



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Análisis de retención de intrones y de la expresión de isoformas de p53 en fibroblastos de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch

Paula Valentina Gaete Carrillo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Morfología

Bogotá D.C., Colombia

2022

Análisis de retención de intrones y de la expresión de isoformas de p53 en fibroblastos de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch

Paula Valentina Gaete Carrillo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Genética Humana

Director:

Gonzalo Arboleda Bustos Md. Msc. PhD.

Línea de Investigación:

Senescencia celular y envejecimiento

Análisis funcional celular/molecular de la ARN polimerasa III A (POLR3A) asociado al Síndrome Progeroide Neonatal (Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch)

Grupo de Investigación:

Grupo de Muerte Celular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Departamento de Morfología

Bogotá D.C., Colombia

2022

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Paula Valentina Gaete Carrillo

CC 1026590616

Fecha: 16 de diciembre de 2022

Agradecimientos

Al profesor Gonzalo Arboleda por guiarme durante el proceso de realización de la tesis, por su confianza y apoyo durante mi desarrollo profesional y por introducirme a la investigación sobre biología del envejecimiento.

A mis compañeros del grupo de investigación en Muerte Celular, especialmente a Camilo Delgado, Juan David Caicedo, Daniel Santos, Andrés Bustamante y Karen Velásquez, con quienes pude compartir ideas, disfrutar momentos y quienes me enseñaron las técnicas relacionadas con el mantenimiento del cultivo celular.

A Daniel Santos por guiarme, apoyarme y enseñarme todo lo relacionado con bioinformática que se realizó en este proyecto.

A mis compañeras de la maestría, especialmente a Solangy Usme.

Al profesor Adrián Sandoval, a Magda y a Julián Valencia por su acompañamiento y ayuda durante este proceso.

A los profesores de la maestría en genética humana por todas sus enseñanzas, especialmente a la Dra. Sandra Ospina, por convertirse para mí en un modelo a seguir tanto profesional, como humano.

A mi esposo, Carlos O Mendivil por todo su apoyo, amor e ideas que contribuyeron a que pudiera disfrutar y aprender al máximo durante esta experiencia.

Resumen

Análisis de retención de intrones y de la expresión de isoformas de p53 en fibroblastos de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch

Objetivo:

El objetivo de esta investigación fue evaluar el impacto de variantes patogénicas en la ARN Polimerasa III subunidad A (POLR3A) sobre la retención de intrones y la expresión relativa del ARN corto nuclear U6 y de diferentes isoformas de p53 en fibroblastos derivados de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch (SWR).

Metodología:

Se realizó un cultivo primario de fibroblastos de dos pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch (SWR) y de un control sano. Se extrajo el ARN de los fibroblastos por medio de TRIzol. A partir del ARN extraído se midió la expresión de 6 isoformas de p53, del ARN corto nuclear U6 y de genes relacionados con la senescencia celular por medio de RT-PCR. Adicionalmente se realizó un secuenciamiento global de ARN mensajero (RNA-Seq) y se analizó la retención de intrones utilizando el programa IRFinder.

Resultados y conclusiones:

En el análisis de retención de intrones no se encontraron diferencias marcadas en el porcentaje de retención de intrones (control: 7.8%, WRS1: 6.3% y WRS2: 8.14%). Los

genes con mayor retención de intrones están relacionados principalmente con vías relacionadas con la unión al ARN, la regulación del ciclo celular, regulación positiva de la transcripción, regulación positiva de vías relacionadas con la inflamación, regulación negativa de la apoptosis, transcripción del ARN, mitocondria y regulación del inicio de la traducción. Los genes con mayor retención de intrones en los pacientes se relacionan con la respuesta inmune y la función mitocondrial, mientras que los que retuvieron más intrones en el control se relacionan con la respuesta al estrés oxidativo. La paciente WRS1 mostró una mayor expresión de ARN corto nuclear U6 comparada con el control y con la paciente WRS2. Los fibroblastos de las pacientes con SWR expresaron un mayor porcentaje de p53 β y un menor porcentaje de Δ 133p53 α , concordante con una mayor expresión de los marcadores de senescencia celular p16 y p21. Estos resultados resaltan la importancia de la función de la ARN polimerasa III en el mantenimiento de la homeostasis celular, principalmente en los procesos de empalme y de reparación del ADN.

Palabras clave: síndromes progeroides, envejecimiento, empalme, intrones y p53.

Abstract

Intron retention analysis and differential expression analysis of p53 isoforms in fibroblasts from patients with Wiedemann-Rautenstrauch Syndrome

Aim:

The aim of this study was to evaluate the impact of pathogenic variants in RNA Polymerase III subunit A (*POLR3A*) on intron retention and on the relative expression of the short nuclear RNA U6 and of different p53 isoforms in fibroblasts derived from patients with Wiedemann-Rautenstrauch Syndrome (WRS).

Methods:

Primary culture of fibroblasts from two patients with Wiedemann-Rautenstrauch Syndrome (WWS) and a healthy control was performed. RNA was extracted from fibroblasts using TRIzol. The expression of six p53 isoforms, the short nuclear RNA U6 and genes related to cell senescence were measured by RT-PCR. Additionally, global mRNA sequencing (RNA-Seq) was performed, and intron retention was analyzed using IRFinder.

Results and conclusions:

In the intron retention analysis, no significant differences were found in the percentage of intron retention (control: 7.8%, WRS1: 6.3% and WRS2: 8.14%). The genes with more intron retention are mainly related to pathways related to RNA binding, cell cycle regulation, positive regulation of transcription, positive regulation of pathways related to inflammation, negative regulation of apoptosis, RNA transcription, mitochondria, and regulation of translation initiation. The genes with more intron retention in WRS patients are related to the immune response and mitochondrial function, while those with more retained introns in the control are related to the response to oxidative stress. Patient WRS1 showed a higher expression of short nuclear RNA U6 compared to control and patient WRS2. Fibroblasts

from patients with WRS express a higher percentage of p53 β and a lower percentage of Δ 133p53 α , consistent with a higher expression of the cellular senescence markers p16 and p21. These results highlight the importance of an adequate function of RNA polymerase III in the maintenance of cellular homeostasis, mainly in the splicing and DNA repair processes.

Keywords: progeroid syndromes, aging, splicing, introns and p53.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Análisis de retención de intrones y de la expresión de isoformas de p53 en fibroblastos de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch	VII
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de abreviaturas.....	XV
Planteamiento del problema.....	1
1. Marco conceptual.....	3
1.1 Envejecimiento.....	3
1.2 Senescencia celular	3
1.3 Síndromes progeroides	4
1.4 Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch.....	6
1.5 ARN polimerasa III dependiente de ADN	8
1.6 ARN corto nuclear U6	8
1.7 Corte y empalme.....	9
1.8 Retención de intrones	10
1.9 p53.....	10
1.9.1 Descripción de las características de las principales isoformas de p53	12
2. Marco Teórico.....	13
2.1 Cambios en el empalme relacionados con el envejecimiento.....	13
2.2 La ARN polimerasa III y el envejecimiento	15
2.3 Cambios en la expresión de isoformas de p53 y senescencia celular	16
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. Metodología.....	19
4.1 Tipo de estudio.....	19
4.2 Descripción de las pacientes.....	19
4.3 Obtención de fibroblastos.....	19
4.4 Extracción de ARN.....	20
4.5 Análisis de expresión global de ARN (RNA-Seq)	21

4.6	Medición de la expresión relativa del ARN corto nuclear U6, de las diferentes isoformas de p53 y de otros genes relacionados con el empalme o la senescencia celular	22
4.7	Verificación del análisis de retención de intrones	25
5.	Resultados	27
5.1	Análisis de retención de intrones	27
5.2	Verificación del análisis de retención de intrones	30
5.3	Análisis de expresión de U6	33
5.4	Análisis de expresión de isoformas de p53	34
5.5	Análisis de expresión de genes relacionados con el empalme y la senescencia celular	37
6.	Discusión	41
7.	Conclusiones y recomendaciones	45
7.1	Conclusiones	45
7.2	Recomendaciones	46
	Bibliografía	47

Lista de figuras

	Pág.
<i>Ilustración 1</i>	5
<i>Ilustración 2</i>	7
<i>Ilustración 3</i>	10
<i>Ilustración 4</i>	11
<i>Ilustración 5</i>	30
<i>Ilustración 6</i>	31
<i>Ilustración 7</i>	32
<i>Ilustración 8</i>	33
<i>Ilustración 9</i>	34
<i>Ilustración 10</i>	35
<i>Ilustración 11</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Ilustración 12</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Ilustración 13</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Ilustración 14</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Ilustración 15</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Ilustración 16</i>	Error! Bookmark not defined.

Lista de tablas

	Pág.
<i>Tabla 1</i>	7
<i>Tabla 2</i>	23
<i>Tabla 3</i>	24
<i>Tabla 4</i>	25
<i>Tabla 5</i>	28
<i>Tabla 6</i>	28
<i>Tabla 7</i>	29
<i>Tabla 8</i>	29

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

SWR	Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch
WRS	Wiedemann-Rautenstrauch Syndrome
RNA-Seq	Secuenciamiento global del ARN mensajero
POLR3A	ARN polimerasa III
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SASP	Fenotipo secretor asociado a la senescencia
Rb	Retinoblastoma
CDK2	Kinasa dependiente de ciclina 2
ARN	Ácido ribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dNTPs	Deoxinucleotidos trifosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
RNU6	ARN corto nuclear U6
RNU48	ARN corto nuclear U48
SF1	Factor del splicing tipo 1
U2AF1	Factor auxiliar del ARN corto nuclear U2
GSTM1	Glutación-S-Transferasa 1
PILRB	Receptor beta tipo 2 tipo inmunoglobulina emparejado
K7EP35	NADH deshidrogenasa 1 Alfa Subunidad 11
OAS1	2'-5'-oligoadenilato sintetasa 1
ACMG	Colegio Americano de Genética Médica
RPL26	Proteína ribosomal L26

Planteamiento del problema

Las mejoras en la salud pública que han ocurrido en años recientes han aumentado la proporción de la población que vive hasta una edad avanzada, esto ha llevado a un aumento en la incidencia de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como lo pueden ser la enfermedad cardiovascular, la osteoporosis, las enfermedades neurodegenerativas, la diabetes tipo 2 y el cáncer (Christensen, et al., 2009). El entendimiento del envejecimiento como un fenómeno global y como el principal factor de riesgo para múltiples enfermedades y alteraciones fisiológicas ha conllevado al desarrollo de modelos de envejecimiento, cuyo objetivo es describir los procesos celulares y moleculares que ocurren con la edad para poder generar estrategias de intervención que permitan inhibir la aparición de estos eventos adversos (Arboleda G, Ramírez & Arboleda H, 2007).

Los síndromes progeroides, incluyendo el Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch, constituyen una alternativa importante para el estudio del envejecimiento. Los fibroblastos de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch tienen características moleculares similares a las observadas durante el envejecimiento (aumento en los sitios de corte de la doble cadena de ADN, aumento en el tamaño del nucléolo y aparición temprana de la senescencia), y aunque ya se ha descrito la causa genética de esta enfermedad (variantes patogénicas bialélicas en el gen de la POLR3A), no es muy clara la etiología de estos cambios celulares (Báez-Becerra, et al., 2020).

Una de las hipótesis que podría responder a la pregunta anteriormente planteada es que debido a alteraciones en la expresión del ARN corto nuclear U6, a causa de la disminución en la actividad de la ARN polimerasa III, podría haber una disfunción en el proceso de empalme alternativo caracterizada principalmente por la aparición de cambios en la expresión de las isoformas de p53 y por un aumento en la retención de intrones, afectando el funcionamiento de múltiples procesos celulares y desencadenando los cambios celulares observados en estos pacientes.

1. Marco conceptual

1.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso de declive funcional dependiente del tiempo que ocurre en los organismos vivos. Este proceso conlleva a un aumento en la probabilidad de morir y es el principal factor de riesgo para múltiples enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (Christensen, et al., 2009).

A nivel macroscópico el envejecimiento se caracteriza por la aparición de arrugas, pérdida del cabello, canicie, disminución en la elasticidad y en el grosor de la piel, presbicia, disminución de la masa ósea y de la masa muscular, aumento de la masa grasa, pérdida progresiva de la fertilidad, disminución progresiva en la capacidad cognitiva, hipoacusia, disminución en la talla, entre otras características (Bhadra, et al., 2020).

Adicionalmente, existen diferentes marcadores moleculares del envejecimiento, siendo uno de los más significativos la inestabilidad genómica. La inestabilidad genómica ocurre debido a una acumulación en los daños al material genético debido a la exposición acumulada a mutágenos, al error propio de la polimerasa y a deficiencias en los mecanismos de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Otros marcadores moleculares importantes asociados con el envejecimiento son: el acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, alteraciones en la arquitectura nuclear, alteraciones en las vías de señalización relacionadas con la exposición a nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, pérdida en el número y en la función de células madre, alteraciones en la comunicación intercelular, entre otros (López-Otín, et al. , 2013).

1.2 Senescencia celular

La senescencia es un estado celular inducido por mecanismos intrínsecos y extrínsecos y está caracterizado por un arresto irreversible del ciclo celular. La senescencia está asociada a cambios morfológicos (células alargadas, planas, vacuoladas y con cambios en la morfología nucleolar), resistencia a la apoptosis y al fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). El SASP incluye diferentes tipos de proteínas, entre los que se incluyen: factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias y proteasas, estas proteínas

propagan y mantienen el fenotipo senescente por medio de mecanismos paracrinos y autocrinos (Kumari & Jat, 2021).

El arresto celular inducido por la senescencia está mediado por la vía p53/p21 o por la vía p16/Retinoblastoma (Rb), ya que inhiben la activación de E2F por medio de la prevención de la fosforilación de Rb. El E2F es el factor de transcripción que estimula la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. El daño al ADN activa a las kinasas ATM o ATR, que estabilizan p53 y por tanto estimulan la expresión de p21; p21 es un inhibidor de la kinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) que fosforila a Rb, rompiendo el complejo Rb/E2F y por tanto, activando a E2F. La respuesta al daño al ADN también aumenta la expresión de p16, que inactiva a las kinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4 y CDK6), que también pueden fosforilar a Rb y activar a E2F (ver Ilustración 1) (Amaya-Montoya, et al., 2020).

La senescencia celular se puede clasificar como senescencia programada por el desarrollo, senescencia prematura inducida por el estrés (estrés del retículo endoplásmico, daño al ADN, aumento en la expresión de oncogenes, cambios epigenéticos, desorganización de la cromatina, alteración en la proteostasis, disfunción mitocondrial, inflamación o aumento en el estrés oxidativo) o senescencia replicativa (asociada con el acortamiento extremo de los telómeros). Aunque la senescencia celular tiene funciones importantes durante el desarrollo y la cicatrización, la acumulación progresiva de células senescentes se asocia con una pérdida en la funcionalidad de los tejidos y múltiples enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Amaya-Montoya, et al., 2020).

1.3 Síndromes progeroides

Los síndromes progeroides son enfermedades genéticas de muy baja prevalencia que se caracterizan por presentar algunas características clínicas que se asimilan al fenotipo de envejecimiento. Estas enfermedades generalmente se deben a inestabilidad genómica causada por alteraciones en la arquitectura nuclear o a defectos en los mecanismos de reparación del ADN. Ejemplos de estas enfermedades incluyen: la progeria de Hutchinson-Gilford, la progeria de Néstor-Guillermo, la displasia mandibuloacral, el síndrome de Werner, el síndrome de Bloom, el Síndrome de Cockayne, la anemia de Fanconi, el síndrome de Seckel, Ataxia-Telangiectasia y el Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch (Carrero, et al., 2016).

Los marcadores moleculares de los síndromes progeroides, como es de esperarse, son muy similares a los marcadores del envejecimiento e incluyen: inestabilidad genómica, disfunción en los telómeros, alteraciones epigenéticas, arquitectura nuclear aberrante, defectos en el ciclo celular y en la mitosis, senescencia celular, disfunciones metabólicas, inflamación crónica y deficiencia en las células madre (Carrero, et al., 2016).

