 Ensayos de longevidad.....	57
6.19 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	58
6.20 FUENTES BIBLIOGRÁFICAS	58
6.21 SOFTWARE Y ALGORITMOS.....	58
7. RESULTADOS.....	59
7.1 CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS DE RATÓN COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO IN VITRO.....	60
7.1.1 Los fibroblastos primarios de ratón mantienen diferencias transcriptómicas asociadas al envejecimiento tras su cultivo <i>in vitro</i>	60
7.2 DETERMINACIÓN DE MODIFICACIONES DE ARN EN FIBROBLASTOS JÓVENES Y VIEJOS	62
7.2.1 La expresión de enzimas modificadoras de ARNm está alterada con el envejecimiento en fibroblastos de ratón.	62
7.2.2 Los niveles globales de m ⁵ C y hm ⁵ C en ARN ribodeplecionado no cambian con la edad.	63
7.3 CULTIVOS DE FIBROBLASTOS INMORTALIZADOS PARA EL ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO Y MODIFICACIONES DE ARN <i>IN VITRO</i>	65
7.3.1 El silenciamiento de <i>p53</i> en fibroblastos primarios generó líneas de fibroblastos inmortalizados.....	65
7.3.2 La immortalización de fibroblastos jóvenes y viejos afecta al fenotipo de envejecimiento	66

7.3.3 El silenciamiento de <i>p53</i> altera la expresión de reguladores epitranscriptómicos en fibroblastos	69
7.4 CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A ARN INTS4 A LAS FUNCIONES DE TET2 EN CÉLULAS JÓVENES	71
7.4.1 INTS4 es una la proteína interactora de TET2 en ESCs y está diferencialmente expresada con el envejecimiento.	71
7.4.2 <i>Ints4</i> y <i>Tet2</i> muestran patrones de expresión similares en varios tejidos y tipos celulares.....	72
7.4.3 La interacción de TET2 con INTS4 no depende de su región de unión a ARN.	75
7.4.4 La sobreexpresión ^{3xFL} INTS4 en mESCs afecta a la salida de pluripotencia.....	76
7.4.5 La pérdida de función de <i>Ints4</i> en ESCs es incompatible con la viabilidad celular....	81
7.4.6 La pérdida de función de <i>Ints4</i> provoca una desregulación de genes relacionados con daño en el ADN.....	88
7.4.7 INTS4 contribuye a la función de TET2 de represión de genes 2C en ESCs	90
7.4.8 INTS4 no contribuye a la función de TET2 en la regulación del estado pluripotente <i>naïve</i>	92
7.4.9 El complejo TET2-INTS4 podría tener un papel en la regulación de genes de reparación del ADN.....	93
7.5 ESTUDIO DE INTERACTORES DE TET2 Y ENZIMAS MODIFICADORAS DE ARN EN ENVEJECIMIENTO DE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	99
7.5.1 Elección de los genes candidatos para su estudio en <i>C. elegans</i>	99
7.5.2 Estudio de interactores de TET2 en envejecimiento de <i>C. elegans</i>	101
7.5.3 Estudio de enzimas modificadoras de ARN en envejecimiento de <i>C. elegans</i>	103
8. DISCUSIÓN	109
9. CONCLUSIONES.....	123
10. CONCLUSIONS	125
11. BIBLIOGRAFÍA	127
12. LISTA DE ABREVIATURAS.....	149
13. LISTA DE FIGURAS.....	153
14. APÉNDICES	157
Tabla suplementaria 1. Reactivos y químicos	158
Tabla suplementaria 2. Kits comerciales.....	160
Tabla suplementaria 3. Accesorios y fungible	161
Tabla suplementaria 4. Plásmidos	161
Tabla suplementaria 5. Anticuerpos	162
Tabla suplementaria 6. Oligonucleótidos	163

Tabla suplementaria 7. Expresión en envejecimiento de lo (28M vs 2M) de los interactores de TET2 identificados en células ESCs que tienen capacidad de unión a ARN (RBPs)....	164
Tabla Suplementaria 8. Interactomas de TET2 reportados en la literatura.....	168
Tabla Suplementaria 9. Lista de los 32 interactores de TET2 candidatos.	168

1. RESUMEN

El envejecimiento es el mayor factor de riesgo para una gran variedad de enfermedades. Se trata de un proceso fisiológico complejo del cual no se conocen por completo los mecanismos moleculares que lo causan. Mientras que las modificaciones epigenéticas han sido ampliamente estudiadas durante el envejecimiento, las modificaciones del ARN permanecen inexploradas en este contexto. El regulador epigenético y epitranscriptómico TET2 es clave en células jóvenes pluripotentes, así como durante el proceso de reprogramación celular somática, considerado el paradigma de rejuvenecimiento celular, sin embargo su papel en el envejecimiento aún se desconoce. En esta tesis doctoral, a través de un amplio espectro de técnicas experimentales, así como de modelos *in vitro* e *in vivo*, diseccionamos la función que desempeña TET2, y las proteínas de unión al ARN con las que interacciona, en el envejecimiento. Empleando fibroblastos de ratones jóvenes y viejos como modelo de envejecimiento *in vitro*, demostramos una regulación a la baja de *Tet2* con la edad, así como de su interactor *Ints4*. Generamos líneas de fibroblastos jóvenes y viejos inmortalizados mediante el silenciamiento de *p53* y comprobamos que su pérdida de función afecta tanto a marcadores de envejecimiento como a la expresión de reguladores epitranscriptómicos, descartando la validez de este modelo para nuestros estudios. Exploramos la función del complejo TET2-INTS4 en células jóvenes, donde proponemos un modelo que sugiere la implicación del complejo en la regulación de la reparación del ADN. Observamos que deficiencias tanto en *Tet2* como en *Ints4* causaron un incremento en los niveles de daño genómico. Finalmente, a través del organismo modelo *C. elegans* estudiamos el papel de proteínas interactoras de TET2, así como de reguladores epitranscriptómicos en el envejecimiento. En resumen, nuestros hallazgos no solo identifican una nueva función del dúo TET2-INTS4 en el mantenimiento de la integridad genómica en células jóvenes, que tendrá que ser explorada en el contexto del envejecimiento, sino que también identifican otras proteínas interactoras de TET2 como cruciales para el envejecimiento en nematodos. Este estudio representa un paso significativo hacia la comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes al envejecimiento y, potencialmente, hacia el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para abordar las enfermedades relacionadas con la edad.

2. RESUMO

O envellecemento é o maior factor de risco para unha gran variedade de enfermidades. É un proceso fisiolóxico complexo do que non se coñecen completamente os mecanismos moleculares que o provocan. Aínda que as modificacións epixenéticas foron amplamente estudadas durante o envellecemento, as modificacións do ARN seguen sen explorar neste contexto. O regulador epixenético e epitranscriptómico TET2 é clave nas células pluripotentes así como durante o proceso de reprogramación celular somática, considerado o paradigma do rexuvenecemento celular, maíus aínda se descoñece o seu papel no envellecemento. Nesta tese de doutoramento, a través dun amplo espectro de técnicas experimentais así como de modelos *in vitro* e *in vivo*, analizamos o papel que xoga TET2, e as proteínas de unión ao ARN coas que interactúa, no envellecemento. Usando fibroblastos de ratos novos e vellos como modelo de envellecemento *in vitro*, demostramos unha regulación á baixa de *Tet2* coa idade, así como o seu interactor *Ints4*. Xeramos liñas de fibroblastos novos e vellos inmortalizados silenciando *p53* e comprobamos que a súa perda de función afecta tanto aos marcadores de envellecemento como á expresión de reguladores epitranscriptómicos, descartando a validez deste modelo para os nosos estudos. Exploramos a función do complexo TET2-INTS4 en células novas, onde propoñemos un modelo que suxire a implicación do complexo na regulación da reparación do ADN. Observamos que as deficiencias tanto en *Tet2* como en *Ints4* provocaron un aumento dos niveis de dano xenómico. Finalmente, a través do organismo modelo *C. elegans* estudamos o papel das proteínas que interactúan con TET2, así como dos reguladores epitranscriptómicos no envellecemento. En resumo, os nosos descubrimentos non só identifican unha nova función do dúo TET2-INTS4 no mantemento da integridade xenómica en células novas, que terá que ser explorada no contexto do envellecemento, senón que tamén identifican outras proteínas que interactúan con TET2 como cruciais para o envellecemento. en nematodos. Este estudo supón un paso significativo cara a unha comprensión máis profunda dos mecanismos subxacentes ao envellecemento e, potencialmente, cara ao desenvolvemento de novas estratexias terapéuticas para abordar as enfermidades relacionadas coa idade.

3. ABSTRACT

Aging is the greatest risk factor for a wide variety of diseases. It is a complex physiological process of which the molecular mechanisms that cause it are not completely understood. While epigenetic modifications have been widely studied in aging, RNA modifications remain unexplored in this context. The epigenetic and epitranscriptomic regulator TET2 is key in pluripotent cells as well as during the process of somatic cellular reprogramming, considered the paradigm of cellular rejuvenation, however its role in aging is still unknown. In this doctoral thesis, through a wide spectrum of experimental techniques as well as *in vitro* and *in vivo* models, we dissect the role that TET2 plays, and the RNA binding proteins with which it interacts, in aging. Using fibroblasts from young and old mice as an *in vitro* aging model, we demonstrated a downregulation of *Tet2* with age, as well as its interactor *Ints4*. We generated lines of young and old fibroblasts immortalized by silencing *p53* and verified that its loss of function affects both aging markers and the expression of epitranscriptomic regulators, ruling out the validity of this model for our studies. We explore the function of the TET2-INTS4 complex in young cells, where we propose a model suggesting the involvement of the complex in the regulation of DNA repair. We observed that deficiencies in both *Tet2* and *Ints4* caused an increase in the levels of genomic damage. Finally, through the model organism *C. elegans* we studied the role of TET2 interacting proteins, as well as epitranscriptomic regulators in aging. In summary, our findings not only identify a novel function of the TET2-INTS4 duo in maintaining genomic integrity in young cells, which will have to be explored in the context of aging, but also identify other TET2-interacting proteins as crucial for the aging in nematodes. This study represents a significant step towards a deeper understanding of the mechanisms underlying aging and, potentially, towards the development of new therapeutic strategies to address age-related diseases.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 ENVEJECIMIENTO Y REJUVENECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso fisiológico asociado al paso del tiempo, común a casi todos los organismos vivos y que se caracteriza por una reducción de la fidelidad molecular de los procesos biológicos¹. El envejecimiento está considerado el mayor factor de riesgo para enfermedades con una elevada prevalencia en los países occidentales, como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades cardiovasculares². En las últimas décadas se ha producido un incremento progresivo de la esperanza de vida (“lifespan”) del ser humano llegando incluso a duplicarse, en gran medida debido a la mejora en la calidad de vida y a los avances en medicina³. No obstante, el aumento de la esperanza de vida muchas veces no va acompañado de una prolongación del periodo de vida con buena salud (“healthspan”). Por ello, descifrar los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento es clave para el desarrollo de terapias dirigidas a la mejora de la salud y calidad de vida en personas de edad avanzada.

4.1.1 Características del envejecimiento

Las causas moleculares del envejecimiento son numerosas y muy complejas. Con el objetivo de identificar y catalogar rasgos comunes al envejecimiento, en 2013 López-Otín y colaboradores describieron por primera vez nueve características de este proceso¹. Estas características, que actualmente son una referencia en el campo de la gerontología, cumplen tres criterios: primero, se manifiestan durante el envejecimiento fisiológico, segundo, su agravamiento experimental acelera el proceso de envejecimiento, y tercero, su mejora retarda el proceso de envejecimiento fisiológico y por tanto también extiende el periodo de vida saludable. Estas nueve características son: inestabilidad genómica, reducción de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteóstasis, alteración de la detección de los nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre y alteración de la comunicación intercelular (**Figura I1**). Recientemente, con los últimos avances en la investigación del campo de la gerontología se ha revisado y actualizado el número de características diferenciales del envejecimiento incluyendo macroautofagia inactiva, inflamación crónica y disbiosis⁴ (**Figura I1**).

Otros autores proponen nuevas características de envejecimiento, que coinciden parcialmente con los propuestos por López-Otín y colaboradores en 2023, ya que engloban los nueve definidos originalmente, y cinco más que son: autofagia comprometida, alteración del microbioma, alteración de las propiedades mecánicas, alteración del corte-y-empalme (“*splicing*”) e inflamación⁵. A pesar de la utilidad de definir procesos alterados para poder estudiar parámetros perturbados con la edad, algunos autores consideran que las características del envejecimiento tienen una limitación, dado que, a diferencia de las características del cáncer, los del envejecimiento no explican completamente las causas de este proceso fisiológico⁶.



Figura I1. Características del envejecimiento actualizados reportados por López-Otín y colaboradores en 2023.

4.1.2 Modelos para el estudio del envejecimiento

El estudio del envejecimiento humano está limitado por la variedad genética y ambiental a la que están expuestas las poblaciones, así como por la extensa vida media del ser humano. La mayoría de los estudios llevados a cabo en humanos no han sido estudios longitudinales sobre los mismos pacientes, sino que comparan grupos de distintos individuos jóvenes y viejos. Por otro lado, existe un conjunto de enfermedades denominadas síndromes progeroides, que están caracterizadas por un envejecimiento acelerado de los individuos, que también se ha estudiado ampliamente en el campo del envejecimiento. Estos síndromes son alteraciones genéticas raras que se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellos causados por perturbaciones en la lámina nuclear, siendo un ejemplo el síndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS por sus siglas en inglés) o progeria infantil, y aquellos que tienen su origen en defectos en los mecanismos de replicación y reparación del ADN, como el síndrome de Werner (WS por sus siglas en inglés)^{7,8}. No obstante, los síndromes progeroides presentan ciertas limitaciones para el estudio del envejecimiento humano, y es que al tratarse de situaciones patológicas muestran ciertas diferencias moleculares con respecto al envejecimiento fisiológico normal. Otro modelo ampliamente empleado en estudios de envejecimiento son los cultivos *ex vivo* de células aisladas de individuos jóvenes y viejos, como por ejemplo fibroblastos o células madre adultas. Los fibroblastos dérmicos son un excelente modelo para el estudio del envejecimiento *in vitro*, ya que están expuestos a los factores intrínsecos (causas moleculares y procesos fisiológicos celulares) y a los factores extrínsecos (elementos medioambientales que pueden acelerar el proceso como por ejemplo la radiación del sol) del envejecimiento⁹. Además, la

facilidad para obtener este tipo celular mediante técnicas mínimamente invasivas facilita su uso como modelo celular. Sin embargo, un estudio reciente de Salzer y colaboradores¹⁰ ha abierto el debate acerca de si los fibroblastos derivados *ex vivo* son capaces de retener las características moleculares del envejecimiento tras su cultivo *in vitro*, dado que se observaron alteraciones del transcriptoma de dichas células en comparación con las células de origen¹⁰. Este estudio está en contraposición con otros numerosos estudios que emplean fibroblastos derivados de individuos jóvenes y viejos, en los que no solo observan diferencias entre ellos, sino que determinan a través de estudios multi-ómicos diferentes trayectorias asociadas al envejecimiento¹¹⁻¹⁶. Otro modelo para el estudio del envejecimiento son células sometidas a envejecimiento *in vitro* a través de la senescencia replicativa, que consiste en someter a las células a pases seriados, lo cual se ha visto que recapitula el envejecimiento epigenético observado en modelos *in vivo*¹⁷. También se emplean como modelo *in vitro* las células senescentes. La senescencia es un estado terminal y estable en el que se detiene la proliferación celular en respuesta a una situación de estrés irreversible^{18,19}. La acumulación de células senescentes es una de las características del envejecimiento descritos por López-Otín y colaboradores, y se sabe que promueve la alteración de la función del organismo contribuyendo así al proceso de envejecimiento (revisado por Di Micco y colaboradores²⁰). A pesar de ello, este modelo posee la desventaja de que las causas moleculares del envejecimiento y de la senescencia no son idénticas, lo que limita su relevancia en el contexto *in vivo*. Estos modelos celulares *in vitro*, aunque son muy útiles para la disección de las causas moleculares a nivel celular del envejecimiento y no presentan implicaciones éticas, presentan una limitación, y es que no son capaces de recapitular la complejidad de un organismo completo, así como la interacción entre órganos y sistemas. Por dichas razones, es también necesario abordar el estudio del envejecimiento *in vivo* empleando modelos animales, siendo los más empleados en el campo *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Nothobranchius furzeri* y *Mus musculus*.

En particular, *C. elegans* es un nematodo de aproximadamente un milímetro de longitud en su fase adulta, y que vive en el suelo en temperaturas templadas. Este organismo modelo posee múltiples ventajas para el estudio del envejecimiento (revisado por Shen y colaboradores²¹). Se trata de un organismo modelo del cual se conoce prácticamente al completo su ciclo vital, su genoma está completamente secuenciado, se conoce el número exacto de células somáticas y germinales que lo conforman, así como el número exacto de descendencia al que da lugar por autofertilización. Incluso se trata del primer organismo del que poseemos el mapa neuronal completo (conectoma)²². Además de ser un organismo libre de limitaciones éticas, su corta esperanza de vida (2-3 semanas) facilita el estudio del envejecimiento, y su pequeño tamaño y sus condiciones de vida facilitan su manipulación y mantenimiento en el laboratorio. Por último, el trabajo con *C. elegans* se beneficia de las miles de cepas de este animal disponibles en el *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC), y de que la pérdida de función mediante el silenciamiento de genes a través ARN de interferencia (ARNi) es muy sencillo, simplemente consiste en alimentar a los nematodos con bacterias portadoras del plásmido codificante para el ARN de interferencia. Los ensayos de longevidad en *C. elegans* sirven para identificar genes involucrados en una extensión o un acortamiento de la vida media de los animales, mientras que los ensayos de fertilidad y de estrés por calor sirvieron como estudio de parámetros de salud, que suelen emplearse como una medida indirecta de la

longevidad en este organismo^{23,24}. Los estudios de resistencia a estrés se emplean por dos motivos: (1) la extensión en la resistencia a estrés ambiental suele estar acompañada de un incremento de la longevidad de los animales²⁵, y (2) el estrés por calor mimetiza algunos aspectos moleculares del proceso de envejecimiento, por lo que estudiar este proceso aporta información sobre mecanismos moleculares y celulares involucrados en el envejecimiento. Los estudios de fertilidad sirven como estudio indirecto del envejecimiento en *C. elegans*, porque un retraso en los periodos fértiles de los animales suele estar relacionado con un incremento en la vida media. Además, se ha demostrado que mutaciones causantes de reducción de la fertilidad de *C. elegans*, causan también una extensión de la longevidad²⁶.

4.1.3 Estrategias de rejuvenecimiento

A pesar de que el envejecimiento hoy en día se considera un proceso irreversible, se conocen varios procedimientos que permiten retardarlo y mejorar varios aspectos asociados al envejecimiento. Es importante diferenciar entre las terapias cuyo propósito es retardar el avance del envejecimiento y las estrategias de rejuvenecimiento, que implican una reducción permanente y sistémica de la edad biológica del individuo. Las estrategias de rejuvenecimiento son principalmente cuatro: los trasplantes heterocrónicos, bien de sangre o de otros órganos de individuos jóvenes a otros más viejos, la manipulación metabólica, la ablación de células senescentes y la reprogramación somática celular²⁷. Aunque los resultados obtenidos en los estudios de rejuvenecimiento llevados a cabo son notables, también presentan ciertas limitaciones en cuanto a la reversión de todas las características del envejecimiento²⁷. La única estrategia actualmente disponible capaz de revertir todas las características asociadas al envejecimiento es la reprogramación somática celular, por ello esta intervención es considerada el paradigma del rejuvenecimiento celular.

4.1.3.1. Reprogramación somática celular

En 2006 se produjo un gran hito con el descubrimiento de cuatro factores de reprogramación o factores de Yamanaka (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, abreviados como OSKM), que cuando son sobreexpresados en células somáticas son capaces de revertir su estado celular a células pluripotentes inducidas (iPSCs de las siglas en inglés *induced pluripotent stem cells*), que son equivalentes a las células madre embrionarias^{28,29}. Estas células pluripotentes se consideran el paradigma de estado celular joven por su capacidad de autorrenovación en ausencia de aparición de marcadores de envejecimiento, como el acortamiento de telómeros, disfunción mitocondrial o ausencia de senescencia, incluso tras su prolongado cultivo *in vitro*. Se ha demostrado que las iPSCs obtenidas a partir de células de individuos viejos muestran extensión de telómeros, mejoras en la función, morfología y número de mitocondrias y recuperación de perfiles epigenéticos y transcriptómicos asociados a estados celulares jóvenes³⁰⁻³³ (**Figura I2**). Interesantemente, las características de célula joven adquiridas durante la reprogramación celular somática (SCR) se mantienen tras la diferenciación de las iPSCs en células somáticas, lo que indica que el estado juvenil persiste tras la rediferenciación y no es exclusivo de las células pluripotentes^{31,32} (**Figura I2**). A pesar de que la reprogramación está actualmente siendo evaluada como estrategia de rejuvenecimiento en modelos *in vivo*, algunos estudios han reportado problemas de seguridad asociados a la expresión sistémica y prolongada de los cuatro factores de Yamanaka, ya que en ratones dio lugar a la formación de teratomas en

varios órganos³⁴, así como la muerte prematura por fallo intestinal y hepático³⁵. Por ello, con el objetivo de evitar la aparición de tumores y otros problemas de seguridad asociados a la técnica, se han desarrollado estrategias de reprogramación parcial o de expresión transitoria de los factores de Yamanaka, que se ha visto que mejoran el envejecimiento tanto en células *in vitro*³⁶⁻³⁸, como *in vivo*³⁹⁻⁴¹. Otra aproximación ha sido la generación de ratones transgénicos en los cuales se evita la expresión de los factores OSKM en intestino e hígado para evitar el fallo de estos órganos y con ello la muerte prematura de los animales³⁵.

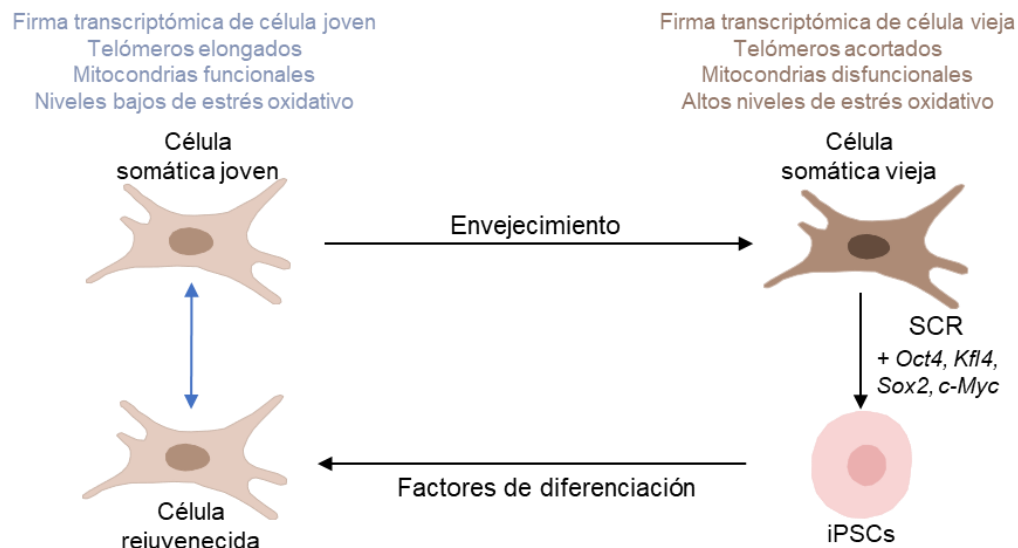


Figura 12. Esquema representativo del rejuvenecimiento de células somáticas viejas mediante reprogramación y diferenciación. Mediante la reprogramación celular somática (SCR) a con los cuatro factores de Yamanaka (*Oct4*, *Klf4*, *Sox2* y *c-Myc*), y la diferenciación de las iPSCs a células que muestran características análogas a células somáticas jóvenes en lugar de características de las células somáticas viejas originales. La flecha azul representa la alta similitud entre las células somáticas jóvenes y aquellas rejuvenecidas por reprogramación y posteriormente diferenciadas.

4.1.4 El estado celular pluripotente como paradigma de estado celular joven

El desarrollo embrionario murino comienza tras la fertilización de un oocito con un espermatozoide, que da lugar a un cigoto⁴². El cigoto se divide dando lugar a los estados de 2, 4, y 8 células y, finalmente, a la mórula. A continuación, la mórula sufre una cavitación dando lugar al blastocisto, donde se distinguen la masa celular interna y una capa celular externa denominada trofoectodermo⁴². El trofoectodermo contribuye a la formación de la placenta, mientras que la masa celular interna da lugar al embrión⁴². Tras la implantación del blastocisto ocurre la gastrulación y la especificación de las capas germinales⁴². El potencial de diferenciación, que es la capacidad de las células para dar lugar a otros tipos celulares más diferenciados, se va restringiendo a medida que progresa el desarrollo embrionario, transitando los estados de totipotencia, pluripotencia, multipotencia, oligopotencia y finalmente, unipotencia.

Las células troncales embrionarias (ESCs) son células pluripotentes que se obtienen de la masa celular interna de blastocistos en estado de pre-implantación, y se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y de diferenciación a los tres linajes celulares (endodermo,

ectodermo y mesodermo)⁴³. La pluripotencia es un término que engloba un amplio espectro de estados celulares. Las condiciones estándar de cultivo de las ESCs son en presencia de suero y del factor inhibidor de leucemia (LIF). Este medio de cultivo, abreviado como SL, permite el mantenimiento de una población heterogénea denominada metaestable⁴⁴. La variabilidad poblacional transita entre dos estados de pluripotencia que son el estado *naïve*, el cual se corresponde con el estado de pluripotencia de las células en blastocistos preimplantacionales, y el estado *primed*, equivalente al estado de pluripotencia de las células en blastocistos postimplantacionales. Entre los estados de pluripotencia *naïve* y *primed* encontramos estados pluripotentes intermedios, como el denominado estado roseta. Estas células equivalen al estado pluripotente de las células en blastocistos justo antes de la implantación, momento en el que las células del epiblasto se organizan formando una estructura en forma de roseta⁴⁵. Otro estado intermediario de las células pluripotentes es estado formativo, equivalente al de las células en blastocistos recién implantados⁴⁶. Los estados pluripotentes son claramente diferenciables por la morfología de las colonias a las que dan lugar, su metabolismo, el estado de inactivación del cromosoma X en las células femeninas, la metilación del ADN y la capacidad de diferenciación a trofoectodermo⁴⁷⁻⁴⁹. Además, entre la población se encuentra un pequeño porcentaje de ESCs que expresan marcadores del estado embrionario de 2 células (2C), que se denominan 2CLCs (del inglés *2C-like cells*)⁵⁰. Esta heterogeneidad implica una gran variabilidad en morfología y expresión de factores de pluripotencia en las ESCs cultivadas en medio SL.

El desarrollo embrionario y el envejecimiento son procesos biológicos que se presentan en etapas opuestas de la vida de un organismo. Sin embargo, descubrimientos recientes resaltan el impacto en el envejecimiento de procesos biológicos clave en el desarrollo embrionario como la regulación epigenética, los mecanismos de reparación del ADN, la función de las células madre, la señalización celular o el metabolismo⁵¹. Las ESCs se consideran el paradigma de estado celular joven indiferenciado *in vitro*, que pueden ser empleadas como modelo para comprender el proceso de rejuvenecimiento celular. Las células pluripotentes muestran telómeros elongados, firma transcriptómica de célula joven, así como edad epigenética de célula joven³⁰⁻³³.

4.2 REGULACIÓN EPIGENÉTICA Y EPITRANSCRIPTÓMICA EN EL ENVEJECIMIENTO

4.2.1 Alteraciones epigenéticas asociadas al envejecimiento

Los cambios epigenéticos son una de las características del envejecimiento. La epigenética engloba los mecanismos moleculares que modulan la expresión génica pero que no implican cambio en la secuencia nucleotídica del ADN, los cuales además pueden ser transmitidos a la descendencia. Modulan la expresión génica a través de cambios en la estructura de la cromatina haciéndola más compacta (heterocromatina) o más laxa (eucromatina), alterando así la accesibilidad al ADN de factores de transcripción. Los mecanismos de regulación epigenética incluyen las modificaciones post-traduccionales de las colas de histonas, así como la deposición en los nucleosomas de variantes de histonas, la metilación e hidroximetilación del ADN y la expresión de ARNs no codificantes (ncARNs).

En modelos de envejecimiento humano fisiológico y progeroide se ha demostrado que, con el paso del tiempo, además de acumularse daños en el ADN, se produce una pérdida de heterocromatina, así como una reducción de los marcadores de la heterocromatina H3K9me3, HP1 γ y LAP2 α ^{32,52,53}. Además, las células procedentes de individuos viejos muestran alteraciones morfológicas, funcionales y estructurales en sus núcleos, junto con mayores niveles del marcador de daño en el ADN γ H2AX y especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias³². También se ha demostrado mediante ensayos de ATAC-seq que con la edad se altera la accesibilidad a la cromatina, con regiones genómicas que ganan accesibilidad mientras otras se tornan más compactas^{54,55}.

Durante el envejecimiento el paisaje epigenético de las células cambia, alterándose los niveles de algunas de las modificaciones de histonas. Los cambios epigenéticos que se producen con la edad son específicos del tipo celular y del organismo. Como se menciona más arriba, un ejemplo es la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3), enriquecida en heterocromatina, que disminuye en células humanas senescentes y de síndromes progeroides^{53,56,57}, así como durante el envejecimiento de *C. elegans*⁵⁸. Sin embargo, esta observación no es universalizable, dado que en algunos organismos como *D. melanogaster* se encuentra incrementada con la edad⁵⁹. Por ello, es muy difícil establecer patrones de modificaciones post-traduccionales de histonas que puedan ser marcadores de envejecimiento universales. Sin embargo, en *C. elegans* existe un modelo que asocia el envejecimiento con una alteración en el balance entre marcas activadoras y marcas represoras de la transcripción, con una ganancia en las modificaciones relacionadas con la activación y una pérdida de las marcas represoras⁶⁰. Esta teoría se basa en que los niveles de marcas activadoras como la trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3) aumentan con la edad, y el silenciamiento de las metiltransferasas que las catalizan o desmetilasas que las eliminan tiene un efecto positivo y negativo, respectivamente, en *C. elegans*⁶¹. Además, marcas represoras como la trimetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3) disminuyen con el paso del tiempo en el nematodo, y el silenciamiento de la desmetilasa *utx-1* aumenta su periodo de vida⁶². No obstante, este modelo presenta limitaciones ya que en otros organismos como *D. melanogaster*, el silenciamiento de metiltransferasas de H3K27me3, y por tanto una reducción en los niveles de esta marca, prolonga la vida de los animales⁶³, al contrario de lo que cabría esperar según el modelo anterior propuesto. Se ha reportado un atlas de 36 modificaciones de histonas diferentes en 20 tipos celulares diferentes procedentes de seres humanos jóvenes (menores de 25 años) y viejos (mayores de 65 años)⁶⁴. En dicho estudio, se observó una mayor homogeneidad entre los individuos jóvenes, indicando que el envejecimiento podría causar una mayor heterogeneidad interindividual en los perfiles epigenéticos, lo cual podría estar a su vez correlacionado con la mayor variabilidad transcripcional observada en individuos viejos^{65,66}. Uno de los hallazgos más remarcables de este estudio, es que los perfiles epigenéticos asociados al envejecimiento varían según el tipo celular, y se da el caso de marcas cuya abundancia se incrementa con la edad en unos tipos celulares y se reduce en otros.

Por otro lado, existen numerosos estudios relacionando cambios en otro mecanismo de regulación epigenética, como es la metilación del ADN, durante el envejecimiento. La metilación del ADN es llevada a cabo por las enzimas de la familia de las ADN metiltransferasas (DNMTs)^{67,68}, que catalizan la adición de un grupo metilo sobre el carbono número 5 de las citosinas dando lugar a 5-metilcitosina (5mC). DNMT1 es la enzima encargada

del mantenimiento de las posiciones metiladas en las nuevas hebras de ADN sintetizadas en las divisiones celulares, mientras que DNMT3a y DNMT3b son metiltransferasas *de novo*, capaces de establecer nuevos patrones de metilación. Existen dos mecanismos de desmetilación del ADN. Por un lado, la desmetilación pasiva consiste en la pérdida de la marca 5mC a lo largo de las sucesivas divisiones celulares debido a la inhibición de la función de DNMT1 y la consecuente dilución de la marca. Por otro lado, existe un mecanismo de desmetilación activa que opera también en células que no proliferan, y es mediado por la familia de proteínas TET. Dicha eliminación de la metilación en citosinas consiste en la oxidación iterativa de 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC)^{69,70}, 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxicitosina (5caC)⁷¹ (**Figura I3**). Estas dos últimas marcas son reconocidas por la proteína Timina DNA Glicosilasa (TDG), enzima implicada en la reparación del ADN mediante reparación por escisión de bases (BER). En particular, TDG reconoce 5fC y 5caC como nucleótidos dañados, que elimina de la hebra de ADN y sustituye por citosinas sin modificar^{72,73} (**Figura I3**). Durante el proceso de envejecimiento se ha observado una hipometilación global del genoma, principalmente en regiones repetitivas⁷⁴⁻⁷⁷, tanto en modelo de ratón, como en rata y humano^{76,78}. Además, la pérdida de metilación global asociada al envejecimiento aparece acompañada con una hipermetilación en regiones genómicas específicas, como secuencias promotoras o genes supresores de tumores⁷⁹.

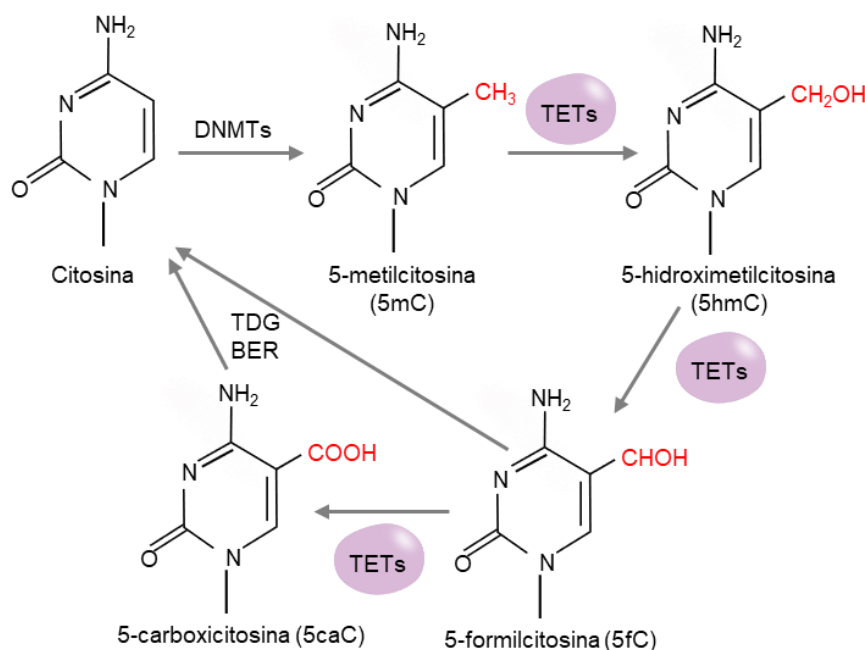


Figura I3. Ciclo de desmetilación del ADN. La metilación es llevada a cabo por las enzimas de la familia DNMT, y la desmetilación de 5mC a 5hmC, 5fC y 5caC es llevada a cabo por la familia de enzimas TET. 5fC y 5caC son reconocidas por TDG y se restituye la citosina no metilada por BER. 5hmC puede ser convertida a 5hmU por el complejo AID/APOBEC, se desconoce el mecanismo por el que se sustituye 5hmU por C.

La metilación del ADN es una marca que generalmente está asociada con represión transcripcional a través del reclutamiento de factores reguladores represivos^{80,81}. Dados estos cambios en los niveles de metilación que se producen a lo largo del proceso de envejecimiento, desde 2011 se han desarrollado y mejorado una serie de “relojes de metilación”, una herramienta capaz de predecir la edad cronológica de un individuo en base a los niveles de metilación de sitios CpG (secuencias en las que se encuentra una citosina seguida de una guanina) específicos^{74,82-84}. Cabe resaltar que en ocasiones la edad cronológica de un individuo (el tiempo que ha transcurrido desde su nacimiento) y la edad biológica (la edad epigenética que el individuo tiene en base a los relojes de metilación de ADN) no coinciden. Esto es debido a las diferencias entre la esperanza de vida y el tiempo de vida saludable de cada individuo. Curiosamente, empleando uno de estos relojes de metilación del ADN, un estudio reciente ha demostrado que el envejecimiento epigenético empezaría durante el desarrollo embrionario, alcanzándose el estado más juvenil en ratones en fase embrionaria E10.5⁸⁵. A partir de dicho momento, los autores describen un aumento en la edad epigenética en embriones murinos y humanos, lo que podría significar que el envejecimiento comienza a producirse incluso antes de que hayamos nacido.

4.2.2 Alteraciones epitranscriptómicas asociadas al envejecimiento

De manera equivalente a las modificaciones epigenéticas del ADN, se sabe que los nucleósidos del ARN también pueden presentar modificaciones químicas y que éstas tienen un gran impacto sobre su función. De hecho, hasta la fecha se han descrito más de 170 modificaciones químicas del ARN⁸⁶, capaces de afectar tanto las propiedades químicas como la estructura secundaria o la interacción con proteínas de los ARNs modificados. Como resultado, dichas modificaciones están emergiendo como una nueva capa regulatoria de los procesos celulares, dado que participan en el control de procesos de corte-y-empalme (“*splicing*”), localización subcelular y estabilidad de dichos transcritos^{87,88}. Las modificaciones del ARN son depositadas por enzimas denominadas escritoras (“*writers*”), pueden ser eliminadas por enzimas borradoras (“*erasers*”) y son reconocidas por enzimas lectoras (“*readers*”). Entre las modificaciones epitranscriptómicas más abundantes y estudiadas, se encuentra la metilación de adenosinas (m^6A), desaminación de adenosinas (*A-to-I editing*) y la metilación de citosinas (m^5C).

Las enzimas escritoras de m^6A en ARNs mensajeros (ARNm) son METTL3, y METTL14⁸⁹, junto a METTL16^{90,91} que además es capaz de modificar ARNs no codificantes (ARNsn y ARNlnc)^{92,93}. Por otro lado, el complejo METTL5-TRMT112 metila adenosinas en el ARNr 18S⁹⁴ y ZCCHC4 en el ARNr 28S⁹⁵. La modificación m^6A puede ser eliminada por las enzimas ALKBH5⁹⁶ y FTO⁹⁷ (**Figura I4**). Por otro lado, la desaminación de adenosinas, también conocida como edición A-to-I, está catalizada por las proteínas de la familia ADAR: ADAR1 y ADAR2⁹⁸⁻¹⁰¹ (**Figura I4**). No se conocen por el momento enzimas capaces de revertir dicha modificación. Finalmente, la modificación m^5C es depositada en el ARN por las proteínas de la familia NSUN, y la enzima DNMT2¹⁰² (**Figura I4**). Las proteínas lectoras de m^5C conocidas son YBX1¹⁰³, ALYREF¹⁰⁴, RAD52¹⁰⁵ y SRSF2¹⁰⁶. m^5C puede ser alterado mediante su oxidación a hm^5C y f^5C por las enzimas de la familia TET y por ALKBH1¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ (**Figura I4**). Cada una de las enzimas encargadas de la catálisis de m^5C o hm^5C en el ARN tiene un ARN sustrato específico (**Figura R3a**). La modificación m^5C en ARNm es llevada a

cabo por NSUN2 y NSUN6, mientras que su oxidación a hm^5C es realizada por TET1, TET2 y ALKBH1¹⁰⁹⁻¹¹¹. TET2 y ALKBH1 además oxidan m^5C a hm^5C en ARNt^{109,112} que son metilados por TRDMT1 (también conocido como DNMT2)¹¹³⁻¹¹⁵, NSUN2^{115,116} y NSUN6^{117,118}. m^5C es depositada en ARNr por NSUN1¹¹⁹, en ARNt-mt por NSUN3¹²⁰⁻¹²² y NSUN4¹²³, en ARNe por NSUN7¹²⁴ y en ARNvt por NSUN2¹²⁵.

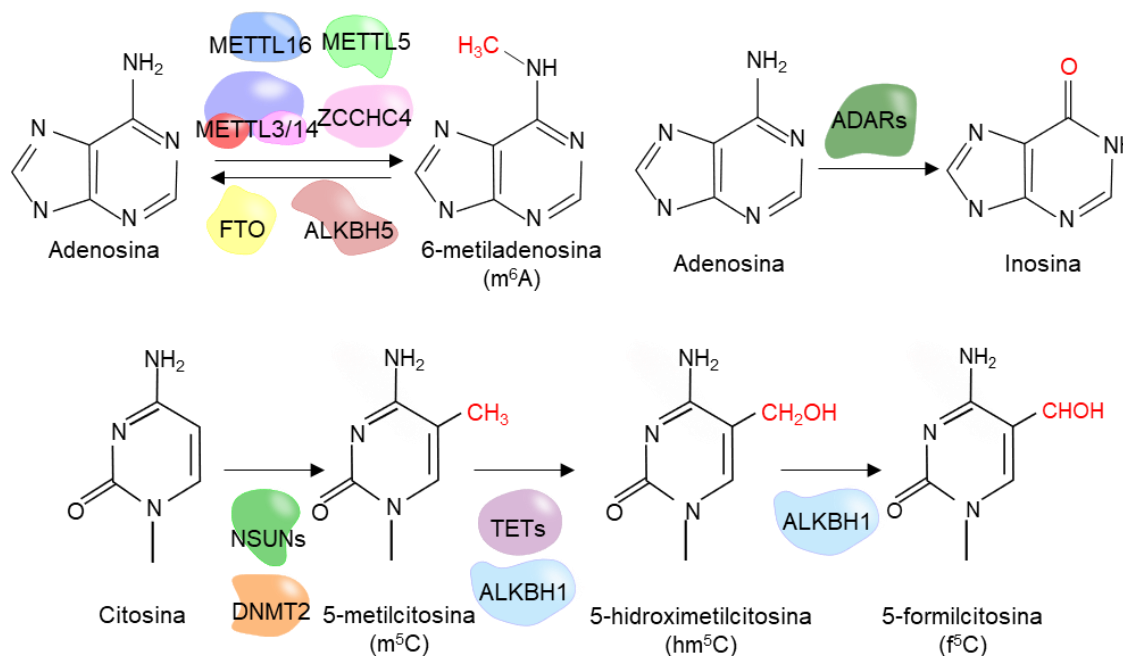


Figura I4. Esquema de las modificaciones del ARN m⁶A, A-to-I y m⁵C/hm⁵C/f⁵C y sus enzimas catalizadoras.

Actualmente son pocos los estudios que exploran el papel de las modificaciones de ARN en el envejecimiento o que caracterizan como cambian los niveles de las marcas con el paso del tiempo. m⁶A es la modificación de ARN más abundante y por tanto la más estudiada en cuanto a su función en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos, incluido el envejecimiento. En células madre mesenquimales humanas (hMSCs) de modelos de síndromes progeroides (HGPS y WS) se han reportado menores niveles de la metiltransferasa METTL3 y de los niveles globales de m⁶A¹²⁶. Además, los mismos autores asocian la pérdida de función de METTL3 con un fenotipo de senescencia acelerada. Otro estudio en células mononucleares de sangre (PBMCs) también reporta una disminución en los niveles de m⁶A asociado al envejecimiento¹²⁷. Recientemente se ha descrito una disminución de m⁶A y METTL3 con el envejecimiento en músculo esquelético de primates, y describen la disminución en la marca epitranscriptómica como una de las causas que contribuye al envejecimiento¹²⁸. Sin embargo, en células de ovario tanto de humanos como de ratón se han identificado mayores niveles de m⁶A en individuos viejos, asociados a una menor expresión y abundancia de la desmetilasa FTO^{129,130}. En *C. elegans* mutaciones en la metiltransferasa *metl-5*, responsable de la formación de m⁶A en el ARN ribosómico 18S, incrementan la resistencia a estrés en los nematodos¹³¹. Sin embargo, a pesar del incremento a la tolerancia del estrés que en muchas ocasiones supone el incremento en la vida media de *C. elegans*¹³², los autores no observan efecto sobre la longevidad de los nematodos con la mutación de *metl-5*¹³¹.

Otra modificación del ARN muy abundante y estudiada es la edición A-to-I. Esta modificación ha sido estudiada en el contexto del envejecimiento en cerebros de una gran variedad de modelos animales. En humanos, así como otros primates, se ha descrito un incremento en la edición A-to-I asociada a la edad¹³³. A pesar del incremento en los niveles globales, las dinámicas a nivel de transcrito pueden variar con el envejecimiento, pues un estudio reporta una reducción en los niveles de edición a inosinas en el ARNm del gen CYFIP2 asociado al paso del tiempo en cerebros humanos¹³⁴. El aumento en los niveles de edición A-to-I con el envejecimiento también ha sido reportado en ratas¹³⁵, ratones^{136,137} y cerdos^{138,139}. En *C. elegans* la delección de las desaminasas *adr-1* y *adr-2* homologas de ADAR1 y 2 reduce significativamente la esperanza de vida de los nematodos¹⁴⁰.

Con respecto a las modificaciones m⁵C y hm⁵C, su papel en el envejecimiento permanece inexplorado. En el organismo modelo *C. elegans* el silenciamiento de la metiltransferasa *nsun-5* responsable de la modificación m⁵C en ARN ribosomales está relacionada con incremento de la vida media, aunque únicamente en condiciones de restricción alimentaria¹⁴¹. Los autores explican que este efecto se debe al papel de la modificación m⁵C en la regulación de respuesta a estrés. El silenciamiento de *nsun-1*, otra metiltransferasa de ARNr en *C. elegans*, se relaciona con un incremento en la vida media pero únicamente cuando el silenciamiento se produce en tejido somático, cuando el silenciamiento es a nivel sistémico en todo el organismo no observan un incremento en la longevidad de los animales¹⁴². Un estudio reciente ha reportado una cepa de *C. elegans* carente de todos los ortólogos de NSUN (denominada noNSUN), y observan una completa depleción de m⁵C en el transcriptoma del nematodo, así como defectos en la respuesta a estrés por calor¹⁴³. No obstante, demuestran que la marca m⁵C del ARN no es esencial para la viabilidad de *C. elegans*. Futuros estudios son necesarios para diseccionar el papel de las modificaciones del ARN, especialmente de las modificaciones m⁵C y hm⁵C, en el envejecimiento y estudiar cómo varían las dinámicas de modificación de los transcritos con el paso del tiempo como potencial diana terapéutica.

4.3 FAMILIA DE PROTEÍNAS TET

Las enzimas TET son una familia de dioxigenasas dependientes de Fe²⁺ y α -cetoglutarato, que está formada por tres miembros: TET1, TET2 y TET3¹⁴⁴. La mayoría de los metazoos presentan al menos un ortólogo de TET, y su presencia se correlaciona estrechamente con la presencia de citosinas metiladas en el ADN^{145,146}, ejemplificado con *C. elegans*, organismo que carece tanto de ortólogos de las enzimas TET como de metilación en las citosinas en su genoma¹⁴⁷. La aparición durante la evolución de los tres genes de la familia TET, coincide con la aparición de vertebrados mandibulados, y se postula que ocurre por una triplicación del gen. Esta teoría es compatible con el hecho de que muestran una estructura altamente conservada, incluyendo un dominio de unión a CpGs CXXC en TET1 y TET3, y un dominio catalítico en el extremo C-terminal compuesto por una región rica en cisteínas (CRD por las siglas en inglés *Cys-rich domain*) y una hélice beta de cadena doble (DSBH – *double stranded beta helix*) con un gran inserto de baja complejidad intercalado en el caso de los tres miembros (**Figura I5**). Además, en la región CRD encontramos un dominio de unión a ADN, mientras que en la región DSBH se ubican los aminoácidos que establecen interacción con los cofactores Fe²⁺ y α -cetoglutarato, necesarios para la actividad catalítica. A través de dicha actividad catalítica, estas enzimas son responsables de la oxidación iterativa de los grupos

metilo en la posición 5 de citosinas (5mC) a hidroximetilo- (5hmC), formil- (5fC) y carboxil- (5caC) citosina en el ADN⁶⁹⁻⁷¹. Sorprendentemente, en 2014 se describió por primera vez que además de su actividad en ADN, las proteínas TET eran capaces de interactuar y modificar ARN, catalizando la oxidación de 5-metilcitosina (m⁵C, diferente abreviación para distinguirlo del ADN) a 5-hidroximetilcitosina (hm⁵C)¹⁰⁷. Estos inesperados hallazgos fueron posteriormente confirmados por nuestro y otros grupos de investigación en diversos estudios^{110-112,148}.

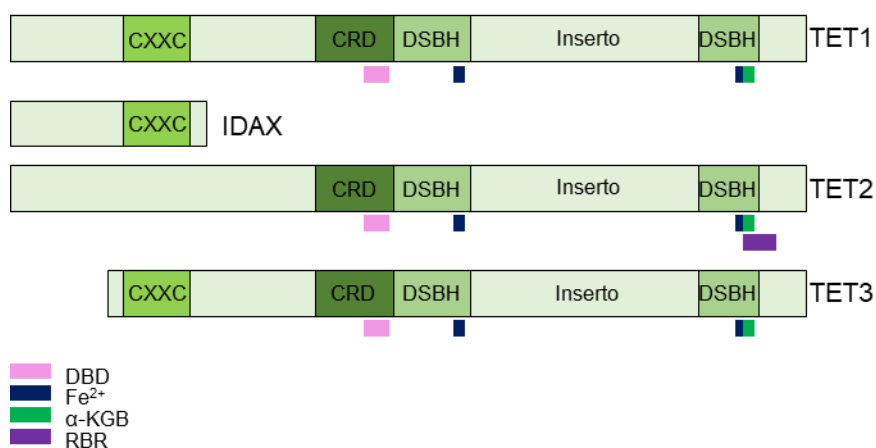


Figura I5. Estructura de las proteínas TET. (TET1 (NP_001240786.1), TET2 (ACY38292.1), TET3 (NP_001334242.1), e IDAX (NP_001004367.2)). Se representa el número de aminoácidos totales de las proteínas, así como los dominios que conforman su estructura y las regiones de interacción con cofactores (Fe²⁺ o α-KGB), ADN (DBD) o ARN (RBR). Adaptado de Garcia-Outeiral y colaboradores, 2020¹⁴⁹.

4.3.1 Funciones de las proteínas TET

Las proteínas TET, dado su rol como reguladores epigenéticos y epitranscriptómicos, desempeñan un papel muy importante en una gran variedad de procesos celulares a través de la modulación de la expresión génica, bien mediante mecanismos epigenéticos (i.e. compactación de la cromatina dando lugar a represión transcripcional) bien mediante mecanismos epitranscriptómicos (i.e. desestabilización de transcritos). TET juegan un papel crucial en el desarrollo embrionario y en el mantenimiento, adquisición y salida de pluripotencia en células madre^{149,150}. Por otro lado, las proteínas TET son críticas para una adecuada función del sistema inmune¹⁵¹, así como en procesos patológicos como cáncer hematológico¹⁵² o en enfermedades neurodegenerativas¹⁵³. Por último, también se ha descrito la importancia de las proteínas TET y 5hmC en ADN en la función de las células musculares lisas^{154,155} y de células hepáticas¹⁵⁴.

4.3.2 TET2 y 5-hidroximetilcitosina

TET2 es el miembro más atípico de la familia TET, ya que, a diferencia de los otros dos miembros, carece de dominio de unión al ADN CXXC, lo que se postula es debido a una inversión cromosómica que dio lugar al gen TET2 y al gen IDAX que contendría el dominio CXXC del gen TET de origen^{144,146} (**Figura I5**). Además, TET2 es el único miembro del que actualmente se conoce una región de unión al ARN¹⁵⁶. Para su actividad catalítica en células troncales embrionarias de ratón (ESCs), se ha demostrado que TET2 necesita de su proteína

interactora PSPC1 para ser reclutada tanto a cromatina como al ARN, así como para su actividad metiloxidasa sobre los transcritos de ARN¹⁴⁸.

4.3.2.1. Funciones de TET2 en ADN y ARN

Los primeros estudios de la proteína TET2 se centraron en su actividad catalítica sobre moléculas de ADN⁶⁹. La interacción entre TET2 y el ADN ocurre en la cavidad del dominio catalítico de la enzima, donde se lleva a cabo la reacción de oxidación de las citosinas modificadas (5mC). Mediante cristalografía se pudo identificar la estructura molecular de la interacción entre el dominio catalítico de la enzima humana y las bases 5mC, 5hmC y 5fC del ADN^{157,158}. Remarcablemente, se ha demostrado que TET2 presenta una preferencia de sustrato similar por 5hmC y 5fC que por 5mC¹⁵⁸. Sin embargo, también se ha demostrado que TET2 es más activa sobre sustratos 5mC que sobre 5hmC o 5fC, debido a distintas interacciones entre los sustratos y la cavidad catalítica de la enzima, haciendo que 5hmC en el genoma sea menos susceptible de ser oxidada¹⁵⁸. Aunque la actividad catalítica de TET2 se localiza en el dominio C-terminal de la proteína, se ha comprobado que la proteína completa es más activa catalíticamente sobre el ADN que versiones truncadas en el extremo N-terminal¹⁵⁷. Además, la actividad catalítica de TET2 sobre el ADN se ve bloqueada por mutaciones que afectan a sus dominios interacción con los cofactores Fe²⁺ y α -cetoglutarato o con el ADN^{69,111,157,159}.

Dados estudios seminales que reportaban por primera vez la presencia de bases m⁵C y hm⁵C en el ARN^{160,161}, se comenzó a explorar el papel de las enzimas TET en la oxidación de estos sustratos, y se demostró la capacidad de estas proteínas de catalizar la formación de 5-hidroximetilcitosina en el ARN *in vitro*¹⁰⁷. Actualmente se sabe que TET2 es responsable de la oxidación de una gran variedad de sustratos de ARN, como ARNs de retrovirus endógenos¹⁴⁸, ARNm¹¹⁰ y ARNt y ARNs pequeños nucleares (ARNsn)¹¹². La oxidación de m⁵C a hm⁵C en ARN se ha visto que disminuye la estabilidad de los transcritos^{110,148}, aunque no afecta a la traducción de los ARNm¹¹⁰. Además, se ha descrito que la oxidación a hm⁵C por parte de TET2 facilita la degradación del ARNm de *Socs3* mediada por ADAR1 de manera catalítico-independiente¹¹¹, y regula la generación de fragmentos de ARNt (tRFs)¹¹². En conjunto, se ha visto que el papel que desempeñan TET2 y la hidroximetilación del ARN es crucial en procesos celulares tales como la represión génica y de retrovirus endógenos mediante la degradación de transcritos^{110,148}, y la regulación de la biogénesis de tRFs¹¹².

4.3.2.2. Papel de TET2 y 5-hidroximetilcitosina en pluripotencia *in vitro* y diferenciación celular

Se sabe que TET2 es un regulador clave de la pluripotencia *naïve* (descrito en el apartado 4.1.4), siendo suficiente su sobreexpresión en células *primed* para la reprogramación a un estado de pluripotencia *naïve* en células troncales¹⁶². Además, entre la heterogénea población de ESCs cultivadas en condiciones estándar (suero + LIF, SL), se encuentra una pequeña fracción (inferior al 3-5%) de células con potencialidad expandida que se asemejan a las células del estado de 2-células denominadas 2CLCs (del inglés *2C-like cells*). Las células 2CLCs, además de expresar genes asociados al estado de 2 células (2C-genes), presentan elevados niveles de expresión de retrovirus endógenos MERVL. La delección de TET2 en ESCs lleva a un aumento de la población 2CLCs, debido a un aumento en la expresión de genes 2C y de elementos MERVL¹⁴⁸. Esto se debe al papel epitranscriptómico y epigenético que

desempeña TET2 mediante la deposición de 5-hidroximetilcitosina en el ARN y el reclutamiento de proteínas deacetilasas de histonas HDACs, que lleva a la represión transcripcional de los genes *2C* y de *MERV1* en ESCs (**Figura I6**). Para esta función represora del estado 2CLC, nuestro grupo demostró que TET2 requiere de la interacción con la proteína de unión al ARN Paraspeckle Component 1 (PSPC1). Desde el punto de vista epitranscriptómico también se ha demostrado que TET2 es clave en ESCs para la regulación de tRFs¹¹². Los niveles de expresión de TET2 en células ESCs son elevados, y disminuyen con la diferenciación de dichas células^{163,164} en paralelo con lo que ocurre con los niveles de 5hmC^{164,165}. Sin embargo, la pérdida de función de *Tet2* en ESCs no afecta a la morfología de las colonias pluripotentes ni a la expresión de marcadores de pluripotencia, mientras que solo se induce moderadamente la expresión de algunos marcadores de diferenciación como *Pax6*, *Neurod1* o *Lefty1/2*, siendo la pérdida de función de TET2 compatible con el mantenimiento de la pluripotencia^{69,163}.

A pesar de que los niveles de TET2 y 5-hidroximetilcitosina disminuyen con la diferenciación celular, se ha demostrado que la ausencia de TET2 en la salida del estado pluripotente tiene efectos negativos. Durante la diferenciación de ESCs *Tet2* KO a progenitores neurales, se observó una disminución de más del 90% en los niveles de 5hmC en el ADN, acompañada de un retraso en la inducción de los genes de diferenciación debido a una hipermetilación por acumulación de 5mC en las secuencias potenciadoras de dichos genes¹⁶⁶ (**Figura I6**). También se ha visto que los teratomas generados con ESCs con pérdida de función de *Tet2*, además de ser más agresivos que los generados por ESCs silvestres, presentan una mayor contribución de neuroectodermo, lo que implica que la ausencia de TET2 altera el potencial de diferenciación de las células a este linaje celular¹⁶³. Por otro lado, el silenciamiento simultáneo de *Tet1* y *Tet2* en ESCs aumenta su propensión a la diferenciación hacia linaje extraembrionario¹⁶⁴. En células madre hematopoyéticas (HSCs), la pérdida de función de *Tet2* también provoca un retraso en la diferenciación, además de un sesgo hacia el linaje de monocitos y macrófagos¹⁶⁷. Como regulador epitranscriptómico, TET2 contribuye a la diferenciación mediante la deposición de hm⁵C en ARNm de genes de pluripotencia, lo cual genera su desestabilización contribuyendo a la flexibilidad transcripcional que se requiere para el proceso de salida de la pluripotencia¹¹⁰ (**Figura I6**). En conjunto, TET2 es prescindible para el mantenimiento de las células madre embrionarias y adultas pero necesario para su diferenciación.

4.3.2.3. TET2 y 5-hidroximetilcitosina en envejecimiento y rejuvenecimiento

En contraposición a las dinámicas de 5mC en el ADN durante el envejecimiento que han sido ampliamente estudiadas, el conocimiento con respecto a cómo varían los niveles de 5hmC con la edad es más escaso. La mayor parte de los datos que se tienen provienen del estudio de cerebros, dados los elevados niveles de 5hmC en este tejido, así como el papel que desempeñan TET2 y 5hmC en el desarrollo neuronal y neurogénesis, y en enfermedades neurodegenerativas¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Sin embargo, existen resultados contradictorios respecto a la función de TET2 y la modificación 5hmC con la edad. En cerebros de individuos viejos en humanos y ratones se ha descrito un incremento en la abundancia de 5hmC¹⁷¹⁻¹⁷⁵. No obstante, otro estudio ha identificado una disminución en los niveles de TET2 y de 5hmC en hipocampo de ratones viejos, y han relacionado esta reducción con la pérdida de funciones cognitivas debido a una

pérdida en capacidades regenerativas y neurogénicas¹⁴⁵ (**Figura I6**). Por otro lado, en enfermedades neurodegenerativas la información que se tiene también es contradictoria, dado que incluye estudios que reportan una disminución en TET2 y 5hmC en estas patologías¹⁷⁶⁻¹⁷⁸, mientras otras investigaciones encuentran un aumento de ambos marcadores^{153,179}. Las dinámicas de 5hmC en envejecimiento en otros tejidos están menos caracterizadas. En ratón, se han identificado niveles de 5hmC aumentados en muestras de hígado con la edad¹⁸⁰, así como una reducción de 5hmC en células madre hematopoyéticas (HSCs) con el paso del tiempo¹⁸¹. Sin embargo, en humanos se ha reportado una disminución de casi un 30% en 5hmC en células sanguíneas de individuos ancianos¹⁸². En células madre mesenquimales se han reportado regiones que ganan y otras que pierden 5hmC durante el envejecimiento, asociando la ganancia de 5hmC con la pérdida de 5mC, lo que implicaría un papel de las proteínas TET en la hipometilación del ADN asociada al envejecimiento¹⁸³. Actualmente permanece inexplorado el rol de TET2 a través de la modificación hm⁵C del ARN en el contexto del envejecimiento, y se desconocen tanto los perfiles epitranscriptómicos de hm⁵C asociados al paso del tiempo y su impacto sobre el transcriptoma y las funciones celulares, como la función reguladora de las proteínas TET y más en concreto de TET2.

En contraste con los escasos estudios de la función de TET2 en envejecimiento, son numerosos los aquellos que han diseccionado el papel que desempeña esta proteína en el proceso de reprogramación celular somática (SCR, del inglés *somatic cell reprogramming*). TET2 tiene un rol esencial en numerosos sistemas de reprogramación, como la reprogramación de células B mediante la sobreexpresión de los factores de Yamanaka (OSKM) junto a CEBP^{184,185}, la reprogramación de células B mediante fusión celular¹⁸⁶, la reprogramación de intermedios de reprogramación (pre-iPSCs) mediante sobreexpresión de NANOG¹⁸⁷ y la reprogramación de fibroblastos mediante la sobreexpresión de los factores de Yamanaka OSKM¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ (**Figura I6**). Se sabe que la expresión de *Tet2* se induce de forma natural en la primera etapa de la reprogramación (día 2) tras la inducción de los factores OSKM en fibroblastos embrionarios de ratón¹⁸⁸, y es necesaria tanto para la transición mesénquima-epitelio¹⁸⁹ como para el cambio metabólico a un perfil más glicolítico¹⁹⁰ que son necesarios para la SCR a iPSCs (**Figura I6**). Recientemente, un estudio que utilizaba la tecnología de SCR parcial para provocar rejuvenecimiento *in vivo* de retinas en ratones ha demostrado que tanto TET2 como TET1 son necesarias para la regeneración axónica que se produce tras la inducción de los factores de reprogramación OSK¹⁹¹. En todos estos estudios, se evalúa el papel de TET2 como regulador epigenético mediante la deposición de 5hmC en el ADN, mientras que aún se desconocen las dinámicas de hidroximetilación del ARN a lo largo de las fases de la reprogramación celular, así como el papel que desempeña esta marca epitranscriptómica en la adquisición de pluripotencia y rejuvenecimiento celular mediante SCR.

