

EL METILOMA DE LA ARN-N⁶-ADENOSINA Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCERpor FRANCISCO ORTIGOSA¹, JOSÉ MIGUEL VALDERRAMA MARTÍN² Y RAFAEL A. CAÑAS²

1: MANUFACTURES SPECIALIST IN MODERNA VACCINE PRODUCTION. LONZA (VISP, SUIZA)

2: ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071.

1: PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071.

FRANCISCO.ORTIGOSA@LONZA.COM , JMVALDERRAMA@UMA.ES Y RCANAS@UMA.ES

Palabras clave: N⁶-metiladenosina, m⁶A, epitranscriptómica, METTL3, METTL14, cáncer*Keywords:* N⁶-methyladenosine, m⁶A, epitranscriptomics, METTL3, METTL14, cancer.

Resumen: La N⁶-metiladenosina es una de las modificaciones más comunes en el ARN y participa de forma crucial en la expresión de determinados grupos de genes. La adición de esta modificación química es llevada a cabo a través de un complejo proteico denominado metiloma y más específicamente a través de las ARN-N⁶-metiltransferasas, presentando funciones claves en importantes procesos celulares encuadrados dentro del metabolismo del ARN como por ejemplo la estabilizando o degradación de ARN mensajeros (ARNm) o promoviendo la traducción de determinados ARNm. De este modo, la función o la falta de función de estas proteínas han sido relacionadas con diferentes tipos de cánceres y su agresividad.

Abstract: N⁶-methyladenosine is one of the most common modifications in RNA and plays a crucial role in the expression of certain groups of genes. The addition of this chemical modification is carried out through a protein complex called methyloma and more specifically through the RNA-N⁶-methyltransferases, playing a key role in important cellular processes within the RNA metabolism such as stabilizing or degrading messenger RNA (mRNA) or promoting the translation of certain mRNAs. In this way, the function of these proteins have been related to different types of cancers and their aggressiveness.

En muchos casos la aparición del cáncer suele atribuirse a la existencia de mutaciones en genes supresores de tumores y protooncogenes, siendo considerado como una enfermedad genética. Sin embargo, si algo se sabe a «ciencia cierta» acerca de la aparición de esta enfermedad es que presenta la característica de la multifactorialidad, siendo ya reconocida también por su carácter epigenético y metabólico, siendo la inestabilidad genómica, característica en ciertos cánceres, una posible causa^[1]. El marcador epigenético más estudiado y caracterizado hasta la fecha es la metilación del ADN genómico, cuya existencia ya se dio a conocer en la primera mitad de la década de los 50^[2] y posteriormente en los 80 su relación con el cáncer^[3]. En este sentido, existe otra capa de información epigenética en el transcriptoma conocida como epitranscriptoma. Actualmente su conocimiento resulta limitado, aunque en continua emergencia, lo que puede llegar a resultar paradójico debido a que la existencia de modificaciones químicas en el ARN se conoce desde los años 50 con el descubrimiento de la pseudouridina (Ψ)^[2]. El ARN presenta un mayor número de modificaciones químicas comparado con las presentes en el ADN, existiendo alrededor de 160

modificaciones diferentes descritas hasta la fecha^[4]. Estas modificaciones están presentes prácticamente en todos los tipos de ARN: ARN transferente (ARNt), ARN ribosomal (ARNr), ARN mensajero (ARNm) y en pequeños ARN (ARNs)^[5] y están relacionadas con importantes funciones celulares, como la estabilización o degradación de ARNm, ajuste alternativo, cambios en la estructura secundaria del ARN, traducción de ARNm o en la maduración de los micro-ARN (miARN)^[6,7]. De entre todas las modificaciones químicas, la N⁶-metiladenosida (m⁶A) es la modificación más frecuente y estudiada en las células eucariotas^[8]. Esta modificación química del ARN es reversible y puede ser eliminada a través de enzimas borradoras (ARN-desmetilasas), agrupadas bajo el término inglés «erasers»^[6], mientras que la respuesta celular es mediada por proteínas que reconocen estas modificaciones, conocidas por su término inglés «readers»^[6]. La metilación de las adenosinas que da lugar a la m⁶A en el ARN está operada por enzimas editoras o «writers» (ARN-metiltransferasas) que forman un complejo proteico denominado como metiloma y que utilizan a la S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo (-CH₃)^[9]. En 1994 se identificó