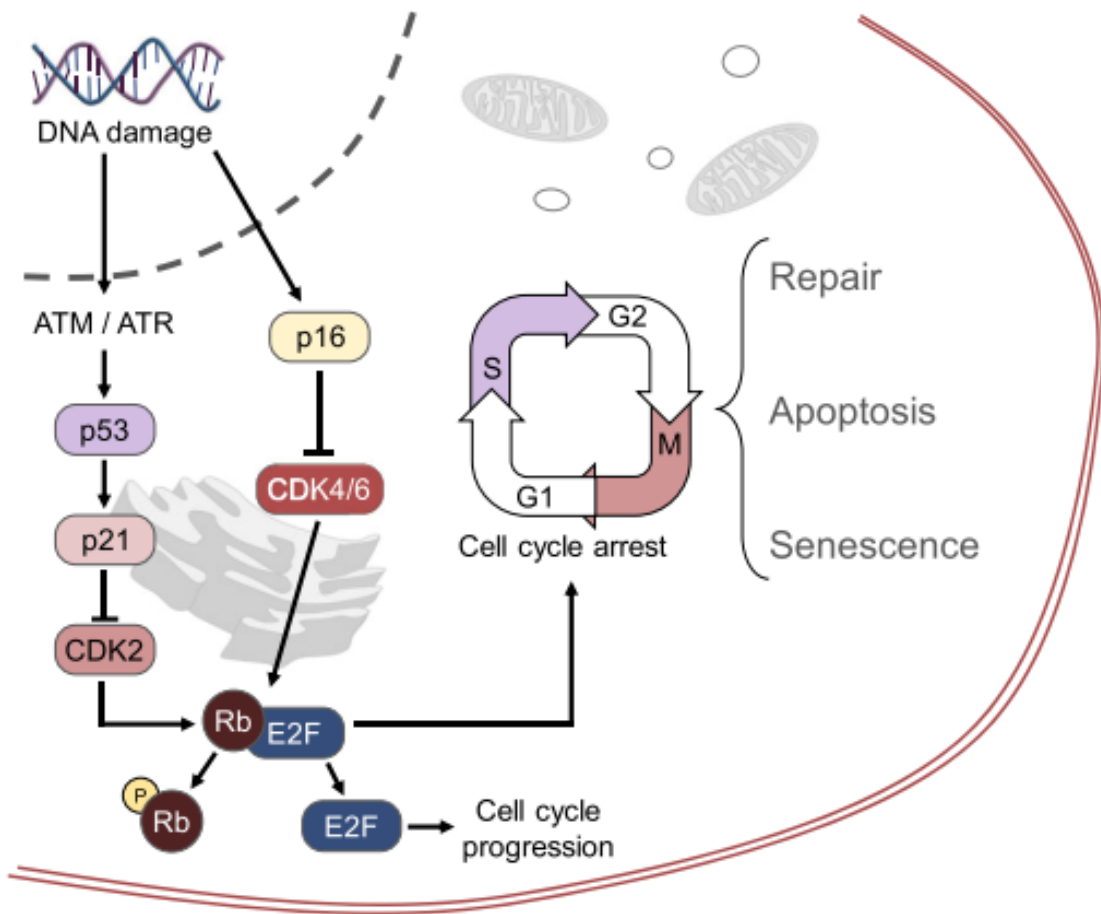


Ilustración 1

Vías de señalización (p53/p21 y p16/Rb) que va desde la respuesta al daño al ADN hasta la senescencia celular. El daño al ADN activa a las kinasas ATM o ATR, que estabilizan a p53 y por tanto aumentan la expresión de p21. P21 inhibe a CDK2 y previene la fosforilación de Rb y por tanto la activación de E2F. La respuesta al daño al ADN también aumenta la expresión de p16, que inhibe a CDK4 y CDK6, que también fosforilan a Rb. Al prevenir la fosforilación de Rb, se mantiene el complejo Rb/E2F, por lo que el E2F permanece inactivado. Tomado de: Amaya-Montoya, M., Pérez-Londoño, A., Guatibonza-García, V., Vargas-Villanueva, A., & Mendivil, C. O. (2020). Cellular senescence as a therapeutic target for age-related diseases: a review. *Advances in therapy*, 37(4), 1407-1424.

1.4 Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch

El síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch fue descrito por primera vez en 1977 por Thomas Rautenstrauch y Friedemann Snigula, quienes describieron a dos hermanas con características progeroides desde el nacimiento, dadas por: baja talla, ausencia de tejido graso subcutáneo, cara triangular, venas prominentes, fontanelas amplias y dientes neonatales (Paolacci, et al., 2017). Una de las pacientes murió a los 5 años de edad, mientras que la otra fue seguida hasta los 16 años de edad, en donde fueron evidentes otras características clínicas: ataxia, espasticidad y pérdida de los dientes. Esta última paciente finalmente falleció a los 17 años debido a una causa desconocida. En 1979, Hans-Rudolph Wiedemann describió a otros dos pacientes no relacionados con las mismas características fenotípicas que los pacientes previamente descritos por Rautenstrauch y Snigula. Después, en 1981 Devos, Leroy, Frijins y Van den Berghe describieron a un quinto paciente con el mismo fenotipo y fueron ellos quienes propusieron el epónimo de síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch (Paolacci, et al., 2017).

Hasta el momento se han descrito menos de 50 pacientes con la enfermedad, que tiene un tipo de herencia autosómica recesiva y se presenta desde el periodo fetal, ya que en los ultrasonidos fetales se puede evidenciar retraso en el crecimiento intrauterino y anomalías craneales. Estos pacientes suelen nacer con macrocefalia, venas prominentes, blefarofimosis, ojos con implantación profunda, entropión superior bilateral, microstomía, labio superior delgado, micrognatia, dientes neonatales, implantación baja de los pabellones auriculares, orejas pequeñas y rotadas hacia posterior, ausencia del tejido adiposo subcutáneo, piel delgada, aracnodactilia e hiperlaxitud. A lo largo de la vida estos pacientes pueden tener retraso en el neurodesarrollo, bajo peso y baja talla, alopecia, espasticidad, ataxia, temblor, distonía y acortamiento de las falanges de manos y pies. En los paraclínicos tienen diferentes alteraciones metabólicas como hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia o diabetes (Paolacci, et al., 2017).

De los pocos casos reportados en la literatura, una proporción considerable han sido descritos en Colombia, incluyendo a una familia con tres hermanos afectados, descrita en el 2011 (ver Ilustración 2) (Arboleda, et al., 2011).

Un estudio publicado en el año 2018, en el cual se estudiaron familias con pacientes afectados por el síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch, realizó secuenciación exómica en dos familias y secuenciación Sanger en ocho familias, encontró que la enfermedad está causada por la presencia de variantes patogénicas en el gen POLR3A, que codifica para la subunidad A de la ARN_ (ácido ribonucleico) polimerasa III dependiente de ADN. En la tabla 1 se muestran las variantes encontradas en el estudio anteriormente mencionado (Paolacci, et al., 2018).



Paciente No.1. Paciente No.2. Paciente No.3.

Ilustración 2

Fotografías de tres hermanos con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch nacidos en Colombia. Tomada de: Arboleda, G., Morales, L. C., Quintero, L., & Arboleda, H. (2011). Neonatal progeroid syndrome (Wiedemann–Rautenstrauch syndrome): report of three affected sibs. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155(7), 1712-1715.

Tabla 1

Variantes descritas en el gen *POLR3A* en los pacientes con síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch. Tomado de: Paolacci, S., Li, Y., Agolini, E., Bellacchio, E., Arboleda-Bustos, C. E., Carrero, D., ... & Hennekam, R. C. (2018). Specific combinations of biallelic *POLR3A* variants cause Wiedemann-Rautenstrauch syndrome. *Journal of medical genetics*, 55(12), 837-846.

Familia	Variantes encontradas	
	Heredadas del padre	Heredadas de la madre
WRS001	c.3206G>A (p.Arg1069Gln)	c.1909+18G>A
WRS002	c.3337-11T>C, c.1909+22G>A	c.1048+5G>T
WRS003	c.3337-11T>C, c.1909+22G>A	c.2474C>G (p.Ser825Ter)
WRS004	c.3337-11T>C, c.1909+22G>A	c.1800C>T (p.Ile600Ile)
WRS005	c.2617-1G>A	c.3337-11T>C, c.1909+22G>A
WRS006	No se encontró ninguna variante	c.3773_3773delCT (p.Leu1258Glyfs*12)
WRS007	No se encontró ninguna variante	c.3773_3773delCT (p.Leu1258Glyfs*12)
WRS008	c.4003G>A (p.Gly1335Arg)	c.*18C>T
WRS009	c.3G>T (p.Met1?)	c.*18C>T
WRS010	No se encontró ninguna variante	c.3874G>A (p.Asp1292Asn)
WRS011	No se encontró ninguna variante	c.2707G>A (p.Gly903Arg)
WRS012	c.3392A>G (p.Lys1131Arg)	Delección que compromete los exones 12-15

1.5 ARN polimerasa III dependiente de ADN

La ARN polimerasa III es una polimerasa dependiente de ADN que sintetiza ARNs cortos esenciales para el adecuado funcionamiento de la célula, como el ARN ribosomal 5s, los ARNs de transferencia, el ARN corto nuclear U6 y algunos ARNs no codificantes, como el 7SL y el 7SK, que regulan la actividad de la ARN polimerasa II (Paolacci, et al., 2018). Adicionalmente, se ha demostrado que el funcionamiento adecuado de este complejo protéico es importante para un adecuado funcionamiento del nucléolo, el ensamblaje de ribosomas y la traducción de proteínas (Báez-Becerra, et al., 2020).

Esta proteína está compuesta por 17 subunidades y tiene una masa total de aproximadamente 700 kD en la levadura. Su estructura es más compleja que la de las otras dos polimerasas, ya que cuenta con 5 subunidades adicionales, que se organizan en subcomplejos. Una adecuada organización de estos subcomplejos es esencial para el reclutamiento de factores de transcripción y la unión de promotores (Abascal-Palacios, et al., 2018).

El complejo de la ARN polimerasa III es ensamblado en el citoplasma y luego es transportada al núcleo en donde termina su proceso de maduración y plegamiento mediado por chaperonas. La subunidad A, codificada por el gen POLR3A, es la subunidad de mayor tamaño del complejo y consiste en 1390 aminoácidos y tiene un peso molecular de 156 kD. La POLR3A tiene el dominio de unión al ADN y junto con la POLR3B constituyen el centro catalítico del complejo. POLR3A está formada principalmente por hélices alfa, que promueven el movimiento de la polimerasa a través de la interface de ARN y ADN (Báez-Becerra, et al., 2020).

1.6 ARN corto nuclear U6

El ARN corto nuclear U6 es un componente clave del complejo de corte y empalme y es uno de los transcritos de la ARN polimerasa III. El complejo de corte y empalme o espliceosoma es una maquinaria molecular que consiste en cinco ARNs cortos nucleares: U1, U2, U4, U5 y U6 y sus proteínas asociadas, que se encarga de retirar los intrones del ARN mensajero precursor (Didychuk, et al., 2018).

Existen alrededor de >900 copias del gen de U6 distribuidas a lo largo del genoma humano, aunque la mayoría son pseudogenes y no se encuentran transcripcionalmente activos. Al menos cuatro genes humanos se encuentran transcripcionalmente activos a diferente grado todo el tiempo. En humanos, el ARN U6 es transcrito por el promotor tipo III de la ARN Polimerasa III, el mismo que promueve la transcripción del ARN 7SK y de la ARNasa P. Estos genes tienen promotores corriente arriba del gen y una caja TATA 30 pares de bases “*upstream*” al sitio de inicio de la transcripción. La transcripción del ARN U6 es

realizada de forma casi exclusiva por la ARN polimerasa III y estudios de inmunoprecipitación de la cromatina en *S.cerevisiae*, han detectado muy bajos niveles de la ARN polimerasa II (Didychuk, et al., 2018).

En lugar del cap de 7-metilguanosina (que ocurre en los transcritos de la ARN polimerasa II), este ARN posee una modificación de γ -monometilfosfato en el extremo 5'. Esta modificación regula la estabilidad y el transporte hacia adentro y fuera del núcleo de este ARN. Adicionalmente, en el extremo 3' cuenta con una cola de oligo(U) de longitud variable con un terminal 2',3' cis diol, que se relaciona con la actividad del ARN. El extremo 3' también se puede adenilar, esta adenilación previene la uridilación y marca al ARN para su posterior degradación (Didychuk, et al., 2018).

El ARN U6 es el componente del espliceosoma más conservado en su secuencia a nivel evolutivo, se encuentra en el corazón del espliceosoma y junto a U2, forman el centro catalítico del espliceosoma. Para poder ensamblarse en el espliceosoma, U6 debe formar previamente un complejo con el ARN U4. Para unirse al U4, U6 debe ser desligado de la proteína Prp24 (chaperona de ARN), que actúa como un regulador negativo de la función del U6. El complejo U4/U6 luego forma un tricómpleso U4/U6/U5, que tiene afinidad por el prespliceosoma, formando al complejo de empalme activo (ver Ilustración 3) (Didychuk, et al., 2018).

1.7 Corte y empalme

El corte y empalme (en inglés *splicing*) es un proceso crítico de regulación post-transcripcional en el que se retiran los intrones del ARN mensajero precursor y ocurre en el complejo de corte y empalme (Lee & Rio, 2015). La reacción de corte y empalme consiste en dos pasos de transesterificación. Primero, el oxígeno 2' de un nucleótido cercano al extremo 3' del intrón (en el sitio de ramificación y más frecuentemente una adenosina) es activado para el ataque nucleofílico sobre el extremo 5' de la unión exón-intrón (sitio de splicing 5') para formar una "lariat" formado por el intrón y el extremo 3' del exón. Después, el ataque nucleofílico del exón 5' liberado sobre la unión intrón-3'exón (sitio de splicing 3') produce una unión entre el exón 4' y el exón 3' y libera la "lariat" con el intrón (Didychuk, et al., 2018).

El complejo de corte y empalme o espliceosoma, es la maquinaria que realiza las reacciones relacionadas con este proceso, y está formado por 5 ARNs cortos nucleares y sus proteínas asociadas. El proceso inicia con la unión del ARN corto nuclear U1 al sitio de splicing 5' y la unión del ARN corto nuclear U2 al punto de ramificación cercano al sitio de splicing 3', formando el complejo A o prespliceosoma. Luego al complejo A se une el complejo preformado constituido por U4/U6 y U5, formando el complejo B. Después ocurre un cambio conformacional en el complejo, que causa la liberación de U1 y U4, dejando en el complejo a U2/U6 y U5, que forman el complejo B activado, el cual cumple con la actividad catalítica (ver Ilustración 3) (Lee & Rio, 2015).

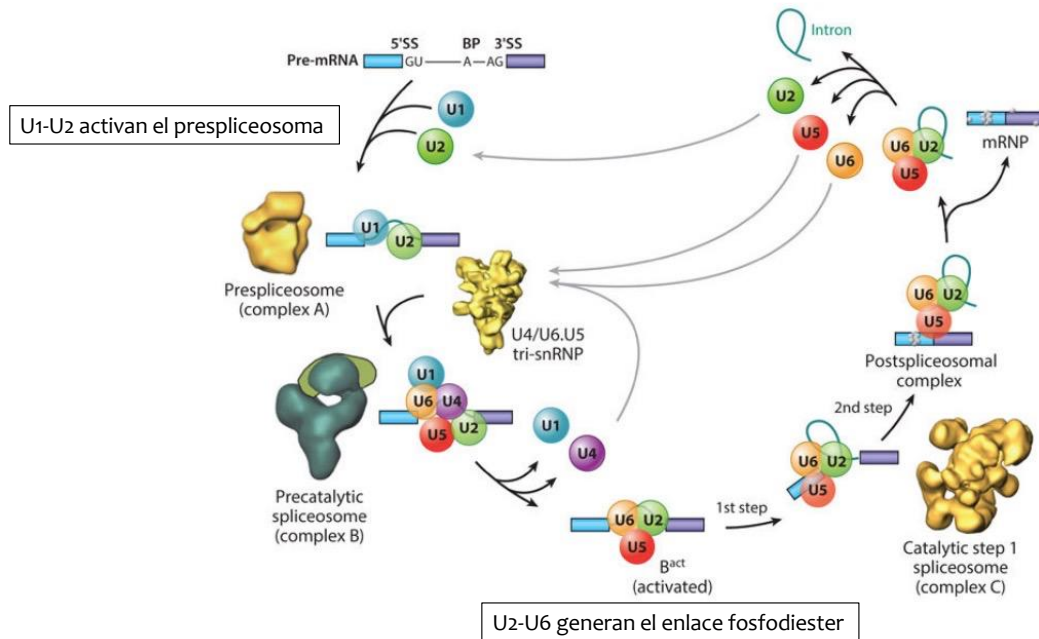


Ilustración 3

Proceso de corte y empalme. Tomado de: Lee, Y., & Rio, D. C. (2015). *Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. Annual review of biochemistry, 84, 291-323.*

1.8 Retención de intrones

El splicing alternativo es un mecanismo regulatorio por el cual se pueden obtener múltiples transcritos de un sólo gen. Este proceso es esencial para varios procesos biológicos, como la neurogénesis. Sin embargo, cuando esto ocurre de manera desregulada puede llevar a un aumento en la retención de intrones en los ARNs mensajeros. La retención de intrones ocurre cuando un intrón específico permanece en el ARN mensajero poliadenilado después de que haya ocurrido el proceso de empalme. El aumento en la retención de intrones en diferentes transcritos puede alterar la funcionalidad de las células, ya que puede aumentar la probabilidad de degradación del ARN mensajero afectado o introducir una mutación a la proteína traducida (Adusumalli, et al., 2019).