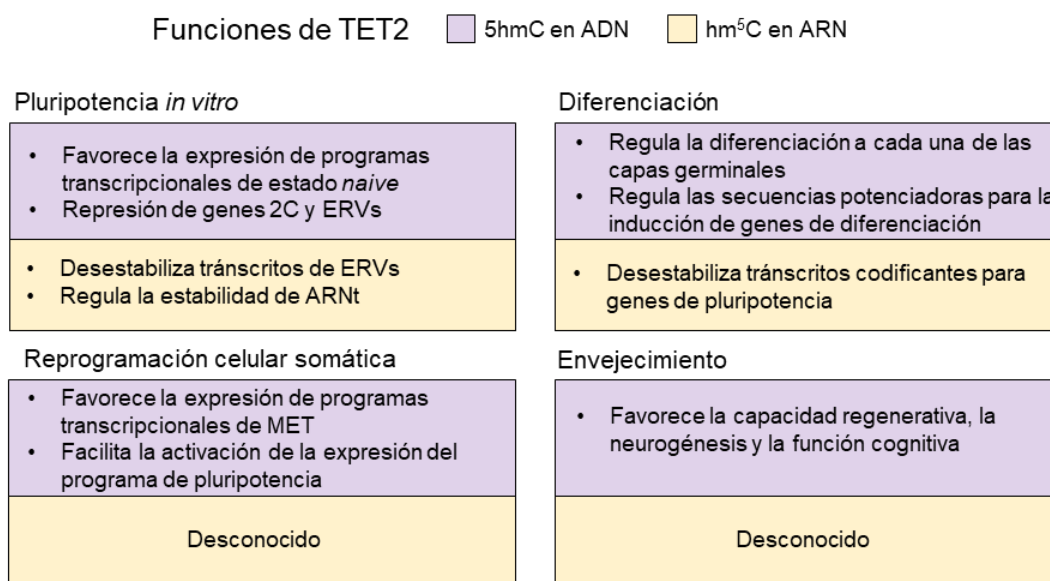


Figura 16. Funciones de TET2 en pluripotencia, diferenciación, reprogramación celular somática y envejecimiento mediante su actividad sobre ADN o ARN.

A lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral, descubrimos la interacción de TET2 con la subunidad 4 del complejo Integrator (INTS4). Dada la importancia del complejo Integrator en el procesamiento de una gran variedad de sustratos de ARN, decidimos centrarnos en explorar el papel del complejo TET2-INTS4 en células troncales embrionarias de ratón y sus potenciales implicaciones en el proceso del envejecimiento.

4.4 COMPLEJO INTEGRATOR

El complejo Integrator es un complejo multiproteico nuclear que está formado por 15 subunidades (INTS1-15)¹⁹²⁻¹⁹⁷. El complejo Integrator se denomina así porque integran el dominio C-terminal (CTD por sus siglas en inglés) de la ARN Polimerasa II (ARNPII), junto al procesamiento de extremos 3' de ARNs pequeños nucleares (snARN, del inglés *small nuclear*). Además, este complejo interacciona con la proteína fosfatasa 2A (PP2A) para modular y reestablecer el estado fosforilado de ARNPII-CTD, y en última instancia regular la actividad ARN polimerasa y la transcripción^{198,199}.

4.4.1 Estructura del complejo Integrator

El complejo Integrator presenta un gran tamaño, por encima de 1.5 MDa, debido al gran número de subunidades que lo forman, así como el gran tamaño de muchas de ellas (por ejemplo: INTS1 245 kDa, INTS2 134 kDa, INTS3 118 kDa, INTS4 108 kDa,). La estructura de Integrator se puede subdividir en módulos estables en base a la estructura global y a la función de cada módulo dentro del complejo (**Figura I7**)^{200,201}. El primero es el módulo formado por INTS4/9/11, que se denomina módulo de corte, debido a la actividad endonucleasa llevada a cabo por INTS11^{200,201}. El segundo módulo es el complejo ternario formado por INTS10/13/14/15²⁰¹⁻²⁰³. Se sabe que el complejo ternario tiene capacidad de unión a ARN de cadena simple con estructuras de horquilla, y que además interactúa directamente con el módulo

de corte, lo cual sugiere que una de las funciones del módulo ternario podría ser la de reclutar la actividad endonucleolítica a las moléculas de ARN para su procesamiento^{201,203}. En tercer lugar, está el módulo en el que reside la actividad fosfatasa, formado por INTS6, la subunidad que interactúa y une al complejo a la fosfatasa PP2A^{200,204}. El módulo que actúa como columna vertebral del complejo Integrator, uniendo las dos actividades enzimáticas del complejo y sirviendo de soporte para todo el resto de las proteínas, está formado por las subunidades INTS1, INTS2 e INTS7²⁰⁰. Se ha descrito que INTS5 e INTS8 interactúan fuertemente formando un módulo estable denominado hombro (*shoulder module* en inglés)^{200,201}. Estos dos módulos forman la estructura central del complejo, y las actividades fosfatasa y nucleasa se localizan en extremos opuestos. INTS3, aunque no se ha descrito en ninguno de los módulos mencionados anteriormente, sí se sabe que dimeriza con INTS6²⁰⁵. Se desconoce el papel de INTS3 dentro del complejo Integrator, sin embargo, es ampliamente conocido su papel en el complejo SOSS (sensor de ADN de cadena simple en inglés) de reparación del ADN²⁰⁵⁻²⁰⁷. Se conoce la disposición espacial de las subunidades del complejo Integrator para todos los módulos, excepto para el complejo ternario, para el que, aunque se sabe que interactúa con el módulo de corte a través del dominio C-terminal de INTS13, se desconoce su ubicación en el conjunto del complejo¹⁹⁹⁻²⁰¹. Además, tampoco se ha conseguido una estructura de Integrator que incluya las subunidades INTS3 e INTS12. En la **Figura I7** se recoge la estructura molecular del complejo Integrator conocida hasta la fecha, y un diagrama con todas las subunidades de Integrator, representando las interacciones conocidas entre cada una de las subunidades, así como los diferentes módulos descritos dentro del complejo.

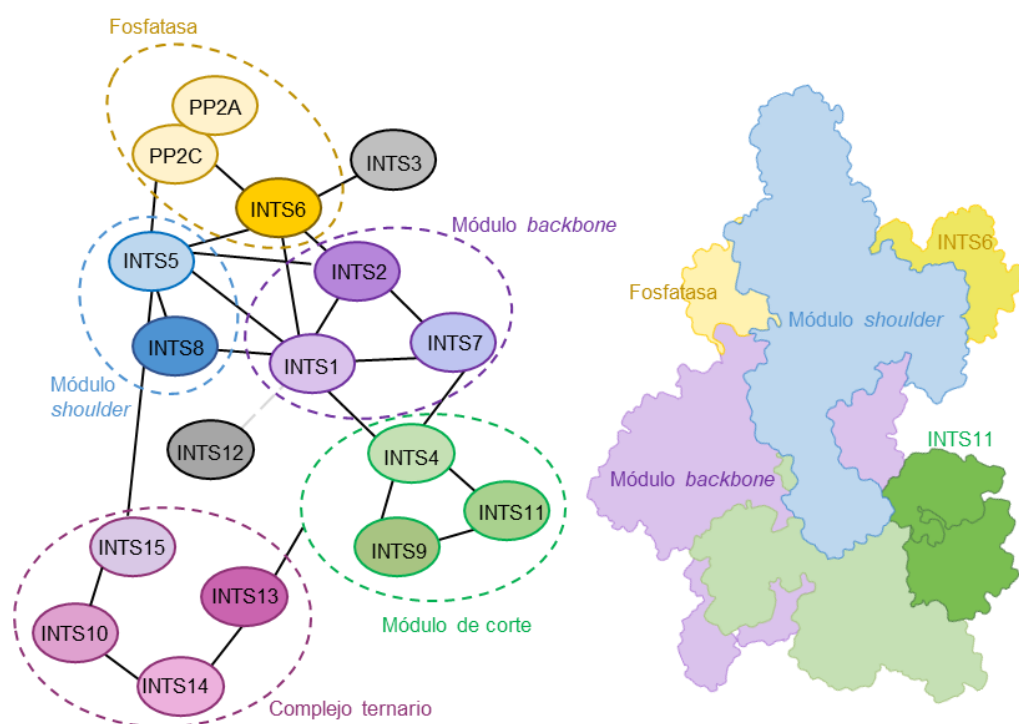


Figura I7. Esquema del complejo Integrator. Esquema de las subunidades de Integrator representando las interacciones descritas en la literatura, y estructura molecular del complejo conocida hasta el momento. Se desconoce cómo se integran en la estructura tridimensional del complejo Integrator algunas subunidades como INTS12 o INTS3, así como las subunidades que forman parte del complejo ternario. Basada en Pfleiderer y Galej, 2021²⁰¹ y Offley y colaboradores, 2023²⁰⁸.

4.4.2 Funciones del complejo Integrator

El complejo Integrator fue descubierto a través de su función de procesamiento y maduración de snARN¹⁹². Sin embargo, en los últimos años se han descrito muchos más sustratos de ARN que son procesados y regulados por este complejo, incluyendo los ARNs transcritos de potenciadores de la transcripción (eARNs, del inglés *enhancer*)²⁰⁹, ARNs que forman parte de la telomerasa (TERC)²¹⁰, ARNs largos no codificantes²¹¹, ARNs víricos²¹², piwi ARNs^{213,214} y microARNs²¹⁵. También se sabe que Integrator tiene un papel fundamental en la regulación de la transcripción de genes codificantes de proteínas, tanto mediante la represión como la activación de la expresión génica de sus dianas. En concreto, se ha demostrado que Integrator reprime la transcripción regulando las fases de iniciación^{216,217}, elongación²¹⁸ y terminación prematura de la transcripción a través de su actividad endonucleasa sobre ARNs nacientes, lo que lleva a una atenuación de la transcripción²¹⁹⁻²²². Además, Integrator puede activar la transcripción mediante su actividad endonucleasa que es capaz de liberar la ARNP_{II} pausada (complejo de elongación pausado), dejando vía libre a polimerasas productivas^{216,218,219,223}. Sin embargo, esta liberación de la ARNP_{II} pausada puede ser inhibida por la actividad fosfatasa del complejo, catalizada por PP2A, resultando en una represión de la transcripción¹⁹⁸. Por otro lado, recientemente se ha descubierto que Integrator se localiza en promotores activos, además de en secuencias potenciadoras de ciertos genes, activando su expresión en respuesta a ciertos estímulos como EGF^{202,216,217} o en ciertos contextos fisiológicos, como la migración neuronal²²⁴. También se ha demostrado que este complejo es capaz de interactuar con factores de transcripción de una manera contexto-específica, como es el caso del factor *Esrrb* en las células de trofoblasto, donde se cree que podría estar también implicado en la activación de la transcripción²²⁵.

Cabe destacar que la función de Integrator no afecta a todos los transcritos generados por la ARNP_{II}, sino que existen mecanismos por los que el complejo identifica sus dianas sobre las cuales debe actuar. En primer lugar, Integrator requiere la presencia del complejo de elongación pausado (PEC por sus siglas en inglés), formado por la ARNP_{II} pausada, DSIF y NELF, para su función sobre los sustratos de ARN²²⁶. El segundo mecanismo es que Integrator tiene la capacidad de reconocer el perfil fosforilativo del dominio C-terminal de la ARNP_{II}²²⁷. Además, la actividad de Integrator podría estar regulada por factores que interactúan con algunas de sus subunidades, como BRAT1, que se ha visto que se une estrechamente con el dominio endonucleasa del complejo, y su depleción causa defectos en el procesamiento de ARNs pequeños nucleares ricos en uridilato (UsnARNs)²²⁸. Por último, Integrator podría procesar los sustratos de ARN en base a dos características: una secuencia consenso que se sabe que es necesaria para el correcto procesamiento de snARNs²²⁹, y la formación de horquillas en el extremo de las moléculas de ARN, que se sabe que incrementa la eficiencia de corte^{230,231}.

4.4.3 Alteración de la función del complejo Integrator y enfermedad

Dada la importancia del complejo Integrator en el mantenimiento de la homeostasis del transcriptoma, la alteración de su funcionamiento por mutaciones en alguna de las subunidades se ha relacionado con numerosas enfermedades y defectos en el desarrollo^{106,232-237}. La ruptura del complejo durante embriogénesis es letal desde *C. elegans* hasta ratones, lo que resalta el papel esencial que tiene el complejo Integrator en el desarrollo embrionario

evolutivamente^{232,233}. En humanos varios estudios en pacientes han relacionado mutaciones en las subunidades *Ints1* e *Ints8* con defectos en el desarrollo neurológico²³⁴⁻²³⁶. Las mutaciones que alteran el funcionamiento del complejo provocan un mal procesamiento de los snARNs y patrones de corte-y-empalme aberrantes, causando de los fenotipos observados en los pacientes. Los defectos en el desarrollo podrían deberse al importante rol del complejo Integrator durante la diferenciación celular²³⁸, y en la regulación de la migración neuronal²²⁴. Alteraciones en el funcionamiento de Integrator se han relacionado también con cáncer, y es que mutaciones en alguna de las subunidades del complejo se han detectado en varios tipos de cáncer²³⁷. En leucemias, INTS3 presenta fallos en el empalme de su ARNm, dando lugar a fallos en el funcionamiento del complejo Integrator que contribuyen a la leucemogénesis¹⁰⁶. Además, se ha comprobado en pacientes en tratamiento con quimioterapia que menores niveles de expresión de las subunidades de Integrator correlacionan con una peor prognosis de la enfermedad²¹¹. Finalmente, se han identificado como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer las subunidades INTS10²³⁹ y PP2A²⁰⁴. Actualmente se desconoce el papel del complejo Integrator en el contexto del envejecimiento.

4.4.4 Modularidad del complejo. Funciones independientes del complejo Integrator

Las subunidades de Integrator muestran diferentes localizaciones celulares pudiendo ser predominantemente nucleares o citoplasmáticas, o apareciendo en ambas fracciones por igual²⁴⁰⁻²⁴². Además, se ha observado que diferentes subunidades se asocian a diferentes fracciones de la cromatina durante la diferenciación celular²⁰², y el silenciamiento o depleción de cada una de las subunidades causa un fenotipo diferente. En base a estos datos, y dada la modularidad del complejo, cabe hipotetizar sobre potenciales funciones de cada uno de los módulos de las subunidades que conforman el complejo Integrator, independientes del complejo y de las funciones que éste realiza. Un ejemplo conocido que apoya esta idea es el papel que desempeña INTS3 junto con INTS6 en los mecanismos de reparación de ADN, donde se ha demostrado la necesidad de INTS3 para la correcta formación y localización del complejo de reparación de ADN SOSS^{205,207,243}, y que no requiere del resto de miembros Integrator. Otro ejemplo es INTS13, que se ha visto que es reclutada a secuencias potenciadoras durante la diferenciación a monocitos por los factores de transcripción EGR1 y NAB2²⁰². La presencia de INTS13 en dichas secuencias potenciadoras es necesaria para la activación génica causante de la diferenciación, y dicha función es independiente del resto del complejo.

4.4.5 INTS4

La subunidad 4 del complejo Integrator (INTS4) es una proteína que interactúa con el heterodímero del módulo endonucleasa del complejo, formado por INTS9 e INTS11. La interacción con estas dos subunidades se produce a través tanto de la región N-terminal como de la C-terminal²⁴¹. La presencia de INTS4 en el módulo endonucleasa es necesaria para la formación de cuerpos de Cajal y el correcto procesamiento de UsnARNs^{241,244}. Además, INTS4 interactúa con otras subunidades del complejo, actuando como unión entre el heterodímero endonucleasa y el resto del complejo Integrator (**Figura I7**). Sin embargo, se desconoce si INTS4 desempeña alguna función adicional dentro del complejo, o si su ausencia está relacionada con defectos en procesos celulares o con situaciones patológicas. El papel de esta proteína en ESCs permanece aún inexplorado.

5. OBJETIVOS

El envejecimiento es un proceso fisiológico complejo que implica cambios en diversos procesos moleculares y celulares con el paso del tiempo. Las modificaciones del ARN, también denominadas modificaciones epitranscriptómicas, están emergiendo como una nueva capa regulatoria tanto de la expresión génica, como de una amplia variedad de procesos celulares. Mientras que la contribución de las modificaciones epigenéticas al desarrollo del envejecimiento ha sido ampliamente explorada en una gran variedad de organismos y modelos celulares, el papel de las modificaciones de ARN en el contexto del envejecimiento, y más específicamente de TET2 y 5-hidroximetilcitosina, permanece inexplorado. Esta tesis doctoral se basa en la hipótesis de que TET2 y la oxidación de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina en el ARN desempeñan un papel en la regulación del proceso de envejecimiento. Con el fin de diseccionar el papel de TET2 en el envejecimiento, establecimos los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Caracterizar el impacto del envejecimiento en la expresión de *Tet2* y otras enzimas escritoras de m⁵C/hm⁵C, y en la presencia de modificación m⁵C/hm⁵C en el ARN analizando células procedentes de individuos jóvenes y viejos.

Objetivo 2: Caracterizar la función de la proteína interactora de TET2, INTS4, en células jóvenes.

Objetivo 3: Caracterizar el papel que desempeñan interactores de TET2 y enzimas modificadoras de ARN en envejecimiento en *C. elegans*.

Los resultados esperados de este trabajo contribuirán a dilucidar nuevos mecanismos asociados al envejecimiento que servirán para el desarrollo de futuras terapias dirigidas a retardar o incluso revertir el envejecimiento epitranscriptómico.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 REACTIVOS Y KITS

Todos los reactivos empleados en esta tesis doctoral junto con sus referencias comerciales se encuentran resumidos en la Tabla Suplementaria 1. Las concentraciones específicas de cada reactivo se encuentran indicadas en su sección correspondiente del apartado materiales y métodos. Los kits comerciales empleados en esta tesis doctoral se encuentran resumidos en la Tabla Suplementaria 2. Los accesorios y material fungible necesarios para la realización de los protocolos aquí descritos se encuentran listados en la Tabla Suplementaria 3.

6.2 LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares empleadas a lo largo de esta tesis doctoral se resumen en la siguiente tabla:

Nombre	Origen	Identificador
v6.5 ESCs	NBP1-41162	Novus Biologicals
J1 ESCs	ATCC	SCRC-1010
TET TKO ESCs	Dr. Rudolf Jaenisch (MIT, EEUU)	Clon #26
TET2 -/- ESCs	Dr. Rudolf Jaenisch (MIT, EEUU)	Clon #16
TET2 KI ESCs	Dr. François Fuks (ULB, Bélgica)	n/a
TET2 KI ΔRBD ESCs	Dr. François Fuks (ULB, Bélgica)	n/a
tdTomato ESCs	Dr. Miguel Fidalgo (USC, España)	n/a
W3T3	Dr. Juan Zalvide (USC, España)	n/a
Fibroblastos primarios	Dr. Diana Guallar (USC, España)	n/a
HEK293T	ATCC	CRL-3216

Células troncales embrionarias (ESCs) murinas J1: línea celular derivada de la masa celular interna de blastocisto pre-implantacional de ratones macho 129S4/SvJae.

ESCs v6.5: línea celular derivada de la masa celular interna de blastocisto pre-implantacional de ratones macho C57BL/6 X 129/sv.

ESCs murinas tdTomato: ESCs J1 transducidas con un plásmido portador de un reportero lentiviral tdTomato de expresión constitutiva.

Tet2 -/- ESCs: ESCs obtenidas de ratones 129/sv x C57BL/6 modificados genéticamente (*Tet2*:nlacZ/nGFP)²⁴⁵. Clon#16²⁴⁶.

TET TKO ESCs: ESCs derivadas de ratones 129/sv x C57BL/6 modificados genéticamente (*Tet1*^{-/-} *Tet2*^{-/-} *Tet3*^{+/-}). Tras su derivación, las células fueron modificadas genéticamente para eliminar el alelo WT de *Tet3*²⁴⁶.

TET2 KI ESCs: ESCs v6.5 modificadas genéticamente mediante CRISPR/Cas9 para el *knock-in* en el extremo 3' de *Tet2* del triple tag Flag+HA+Strep.

TET2 KI ΔRBD ESCs: ESCs v6.5 modificadas genéticamente mediante CRISPR/Cas9 para la delección de la región de unión a ARN (ΔRBD) y el *knock-in* en el extremo 3' de *Tet2* del triple tag Flag+HA+Strep.

W3T3: línea celular de fibroblastos aislados de embriones de ratón C57BL/6 inmortalizados mediante el protocolo 3T3²⁴⁷.

Células embrionarias de riñón humanas (HEK293T): Línea celular inmortalizada portadora del antígeno T de SV40 que facilita la propagación de vectores portadores del origen de replicación de SV40. Esta línea celular fue empleada para la generación de partículas virales portadoras de shARNs clonados en el plásmido pLKO (ver sección 6.7.1).

Fibroblastos primarios de ratón: líneas celulares derivadas de orejas y colas de ratones macho de fondo genético C57BL/6J de 2 o 28 meses de edad.

6.3 CULTIVO CELULAR

El mantenimiento de las líneas celulares fue llevado a cabo en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar.

Para el cultivo y experimentación de todas las líneas celulares empleadas en esta tesis doctoral, las células fueron individualizadas con tripsina-EDTA 0,5% a 37°C durante 5 minutos (fibroblastos o HEK293T) o 7 minutos (células madre embrionarias, ESCs). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂. Para la preservación de las líneas celulares a largo plazo, se recogieron las células mediante centrifugación a 300 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y tras eliminar el medio de cultivo del sobrenadante, las células se resuspendieron en medio de congelación (90% medio de cultivo y 10% dimetilsulfóxido, DMSO), y se transfirieron a crio-viales. Tras 24 horas a -80°C se trasladaron los crio-viales a tanques de nitrógeno líquido para su almacenamiento hasta su uso.

6.3.1 Derivación de fibroblastos de orejas y colas de ratón.

Los cultivos primarios de fibroblastos de ratón fueron obtenidos empleando orejas y colas de ratones de 2 meses y de 28 meses de edad. Se derivaron las células cortando los tejidos en fragmentos de aproximadamente 1 mm² y tratando con liberasa 0,14W durante 90 minutos a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente los fragmentos de tejido se mantuvieron en cultivo con DMEM alto contenido en glucosa, 10% de suero fetal bovino, 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (denominado en esta tesis “medio MEF”), hasta obtener fibroblastos en cultivo.

6.3.2 Cultivo celular

Las células troncales embrionarias (ESCs) de ratón se cultivaron en placas cubiertas con gelatina. Para ello se preparó gelatina 0,1% en agua ultrapura estéril, y con ella se cubrió la superficie de las placas de cultivo, y se incubaron las placas en el incubador a 37°C y 5% CO₂ durante al menos 30 minutos. La gelatina fue retirada de las placas previamente a la siembra celular. Las ESCs se mantuvieron en medio de cultivo ESM (SL), compuesto por medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa, 15% de suero fetal bovino (FBS) inactivado a 56°C 30 minutos, 100 mM de aminoácidos no esenciales, 200 mM L-glutamina, 1% de mezcla de nucleósidos (adenosina, citidina, guanosina, uridina y timidina), 100 U/ml de penicilina-estreptomycin, 0,1 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 1000 U/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF) recombinante producido y restado para su uso en ESCs en el laboratorio.

Los cultivos de fibroblastos y las células embrionarias de riñón humanas (HEK293T) fueron cultivados en placas de cultivo sin ningún tratamiento adicional, y se mantuvieron en medio de cultivo MEF. Los fibroblastos y las células HEK293T se pasaron cada tres días con una ratio de dilución 1:3 y 1:4, respectivamente.

6.4 CLONAJE

6.4.1 Clonaje de regiones codificantes de proteínas en plásmidos PiggyBac.

Con la finalidad de generar líneas celulares de sobreexpresión de la proteína INTS4, se empleó el sistema del transposón PiggyBac (PB)²⁴⁸. Para ello, a partir de ADN complementario obtenido de ARN de ESCs de ratón por PCR reversa (ver sección 6.10.2), se amplificó el CDS del gen *Ints4* (sin el codón de inicio ATG) mediante PCR empleando oligonucleótidos específicos (ver Tabla Suplementaria 6) portadores de colas con la secuencia diana para las enzimas de restricción XbaI y PacI. El producto de PCR obtenido fue clonado en el vector pJet1.2 empleando el kit CloneJet PCR cloning kit. Tras la transformación bacteriana y purificación del plásmido, se verificó la secuencia del CDS de *Ints4* por secuenciación Sanger. Una vez confirmada la secuencia del inserto, se clonó en el plásmido pPB-CAG-3xFLAG-pA-pgk-hph (Addgene, #48753) previamente digerido con las enzimas NheI y PacI, mediante ligación con 1U T4 ligasa. El constructo final pPB-3xFLAG-mInts4-Hygro fue validado por digestión diagnóstica, y la expresión del inserto ^{3x}FLAG-INTS4 mediante Western blot con anticuerpos anti-FLAG y anti-INTS4 (ver sección 6.11.4).

6.4.2 Clonaje de shARNs en vectores lentivirales pLKO

La generación de vectores con shARNs para el *knock-down* de los genes de interés fue llevado a cabo siguiendo el procedimiento previamente publicado por nuestro grupo²⁴⁹. En primer lugar, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos con las secuencias diana para los genes de interés. En el caso de estar disponibles en la base de datos Broad Institute GPP Web Portal (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public>), se emplearon dichas secuencias validadas para los ensayos de pérdida de función. Para aquellos genes que no hay secuencias de oligonucleótidos disponibles en dicha base de datos, el diseño fue llevado a cabo empleando secuencias diana para miARNs identificadas con la herramienta online TargetScanMouse (https://www.targetscan.org/mmu_80/). Se diseñaron los oligos empleando las secuencias diana con una mayor puntuación (lower predicted relative Kd), y los 7 nucleótidos adyacentes a ambos lados, dado que las secuencias diana de los miARNs son de 7 nucleótidos y las de los shARNs son de 21.

Oligonucleótido directo:

5'-CCGG-(21 nt, secuencia diana)-CTCGAG-(21 nt, complemento reverso)-TTTTTIG-3'

Oligonucleótido reverso:

5'- AATTCAAAAA- (21 nt, secuencia diana)-CTCGAG-(21 nt, complemento reverso)- 3'

Para el anillamiento de los oligonucleótidos se preparó la mezcla de reacción (2,5 μ M oligonucleótido directo, 2,5 μ M de oligonucleótido reverso, y tampón de reacción (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT), y se incubó en el termociclador con el

siguiente programa: 30 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C y una reducción de 5°C cada minuto hasta alcanzar 25°C. Los oligonucleótidos anillados se clonaron en el plásmido pLKO.1 con resistencia a puromicina (Addgene, #8453) o a higromicina (Addgene, #24150), digerido con las enzimas EcoRI y AgeI. La ligación se llevó a cabo incubando 50 ng de vector digerido con 1 µl de una dilución 1:100 de los oligonucleótidos anillados, y 1U T4 ligasa y 1x Tampón de reacción de la T4 ligasa. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se transformaron bacterias *E. coli Stbl3* competentes con el producto de ligación (ver sección 6.5.1). Se identificaron las colonias recombinantes que tienen el plásmido de interés obtenidas mediante PCR. Brevemente, se resuspendió media colonia en mezcla de reacción de PCR (DreamTaq Green PCR Master Mix 2x, 10µM oligonucleótido directo y 10 µM oligonucleótido reverso). Se llevó a cabo la PCR empleando el equipo Applied Biosystems™ SimpliAmp™ ThermalCycler con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de amplificación (95°C 30 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 30 segundos) y una extensión final a 72°C 5 minutos. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 2,5% con Synergel y se visualizó empleando el equipo BioRad Gel Doc™ XR+. En el gel observamos un amplicón más largo en los casos en los que los shARNs se insertaron en el plásmido con respecto al vector vacío. Las colonias positivas para la clonación de los shARNs fueron crecidas en medio de cultivo líquido para la purificación de los plásmidos pLKO con los shARNs, y la secuencia de los shARNs se validó mediante secuenciación Sanger como confirmación.

6.4.3 Clonaje de guías de ARN para CRISPR/Cas9

La generación de líneas *knock-out* (KO) se llevó a cabo empleando la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9²⁵⁰. Para ello, se diseñaron guías de ARN dirigidas a secuencias diana del exón 2 (porque no encontramos guías en el exón 1) de *Ints4*, empleando el programa en línea CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>)²⁵¹. Se eligieron las guías con mayor puntuación de especificidad, para minimizar el número de dianas no específicas. El programa genera secuencias de oligonucleótidos que al anillar dan lugar a extremos cohesivos compatibles con los extremos generados por digestión con la enzima de restricción BbsI. Los oligonucleótidos se pidieron a Sigma-Aldrich, se anillaron y fosforilaron en la siguiente reacción: 2,5 µM de oligonucleótido directo, 2,5 µM de oligonucleótido reverso, 1x solución de reacción A de la polinucleótido quinasa T4 (PNK), 1 mM de ATP y 10 U de T4 PNK. Se incubó la reacción en un termociclador durante 30 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C seguida de una reducción de temperatura de 5°C cada minuto hasta alcanzar 25°C. El vector SpCas9-2A-Puro V2.0 (Addgene, 62988), que codifica para la enzima Cas9 y permite el clonaje de la guía se digirió con la enzima BbsI y se desfosforiló. A continuación, se aisló el vector linearizado mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó el ADN del gel con el kit comercial GenElute Gel Extraction siguiendo las indicaciones del fabricante. Por último, se ligaron el vector linearizado purificado y los dúplex anillados de las guías de ARN con la ligasa de ADN T4, en una reacción análoga a la descrita en el apartado anterior. Se verificó la identidad del plásmido obtenido mediante secuenciación de Sanger y por PCR. Las secuencias de las guías de ARN empleadas en esta tesis doctoral se encuentran recogidas en la Tabla Suplementaria 6.

6.5 TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN DE ADN

6.5.1 Transformación bacteriana

Para la transformación bacteriana se añadió el ADN plasmídico a las bacterias competentes (máximo un 10% del volumen de bacterias), y se incubaron las bacterias en hielo durante 30 minutos. Tras dicho tiempo, se sometieron las bacterias a un choque térmico de 42°C durante 1 minuto en el caso de la cepa *Stbl3*, y 37°C durante 45 segundos en el caso de la cepa *DH5α*, para facilitar la entrada del plásmido. A continuación, se incubaron las bacterias en hielo durante 5 minutos, se añadieron 400 µl de medio SOC (20 g triptona, 5 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl por cada litro) y se dejaron crecer las bacterias en dicho medio durante 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente se sembraron 200 µl de cultivo bacteriano en placas de LB Agar, con el antibiótico de selección necesario, y se incubó a 37°C durante 16 horas con agitación a 225 rpm.

6.5.2 Extracción de ADN plasmídico

Se preparó un cultivo picando una única colonia transformada con el plásmido de interés, y se inoculó en 8 ml de cultivo líquido de medio LB con el antibiótico de selección adecuado para la resistencia conferida por el plásmido a purificar (ver **Tabla M1**). El cultivo se incubó durante 16 horas a 37°C en agitación a 225 rpm. Al día siguiente el cultivo bacteriano se centrifugó, y el pellet de bacterias fue empleado para la extracción de ADN plasmídico con el kit GenElute™ Plasmid MiniPrep siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para preparaciones de mayor cantidad de ADN, se emplearon cultivos bacterianos de 50-200 ml (según el tipo de plásmido, de alto o bajo número de copias), y la extracción fue llevada a cabo empleando el kit PureLink™ HiPure PlasmidFilter MidiPrep kit siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Tras la purificación, se cuantificó la concentración y la pureza de los ácidos nucleicos obtenidos empleando el espectrofotómetro Nanodrop 2000.

Tabla M1. Antibióticos y concentraciones empleadas en cultivo bacteriano.

Antibiótico	Concentración
Ampicilina	50 µg/ml
Kanamicina	50 µg/ml
Estreptomicina	60 µg/ml
Tetraciclina	12.5 µg/ml

6.6 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Los plásmidos basados en el transposón PiggyBac (PB) empleados para la sobreexpresión de nuestras proteínas de interés fueron cotransfectados con la transposasa pBase, en células ESCs empleando el reactivo jetPRIME. Para ello, se sembraron 100.000 células en un pocillo de una placa de 12 pocillos, previamente tratado con gelatina al 0,1%. Tras veinticuatro horas en cultivo, se añadió medio fresco a las células y se transfectaron con 300 ng de plásmido PB y 100 ng de pBase. La reacción de transfección se preparó diluyendo el ADN en 75 µl de tampón jetPRIME y posteriormente se añadió a la mezcla 1,6 µl de reactivo jetPRIME. Se homogenizó la mezcla y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para

permitir la formación de vesículas de transfección. Transcurrido este tiempo, se añadió la mezcla a las células gota a gota por toda la superficie del pocillo. Tras cuatro horas se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco y tras veinticuatro horas se procedió a la selección con el antibiótico correspondiente. El medio de cultivo con el agente de selección fue reemplazado diariamente hasta que todas las células del pocillo no transfectado (control de selección) hubiesen muerto, tripsinizando las células cuando era necesario.

6.7 PRODUCCIÓN DE VIRUS Y TRANSDUCCIÓN

6.7.1 Generación de partículas virales

Los vectores lentivirales pLKO para la expresión de shARNs se transfectarán junto con los vectores empaquetadores psPAX2 y pMD2.G en células HEK293T. Se sembraron las células indicadas a una densidad de 8.000.000 células en una placa de 150 mm (aproximadamente 55.000 células por cm²). Veinticuatro horas después, se les cambió el medio de cultivo y se transfectaron con PEI (Polietilenimina). Para la transfección con PEI se prepararon dos diluciones, una de 1,6 ml de NaCl 150 mM estéril en la que se diluyeron 16 µL de Pei 5x, y otra de 1,6 ml de NaCl 150 mM a la que se añadieron 20 µg de ADN (en el caso de la producción de lentivirus el 50% del ADN se corresponde al vector lentiviral y 25% de cada uno de los empaquetadores). A continuación, se añadió la disolución de PEI sobre la de ADN, se mezcló hasta homogenizar y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la solución de transfección se añadió a los cultivos celulares gota a gota. A las 24 horas después de la transfección se cambió el medio de cultivo, y a las 48 y 72 horas tras la transfección se recogieron los sobrenadantes, que contenían las partículas virales. Tras una primera centrifugación para eliminar las posibles células presentes en los sobrenadantes, éstos se concentraron empleando unidades de filtrado por ultracentrífuga de Amicon con tamaño de poro 0,22 µm, centrifugando a 3.500 g durante 30 minutos a 4 °C. Para almacenamiento a largo plazo los virus concentrados fueron alicuoteados y almacenados a -80 °C.

6.7.2 Transducción de células de mamífero

Para la infección con las partículas virales producidas de fibroblastos se sembraron 50.000 por cada pocillo de una placa de 6 pocillos, y tras veinticuatro horas en condiciones de cultivo estándar, se les añadió 2 ml de medio fresco suplementado con 6 µg/ml de polibreno y 100 µl de concentrado de partículas virales. Veinticuatro horas después de la infección, se reemplazó el medio de cultivo.

Los ensayos de pérdida de función mediados por shARNs clonados en vectores lentivirales pLKO (ej. pLKO.sh*Ints4*) en células embrionarias de ratón se realizaron sembrando 200.000 células por pocillo de placas de 6 pocillos, previamente recubiertas con gelatina al 0,1%. Tras veinticuatro horas de cultivo en condiciones de cultivo estándar, se reemplazó el medio por una mezcla a partes iguales de medio de cultivo con sobrenadante que contiene las partículas virales, y suplementado con 8 µg/ml de polibreno.

6.8 GENERACIÓN DE LÍNEAS KNOCK-OUT MEDIANTE CRISPR/CAS9

Con los plásmidos portadores de la secuencia codificante para la endonucleasa Cas9 y las guías de ARN (sgARN) dirigidas contra la secuencia genómica del exón 2 de *Ints4* (ver sección 6.4.3), se transfectaron células madre embrionarias de ratón usando el kit jetOptimus siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las células transfectadas se seleccionaron con 2 µg/ml de puomicina durante 2 semanas para seleccionar las células en las que la integración del cassette haya tenido lugar. Se verificó la generación de las líneas KO mediante genotipado por PCR, RT-qPCR y Western blot.

6.9 GENOTIPADO

6.9.1 Aislamiento de ADN genómico

El ADN genómico (ADNg) fue extraído y purificado empleando el kit Centra Puregene Cell Kit siguiendo las indicaciones del fabricante. En resumen, 1.000.000 ESCs fueron resuspendidas en 200 µl de solución de lisis celular e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente para su ruptura. A continuación, se añadieron 3 µl de RNasa A (1 mg/ml) y se incubaron las muestras durante 1 hora a 37°C. Entonces se procedió a enfriar las muestras incubando durante 10 minutos en hielo, y se añadieron 200 µl de solución de precipitación de proteínas. Se precipitaron las proteínas mediante centrifugación a temperatura ambiente, a 14.000 g durante 3 minutos. Se mezcló el sobrenadante con 200 µl de isopropanol en un tubo de microcentrífuga limpio, y tras homogenizar completamente la mezcla, se centrifugó durante 5 minutos a temperatura ambiente a 14.000 g para precipitar el ADNg. El pellet fue lavado con etanol al 70% durante 5 minutos y tras este tiempo se descartó el sobrenadante de etanol y se dejaron secar los pellets al aire durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendió el ADNg obtenido en 66 µl de solución de hidratación de ADN, se incubó durante 1 hora a 65°C, seguido de 16 horas a temperatura ambiente. La concentración y calidad de las muestras se cuantificó empleando un espectrofotómetro Nanodrop 2000. Para almacenamiento de las muestras se guardaron a 4°C.

6.9.2 Genotipado por PCR

El genotipado para la identificación de células *knock-out* fue llevado a cabo mediante PCR empleando ADN genómico, y una combinación de tres oligonucleótidos específicos (ver **Figura R16c**). Al par de oligonucleótidos directo y reverso, se añadió un tercer oligonucleótido en sentido directo que anilla específicamente en la secuencia diana reconocida por la ARNg, dando lugar así a dos amplicones de 400 y 200 bp en genotipo silvestre y un único amplicón de tamaño variable, según el fragmento de ADN eliminado tras el corte por Cas9, en el caso del genotipo *knock-out*. La reacción de PCR fue realizada con el siguiente programa: desnaturalización inicial 2 minutos 95°C, 30 ciclos de amplificación (94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 30 segundos), y extensión final 5 minutos 72°C. Finalmente, los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados en el equipo BioRad GelDoc™ XR+ system.



Los oligonucleótidos empleados para genotipado por PCR empleados en esta tesis doctoral se encuentran recogidos en la Tabla Suplementaria 6.

6.10 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICOS

6.10.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo empleando Trizol (Invitrogen, 15596018) y tubos Phasemaker. Se resuspendió el pellet de células en la solución de Trizol y se transfirió la mezcla a uno de los tubos Phasemaker. A continuación, se procedió a la extracción de ARN siguiendo las indicaciones comerciales. La concentración de las muestras de ARN obtenidas y su calidad fueron determinadas empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, ND2000) o el fluorómetro Qubit 4 Fluorometer usando el kit Qubit RNA HS Assay Kit y el kit Qubit RNA IQ Assay Kit, siguiendo las indicaciones del comercial.

6.10.2 Generación de ADN complementario

Para la obtención de ADN complementario (ADNc), 1 µg de ARN total se convirtió en ADNc empleando el kit qScript cDNA SuperMix Kit siguiendo las indicaciones del comercial. Se realizó una transcripción reversa (5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C) fue llevada a cabo con el equipo SimpliAmp Thermocycler System.

6.10.3 Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)

La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó mezclando ADNc (ve sección 6.10.2), la mezcla maestra PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, A25742), y 1 µM de cebadores directos e inversos específicos para cada gen de interés. Las reacciones se llevaron a cabo en microplacas de 384 pocillos y selladas con películas adhesivas ópticas. La qPCR fue llevada a cabo con el equipo StepOnePlus Real-Time PCR system and QuantStudio 5 qPCR System siguiendo condiciones de amplificación específicas recogidas en la **Tabla M2**. La media del umbral de ciclo (Ct) fue determinada a partir de reacciones en triplicado, y los datos fueron analizados el método delta-delta CT, en el cual se normalizan los valores a un gen de referencia y los valores relativos de expresión de una muestra control. Las parejas de cebadores específicos empleados en esta tesis están recogidas en la Tabla Suplementaria 6. Las representaciones gráficas se hicieron con GraphPad Prism (v8.0.2) o con Microsoft Excel.

Tabla M2. Condiciones de la qPCR para el análisis de la expresión génica.

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
50°C	2 minutos	1
95°C	2 minutos	1
95°C	5 segundos	45
60°C	32 segundos	
95°C	15 minutos	1
60°C	1 minuto	1
95°C	15 segundos	1

6.10.4 Entrecruzamiento e inmunoprecipitación seguida de qPCR (CLIP-qPCR)

Para la inmunoprecipitación de ARNs unidos a INTS4, se estabilizaron las interacciones ARN-proteína mediante irradiación con UV 254 nm en células ESC con sobreexpresión de ^{3xFLN}INTS4, y se generaron extractos celulares totales. Brevemente, se recogieron 100.000.000 células en 10 mL de PBS frío y se irradiaron sobre una placa de cultivo de 150 mm con 400.000

J/cm² a 254 nm en UV Stratalinker 1800 (Stratagene). Se recogieron las células en un tubo de 15 mL y se sometieron a centrifugación 300 g, 5 minutos a 4°C. El pellet celular fue lisado en 4 ml de Solución de CLIP (ver **Tabla M3**) mediante 3 ciclos de sonicación, 30 segundos ON, 2 minutos OFF en el sonicador Branson Digital Sonifier. Los lisados celulares fueron centrifugados 10 minutos a 2.500g y 4°C para eliminar los restos celulares de los extractos proteicos totales. Se determinó la cantidad de proteína en los extractos mediante el método BCA. Para inmunoprecipitar ^{3xFL}INTS4, se incubaron 4 mg de extracto proteico total con 4 µg de anticuerpo anti-FLAG 16 horas a 4°C en rotación. Al día siguiente, tras equilibrar las bolas magnéticas con solución de CLIP, se añadieron a las reacciones de inmunoprecipitación y se incubaron 4 horas en rotación a 4°C. Se llevaron a cabo lavados de 5 minutos en rotación a 4°C con las siguientes soluciones: 1) solución de lavado baja en sal, 2) solución de lavado alta en sal, 3) Solución de lavado con LiCl y 4) Solución de CLIP (ver **Tabla M3**). Tras los lavados se incubaron los inmunocomplejos obtenidos con proteinasa K durante 20 minutos a 55°C para liberar los ARNs unidos a las proteínas inmunoprecipitadas, y finalmente se resuspendió en TRIZOL para la purificación del ARN (ver sección 6.10.1). El ARN purificado fue cuantificado con Qubit High Sensitivity y se retrotranscribió a cDNA para qPCR (ver sección 6.10.2).

Tabla M3. Composición de las soluciones empleadas en el protocolo de CLIP-qPCR.

Solución de CLIP	
Reactivo	Concentración
KCl	150 mM
Tris HCl pH 7,5	25 mM
EDTA	5 mM
DTT	0,5 mM
Igepal	0,5%
Solución de lavado baja en sal	
Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
SDS	0,1%
Tritón X-100	1%
Solución de lavado alta en sal	
Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	500 mM
EDTA	2 mM
SDS	0,1%
Tritón X-100	1%
Solución de lavado con LiCl	
Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 8,0	10 mM
LiCl	250 mM
EDTA	1 mM
Deoxicolato sódico	1%
Igepal	1%

6.10.5 Espectrometría de masas

Para el análisis de modificaciones del ARN mediante espectrometría de masas, se empleó la fracción larga (>200 nt) de muestras de ARN ribodeplecionado. Para obtener dicha fracción, ARN total aislado con TRIZOL (ver sección 6.10.1), se trató con DNasa I durante 30

minutos a 37°C para eliminar potenciales restos de ADN genómico que pudieran existir. A continuación, se precipitó el ARN con acetato de sodio 3M pH=5,2 y etanol al 100% durante 1 hora a -20°C. El ARN purificado fue sometido a ribodepleción con el kit RiboMinus Eukaryote Probe Mix v2 siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ARN ribodeplecionado obtenido fue tratado con la mezcla de digestión de nucleósidos durante 1 hora a 37°C, y desalado utilizando columnas HyperSep Hypercarb SPE Spin Tips. Las muestras fueron enviadas al servicio de espectrometría de masas del Centro de Regulación Genómica (CRG) para su análisis. Las muestras fueron analizadas empleando el espectrómetro de masas Orbitrap Eclipse Tribrid acoplado a la columna de cromatografía EASY-nLC 1200. Los datos adquiridos se analizaron con el software Skyline-daily (v22.2.1.278) y las áreas extraídas de los ribonucleósidos se usaron para la cuantificación.

6.10.6 Secuenciación masiva de ARN y análisis

Para la secuenciación de ARN, la extracción con Trizol se realizó empleando tubos Phasemaker (Invitrogen), siguiendo los pasos indicados en el apartado 6.10.1. Se analizó la calidad e integridad del ARN aislado mediante Qubit y gel de agarosa al 1% en 0,5x TBE a 180V durante 16 minutos. La secuenciación del transcriptoma se realizó en la compañía Novogene, quienes analizaron la calidad de las muestras con Agilent Bioanalyzer 2100. La secuenciación la llevaron a cabo empleando la plataforma Illumina HiSeq4000, generando lecturas específicas de cadena (*strand-specific*) de extremos emparejados (*paired-end*) de 150 pares de bases de largo. Se analizaron replicados biológicos de ESCs *shLuci* o *shInts4*, así como fibroblastos derivados de ratones jóvenes (2 meses) y viejos (28 meses) y fibroblastos jóvenes y viejos inmortalizados.

El análisis bioinformático de los datos de secuenciación masiva se realizó en nuestro laboratorio, siguiendo protocolos establecidos en el campo. Para el análisis de la calidad de las lecturas generadas se empleó el software Fastqc v0.11.5. Las lecturas de calidad inferior a 30, consideradas lecturas de baja calidad, y los adaptadores de la librería de secuenciación fueron eliminados con el software Trimmomatic v0.39. Las lecturas de alta calidad se mapearon al genoma de ratón (Ensembl GRCmm39 versión 104) con el software STAR v2.7.6, siguiendo los parámetros de configuración por defecto. A continuación, se eliminaron los duplicados de secuenciación con el software Picard-tools (v2.27.2) con los comandos “MarkDuplicates” y “RemoveDuplicates=TRUE”. Las lecturas filtradas fueron asignadas a los genes correspondientes con el software htseq-count v0.13.5, con el parámetro de superposición “intersection-nonempty”. Por último, el análisis diferencial de la expresión génica entre las muestras fue calculada con el software DESeq2 v1.32.0, instalado en el ambiente R v4.2.2. La matriz de lecturas se cargó con el paquete ddsHTseq, y tras un filtrado para la exclusión de los genes no expresados, se llevó a cabo el análisis diferencial definiendo la muestra control con el comando “contrast”. Las matrices de datos se anotaron con una lista de parámetros útiles para el procesamiento de los mismos (Nombre del gen, ID de ENSEMBL, posición de inicio y final en el genoma, cromosoma, tipo de transcrito y hebra codificante) empleando el paquete BiomaRT v2.52.0.

El análisis bioinformático (filtrado, alineamiento y análisis de expresión diferencial) de los datos de secuenciación fue llevado a cabo en colaboración con mis compañeros de laboratorio David Martínez Delgado y Alejandro Fuentes Iglesias.

6.10.7 Análisis de ontología génica y vías de señalización KEGG

Los análisis de ontología génica y vías de señalización KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) fueron realizados empleando la herramienta de anotación funcional DAVID ((<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)).

6.10.8 Análisis de enriquecimiento génico (GSEA)

Con el fin de llevar a cabo análisis de enriquecimiento en la expresión génica se empleó el software GSEA_4.3.2 (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Se llevó a cabo el análisis con 1.000 permutaciones y empleando el tipo de permutación gene_set. Para el cálculo de la puntuación de enriquecimiento se ponderó mediante weighted_p2, y t-test para la clasificación de los genes. El diagrama de enriquecimiento junto con los valores de enriquecimiento normalizado (NES), de significancia estadística (p valor) y de descubrimiento falso (FDR) fueron generadas empleando el software.

6.11 ANÁLISIS DE PROTEINAS

6.11.1 Extracción de proteína

Se obtuvieron extractos de células enteras empleando la solución de lisis celular RIPA Lysis Buffer System junto con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados se incubaron durante 30 minutos en hielo, mezclando con un agitador vortex cada 5 minutos para la completa lisis celular. Tras ello, se centrifugó los lisados 10 minutos a 10.000 g y 4°C para eliminar los restos celulares de los extractos proteicos. El sobrenadante se almacenó en tubos de microcentrífuga a -80°C. La cuantificación de la concentración proteica se llevó a cabo empleando el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.11.2 Fracciones proteicas subcelulares

La obtención de fracciones proteicas subcelulares (citoplasmática, soluble nuclear y unida a cromatina) se empleó un kit de fraccionamiento subcelular de proteínas siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, se recogieron las células en cultivo en 2 placas de 10 cm, que dieron lugar a un volumen celular de 50 µl. Tras un lavado con PBS, se llevó a cabo el protocolo de extracción. Las fracciones proteicas subcelulares obtenidas fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis. Para su análisis mediante Western blot, cada una de las fracciones fue cuantificada empleando su tampón de extracción en la recta patrón

6.11.3 Inmunoprecipitación de proteína

La preparación de extractos proteicos celulares totales para la identificación de complejos proteicos mediante inmunoprecipitación se hizo con la solución de lisis de interactoma, cuya composición está descrita en la **Tabla M4**. La inmunoprecipitación se llevó a cabo incubando 16 horas a 4°C en rotación 1 mg de extracto proteico con 2 µg de anticuerpo

en tubos de recolección con baja unión de proteínas. Al día siguiente se añadieron 20 µl de bolas magnéticas, previamente equilibradas con solución de lisis, y se incubó durante 4 horas a 4°C en rotación. Transcurrido dicho tiempo, con ayuda de una gradilla magnética se separaron los complejos de perlas magnéticas e inmunoprecipitado del resto de la solución, y tras cuatro lavados con solución de lisis durante 5 minutos a 4°C en rotación, se resuspendieron los inmunocomplejos en solución de carga de Western blot 1x (8% de SDS, 40% de glicerol, 5% de β-mercaptoetanol, 0,04% de azul de bromofenol y 240 mM de Tris HCl pH 6,8). Se hirvieron las muestras 100°C 5 minutos y con ayuda de la gradilla magnética se separaron las proteínas inmunoprecipitadas de las bolas magnéticas. Finalmente se analizaron los inmunocomplejos mediante Western blot.

La inmunoprecipitación empleando el sistema Strep-Tactin fue llevado a cabo incubando 16 horas a 4°C en rotación 1 mg de extracto proteico con 20 µl de bolas magnéticas MagStrep previamente equilibradas. El día siguiente se recogieron los complejos proteína-bolas magnéticas con ayuda de una gradilla magnética, y tras cuatro lavados con solución de lisis durante 5 minutos a 4°C en rotación, fueron resuspendidos en solución de carga de Western blot.

Tabla M4. Composición de la solución de lisis de interactoma.

Solución de lisis de interactoma	
Reactivo	Concentración
Tris HCl pH 7.5	25 mM
Glicerol	20%
KCl	100 mM
EDTA	0,5 mM
Igepal	0,05%
PMSF	0,2 mM
DTT	1 mM
PIC	1x

6.11.4 Western blot

Para el análisis mediante Western blot se mezclaron las diluciones de proteína con solución Laemmli (preparación casera) para su desnaturalización a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles comerciales Novex WedgeWell 4–20% tris-Glycine Gel o en geles de preparación casera de acrilamida/bisacrisamida de 8-12%. Las preparaciones de proteínas fueron separadas mediante electroforesis (100V, 1h) y transferidas a 4°C 50V durante 16 horas del gel a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), previamente activadas con metanol durante 5 minutos. Tras la transferencia se lavó las membranas con agua milliQ y se procedió a teñir con Ponceau S para la visualización de las bandas de proteínas como control de carga. Las membranas se lavaron con agua milliQ para eliminar el exceso de tinción y se escanearon. A continuación, se lavó 3 veces con tampón TBS (tampón salino Tris 1x) suplementado con 0,1% TWEEN® 20 (solución TBS-T) durante 5 minutos, y se procedió al bloqueo de la membrana con una solución de leche en polvo al 5% en TBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se procedió a la incubación con anticuerpo primario diluido en leche en polvo al 0,5% en TBS-T. La lista de anticuerpos y condiciones de uso empleadas en

esta tesis doctoral se encuentra recogida en la Tabla Suplementaria 5. Se lavó 3 veces con TBS-T durante 15 minutos para quitar el exceso de anticuerpo y se incubó 45 minutos a 4°C con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), diluido 1:5.000 en leche en polvo al 0,5% en TBS-T. Finalmente se lavó 3 veces con TBS-T durante 15 minutos cada lavado y se incubó 5 minutos con los sustratos ECL Pierce® ECL Western Blotting Substrate. Tras la exposición de las películas fotográficas Fuji Medical X-Ray Films a las membranas se reveló y fijó la señal empleando el equipo Fuji Medical Film Processor FPM-100A.

6.11.5 Cuantificación de intensidad de señal

La cuantificación de la intensidad de señal obtenida por Western blot fue llevada a cabo empleando el software ImageJ²⁵². En resumen, se abrió la imagen a cuantificar con el programa, y se invirtieron los colores previamente a la cuantificación. Se dibujó un cuadrado entorno a las bandas de interés y con la herramienta de análisis de geles (Analyze>Gels) se marcó el cuadrado como carril número 1, y a continuación se cuantificó la intensidad del carril 1 con la herramienta “plot lanes”. Del gráfico resultante con la herramienta “wand” se obtuvo el área bajo la curva, equivalente a la intensidad de la señal de cada una de las bandas. Finalmente se calculó la intensidad de cada una de las muestras relativa a la intensidad del control de carga (ACTB o TUBULINA).

6.11.6 Deshibridación de la membrana

Con el objetivo de liberar los anticuerpos unidos a la membrana para su reincubación con distintos anticuerpos se trataron las membranas en tampón de deshibridación (2% de SDS, 62,5 mM de Tris HCl pH 6,8, 0,8% de β -mercaptoetanol) durante 45 minutos en un baño de agua a 56°C. Posteriormente se lavó tres veces durante 5 minutos con agua milliQ y otras tres veces durante 15 minutos con TBS-T. Tras ello, se procedió a repetir el bloque e incubación con anticuerpos como indicado anteriormente en el apartado 6.11.5.

6.11.7 Inmunocitoquímica

Se sembraron 20.000 células en cubreobjetos de vidrio redondos previamente depositados en pocillos de placas de 24 pocillos y tratados con gelatina 0,1%. 24h después se fijó las células tratando con paraformaldehído al 4% diluido en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras lavar tres veces con PBS durante 5 minutos, se incubaron las muestras con solución de bloqueo y permeabilización (5% suero fetal bovino, 0,3% Triton X-100 en PBS) durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS 10 minutos y se incubaron con anticuerpos primarios anti-H2AX y anti-LaminA/C diluidos 1:500 durante 16 horas (*overnight*). Al día siguiente se lavó tres veces durante 10 minutos los cubres con PBS, y se incubó 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario conjugado con Alexa488 dilución 1:500, y DAPI 1 μ M. Los cubres se montaron con medio de montaje ProLong™ Glass Antifade Mountant y sellaron sobre portas con esmalte de uñas. Las imágenes se tomaron empleando un microscopio invertido de fluorescencia Leica Thunder, y se cuantificó la intensidad relativa (Alexa488/DAPI) empleando el software Cell Profiler.

6.11.8 Cuantificación de intensidad de fluorescencia y de morfología nuclear.

Tras procesar las imágenes para ajustar la intensidad de la señal visible en todas las muestras por igual con el software Leica Application Suite X, se exportaron las imágenes con superposición de canales en formato JPEG. A continuación, con el software Cell Profiler 2.1.1 se cargaron las imágenes obtenidas agrupadas por condición experimental. Las intensidades de las señales obtenidas fueron transformadas a rangos en escala de grises, y se hicieron cuantificaciones de células individuales basadas en el tamaño nuclear previamente determinado (20-70 píxeles) de forma que se asociaron intensidades a cada una de las células individualizadas. Los resultados obtenidos fueron importados a Microsoft Excel (Microsoft) para el análisis de los parámetros de interés. Para la cuantificación de intensidad de fluorescencia relativa se dividió la intensidad del marcador (e.g γ H2AX) entre la intensidad de DAPI. La morfología nuclear fue determinada empleando el dato de excentricidad del área cuantificada, siendo 0 un círculo perfecto y 1 una línea recta.

6.12 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR

6.12.1 Proliferación por conteo

Con la finalidad de determinar la capacidad proliferativa de las ESCs en condiciones estándar de cultivo se realizaron conteos celulares. Tras despegar los cultivos adherentes con tripsina-EDTA, se utilizó una alícuota de la suspensión celular para el conteo de número de células totales con una cámara de Neubauer. Se sembró 1/6 de la suspensión celular, y se repitió este procedimiento durante 6 días, contando cada 2 días el número de células de cada condición experimental. El número de células totales de cada día se extrapoló teniendo en cuenta las diluciones hechas tras cada pase.

6.12.2 Ensayo de competición por citometría de flujo

Se analizó la capacidad proliferativa de las ESCs mediante co-cultivo con células que expresan constitutivamente el reportero fluorescente tdTomato (tdTomato+). Para ello se sembraron ESCs tratadas con *shLuci* o *shInts4* junto con células ESCs tdTomato en una proporción 70% ESCs J1 *shLuci* o *shInts4* y 30% ESCs tdTomato+ positivas. Al día siguiente se recogieron las células para el análisis por citometría de flujo del porcentaje de células positivas para tdTomato (ver sección 6.18). El análisis mediante citometría de flujo se repitió tras 2 y 4 días de co-cultivo.

6.13 TINCIÓN CON FOSFATASA ALCALINA

La presencia de la enzima fosfatasa alcalina (AP por sus siglas en inglés) es un marcador de células indiferenciadas²⁵³, que es empleado como marcador de células pluripotentes. La tinción de fosfatasa alcalina fue llevada a cabo empleando el kit comercial de fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, 86R) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En resumen, se prepararon las soluciones de fijación y de tinción como indica la **Tabla M5**. Se lavaron las células con DPBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} , y se fijaron incubando con la solución de fijación durante 30 segundos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células con agua milliQ durante 1 minuto a temperatura ambiente, y se procedió a la tinción con la solución de tinción durante 15

minutos en completa oscuridad a temperatura ambiente. Para finalizar, se lavaron las células con agua milliQ durante 2 minutos y se dejaron secar las placas a temperatura ambiente.

Tabla M5. Composición de las soluciones empleadas en la tinción fosfatasa alcalina.

Solución de fijación	
Reactivo	Volumen (ml)
Citrato	2,5
Acetona	6,5
37% Formaldehído	0,8
Solución de tinción	
Reactivo	Volumen (ml)
Solución de nitrito de sodio	0,2
Solución FRV-Alcalina	0,2
Mezclar por inversión. Dejar reposar 2 minutos y añadir el agua	
Agua desionizada	9,0
Naftol AS-BI solución alcalina	0,2

6.14 ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS

Con objeto de identificar el papel que desempeña en el mantenimiento de la pluripotencia INTS4, se llevaron a cabo ensayos de formación de colonias (CFA del inglés *colony formation assay*). Se sembraron 400 células por pocillo en placas de 6 pocillos recubiertas con gelatina al 0,1%, y se mantuvieron en cultivo con y sin LIF durante cuatro días. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días. Se tiñó las colonias con tinción de fosfatasa alcalina (ver apartado 6.13) y se contó manualmente el número de colonias al microscopio. Se clasificaron las colonias de acuerdo con su estado pluripotente en tres categorías: no diferenciadas (colonias uniformemente positivas para fosfatasa alcalina, morfología redonda), parcialmente diferenciadas (parcialmente positivas para fosfatasa alcalina, morfología ligeramente irregular) y diferenciadas (negativas para tinción de fosfatasa alcalina y morfología irregular).

6.15 ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CON ÁCIDO RETINOICO

Para identificar el rol de INTS4 en la salida de la pluripotencia se realizaron ensayos de diferenciación a neuroectodermo mediante tratamiento con ácido retinoico (RA) siguiendo protocolos establecidos en la literatura²⁵⁴. Se sembró 20.000 ESCs en pocillos de placas de 6 pocillos recubiertas con gelatina al 0,1% y se mantuvieron 4 días en cultivo sin LIF, en presencia o ausencia de 5 μ M de ácido retinoico. Se cambió los medios de cultivo cada dos días, tras lo cual se tiñeron las colonias con cristal violeta y se recogieron muestras para extracción de ARN a lo largo del proceso de diferenciación. Se evaluó la expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación a neuroectodermo mediante qPCR.

6.16 ANÁLISIS DE CICLO CELULAR

El análisis de ciclo celular en células ESCs shLuci o shInts4 se llevó a cabo mediante tinción con yoduro de propidio. Se sembraron 150.000 células en pocillos pretratados con gelatina 0,1% y se cultivaron con medio estándar (SL). Tras 24 horas, se transfectaron las células con los plásmidos portadores de los shARNs, y al día siguiente se seleccionaron durante

dos días con G418. Transcurridas las 48 horas de selección, se tripsinizaron las células y se recogieron mediante centrifugación a 300 g 5 minutos. Tras un lavado con PBS, se fijaron las células con etanol 70% frío, añadido gota a gota al pellet celular mientras se agitaban suavemente en vórtex y se incubaron 30 minutos a 4°C. Tras la fijación, se atemperaron las muestras a temperatura ambiente y se recogió las células mediante centrifugación a 500 g 5 minutos. Tras dos lavados con PBS, se resuspendió las células en solución de tinción (50 µg/mL de yoduro de propidio y 10 µg/ml de RNasa A diluidos en PBS) y se incubaron a 37°C 30 minutos en oscuridad. Por último, se analizó a intensidad de yoduro de propidio por citometría de flujo (ver sección 6.17).

6.17 CITOMETRÍA DE FLUJO

Mediante citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) se analizó la intensidad de fluorescencia de tdTomato o de yoduro de propidio. Brevemente, se recogieron las células mediante centrifugación a 300 g 5 minutos, y tras un lavado con PBS, se resuspendieron en PBS + Ca^{2+} + Mg^{2+} en tubos de citometría. A continuación, se cuantificó la fluorescencia con un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences), analizando 10.000 células por condición con los parámetros de absorción y emisión del marcador analizado. Los datos obtenidos fueron procesados y analizados con el programa FlowJo (v7.6.1). El tratamiento de las células para el análisis del ciclo celular con yoduro de propidio se describe en el apartado 6.16.

6.18 *C. elegans*

6.18.1 Cepas

Para los experimentos en *C. elegans*, se utilizaron dos cepas de gusanos: N2, Cepa genotipo salvaje²⁵⁵ y DA1113. Genotipo: *eat-2* (ad1113) II. Ambas cepas estaban disponibles en el laboratorio del Dr. Julián Valdés (UNAM, México).

6.18.2 Cultivo y manejo

Los nematodos se cultivaron sobre placas de medio NGM agar (3 g/l NaCl, 2,5 g/l Bacto-Peptona, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , 5 µg/ml colesterol, 25 mM KPO_4 pH 6,0) recubiertas con cultivo bacteriano de *E. coli* cepa OP50, a una temperatura de 20°C. Para traspasar los animales a placas nuevas se recogieron en solución M9 (5 g/l NaCl, 6 g/L Na_2HPO_4 , 3,1 g/l KH_2PO_4 , 0,24 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), se transfirió el volumen a tubos de microcentrífuga limpios, se dejó caer los animales por gravedad, se retiró el sobrenadante, y se sembró el volumen de *C. elegans* deseado en la placa. Para la recolección de nematodos individualmente se empleó un asa de siembra con punta de platino esterilizada a la llama con la que se agarraban los animales y se transferían a nuevas placas.

6.18.3 Sincronización

Para la sincronización de las poblaciones de nematodos, se aislaron huevos mediante la técnica de blanqueamiento (*bleaching* en inglés). Tras recoger la población con solución M9, a un pellet de aproximadamente 200 µl de gusanos se le añadió 800 µl de solución M9 (200 µl de NaOH 5N y 400 µl de hipoclorito de sodio). Se mezclaron los tubos vigorosamente utilizando un vortex para lisar completamente los animales. Durante el proceso, se comprobó el estado de

lisis de los animales, así como la viabilidad de los huevos en una lupa. Rápidamente se centrifugaron los lisados, y se retiró el sobrenadante, seguido de 6 lavados con solución M9 para retirar los restos de lisis y recoger únicamente los huevos. Finalmente, el pellet de huevos se resuspendió en un volumen de solución M9 para sembrar en placas NGM.