a METTL3, la primera enzima implicada en este proceso. METTL3 se encarga de catalizar la metilación en la posición N6 de un residuo de adenosina^[6] (Figura 1A). Sin embargo, muchas más proteínas han sido identificadas posteriormente encontrándose representantes de múltiples familias. Entre los integrantes mejor estudiados y descritos se encuentran: METTL14 que constituye el armazón de unión al ARN y ayuda al reconocimiento del residuo de adenosina específico potenciando alostéricamente la actividad catalítica de METTL3^[6], WTAP y VIRMA que presentan una función reguladora responsable de la formación del complejo proteico y como guía del complejo proteico a la región diana^[6], RBM15 que es una proteína de unión al ARN responsable del reclutamiento del complejo^[6], y ZC3H13 que actúa como nexo entre WTAP y RBM15, siendo requerido también en la localización nuclear del complejo proteico^[6] (Figura 1B). Múltiples y recientes trabajos han puesto de

manifiesto diferencias en el patrón de metilación de transcritos codificantes de importantes oncogenes lo que altera la expresión y/o traducción de los mismos, ya sea interviniendo en procesos de ajuste alternativo, estabilizando o degradando el ARNm, o interviniendo en el proceso de traducción del mismo^[10]. Todo ello se encuentra relacionado con procesos de tumorigénesis, proliferación tumoral y metástasis^[10]. Dentro del conjunto de proteínas que conforman el metiloma humano, METTL3 y METTL14 son las mejor caracterizadas y relacionadas con procesos oncogénicos. De este modo se observa que dependiendo del tipo de tumor que se estudia, METTL3 y METTL14 pueden actuar como oncogenes o como genes supresores de tumores^[11]. Por ello, cada vez hay más estudios sobre las funciones moleculares de las enzimas encargadas de la formación de m⁶A en el ARN en relación a diferentes tipos de cáncer.

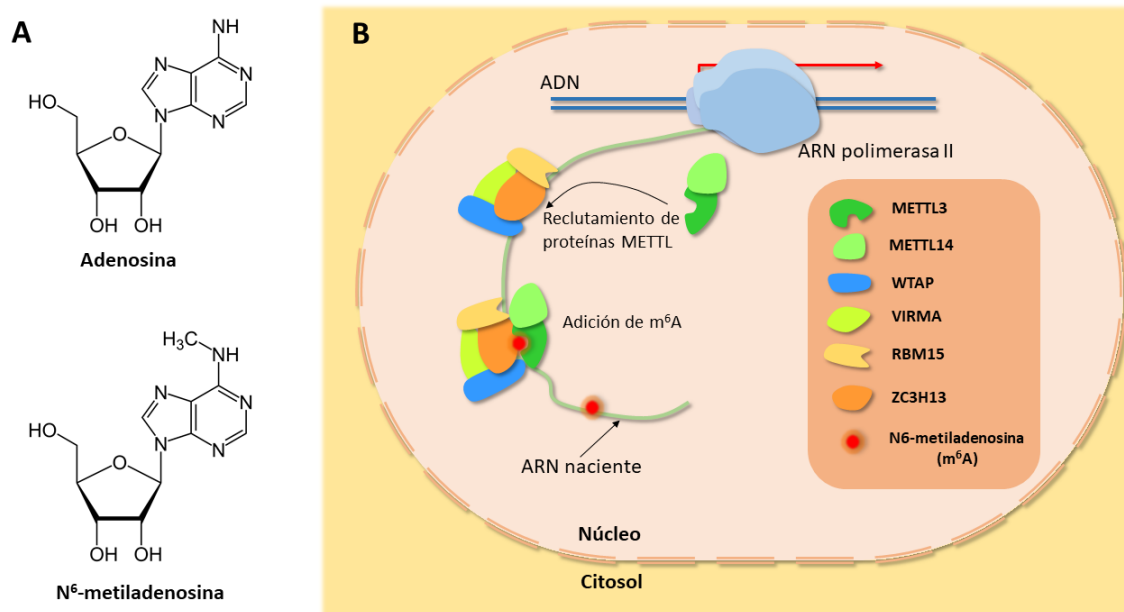


Figura 1. A. Estructura química de los nucleósidos adenosina y N⁶-metiladenosina. B. Representación esquemática de los componentes metiloma y su acción en humano.