1.9 p53

La proteína p53 fue descubierta en 1979 debido a su interacción con el antígeno oncogénico T del virus SV40. Actualmente se le conoce como el “guardián del genoma” debido a su importante papel como gen supresor tumoral (Bourdon, et al., 2005). La proteína p53 es un factor de transcripción que se une a secuencias específicas del ADN y activa la transcripción de múltiples genes relacionados con el arresto del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN, senescencia y metabolismo (Gudikote, et al., 2020).

El gen que codifica para p53 es *TP53*, un gen altamente conservado en organismos multicelulares. En humanos se encuentra localizado en el cromosoma 17p13.1 y está compuesto por trece exones, de los cuales el primero no es codificante (ver Ilustración 4). Hasta ahora se ha descrito que el gen *TP53* codifica para 13 isoformas de p53, esto ocurre debido al uso de diferentes promotores y al splicing alternativo del intrón 2 y el intrón 9.

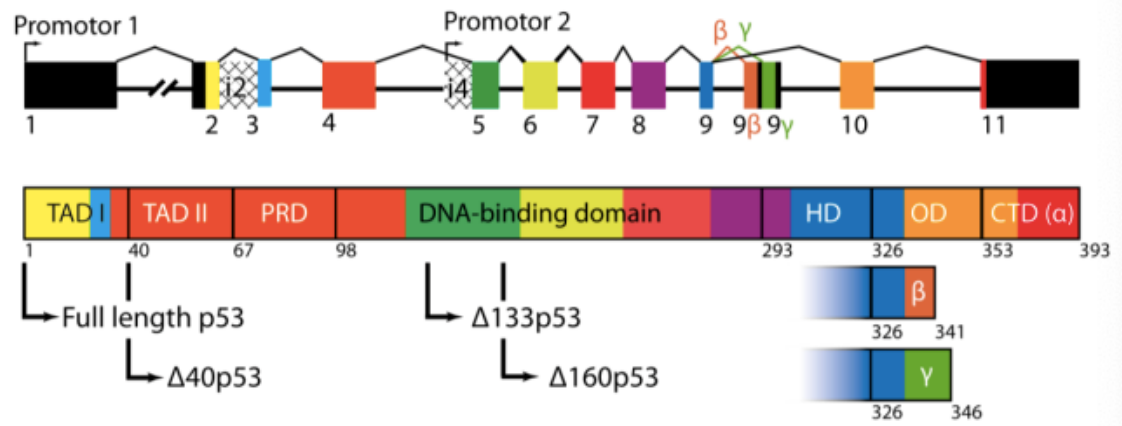


Ilustración 4

Estructura del gen *TP53* en la parte superior señalando los dos promotores que se pueden utilizar. El promotor 1 produce un transcrito que se traduce formando la proteína p53 completa y la isoforma $\Delta 40p53$, la cual solo se traduce si se retiene el intrón 2 en el ARN mensajero maduro. El uso del promotor 2 produce los transcritos que codifican para las isoformas $\Delta 133p53$ y $\Delta 160p53$, llamadas de esa forma debido a que inician desde el codón 133 y 160 respectivamente. Las isoformas también pueden tener diferentes extremos carbono-terminal (α , β , γ), esto está regulado por el empalme alternativo del intrón 9. El color de los exones indica diferentes dominios en la proteína p53. En la parte inferior se muestran los dominios de la proteína señalados del mismo color que los exones.

TAD I: dominio de transactivación I, TAD II: dominio de transactivación II, PRD: dominio rico en prolina, HD: dominio de oligomerización, CTD: dominio carbono-terminal. Las flechas indican el inicio del extremo N(amino)-terminal. Tomado de: Vieler, M., & Sanyal, S. (2018). p53 isoforms and their implications in cancer. *Cancers*, 10(9), 288.

1.9.1 Descripción de las características de las principales isoformas de p53

-p53 α o p53 (53 kD)

Transcrito producido cuando se usa el promotor P1 y se retienen todos los exones, incluyendo el exón 10 y el 11 (Vieler & Sanyal, 2018). Es un factor de transcripción que se une a secuencias específicas del ADN y activa la transcripción de múltiples genes relacionados con el arresto del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN, senescencia y metabolismo (Gudikote, et al., 2020).

-p53 β (47 kD)

Transcrito producido cuando se usa el promotor P1 y se realiza un empalme alternativo del exón 9, generando un codón de parada al inicio del exón 9, eliminando gran parte del exón 9 y los exones 10 y 11 del transcrito (Vieler & Sanyal, 2018). Aumenta la actividad transcripcional de p21 por medio de la vía p53 y a través de los promotores de la proteína X asociada con Bcl-2 (BAX) y aumenta la apoptosis por una vía independiente a p53 (Kim & Ann, 2016).

-p53 γ (48 kD)

Transcrito producido cuando se usa el promotor P1 y se realiza un empalme alternativo del exón 9, generando un codón de parada al final del exón 9, eliminando una pequeña parte del exón 9 y los exones 10 y 11 del transcrito (Vieler & Sanyal, 2018). Aumenta la actividad transcripcional a través de los promotores de BAX, relacionados con apoptosis (Kim & An, 2016).

- Δ 133p53 α (35 kD)

Transcrito producido usando el promotor P2 (promotor interno localizado en el intrón 4), la traducción inicia desde el codón 133 (exón 5) y se mantienen los exones 10 y 11 en la proteína (Vieler & Sanyal, 2018). Inhibe la senescencia celular inducida por p53, inhibiendo la función de la proteína por medio de la formación de un complejo p53- Δ 133p53 α . Aumenta la traducción de RAD51 mejorando los mecanismos de reparación del ADN (von Muhlinen, et al., 2018).

- Δ 133p53 β (29 kD)

Transcrito producido usando el promotor P2, la traducción inicia desde el codón 133 y ocurre un empalme alternativo del exón 9 que añade un codón de parada al inicio del exón 9, eliminando gran parte del exón 9 y los exones 10 y 11 (Vieler & Sanyal, 2018). Promueve la invasión y metástasis de células cancerosas (Gadea, et al., 2016).

- Δ 133p53 γ (29 kD)

Transcrito producido usando el promotor P2, iniciando la traducción desde el codón 133, ocurre un empalme alternativo del exón 9 que añade un codón de parada al final del exón 9, eliminando una pequeña parte del exón y los exones 10 y 11 (Vieler & Sanyal, 2018). Aumenta la transcripción de genes relacionados con apoptosis en células normales, pero aumenta la carcinogénesis en células cancerosas (Khoury & Bourdon, 2011).

2. Marco Teórico

2.1 Cambios en el empalme relacionados con el envejecimiento

El envejecimiento está caracterizado por el declive funcional progresivo en las funciones fisiológicas, uno de los procesos celulares que se puede ver afectado es el procesamiento del ARN, especialmente el proceso de empalme (Bhadra, et al., 2020). El empalme de ARN es un proceso altamente dinámico, ya que el uso de diferentes sitios de empalme puede resultar en la producción de ARNs mensajeros distintos, que cuando se traduzcan van a producir diferentes isoformas de proteína a nivel estructural y funcional, a este proceso se le conoce como empalme alternativo (Singh & Cooper, 2012). Se estima que más del 90% de los ARNs mensajeros precursores humanos tienen empalme alternativo (Wang et al., 2008).

Se han descrito diferentes tipos de empalme alternativo, dentro de los cuales se incluyen: salto de exones, retención de intrones, uso de sitios de empalme alternativos, exones

mutuamente excluyentes, uso de regiones promotoras alternativas y uso de sitios de poliA alternativos (Bahdra, et al., 2020). Alteraciones en el reconocimiento de los sitios de empalme constitutivos puede causar que se salten exones constitutivos, se retengan intrones o se activen sitios crípticos de empalme, estas alteraciones en el empalme pueden resultar en la producción de proteínas anormales o en el decaimiento mediado por un codón de terminación prematura en el ARN mensajero (Faustino & Cooper, 2003).

Aunque el proceso de empalme alternativo puede aumentar la complejidad funcional en los organismos más evolucionados, esta complejidad también es más sensible a la disfunción si algún componente del sistema empieza a fallar. El proceso de empalme alternativo está regulado por diferentes factores en cis (enhancers o silenciadores intrónicos y exónicos) y en trans (factores activadores o represores de los sitios de splicing), por la estructura de la cromatina y por la cinética de la transcripción (Bahdra, et al., 2020).

Con la edad, la disrupción en la homeostasis del ARN puede comprometer la función tisular y celular y contribuir al desarrollo de las enfermedades y alteraciones relacionadas con el envejecimiento. Dentro de los cambios en el procesamiento del ARN que se han descrito que ocurren con la edad, se encuentran: cambios en la expresión de los factores reguladores del empalme y de los componentes del espliceosoma, cambios en la localización de los factores del empalme, disfunción del complejo de empalme, empalme aberrante, pérdida de los mecanismos de vigilancia del ARN y traducción de ARNs aberrantes (Bahdra, et al., 2020).

Como se describió anteriormente, cambios en la expresión de los ARNs componentes del espliceosoma causan diferencias en el empalme y actúan como reguladores del empalme. Los niveles de expresión de estos ARNs son variables entre tejidos, a lo largo del desarrollo y en condiciones de enfermedad, como el cáncer. Las alteraciones en la expresión de U1 y U2 se encuentran relacionadas con el salto de exones, mientras que cambios en la expresión de U4 y U6 se asociaron con una mayor retención de intrones (Dvinge, et al., 2019).

Se han reportado alteraciones en el empalme alternativo en las células sanguíneas de personas de edad avanzada (Harries, et al., 2011), neuronas de la corteza frontal de personas con Enfermedad de Alzheimer (Adusumalli, et al., 2019) y en fibroblastos humanos senescentes (Holly, et al., 2013), así como en células de *Drosophila* y de ratones de edad avanzada (Adusumalli, et al., 2019). Estos resultados demuestran que las alteraciones en el empalme parecen estar relacionadas con el envejecimiento y con la senescencia celular, y que esta relación es altamente conservada a lo largo de la evolución.

La relación entre alteraciones en el empalme y el envejecimiento y la senescencia celular está tan altamente conservada, que incluso un estudio realizado en *C.elegans* demostró que la homeostasis en el empalme es un biomarcador y predictor de la expectativa de vida del nematodo y que la restricción dietaria a través de la inhibición de la vía de mTOR y el

aumento en la expresión del factor de splicing 1 (SF1), puede restaurar la homeostasis del empalme y aumentar la longevidad del animal (Heintz, et al., 2017).

Dentro de las alteraciones en la homeostasis en el empalme, la retención de intrones parece ser la más relacionada con el envejecimiento y las enfermedades asociadas. Un estudio en el que se comparó la retención de intrones a partir de datos obtenidos por RNA-Seq de ratones, *Drosophila* y humanos a distintas edades encontró que existe un aumento significativo en los eventos de retención de intrones relacionados con la edad avanzada. Así mismo también se compararon los datos de transcriptómica de la corteza prefrontal de personas con Enfermedad de Alzheimer y personas sanas neurológicamente, encontrando que las personas con esta enfermedad también tenían un aumento en la retención de intrones en este tejido específico relativo a controles sanos (y no en el cerebelo). El estudio de los genes que presentaron mayores eventos de retención de intrones encontró que estos genes están caracterizados por tener intrones de longitud corta y por estar relacionados con el procesamiento del ARN mensajero y el mantenimiento de la proteostasis (Adusumalli, et al., 2019).

Un estudio publicado a principios del 2022 describió las alteraciones en el empalme relacionadas con el envejecimiento en múltiples tejidos. Este estudio encontró que la retención de intrones promedio aumenta con la edad y se correlaciona con el estado de enfermedad y, aunque estas alteraciones ocurren de forma generalizada, existen tejidos en los que estos cambios ocurren de forma menos marcada, como lo es el tejido cerebral. Dentro de las posibles causas de la pérdida en la homeostasis del empalme, encontraron que la expresión de genes relacionados con el empalme se correlaciona de forma negativa con la retención de intrones. Algo interesante que estos investigadores describieron es que los cultivos celulares presentaron valores atípicos y no se correlacionaron con lo que ocurría en los tejidos durante el proceso de envejecimiento (Mariotti, et al., 2022).

2.2 La ARN polimerasa III y el envejecimiento

Además de la transcripción de los ARNs de transferencia, el ARN corto nuclear U6 y otros ARNs no codificantes, la ARN polimerasa también está involucrada en la respuesta a virus ADN y en el mecanismo de reparación del ADN mediado por recombinación homóloga. Recientemente se ha descrito que la vía TORC1, relacionada con el envejecimiento y activada por la presencia de nutrientes y factores de crecimiento, regula la actividad de la ARN polimerasa III. Estudios realizados en *C. elegans* y *Drosophila* han demostrado que tanto aumentar, como limitar, la función de la ARN polimerasa III conlleva a un aumento en la expectativa de vida dependiendo del contexto (Kulaberoglu, et al., 2021).

Debido a que la disminución en la traducción de proteínas es un mecanismo bien conocido de longevidad, tiene sentido que una menor actividad de la ARN polimerasa III y su consecuente disminución en los ARNs de transferencia, conlleven a un aumento en la longevidad. Sin embargo, es importante que en estos casos se realiza una inhibición de la función de la ARN polimerasa III en la etapa adulta, ya que la disminución en la actividad

de la ARN polimerasa III durante las etapas embrionarias de *C.elegans* y de ratones es letal. Estos resultados demuestran la importancia de la regulación óptima de la ARN Polimerasa III en los procesos fisiológicos celulares, la salud, el desarrollo y el envejecimiento (Kulaberoglu, et al., 2021).

La inestabilidad genómica también es uno de los marcadores centrales del envejecimiento (López-Otín, et al., 2013). La asociación entre el daño al ADN y el envejecimiento se encuentra claramente establecida y apoyada por múltiples datos en humanos y en modelos animales. Una de las posibles razones por las cuales hay un aumento en el daño en el ADN con la edad, es la pérdida progresiva de los mecanismos de reparación. Individuos con alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN presentan características fenotípicas relacionadas con el envejecimiento de forma prematura, como lo pueden ser las afectaciones cardiovasculares en la progeria de Hutchinson-Gilford, la neurodegeneración en Ataxia-Telangiectasia y el cáncer en la anemia de Fanconi (Petr, et al., 2020).

Recientemente se ha descrito que la actividad de la ARN polimerasa III es requerida para el mecanismo de reparación de los cortes a la doble cadena del ADN mediado por la recombinación homóloga. La ARN polimerasa III sintetiza una hebra de ARN que protege a la hebra de cadena simple del ADN que queda libre en el extremo 3', previniendo que esta sea degradada por endonucleasas. Una disminución en la expresión de la ARN polimerasa III suprime a la recombinación homóloga y conlleva a una disfunción en la reparación y a la pérdida genética de segmentos de más de 30 pb en los sitios de corte a la doble cadena del ADN (Liu, et al., 2021). Esto podría explicar la inestabilidad genómica y el fenotipo progeroide en los pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch (Baéz-Becerra, et al, 2020).

