# التنميط الجزيئي للإيبيتر انسكربتوم في النسيج البيني خارج الخلايا السرطانية المنفصلة

Student: Mahmood Hassan Dalhat

Student ID: 1902415

Supervisor: Prof. Hani Choudhry

Co-Supervisor: Dr. Mohammad Imran Khan

## المستخلص

**المقدمة والهدف:** Epitranscriptomes هي تعديلات على نسخ RNA (الحمض النووي الريبي) التي تعزز استقلاب الحمض النووي الريبي مثل استقرار RNA ، و الاضمحلال عن طريق الحمض النووي الريبي ، و ربط الحمض النووي الريبي ، وكفاءة الترجمة. تتم إضافة هذه epitranscriptomes إما بواسطة الكُتاب (ميثيل- وأسيتيل ترانسفيرازات) ، أو إزالتها بواسطة المحايات (de-acetylase و demethylase) أو الارتباط بالقراء (بروتينات ربط RNA). و بشكل عام ، يُشار إلى الكُتاب والماحيات والقراء على أنهم منظمات epitranscriptomic. تم الإبلاغ عن مستويات غير معتادة من epitranscriptomes ومنظماتها في أمراض مثل مرض السكري والعدوى البكتيرية والعدوى الفيروسية والسرطان. في السرطان ، ترتبط epitranscriptomes بتكاثر الخلايا ونمو الخلايا والانتقال الظهاري إلى اللحمة المتوسطة للخلايا (EMT) و انتشار السرطان وفي الخلايا الجذعية.

تم الإبلاغ مؤخرًا عن أن الخلايا السرطانية المنفصلة في النسيج البيني خارج الخلية (ECM) تمتلك خصائص نقلية وجذعية، لذلك ، في هذه الدراسة ، تم تحديد منظمات epitranscriptomic في

الخلايا السرطانية المنفصلة خارج الخلية (ECM) ، ومن بين جميع منظمات epitanscriptomic المحددة ؛ تم العثور على N-acetyltransferase 10 (NAT10) مفرط التعبير باستمرار في جميع الخلايا السرطانية المنفصلة في النسيج البيني خارج الخلية (ECM). NAT10 هو عبارة عن ناقل سيتيدين للحمض النووي الريبي (RNA cytidine transferase) الذي يضيف مجموعة أسيتيل في الموضع الرابع للسيتيدين في نسخة RNA بما في ذلك mRNA و tRNA و rRNA مما يؤدي إلى استقرار الحمض النووي الريبي والتكوين الحيوي لـ rRNA وكفاءة الترجمة. في مرض السرطان ، NAT10 يحفز تكاثر الخلايا ونمو الخلايا والانتقال الظهاري إلى اللحمة المتوسطة للخلايا (EMT) يقلق فرص بقاء المرضى على قيد الحياة. استخدمت هذه الدراسة مناهج متعددة الأومكس (multi-omics) مثل الأيض غير المستهدف، وعلم الدهون، وعلم النسخ بالإضافة إلى epitranscriptomics لتحديد الجزيئات الرئيسية بوساطة NAT10 وتحديد المسارات التي يمكن استهدافها للأغراض التشخيصية والعلاجية.

**طرق البحث:** تم إجراء تسلسل الحمض النووي الريبي عالي الإنتاجية ، وتسلسل الترسيب المناعي الحمض النووي الريبي الاستيلي (acRIP-seq) ، وعلم الأيض والدهون غير المستهدفة في الخلايا السرطانية المستنفدة لـ NAT10. علاوة على ذلك ، تم إجراء تحليل وظيفي باستخدام مقياس التدفق الخلوي لموت الخلايا المبرمج ، ودورة الخلية ، وإمكانات غشاء الميتوكوندريا ، وأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) ، ومقايسات ROS الدهنية.

**النتائج:** من خلال التحليل الدهني والأيض ، NAT10 ومثبطاته. وجد ان Remodelin يعدل التمثيل الغذائي للأحماض الدهنية (FA) وأيض الدهون في الميتوكوندريا على التوالي. بالإضافة إلى ذلك ، لوحظ حدوث موت للخلايا (ferroptosis) في الخلايا السرطانية المستنفدة لـ NAT10 وكذلك الخلايا السرطانية التي تم علاجها بواسطة Remodelin. أظهرت بيانات الترنسكريبتوميك