1. El metiloma de la m⁶A y su relación con la estabilidad de los ARN mensajeros

En múltiples estudios se han descrito la función reguladora de la m⁶A en la estabilidad de importantes genes implicados en el proceso de metástasis y su relación con la actividad de las ARN-metiltransferasas^[11]. Así mismo, los mecanismos principalmente afectados por esta marca epitranscriptómica son la estabilidad/degradación de ARNm y el proceso de traducción, bien de oncogenes o bien de genes supresores de tumores^[11]. El cáncer de mama (*Breast Cancer*, BC)

es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres y se sabe que la actividad de la METTL3 previene su aparición mediante la regulación de la vida media de los transcritos de diferentes factores de transcripción. NANOG, KLF4 y SOX2 son factores de transcripción implicados en la regulación de la pluripotencia, de la proliferación, diferenciación, apoptosis y reprogramación celular, por lo que son importantes componentes en la iniciación del tumor y su metástasis. A su vez, el gen ZNF217 codifica para un factor de transcripción que regula la expresión de los genes NANOG, KLF4 y SOX2 y que se encuentra sobreexpresado

en el cáncer de mama. Se ha visto que ZNF217 es capaz de secuestrar a la proteína METTL3, lo que provoca un patrón de metilación disminuido en estos transcritos lo que se traduce en un incremento en la estabilidad de estos ARN mensajeros de KLF4, SOX2 y NANOG. A su vez, la proteína eliminadora de m⁶A ALKBH5 también presenta una mayor expresión en este tipo de tumor lo que refuerza la estabilización de KLF4, SOX2 y NANOG mediante la eliminación de esta marca epitranscriptómica. Todo ello en conjunto, promueve el proceso de tumorigénesis^[12] (Figura 2A). Otros ejemplos aparecen en la leucemia mieloide aguda y el glioblastoma. La leucemia mieloide aguda (*Acute Myeloid Leukemia*, AML) es el tipo más común de leucemia aguda en adultos y se origina en la médula ósea. El linaje celular generado durante la AML es incapaz de realizar sus funciones correctamente y es uno de los cánceres en los que METTL3 y METTL14 exhiben una mayor expresión en comparación con el perfil que presentan las células progenitoras hematopoyéticas sanas^[13]. Esto ha sido relacionado con la capacidad de METTL3 y METTL14 de metilar las adenosinas de transcritos como SP1, MYC, MYB, BCL2 y PTEN promoviendo su estabilidad y con ello la supervivencia de las células tumorales, a pesar de que durante el curso de la AML se originan múltiples mutaciones y reordenamientos cromosómicos^[13]. La expresión de otra proteína implicada en la formación del metiloma es WTAP, cuya expresión se encuentra sobredimensionada en la AML, observándose que el aumento de WTAP se encuentra relacionado con la proliferación celular e inhibiendo la diferenciación celular en la AML^[14]. Gracias al trabajo de Sorci y colaboradores^[15] ha sido posible demostrar que los niveles endógenos de METTL3 resultan cruciales para la homeostasis de la WTAP puesto que el incremento de METTL3 citoplasmático genera un aumento en los niveles de proteína de WTAP al modular la traducción del transcrito de manera independiente a la actividad catalítica de la ARN-metiltransferasa^[15], lo que podría constituir un mecanismo por el cual WTAP es regulado en función de la expresión y presencia de las subunidades METTL3 y METTL14 del metiloma^[15] sirviendo como sustento para las células tumorales (Figura 2B). Otro nexo entre la m⁶A y algunas formas del subtipo de AML megacarioblástica (AMLK) es