2.3 Cambios en la expresión de isoformas de p53 y senescencia celular

También se ha estudiado el efecto del empalme en genes específicos en la aparición de senescencia celular (Deschênes & Chabot, 2017). Un estudio realizado en fibroblastos humanos encontró que el aumento en la expresión de p53 β y la disminución en la expresión de Δ 133p53 α , induce senescencia. Así mismo, el aumento en la expresión de Δ 133p53 α inhibió la aparición del fenotipo senescente (Fujita, et al., 2009). Estos mismos resultados se repitieron en linfocitos T (Mondal, et al., 2013), astrocitos (Turnquist, et al., 2016), células madre pluripotenciales (Horikawa, et al., 2017) e incluso en fibroblastos de pacientes con Progeria de Hutchinson-Gilford (von Muhlinen, et al., 2018).

La senescencia replicativa parece disminuir la expresión de Δ 133p53 α , al parecer esto ocurre debido a que con la replicación celular disminuye la expresión de STUB1, una proteína reguladora de la autofagia. Debido a que la degradación de Δ 133p53 α ocurre por medio de la autofagia, una disminución en la expresión de STUB1 conlleva a un aumento

en el reclutamiento de la $\Delta 133p53\alpha$ al autofagosoma y a una mayor degradación (Fujita, 2019).

La expresión de $p53\beta$ es regulada por los factores reguladores del empalme, cuando el SRSF7 es reclutado durante el empalme de $p53$ se genera la isoforma $p53\beta$, mientras que si se recluta el SRSF3 o el SRSF1 se genera la isoforma $p53\alpha$. Se ha encontrado que existe una relación positiva entre el daño al ADN inducida por la radiación y la expresión de SRSF7 (Chen, et al., 2021). Lo que podría explicar porque cuando aumenta la inestabilidad genómica también aumenta la expresión de $p53b$ y la senescencia celular (von Muhlinen, et al., 2018).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar el impacto de variantes patogénicas en la ARN Polimerasa III subunidad A (POLR3A) sobre la expresión de U6, la retención de intrones y la expresión de diferentes isoformas de $p53$ en fibroblastos derivados de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch.

3.2 Objetivos específicos

1. Comparar el puntaje de retención de intrones, los genes con una retención diferencial de intrones y las vías metabólicas en las que estos participan, entre fibroblastos control y derivados de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch.
2. Analizar la expresión diferencial de U6 entre fibroblastos control y derivados de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch.
3. Analizar la expresión diferencial de isoformas de $p53$ entre fibroblastos control y derivados de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch.

4. Metodología

4.1 Tipo de estudio

Estudio experimental llevado a cabo en fibroblastos obtenidos de dos pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch y un control sano.

4.2 Descripción de las pacientes

La paciente WRS1 es una paciente de sexo femenino de 21 años de edad, natural y procedente de Bogotá, con fenotipo concordante con el Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch y con hallazgo de una variante patogénica heredada de la madre en el gen *POLR3A* (c. 3772_2773delCT; p.Leu1258Glyfs*12). Esta variante está clasificada como una variante patogénica debido a que cumple con los criterios de patogenicidad de las guías del Colegio Americano de Genética Médica (ACMG): PVS1, PP5 y PM2, y no cumple con ningún criterio de benignidad.

La paciente WRS2 es una paciente de sexo femenino de 6 años de edad, natural y procedente de Bogotá, con fenotipo concordante con el Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch y con hallazgo de una variante patogénica heredada del padre en el gen *POLR3A* (c.3G>T; p.Met1Leu*). Esta variante está clasificada como una variante patogénica debido a que cumple con los criterios de patogenicidad de las guías del ACMG: PVS1, PP5 y PM2, y no cumple con ningún criterio de benignidad.

El control es una persona sana de sexo femenino de 21 años de edad.

4.3 Obtención de fibroblastos

Previo consentimiento informado se tomó una biopsia de piel de la parte interna del brazo de dos pacientes femeninas con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch en la primera y en la tercera década de la vida y de un control sano. Para obtener la muestra se desinfectó el área con alcohol al 70% y se extrajo un fragmento de piel de la zona deseada usando el punch y las pinzas de disección, luego se suturó la herida con un punto. Posteriormente, la muestra recogida fue colocada en un tubo falcon de 15 mL con 12 mL de medio

suplementado previamente atemperado a 37°C. Después, en la cabina de flujo, se retiró el medio en el cual se encontraba la biopsia y se realizaron tres lavados con PBS 1X al 1% de penicilina/estreptomina estéril con movimientos rotatorios y se descartó el sobrenadante.

Luego, en una caja de Petri de 100 mm se añadieron 3 mL de PBS 1X, 3 mL de medio suplementado y el fragmento de piel. Una vez sumergida, la muestra se fragmentó en 12 a 18 trozos con una hoja de bisturí anclado a un mango adecuado. Una vez ya obtenidos los fragmentos, se retiró cuidadosamente el medio circundante y se agregaron 3 mL de tripsina-EDTA al 0.25% y se dejó incubando durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se inactivó la tripsina con 10 mL de medio suplementado en un tubo falcon de 15 mL. Se centrifugó el contenido del tubo a 1000 rpm durante tres minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 8 mL de medio suplementado fresco. El contenido del tubo falcon fue dividido en dos partes iguales y transferido a dos frascos T25 que se dejaron incubando a 37°C y 5% de CO₂. Se cambió el medio cada 24 horas aproximadamente. Los fibroblastos alcanzaron un porcentaje de confluencia cercano al 70% a los 25-30 días.

4.4 Extracción de ARN

Alrededor de 30 días después de la obtención de la biopsia, una vez las células alcanzaron un porcentaje alto de confluencia, se extrajo el ARN con TRIzol para los análisis posteriores. Las células fueron lisadas usando el reactivo TRIzol durante 5-10 minutos, con el objetivo de permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteína. Después se pasó el lisado celular a un eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 14mil rpm durante diez minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Luego se agregaron 200 µL de cloroformo por cada mL de reactivo TRIzol y se agitó vigorosamente a mano durante 15 segundos. Posteriormente, se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12mil gravedades durante 15 minutos a 4 grados Celsius. Después de la centrifugación, la fase acuosa, que contiene el ARN se transfirió a un tubo nuevo y el ARN se precipitó agregando 500 µL de alcohol isopropílico. Las muestras se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron a 12 mil gravedades durante 10 minutos a 4 grados Celsius. Después se removió el sobrenadante y se lavó el pellet de ARN con 1 mL de etanol al 75% en agua DEPC mezclando con vórtex. Luego, se centrifugó

a 7500 gravedades durante 8 minutos a 4 grados Celsius, se removió el sobrenadante y se secó el ARN durante 5 minutos. Una vez seco, el ARN fue disuelto en 50 μ L de agua DEPC. Las muestras fueron cuantificadas usando NanoDrop. Este proceso se realizó por triplicado.

4.5 Análisis de expresión global de ARN (RNA-Seq)

El ARN extraído fue llevado a secuenciación de nueva generación de ARNs con secuencia de poliA utilizando un equipo Illumina. Los datos del RNA-Seq fueron entregados en formato FASTA y con las secuencias de adaptadores eliminadas. Las secuencias fueron alineadas usando STAR aligner v27.0a, utilizando como genoma de referencia y como genoma de anotación la secuencia del genoma humano GRCh38. Una vez concluido el proceso de alineación, se obtuvieron los archivos BAM unsorted, luego estos archivos fueron subidos al programa IRFinder, en dónde se obtuvieron los resultados de la medición retención de intrones global en archivos de texto, como la proporción de retención de intrones, que es igual a la abundancia de intrones sobre la abundancia de intrones más exones (Middleton, et al., 2017).

Luego se realizó el análisis diferencial de la retención de intrones en DESeq2 en una interfaz R, siguiendo las instrucciones del manual de IRFinder. Después se analizaron las vías metabólicas en las que participan los genes con una retención de intrones diferencial utilizando las bases de datos de ontología genética y KEGG (Zheng, et al., 2020), utilizando DAVID.

4.6 Medición de la expresión relativa del ARN corto nuclear U6, de las diferentes isoformas de p53 y de otros genes relacionados con el empalme o la senescencia celular

El ARN extraído y previamente cuantificado fue utilizado para realizar síntesis de ADN complementario mediante un proceso de transcripción reversa utilizando el kit Superscript III de Invitrogen. Se agregó el volumen equivalente a 5 µg de ARN en un tubo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) libre de ARNasas y luego se añadieron los otros componentes de la mezcla para alcanzar una concentración final de 10 M de primers de hexámeros al azar, 0.5 mM de deoxinucleotidos trifosfato (dNTPs), 1X de buffer, 0.5 UI de transcriptasa reversa, 40 UI de RNase OUT y se completó el volumen con agua DEPC hasta alcanzar 10 µL.

La mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. En el termociclador se inició con un periodo de 2 minutos a 94 grados Celsius, con el objetivo de alcanzar la denaturación completa del ARN y después se realizaron 40 ciclos de denaturación (94 grados Celsius durante 45 segundos), anillaje (60 grados Celsius durante 30 segundos) y extensión (72 grados Celsius durante 40 segundos), finalmente se dejó incubando la muestra a 4 grados Celsius.

El ADN complementario obtenido fue cuantificado usando NanoDrop. Una vez obtenido el ADN complementario se midió la expresión relativa de las isoformas de p53, de U2AF1, p16, p21, GSTM1 y del ARN corto nuclear U6 usando los primers nombrados en la tabla 2. Para la cuantificación de la expresión de GSTM1, p16, p21 y U2AF1 se usó como gen control el de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), en el caso del ARN corto nuclear U6, se usó el gen de ARN corto nuclear U48 (RNU48) y en el caso de las isoformas de p53 se utilizó como gen de referencia el de la beta-actina.

Tabla 2

Primers utilizados para medir la expresión relativa del ARN corto nuclear U6, de las diferentes isoformas de p53 y de genes relacionados con el empalme y la senescencia celular.

ARN corto nuclear U6	
Primer Forward	5'-CAGCACATATACTAAAATTGGAACG-3'
Primer Reverse	5'-ACGAATTTGCGTGCATCC-3'
Gen control: ARN corto nuclear U48	
Primer Forward	5'-TGATGATGACCCCAGGTA ACTC-3'
Primer Reverse	5'-GAGCGCTGCGGTGATG-3
Isoformas de p53	
Primer Forward (e2.1-exón 2)	5' -GTCACTGCCATGGAGGAGCCGCA-3'
Primer Forward (e2-exón 2)	5'- ATGGAGGAGCCGCAGTCAGAT-3'
Primer Forward (i4FI-intrón 4)	5'- TAGACGCCAACTCTCTCTAG -3'
Primer Forward (i4F2-intrón 4)	5'- CTAGTGGGTTGCAGGAGGTGCTTACAC-3'
Primer Reverse (RT1-exón 11)	5'- GACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC -3'
Primer Reverse (RT2-exón 11)	5'- ATGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC -3'
Primer Reverse (p53b-exón 9b)	5'- TTTGAAAGCTGGTCTGGTCCTGA-3'
Primer Reverse (p53g-exón 9g)	5'- TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG-3'
Gen control: β-actina	
Primer Forward	5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'
Primer Reverse	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'
Glutación-S-Transferasa 1 (GSTM1)	
Primer Forward	5'- TACTCTGAGCCCTGCTCGGT-3
Primer Reverse	5'- TGTATTCCAGGAGCAGGCGG-3'
p16	
Primer Forward	5'-CCAACGCACCGAATAGTTACG-3'
Primer Reverse	5'-GCGCTGCCCATCATCATG-3'
p21	
Primer Forward	5'-TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA-3'
Primer Reverse	5'-AGATGGTGATGGGCTTCCC-3'
U2AF1 (Factor auxiliar del ARN corto nuclear U2 tipo 1)	
Primer Forward	5'- CCAGTCTGCTGACGGTTTG-3
Primer Reverse	5'- AGGTGGTCTCCAGGTTGT-3
Gen control: gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH)	
Primer Forward	5'- TGGTATCGTGGAAGGACTCA-3'
Primer Reverse	5'-CCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3'

Para medir la expresión relativa del ARN corto nuclear U6, de GSTM1, de U2AF1, de p16 y de p21, se realizó una PCR en tiempo real en el CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad) midiendo la fluorescencia utilizando SYBR-Green y realizando 48 ciclos de denaturación, anilaje y extensión. El análisis de los resultados se realizó siguiendo el método $\Delta\Delta Ct$.

Para medir la expresión relativa de las isoformas de p53 se realizó una PCR anidada utilizando el ADN complementario obtenido y realizando las reacciones establecidas en la Tabla 3. El análisis de los resultados se realizó siguiendo el método $\Delta\Delta Ct$.

Tabla 3

Primers específicos utilizados en cada reacción de PCR anidada para medir la expresión relativa de 6 isoformas de p53. Adaptado de: Khoury, M. P., Marcel, V., Fernandes, K., Diot, A., Lane, D. P., & Bourdon, J. C. (2013). Detecting and quantifying p53 isoforms at mRNA level in cell lines and tissues. In p53 Protocols (pp. 1-14). Humana Press, Totowa, NJ.

Nombre y tamaño del amplicón	PCR	Nombre del primer y región diana	Secuencia 5'-3'
P53a (1130 pb)	I	Fw: e2.1 (exón 2)	GTCAGTGCATGGAGGAGCCGCA
		Rv: RT1 (exón 11)	GACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC
	II	Fw: e2 (exón 2)	ATGGAGGAGCCGCAGTCAGAT
		Rv: RT2 (exón 11)	ATGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC
P53b (1120 pb)	I	Fw: e2.1 (exón 2)	GTCAGTGCATGGAGGAGCCGCA
		Rv: RT1 (exón 11)	GACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC
	II	Fw: e2 (exón 2)	ATGGAGGAGCCGCAGTCAGAT
		Rv: p53b (exón 9b)	TTTGAAGCTGGTCTGGTCCTGA
P53g (1120 pb)	I	Fw: e2.1 (exón 2)	GTCAGTGCATGGAGGAGCCGCA
		Rv: RT1 (exón 11)	GACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC
	II	Fw: e2 (exón 2)	ATGGAGGAGCCGCAGTCAGAT
		Rv: p53g (exón 9g)	TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG
D133p53a (770 pb)	I	Fw: i4F1 (intrón 4)	TAGACGCCAACTCTCTCTAG
		Rv: RT1 (exón 11)	GACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC
	II	Fw: i4F2 (intrón 4)	CTAGTGGGTTGCAGGAGGTGCTTACAC
		Rv: RT2 (exón 11)	ATGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC
D133p53b (760 pb)	I	Fw: i4F1 (intrón 4)	TAGACGCCAACTCTCTCTAG
		Rv: RT1 (exón 11)	GACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC
	II	Fw: i4F2 (intrón 4)	CTAGTGGGTTGCAGGAGGTGCTTACAC
		Rv: p53b (exón 9b)	TTTGAAGCTGGTCTGGTCCTGA
D133p53g (760 pb)	I	Fw: i4F1 (intrón 4)	TAGACGCCAACTCTCTCTAG
		Rv: RT1 (exón 11)	GACGCACACCTATTGCAAGCAAGGGTTC
	II	Fw: i4F2 (intrón 4)	CTAGTGGGTTGCAGGAGGTGCTTACAC
		Rv: p53g (exón 9g)	TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG

4.7 Verificación del análisis de retención de intrones

Para la verificación del análisis de retención de intrones se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% de los productos de PCR utilizando los primers descritos en la Tabla 4.

Tabla 4

Primers utilizados para la verificación del análisis de retención de intrones

PILRB (Receptor beta tipo 2 tipo inmunoglobulina emparejado)	
Primer Forward	5-' ATCCCCTGTTAGAGACGGGC-3'
Primer Reverse	5'- GAACTCAGGCATAGGGGAGC-3'
K7EP35 (NADH Deshidrogenasa 1 Alfa Subunidad 11)	
Primer Forward	5'-CCTGTCTGCTGTGATTCAGG-3'
Primer Reverse	5'-GGAGGTTGCAGTGAGCTGAG-3'
Glutación-S-Transferasa 1 (GSTM1)	
Primer Forward	5'-TTAGGCCTGTCTGCGGAATC-3'
Primer Reverse	5'-GAGATGGAGGGTCCCTGACT-3'
OAS1 (2'-5'-oligoadenilato sintetasa 1)	
Primer Forward	5'-CCTCCAGCTGCAACCATG-3'
Primer Reverse	5'-GTCTGCTTCCTAGCCATCTG-3'

5. Resultados

5.1 Análisis de retención de intrones

En el análisis de retención de intrones se encontró que en el control, de 11,186 genes expresados, 873 genes tenían intrones retenidos (lo que corresponde al 7.8% de los genes expresados). Este porcentaje de genes con retención de intrones fue muy similar al porcentaje de genes retención de intrones en las pacientes con Síndromes de Wiedemann-Rautenstrauch, ya que en la paciente WRS1 se encontró que 857 genes de los 13,655 expresados tenían intrones retenidos (lo que corresponde al 6.3%) y en la paciente WRS2 se encontró que 941 genes de los 11,564 expresados tenían retención de intrones (lo que corresponde al 8.14%).