6.18.4 iARN en *C. elegans*

Los ensayos de pérdida de función en *C. elegans* se llevaron a cabo mediante ARN de interferencia disponibles en el laboratorio de la Dra. Rosa Navarro (UNAM, México). Para ello, se emplearon placas de medio NGM lite (2 g/L NaCl, 4 g/L bacto-triptona, 3 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L K_2HPO_4 , 30 g/L agar, 2 mg/L colesterol) suplementado con IPTG 1 mM, ampicilina 50 $\mu\text{g/ml}$ y tetraciclina 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Las placas se recubrieron con cultivo de bacteria *E. coli* transformada con los plásmidos portadores del ARN de interferencia. Antes de sembrar los nematodos, se incubaron las placas 16 horas a temperatura ambiente para la inducción de la expresión de los ARN de interferencia. Transcurrido dicho tiempo, se inocularon las placas con aproximadamente 150 embriones obtenidos por sincronización, y se dejaron crecer los animales a 20°C.

6.18.5 Ensayos de estrés por calor

Los ensayos de estrés por calor fueron llevados a cabo en un baño de agua con flujo para asegurar la estabilidad de la temperatura en el baño a lo largo del experimento. Nematodos en fase adulta se recogieron con solución M9, y tras estimar el número de animales por microlitro, se sembraron aproximadamente 30 nematodos por cada placa de 35 mm. Tras sellar los bordes de las placas con Parafilm, se colocaron cuidadosamente en el baño de agua a 34°C. A cada hora transcurrida, se retiró una placa del baño y se colocó de vuelta en el incubador a 20°C durante 24 horas. Al día siguiente se contaron el número de gusanos totales y de gusanos muertos en cada placa, para obtener el porcentaje de supervivencia a lo largo del tiempo.

6.18.6 Ensayos de fertilidad

Para la determinación de la fertilidad de *C. elegans* se tomó un nematodo en fase larvaria L4 con ayuda de un asa y se transfirió a una placa de 35 mm. Transcurridas 24 horas se transfirió de nuevo el animal a una placa de 35 mm nueva, mientras que en la placa anterior se contaron el número de huevos o de larvas en fase L1. Este paso se repitió durante dos días más, hasta el final de la fase fértil de *C. elegans*, obteniendo al final un total de cuatro placas.

6.18.7 Ensayos de longevidad

Los ensayos de longevidad fueron llevados a cabo en presencia de 5-Fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR). Este inhibidor de la síntesis del ADN impide que los huevos depositados por los animales eclosionen, evitando así interferencia de la descendencia con el experimento. Para ello, se prepararon placas de cultivo NGM suplementadas con FUdR 40 mM, y se sembraron aproximadamente 50 animales por placa. Se mantuvieron en cultivo a 20°C y se contaron diariamente en la lupa el número de gusanos muertos (determinado por ausencia de movimiento y de bombeo faríngeo) hasta que el total de la placa muriese.

6.19 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.), Excel o R (<http://www.r-project.org>). Las diferencias estadísticas fueron calculadas empleando las pruebas estadísticas de Student de dos colas no pareado, o ANOVA de un factor para el análisis de la varianza seguida del test de comparaciones múltiples de Dunnett. P valores inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

6.20 FUENTES BIBLIOGRÁFICAS

En esta tesis se emplearon Google Scholar (<https://scholar.google.es/>) y PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) para la búsqueda bibliográfica. La bibliografía fue generada empleando los gestores bibliográficos EndNote X9 (<https://endnote.com/>).

6.21 SOFTWARE Y ALGORITMOS

Software	Fuente	Enlace
BiomaRT v2.52.0	Durink <i>et al.</i> , 2009 ²⁵⁶	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/biomaRt.html
Bowtie2 v2.4.5	Johns Hopkins University	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
Cluster v3.0	Stanford University	http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/
CRISPOR	Concordet y Haeussler, 2018 ²⁵¹	http://crispor.tefor.net
Cytoscape v3.8.2	Shannon <i>et al.</i> , 2003 ²⁵⁷	https://cytoscape.org
DAVID	LHRI	https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp
DESeq2 v1.32.0	Love <i>et al.</i> , 2014 ²⁵⁸	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html
Fastqc v0.11.5	Babraham Institute	https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc
FlowJo v7.6.1	FlowJo, LLC	https://www.flowjo.com/
Genetic Perturbation Platform (GPP)	Broad Institute	https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/
GraphPad Prism 9	GraphPad	https://www.graphpad.com/
GSEA v4.2.2	Broad Institute	https://www.gsea-msigdb.org/gsea
htseq-count v0.13.5	Putri <i>et al.</i> , 2022 ²⁵⁹	https://htseq.readthedocs.io/en/master/
Image J v1.33	NIH ²⁵²	https://imagej.nih.gov/ij
Leica LAS X v3.4.2.18368	Leica Microsystems	https://www.leica-microsystems.com
Origin Pro 2017 v9.4.0.220	OriginLab	https://www.originlab.com/Origin
Picard-tools v2.27.2	Broad Institute	https://broadinstitute.github.io/picard/
Sequencher 5.4	Gene Codes Corporation	http://www.genecodes.com/
SerialCloner v2.6.1	Serial Cloner	http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
Snapgene	Dotmatics	https://www.snapgene.com/
STAR v2.7.6	Dobin <i>et al.</i> , 2013 ²⁶⁰	https://github.com/alexdobin/STAR
STRING	Szklarczyk <i>et al.</i> , 2021 ²⁶¹	https://string-db.org/
Trimmomatic v0.39	Bolger <i>et al.</i> , 2014 ²⁶²	http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic
EndNote X9	The EndNote Team	https://endnote.com/

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS DE RATÓN COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO *IN VITRO*

7.1.1 Los fibroblastos primarios de ratón mantienen diferencias transcriptómicas asociadas al envejecimiento tras su cultivo *in vitro*

Con el objetivo de generar un modelo para el estudio del envejecimiento *in vitro* derivamos fibroblastos de colas y orejas procedentes de ratones de 2 meses de edad (2M) y de ratones de 28 meses de edad (28M), que de aquí en adelante serán nombrados como fibroblastos jóvenes y viejos (**Figura R1a**). Escogimos fibroblastos de la piel puesto que son un excelente modelo para el estudio del envejecimiento ya que se encuentran expuestos tanto a factores intrínsecos como a factores extrínsecos del envejecimiento. Además, los fibroblastos de la piel son un tipo celular ampliamente empleado en ensayos de reprogramación celular somática, que es el paradigma de rejuvenecimiento *in vitro*. En primer lugar, nos propusimos determinar si las características asociadas al envejecimiento se mantienen en fibroblastos tras su derivación y cultivo *in vitro*, o si por el contrario se pierden tras su mantenimiento *ex vivo*. Para ello, analizamos los perfiles transcripcionales de los cultivos obtenidos mediante secuenciación masiva de ARN (ARN-seq) a partir de muestras de ARN total ribodeplecionado (**Figura R1a**). El análisis de expresión génica diferencial con criterio de ratio de descubrimientos falsos (FDR) $< 0,05$ reveló un total de 5.717 genes diferencialmente expresados entre los fibroblastos viejos y los jóvenes. De estos, 2.991 genes se encontraban regulados al alza y 2.726 regulados a la baja con la edad (**Figura R1b**). El análisis de ontología génica de los 5.717 genes diferencialmente expresados reveló procesos biológicos relacionados con el envejecimiento tales como envejecimiento celular y envejecimiento de organismo multicelular (**Figura R1c**). Además, observamos la presencia de categorías relacionadas con la biología del ARN (estabilización y desestabilización de ARNm, transporte de ARNm, “splicing” y traducción) y con la biología del ADN (regulación de la transcripción, replicación de ADN) (**Figura R1c**), sugiriendo un papel de la biología del ARN en el proceso de envejecimiento. En ello pueden ser especialmente relevantes las proteínas de unión al ARN (RBPs del inglés *RNA binding proteins*) como reguladoras del transcriptoma a través de procesos como la estabilización de los transcritos, su localización o su procesamiento^{263,264}. El análisis de enriquecimiento génico de los genes relacionados con envejecimiento (GO:0007568) mostró que dichos genes se encuentran más enriquecidos en las muestras de fibroblastos viejos (**Figura R1d**). Un estudio reciente ha reportado la existencia de cambios transcripcionales conservados como marcadores del envejecimiento, entre los que se encuentran *Igf1* y *Lgals1*²⁶⁵. Observamos que, en nuestros cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos, *Igf1* se encuentra menos expresado en las células viejas (**Figura R1e**), mientras que *Lgals1* se encuentra regulado al alza en los mismos fibroblastos (**Figura R1f**), en línea con lo reportado por Tyshkovskiy y colaboradores.

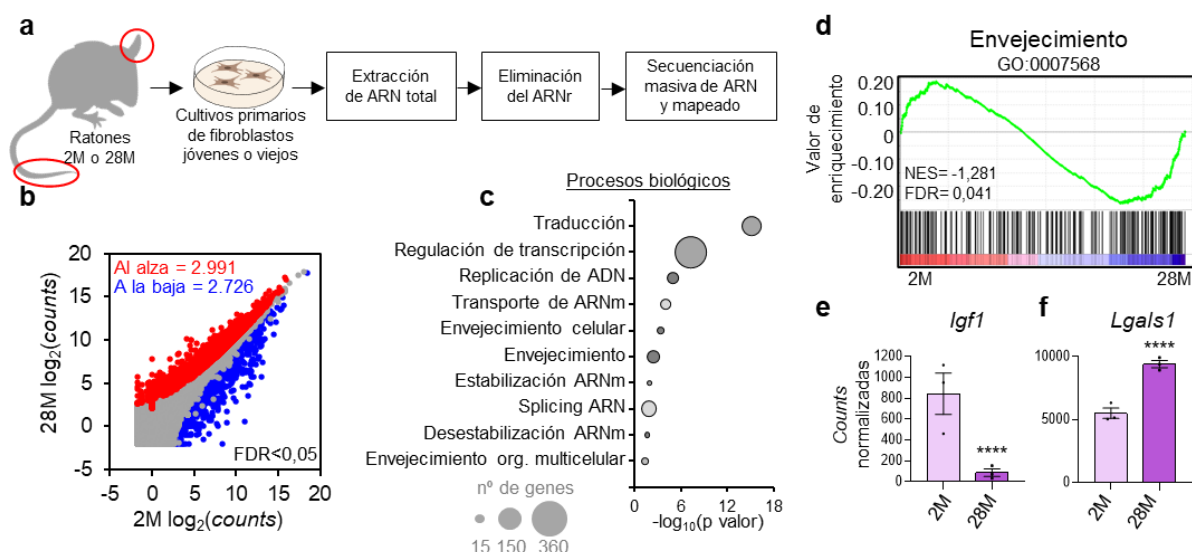


Figura R1. Los fibroblastos derivados de ratones jóvenes y viejos muestran diferencias transcripcionales asociadas al envejecimiento. a) Esquema del análisis transcripcional de fibroblastos obtenidos de ratones jóvenes (2 meses, 2M) y viejos (28 meses, 28M). b) Diagrama de puntos de la expresión génica (en $\log_2$ lecturas normalizadas) en los fibroblastos de jóvenes (2M) y fibroblastos viejos (2M y 28M), determinada por secuenciación masiva de ARN. Los genes regulados al alza y a la baja con un criterio de significación $FDR < 0,05$, están resaltados en rojo y azul, respectivamente. c) Análisis de ontología génica de los genes diferencialmente expresados entre los fibroblastos viejos y jóvenes descritos en b). d) Análisis de enriquecimiento génico (GSEA) de los genes relacionados con envejecimiento en los fibroblastos jóvenes y viejos. e) Gráfico de barras de la expresión de *Igf1* en los fibroblastos jóvenes y viejos. f) Gráfico de barras de la expresión de *Lgals1* en los fibroblastos jóvenes y viejos.

Se sabe que con la edad se incrementan los niveles del marcador de daño en ADN γ H2AX y se produce una alteración de la morfología nuclear³². Por ello, analizamos mediante inmunocitoquímica los marcadores γ H2AX para el estudio de los niveles de daño en el ADN, y LaminA/C para el estudio de la integridad nuclear, en los fibroblastos jóvenes y viejos con el objetivo de determinar si se mantenían dichas diferencias asociadas al envejecimiento en los fibroblastos tras su cultivo *in vitro*. La tinción de los núcleos con el anticuerpo anti-LaminA/C, ostró una alteración en la morfología nuclear en las células viejas con respecto a las jóvenes, en línea con lo reportado en la literatura. En particular, el análisis cuantitativo a nivel de célula única determinó que los núcleos de células viejas presentaban un aspecto menos esférico, medido como excentricidad, que las células jóvenes, cuyos núcleos se acercaban más a la esfera perfecta (**Figura R2a, R2b**). Por otro lado, analizamos mediante la misma técnica los niveles del marcador de daño genómico γ H2AX. En línea con lo que está descrito en la literatura⁵³, se detectaron mayores niveles de γ H2AX relativos a la tinción de ADN genómico con DAPI, en fibroblastos viejos que en jóvenes (**Figura R2c, R2d**). Por último, evaluamos mediante Western blot otros dos marcadores de envejecimiento: la acumulación de progerina²⁶⁶ y la disminución de la proteína de heterocromatina HP1 γ ^{32,53}. Observamos mayores niveles de progerina (**Figura R2e**) y menores niveles de HP1 γ en las células viejas (**Figura R2f**), en línea con lo descrito en la literatura. Estos resultados demuestran que existen diferencias transcripcionales relacionadas con el envejecimiento entre los fibroblastos jóvenes y viejos a pesar de su cultivo *in vitro*, así como marcadores de daño genómico y expresión de proteínas reportados en otros estudios, confirmando que los fibroblastos jóvenes y viejos representan un modelo válido para el estudio del envejecimiento *in vitro*.

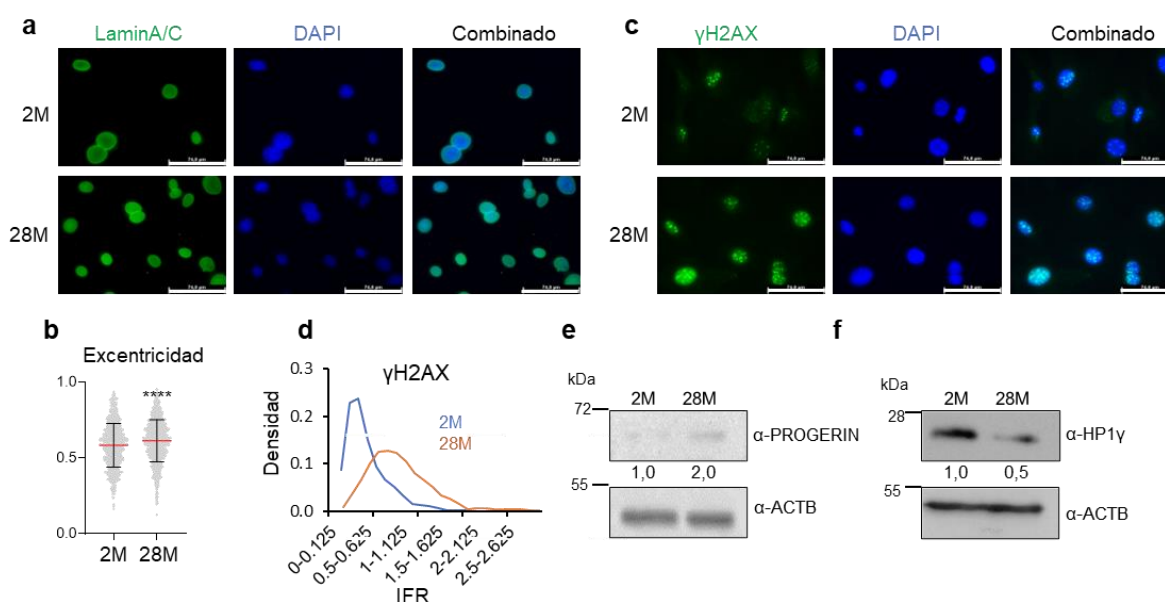


Figura R2. Los fibroblastos jóvenes y viejos en cultivo mantienen diferencias en marcadores de envejecimiento. a) Inmunocitoquímica de la proteína laminA/C en fibroblastos jóvenes (2M) y viejos (28M). Escala: 75 μ m. b) Cuantificación de la circularidad de la forma nuclear en fibroblastos sin immortalizar de 2 meses y de 28 meses. c) Inmunocitoquímica de la proteína laminA/C en fibroblastos sin immortalizar de 2 meses y de 28 meses. Escala: 75 μ m. d) Cuantificación de la circularidad nuclear en fibroblastos sin immortalizar de jóvenes y viejos. e) Western blot de progerina en fibroblastos jóvenes y viejos. f) Western blot del marcador de heterocromatina HP1 γ en fibroblastos jóvenes y viejos.

7.2 DETERMINACIÓN DE MODIFICACIONES DE ARN EN FIBROBLASTOS JÓVENES Y VIEJOS

7.2.1 La expresión de enzimas modificadoras de ARNm está alterada con el envejecimiento en fibroblastos de ratón.

Con el objetivo era determinar el papel de la modificación hm⁵C en el envejecimiento, nos propusimos caracterizar las dinámicas de expresión de los reguladores de las marcas m⁵C y hm⁵C en el envejecimiento. Comprobamos en los datos de transcriptómica (ARN-seq) la expresión de cada una de las enzimas catalizadoras de m⁵C y hm⁵C, con nuestro foco de interés puesto en las enzimas catalizadoras de las modificaciones epitranscriptómicas sobre el ARNm (**Figura R3a**), así como de las proteínas lectoras de m⁵C YBX1, RAD52, ALYREF Y SRSF2^{103-105,267}. A nivel transcripcional, la mayoría de los genes que codifican para estos reguladores epitranscriptómicos no muestran un cambio de expresión significativo con el envejecimiento (**Figura R3b**). Sin embargo, sí observamos una regulación al alza con la edad de los escritores de m⁵C *Nsun1*, *Nsun2* y de hm⁵C *Alkbh1*, y de los lectores de m⁵C *Srsf2*, y *Alyref*, mientras que los escritores *Nsun4*, *Nsun6* y *Tet2* muestran una regulación a la baja estadísticamente significativa (**Figura R3b**). Estos resultados muestran un cambio de la expresión de reguladores epitranscriptómicos de m⁵C y hm⁵C en ARNm, ARNt y ARNvt en fibroblastos con el envejecimiento, sugiriendo una posible alteración de los mecanismos regulados por estas proteínas con la edad. Nos resultó especialmente relevante la regulación a la baja de *Tet2* asociada al envejecimiento, ya que observamos una reducción de hasta el 50% en los niveles de expresión en las células viejas comparadas con las células jóvenes (**Figura**

R3b). Decidimos por tanto explorar si esta reducción en los niveles de *Tet2* con la edad desempeñaba un papel en el envejecimiento a través de la alteración de los niveles de m^5C y hm^5C en ARNm.

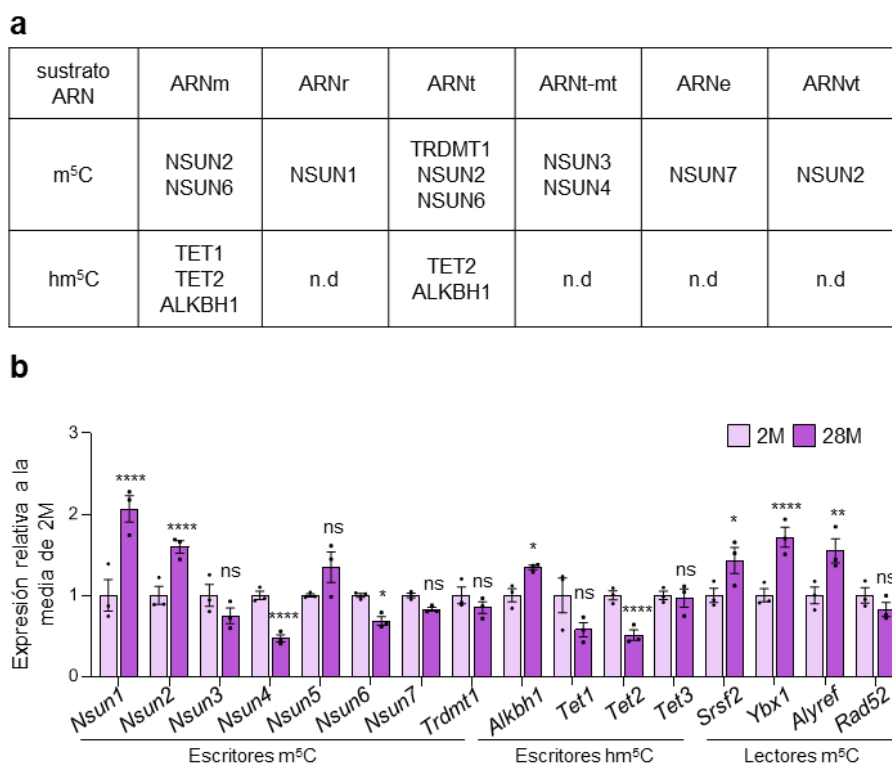


Figura R3. La expresión de enzimas modificadoras de ARNm está alterada con el envejecimiento en fibroblastos de ratón. a) Tabla resumen de las enzimas catalizadoras de m^5C/hm^5C en el sustrato de ARN. n.d = no determinado. b) Gráfico de barras de la expresión de enzimas catalizadoras de m^5C en ARN (*Nop2*, *Nsun2-7*), enzimas catalizadoras de la oxidación de m^5C a hm^5C (*Alkbh1*, *Tet1-3*, *Pspc1*) y de enzimas lectoras de m^5C (*Alyref*, *Rad52* y *Ybx1*) en fibroblastos procedentes de ratones jóvenes (2M) y viejos (28M) determinada mediante secuenciación masiva de ARN (ARN-seq). Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. (n=3 réplicas biológicas). La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,0001$, ns: estadísticamente no significativo.

7.2.2 Los niveles globales de m^5C y hm^5C en ARN ribodeplecionado no cambian con la edad.

Dado que observamos cambios en la expresión de escritores y borradores de m^5C/hm^5C en ARNm y ARNt en los fibroblastos con la edad, con especial interés puesto en la reducción del 50% en los niveles de expresión de *Tet2*, nos preguntamos si dichos cambios de expresión se traducían en cambios en la abundancia de m^5C y hm^5C en la fracción de ARN que contenía estas especies. Para ello, extrajimos ARN total de fibroblastos jóvenes y viejos, y eliminamos el ARN ribosómico, dado que es la especie de ARN más abundante y se encuentra altamente modificada con m^5C ²⁶⁸. Dada su abundancia, las modificaciones químicas del ARNr han sido ampliamente estudiadas en una gran variedad de contextos biológicos, y no es el foco de interés del estudio llevado en esta tesis doctoral, por lo que llevamos a cabo la ribodepleción de nuestras muestras para analizar las modificaciones en ARNm y ARNt, nuestros transcritos de interés. Tras su digestión a mononucleósidos, se analizó la abundancia de m^5C y hm^5C mediante

espectrometría de masas (**Figura R4a**). Para su análisis en el espectrómetro los nucleósidos son ionizados dando lugar a los precursores, que son fragmentados para la eliminación de las ribosas, y finalmente las bases nitrogenadas son cuantificadas en el espectrómetro de masas (**Figura R4a**). La cuantificación de m^5C en la fracción de ARN ribodeplecionado de los fibroblastos jóvenes y viejos mostró una tendencia a la baja de dicha marca con la edad (**Figura R4b, 4c**), mientras que los niveles de hm^5C muestran una tendencia al alza en las células viejas (**Figura R4d, R4e**). Sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos (**Figura R4c, R4e**). Estos resultados muestran que no existen diferencias significativas en la abundancia de m^5C y hm^5C entre los fibroblastos jóvenes y viejos. En los fibroblastos viejos detectamos una reducción en la expresión de *Nsun6* y un aumento en la expresión de *Nsun2* (**Figura R3b**), lo que podría explicar por qué no detectamos diferencias significativas en la abundancia de m^5C en ARN ribodeplecionado con la edad. Lo mismo ocurre con hm^5C , que observamos una disminución en la expresión de *Tet2* y un aumento en la expresión de *Alkbh1* con la edad (**Figura R3b**). Además, la mayoría de las especies de ARN analizadas en las muestras de ARN ribodeplecionado son ARNt, mientras que nuestro ARN de interés es el ARNm. Por ello, decidimos explorar los cambios en las modificaciones del ARN asociados al envejecimiento en transcritos específicos, en lugar de a nivel global.

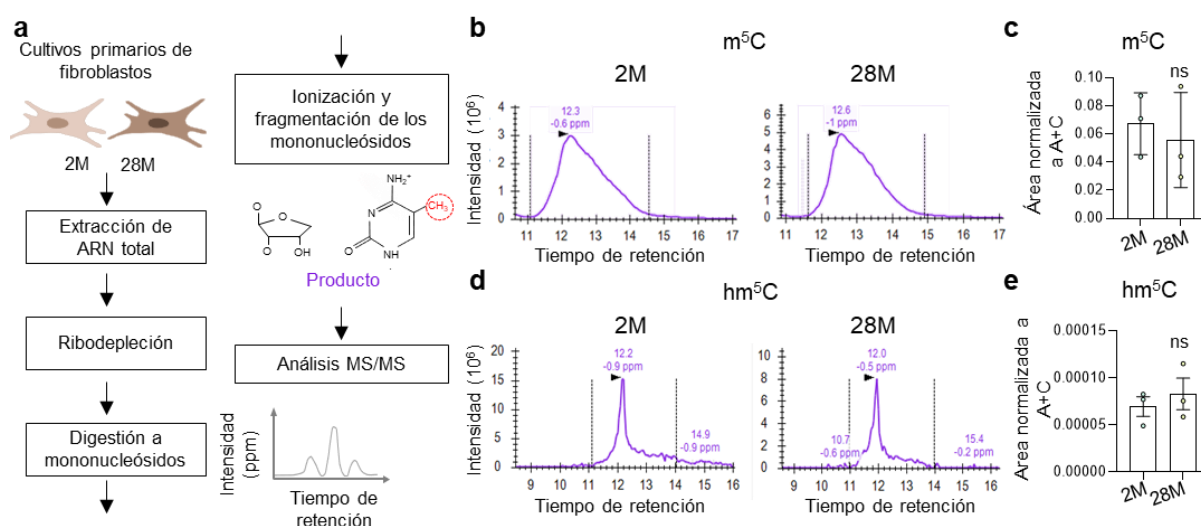


Figura R4. La cuantificación de m^5C y hm^5C por espectrometría de masas no revela diferencias significativas en ARN ribodeplecionado entre fibroblastos jóvenes y viejos. a) Izquierda: Esquema del protocolo seguido para la obtención de muestras de ARN de fibroblastos obtenidos *ex vivo* de ratones jóvenes (2 meses) y viejos (28 meses). Derecha: Esquema de la cuantificación de modificaciones de ARN mediante espectrometría de masas. b) Imagen representativa de los picos obtenidos para los productos de m^5C obtenidos mediante espectrometría de masas en ARN ribodeplecionado de fibroblastos de la edad indicada) Gráfico de barras del área de m^5C normalizada con la mediana de adenosinas y citosinas (A+C) de las muestras de los fibroblastos jóvenes y viejos. d) Imagen representativa de los picos obtenidos para productos de hm^5C en ARN ribodeplecionado de fibroblastos jóvenes y viejos. e) Gráfico de barras del área de hm^5C normalizada a la mediana de A+C de las muestras de los fibroblastos jóvenes y viejos. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. (n= 3 réplicas biológicas). La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. ns: estadísticamente no significativo.

7.3 CULTIVOS DE FIBROBLASTOS INMORTALIZADOS PARA EL ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO Y MODIFICACIONES DE ARN *IN VITRO*

7.3.1 El silenciamiento de *p53* en fibroblastos primarios generó líneas de fibroblastos inmortalizados

Nos propusimos estudiar los cambios de hm^5C , y de m^5C como precursor de hm^5C , a nivel de transcritos específicos entre los fibroblastos jóvenes y viejos con la finalidad de diseccionar las dinámicas de estas modificaciones del ARN asociadas al envejecimiento a nivel de ARNm. Para la identificación de transcritos modificados con m^5C o hm^5C , así como aquellos a los que se unen sus proteínas moduladoras, es necesario llevar a cabo técnicas de inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra m^5C o hm^5C seguida de secuenciación (hmeRIP-seq) o inmunoprecipitación de proteínas seguida de secuenciación (CLIP-seq), respectivamente. No obstante, estas técnicas requieren elevadas cantidades de ARN o proteína, que son difíciles de obtener con cultivos celulares primarios, dada su limitada capacidad proliferativa. Con el objetivo de generar un modelo de envejecimiento *in vitro* con capacidad de proliferación ilimitada, exploramos la immortalización de los cultivos de fibroblastos jóvenes y viejos mediante el silenciamiento de *p53* (shp53)²⁶⁹ (**Figura R5a**). P53 es un conocido factor de transcripción especialmente relevante en la biología celular por la gran variedad de procesos celulares que regula, entre los que se incluyen el ciclo celular y la senescencia²⁷⁰. En primer lugar, validamos el silenciamiento de *p53* mediante Western blot, observando una menor expresión tanto en fibroblastos jóvenes como viejos transducidos con el shARN contra *p53* comparados con el control (**Figura R5b**). Por otro lado, observamos que la immortalización, por tratamiento con shp53 no afecta de manera notable a la morfología de las células, comparadas con los cultivos primarios (**Figura R5c**).

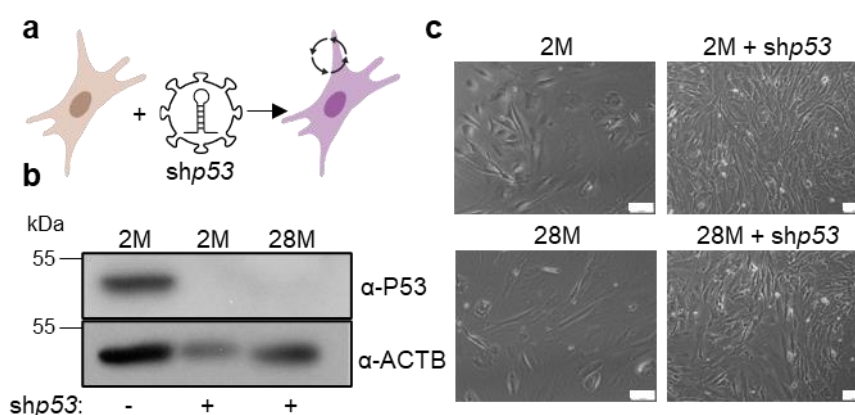


Figura R5. Generación de fibroblastos jóvenes y viejos inmortalizados a través del silenciamiento de *p53*. a) Representación esquemática de la estrategia llevada a cabo para la immortalización de fibroblastos jóvenes y viejos mediante infección con lentivirus con shARN dirigidos contra *p53*. b) Validación mediante Western blot del silenciamiento de *p53* en los fibroblastos inmortalizados jóvenes y viejos comparado con fibroblastos jóvenes sin immortalizar. c) Imágenes representativas de los fibroblastos sin immortalizar e inmortalizados en cultivo. Escala: 100 μm .

7.3.2 La immortalización de fibroblastos jóvenes y viejos afecta al fenotipo de envejecimiento

P53 es un factor de transcripción involucrado en la regulación de un amplio número de genes y procesos celulares²⁷¹, por lo cual era esperable que su silenciamiento tuviese impacto sobre el transcriptoma. Sin embargo, nos propusimos comprobar si, a pesar de los cambios de expresión génica inducidos por la depleción de *p53*, la firma transcriptómica asociada al envejecimiento, incluyendo la relacionada con la expresión de los reguladores de m^5C/hm^5C , se mantenía. Para ello, preparamos ARN total de fibroblastos jóvenes y viejos immortalizados y llevamos a cabo un análisis del transcriptoma por ARN-seq (**Figura R6a**). El análisis de expresión diferencial entre los fibroblastos immortalizados de 2M y 28M mostró 3.784 genes cuya expresión se encontraba significativamente ($FDR < 0,05$) alterada entre ambas líneas celulares, con 1.878 genes regulados al alza y 1.906 genes a la baja en los fibroblastos viejos immortalizados comparados con los jóvenes immortalizados (**Figura R6b**). El análisis de ontología génica de los genes diferencialmente expresados reveló que dichos genes estaban involucrados en vías de señalización asociadas al envejecimiento tales como la vía de señalización PI3K-Akt, vías de señalización en cáncer, o la vía de EGFR tirosina kinasa^{103,272,273} (**Figura R6c**). Además, los 3.784 genes alterados estaban relacionados con procesos biológicos de envejecimiento y de la biología del ADN y ARN (expresión génica, transcripción y replicación) (**Figura R6d**), similar a lo que observamos comparando fibroblastos jóvenes y viejos sin immortalizar (**Figura R1c**). Sin embargo, el análisis de enriquecimiento génico indicó que los genes relacionados con el envejecimiento estaban más enriquecidos en los fibroblastos immortalizados de 2M que en los de 28M (**Figura R6e**), sugiriendo un efecto de la immortalización sobre el fenotipo envejecido. Estos resultados demostraron que, independientemente de la immortalización, los perfiles transcripcionales de fibroblastos de diferente edad mantienen la expresión diferencial de genes relacionados con el envejecimiento. Sin embargo, teniendo en cuenta la firma transcripcional de los fibroblastos jóvenes immortalizados, también parecen indicar que el silenciamiento de *p53* promovió el envejecimiento de células jóvenes, comparado con células viejas, al menos en lo relativo a su expresión génica (**Figura R6e**).

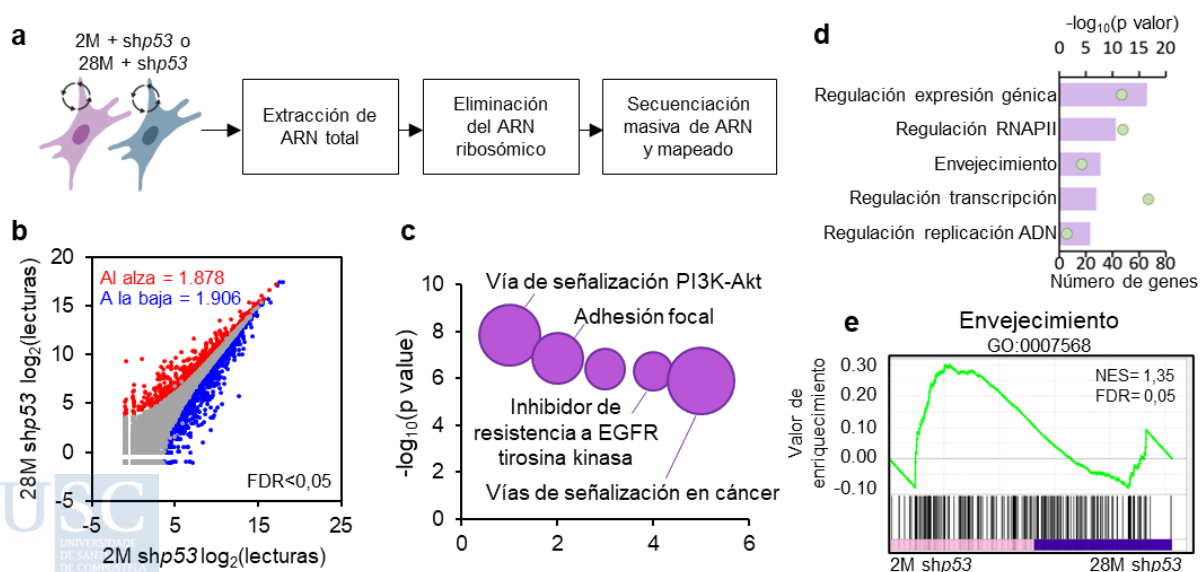


Figura R6. Análisis de las diferencias transcripcionales entre fibroblastos jóvenes y viejos tras la inmortalización. a) Esquema del procesamiento de las muestras de ARN total obtenido de fibroblastos jóvenes inmortalizados (2M + shp53) o viejos inmortalizados (28M + shp53) para el análisis del transcriptoma mediante secuenciación masiva de ARN (ARN-seq). b) Diagrama de puntos de la expresión génica (en $\log_2$ lecturas normalizadas) en los fibroblastos de jóvenes y viejos inmortalizados determinada por ARN-seq. c) Análisis de las redes de interacciones moleculares de las vías de señalización KEGG en las que están involucradas los genes diferencialmente expresados entre los fibroblastos jóvenes y viejos inmortalizados. d) Análisis de ontología génica de los procesos biológicos con los que están relacionados los genes diferencialmente expresados. e) Análisis de enriquecimiento génico (GSEA) de los genes relacionados con envejecimiento en las muestras de ARN-seq.

En base al resultado del análisis de enriquecimiento génico de genes relacionados con el envejecimiento (**Figura R6e**), hipotetizamos que la inmortalización podría estar afectando al fenotipo joven o viejo de nuestros fibroblastos, de forma que las diferencias asociadas al envejecimiento podrían haber desaparecido a causa del silenciamiento de *p53*. Para validar nuestra hipótesis, comparamos transcripcionalmente los fibroblastos inmortalizados jóvenes y viejos con los cultivos de fibroblastos primarios de los que procedían. Como cabía esperar, el análisis de componentes principales reveló que los fibroblastos inmortalizados son transcripcionalmente diferentes a las líneas originales (**Figura R7a**). Además, observamos que la inmortalización de los fibroblastos los hacía transcripcionalmente más similares entre ellos, llevándolos transcripcionalmente a un punto intermedio entre los fibroblastos sin inmortalizar de los que procedían, próximos a los fibroblastos primarios viejos (**Figura R7a**). Seguidamente decidimos analizar la proporción de genes alterados con la edad que se conservaban tras la inmortalización. Para ello, comparamos los genes diferencialmente expresados entre fibroblastos jóvenes y viejos, antes y después de la inmortalización mediante un diagrama de Venn. Observamos que 1.836 genes diferencialmente expresados con $FDR < 0,05$, que representan el 32% de la firma transcriptómica de envejecimiento determinada en fibroblastos sin inmortalizar (**Figura R1b**), se mantiene tras la inmortalización (**Figura R7b**). Además, verificamos las tendencias de los genes diferencialmente expresados en las líneas WT y shp53, observando una tendencia de los genes que estaban regulados a la baja entre los fibroblastos jóvenes y viejos control a mantenerse a la baja en las líneas shp53 (**Figura R7c**), así como para los que se regulan al alza (**Figura R7d**). Sin embargo, en el mapa de calor observamos que un 28,50% (524 de 1.838) de los genes diferencialmente expresados con la edad en los cultivos primarios, muestran tendencias opuestas en los fibroblastos tras la inmortalización (**Figura R7e**). En base a estos resultados podemos concluir que la inmortalización altera los paisajes transcripcionales celulares asociados al envejecimiento, con una pérdida del 70% de la firma transcriptómica observada en los fibroblastos con la edad. Esto indica que la inmortalización de fibroblastos primarios mediante silenciamiento de *p53* no es un buen modelo para el estudio de mecanismos moleculares y celulares que ocurren durante el envejecimiento.

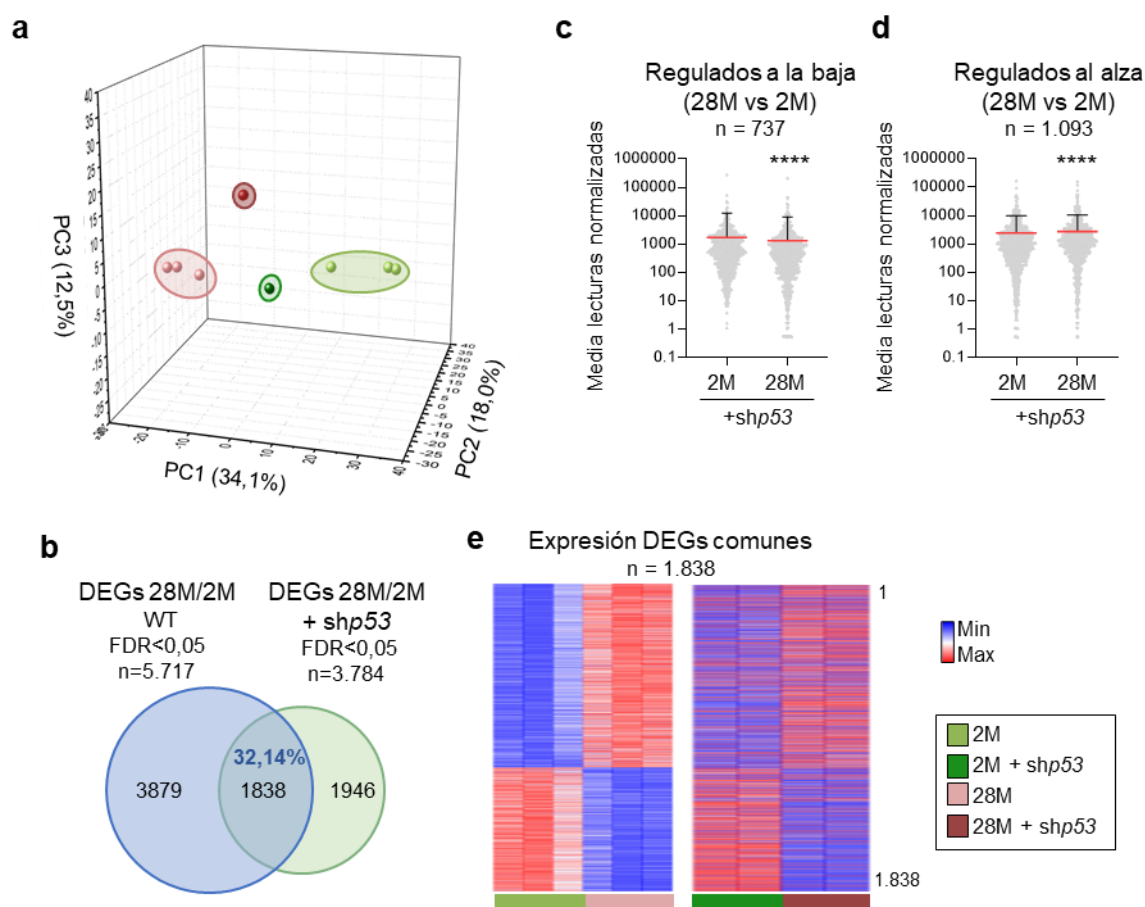


Figura R7. El 30% de la firma transcriptómica del envejecimiento se mantiene en los fibroblastos inmortalizados. a) Análisis de componentes principales de los fibroblastos de 2 meses y de 28 meses WT y shp53. El análisis de componentes principales fue llevado a cabo empleando la lista de genes diferencialmente expresados con el envejecimiento entre fibroblastos jóvenes (2M) y viejos (28M) descrita en la Figura R1b. b) Diagrama de Venn mostrando el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados entre los fibroblastos viejos y los jóvenes antes (WT) y después (shp53) de la immortalización. c,d) Diagrama de puntos de la expresión en los fibroblastos inmortalizados de los genes regulados al alza o a la baja durante el envejecimiento en los fibroblastos sin immortalizar. e) Mapa de calor de los genes diferencialmente expresados en el envejecimiento comunes a los fibroblastos antes y después de su immortalización. Se hizo la prueba estadística de Wilcoxon. ****P<0,0001.

Dado que menos del 30% de la firma transcriptómica del envejecimiento se mantiene tras la immortalización, nos propusimos determinar si la immortalización también afectaba a otros marcadores de envejecimiento. Analizamos mediante inmunocitoquímica el marcador de daño en el ADN γ H2AX, y LaminA/C para el estudio de la morfología nuclear, en los fibroblastos jóvenes y viejos immortalizados. En contraste con lo que observamos en los fibroblastos primarios (**Figura R2a, R2b**), en los fibroblastos immortalizados detectamos una mayor alteración en la morfología nuclear en las células jóvenes que en las viejas (**Figura R8a, R8b**). Por otro lado, con respecto a los niveles de daño en el ADN, detectamos que en los fibroblastos immortalizados la intensidad relativa de γ H2AX es similar en células jóvenes y viejas (**Figura R8c, R8d**). Este resultado contrasta con lo observado en los fibroblastos primarios (**Figura R2c, R2d**), en los que observamos mayores niveles de daño en el genoma en las células viejas con respecto a las células jóvenes. Analizamos además los niveles de progerina y del marcador de heterocromatina HP1 γ mediante Western blot. En los fibroblastos

inmortalizados observamos menores niveles de progerina en las células viejas (**Figura R8e**), y niveles equivalentes de HP1 γ en células jóvenes y viejas (**Figura R8f**). Estos datos también contrastan con lo observado en los fibroblastos primarios (**Figura R2e, R2f**). En base a estos resultados podemos concluir que la inmortalización de los fibroblastos afecta a parámetros asociados al envejecimiento como la acumulación de daño en ADN, la alteración de la morfología nuclear, la expresión de progerina o de HP1 γ , en línea con lo observado al analizar el transcriptoma previo y posterior al silenciamiento de *p53*. En conjunto, estos resultados sugieren que la inmortalización incrementa la expresión de marcadores de envejecimiento en las células jóvenes, de forma que las diferencias entre jóvenes y viejas desaparecen, llegando incluso a revertirse.

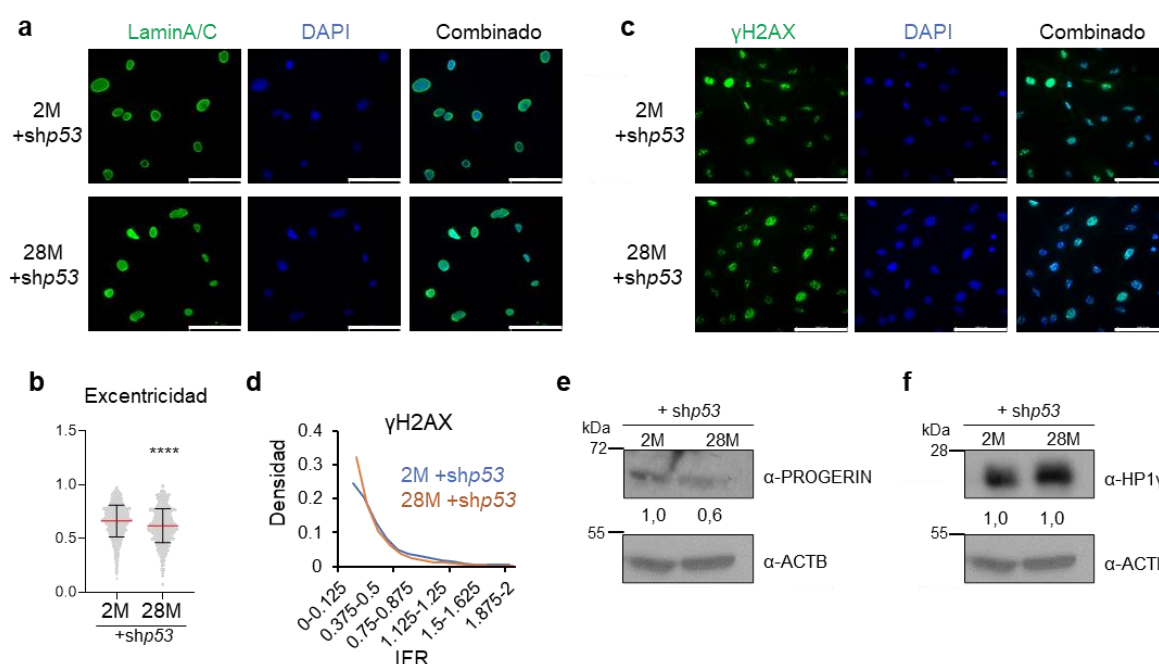
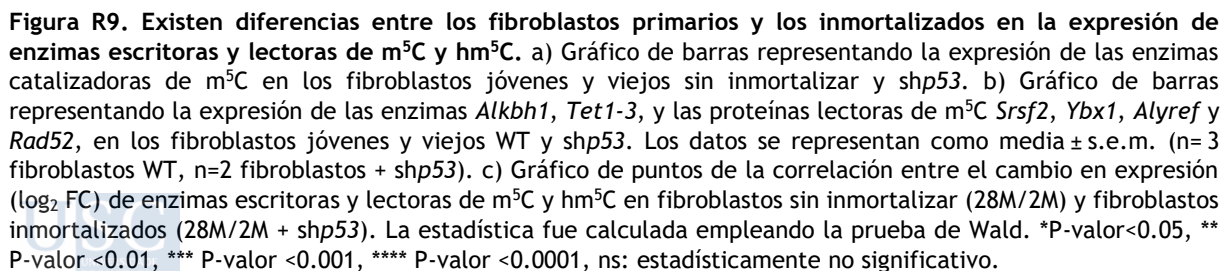


Figura R8. La inmortalización afecta a marcadores de envejecimiento. a) Inmunocitoquímica de la proteína laminaA/C en fibroblastos inmortalizados jóvenes (2M + shp53) y viejos (28M + shp53). Escala: 110 μ m. b) Cuantificación de la circularidad de la forma nuclear en fibroblastos inmortalizados jóvenes y viejos. c) Inmunocitoquímica de la proteína gammaH2AX en fibroblastos inmortalizados de 2 meses y de 28 meses. Escala: 110 μ m. d) Cuantificación de la circularidad nuclear en fibroblastos sin inmortalizar de jóvenes y viejos. e) Western blot de progerina en fibroblastos inmortalizados jóvenes y viejos. f) Western blot del marcador de heterocromatina HP1 γ en fibroblastos inmortalizados de 2 meses y de 28 meses.

7.3.3 El silenciamiento de *p53* altera la expresión de reguladores epitranscriptómicos en fibroblastos

Dado el efecto del silenciamiento de *p53* en los marcadores de envejecimientos analizados, quisimos determinar los efectos de la inmortalización sobre la expresión de los reguladores epitranscriptómicos de m⁵C o hm⁵C, para identificar si estos marcadores se encontraban entre los que se mantienen a pesar de la inmortalización. Para ello analizamos mediante RT-qPCR la expresión de los enzimas involucrados en la deposición y reconocimiento de estas marcas en fibroblastos de 2 y 28 meses antes y después de la inmortalización. La comparación de la expresión en las células sin inmortalizar y con shp53

70



7.4 CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A ARN INTS4 A LAS FUNCIONES DE TET2 EN CÉLULAS JÓVENES

7.4.1 INTS4 es una la proteína interactora de TET2 en ESCs y está diferencialmente expresada con el envejecimiento.

En base a los resultados anteriormente descritos, decidimos abordar el estudio de la función de TET2 en el envejecimiento desde una perspectiva alternativa, empleando células troncales embrionarias (ESCs) que son consideradas el paradigma de estado celular joven, y donde la función de TET2 en ESCs ha sido ampliamente estudiada¹⁴⁹. A pesar de ser clásicamente conocida como un regulador de los niveles de metilación en el ADN, más recientemente varios estudios han mostrado una función de TET2 en la regulación epitranscriptómica del ARN. De hecho, estudios previos del laboratorio identificaron a la proteína de unión al ARN, PSPC1, como factor necesario para el reclutamiento de TET2 tanto a la cromatina como al ARN¹⁴⁸. Por consiguiente, decidimos investigar más a fondo el papel epitranscriptómico de TET2 en el proceso de envejecimiento, examinando las proteínas de unión al ARN que interaccionan con TET2, y cuya expresión se ve modificada con la edad (**Figura R10a**).

Con el objetivo de elegir el candidato en el que centraríamos nuestro estudio, tomamos la lista de los 154 interactores de TET2 descritos en ESCs por Guallar y colaboradores en 2018¹⁴⁸ y filtramos para quedarnos únicamente con aquellos con capacidad de unión a ARN (RBPs), utilizando la lista de RBPs descritas en ESCs por He y colaboradores en 2016¹⁵⁶ (**Figura R10a, R10b**). Como resultado, obtuvimos una lista de 136 RBPs capaces de interaccionar con TET2 (**Figura R10b**). La alta representación de RBPs entre los interactores de TET2 (88,3% del total de interactores) subraya la relevancia del ARN en la función de TET2 indirectamente a través de estos (**Figura R10b**). Dado que nos interesaba elegir candidatos que interaccionan con TET2 y con relevancia en envejecimiento, analizamos la expresión de las 136 RBPs en nuestro ARN-seq de fibroblastos procedentes de ratones viejos (28M) y ratones jóvenes (2M) (**Figura R10a**). Sorprendentemente, analizando mediante mapa de calor la expresión de los interactores RBPs de TET2 en los fibroblastos jóvenes y viejos, observamos que la mayoría de los interactores RBPs de TET2 se encuentran regulados al alza con el envejecimiento (**Figura R10c**). Al realizar el análisis de expresión diferencial con criterio de significación FDR<0,05, obtuvimos 64 RBPs, con 60 cuya expresión estaba aumentada con la edad, mientras que únicamente 4 mostraban una expresión a la baja con el envejecimiento (**Figura R10d, Tabla Suplementaria 7**). Teniendo en cuenta que la expresión de *Tet2* se reduce con la edad (**Figura R10e**), hipotetizamos que aquellas proteínas cuya expresión se encontrase también reducida con el envejecimiento, podrían contribuir en mayor medida a que la pérdida de función de TET2 con la edad. Por dicho motivo, decidimos centrar nuestro estudio en una de las 4 proteínas interactoras cuya expresión disminuía con la edad. Teniendo en cuenta los niveles de enriquecimiento en las dos réplicas de inmunoprecipitación llevadas a cabo para la caracterización del interactoma de TET2 por Guallar y colaboradores¹⁴⁸, así como una reducción en los niveles de expresión de *Ints4* de aproximadamente un tercio con el envejecimiento (**Figura R10e**), decidimos centrar nuestro estudio en la caracterización de la contribución de esta proteína a la función de TET2. *Ints4* codifica para una de las 15 subunidades que conforman el complejo Integrator, clave en la biología del ARN regulando

una variedad de procesos incluyendo la iniciación, elongación y terminación de la transcripción o el procesamiento de ARNs^{274,275}. Además, la función de INTS4 permanece inexplorada en células troncales de ratón, desconociéndose su papel en el estado pluripotente, y su contribución a la función de TET2, justificando la relevancia de su estudio.

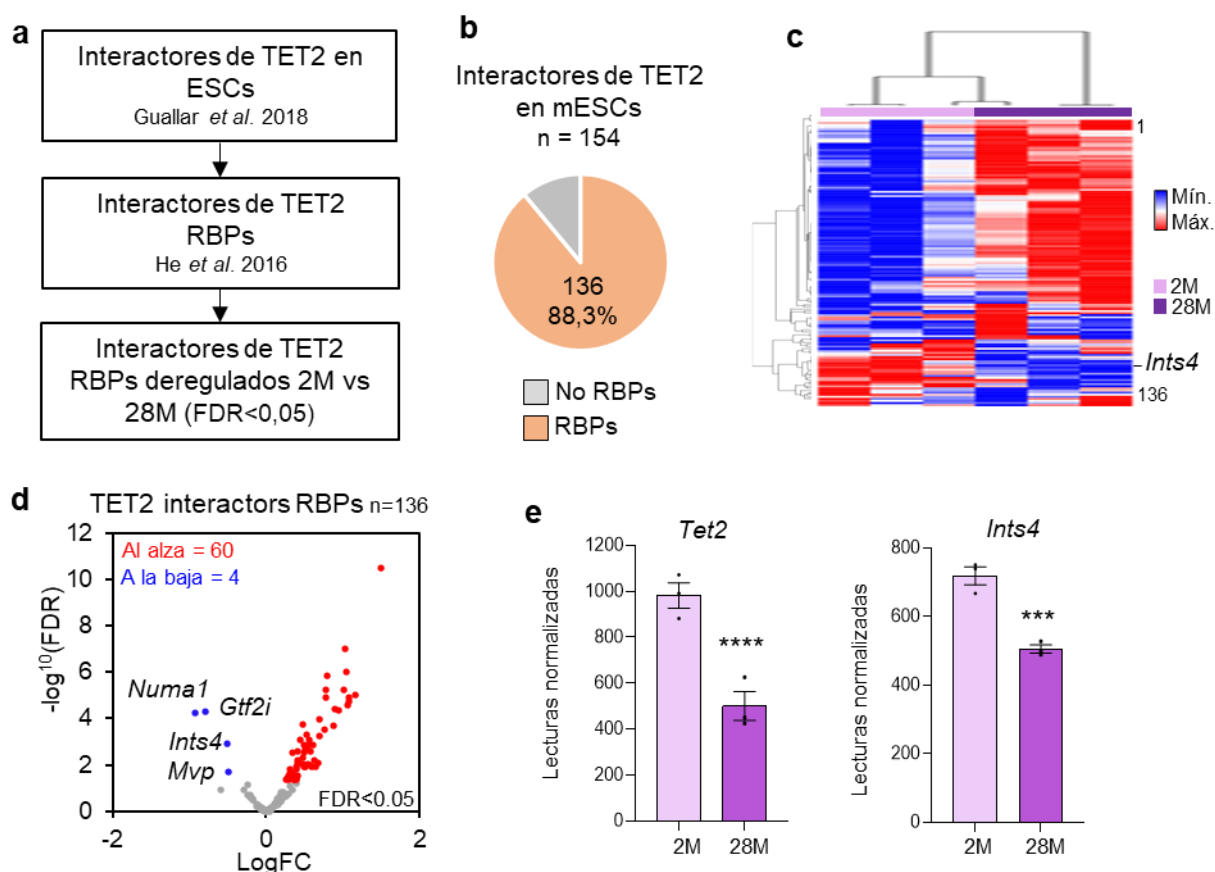


Figura R10. El interactoma de TET2 en ESCs está enriquecido en proteínas con capacidad de unión a ARN (RBPs - RNA binding proteins). a) Esquema de cómo se seleccionaron los RBPs que interaccionan con TET2 RBPs diferencialmente expresados con la edad. b) Diagrama sectorial representando los interactores de TET2 identificados en células madre embrionarias de ratón (ESCs) con capacidad de unión a ARN (RBPs) o sin ella (No RBPs), según lo reportaron en su estudio He y colaboradores¹⁵⁶. c) Mapa de calor representando la expresión de los interactores de TET2 que son RBPs en fibroblastos adultos de ratones de 2 meses y de 28 meses. d) Diagrama de puntos de la expresión génica ($\log_2$ de las lecturas normalizadas) en fibroblastos jóvenes (2M) y viejos (28M) de los interactores de TET2 en ESCs. e) Gráfico de barras de la expresión de *Tet2* (arriba) e *Ints4* (abajo) en fibroblastos de ratón jóvenes (2M) y viejos (28M) determinada por ARN-seq. La estadística fue calculada empleando la prueba de Wald. *** FDR<0,001 ****FDR<0,0001.

7.4.2 *Ints4* y *Tet2* muestran patrones de expresión similares en varios tejidos y tipos celulares

Con el objeto de explorar el rol del complejo INTS4-TET2 decidimos caracterizar las dinámicas de expresión de ambos genes en una variedad de contextos biológicos. Empleando la base de datos biogps.or²⁷⁶, evaluamos la expresión de *Tet2* e *Ints4* en varios tejidos de ratón, y detectamos que ambos genes muestran niveles de expresión en una variedad de tejidos entre

los que se incluyen corazón, ovario, bazo, pulmón, estómago, intestino grueso y delgado, hígado páncreas, tejidos nerviosos y epidermis más bajos que en ESCs (**Figura R11a**).

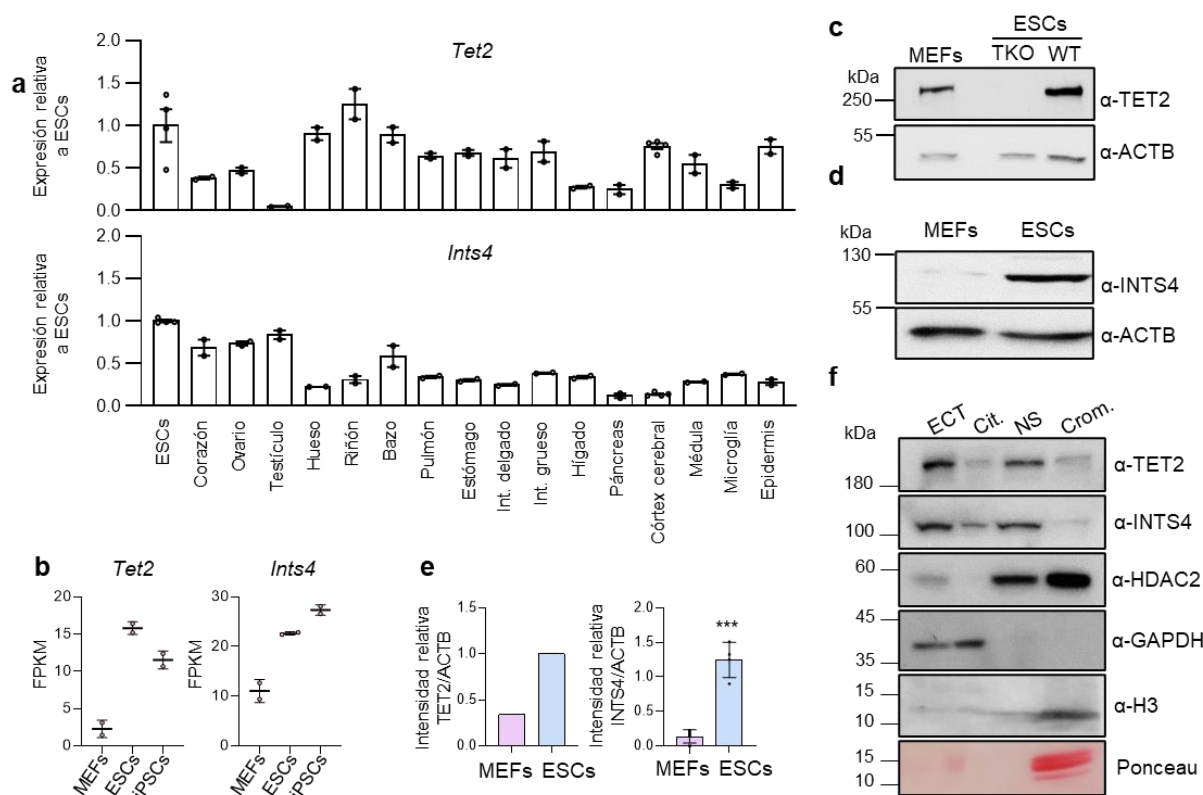


Figura R11. *Ints4* y *Tet2* muestran patrones de expresión similares en MEFs, ESCs y tejidos de ratón. a) Gráfico de barras con la expresión de *Tet2* e *Ints4* en los tejidos de ratón indicados. Datos obtenidos de BioGPS (<http://biogps.org>). b) Gráfico de puntos de la expresión de *Tet2* e *Ints4* en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), células madre embrionarias (ESCs) y células pluripotentes inducidas (iPSCs). Datos obtenidos de Carter y colaboradores²⁷⁷. c) Western blot de la expresión de TET2 en MEFs, células silvestres (WT) y TET1,2,3 triple KO (TKO)²⁴⁶. Se analizó actina (ACTB) como control de carga. d) Western blot de INTS4 en MEFs y ESCs se muestra ACTB como control de carga. e) Cuantificación de la intensidad relativa de proteína TET2 e INTS4 a ACTB en MEFs y ESCs determinadas mediante Western Blot en c) y d), respectivamente. f) Western blot de subfraccionamiento celular para el análisis de la localización de TET2 e INTS4 en ESCs. ECT = Extracto celular total, Cit. = Fracción citoplasmática, NS = Fracción nuclear soluble, Crom. = Fracción nuclear unida a cromatina. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. ****P*-valor<0,001, *****P*-valor<0,0001.

