



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea in scienze biologiche

ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation

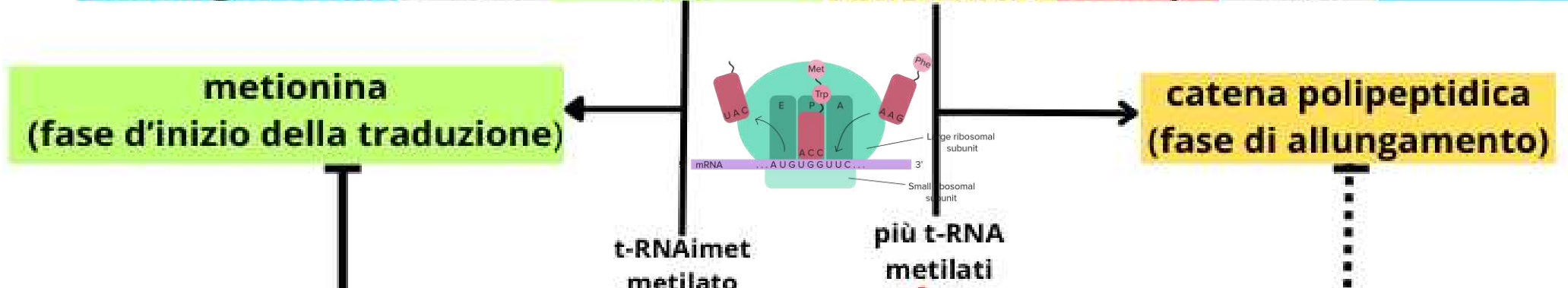
La Demetilazione dei t-RNA Mediata da ALKBH1 Regola la Traduzione

Tesi di laurea di:
Francesco Luzi

Docente referente:
Oliana Carnevali

Sessione: 15/12/2023
A.A. 2022/2023

m-RNA



Obiettivi

Lo scopo dello studio è quello di definire la funzione e i meccanismi d'azione della demetilasi ALKBH1 tenendo in considerazione ipotesi e dati di studi precedenti.

Gli esperimenti avranno lo scopo di dimostrare che:

- ALKBH1 catalizza la demetilazione di m1A nei tRNA
- La demetilazione dei tRNA_{iMet}, ad opera di ALKBH1, influenza la fase di inizio della traduzione
- La demetilazione dei tRNA attenua la fase di allungamento della traduzione

Qualche premessa...

Bisogna ricordare che gli acidi nucleici possono avere delle basi modificate che li contraddistinguono come:

-**m5C** per il DNA

-**U, m1A, m6A, m5C, m3C, m7G, pseudouridina e inosina** per i vari RNA

La Famiglia ALKBH

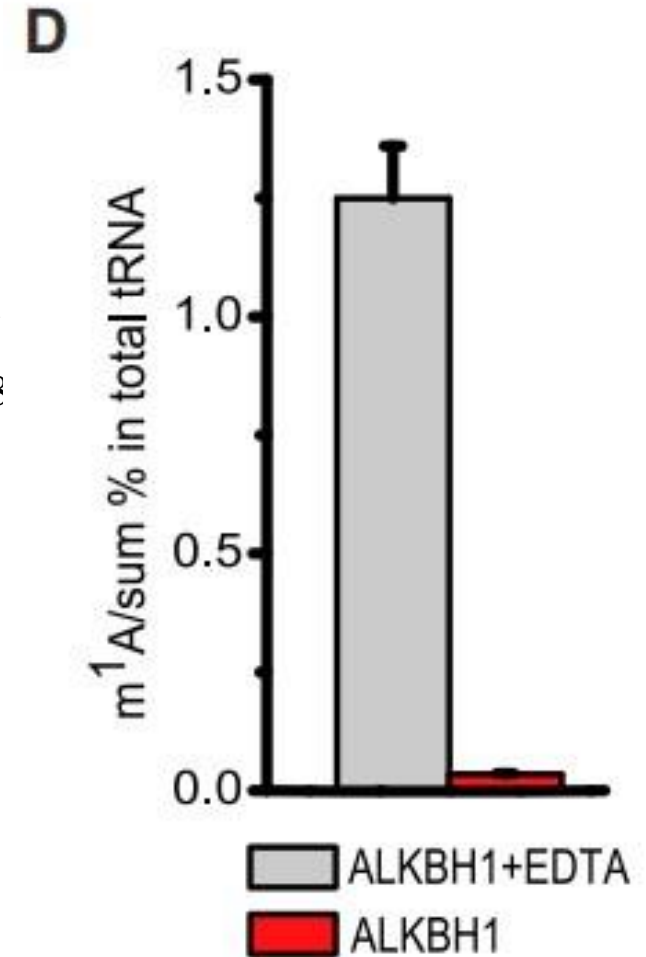
- E' una famiglia di demetilasi dipendenti da ferro e alfa-chetoglutarato
- Può usare DNA e RNA come substrati
- I membri di questa famiglia agiscono su diversi nucleosidi metilati come m1A e m6A
- Presentano un sito atto a riconoscere la corretta conformazione dell'acido nucleico bersaglio (è necessario un corretto ripiegamento per favorire la reazione)
- Nel 2011 sono stati studiati i meccanismi di ALKBH5 e FTO in grado di demetilare N6-metiladenosine di mRNA poliadenilati in presenza di ioni Fe²⁺ ed alfa-chetoglutarato