Al analizar las vías metabólicas en las que están involucrados los genes con mayor retención de intrones, tanto en los pacientes con SWR, como en el control, se encontró que estos genes están relacionados principalmente con vías relacionadas con la unión al ARN, la regulación del ciclo celular, regulación positiva de la transcripción, regulación positiva de vías relacionadas con la inflamación, regulación negativa de la apoptosis, transcripción del ARN, mitocondria y regulación del inicio de la traducción. Esto es algo que se esperaba, ya que los genes con mayor retención de intrones tienden a ser generalmente aquellos relacionados con las vías de regulación del ARN, del empalme, de la transcripción y de la traducción (Okada, et al., 2021).

En cuanto al análisis diferencial de retención de intrones, al comparar a la paciente WRS1 con el control, se encontraron 9 genes con una retención de intrones diferencial: 6 genes con una retención de intrones mayor en el control que en la paciente WRS1 y 3 genes con una retención de intrones mayor en la paciente WRS1 (ver Tabla 5). Los términos enriquecidos en el análisis de vías metabólicas y de ontología genética de los genes con una retención de intrones diferencial están relacionados con la respuesta inmune, la presentación de antígenos y la función mitocondrial (ver Tabla 6).

Tabla 5

Genes con una retención de intrones diferencial en la paciente WRS1. Los genes con una mayor retención de intrones en la paciente WRS1 comparada con el control están marcados con verde y los genes con una menor retención de intrones en la paciente WRS1 comparada con el control están marcados en rojo.

Gen	Expresión Relativa	Valor de p	Valor Q
K7EP35	5,7989	5,92E-06	0,00943396
EEF1A1	2,8005	2,94E-05	0,02830189
HLA-B	-3,7426	4,59E-05	0,03773585
HLA-A	-2,6195	7,90E-05	0,04716981
MZT2A	2,3241	8,33E-05	0,05660377
COL6A3	2,1660	0,000142278	0,06603774
GBP3	8,0457	0,000174635	0,0754717
PIMREG	-5,7315	0,00021821	0,08490566
CAPN2	4,7937	0,000274414	0,09433962

Tabla 6

Términos enriquecidos en el análisis de vías metabólicas y ontología genético de los genes con una retención de intrones diferencial en la paciente WRS1

Término	Categoría	Valor de p	Valor de p ajustado
Ensamblaje del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial	Proceso Biológico	1,5E-4	0,0048
Membrana mitocondrial interna	Componente celular	6,8E-3	0,068
Péptidos señal de clase MHC1	Proceso biológico	1E-2	0,01
Detección de bacterias	Proceso biológico	2,5E-3	0,033
Procesamiento y presentación de antígenos vía MHC clase II	Proceso biológico	2,5E-3	0,033
Regulación positiva de la citotoxicidad mediada por células T	Proceso biológico	5,4E-3	0,047
Presentación y procesamiento de antígenos	Proceso biológico	9,8E-3	0,073
Unión a antígenos	Función molecular	9,8E-3	0,1

Al comparar la retención de intrones entre la paciente WRS2 y el control, se encontraron 18 genes con una retención de intrones diferencial: 16 genes con una mayor retención de intrones en el control y 2 genes con una mayor retención de intrones en la paciente WRS2 (Ver Tabla 7). Los términos enriquecidos en los genes con una retención de intrones diferencial en la paciente WRS2, similar a lo encontrado en la paciente WRS1, están relacionados con la presentación de antígenos y la respuesta inmune (ver Tabla 8).

Tabla 7

Genes con una retención de intrones diferencial en la paciente WRS2. . Los genes con una mayor retención de intrones en la paciente WRS2 comparada con el control están marcados con verde y los genes con una menor retención de intrones en la paciente WRS2 comparada con el control están marcados en rojo.

Gen	Expresión relativa	Valor de p	Valor Q
GSTM1	-8,678446	5,12E-06	0,00454545
PIMREG	-5,596003	5,57E-06	0,00909091
CCS	-4,317953	6,72E-06	0,01363636
HLA-B	-3,240684	2,25E-05	0,03636364
MYLK	-3,459510	3,94E-05	0,04090909
GMPPB	-3,831263	7,57E-05	0,04545455
CCHCR1	-2,619088	9,08E-05	0,05
CTBP2	-3,917777	0,000130455	0,05454545
ILK	-1,670769	0,000147418	0,05909091
AKT2	-3,771484	0,00018781	0,06363636
RUSC2	-3,964186	0,000206143	0,06818182
PLPP2	-7,442287	0,000214233	0,07272727
CPSF1	-1,783725	0,000234661	0,07727273
LMF2	-3,069483	0,000261256	0,08181818
SCRIB	-3,930044	0,000263803	0,08636364
TXNDC15	-3,696140	0,000301119	0,09090909
TLE5	4,5083	0,000314366	0,09545455
MZT2A	1,7726	0,000327784	0,1

Tabla 8

Términos enriquecidos en el análisis de vías metabólicas y ontología genético de los genes con una retención de intrones diferencial en la paciente WRS2

Término	Categoría	Valor de p	Valor de p ajustado
Protección de la citotoxicidad mediada por células NK	Proceso biológico	1,3E-3	3,3E-2
Procesamiento y presentación de antígenos vía MHC clase I	Proceso biológico	1,7E-3	3,3E-2
Regulación de la producción de IL-6	Proceso biológico	2,3E-3	3,3E-2
Detección de bacterias	Proceso biológico	2,5E-3	3,3E-2
Presentación y procesamiento de antígeno vía MHC clase II	Proceso biológico	4,2E-3	4,3E-2
Respuesta inmune adaptativa	Proceso biológico	6,4E-3	1,2E-1

5.2 Verificación del análisis de retención de intrones

Para la verificación del análisis de retención de intrones se seleccionaron los genes: *K7EP35*, *OAS1*, *GSTM1* y *PILRB*. Para el gen *K7EP35* se diseñaron unos primers que incluyeran el intrón, de tal manera que si el transcrito incluía el intrón la longitud del amplicón sería de 499 pb, mientras que si no lo incluía la longitud del amplicón sería de 320 pb. En la Ilustración 5 se puede ver la electroforesis de los productos de la PCR de ambos pacientes y el control, en donde se verificó que mientras que el control únicamente expresa el transcrito sin el intrón, ambos pacientes expresan transcritos con y sin el intrón. En el análisis de retención de intrones se había encontrado que únicamente la paciente WRS1 retenía el intrón.

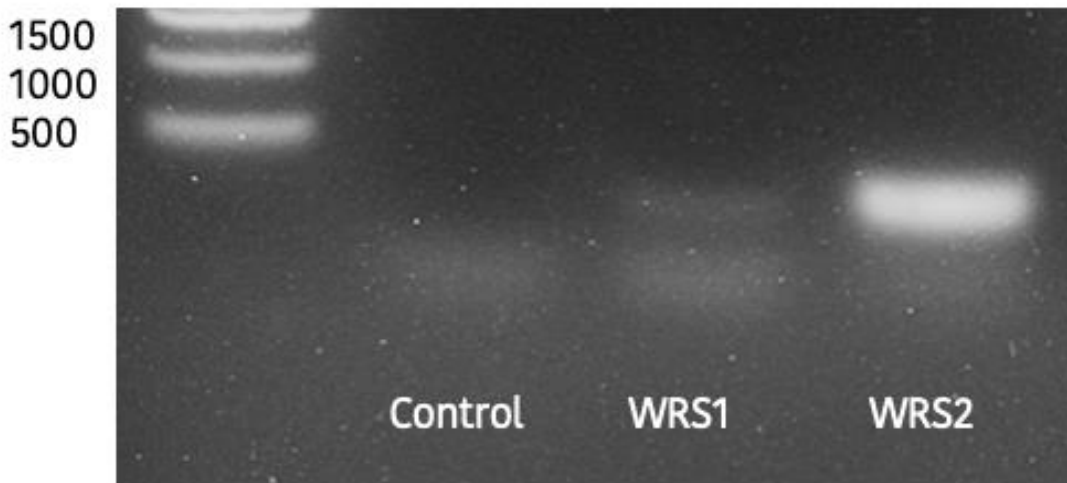


Ilustración 5

Patrón de migración en la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen K7EP35. En el primer carril se agregó el marcador de peso molecular, la banda inferior hace referencia a 500 pb, la banda de la mitad hace referencia a las 1000 pb y la banda superior hace referencia a 1500 pb. En el segundo carril se agregó el resultado de la PCR del control, observando una única banda que hace referencia al amplicón sin el intrón retenido con un peso molecular de 320 pb, mientras que en el tercero y en el cuarto carril se agregaron los resultados de la PCR de la paciente WRS1 y WRS2, respectivamente, en estos casos se observan dos bandas, una de menor tamaño correspondiente al amplicón sin el intrón retenido y con un peso molecular de 320 pb, y una de mayor tamaño correspondiente al amplicón con el intrón retenido y con un peso molecular de 499 pb.

Para el gen *OAS1* se diseñaron unos primers dentro del intrón, de tal manera que si se retenía el intrón, la longitud del amplicón iba a ser de 498 pb, mientras que si no se incluía el intrón, no se observaría un amplicón en la electroforesis (Ver Ilustración 6). En este caso se encontró que mientras que ambos pacientes expresaban el intrón, el control no lo expresaba. En el análisis de retención de intrones se había encontrado que ambos pacientes retenían el intrón, aunque con un p ajustado mayor a 0.1.



Ilustración 6

*Patrón de migración en la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen *OAS1*. En el primer carril se agregó el marcador de peso molecular, la banda inferior hace referencia a 500 pb, la banda de la mitad hace referencia a las 1000 pb y la banda superior hace referencia a 1500 pb. En el segundo carril se agregó el resultado de la PCR del control. Debido a que los primers amplifican el intrón, en este caso no se observó ninguna banda, mientras que en el tercero y en el cuarto carril se agregaron los resultados de la PCR de la paciente WRS1 y WRS2, respectivamente, en estos casos se observa una banda que corresponde a un fragmento del intrón de 498 pb.*

Para el gen *GSTM1* se diseñaron unos primers que incluyeran el intrón, de tal manera que si el transcrito tenía el intrón, su longitud sería de 303 pb, mientras que si no lo incluía, su longitud sería de 96 pb. En este caso se observó que mientras que el control retenía el intrón, ninguna de las pacientes lo retenía (Ver Ilustración 7). Esto fue similar a lo descrito en el análisis de retención de intrones, aunque en el caso de la paciente WRS2 el p ajustado fue mayor a 0.1.

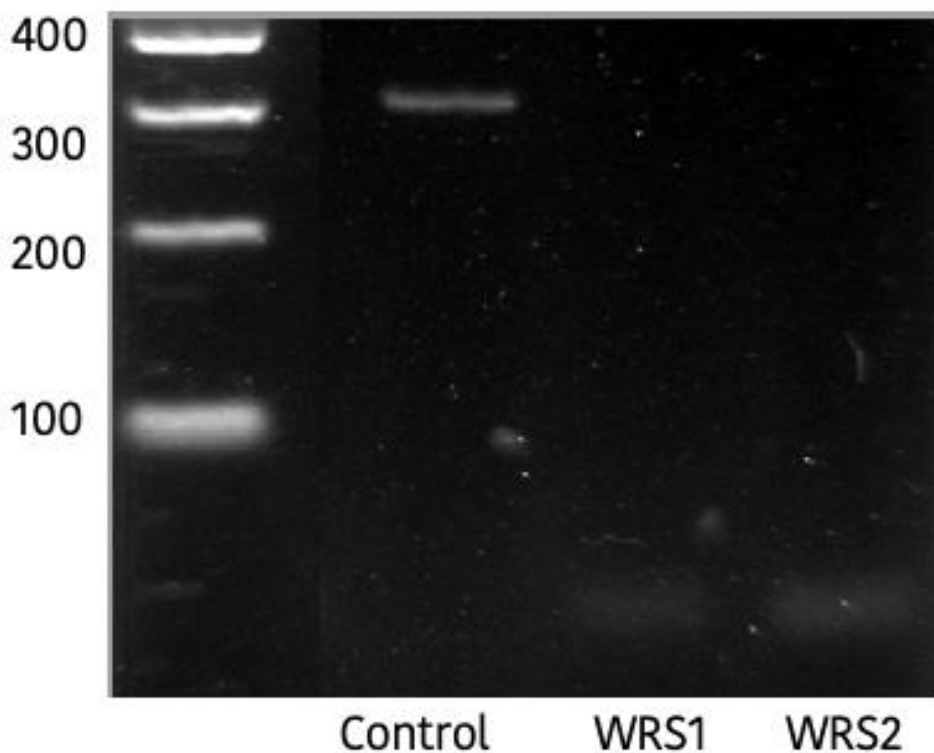


Ilustración 7

Patrón de migración en la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen GSTM1. En el primer carril se agregó el marcador de peso molecular, la banda inferior hace referencia a 500 pb, la banda de la mitad hace referencia a las 1000 pb y la banda superior hace referencia a 1500 pb. En el segundo carril se agregó el resultado de la PCR del control, observando una única banda de 303 pb, la cual hace referencia al amplicón con el intrón retenido. En el tercer carril se agregó el resultado de la PCR de la paciente WRS1 y en el cuarto carril se agregó el resultado de la PCR de la paciente WRS2. En ambas paciente se observa una única banda de 96 pb, la cual hace referencia al amplicón sin el intrón retenido.

En el caso del gen PILRB se diseñaron unos primers dentro del intrón, de tal manera que si se retenía el intrón, la longitud del amplicón iba a ser de 432 pb, mientras que si no se incluía el intrón, no se observaría un amplicón en la electroforesis (Ver Ilustración 8). En este caso se encontró que únicamente la paciente WRS2 retenía el intrón, mientras que ni el control ni la paciente WRS1 lo retenían. Esto fue similar a lo encontrado en el análisis de retención de intrones.



Ilustración 8

Patrón de migración en la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del gen PILRB. En el primer carril se agregó el marcador de peso molecular, la banda inferior hace referencia a 500 pb, la banda de la mitad hace referencia a las 1000 pb y la banda superior hace referencia a 1500 pb. En el segundo carril se agregó el resultado de la PCR del control, en el tercer carril se agregó el resultado de la PCR de la paciente WRS1 y en el cuarto carril se agregó el resultado de la PCR de la paciente WRS2. En el control y en la paciente WRS1 no se observó ninguna banda, lo que hace referencia a que no hubo retención de ningún intrón, en la paciente WRS2 se observó una banda de 432 pb, que corresponde al amplicón con el intrón retenido.

5.3 Análisis de expresión de U6

En el análisis de expresión del ARN corto nuclear U6 se encontró que la paciente WRS1 tenía una marcada mayor expresión que el control, mientras que la paciente WRS2 tenía una expresión similar a la del control (Ver Ilustración 9). Este aumento en la expresión del ARN U6 observado en la paciente WRS1 podría estar relacionado con su menor porcentaje de retención de intrones.

