



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

La modificación m<sup>6</sup>A en la regulación del transcrito de AgRP

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
DIEGO FRANCISCO MORELOS LAGUNA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. SELMA ERÉNDIRA AVENDAÑO VÁZQUEZ  
[Instituto Nacional de Medicina Genómica](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ  
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)  
DRA. LORENA AGUILAR ARNAL  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Ciudad de México. octubre, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP**

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACyT [A1-S-38213] y al Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN [09/2019/I y 08/2017/I].

Diego Francisco Morelos Laguna fue becado durante sus estudios de maestría por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), becario # 1049826.

Queremos agradecer el valioso apoyo técnico de la QFB Cristina Aranda Fraustro y al M. en C. Valentín Mendoza Rodríguez.

## **La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP**

### DEDICATORIAS

A mis padres, Oralia y José, por ser mis modelos a seguir, por dedicarse en cuerpo y alma a sus hijos y por el apoyo incondicional que siempre me han dado y me siguen dando para que logre mis metas, y sobre todo por el amor incondicional que a diario me dan y me han enseñado a dar.

A mis hermanos, Ruth y Toté, por acompañarme en la vida, por las risas y los consejos que me dan y por todos esos momentos felices que siempre atesoraré en mis recuerdos.

## **La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP**

### AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a mi tutora, la Dra. Selma Eréndira Avendaño Vázquez, por darme la oportunidad de continuar mi camino en la maestría permitiéndome estar en su laboratorio, porque siempre tuvo la disposición de escucharme e ir más allá del deber de un tutor al preocuparse por mí y sus demás alumnos como si de familia se tratase, y por la gran amistad que pude forjar con ella.

Quiero agradecer a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Lorena Aguilar Amal y la Dra. Alicia González Manjarrez, por sus comentarios, por su guía y su apoyo para que mi desarrollo en el área de la investigación siempre pudiese continuar hacia adelante.

También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, Jesús, Sarah, Nancy y Paula, por la amistad que hemos podido forjar, por su amistad y su apoyo, por sus consejos y su enseñanza.

Quiero darle un especial agradecimiento a mi gran amigo Jesús, quien más allá de un compañero de laboratorio, sin tu guía no habría logrado conseguir aprender todo lo que logré durante mi maestría, pero, sobre todo, por tu incondicional amistad, por tu preocupación y por estar ahí cuando más lo necesité.

Por último, quiero agradecerle a Itzel, tú me has acompañado a lo largo de más de siete años, por haber enfrentado al mundo junto a mí, por tu amor incondicional y porque cada día ser mi inspiración, mi modelo a seguir, la razón por la cual siempre seguiré adelante.

# La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP



CGEP/PMDCBO/79  
79BE06-632284DFDDA92  
Asunto: Jurado de examen

## SINODALES DESIGNADOS

Presente

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **12 de septiembre de 2022**, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias** del/la estudiante **MORELOS LAGUNA DIEGO FRANCISCO**, con la tesis "**La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP**", dirigida por el/la Dr(a). **AVENDAÑO VÁZQUEZ SELMA ERÉNDIRA**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

			ACEPTA	FECHA	FIRMA
SOBERÓN CHÁVEZ GLORIA	PMDCBQ	PRESIDENTE	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	28/09/2022	<i>Gloria Sobrón</i>
REYES TABOADA JOSÉ LUIS	PMDCBQ	SECRETARIO	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	28/09/2022	<i>José Luis Reyes</i>
MIRANDA RÍOS JUAN	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	29/09/2022	<i>Juan Miranda</i>
VALDÉS RODRÍGUEZ VÍCTOR JULIÁN	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	30/09/2022	<i>Victor Valdés</i>
MEZA SOSA KARLA FABIOLA	NO ACREDITADO	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	05/10/2022	<i>Karla Meza</i>

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de septiembre de 2022

Coordinadora  
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Localización anatómica del núcleo arqueado en el encéfalo del ratón.....	2
Figura 2: Representación del circuito de la regulación del apetito y la saciedad de ARC-NPV.....	4
Figura 3: Línea temporal del desarrollo de neuronas AgRP y POMC de ratón .....	5
Figura 4: Esquemización de la modificación química N6-metiladenosina .....	7
Figura 5: Vía de regulación de la modificación m6A .....	10
Figura 6: Modelo de la activación del splicing de MAT2A regulada por METTL16 en respuesta a los niveles de SAM .....	10
Figura 7: Flujo de trabajo y representación gráfica del flujo de trabajo del algoritmo MACS2 para realizar el análisis de peak calling en bibliotecas MeRIP-seq .....	22
Figura 8: Resultados de predicción de posibles sitios de metilación m <sup>6</sup> A en el transcrito completo de AgRP, mediante la herramienta <i>in silico</i> SRAMP .....	24
Figura 9: El transcrito de AgRP está más metilado a las 2 semanas con respecto a 6 semanas en hipotálamo de ratón .....	25
Figura 10: El splicing del transcrito de AgRP se regula epitranscriptómicamente .....	26
Figura 11: Cada marca de m <sup>6</sup> A en el transcrito de AgRP tiene un efecto local sobre el procesamiento de los elementos génicos vecinos .....	32
Figura 12: El transcrito de AgRP se metila y los niveles de metilación son mayores a las 2 semanas que a las 6 semanas .....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Proteínas reguladoras de m<sup>6</sup>A: escritores, lectores y borradores ..... 8

Tabla 2: Conjuntos de datos de MeRIP-seq y RNA-seq de cerebro de ratones utilizados para este trabajo ..... 14

Tabla 3: Preparación de biblioteca y protocolos de secuenciación de los conjuntos de datos de MeRIP-seq y RNA-seq utilizados para este trabajo ..... 15



### GLOSARIO

- 3'UTR = Región no codificante 3'
- 5'UTR = Región no codificante 5'
- AgRP = Péptido relacionado a Agouti
- ALKBH5 = Proteína homóloga a AlkB 5
- ARC = Núcleo arqueado
- CART = Transcrito relacionado a cocaína y anfetamina
- CBLL1 = Ligasa ubiquitín-proteína E3 Hakai
- CCR4-NOT = Represión de catabolitos de carbono-Negativo en TATA-less
- CHIP-seq = Secuenciación profunda de inmunoprecipitación de cromatina
- CPM = Cuentas por millón
- Día E = Día embrionario
- Día P = Día postnatal
- e2 = Exón 2
- e3 = Exón 3
- e4 = Exón 4
- e5 = Exón 5
- eIF3 = Factor iniciador eucariota 3
- EM = Eminencia media
- ESC = Células troncales embrionarias
- F-KO = Knockout de FTO
- f-m<sup>6</sup>A = N<sup>6</sup>-formiladenosina
- FMRP = Proteína de retraso mental de X frágil
- FPKM = Fragmentos por kilobase de transcrito por millón de fragmentos mapeados
- FTO = Proteína asociada a obesidad y grasa corporal
- GABA = Ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- GEO = Gene expression Omnibus
- hESC = Células troncales embrionarias de humano
- h-m<sup>6</sup>A = N<sup>6</sup>-hidroximetiladenosina

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

- HNRNPA2B1 = Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2/B1
- HNRNPC = Ribonucleoproteína nuclear heterogénea C
- i2 = Intrón 2
- i3 = Intrón 3
- i4 = Intrón 4
- IGF2BP1-3 = Proteína de unión al mRNA 1 del factor de crecimiento similar a insulina 2
- iPSC = Células troncales pluripotentes inducidas
- m<sup>6</sup>A = N6-metiladenosina
- m<sup>6</sup>A<sub>m</sub> = N<sup>6</sup>, 2'-O-dimetiladenosina
- m<sup>6</sup>A-seq = Secuenciación profunda de m<sup>6</sup>A
- MAT2 $\alpha$  = Metionina adenosiltransferasa 2A
- MC3R = Receptor de melanocortina 3
- MC4R = Receptor de melanocortina 4
- MeRIP-seq = Secuenciación profunda de inmunoprecipitación de m<sup>6</sup>A de RNA
- mESC = Células troncales embrionarias de ratón
- METTL14 = Tipo metiltransferasa 14
- METTL16 = Tipo metiltransferasa 16
- METTL3 = Tipo metiltransferasa 3
- METTL5 = Tipo metiltransferasa 5
- M-KO = Knockout de METTL3
- mRNA = Ácido ribonucleico mensajero
- NCBI = National center of Biotechnology Information
- Nkx2.1 = Factor de transcripción tiroideo 1/ NK2 homeobox 1
- NPV = Núcleo paraventricular
- NPY = Neuropeptido Y
- NXF1 = Factor de exportación de RNA nuclear 1
- P-bodies = Cuerpos de procesamiento
- POMC = Proopiomelanocortina
- Prdm12 = Proteína con dedos de zinc con dominio PR 12
- Rax = Factor de transcripción homeobox de retina y pliegue anterior

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

- RBM15/15B = Proteína de unión al RNA putativa 15
- RI = Retención de intrón/intrones
- SA = Splicing alternativo
- SAM = S-adenosilmetionina
- SRSF10 = Factor de splicing rico en serina y arginina 10
- SRSF3 = Factor de splicing rico en serina y arginina 3
- TRMT112 = Subunidad activadora de metiltransferasa tRNA 11-2
- **Virma** = Proteína asociada a metiltransferasa m<sup>6</sup>A parecida a vir
- WT = Tipo silvestre
- WTAP = Proteína asociada a WT1
- YTH = Dominio con homología a YT521
- YTHDC1 = Proteína contenedora de dominio YTH 1
- YTHDC2 = Proteína contenedora de dominio YTH 2
- YTHDF1 = Familia de proteínas contendedoras de dominio YTH 1
- YTHDF2 = Familia de proteínas contendedoras de dominio YTH 2
- YTHDF3 = Familia de proteínas contendedoras de dominio YTH 3
- ZC3H13 = Proteína contenedora de dominio CCCH de dedos de Zinc 13
- ZCCH4 = Proteína contenedora de dominio CCHC de dedos de Zinc 4
- $\alpha$ -MSH = Hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$
- $\beta$ -MSH = Hormona estimulante de los melanocitos  $\beta$

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
MARCO TEÓRICO .....	3
HIPOTÁLAMO .....	3
NÚCLEO ARQUEADO .....	3
NEURONAS OREXIGÉNICAS Y ANOREXIGÉNICAS .....	4
REGULACIÓN DEL APETITO MEDIADO POR AGRP Y POMC .....	5
DESARROLLO DE NEURONAS DEL NÚCLEO ARQUEADO.....	6
N6-METILADENOSINA Y LA EPITRANSCRIPTÓMICA.....	9
ANTECEDENTES DIRECTOS .....	18
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS PARTICULARES .....	20
METODOLOGÍA .....	21
Predictor de sitios m <sup>6</sup> A .....	21
Selección de bibliotecas .....	21
Procesamiento de bibliotecas m <sup>6</sup> A-seq .....	22
Identificación de picos m <sup>6</sup> A .....	23
Generación de gráficas de densidad de lecturas .....	24
Generación y obtención de archivos de coordenadas .....	24
RESULTADOS .....	26
La secuencia de AgRP presenta múltiples posibles sitios m <sup>6</sup> A .....	26

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

El transcrito de AgRP posee sitios modificados con m <sup>6</sup> A en bibliotecas MeRIP-seq de hipotálamo de ratón .....	26
El splicing de AgRP se regula epitranscriptómicamente .....	28
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	30
CONCLUSIONES .....	37
REFERENCIAS .....	39

## RESUMEN

El núcleo arqueado de ratón se encuentra en el hipotálamo y es el principal controlador del apetito y el gasto energético del sistema nervioso central. En la etapa adulta está conformado principalmente por dos tipos neuronales: las neuronas POMC/CART y las neuronas NPY/AgRP. Durante el desarrollo del núcleo arqueado, ambas estirpes neuronales provienen de las mismas células progenitoras, y terminan de diferenciarse en etapas postnatales. Los mecanismos que llevan a la completa diferenciación actualmente se están estudiando. Uno de los posibles mecanismos que podría guiar esta diferenciación es la modificación postranscripcional N<sup>6</sup>-metiladenosina (m<sup>6</sup>A), sobre transcritos claves. Esta metilación ha sido vinculada a procesos de diferenciación y maduración neuronal, así como a eventos de splicing alternativo. En el presente trabajo analizamos bibliotecas públicas de MeRIP-seq y RNA-seq y reportamos la influencia que tiene la modificación m<sup>6</sup>A sobre el transcrito de AgRP, el cual da lugar a uno de los principales péptidos orexigénicos (inductores del apetito) del núcleo arqueado. Nuestros análisis muestran que esta modificación postranscripcional puede modular la retención y exclusión de cada uno de los elementos intrónicos y exónicos de este transcrito, modulando su procesamiento y su traducción. Sugerimos que esto puede ser un determinante para la definición de las neuronas orexigénicas.