RBM15, puesto que la supresión de RBM15, bloquea la diferenciación de células B y células mieloides, así como del proceso de expansión megacariocítica que termina generando plaquetas^[13], indicando que la desregulación de m⁶A puede afectar a la diferenciación hematopoyética^[16] aunque por ahora hacen falta más evidencias experimentales que avalen el papel de RBM15 y m⁶A. Por otro lado, el glioblastoma (GBM) es un tumor que afecta al sistema nervioso central muy agresivo y con un mal pronóstico. Las células madre del glioblastoma (*Glioblastoma stem cells*, GSCs) se caracterizan por ser capaces de autorrenovarse, modificar la heterogeneidad de las células tumorales, por tener la capacidad de generar tumores tras un trasplante y ser resistentes a la mayoría de las terapias^[17,18]. SOX2 es un factor de transcripción esencial para el mantenimiento de la autorrenovación de células madre embrionarias no diferenciadas. Se ha observado que METTL3 se encuentra sobreexpresado en las GSCs^[18]. En las GSCs, METTL3 metila determinadas adenosinas del extremo 3'-UTR del ARN mensajero de SOX2 resultando en la estabilización y acumulación de este, lo que resulta ser crucial para la expresión de genes específicos que permiten el mantenimiento de las GSCs pudiendo en parte constituir la explicación de la alta resistencia de estos tumores a la radioterapia^[18](Figura 2C).

2. El metiloma de la m⁶A, su relación con los micro-ARN y su función reguladora

Los micro-ARN (miARN) son pequeñas secuencias de ARN (~21 nucleótidos) que se generan a partir de un precursor de mayor tamaño (pre-miARN) a través de la acción de la ARN polimerasa II, pudiéndose encontrar codificados en los intrones de genes precursores de ARN tanto codificantes como no codificantes^[19]. La función reguladora de estos pequeños ARNs tiene lugar cuando un miARN encuentra su ARNm diana pudiendo actuar, dependiendo del caso, promoviendo la degradación o parando la traducción del mensajero diana (Figura 3). Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la modificación post-transcripcional m⁶A influye en la maduración de los micro-ARN (miARN)^[20] y su relación con el cáncer al alterar su maduración y/o sus funciones reguladoras.

