



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di scienze della vita e dell'ambiente

Corso di laurea in scienze biologiche

Crosstalk between mRNA post-transcriptional modifications and alternative splicing in breast cancer cells: the regulation of N-6-methyladenosine.

Interazione tra modificazioni post-trascrizionali e splicing alternativo di mRNA in cellule di cancro al seno: la regolazione della N-6-metiladenosina.

**Tesi di laurea di:
Marina Mariano**


**Docente Referente
Chiar.ma Prof.ssa Anna La Teana**

Sessione autunnale

Anno accademico 2023/2024

REVIEW

Crosstalk between m6A modification and alternative splicing during cancer progression

Zhi-Man Zhu¹ | Fu-Chun Huo¹ | Jian Zhang² | Hong-Jian Shan³ | Dong-Sheng Pei¹ 

¹Department of Pathology, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China

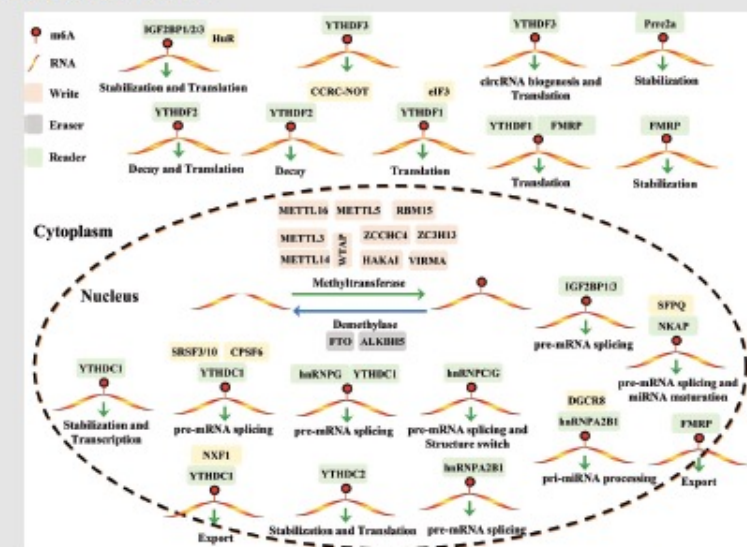
²Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China

³Department of Orthopedics, The Affiliated Jiangning Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, China

Correspondence
Dong-Sheng Pei, Department of Pathology, Xuzhou Medical University, 209 Tong-shan Road, Xuzhou 221004, Jiangsu, China.
Email: dspei@xzhmu.edu.cn

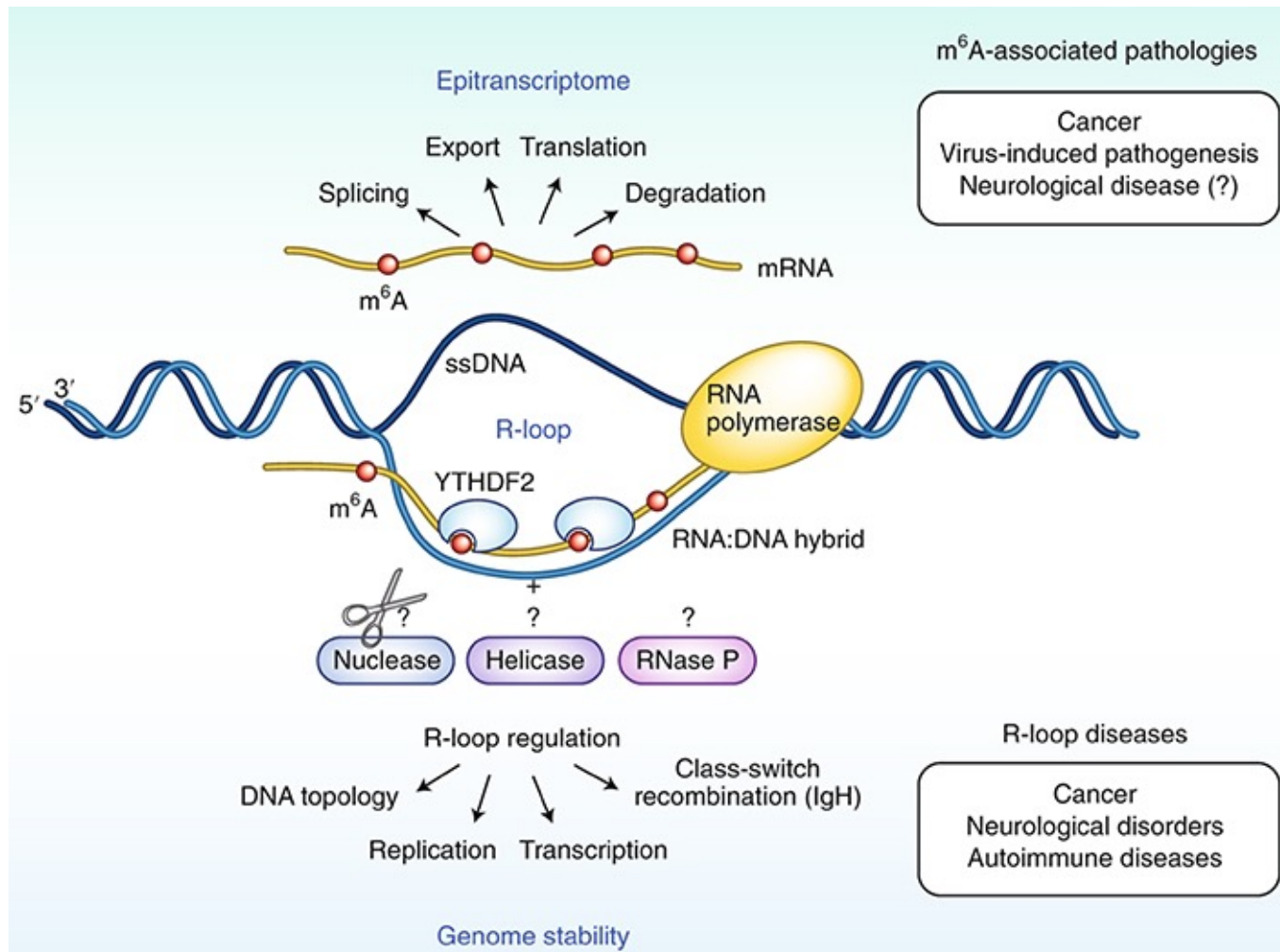
Hong-Jian Shan, Department of Orthopedics, The Affiliated Jiangning Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 211100, Jiangsu, China.
Email: 1638984763@qq.com

Graphical Abstract



1. m6A modification regulating alternative splicing reveals a strong link between RNA epitranscriptomic modification and genomic complexity.
2. Alternative splicing of m6A modification machinery endows tumor cells with specific splicing patterns and characteristics.
3. The combination of alternative splicing with m6A modification provides novel prognostic models and therapeutic targets for individual cancer.