No obstante, en riñón se observan niveles de expresión mayores de *Tet2* que en ESCs, mientras que no ocurre lo mismo con la expresión de *Ints4* (**Figura R11a**). Por otro lado, observamos una mayor expresión en células pluripotentes (ESCs) y células pluripotentes inducidas (iPSCs) que en células somáticas (MEFs) tanto de *Tet2* como de *Ints4* (**Figura R11b**). Mediante Western blot de TET2 (**Figura R11c**) e INTS4 (**Figura R11d**), validamos que estos mayores niveles de expresión a nivel de ARN también se traducían en mayor cantidad de proteína en el estado pluripotente (ESCs) que en MEFs, tanto para TET2 como para INTS4 (**Figura R11e**). TET2 es una proteína principalmente nuclear, aunque también se encuentra en el citoplasma^{278,279}. Así mismo, se ha reportado que el complejo Integrator se localiza fundamentalmente en el núcleo en células HeLa, dada su función en la regulación

transcripcional y procesamiento de ARNs²⁷⁴. Sin embargo, la localización subcelular de distintas subunidades del complejo Integrator es diferente, habiendo subunidades predominantemente nucleares (como INTS4, INTS6, INTS9 o INTS12), subunidades predominantemente citoplasmáticas (como INTS2 o INTS7) y subunidades presentes tanto en citoplasma como en el núcleo (como INTS3, INTS5 o INTS11)²⁴⁰. Para caracterizar la localización subcelular de TET2 e INTS4 en ESCs, llevamos a cabo un fraccionamiento subcelular en el que obtuvimos las fracciones citoplasmática, nuclear soluble y nuclear unida a cromatina. Como controles para cada fracción elegimos GAPDH como marcador de citoplasma, HDAC2 como proteína presente en la fracción soluble nuclear y H3 en la fracción de cromatina. Mediante Western blot de las distintas fracciones observamos que tanto TET2 como INTS4 están presentes en las tres fracciones citoplasmática, nuclear soluble y unida a cromatina, siendo su presencia más abundante en la fracción nuclear soluble (**Figura R11f**).

Puesto que, tanto *Tet2* como *Ints4*, se expresan más en células pluripotentes que en células somáticas, nos propusimos determinar su expresión en los procesos de diferenciación (salida de pluripotencia) y reprogramación celular somática (adquisición de pluripotencia). Empleando datos disponibles en la literatura caracterizamos la expresión de *Tet2* e *Ints4* en la diferenciación de ESCs con ácido retinoico, que induce diferenciación a neuroectodermo²⁸⁰. Observamos que ambos genes se regulan a la baja a lo largo de los 6 días de diferenciación mostrando perfiles similares (**Figura R12a**). Como controles analizamos los marcadores de pluripotencia *Sox2* y *Oct4*, cuya expresión se reduce (**Figura R12a**), y los marcadores de neuroectodermo *Nestin* y *Pax6* cuya expresión se induce con ácido retinoico especialmente entre los días 2 y 5 (**Figura R12a**). Analizamos también diferenciación de ESCs mediante formación de cuerpos embrioides, una diferenciación en agregados tridimensionales donde se recapitulan las etapas de la embriogénesis temprana, y que produce diferenciación a las tres capas germinales del embrión: endodermo, ectodermo y mesodermo²⁸¹. En la diferenciación de cuerpos embrioides observamos también que tanto *Ints4* como *Tet2* se expresan menos a medida que avanzan las horas de diferenciación (**Figura R12b**). Como controles estudiamos la expresión del marcador de pluripotencia *Oct4*, cuya expresión disminuye con la diferenciación, y de los marcadores de endodermo *Foxa2*, de mesodermo *Fgf8* y de ectodermo *Fgf5*, que se inducen con la diferenciación (**Figura R12b**). Durante la reprogramación celular somática de MEFs mediante sobreexpresión de los factores de Yamanaka (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*), observamos que la expresión tanto de *Tet2* como de *Ints4* se incrementa durante la adquisición de la pluripotencia (**Figura R12c**). Como controles evaluamos la expresión de los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *Sox2*, cuya expresión se induce con la adquisición de pluripotencia, y los marcadores de *Snai1* y *Snai2* cuya expresión se reduce a lo largo de la reprogramación (**Figura R12c**). En base a todos estos resultados, podemos concluir que *Tet2* e *Ints4* muestran perfiles de expresión similares en una variedad de tejidos y procesos de diferenciación y reprogramación, siendo más expresados en el estado pluripotente. Además, ambas proteínas muestran localizaciones subcelulares similares. En conjunto, estos resultados son compatibles con la posible relevancia de INTS4 den la función de TET2 en células pluripotentes.

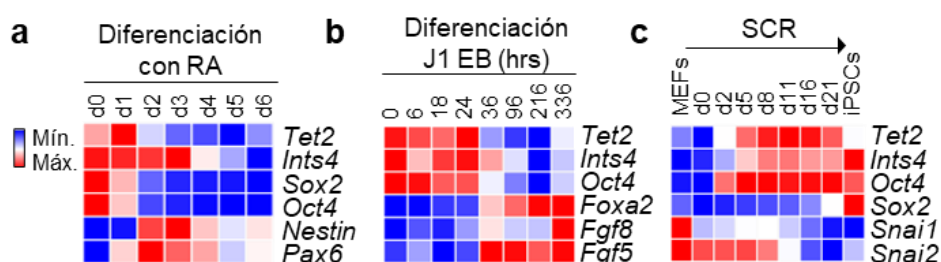


Figura R12. *Ints4* y *Tet2* muestran patrones de expresión similares durante salida y adquisición de pluripotencia. a) Mapa de calor de la expresión de *Tet2* e *Ints4* durante la diferenciación de ESCs a neuroectodermo mediante tratamiento con ácido retinoico (RA) 5 μ M. Se muestran los datos de expresión de los marcadores de pluripotencia *Sox2* y *Oct4* y de los marcadores de ectodermo *Nestin* y *Pax6* como controles. Datos obtenidos de Ivanova y colaboradores²⁵⁴. b) Mapa de calor de la expresión de *Tet2* e *Ints4* a lo largo del proceso de diferenciación de cuerpos embrioides (EB) de células ESCs J1. Se muestran los datos de expresión del marcador de pluripotencia *Oct4* y de los marcadores de endodermo *Foxa2*, de ectodermo *Fgf5* y de mesodermo *Fgf8* como controles. Datos obtenidos de Ding y colaboradores²⁸². c) Mapa de calor de la expresión de *Tet2* e *Ints4* a lo largo del proceso de reprogramación celular somática (SCR) de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Se muestran los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *Sox2* y los marcadores de transición epitelio-mesénquima *Snai1* y *Snai2*. Datos obtenidos de Samavarchi-Tehrani y colaboradores²⁸³.

7.4.3 La interacción de TET2 con INTS4 no depende de su región de unión a ARN.

Tras comprobar que TET2 e INTS4 presentan patrones de expresión similares, con una elevada expresión en células pluripotentes, procedimos a la validación de la interacción de ambas proteínas en ESCs, que había sido identificada mediante dos réplicas de inmunoprecipitación de ^{3xFL}TET2 seguida de espectrometría de masas¹⁴⁸. Para validar la interacción entre ambas proteínas llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación de TET2 e INTS4. Para la inmunoprecipitación de TET2 empleamos líneas celulares de ESCs knock-in para TET2 silvestre o mutante (*Tet2* o *Tet2* Δ RBD KI) generadas por el laboratorio del Dr. Fuks¹¹⁰. En dichas líneas en el extremo 3' del gen *Tet2* endógeno se había insertado la secuencia que codificaba para una etiqueta triple que incluía un Twin-Strep, un FLAG y un HA (**Figura R13a**). La mutación *Tet2* Δ RBD consiste en la delección del dominio de unión a ARN (RBD) de *Tet2* descrito por He y colaboradores¹⁵⁶.

En primer lugar, llevamos a cabo una inmunoprecipitación en lisados de proteínas totales de células *Tet2* o *Tet2* Δ RBD KI ESCs con el sistema Strep-Tactin XT, tomando ventaja de la etiqueta Twin-Strep. Tras validar la correcta inmunoprecipitación de TET2 mediante Western blot con un anticuerpo anti-TET2 (**Figura R13b**), confirmamos la interacción de INTS4 con TET2 utilizando un anticuerpo dirigido contra este miembro del complejo Integrator (**Figura R13b**). Además, observamos que INTS4 también fue detectado en la fracción proteica asociada a TET2 Δ RBD, indicando que la interacción entre INTS4 y TET2 no es dependiente del dominio de unión al ARN de esta última. INTS4 forma parte del módulo de corte del complejo Integrator, por lo que decidimos testar la interacción de miembros de los módulos ternario (INTS10) y backbone (INTS7) con TET2, a pesar de que no habían sido detectados en los ensayos de espectrometría de masas¹⁴⁸. En línea con lo observado en el interactoma, no detectamos interacción entre INTS10 o INTS7 con TET2 ni TET2 Δ RBD (**Figura R13b**). Estos datos sugieren que INTS4 interacciona con TET2 independientemente del complejo Integrator,

No obstante, no podemos descartar que TET2 interactúe con otras subunidades del complejo Integrator a través de INTS4, y que dichas interacciones sean más débiles y por ello no sean detectadas por nuestros ensayos. Empleando las mismas líneas celulares llevamos a cabo la inmunoprecipitación de INTS4. Tras verificar la correcta inmunoprecipitación mediante Western blot anti-INTS4, llevamos a cabo un Western blot anti-TET2. A pesar de que observamos la interacción de INTS4 con las subunidades del complejo Integrator como INTS3, INTS5 (módulo shoulder), INTS7 (módulo backbone) e INTS10 (complejo ternario) (**Figura R13c**), en esta inmunoprecipitación no pudimos detectar la presencia de TET2 (datos no mostrados). Nuestros resultados validan la interacción de TET2 con INTS4, siendo dicha interacción independiente del dominio RBD. Además, plantean la posibilidad de una interacción entre TET2 e INTS4 que funcionaría de manera independiente al complejo Integrator, a pesar de la participación de INTS4 en dicho complejo en ESCs.

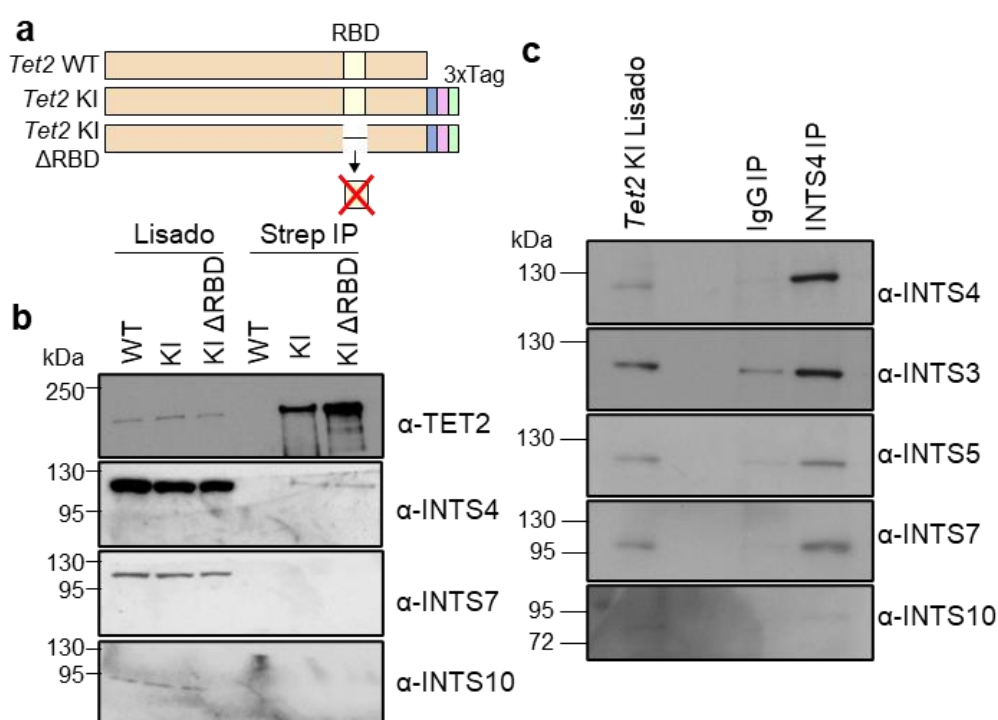


Figura R13. Validación de la interacción entre TET2 e INTS4 en ESCs. a) Esquema representativo del marcaje endógeno mediante la tecnología CRISPR-Cas9 de *Tet2* y *Tet2* Δ RBD. El resultado son líneas celulares de ESCs *Tet2* WT, *Tet2* KI 3xTag (Twin-Strep, Flag, HA) y *Tet2* KI 3xTag Δ RBD, empleadas para la generación de extractos celulares totales con los que se llevó a cabo la inmunoprecipitación de TET2 empleando MagStrep Beads. b) Western Blot de TET2, INTS4 y otros miembros del complejo Integrator (INTS7, INTS10) en lisados celulares totales (Lisado) y tras la inmunoprecipitación de TET2 (Strep IP) en las líneas WT, *Tet2* KI (KI) y *Tet2* KI mutante para la unión al ARN (KI Δ RBD). c) Western blot de INTS4 y distintos miembros del complejo integrator en las fracciones proteicas indicadas. *Tet2*KI lisado: Extracto celular total. IgG IP: Inmunoprecipitación control con anticuerpo IgG. INTS4 IP: Inmunoprecipitación con anticuerpo anti-INTS4.

7.4.4 La sobreexpresión ^{3xFL}INTS4 en mESCs afecta a la salida de pluripotencia

Tras confirmar la interacción entre TET2 e INTS4 en células ESCs, con objeto de explorar el papel de INTS4 en este tipo celular generamos líneas con sobreexpresión de INTS4 marcada con tres péptidos FLAG (^{3xFL}INTS4). Para ello transfectamos células ESCs con el plásmido pPB-^{3xFL}*Ints4-HygroR*, y seleccionamos las células portadoras del vector añadiendo

higromicina al medio (**Figura R14a**). En primer lugar, verificamos la generación de células con sobreexpresión de 3^{xFL} INTS4 en dos clones mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-FLAG y anti-INTS4. En el blot donde se usó anti-FLAG, observamos una banda correspondiente a la proteína sobreexpresada, que estaba ausente en las células control (**Figura R14b**). Además, en el blot en el que se usó anti-INTS4, observamos dos bandas de tamaños compatibles con la proteína endógena y la sobreexpresada (**Figura R14b**).

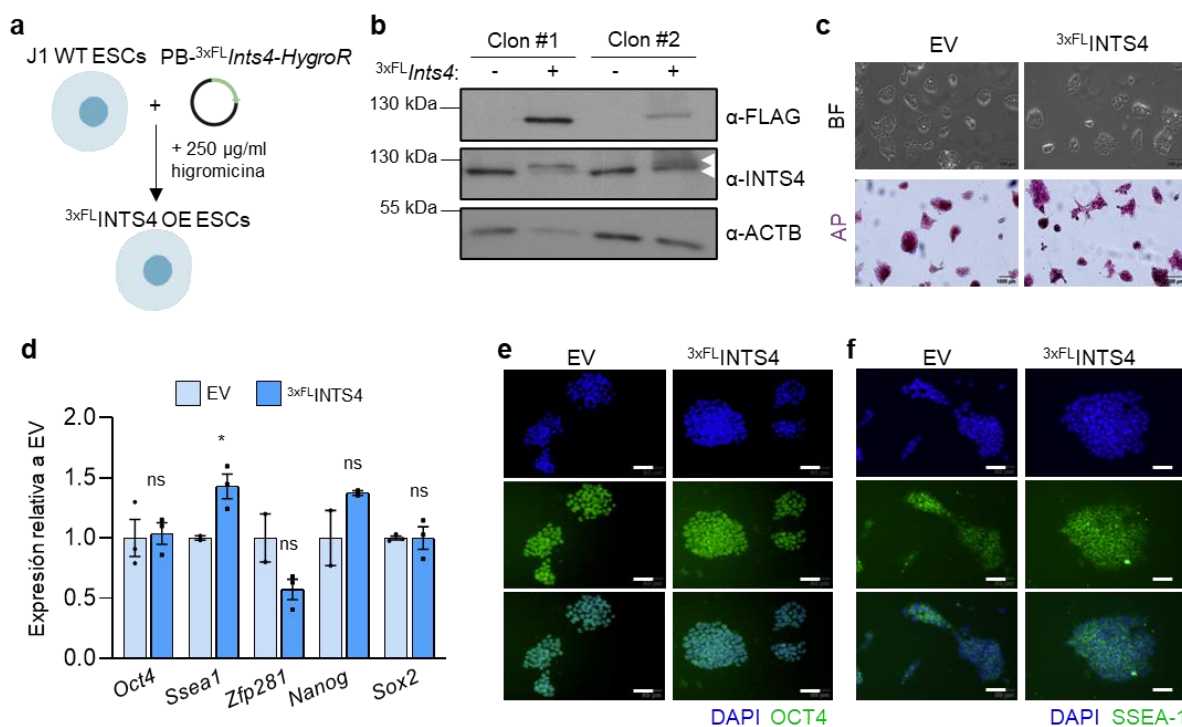


Figura R14. La sobreexpresión de 3^{xFL} INTS4 en células troncales embrionarias de ratón no afecta a la morfología de las colonias ni a la expresión de marcadores de pluripotencia. a) Esquema representativo de la generación de líneas de células ESCs con sobreexpresión de INTS4 marcado en su extremo N-terminal con una etiqueta con tres copias de FLAG (3^{xFL} INTS4). b) Western blot de FLAG e INTS4 en dos clones de células ESCs con sobreexpresión de 3^{xFL} INTS4 y control (EV). c) Imágenes de las colonias formadas por las ESCs con sobreexpresión de 3^{xFL} INTS4 y control (EV), en campo claro y tras la tinción de pluripotencia fosfatasa alcalina (AP). d) Gráfico de barras de la expresión de los marcadores de pluripotencia *Oct4*, *Ssea1*, *Zfp281*, *Nanog* y *Sox2* en las células ESCs con sobreexpresión de 3^{xFL} INTS4 y en las líneas control (EV) determinada por RT-qPCR. e) Inmunocitoquímica del marcador de pluripotencia OCT4 en colonias de células ESCs con sobreexpresión de 3^{xFL} INTS4 y control (EV). Escala: 50 µm. f) Inmunocitoquímica del marcador de pluripotencia SSEA-1 en las células ESCs con sobreexpresión de 3^{xFL} INTS4 y en las líneas control (EV). Escala: 50 µm. Los datos se representan como media ± s.e.m (n=3). La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. *P-valor<0,05, ns: estadísticamente no significativo.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de 3^{xFL} INTS4 sobre el estado pluripotente de las ESCs, llevamos a cabo la caracterización de marcadores de pluripotencia en las células control y en las células con sobreexpresión. La tinción con fosfatasa alcalina (AP, del inglés “alkaline phosphatase”) es un marcador de pluripotencia, puesto que dicha enzima es expresada en células pluripotentes, pero no tras su diferenciación. Las colonias formadas por las células ESCs + 3^{xFL} INTS4 no mostraron diferencias en cuanto a morfología ni en intensidad de tinción AP con respecto a las células transfectadas con el vector vacío (EV) como control (**Figura R14c**). Para confirmar lo observado a nivel de colonia, analizamos si la sobreexpresión de

INTS4 había afectado a la expresión de marcadores de pluripotencia. Para ello analizamos la expresión de *Oct4* (*Pou5f1*), *Ssea1*, *Zfp291*, *Nanog* y *Sox2* mediante RT-qPCR. No detectamos diferencias significativas en la expresión de estos marcadores de pluripotencia excepto para *Ssea1* cuyos niveles aparecen ligeramente incrementados en las células con la sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 comparadas con el control (**Figura R14d**). Además, llevamos a cabo una tinción inmunocitoquímica de OCT4 (**Figura R14e**) y SSEA-1 (**Figura R14f**) dónde no observamos diferencias notables entre las células control y las células con sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4, en línea con la ausencia de cambios dramáticos observada por RT-qPCR. En conclusión, la sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 no afecta a la expresión de marcadores de pluripotencia ni al mantenimiento de las ESCs.

Por otro lado, nos propusimos determinar si la sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 en las células ESCs afectaba a la salida del estado pluripotente o a la diferenciación, dado que se sabe que TET2 es dispensable para el mantenimiento de la pluripotencia pero necesario para una correcta salida del estado pluripotente¹⁴⁹. El factor de inhibición de leucemia (LIF por sus siglas en inglés), es una citocina necesaria para el mantenimiento de la pluripotencia de las ESCs *in vitro*, ya que su ausencia en el medio de cultivo provoca la diferenciación espontánea de éstas a células de las tres capas germinales. Para evaluar si la sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 afectaba a la capacidad de autorrenovación de las ESCs, llevamos a cabo un ensayo clonogénico de formación de colonias. Para ello, sembramos ESCs a baja densidad, y tras 4 días en cultivo en presencia o ausencia de LIF realizamos la tinción de fosfatasa alcalina y contamos el número de colonias indiferenciadas, y parcial o totalmente diferenciadas obtenidas en cada una de las condiciones, para evaluar el efecto de la sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 en el mantenimiento de la pluripotencia (**Figura R15a**). El conteo de las colonias de cada categoría mostró que no existían diferencias significativas entre la proporción de colonias diferenciadas, parcialmente diferenciadas ni indiferenciadas, formadas por las células ESCs + ^{3xFL}INTS4 y las células control transfectadas con el control vacío (EV), en presencia de LIF (**Figura R15b**). Obtuvimos datos similares cuando realizamos el mismo ensayo en condiciones de diferenciación espontánea (sin LIF) (**Figura R15b**). En conjunto, observamos que la sobreexpresión de INTS4 no afecta al mantenimiento y salida de pluripotencia de las ESCs.

Para confirmar que no existían problemas en la diferenciación de ESCs debido a la sobreexpresión de INTS4 a nivel molecular a nivel de marcadores específicos, llevamos a cabo un ensayo de salida de pluripotencia de las células EV y ^{3xFL}INTS4 en cultivo sin LIF durante 4 días, y tomamos muestras de ARN en los días 2 y 4 de diferenciación, (**Figura R15c**). Además, teñimos las células a diferentes días con cristal violeta. Las imágenes tomadas en microscopio de campo claro en los días 1, 2 y 3 de la diferenciación, así como la tinción con cristal violeta en el día 4 no reveló diferencias observables entre las células control y las que sobreexpresaban ^{3xFL}INTS4 (**Figura R15d**). Seguidamente, analizamos mediante RT-qPCR en las muestras obtenidas durante la diferenciación a días 0, 2 y 4 la expresión de marcadores de pluripotencia (*Oct4* y *Sox2*), y neuroectodermo (*Nestin*) además de nuestros genes de interés *Ints4* y *Tet2*. Observamos una reducción de la expresión de los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *Sox2* durante la diferenciación tras la retirada del LIF, tanto en las células EV como en las células ^{3xFL}INTS4 (**Figura R15e y R15f**), siendo a día 2 la reducción de expresión de *Oct4* más pronunciada en las células ^{3xFL}INTS4 que en las EV (**Figura R15e**). El marcador de neuroectodermo *Nestin* se indujo con la diferenciación a día 4 tanto en las células EV como en

las células ^{3xFL}INTS4 (**Figura R15g**). Observamos una reducción en la expresión de *Ints4* se durante la diferenciación, tanto en las células EV como en las células ^{3xFL}INTS4 (**Figura R15h**). Curiosamente, observamos una mayor disminución de la expresión de *Ints4* endógeno a día 2 en las células con sobreexpresión de 3xFL-INTS4, cuando en las células control EV apenas se detecta una reducción respecto al día 0 (**Figura R15h**). La expresión de *Tet2* también se redujo con la diferenciación en las células EV y ^{3xFL}INTS4 (**Figura R15i**). En conclusión, no observamos diferencias llamativas en la expresión de los marcadores analizados a lo largo del proceso de diferenciación entre las células EV y ^{3xFL}INTS4, lo que indica que la sobreexpresión de INTS4 no afecta a la diferenciación de las ESCs por ausencia de LIF.

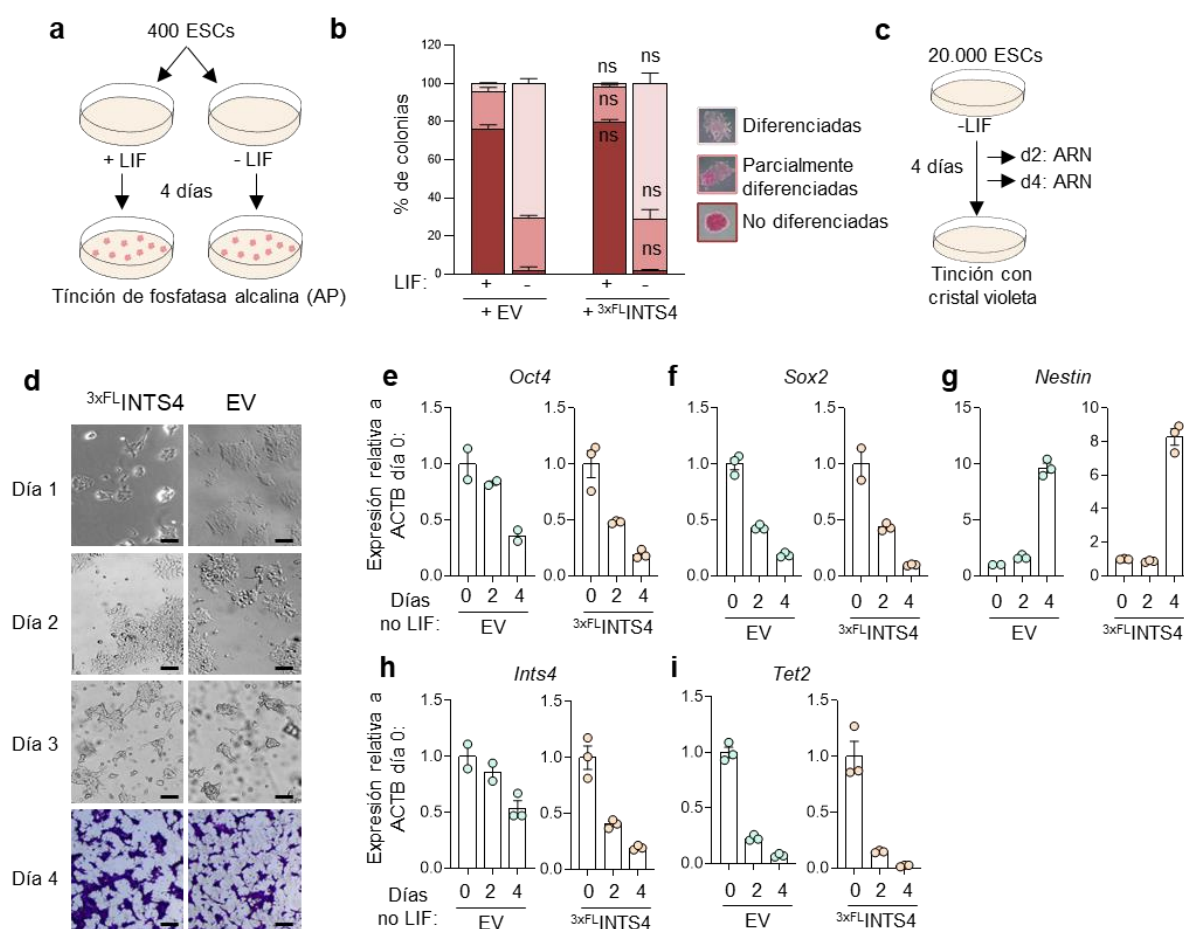


Figura R15. La sobreexpresión ^{3xFL}INTS4 en las células troncales embrionarias de ratón no afecta al mantenimiento y salida de la pluripotencia. a) Esquema del ensayo de formación de colonias a partir de célula única llevado a cabo con las células ESCs con sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 y las células control transfectadas con el vector vacío (EV). b) Gráfico de barras de las colonias obtenidas en el ensayo de formación de colonias clasificadas en tres grupos en función de la morfología de la colonia y del grado de tinción del marcador fosfatasa alcalina. c) Esquema del ensayo de diferenciación en ausencia de factor inhibidor de leucemia (LIF). d) Imágenes representativas del ensayo de diferenciación sin LIF a días 1, 2 y 3 en campo claro y tras la tinción con cristal violeta 4 días tras la diferenciación. Escala en imágenes de campo claro: 100 μ m, escala en tinción cristal violeta: 200 μ m. e-i) Gráfico de barras de la expresión de *Oct4*, *Sox2*, *Nestin*, *Ints4* y *Tet2* en las ESCs + EV o + ^{3xFL}INTS4 tras 0, 2 y 4 días en cultivo sin LIF. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. ns: estadísticamente no significativo.

El ácido retinoico (RA) induce la diferenciación de las ESCs a neuroectodermo (NE)^{254,284}. En células *Tet2* KO se han observado defectos en la diferenciación con una mayor contribución a neuroectodermo en células sin esta proteína¹⁶³. Para testar si la sobreexpresión de INTS4 afectaba a la diferenciación a NE, cultivamos células EV y ^{3xFL}INTS4 con 5 μ M de RA en el medio de cultivo durante 4 días (**Figura R16a**). Durante la diferenciación recogimos muestras de ARN en los días 2 y 4, y a día 4 llevamos a cabo una tinción celular con cristal violeta (**Figura R16a**). En las fotografías tomadas en microscopio de campo claro en los días 1, 2 y 3 de diferenciación, así como la tinción con cristal violeta a día 4 no se observaron diferencias observables entre las células control y las células con sobreexpresión de INTS4 (**Figura R16b**).

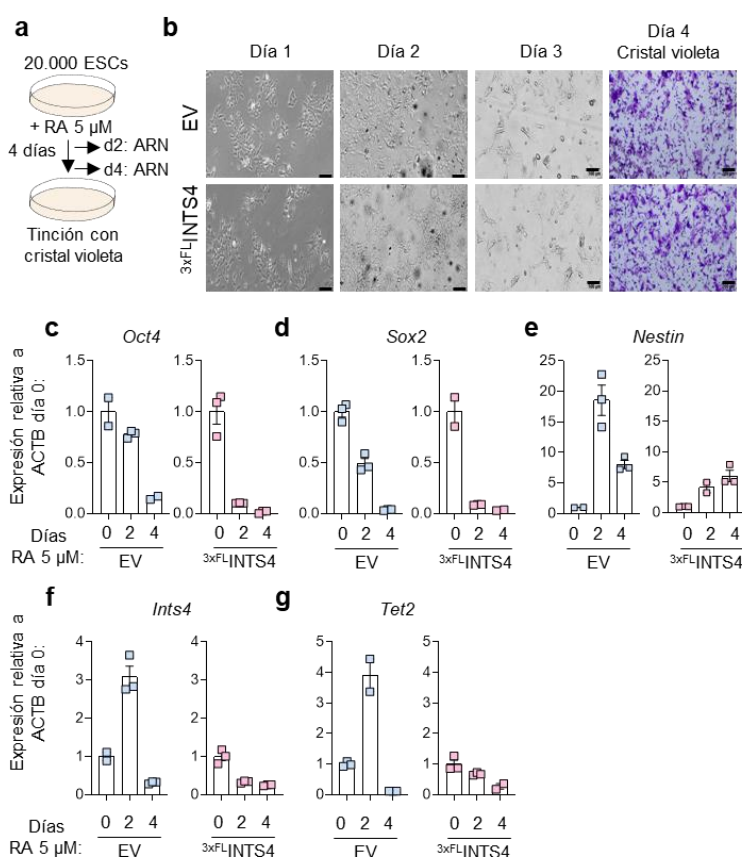


Figura R16. Efecto de la sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 en la salida de pluripotencia inducida por ácido retinoico en células troncales embrionarias de ratón. a) Esquema del ensayo de diferenciación a neuroectodermo mediante tratamiento con ácido retinoico (RA) 5 μ M. b) Imágenes representativas de las células tras el tratamiento a días 1, 2 y 3 en campo claro y a día 4 tras la tinción con cristal violeta. Escala imágenes campo claro: 100 μ M, tinción cristal violeta: 200 μ M. c-g) Gráfico de barras de la expresión de *Oct4*, *Sox2*, *Nestin*, *Ints4* y *Tet2* en las ESCs + EV o + ^{3xFL}INTS4 tras 0, 2 y 4 días en cultivo con 5 μ M de ácido retinoico (RA). Los datos se representan como media $\pm$ s.d (n=3).

Analizamos mediante RT-qPCR los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *Sox2*, el marcador de NE *Nestin* y nuestros genes de interés *Ints4* y en las muestras obtenidas durante la diferenciación con RA a días 0, 2 y 4. A día 2 de la diferenciación, observamos una reducción en la expresión de los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *Sox2* más pronunciada en las células ^{3xFL}INTS4 que en las células control EV (**Figura R16c, R16d**), aunque a día 4 dichas

diferencias desaparecieron. En células control (EV), la diferenciación con RA indujo la expresión del marcador de NE *Nestin*, con un pico de expresión a día 2 (**Figura R16e**). En contraste, dicho pico de inducción de *Nestin* no se produjo en células con sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4, y los niveles de este marcador de NE en células con sobreexpresión no alcanzaron los niveles de este en células control (**Figura R16e**). Así mismo, *Ints4* y *Tet2* mostraron picos de expresión en las células EV control a día 2 de diferenciación (**Figura R16f, R16g**). En contraposición, en las células ^{3xFL}INTS4 no observamos dichos picos, sino que la expresión de *Ints4* y *Tet2* se redujo progresivamente con la diferenciación con RA (**Figura R16f, R16g**).

En base a estos datos, podemos concluir que la sobreexpresión de INTS4 en condiciones de diferenciación espontánea no tiene efecto sobre la salida de pluripotencia de las ESCs. Sin embargo, en condiciones de diferenciación con ácido retinoico acelera la pérdida de marcadores de pluripotencia durante diferenciación, además de que impide que se produzca a día 2 el pico de expresión de los marcadores *Nestin*, *Ints4* y *Tet2*, sugiriendo deficiencias en la diferenciación a NE. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión ^{3xFL}INTS4 interfiere con la diferenciación a NE de las ESCs, en particular con la activación de marcadores durante etapas tempranas de diferenciación.

7.4.5 La pérdida de función de *Ints4* en ESCs es incompatible con la viabilidad celular

Con el propósito de diseccionar el papel de INTS4 en células troncales embrionarias, así como su potencial contribución a las funciones de TET2, llevamos a cabo ensayos de pérdida de función. Para ello, utilizamos la tecnología CRISPR/Cas9 utilizando dos ARN guía (sgARNs) diseñados contra el exón 2 de *Ints4* (**Figura R17a**). Tras varios intentos fallidos de generar células *knock-out* para *Ints4*, con protocolos utilizados de rutina en el laboratorio que incluyen selección transitoria con antibiótico para enriquecer en células transfectadas con el plásmido CRISPR, decidimos forzar la inserción del vector en el genoma de las células mediante tratamiento prolongado con antibiótico. Para ello, transfectamos ESCs con el plásmido codificante para la endonucleasa Cas9 y cada uno de los dos sgARNs, seleccionamos con puromicina durante 14 días para forzar la inserción del vector en el genoma de las células, y llevamos a cabo la validación del *knock-out* mediante PCR y Western blot (**Figura R17b**). La estrategia de genotipado mediante PCR se basaba en un cebador reverso y dos cebadores directos, uno de los cuales anillaba en la región diana del sgARN de CRISPR/Cas9, de forma que se generaban dos amplicones de alrededor de 400 pb y 200 pb en las líneas silvestres (WT, del inglés “*wild type*”), y un único amplicón (de tamaño variable según la extensión de la delección) en las líneas *Ints4* KO (**Figura R17c**), al producirse la delección de la secuencia diana del sgARN, desapareciendo con ello la secuencia de anillamiento del segundo cebador directo. El resultado del genotipado por PCR reveló que ninguna de las líneas obtenidas (transfectadas con los sgARNs sg#1, sg#2 o una combinación de sg#1+2) tenía la delección de *Ints4* esperada, dado que tras la PCR se observaron los dos amplicones correspondientes al genotipo WT, igual que en las células control transfectadas con el vector de CRISPR/cas9 vacío (EV) (**Figura R17d**). A continuación, validamos dicho resultado mediante Western blot. A pesar de que se observó cierta reducción en la intensidad de la banda de peso compatible con la proteína INTS4 con respecto a las células control (EV), los niveles de proteína no desaparecieron, confirmando

que las células obtenidas no eran *knock-out* para *Ints4* (**Figura 17e**). Nuestra experiencia con este protocolo de *knock-out* en el que se fuerza la inserción del vector con dos semanas de selección con antibiótico, es que siempre se obtienen líneas de ESCs con pérdida de función del gen deseado, a no ser que el gen sea imprescindible para la viabilidad celular o el mantenimiento del estado pluripotente. Sin embargo, tras varios intentos no fuimos capaces de obtener líneas ESCs *Ints4* KO, indicando que INTS4 podría ser necesario para el mantenimiento de las células ESCs.

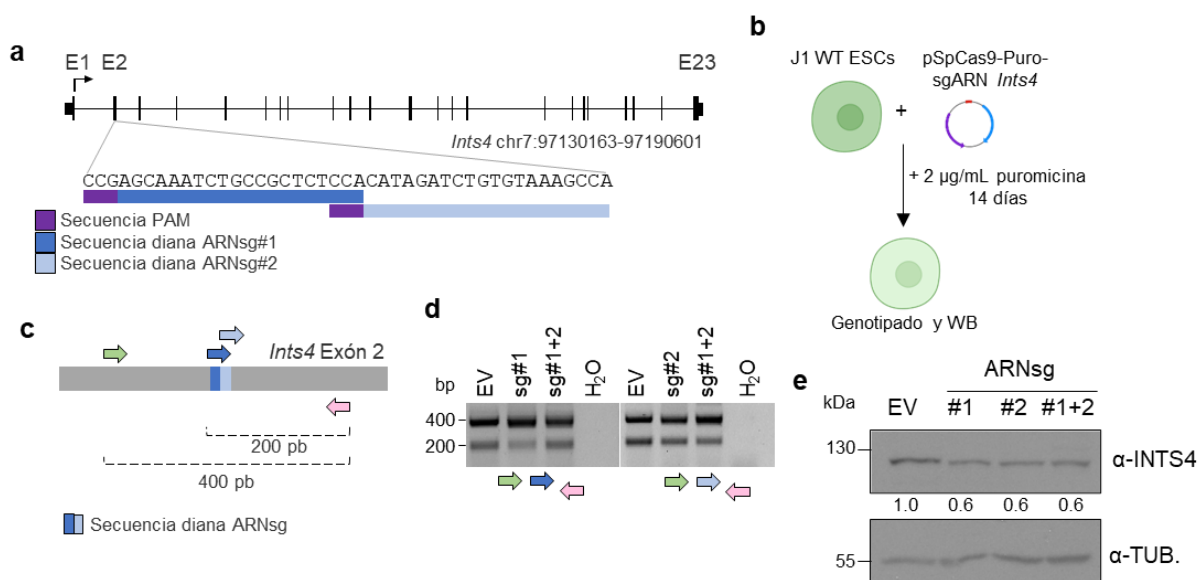


Figura R17. La depleción de *Ints4* mediante CRISPR/Cas9 en células troncales embrionarias de ratón no es viable. a) Esquema de las secuencias diana de los ARN guías (sgARNs) diseñados para la generación de líneas celulares ESCs *Ints4* KO mediante CRISPR/cas9 y su región genómica diana. b) Esquema experimental seguido para la generación de líneas ESC *Ints4* KO. c) Western blot de los niveles de INTS4 en las líneas celulares obtenidas tras 14 días bajo selección con puromicina, codificada por el plásmido CRISPR/Cas9. d) Esquema representativo de la estrategia de genotipado por PCR para la detección de líneas ESCs *Ints4* KO y gel de agarosa de los fragmentos de ADN obtenidos en la PCR de genotipado. e) Western blot de INTS4 en extractos de ESCs tratadas con una o las dos sgARNs. La tinción con un anticuerpo anti-tubulina (TUB) se utilizó como control de carga.

Dado que no fue posible la generación de líneas ESCs *Ints4* KO estables, decidimos estudiar la pérdida de función de INTS4 mediante su silenciamiento con shARNs. Para ello, diseñamos cuatro shARNs dirigidos contra la secuencia codificante (CDS) de *Ints4*, y un shARN dirigido contra su región 3'UTR (**Figura R18a**). Transfectamos ESCs con uno de los shARNs dirigidos contra *Ints4* o sh*Luci* (gen de la luciferasa, no presente en células de mamífero) como control, y los mantuvimos en cultivo en selección con antibiótico 2 días (*knock-down* a corto plazo) u 8 días (*knock-down* a largo plazo) (**Figura R18b**). Tomamos fotos cada dos días de los cultivos, y observamos que mientras las células transfectadas con sh*Luci* proliferaban y formaban colonias con morfología pluripotente, el silenciamiento de *Ints4* provocó la disminución progresiva del número de células de forma que a días 6 y 8 prácticamente el cultivo carecía de ESCs (**Figura R18c**). Se extrajo ARN de las células a días 2 y 8 de selección con G418 que se analizó mediante RT-qPCR con la finalidad de validar el silenciamiento de *Ints4*. Observamos que mientras a día 2 obtuvimos un silenciamiento de entre el 60 y el 78% con todos los shARNs (**Figura R18d**), a día 8 las pocas células que logramos

obtener no solo no mostraban silenciamiento de *Ints4*, sino que presentaban niveles significativamente más altos que las células transfectadas con sh*Luci* (**Figura R18e**). Estos resultados, junto con los obtenidos con la expresión continuada de CRISPR/Cas9 contra *Ints4*, indican que, mientras que la depleción a corto plazo de *Ints4* (2 días de selección, 3 días de pérdida de función de *Ints4*) es posible, a largo plazo su pérdida de función es incompatible con el mantenimiento de las ESCs.

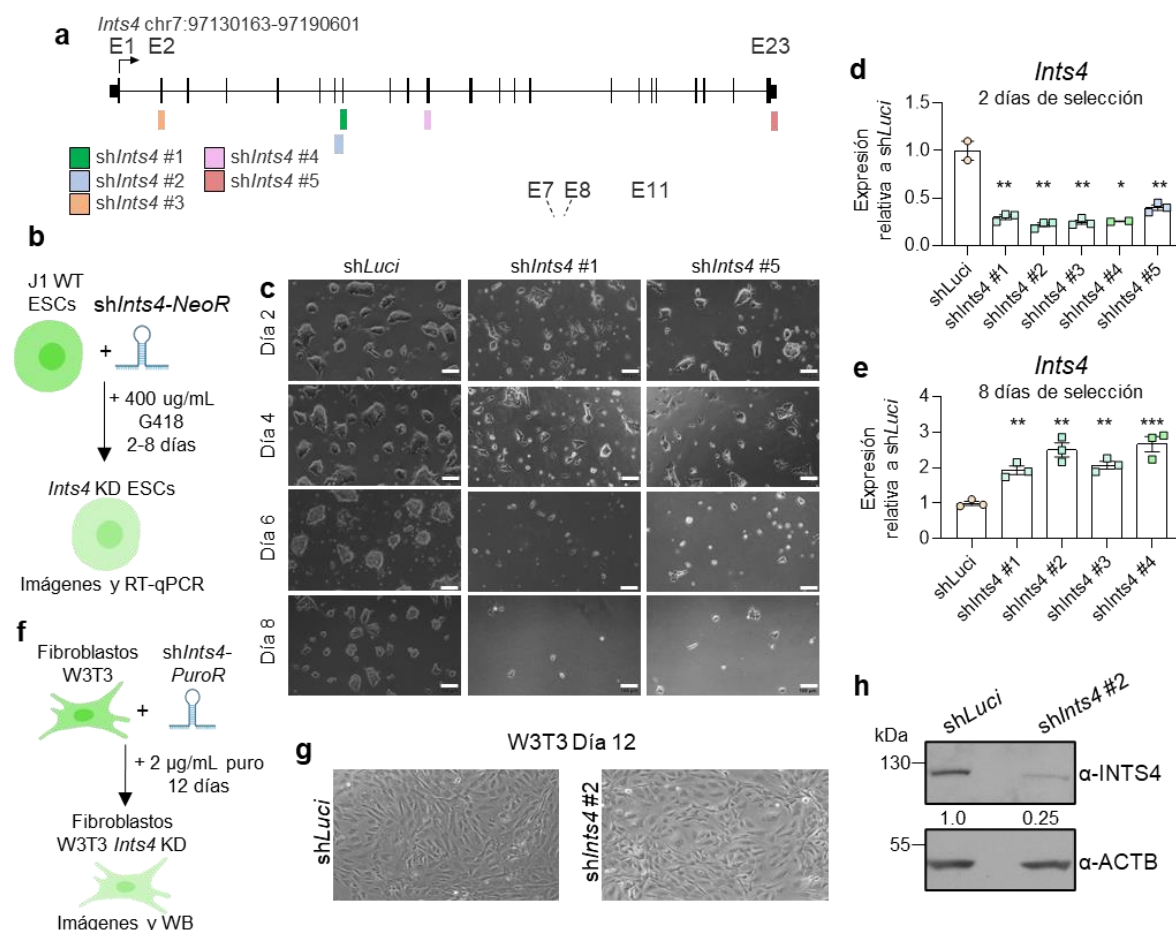


Figura R18. La pérdida de función de *Ints4* en células troncales embrionarias de ratón afecta a la viabilidad celular, y únicamente puede mantenerse a corto plazo. a) Esquema de las secuencias diana de los cinco shARNs contra *Ints4* testados. b) Esquema representativo de los ensayos de pérdida de función de *Ints4* en las células ESCs. c) Imágenes representativas de las ESCs transfectadas con sh*Luci* o sh*Ints4* a los días 2, 4, 6 y 8 de selección con G418. Escala: 100 μ m. d) Gráfico de barras de la expresión de *Ints4* en las ESCs sh*Luci* o sh*Ints4* tras 2 días de selección con G418. e) Gráfico de barras de la expresión de *Ints4* en las ESCs sh*Luci* o sh*Ints4* tras 8 días de selección con G418. La muestra ESCs + sh*Ints4* #5 no pudo ser analizada porque no se obtuvo suficiente ARN. f) Esquema representativo de cómo se llevó a cabo la pérdida de función de *Ints4* a largo plazo en los fibroblastos W3T3. g) Imágenes de los cultivos de fibroblastos W3T3 sh*Luci* y sh*Ints4* tras 12 días de selección con puromicina. h) Western blot de INTS4 en los fibroblastos W3T3 sh*Luci* y sh*Ints4* tras 12 días de selección con puromicina. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. (n=3). La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. **P*-valor<0,05, ***P*-valor<0,01, *** *P*-valor<0,001.

Con objeto de comprobar si el requerimiento de la función de *Ints4* es específico de células pluripotentes, llevamos a cabo su silenciamiento mediante shARNs en fibroblastos de la línea W3T3 (**Figura R18f**). A largo plazo (12 días de selección, 13 días de pérdida de función

de *Ints4*), en presencia de selección con puromicina, los cultivos de fibroblastos sh*Luci* y sh*Ints4* se mostraron confluentes y no observamos diferencias morfológicas entre las células con ambos tratamientos (**Figura R18g**). El análisis de la expresión de INTS4 por Western blot reveló que el shARN contra *Ints4* era capaz de producir un silenciamiento del 75% en los fibroblastos incluso a largo plazo (12 días de selección, 13 días de pérdida de función de *Ints4*) (**Figura R18h**). Estos resultados demuestran que la pérdida de función de *Ints4* en células somáticas, como los fibroblastos, no es incompatible con la viabilidad celular, y que el efecto observado en ESCs está provocado por una función de INTS4 específica de células pluripotentes.

Con el objetivo de confirmar que INTS4 es esencial para la viabilidad de las ESCs, llevamos a cabo ensayos de pérdida de función mediante shARNs con la línea de sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 y la línea control portadora del plásmido de sobreexpresión vacío (EV). Empleamos dos shARN diferentes, uno dirigido contra el CDS de *Ints4*, capaz de silenciar tanto el gen endógeno como el sobreexpresado, y un shARN dirigido contra la secuencia 3'UTR de *Ints4* de forma que únicamente se silencia el gen endógeno, manteniéndose la expresión de *Ints4* por parte del plásmido de sobreexpresión. En la línea celular control (EV), con el silenciamiento de *Ints4* con ambos shARNs, a día 5 de selección observamos una reducción del número de células en cultivo (**Figura R19a**), y a día 6 tras la tinción con fosfatasa alcalina no detectamos colonias positivas (**Figura R19b, R19c**), en línea con lo observado anteriormente (**Figura R18c**). Sin embargo, en la línea celular con sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4, con el shARN dirigido al 3'UTR observamos un mayor número de colonias que con el shARN dirigido al CDS de *Ints4* (**Figura R19a, R19b, R19c**). Además, el número de colonias obtenidas con el shARN dirigido contra la secuencia 3'UTR es significativamente mayor en la línea celular de sobreexpresión ^{3xFL}INTS4 que en el control EV (**Figura R19a, R19b, R19c**), demostrando que los efectos observados en el mantenimiento de las ESCs son debidos específicos y debidos a la ausencia de INTS4.

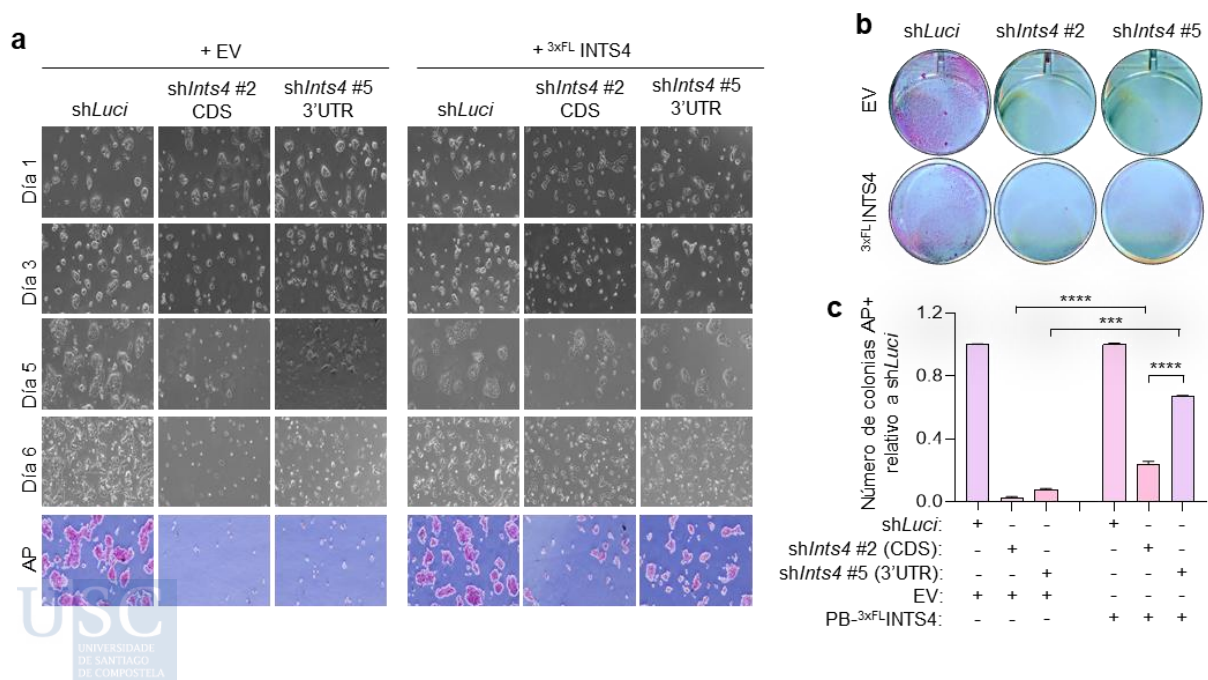


Figura R19. La pérdida de función de *Ints4* en células troncales embrionarias de ratón con sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 es compatible con la viabilidad celular. a) Imágenes representativas de los cultivos de ESCs ^{3xFL}INTS4 o control (EV) tratadas con sh*Luci* o sh*Ints4* en los días indicados de selección con antibiótico. La tinción de las colonias con fosfatasa alcalina se realizó a término del experimento a día 6. b) Imágenes de los pocillos de los cultivos de ESCs con sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 o control (EV) y sh*Luci* o sh*Ints4* a día 6 tras la tinción con fosfatasa alcalina. c) Gráfico de barras del número de colonias AP⁺ relativo a sh*Luci* en las líneas de ESCs ^{3xFL}INTS4 o control (EV). Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. (n=3). La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. ***P-valor<0,001, ****P-valor<0,0001.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en los que observamos una disminución en las colonias de ESCs con silenciamiento de *Ints4*, evaluamos si la pérdida de células ESCs *Ints4* KD es debida a defectos en el ciclo celular y/o a defectos en la capacidad proliferativa de las células sh*Ints4*. Para ello, llevamos a cabo un análisis del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio en las células control (ESCs + sh*Luci*) o con niveles reducidos de *Ints4* (ESCs + sh*Ints4*) a día 2 de selección con antibiótico. Comparando el porcentaje de células que se encuentra en cada fase del ciclo celular (G1, S, G2/M), no detectamos diferencias pronunciadas causadas por el silenciamiento de *Ints4* (**Figura R20a**). Únicamente se apreció un ligero incremento significativo en el número de células sh*Ints4* en G1, pero sin diferencias significativas en las fases S y G2/M (**Figura R20b**). Estos resultados muestran que el silenciamiento de *Ints4* no produce un defecto pronunciado sobre el ciclo celular de las ESCs.

Por otro lado, analizamos la capacidad proliferativa de las células mediante un ensayo de proliferación por conteo (**Figura R20c**). Mientras el número de células sh*Luci* se incrementaba exponencialmente a lo largo del tiempo, el número de células sh*Ints4* fue significativamente menor en todos los días analizados (**Figura R20d**), demostrando que la depleción de *Ints4* provocaba un defecto significativo en la proliferación de las células ESCs.

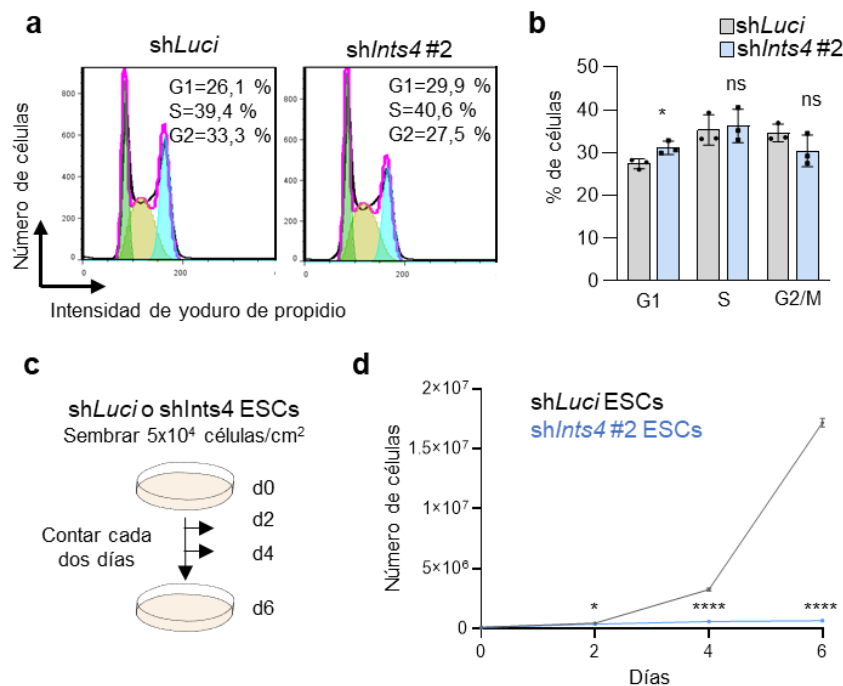


Figura R20. La pérdida de función de *Ints4* en células madre embrionarias de ratón afecta a la capacidad proliferativa de las células. a) Experimento representativo del análisis del ciclo celular en las ESCs transfectadas con sh*Luci* o sh*Ints4* mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. Se muestran los porcentajes

de células en cada una de las fases del ciclo (G1, S y G2/M). b) Gráfico de barras con los porcentajes de cada una de las fases en las células *shLuci* o *shInts4* #2 (n=3). c) Esquema representativo del ensayo de proliferación celular mediante conteo. d) Gráfico del número de células *shLuci* o *shInts4* #2 a lo largo del ensayo de proliferación celular. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. (n=3). La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. **P*-valor<0,05, *****P*-valor<0,0001, ns: estadísticamente no significativo.

Para validar los defectos en la proliferación celular detectados tras el silenciamiento de *Ints4*, llevamos a cabo un ensayo de competición en cultivo. Para ello, sembramos las ESCs + *shLuci* o + *shInts4* en co-cultivo con células ESCs marcadas con el reportero fluorescente TdTomato en proporción 70%:30%. Tras 1, 3 y 4 días en cultivo, se analizó el número de células TdTomato positivas en cada cultivo mediante citometría de flujo, para evaluar el porcentaje de células TdTomato⁺ en la población, de forma que si las células en co-cultivo muestran defectos en la proliferación o viabilidad celular, el porcentaje de células TdTomato positivas se incrementará con respecto al día 0 (**Figura R21a**). Mediante microscopía de fluorescencia, pudimos ver un incremento en la proporción de células con señal TdTomato⁺ en los cultivos *shInts4* con respecto a los *shLuci* (**Figura R21b**). Esta observación fue corroborada mediante análisis por citometría de flujo, que reveló un incremento en el porcentaje de la población TdTomato⁺ en co-cultivo con células ESCs *shInts4*, mientras que con *shLuci* incluso disminuyó ligeramente la población con fluorescencia roja (**Figura R21c, R21d**). En conjunto, estos resultados demuestran que el silenciamiento de *Ints4* en ESCs causa defectos en la proliferación y/o la aptitud de crecimiento de las células pluripotentes.

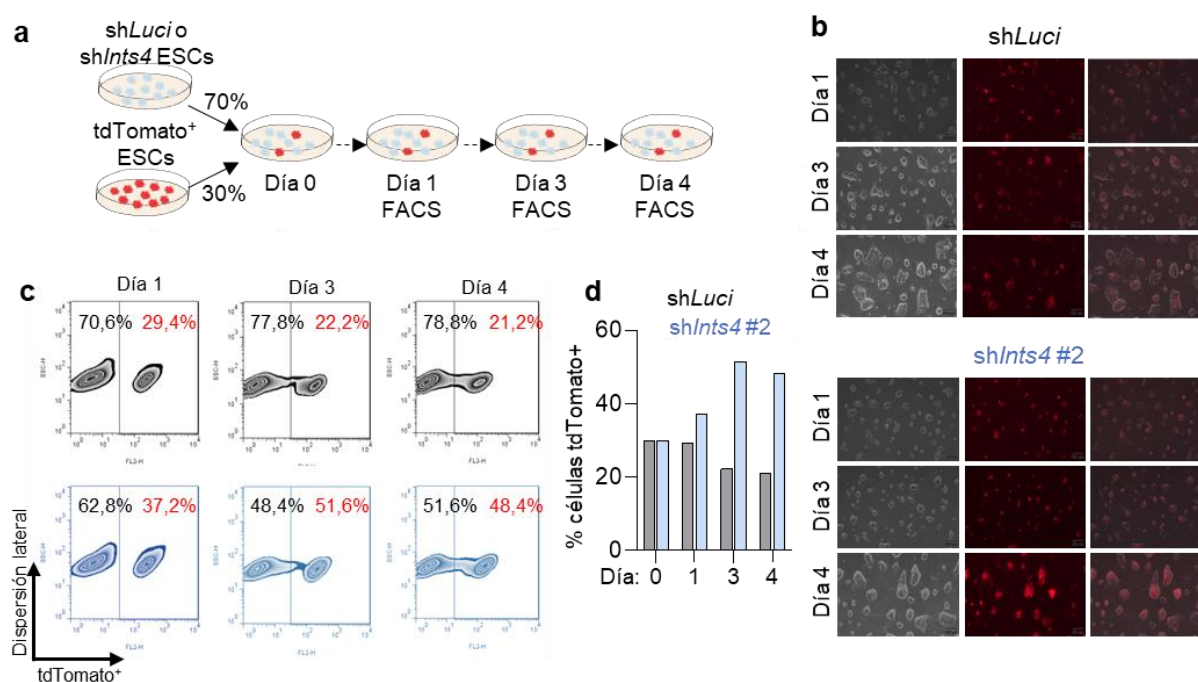


Figura R21. La pérdida de función de *Ints4* en células madre embrionarias de ratón reduce la competencia celular. a) Esquema del ensayo de competición celular mediante co-cultivo con ESCs tdTomato⁺. b) Imágenes representativas en campo claro y fluorescencia roja de los co-cultivos de células tdTomato⁺ y ESCs *shLuci* o *shInts4* a los días 1, 3 y 4. Escala: 100 μ M. c) Gráfico de zebra de las poblaciones tdTomato⁺ o tdTomato⁻ (ESCs + *shLuci*/*shInts4*) obtenidas mediante citometría de flujo (FACS) de los co-cultivos a los días 1, 3 y 4. d) Gráfico de barras representando el porcentaje de células tdTomato⁺ en el ensayo de competición a los días indicados.

Puesto que la pérdida de función de *Ints4* es solo posible a corto plazo, decidimos centrar nuestros experimentos de caracterización molecular tras 72h de silenciamiento, de aquí en adelante. Para ello, primero llevamos a cabo un ensayo de formación de colonias y tinción con fosfatasa alcalina (AP). No observamos diferencias entre las colonias formadas por las células *shLuci* o *shInts4*, ni en la tinción con AP (**Figura R22a**). Por otro lado, analizamos la expresión de marcadores de pluripotencia por inmunocitoquímica y por Western blot. En la tinción por inmunocitoquímica no observamos diferencias marcadas en los niveles de SSEA-1 y OCT4 entre las células *shLuci* y las células *shInts4*, indicando que a corto plazo, las células con pérdida de función de INTS4 no ven afectada su pluripotencia (**Figura R22b, R22c**). El análisis por Western blot de los marcadores de pluripotencia OCT4 y NANOG tampoco reveló cambios en su abundancia entre las células *Ints4* KD y las células control, independientemente del shARN testado (**Figura R22d**). Estos resultados muestran que la ausencia de INTS4 a corto plazo no afecta a marcadores de pluripotencia.

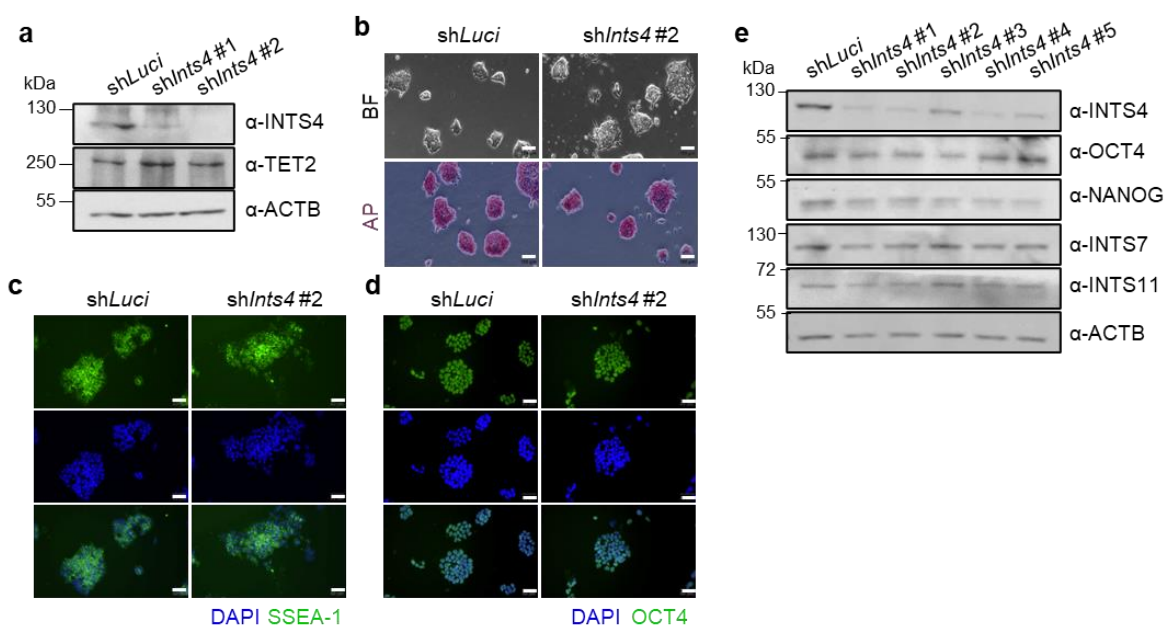


Figura R22. La pérdida de función de *Ints4* en ESCs no afecta a la expresión de marcadores de pluripotencia. a) Imágenes de las colonias formadas por las ESCs con los tratamientos indicados en campo claro y tras la tinción con fosfatasa alcalina. Escala: 100 μ M. b) Inmunocitoquímica del marcador de pluripotencia SSEA-1 en las células ESCs *shLuci* o *shInts4*. Escala: 50 μ M. c) Inmunocitoquímica del marcador de pluripotencia OCT4 en las células ESCs *shLuci* o *shInts4*. Escala: 50 μ M. d) Western blot de los marcadores de pluripotencia OCT4 y NANOG, y de las subunidades del complejo Integrator INTS7 e INTS11, en las células *shLuci* y *shInts4*. del anticuerpo contra la ACTINA (ACTB) se utilizó como control de carga. e) Western Blot de TET2 en las células *shLuci* y *shInts4*.