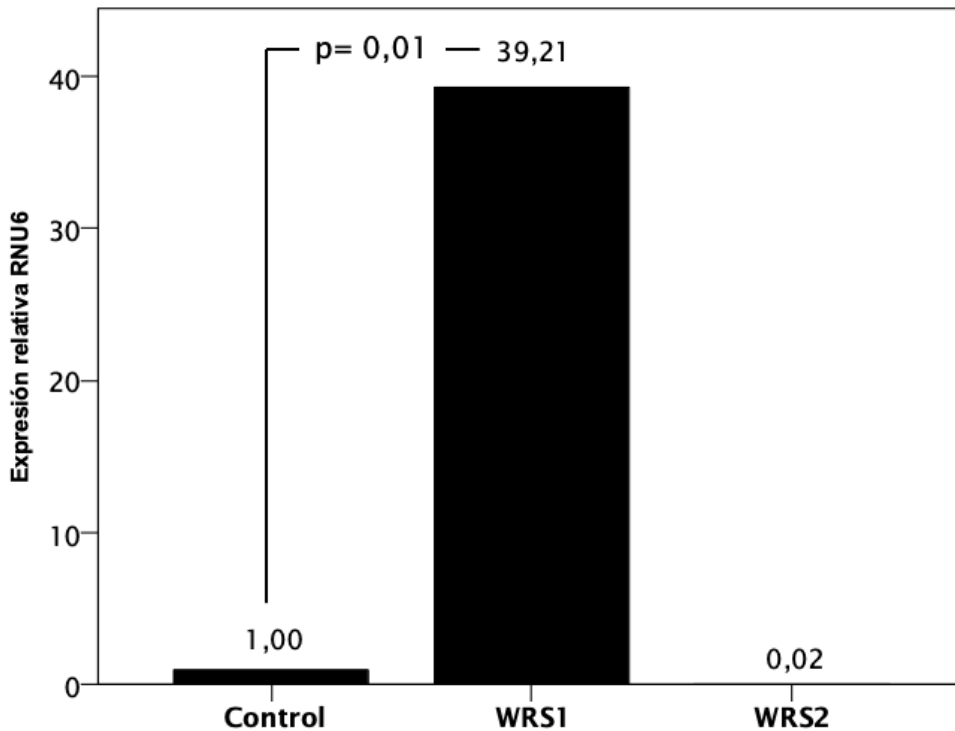


Ilustración 9

Análisis de expresión relativa del ARN corto nuclear U6. Se utilizó como gen de referencia al ARN corto nuclear U48.

5.4 Análisis de expresión de isoformas de p53

En el análisis de expresión diferencial de las isoformas de p53 (Ver Ilustración 10) se encontró que la paciente WRS2 tenía un marcado aumento en la expresión de p53 β , asociado a una disminución en la expresión de la isoforma Δ 133p53 α , lo que podría explicar el marcado aumento en los marcadores de senescencia celular en estos fibroblastos (Ilustración 12). Adicionalmente, esta paciente (WRS2) también mostró un aumento en la expresión de p53 γ y una disminución en la expresión de Δ 133p53 β y Δ 133p53 γ . De forma interesante, ambas pacientes mostraron una disminución en la expresión de p53 α . Los cambios en la expresión de las isoformas de p53 (Ilustración 10) fueron menos marcados en la paciente WRS1, que aunque también mostró una tendencia al aumento en la expresión de la isoforma p53 β , estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, esta paciente también presentó un aumento en la expresión de marcadores de senescencia celular, aunque de una forma menos marcada que la paciente WRS2. La paciente WRS1 también mostró una disminución en la expresión de la isoforma Δ 133p53 γ .

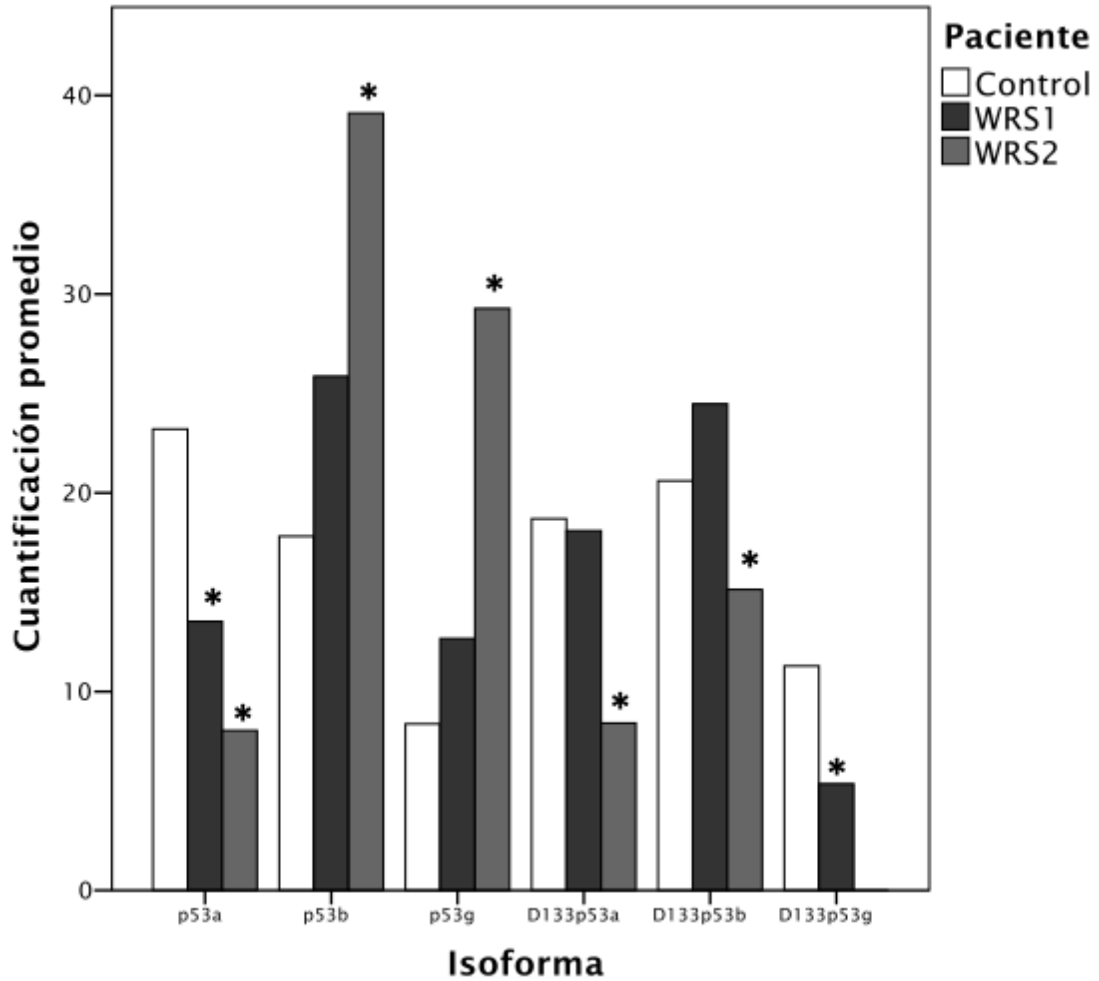
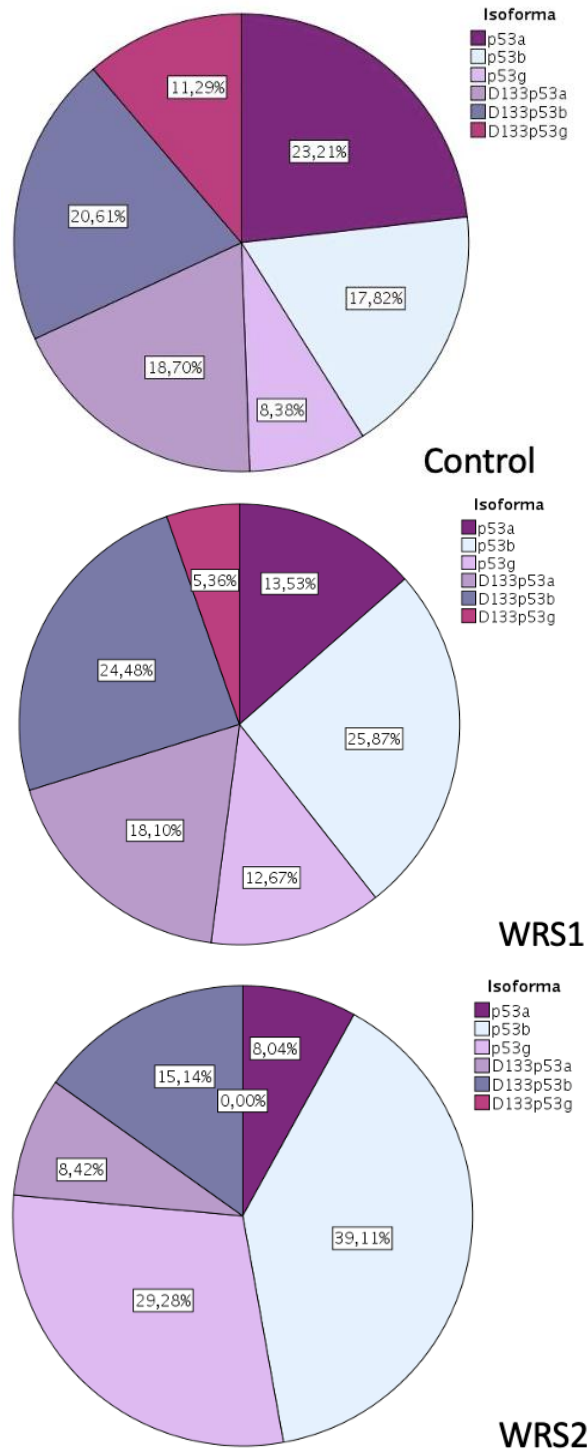


Ilustración 10

Análisis de expresión de las isoformas de p53. Se usó como gen de referencia el gen de la β -actina.

En la Ilustración 11 se pueden observar los diagramas de torta de la expresión de las isoformas de p53 en cada individuo. La isoforma mayoritaria en el control fue p53 α , mientras que en ambas pacientes la isoforma mayormente expresada fue la p53 β .

**Ilustración 11**

Diagramas de torta que muestran la expresión de cada isoforma de p53 en el control y ambas pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch.

5.5 Análisis de expresión de genes relacionados con el empalme y la senescencia celular

Adicionalmente, también se midió la expresión relativa de marcadores de senescencia celular (*p16* y *p21*). Se observó que ambas pacientes tenían una mayor expresión de ambos marcadores de senescencia celular, aunque este incremento fue mucho más marcado en la paciente WRS2 (Ver Ilustraciones 12 y 13).

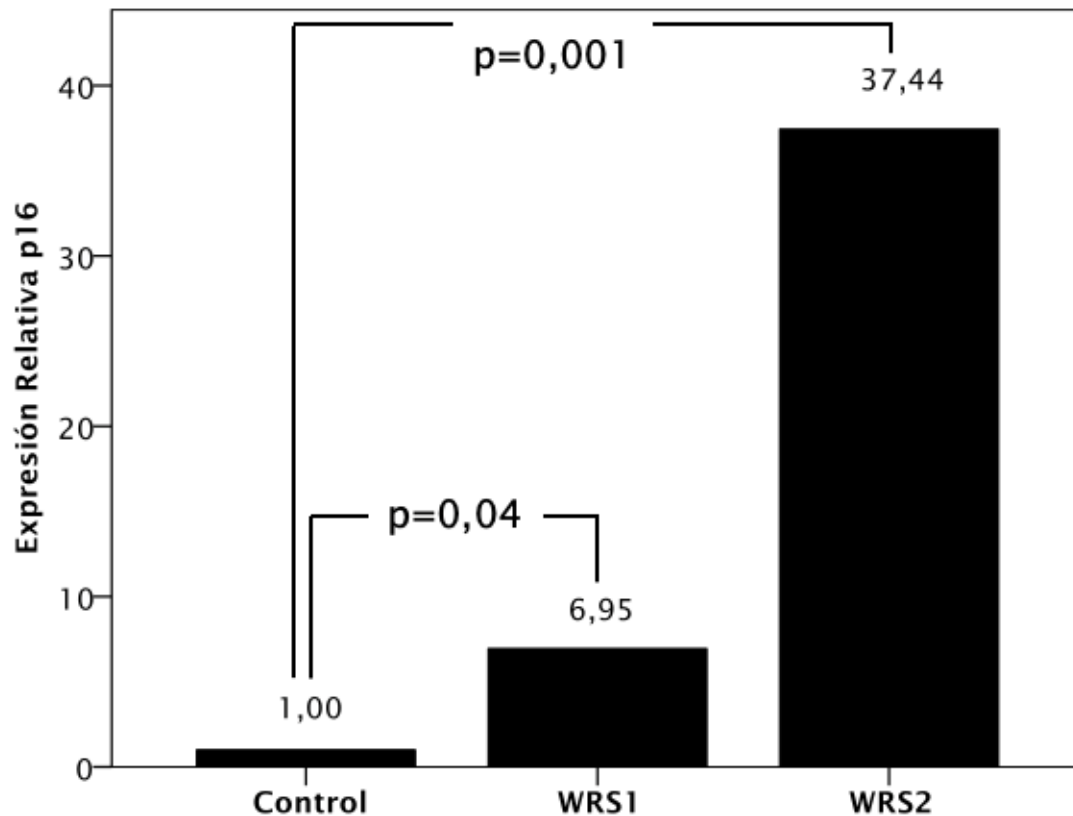


Ilustración 12

Análisis de expresión relativa de *p16*. Se utilizó como gen de referencia el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*).

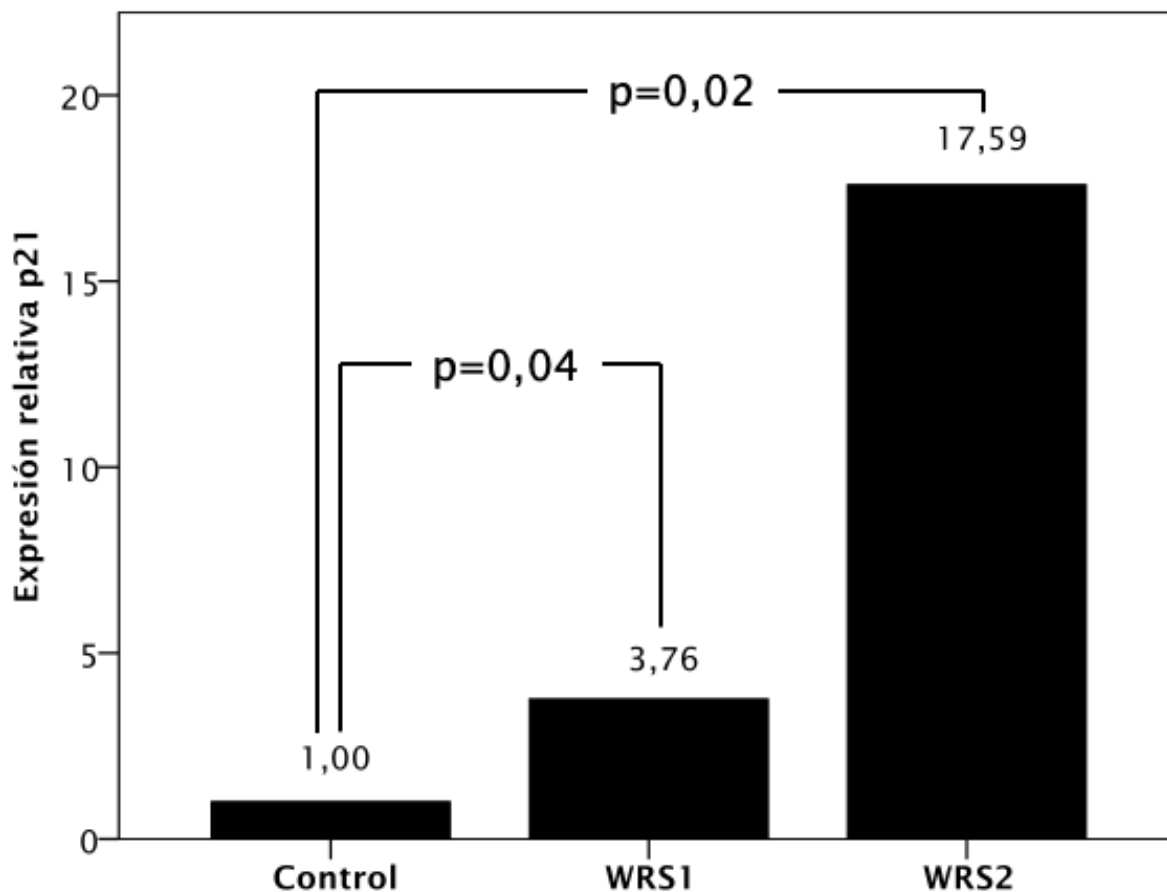


Ilustración 13

Análisis de expresión relativa de p21. Se utilizó como gen de referencia el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

También se midió la expresión del factor auxiliar del ARN U2 tipo 1 (*U2AF1*), que ayuda a estabilizar la unión del ARN U2 sobre el punto de ramificación cercano al sitio de empalme 3' (Ilustración 14). Se observó que ambas pacientes expresaban una mucho mayor expresión de este gen, lo que podría ser un mecanismo compensador para mantener la homeostasis del empalme.