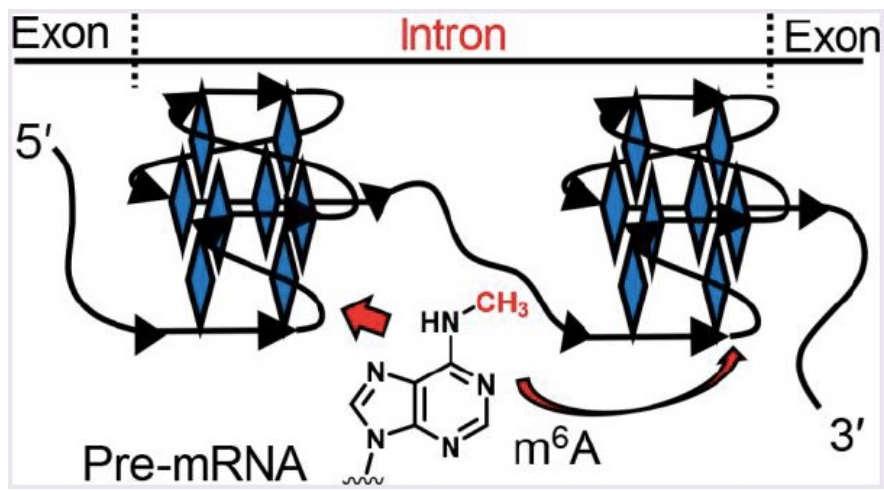
doi: [10.1002/ctm2.1460](https://doi.org/10.1002/ctm2.1460)



Doi: [10.1038/s41588-019-0563-z](https://doi.org/10.1038/s41588-019-0563-z)

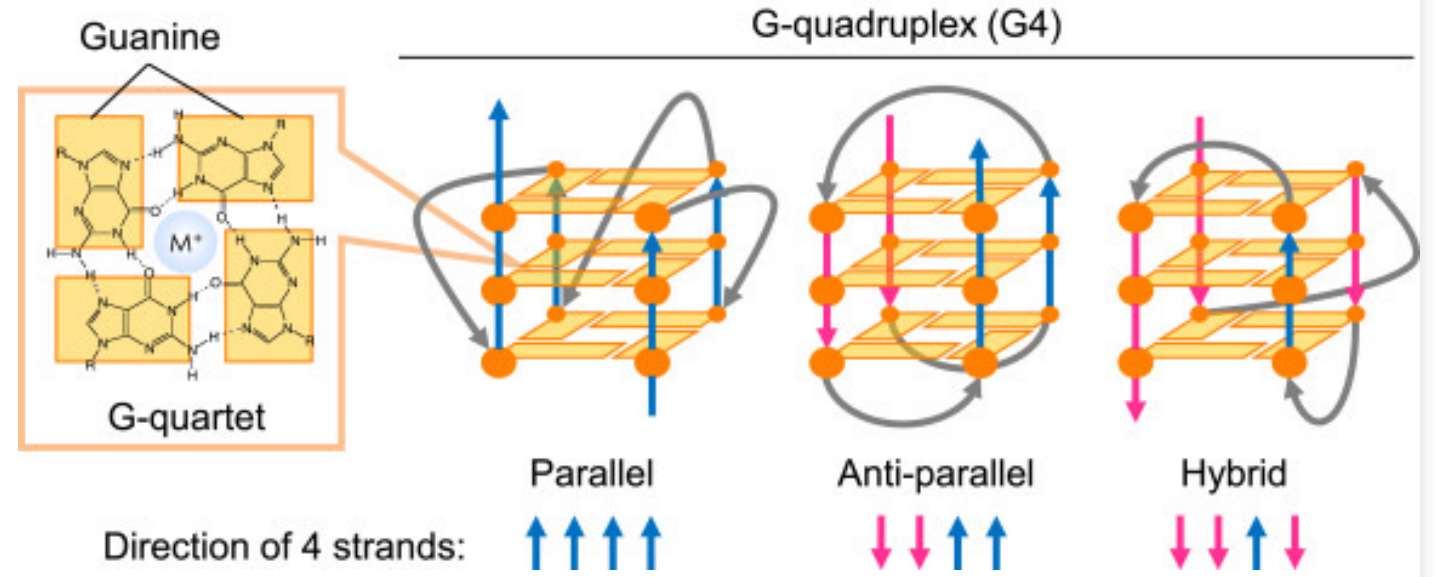
CO-LOCALIZZAZIONE DI m6A E POTENZIALI STRUTTURE RNA FORMANTI G-QUADRUPLIX NEI SITI DI SPLICING INTRONICI.

DOI: [10.1016/j.bbrc.2020.03.178](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.178)



G4-forming sequence 5'-GGGN₁₋₇GGGN₁₋₇GGGN₁₋₇GGG-3'

Telomere repeat sequence 5'-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'



METILASI

Complesso METTL3-METTL14 umano

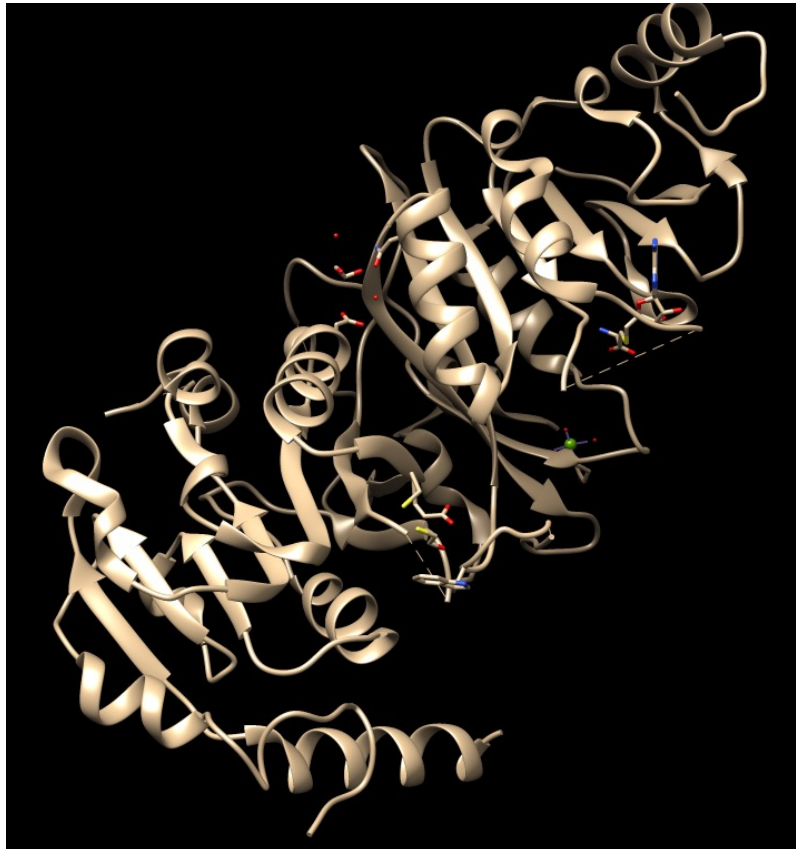
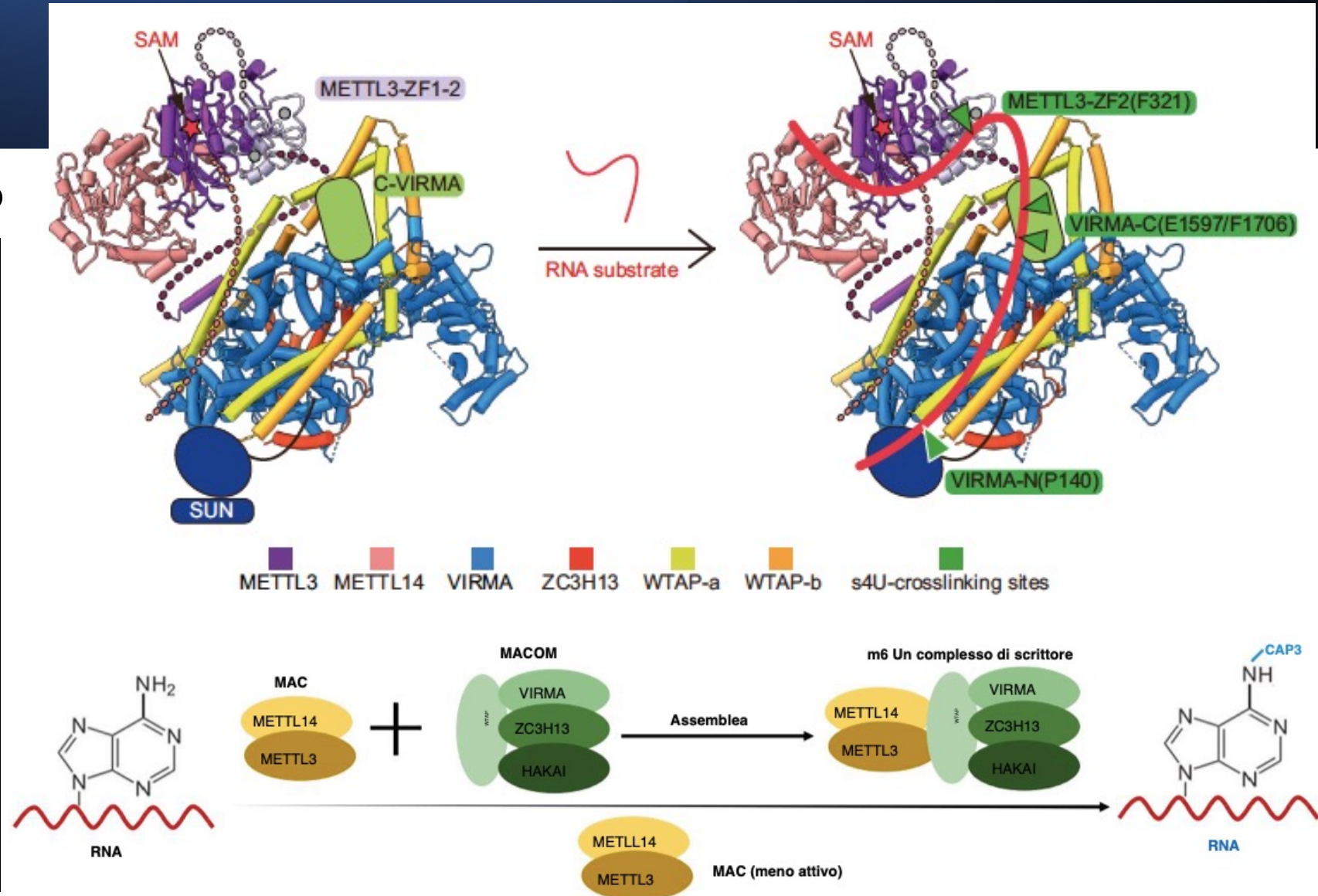