### INTRODUCCIÓN

El DNA es el reservorio de información genética de cada organismo, donde se almacenan los datos necesarios para la síntesis adecuada de todas las proteínas que son requeridas para un buen funcionamiento de todos los procesos biológicos necesarios para la vida. La información de estas proteínas está almacenada en los genes, y cada gen posee la información para codificar para una proteína en las células eucariotas. En los organismos pluricelulares, como los mamíferos, el organismo está conformado por diferentes organizaciones celulares que dan origen a un tejido u órgano en específico, y estas agrupaciones específicas de células expresan genes específicos o a niveles particulares en patrones exclusivos de ellos. Este control específico de la expresión génica es lo que da origen a los diferentes tejidos y órganos con los que funciona todo el organismo. Hoy en día conocemos múltiples mecanismos que regulan la expresión génica para diferentes tejidos y órganos, entre ellos se encuentran las modificaciones químicas que ocurren en el DNA que no alteran su secuencia de nucleótidos, conocida como epigenética, aunque también se han descrito múltiples mecanismos que regulan la expresión de genes postranscripcionalmente, es decir, después de la transcripción del DNA a mRNA, lo que ha dado pie a la investigación de este último tipo de mecanismos. Entre ellos se han descrito varios cambios químicos que ocurren en el RNA que no alteran a su secuencia de nucleótidos, denominado epitranscriptómica, siendo de estas modificaciones la más común en el mRNA la N<sup>6</sup>-metiladenosina, es decir, la adición de un grupo metilo en el nitrógeno seis de algunas adenosinas presentes en la secuencia del mRNA, también denominada m<sup>6</sup>A. La m<sup>6</sup>A ha sido profundamente estudiada desde hace relativamente poco, y se ha relacionado con múltiples procesos fisiológicos y celulares, como es el neurodesarrollo, la memoria, el aumento o disminución de la expresión de genes específicos, e incluso se han identificado que las alteraciones en el mecanismo de regulación de m<sup>6</sup>A están relacionadas con la severidad de algunos tipos de cáncer y otro tipo de enfermedades crónico-degenerativas, como el Alzheimer.

Por esto mismo, en el presente trabajo analizamos dos bases de datos de MeRIP-seq de cerebro de ratón a diferentes edades y una base de datos de RNA-seq de cerebro de ratón con silenciamiento en METTL3 y FTO para determinar el efecto que tiene la marca m<sup>6</sup>A sobre

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

la maduración de AgRP con respecto al punto tiempo-específico del desarrollo neuronal. Nuestros resultados muestran que efectivamente AgRP está metilado en varios sitios m<sup>6</sup>A, además de que sugieren que estas marcas tienen un patrón y enriquecimiento tiempo-dependiente, y que cada marca de metilación m<sup>6</sup>A puede regular la retención y/o exclusión de los intrones y exones físicamente cercanos.

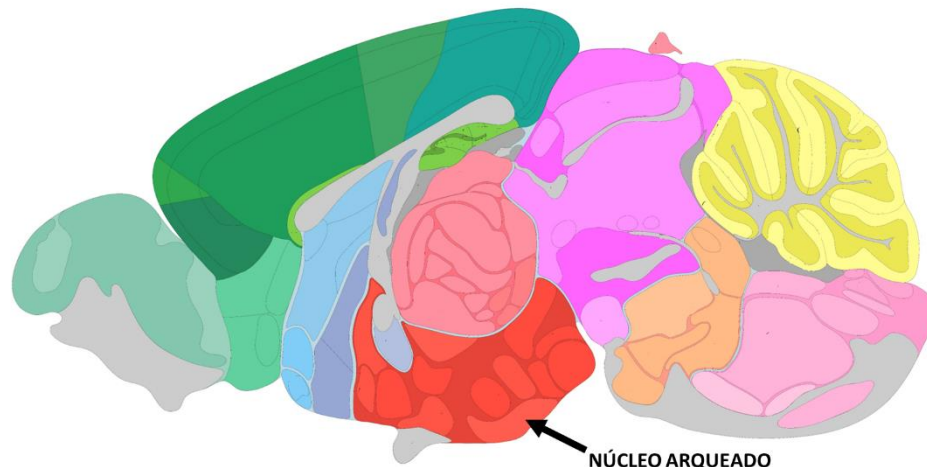
## MARCO TEÓRICO

### HIPOTÁLAMO

El hipotálamo de los mamíferos es uno de los principales centros integradores de una gran variedad de procesos biológicos, como la homeostasis energética (Wang et al., 2016). Está conformado por diversos tipos celulares que coordinan aspectos específicos, como: el metabolismo, el comportamiento, el control del peso corporal, la producción de glucosa hepática, la temperatura corporal, la fisiología autónoma, los ejes neuroendócrinos, la osmolaridad sérica, el ritmo cardíaco, entre otros (Wang et al., 2016). Estas células especializadas en el hipotálamo se encuentran físicamente agrupadas, formando los diversos núcleos hipotalámicos. Entre ellos, el especializado en la regulación del apetito y el consumo energético es el núcleo arqueado (ARC).

### NÚCLEO ARQUEADO

El núcleo arqueado está localizado en la eminencia media del hipotálamo. En esta zona, la barrera hematoencefálica es sumamente delgada, lo que permite que las neuronas del ARC





puedan reconocer hormonas periféricas que reportan el estado energético del organismo, y, en respuesta, secretar neuropéptidos que estimularán a su vez al núcleo paraventricular (NPV), la región medio dorsal, y otras áreas del cerebro que regulan el consumo de alimento y el gasto energético (Wang et al., 2016).

**Figura 1. Localización anatómica del núcleo arqueado en el encéfalo del ratón.** El núcleo arqueado (ARC) se alberga en la base del hipotálamo, justo por encima de la Eminencia media (EM). La barrera hematoencefálica es particularmente delgada en la EM, lo que permite el contacto del ARC y mensajes químicos en el torrente sanguíneo. Figura obtenida y modificada de Allen Mouse Brain Atlas (<http://atlas.brain-map.org/>), y se diseñó con base en Gómez-Montalvo, 2021.

### NEURONAS OREXIGÉNICAS Y ANOREXIGÉNICAS

El ARC está conformado principalmente por dos poblaciones neuronales altamente diferenciadas: (1) las neuronas anorexigénicas (inductoras de la saciedad), las cuales tienen como principal función la inhibición del apetito mediante la acción de los neuropéptidos derivados de proopiomelanocortina (POMC) y del transcrito relacionado a cocaína y anfetaminas (*CART*, por sus siglas en inglés) (; y (2) las neuronas orexigénicas (inductoras del apetito) que, por el contrario, son las responsables de promover el apetito y el comportamiento de forrajeo mediante la síntesis y liberación de neuropéptido Y (NPY) y el neuropéptido parecido a Agouti (*AgRP*, por sus siglas en inglés) (Deem et al., 2021). Es importante resaltar el hecho de que las neuronas anorexigénicas maduras no expresan los neuropéptidos NPY ni AgRP, mientras que las orexigénicas tampoco expresan POMC ni CART, por lo que son nombradas por sus neuropéptidos característicos: neuronas POMC/CART y neuronas NPY/AgRP, respectivamente.

La actividad de estas neuronas se encuentra en un equilibrio dinámico, pero esto cambia cuando aparece algún estímulo que indique un cambio en el estado energético del organismo, como puede ser la liberación de grelina o de leptina (Carranza-Quishque et al., 2016). La grelina y la leptina son hormonas que se sintetizan y secretan en respuesta al estado energético. Cuando se presenta un déficit energético, el estómago libera grelina al sistema circulatorio. Cuando esta hormona alcanza a las neuronas NPY/AgRP, promueve su activación, lo que se traduce en la síntesis y liberación de NPY y AgRP a sus neuronas blanco, lo que desemboca en la estimulación de la búsqueda y consumo de alimento. Por otro lado, cuando el organismo ya se ha alimentado, el tejido adiposo libera leptina. Esta hormona es

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

reconocida por las neuronas POM/CART, lo que estimula la síntesis y liberación de CART y péptidos derivados de POMC ( $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -MSH). Cuando estos neuropéptidos alcanzan a sus neuronas blanco que expresan al receptor de melanocortinas 3 y 4 (MC3R y MC4R) situadas en el núcleo paraventricular, son capaces de inhibir el apetito al fomentar la sensación de saciedad (Figura 2) (Wang et al., 2016).

### REGULACIÓN DEL APETITO MEDIADO POR AGRP Y POMC

Cuando aumentan los niveles de leptina en el torrente sanguíneo, las neuronas anorexigénicas incrementan la síntesis de  $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -MSH. Estas melanocortinas son liberadas en el núcleo paraventricular, específicamente a un conjunto de neuronas que expresan al receptor de melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R, respectivamente). La interacción entre estas melanocortinas y los receptores MC3R y MC4R activa una cascada de señalización que induce la sensación de saciedad. Por otro lado, cuando se activan las neuronas NPY/AgRP, éstas sintetizan y liberan al péptido relacionado a Agouti (AgRP), el cual compite con las melanocortinas para unirse a MC4R y, en menor medida, a MC3R. La unión de AgRP a estos receptores evita que se active su cascada de señalización, e incluso es capaz de disminuir su actividad basal, promoviendo un balance energético positivo, esto se debe a que AgRP es un agonista inverso de estos receptores (Quishpe et al., 2016).

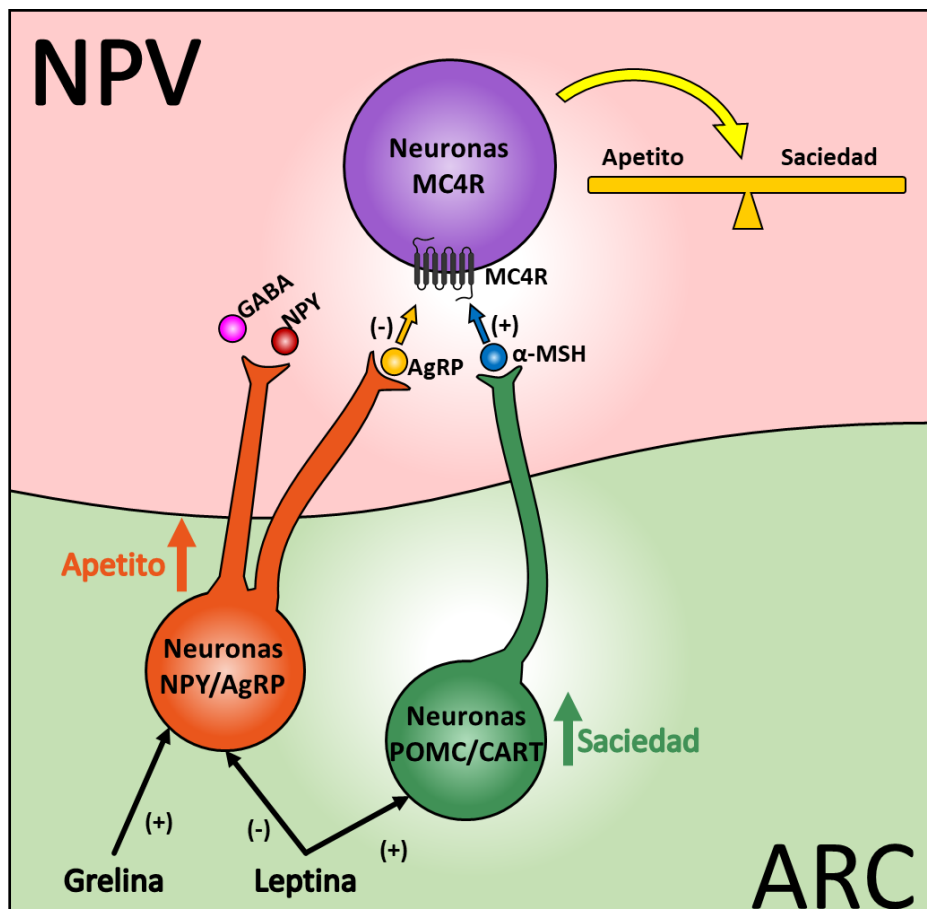


Figura 2. Representación del circuito de la regulación del apetito y la saciedad de ARC-NPV. Las señales periféricas reportan el estado energético del organismo a las neuronas del ARC. La leptina aumenta sus niveles séricos posteriormente al consumo de alimento, lo que estimula a las neuronas POMC/CART; simultáneamente inhibe a las neuronas NPY/AgRP, lo que provoca que las neuronas POMC/CART sintetizen a la melanocortina  $\alpha$ -MSH. La melanocortina es liberada a neuronas con el receptor de melanocortina 4 (MC4R) en el NPV mediante proyecciones axónicas, donde la interacción  $\alpha$ -MSH-MC4R desencadena señales de saciedad. Durante el ayuno aumentan los niveles séricos de grelina, lo que estimula a las neuronas NPY/AgRP provocando la síntesis y liberación de AgRP hacia neuronas con MC4R; donde ejerce su función de agonista inverso de este receptor, previniendo la interacción  $\alpha$ -MSH-MC4R y reprimiendo la señalización basal de esta vía. El diseño de esta figura se basó en Gómez-Montalvo, 2021.

### DESARROLLO DE NEURONAS DEL NÚCLEO ARQUEADO

Si bien las neuronas POMC/CART y las neuronas NPY/AgRP son funcionalmente antagónicas, ambas se originan del mismo progenitor neuronal: las neuronas progenitoras *Rax/Nkx2.1+*. Estos progenitores son los responsables de dar origen a todo el ARC (Nilsson et al., 2005). En ratón, a partir del día embrionario 10.5 (E10.5), estos progenitores comienzan a expresar al transcrito de POMC. Es hasta el día E15.5 cuando el transcrito de NPY es detectable, aunque no ocurre así con AgRP. De hecho, el transcrito de AgRP es el último en

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

ser detectable, pues su mRNA solo ha podido ser detectado a partir del día postnatal 0 (P0), aunque sus niveles son extremadamente bajos, aumentando a lo largo que transcurren los siguientes días, hasta alcanzar sus niveles de expresión maduros en el día P21 (Padilla et al., 2010).