(Transcriptomic) انخفاضًا في تنظيم التمثيل الغذائي للدهون والجينات التنظيمية لموت الخلايا (ferroptosis) مثل ELOVL6 و ACSL1 و ACSL3 و ACSL4 و ACADSB و ACAT1 و GCLC و SLC7A11 و MAP1LC3A و SLC39A8 في الخلايا السرطانية المستنفدة NAT10 والمعالجة بواسطة Remodelin. على الدوام ، أظهرت البيانات epitranscriptomic انخفاضًا في مستويات ac4C على نسخ mRNA للجينات المرتبطة بـFA (ELOVL6 و ACSL1 و ACSL3 و ACSL4) والجينات المرتبطة بموت الخلايا (ferroptosis) ( GCLC، SLC7A11). أكد قياس التدفق الخلوي والتحليل الكيميائي الحيوي وجود دليلًا إضافيًا على تأثير NAT10 على بقاء السرطان وتعديل الدهون من خلال قياس موت الخلايا ودورة الخلية وإمكانات الميتوكوندريا و وأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) وأنشطة مضادات الأكسدة وROS الدهنية وتشكيل قطرات الدهون. بشكل عام وجود نسبة عالية من أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) و ROS الدهنية والميتوكوندريا منزوعة الاستقطاب في الخلايا السرطانية المستنفدة لل NAT10 والمعالجة بواسطة Remodelin مرتبط في زيادة موت الخلايا عن طريق موت الخلايا المبرمج و موت الخلايا (ferroptosis) وتوقف دورة الخلية.

**الخلاصة:** بشكل قاطع ، توفر النتائج رؤى جديدة للدور الحاسم لـ NAT10 كعامل تنظيمي في إعادة برمجة التمثيل الغذائي للدهون وأظهرت فائدة استهداف NAT10 لعلاج السرطان.

## Molecular Profiling of Epitranscriptomes in Extracellular Matrix Detached Cancer Cells

**Student: Mahmood Hassan Dalhat**

**Student ID: 1902415**

**Supervisor: Prof. Hani Choudhry**

**Co-Supervisor: Dr. Mohammad Imran Khan**

# Abstract

**Introduction & Aim:** Epitranscriptomes are modifications on RNA transcripts that promote RNA metabolisms such as RNA stability, RNA-mediated decay, RNA splicing, and translational efficiency. These epitranscriptomes are added either by writers (methyl- and acetyl-transferases), removed by erasers (demethylase and de-acetylase) or bound by readers (RNA binding proteins). Collectively, the writers, erasers, and readers are referred to as epitranscriptomic regulators. Aberrant levels of epitranscriptomes and their regulators have been reported in diseases such as diabetes, bacterial infection, viral infection, and cancer. In cancer, epitranscriptomes are associated with cell proliferation, cell growth, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), metastasis, and stemness.

Extracellular matrix (ECM) detached cancer cells were recently reported to possess metastatic and stemness properties, therefore, in this study epitranscriptomic regulators were profiled in ECM detached cancer cells, and amongst all the profiled epitanscriptomic regulators; N-acetyltransferase 10 (NAT10) was found to be consistently overexpressed in all ECM detached cancer cells. NAT10 is an RNA cytidine transferase that adds an acetyl group at the $4^{th}$ position of cytidine in RNA transcript including mRNA, tRNA, and rRNA resulting in RNA stability, rRNA biogenesis, and translational efficiency. In cancer, NAT10 promotes cell proliferation,

cell growth, EMT, and poor patient survival. This study utilized multi-omics approaches such as untargeted metabolomics, lipidomics, transcriptomics as well as epitranscriptomics to identify NAT10-mediated key molecules and profile pathways that could be targeted for diagnostic and therapeutic purposes.

**Methods:** High-throughput RNA sequencing, acetylated-RNA immunoprecipitation-sequencing (acRIP-seq) and untargeted metabolomics and lipidomics were performed in NAT10 depleted cancer cells. Further, functional analysis using flow cytometer was conducted for apoptosis, cell cycle, mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS), and lipid ROS assays.

**Results:** Through lipidomic and metabolomic analysis, NAT10 and its inhibitor; Remodelin were found to modulate fatty acid (FA) metabolism and mitochondrial lipid metabolism respectively. Additionally, ferroptosis was observed to be induced in NAT10-depleted cancer cells as well as Remodelin treated cancer cells. Transcriptomic data showed downregulation of lipid metabolism and ferroptosis regulatory genes such as *ELOVL6*, *ACSL1*, *ACSL3*, *ACSL4*, *ACADSB*, *ACAT1*, *GCLC*, *SLC7A11*, *MAP1LC3A*, and *SLC39A8* in NAT10 depleted and Remodelin treated cancer cells. Consistently, epitranscriptomic data showed a reduction in ac4C levels on the mRNA transcripts of the FA-related genes (*ELOVL6*, *ACSL1*, *ACSL3*, and *ACSL4*) and ferroptosis-related genes (*GCLC, SLC7A11*). Flow cytometry and biochemical analysis further confirmed evidence on the impact of NAT10 on cancer survival and lipid modulation through measurement of cell death, cell cycle, mitochondrial potential, ROS, antioxidant activities, lipid ROS, and lipid droplet formation. Collectively showing high ROS, lipid ROS and depolarized mitochondria in NAT10 depleted and Remodelin treated cancer cells implicated in elevated cell death via apoptosis and ferroptosis and cell cycle arrest.

**Conclusion:** Conclusively, the results provide novel insights into the critical role of NAT10 as a regulatory factor in lipid metabolic reprogramming and showed the benefit of targeting NAT10 for cancer treatment.