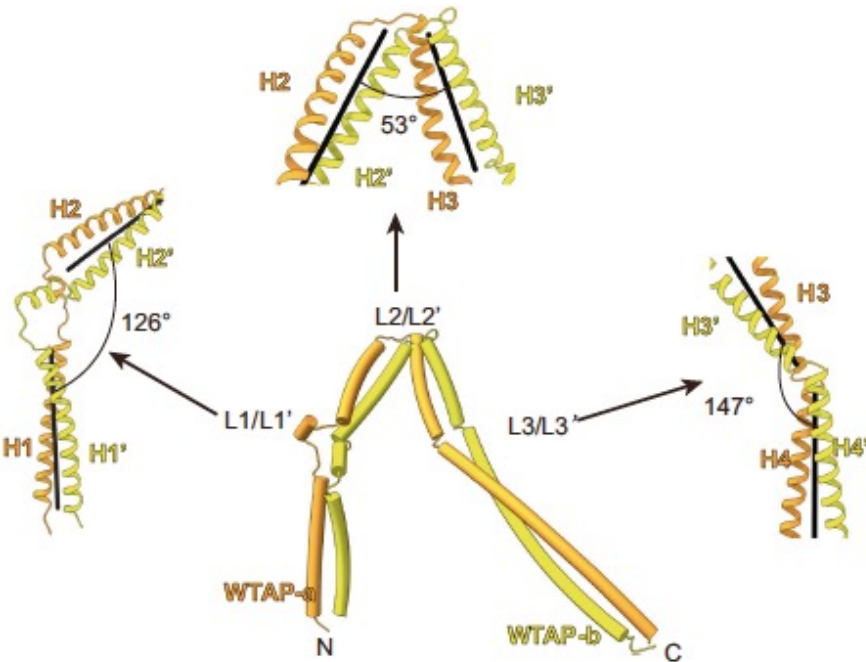
Immagine generata utilizzando ChimeraX

PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb5tey/pdb>

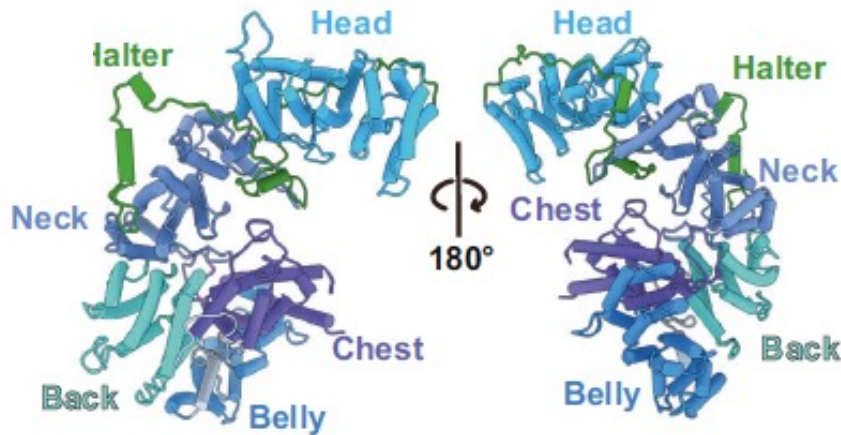


doi: [10.1038/s41422-022-00725-8](https://doi.org/10.1038/s41422-022-00725-8)

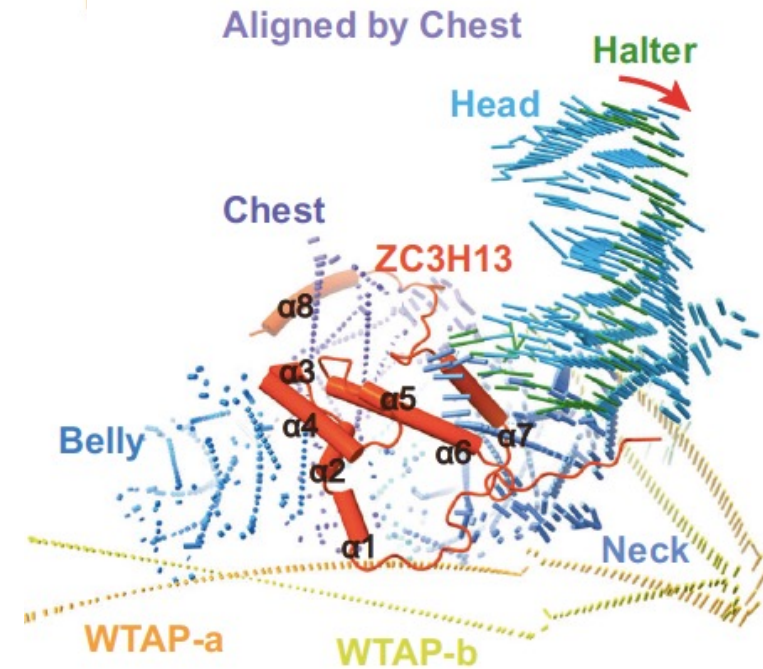
PRINCIPALI COMPONENTI DEL MACOM



WTAP → omodimero a forma di sella



VIRMA → conformazione a forma di cavallo



Cambiamenti conformazionali di HWV in seguito al legame con ZC3H13.