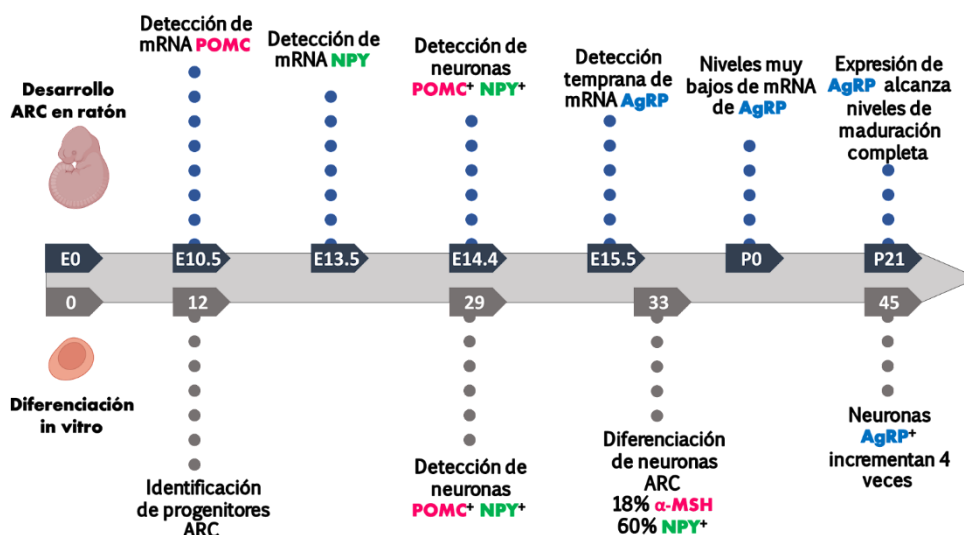


Figura 3. Línea temporal del desarrollo de neuronas AgRP y POMC de ratón y de la diferenciación de células madre embrionarias (hESC) y células pluripotenciales inducidas (iPSC) a células de núcleo arqueado (ARC). En el desarrollo del hipotálamo de ratón, las identidades peptidérgicas de las neuronas POMC y AgRP se establecen en diferentes puntos temporales. Mientras que el mRNA de POMC es detectado a partir del día E10.5, el mRNA de NPY aparece hasta el día E13.5. El mensajero de AgRP es el último en ser expresado, pues aparece hasta el día E15.5, pero no es hasta el día P21 cuando su mRNA alcanza sus niveles de madurez. Durante esta diferenciación neuronal, se observa un interesante evento, en el cual las neuronas coexpresan los mRNAs de POMC y NPY durante el día E14.5, y posteriormente un conjunto de estas neuronas adquirirá la identidad NPY/AgRP. Por otro lado, la diferenciación *in vitro* muestra que entre los días 12 y 24, las hESC e iPSC expresan los primeros marcadores de progenitores ARC. Aproximadamente, en el día 29 se pueden identificar a los péptidos de POMC y NPY en poblaciones que solo expresen a uno de estos dos, o a ambos simultáneamente. Alrededor del día 33 de diferenciación, ~18% de las células solo expresan a  $\alpha$ -MSH, mientras que ~60% solo expresa a NPY, pero ~22% coexpresa ambos péptidos; no obstante, los niveles del péptido de AgRP apenas son detectables. Cerca del día 45, los niveles de AgRP aumentan cerca de cuatro veces, pero las células siguen presentando identidades POMC/CART y NPY/AgRP mezcladas. Figura tomada y modificada de Gómez Montalvo, 2021; Coronado Monroy, 2020.

Una particularidad de la diferenciación de estas dos estirpes neuronales es que los progenitores *Rax*/*Nkx2.1* primero expresan el mRNA de POMC, y, gradualmente, también el mRNA de NPY, por lo que, en un momento del neurodesarrollo del núcleo arqueado, existe una población de neuronas que expresa transcritos de ambas estirpes neuronales. Posteriormente, llega un punto en la diferenciación en el cual un conjunto de estas células se diferencia al tipo anorexigénico, y otro al orexigénico (Chen et al., 2020). No obstante, no hay

## **La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP**

suficiente información para comprender los mecanismos por los cuales se define el destino final de diferenciación de estas neuronas. Recientemente, Chen y col (2020) analizaron si existen diferencias entre los perfiles transcriptómicos de las neuronas que se convertirán en el tipo anorexigénico y las que se convertirán en el tipo orexigénico del ARC, mostrando que efectivamente hay diferencias, ya que encontraron que hay 29 factores de transcripción que están enriquecidos en uno de los dos grupos neuronales, con la principal diferencia de la expresión de Prdm12, el cual fue detectado en las neuronas con destino POC/CART, pero fue indetectable en las destinadas al tipo NPY/AgRP. Prdm12 es un factor de transcripción relacionado con la percepción del dolor y con la especificación del destino celular en el desarrollo de los ganglios sensoriales (Mona et al., 2017) y recientemente se ha relacionado con la especificación del destino celular de las neuronas POMC/CART del núcleo arqueado (Chen et al., 2020; Mona et al., 2017; Bartesaghi et al., 2019). Con esto, el grupo de investigación de Chen ofrece una pista importante de la existencia de diversos genes que definen el destino final de estas neuronas, el crecimiento axonal y la formación de la sinapsis, y proponen que los mecanismos para definir y mantener esta diferenciación son factores intrínsecos, es decir, factores internos de las células, como la expresión o represión programada de conjuntos específicos de genes en lugar de estímulos externos (Chen et al., 2020).

Actualmente, los avances técnicos en secuenciación y caracterización de células mediante su transcriptoma han permitido profundizar en el conocimiento que se tiene sobre las neuronas que componen al núcleo arqueado, como su función y su proceso de maduración; sin embargo, aún existen importantes desafíos que han dificultado responder las incógnitas sobre el destino final de estas neuronas. Limitaciones técnicas como la compleja labor de obtener con certeza el núcleo arqueado de ratones en estados embrionario o neonatales, la falta de una línea celular establecida de alguna de las dos poblaciones de neuronas del ARC, y el poco estudio de más procesos de regulación génica a diferentes niveles, son solo algunos de los desafíos que deben superarse para lograr un mejor entendimiento del desarrollo y funcionamiento de este núcleo hipotalámico. Recientemente se han explorado procesos celulares que podrían estar facilitando la resolución hacia la completa diferenciación de las

estirpes neuronales, uno de los que han llamado más la atención es la metilación de las adenosinas del mRNA (Geula et al., 2016).

### N6-METILADENOSINA Y LA EPITRANSCRIPTÓMICA

LA N6-metiladenosina ( $m^6A$ ) es una modificación del RNA altamente conservada, que se encuentra desde levaduras hasta mamíferos, como el ratón y el humano. Se ha encontrado en mayor abundancia cerca de los codones de paro, en las regiones 3'UTR, en los exones largos y en transcritos con splicing alternativo (SA) (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012). Esta modificación postranscripcional fue descrita por primera vez por Brown y Attardi en 1965 en diversos tipos de RNA, pero no fue hasta el 2012 cuando se demostró que es la modificación epitranscriptómica más común en los mRNA de transcritos humanos y ratón, encontrándose con mayor presencia en tejidos específicos, como el hígado, el riñón y el cerebro (Meyer et al., 2012).

Recientemente, se ha descubierto que la  $m^6A$  es un nuevo nivel de regulación de la expresión génica, ya que influye en el metabolismo del mRNA. Es capaz de acelerar el procesamiento, la traducción, la degradación, el transporte, y la localización de los mRNAs (Meyer et al., 2017).

Debido a que la modificación  $m^6A$  es un fenómeno dinámico capaz de regular el metabolismo de los mRNAs metilados, se puede considerar como un «interruptor». Dicho interruptor es controlado por tres tipos de proteínas: los escritores, los lectores y los borradores (Galarce-Sosa, 2020).

## La modificación m<sup>6</sup>A en la regulación del transcrito de AgRP

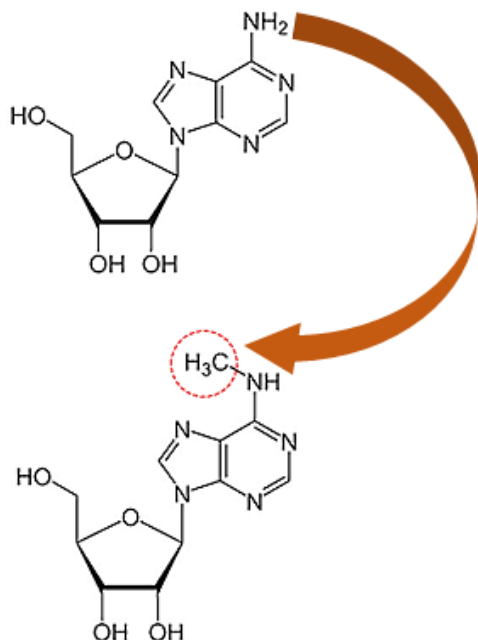


Figura 4. Esquemización de la modificación química N<sup>6</sup>-metiladenosina.

Los escritores son metiltransferasas que utilizan como sustrato donador a la S-adenosilmetionina (SAM) para transferir un grupo metilo a un residuo de adenosina situado en el RNA. Hasta ahora, se han caracterizado como escritores a METTL3, METTL14, METTL16, WTAP, RBM15/15B y KIAA1429. Se ha identificado al complejo escritor de m<sup>6</sup>A, conformado por varios escritores y otras moléculas, entre los más importantes se encuentran METTL3 y METTL14, la porción catalítica y el activador alostérico, respectivamente. Además, METTL14 tiene función de unión al RNA objetivo (Wang et al., 2016; Liu et al., 2014). El complejo escritor de m<sup>6</sup>A es el actor principal responsable de la mayoría de las modificaciones m<sup>6</sup>A en los transcritos (Fig. X); no obstante, existen otros escritores ajenos al complejo escritor que son capaces de actuar en condiciones particulares. Tal es el caso de METTL16, una metiltransferasa cuya unión a su mRNA blanco, el transcrito de adenosiltransferasa II  $\alpha$  (MAT2 $\alpha$ ), es dependiente de la biodisponibilidad del sustrato SAM. MAT2 $\alpha$  codifica a la enzima responsable de la biosíntesis de SAM cuando los niveles intracelulares de este sustrato donador de grupos metil disminuyen. Este escritor se une al extremo 3'UTR del transcrito de MAT2 $\alpha$  y cataliza la adición de la m<sup>6</sup>A para luego separarse del transcrito para metilar al siguiente. Esta metilación tiene como resultado la retención de sus intrones (RI), lo que provoca la degradación del transcrito; no obstante, cuando no hay suficiente sustrato

## La modificación m<sup>6</sup>A en la regulación del transcrito de AgRP

donador (SAM) en el medio intracelular, METTL16 es incapaz de metilar al transcrito de MAT2 $\alpha$ , lo que provoca que se mantenga unida al transcrito. Este evento dispara el procesamiento del transcrito a un mRNA maduro, lo que resulta en su traducción y la biosíntesis de SAM (Pendleton et al., 2017).

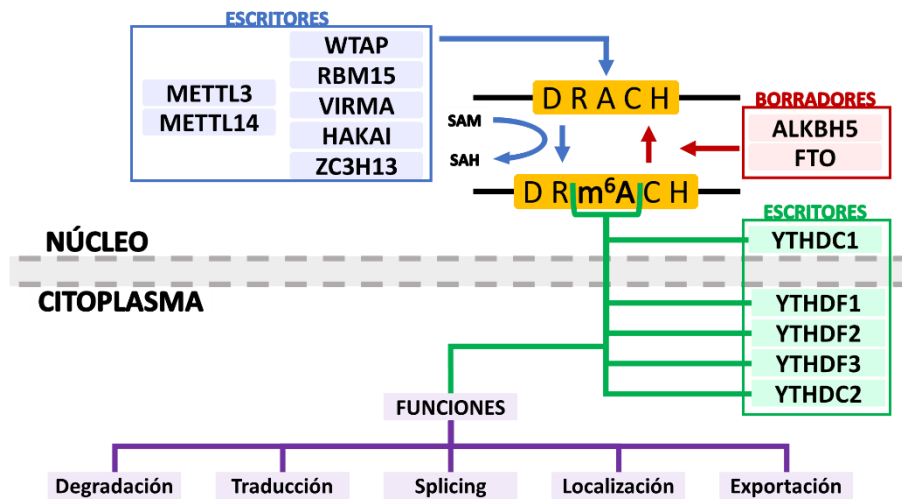


Figura 5. Vía de regulación de la modificación m<sup>6</sup>A. Representación esquemática de los componentes principales conocidos de la maquinaria reguladora de la modificación m<sup>6</sup>A. En azul se encuentran los escritores que conforman al complejo escritor m<sup>6</sup>A, el principal responsable de la mayoría de las modificaciones m<sup>6</sup>A en los motivos DRACH presentes en el RNA. En rojo se encuentran los borradores FTO y ALKBH5, las desmetilasas responsables de revertir la modificación m<sup>6</sup>A en el RNA. En verde se encuentran los lectores con dominio YTH que reconocen al motivo DRACH que contiene m<sup>6</sup>A y son proteínas de unión al RNA que ejecutan las funciones reguladoras relacionadas a la metilación m<sup>6</sup>A. Imagen tomada y modificada de Batista, 2017.