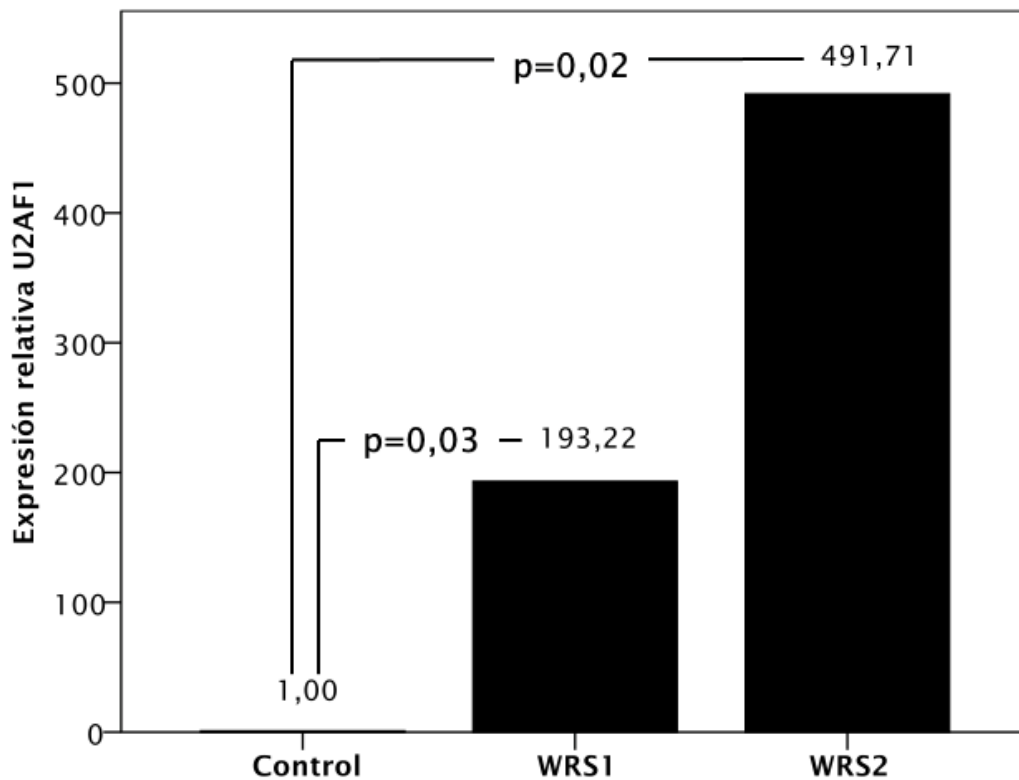


Ilustración 14

Análisis de expresión relativa del factor auxiliar del ARN corto nuclear U2 tipo 1 (U2AF1). Se utilizó como gen de referencia el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Teniendo en cuenta lo encontrado en el análisis de retención de intrones, se decidió medir la expresión de *GSTM1*. En este caso se encontró que ambos pacientes tenían una mayor expresión de este gen de respuesta al estrés oxidativo. Esto, en conjunto con la retención de intrones en el control y no en las pacientes, podría implicar que los fibroblastos de las pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch están expuestos a un mayor estrés oxidativo.

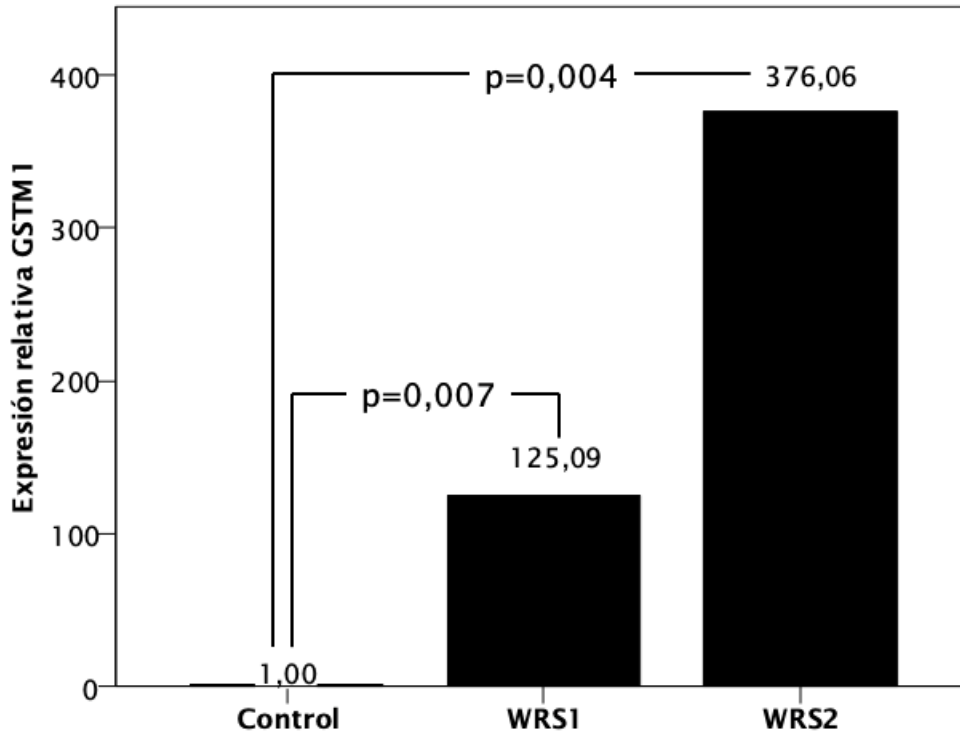


Ilustración 15

Análisis de expresión relativa de la glutatión-S-transferasa 1 (GSTM1). Se utilizó como gen de referencia el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

6. Discusión

Diferentes estudios han asociado la retención de intrones con los procesos de envejecimiento y senescencia celular, tanto en modelos animales, como en humanos y cultivos celulares (Adusumalli, et al., 2019; Okada, et al., 2021; von Muhlinen, et al., 2018). Los transcritos con retención de intrones pueden tener múltiples destinos, un subgrupo de estos transcritos es retenido dentro del núcleo, mientras que otro subgrupo es exportado hacia el citoplasma. De los transcritos que son exportados al citoplasma, algunos son degradados por medio del sistema de decaimiento mediado por codón de terminación prematura (*Nonsense mediated decay* en inglés), y otros son traducidos formando nuevas isoformas de proteínas (Vanichkina, et al., 2018).

Se han propuesto diferentes funciones que podrían tener estos transcritos con intrones retenidos; señales en los intrones podrían direccionar la localización subcelular de los transcritos y las proteínas o podrían funcionar como un mecanismo de regulación post-transcripcional al competir con los otros ARNs (Vanichkina, et al., 2018). Relacionado con lo anterior, un estudio en ratones describió que durante la respuesta al choque térmico existe un amplio contenido de ARNs con intrones retenidos dentro del núcleo, los genes con mayor porcentaje de retención de intrones estaban relacionados con la síntesis de ARNs de transferencia, poros nucleares y funciones del espliceosoma, en tanto que los genes relacionados con el plegamiento de proteínas y los mecanismos antioxidantes no tenían intrones retenidos y eran traducidos de la forma usual. Se cree que estos transcritos con intrones retenidos localizados dentro del núcleo se encuentran esperando una señal de continuar con el proceso de empalme, una vez la situación de estrés haya culminado (Okada, et al., 2021). Es decir que los transcritos con retención de intrones, podrían ser genes que no son necesarios en la situación actual para el adecuado funcionamiento de la célula. Esto podría explicar porque en el control el gen *GSTM1* tiene retención de intrones y una menor expresión comparado con las pacientes.

Las células de los pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch presentan una senescencia celular temprana, al igual que las células de pacientes con otros síndromes progeroides (Carrero, Soria-Valles & López-Otin, 2016). Como se describió previamente, un aumento en la retención de intrones también se ha asociado con la aparición del proceso de senescencia celular, al parecer, debido a la alteración en las respuestas celulares al estrés. Aunque las células de los pacientes con SWR no presentaron un aumento significativo global en la retención de intrones, llama la atención que genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo tienen una mayor retención de intrones en el control, mientras que genes relacionados con la función mitocondrial tienen mayor retención de intrones en las pacientes con SWR comparadas con el control. La inestabilidad genómica es uno de los principales inductores de la senescencia celular, no obstante, el aumento en el estrés oxidativo también se ha descrito como un importante inductor del proceso de senescencia celular (Amaya-Montoya, et al., 2020). El aumento en

el estrés oxidativo aumenta el daño al ADN nuclear y al ADN mitocondrial, activando aún más las vías de señalización en respuesta al daño al ADN. El ADN mitocondrial es mucho más vulnerable al estrés oxidativo dada la cercanía con las especies reactivas de oxígeno, a su vez el daño en el ADN mitocondrial deteriora la función de la fosforilación oxidativa, aumentando aún más el estrés oxidativo. Durante el proceso de senescencia celular aumenta la biogénesis mitocondrial, aumentando la masa mitocondrial, sin un aumento efectivo en la función mitocondrial, ya que a pesar de un mayor número de mitocondrias, se ha demostrado que las células senescentes tienen una menor síntesis de ATP, un potencial de membrana mitocondrial disminuido, una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y una mayor probabilidad de fuga de enzimas hacia afuera de las mitocondrias (Vasileiou, et al., 2019). Esto podría explicar porque en los fibroblastos de las pacientes con SWR se observó una mayor retención de intrones en genes relacionados con la función mitocondrial y un aumento en la expresión (con una menor retención de intrones que en el control), en el gen *GSTM1*, relacionado con la respuesta al estrés oxidativo.

La función de la ARN Polimerasa III es importante para la función del nucleolo y el ensamblaje de ribosomas (Tiku & Antebi, 2018). Un estudio previo realizado en fibroblastos de pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch encontró que estas células presentaban un aumento en el número de nucleolos, así como un área nucleolar aumentada (Báez-Becerra, et al., 2020). Un estudio previo demostró que alteraciones en la función y la estructura nucleolar, alteraban el proceso de activación de la glutatión transferasa, disminuyendo su función y aumentando el estrés oxidativo. Un aumento en el estrés oxidativo nucleolar cambia la localización de la nucleofosmina y el estado redox del nucleolo, alterando la estabilidad de p53, promoviendo la activación de su vía de señalización y el inicio de la senescencia celular (Yang, et al., 2016). Alteraciones en la función en la estructura nucleolar podrían ser otro mecanismo por el cual se induce la senescencia celular en las células de los pacientes con SWR, así como un aumento en el estrés oxidativo y en la inestabilidad genómica, junto con una disminución en la función mitocondrial.

La retención de intrones también parece tener un papel importante durante la embriogénesis (Mariotti, et al., 2022), la neurogénesis y la homeostasis neuronal (Howe, et al., 2022). Hasta el momento no se han descrito claramente los mecanismos por los cuales ocurre la retención de intrones a nivel global, aunque parece haber una relación entre la retención de intrones y cambios en la expresión de los componentes del espliceosoma (Dvinge, et al., 2019). Cambios en la expresión de proteínas de unión al ARN también parecen estar involucrados en este proceso, un estudio realizado en fibroblastos describió que las células con *knock-down* para la proteína *U2AF1*, presentaban mayores eventos de retención de intrones y un inicio prematuro de la senescencia celular (Yao, et al., 2020). En este estudio, aunque las células de las pacientes sí expresaban marcadores relacionados con la senescencia celular, no encontramos diferencias significativas en la tasa de retención de intrones. Esto podría estar relacionado con la mayor expresión de *U2AF1* que se encontró en las pacientes, ya que esto podría estar actuando como un

mecanismo compensatorio, frenando la retención de intrones. Adicionalmente, la paciente WRS1, que fue quien presentó el menor porcentaje de retención de intrones, mostró una mayor expresión del ARN corto nuclear U6, lo que también podría estar actuando como un mecanismo compensatorio.

Sin embargo, es difícil de entender cómo la paciente WRS1 presenta una mayor expresión del ARN corto nuclear U6, teniendo en cuenta la disminución en la funcionalidad de la ARN Polimerasa III, ya que el promotor de este gen es exclusivo de la ARN polimerasa III y en los estudios de inmunoprecipitación de la cromatina no se han encontrado concentraciones significativas de la ARN Polimerasa II (Didychuk, et al., 2018). Esto podría estar explicado por un aumento en la expresión de la ARN polimerasa III, y este fenómeno ya fue comprobado por una investigación previa realizada dentro del grupo de investigación, en donde se muestra que las células de la paciente WRS1 presentan una mayor expresión de POLR3A normal y mutada (Báez-Becerra, et al., 2020).

Como se había descrito anteriormente, la ARN polimerasa III tiene una función importante durante el mecanismo de reparación de los cortes a la doble cadena del ADN mediado por recombinación homóloga, y alteraciones en la función de esta proteína se han visto relacionadas con un aumento en la inestabilidad genómica (Liu, et al., 2021). Asociado con la anterior, se ha descrito que las células de las pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch tienen una mayor marcación de la histona 2 fosforilada (pH2AX), marcador relacionado con los cortes a la doble cadena del ADN (Báez-Becerra, et al., 2020). La inestabilidad genómica es un inductor de la expresión de p53 α y p53 β . Después de la activación de las vías en respuesta al daño del ADN, aumenta la expresión de la proteína ribosomal L26 (RPL26), que es un regulador positivo de p53 α . RPL26 es un regulador negativo de la expresión de la ubiquitina ligasa MDM2, que induce la degradación tanto de p53 α , como de RPL26 a través del proteasoma. De tal manera que hay una mayor concentración de p53 α y de RPL26, tanto por aumento en la expresión, como por disminución en la degradación. Cuando RPL26 está unida al transcrito de p53, recluta a SRSF7, que favorece que ocurra el empalme alternativo para formar la isoforma p53 β (Chen, et al., 2021). P53 β aumenta la actividad transcripcional de p21 por medio de la vía p53, promoviendo aún más la senescencia celular (Kim & Ann, 2016).

Teniendo en cuenta lo anterior, se propone un modelo descrito en la Ilustración 16, que podría explicar porque en las células de las pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch existe una mayor expresión de p53 β y de marcadores relacionados con la senescencia celular. Aunque es necesario realizar más estudios para comprobar la veracidad de este modelo, así como para describir los otros mecanismos de señalización por los cuales se altera la función del nucleolo y aumenta el estrés oxidativo.