DEMETILASI

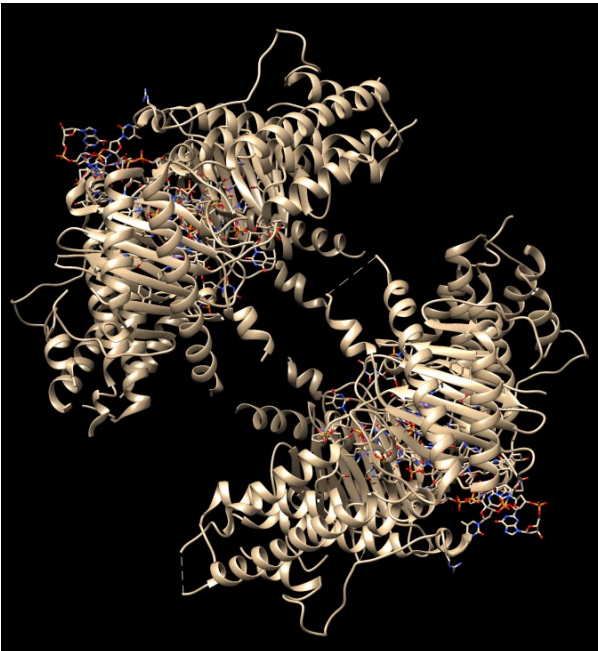
FTO

Crystal structure of FTO in complex with m6dA modified ssDNA

Zhang, X., Wei, L.H., Luo, J., Xiao, Y., Liu, J., Zhang, W., Zhang, L., Jia, G.F.

(2019) Proc Natl Acad Sci U S A **116**: 2919-2924

Released	2019-04-10
Method	X-RAY DIFFRACTION 3.3 Å
Organisms	DNA launch vector pDE-GFP2 Homo sapiens
Macromolecule	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO (protein) DNA (5'-D(P*TP*CP*TP*(6MA)P*TP*AP*TP*CP*G)-3') (nucleic acid)
Unique Ligands	MN, OGA



PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb5zmd/pdb>

ALKBH5

Crystal Structure of Human ALKBH5

Aik, W.S., McDonough, M.A., Schofield, C.J.

(2014) Nucleic Acids Res **42**: 4741-4754

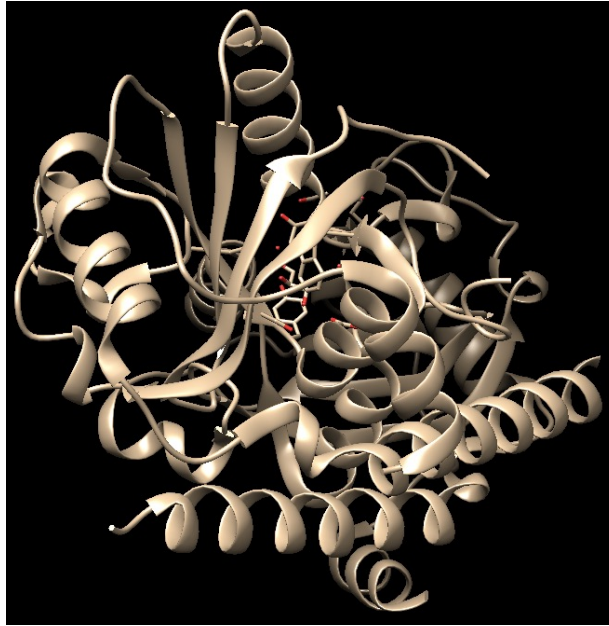
Released	2014-01-15
Method	X-RAY DIFFRACTION 2.02 Å
Organisms	Homo sapiens
Macromolecule	RNA demethylase ALKBH5 (protein)
Unique Ligands	GOL, MN, NO3, UN9

Immagini generate utilizzando ChimeraX



PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb4NJ4/pdb>

PROTEINE LETTRICI



Crystal structure of YTHDF1 YTH domain dimer

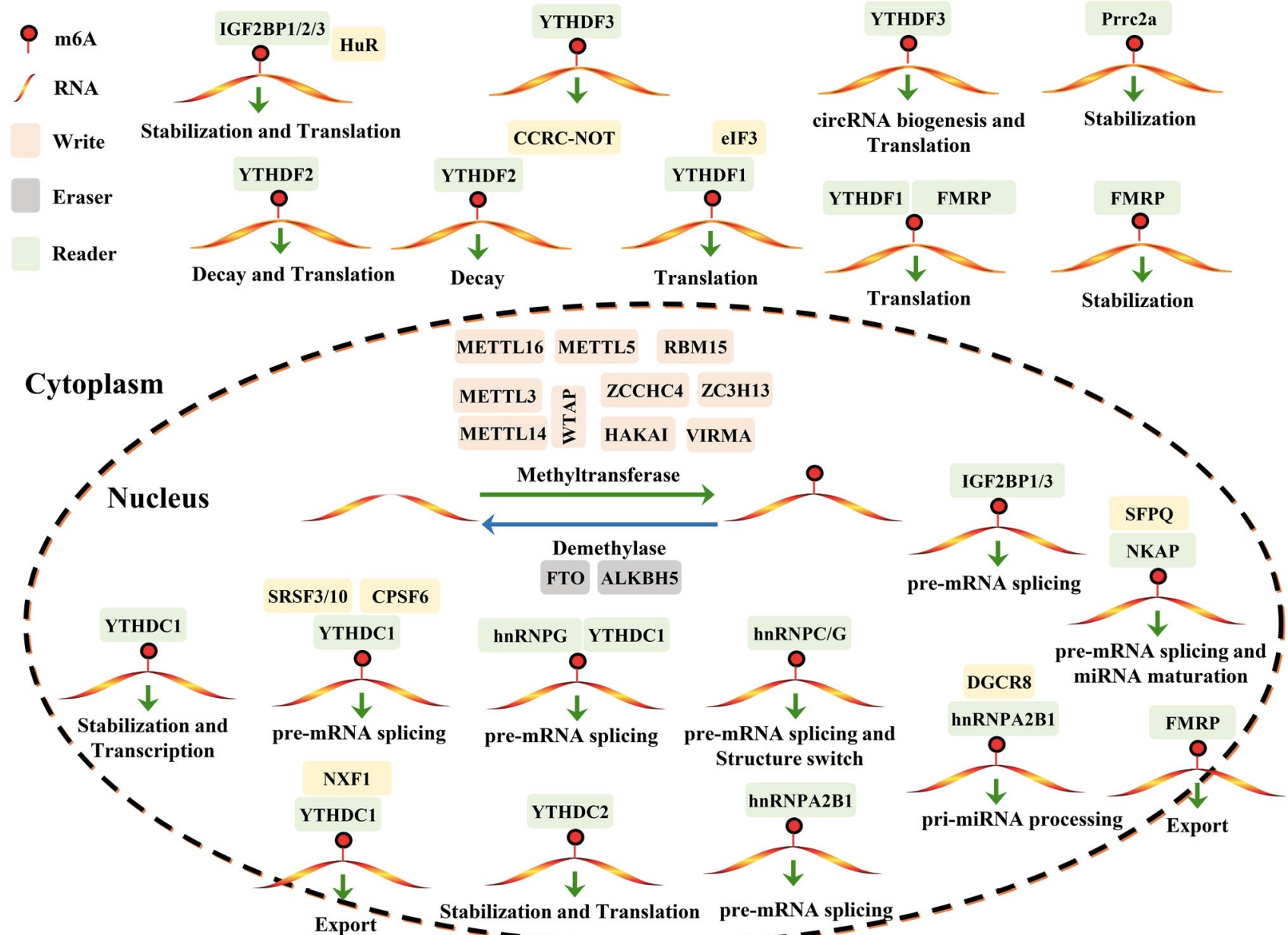
Bedi, R.K., Caflich, A.