INTS4 es un miembro de las quince subunidades que conforman el complejo Integrator. Al igual que ocurre en otros macro complejos proteicos, se ha demostrado que la pérdida de función de alguna de las quince subunidades afecta a la estabilidad de otros miembros del complejo²⁸⁵. Por ello, decidimos comprobar si la pérdida de función de *Ints4* también afectaba a la abundancia o estabilidad de otras subunidades del complejo Integrator en células pluripotentes. Con este fin, analizamos por Western blot la abundancia de INTS11, interactador directo de INTS4 en el módulo de corte de Integrator, e INTS7, del módulo *backbone*, en

presencia de niveles reducidos de INTS4 (*shInts4*). No observamos diferencias notables en los niveles de dichas proteínas en las células *Ints4* KD (**Figura R22d**), indicando que la pérdida de función de *Ints4* a corto plazo no afecta a la abundancia de otras subunidades del complejo Integrator. Por otro lado, dado que nuestro objetivo es diseccionar la contribución de INTS4 a las funciones de TET2 en células jóvenes, también comprobamos si el silenciamiento de *Ints4* afectaba a los niveles de TET2 en ESCs. Mediante Western blot, analizamos la expresión de INTS4 y TET2 tras el tratamiento con *shInts4* o *shLuci* control, y observamos que, a pesar de observar una reducción en los niveles de INTS4, la abundancia de TET2 en las células *Ints4* KD no se vio afectada con respecto a las células *shLuci* control (**Figura R22e**).

7.4.6 La pérdida de función de *Ints4* provoca una desregulación de genes relacionados con daño en el ADN

Con el objetivo de estudiar qué ocurre en las ESCs tras la pérdida de *Ints4* que pueda causar los defectos observados en el mantenimiento celular, llevamos a cabo un análisis del paisaje transcripcional de las células *Ints4* KD mediante secuenciación masiva de ARN total ribodeplecionado (**Figura R23a**). Para asegurar que los cambios transcripcionales se debían a la reducción de los niveles de *Ints4* y no a efectos inespecíficos de los shARNs (*off target*), decidimos utilizar dos shARNs diferentes de los que previamente habíamos validado (**Figura R18d**). Comprobamos el silenciamiento de *Ints4* en las muestras analizadas tanto mediante la visualización de las lecturas alineadas en el locus del gen *Ints4* (**Figura R23b**), como en el número de lecturas normalizadas (**Figura R23c**). Finalmente validamos la pérdida de función de *Ints4* mediante RT-qPCR, observando un 80% de silenciamiento con los dos *shInts4* empleados (**Figura R23d**).

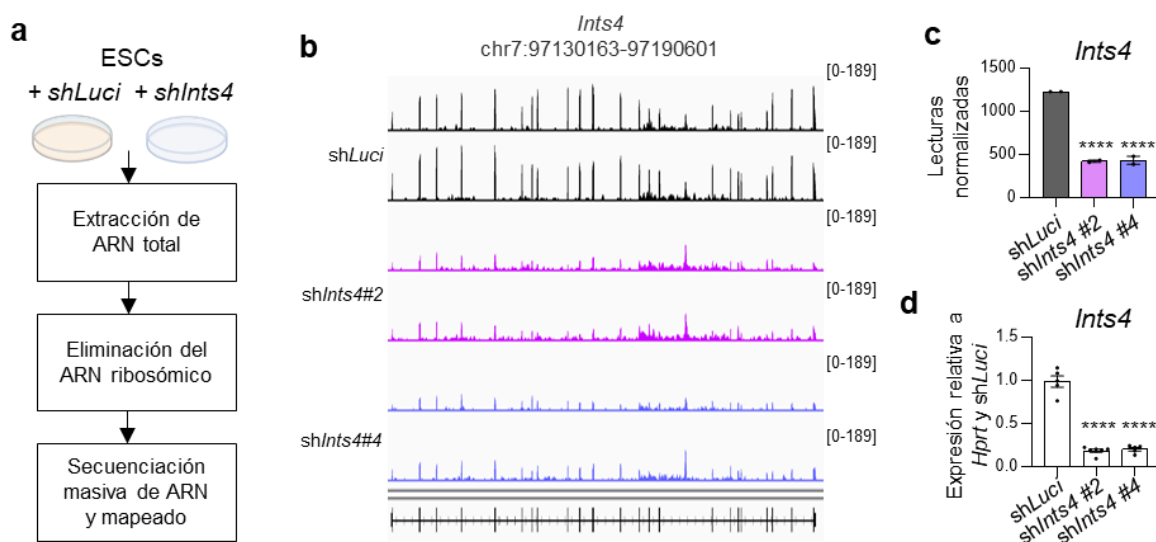


Figura R23. Análisis del perfil transcripcional de las ESCs con pérdida de función de *Ints4* mediante secuenciación masiva de ARN (ARN-seq). a) Esquema del procesamiento de las muestras de ARN total obtenido de ESCs tratadas con *shLuci* o *shInts4* para el análisis del transcriptoma mediante ARN-seq. b) Imagen representativa de IGV (Integrative Genomics Viewer) de las lecturas en el ARN-seq en cada una de las muestras analizadas alineadas con el locus del gen *Ints4*. c) Gráfico de barras representando las lecturas normalizadas relativas a la media de *shLuci*, en las muestras analizadas por ARN-seq. d) Expresión relativa a *Hprt* y *shLuci* de

la expresión de *Ints4* en las células ESCs en las muestras indicadas a Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. (n=2 ARN-seq, n=3 qPCR). La estadística fue calculada empleando la prueba de Wald (c) y la prueba t de Student (d). **** FDR<0,0001 (c) ****P-valor<0,0001 (d)

El análisis de expresión diferencial de las células ESC + sh*Ints4* #2 con respecto a las células control sh*Luci*, reveló 284 genes regulados al alza y 499 genes regulados a la baja empleando el criterio FDR<0,05 (**Figura R24a**). En las células ESCs + sh*Ints4* #4 obtuvimos 509 genes regulados al alza y 665 genes regulados a la baja empleando el mismo criterio de significación estadística (**Figura R24b**). Seguidamente, analizamos mediante diagrama de Venn el solapamiento entre los 783 genes diferencialmente expresados con el sh*Ints4* #2 y los 1.174 genes con el sh*Ints4* #4, observando 276 genes con expresión alterada en ambas condiciones (**Figura R24c**). El número de genes diferencialmente expresado tras la pérdida de función de *Ints4* es moderado, lo cual indica que la pérdida de función de *Ints4* tiene impacto moderado sobre el transcriptoma codificante de las ESCs, al contrario que lo observado tras la pérdida de función de otro miembro del módulo endonucleasa, *Ints11*²⁸⁵. Para estudiar cómo agrupan nuestras muestras de acuerdo con su perfil transcripcional, realizamos un análisis de componentes principales (PCA). En línea con el número reducido de solapamiento entre los genes alterados tras el tratamiento con ambos shARNs, observamos que las células sh*Ints4* #2 y sh*Ints4* #4 no aparecen próximas entre sí (**Figura R24d**).

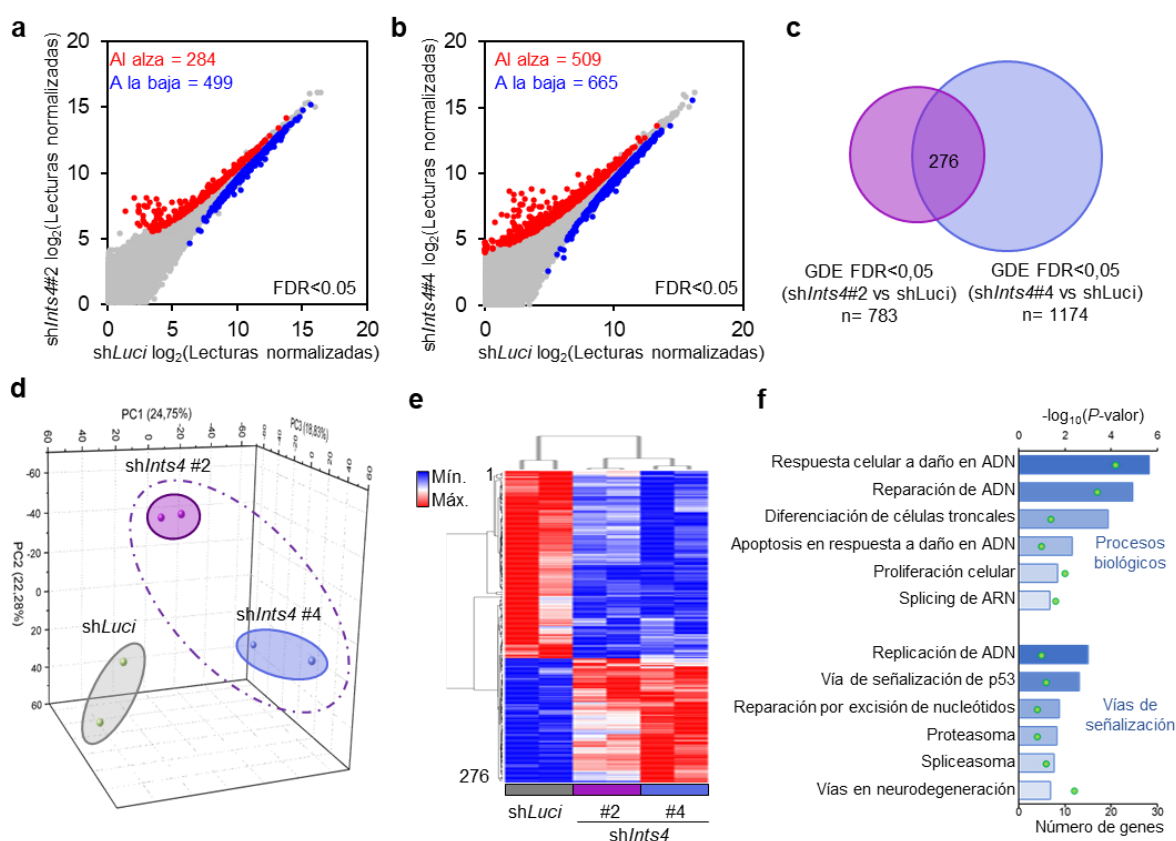


Figura R24. La pérdida de función de *Ints4* en ESCs altera la expresión de genes relacionados con daño en el ADN. a) y b) Diagrama de puntos de la expresión génica (en $\log_2$ lecturas normalizadas) en las ESCs tratadas con sh*Luci* y sh*Ints4* #2 y sh*Ints4* #4 determinadas por secuenciación masiva de ARNc) Diagrama de Venn representando el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados (GDE) en las células sh*Ints4* #2 y

shInts4 #4 con respecto a las células control shLuci. d) Análisis de componentes principales de las células con los shARNs indicados. e) Mapa de calor representando la expresión de los 276 genes diferencialmente expresados comunes a las células tratadas con ambos shARNs para *Ints4*. f) Análisis de ontología génica de los 276 genes diferencialmente expresados comunes. Las barras indican la significancia estadística ($-\log_{10}(P\text{-valor})$) y los puntos verdes el número de genes de cada categoría.

El reducido solapamiento entre shInts4 #2 y shInts4 #4 puede deberse a efectos indirectos o inespecíficos de los shARNs, por lo que decidimos emplear para nuestros análisis únicamente los 276 genes comunes alterados en ambos shARNs. Para determinar si los 276 genes diferencialmente expresados comunes muestran la misma regulación en shInts4 #2 y shInts4 #4, analizamos mediante un mapa de calor la expresión de dichos genes en los tres tratamientos. Observamos cambios de expresión congruentes entre los dos shARNs, sugiriendo que los 276 genes diferencialmente expresados son consecuencia directa de la pérdida de función de *Ints4* en células pluripotentes (**Figura R24e**). Para determinar en qué procesos biológicos están involucrados los genes diferencialmente expresados tras la pérdida de *Ints4*, realizamos un análisis de ontología génica de los 276 genes comunes, y observamos que los procesos biológicos y vías de señalización más representados entre estas dianas de *Ints4* fueron aquellos relacionados con el daño en ADN y la respuesta celular a dicho daño (**Figura R24f**). Además, observamos también vías de señalización del proteasoma y “spliceasoma” y vías en neurodegeneración (**Figura R24f**). Una deficiencia en los mecanismos de reparación del ADN asociada a la pérdida de función de *Ints4*, podría explicar los defectos en el mantenimiento de las ESCs + shInts4 observados anteriormente (**Figura R18c, R19**).

7.4.7 INTS4 contribuye a la función de TET2 de represión de genes 2C en ESCs

Se ha demostrado que en células pluripotentes, TET2 reprime genes del estadio de embrión de 2 células (2C) incluyendo retrovirus endógenos MERVL característicos de esta etapa embrionaria¹⁴⁸. Para ello, tomamos ventaja de datos previamente publicados por Cao y colaboradores²⁸⁶ con una lista de genes específicos de los distintos estadios del desarrollo preimplantacional en ratón (oocito, embrión de 2, 4, y 8 células, mórula, blastocisto y trofoectodermo). Empleando dichos datos, analizamos la expresión de los genes diferencialmente expresados tras la pérdida de función de *Tet2* o de *Ints4* en las diferentes fases del desarrollo embrionario temprano. Comprobamos que los genes diferencialmente expresados en células *Tet2* KO están más expresados en el estadio de 2 células (2C) que en otras fases del desarrollo embrionario temprano (**Figura R25a**). Al analizar los 276 genes diferencialmente expresados en las células *Ints4* KD en las fases del desarrollo embrionario temprano, observamos que dichos genes se encuentran más expresados en los embriones de 2, 4 y 8 células (**Figura R25b**). Dado que TET2 participa en el silenciamiento de genes 2C en ESCs¹⁴⁸, decidimos ahondar en posibles funciones conjuntas de TET2 e INTS4 en la regulación de estos genes. Tomamos ventaja de la lista de genes característicos del estadio de 2 células (genes 2C) definidos por Macfarlan y colaboradores⁵⁰, y observamos que los genes 2C se encontraban significativamente regulados al alza en las células con pérdida de función de *Ints4* comparado con el control (**Figura R25c**), de forma similar a lo que ocurre en células sin *Tet2* (*Tet2* KO)²⁸⁷ (**Figura R25c**). A continuación, analizamos la expresión de marcadores característicos del estadio 2C, como son los genes *Zfp352*, *Sp110*, *Ubtfl1*, *Gm4791*, *Tdpoz4*, *Tmem92*, *Tdpoz2* y *Zscan4c*. Observamos que todos ellos se encuentran más expresados en las células shInts4 que

en las células *shLuci* (**Figura R25d**). A continuación, analizamos si la depleción de *Ints4* afectaba también a la expresión de los retrotransposones de la familia ERVL, que son retrotransposones LTR de la clase III (**Figura R25e**), reprimidos junto a los genes 2C por TET2 en células pluripotentes¹⁴⁸. Sin embargo, al contrario que con los otros marcadores del estado 2C, no detectamos cambios significativos en la expresión de elementos MERVL o MT2 en las células con pérdida de función de *Ints4* con respecto a las células control *shLuci*, salvo para los elementos MERVL_int en el *shInts4* #2 (**Figura R25f**). En base a estos datos concluimos que INTS4, igual que TET2, contribuye a la represión de los genes 2C en ESCs, provocando la pérdida de función de *Ints4* una regulación al alza de estos genes, aunque no la de la mayoría de retrotransposones ERVL relacionados con este estadio.

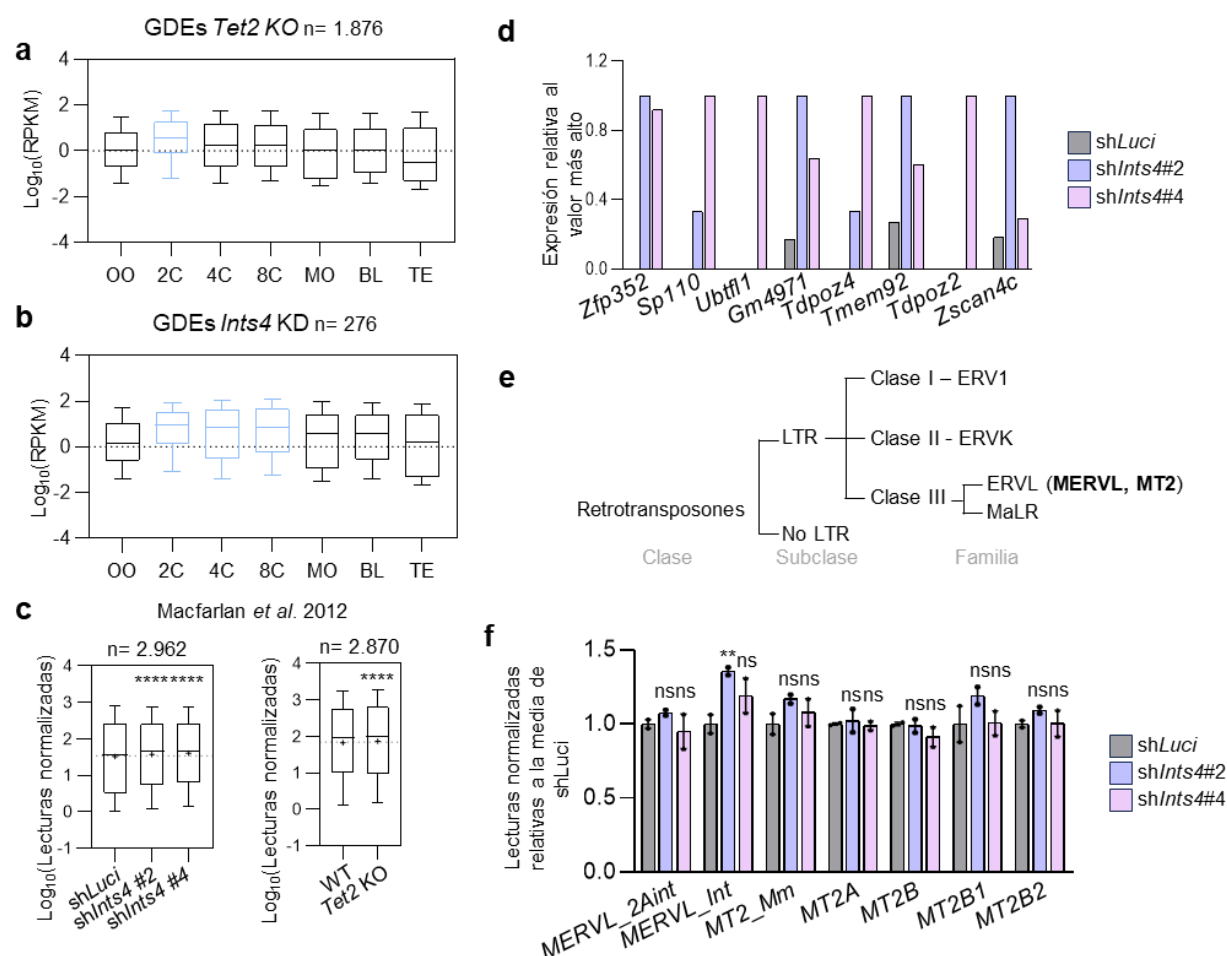


Figura R25. La pérdida de función de *Ints4* afecta a genes característicos del estadio embrionario de 2-células (2C), también regulados por TET2. a) Gráfico de cajas de la expresión de los genes diferencialmente expresados en células *Tet2* KO durante las fases de desarrollo embrionario indicadas. Los datos fueron obtenidos de Cao y colaboradores²⁸⁶. b) Gráfico de cajas de la expresión de los 276 genes diferencialmente expresados en células *Ints4* KD durante las fases de desarrollo embrionario. c) Expresión de los genes del estadio 2C definidos por Macfarlan y colaboradores⁵⁰ en las células con pérdida de función de *Ints4*, o *Tet2*. Los datos fueron obtenidos de Reimer y colaboradores²⁸⁷. d) Expresión de genes 2C en las células con los tratamientos indicados. e) Esquema de las clases de retrotransposones LTR. f) Expresión de los elementos MERVL característicos del estadio de 2C, regulados por TET2 en las células con los tratamientos indicados. Los datos se representan como el rango entre los percentiles 10-90, o como la media $\pm$ s.e.m. (n= 2). La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. ****P-valor < 0,0001, **P-valor < 0,01, ns: estadísticamente no significativo. OO = oocito, 2C = 2 células, 4C = 4 células, 8C = 8 células, MO = morula, BL = blastocisto, TE = trofoectodermo.

7.4.8 INTS4 no contribuye a la función de TET2 en la regulación del estado pluripotente *naïve*

Las células ESCs de ratón en cultivo pueden presentar diferentes estados pluripotentes, incluyendo pluripotencia *naïve*, roseta, formativa y primed, que se diferencian en la morfología de las colonias celulares, su metabolismo, el estado de inactivación del cromosoma X en las células femeninas, la metilación del ADN y la capacidad de diferenciación a trofoectodermo⁴⁷⁻⁴⁹ (**Figura R26a**). Además, cada estado pluripotente presenta una firma transcripcional característica¹⁶². Se sabe que TET2 es un factor determinante del estado *naïve*, y su sobreexpresión es suficiente para promover este estado incluso en las ESCs murinas cultivadas en medio de suero con factor inhibidor de la leucemia (LIF), que promueve una población metaestable^{162,288}. Con el objetivo de estudiar si INTS4 contribuye a la función de TET2 en la regulación del estado pluripotente *naïve*, analizamos la expresión de *Tet2* e *Ints4* utilizando datos previamente publicados de cada uno de los estados pluripotentes. En línea con lo publicado anteriormente¹⁶², observamos que *Tet2* está más expresado en células con pluripotencia *naïve* y sus niveles descienden en los estados de pluripotencia roseta y formativo, alcanzando su mínimo de expresión en células con pluripotencia primed (**Figura R26b**). En comparación, observamos que *Ints4* se expresa igual en todos los estados de pluripotencia analizados, con una ligera menor expresión en condiciones de cultivo primed (**Figura R26b**).

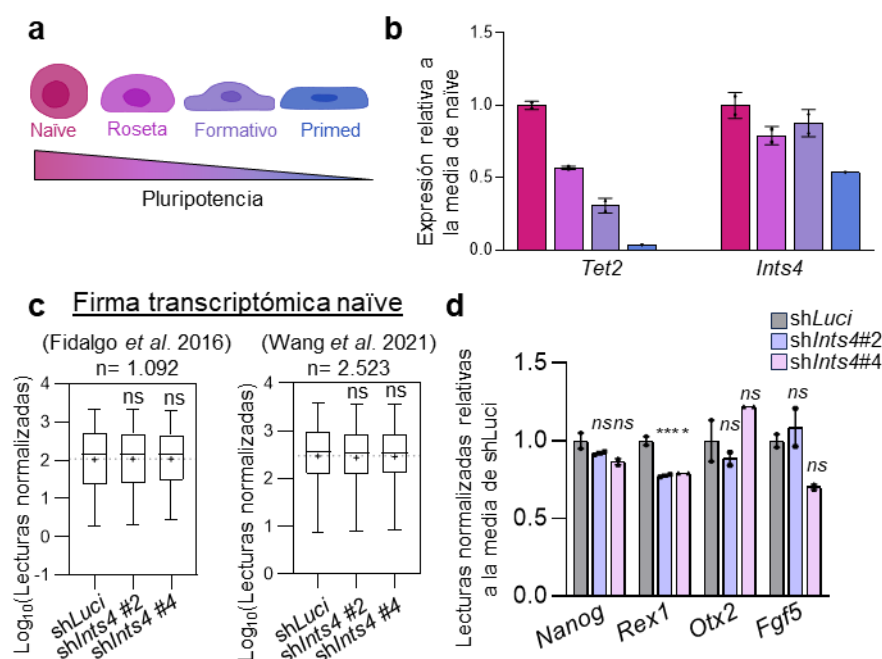


Figura R26. INTS4 no contribuye a la función de TET2 en la regulación del estado pluripotente *naïve*. a) Esquema de los estados pluripotentes de ESCs *in vitro*. b) Gráfico de barras de la expresión de *Tet2* e *Ints4* en los diferentes estados pluripotentes indicados en (a). c) Diagrama de cajas con la expresión de firmas transcripcionales del estado pluripotente *naïve* descritas por Fidalgo y colaboradores¹⁶² o Wang y colaboradores²⁸⁹, en las células shLuci o shInts4. d) Gráfico de barras de la expresión de *Nanog*, *Rex1*, *Otx2* y *Fgf5* en las células shLuci o shInts4. Los datos se representan como el rango entre los percentiles 10-90, o como la media $\pm$ s.e.m. (n=2). La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student., *P-valor<0,05, ***P-valor< 0,001, ns: estadísticamente no significativo.

Para determinar si INTS4 contribuye a la regulación de genes característicos del estado pluripotente *naïve* como TET2, evaluamos en las células con pérdida de función de *Ints4* la expresión de dos firmas transcriptómica de este estado pluripotente definidas por Fidalgo y colaboradores¹⁶² y Wang y colaboradores²⁸⁹, respectivamente. No observamos cambios significativos tras el silenciamiento de *Ints4* con respecto a las células *shLuci* utilizando ninguna de las dos firmas transcriptómicas analizadas (**Figura R26c**), indicando que INTS4 no está implicado en la regulación de dichos estados pluripotentes, al contrario que TET2. Finalmente decidimos comprobar si la depleción de *Ints4* provocaba cambios en la expresión de marcadores del estado *naïve* (ej. *Rex1/Zfp42* y *Nanog*)²⁹⁰, o del estado primed (ej. *Otx2* y *Fgf5*)^{291,292}. Para ello, analizamos la expresión de estos marcadores en nuestros datos de ARN-seq de ESCs con niveles reducidos de *Ints4*. En línea con lo anteriormente observado, comprobamos que, a excepción del marcador *Rex1*, la expresión de estos marcadores no presentaba cambios significativos en las células con silenciamiento de *Ints4*, (**Figura R26d**). En conclusión, INTS4 no contribuye a la función de TET2 en la regulación del estado pluripotente *naïve* dado que, en contraste con lo que se ha descrito para células ESC con pérdida de función de TET2, la depleción de INTS4 no promueve la alteración del transcriptoma típico de pluripotencia *naïve* en condiciones de cultivo metaestable (en presencia de suero y LIF).

7.4.9 El complejo TET2-INTS4 podría tener un papel en la regulación de genes de reparación del ADN

Con el objetivo de diseccionar el papel que desempeña INTS4 junto con TET2, nos propusimos explorar posibles funciones de TET2 desconocidas en las que pueda estar implicado el complejo INTS4-TET2 en células jóvenes. Dado que el interactor de TET2, PSPC1, recluta a esta oxidasa a la cromatina¹⁴⁸, decidimos determinar si INTS4 también actúa como reclutador de TET2 al ADN. Para ello, realizamos fraccionamiento subcelular de células ESCs + *shLuci* o *shInts4*, y analizamos la presencia de la proteína TET2 las fracciones nuclear soluble y unida a cromatina mediante Western blot (**Figura R27a**). Mientras en la fracción nuclear soluble no se aprecian diferencias en los niveles de TET2 entre las células *shLuci* y *shInts4* (**Figura R27a, izquierda**), en la fracción unida a cromatina detectamos una ligera reducción de TET2 en las células con silenciamiento de *Ints4* (**Figura R27a, derecha**), sugiriendo que INTS4 al menos parcialmente contribuiría al reclutamiento de TET2 al ADN. Teniendo en cuenta este resultado, nos propusimos comprobar el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados tras el silenciamiento de *Ints4* y los genes que son dianas de TET2 en cromatina identificados por inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación (ChIP-seq)²⁹³. Observamos que el 55% de los genes diferencialmente expresados en células *Ints4* KD (153/276 genes) son dianas de TET2 en la cromatina (**Figura R27b**). El análisis de ontología génica de los 153 genes reveló su implicación en procesos biológicos relacionados con el daño en ADN (respuesta a daño en ADN, reparación del ADN, reparación de roturas de ADN de doble cadena, regulación de apoptosis inducida por daño en ADN), biología del ADN (regulación de la replicación y de la transcripción) y procesos celulares relevantes para las ESCs (regulación del ciclo celular y diferenciación celular) (**Figura R27c**). Estas categorías resultan llamativas porque el papel de TET2 en reparación del ADN permanece ampliamente inexplorado, aunque dos estudios

sugieren una función de TET2 en la reparación del ADN en contexto de cáncer (células HeLa y U2OS)^{294,295}.

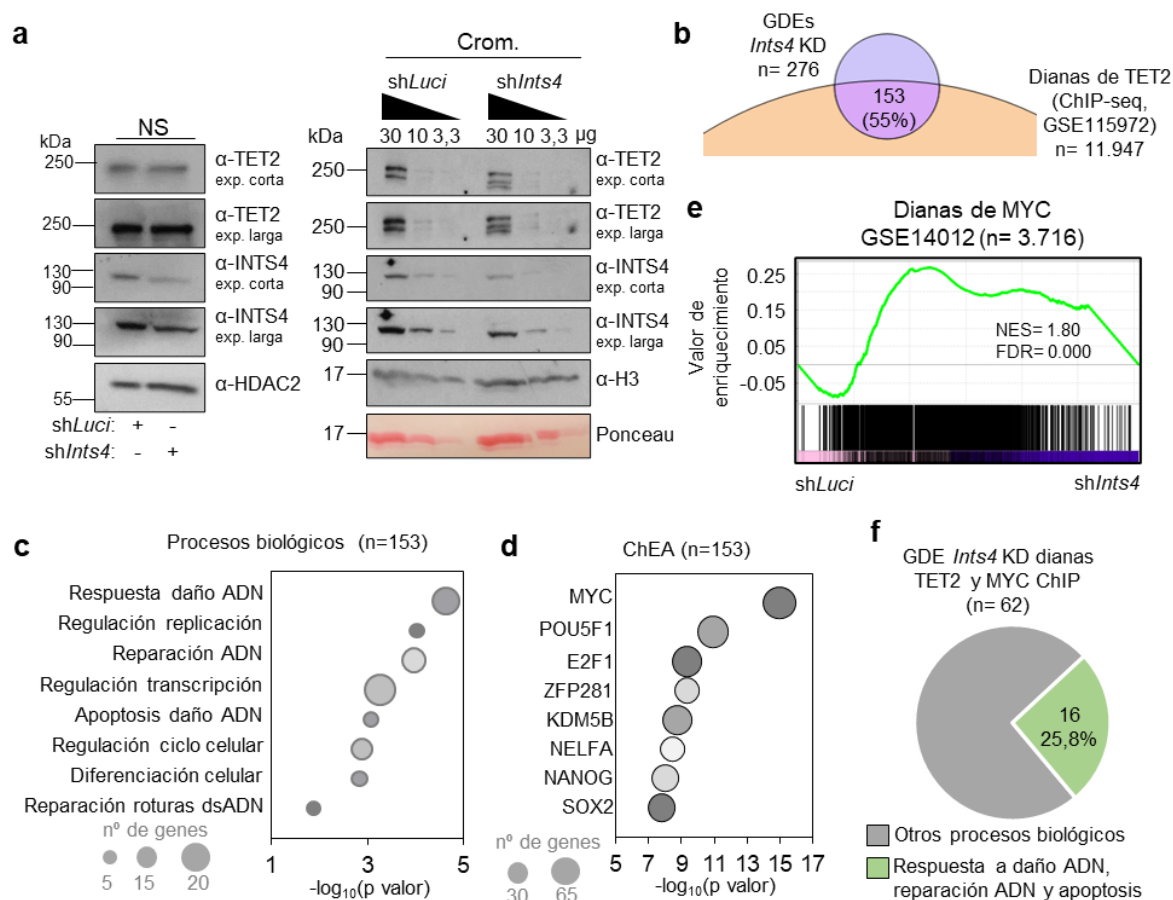


Figura R27. La pérdida de función de *Ints4* altera la expresión de genes diana de TET2 y MYC relacionados con respuesta a daño en ADN. a) Izquierda: Western blot de TET2, INTS4, HDAC2 y H3 total en la fracción soluble nuclear (NS) de células de células ESCs + *shInts4* o *shLuci*. Se muestran HDAC2 y H3 como controles del fraccionamiento subcelular. Derecha: Western blot de TET2, INTS4, HDAC2 y H3 total en la fracción nuclear unida a cromatina (Crom.) de células ESCs + *shInts4* o *shLuci*. Se muestra H3 y la tinción con colorante Ponceau como controles del fraccionamiento subcelular. b) Diagrama de Venn mostrando el solapamiento entre los genes dianas de TET2 en cromatina identificados por ChIP-seq²⁹³ y los genes diferencialmente expresados (GDEs) con la pérdida de función de *Ints4*. c) Análisis de ontología génica de los procesos biológicos en los que están implicados los 153 genes diana de TET2 en cromatina y diferencialmente expresados tras el silenciamiento de *Ints4*. d) Análisis de enriquecimiento en ChIP para identificar factores entre cuyas dianas están los 153 genes de interés. e) Análisis de enriquecimiento de genes (GSEA) de la expresión de las dianas de MYC en las células *shLuci* y *shInts4*. f) Diagrama sectorial de los 62 genes diferencialmente expresados con *Ints4* KD que son dianas de TET2 y MYC en cromatina, mostrando el porcentaje que están relacionados con procesos biológicos relacionados con respuesta a daño en ADN, reparación de ADN y apoptosis.

Con el propósito de estudiar qué factores de transcripción contribuyen a la regulación de los 153 genes diferencialmente expresados con *Ints4* KD que son dianas de TET2 en cromatina, realizamos el análisis de enriquecimiento en ChIP (ChEA) de los 153 genes, e interesantemente observamos que son dianas de factores de pluripotencia (MYC, OCT4, NANOG, ZFP281, y SOX2) y del regulador epigenético KDM5B (**Figura R27d**). Dado que, en línea con lo observado por Chen y colaboradores, que reportaron el papel de TET2 en la

activación de la expresión de genes diana de MYC²⁹⁴, nosotros también encontramos este factor de transcripción enriquecido en el análisis de ChEA, decidimos estudiar el enriquecimiento de las dianas de MYC mediante un análisis GSEA en los datos de ARN-seq de células *shLuci* y *shInts4*. Detectamos una mayor expresión de los genes diana de MYC en las células *shLuci* que en las células *shInts4*, sugiriendo que INTS4 podría colaborar con MYC para activar dichos genes (**Figura R27e**). Además, identificamos 62 genes que son dianas tanto de MYC como de TET2 y que están diferencialmente expresados en las células *Ints4* KD (**Figura R27f**), con casi un tercio (26%) de dichos genes involucrado en procesos biológicos de daño y reparación del ADN y apoptosis (**Figura R27f**).

Estos resultados parecen indicar una relación del complejo formado por INTS4-TET2 con los mecanismos de reparación de daño en el ADN. Para verificar nuestra hipótesis, comprobamos mediante RT-qPCR la expresión de cuatro de estos genes (*Brca1*, *Atrx*, *Xrcc5* y *Atm*) en las células ESCs + *shLuci* o *shInts4*, así como en células ESCs WT y *Tet2* KO. Observamos que *Brca1* se encuentra significativamente regulado a la baja en las células *shInts4* y en las células *Tet2* KO (**Figura R28a**). Por otro lado, *Atrx*, *Xrcc5* y *Atm* están significativamente menos expresados en las células *shInts4*, y en las células *Tet2* KO muestran una tendencia a la baja, a pesar de que el cambio no sea estadísticamente significativo (**Figura R28b-d**).

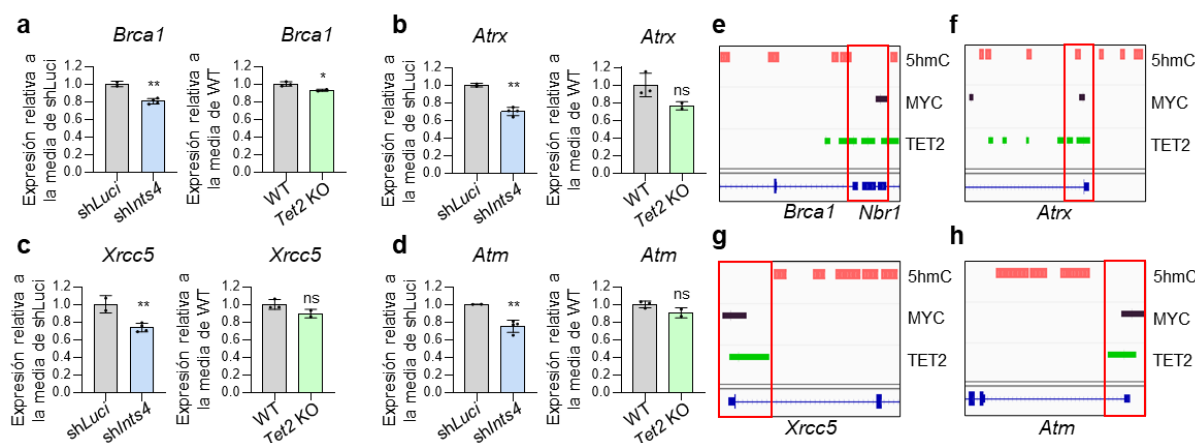


Figura R28. Los genes de respuesta a daño en ADN regulados a la baja con la pérdida de función de *Ints4* o *Tet2* están unidos por TET2 y MYC. a-d) Expresión de *Brca1* (a), *Atrx* (b), *Xrcc5* (c) y *Atm* (d) en las células ESCs + *shLuci* o *shInts4* y en las células WT o *Tet2* KO. e-h) Imagen de IGV de las posiciones de unión de MYC y TET2 determinadas por ChIP-seq^{293,296} (GSE125435 y GSE115964) y de las posiciones modificadas por 5hmC determinadas por 5hmeDIP-seq²⁹⁷ (GSE28500) en los loci indicados. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. *P-valor < 0,05, **P-valor < 0,01, ns: estadísticamente no significativo.

Finalmente decidimos determinar la co-ocupación de MYC y TET2 en los loci de estos cuatro genes candidatos, utilizando datos de ChIP-seq de MYC reportados por Luo y colaboradores²⁹⁶ (GSE125435) y TET2 de Rasmussen y colaboradores²⁹³ (GSE115964). En este análisis incluimos las posiciones modificadas por 5hmC en ESCs identificadas mediante 5hmeDIP-seq por Xu y colaboradores²⁹⁷ (GSE28500). Por un lado, detectamos la co-ocupación de MYC y TET2 cerca del inicio de la transcripción (TSS) del gen *Nbr1*, que podría coincidir con secuencias promotora de *Brca1* (**Figura R28e**). Comprobamos la expresión de *Nbr1* en

nuestras células *Ints4* KD y no detectamos cambios significativos (datos no mostrados), sugiriendo que la unión de MYC y TET2 en esa región no regula *Nbr1* sino su gen adyacente, *Brca1*. Sin embargo, observamos que no había un enriquecimiento de 5hmC en el lugar de unión de MYC y TET2 (**Figura R28e**). En el locus de *Atrx* encontramos la unión de MYC y TET2 en la misma posición donde se detectó enriquecimiento de 5hmC (**Figura R28f**), lo que sería compatible con una función catalítica de TET2 en la regulación de la expresión de dicho gen. En los loci de *Xrcc5* y *Atm* detectamos también la unión de MYC y TET2 sobre las mismas posiciones, aunque estas no coinciden con posiciones 5hmC (**Figura R28g-h**), lo que podría indicar una regulación por parte de TET2 independiente de su actividad catalítica sobre el ADN. En conjunto, estos datos parecen indicar un papel de INTS4 en la activación de genes de respuesta a daño del ADN como *Brca1*, *Atrx*, *Xrcc5* o *Atm*, junto con TET2 y MYC, mediante su unión a la cromatina. Deficiencias en *Tet2* se han asociado con una regulación a la baja de los genes de reparación del ADN *Brca1* y *Brca2* en células de leucemia²⁹⁸, sin embargo la relación entre *Tet2* y *Atm*, *Xrcc5* o *Atrx* permanece aún inexplorada en ESCs. Además del estudio de Ding y colaboradores, se desconoce la corregulación por parte de TET2 y MYC de la expresión de sus genes diana, y en específico de genes de reparación del ADN.

Con el objetivo de comprobar la posible implicación del complejo INTS4-TET2 en la regulación de la respuesta a daño genómico, decidimos estudiar los niveles de daño en ADN en las células con pérdida de función de *Ints4* (**Figura R29a**) o *Tet2* (**Figura R29c**). Para ello analizamos el marcador de daño γ H2AX y la tinción de ADN con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), como control, mediante inmunocitoquímica de célula única. Cuantificamos la intensidad de fluorescencia de la señal anti- γ H2AX, y la normalizamos con respecto a DAPI para obtener el dato relativo y poder comparar entre condiciones. En las células sh*Ints4* detectamos mayores niveles de fluorescencia de γ H2AX relativa a DAPI que en las células sh*Luci* (**Figura R29b**). En las células *Tet2* KO también detectamos mayor fluorescencia relativa a DAPI que en las células WT (**Figura R29d**). Estos resultados indican una mayor acumulación de daño en ADN con la pérdida de función de *Ints4* o de *Tet2*, lo que apoya la idea de que el complejo INTS4-TET2 podría estar implicado en la regulación de respuesta a daño en ADN, posiblemente a través de la activación de la transcripción de factores implicados en la reparación de daño genómico como BRCA1, probablemente de forma independiente de la actividad catalítica de la metildioxigenasa.

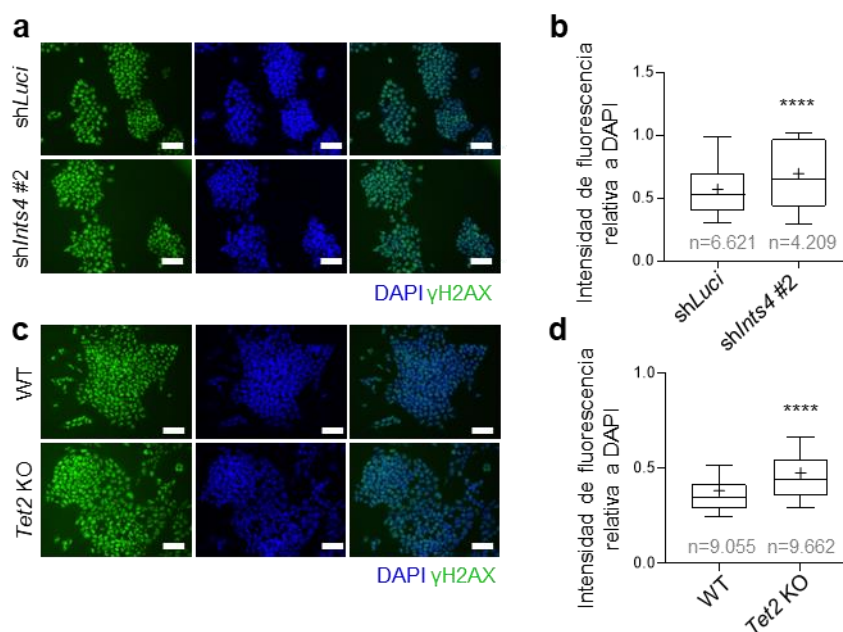


Figura R29. La pérdida de función de *Ints4* o de *Tet2* incrementa el daño en ADN en ESCs. a) Inmunocitoquímica del marcador de daño en ADN γ H2AX en células ESCs + shLuci o +shInts4. Escala: 100 μ m. b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de γ H2AX relativa a DAPI en las células shLuci o shInts4. c) Inmunocitoquímica del marcador de daño en ADN γ H2AX en células ESCs WT o *Tet2* KO²⁴⁶. Escala: 100 μ m. d) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de γ H2AX relativa a DAPI en las células WT o *Tet2* KO²⁴⁵. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. *****P*-valor < 0,0001.

Dado que el reclutamiento de TET2 a la cromatina es dependiente de ARN¹⁴⁸, decidimos explorar los 153 genes diferencialmente expresados en células *Ints4* KD que son dianas de TET2 en cromatina y observamos que el 58,1% (89/153) también están unidos por TET2 a nivel de ARN¹¹⁰ (**Figura R30a**). Por otro lado, dada la capacidad de TET2 de hidroximetilar ARN, analizamos si esos ARNs contenían la modificación hm⁵C en ESCs¹¹⁰. De esos 89 transcritos, observamos que únicamente 7 (7,9%) se encontraban modificados por hm⁵C (**Figura R30a**). En particular, los transcritos de *Brca1*, *Xrcc5*, *Atrx* y *Atm* estaban unidos por TET2 a nivel de ARN, pero no marcados con hm⁵C (**Figura R30a**). Estos resultados parecen indicar que la función del complejo INTS4-TET2 en la mayoría de ARNs dianas es independiente de la catálisis de hm⁵C en ESCs. Por otro lado, con el objetivo de determinar si PSPC1 forma parte del complejo INTS4-TET2, analizamos el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados en las células *Ints4* KD que son dianas de TET2 a nivel de ARN¹¹⁰ y las dianas de ARN del interacto de TET2, PSPC1, identificadas por Guallar y colaboradores¹⁴⁸. Observamos que el 50,4% (139/276) de los genes diferencialmente expresados con la pérdida de función de *Ints4* son dianas de TET2 en ARN (**Figura R30b**). Sin embargo, de estos 139 transcritos solo el 25,5% son dianas también de PSPC1 (**Figura R30b**). Comprobamos el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados en células *Ints4* KD y células *Pspc1* KD y solo 12 genes (el 4,4% de los genes alterados con la pérdida de función de *Ints4*) son comunes (**Figura R30c**). Estos datos parecen indicar que el complejo INTS4-TET2 es independiente del complejo que TET2 forma con PSPC1.

Con el objeto de validar si los transcritos de *Brca1*, *Xrcc5*, *Atrx* y *Atm* están unidos y regulados por el complejo INTS4-TET2, decidimos llevar a cabo un ensayo de CLIP-qPCR con

nuestras células ^{3xFL}INTS4. Para ello, fijamos las interacciones entre ARN y proteína mediante irradiación con rayos ultravioleta de onda corta (254 nm), que permiten identificar interacciones directas ARN-proteína. Tras ello, preparamos lisados celulares totales para inmunoprecipitar la proteína ^{3xFL}INTS4 y finalmente analizar los ARNs asociados a esta proteína (**Figura R30d**). Tras verificar que la inmunoprecipitación de la proteína ^{3xFL}INTS4 fue exitosa mediante Western blot (**Figura R30e**), analizamos la presencia de nuestros transcritos de interés entre las dianas de INTS4 a nivel de ARN mediante RT-qPCR (**Figura R230f**). Como control, analizamos la presencia de los ARNs pequeños nucleares (snARN) U1 y U2 entre las dianas de INTS4. En línea con lo previamente publicado²⁷⁵, el resultado de la RT-qPCR reveló un enriquecimiento de estos snARN entre las dianas de INTS4, indicando que el CLIP de INTS4 había funcionado correctamente. En contraste, cuando analizamos el ARNm de *Jarid2*, reportado como diana de TET2¹¹⁰, no lo encontramos enriquecido en la muestra inmunoprecipitada con FLAG con respecto a la muestra EV control (**Figura R29f**), sugiriendo que no todas las dianas de ARN de TET2 se unen al complejo INTS4-TET2. Por el contrario, sí que fuimos capaces de detectar *Xrcc5* entre los ARN que interactúan con INTS4, ya que observamos un mayor enriquecimiento de este ARNm en el inmunoprecipitado de ^{3xFL}INTS4 que en el control (**Figura R30f**). En contraste, no observamos enriquecimiento de los ARNm de *Atm*, *Atrx* o *Brca1* entre los ARNs unidos por INTS4 (**Figura R30f**).

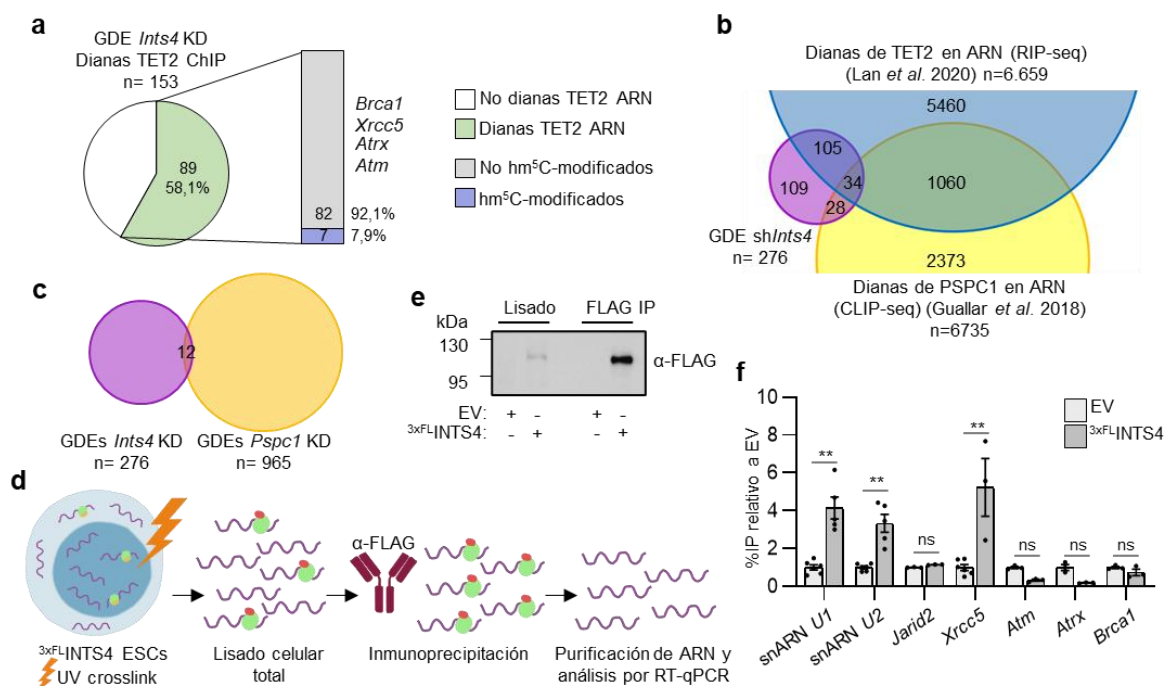


Figura R30. Los genes alterados en células *Ints4* KD que son dianas de TET2 en cromatina están unidos por TET2 en ARN pero no hm⁵C modificados. a) Diagrama sectorial de los 153 genes diferencialmente expresados en *Ints4* KD y que son dianas de TET2 en cromatina, identificando aquellos que son también dianas de TET2 a nivel de ARN, y de estos, los hm⁵C modificados. b) Diagrama de Venn del solapamiento entre los genes diferencialmente expresados en *Ints4* KD, las dianas de TET2 en ARN¹¹⁰ y las dianas de PSC1 en ARN¹⁴⁸. c) Diagrama de Venn del solapamiento entre los genes diferencialmente expresados en células *Ints4* KD y *Psc1* KD. d) Esquema representativo del protocolo de CLIP-qPCR llevado a cabo con las células ESCs + ^{3xFL}INTS4. e) Western blot de los lisados celulares y de los productos de inmunoprecipitación con anti-FLAG de las células ESCs + EV (control) y ESCs + ^{3xFL}INTS4. f) Gráfico de barras del porcentaje de ARNs unidos a ^{3xFL}INTS4 con respecto a los lisados totales en extractos de células EV (control). Los datos se representan como media ± s.e.m. La estadística

fue calculada empleando la prueba t de Student. **P*-valor < 0,05, ** *P*-valor < 0,01, ns: estadísticamente no significativo.

En conjunto, estos datos muestran que INTS4 podría regular la expresión de genes implicados en la reparación del daño en el ADN mediante su unión con TET2 al ARNm de estos, como en el caso de *Xrcc5*. La ausencia de los transcritos de *Brca1*, *Atm* y *Atrx* entre los hayan sido detectados unidos a INTS4 en este ensayo no necesariamente significa que no se encuentren regulados por el complejo INTS4-TET2, dado que una cinética y/o afinidad inferior de unión podrían haber mermado la inmunoprecipitación e impedido la detección de dichos ARNs en este ensayo.

En resumen, aunque numerosos ensayos y validaciones serán necesarios para confirmar nuestro modelo, nuestros resultados parecen indicar el papel del complejo INTS4-TET2 en la regulación de la expresión de genes de reparación del ADN en células pluripotentes. Observamos que niveles reducidos de *Ints4* o *Tet2* se traducen en un aumento en los niveles de daño en el genoma visto por acumulación de γ H2AX, posiblemente debido a defectos en los mecanismos de reparación del ADN por BRCA1, entre otros. Por otro lado, en el contexto del envejecimiento en el que nuestros análisis revelaron una disminución en la expresión de *Ints4* y *Tet2* podría pues estar contribuyendo a la acumulación de daño genómico que ha sido asociada con el paso del tiempo en múltiples especies.

7.5 ESTUDIO DE INTERACTORES DE TET2 Y ENZIMAS MODIFICADORAS DE ARN EN ENVEJECIMIENTO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

7.5.1 Elección de los genes candidatos para su estudio en *C. elegans*

C. elegans es un organismo que carece de ortólogos de las proteínas TET, y la presencia de hm^5C en su transcriptoma es aún una cuestión controvertida^{299,300}. Con el fin de diseccionar el papel de las modificaciones del ARN en el envejecimiento este organismo modelo, decidimos estudiar ortólogos de proteínas interactoras de TET2, así como enzimas catalizadoras de modificaciones de ARN conocidas en este nematodo. Para la selección de los interactores candidatos de TET2 para su estudio en el envejecimiento, generamos una lista con todos los interactores de TET2 reportados en la literatura en diferentes tipos celulares. Tras una búsqueda bibliográfica exhaustiva, encontramos cuatro interactomas de TET2 diferentes, uno en células troncales embrionarias de ratón¹⁴⁸, dos en células embrionarias de riñón humano^{301,302}, y uno en células humanas de síndrome mielodisplásico³⁰³ (**Tabla Suplementaria 8**). Para determinar la similitud entre los cuatro interactomas de TET2 reportados, analizamos mediante un diagrama de Venn el número de interactores comunes entre ellos, identificando a la O-GlcNac transferasa OGT como el único interactor común a los cuatro conjuntos de datos (**Figura R31a**).

Puesto que los cuatro interactomas de TET2 han sido generados en tipos celulares diferentes, decidimos estudiar todas las proteínas interactoras de TET2 descritas con el fin de hacer un análisis menos sesgado e identificar aquellas que puedan desempeñar un papel en el envejecimiento junto con TET2. Para ello, generamos una lista con todas las proteínas

interactoras de TET2 descritas en cualquiera de los cuatro interactomas, obteniendo una lista de 373 proteínas cuya interacción con TET2 ha sido reportada (**Figura R31a**). En línea con lo observado en las muestras de ESCs (**Figura R10b**), el 83,9% son proteínas con capacidad de unión a ARN¹⁵⁶ (RBPs) (**Figura R31b**). Es destacable el hecho de que más del 80% de las proteínas interactoras de TET2 descritas en varios tipos celulares distintos así como en dos especies distintas (humano y ratón) sean proteínas con capacidad de unión a ARN. Con el objetivo de dilucidar las funciones de las proteínas interactoras de TET2, analizamos las interacciones, la expresión durante el envejecimiento y los procesos biológicos con los que se relacionan dichas RBPs. Observamos un gran número de interacciones entre ellas y una estrecha relación con procesos de la biología del ARN como la localización y transporte de los transcritos, el metabolismo y el reconocimiento y unión de ARN (**Figura R31c**).

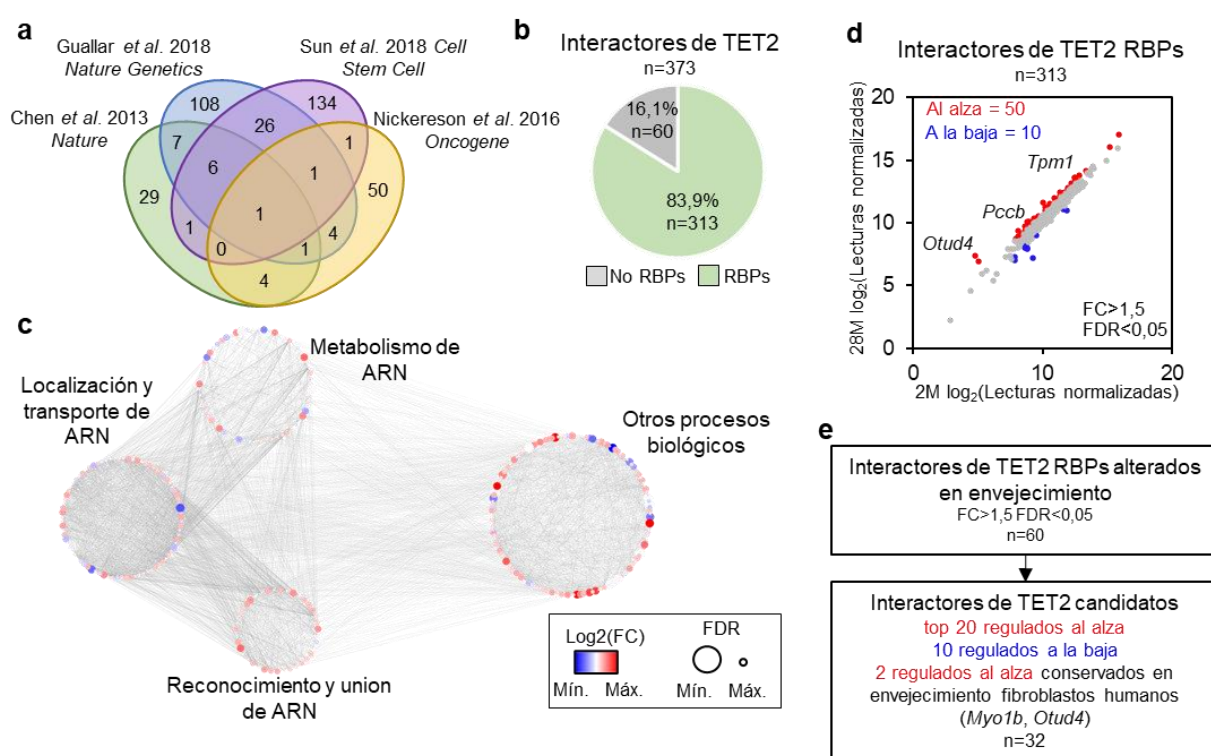


Figura R31. Los interactomas de TET2 están enriquecidos en proteínas estrechamente relacionadas con la biología del ARN. a) Diagrama de Venn mostrando el solapamiento entre los cuatro interactomas de TET2 publicados en la literatura. b) Diagrama sectorial de los 373 interactivos de TET2 que tienen capacidad de unión a ARN (RBPs) o ausencia de ella (no RBPs). c) Interactoma de las proteínas interactoras de TET2 obtenido con la base de datos STRING, clasificado por funciones biológicas relacionadas con la biología del ARN. Se muestran los genes regulados al alza y a la baja en los fibroblastos viejos (28 meses, 28M) con respecto a los fibroblastos jóvenes (2 meses, 2M) en rojo y azul respectivamente. El tamaño de burbuja representa el valor de significancia de la expresión diferencial. d) Diagrama de puntos de la expresión de los 313 interactivos de TET2 RBPs en fibroblastos de ratón de 2M y 28M. e) Diagrama de flujo de la selección de los interactivos de TET2 candidatos para su caracterización en envejecimiento en *C.elegans*.

Posteriormente, decidimos analizar los cambios de expresión durante el envejecimiento de las 313 RBPs que interaccionan con TET2, para seleccionar como candidatas aquellas cuya expresión se ve significativamente alterada en individuos viejos. El análisis de la expresión durante el envejecimiento en nuestros fibroblastos de ratón de los 313 RBPs interactoras de

TET2 reveló que 50 de ellas estaban regulados al alza con la edad y 10 regulados a la baja, con los criterios de $FC > 1,5$ y $FDR < 0,05$ (**Figura R31d**). De entre las 60 proteínas interactoras de TET2 diferencialmente expresados con la edad, seleccionamos 32 candidatas para su estudio en el envejecimiento que incluían los 20 con mayor regulación al alza con la edad, los 10 regulados a la baja con el envejecimiento, así como 2 interactores que se encontraban regulados al alza con la edad en fibroblastos de ratón y dicho cambio estaba conservado en fibroblastos humanos (tesis de Alba Coego, en preparación) (**Tabla Suplementaria 9, Figura R31e**). Para su estudio en *C. elegans*, identificamos los ortólogos de los 32 interactores de TET2 candidatos, y descartamos aquellos cuyo silenciamiento causase fenotipo letal embrionario según la literatura científica disponible (**Figura R32a, izquierda**). Finalmente, nos quedamos con 3 candidatos: el gen *lev-11*, ortólogo del gen *Tpm1*, que codifica tropomiosina, una proteína de unión y organización de los filamentos de actina³⁰⁴, el gen *otub-4* que codifica para una deubiquitinasa ortólogo del gen *Otud4* de ratón³⁰⁵, y el gen *pccb-1* que codifica para la propionil-CoA carboxilasa, clave en el metabolismo de ácidos grasos, y ortólogo del gen *Pccb*³⁰⁶. El papel de ninguno de estos candidatos ha sido explorado todavía en el envejecimiento de *C. elegans*. Para completar el análisis, decidimos incluir también en el estudio los ortólogos de *C. elegans* de enzimas modificadoras de m⁵C, m⁶A y A-to-I editing en ARN *nsun-5*, *metl-5* y *adr-2*, respectivamente (**Figura R32a, derecha**). De este modo, obtuvimos una lista de seis genes para validar su efecto en envejecimiento en *C. elegans* (**Figura R32b**). Para estudiar la función de estos genes en el envejecimiento, generamos líneas de *C. elegans* portadoras del ARNi para el silenciamiento cada gen de interés, y llevamos a cabo ensayos de longevidad, de fertilidad y de estrés por calor como estudio de parámetros de salud del animal y, de forma indirecta, de la longevidad de *C. elegans* (**Figura R32c**).