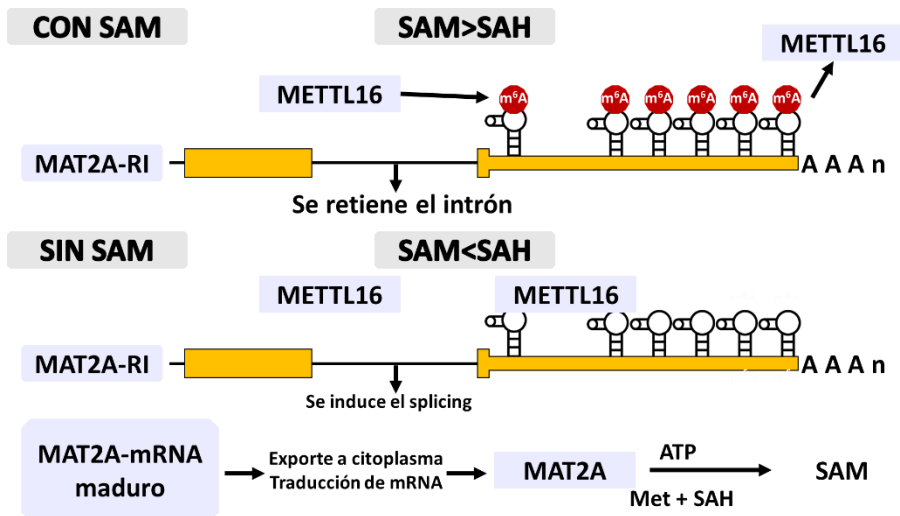




Figura 6. Modelo de la activación del splicing de MAT2A regulada por METTL16 en respuesta a los niveles de SAM intracelulares. La ocupación de METTL16 en el primer hairpin controla la producción de SAM mediante la inducción del plicing del intrón retenido en MAT2A en condiciones de SAM limitada. Cuando la SAM está disponible, METTL16 se une al primer hairpin del 3'UTR del transcrito de MAT2A, lo metila e inmediatamente se disocia. Aunque ocurre un splicing basal limitado, el corto tiempo que pasa METTL16 unido al transcrito no es suficiente para inducir el splicing de manera robusta. El transcrito de MAT2A que retiene a su intrón es degradado mediante NMD (non-sense mediated decay). En condiciones de SAM limitado, METTL16 se une al primer hairpin, pero no se disocia debido a la falta de un donador de grupos metil. La ocupación incrementada resultante de la metiltransferasa estimula el splicing del intrón retenido de MAT2A, lo que promueve la maduración del mRNA, su exportación y su traducción. Esto provoca que la proteína codificada por MAT2A se traduzca y aumente los niveles intracelulares de SAM. *Imagen tomada y modificada de Pendleton et al., 2017.*

Los lectores son proteínas de unión al RNA que son capaces de reconocer de manera específica a las regiones m<sup>6</sup>A modificadas en el RNA, lo que les permite unirse gracias a su dominio YTH para ejercer sus funciones (Stoilov et al., 2002). En mamíferos se han descrito cinco lectores con dominio YTH, los cuales se pueden dividir en tres categorías: (1) YTHDC1, el cual se encuentra ampliamente expresado, se localiza en el núcleo y está principalmente involucrado en procesos de splicing alternativo, ya que puede promover la unión del factor de splicing SRSF3 al transcrito metilado para favorecer la inclusión exónica y prevenir la unión de SRSF10 al transcrito metilado para evitar la exclusión exónica (Xiao et al., 2016 ); (2) YTHDC2, el cual se expresa solo en algunos tejidos, se puede localizar en el núcleo y en el citoplasma, y puede promover tanto la traducción como la degradación de los transcritos metilados (Kretschmer et al., 2018; Jain et al., 2018; Hsu et al., 2017); y (3) YTHDF, conformado por tres parálogos proteicos (YTHDF1, YTHDF2 y YTHDF3) con una similitud muy alta en sus secuencias de aminoácidos, los lectores de esta categoría se localizan en el citoplasma (Wang et al., 2013; Wang et al., 2015; Du et al., 2016; Shi et al., 2017). Mientras que YTHDF2 puede promover la degradación de los transcritos metilados a los que se une mediante el transporte a los cuerpos de procesamiento y el reclutamiento del complejo CCR4-NOT, el cual promueve la deadenilación y degradación de los mRNAs metilados; YTHDF1 puede promover la traducción cap-independiente mediante el reclutamiento del factor de traducción eIF3, asimismo, YTHDF3 puede facilitar que los transcritos metilados se unan a YTHDF1 para facilitar su traducción (Wang et al., 2015; Shi et al., 2017). Recientemente se ha publicado un trabajo el cual se inclina hacia una función diferente de los miembros de la familia YTHDF, en el cual se propone que algunos artefactos metodológicos presentados en trabajos anteriores generaron ideas erróneas de la función de estos lectores, y que realmente

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

esta familia de proteínas solo tiene la función de promover la degradación de los transcritos con marcas m<sup>6</sup>A (Zaccara y Jaffrey, 2020).

Tabla 1. Proteínas reguladoras de m<sup>6</sup>A: escritores, lectores y borradores. Modificada de Lv et al., 2021.

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

Tipo de regulador	Nombre de proteína	Localización celular	Efecto sobre la metilación de RNA y su mecanismo	Referencia
<b>Escritor</b>	METTL3	Núcleo y citoplasma	Metiltransferasa principal que instala residuos m6A en mRNAs y lncRNAs en eucariotas	Lin et al., 2019
	METTL5		Regula la modificación m6A del rRNA 18S humano con la activación de TRMT112	van Tran et al., 2019; Ignatova et al., 2020
	METTL14	Núcleo y citoplasma	Forma heterodímero estable con METTL3 y mejora la actividad de metilación de METTL3	
	WTAP	Núcleo	Cambia el patrón de splicing alternativo en el mRNA; forma parte del complejo escritor y mejora la actividad del heterodímero METTL3-METTL14.	Ping et al., 2014; Liu et al., 2014
	TRMT112		Forma heterodímero estable con METTL5 y mejora la actividad de metilación de METTL5	van Tran et al., 2019; Ignatova et al., 2020
	VIRMA/KIAA1429		Ensambla los componentes del núcleo del complejo escritor mediante su N-terminal	Yue et al., 2018
	RBM15/15b		Regula la modificación m6A de lncRNA-XIST	Patil et al., 2016
	ZCCH4		Regula la modificación m6A del rRNA 28S humano	Ma H. et al., 2019; Ren et al., 2019; Pinto et al., 2020
	ZC3H13	Núcleo	Promueve la función catalítica de WTAP y MTC, que son retenidos en motas de splicing al interactuar mediante su dominio de baja complejidad (LC)	Knuckles et al., 2018; Wen et al., 2018
	CBLL1	Núcleo	Apoya la activación de WTAP mediante la formación de interacciones estables	Figuroa et al., 2009
<b>Borrador</b>	FTO	Principalmente en el núcleo	Remueve m6A del mRNA y m1A de tRNA mediante su C-terminal	Jia et al., 2011
	ALKBH5	Principalmente en el núcleo	Remueve m6A del mRNA	Zheng et al., 2013
<b>Lector</b>	YTHDC1	Núcleo	Estimula el splicing y la exportación del mRNA (unión directa a m6A); reduce la síntesis de rRNA	Roundtree and He, 2016; Roundtree et al., 2017; Chen et al., 2021
	YTHDC2	Núcleo y citoplasma	Estimula la traducción y la degradación del mRNA (unión directa a m6A)	Hsu et al., 2017; Wojtas et al., 2017
	YTHDF1	Citoplasma	Estimula la traducción del mRNA (unión directa a m6A)	Wang et al., 2015
	YTHDF2	Citoplasma	Estimula la traducción y degradación del mRNA (unión directa a m6A)	Wang et al., 2014
	YTHDF3	Citoplasma	Estimula la traducción y degradación del mRNA (unión directa a m6A)	Li A. et al., 2017; Shi et al., 2017
	HNRNPA2B1	Núcleo	Regula el procesamiento de miRNAs m6A-dependiente y puede afectar al splicing (unión regulada por cambios estructurales m6A-dependientes)	Alarcón et al., 2015
	HNRNPC	Núcleo	Afecta al splicing del mRNA (unión regulada por cambios estructurales m6A-dependientes)	Liu et al., 2015
	IGF2BP1-3	Núcleo y citoplasma	Incrementa la estabilidad del mRNA (unión regulada por cambios estructurales m6A-dependientes)	Huang et al., 2018
	FMRP	Núcleo y citoplasma	Mantiene directa o indirectamente la estabilidad del mRNA metilado al unirse directamente a YTHDF2 (unión bona fide a proteínas de unión a m6A)	Edupuganti et al., 2017; Huang et al., 2018

## La modificación m<sup>6</sup>A en la regulación del transcrito de AgRP

Los borradores son enzimas desmetilasas especializadas en remover las marcas m<sup>6</sup>A del mRNA. Hasta la fecha, se han descritos dos borradores: (1) FTO (Wei et al., 2018) y (2) ALKBH5 (Zheng et al., 2013). Ambas desmetilasas pertenecen a la familia de Alkb de dioxigenasas dependientes de alfa-cetoglutarato/Fe(II), y realizan una desmetilación oxidativa utilizando RNA de cadena sencilla como sustrato (López-Pérez et al., 2021). FTO fue la primera desmetilasa identificada para catalizar a m<sup>6</sup>A en el RNA. FTO se expresa principalmente en el cerebro y el tejido adiposo. Su función como desmetilasa provoca una reacción de oxidación que genera que m<sup>6</sup>A forme a los intermediarios N6-hidroxi-metiladenosina (h-m<sup>6</sup>A) y n6-formiladenosina (f-m<sup>6</sup>A). Estos intermediarios poseen una vida media muy corta para finalmente convertirse en una adenosina regular (Fu et al., 2013). ALKBH5 fue la segunda desmetilasa identificada específicamente para desmetilar m<sup>6</sup>A, la cual tiene un mecanismo enzimático similar a FTO; no obstante, mientras que FTO puede catalizar tanto la desmetilación de m<sup>6</sup>A como de m<sup>6</sup>A<sub>m</sub>, ALKBH5 desmetila exclusivamente a la m<sup>6</sup>A en el RNA. Otra gran diferencia que existe entre estas dos desmetilasas es que ALKBH5 se expresa en tejido testicular, a diferencia de FTO, que tiene mayor expresión en el cerebro y el tejido adiposo (Ji et al., 2018).

Es importante destacar que hay estudios que proponen a ALKBH5 como el principal borrador de m<sup>6</sup>A, incluso descartan a FTO como un borrador de m<sup>6</sup>A, pues los resultados de estos estudios señalan que FTO no tiene afinidad por la modificación m<sup>6</sup>A presente en los mRNAs, sino por la modificación m<sup>6</sup>Am presente en los snRNAs (Koh et al., 2019; Mauer et al., 2019).

Una gran cantidad de trabajos han mostrado que cerca del 90% de los sitios m<sup>6</sup>A en los mRNAs ocurren dentro de una secuencia en particular, la cual se ha descrito como DRACH (D = A, G o U; R = A o G; H = A, C o U) (Jiang et al., 2021). Esta secuencia es reconocida por el complejo escritor (Meyer et al., 2014); sin embargo, aunque pueden existir varias adenosinas metiladas en un mismo mRNA, son pocas las secuencias DRACH que realmente se modifican, pues existen más factores que influyen en el destino de metilación de las adenosinas. Un claro ejemplo de esto es que se ha encontrado que aproximadamente el 70% de los sitios m<sup>6</sup>A coinciden con regiones cercanas a histonas trimetiladas en Lys36 (Ru et al., 2020; Huang et al., 2019). Esta modificación epigenética recluta al complejo escritor, el cual se acopla a la RNA polimerasa II para poder realizar modificaciones m<sup>6</sup>A sobre el mRNA

naciente de manera cotranscripcional (Huang et al., 2019). Otro factor que influye en la deposición de un grupo metilo a las adenosinas son los factores de transcripción, ya que algunos pueden reclutar escritores o borradores de m<sup>6</sup>A (Song et al., 2019; Bertelo et al., 2018).

A nivel fisiológico, la modificación m<sup>6</sup>A es importante para un correcto desarrollo embrionario, pues, aunque sus niveles son bajos durante la embriogénesis, se ha descubierto que es fundamental para la correcta maduración neuronal (Dominissini et al., 2012; Batista et al., 2014). Un trabajo publicado por el grupo de Shafik (2021) mostró el aumento de la metilación m<sup>6</sup>A tejido específico en tejido hipotalámico de ratones en diferentes edades postnatales. Cabe destacar que los transcritos hipotalámicos metilados eran en su mayoría de genes involucrados en el desarrollo hipotalámico.