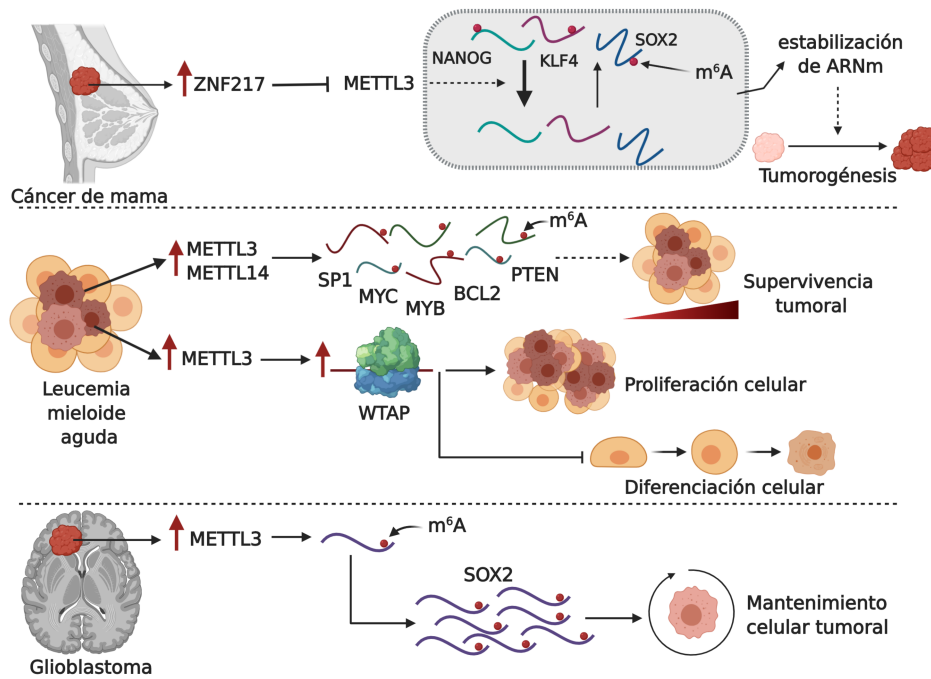


Figura 2. Ilustración del papel regulador de las ARN-metiltransferasas en diferentes tipos de cánceres. A. Durante el cáncer de mama se observa un aumento de la expresión del factor de transcripción ZNF217, el cual es capaz de secuestrar a METTL3 evitando su actividad catalítica en la m⁶A. Esto da lugar a una hipometilación de transcritos codificantes relacionados con la iniciación tumoral y el proceso metastásico, de modo que se promueve la tumorigénesis. B. En la leucemia mieloide aguda, METTL3 y METTL14 se encuentran sobrerrepresentadas. Esto da lugar a la estabilización de transcritos relacionados con el aumento de la supervivencia tumoral. METTL3 citoplasmático es capaz de promover el aumento de los niveles de la proteína WTAP dando lugar a un aumento de la proliferación y la inhibición del proceso de diferenciación celular. C. En el glioblastoma, la sobreexpresión de METTL3 da lugar mediante la adición de m⁶A a la estabilización y acumulación de un transcrita implicado en la expresión de genes específicos para el mantenimiento de GSCs. Imagen diseñada con Biorender.

El cáncer colorrectal engloba a cánceres que se originan en el colon o en el recto, siendo el tumor maligno con mayor incidencia en España según apunta la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Estudios epitranscriptómicos han puesto de manifiesto una alteración de los niveles de m⁶A en estos tejidos tumorales siendo posible relacionar el progreso de la metástasis en el cáncer colorrectal con la alteración de la expresión de METTL3. De este modo se ha comprobado que la sobreexpresión de METTL3 promueve el progreso metastásico mientras que cuando se bloquea la expresión de esta enzima mediante ARN pequeños interferentes se origina el

efecto contrario^[21].

La comparación entre los miARN relacionados y no relacionados con la metástasis identificó a miR1246 como un posible candidato a estar regulado por METTL3. De este modo se ha podido describir que las metilaciones originadas por METTL3 promueven la maduración pre-miR1246 cuyo producto maduro miR1246 inhibe la expresión de SPRED2, un anti-oncogen que regula la vía Raf/MEK/ERK potenciando la metástasis en estos tumores^[21]. De similar manera se han relacionado los miARN con la m⁶A en el carcinoma hepatocelular y el cáncer de mama.

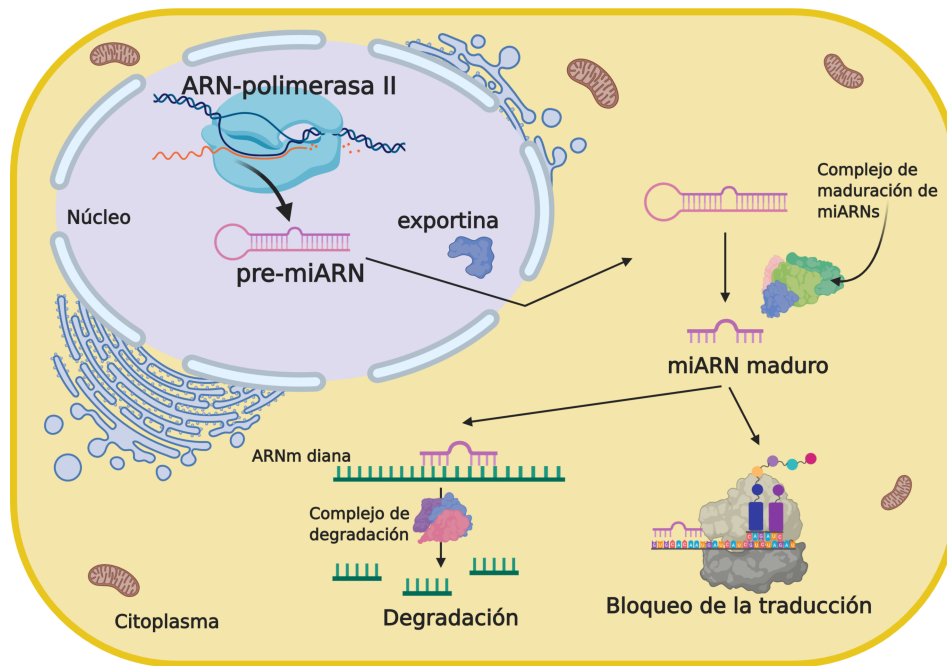


Figura 3. Síntesis de micro-ARN (miARN) a través de su precursor (pre-miARN) transcrito por la ARN-polimerasa II. El miARN una vez procesado por el complejo de maduración de los miARN puede actuar regulando la expresión de sus ARNm dianas promoviendo su degradación o bloqueando su traducción. Imagen diseñada con Biorender.