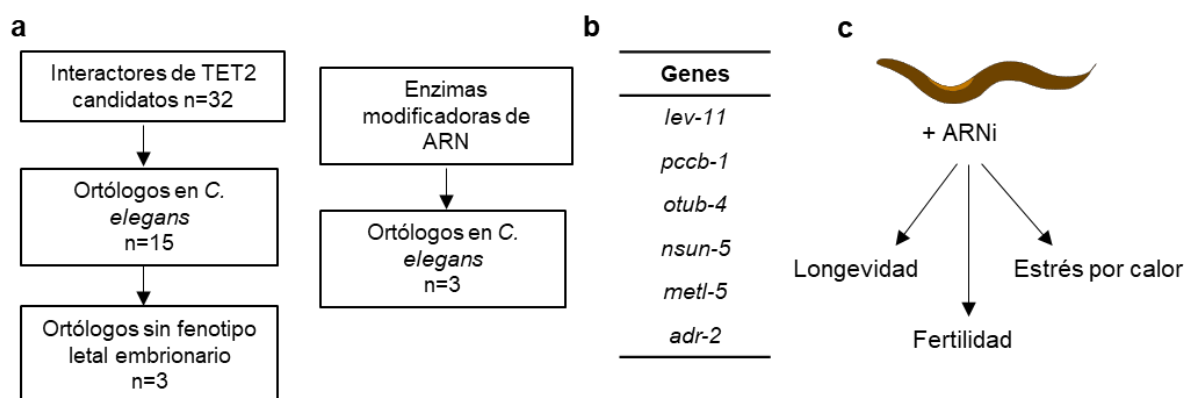


Figura R32. Estudio de interactivos de TET2 y su impacto en el envejecimiento en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. a) Diagrama de la selección de los genes candidatos a estudiar en *C. elegans*. b) Lista de los genes candidatos seleccionados. c) Esquema de los ensayos llevados a cabo en *C. elegans*.

7.5.2 Estudio de interactivos de TET2 en envejecimiento de *C. elegans*

Con el fin de estudiar el papel de los candidatos seleccionados en el envejecimiento en *C. elegans*, los alimentamos con bacterias *E. coli* que expresaban ARNi para *pccb-1*, *otub-4* o *lev-11*. Seguidamente, llevamos a cabo ensayos de fertilidad en estos nematodos con pérdida de función de cada candidato. En el ciclo de vida normal de *C. elegans*, existen 4 días fértiles³⁰⁷.

El silenciamiento de *pccb-1* no tuvo impacto en el número total de descendencia (**Figura R33a**), aunque sí detectamos un retraso en el periodo fértil de los animales, que alcanzó su máximo el segundo día fértil, en contraste con el control en el que el máximo se presentó en el primer día (**Figura R33b**). La pérdida de función de *otub-4* reveló el mismo fenotipo, con un número de descendencia total similar a los animales control (**Figura R33c**), pero un retraso en el periodo fértil reflejado en un retraso en el pico de descendientes de día 1 a día 2 respecto al control (**Figura R33d**). Un retraso en el periodo fértil de los animales puede estar relacionado con un retraso en el desarrollo y una extensión de la vida media de los animales. El *knock-down* de *lev-11* dio lugar a infertilidad en la mayoría de los animales (**Figura R33e, R33f**). Dado el fuerte fenotipo que observamos con la pérdida de función de *lev-11*, decidimos ahondar en su papel en envejecimiento de *C. elegans*. Para ello, llevamos a cabo ensayos de estrés por calor y de longevidad. Observamos que la depleción de *lev-11* incrementó la resistencia a estrés por calor (**Figura R33g**) y redujo la vida media de los nematodos (**Figura R33h**). Estos resultados sugieren un papel de *lev-11*, *otub-4* y *pccb-1* sobre parámetros de fertilidad de *C. elegans*, y muestran una nueva función de *lev-11* en longevidad. Aunque en la mayoría de los casos mutaciones que mejoran la resistencia a estrés provocan también un aumento de la vida media de los nematodos, no siempre una mayor tolerancia a estrés se traduce en un incremento en la longevidad de *C. elegans*^{308,309}.

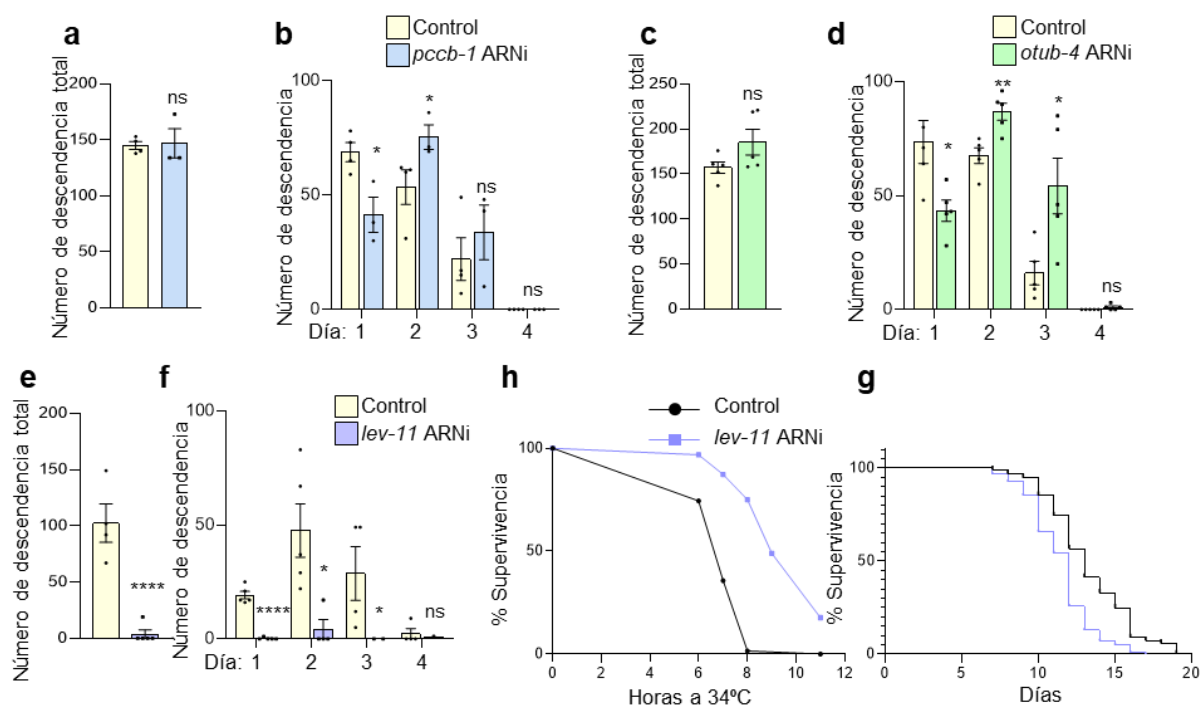


Figura R33. La pérdida de función de los interactores de TET2 *lev-11*, *otub-4* y *pccb-1* en *C. elegans* afecta los parámetros de salud y de longevidad del animal. a) Gráfico de barras del número de descendencia total de *C. elegans* tras el silenciamiento (ARNi) de *pccb-1* o su control (EV). b) Gráfico de barras del número de descendencia de *C. elegans* en las muestras indicadas a lo largo de los cuatro días fértiles. c) Gráfico de barras del número de descendencia total de *C. elegans* tras el silenciamiento de *otub-4* o su control (EV). d) Gráfico de barras del número de descendencia de *C. elegans* control y *otub-4* knock-down a lo largo de los cuatro días fértiles. e) Gráfico de barras del número de descendencia total de *C. elegans* control (vector vacío) y *lev-11* knock-down. f) Gráfico de barras del número de descendencia de *C. elegans* control y *lev-11* knock-down a lo largo de los cuatro días fértiles. g) Curva representando el porcentaje de supervivencia de *C. elegans* control y *lev-11* knock-down a lo largo del ensayo de estrés por calor a 34°C. h) Gráfico de supervivencia de *C. elegans*

control y *lev-11* ARNi. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. **P*-valor<0,05, ***P*-valor<0,01, *****P*-valor<0,0001, ns: estadísticamente no significativo.

7.5.3 Estudio de enzimas modificadoras de ARN en envejecimiento de *C. elegans*

Con el propósito de evaluar el papel que tienen las modificaciones de ARN y sus enzimas catalizadoras en el envejecimiento de *C. elegans*, llevamos a cabo ensayos de pérdida de función de los genes *nsun-5*, *adr-2* y *metl-5*.

nsun-5 es el gen codificante para la enzima responsable de la metilación de citosinas (m^5C) (**Figura R34a**) en ARN ribosomal de *C. elegans*¹⁴¹, que se ha relacionado con la respuesta a estrés por parte del nematodo¹⁴¹⁻¹⁴³. Dado que también se ha reportado que *nsun-5* es prescindible para la supervivencia de este animal¹⁴³, decidimos validar la función de esta metiltransferasa en distintos sistemas para evaluar su posible implicación en envejecimiento. Tras el silenciamiento de *nsun-5* no observamos alteraciones de la fertilidad de *C. elegans*, ni en el número total de descendencia (**Figura R34b**), ni tampoco en el número de huevos depositados cada día a lo largo del periodo fértil (**Figura R34c**). Por otro lado, analizamos la pérdida de función de *nsun-5* en la cepa silvestre N2 y detectamos que, a pesar de que no tuvo efecto sobre la resistencia a estrés por calor (**Figura R34d**), sí incrementó la vida media de los animales dos días, lo que representa un 10% de alargamiento de su vida (**Figura R34e**). Para completar nuestro estudio, decidimos llevar a cabo también la pérdida de función de *nsun-5* en la cepa *eat-2*, donde se ha descrito que, al contrario con lo que ocurre en cepas N2, la pérdida de función de *nsun-5* tiene efecto sobre la longevidad de esta cepa¹⁴¹. *eat-2* se emplea de forma rutinaria como modelo de restricción calórica por sus deficiencias en el bombeo faríngeo. Tras el silenciamiento de *nsun-5* en la cepa *eat-2*, observamos un incremento en la resistencia a estrés por calor en los nematodos (**Figura R34f**). A pesar de que en muchos casos en *C. elegans* un incremento en la resistencia a estrés está asociada a un incremento en la esperanza de vida¹⁴¹, en *eat-2* observamos que el silenciamiento de *nsun-5* reveló la misma vida media que en los animales control (**Figura R34g**), al contrario de lo esperado por lo reportado en la literatura. Estos resultados indican el papel de *nsun-5* como un factor pro-envejecimiento en condiciones silvestres. Por otro lado, en condiciones de restricción calórica obtuvimos una mejor respuesta a estrés asociada a la reducción de *nsun-5*, que sin embargo no provocó un aumento en la longevidad de estos animales.

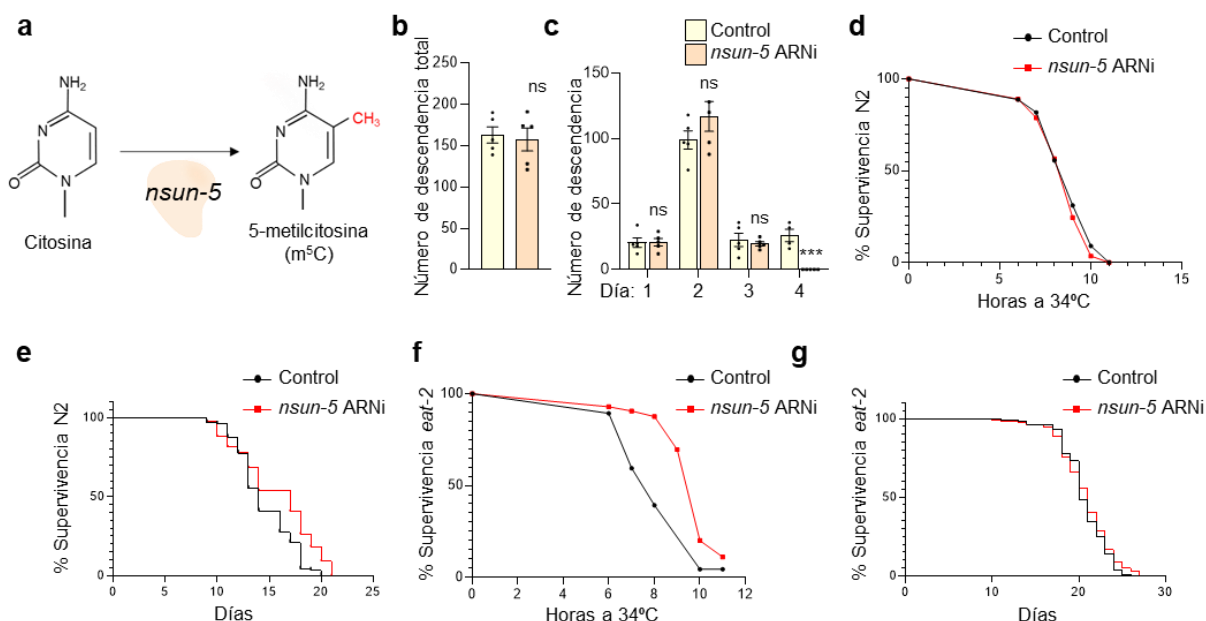


Figura R34. La pérdida de función de *nsun-5* en *C. elegans* tiene efecto sobre la longevidad. a) Esquema de la modificación de ARN m⁵C llevada a cabo por *nsun-5* en *C. elegans*. b) Gráfico de barras del número de descendencia total de *C. elegans* control (vector vacío) y *nsun-5* KD (ARNi). c) Gráfico de barras del número de descendencia de gusanos control y *nsun-5* KD a lo largo de los cuatro días fértiles. d) Curva representando el porcentaje de supervivencia de nematodos control y *nsun-5* KD a lo largo del ensayo de estrés por calor a 34°C. e) Gráfico de supervivencia de *C. elegans* control y *nsun-5* ARNi en condiciones normales. f) Curva representando el porcentaje de supervivencia de *C. elegans* cepa *eat-2* (modelo de restricción calórica), control y *nsun-5* KD a lo largo del ensayo de estrés por calor a 34°C. g) Gráfico de supervivencia de *C. elegans* cepa *eat-2*, control y *nsun-5* ARNi. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. ***P-valor<0,001, ns: estadísticamente no significativo.

A continuación, analizamos la posible implicación de la desaminasa de adenosinas, *adr-2*, en el envejecimiento de *C. elegans*. *adr-2* desamina adenosinas, convirtiéndolas en inosinas (**Figura R35a**), en ARNs de cadena doble³¹⁰. El silenciamiento de *adr-2* mediante ARNi no tuvo efecto sobre la fertilidad de los nematodos, ni en cuanto al número de descendencia total producida (**Figura R35b**), ni en el número de huevos depositados en cada uno de los días fértiles (**Figura R35c**). No obstante, la pérdida de función de esta enzima sí incrementó la resistencia a estrés por calor de los animales (**Figura R35d**), e incrementó también su vida media un 10% con respecto al control (**Figura R35e**). Estos resultados sugieren un papel de *adr-2* como enzima pro-envejecimiento en *C. elegans*, ya que la ausencia de esta enzima provocó un aumento en la tolerancia a estrés por calor y una extensión de la vida media.

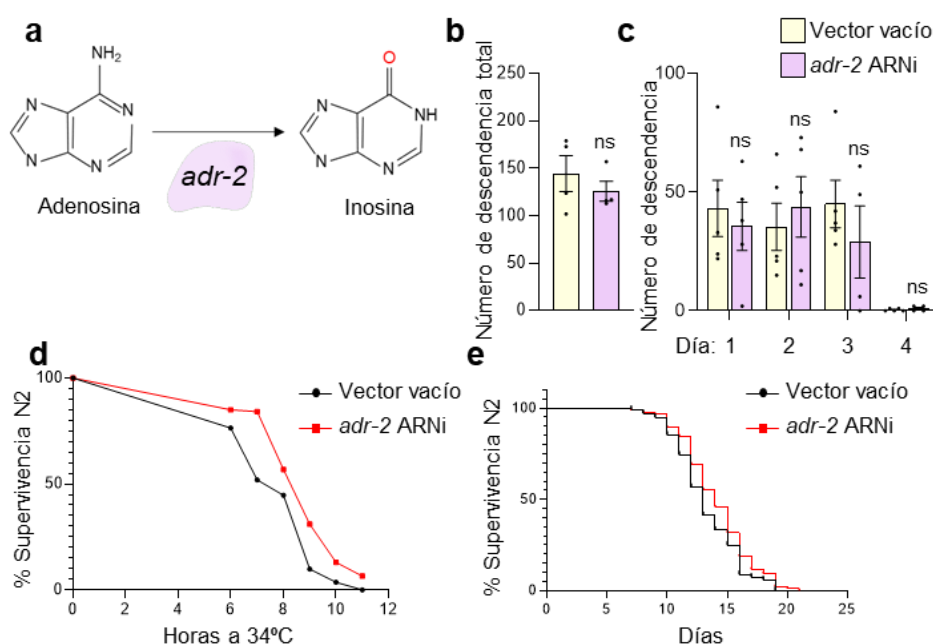


Figura R35. La pérdida de función de *adr-2* en *C. elegans* tiene efecto sobre la resistencia a estrés por calor. a) Esquema de la modificación de ARN A-to-I llevada a cabo por *adr-2* en *C. elegans*. b) Gráfico de barras del número de descendencia total de *C. elegans* control (vector vacío) y *adr-2* knock-down. c) Gráfico de barras del número de descendencia de gusanos control y *adr-2* KD a lo largo de los cuatro días fértiles. d) Curva representando el porcentaje de supervivencia de nematodos control y *adr-2* KD a lo largo del ensayo de estrés por calor a 34°C. e) Gráfico de supervivencia de *C. elegans* control y *adr-2* ARNi en condiciones normales. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. * ns: estadísticamente no significativo.

Por último, decidimos estudiar el papel de *metl-5* en el envejecimiento de *C. elegans*. La enzima codificada por *metl-5* es responsable de la metilación de adenosinas a 6-metiladenosina (m^6A) (**Figura R36a**) en ARN ribosomal de *C. elegans* y su función se ha implicado en la regulación de la función ribosomal y la respuesta a estrés¹³¹. Realizando ensayos similares a los anteriores, observamos que el silenciamiento de *metl-5* no produjo un cambio significativo en el número de descendencia total (**Figura R36b**), pero sí produjo un retraso en el periodo fértil, dando lugar a un incremento estadísticamente significativo del número de huevos depositados a día 2 (**Figura R36c**), indicativo de un retraso en la etapa fértil del animal tras el silenciamiento de este enzima. Finalmente, utilizando ensayos de estrés por calor y de longevidad detectamos que la pérdida de función de la metiltransferasa no tuvo efecto sobre la resistencia a estrés de los animales (**Figura R36d**), pero sí incrementó un 10% el periodo de vida media de estos (**Figura R36e**). Estos resultados indican el papel de *metl-5* como factor pro-envejecimiento en *C. elegans*.

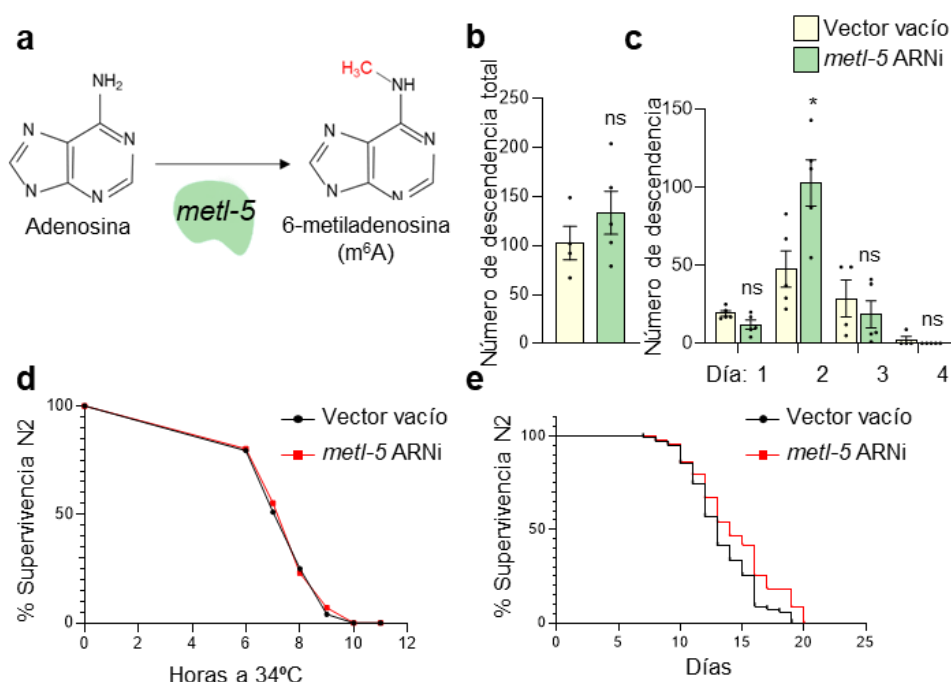


Figura R36. La pérdida de función de *metl-5* en *C. elegans* tiene efecto sobre la longevidad. a) Esquema de la modificación de ARN m⁶A llevada a cabo por *metl-5* en *C. elegans*. b) Gráfico de barras del número de descendencia total de gusanos control (vector vacío) y *metl-5* KD. c) Gráfico de barras del número de descendencia de *C. elegans* control y *metl-5* KD a lo largo de los cuatro días fértiles. d) Curva representando el porcentaje de supervivencia de nematodos control y *metl-5* ARNi a lo largo del ensayo de estrés por calor a 34°C. e) Gráfico de supervivencia de gusanos control y *metl-5* ARNi en condiciones normales. f) Gráfico de supervivencia de *C. elegans* control y *metl-5* ARNi en condiciones de alta glucosa. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. *P-valor<0,05, ns: estadísticamente no significativo.

Recientes estudios han revelado una interconexión entre marcas del ARN. Por ejemplo se ha reportado que m⁶A es capaz de modular la edición A-to-I mostrando ambas marcas una correlación negativa³¹¹. Por otro lado, las modificaciones m⁶A y m⁵C pueden cooperar, por ejemplo para aumentar la traducción del ARNm de p21³¹². Para estudiar la interconexión entre modificaciones de ARN, decidimos evaluar el efecto de la pérdida de función de combinaciones de las enzimas modificadoras de ARN en la fertilidad y la resistencia a estrés por calor de *C. elegans*. Dado que la utilización de más de dos ARNi en *C. elegans* muestra problemas de eficiencia en la pérdida de función³¹³, decidimos testar las combinaciones *adr-2* KD + *metl-5* KD, *adr-2* KD + *nsun-5* KD y *metl-5* + *nsun-5* KD, de dos en dos en los nematodos. Mientras que observamos una reducción estadísticamente significativa en el número de descendencia total con el silenciamiento de *metl-5* + *nsun-5*, las combinaciones *adr-2* + *metl-5* y *adr-2* + *nsun-5* no tuvieron efecto significativo sobre este parámetro (**Figura R37a**). Por otro lado, no detectamos diferencias significativas en el inicio ni duración del periodo fértil de los animales en ninguna de las tres condiciones con respecto al control (**Figura R37b**). En contraste, usando ensayos de resistencia a estrés por calor observamos un incremento en la resistencia de los nematodos con las tres combinaciones de doble KD (dKD); *adr-2* + *metl-5* (**Figura R37c**), *adr-2* + *nsun-5* (**Figura R37d**) y *metl-5* + *nsun-5* (**Figura R37e**). En conclusión, la pérdida de función de enzimas modificadoras de ARN en forma de dobles *knock-down* incrementa la

resistencia a estrés por calor en el organismo modelo *C. elegans*. Este resultado cabría esperar en las combinaciones *adr-2* + *metl-5* o *adr-2* + *nsun-5*, puesto que ya observamos un aumento en la tolerancia a estrés por calor con la pérdida de función de *adr-2*. Sin embargo, en contraste con el silenciamiento individual de *metl-5* o *nsun-5* que no promovió una mayor tolerancia a estrés por calor, la combinación de doble KD *metl-5* + *nsun-5* sí produjo este efecto. Ambas enzimas han sido asociadas con la regulación de la respuesta a estrés en *C. elegans* a través de su papel en la metilación del ARN ribosomal^{131,141}. Es posible que observemos un efecto en la combinación doble *knock-down* que no observamos con los silenciamientos individuales debido a una sinergia entre las marcas que dichas enzimas depositan. Estos resultados parecen indicar el papel pro-envejecimiento de las modificaciones m⁶A, A-to-I y m⁵C del ARN en *C. elegans*. En futuros estudios será necesario valorar el papel que desempeñan las modificaciones epitranscriptómicas en organismos modelo superiores como el ratón, para dilucidar si los mecanismos por los que las marcas del ARN regulan el envejecimiento se encuentran evolutivamente conservados.

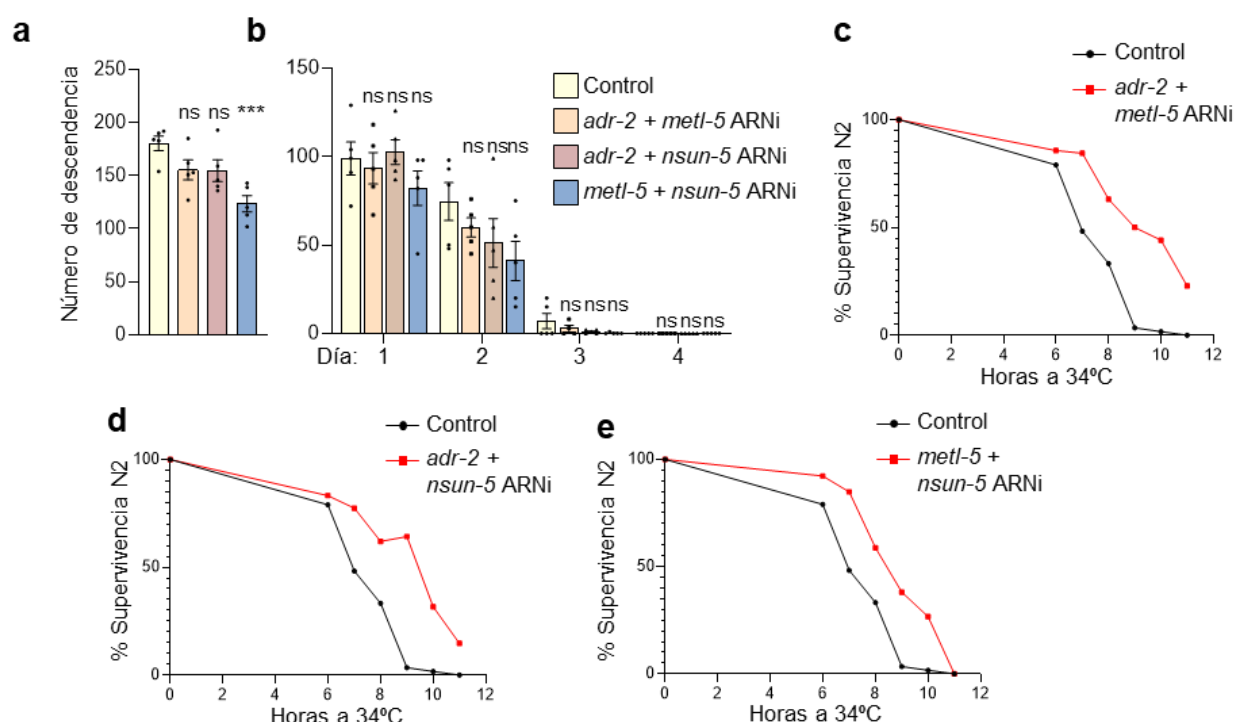


Figura R37. La combinación de dobles *knock-down* de enzimas modificadoras de ARN incrementa la resistencia a estrés por calor en *C. elegans*. a) Gráfico de barras del número de descendencia total de *C. elegans* control y *adr-2* + *metl-5*, *adr-2* + *nsun-5* y *metl-5* + *nsun-5* doble KD. b) Gráfico de barras del número de descendencia de *C. elegans* control y *adr-2* + *metl-5*, *adr-2* + *nsun-5* y *metl-5* + *nsun-5* doble silenciamiento a lo largo de los cuatro días fértiles. c-e) Curvas de supervivencia en *C. elegans* con los tratamientos indicados, a lo largo de 12 horas de estrés térmico a 34°C. Los datos se representan como media $\pm$ s.e.m. La estadística fue calculada empleando la prueba t de Student. ****P*-valor < 0,001, ns: estadísticamente no significativo.

Los resultados obtenidos con los ensayos de longevidad, estrés por calor o fertilidad con pérdida de función de los ortólogos de los genes candidatos en *C. elegans* se encuentran recogidos en la **Tabla R1**.

Tabla R1. Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de longevidad, fertilidad y estrés por calor en *C. elegans* tras el silenciamiento de los genes indicados.

Pérdida de función	Longevidad	Fertilidad	Estrés por calor
<i>pccb-1</i>	---	Retraso	---
<i>otub-4</i>	---	Retraso	---
<i>lev-11</i>	Reducida	Abolida	Resistencia aumentada
<i>adr-2</i>	Aumentada	Sin efecto	Resistencia aumentada
<i>metl-5</i>	Aumentada	Retraso	Sin efecto
<i>nsun-5</i>	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
<i>nsun-5</i> ayuno	Sin efecto	---	Resistencia aumentada
dKD1 (<i>adr-2</i> + <i>metl-5</i>)	---	Sin efecto	Resistencia aumentada
dKD2 (<i>adr-2</i> + <i>nsun-5</i>)	---	Sin efecto	Resistencia aumentada
dKD3 (<i>metl-5</i> + <i>nsun-5</i>)	---	Reducida	Resistencia aumentada

8. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un proceso fisiológico complejo cuyos mecanismos moleculares subyacentes no se conocen en detalle. Las modificaciones del ARN, también denominadas modificaciones epitranscriptómicas, han emergido en los últimos años como una nueva capa reguladora de la mayoría de los procesos celulares, incluyendo la regulación epigenética, traducción de proteínas o respuesta al estrés, entre otras. Sin embargo, el papel que desempeñan las modificaciones epitranscriptómicas en el envejecimiento permanece prácticamente inexplorado. En esta tesis doctoral caracterizamos una nueva función del modificador TET2, cuya expresión hemos observado que disminuye en fibroblastos de individuos viejos, además del impacto de los modificadores de ARN en el envejecimiento a través de estudios *in vivo* en *C. elegans*. Nuestros resultados indican la importancia de los modificadores epitranscriptómicos en el envejecimiento. Primero analizamos los cambios que se producen con el envejecimiento en fibroblastos de ratón tanto de las enzimas modificadoras y lectoras del ARN, así como de los niveles de m⁵C/hm⁵C. Segundo, tratamos de generar un nuevo modelo de envejecimiento *in vitro* a través de la inmortalización de fibroblastos jóvenes y viejos mediante silenciamiento del regulador del ciclo celular, P53. No obstante, detectamos que el silenciamiento de *p53* afecta a marcadores de envejecimiento, así como a la expresión de las enzimas escritoras y lectoras de las marcas m⁵C y hm⁵C. Tercero, caracterizamos el interactor de TET2, INTS4, en células troncales embrionarias de ratón, que representan el paradigma de estado celular joven. Comprobamos que la pérdida de función de *Ints4* es incompatible con el mantenimiento de estas células en cultivo. Cuarto, estudiamos la función del complejo INTS4-TET2 y observamos su implicación en la regulación de genes de respuesta a daño en ADN (**Figura D1**). En línea con esto, demostramos que la pérdida de función de *Ints4* o *Tet2* produce una acumulación de daño en el ADN. Por último, caracterizamos mediante estudios *in vivo* el impacto de la pérdida de función de interactores de TET2 que se ven alterados en el envejecimiento en ratón, así como enzimas modificadoras del ARN en el envejecimiento del organismo modelo *C. elegans*. Observamos que la pérdida de función de los ortólogos de interactores de TET2, *lev-11*, *pccb-1* y *otub-4* tenía efecto sobre la fertilidad del nematodo. Además, el silenciamiento de *lev-11* incrementó la resistencia a estrés por calor y redujo la longevidad de los animales. Los ensayos de pérdida de función de las enzimas modificadoras del ARN revelaron efectos sobre parámetros de salud de *C. elegans* relacionados con el envejecimiento, que fueron determinados mediante ensayos de longevidad, fertilidad y de resistencia a estrés por calor.

Modelos de envejecimiento *in vitro*

Para el estudio del envejecimiento *in vitro* empleamos fibroblastos derivados de orejas y colas de ratones jóvenes (2 meses) y de ratones viejos/geriátricos (28 meses). Los fibroblastos de la piel son un excelente modelo de envejecimiento, ya que están no solo expuestos a factores intrínsecos del envejecimiento, sino también a factores extrínsecos, y a nivel transcripcional muestran una firma transcriptómica asociada al paso del tiempo¹³. Sin embargo, se ha generado una controversia respecto al uso de este tipo de células en cultivo como modelo de envejecimiento, dado que los autores de un estudio reciente afirman que el cultivo *in vitro* de los fibroblastos jóvenes y viejos hace que desaparezcan las diferencias debidas a la edad que existen en los individuos de los que proceden¹⁰. No obstante, son numerosos los estudios que emplean este modelo para el estudio del proceso fisiológico asociado al paso del tiempo,

detectando así diferencias reproducibles entre células jóvenes y viejas tanto en ratones como en humanos^{11,13,314,315}. En esta tesis doctoral, con el fin de validar nuestro modelo de estudio *in vitro*, caracterizamos el paisaje transcripcional de nuestros fibroblastos jóvenes y viejos y verificamos que los patrones transcripcionales asociados al envejecimiento se encuentran más enriquecidos en nuestros fibroblastos viejos (**Figura R1**). Además, comprobamos que cambios de expresión en los genes *Igf1* y *Lgals1*, que han sido reportados como marcadores de envejecimiento altamente conservados, incluso entre especies²⁶⁵, también en nuestros cultivos presentan los patrones esperados (**Figura R1**). Por otro lado, analizamos marcadores citológicos y epigenéticos del envejecimiento. Estudiamos por un lado la alteración de la forma nuclear mediante inmunocitoquímica de LaminA/C y por otro la acumulación de daño en ADN con el marcador γ H2AX, y comprobamos que los niveles de ambos son mayores en las células viejas (**Figura R7**), tal y como está reportado en la literatura³². Estos resultados validan que diversos marcadores relacionados con el envejecimiento siguen estando presentes en nuestro modelo de fibroblastos jóvenes y viejos incluso tras su cultivo *in vitro*. Una vez validado nuestro modelo, analizamos la expresión de enzimas modificadoras del ARN m⁵C y hm⁵C en ARNm, ARNt y ARNvt, y detectamos cambios significativos en la expresión de algunos a nivel de ARN. En particular, destacan el incremento de *Nsun2* y la reducción en la expresión de *Nsun6* y *Tet2* en células viejas. Por ello, analizamos mediante espectrometría de masas los niveles globales de m⁵C y hm⁵C en ARN total ribodeplecionado de células jóvenes y viejas, y aunque sin significación estadística, observamos una tendencia de m⁵C a la baja y de hm⁵C al alza con la edad. Esto sugiere un posible incremento de la oxidación de m⁵C a hm⁵C asociado al envejecimiento que puede estar impactando el transcriptoma celular y con ello la expresión génica. Este resultado parece contraintuitivo, ya que observamos también una disminución significativa en la expresión de *Tet2* en células viejas. Sin embargo, se sabe que las células que carecen de todos los miembros de la familia TET (*Tet* triple KO (TKO)) retienen un 50% de niveles de hm⁵C del ARN¹¹⁰. En línea con esto, recientemente se ha descrito que ALKBH1 es capaz de catalizar hm⁵C en el ARN¹⁰⁹. En nuestro modelo, observamos que los niveles de ALKBH1 se incrementan significativamente con la edad (**Figura R4**), pudiendo explicar que, a pesar de la reducción de TET2, los niveles globales de hm⁵C no se vieran afectados. Futuros estudios revelarán la importancia de la oxidación de m⁵C a hm⁵C en el envejecimiento, así como el papel que desempeñan cada una de las enzimas involucradas en su generación. Puesto que los cambios en los niveles globales de m⁵C/hm⁵C no fueron estadísticamente significativos, tratamos de diseccionar los cambios de estas marcas a nivel de transcritos específicos. Para tal fin, necesitábamos obtener una gran cantidad de ARN para su inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-m⁵C y anti-hm⁵C. Dada la limitada capacidad proliferativa que tienen los cultivos primarios, decidimos immortalizar nuestros cultivos de fibroblastos jóvenes y viejos mediante el silenciamiento de *p53*, y caracterizar la validez de este modelo para el estudio del envejecimiento *in vitro*. Para caracterizar el impacto del silenciamiento de *p53* en los fibroblastos, concretamente sobre el fenotipo envejecido, llevamos a cabo un análisis de marcadores de envejecimiento en los fibroblastos immortalizados. El análisis transcriptómico global mediante ARN-seq mostró que únicamente se conservaba el 32% de la firma transcriptómica del envejecimiento tras el silenciamiento de *p53* (**Figura R7**), lo cual podría explicarse por la gran relevancia que tiene *p53* como factor de transcripción regulador de una gran variedad de funciones biológicas³¹⁶. Además, detectamos que el silenciamiento de *p53* produjo alteraciones en marcadores de envejecimiento (forma nuclear, niveles de γ H2AX,

progerina y HP1 γ) (**Figura R8**), lo que parece indicar que la inmortalización altera el fenotipo envejecido de los fibroblastos. Esto podría deberse a una acumulación de daño a través del silenciamiento de *p53* que haga que los fibroblastos jóvenes inmortalizados se parezcan más a los fibroblastos viejos. En los últimos años se ha empezado a discutir sobre la teoría del daño en el ADN como una de las causas del envejecimiento. Yang y colaboradores reportaron en 2023 un trabajo en el que han sido capaces de generar un modelo de ratón con envejecimiento acelerado causado por daño en el ADN, que a su vez dan lugar a pérdida de información epigenética³¹⁷. El fenotipo envejecido que observamos en nuestros fibroblastos jóvenes inmortalizados, que se asemejan más a los fibroblastos viejos que a los jóvenes silvestres, podría estar en línea con lo descrito por Yang y colaboradores, debido a una acumulación de daño en el genoma debida al silenciamiento de *P53*. Estos resultados descartan los fibroblastos inmortalizados mediante silenciamiento de *p53* como un modelo válido para el estudio del envejecimiento *in vitro*. No obstante, los fibroblastos 2M + sh*p53* podrían ser un modelo de envejecimiento acelerado *in vitro* de confirmarse nuestra hipótesis de que el silenciamiento de *p53* causa un fenotipo envejecido en los fibroblastos jóvenes a través de una acumulación de daño en el genoma de las células. El análisis de un mayor número de marcadores como H3K9me3, LAP2 α o los niveles de especies reactivas de oxígeno mitocondriales³², en los fibroblastos jóvenes antes y después de la inmortalización, ayudará a validar este nuevo modelo para el estudio de envejecimiento *in vitro*.

Por otro lado, un estudio de 2014 mostró que el silenciamiento de *p53* en fibroblastos humanos provocaba su conversión a células neurales si estas células eran cultivadas en medio que promovía la transdiferenciación³¹⁸. En nuestros experimentos, no observamos cambios en la morfología de los fibroblastos tras el silenciamiento de *p53* (**Figura R5**), y únicamente detectamos un cambio significativo en la expresión del marcador neuronal *Tubb1*, mientras que en otros marcadores como sinapsina, *Tbr1* o GABA no observamos cambios significativos tras la inmortalización. En base a estos datos, podemos descartar una conversión a células neurales de nuestros fibroblastos tras la inmortalización. Es posible que esto se deba a que nosotros mantuvimos nuestros fibroblastos inmortalizados en cultivo con el mismo medio de cultivo que los fibroblastos primarios, mientras que en el estudio de Zhou y colaboradores emplean medio de cultivo específico de neuronas o astrocitos para promover la transdiferenciación.

Finalmente, comprobamos la expresión de las enzimas escritoras y lectoras de m⁵C y hm⁵C en los fibroblastos jóvenes y viejos silvestres e inmortalizados (**Figura R9**). A pesar de que no detectamos diferencias significativas en la expresión de *Tet2* tras la inmortalización, los niveles de expresión de las enzimas escritoras de m⁵C *Nsun2* y *Nsun6* sí se alteraron con el silenciamiento de *p53*, especialmente en los fibroblastos jóvenes. Esto podría implicar una modificación de los perfiles de m⁵C en el transcriptoma, con el consiguiente efecto sobre hm⁵C, por lo que los fibroblastos inmortalizados tampoco representan un modelo válido para el estudio de las modificaciones epitranscriptómicas m⁵C y hm⁵C, según nuestros datos. De hecho, en varios tipos de cáncer se ha descrito que las modificaciones del ARN, entre las que se incluyen m⁶A y m⁵C, así como sus reguladores epitranscriptómicos tienen un papel regulador de multitud de procesos, incluyendo proliferación, supervivencia, metástasis, expresión de oncogenes en tumores³¹⁹. *P53* es el gen que más frecuentemente se encuentra mutado en cáncer³²⁰. A pesar de que no existen actualmente estudios que relacionen alteraciones en la función de *P53* con alteraciones en las modificaciones del ARN, es posible que exista una relación entre ellas,

teniendo en cuenta nuestros resultados, así como el papel de P53 y las modificaciones epitranscriptómicas en el cáncer. Futuros estudios serán necesarios para desentrañar el papel que desempeña P53 en la regulación del paisaje epitranscriptómico celular.

Caracterización de *Ints4* en pluripotencia

De entre las proteínas interactoras de TET2 en células madre embrionarias (ESCs), con capacidad de unión a ARN y diferencialmente expresadas con la edad, escogimos centrarnos en el estudio de la proteína INTS4. Dicha elección se basó en dos motivos: el primero es la regulación a la baja en la expresión de *Ints4* asociada al envejecimiento, al igual que ocurre con la expresión de *Tet2* (**Figura R10**) y el segundo es el hecho de que la función de INTS4 no ha sido explorada en envejecimiento ni en ESCs. El complejo Integrator, del que forma parte INTS4, ha sido estudiado en una gran variedad de organismos, desde *D. melanogaster* y *C. elegans* hasta ratones y humanos, así como de modelos celulares (HeLa, U2OS....). Sin embargo, en ESCs al inicio de esta tesis doctoral solo existía un estudio en el que, en un cribado de factores que afectaban a la pluripotencia, se indicaba que la pérdida de función de *Ints4* mediante ARNi causaba defectos en la viabilidad celular, no siendo éste el foco de dicha investigación³²¹. Por todo ello, llevamos a cabo la caracterización de esta proteína interactora de TET2 en células pluripotentes, con el objetivo de identificar su contribución a la función del regulador epigenético o nuevas funciones en común todavía no conocidas. Cuando analizamos sus niveles de expresión en envejecimiento, observamos una regulación a la baja tanto de *Ints4* como de *Tet2* asociada al envejecimiento, y decidimos explorar mediante análisis *in silico* la expresión de *Ints4* en una variedad de tejidos de ratón, así como en células somáticas (fibroblastos embrionarios de ratón, MEFs) y células pluripotentes (ESCs e iPSCs), y compararla con los datos de expresión de *Tet2* (**Figura R11**). Observamos que tanto *Ints4* como *Tet2* se expresan más en el estado pluripotente, y validamos dicho dato mediante análisis de proteínas por Western blot (**Figura R11**). Por otro lado, al analizar la localización subcelular de ambas proteínas en ESCs, observamos que sus localizaciones coinciden, encontrándose ambas tanto en la fracción citoplasmática como nuclear unida a cromatina, pero con un especial enriquecimiento en la fracción nuclear soluble (**Figura R11**). Además, estudiamos a partir de datos previamente publicados la expresión de *Ints4* y *Tet2* en procesos de salida (diferenciación) y adquisición (reprogramación somática celular) de pluripotencia, y de nuevo, observamos patrones de expresión análogos entre *Ints4* y *Tet2* (**Figura R12**). En conjunto, todos estos datos de similitud en patrones de expresión y localización podrían indicar una posible relación funcional entre ambas proteínas, pudiendo estar involucradas en funciones biológicas conjuntamente, con especial relevancia en el estado pluripotente y el envejecimiento.

Al contrario que lo que se ha reportado para la depleción de *Tet2*^{69,163,166,322}, la pérdida de función de *Ints4* es incompatible con el mantenimiento de las ESCs en cultivo a largo plazo (6-8 días) (**Figura R18**). Este efecto es específico de células pluripotentes, dado que el silenciamiento de *Ints4* en fibroblastos sí fue posible incluso a largo plazo (13 días) (**Figura R18**). En línea con esto, se ha demostrado que la función del complejo Integrator es necesaria para el mantenimiento de células troncales adultas en la planaria *Schmidtea mediterranea*³²³.

A pesar de que detectamos defectos en la proliferación de ESCs con pérdida de función de *Ints4*, no observamos cambios destacables en el perfil del ciclo celular en cultivos asíncronos

(**Figura R20, R21**). Dicho defecto proliferativo tampoco se debió a una diferenciación de las ESCs, dado que tampoco observamos cambios de expresión de marcadores de pluripotencia ni en el marcador alcalina fosfatasa tras el silenciamiento de INTS4 (**Figura R22**). El análisis transcripcional de las células *Ints4* KD a corto plazo mediante secuenciación masiva de ARN (ARN-seq) reveló genes diferencialmente expresados relacionados con apoptosis y respuesta celular a daño en el ADN (**Figura R24**). Durante el desarrollo embrionario temprano, el mantenimiento de la integridad genómica es clave para prevenir defectos genómicos o la muerte embrionaria, y es por ello que las ESCs expresan mayores niveles de proteínas relacionadas con la recombinación homóloga que las células diferenciadas³²⁴. Tras el silenciamiento de *Ints4* en las ESCs observamos una mayor acumulación de daño en el genoma, cuantificado a través del marcador γ H2AX (**Figura R29**). Es posible que si el daño producido por la pérdida de función de *Ints4* es demasiado severo y se acumula tras los días en cultivo *in vitro*, se podría inducir su muerte por apoptosis, explicando la reducción en la viabilidad celular que observamos con la pérdida de función de *Ints4* a largo plazo (**Figura R18, R19, R20, R21**). Este efecto podría deberse a alteraciones en la función del complejo Integrator independientes de TET2, ya que la pérdida de función de TET2 sí que es compatible con el mantenimiento de las ESCs en cultivo a largo plazo, a pesar de que su proliferación sí se ve ligeramente reducida comparada con células silvestres (nuestros datos y ^{69,163}).

Por otro lado, analizamos si la sobreexpresión de INTS4 afectaba en alguna medida a las ESCs. En ensayos de salida de pluripotencia con células con sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 no observamos ningún efecto en la expresión de los marcadores analizados durante la diferenciación espontánea en cultivo sin LIF (**Figura R15**), aunque sí detectamos que en diferenciación a neuroectodermo inducida por tratamiento con ácido retinoico las células con sobreexpresión de INTS4 pedían antes la expresión de los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *Sox2*, lo que parecería indicar que la sobreexpresión de INTS4 favorece la salida de pluripotencia (**Figura R16**). Estos resultados destacan la importancia de INTS4 para el mantenimiento de las células pluripotentes en cultivo, en contraposición de lo que ocurre en células somáticas.

En el año 2022, durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se reportó el primer estudio del complejo Integrator en células ESCs, que describe el papel del complejo en el proceso de terminación de la transcripción²⁸⁵. Stein y colaboradores llevaron a cabo ensayos de degradación aguda del miembro de Integrator INTS11 en ESCs mediante el sistema PROTAC³²⁵, además de ensayos de pérdida de función con siARN durante 48 horas. La depleción de INTS11 conllevó una disminución en los niveles de su interactor directo INTS4, seguramente por una pérdida de estabilidad de la proteína en ausencia de la formación del complejo. En este estudio, los ensayos de pérdida de función a largo plazo consistieron en el silenciamiento del gen por tan solo 48 horas, tal vez por incompatibilidad con el mantenimiento de las células en cultivo a más largo plazo, aunque los autores no reportan nada a este respecto. Este estudio, junto con nuestros resultados, parecen indicar una importancia clave del complejo Integrator en el mantenimiento de la pluripotencia. En el trabajo de Stein y colaboradores, con la pérdida de función de *Ints11* durante 48 horas, observaron un número similar de genes regulados al alza y a la baja, al igual que observamos nosotros con la pérdida de función de *Ints4* tras 48 horas. Sin embargo, con la pérdida de función de INTS11 a corto plazo con el sistema PROTAC (4 horas), observaron un bajo solapamiento con los genes diferencialmente

expresados con la pérdida de función a 48 horas, lo que podría indicar un número elevado de efectos inespecíficos o indirectos causados por la pérdida de función a largo plazo. De confirmarse dicha hipótesis, es probable que muchos de los genes diferencialmente expresados que vemos con la pérdida de función de *Ints4* en nuestros datos de ARN-seq (**Figura R24**) puedan deberse a efectos indirectos causados por el silenciamiento a largo plazo (48 horas) de esta proteína. Esto también explicaría el bajo solapamiento entre los genes diferencialmente expresados observados por los dos shARNs usados en esta tesis para *Ints4* (**Figura R24**). Por ello, futuros ensayos de pérdida de función de INTS4 con sistemas de degradación aguda de proteína como DEGRON³²⁶ o PROTAC serán interesantes para asegurar que los cambios transcripcionales observados tras la depleción de INTS4 son causa directa de la pérdida de función de dicha proteína. Por otro lado, el complejo Integrator es importante en el procesamiento de ARNs pequeños (como los ARN pequeños nucleares, ARNsn), que requieren de una preparación de muestra y librería, así como de análisis bioinformático específicos, y por lo tanto no han sido analizados en las condiciones en que llevamos a cabo nuestro ARN-seq. Serán necesarios futuros ensayos de ARN-seq de ARNs pequeños para comprender más en detalle el impacto del silenciamiento de *Ints4* sobre el transcriptoma pluripotente.

La pérdida de función de subunidades del complejo Integrator se ha asociado tanto con regulación a la baja como regulación al alza de genes, dado que el complejo puede tanto mediar la activación como la represión de la transcripción de sus dianas²⁷⁵. En nuestros datos de ARN-seq de células sh*Ints4*, con ambos shARNs observamos un mayor número de genes regulados a la baja que al alza (con sh*Ints4* #2 284 genes al alza y 499 regulados a la baja, y con sh*Ints4* #4 509 genes regulados al alza y 665 a la baja) (**Figura R24**). Esto podría indicar un papel de INTS4 mayor en la activación que en la represión de la expresión génica en ESCs. Por otro lado, visto que en los datos de silenciamiento de *Ints11* a 48 horas, no se detecta un mayor número de genes regulados a la baja²⁸⁵, el efecto que observamos con la pérdida de función de *Ints4* podría deberse a funciones de INTS4 independientes del resto del complejo.

Función del complejo TET2-INTS4 en ESCs

Con el objetivo de caracterizar funciones que TET2 puede desempeñar en el envejecimiento a través de INTS4, diseccionamos las posibles funciones del complejo TET2-INTS4 en las células ESCs. Primero determinamos la contribución de INTS4 a las funciones de TET2 en las células ESCs. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que TET2 es, junto con PSPC1, responsable de la represión en ESCs de genes y retrotransposones ERVL, específicos del estadio de embrión de 2 células, promoviendo la aparición de células similares a las del embrión totipotente (2CLC, del inglés “2C-like cells”)¹⁴⁸. Con la pérdida de función de *Ints4* observamos una regulación al alza de genes 2CLC, pero no un cambio generalizado de elementos MERVL o MT2, característicos de este estadio de desarrollo (**Figura R25**). Los genes 2C se expresan a niveles tan bajos en las células ESCs, que con el bajo número de lecturas obtenidas en el análisis de ARN-seq el análisis estadístico no permite obtener un valor de FDR. Es por esta razón que no podemos concluir que las diferencias observadas en la expresión de los genes 2C sean o no significativas. En línea con nuestra observación, durante la redacción de esta tesis se publicó un estudio que reportaba que el silenciamiento de *Ints11* en ESCs provoca la expresión de la firma transcriptómica de 2CLC, así como de elementos LTR como MERVL³²⁷. Por ello, los cambios que observamos en la expresión de genes característicos de

2CLC tras el silenciamiento de *Ints4* sería dependiente de su participación en el complejo Integrator, dado que son recapitulados por la delección de INTS11 también. Puesto que INTS4 actúa como unión entre el heterodímero con actividad catalítica (INTS11-INTS9) y el resto del complejo Integrator, tal vez su silenciamiento esté provocando una menor actividad catalítica por parte de INTS11. Serán necesarios análisis complementarios para verificar si INTS4 (o todo el complejo Integrator) contribuye a la función TET2 en la represión de los genes 2CLC en células pluripotentes, o si por el contrario se trata de un papel del complejo Integrator independiente de esta proteína. En el interactoma de TET2 en ESCs¹⁴⁸, no encontramos otros miembros del complejo Integrator presentes con un valor de enriquecimiento significativo en ambas réplicas, lo que sugiere que el complejo INTS4-TET2 actúa de manera independiente al resto del complejo. No obstante, dadas las limitaciones propias de la técnica, no podemos descartar que TET2 no interactúe con otras subunidades del complejo Integrator, ya que la ausencia de dichas proteínas en los datos del interactoma no significa la ausencia de interacción. Sin embargo, en la inmunoprecipitación de TET2-KI, no detectamos la presencia de INTS7 o INTS10 (**Figura R13**). Futuras validaciones serán necesarias para descartar la interacción de TET2 con otras subunidades del complejo Integrator.

Por otro lado, se ha demostrado que TET2 juega un papel crítico en la regulación del estado pluripotente *naïve*¹⁶². Por ello, analizamos la expresión de la firma transcriptómica de este estado pluripotente^{162,289} en las células ESCs con pérdida de función de *Ints4*, y no observamos cambios significativos en su expresión con respecto a las células control (**Figura R26**). En línea con esto, observamos que, aunque *Tet2* está enriquecido en ESCs en su estado de pluripotencia *naïve* comparado con otros estados pluripotentes¹⁶², *Ints4* muestra niveles de expresión similares en todos ellos, al menos a nivel de ARN (**Figura R26**). En base a estos datos podemos concluir que INTS4 no contribuye a la función de TET2 en la regulación del estado pluripotente *naïve*.

Estudios previos del laboratorio han demostrado que la ausencia de la proteína de unión al ARN PSPC1 compromete el reclutamiento de TET2 a la cromatina en ESCs¹⁴⁸. Por ello, nos preguntamos si INTS4 también podría contribuir a su reclutamiento al ADN. Mediante fraccionamiento subcelular estudiamos las fracciones nuclear soluble y unida a cromatina de células con *shLuci* y *shInts4*. Mientras que no observamos diferencias en la abundancia de TET2 en la fracción celular soluble, sí detectamos una reducción de la fracción de TET2 asociada a cromatina en las células con niveles reducidos de *Ints4* (**Figura R27**), sugiriendo que INTS4 participaría en el reclutamiento de TET2 a la cromatina en ESCs. Para determinar si INTS4 participa en la regulación llevada a cabo por el complejo TET2-PSPC1, analizamos el solapamiento entre los genes diferencialmente expresados con la pérdida de función de *Ints4*, y las dianas de ARN de TET2 y de PSPC1, y lo comparamos además con los genes diferencialmente expresados en células *Pspc1* KD. El complejo TET2-INTS4 parece ser independiente del complejo que forma TET2 con PSPC1, ya que el solapamiento entre los 153 genes diferencialmente expresados con la pérdida de función de *Ints4* que son dianas de TET2 y las dianas de ARN de PSPC1 es de únicamente 34 transcritos, y el número de genes diferencialmente expresados comunes entre *Ints4* KD y *Pspc1* KD es únicamente de 12 (**Figura R30**). No obstante, es posible que exista alguna función biológica común entre Integrator y PSPC1, con TET2 como potencial nexo entre ambos. De hecho, se sabe que PSPC1 interacciona con el dominio C-terminal de la ARN polimerasa II³²⁸, que a su vez interactúa estrechamente

con el complejo Integrator. En ESCs, PSPC1 es necesario para el correcto funcionamiento de la polimerasa, ya que inhibe la liberación prematura de PolII³²⁸. Aunque en nuestros experimentos nunca detectamos la interacción de PSPC1 e INTS4 a nivel de proteína (datos no mostrados) futuros estudios serán necesarios para explorar esta interconexión entre Integrator y PSPC1, y si TET2 desempeña un papel en la misma.

Puesto que observamos que INTS4 participa en el reclutamiento de TET2 a la cromatina, decidimos explorar posibles dianas en cromatina del complejo INTS4-TET2. Para ello, estudiamos el solapamiento entre las dianas de TET2 en cromatina (identificadas por ChIP-seq³²⁹) y los genes cuya expresión se altera con el silenciamiento de *Ints4* (esta tesis). Observamos que más de la mitad de los genes diferencialmente expresados en células sh*Ints4* son dianas de TET2 en cromatina³²⁹ y que éstas están principalmente relacionadas con respuesta a daño en ADN. Mediante un análisis ChEA, comprobamos que 62 de esos genes son además dianas del factor de transcripción MYC. En línea con esta observación, un estudio previo reportó que, en células U2OS, TET2 era reclutado a genes de respuesta a daño en ADN que son dianas del factor de transcripción MYC, aunque en este caso a través del factor SNIP1²⁹⁴. Por ello, analizamos el enriquecimiento de las dianas de MYC en los transcriptomas de nuestras células. Observamos que los genes diana de MYC se encuentran más enriquecidos en las células sh*Luci*, presentando menor expresión en células tratadas con sh*Ints4* y por lo tanto sugiriendo un papel activador de su transcripción mediado por INTS4 (**Figura R28**). De entre las dianas de MYC que codificaban para proteínas involucradas en respuesta a daño en el ADN, elegimos *Brca1*, *Atrx*, *Xrcc5* y *Atm* para su validación. Observamos que estos genes muestran menor expresión en células con pérdida de función de *Ints4* y en algunos casos también de *Tet2*, y además poseen picos de unión en cromatina de TET2 y MYC en las mismas posiciones (**Figura R28**). En base a estos resultados, nos planteamos la posibilidad de un modelo análogo al reportado por Chen y colaboradores en las células U2OS, en el que INTS4 media el reclutamiento de TET2 a las dianas de MYC para la inducción de la expresión de genes de respuesta y reparación de daño en ADN (**Figura D1**). En células con pérdida de función de *Ints4* o de *Tet2*, la expresión de los genes de respuesta a daño en ADN se encuentra reducida, por lo que la reparación del ADN sería deficiente y por ello se produciría la acumulación de daño en el genoma, detectada a través del aumento de los niveles de γ H2AX, observada (**Figura R29**). Se sabe que la pérdida de función de *Brca1* incrementa los niveles de γ H2AX³³⁰, al igual que la pérdida de función de *Xrcc5*³³¹ y de *Atrx*³³². Con el objeto de validar nuestro modelo, analizamos *in silico* los 153 genes diferencialmente expresados tras la depleción de *Ints4* que son dianas de TET2 en cromatina. Comprobamos que el 58% de estos genes son también unidos por TET2 a nivel de ARN, pero de estos únicamente 7 se ha reportado como portadores de la modificación hm⁵C (**Figura R30**), sugiriendo que la regulación del complejo TET2-INTS4 es independiente de la actividad catalítica de TET2 sobre el ARN. Finalmente comprobamos si los transcritos de los genes de reparación del ADN candidatos (*Brca1*, *Xrcc5*, *Atrx* y *Atm*), además de estar unidos por TET2, están unidos por INTS4 a nivel de ARN. Sin embargo, mediante CLIP-qPCR solo fuimos capaces de detectar el transcrito de *Xrcc5* entre los ARNs unidos por INTS4 de forma directa (**Figura R30**), sugiriendo que TET2 sería en este caso el responsable de la interacción con estos ácidos nucleicos.

En el estudio de Stein y colaboradores, tras la degradación aguda (4 horas) de INTS11 detectan un incremento en la expresión de varios factores de transcripción, entre los que se

encuentra *Myc*²⁸⁵. Por ello, nos planteamos si los cambios transcripcionales podrían deberse al aumento de expresión de MYC de forma indirecta, y no a la regulación transcripcional de los mismos por parte de INTS4-TET2. Sin embargo, en las células ESCs + sh*Ints4* no observamos variación en la expresión de *Myc*, indicando un efecto directo de INTS4-TET2 en la regulación de dichas dianas.

Hasta el momento, no se ha reportado un papel de INTS4 en la reparación del ADN. Sin embargo, otras subunidades del complejo Integrator sí han sido relacionadas con complejos de reparación del ADN²⁰⁷. En concreto, tanto INTS3 como INTS6 interactúan con el complejo SOSS1, y se ha demostrado que son necesarios para su correcta localización y/o función de reparación de roturas de cadena doble del ADN^{207,243}. En los datos del interactoma de TET2 en ESCs¹⁴⁸ no se detectó la presencia de péptidos de INTS3 ni de INTS6 como proteínas interactoras de TET2. Además, la función de INTS3 e INTS6 en el complejo SOSS1 es a nivel de reparación del ADN, mientras que la función de TET2-INTS4 que nosotros reportamos es a nivel de activación transcripcional de genes implicados en la respuesta a daño en el ADN. Por todo ello, cabe pensar que el papel del complejo TET2-INTS4 en la reparación del ADN es independiente del llevado a cabo por INTS3 e INTS6. Con respecto a TET2, hay varios estudios que parecen indicar que podría desempeñar un papel en la reparación del ADN. En particular, un estudio de Kafer y colaboradores describe un enriquecimiento de 5hmC formado por TET2 en focos de daño en el ADN, así como una regulación a la baja de *Brca2*, un regulador clave de la reparación del ADN, en células HeLa²⁹⁵. Además, el trabajo de Chen y colaboradores describe el papel de TET2 a través de MYC y SNIP1 en la regulación de la respuesta a daño en el ADN para prevenir la apoptosis inducida por daño en el genoma en células U2OS²⁹⁴. En línea con estos estudios, nuestros resultados muestran como algunas dianas de TET2 en cromatina están relacionadas con reparación de ADN, y la depleción de TET2 provoca un aumento en el marcador de daño genómico γ H2AX. MYC es un factor de transcripción que regula un elevado número de genes involucrados en una gran variedad de procesos biológicos. De hecho, entre los genes regulados por MYC se encuentran varios genes de reparación de daño en el ADN, como son *Rad51*, *Rad51b*, *Rad51c*, *Xrcc2*, *Rad50*, *Brca1*, *Brca1*, *Xrcc4*, *Xrcc5* o la ligasa de ADN IV³³³, y esta función de MYC ha sido demostrada en una gran variedad de tipos celulares, desde fibroblastos hasta células tumorales³³³⁻³³⁶. En ESCs, empleando datos públicamente disponibles de ChIP-seq de MYC²⁹⁶, observamos que MYC también se encuentra unido a regiones promotoras de genes de reparación de daño en ADN (**Figura R27**), apoyando nuestra hipótesis de su implicación en la regulación de la expresión de genes importantes para la reparación del ADN co-regulados por INTS4 y TET2.