Diversos trabajos han demostrado que el silenciamiento parcial o total de METTL3 y METTL14 afectan de manera significativa el correcto desarrollo y maduración neuronal durante la embriogénesis. Por ejemplo, el silenciamiento parcial de METTL3 en células madre embrionarias de ratón y humano disminuye los niveles de m<sup>6</sup>A, lo que resulta en un grave deterioro en la transición de las neuronas de la autorrenovación a la diferenciación; mientras que el silenciamiento total de esta metiltransferasa resulta en un fenotipo letal, ya que en las ESC naïve y en epiblasto preimplantado causa un inicio de linaje celular aberrante en la etapa postimplantación, lo que conlleva a letalidad embrionaria temprana (Geula et al., 2015). Por otro lado, el silenciamiento de METTL14 en células madre neuronales embrionarias de ratón, provoca la pérdida prematura de las células del reservorio de neuronas madre, debido a que la diferenciación de estos progenitores ocurre de forma prematura y disminuye su proliferación (Yoon et al., 2017), además que los embriones METTL14<sup>-/-</sup> mueren o son reabsorbidos al día E9.5 (Wang et al., 2019). Esta evidencia resalta la importancia de la modificación m<sup>6</sup>A como un factor fundamental en el apropiado desarrollo de los tejidos cerebrales, aunque aún faltan estudios más profundos para poder comprender de manera concreta los mecanismos por los cuales m<sup>6</sup>A cumple sus funciones en el neurodesarrollo.

La modificación m<sup>6</sup>A tiene una significativa influencia sobre el metabolismo de los mRNAs, incluyendo el splicing y el splicing alternativo (SA). La metilación m<sup>6</sup>A puede promover la maduración de los mRNAs, aunque también es capaz de promover eventos de SA. Se han

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

identificado mecanismos por los cuales los lectores m<sup>6</sup>A, como YTHDC1, pueden promover el splicing o el SA, aunque todavía se requieren de más estudios para conocer a mayor profundidad todos los mecanismos por los cuales la m<sup>6</sup>A puede controlar el procesamiento del mRNA.

El estudio de la modificación m<sup>6</sup>A ha resultado particularmente desafiante, en comparación con otras modificaciones epitranscriptómicas, ya que esta metilación no es susceptible a cambios por reacciones químicas, como lo son otras. Para poder abordar su estudio en todo el transcriptoma y conocer su posición en cada transcrito, se desarrolló una técnica en la cual el RNA es fragmentado e inmunoprecipitado con anticuerpos anti-m<sup>6</sup>A, para luego ser secuenciado con tecnologías de NGS (Next gen sequencing). Esta técnica es conocida como m<sup>6</sup>A-seq o meRIP-seq, la cual fue desarrollada en 2012 (Meyer et al., 2012). Gracias a esta técnica, se han podido estudiar diversos procesos en los que la m<sup>6</sup>A está directa o indirectamente relacionada, además de que se han podido identificar mRNAs metilados que están relacionados a importantes vías biológicas. Esta técnica ha sido implementada ampliamente ya que nos permite evaluar las diferencias de enriquecimiento de distintos sitios m<sup>6</sup>A en todo el transcriptoma bajo diferentes condiciones y/o tratamientos, además que nos permite ver esto mismo en un solo transcrito bajo diferentes criterios. Hoy en día se han desarrollado más aproximaciones para evaluar y estudiar la modificación m<sup>6</sup>A, no obstante, la técnica de meRIP-seq sigue siendo una de las más utilizadas, por lo que hay muchos trabajos que se han dedicado a mejorarla para ser cada vez más precisa y eliminar el alto grado de falsos positivos que en un principio presentó esta técnica debido a la inespecificidad que llegan a presentar los anticuerpos comerciales (Anreiter et al., 2021).

### ANTECEDENTES DIRECTOS

Una herramienta que podría resultar sumamente útil para poder estudiar los mecanismos moleculares que rigen la diferenciación de las neuronas del ARC y regulan la expresión de sus neuropéptidos característicos es un modelo celular de las dos poblaciones neuronales del ARC: POMC/CART y AgRP/NPY. En nuestro grupo de trabajo, buscamos generar estos modelos celulares a partir de una línea celular de ARC de ratón. Para ello, generamos múltiples clonas a partir de células únicas para poder tener cultivos que solo presentaran células POMC/CART o AgRP/NPY. Sin embargo, al momento de caracterizar las clonas mediante sus transcritos, observamos que en todas se encontraba el transcrito maduro de POMC y de CART, pero también encontramos un transcrito de AgRP que retiene dos intrones. Cuando analizamos la presencia de los neuropéptidos mediante Western blot, AgRP no fue detectable, mientras que POMC y CART sí lo fueron. Esto no fue solo un artefacto de la línea celular, ya que también lo observamos en el ARC de ratones postnatales de 7 días (P7), aunque en ratones adultos, sólo observamos al transcrito de AgRP maduro (Coronado-Monroy, 2020). Este descubrimiento abrió nuevas interrogantes: ¿por qué hay neuronas que tienen los transcritos POMC, CART y AgRP?; ¿cuál es el mecanismo molecular que regula la retención de estos intrones en el transcrito de AgRP y qué función tiene esta retención de intrones?

La importancia que tiene la m<sup>6</sup>A sobre el metabolismo de los transcritos blancos, su papel esencial para el neurodesarrollo, su regulación dinámica dada por los escritores y borradores durante diferentes estímulos y eventos dependientes del tiempo y sus altos niveles durante el desarrollo hipotalámico, permiten considerar que podría ser que la modificación epitranscriptómica N6-metiladenosina (m<sup>6</sup>A) es capaz de regular la expresión génica de AgRP. Los mRNAs metilados de esta manera son reconocidos por lectores de m<sup>6</sup>A, y promover el splicing alternativo (AS).

Se ha corroborado que el silenciamiento de METTL3 en células troncales embrionarias (CTE) y cuerpos embrionarios (CE) provoca la depleción casi completa de la metilación m<sup>6</sup>A en los mRNAs, lo que evita que los procesos de diferenciación den inicio, lo que hace que estas células muestren un fenotipo pluripotencial "híper naïve". Además de esto, la depleción de m<sup>6</sup>A en los mRNAs debido al silenciamiento de METTL3 en estas células provoca eventos

## **La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP**

aberrantes de splicing alternativo, entre los más destacados se encuentra el aumento de eventos de retención de intrones en los mRNAs, por lo que estos resultados sugieren que la metilación m<sup>6</sup>A está íntimamente vinculada a la fina regulación del splicing y del splicing alternativo (Geula et al., 2015).

Esta información nos hace preguntarnos si podrá ser que la metilación m<sup>6</sup>A esté regulando la expresión génica de AgRP mediante la retención de sus intrones.



### HIPÓTESIS

La modificación postranscripcional m<sup>6</sup>A en su transcrito regula la expresión de AgRP en el núcleo arqueado de ratón.

### OBJETIVO GENERAL

Determinar si el transcrito de AgRP presenta modificaciones m<sup>6</sup>A y si éstas modulan su procesamiento y traducción en ratón.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar la existencia de posibles sitios m<sup>6</sup>A en el transcrito de AgRP de ratón mediante herramientas *in silico*.
- 2) Buscar la presencia de transcritos de AgRP metilados (m<sup>6</sup>A) en bibliotecas de m<sup>6</sup>A-seq disponibles en bases de datos públicas de *Mus musculus*.
- 3) Buscar cambios de metilación m<sup>6</sup>A en el transcrito de AgRP en condiciones de silenciamiento de FTO y MET TL3 en bases de datos públicas de *Mus musculus*.
- 4) Analizar el estatus de maduración y traducción de los transcritos de AgRP en *Mus musculus*.

### METODOLOGÍA

#### Predictor de sitios m<sup>6</sup>A

Para determinar potenciales sitios m<sup>6</sup>A, se empleó la herramienta SRAMP (*sequence-based RNA adenosine methylation site predictor*) (Zhou et al., 2016). SRAMP toma una secuencia en formato FASTA de una secuencia de DNA o de RNA y la compara con mapas de sitios m<sup>6</sup>A de 1 nucleótido de resolución de mamíferos generados experimentalmente. De manera general, SRAMP evalúa la secuencia examinada mediante una ventana flanqueante de los motivos DRACH de W nucleótidos de longitud (ventana F) y tres clasificadores *Random Forest* para predecir si hay secuencias DRACH capaces de metilarse y el umbral de confianza de los potenciales sitios m<sup>6</sup>A: (1) clasificador binario, el cual representa a cada nucleótido en la secuencia de la ventana F como un vector binario; (2) clasificador KNN, el que representa la similitud de la ventana F con sitios m<sup>6</sup>A conocidos; y (3) clasificador de espectro, que representa el contexto de secuencia de un sitio m<sup>6</sup>A/no-m<sup>6</sup>A mediante la frecuencia de todos los posibles pares de nucleótidos con  $\alpha$ -nucleótidos entre ellos, dentro de la ventana F. SRAMP combina estos tres puntajes de predicción para determinar el umbral de confianza de cada sitio m<sup>6</sup>A dentro de una secuencia DRACH.

#### Selección de bibliotecas

Las bibliotecas de m<sup>6</sup>A-seq de tejido cerebral de ratón fueron obtenidas de la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO) de NCBI. Los términos implementados para realizar la búsqueda fueron: «hypothalamus», «arcuate nucleus», «MeRIP-seq», «AgRP neuron», «m<sup>6</sup>A-seq» y «epitranscriptomics». Posteriormente, se aplicó otro filtro para seleccionar solo a las bibliotecas realizadas con *Mus musculus* y que las edades estuvieran explícitamente definidas. Por último, se eligieron aquellas que fueron realizadas con alguna plataforma Illumina.

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

Tabla 2. Conjuntos de datos de MeRIP-seq y RNA-seq de cerebro de ratones utilizados para este trabajo.

Número de identificación GEO	Organismos	Edad	Tejido o tipo neuronal	Condición tratamientos	Referencia
GSE144032	Mus musculus	2, 4, 6, 26 y 52 semanas (M. musculus); 12 y 69 años (H. sapiens)	Corteza; cerebelo; hipocampo; hipotálamo (M. musculus)	5XFAD (M. musculus)	Shafik et al., 2021
GSE29714	Mus musculus	6-16 semanas (M. musculus)	Cerebro completo (M. musculus)	-	Meyer et al., 2012
GSE154992	Mus musculus	E15.5	Corteza cerebral	FTO KO y METTL3 KO específico en corteza cerebral	Du et al., 2020

Tabla 3. Preparación de bibliotecas y protocolos de secuenciación de los conjuntos de datos de MeRIP-seq y RNA-seq utilizados para este trabajo.

Número de identificación GEO	Kits para preparación de bibliotecas	Direccionalidad de lecturas de las bibliotecas	Plataforma Illumina	Tipo de secuenciación	Número de lecturas (x10 <sup>6</sup> )	Referencia
GSE144032	SMARTer Stranded Total RNA Sample prep kit	Unstranded	Illumina HiSeq 2000	Single-end	11-156	Shafik et al., 2021
GSE29714	Illumina mRNA-seq 8-Sample prep kit	Unstranded	Illumina HiSeq 2000 (M. musculus); Illumina Genome Analyzer Iix (M. musculus)	Single-end	37-96	Meyer et al., 2012
GSE154992	NEBNext UltraTM RNA Library prep kit	Unstranded	Illumina HiSeq 2000 (M. musculus)	Paired-end	24-77	Du et al., 2020

Para conveniencia de este trabajo, los datos obtenidos de estas bibliotecas de perfil de metilación m<sup>6</sup>A de los RNA comprenden diferentes edades, que van de edades embrionarias (E), postnatales (P) a semanas (W): E15.5, 2W, 6W, y 16W.

### Procesamiento de bibliotecas m<sup>6</sup>A-seq

Los archivos fastq crudos fueron obtenidos mediante la plataforma en línea Galaxy con la herramienta *Download and Extract Reads in FASTAQ* (versión de Galaxy 2.11.0+galaxy0) (Afgan et al., 2020). Verificamos la calidad de los archivos fastq crudos mediante la herramienta FastQC (versión de Galaxy 0.72+galaxy01) Mediante el reporte de calidad obtenido con FastQC, obtuvimos los adaptadores utilizados para la generación de cada una de las bibliotecas. Las secuencias de los adaptadores, las lecturas de baja calidad (puntaje

de calidad <20), y las secuencias de rRNA residuales fueron eliminadas con la herramienta Cutadapt (versión de Galaxy 3.4+galaxy0), utilizando los parámetros por defecto, excepto para *Quality Cutoff*, que fue ajustado a un valor de 20; y *Minimum Length*, que fue ajustado según la longitud de las lecturas de cada réplica. A este proceso le denominamos «curación». Posteriormente, volvimos a realizar el análisis de calidad de los archivos fastq curados mediante FastQC para verificar su correcto procesamiento. Una vez que curamos los archivos fastq apropiadamente, generamos los archivos de alineamiento en formato BAM mediante el mapeo de las lecturas curadas con la versión del genoma de *Mus musculus* GRCm37 de la base de datos Ensembl (NCBI: mm9), con la herramienta RNA STAR (versión de Galaxy 2.7.8a+galaxy0), utilizando los parámetros predeterminados, excepto *MAPQ value for unique mappers* (ajustado a 255).