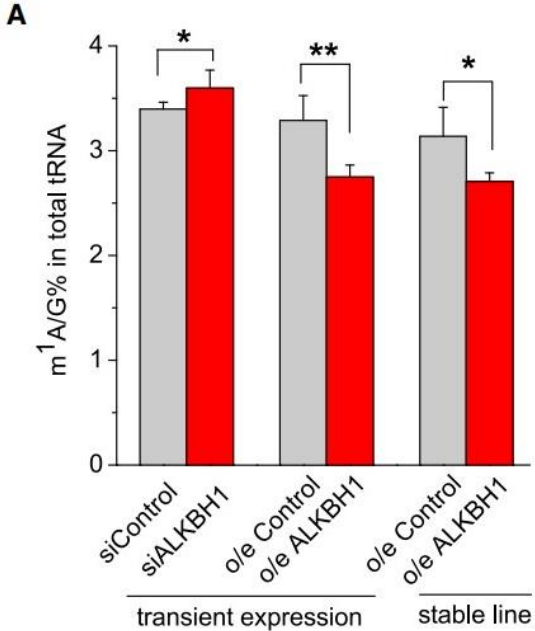
ALKBH1 catalizza la demetilazione di m1A nei tRNA

- CLIP (*cross-linking immuno-precipitation*) → scoperta di un tRNA binding motif.
- Colture di cellule **HeLa** con **Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA)**, in grado di mascherare gli ioni Fe, confrontate con culture prive di EDTA in grado di sfruttare gli ioni Fe.
- Osservazioni con cromatografia liquida e spettrometria di massa (LC-MS/MS) hanno riportato variazioni di m1A, le altre basi metilate sono rimaste invariate.
- In particolare è stata registrata una particolare affinità di ALKBH1 per m1A58 presente nel braccio T ψ C di molti tRNA.

CLIP: consiste nel rendere irreversibile il legame acido nucleico-proteina e identificare la sequenza bersaglio. Una volta trasferita su nitrocellulosa, viene separato dalla proteina attraverso una proteinasi k e infine ottenuto un cDNA attraverso una trascrittasi inversa. Tale cDNA sarà troncato agli estremi della sequenza del legame.

LC-MS: procedura che si avvale di due tecniche; la **cromatografia liquida** per una divisione degli elementi del campione per peso molecolare e la **spettrofotometria di massa** che agisce da secondo filtro questa volta sfruttando anche un gradiente di carica (campo elettrico).



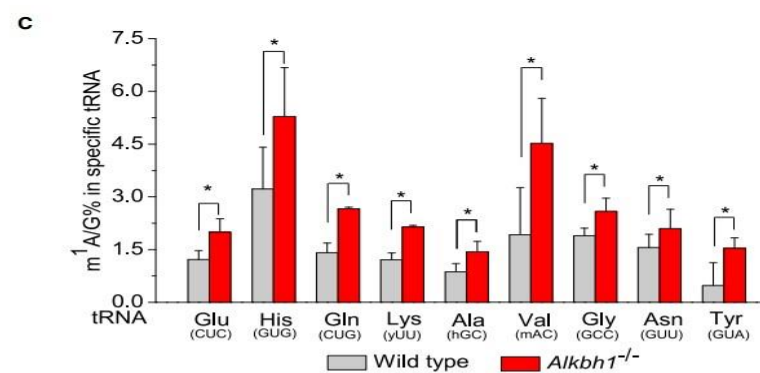


Analisi del rapporto m¹A/G di cellule HeLa mutate e controllo.