Teniendo en cuenta los datos previamente comentados, planteamos un modelo en el que INTS4 es responsable del reclutamiento a TET2 a regiones genómicas diana del factor de transcripción MYC, codificantes para genes de respuesta a daño en el ADN (**Figura D1**). Este reclutamiento de TET2 a los genes de respuesta a daño en el ADN, promueve su expresión, promoviendo una correcta reparación del daño en el genoma. En células con pérdida de función de *Ints4* o de *Tet2*, la expresión de los genes de respuesta a daño en el ADN se ve disminuida, lo que conllevaría una menor eficiencia en la reparación del daño genómico con la consecuente acumulación de daño en el genoma y del marcador γ H2AX (**Figura D1**). Sería esperable entonces que durante el envejecimiento, la reducción en la expresión de *Tet2* y de *Ints4* (**Figura R10**) conllevara una menor presencia de TET2 en la cromatina (**Figura R27**), impidiendo la

correcta activación de sus genes diana, ejemplificado por el gen del factor de reparación de ADN *Xrcc5*. Como consecuencia, podrían generarse defectos en la reparación de daño genómico, contribuyendo a este marcador del envejecimiento. Serán necesarios futuros estudios para validar si el declive en la función del complejo TET2-INTS4 asociado a la acumulación de daño en el ADN contribuye al envejecimiento celular a través de la generación de inestabilidad genómica. Este mecanismo además puede ser también muy relevante en situaciones patológicas como el cáncer donde se sabe que existen alteraciones en la función de TET2^{145,337}, además de existir defectos en la maquinaria de reparación del ADN que dan lugar a inestabilidad genómica³³⁸

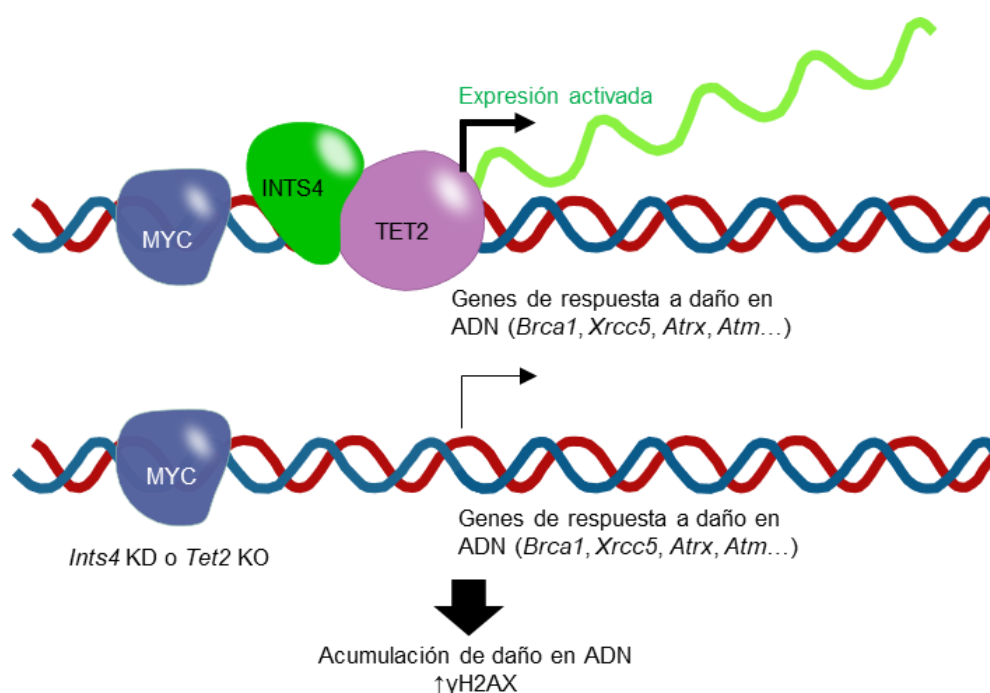


Figura D1. Modelo propuesto de la función del complejo INTS4-TET2 en la regulación de genes de respuesta a daño en ADN.

Función de enzimas modificadoras de ARN en envejecimiento de *C. elegans*.

C. elegans es un organismo modelo ampliamente empleado en estudios de envejecimiento por sus múltiples ventajas, como son su fácil manipulación, su corto periodo de vida y el extenso conocimiento que se tiene sobre su biología^{21,339}. Con el objetivo de estudiar el impacto de las modificaciones de ARN en el envejecimiento *in vivo*, decidimos llevar a cabo la pérdida de función de enzimas escritoras de m⁵C, m⁶A o A-to-I en *C. elegans* seguidos de ensayos de fertilidad, estrés por calor y longevidad. Por otro lado, puesto que *C. elegans* carece de ortólogos de las enzimas TET decidimos abordar indirectamente su estudio a través de la caracterización de algunos de los interactores de TET2 candidatos identificados en esta tesis doctoral que están conservados en el nematodo (Figura R32). Observamos que el silenciamiento de *pccb-1* y *otub-4*, ortólogos de interactores de TET2 de ratón, causaban un retraso en el periodo fértil de los nematodos sin impacto en el número total de descendencia (Figura R33). Algunos estudios indican la relación entre el retraso en la fertilidad y el desarrollo del animal y un incremento en la vida media de *C. elegans*^{23,26}, por lo que nuestros

datos sugieren que *pccb-1* y *otub-4* podrían tener también impacto en la longevidad de este organismo modelo. Por otro lado, la pérdida de función de *lev-11* redujo drásticamente el número de descendencia de los nematodos (**Figura R33**), lo cual coincide con el fenotipo reportado por otros estudios^{340,341}, resaltando la importancia de *lev-11* en el sistema reproductivo de *C. elegans*. Además, observamos una mayor resistencia al estrés por calor y una menor longevidad con el silenciamiento de *lev-11* (**Figura R33**). Son numerosos los estudios que relacionan la respuesta a varios tipos de estrés con el incremento de la vida media de *C. elegans*³⁴²⁻³⁴⁵. Generalmente, un incremento en la supervivencia en respuesta a un estrés se relaciona con un incremento en la longevidad. Sin embargo, con el silenciamiento de *lev-11* observamos lo contrario, una mayor resistencia a estrés y una reducción en la longevidad. La relación entre respuesta a estrés y longevidad es compleja, por lo que no siempre una mayor tolerancia a estrés se traduce en un incremento en la longevidad de *C. elegans*^{308,309}, y el silenciamiento de *lev-11* podría ser uno de esos casos. En modelos murinos se ha descrito TPM1 (ortólogo de *lev-11*) como un factor sistémico pro-envejecimiento, con potencial rol en enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad³⁴⁶. En ese estudio, se redujeron los niveles de TPM1 mediante su neutralización con anticuerpos con inyecciones retroorbitales, de forma que el efecto que observan era muy localizado. Es posible que nosotros observásemos una muerte prematura de los nematodos con pérdida de función de *lev-11* debido a defectos en la movilidad de los animales que ha sido reportada anteriormente³⁴⁷. Futuros estudios en los que se lleve a cabo la pérdida de función de *lev-11* de forma localizada en los nematodos, o se incrementen los niveles de proteína confirmarán si el ortólogo del enzima interactor de TET2, *lev-11*, también actúa como factor pro-envejecimiento en *C. elegans*.

Además de proteínas interactoras de TET2, estudiamos el papel en el envejecimiento de *C. elegans* de enzimas modificadoras del ARN descritas en este organismo modelo. En concreto estudiamos el impacto de la pérdida de función de las enzimas *nsun-5*, *metl-5* y *adr-2*. El silenciamiento de *nsun-5*, enzima escritora de m⁵C en ARNr, no tuvo impacto sobre la fertilidad del animal ni sobre la respuesta a estrés por calor, aunque sí observamos un incremento en la longevidad de *C. elegans* (**Figura R34**). En la cepa *eat-2*, utilizada como modelo de restricción calórica, el tratamiento con *nsun-5* ARNi llevó a un incremento en la resistencia a estrés por calor, sin efecto en la longevidad (**Figura R34**). Estos resultados están en contraposición con lo observado por Schosserer y colaboradores¹⁴¹, que reportaron un incremento en la longevidad de *C. elegans* tras la pérdida de función de *nsun-5* únicamente en condiciones de restricción calórica o de nutrientes. Además, Schosserer y colaboradores demostraron una mayor resistencia al estrés oxidativo en *C. elegans* N2 + *nsun-5* ARNi¹⁴¹. En este caso, al tratarse de un tipo de estrés diferente el fenotipo observado con la pérdida de función puede variar. Las diferencias entre los resultados observados por Schosserer y colaboradores y nuestros datos pueden deberse a múltiples factores. En primer lugar, las condiciones de los ensayos de pérdida de función mediante ARNi son diferentes, pudiendo explicar las diferencias fenotípicas. Además, se ha descrito una alta variabilidad entre laboratorios en parámetros como la esperanza de vida de los nematodos, a pesar de emplear condiciones de cultivo similares que limita en muchos casos la comparación de datos así como su reproducibilidad³⁴⁸. Recientes estudios resaltan el papel de m⁵C en la eficiencia de la traducción, y asocian defectos en esta marca con alteraciones en la función ribosomal^{141,143}, lo cual desencadena una respuesta a estrés y con ello incrementa la esperanza de vida de los animales¹⁴¹. Integrando estos estudios con nuestros

datos, donde observamos un incremento en la longevidad y en la tolerancia a estrés por calor de los nematodos, hipotetizamos el papel pro-envejecimiento de *nsun-5* y m^5C en *C. elegans*.

Por otro lado, el silenciamiento de *adr-2*, enzima escritora de la modificación A-to-I en *C. elegans*, no tuvo efecto sobre la fertilidad del animal, pero sí incrementó su resistencia a estrés por calor y su longevidad (**Figura R35**). Sebastiani y colaboradores observaron que el silenciamiento de *adr-1* y *adr-2* causa una reducción en la longevidad de *C. elegans*¹⁴⁰. No obstante, recientemente se ha demostrado que *adr-1* no es catalíticamente activa, y que además tiene funciones en el desarrollo de *C. elegans* que no están relacionadas con la edición del ARN³⁴⁹. Esto podría estar afectando al fenotipo observado por Sebastiani y colaboradores, siendo las conclusiones derivadas de su ensayo de longevidad no comparables con las nuestras. Además, demuestran que la pérdida de función de *adr-2* incrementó la esperanza de vida de los nematodos e hipotetizan que pueda ser a través de la pérdida total de A-to-I³⁴⁹. Este resultado, que está en línea con el fenotipo que hemos observado con el silenciamiento de *adr-2* en nuestros ensayos, apoya la hipótesis de que *adr-2* y A-to-I desempeñan un papel pro-envejecimiento en *C. elegans*.

Finalmente, analizamos la pérdida de función de *metl-5*, enzima escritora de m^6A en ARN ribosómico en *C. elegans*. Observamos que su depleción no afecta al número total de descendencia, pero sí retrasa la fertilidad del animal. Por otro lado, el silenciamiento de *metl-5*, no aumenta la resistencia a estrés por calor, pero si se incrementa la longevidad de *C. elegans* en un 10% (**Figura R36**). El retraso en el periodo fértil de *C. elegans* podría deberse a un retraso en el desarrollo del animal, que a su vez se produce en una extensión en la esperanza de vida. Estudios previos de Liberman y colaboradores observaron que las cepas mutantes para *metl-5* mostraron mayor resistencia a varios tipos de estrés, entre los que se encuentra el estrés por calor¹³¹. Es probable que la diferencia en la tolerancia a estrés por calor entre este estudio y el nuestro se deba a que ellos testaron nematodos mutantes, mientras que nosotros llevamos a cabo la pérdida de función mediante ARNi en gusanos silvestres. Nuestros resultados, junto con los de Liberman y colaboradores, indican el papel de *metl-5* y m^6A como factores pro-longevidad. Futuros estudios serán necesarios para determinar la abundancia de cada una de las marcas estudiadas tras el silenciamiento con ARNi, y demostrar si por tanto los efectos observados en parámetros de salud o longevidad son debidos a la alteración en las modificaciones de ARN.

En mamífero se ha visto que existe una regulación cruzada de m^6A y A-to-I³¹¹. Para determinar si esto también ocurre en el nematodo, llevamos a cabo la pérdida de función de varias enzimas modificadoras de ARN de dos en dos (dobles *knock-down*), para estudiar la posible relación entre estas modificaciones epitranscriptómicas. A pesar de que no observamos un efecto sobre la fertilidad de los animales, todas las combinaciones de doble *knock-down* incrementaron la resistencia a estrés por calor (**Figura R37**). La mayor resistencia a estrés por calor fue observada con el silenciamiento de *adr-2* + *metl-5* o *adr-2* + *nsun-5*, pudiendo esto deberse al efecto del silenciamiento de *adr-2*. Sin embargo, el fenotipo de *metl-5* + *nsun-5* no se corresponde con lo observado con el silenciamiento de cada uno de los genes por separado, por lo que sugeriría una sinergia de la pérdida de función de las dos enzimas modificadoras del ARN.

En conjunto, estos resultados indican un papel tanto de las enzimas modificadoras del ARN como de algunos de los interactores de TET2 en la regulación de la longevidad y

parámetros de salud de *C. elegans*. Serán necesarios estudios adicionales para abordar más profundamente la importancia de las modificaciones del ARN en el envejecimiento *in vitro* e *in vivo* y diseccionar la alteración que éstas sufren con el paso del tiempo. Descifrar el papel que desempeñan las modificaciones químicas del ARN en el envejecimiento, así como descifrar los patrones de modificación del transcriptoma y cómo varían con el paso del tiempo, dada la reversibilidad de las modificaciones epitranscriptómicas, será clave para su uso como potenciales dianas terapéuticas de un envejecimiento más saludable.

9. CONCLUSIONES

1. Los cultivos de fibroblastos derivados de orejas y colas de ratones jóvenes (2 meses) y viejos (28 meses) son un buen modelo para el estudio del envejecimiento *in vitro*.
2. No existen diferencias significativas en los niveles globales de m⁵C y hm⁵C en ARN ribodeplecionado de fibroblastos jóvenes y viejos.
3. La inmortalización de fibroblastos jóvenes y viejos mediante silenciamiento de P53 no es un buen modelo de envejecimiento, dado que altera marcadores asociados con la edad, así como la expresión de enzimas modificadoras o lectoras de las marcas epitranscriptómicas m⁵C y hm⁵C.
4. La pérdida de función de *Ints4* es incompatible con el mantenimiento de las ESCs debido a defectos en la proliferación celular pero no en el ciclo celular.
5. INTS4 contribuye al reclutamiento de TET2 a la cromatina
6. La pérdida de función de *Ints4* altera la expresión de genes diana de TET2 y MYC relacionados con respuesta a daño en ADN.
7. La pérdida de función de *Ints4* o *Tet2* incrementa el daño en ADN en células troncales embrionarias.
8. El silenciamiento de los interactores de TET2 en ESC, *pccb-1*, *otub-4* o *lev-11* en *C. elegans* produce defectos en la fertilidad.
9. El silenciamiento de *lev-11* causa una reducción en la longevidad y un aumento de la resistencia a estrés por calor en *C. elegans*.
10. El silenciamiento de enzimas modificadoras de m⁵C, m⁶A y A-to-I en ARN en *C. elegans* altera fenotipos relacionados con el envejecimiento, tales como la longevidad, el periodo fértil y/o la resistencia a estrés por calor.

10.CONCLUSIONS

1. Fibroblast cultures derived from ears and tails from young (2 months) and old (28 months) mice are a good model for the study of ageing *in vitro*.
2. There are no significant differences in the global levels of m⁵C or hm⁵C in ribodepleted RNA from young and old fibroblasts.
3. Immortalization of young and old fibroblasts through the silencing of P53 is not a good model for the study of ageing, since it alters ageing-associated markers, as well as the expression of enzymes that modify or read the epitranscriptomic marks m⁵C and hm⁵C.
4. Loss of function of *Ints4* is incompatible with ESCs maintenance due to defects in cell proliferation but not in cell cycle.
5. INTS4 contributes to the recruitment of TET2 to chromatin.
6. Loss of function of *Ints4* alters the expression of TET2 and MYC target genes, related to DNA damage response.
7. Loss of function of *Ints4* or *Tet2* increases DNA damage accumulation in embryonic stem cells.
8. Silencing of TET2 interactors *pccb-1*, *otub-4*, or *lev-11* in *C. elegans* causes fertility defects.
9. Silencing of *lev-11* KD reduces longevity and increases heat stress resistance in *C. elegans*.
10. Silencing of m⁵C, m⁶A and A-to-I modifying enzymes in *C. elegans* alters ageing-related phenotype, such as longevity, fertility and/or heat stress resistance.

11.BIBLIOGRAFÍA

- 1 Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217, doi:10.1016/j.cell.2013.05.039 (2013).
- 2 Niccoli, T. & Partridge, L. Ageing as a risk factor for disease. *Current Biology* 22, R741-752, doi:10.1016/j.cub.2012.07.024 (2012).
- 3 Modig, K., Andersson, T., Vaupel, J., Rau, R. & Ahlbom, A. How long do centenarians survive? Life expectancy and maximum lifespan. *Journal of internal medicine* 282, 156-163, doi:10.1111/joim.12627 (2017).
- 4 Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186, 243-278, doi:10.1016/j.cell.2022.11.001 (2023).
- 5 Schmauck-Medina, T. *et al.* New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging* 14, 6829-6839 (2022).
- 6 Gems, D. & de Magalhaes, J. P. The hoverfly and the wasp: A critique of the hallmarks of aging as a paradigm. *Ageing Research Reviews* 70, 101407, doi:10.1016/j.arr.2021.101407 (2021).
- 7 Coppede, F. Mutations Involved in Premature-Ageing Syndromes. *The Application of Clinical Genetics* 14, 279-295, doi:10.2147/TACG.S273525 (2021).
- 8 Kudlow, B. A., Kennedy, B. K. & Monnat, R. J., Jr. Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 394-404, doi:10.1038/nrm2161 (2007).
- 9 Tigges, J. *et al.* The hallmarks of fibroblast ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 138, 26-44, doi:10.1016/j.mad.2014.03.004 (2014).
- 10 Salzer, M. C. *et al.* Identity Noise and Adipogenic Traits Characterize Dermal Fibroblast Aging. *Cell* 175, 1575-1590 e1522, doi:10.1016/j.cell.2018.10.012 (2018).
- 11 Mahmoudi, S. *et al.* Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. *Nature* 574, 553-558, doi:10.1038/s41586-019-1658-5 (2019).
- 12 LaRocca, T. J., Cavalier, A. N. & Wahl, D. Repetitive elements as a transcriptomic marker of aging: Evidence in multiple datasets and models. *Aging Cell* 19, e13167, doi:10.1111/accel.13167 (2020).
- 13 Fleischer, J. G. *et al.* Predicting age from the transcriptome of human dermal fibroblasts. *Genome Biology* 19, 221, doi:10.1186/s13059-018-1599-6 (2018).
- 14 Marthandan, S. *et al.* Conserved Senescence Associated Genes and Pathways in Primary Human Fibroblasts Detected by RNA-Seq. *PLoS One* 11, e0154531, doi:10.1371/journal.pone.0154531 (2016).
- 15 Vidal, R. *et al.* Transcriptional heterogeneity of fibroblasts is a hallmark of the aging heart. *JCI Insight* 4, doi:10.1172/jci.insight.131092 (2019).
- 16 Lee, Y. & Shivashankar, G. V. Analysis of transcriptional modules during human fibroblast ageing. *Science Reports* 10, 19086, doi:10.1038/s41598-020-76117-y (2020).
- 17 Minter, C. *et al.* Cellular aging in vitro recapitulates multi-tissue epigenetic aging in vivo. *BioRxiv*, doi:10.1101/2020.09.02.280073 (2021).
- 18 de Magalhaes, J. P. & Passos, J. F. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 170, 2-9, doi:10.1016/j.mad.2017.07.001 (2018).
- 19 Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585-621 (1961).

- 20 Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22, 75-95, doi:10.1038/s41580-020-00314-w (2021).
- 21 Shen, P., Yue, Y. & Park, Y. A living model for obesity and aging research: *Caenorhabditis elegans*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58, 741-754, doi:10.1080/10408398.2016.1220914 (2018).
- 22 Cook, S. J. *et al.* Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* 571, 63-71, doi:10.1038/s41586-019-1352-7 (2019).
- 23 Scharf, A., Pohl, F., Egan, B. M., Kocsisova, Z. & Kornfeld, K. Reproductive Aging in *Caenorhabditis elegans*: From Molecules to Ecology. *Front Cell Dev Biol* 9, 718522, doi:10.3389/fcell.2021.718522 (2021).
- 24 Cypser, J. R., Tedesco, P. & Johnson, T. E. Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology* 41, 935-939, doi:10.1016/j.exger.2006.09.004 (2006).
- 25 Soo, S. K. *et al.* Genetic basis of enhanced stress resistance in long-lived mutants highlights key role of innate immunity in determining longevity. *Aging Cell* 22, e13740, doi:10.1111/accel.13740 (2023).
- 26 Szewczyk, N. J. *et al.* Delayed development and lifespan extension as features of metabolic lifestyle alteration in *C. elegans* under dietary restriction. *The Journal of experimental biology* 209, 4129-4139, doi:10.1242/jeb.02492 (2006).
- 27 Mahmoudi, S., Xu, L. & Brunet, A. Turning back time with emerging rejuvenation strategies. *Nat Cell Biol* 21, 32-43, doi:10.1038/s41556-018-0206-0 (2019).
- 28 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- 29 Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).
- 30 Suhr, S. T. *et al.* Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PLoS One* 5, e14095, doi:10.1371/journal.pone.0014095 (2010).
- 31 Lapasset, L. *et al.* Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes and Development* 25, 2248-2253, doi:10.1101/gad.173922.111 (2011).
- 32 Miller, J. D. *et al.* Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 13, 691-705, doi:10.1016/j.stem.2013.11.006 (2013).
- 33 Mertens, J. *et al.* Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects. *Cell Stem Cell* 17, 705-718, doi:10.1016/j.stem.2015.09.001 (2015).
- 34 Abad, M. *et al.* Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340-345, doi:10.1038/nature12586 (2013).
- 35 Parras, A. *et al.* In vivo reprogramming leads to premature death due to hepatic and intestinal failure. *BioRxiv*, doi:10.1101/2022.05.27.493700 (2022).
- 36 Sarkar, T. J. *et al.* Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nature Communications* 11, 1545, doi:10.1038/s41467-020-15174-3 (2020).
- 37 Roux, A. E. *et al.* Diverse partial reprogramming strategies restore youthful gene expression and transiently suppress cell identity. *Cell Systems* 13, 574-587 e511, doi:10.1016/j.cels.2022.05.002 (2022).

- 38 Gill, J. *et al.* Multi- omic rejuvenation of human cells by maturation phase transient reprogramming. *eLife* 11, 1-23 (2022).
- 39 Ocampo, A. *et al.* In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* 167, 1719-1733 e1712, doi:10.1016/j.cell.2016.11.052 (2016).
- 40 Hishida, T. *et al.* In vivo partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration. *Cell Reports* 39, 110730, doi:10.1016/j.celrep.2022.110730 (2022).
- 41 Browder, K. C. *et al.* In vivo partial reprogramming alters age-associated molecular changes during physiological aging in mice. *Nature Aging* 2, 243-253, doi:10.1038/s43587-022-00183-2 (2022).
- 42 Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed., (Garland Science/Taylor & Francis LLC, 2015).
- 43 Martello, G. & Smith, A. The nature of embryonic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology* 30, 647-675, doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013116 (2014).
- 44 Marks, H. *et al.* The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149, 590-604, doi:10.1016/j.cell.2012.03.026 (2012).
- 45 Neagu, A. *et al.* In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states. *Nat Cell Biol* 22, 534-545, doi:10.1038/s41556-020-0508-x (2020).
- 46 Smith, A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Development* 144, 365-373, doi:10.1242/dev.142679 (2017).
- 47 Nichols, J. & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4, 487-492, doi:10.1016/j.stem.2009.05.015 (2009).
- 48 Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N. & Hanna, J. H. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 155-169, doi:10.1038/nrm.2015.28 (2016).
- 49 Devika, A. S., Wruck, W., Adjaye, J. & Sudheer, S. The quest for pluripotency: a comparative analysis across mammalian species. *Reproduction (Cambridge, England)* 158, R97-r111, doi:10.1530/rep-18-0083 (2019).
- 50 Macfarlan, T. S. *et al.* Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* 487, 57-63, doi:10.1038/nature11244 (2012).
- 51 Feltes, B. C., de Faria Poloni, J. & Bonatto, D. Development and aging: two opposite but complementary phenomena. *Interdisciplinary topics in gerontology* 40, 74-84, doi:10.1159/000364932 (2015).
- 52 Scaffidi, P. & Misteli, T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11, 440-445, doi:10.1038/nm1204 (2005).
- 53 Scaffidi, P. & Misteli, T. Lamin A–Dependent Nuclear Defects in Human Aging. *Science* 312, 1059-1063 (2006).
- 54 Moskowitz, D. M. *et al.* Epigenomics of human CD8 T cell differentiation and aging. *Science Immunology* 2, 1-13 (2017).
- 55 Ucar, D. *et al.* The chromatin accessibility signature of human immune aging stems from CD8(+) T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 214, 3123-3144, doi:10.1084/jem.20170416 (2017).
- 56 Zhang, W. *et al.* A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science* 348, 1160-1163 (2015).

- 57 McCord, R. P. *et al.* Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome Res* 23, 260-269, doi:10.1101/gr.138032.112 (2013).
- 58 Ni, Z., Ebata, A., Alipanahramandi, E. & Lee, S. S. Two SET domain containing genes link epigenetic changes and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 11, 315-325, doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00785.x (2012).
- 59 Wood, J. G. *et al.* Chromatin remodeling in the aging genome of *Drosophila*. *Aging Cell* 9, 971-978, doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00624.x (2010).
- 60 Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R. & Berger, S. L. Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell* 166, 822-839, doi:10.1016/j.cell.2016.07.050 (2016).
- 61 Greer, E. L. *et al.* Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 479, 365-371, doi:10.1038/nature10572 (2011).
- 62 Maures, T. J., Greer, E. L., Hauswirth, A. G. & Brunet, A. The H3K27 demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* lifespan in a germline-independent, insulin-dependent manner. *Aging Cell* 10, 980-990, doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00738.x (2011).
- 63 Siebold, A. P. *et al.* Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 169-174, doi:10.1073/pnas.0907739107 (2010).
- 64 Cheung, P. *et al.* Single-Cell Chromatin Modification Profiling Reveals Increased Epigenetic Variations with Aging. *Cell* 173, 1385-1397.e1314, doi:10.1016/j.cell.2018.03.079 (2018).
- 65 Martinez-Jimenez, C. P. *et al.* Aging increases cell-to-cell transcriptional variability upon immune stimulation. *Science* 355, 1433–1436 (2017).
- 66 Enge, M. *et al.* Single-Cell Analysis of Human Pancreas Reveals Transcriptional Signatures of Aging and Somatic Mutation Patterns. *Cell* 171, 321-330 e314, doi:10.1016/j.cell.2017.09.004 (2017).
- 67 Bestor, T. H. & Ingram, V. M. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: Purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 5559-5563 (1983).
- 68 Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99, 247–257.
- 69 Ito, S. *et al.* Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466, 1129-1133, doi:10.1038/nature09303 (2010).
- 70 Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 324, 930-935 (2009).
- 71 Ito, S. *et al.* Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 333, 1300-1303, doi:10.1126/science.1210597 (2011).
- 72 Maiti, A. & Drohat, A. C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* 286, 35334-35338, doi:10.1074/jbc.C111.284620 (2011).
- 73 He, Y. F. *et al.* Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. *Science* 333, 1303-1307 (2011).
- 74 Hannum, G. *et al.* Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular Cell* 49, 359-367, doi:10.1016/j.molcel.2012.10.016 (2013).

- 75 McClay, J. L. *et al.* A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects. *Hum Mol Genet* 23, 1175-1185, doi:10.1093/hmg/ddt511 (2014).
- 76 Bollati, V. *et al.* Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mechanisms of Ageing and Development* 130, 234-239, doi:10.1016/j.mad.2008.12.003 (2009).
- 77 Heyn, H. *et al.* Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 10522-10527, doi:10.1073/pnas.1120658109 (2012).
- 78 Sidler, C., Kovalchuk, O. & Kovalchuk, I. Epigenetic Regulation of Cellular Senescence and Aging. *Front Genet* 8, 138, doi:10.3389/fgene.2017.00138 (2017).
- 79 Jung, M. & Pfeifer, G. P. Aging and DNA methylation. *BMC Biology* 13, 7, doi:10.1186/s12915-015-0118-4 (2015).
- 80 Lee, J. Y. & Lee, T. H. Effects of DNA methylation on the structure of nucleosomes. *J Am Chem Soc* 134, 173-175, doi:10.1021/ja210273w (2012).
- 81 Nan, X. *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389 (1998).
- 82 Koch, C. M. & Wagner, W. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging* 3, 1-10 (2011).
- 83 Bocklandt, S. *et al.* Epigenetic predictor of age. *PLoS One* 6, e14821, doi:10.1371/journal.pone.0014821 (2011).
- 84 Horvath, S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14, 1-19 (2013).
- 85 Kerepesi, C., Zhang, B., Lee, S. G., Trapp, A. & V.N., G. Epigenetic clocks reveal a rejuvenation event during embryogenesis followed by aging. *Science Advances* 7, 1-11 (2021).
- 86 Cappannini, A. *et al.* MODOMICS: a database of RNA modifications and related information. 2023 update. *Nucleic Acids Res* 52, D239-d244, doi:10.1093/nar/gkad1083 (2024).
- 87 Lewis, C. J., Pan, T. & Kalsotra, A. RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 202-210, doi:10.1038/nrm.2016.163 (2017).
- 88 Eisenberg, E. & Levanon, E. Y. A-to-I RNA editing - immune protector and transcriptome diversifier. *Nature Reviews Genetics* 19, 473-490, doi:10.1038/s41576-018-0006-1 (2018).
- 89 Liu, J. *et al.* A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology* 10, 93-95, doi:10.1038/nchembio.1432 (2014).
- 90 Shima, H. *et al.* S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N(6)-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Reports* 21, 3354-3363, doi:10.1016/j.celrep.2017.11.092 (2017).
- 91 Mendel, M. *et al.* Methylation of Structured RNA by the m(6)A Writer METTL16 Is Essential for Mouse Embryonic Development. *Molecular Cell* 71, 986-1000 e1011, doi:10.1016/j.molcel.2018.08.004 (2018).
- 92 Pendleton, K. E. *et al.* The U6 snRNA m(6)A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell* 169, 824-835 e814, doi:10.1016/j.cell.2017.05.003 (2017).

- 93 Brown, J. A., Kinzig, C. G., DeGregorio, S. J. & Steitz, J. A. Methyltransferase-like protein 16 binds the 3'-terminal triple helix of MALAT1 long noncoding RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 14013-14018, doi:10.1073/pnas.1614759113 (2016).
- 94 van Tran, N. *et al.* The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Research* 47, 7719-7733, doi:10.1093/nar/gkz619 (2019).
- 95 Pinto, R. *et al.* The human methyltransferase ZCCHC4 catalyses N6-methyladenosine modification of 28S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 48, 830-846, doi:10.1093/nar/gkz1147 (2020).
- 96 Zheng, G. *et al.* ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular Cell* 49, 18-29, doi:10.1016/j.molcel.2012.10.015 (2013).
- 97 Jia, G. *et al.* N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology* 7, 885-887, doi:10.1038/nchembio.687 (2011).
- 98 O'Connell, M. A. *et al.* Cloning of cDNAs Encoding Mammalian Double-Stranded RNA-Specific Adenosine Deaminase. *Molecular and Cellular Biology* 15, 1389-1397 (1995).
- 99 O'Connell, M. A. & Keller, W. Purification and properties of double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from calf thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 10596-10600 (1994).
- 100 Melcher, T. *et al.* A mammalian RNA editing enzyme. *Nature* 379, 460-464 (1996).
- 101 Patterson, J. B. & Samuel, C. E. Expression and Regulation by Interferon of a Double-Stranded RNA-Specific Adenosine Deaminase from Human Cells: Evidence for Two Forms of the Deaminase. *Molecular and Cellular Biology* 15, 5376-5388 (1995).
- 102 Bohnsack, K. E., Hobartner, C. & Bohnsack, M. T. Eukaryotic 5-methylcytosine (m(5)C) RNA Methyltransferases: Mechanisms, Cellular Functions, and Links to Disease. *Genes* 10, doi:10.3390/genes10020102 (2019).
- 103 Chen, X. *et al.* 5-methylcytosine promotes pathogenesis of bladder cancer through stabilizing mRNAs. *Nature Cell Biology* 21, 978-990, doi:10.1038/s41556-019-0361-y (2019).
- 104 Yang, X. *et al.* 5-methylcytosine promotes mRNA export - NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m(5)C reader. *Cell Research* 27, 606-625, doi:10.1038/cr.2017.55 (2017).
- 105 Chen, H. *et al.* m(5)C modification of mRNA serves a DNA damage code to promote homologous recombination. *Nature Communications* 11, 2834, doi:10.1038/s41467-020-16722-7 (2020).
- 106 Yoshimi, A. *et al.* Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature* 574, 273-277, doi:10.1038/s41586-019-1618-0 (2019).
- 107 Fu, L. *et al.* Tet-mediated formation of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *Journal of the American Chemical Society* 136, 11582-11585, doi:10.1021/ja505305z (2014).
- 108 Kawarada, L. *et al.* ALKBH1 is an RNA dioxygenase responsible for cytoplasmic and mitochondrial tRNA modifications. *Nucleic Acids Research* 45, 7401-7415, doi:10.1093/nar/gkx354 (2017).
- 109 Arguello, A. E. *et al.* Reactivity-dependent profiling of RNA 5-methylcytidine dioxygenases. *Nature Communications* 13, 4176, doi:10.1038/s41467-022-31876-2 (2022).

- 110 Lan, J. *et al.* Functional role of Tet-mediated RNA hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature Communications* 11, 4956, doi:10.1038/s41467-020-18729-6 (2020).
- 111 Shen, Q. *et al.* Tet2 promotes pathogen infection-induced myelopoiesis through mRNA oxidation. *Nature* 554, 123-127, doi:10.1038/nature25434 (2018).
- 112 He, C. *et al.* TET2 chemically modifies tRNAs and regulates tRNA fragment levels. *Nature Structural and Molecular Biology* 28, 62-70, doi:10.1038/s41594-020-00526-w (2021).
- 113 Goll, M. G. *et al.* Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311, 395-398, doi:10.1126/science.1120976 (2006).
- 114 Schaefer, M. *et al.* RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev* 24, 1590-1595, doi:10.1101/gad.586710 (2010).
- 115 Tuorto, F. *et al.* RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 19, 900-905, doi:10.1038/nsmb.2357 (2012).
- 116 Blanco, S. *et al.* Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neurodevelopmental disorders. *The EMBO journal* 33, 2020-2039, doi:10.15252/embj.201489282 (2014).
- 117 Liu, R. J., Long, T., Li, J., Li, H. & Wang, E. D. Structural basis for substrate binding and catalytic mechanism of a human RNA:m5C methyltransferase NSun6. *Nucleic Acids Res* 45, 6684-6697, doi:10.1093/nar/gkx473 (2017).
- 118 Haag, S. *et al.* NSUN6 is a human RNA methyltransferase that catalyzes formation of m5C72 in specific tRNAs. *Rna* 21, 1532-1543, doi:10.1261/rna.051524.115 (2015).
- 119 Bourgeois, G. *et al.* Eukaryotic rRNA Modification by Yeast 5-Methylcytosine-Methyltransferases and Human Proliferation-Associated Antigen p120. *PLoS One* 10, e0133321, doi:10.1371/journal.pone.0133321 (2015).
- 120 Nakano, S. *et al.* NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA(Met). *Nat Chem Biol* 12, 546-551, doi:10.1038/nchembio.2099 (2016).
- 121 Haag, S. *et al.* NSUN3 and ABH1 modify the wobble position of mt-tRNA^{Met} to expand codon recognition in mitochondrial translation. *The EMBO journal* 35, 2104-2119, doi:10.15252/embj.201694885 (2016).
- 122 Van Haute, L. *et al.* Deficient methylation and formylation of mt-tRNA(Met) wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. *Nat Commun* 7, 12039, doi:10.1038/ncomms12039 (2016).
- 123 Metodiev, M. D. *et al.* NSUN4 is a dual function mitochondrial protein required for both methylation of 12S rRNA and coordination of mitoribosomal assembly. *PLoS Genet* 10, e1004110, doi:10.1371/journal.pgen.1004110 (2014).
- 124 Aguilo, F. *et al.* Deposition of 5-Methylcytosine on Enhancer RNAs Enables the Coactivator Function of PGC-1 α . *Cell Rep* 14, 479-492, doi:10.1016/j.celrep.2015.12.043 (2016).
- 125 Hussain, S. *et al.* NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. *Cell Rep* 4, 255-261, doi:10.1016/j.celrep.2013.06.029 (2013).
- 126 Wu, Z. *et al.* METTL3 counteracts premature aging via m6A-dependent stabilization of MIS12 mRNA. *Nucleic Acids Res* 48, 11083-11096, doi:10.1093/nar/gkaa816 (2020).

- 127 Min, K. W. *et al.* Profiling of m6A RNA modifications identified an age-associated regulation of AGO2 mRNA stability. *Aging Cell* 17, e12753, doi:10.1111/accel.12753 (2018).
- 128 Wu, Z. *et al.* m(6)A epitranscriptomic regulation of tissue homeostasis during primate aging. *Nat Aging* 3, 705-721, doi:10.1038/s43587-023-00393-2 (2023).
- 129 Jiang, Z. X. *et al.* The m6A mRNA demethylase FTO in granulosa cells retards FOS-dependent ovarian aging. *Cell death & disease* 12, 744, doi:10.1038/s41419-021-04016-9 (2021).
- 130 Sun, X. *et al.* Decreased expression of m(6)A demethylase FTO in ovarian aging. *Archives of gynecology and obstetrics* 303, 1363-1369, doi:10.1007/s00404-020-05895-7 (2021).
- 131 Liberman, N. *et al.* N6-adenosine methylation of ribosomal RNA affects lipid oxidation and stress resistance. *Sci Adv* 6, eaaz4370, doi:10.1126/sciadv.aaz4370 (2020).
- 132 Zhou, K. I., Pincus, Z. & Slack, F. J. Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)* 3, 733-753, doi:10.18632/aging.100367 (2011).
- 133 Li, Z. *et al.* Evolutionary and ontogenetic changes in RNA editing in human, chimpanzee, and macaque brains. *Rna* 19, 1693-1702, doi:10.1261/rna.039206.113 (2013).
- 134 Nicholas, A. *et al.* Age-related gene-specific changes of A-to-I mRNA editing in the human brain. *Mech Ageing Dev* 131, 445-447, doi:10.1016/j.mad.2010.06.001 (2010).
- 135 Zaidan, H. *et al.* A-to-I RNA editing in the rat brain is age-dependent, region-specific and sensitive to environmental stress across generations. *BMC genomics* 19, 28, doi:10.1186/s12864-017-4409-8 (2018).
- 136 Dillman, A. A. *et al.* mRNA expression, splicing and editing in the embryonic and adult mouse cerebral cortex. *Nat Neurosci* 16, 499-506, doi:10.1038/nn.3332 (2013).
- 137 Wahlstedt, H., Daniel, C., Ensterö, M. & Ohman, M. Large-scale mRNA sequencing determines global regulation of RNA editing during brain development. *Genome Res* 19, 978-986, doi:10.1101/gr.089409.108 (2009).
- 138 Larsen, K., Momeni, J., Farajzadeh, L. & Bendixen, C. Differential A-to-I RNA editing of the serotonin-2C receptor G-protein-coupled, HTR2C, in porcine brain tissues. *Biochimie* 121, 189-196, doi:10.1016/j.biochi.2015.12.011 (2016).
- 139 Larsen, K., Kristensen, K. K., Momeni, J., Farajzadeh, L. & Bendixen, C. A-to-I RNA editing of the IGFBP7 transcript increases during aging in porcine brain tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 479, 596-601, doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.125 (2016).
- 140 Sebastiani, P. *et al.* RNA editing genes associated with extreme old age in humans and with lifespan in *C. elegans*. *PLoS One* 4, e8210, doi:10.1371/journal.pone.0008210 (2009).
- 141 Schosserer, M. *et al.* Methylation of ribosomal RNA by NSUN5 is a conserved mechanism modulating organismal lifespan. *Nat Commun* 6, 6158, doi:10.1038/ncomms7158 (2015).
- 142 Heissenberger, C. *et al.* The ribosomal RNA m(5)C methyltransferase NSUN-1 modulates healthspan and oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 9, doi:10.7554/eLife.56205 (2020).
- 143 Navarro, I. C. *et al.* Translational adaptation to heat stress is mediated by RNA 5-methylcytosine in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal* 40, e105496, doi:10.15252/embj.2020105496 (2021).

- 144 Iyer, L. M., Tahiliani, M., Rao, A. & Aravind, L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* 8, 1698-1710, doi:10.4161/cc.8.11.8580 (2009).
- 145 Gontier, G. *et al.* Tet2 Rescues Age-Related Regenerative Decline and Enhances Cognitive Function in the Adult Mouse Brain. *Cell Reports* 22, 1974-1981, doi:10.1016/j.celrep.2018.02.001 (2018).
- 146 Iyer, L. M., Abhiman, S. & Aravind, L. Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 101, 25-104, doi:10.1016/B978-0-12-387685-0.00002-0 (2011).
- 147 Simpson, V. J., Johnson, T. E. & Hammen, R. F. Caenorhabds elegans DNA does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging. *Nucleic Acids Research* 14, 6711-6719 (1986).
- 148 Guallar, D. *et al.* RNA-dependent chromatin targeting of TET2 for endogenous retrovirus control in pluripotent stem cells. *Nature Genetics* 50, 443-451, doi:10.1038/s41588-018-0060-9 (2018).
- 149 Garcia-Outeiral, V., de la Parte, C., Fidalgo, M. & Guallar, D. The Complexity of TET2 Functions in Pluripotency and Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 630754, doi:10.3389/fcell.2020.630754 (2020).
- 150 Yang, J., Bashkenova, N., Zang, R., Huang, X. & Wang, J. The roles of TET family proteins in development and stem cells. *Development* 147, doi:10.1242/dev.183129 (2020).
- 151 Lio, C. J. & Rao, A. TET Enzymes and 5hmC in Adaptive and Innate Immune Systems. *Frontiers in Immunology* 10, 210, doi:10.3389/fimmu.2019.00210 (2019).
- 152 Li, W. & Xu, L. Epigenetic Function of TET Family, 5-Methylcytosine, and 5-Hydroxymethylcytosine in Hematologic Malignancies. *Oncology Research and Treatment* 42, 309-318, doi:10.1159/000498947 (2019).
- 153 Bradley-Whitman, M. A. & Lovell, M. A. Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 134, 486-495, doi:10.1016/j.mad.2013.08.005 (2013).
- 154 Liu, R. *et al.* Ten-eleven translocation-2 (TET2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity. *Circulation* 128, 2047-2057, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002887 (2013).
- 155 Prosdocimo, D. A., Jain, R. & Jain, M. K. UnTEThering (smooth muscle) cell plasticity. *Circulation* 128, 2002-2004, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006092 (2013).
- 156 He, C. *et al.* High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions in the Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell* 64, 416-430, doi:10.1016/j.molcel.2016.09.034 (2016).
- 157 Hu, L. *et al.* Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation. *Cell* 155, 1545-1555, doi:10.1016/j.cell.2013.11.020 (2013).
- 158 Hu, L. *et al.* Structural insight into substrate preference for TET-mediated oxidation. *Nature* 527, 118-122, doi:10.1038/nature15713 (2015).
- 159 Ko, M. *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468, 839-843, doi:10.1038/nature09586 (2010).
- 160 Amort, T. *et al.* Distinct 5-methylcytosine profiles in poly(A) RNA from mouse embryonic stem cells and brain. *Genome Biology* 18, 1, doi:10.1186/s13059-016-1139-1 (2017).

- 161 Squires, J. E. *et al.* Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Research* 40, 5023-5033, doi:10.1093/nar/gks144 (2012).
- 162 Fidalgo, M. *et al.* Zfp281 Coordinates Opposing Functions of Tet1 and Tet2 in Pluripotent States. *Cell Stem Cell* 19, 355-369, doi:10.1016/j.stem.2016.05.025 (2016).
- 163 Koh, K. P. *et al.* Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 200-213, doi:10.1016/j.stem.2011.01.008 (2011).
- 164 Ficiz, G. *et al.* Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473, 398-402, doi:10.1038/nature10008 (2011).
- 165 Ruzov, A. *et al.* Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Research* 21, 1332-1342, doi:10.1038/cr.2011.113 (2011).
- 166 Hon, G. C. *et al.* 5mC oxidation by Tet2 modulates enhancer activity and timing of transcriptome reprogramming during differentiation. *Molecular Cell* 56, 286-297, doi:10.1016/j.molcel.2014.08.026 (2014).
- 167 Ko, M. *et al.* Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 14566-14571, doi:10.1073/pnas.1112317108 (2011).
- 168 Li, X. *et al.* Ten-eleven translocation 2 interacts with forkhead box O3 and regulates adult neurogenesis. *Nature Communications* 8, 15903, doi:10.1038/ncomms15903 (2017).
- 169 Hahn, M. A. *et al.* Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Reports* 3, 291-300, doi:10.1016/j.celrep.2013.01.011 (2013).
- 170 Sherwani, S. I. & Khan, H. A. Role of 5-hydroxymethylcytosine in neurodegeneration. *Gene* 570, 17-24, doi:10.1016/j.gene.2015.06.052 (2015).
- 171 Chen, H., Dzitoyeva, S. & Manev, H. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in the mouse hippocampus. *Restorative Neurology and Neuroscience* 30, 237-245, doi:10.3233/RNN-2012-110223 (2012).
- 172 Chouliaras, L. *et al.* Age-Related Increase in Levels of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse Hippocampus is Prevented by Caloric Restriction. *Current Alzheimer Research* 9, 536-544 (2012).
- 173 Haffner, M. C. *et al.* <Haffner_Yegnasubramanian_Oncotarget 2011_.pdf>. *Oncotarget* 2 (2011).
- 174 Song, C. X. *et al.* Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Biotechnology* 29, 68-72, doi:10.1038/nbt.1732 (2011).
- 175 Szulwach, K. E. *et al.* 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature Neuroscience* 14, 1607-1616, doi:10.1038/nn.2959 (2011).
- 176 Zhang, Y. *et al.* Selective loss of 5hmC promotes neurodegeneration in the mouse model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal* 34, 16364-16382, doi:10.1096/fj.202001271R (2020).
- 177 Condliffe, D. *et al.* Cross-region reduction in 5-hydroxymethylcytosine in Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging* 35, 1850-1854, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.002 (2014).

- 178 Chouliaras, L. *et al.* Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of Aging* 34, 2091-2099, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021 (2013).
- 179 Coppieters, N. *et al.* Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiology of Aging* 35, 1334-1344, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031 (2014).
- 180 Tammen, S. A. *et al.* Aging alters hepatic DNA hydroxymethylation, as measured by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Cancer Prevention* 19, 301-308, doi:10.15430/jcp.2014.19.4.301 (2014).
- 181 Sun, D. *et al.* Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell* 14, 673-688, doi:10.1016/j.stem.2014.03.002 (2014).
- 182 Buscarlet, M., Tessier, A., Provost, S., Mollica, L. & Busque, L. Human blood cell levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) decline with age, partly related to acquired mutations in TET2. *Experimental Hematology* 44, 1072-1084, doi:10.1016/j.exphem.2016.07.009 (2016).
- 183 Torano, E. G. *et al.* Age-associated hydroxymethylation in human bone-marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine* 14, 207, doi:10.1186/s12967-016-0966-x (2016).
- 184 Di Stefano, B. *et al.* C/EBPalpha creates elite cells for iPSC reprogramming by upregulating Klf4 and increasing the levels of Lsd1 and Brd4. *Nature Cell Biology* 18, 371-381, doi:10.1038/ncb3326 (2016).
- 185 Sardina, J. L. *et al.* Transcription Factors Drive Tet2-Mediated Enhancer Demethylation to Reprogram Cell Fate. *Cell Stem Cell* 23, 727-741 e729, doi:10.1016/j.stem.2018.08.016 (2018).
- 186 Piccolo, F. M. *et al.* Different roles for Tet1 and Tet2 proteins in reprogramming-mediated erasure of imprints induced by EGC fusion. *Molecular Cell* 49, 1023-1033, doi:10.1016/j.molcel.2013.01.032 (2013).
- 187 Costa, Y. *et al.* NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature* 495, 370-374, doi:10.1038/nature11925 (2013).
- 188 Doege, C. A. *et al.* Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2. *Nature* 488, 652-655, doi:10.1038/nature11333 (2012).
- 189 Hu, X. *et al.* Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 14, 512-522, doi:10.1016/j.stem.2014.01.001 (2014).
- 190 Cheng, Z. L. *et al.* The Zscan4-Tet2 Transcription Nexus Regulates Metabolic Rewiring and Enhances Proteostasis to Promote Reprogramming. *Cell Reports* 32, 107877, doi:10.1016/j.celrep.2020.107877 (2020).
- 191 Lu, Y. *et al.* Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* 588, 124-129, doi:10.1038/s41586-020-2975-4 (2020).
- 192 Baillat, D. *et al.* Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II. *Cell* 123, 265-276, doi:10.1016/j.cell.2005.08.019 (2005).
- 193 Chen, J. *et al.* An RNAi screen identifies additional members of the Drosophila Integrator complex and a requirement for cyclin C/Cdk8 in snRNA 3'-end formation. *RNA* 18, 2148-2156, doi:10.1261/rna.035725.112 (2012).

- 194 Malovannaya, A. *et al.* Analysis of the human endogenous coregulator complexome. *Cell* 145, 787-799, doi:10.1016/j.cell.2011.05.006 (2011).
- 195 Malovannaya, A. *et al.* Streamlined analysis schema for high-throughput identification of endogenous protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 2431-2436, doi:10.1073/pnas.0912599106 (2010).
- 196 Funk, L. *et al.* The phenotypic landscape of essential human genes. *Cell* 185, 4634-4653 e4622, doi:10.1016/j.cell.2022.10.017 (2022).
- 197 Replogle, J. M. *et al.* Mapping information-rich genotype-phenotype landscapes with genome-scale Perturb-seq. *Cell* 185, 2559-2575 e2528, doi:10.1016/j.cell.2022.05.013 (2022).
- 198 Huang, K. L. *et al.* Integrator Recruits Protein Phosphatase 2A to Prevent Pause Release and Facilitate Transcription Termination. *Molecular Cell* 80, 345-358 e349, doi:10.1016/j.molcel.2020.08.016 (2020).
- 199 Fianu, I. *et al.* Structural basis of Integrator-mediated transcription regulation. *Science* 374, 883-887 (2021).
- 200 Zheng, H. *et al.* Identification of Integrator-PP2A complex (INTAC), an RNA polymerase II phosphatase. *Science* 370, doi:10.1126/science.abb5872 (2020).
- 201 Pfleiderer, M. M. & Galej, W. P. Structure of the catalytic core of the Integrator complex. *Molecular Cell* 81, 1246-1259 e1248, doi:10.1016/j.molcel.2021.01.005 (2021).
- 202 Barbieri, E. *et al.* Targeted Enhancer Activation by a Subunit of the Integrator Complex. *Molecular Cell* 71, 103-116 e107, doi:10.1016/j.molcel.2018.05.031 (2018).
- 203 Sabath, K. *et al.* INTS10-INTS13-INTS14 form a functional module of Integrator that binds nucleic acids and the cleavage module. *Nature Communications* 11, 3422, doi:10.1038/s41467-020-17232-2 (2020).
- 204 Vervoort, S. J. *et al.* The PP2A-Integrator-CDK9 axis fine-tunes transcription and can be targeted therapeutically in cancer. *Cell* 184, 3143-3162 e3132, doi:10.1016/j.cell.2021.04.022 (2021).
- 205 Jia, Y. *et al.* Crystal structure of the INTS3/INTS6 complex reveals the functional importance of INTS3 dimerization in DSB repair. *Cell Discovery* 7, 66, doi:10.1038/s41421-021-00283-0 (2021).
- 206 Ren, W. *et al.* Structural basis of SOSS1 complex assembly and recognition of ssDNA. *Cell Reports* 6, 982-991, doi:10.1016/j.celrep.2014.02.020 (2014).
- 207 Zhang, F., Ma, T. & Yu, X. A core hSSB1-INTS complex participates in the DNA damage response. *Journal of Cell Science* 126, 4850-4855, doi:10.1242/jcs.132514 (2013).
- 208 Offley, S. R. *et al.* A combinatorial approach to uncover an additional Integrator subunit. *Cell Reports* 42, 112244, doi:10.1016/j.celrep.2023.112244 (2023).
- 209 Lai, F., Gardini, A., Zhang, A. & Shiekhhattar, R. Integrator mediates the biogenesis of enhancer RNAs. *Nature* 525, 399-403, doi:10.1038/nature14906 (2015).
- 210 Rubtsova, M. P. *et al.* Integrator is a key component of human telomerase RNA biogenesis. *Scientific Reports* 9, 1701, doi:10.1038/s41598-018-38297-6 (2019).
- 211 Barra, J. *et al.* Integrator restrains paraspeckles assembly by promoting isoform switching of the lncRNA NEAT1. *Science Advances* 6, 1-16 (2020).
- 212 Cazalla, D., Xie, M. & Steitz, J. A. A primate herpesvirus uses the integrator complex to generate viral microRNAs. *Molecular Cell* 43, 982-992, doi:10.1016/j.molcel.2011.07.025 (2011).

- 213 Berkyurek, A. C. *et al.* The RNA polymerase II subunit RPB-9 recruits the integrator complex to terminate *Caenorhabditis elegans* piRNA transcription. *The EMBO journal* 40, e105565, doi:10.15252/embj.2020105565 (2021).
- 214 Beltran, T., Pahita, E., Ghosh, S., Lenhard, B. & Sarkies, P. Integrator is recruited to promoter-proximally paused RNA Pol II to generate *Caenorhabditis elegans* piRNA precursors. *The EMBO journal* 40, e105564, doi:10.15252/embj.2020105564 (2021).
- 215 Kirstein, N. *et al.* The Integrator complex regulates microRNA abundance through RISC loading. *BioRxiv*, doi:10.1101/2021.09.21.461113 (2021).
- 216 Gardini, A. *et al.* Integrator regulates transcriptional initiation and pause release following activation. *Molecular Cell* 56, 128-139, doi:10.1016/j.molcel.2014.08.004 (2014).
- 217 Yue, J. *et al.* Integrator orchestrates RAS/ERK1/2 signaling transcriptional programs. *Genes&Development* 31, 1809-1820, doi:10.1101/gad.301697 (2017).
- 218 Beckedorff, F. *et al.* The Human Integrator Complex Facilitates Transcriptional Elongation by Endonucleolytic Cleavage of Nascent Transcripts. *Cell Reports* 32, 107917, doi:10.1016/j.celrep.2020.107917 (2020).
- 219 Elrod, N. D. *et al.* The Integrator Complex Attenuates Promoter-Proximal Transcription at Protein-Coding Genes. *Molecular Cell* 76, 738-752 e737, doi:10.1016/j.molcel.2019.10.034 (2019).
- 220 Tatomer, D. C. *et al.* The Integrator complex cleaves nascent mRNAs to attenuate transcription. *Genes and Development* 33, 1525-1538, doi:10.1101/gad.330167.119 (2019).
- 221 Skaar, J. R. *et al.* The Integrator complex controls the termination of transcription at diverse classes of gene targets. *Cell Research* 25, 288-305, doi:10.1038/cr.2015.19 (2015).
- 222 Lykke-Andersen, S. *et al.* Integrator is a genome-wide attenuator of non-productive transcription. *Mol Cell* 81, 514-529.e516, doi:10.1016/j.molcel.2020.12.014 (2021).
- 223 Stadelmayer, B. *et al.* Integrator complex regulates NELF-mediated RNA polymerase II pause/release and processivity at coding genes. *Nature Communications* 5, 5531, doi:10.1038/ncomms6531 (2014).
- 224 van den Berg, D. L. C. *et al.* Nipbl Interacts with Zfp609 and the Integrator Complex to Regulate Cortical Neuron Migration. *Neuron* 93, 348-361, doi:10.1016/j.neuron.2016.11.047 (2017).
- 225 Latos, P. A. *et al.* Fgf and Esrrb integrate epigenetic and transcriptional networks that regulate self-renewal of trophoblast stem cells. *Nat Commun* 6, 7776, doi:10.1038/ncomms8776 (2015).
- 226 Yamamoto, J. *et al.* DSIF and NELF interact with Integrator to specify the correct post-transcriptional fate of snRNA genes. *Nature Communications* 5, 4263, doi:10.1038/ncomms5263 (2014).
- 227 Egloff, S., Zaborowska, J., Laitem, C., Kiss, T. & Murphy, S. Ser7 phosphorylation of the CTD recruits the RPAP2 Ser5 phosphatase to snRNA genes. *Molecular Cell* 45, 111-122, doi:10.1016/j.molcel.2011.11.006 (2012).
- 228 Cihlarova, Z. *et al.* BRAT1 links Integrator and defective RNA processing with neurodegeneration. *Nature Communications* 13, 5026, doi:10.1038/s41467-022-32763-6 (2022).
- 229 Hernandez, N. Formation of the 3' end of U1 snRNA is directed by a conserved sequence located downstream of the coding region. *The EMBO journal* 4, 1827-1837, doi:10.1002/j.1460-2075.1985.tb03857.x (1985).

- 230 Xie, M. *et al.* The host Integrator complex acts in transcription-independent maturation of herpesvirus microRNA 3' ends. *Genes&Development* 29, 1552–1564, doi:10.1101/gad.266973 (2015).
- 231 Ezzeddine, N. *et al.* A subset of Drosophila integrator proteins is essential for efficient U7 snRNA and spliceosomal snRNA 3'-end formation. *Mol Cell Biol* 31, 328-341, doi:10.1128/mcb.00943-10 (2011).
- 232 Hata, T. & Nakayama, M. Targeted disruption of the murine large nuclear KIAA1440/Ints1 protein causes growth arrest in early blastocyst stage embryos and eventual apoptotic cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773, 1039-1051, doi:10.1016/j.bbamcr.2007.04.010 (2007).
- 233 Gómez-Orte, E. *et al.* Disruption of the Caenorhabditis elegans Integrator complex triggers a non-conventional transcriptional mechanism beyond snRNA genes. *PLoS Genet* 15, e1007981, doi:10.1371/journal.pgen.1007981 (2019).
- 234 Oegema, R. *et al.* Human mutations in integrator complex subunits link transcriptome integrity to brain development. *PLoS Genetics* 13, e1006809, doi:10.1371/journal.pgen.1006809 (2017).
- 235 Krall, M. *et al.* Biallelic sequence variants in INTS1 in patients with developmental delays, cataracts, and craniofacial anomalies. *European Journal of Human Genetics* 27, 582-593, doi:10.1038/s41431-018-0298-9 (2019).
- 236 Zhang, X. *et al.* Biallelic INTS1 Mutations Cause a Rare Neurodevelopmental Disorder in Two Chinese Siblings. *Journal of molecular neuroscience : MN* 70, 1-8, doi:10.1007/s12031-019-01393-x (2020).
- 237 Federico, A. *et al.* Pan-Cancer Mutational and Transcriptional Analysis of the Integrator Complex. *International Journal of Molecular Sciences* 18, doi:10.3390/ijms18050936 (2017).
- 238 Zhang, Y. *et al.* The Integrator Complex Prevents Dedifferentiation of Intermediate Neural Progenitors back into Neural Stem Cells. *Cell Reports* 27, 987-996 e983, doi:10.1016/j.celrep.2019.03.089 (2019).
- 239 Van den Eynden, J., Basu, S. & Larsson, E. Somatic Mutation Patterns in Hemizygous Genomic Regions Unveil Purifying Selection during Tumor Evolution. *PLoS Genet* 12, e1006506, doi:10.1371/journal.pgen.1006506 (2016).
- 240 Jodoin, J. N. *et al.* Nuclear-localized Asunder regulates cytoplasmic dynein localization via its role in the integrator complex. *Molecular Biology of the Cell* 24, 2954-2965, doi:10.1091/mbc.E13-05-0254 (2013).
- 241 Albrecht, T. R. *et al.* Integrator subunit 4 is a 'Symplekin-like' scaffold that associates with INTS9/11 to form the Integrator cleavage module. *Nucleic Acids Res* 46, 4241-4255, doi:10.1093/nar/gky100 (2018).
- 242 Anderson, M. A. *et al.* Asunder is a critical regulator of dynein-dynactin localization during Drosophila spermatogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 20, 2709-2721, doi:10.1091/mbc.e08-12-1165 (2009).
- 243 Huang, J., Gong, Z., Ghosal, G. & Chen, J. SOSS complexes participate in the maintenance of genomic stability. *Mol Cell* 35, 384-393, doi:10.1016/j.molcel.2009.06.011 (2009).
- 244 Takata, H., Nishijima, H., Maeshima, K. & Shibahara, K. The integrator complex is required for integrity of Cajal bodies. *Journal of Cell Science* 125, 166-175, doi:10.1242/jcs.090837 (2012).

- 245 Li, Z. *et al.* Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* 118, 4509-4518, doi:10.1182/blood-2010-12-325241 (2011).
- 246 Dawlaty, M. M. *et al.* Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Dev Cell* 29, 102-111, doi:10.1016/j.devcel.2014.03.003 (2014).
- 247 Zalvide, J. & DeCaprio, J. A. Role of pRb-related proteins in simian virus 40 large-T-antigen-mediated transformation. *Mol Cell Biol* 15, 5800-5810, doi:10.1128/mcb.15.10.5800 (1995).
- 248 Katter, K. *et al.* Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *Faseb j* 27, 930-941, doi:10.1096/fj.12-205526 (2013).
- 249 Covelo-Molares, H., Souto, Y., Fidalgo, M. & Guallar, D. A Simple, Rapid, and Cost-Effective Method for Loss-of-Function Assays in Pluripotent Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2520, 199-213, doi:10.1007/7651_2021_434 (2022).
- 250 Cong, L. & Zhang, F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1239, 197-217, doi:10.1007/978-1-4939-1862-1_10 (2015).
- 251 Concordet, J. P. & Haeussler, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res* 46, W242-w245, doi:10.1093/nar/gky354 (2018).
- 252 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675, doi:10.1038/nmeth.2089 (2012).
- 253 Štefková, K., Procházková, J. & Pacherník, J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem cells international* 2015, 628368, doi:10.1155/2015/628368 (2015).
- 254 Ivanova, N. *et al.* Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442, 533-538, doi:10.1038/nature04915 (2006).
- 255 Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94, doi:10.1093/genetics/77.1.71 (1974).
- 256 Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature protocols* 4, 1184-1191, doi:10.1038/nprot.2009.97 (2009).
- 257 Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* 13, 2498-2504, doi:10.1101/gr.1239303 (2003).
- 258 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8 (2014).
- 259 Putri, G. H., Anders, S., Pyl, P. T., Pimanda, J. E. & Zanini, F. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, doi:10.1093/bioinformatics/btac166 (2022).
- 260 Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)* 29, 15-21, doi:10.1093/bioinformatics/bts635 (2013).
- 261 Szklarczyk, D. *et al.* Correction to 'The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets'. *Nucleic Acids Res* 49, 10800, doi:10.1093/nar/gkab835 (2021).
- 262 Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30, 2114-2120, doi:10.1093/bioinformatics/btu170 (2014).

- 263 Van Nostrand, E. L. *et al.* A large-scale binding and functional map of human RNA-binding proteins. *Nature* 583, 711-719, doi:10.1038/s41586-020-2077-3 (2020).
- 264 Li, J. *et al.* RBPMetaDB: a comprehensive annotation of mouse RNA-Seq datasets with perturbations of RNA-binding proteins. *Database : the journal of biological databases and curation* 2018, doi:10.1093/database/bay054 (2018).
- 265 Tyshkovskiy, A. *et al.* Distinct longevity mechanisms across and within species and their association with aging. *Cell* 186, 2929-2949.e2920, doi:10.1016/j.cell.2023.05.002 (2023).
- 266 Skoczyńska, A., Budzisz, E., Dana, A. & Rotsztein, H. New look at the role of progerin in skin aging. *Przegląd menopauzalny = Menopause review* 14, 53-58, doi:10.5114/pm.2015.49532 (2015).
- 267 Ma, H. L. *et al.* SRSF2 plays an unexpected role as reader of m(5)C on mRNA, linking epitranscriptomics to cancer. *Mol Cell* 83, 4239-4254.e4210, doi:10.1016/j.molcel.2023.11.003 (2023).
- 268 Winans, S. & Beemon, K. m(5)C Goes Viral. *Cell host & microbe* 26, 154-155, doi:10.1016/j.chom.2019.07.019 (2019).
- 269 Harvey, D. M. & Levine, A. J. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev* 5, 2375-2385, doi:10.1101/gad.5.12b.2375 (1991).
- 270 Kruse, J. P. & Gu, W. Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622, doi:10.1016/j.cell.2009.04.050 (2009).
- 271 Levine, A. J. The many faces of p53: something for everyone. *Journal of molecular cell biology* 11, 524-530, doi:10.1093/jmcb/mjz026 (2019).
- 272 Liu, S. *et al.* The PI3K-Akt pathway inhibits senescence and promotes self-renewal of human skin-derived precursors in vitro. *Aging Cell* 10, 661-674, doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00704.x (2011).
- 273 Shiraha, H., Gupta, K., Drabik, K. & Wells, A. Aging fibroblasts present reduced epidermal growth factor (EGF) responsiveness due to preferential loss of EGF receptors. *J Biol Chem* 275, 19343-19351, doi:10.1074/jbc.M000008200 (2000).
- 274 Welsh, S. A. & Gardini, A. Genomic regulation of transcription and RNA processing by the multitasking Integrator complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 24, 204-220, doi:10.1038/s41580-022-00534-2 (2023).
- 275 Pfleiderer, M. M. & Galej, W. P. Emerging insights into the function and structure of the Integrator complex. *Transcription* 12, 251-265, doi:10.1080/21541264.2022.2047583 (2021).
- 276 Wu, C., Jin, X., Tsueng, G., Afrasiabi, C. & Su, A. I. BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. *Nucleic Acids Res* 44, D313-316, doi:10.1093/nar/gkv1104 (2016).
- 277 Carter, A. C., Davis-Dusenbery, B. N., Koszka, K., Ichida, J. K. & Eggen, K. Nanog-independent reprogramming to iPSCs with canonical factors. *Stem Cell Reports* 2, 119-126, doi:10.1016/j.stemcr.2013.12.010 (2014).
- 278 Arioka, Y., Watanabe, A., Saito, K. & Yamada, Y. Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. *PLoS One* 7, e45031, doi:10.1371/journal.pone.0045031 (2012).
- 279 Li, C. *et al.* Nuclear localization of TET2 requires β -catenin activation and correlates with favourable prognosis in colorectal cancer. *Cell death & disease* 14, 552, doi:10.1038/s41419-023-06038-x (2023).