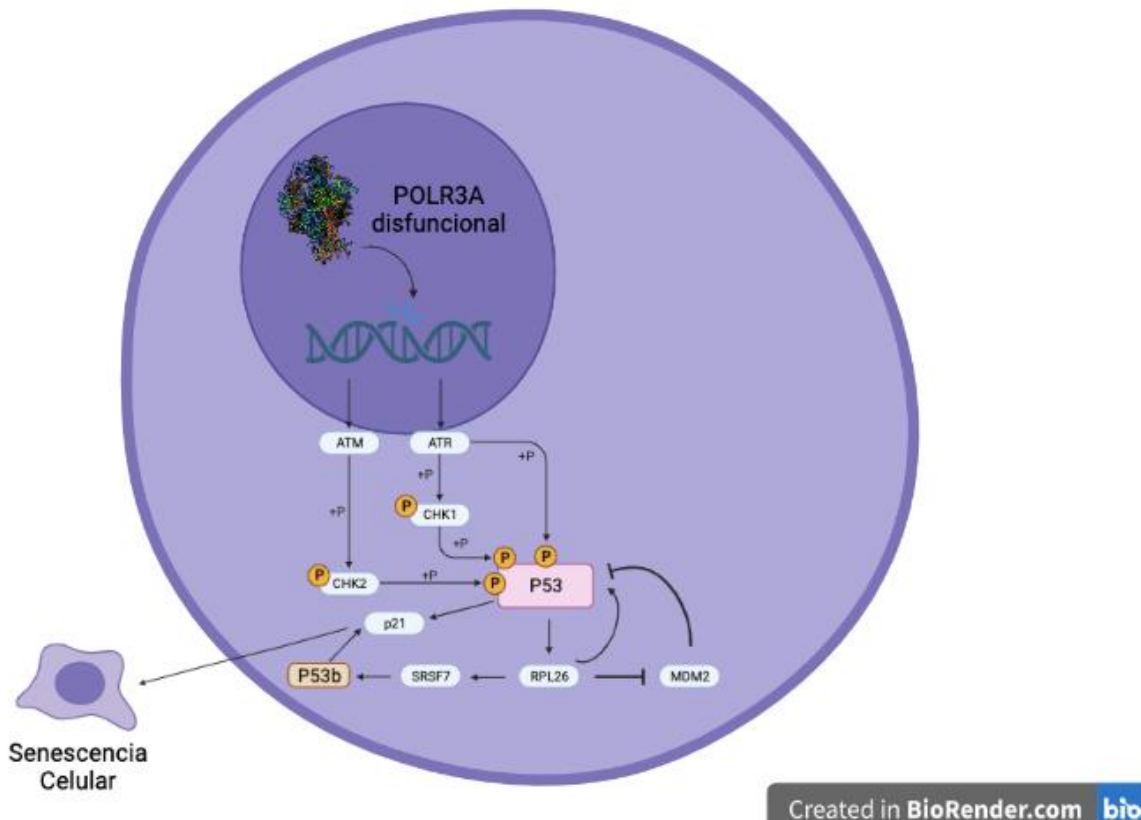


Ilustración 16

Modelo propuesto de la interacción entre POLR3A, p53β y el proceso de senescencia celular. Alteraciones en la función de la ARN Polimerasa III debido a variantes patogénicas en POLR3A causan alteraciones en la reparación del ADN por medio del proceso de recombinación homóloga, que traen como consecuencia un aumento en la inestabilidad genómica. Esta inestabilidad genómica conlleva a la activación de las vías relacionadas con el daño al ADN, incluyendo ATM y ATR, que finalmente conllevan a la fosforilación y activación de p53. La activación de p53 aumenta la expresión de la proteína ribosomal RPL26. RPL26 es un regulador negativo de la expresión de la ubiquitina ligasa MDM2, que induce la degradación tanto de p53, como de RPL26 a través del proteasoma. Cuando RPL26 está unida al transcrito de p53, recluta a SRSF7, que favorece que ocurra el empalme alternativo para formar la isoforma p53β. P53β aumenta la actividad transcripcional de p21 por medio de la vía p53, promoviendo aún más la senescencia celular.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

- No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de genes con intrones retenidos entre el control y los pacientes con SWR.
- Los genes con mayor retención de intrones en las pacientes WRS comparados con el control están relacionados con la respuesta inmune y la función mitocondrial.
- Los genes con mayor retención de intrones en el control comparado con las pacientes WRS, están relacionados con la respuesta al estrés oxidativo.
- Los genes con mayor retención de intrones en ambos grupos están relacionados con la regulación de la transcripción, el empalme y la traducción.
- En los pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch hay una mayor expresión de marcadores de senescencia celular.
- La paciente WRS1, que mostró un porcentaje menor de genes con intrones retenidos (6.3% vs 7.8), tuvo una mayor expresión de RNU6 comparada con el control y con la paciente WRS2.
- La paciente WRS2, que obtuvo una mayor expresión de p16 y p21, tuvo una mayor expresión de p53 β y una menor expresión de Δ 133p53 α , aunque la paciente WRS1 también mostró una tendencia a seguir el mismo patrón de expresión.
La isoforma de p53 mayormente expresada en el control fue p53 α , mientras que la más expresada en las pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch fue la isoforma p53 β .
- Los fibroblastos de las pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch tienen una mayor expresión de *GSTM1*, comparados con el control. Además, el

control retiene intrones en este gen (*GSTM1*) mientras que las pacientes no. Esto podría implicar que los fibroblastos de las pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch están expuestas a un mayor estrés oxidativo.

- Este estudio amplió el conocimiento sobre las vías fisiopatológicas que pueden llevar a senescencia celular en los fibroblastos con alteraciones en la función de la ARN Polimerasa III.

7.2 Recomendaciones

Estudios previos realizados en el grupo de investigación, han encontrado que los fibroblastos de los pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch tienen un aumento en los cortes en la doble cadena del ADN, observados de forma indirecta por la marcación de la histona 2 fosforilada (pH2AX) (Báez-Becerra, et al., 2020). La ARN polimerasa III tiene una función importante en el proceso de recombinación homóloga, por lo que tiene sentido que alteraciones en la función de esta proteína aumenten los cortes en la doble cadena del ADN.

Este estudio demostró que en las pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch hay una mayor expresión de la isoforma p53 β y una menor expresión de la isoforma $\Delta 133p53\alpha$, teniendo en cuenta que uno de los inductores de la expresión de la p53 β es el SRSF7, y que la expresión de este factor aumenta con la inestabilidad genómica (Chen, et al., 2021), podría ser interesante medir la expresión de este factor del empalme en los fibroblastos control y de los pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch. Adicionalmente también es importante medir la expresión de SRSF3 que se relaciona con la expresión de p53 α y de STUB1, una proteína que inhibe la degradación de $\Delta 133p53\alpha$ por medio del proceso de autofagia (von Muhlinen, et al., 2018).

Los resultados en el análisis de expresión y de retención de intrones de la *GSTM1*, podrían indicar que los fibroblastos de los pacientes con Síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch podrían estar expuestos a un mayor estrés oxidativo, para corroborar esto, sería interesante medir el estrés oxidativo de forma directa en estas células.

Bibliografía

Abascal-Palacios, G., Ramsay, E. P., Beuron, F., Morris, E., & Vannini, A. (2018). Structural basis of RNA polymerase III transcription initiation. *Nature*, 553(7688), 301-306.

Adusumalli, S., Ngjan, Z. K., Lin, W. Q., Benoukraf, T., & Ong, C. T. (2019). Increased intron retention is a post-transcriptional signature associated with progressive aging and Alzheimer's disease. *Aging cell*, 18(3), e12928.

Amaya-Montoya, M., Pérez-Londoño, A., Guatibonza-García, V., Vargas-Villanueva, A., & Mendivil, C. O. (2020). Cellular senescence as a therapeutic target for age-related diseases: a review. *Advances in therapy*, 37(4), 1407-1424.

Arboleda, G., Ramírez, N., & Arboleda, H. (2007). The neonatal progeroid syndrome (Wiedemann–Rautenstrauch): A model for the study of human aging?. *Experimental gerontology*, 42(10), 939-943.

Baez-Becerra, C. T., Valencia-Rincón, E., Velásquez-Méndez, K., Ramírez-Suárez, N. J., Guevara, C., Sandoval-Hernandez, A., ... & Arboleda, G. (2020). Nucleolar disruption, activation of P53 and premature senescence in POLR3A-mutated Wiedemann-Rautenstrauch Syndrome fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*, 192, 111360.

Bhadra, M., Howell, P., Dutta, S., Heintz, C., & Mair, W. B. (2020). Alternative splicing in aging and longevity. *Human genetics*, 139(3), 357-369.

Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., ... & Lane, D. P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*, 19(18), 2122-2137.

Carrero, D., Soria-Valles, C., & López-Otín, C. (2016). Hallmarks of progeroid syndromes: lessons from mice and reprogrammed cells. *Disease models & mechanisms*, 9(7), 719-735.

Chan, W. M., & Poon, R. Y. (2007). The p53 isoform Δ p53 lacks intrinsic transcriptional activity and reveals the critical role of nuclear import in dominant-negative activity. *Cancer research*, 67(5), 1959-1969.

Chen, J., Zhang, D., Qin, X., Owzar, K., McCann, J. J., & Kastan, M. B. (2021). Dna-damage-induced alternative splicing of p53. *Cancers*, 13(2), 251.

Christensen, K., Doblhammer, G., Rau, R., & Vaupel, J. W. (2009). Ageing populations: the challenges ahead. *The lancet*, 374(9696), 1196-1208.

Deschênes, M., & Chabot, B. (2017). The emerging role of alternative splicing in senescence and aging. *Aging cell*, 16(5), 918-933.

Didychuk, A. L., Butcher, S. E., & Brow, D. A. (2018). The life of U6 small nuclear RNA, from cradle to grave. *RNA*, 24(4), 437-460.

Dvinge, H., Guenthoer, J., Porter, P. L., & Bradley, R. K. (2019). RNA components of the spliceosome regulate tissue-and cancer-specific alternative splicing. *Genome research*, 29(10), 1591-1604.

Faustino, N. A., & Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes & development*, 17(4), 419-437.

Fujita, K. (2019). P53 isoforms in cellular senescence-and ageing-associated biological and physiological functions. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6023.

Fujita, K., Mondal, A. M., Horikawa, I., Nguyen, G. H., Kumamoto, K., Sohn, J. J., ... & Harris, C. C. (2009). p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53 β are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nature cell biology*, 11(9), 1135-1142.

Gadea, G., Arsic, N., Fernandes, K., Diot, A., Joruz, S. M., Abdallah, S., ... & Roux, P. (2016). TP53 drives invasion through expression of its $\Delta 133p53\beta$ variant. *Elife*, 5, e14734.

García-Alai, M. M., Tidow, H., Natan, E., Townsley, F. M., Veprintsev, D. B., & Fersht, A. R. (2008). The novel p53 isoform "delta p53" is a misfolded protein and does not bind the p21 promoter site. *Protein Science*, 17(10), 1671-1678.

Gudikote, J. P., Cascone, T., Poteete, A., Sitthideatphaiboon, P., Wu, Q., Morikawa, N., ... & Heymach, J. V. (2021). Inhibition of nonsense-mediated decay rescues p53 β/γ isoform expression and activates the p53 pathway in MDM2-overexpressing and select p53-mutant cancers. *Journal of Biological Chemistry*, 297(5).

Harries, L. W., Hernandez, D., Henley, W., Wood, A. R., Holly, A. C., Bradley-Smith, R. M., ... & Melzer, D. (2011). Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. *Aging cell*, 10(5), 868-878.

Heintz, C., Doktor, T. K., Lanjuin, A., Escoubas, C. C., Zhang, Y., Weir, H. J., ... & Mair, W. B. (2017). Splicing factor 1 modulates dietary restriction and TORC1 pathway longevity in *C. elegans*. *Nature*, 541(7635), 102-106.

Holly, A. C., Melzer, D., Pilling, L. C., Fellows, A. C., Tanaka, T., Ferrucci, L., & Harries, L. W. (2013). Changes in splicing factor expression are associated with advancing age in man. *Mechanisms of ageing and development*, 134(9), 356-366.

Horikawa, I., Park, K. Y., Isogaya, K., Hiyoshi, Y., Li, H., Anami, K., ... & Harris, C. C. (2017). $\Delta 133p53$ represses p53-inducible senescence genes and enhances the generation of human induced pluripotent stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 24(6), 1017-1028.

Howe, M. P., Crerar, H., Neeves, J., Harley, J., Tyzack, G. E., Klein, P., ... & Luisier, R. (2022). Physiological intron retaining transcripts in the cytoplasm abound during human motor neurogenesis. *Genome Research*, 32(10), 1808-1825.

Joruiz, S. M., & Bourdon, J. C. (2016). p53 isoforms: key regulators of the cell fate decision. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a026039.

Kulaberoglu, Y., Malik, Y., Borland, G., Selman, C., Alic, N., & Tullet, J. M. (2021). RNA polymerase III, ageing and longevity. *Frontiers in Genetics*, 12.

Khoury, M. P., & Bourdon, J. C. (2011). p53 isoforms: an intracellular microprocessor?. *Genes & cancer*, 2(4), 453-465.

Khoury, M. P., Marcel, V., Fernandes, K., Diot, A., Lane, D. P., & Bourdon, J. C. (2013). Detecting and quantifying p53 isoforms at mRNA level in cell lines and tissues. In *p53 Protocols* (pp. 1-14). Humana Press, Totowa, NJ.

Kim, S., & An, S. S. A. (2016). Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine*, 95(26).

Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 485.

Lee, Y., & Rio, D. C. (2015). Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annual review of biochemistry*, 84, 291-323.

Liu, S., Hua, Y., Wang, J., Li, L., Yuan, J., Zhang, B., ... & Kong, D. (2021). RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Cell*, 184(5), 1314-1329.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.

Marcel, V., Perrier, S., Aoubala, M., Ageorges, S., Groves, M. J., Diot, A., ... & Bourdon, J. C. (2010). $\Delta 160p53$ is a novel N-terminal p53 isoform encoded by $\Delta 133p53$ transcript. *FEBS letters*, 584(21), 4463-4468.

Mariotti, M., Kerepesi, C., Oliveros, W., Mele, M., & Gladyshev, V. N. (2022). Deterioration of the human transcriptome with age due to increasing intron retention and spurious splicing. *bioRxiv*.

Middleton, R., Gao, D., Thomas, A., Singh, B., Au, A., Wong, J. J., ... & Ritchie, W. (2017). IRFinder: assessing the impact of intron retention on mammalian gene expression. *Genome biology*, 18(1), 1-11.

Mondal, A. M., Horikawa, I., Pine, S. R., Fujita, K., Morgan, K. M., Vera, E., ... & Harris, C. C. (2013). p53 isoforms regulate aging-and tumor-associated replicative senescence in T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation*, 123(12), 5247-5257.

Okada, N., Oshima, K., Iwasaki, Y., Maruko, A., Matsumura, K., Iioka, E., ... & Nishimura, S. (2021). Intron retention as a new pre-symptomatic marker of aging and its recovery to the normal state by a traditional Japanese multi-herbal medicine. *Gene*, 794, 145752.

Paolacci, S., Bertola, D., Franco, J., Mohammed, S., Tartaglia, M., Wollnik, B., & Hennekam, R. C. (2017). Wiedemann–Rautenstrauch syndrome: a phenotype analysis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 173(7), 1763-1772.

Paolacci, S., Li, Y., Agolini, E., Bellacchio, E., Arboleda-Bustos, C. E., Carrero, D., ... & Hennekam, R. C. (2018). Specific combinations of biallelic POLR3A variants cause Wiedemann-Rautenstrauch syndrome. *Journal of medical genetics*, 55(12), 837-846.

Petr, M. A., Tulika, T., Carmona-Marin, L. M., & Scheibye-Knudsen, M. (2020). Protecting the aging genome. *Trends in Cell Biology*, 30(2), 117-132.

Singh, R. K., & Cooper, T. A. (2012). Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 18(8), 472-482.

Tiku, V., & Antebi, A. (2018). Nucleolar function in lifespan regulation. *Trends in cell biology*, 28(8), 662-672.

Turnquist, C., Horikawa, I., Foran, E., Major, E. O., Vojtesek, B., Lane, D. P., ... & Harris, C. C. (2016). p53 isoforms regulate astrocyte-mediated neuroprotection and neurodegeneration. *Cell Death & Differentiation*, 23(9), 1515-1528.

Vanichkina, D. P., Schmitz, U., Wong, J. J. L., & Rasko, J. E. (2018, March). Challenges in defining the role of intron retention in normal biology and disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 75, pp. 40-49). Academic Press.

Vasileiou, P. V., Evangelou, K., Vlasis, K., Panayiotidis, M. I., Chronopoulos, E., Passias, P. G., ... & Havaki, S. (2019). Mitochondrial homeostasis and cellular senescence. *Cells*, 8(7), 686.

Vieler, M., & Sanyal, S. (2018). p53 isoforms and their implications in cancer. *Cancers*, 10(9), 288.

von Muhlinen, N., Horikawa, I., Alam, F., Isogaya, K., Lissa, D., Vojtesek, B., ... & Harris, C. C. (2018). p53 isoforms regulate premature aging in human cells. *Oncogene*, 37(18), 2379-2393.

Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., ... & Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456(7221), 470-476.

Yang, K., Wang, M., Zhao, Y., Sun, X., Yang, Y., Li, X., ... & Yi, J. (2016). A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. *Nature communications*, 7(1), 1-16.

Yao, J., Ding, D., Li, X., Shen, T., Fu, H., Zhong, H., ... & Ni, T. (2020). Prevalent intron retention fine-tunes gene expression and contributes to cellular senescence. *Aging Cell*, 19(12), e13276.

Zheng, J. T., Lin, C. X., Fang, Z. Y., & Li, H. D. (2020). Intron retention as a mode for RNA-seq data analysis. *Frontiers in Genetics*, 11, 586.