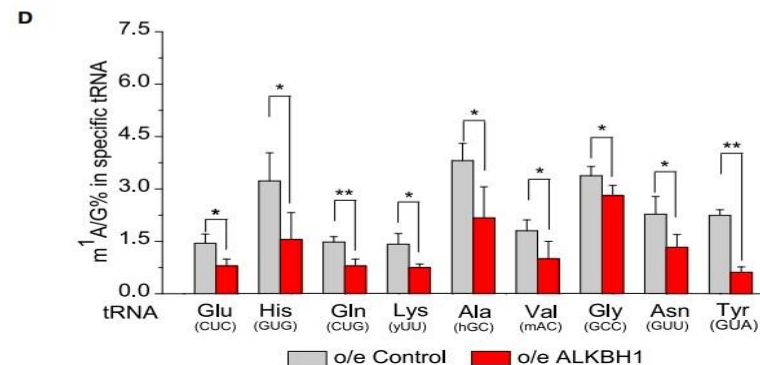
Inibizione transiente (siALKBH1) → +6% m¹A

sovraespressione transiente (o/e ALKBH1). → -16% m¹A

sovraespressione costante di ALKBH1(stable line). costante → -21% m¹A



- I singoli t-RNA sono stati isolati e purificati per vedere eventuali variazioni di affinità tra questi ultimi e ALKBH1.
- Tutti i t-RNA analizzati sono risultati sensibili a fluttuazioni della concentrazione di ALKBH1 ad eccezione dei tRNA di **fenilalanina** e **selenocisteina**.



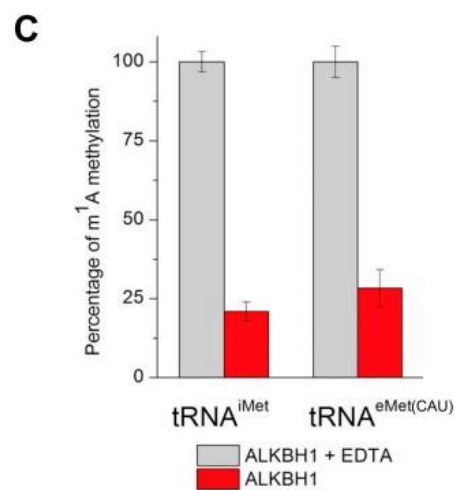
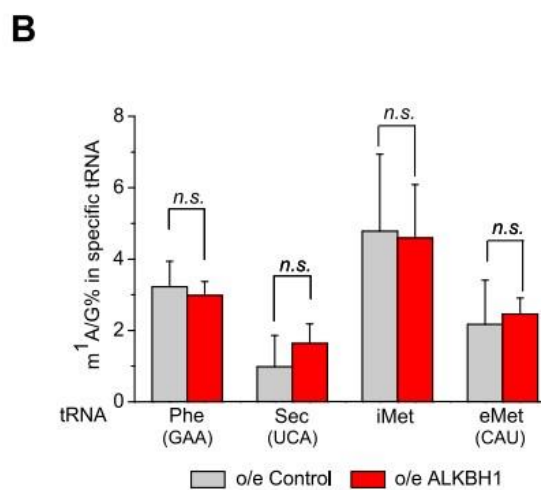
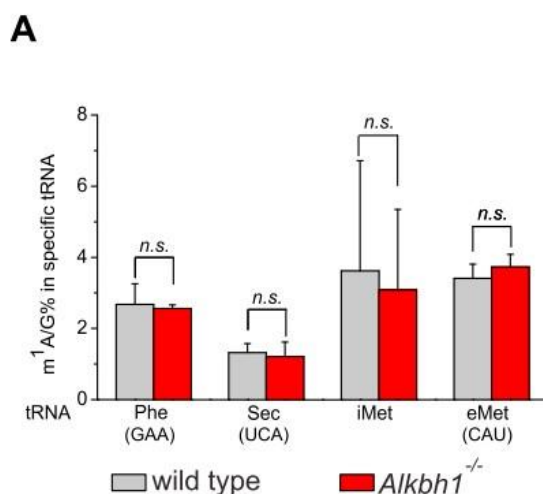
test simili su mRNA e rRNA, sia nei confronti di m¹A che di m⁶A, non hanno riportato variazioni significative paragonabili a quelle dei tRNA.