### Identificación de picos m<sup>6</sup>A

Para identificar las regiones que albergaban sitios m<sup>6</sup>A, se utilizó el método computacional *peak calling*. Este método permite identificar áreas que han sido enriquecidas con lecturas de alineamiento como consecuencia de experimentos de inmunoprecipitación-secuenciación. Para ello, se utilizó la herramienta *MACS2* (versión de Galaxy 2.1.1.20160309.6). MACS2 es un algoritmo desarrollado originalmente para analizar datos de CHIP-seq, no obstante, hay estudios que demuestran su validez para analizar datos de m<sup>6</sup>A-seq. En general, MACS2 requiere tres archivos input: (1) archivo BAM de meRIP-seq; (2) archivo BAM de RNA-seq de la misma muestra biológica utilizada para meRIP-seq; y (3) la longitud en nucleótidos de genoma efectivo, es decir, de todo el genoma en el que se alinearon las lecturas. MACS2 normaliza la profundidad de los dos archivos BAM y determina las acumulaciones de lecturas alineadas (picos) de la muestra inmunoprecipitada y las compara con las acumulaciones del background, de esta forma, puede diferenciar las regiones enriquecidas por la inmunoprecipitación de las presentes en el transcriptoma total.

## La modificación m<sup>6</sup>A en la regulación del transcrito de AgRP

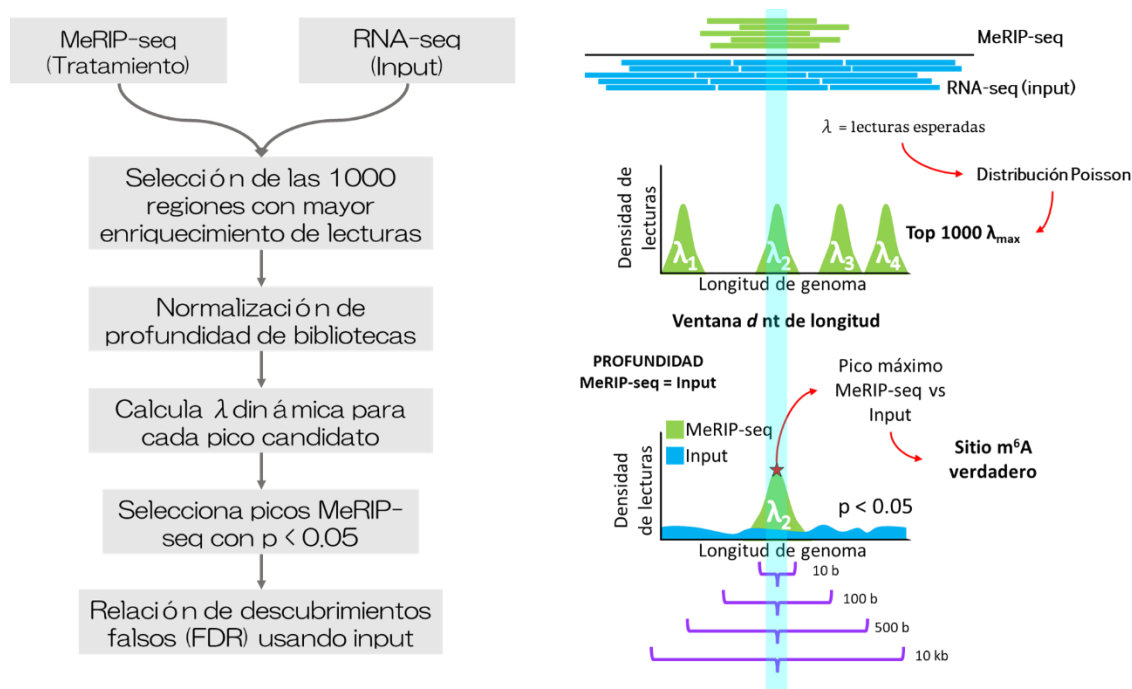


Figura 7. Flujo de trabajo y representación gráfica del flujo de trabajo del algoritmo MACS2 para realizar el análisis de «peak calling» en bibliotecas MeRIP-seq (Zhang et al., 2008).

### Generación de gráficas de densidad de lecturas

La densidad de lecturas fue graficada mediante pyGenomeTracks (versión de Galaxy 3.6) (Lopez-Delisle et al., 2020). pyGenomeTracks toma dos archivos como input, (1) un archivo de alineamiento de lecturas, el cual puede estar en una gran variedad de formatos (bigwig, bam, bedgraph, bed/gtf, etc.); y (2) un archivo de anotación de genes. Las réplicas con las mismas condiciones y de las mismas bibliotecas fueron fusionadas mediante Samtools merge (versión de Galaxy 1.13). Se utilizó la anotación de genes de ratón de Ensembl NCBI37.67.

### Generación y obtención de archivos de coordenadas

Para la obtención del archivo de conservación de elementos (PhastCons), utilizamos el archivo obtenido del sitio web de UCSC, mediante la siguiente ruta:

[www.genome.ucsc.edu/index.html](http://www.genome.ucsc.edu/index.html) → Downloads → Genome Data → Mouse → Jul.2007 (NCBI37/mm9) → Multiple alignments → Conservation scores for alignments of 29 vertebrate genome with Mouse → placental/ → chr8.placental.pp.data.gz

Para la obtención del archivo de tasa de conservación (PhyloP) utilizamos el archivo obtenido del sitio web de UCSC, mediante la siguiente ruta:

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

[www.genome.ucsc.edu/index.html](http://www.genome.ucsc.edu/index.html) → Downloads → Genome data → Mouse → Jul.2007 (NCBI37/mm9) → Basewise conservation scores (PhyloP) of 29 vertebrate genomes with Mouse → placental/ → chr8.placental.pp.data.gz

Una vez obtenidos ambos archivos, los cargamos en la plataforma virtual de Galaxy para descomprimirlos y darles el formato BEDGRAPH (PhastCons) y WIG (PhyloP), además de asignarlos a la versión mm9 del ratón, con lo cual estuvieron listos para ser utilizados en pyGenomeTracks.

PhastCons es un programa diseñado para identificar elementos conservados en múltiples secuencias alineadas. Está basado en un modelo Markov filogenético discreto (phylo-HMM), un tipo de modelo estadístico que considera tanto el proceso por el cual las sustituciones de nucleótidos ocurren en cada sitio en un genoma y cómo este proceso cambia de un sitio al siguiente (Siepel et al., 2005).

PhyloP es un programa diseñado para medir la conservación evolutiva de cada sitio de alineamiento de manera individual. La interpretación de los puntajes es comparada con la evolución esperada bajo deriva neutral. Los puntajes positivos representan alta conservación, es decir, los sitios que cambian evolutivamente más lento de lo esperado; mientras que los puntajes negativos representan alta aceleración, es decir, los sitios que cambian evolutivamente más rápido de lo esperado. Los valores absolutos de los puntajes de PhyloP representan los valores p bajo la hipótesis nula de evolución neutral (Pollard et al., 2009).

### RESULTADOS

La secuencia de AgRP presenta múltiples posibles sitios m<sup>6</sup>A

Ya que hasta ahora no se ha estudiado específicamente si el transcrito de AgRP posee modificaciones m<sup>6</sup>A, lo primero que se realizó fue analizar su secuencia mediante el predictor de sitios m<sup>6</sup>A específico para transcritos de mamíferos SRAMP (sequence-based RNA adenosine methylation site predictor) (Zhou et al., 2016). SRAMP es un predictor basado en machine learning y con un esquema de trabajo que permite discriminar con alta eficiencia posibles sitios m<sup>6</sup>A, además de ser de acceso gratuito, estar disponible en línea y tener una interfaz de fácil manejo por los usuarios. El análisis de la secuencia de AgRP con este predictor mostró que AgRP tiene ocho posibles sitios m<sup>6</sup>A, de los cuales, cuatro son de alta confianza (puntaje combinado  $\geq 0.6$ ). Estos resultados sugieren que el transcrito de AgRP muy probablemente posea sitios modificados con m<sup>6</sup>A.

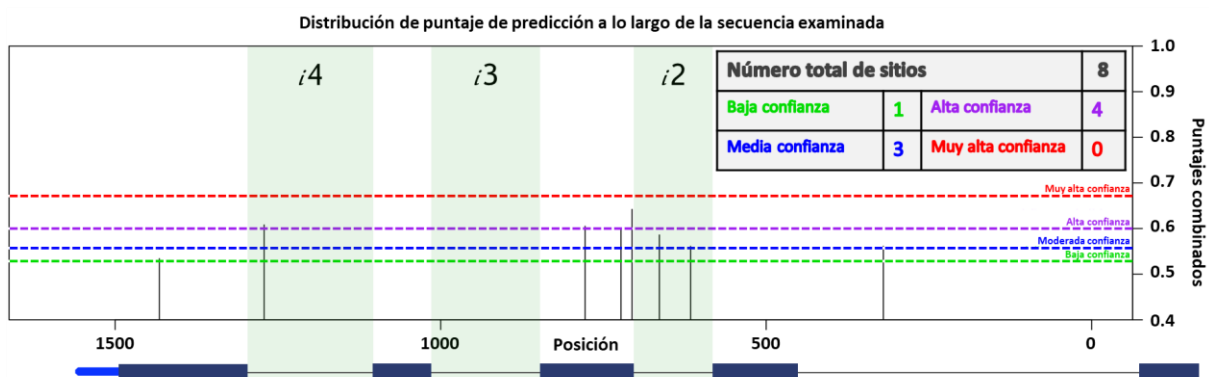


Figura 8. Resultados de predicción de posibles sitios de metilación m<sup>6</sup>A en el transcrito completo de AgRP, mediante la herramienta *in silico* SRAMP. Cada pico representa un probable sitio m<sup>6</sup>A reconocido por SRAMP. Cada umbral representado de distintos colores indica la confianza que SRAMP le asigna a cada sitio predicho. El verde es para los que tienen baja confianza, el azul para los de media confianza, el morado para los de alta confianza, y el rojo para los de muy alta confianza. El transcrito está representado por la línea inferior, donde se pueden observar los exones como las cajas y los intrones junto con las regiones UTR como las líneas continuas.

El transcrito de AgRP posee sitios modificados con m<sup>6</sup>A en bibliotecas MeRIP-seq de hipotálamo de ratón

Para comprobar que el transcrito de AgRP realmente se metila en el hipotálamo de ratones, analizamos dos conjuntos de datos públicos de MeRIP-seq de cerebro de ratón. Para este propósito, utilizamos MACS2. En las bibliotecas de cerebro completo e hipotálamo de ratón

## La modificación m<sup>6</sup>A en la regulación del transcrito de AgRP

logramos observar que AgRP alberga picos de enriquecimiento de m<sup>6</sup>A. En las bibliotecas de hipotálamo de ratón a las dos y seis semanas de edad, encontramos que el patrón de enriquecimiento de sitios m<sup>6</sup>A se concentraba principalmente en i2, e3 y el 3'UTR, aunque también presentaron cobertura en i3 e i4. Un resultado muy interesante es que, aunque la distribución temporal de la metilación m<sup>6</sup>A del transcrito de AgRP en hipotálamos de ratones de dos y 6 semanas no parece cambiar, se presentan mayores niveles de modificaciones m<sup>6</sup>A a las dos semanas, en comparación con seis semanas. En conjunto, estos resultados demuestran que el transcrito de AgRP se encuentra activamente metilado en el hipotálamo de ratones, y sugieren que los niveles de m<sup>6</sup>A de este transcrito son temporalmente dinámicos, siendo mayores a edades tempranas y disminuyendo conforme el hipotálamo madura.