El carcinoma hepatocelular (*hepatocellular carcinoma*, HCC) es el principal tipo de cáncer primario de hígado presentando la tercera tasa de mortalidad más alta de tumores malignos a nivel mundial y su progresión ha sido relacionada con alteraciones de los niveles de m⁶A donde frecuentemente la proteína METTL3 se encuentra sobreexpresada^[22]. Ello conduce a que un aumento en los niveles de metilación del transcrito del supresor tumoral SOCS2 provoque su degradación favoreciendo la progresión del carcinoma^[21]. Sin embargo, se ha observado que en este tipo de tumores la subexpresión de la proteína METTL14 está relacionada con el proceso de metástasis. Una de las dianas de METTL14 es el precursor de miR126 que es un miARN con actividad precursora de tumores. La metilación de pre-miR126 modula positivamente su maduración, con lo cual una baja expresión de METTL14 provoca una subexpresión de miR126 favoreciendo el desarrollo del proceso metastásico^[22]. De un modo similar, ha sido posible describir que en el cáncer de mama se observa una expresión aberrante de METTL14 en comparación con líneas celulares control, observándose que la sobreexpresión de esta enzima modifica el perfil de expresión de los miARN^[23]. A través del análisis de redes de interacción y del enriquecimiento funcional se observa que las dianas de estos miARN diferencialmente expresados bajo esta condición presentan importantes dianas relacionadas con genes implicados en el proceso del desarrollo tumoral del cáncer

de mama^[23]. Uno de los miARN que se acumulan a casusa de la sobreexpresión de METTL14 en el BC es hsa-miR-146a-5p. Mediante ensayos funcionales se ha relacionado su sobreexpresión con un aumento de la migración celular e invasión en BC^[23]. Esto sugiere que METTL14 puede estar implicado en la modulación del potencial metastásico del BC mediante el papel regulador de los miARN^[23].

3. El metiloma de la m⁶A y su función reguladora independiente a su actividad metiltransferasa

Adicionalmente a la función que presentan las ARN metiltransferasas de manera dependiente a su actividad catalítica en la estabilización del ARN mensajero y la maduración de los miARN también es capaz de actuar de manera independiente a esta. En 2016, Lin y colaboradores^[24] publicaron un artículo en el que se relacionaba la actividad de METTL3 con el cáncer de pulmón, controlando su crecimiento, invasividad y supervivencia, aunque de un modo diferente a la función anteriormente descrita para esta enzima. En el cáncer de pulmón METTL3, al igual que en casos anteriores, presenta altos niveles de expresión y es capaz de asociarse con ribosomas. La supresión de la expresión de METTL3 da lugar a una reducción general de la expresión de proteínas sin cambios significativos en la abundancia de los ARN mensajeros, pero sí altera la formación de

polisomas lo que se ha relacionado con la reducción de la traducción de sus genes diana. Por otro lado, la alta abundancia de esta enzima promueve su capacidad para promover la traducción de determinados oncogenes de manera independiente a su actividad metiltransferasa reclutando e interaccionando con el factor de inicio de la traducción eIF3 del complejo de inicio de la traducción^[24]. De este modo METTL3 no solamente parece intervenir en la regulación del ARN mediante eventos de metilación, sino que también es capaz de realizar una regulación de manera independiente a su actividad catalítica^[24].