Da ciò possiamo affermare che ALKBH1 è in grado di demetilare con estrema efficienza i residui di N1-metiladenosina dei tRNA

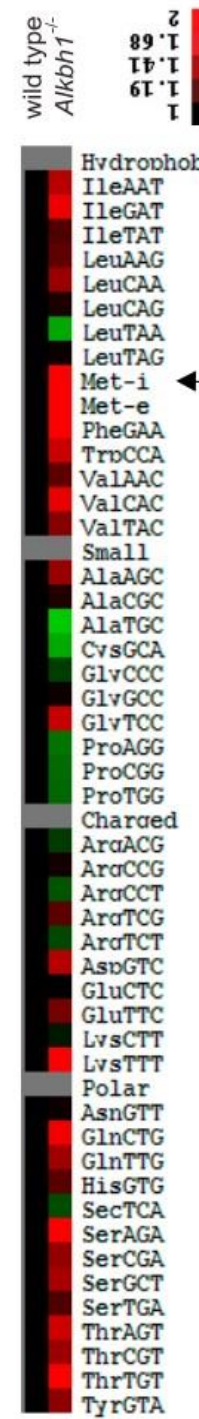
La demetilazione dei t-RNA_{iMet} influenza la fase di inizio della traduzione

La CLIP non è stata in grado di identificare il legame tra ALKBH1 e tRNA_{iMet}.

- Attraverso LC-MS non sono state rilevate fluttuazioni significative di m¹A dei tRNA di Phe, Sec, iMet ed eMet su fibroblasti embrionali di topo (MEF) [grafici A e B].
- Analisi della percentuale di m¹A su tRNA_{iMet} e tRNA_{eMet} su cellule HELA trattate o meno con EDTA hanno riportato oscillazioni significative (C).
- Il sequenziamento dell'intero genoma dei tRNA su cellule ALKBH1^{-/-} (figura D) ha stimato un aumento dell'espressione dei tRNA_{iMet} e tRNA_{eMet} di 1,9 volte rispetto a colture wt.

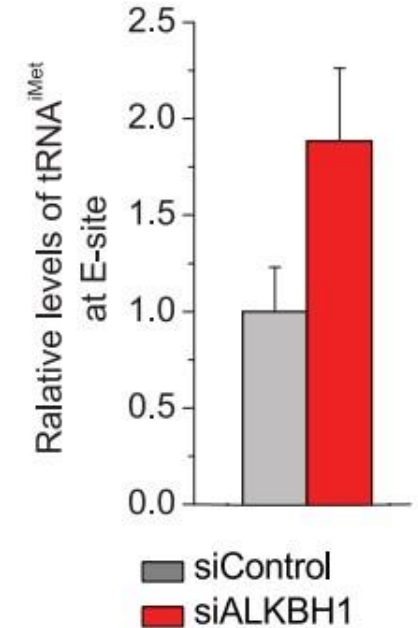


D

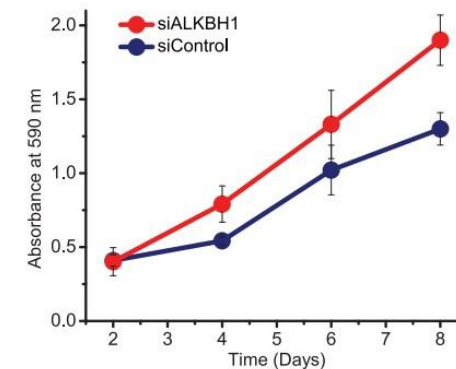


- Il tRNA_{iMet} è noto per essere il tRNA iniziatore della sintesi proteica.
- Trattamento di cellule HeLa wt e ALKBH1^{-/-} con **lattimidomicina (LTM)** in modo da bloccare il sito ribosomiale E, bloccando la traduzione appena terminata la fase di inizio.
- La concentrazione di tRNA iniziatori sul sito E di cellule ALKBH1^{-/-} è doppia rispetto alle cellule di controllo (A).
- Nel grafico (B) sono riportate delle misure di assorbanza nel tempo per calcolare la crescita delle popolazioni di cellule HeLa wt e ALKBH1^{-/-}. Possiamo facilmente osservare un tasso di crescita più elevato per le cellule che non esprimono ALKBH1.