- 280 Engberg, N., Kahn, M., Petersen, D. R., Hansson, M. & Serup, P. Retinoic acid synthesis promotes development of neural progenitors from mouse embryonic stem cells by suppressing endogenous, Wnt-dependent nodal signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28, 1498-1509, doi:10.1002/stem.479 (2010).
- 281 Bratt-Leal, A. M., Carpenedo, R. L. & McDevitt, T. C. Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnology progress* 25, 43-51, doi:10.1002/btpr.139 (2009).
- 282 Ding, J. *et al.* Tex10 Coordinates Epigenetic Control of Super-Enhancer Activity in Pluripotency and Reprogramming. *Cell Stem Cell* 16, 653-668, doi:10.1016/j.stem.2015.04.001 (2015).
- 283 Samavarchi-Tehrani, P. *et al.* Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7, 64-77, doi:10.1016/j.stem.2010.04.015 (2010).
- 284 Tighe, A. P. & Gudas, L. J. Retinoic acid inhibits leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Journal of cellular physiology* 198, 223-229, doi:10.1002/jcp.10424 (2004).
- 285 Stein, C. B. *et al.* Integrator endonuclease drives promoter-proximal termination at all RNA polymerase II-transcribed loci. *Molecular Cell* 82, 4232-4245 e4211, doi:10.1016/j.molcel.2022.10.004 (2022).
- 286 Cao, S. *et al.* Specific gene-regulation networks during the pre-implantation development of the pig embryo as revealed by deep sequencing. *BMC genomics* 15, 4, doi:10.1186/1471-2164-15-4 (2014).
- 287 Reimer, M., Jr. *et al.* Deletion of Tet proteins results in quantitative disparities during ESC differentiation partially attributable to alterations in gene expression. *BMC Dev Biol* 19, 16, doi:10.1186/s12861-019-0196-6 (2019).
- 288 Pantier, R., Tatar, T., Colby, D. & Chambers, I. Endogenous epitope-tagging of Tet1, Tet2 and Tet3 identifies TET2 as a naïve pluripotency marker. *Life science alliance* 2, doi:10.26508/lsa.201900516 (2019).
- 289 Wang, X. *et al.* Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells poised for gastrulation. *Cell Res* 31, 526-541, doi:10.1038/s41422-021-00477-x (2021).
- 290 Ghimire, S. *et al.* Comparative analysis of naïve, primed and ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells originating from the same genetic background. *Sci Rep* 8, 5884, doi:10.1038/s41598-018-24051-5 (2018).
- 291 Buecker, C. *et al.* Reorganization of enhancer patterns in transition from naïve to primed pluripotency. *Cell Stem Cell* 14, 838-853, doi:10.1016/j.stem.2014.04.003 (2014).
- 292 Yang, S. H. *et al.* Otx2 and Oct4 drive early enhancer activation during embryonic stem cell transition from naïve pluripotency. *Cell Rep* 7, 1968-1981, doi:10.1016/j.celrep.2014.05.037 (2014).
- 293 Rasmussen, K. D. *et al.* TET2 binding to enhancers facilitates transcription factor recruitment in hematopoietic cells. *Genome Res* 29, 564-575, doi:10.1101/gr.239277.118 (2019).
- 294 Chen, L. L. *et al.* SNIP1 Recruits TET2 to Regulate c-MYC Target Genes and Cellular DNA Damage Response. *Cell Rep* 25, 1485-1500.e1484, doi:10.1016/j.celrep.2018.10.028 (2018).
- 295 Kafer, G. R. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. *Cell Rep* 14, 1283-1292, doi:10.1016/j.celrep.2016.01.035 (2016).

- 296 Luo, Z., Liu, X., Xie, H., Wang, Y. & Lin, C. ZFP281 Recruits MYC to Active Promoters in Regulating Transcriptional Initiation and Elongation. *Mol Cell Biol* 39, doi:10.1128/mcb.00329-19 (2019).
- 297 Xu, Y. *et al.* Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell* 42, 451-464, doi:10.1016/j.molcel.2011.04.005 (2011).
- 298 Maifrede, S. *et al.* TET2 and DNMT3A Mutations Exert Divergent Effects on DNA Repair and Sensitivity of Leukemia Cells to PARP Inhibitors. *Cancer research* 81, 5089-5101, doi:10.1158/0008-5472.Can-20-3761 (2021).
- 299 Huber, S. M. *et al.* Formation and abundance of 5-hydroxymethylcytosine in RNA. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 16, 752-755, doi:10.1002/cbic.201500013 (2015).
- 300 Huber, S. M., van Delft, P., Tanpure, A., Miska, E. A. & Balasubramanian, S. 2'-O-Methyl-5-hydroxymethylcytidine: A Second Oxidative Derivative of 5-Methylcytidine in RNA. *J Am Chem Soc* 139, 1766-1769, doi:10.1021/jacs.6b12180 (2017).
- 301 Nickerson, M. L. *et al.* TET2 binds the androgen receptor and loss is associated with prostate cancer. *Oncogene* 36, 2172-2183, doi:10.1038/onc.2016.376 (2017).
- 302 Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R. & Yu, X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* 493, 561-564, doi:10.1038/nature11742 (2013).
- 303 Sun, J. *et al.* SIRT1 Activation Disrupts Maintenance of Myelodysplastic Syndrome Stem and Progenitor Cells by Restoring TET2 Function. *Cell Stem Cell* 23, 355-369.e359, doi:10.1016/j.stem.2018.07.018 (2018).
- 304 Kagawa, H. *et al.* Genome structure, mapping and expression of the tropomyosin gene *tmy-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology* 251, 603-613, doi:10.1006/jmbi.1995.0459 (1995).
- 305 Shaye, D. D. & Greenwald, I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One* 6, e20085, doi:10.1371/journal.pone.0020085 (2011).
- 306 Chandler, R. J. *et al.* Propionyl-CoA and adenosylcobalamin metabolism in *Caenorhabditis elegans*: evidence for a role of methylmalonyl-CoA epimerase in intermediary metabolism. *Molecular genetics and metabolism* 89, 64-73, doi:10.1016/j.ymgme.2006.06.001 (2006).
- 307 Pickett, C. L. & Kornfeld, K. Age-related degeneration of the egg-laying system promotes matricidal hatching in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 12, 544-553, doi:10.1111/accel.12079 (2013).
- 308 Bansal, A., Zhu, L. J., Yen, K. & Tissenbaum, H. A. Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E277-286, doi:10.1073/pnas.1412192112 (2015).
- 309 Dues, D. J., Andrews, E. K., Senchuk, M. M. & Van Raamsdonk, J. M. Resistance to Stress Can Be Experimentally Dissociated From Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 74, 1206-1214, doi:10.1093/gerona/gly213 (2019).
- 310 Tonkin, L. A. *et al.* RNA editing by ADARs is important for normal behavior in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal* 21, 6025-6035, doi:10.1093/emboj/cdf607 (2002).
- 311 Xiang, J. F. *et al.* N(6)-Methyladenosines Modulate A-to-I RNA Editing. *Mol Cell* 69, 126-135.e126, doi:10.1016/j.molcel.2017.12.006 (2018).

- 312 Li, Q. *et al.* NSUN2-Mediated m5C Methylation and METTL3/METTL14-Mediated
m6A Methylation Cooperatively Enhance p21 Translation. *Journal of cellular*
biochemistry 118, 2587-2598, doi:10.1002/jcb.25957 (2017).
- 313 Min, K., Kang, J. & Lee, J. A modified feeding RNAi method for simultaneous knock-
down of more than one gene in *Caenorhabditis elegans*. *BioTechniques* 48, 229-232,
doi:10.2144/000113365 (2010).
- 314 Rorteau, J. *et al.* Maintenance of Chronological Aging Features in Culture of Normal
Human Dermal Fibroblasts from Old Donors. *Cells* 11, doi:10.3390/cells11050858
(2022).
- 315 Watson, W. H. *et al.* Differential Regulation of the Extracellular Cysteine/Cystine
Redox State (EhCySS) by Lung Fibroblasts from Young and Old Mice. *Oxidative*
medicine and cellular longevity 2016, 1561305, doi:10.1155/2016/1561305 (2016).
- 316 Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysik, Z. & Espinosa, J. M. Mechanisms of
transcriptional regulation by p53. *Cell death and differentiation* 25, 133-143,
doi:10.1038/cdd.2017.174 (2018).
- 317 Yang, J. H. *et al.* Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging. *Cell*
186, 305-326.e327, doi:10.1016/j.cell.2022.12.027 (2023).
- 318 Zhou, D. *et al.* Conversion of fibroblasts to neural cells by p53 depletion. *Cell Rep* 9,
2034-2042, doi:10.1016/j.celrep.2014.11.040 (2014).
- 319 Nombela, P., Miguel-López, B. & Blanco, S. The role of m(6)A, m(5)C and Ψ RNA
modifications in cancer: Novel therapeutic opportunities. *Molecular cancer* 20, 18,
doi:10.1186/s12943-020-01263-w (2021).
- 320 Chen, X. *et al.* Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic
modulation. *Cell death & disease* 13, 974, doi:10.1038/s41419-022-05408-1 (2022).
- 321 Fazio, T. G., Huff, J. T. & Panning, B. An RNAi screen of chromatin proteins identifies
Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* 134, 162-174,
doi:10.1016/j.cell.2008.05.031 (2008).
- 322 Huang, Y. *et al.* Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse
embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 1361-1366,
doi:10.1073/pnas.1322921111 (2014).
- 323 Schmidt, D. *et al.* The Integrator complex regulates differential snRNA processing and
fate of adult stem cells in the highly regenerative planarian *Schmidtea mediterranea*.
PLoS Genet 14, e1007828, doi:10.1371/journal.pgen.1007828 (2018).
- 324 Choi, E. H., Yoon, S., Koh, Y. E., Seo, Y. J. & Kim, K. P. Maintenance of genome
integrity and active homologous recombination in embryonic stem cells. *Experimental*
& molecular medicine 52, 1220-1229, doi:10.1038/s12276-020-0481-2 (2020).
- 325 Sakamoto, K. M. *et al.* Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-
Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98,
8554-8559, doi:10.1073/pnas.141230798 (2001).
- 326 Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. & Kanemaki, M. An auxin-
based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods*
6, 917-922, doi:10.1038/nmeth.1401 (2009).
- 327 Torre, D. *et al.* Nuclear RNA catabolism controls endogenous retroviruses, gene
expression asymmetry, and dedifferentiation. *Mol Cell* 83, 4255-4271.e4259,
doi:10.1016/j.molcel.2023.10.036 (2023).
- 328 Shao, W. *et al.* Phase separation of RNA-binding protein promotes polymerase binding
and transcription. *Nat Chem Biol* 18, 70-80, doi:10.1038/s41589-021-00904-5 (2022).

- 329 Rasmussen, K. D. *et al.* TET2 binding to enhancers facilitates transcription factor recruitment in hematopoietic cells. *Genome Res* 29, 564-575, doi:10.1101/gr.239277.118 (2019).
- 330 Zámboreszky, J. *et al.* Loss of BRCA1 or BRCA2 markedly increases the rate of base substitution mutagenesis and has distinct effects on genomic deletions. *Oncogene* 36, 746-755, doi:10.1038/onc.2016.243 (2017).
- 331 Ghosh, G., Li, G., Myung, K. & Hendrickson, E. A. The lethality of Ku86 (XRCC5) loss-of-function mutations in human cells is independent of p53 (TP53). *Radiation research* 167, 66-79, doi:10.1667/rr0692.1 (2007).
- 332 Solomon, L. A., Russell, B. A., Watson, L. A., Beier, F. & Bérubé, N. G. Targeted loss of the ATR-X syndrome protein in the limb mesenchyme of mice causes brachydactyly. *Hum Mol Genet* 22, 5015-5025, doi:10.1093/hmg/ddt351 (2013).
- 333 Luoto, K. R. *et al.* Tumor cell kill by c-MYC depletion: role of MYC-regulated genes that control DNA double-strand break repair. *Cancer research* 70, 8748-8759, doi:10.1158/0008-5472.Can-10-0944 (2010).
- 334 Chiang, Y. C., Teng, S. C., Su, Y. N., Hsieh, F. J. & Wu, K. J. c-Myc directly regulates the transcription of the NBS1 gene involved in DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* 278, 19286-19291, doi:10.1074/jbc.M212043200 (2003).
- 335 Li, Z. *et al.* A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8164-8169, doi:10.1073/pnas.1332764100 (2003).
- 336 Kumari, A., Folk, W. P. & Sakamuro, D. The Dual Roles of MYC in Genomic Instability and Cancer Chemoresistance. *Genes (Basel)* 8, doi:10.3390/genes8060158 (2017).
- 337 Jiang, S. Tet2 at the interface between cancer and immunity. *Communications biology* 3, 667, doi:10.1038/s42003-020-01391-5 (2020).
- 338 Hopkins, J. L., Lan, L. & Zou, L. DNA repair defects in cancer and therapeutic opportunities. *Genes Dev* 36, 278-293, doi:10.1101/gad.349431.122 (2022).
- 339 Zhang, S., Li, F., Zhou, T., Wang, G. & Li, Z. *Caenorhabditis elegans* as a Useful Model for Studying Aging Mutations. *Frontiers in endocrinology* 11, 554994, doi:10.3389/fendo.2020.554994 (2020).
- 340 Ono, K. & Ono, S. Tropomyosin and troponin are required for ovarian contraction in the *Caenorhabditis elegans* reproductive system. *Mol Biol Cell* 15, 2782-2793, doi:10.1091/mbc.e04-03-0179 (2004).
- 341 Ono, S. & Ono, K. Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J Cell Biol* 156, 1065-1076, doi:10.1083/jcb.200110013 (2002).
- 342 Kishimoto, S., Uno, M. & Nishida, E. Molecular mechanisms regulating lifespan and environmental stress responses. *Inflammation and regeneration* 38, 22, doi:10.1186/s41232-018-0080-y (2018).
- 343 Soo, S. K. *et al.* Biological resilience and aging: Activation of stress response pathways contributes to lifespan extension. *Ageing Res Rev* 88, 101941, doi:10.1016/j.arr.2023.101941 (2023).
- 344 Derisbourg, M. J., Wester, L. E., Baddi, R. & Denzel, M. S. Mutagenesis screen uncovers lifespan extension through integrated stress response inhibition without reduced mRNA translation. *Nat Commun* 12, 1678, doi:10.1038/s41467-021-21743-x (2021).
- 345 Morley, J. F. & Morimoto, R. I. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 15, 657-664, doi:10.1091/mbc.e03-07-0532 (2004).

- 346 Li, R., Liang, Y. & Lin, B. Accumulation of systematic TPM1 mediates inflammation and neuronal remodeling by phosphorylating PKA and regulating the FABP5/NF- κ B signaling pathway in the retina of aged mice. *Aging Cell* 21, e13566, doi:10.1111/ace1.13566 (2022).
- 347 Anyanful, A., Sakube, Y., Takuwa, K. & Kagawa, H. The third and fourth tropomyosin isoforms of *Caenorhabditis elegans* are expressed in the pharynx and intestines and are essential for development and morphology. *Journal of molecular biology* 313, 525-537, doi:10.1006/jmbi.2001.5052 (2001).
- 348 Urban, N. D. *et al.* Explaining inter-lab variance in *C. elegans* N2 lifespan: Making a case for standardized reporting to enhance reproducibility. *Experimental gerontology* 156, 111622, doi:10.1016/j.exger.2021.111622 (2021).
- 349 Ganem, N. S. *et al.* Disruption in A-to-I Editing Levels Affects *C. elegans* Development More Than a Complete Lack of Editing. *Cell Rep* 27, 1244-1253.e1244, doi:10.1016/j.celrep.2019.03.095 (2019).

12.LISTA DE ABREVIATURAS

2C: Embrión de 2 células

2M: 2 meses

28M: 28 meses

3'UTR: región no traducida del extremo 3' (del inglés, *3' untranslated region*)

4C: Embrión de 4 células

5-caC: 5-carboxilcitosina

5-fC: 5-formilcitosina

5-hmC: 5-hidroximetilcitosina

5-mC: 5-metilcitosina

8C: Embrión de 8 células

ADNc: ADN complementario

AP: fosfatasa alcalina (del inglés *alkaline phosphatase*)

ARNe: ARN potenciador (del inglés *enhancer*)

ARNi: ARN interferente

ARNm: ARN mensajero

ARNmt: ARN mitocondrial

ARNr: ARN ribosómico

ARNsn: ARN pequeño nuclear (del inglés *small nuclear*)

ARNsg: ARN guía

ARNt: ARN transferente

ARNvt: ARN vault

ATAC: ensayo de accesibilidad a cromatina para transposasa (del inglés, *Assay for Transposase-Accessible Chromatin*)

BF: campo claro, (del inglés, *brightfield*)

BL: Blastocisto

bp: pares de bases

BSA: albúmina de suero bovino (del inglés *bovine serum albumin*)

BS-RNA-seq: secuenciación por bisulfito en ARN (del inglés, *RNA Bisulfite Sequencing*).

CDS: secuencia codificante

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina (del inglés *chromatin immunoprecipitation*)

CLIP: Entrecruzamiento e inmunoprecipitación (del inglés *cross-linking immunoprecipitation*)

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DAVID: del inglés *database for annotation, visualization, and integrated discovery*

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco

DNMT: ADN metiltransferasas (del inglés *de novo DNA methyltransferase*)

EBs: cuerpos embrioides (del inglés *embryoid bodies*)

ELISA: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima

EV: vector vacío (del inglés *empty vector*)

ESCs: células troncales embrionarias (del inglés *embryonic stem cells*)

FACS: citometría de flujo activada por fluorescencia

FBS: suero fetal bovino

FC: valor o tasa de cambio (del inglés, *fold-change*)

FDR: tasa de descubrimientos falsos (del inglés *false discovery rate*)

GDEs: genes diferencialmente expresados

GO: ontología génica (del inglés *gene ontology*)

GSEA: análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (del inglés *gene set enrichment analysis*)

hm⁵C: 5-hidroximetilcitosina (ARN)

IFC: intensidad de fluorescencia relativa

IP: inmunoprecipitación

iPSCs: células pluripotentes inducidas (del inglés *induced pluripotent stem cells*)

KEGG: vías de señalización KEGG (del inglés *kyoto encyclopedia of genes and genomes*)

KD: *knock-down*

KO: *knock-out*

LIF: factor inhibidor de la leucemia

MO: mórula

m⁵C: 5-metilcitosina (ARN)

m⁶A: 6-metiladenosina (ARN)

NES: valor de enriquecimiento normalizado (del inglés *normalized enrichment score*)

NSUN: metiltransferasa de ARN (del inglés *NOP2/Sun RNA methyltransferase*)

OO: oocito

PBS: tampón fosfato salino

PCA: análisis de componentes principales (del inglés *principal component analysis*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCV: volumen de células sedimentadas (del inglés *packed cell volume*)

PEI: polietilenimina

PIC: cocktail inhibidor de proteasas

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RA: ácido retinoico (del inglés *retinoic acid*)

RBP: proteínas con capacidad de unión al ARN (del inglés *RNA binding protein*)

RNA-seq: secuenciación masiva de ARN

rpm: revoluciones por minuto

RT: temperatura ambiente (del inglés *room temperature*)

SCR: reprogramación celular somática

s.e.m.: error estándar de la media (del inglés *standard error of the mean*)

shARN: ARN de horquilla corta

SL: medio de cultivo estándar pluripotente (conteniendo suero y LIF)

TE: trofotodermo

TET: enzimas metilcitosina dioxigenasas (del inglés *ten-eleven translocation*)

WB: western blot

WT: genotipo silvestre (del inglés *wildtype*)

13.LISTA DE FIGURAS

Figura I1. Características del envejecimiento actualizados reportados por López-Otín y colaboradores en 2023.

Figura I2. Esquema representativo del rejuvenecimiento de células somáticas viejas mediante reprogramación y diferenciación.

Figura I3. Ciclo de desmetilación del ADN.

Figura I4. Estructura de las proteínas TET.

Figura I5. Esquema de las modificaciones del ARN m⁶A, A-to-I y m⁵C/hm⁵C y sus enzimas catalizadoras

Figura I6. Funciones de TET2 en pluripotencia, diferenciación, reprogramación celular somática y envejecimiento mediante su actividad sobre ADN o ARN.

Figura I7. Esquema del complejo Integrator.

Figura R1. Los fibroblastos derivados de ratones jóvenes y viejos muestran diferencias transcripcionales asociadas al envejecimiento.

Figura R2. Los fibroblastos jóvenes y viejos en cultivo mantienen diferencias en marcadores de envejecimiento.

Figura R3. La expresión de enzimas modificadoras de ARNm está alterada con el envejecimiento en fibroblastos de ratón.

Figura R4. La cuantificación de m⁵C y hm⁵C por espectrometría de masas no revela diferencias significativas en ARN ribodeplecionado entre fibroblastos jóvenes y viejos.

Figura R5. Generación de fibroblastos jóvenes y viejos inmortalizados a través del silenciamiento de *p53*.

Figura R6. Análisis de las diferencias transcripcionales entre fibroblastos jóvenes y viejos tras la inmortalización.

Figura R7. El 30% de la firma transcriptómica del envejecimiento se mantiene en los fibroblastos inmortalizados.

Figura R8. La inmortalización afecta a marcadores de envejecimiento.

Figura R9. Existen diferencias entre los fibroblastos primarios y los inmortalizados en la expresión de enzimas escritoras y lectoras de m⁵C y hm⁵C.

Figura R10. El interactoma de TET2 en ESCs está enriquecido en proteínas con capacidad de unión a ARN (RBPs – *RNA binding proteins*)

Figura R11. *Ints4* y *Tet2* muestran patrones de expresión similares en MEFs, ESCs y tejidos de ratón

Figura R12. *Ints4* y *Tet2* muestran patrones de expresión similares durante salida y adquisición de pluripotencia.



Figura R13. Validación de la interacción entre TET2 e INTS4 en ESCs.

Figura R14. La sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 en células troncales embrionarias de ratón no afecta a la morfología de las colonias ni a la expresión de marcadores de pluripotencia.

Figura R15. La sobreexpresión ^{3xFL}INTS4 en las células troncales embrionarias de ratón no afecta al mantenimiento y salida de la pluripotencia.

Figura R16. Efecto de la sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 en la salida de pluripotencia inducida por ácido retinoico en células troncales embrionarias de ratón.

Figura R17. La depleción de *Ints4* mediante CRISPR/Cas9 en células troncales embrionarias de ratón no es viable.

Figura R18. La pérdida de función de *Ints4* en células troncales embrionarias de ratón afecta a la viabilidad celular, y únicamente puede mantenerse a corto plazo.

Figura R19. La pérdida de función de *Ints4* en células madre embrionarias de ratón con sobreexpresión de ^{3xFL}INTS4 es compatible con la viabilidad celular.

Figura R20. La pérdida de función de *Ints4* en células madre embrionarias de ratón afecta a la capacidad proliferativa de las células.

Figura R21. La pérdida de función de *Ints4* en células troncales embrionarias reduce la competencia celular.

Figura R22. La pérdida de función de *Ints4* en ESCs no afecta a la expresión de marcadores de pluripotencia.

Figura R23. Análisis del perfil transcripcional de las ESCs con pérdida de función de *Ints4* mediante secuenciación masiva de ARN (ARN-seq).

Figura R24. La pérdida de función de *Ints4* en ESCs altera la expresión de genes relacionados con daño en el ADN.

Figura R25. La pérdida de función de *Ints4* afecta a genes característicos del estadio embrionario de 2-células (2)C también regulados por TET2.

Figura R26. INTS4 no contribuye a la función de TET2 en la regulación del estado pluripotente *naïve*.

Figura R27. La pérdida de función de *Ints4* altera la expresión de genes diana de TET2 y MYC relacionados con respuesta a daño en ADN.

Figura R28. Los genes de respuesta a daño en ADN regulados a la baja con la pérdida de función de *Ints4* o *Tet2* están unidos por TET2 y MYC.

Figura R29. La pérdida de función de *Ints4* o de *Tet2* incrementa el daño en ADN en ESCs.

Figura R30. Los genes alterados en células *Ints4* KD que son dianas de TET2 en cromatina están unidos por TET2 en ARN pero no están hm⁵C modificados.

Figura R31. Los interactomas de TET2 están enriquecidos en proteínas estrechamente relacionadas con la biología del ARN.

Figura R32. Estudio de interactores de TET2 y su impacto en el envejecimiento en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

Figura R33. La pérdida de función de los interactores de TET2 *lev-11*, *otub-4* y *pccb-1* en *C. elegans* afecta los parámetros de salud y de longevidad del animal.

Figura R34. La pérdida de función de *nsun-5* en *C. elegans* tiene efecto sobre la longevidad

Figura R35. La pérdida de función de *adr-2* en *C. elegans* tiene efecto sobre la resistencia a estrés por calor.

Figura R36. La pérdida de función de *metl-5* en *C. elegans* tiene efecto sobre la longevidad.

Figura R37. La combinación de dobles *knock-down* de enzimas modificadoras de ARN incrementa la resistencia a estrés por calor en *C. elegans*.

Figura D1. Modelo propuesto de la función del complejo INTS4-TET2 en la regulación de genes de respuesta a daño en ADN.

14.APÉNDICES

Tabla suplementaria 1. Reactivos y químicos

Nombre	Marca	Referencia
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich	D9542
5-Fluoro-2'-deoxyuridina (FuDR)	Sigma - Aldrich	F0503
Acetona	Fisher Chemical	A/0560/17
Ácido retinoico	SantaCruzBiotechnology	sc-200898
Acrilamida/bisacrilamida	Sigma-Aldrich	A3574
Adenosina	Sigma-Aldrich	A4036
Agarosa	Fisher BioReagents	10688973
Agua libre de ribonucleasas	Invitrogen	10977-035
Albúmina de suero bovino (BSA)	Fisher Bioreagents	BP1605
Aminoácidos no esenciales	Gibco	11140-050
Ampicilina	Fisher Bioreagents	BP1760
Azul de tripán	VWR	K940-100ML
Bacto-Agar	BD	214010
Bolas magnéticas (Dynabeads Protein G)	Invitrogen	1004D
Bromuro de etidio	Fisher Bioreagents	BP1302-10
CaCl ₂	Sigma-Aldrich	C5670
Citidina	Sigma-Aldrich	C4654
Cloroformo	Fisher Chemical	C/4920/15
Cocktail inhibidor de proteasas (PIC)	Sigma-Aldrich	P8340
Colesterol	Sigma-Aldrich	C8503
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	75-21-8
DNasa I	Thermo Scientific	EN0521
DTT	Sigma-Aldrich	43816
EDTA	Sigma-Aldrich	E7889
EGTA	Alfa Aesar	J61721
Enzima de restricción <i>AgeI</i>	Thermo Scientific	10860241
Enzima de restricción <i>BbsI</i>	Thermo Scientific	10569110
Enzima de restricción <i>EcoRI</i>	Thermo Scientific	11883833
Enzima de restricción <i>NheI</i>	Thermo Scientific	10755851
Enzima de restricción <i>PacI</i>	Thermo Scientific	10715271
Enzima de restricción <i>XbaI</i>	Thermo Scientific	10796601
Estreptomycin	Sigma-Aldrich	S6501
Etanol	Sigma-Aldrich	1.08543
Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF)	producido en el laboratorio	n/a

Fenol:cloroformo:isoamil alcohol (PCIA 25:24:1)	Affymetrix	75831
Formaldehido 37%	Sigma-Aldrich	F8775
Fosfatasa alcalina termosensible FasAP	Thermo Scientific	EF0654
Gelatina	Sigma-Aldrich	G9391
Glicerol	Sigma-Aldrich	G5516
Glicina	Sigma-Aldrich	G8898
Glucógeno	Thermo Scientific	R0561
Guanosina	Sigma-Aldrich	G6264
HEPES pH 7.3	Fisher Bioreagents	BP299
HEPES pH 7.9	Cytiva	SH30237.01
Higromicina	Corning	30-240-CR
HRP Sustrato quimioluminiscente Western blot Immobilon	Sigma-Aldrich	WBKLS0100
Igepal	Sigma-Aldrich	I3021
Inhibidor de ribonucleasas RNASEOUT	Thermo Scientific	10154652
Inhibidor de ribonucleasas RNasin® Plus	PROMEGA	N2615
IPTG	Sigma-Aldrich	I6758-1G
Isopropanol	Fisher Bioreagents	BP2618
JetOptimus	VWR (Polyplus)	117-01
JetPrime	Polyplus	114-07
K ₂ HPO ₄	J.T. Baker	3252-01
Kanamicina	Fisher Bioreagents	BP906-5
KCl	Fisher Chemical	P/4240/60
KH ₂ PO ₄	J.T. Baker	3246-01
Leche en polvo	Lab Scientific	M0841
L-Glutamina	Gibco	25030-081
Ligasa de ADN T4	Thermo Scientific	EL0016
Lipofectamina 3000	Fisher Scientific (Invitrogen™)	15282465
Medio Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (DMEM)	Corning	10013-CVR
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	M-6250
Metanol	Fisher Chemical	M-4056-17
Mezcla maestra de polimerasa de ADN DreamTaq Green PCR	Thermo Scientific	K1081
Mezcla maestra de polimerasa de alta fidelidad Platinum SuperFi II PCR	Invitrogen	12368010
Mezcla maestra de transcriptasa reversa qSCRIPT	VWR	733-1177
MgCl ₂	Acros Organics	223210010
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma-Aldrich	230391
Na ₂ HPO ₄	J.T. Baker	3246-01
NaCl	Fisher Bioreagents	BP358-1
Ortovanadato de sodio	MP Biomedicals	215966410
Paraformaldehido	Sigma-Aldrich	P6148
Penicilina/estreptomicina	Gibco	15070-063

Peptona Bacto	Gibco	211677
PMSF	Santa Cruz Biotechnology	sc-482875
Polibreno	Sigma-Aldrich	H9268
Polietilenimina (PEI)	Sigma-Aldrich	408727
Polietilenimina (PEI)	Sigma-Aldrich	408727
Ponceau S	Sigma-Aldrich	P3504
Proteinasa K	Thermo Scientific	EO0491
Puomicina	Fisher Bioreagents	BP2956
Reactivo de detección de Western blot Amersham	GE Healthcare	RPN2106
Reactivo de detección para Western blot ECL	GE Healthcare	12644055/RPN2235
Ribonucleasa A	Thermo Scientific	EN0531
RNasa A	Thermo Scientific	EN0531
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Fisher Bioreagents	BP1311
Suero fetal bovino (FBS)	Gibco	10270106
SYNERGEL	Diversified Biotech	DIVESYN-100
T4 PNK	Thermo Scientific	EK0032
Tampón de fosfato salino con MgCl ₂ y CaCl ₂	Sigma-Aldrich	D8662
Tampón de reacción A de la polinucleótido quinasa T4 (PNK)	Thermo Scientific	EK0032
Tampón de reacción NEBuffer 2	New England BioLabs	B7002S
Tampón fosfato salino (PBS)	Corning	21-031-CV
Tetracilicina	Sigma-Aldrich	T3258
Timidina	Sigma-Aldrich	T1895
Tripsina-EDTA	Sigma-Aldrich	T3924
Triptona Bacto	Gibco	211705
Tris-HCl pH 6,8	Bio Basic	SD8122
Tris-HCl pH 7,5	Fisher Bioreagents	BP1757
Tris-HCl pH 8,0	Alfa Aesar	J60080
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T8787
TRIzol	Invitrogen™	15596026
TWEEN 20	Sigma-Aldrich	P1379
Uridina	Sigma-Aldrich	U3003
Yoduro de propidio	Molecular Probes	P3566

Tabla suplementaria 2. Kits comerciales

Nombre	Marca	Referencia
GeneArt Gibson Assembly HiFi Master Mix	Invitrogen™	A46628
CLONEJET PCR CLONING	Thermo Scientific™	K1231
GENELUTE GEL EXTRACTION KIT	Sigma-Aldrich	NA1111-1KT
GENELUTE PCR CLEAN-UP KIT	Sigma-Aldrich	NA1020-1KT

PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Invitrogen™	10043432
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit	Invitrogen™	K210015
GENELUTE ENDOTOXIN-FREE MIDIPREP*PLASMID	SIGMA-ALDRICH	PLED35-1KT
GENELUTE HP PLASMID MINIPREP KIT	SIGMA-ALDRICH	NA0150-1KT
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	SIGMA-ALDRICH	PLN350-1KT
Fraccionamiento subcelular de proteínas para células cultivadas	Thermo Scientific™	PI-78840
BCA PROTEIN ASSAY KIT	Thermo Scientific™	23236
qScript™ cDNA SuperMix	Quanta	733-1177P
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	Applied Biosystems	15320929
Qubit RNA HS Assay Kit	Invitrogen™	Q32855
Qubit RNA IQ Assay Kit	Invitrogen™	Q33222
RiboMinus™ Eukaryote Kit v2	Invitrogen	A15020
Mix de digestión de nucleósidos	New England Biolabs	#M0649
Alkaline Phosphatase Kit	Sigma-Aldrich	86R
EZNA TOTAL RNA PURIFICATION	Omega Bio-Tek	R6834-02
Sistema de tampón de lisis RIPA	Santa Cruz Biotechnology	sc-24948
KIT GIBSON ASSEMBLY HIFI 1	VWR	GA1100-10

Tabla suplementaria 3. Accesorios y fungible

Nombre	Marca	Referencia
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit	Millipore	UFC9030
0.22µm EMD Millipore Steriflip™	Millipore	SCGP00525
Corning™ Centrifugal Tubes with CentriStar Cap	Corning	430791
Falcon® 5mL Round Bottom Polystyrene tubes	Falcon	352235
Immobilon-P PVDF Membrane	Millipore	IPVH00010
Invitrogen™ Qubit™ Assay Tubes	Invitrogen	Q32856
MicroAMP Fast Optical 96-well Reaction Plates	Applied Biosystems	4346907
Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Protein Gels	BIO-RAD	45610955
Novex WedgeWell 4-20% tris-Glycine Gel	Invitrogen	XP04205BOX
Optical Adhesive Film	Applied Biosystems	4360954
Phasemaker Tubes	Fisher Scientific (Invitrogen™)	15645268
Qubit™ 4 Fluorometer	Invitrogen	Q33226

Tabla suplementaria 4. Plásmidos

Plásmido	Función	Fuente	Identificador
pLKO.pim.shP53#1	Silenciamiento de p53	Este estudio	pF1549
pLKO.pim.shP53#2	Silenciamiento de p53	Este estudio	pF1550
pBase	Transposasa	Jose C. Silva (Cambridge Univ, UK)	N/A

PB-flox-Empty-Pgk-Hygromycin	Plásmido de sobreexpresión vacío	Jose C. Silva (Cambridge Univ, UK)	N/A
PB-3xFLAG-Ints4	Sobreexpresión de INTS4 con 3xFLAG tag	Este estudio	pF1787
pHSVg-shInts4 #1	Silenciamiento de <i>Ints4</i>	Este estudio	pF1819
pHSVg-shInts4 #2	Silenciamiento de <i>Ints4</i>	Este estudio	pF1820
pHSVg-shInts4 #3	Silenciamiento de <i>Ints4</i>	Este estudio	pF1821
pHSVg-shInts4 #4	Silenciamiento de <i>Ints4</i>	Este estudio	pF1822
pHSVg-shInts4 #5	Silenciamiento de <i>Ints4</i>	Este estudio	pF1823
pSpCas9-2A-Puro Ints4 gRNA#1	Guías para KO de Ints4 mediante Crispr/Cas9	Este estudio	pF1784
pSpCas9-2A-Puro Ints4 gRNA#2	Guías para KO de Ints4 mediante Crispr/Cas9	Este estudio	pF1785
pPB-3XFLAG-mTet2-Hygro	Sobreexpresión de TET2 con 3xFLAG tag	Jianlong Wang (Univ Columbia, USA)	pF918
pPB-3XFLAG-mTet2MUT-Hygro	Sobreexpresión de TET2 mutante catalítico con 3xFLAG tag	Jianlong Wang (Univ Columbia, USA)	pF924

Tabla suplementaria 5. Anticuerpos

WESTERN BLOT			
Anticuerpo	Referencia	Dilución	Incubación
TUBULINA (B)	sc-55529	1:800	4°C o/n
TET2	ab124297	1:3000	4°C o/n
Tag: FLAG-M2	F1804	1:1000	1h RT
PROGERINA	sc-81611	1:200	4°C o/n
INTS7	17054-1-AP	1:1000	1h30 RT
INTS5	14069-1-AP	1:3000	1h30 RT
INTS4	16130-1-AP	1:2000	1h30 RT
INTS3	16620-1-AP	1:3000	1h30 RT
INTS11	15860-1-AP	1:1000	1h30 RT
INTS10	15271-1-AP	1:3000	1h30 RT
HP1γ (a.k.a. CBX3)	sc-398562	1:500	4°C o/n
H3	ab1791	1:50.000	4°C o/n
ACTINA (B)	sc-47778	1/1000	1h RT
ACTINA (B)	A5441	1/1000	1h RT
NANOG	A300-397A-2	1:1000	1h RT
HDAC2	A300-705A-1	1:2500	1h RT
GAPDH	10494-1-AP	1:1000	1h RT
P53	sc-126	1:1000	4°C o/n
OCT4	sc-5279	1:2000	1h RT
INMUNOCITOQUÍMICA			
Anticuerpo	Referencia	Dilución	Incubación
H2AX(γ)	05-636	1:500	4°C o/n
Lamin A/C	sc-376248	1:150	4°C o/n
γH2AX	sc-517348	1:500	4°C o/n

SSEA-1	MA1-022-D488	1:1000	4°C o/n
OCT4	sc-5279	1:500	4°C o/n

Tabla suplementaria 6. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Función
Tet2 (F)	GGAGAAGGGTTGGTTTGC	RT-qPCR
Tet2 (R)	GAACATACATCACTGTGCGTCA	RT-qPCR
Ints4 (F)	TGGACGACGCCATTAACATAC	RT-qPCR
Ints4 (R)	CGCACTTGGGTAGCTTGATTTT	RT-qPCR
Ints4 (F)	ACCAGACATGGACGATCCAGCT	RT-qPCR
Ints4 (R)	GAGAAAGGCTGTCTCGGAGGTA	RT-qPCR
Actb (F)	GAGATTACTGCTCTGGCTCCTA	RT-qPCR
Actb (R)	GGACTCATCGTACTCCTGCTTG	RT-qPCR
Ssea1 (F)	ACGGATAAGGCGCTGGTACTA	RT-qPCR
Ssea1 (R)	GGAAGCCATAGGGCACGAA	RT-qPCR
Oct4 (F)	TCTTTCCACCAGGCCCCGGCTC	RT-qPCR
Oct4 (R)	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC	RT-qPCR
Zfp281(F)	CGCAGTGCGTGTTATCCTC	RT-qPCR
Zfp281(R)	TCCTTCTTAAAAGTCATGTCCG	RT-qPCR
Nanog (F)	TGGTCCCCACAGTTTGCCTAGTTC	RT-qPCR
Nanog (R)	CAGGTCTTCAGAGGAAGGGCGA	RT-qPCR
Sox2 (F)	GGAGTGGAAACTTTTGTCC	RT-qPCR
Sox2 (R)	GGGAAGCGTGACTTATCCT	RT-qPCR
Nestin (F)	GAGTTCTCAGCCTCCAGCAG	RT-qPCR
Nestin (R)	AGATCGCTCAGATCCTGGAA	RT-qPCR
U1 snARN (F)	GATACCATGATCACGAAGGTGGT	RT-qPCR
U1 snARN (R)	CACAAATTATGCAGTCGAGTTTC	RT-qPCR
U2 snARN (F)	TTTGGCTAAGATCAAGTGATATCTGTT	RT-qPCR
U2 snARN (R)	AATCCATTAAATATATTGTCCTCGGATAG	RT-qPCR
Jarid2 (F)	GAAGGCGGTAAATGGGCTTCT	RT-qPCR
Jarid2 (R)	TCGTTGCTAGTAGAGGACACTT	RT-qPCR
Xrcc5 (F)	ATGGCGTGGTCGGTAAATAAG	RT-qPCR
Xrcc5 (R)	CCTGTCGTTGGACAAACATAGTC	RT-qPCR
Atm (F)	GATCTGCTCATTTGCTGCCG	RT-qPCR
Atm (R)	GTGTGGTGGCTGATACATTTGAT	RT-qPCR
Atrx (F)	GCTTGTTGGACAGCAGGTCAAT	RT-qPCR
Atrx (R)	GTCACGGCTAATATCGTCACTC	RT-qPCR
Brca1 (F)	CGAATCTGAGTCCCCTAAAGAGC	RT-qPCR
Brca1 (R)	AAGCAACTTGACCTTGGGGTA	RT-qPCR
Gapdh(F)	TTGATGGCAACAATCTCCAC	RT-qPCR
Gapdh(F)	CGTCCCGTAGACAAAATGGT	RT-qPCR

INTS4 Exon 2 Guía #1 (F)	CACCGTGGAGAGCGGCAGATTTGCT	CRISPR sg target
INTS4 Exon 2 Guía #1 (R)	AAACAGCAAATCTGCCGCTCTCCAC	CRISPR sg target
INTS4 Exon 2 Guía #2 (F)	CACCGTGGCTTTACACAGATCTATG	CRISPR sg target
INTS4 Exon 2 Guía #2 (R)	AAACCATAGATCTGTGTAAAGCCAC	CRISPR sg target
Ints4 Diagnosis primer PCR (F)	AAGCACTTTTACCTGCTGGC	Ints4 KO diagnosis
Ints4 Diagnosis primer PCR (F) (sgRNA Guía 1)	AGCAAATCTGCCGCTCTCCA	Ints4 KO diagnosis
Ints4 Diagnosis primer PCR (F) (sgRNA Guía 2)	CATAGATCTGTGTAAAGCCAcct	Ints4 KO diagnosis
Ints4Diagnosis primer PCR (R)	AGACACGGTATGGCTCTGAC	Ints4 KO diagnosis
Ints4 secuenciación CDS (F) 2	AGTTCCAATACCGTCTTCTA	Secuenciación Ints4 CDS
Ints4 secuenciación CDS (F) 3	CTGCTGAACCAGACATGGAC	Secuenciación Ints4 CDS
Ints4 shRNA#1 (F)	CCGGCCGTCTAGTTGATGATGCATTCTCGAGAATGCATCA TCAACTAGACGGTTTTTG	Ints4 KD
Ints4 shRNA#1 (R)	AATTCAAAAACCGTCTAGTTGATGATGCATTCTCGAGAATG CATCATCAACTAGACGG	Ints4 KD
Ints4 shRNA#2 (F)	CCGGCCTGAGAGTATAGTTCCAATACTCGAGTATTGGAAC TATACTCTCAGTTTTTG	Ints4 KD
Ints4 shRNA#2 (R)	AATTCAAAAACCTGAGAGTATAGTTCCAATACTCGAGTATT GGAATATACTCTCAGG	Ints4 KD
Ints4 CDS XbaI (F)	TCTAGAGCGGCGCACCTGAAAAAGCG	Clonaje en PB
shInts4 #3 (F) (CDS)	CCGGCCGATTAACAAAGCCGAGCAACTCGAGTTGCTCGGC TTTGTTAATCGTTTTTG	Ints4 KD
shInts4 #3 (R) (CDS)	AATTCAAAAACCGATTAACAAAGCCGAGCAACTCGAGTTGC TCGGCTTTGTTAATCGG	Ints4 KD
shInts4 #4 (F) (CDS)	CCGGCCTTGACTTTCTAGTTGACATCTCGAGATGTCAACTA GAAAGTCAAGTTTTTG	Ints4 KD
shInts4 #4 (R) (CDS)	AATTCAAAAACCTTGACTTTCTAGTTGACATCTCGAGATGT CAACTAGAAAGTCAAGG	Ints4 KD
shInts4 #5 (F) (3' UTR)	CCGGTTCATACCACACACAGGATCACTCGAGTGATCCTGT GTGTGGTATGAATTTTTG	Ints4 KD
shInts4 #5 (R) (3' UTR)	AATTCAAAAATTCATACCACACACAGGATCACTCGAGTGAT CCTGTGTGTGGTATGAA	Ints4 KD
shInts4 #6 (F) (3' UTR)	CCGGTGGATGTGTATAGGCTTCTCGAGAAGCCTATA CATACACATCCATTTTTG	Ints4 KD
shInts4 #6 (R) (3' UTR)	AATTCAAAAATGGATGTGTATGTATAGGCTTCTCGAGAAG CCTATACATACACATCCA	Ints4 KD

Tabla suplementaria 7. Expresión en envejecimiento de lo (28M vs 2M) de los interactores de TET2 identificados en células ESCs que tienen capacidad de unión a ARN (RBPs).

Se muestran los interactores de TET2 clasificados por orden según su cambio con el envejecimiento (logFC) y el análisis estadístico (FDR).

Gen	logFC	FDR	2M_#09	2M_#11	2M_#12	28M_#20	28M_#21	28M_#22
Tet2	-0.92	0	1072.2	991.5	881.7	626.2	450.6	425.1
Gtf2i	-0.79	0	3922.1	4229.1	2934.0	2355.3	1989.5	1861.4
Numa1	-0.5	0	3055.7	3187.9	2937.5	2251.6	2106.1	2059.6
Ints4	-0.49	0	739.3	750.3	667.1	488.4	527.8	500.0
Mvp	-0.4	0.02	1469.9	1628.5	1631.2	1337.5	1163.8	1021.0
Ranbp2	0.26	0.04	4263.7	4245.6	4439.9	5004.8	5094.9	5518.0

Khsrp	0.28	0.04	2124.4	2179.9	2379.5	2826.7	2663.2	2708.3
Hnrnpk	0.29	0.03	5537.9	5498.5	6176.7	6701.4	7181.7	7313.3
Vcp	0.29	0.05	7117.5	7359.0	7534.0	8131.0	9625.1	9374.0
Rps19	0.3	0.03	4054.3	4103.9	4710.2	5336.0	5397.8	5284.5
Smarca4	0.31	0.02	2520.8	2426.6	2690.4	3092.2	3195.2	3265.7
Capza2	0.32	0.02	1499.8	1507.9	1683.4	1883.9	2005.4	2006.8
Capzb	0.32	0.02	3392.3	3437.4	3967.7	4606.1	4602.4	4407.8
Dst	0.34	0	12829.9	12348.4	13213.0	16101.7	16047.4	16796.3
Hnrnpf	0.35	0.02	1683.1	1773.0	2083.6	2363.1	2332.6	2459.4
Svil	0.36	0.04	1153.2	954.6	1263.4	1538.7	1448.3	1409.8
Ruvbl1	0.37	0.04	271.8	277.1	310.9	363.0	398.6	367.9
Ints1	0.38	0.03	1190.6	1136.9	1465.3	1529.4	1724.3	1770.0
Tardbp	0.39	0.04	1537.2	1529.1	1753.0	1742.3	2368.7	2328.4
Rps9	0.39	0.01	3588.0	3101.4	3930.6	4788.8	4860.0	4482.7
Sf3a3	0.39	0.02	379.0	371.9	428.1	518.6	520.2	533.1
Dynll1	0.4	0.04	1176.9	1168.2	1522.1	1517.1	1835.1	1857.0
Rbbp7	0.41	0.03	1791.5	1764.7	1808.7	1938.1	2610.4	2756.8
Eif3c	0.41	0.01	3108.0	2868.5	3521.1	4515.6	4199.6	4081.8
Lima1	0.41	0	3124.3	2686.2	3088.3	4022.5	4130.0	3841.7
Rps3	0.41	0.01	4137.8	4082.7	5060.6	5843.0	6314.9	5808.8
Msh6	0.42	0.01	512.4	511.8	573.1	750.0	666.2	756.7
Dhx15	0.45	0	1926.2	1924.0	2058.1	2502.4	2791.6	2893.4
Hsp90ab1	0.48	0.01	11921.0	11003.5	13627.2	15058.4	17554.4	18929.7
Tpr	0.48	0	2355.0	2306.9	2500.1	3608.4	3288.4	3220.5
Eif3g	0.48	0.01	433.9	428.1	549.9	696.6	712.4	611.3
Snrpb	0.49	0.01	784.2	834.0	981.5	1032.5	1387.8	1330.5
Hnrnpd	0.5	0	563.5	503.6	592.8	840.6	756.9	784.2
Hspa9	0.5	0	4076.7	3897.7	4878.4	6948.3	5830.8	5784.5
Ptbp1	0.5	0	2714.1	2470.8	2968.8	3440.5	4018.4	4315.3
Prpf31	0.52	0.01	319.2	332.3	458.3	553.4	528.6	552.9
Mbd3	0.53	0	718.1	618.6	828.4	1076.7	1043.0	1059.5
Hspa8	0.53	0	13413.3	12912.8	16384.8	20184.6	21362.2	21002.6
Kif20b	0.55	0.01	346.6	507.2	509.3	708.2	633.5	717.0
Eif4a1	0.56	0	4334.8	4057.8	5539.7	6508.7	7387.3	7128.3
Eif3a	0.57	0	3346.2	3237.6	3990.9	6081.4	5008.5	4908.9
Erh	0.58	0	589.7	586.4	794.7	924.9	1058.9	1034.2
Kpna2	0.58	0.01	1001.1	1335.7	1711.2	1949.0	2101.1	2236.9
Snrpd2	0.6	0.01	284.3	291.8	446.7	497.7	599.1	516.6
Prmt1	0.6	0	690.7	624.1	849.2	993.8	1163.0	1223.7
Otud4	0.63	0.01	1410.0	1393.7	1691.5	1744.6	2574.3	2941.8
Myo1b	0.65	0.01	807.9	417.0	734.4	1104.5	1137.8	1001.2

Ldha	0.67	0.01	4946.9	5048.4	7554.9	7211.5	10813.2	11286.0
Lmnb1	0.69	0	421.4	464.9	581.2	698.9	855.9	896.5
Snrpd3	0.69	0	230.6	232.9	285.4	395.5	417.0	429.6
Snrpd1	0.77	0	209.5	283.5	316.7	434.2	502.6	493.4
Tubb5	0.78	0	9617.1	9184.5	12214.1	15790.6	19238.5	19482.6
Ywhag	0.78	0	3790.0	3434.6	4531.6	6058.2	7458.6	7128.3
Myl6	0.79	0	1428.7	1422.3	1735.6	2904.1	2819.3	2371.3
Flna	0.87	0	32354.6	29944.1	45670.5	52503.4	76850.6	76563.7
Mybbp1a	0.9	0	1347.7	1321.9	1936.3	2443.6	3162.5	3309.7
Myo1c	0.95	0	5671.3	6381.4	9660.6	12590.8	15325.0	15767.6
Mthfd1l	1.02	0	486.2	423.5	650.9	899.4	1160.5	1227.0
Hspd1	1.02	0	1648.2	1753.7	2386.4	3603.8	4329.7	4169.9
Ddx21	1.04	0	1044.7	953.7	1498.9	2206.7	2654.0	2592.7
Actb	1.07	0	52065.0	49646.9	81038.9	100552.4	148321.0	152935.7
Tpm1	1.07	0	5332.2	4446.3	7254.4	9377.9	14270.3	13899.6
Tpm4	1.07	0	4855.9	4381.9	7978.4	11038.9	13772.7	13129.8
Dbn1	1.17	0	571.0	334.2	438.5	1254.7	1128.6	783.1
Coro1c	1.5	0	946.3	853.4	1364.3	2527.9	3412.5	3299.8
Hspa5	0.4	0.07	5815.9	6624.4	9041.1	9292.8	9684.7	9855.3
Ddx5	-0.24	0.07	9302.9	9059.3	8413.4	7767.2	7569.4	7239.5
Tmod3	0.32	0.08	1610.8	1410.3	1937.5	2104.5	2132.1	2044.2
Top2a	0.35	0.11	2209.2	2990.0	3369.1	3492.3	3510.7	4184.2
Ogt	-0.29	0.12	3135.5	3512.0	3193.9	2229.2	2756.4	2958.4
Tet1	-0.59	0.12	87.3	90.2	41.8	53.4	42.0	30.8
Hcfc1	0.22	0.15	2600.6	2394.4	2764.6	3120.8	2911.6	3036.6
Hnrnpu	0.2	0.16	5451.9	4832.0	5166.2	6099.2	5927.3	5794.5
Eif3k	0.22	0.16	812.9	778.8	889.8	973.7	985.1	959.3
Copb2	0.21	0.17	3029.5	2975.3	3478.1	3695.1	3749.0	3601.6
Tmpo	0.3	0.17	1664.4	1783.1	1776.2	1714.4	2215.2	2614.7
Zmym2	-0.24	0.19	1408.8	1364.3	1232.1	965.2	1197.4	1180.7
Trap1	0.25	0.19	603.4	682.1	759.9	777.1	793.8	896.5
Maea	0.21	0.2	1165.7	1155.3	1324.9	1329.8	1484.3	1448.3
Ranbp9	-0.21	0.2	1287.9	1283.3	1119.6	1088.3	1022.0	1059.5
Rif1	0.24	0.2	713.1	765.9	856.2	839.0	947.3	999.0
Actl6a	0.27	0.22	392.7	309.3	423.5	444.3	451.4	480.2
Pcbp2	0.17	0.22	3713.9	3725.5	3807.6	4090.6	4127.4	4530.1
Mta3	-0.21	0.24	488.7	464.9	491.9	425.7	394.4	419.6
Rbm39	-0.2	0.25	4094.2	4021.9	3876.1	3906.4	3220.4	3234.8
Eif3f	0.2	0.25	1997.2	1757.4	2050.0	2403.3	2185.8	2109.2
Sin3a	-0.17	0.28	1012.3	1016.3	973.4	895.5	860.9	904.3
Rps4x	0.17	0.29	6881.8	6748.7	7836.8	8380.2	8094.6	7774.8

Setd1a	0.21	0.29	432.6	379.3	468.7	501.6	471.6	525.4
Rbm25	0.15	0.31	2356.3	2434.9	2352.8	2788.8	2568.4	2599.3
Smarcd1	-0.18	0.33	441.3	448.3	453.6	380.0	391.0	407.5
Trim28	0.19	0.36	2193.0	2087.8	2417.8	2153.3	2779.0	2796.5
Flii	0.16	0.37	2260.3	2506.7	2765.8	2740.8	2785.8	2928.6
Morc3	0.16	0.39	563.5	533.9	547.6	572.0	630.2	646.5
Puf60	0.15	0.4	1007.3	970.3	1098.7	1069.7	1177.2	1185.1
Myo18a	0.16	0.42	1685.6	1668.1	2015.2	1825.1	2075.1	2151.0
Eef1a1	0.13	0.44	57195.2	54558.1	63110.0	68243.7	62770.8	61280.7
Ckap5	0.12	0.44	2214.2	2379.7	2334.2	2473.7	2445.9	2647.8
Mta2	0.13	0.46	1528.5	1379.0	1628.9	1686.6	1607.7	1696.2
Pcbp1	0.13	0.47	2416.1	2400.8	2762.3	2911.1	2622.1	2798.7
Bclaf1	0.13	0.47	2234.1	2429.4	2490.9	2791.9	2433.3	2623.5
Arid1a	0.11	0.48	1835.2	1701.2	1808.7	1928.1	1890.5	1982.5
Pspc1	0.15	0.49	406.4	329.6	380.5	409.5	399.4	442.8
Matr3	-0.12	0.5	2227.9	2144.9	1965.3	1830.5	1853.5	2104.8
Stk38	-0.11	0.53	1229.3	1175.6	1280.8	1206.7	1098.4	1083.8
Polr2a	-0.11	0.53	3307.5	3473.3	3413.2	3437.4	2919.2	3031.1
Tyms	0.14	0.53	352.8	342.5	386.3	414.1	362.5	422.9
Hdac1	-0.1	0.54	1138.2	1117.6	1211.2	1054.2	1086.6	1071.7
Sf3b3	0.09	0.59	2802.6	2717.5	2907.3	2907.2	2982.9	3085.0
Add1	0.1	0.59	2909.8	2782.9	2763.5	3274.8	2980.4	2810.8
Rbm10	-0.12	0.6	471.3	558.8	545.3	448.2	475.8	521.0
Hnrnpul2	0.09	0.65	1446.2	1448.1	1472.2	1681.2	1486.9	1477.0
Ap2b1	0.07	0.69	3538.2	3643.6	3706.7	3582.1	3912.6	3962.8
Htatsf1	0.09	0.71	402.7	385.7	393.3	458.2	404.4	395.4
Ranbp10	-0.08	0.71	834.1	873.6	953.6	788.7	813.1	909.8
Chd4	-0.06	0.71	6021.6	5684.5	5495.6	5377.1	5603.4	5469.5
Cttn	-0.06	0.73	4080.5	4632.3	4571.0	4089.1	4293.6	4298.8
Mkln1	-0.06	0.75	1695.5	1557.6	1517.5	1437.3	1512.9	1602.5
Trim35	0.06	0.75	2765.2	2705.5	2794.8	3092.9	2831.9	2703.9
Smc3	0.07	0.77	730.6	741.1	689.1	874.6	730.0	675.2
Wdr26	0.05	0.78	3186.6	3338.0	3207.8	3356.1	3371.4	3341.6
Sf3b2	0.04	0.82	2281.5	2260.9	2174.1	2492.3	2178.3	2266.7
Ell	0.06	0.83	352.8	346.1	430.4	376.2	394.4	408.6
Frg1	-0.07	0.83	189.5	163.9	183.3	203.6	157.8	143.2
Snrnp200	-0.03	0.85	2681.7	2761.7	2771.6	2620.8	2550.0	2837.2
Myh10	0.06	0.86	5364.6	3839.7	3890.0	3384.0	4962.3	5417.8
Hnrnmp	-0.03	0.89	1544.7	1666.2	1690.3	1725.3	1611.0	1449.4
Msh2	-0.04	0.9	295.5	302.9	275.0	253.9	270.2	327.1
Upf1	-0.03	0.91	1832.7	1718.7	1782.0	1520.2	1807.4	1895.5

Thrap3	0.02	0.93	2942.2	2986.3	2847.0	3161.1	2860.4	2868.0
Eif4b	-0.01	0.95	5618.9	5149.6	5706.8	5790.4	5125.1	5398.0
Sf3b1	0.01	0.97	4343.5	4094.7	4154.5	4140.2	4182.8	4343.9
Armc8	0.01	0.97	421.4	446.5	496.6	441.2	456.5	479.1
Polr2b	0.01	0.98	851.5	835.0	831.8	855.3	858.4	815.0
Nono	-0.01	0.98	2663.0	2543.5	2444.4	2386.3	2536.5	2700.6
Setx	0	1	2133.1	2306.0	2355.1	2252.4	2223.6	2325.1
Sall4	0.04		0.0	0.0	0.0	0.8	0.8	0.0

Tabla Suplementaria 8. Interactomas de TET2 reportados en la literatura.

Estudio	Tipo celular	Especie	Método	Interactores reportados
Sun et al. 2018 Cell Stem Cell ³⁰³	MDS-L + Flag-Tet2	Humano	FLAG IP-MS	218 (con más de 10 péptidos)
Nickerson et al. 2016 Oncogene ³⁰¹	HEK293T + 3xFL-Tet2	Humano	FLAG IP-MS	67 (con más de 2 péptidos)
Chen et al. 2013 Nature ³⁰²	HEK293T + SPB-Tet2	Humano	Strep IP-MS	49 (con más de 3 péptidos)
Guallar et al. 2018 Nature Genetics ¹⁴⁸	Células madre embrionarias Tet2 3xFL KI	Ratón	FLAG-IP MS SILAC IP-MS	154

Tabla Suplementaria 9. Lista de los 32 interactores de TET2 candidatos.

Se muestran los interactores de TET2 candidatos clasificados por orden según su cambio con el envejecimiento (FC) y el análisis estadístico (FDR).

Gen	Cambio FC	FDR	¿Identificado en mESCs?	¿Cambio conservado en fibroblastos humanos?	Ortólogo <i>C. elegans</i>
Igf2bp3	5.56	1.59E-08			<i>imph-1</i>
Igf2bp1	3.09	0.0011	SÍ		
Coro1c	2.82	3.1E-11			<i>cor-1</i>
Tuba4a	2.26	1.39E-09			
Ckb	2.25	1.7E-07			
Dbn1	2.24	1.01E-05	SÍ		
Tpm4	2.10	1.75E-05	SÍ		

Tpm1	2.10	1.23E-05	Sí		<i>lev-11</i>
Actb	2.09	2.69E-05	Sí		<i>act-1</i>
Ddx21	2.06	9.41E-07	Sí		
Hspd1	2.03	9.46E-08	Sí		<i>hsp-60</i>
Mthfd1l	2.03	5.74E-06	Sí		
Ncl	1.99	3.45E-12			
Cobl	1.97	0.000247			
Myo1c	1.93	4.64E-05	Sí		
Nop58	1.89	1.75E-06			<i>nol-58</i>
Hsp90aa1	1.86	3.3E-07			<i>hsp-90</i>
Mybbp1a	1.86	3.78E-05	Sí		
Flna	1.83	0.000214	Sí		
Myo1b	1.57	0.012735	Sí	Sí	<i>imb-1</i>
Otud4	1.55	0.006178	Sí	Sí	<i>otub-4</i>
Ldhb	0.24	8.4E-14		Sí	
Mccc1	0.58	1.15E-05			<i>mccc-1</i>
Numa1	0.71	4.74E-05	Sí	Sí	
Gtf2i	0.58	5.47E-05	Sí		
Pccb	0.57	0.001045			<i>pccb-1</i>
Ints4	0.71	0.00116	Sí		<i>ints-4</i>
Mccc2	0.70	0.008533			<i>mccc-2</i>
Pcca	0.69	0.012604			<i>pcca-1</i>
Xrcc5	0.75	0.01551			<i>cku-80</i>
Hspa1a	0.60	0.016559			



Esta tesis doctoral investiga las funciones que desempeña TET2 a través de sus proteínas interactoras en el envejecimiento y en las células pluripotentes, consideradas el paradigma de estado celular joven. Empleando como modelo de envejecimiento in vitro fibroblastos derivados de ratones jóvenes y viejos, se muestra una regulación a la baja tanto de Tet2 como de su interactor Ints4 con la edad. Además, se estudia el papel del complejo TET2-INTS4 en células pluripotentes, revelando un papel desconocido de este complejo en la reparación del ADN. Finalmente se estudian otros interactores de TET2 así como reguladores epitranscriptómicos en el envejecimiento de *C. elegans*. Este estudio muestra nuevas funciones desconocidas de TET2 y nuevas perspectivas para desentrañar el papel que ésta desempeña en el envejecimiento.