To be published

Released 2023-12-13
 Method X-RAY DIFFRACTION 2.1 Å
 Organisms Homo sapiens
 Macromolecule YTH domain-containing family protein 1 (protein)

Immagine generata utilizzando ChimeraX

PDB DOI: <https://doi.org/10.2210/pdb8BS4/pdb>

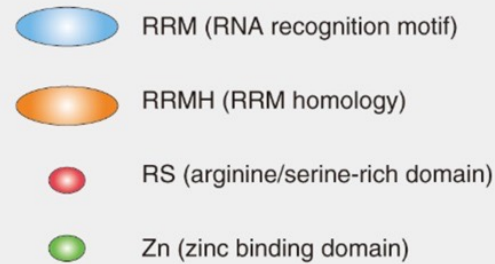


doi: [10.1002/ctm2.1460](https://doi.org/10.1002/ctm2.1460)

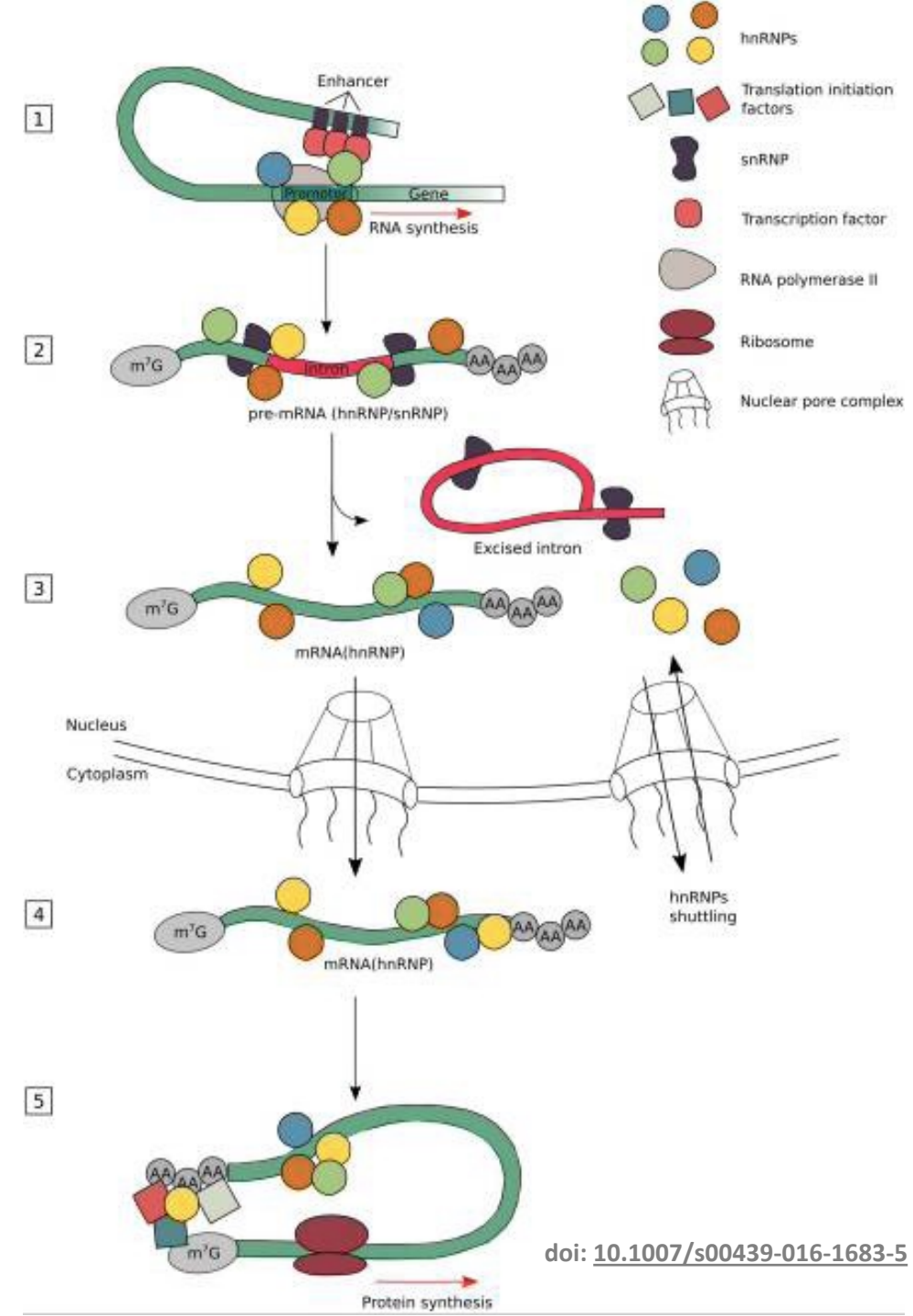
m6A E GIUNZIONI ALTERNATIVE

Le proteine leganti m6A (lettrici) reclutano fattori di splicing

Gene Symbol	Synonym	Domain structure	Shuttling
SRSF1	(ASF/SF2)		YES
SRSF2	(SC35)		YES
SRSF3	(SRp20)		YES
SRSF4	(SRp75)		YES
SRSF5	(SRp40)		YES
SRSF6	(SRp55)		YES
SRSF7	(9G8)		YES
SRSF8	(SRp46)		NO
SRSF9	(SRp30c)		NO
SRSF10	(SRp38)		YES
SRSF11	(p54)		NO
SRSF12	(SRp35)		NO