A



B



ALKBH1 altera l'affinità di tRNA_{iMet} per il complesso ribosomiale, regolando così la fase di inizio della traduzione

ALKBH1 ATTENUA LA FASE DI ALLUNGAMENTO DELLA TRADUZIONE

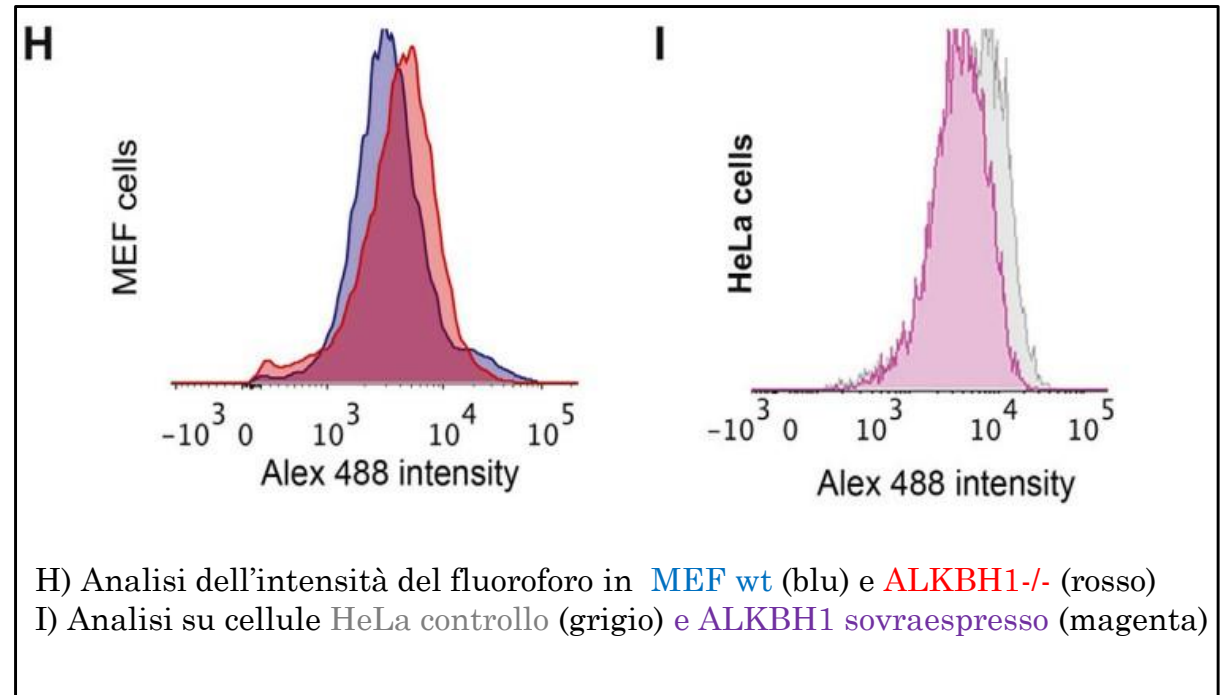
Nei seguenti esperimenti dimostreremo che l'attività di ALKBH1 può influenzare anche l'affinità di tRNA non iniziatori, in modo da regolare la fase di allungamento della sintesi proteica.

ESPERIMENTO 1

- 1) Uso di una glicina marcata con fluoroforo Alex488 e applicazione su campioni: ALKBH1^{-/-}, e/oALKBH1, wt e controllo
- 2) Dopo un po' di tempo è stata misurata la fluorescenza dei campioni mediante citometria a flusso

OSSERVAZIONI

Tramite la citometria a flusso è stato possibile osservare **un incremento della produzione di proteine nelle colture ALKBH1^{-/-}** rispetto a colture in condizioni normali.