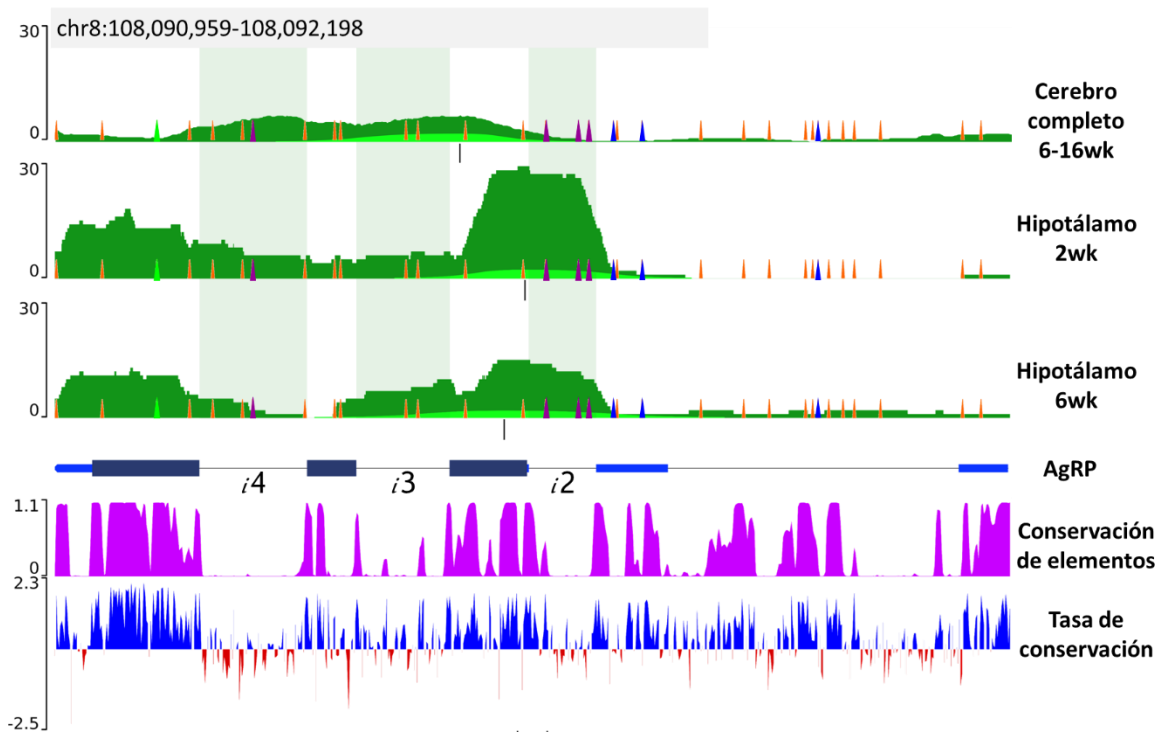


Figura 9. El transcrito de AgRP está más metilado a las 2 semanas con respecto a 6 semanas en hipotálamo de ratón. El gráfico de densidad de lecturas de datos de MeRIP-seq de cerebro total de ratón adulto (6-16wk) (Meyer et al., 2012), hipotálamo de ratones de 2 y 6 semanas de edad (2wk y 6wk, respectivamente) (Shafik et al., 2021), muestran que el transcrito de AgRP está activamente modificado con metilaciones m<sup>6</sup>A. El eje y muestra la densidad de lecturas. Las marcas en naranja son todas las secuencias DRACH existentes en AgRP, mientras que las que se destacan en otros colores son los predichos con SRAMP (verde=baja confianza;



## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

azul=confianza moderada; morado=alta confianza). La línea vertical negra situada debajo de cada gráfico de densidad de lecturas representa el punto máximo de lecturas apiladas obtenido con MACS2. En la anotación, las líneas representan a los intrones y las cajas a los exones. La región codificante de AgRP se resalta en azul marino. La conservación de elementos PhastCons se encuentra representada en color púrpura, mientras que la tasa de conservación evolutiva PhyloP se representa en azul rey y rojo para los valores positivos y negativos, respectivamente.

### El splicing de AgRP se regula epitranscriptómicamente

Dado a que la metilación m<sup>6</sup>A es una modificación dinámica regulada por proteínas escritoras y borradoras de m<sup>6</sup>A, como METTL3 y FTO, respectivamente, exploramos la posibilidad de que alguno de estos dos reguladores de m<sup>6</sup>A tuviera influencia sobre el procesamiento del transcrito de AgRP. Para este fin, utilizamos una base de datos de RNA-seq donde silenciaron a *mettl3* y a *fto* en cerebro de ratones, con ratones WT como control (M-KO; F-KO; y WT, respectivamente). Observamos que la abundancia de lecturas en *e2* e *i2* es mayor en ratones F-KO con respecto a los ratones WT, mientras que no se observa alguna diferencia entre los ratones M-KO y WT en estos mismos elementos génicos. Por otro lado, tanto en los ratones M-KO como en los F-KO encontramos mayor abundancia en *e3* con respecto a los ratones WT. La abundancia en *i3* mostró un ligero aumento en ratones F-KO con respecto a WT, mientras que los ratones M-KO no parecen tener algún cambio aparente con respecto a los WT. En los ratones F-KO también logramos observar una notable disminución de la abundancia en *e4*, con respecto a los ratones M-KO y WT, mientras que no se observa ninguna diferencia entre estos dos últimos.

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

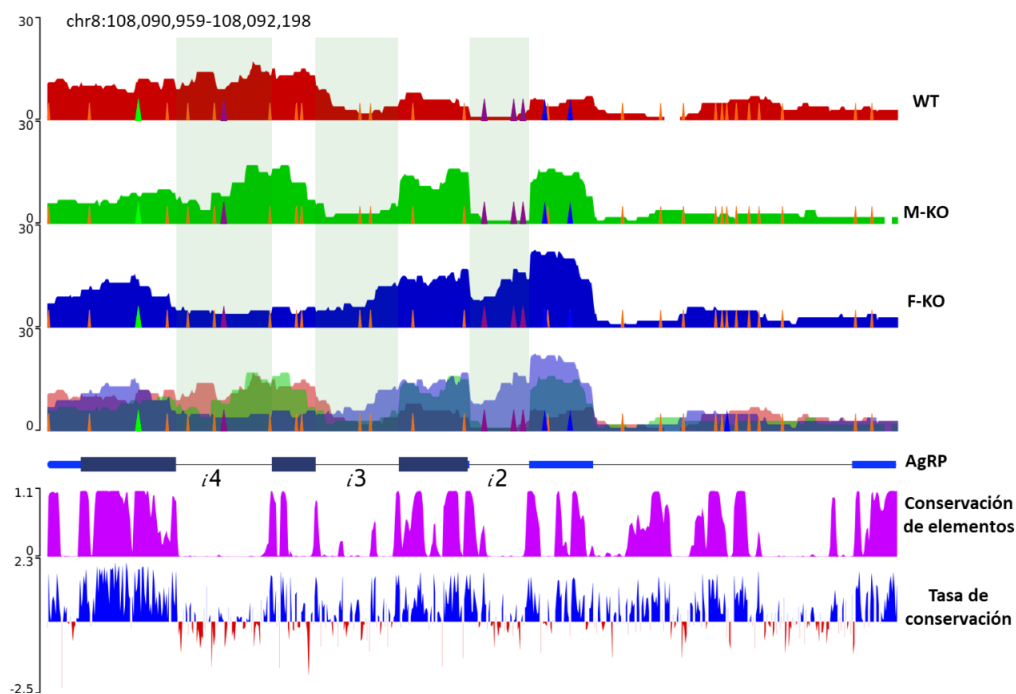


Figura 10. El splicing del transcrito de AgRP se regula epitranscriptómicamente. Los gráficos de densidad de lecturas de datos de RNA-seq de cerebro de ratón E15.5 (Du et al., 2020), muestran que los elementos génicos de AgRP están regulados por la modificación m<sup>6</sup>A mediante METTL3 y FTO. El eje y muestra la densidad de lecturas. Las marcas en naranja son todas las secuencias DRACH existentes en AgRP, mientras que las que se destacan en otros colores son los predichos con SRAMP (verde=baja confianza; azul=confianza moderada; morado=alta confianza). En la anotación, las líneas representan a los intrones y las cajas a los exones. La región codificante de AgRP se resalta en azul marino. La conservación de elementos PhastCons se encuentra representada en color púrpura, mientras que la tasa de conservación evolutiva PhyloP se representa en azul rey y rojo para los valor positivos y negativos, respectivamente.

La abundancia en *i4* es notablemente menor en los ratones F-KO con respecto a los WT; por otro lado, los ratones M-KO parecen tener una abundancia similar a la de los WT, sin embargo, la cobertura de este intrón abarca principalmente su región 5' y disminuye conforme se aproxima a su extremo 3', mientras que en los ratones WT parece abarcar toda la longitud del exón. La abundancia en *e5* parece ser ligeramente mayor en los ratones F-KO en comparación con los WT, mientras que no se observa diferencia alguna entre M-KO y WT. Inesperadamente, estos resultados conjuntamente sugieren un comportamiento de inclusión y exclusión particular para cada uno de los elementos génicos de AgRP m<sup>6</sup>A-dependiente; esto también muestra que potencialmente la exclusión de *e2* e *i2* está directamente regulada por la desmetilación mediada por FTO, mientras que *i4* podría requerir la metilación para

retenerse y la desmetilación para ser removido; por otro lado, hay elementos génicos, como *e3*, que pueden requerir la actividad tanto de METTL3 como de FTO para excluirse.

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En trabajos anteriores, nuestro grupo de investigación encontró una isoforma del transcrito de AgRP que presenta la retención de dos de sus intrones: el intrón 3 (*i3*) y el intrón 4 (*i4*). Este hallazgo fue observado en muestras de hipotálamo de ratones en la etapa postnatal (P) temprana, sin embargo, esta isoforma del transcrito de AgRP no fue encontrada en los hipotálamos de ratón adulto. En este trabajo, analizamos bases de datos públicas de m<sup>6</sup>A-seq y RNA-seq poli-A de cerebro e hipotálamo de ratón en diferentes puntos temporales del desarrollo embrionario y postnatal, con la finalidad de analizar la relación entre esta isoforma de AgRP y la modificación epitranscriptómica m<sup>6</sup>A.

Los eventos de metilación m<sup>6</sup>A en el transcrito de AgRP fueron identificados en cada uno de los conjuntos de datos de m<sup>6</sup>A-seq. Cuando se analizaron los datos de hipotálamo de ratón a las dos y seis semanas de edad, hubo un importante aumento de eventos m<sup>6</sup>A en el periodo de dos semanas de edad en comparación con las seis semanas de edad. Se ha reportado que la modificación m<sup>6</sup>A está estrechamente involucrada en la regulación de la diferenciación de las células troncales neuronales a diferentes estirpes en diversas regiones del cerebro murino. Por ejemplo, Ma y colaboradores (2018) identificaron dos tipos de metilación de mRNA durante el desarrollo del cerebelo, clasificándolos en dos categorías: (1) aquellos transcritos que mantienen sus patrones de metilación inmutables a lo largo del desarrollo cerebelar, y; (2) aquellos que presentan cambios en sus patrones de metilación tiempo-específicos a lo largo de cuatro procesos del desarrollo postnatal. Este último tipo de transcritos exhibe remarcables cambios en el patrón de distribución/abundancia de sus sitios m<sup>6</sup>A de manera tiempo-dependiente. De igual manera, se ha propuesto un modelo por el cual, al ocurrir la señal de diferenciación, los genes que mantienen el estado «naïve» de las células troncales detienen su transcripción, mientras que los mRNAs existentes de estos genes son marcados con m<sup>6</sup>A para promover su transporte a cuerpos de procesamiento (cuerpos-P) para su degradación, esto último permite que estas células salgan del estado de pluripotencialidad y puedan ingresar a etapas más avanzadas de su diferenciación neuronal.

## La modificación m<sup>6</sup>A en la regulación del transcrito de AgRP

En conjunto con el aumento de la metilación m<sup>6</sup>A en el transcrito de AgRP a las dos semanas con respecto a las 6 semanas observada, nuestros resultados sugieren que la abundancia y los patrones de sitios m<sup>6</sup>A en AgRP son controlados de manera tiempo-específica, presentando mayores niveles en etapas tempranas en comparación con etapas más avanzadas del desarrollo hipotalámico.

Frye y colaboradores (2018) han propuesto un modelo en el cual la modificación m<sup>6</sup>A tiene un papel clave en la diferenciación de las células progenitoras «naïve» neuronales. Mediante una secuencia de eventos que comienza al ocurrir la señal de diferenciación, los RNAs asociados al estado «naïve» marcados con m<sup>6</sup>A se degradan, lo que facilita cambiar el programa de expresión génica de las células progenitoras por otro programa, permitiendo así entrar en procesos de diferenciación. Esto gradualmente permite que las células progenitoras neuronales abandonen sus características «naïve» y simultáneamente adquieren, de manera progresiva, las características de identidad de la estirpe neuronal a la que darán origen. Nuestros resultados muestran una metilación diferencial del transcrito de AgRP de los hipotálamos de ratón de 2 y 6 semanas de edad, donde se pudo observar que la abundancia de sitios m<sup>6</sup>A es mayor en el mRNA de AgRP a las 2 semanas, y disminuye a las 6 semanas de edad. En conjunto, esto sugiere que, al ser la expresión de AgRP específica del núcleo arqueado, su transcrito se encuentre metilado en las etapas tempranas del desarrollo de este núcleo hipotalámico, momento en el cual las neuronas NPY/AgRP aún no han madurado en su totalidad, posiblemente porque el transcrito de AgRP esté traduccionalmente reprimido por la marca m<sup>6</sup>A, y su desmetilación podría aumentar sus niveles de proteína cuando el núcleo arqueado se encuentre en un estado más avanzado de maduración, como lo es a las 6 semanas de edad, cuando los ratones han dejado de ser amamantados y ya han iniciado la ingesta de alimentos sólidos. Lo que aún no es claro es si la desmetilación del transcrito de AgRP es consecuencia de la maduración del núcleo arqueado, o viceversa, ni si la isoforma que retiene al *β* e *γ* sea resultado de la metilación de este transcrito.