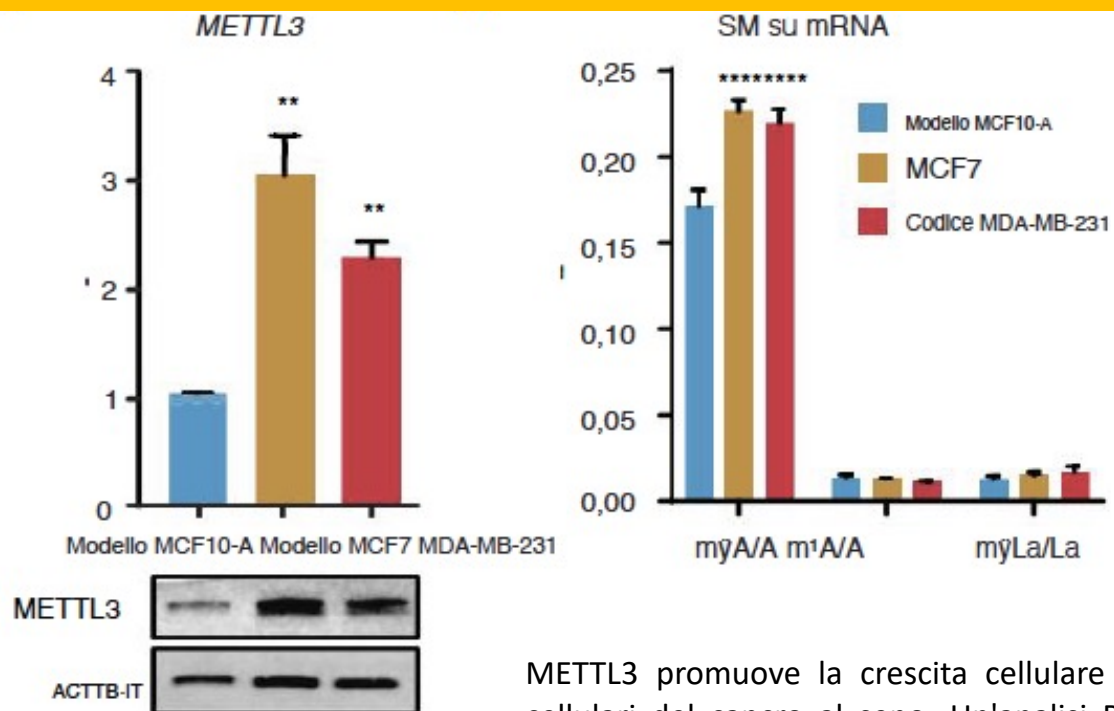
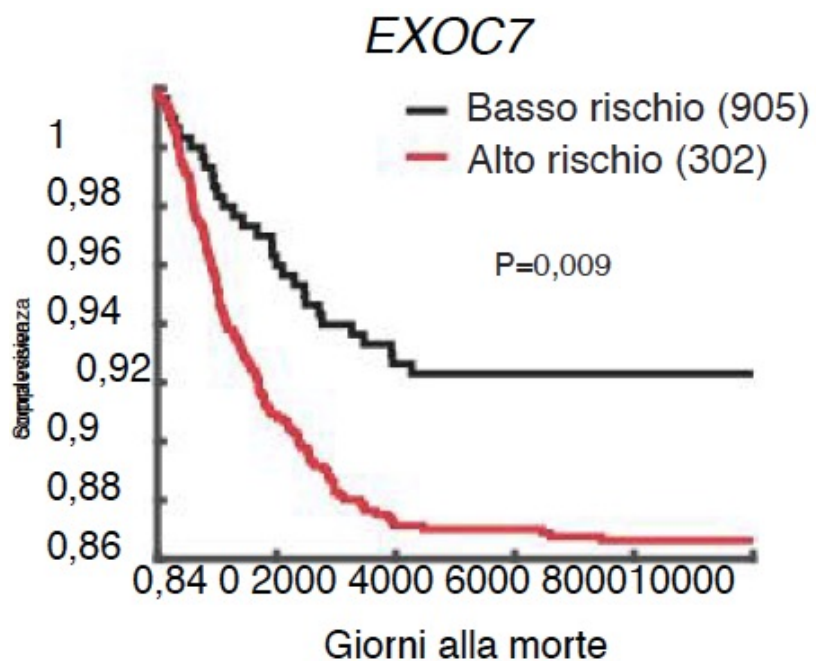
doi: [10.7150/ijbs.46751](https://doi.org/10.7150/ijbs.46751)



doi: [10.1007/s00439-016-1683-5](https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5)

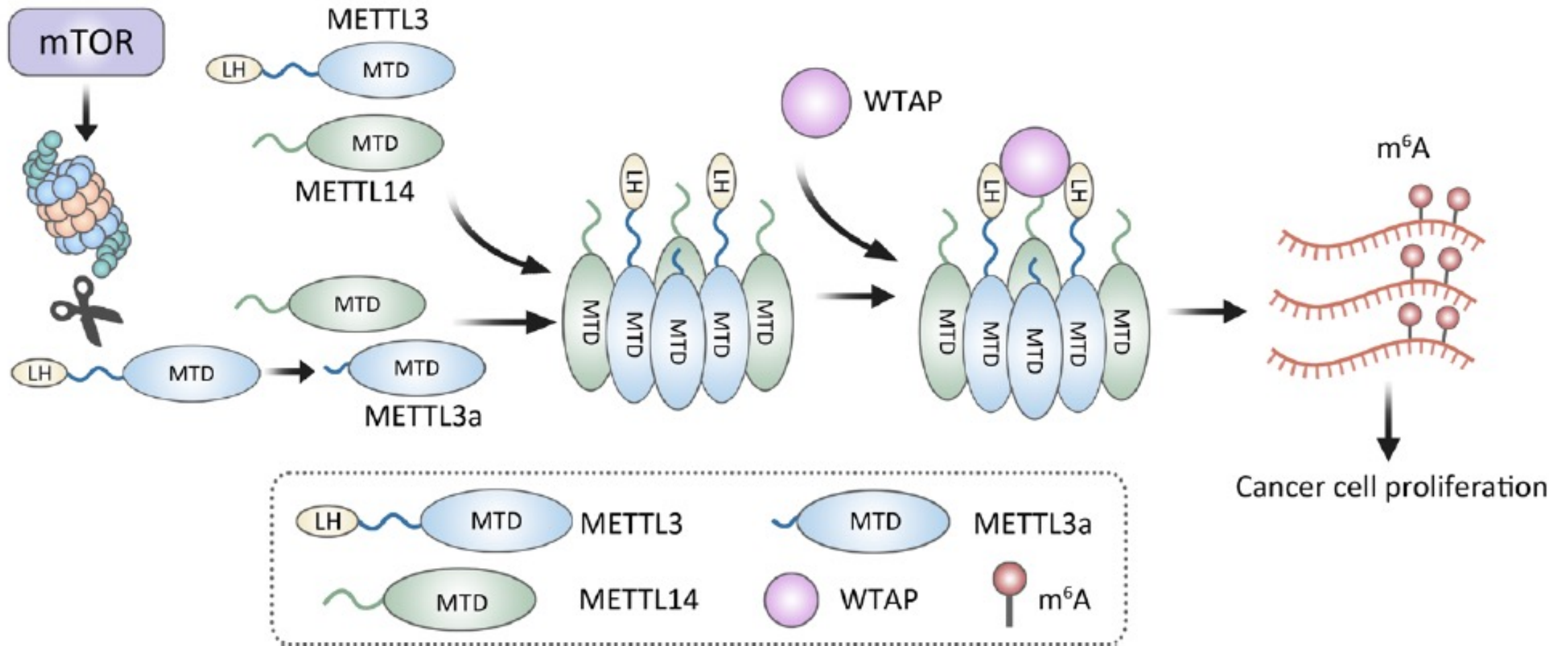
METTL3 REGOLA GLI SWITCH DI SPLICING ALTERNATIVI ASSOCIATI AL CANCRO AL SENO

Curva di Kaplan-Meier → Tasso di sopravvivenza collettivo delle pazienti con cancro al seno suddiviso in gruppi ad alto o basso rischio in associazione a ciascun evento AS per EXOC7.