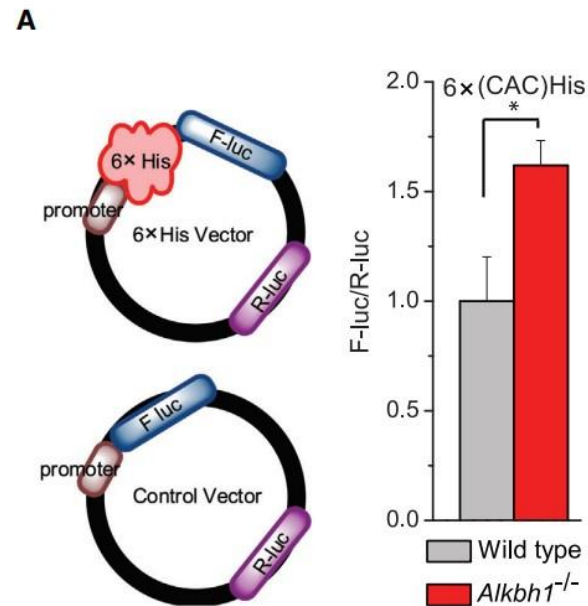


ESPERIMENTO 2 (*dual luciferase reporter assay*)

- È una tecnica che consiste nell'inserire un vettore il quale porta con sé un gene di interesse e due geni per due differenti luciferasi: una ottenuta da *Photinus pyralis* (F-luc) e l'altra da *Renilla reniformis* (R-luc).
- R-luc permette di normalizzare l'attività di F-luc.
- Ogni volta che il plasmide verrà tradotto, verranno sintetizzate le due luciferasi. Misurando l'intensità dei fenomeni di bioluminescenza è possibile misurare la concentrazione delle luciferasi ergo il numero di eventi di traduzione del plasmide.

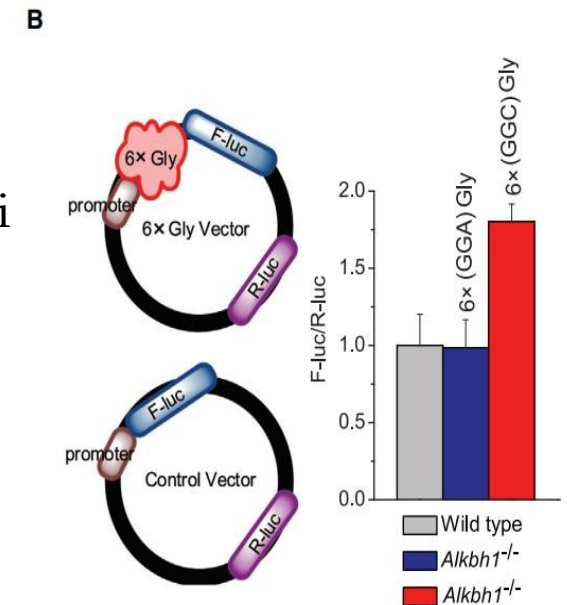
Vettore 1:

- Promotore
- 6 codoni modificati
CAC → His_{GUG}
- F-luc
- R-luc



Vettore 2:

- Promotore
- 6 codoni modificati
GCC → Gly_{GGC}
- F-luc
- R-luc

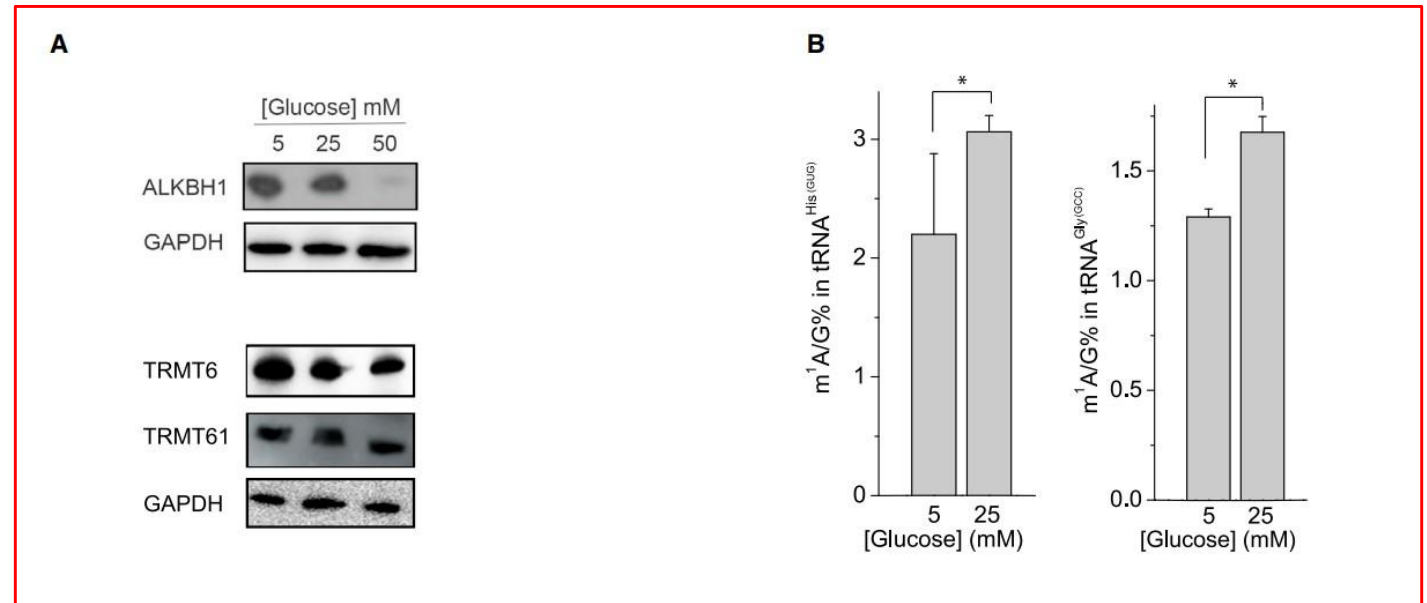


Nel secondo saggio è stato inserito un vettore di controllo con 6 codoni GGA che non possono essere codificati dal tRNA_{Gly}, quest'ultimo ha riportato un quantitativo di bioluminescenza pari al campione wt, rafforzando la validità dei dati ottenuti

➤ è stata osservata una sovraespressione di ALKBH1 in cellule carenti di glucosio.

➤ Analisi western blot(A) hanno confermato che una concentrazione bassa di glucosio, porta una quantità maggiore di ALKBH1.

Questo porta ad una variazione di adenosine metilate nei vari tRNA come si può osservare nella figura (B).



Sono state misurate le concentrazioni delle t-RNA metiltrasferasi 6 e 61 al fine di accertarsi che le variazioni di m¹A nei t-RNA siano state causate da una variazione di ALKBH1.

La concentrazione costante della gliceraldeide-3fosfato deidrogenasi indica che non vi sono state alterazioni della via glicolitica.

CONCLUSIONI ...

I risultati mostrano che ALKBH1:

- Demetila m1A dei tRNA in particolare m1A58.
- La sua affinità per tRNA_{iMet} permette la regolazione della fase di inizio della traduzione.
- Demetilando i vari tRNA altera la loro affinità per il complesso ribosomiale attenuando così la fase di allungamento della traduzione.
- Regolando e attenuando la traduzione è in grado di alterare la velocità di crescita delle cellule.
- In carenza di glucosio si ha un aumento dell'espressione di ALKBH1 quindi una diminuzione dei fenomeni di traduzione.

Perché studiare ALKBH1

- Numerosi studi riportano una sovraespressione di ALKBH1 in cellule tumorali di diverse tipologie come tumore ai polmoni, colon, retto e stomaco.
- Regolando ALKBH1 si può regolare la traduzione e la crescita di una coltura (es. inibire ALKBH1 per avere una coltura con maggior tasso di crescita e abbassare i tempi di produzione per colture necessarie alla ricerca).
- Lo studio di altre demetilasi della famiglia ALKBH può aiutare a comprendere altri meccanismi di regolazione non solo a livello traduzionale.

FONTI

Articolo Principale:

[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(16\)31323-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741631323X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(16)31323-X?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS009286741631323X%3Fshowall%3Dtrue)

Approfondimenti:

- [http://refhub.elsevier.com/S0092-8674\(16\)31323-X/sref27](http://refhub.elsevier.com/S0092-8674(16)31323-X/sref27)
- [The essential Gcd10p–Gcd14p nuclear complex is required for 1-methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA \(cshlp.org\)](#)
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36467585/>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36550779/>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444240/>