4. Conclusiones

El metiloma de la m⁶A en el ARN interviene en procesos de regulación claves entre el proceso de transcripción y de traducción, lo que condiciona el comportamiento celular. La multifactorialidad del cáncer resulta ser mucho mayor de lo que se pensaba puesto que la actividad reguladora de la m⁶A como el efecto de las diferentes enzimas que componen el complejo proteico del metiloma exhiben diferentes efectos celulares dependiendo del tipo celular y tisular que se estudia. Así mismo, esto hace que los esfuerzos en investigación sean cruciales para ahondar en la comprensión de la función reguladora de las proteínas que modifican el ARN y de su compleja regulación, así como los factores que puedan intervenir en el proceso de modificación de manera selectiva y localizada. De este modo, la comprensión de estos factores puede establecer nuevos biomarcadores para el diagnóstico y prognosis e incluso es posible suponer que ello conlleve el descubrimiento de nuevos y prometedores fármacos terapéuticos contra el cáncer tal y como ya ha sido posible gracias a los estudios epigenómicos del cáncer aprobándose el uso terapéutico de inhibidores de ADN-metiltransferasas como la azacitidina o la decitabina^[25].

Referencias

- [1] Nowak M.A. y otros. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Dec 10;99(25):16226-31, 2002.
- [2] Grosjean, H. Fine-tuning of RNA functions by modification and editing. Ed. Henri Grosjean. Vol. 12. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005.
- [3] Feinberg, A. P. y Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301.5895: 89-92, 1983.
- [4] Boccaletto, P., y otros. Existence of Diverse Modifications in Small-RNA Species Composed of 16–28 Nucleotides. *Chemistry—A European Journal*, 24(39), 9949-9956, 2018.
- [5] Lan, M. D y otros. Existence of Diverse Modifications in Small-RNA Species Composed of 16–28 Nucleotides. *Chemistry—A European Journal*, 24(39), 9949-9956, 2018.
- [6] Yang, Y. y otros. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell research*, 28(6), 616-624, 2018
- [7] Cañas R. Una nueva capa de información: epitranscriptómica. *Encuentros en la Biología*, Vol IX | No 166 INVIERNO, 2018.
- [8] Dominissini, D. y otros. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 485(7397), 201-206, 2012.
- [9] Atdjian, C. y otros. Synthesis of SAM-Adenosine Conjugates for the Study of m⁶A-RNA Methyltransferases. *European Journal of Organic Chemistry*, 2018(32), 4411-4425, 2018.
- [10] Chen, X. Y. y otros. The role of m⁶A RNA methylation in human cancer. *Molecular cancer*, 18(1), 103, 2019.
- [11] Sun, T. y otros. The role of m⁶A RNA methylation in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108613, 2019.
- [12] Zhang, C. y otros. Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217-and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(40), 64527, 2016.
- [13] Fatica, A. y otros. N⁶-methyladenosine (m⁶A): a promising new molecular target in acute myeloid leukemia. *Frontiers in oncology*, 9, 251, 2019.
- [14] Liu, Z. X. y otros. Link between m⁶A modification and cancers. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 89, 2018.
- [15] Sorci, M y otros. METTL3 regulates WTAP protein homeostasis. *Cell death & disease*, 9(8), 1-12, 2018.
- [16] Ianniello, Z., & Fatica, A. (2018). N⁶-Methyladenosine Role in Cancer: Learning from AML. Preprint.
- [17] Gimple, R. C. y otros. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes & development*, 33(11-12), 591-609, 2019.
- [18] Visvanathan, A. y otros. Essential role of METTL3-mediated m⁶A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene*, 37(4), 522-533, 2018.
- [19] Bartel, D. P. Metazoan microRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51, 2018.
- [20] Alarcón, C. R., y otros. N⁶-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 519(7544), 482-485, 2015.
- [21] Peng, W. y otros. Upregulated METTL3 promotes metastasis of colorectal Cancer via miR-1246/SPRED2/MAPK signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 393, 2019.
- [22] Ma, J. Z. y otros. METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N⁶-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing. *Hepatology*, 65(2), 529-543, 2017.
- [23] Yi, D. y otros. METTL14 promotes the migration and invasion of breast cancer cells by modulating N⁶ methyladenosine and hsa miR 146a 5p expression. *Oncology Reports*, 43(5), 1375-1386, 2020.
- [24] Lin, S. y otros. The m⁶A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Molecular cell*, 62(3), 335-345, 2016.
- [25] Ahuja, N. y otro. Epigenetic therapeutics: a new weapon in the war against cancer. *Annual review of medicine*, 67, 73-89, 2016. .