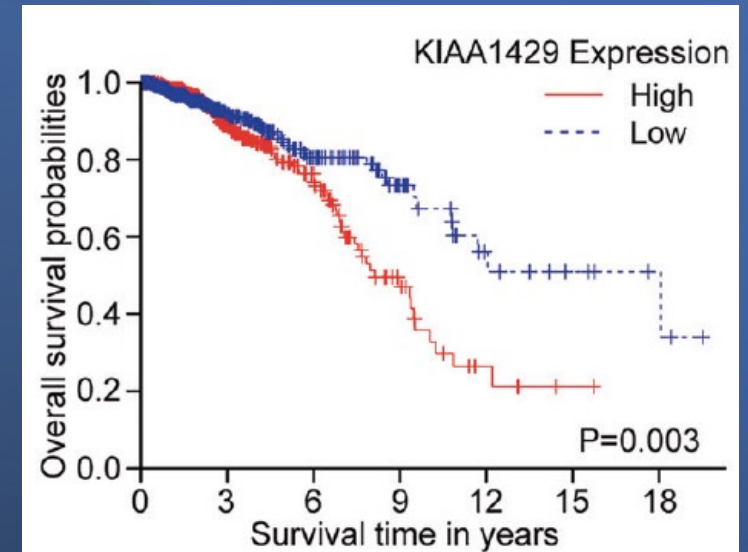
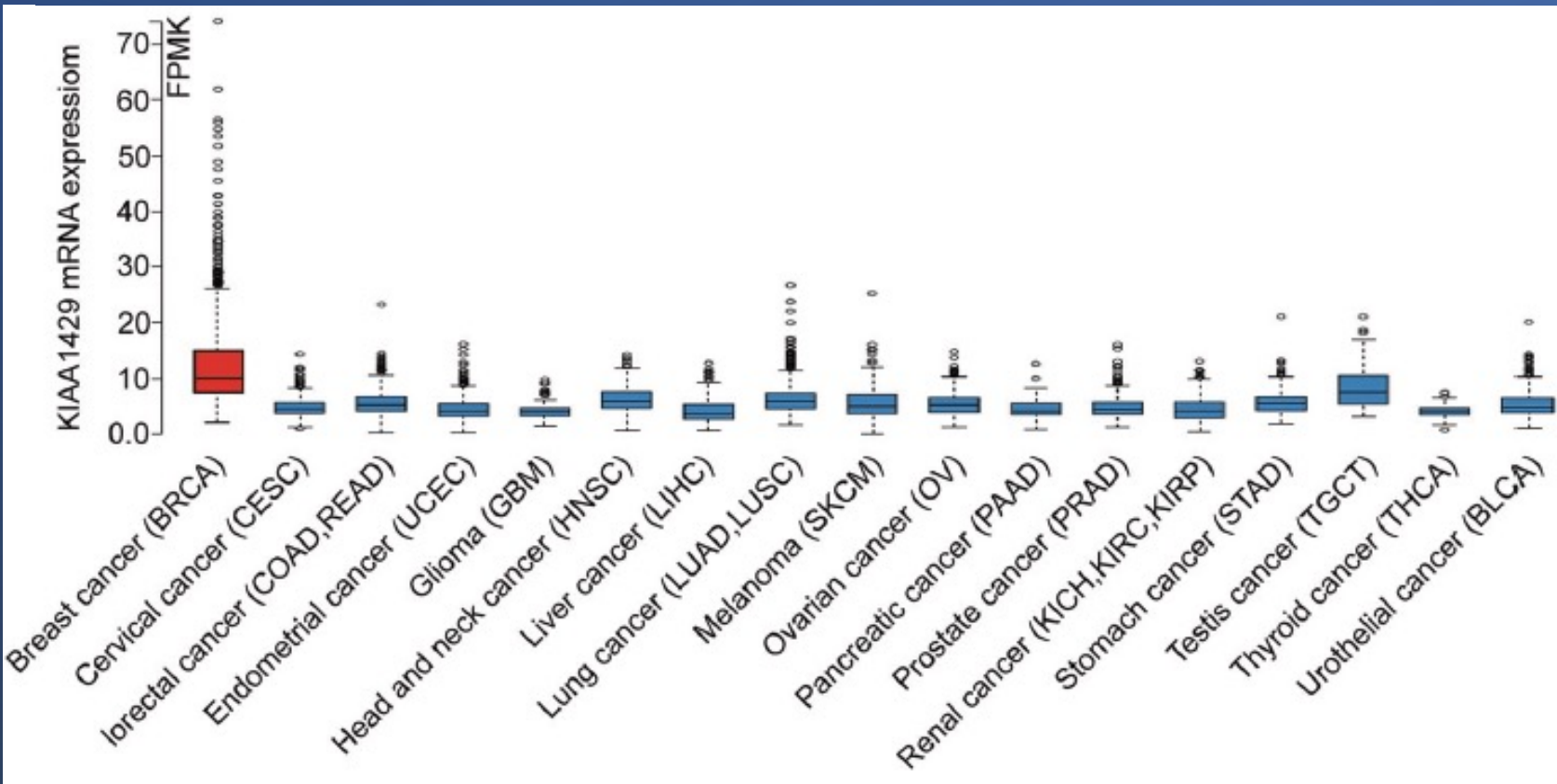
METTL3 promuove la crescita cellulare nelle linee cellulari del cancro al seno. Un'analisi RT-qPCR del livello di mRNA di METTL3 nella linea cellulare epiteliale mammaria non tumorigenica MCF10-A e nelle linee cellulari del cancro al seno MCF7 e MDA-MB-231. METTL3 è normalizzato a β -ACTIN.

Un METTL3 SCISSO POTENZIA L'INTERAZIONE METTL3-WTAP E LA PROGRESSIONE DEL CANCRO AL SENO.



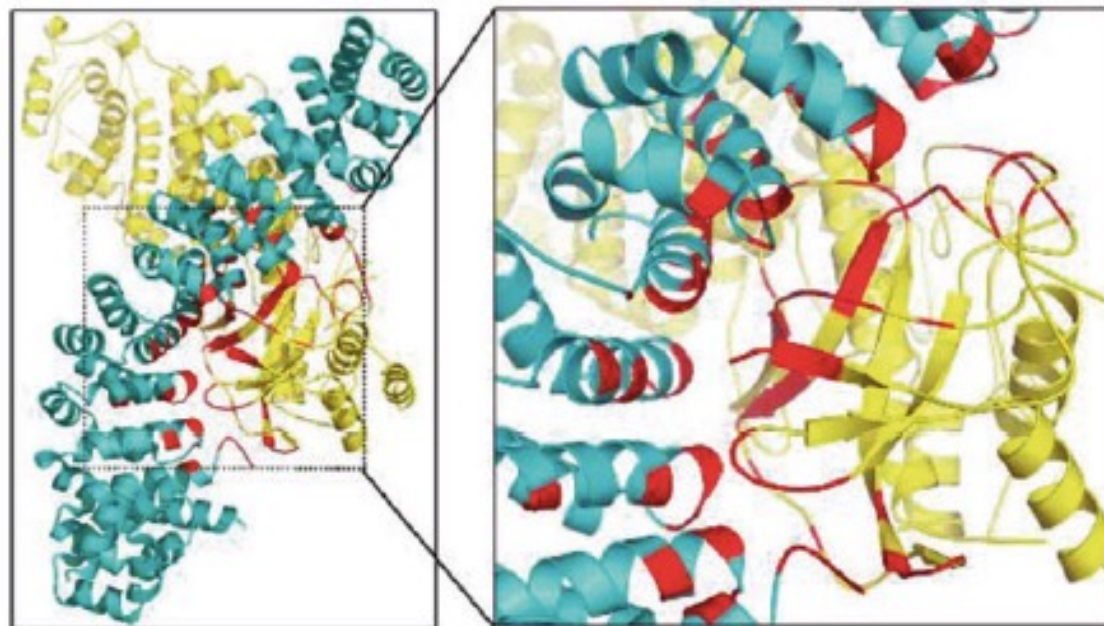
KIAA1429 (VIRMA) AGISCE COME FATTORE ONCOGENICO NEL CANCRO AL SENO REGOLANDO CDK1 IN MODO INDIPENDENTE DA m6A

DOI: [10.1038/s41388-019-0861-z](https://doi.org/10.1038/s41388-019-0861-z)



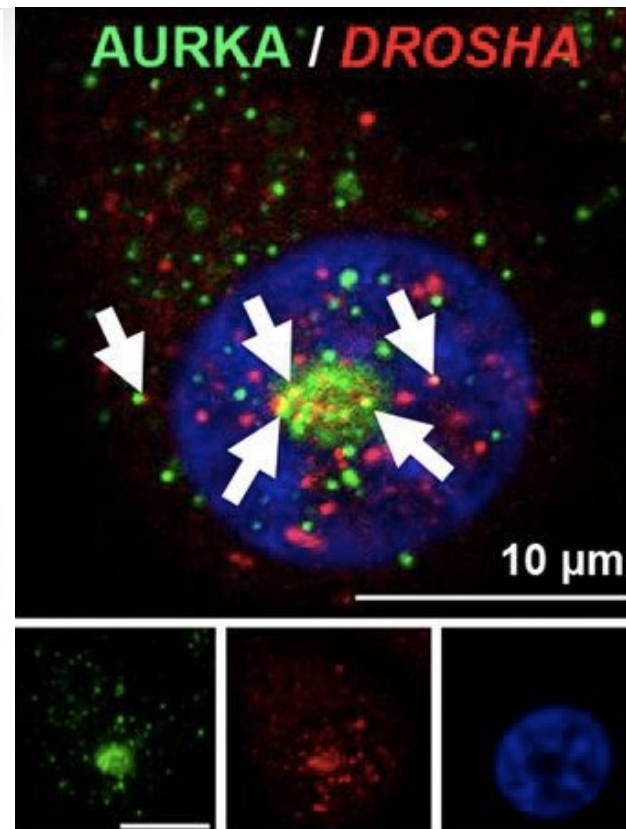
m6A POTENZIATA DA AURKA AUMENTA LA STABILITA' DELL'mRNA DI DROSHA CHE SI LEGA ALLA BETA-CATENINA PER TRANSATTIVARE STC1 NELLE CELLULE STAMINALI DEL CANCRO AL SENO.

doi: [10.1038/s41422-020-00397-2](https://doi.org/10.1038/s41422-020-00397-2)



■ β -Catenin
■ DROSHA

■ The amino acids with high probabilities of interactions in β -Catenin and DROSHA



co-colorazione (freccie bianche) della proteina AURKA (verde) e dell'mRNA DROSHA (rosso) osservata nel nucleo (blu).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

La modificazione m6A in un mRNA può portare sia all'attivazione che alla repressione di eventi di splicing alternativo, che svolgono un ruolo critico in vari processi biologici (determinazione del sesso, sviluppo riproduttivo, risposta infiammatoria, adipogenesi).

La deregolazione dello splicing alternativo m6A-dipendente è stata osservata in numerose malattie umane, in particolare nel cancro.

La relazione tra m6A e splicing alternativo è stata implicata sia nell'insorgenza del tumore che nella sua progressione, fornendo alle cellule tumorali profili e caratteristiche di splicing unici.

Questo pone le basi per nuovi modelli prognostici e bersagli terapeutici, offrendo approcci personalizzati al trattamento del cancro.

RIASSUNTO ESTESO

La modifica epitrascrittomica N-6-metiladenosina (m6A) influenza diversi aspetti del metabolismo dell'mRNA, tra cui lo splicing alternativo. Infatti, le proteine lettrici, che riconoscono e legano m6A, possono legare a loro volta i fattori di splicing. Una deregolazione di m6A causa disordini metabolici dell'RNA ed è stata osservata in diversi tipi di patologie umane, specialmente nel cancro. Mutazioni che avvengono a livello delle sequenze regolative di splicing di geni oncogeni e oncosoppressori, a livello di geni codificanti per fattori di splicing, proteine che fanno parte del complesso dello spliceosoma, proteine che intervengono nell'aggiunta o rimozione del codice metilico, producono isoforme che generano fenotipi maligni tumore-specifici. Tra le proteine che formano il complesso metiltrasferasico, o MTC, ce ne sono alcune in particolare la cui espressione è deregolata nelle cellule cancerose del seno. Tra queste: VIRMA e METTL3. Geni che portano firme di splicing alternativo specifiche producono isoforme a divergenza funzionale che possono rappresentare marker diagnostici e o prognostici e sulle quali si possono basare strategie terapeutiche mirate.

BIBLIOGRAFIA

- Zhu Z-M, Huo F-C, Zhang J, Shan H-J, Pei D-S. Crosstalk between m⁶A modification and alternative splicing during cancer progression. *Clin Transl Med.* 2023; 13(10):e1460. doi: 10.1002/ctm2.1460.
- Marnef, A., Legube, G. m⁶A RNA modification as a new player in R-loop regulation. *Nat Genet* 52, 27–28 (2020). Doi: 10.1038/s41588-019-0563-z
- Jara-Espejo M, Fleming AM, Burrows CJ. Potential G-Quadruplex Forming Sequences and N⁶-Methyladenosine Colocalize at Human Pre-mRNA Intron Splice Sites. *ACS Chem Biol.* 2020 Jun 19;15(6):1292-1300. doi: 10.1021/acscchembio.0c00260
- Peng F, Xu J, Cui B, Liang Q, Zeng S, He B, Zou H, Li M, Zhao H, Meng Y, Chen J, Liu B, Lv S, Chu P, An F, Wang Z, Huang J, Zhan Y, Liao Y, Lu J, Xu L, Zhang J, Sun Z, Li Z, Wang F, Lam EW, Liu Q. Oncogenic AURKA-enhanced N⁶-methyladenosine modification increases DROSHA mRNA stability to transactivate STC1 in breast cancer stem-like cells. *Cell Res.* 2021 Mar;31(3):345-361. doi: 10.1038/s41422-020-00397-2.
- Yan C, Xiong J, Zhou Z, Li Q, Gao C, Zhang M, Yu L, Li J, Hu MM, Zhang CS, Cai C, Zhang H, Zhang J. A cleaved METTL3 potentiates the METTL3-WTAP interaction and breast cancer progression. *Elife.* 2023 Aug 17;12:RP87283. doi: 10.7554/eLife.87283.
- Qian JY, Gao J, Sun X, Cao MD, Shi L, Xia TS, Zhou WB, Wang S, Ding Q, Wei JF. KIAA1429 acts as an oncogenic factor in breast cancer by regulating CDK1 in an N⁶-methyladenosine-independent manner. *Oncogene.* 2019 Aug;38(33):6123-6141. doi: 10.1038/s41388-019-0861-z.
- Achour C, Bhattarai DP, Groza P, Román AC, Aguilo F. METTL3 regulates breast cancer-associated alternative splicing switches. *Oncogene.* 2023 Mar;42(12):911-925. doi: 10.1038/s41388-023-02602-z.
- Su S, Li S, Deng T, Gao M, Yin Y, Wu B, Peng C, Liu J, Ma J, Zhang K. Cryo-EM structures of human m⁶A writer complexes. *Cell Res* 32, 982–994 (2022). Doi: 10.1038/s41422-022-00725-8.
- Protein Data Bank
- Biologia molecolare del gene (J. Watson, Tania A Baker, Stephen P Bell, Alexander Gann, Micheal Levine, Richard Losick)

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!