Se conoce que, en los ratones, el gen de AgRP se activa transcripcionalmente en el día E15.5; sin embargo, los niveles de su transcrito son bajos incluso en el día P0, posteriormente, estos niveles aumentan de manera gradual conforme va madurando el hipotálamo, hasta alcanzar sus niveles máximos en el día P21, momento en el cual las

neuronas NPY/AgRP han establecido completamente su identidad peptidérgica. Además, se ha reportado que la proteína codificada por este gen no es detectable sino hasta luego del periodo perinatal y sus niveles siguen el mismo patrón que los de su transcrito. Un reciente estudio mostró la existencia de múltiples transcritos que presentan patrones diferenciales de metilación m<sup>6</sup>A a lo largo de distintas edades postnatales en cuatro diferentes regiones del cerebro murino, entre ellas, el hipotálamo (Shafik et al., 2021). Un interesante hallazgo de este trabajo es la identificación de un subconjunto de transcritos específicos de cada uno de estos tejidos cerebrales, los cuales mostraron patrones de metilación diferenciales específicos de dichos tejidos, por ejemplo: en el hipotálamo se presentaron patrones de metilación diferenciales en múltiples transcritos relacionados a su apropiado desarrollo, además, estos patrones diferenciales no fueron observados en ninguna de las otras tres regiones cerebrales examinadas. Nuestros resultados muestran que el transcrito de AgRP, el cual es específico del núcleo arqueado, está siendo modificado activamente con múltiples sitios m<sup>6</sup>A y presenta mayores niveles de metilación a las dos semanas en comparación con las bibliotecas de ratones de 6 semanas de edad. Esto sugiere que los altos niveles de metilación en el transcrito de AgRP a las dos semanas pueden deberse a un mecanismo por el cual se regula la traducción de AgRP en las neuronas que aún no terminan de definir su identidad peptidérgica, y, una vez definido su destino final, la represión traduccional se elimina paulatinamente hasta llegar a expresar al péptido AgRP en niveles encontrados en hipotálamos maduros.

Un estudio enfocado en conocer los patrones de metilación en cuatro diferentes regiones del cerebro de ratón y humano en la enfermedad de Alzheimer encontró que en el hipotálamo murino existen genes diferencialmente metilados entre dos edades, donde existe un mayor nivel de m<sup>6</sup>A durante las 2 semanas de edad, y disminuye a las 6 semanas de edad, especialmente en genes que se expresan principal o exclusivamente en el hipotálamo. Los resultados del presente trabajo muestran que el transcrito de AgRP presenta mayores niveles de metilación a las 2 semanas de edad con respecto a los tejidos hipotalámicos analizados de ratones con 6 semanas de edad, lo que concuerda con lo reportado en la literatura, pues se sabe que el gen de AgRP se expresa principalmente en el núcleo arqueado, región exclusiva del hipotálamo. También se ha mostrado que una de las principales funciones de la

## La modificación m<sup>6</sup>A en la regulación del transcrito de AgRP

modificación m<sup>6</sup>A en el mRNA es disminuir su estabilidad. Con esto podemos sugerir que el transcrito de AgRP está mayormente metilado en la etapa postnatal temprana, cuando los ratones aún se alimentan de leche materna, por lo que la activación de la vía orexigénica mediada por AgRP no es esencial para su supervivencia, lo que provoca que los altos niveles de metilación del transcrito de AgRP disminuyan su vida media. Por otro lado, a las 6 semanas los ratones ya han comenzado una dieta sólida y han abandonado la alimentación con leche materna, igualmente la identidad peptidérgica de las neuronas NYP/AgRP ya se ha definido, por lo que probablemente estas neuronas disminuyen sus niveles de m<sup>6</sup>A en el transcrito de AgRP para poderlo expresar apropiadamente.

Es conocido que cada sitio marcado con m<sup>6</sup>A en un transcrito es crítico para su procesamiento, ya que el lugar donde se lleve a cabo dicha marca determina el tipo de lector m<sup>6</sup>A que interactúe con el transcrito. Un ejemplo es YTHDF2, la cual cuando se une al transcrito metilado es capaz de transportarlo a cuerpos-P (cuerpos de procesamiento), donde recluta al complejo CCR4-NOT para promover la deadenilación y la subsecuente degradación del transcrito metilado (Du et al., 2016). Por otro lado, YTHDC1 facilita la exportación nuclear dependiente de NXF1 de los RNAs metilados mediante la interacción con SRSF3 (Xiao et al., 2016). La interacción de YTHDF1 con el transcrito metilado promueve la interacción con eIF3, lo que resulta en niveles elevados de traducción del transcrito metilado, asimismo, YTHDF3 es capaz de interactuar con los transcritos metilados para promover la unión de YTHDF1, y así promover su traducción (Wang et al., 2015). Nuestro análisis del perfil de m<sup>6</sup>A del transcrito de AgRP en condiciones *mettl3-Ko* y *FTO-KO* mostró que tanto la ausencia de la metiltransferasa como de la desmetilasa alteran activamente las isoformas del transcrito de AgRP, donde el cambio es más pronunciado en la condición de *FTO-KO*. Nuestros resultados sugieren un potencial papel de cada una de las marcas m<sup>6</sup>A en el transcrito de AgRP, ya que parece ser que cada sitio metilado tiene un efecto local sobre el procesamiento de los elementos génicos vecinos, pues encontramos que la retención o exclusión de cada uno de estos elementos intrónicos y exónicos no sigue un destino conjunto, sino que su procesamiento está regulado por marcas m<sup>6</sup>A físicamente cercanas e independientes, contrario a la idea de que una única marca m<sup>6</sup>A puede definir el destino metabólico del mRNA completo. Además de esto, el cambio más notorio observado en la condición *FTO-KO* podría

ser debido a que la otra desmetilasa descrita ALKBH5 no tiene función redundante con FTO sobre este procesamiento, por lo que la falta de FTO posiblemente no pueda ser sustituida o reemplazada por esta desmetilasa.

Nuestro trabajo aporta más información de cómo la participación de la modificación m<sup>6</sup>A influye en el procesamiento de los transcritos por splicing. Además, nuestro trabajo favorece la idea de que la modificación m<sup>6</sup>A juega un papel importante en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional. Lo que entendemos de la metilación m<sup>6</sup>A hasta el momento, ha sido gracias a un limitado número de trabajos realizados en el campo, ya que a pesar de que hay numerosos trabajos enfocados en el sistema nervioso central, son muy pocos aquellos que abordan el estudio de regiones específicas, y mucho menor el número que lo abordan durante el desarrollo, un ejemplo de esto es que a pesar de la búsqueda exhaustiva realizada en este proyecto, solo encontramos una base de datos pública con bibliotecas de hipotálamo, y ninguna de núcleo arqueado de ratón. Futura investigación nos permitirá establecer con mayor detalle esta participación, así como nos permitirá esclarecer su relevancia para la expresión del gen de AgRP y su implicación en la maduración de las neuronas del núcleo arqueado. Para obtener resultados conclusivos es requerido generar datos experimentales específicos de m<sup>6</sup>A en núcleo arqueado durante el neurodesarrollo, pues en la literatura no existen los suficientes como para poder realizar hoy en día un estudio para poder.

Es importante mencionar que, durante el desarrollo de este proyecto de investigación, utilizamos las bibliotecas de tres trabajos publicados en la base de datos GEO, de las cuales, dos correspondían a estudios de MeRIP-seq (Meyer et al., 2012; Shafik et al., 2021) y la tercera a un estudio de RNA-seq y Ribo-seq (Du et al., 2021). Con ellas, buscamos hacer el análisis diferencial de la expresión de genes, el análisis de retención de intrones y el análisis de RNAs asociados a ribosomas. El primero de estos análisis fue inconcluso debido a que, en todas las bibliotecas, el número de lecturas que correspondían a AgRP fue tan bajo que el algoritmo del software utilizado (DESEQ2) eliminó a AgRP de los genes que consideró para dicha tarea. Es importante en este punto señalar que la profundidad de la secuenciación es un factor clave, ya que hace referencia al número total de fragmentos que son leídos, por lo que una mayor profundidad significa que hay más fragmentos leídos por las plataformas, lo

## La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP

que permite tener una mayor cantidad de información y un sesgo mucho menor, ya que una profundidad baja puede significar que el número de lecturas de fragmentos de un gen potencialmente sean reducidas drásticamente o incluso eliminadas por completo; sin embargo, la profundidad que presentan las bibliotecas que utilizamos fue de 10 a 25 millones de fragmentos leídos, lo que se considera una profundidad baja, siendo lo ideal para nuestro trabajo una profundidad de aproximadamente 100 millones de lecturas. En el segundo análisis ocurrió lo mismo, ya que el software utilizado, iREAD, tiene un umbral mínimo de lecturas en los intrones y de cobertura total de la secuencia de estos para tomarlos en cuenta. Para tratar de sortear este desafío, modificamos el código de iREAD para que considerara un mínimo de 1 lectura por intrón para que lo tomara en cuenta, sin embargo, la cobertura fue tan baja que los resultados volvieron a ser inconclusos. Otro punto importante resaltar aquí es la cobertura, que hace referencia a la cantidad de bases de la región de interés que se cubre por el conjunto de fragmentos secuenciados, por lo que una cobertura alta significa que los fragmentos en conjunto que mapean para un gen cubrieron casi o la totalidad de bases que corresponden a dicho gen, aunque también se puede aplicar para los elementos génicos como son los intrones y los exones. En nuestro caso, al tener una profundidad baja, la cantidad de lecturas que corresponden a AgRP es demasiado baja, por lo que iREAD es incapaz de determinar si los eventos de retención de intrones son negativos por los procesos biológicos o por la falta de más lecturas que eliminen este sesgo. Tanto la profundidad como la cobertura son características de las bibliotecas que pueden variar ampliamente, ya que para algunos análisis, ambas pueden tener valores bajos y no involucra algún problema para los genes analizados; sin embargo, para análisis de genes específicos de poblaciones celulares que representan una fracción diminuta de todo el tejido analizado, o para el análisis de variantes de splicing, tanto la cobertura como la profundidad requeridas deben ser significativamente altas para poder tener resultados que no sean afectados por los sesgos metodológicos y puedan considerarse como resultados veraces. Por último, el análisis de RNAs asociados a ribosomas consiste en secuenciar únicamente a los mRNAs que están protegidos por los ribosomas por el proceso de la traducción, en el cual se inhibe la traducción, se utilizan ribonucleasas para degradar todo el RNA que no esté asociado a ribosomas, posteriormente se utilizan proteasas para degradar a los ribosomas y los fragmentos de RNA son secuenciados. No obstante, luego de la eliminación de los



## **La modificación m6A en la regulación del transcrito de AgRP**

ribosomas, los fragmentos de mRNA requieren ser preparados con adaptadores para generar las bibliotecas de cDNA para la secuenciación, por lo que, al momento de curar estas bibliotecas, los criterios de calidad son similares a los que se aplican a las bibliotecas de RNA-seq. Este análisis fue imposible de realizar, ya que las bibliotecas de Ribo-seq utilizadas no pasaron nuestros estándares de calidad al momento de procesarlas para la eliminación de los adaptadores y las lecturas de baja calidad, por lo que tuvimos que descartar todos los datos de estas bibliotecas y solo mantuvimos aquellas que pasaron las pruebas de calidad, de las cuales ninguna correspondió a las bibliotecas de Ribo-seq. La técnica de Ribo-seq.

Es requerido generar datos experimentales específicos de m<sup>6</sup>A en núcleo arqueado de ratón durante el neurodesarrollo, pues hoy en día en las bibliotecas públicas disponibles no existen los suficientes datos como para poder realizar un estudio que nos lleve a resultados conclusivos.

## CONCLUSIONES

Nuestros datos muestran por primera vez que el transcrito de AgRP está activamente modificado con marcas m<sup>6</sup>A en ratones, y que esta metilación es temporalmente dinámica, pues presenta un patrón diferencial entre los mRNAs de AgRP en ratones jóvenes en comparación de ratones adultos, más aún, el análisis de las bibliotecas FTO-KO sugiere que la modificación m<sup>6</sup>A es dinámica aún dentro de la vida de un transcrito, pues parece ser que el transcrito de AgRP requiere ser metilado y luego desmetilado para su completo procesamiento. También podemos sugerir que la influencia de la metilación m<sup>6</sup>A es específica e independiente para cada uno de los intrones y exones del transcrito de AgRP. Finalmente, sugerimos que la influencia que tiene m<sup>6</sup>A sobre el procesamiento de AgRP es clave para la diferenciación de las neuronas NPY/AgRP.

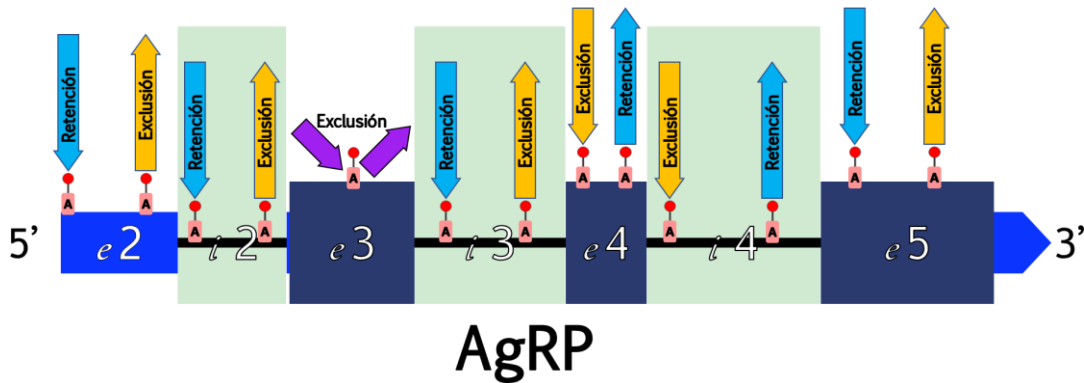


Figura 11. Cada marca de m<sup>6</sup>A en el transcrito de AgRP tiene un efecto local sobre el procesamiento de los elementos genéticos vecinos.

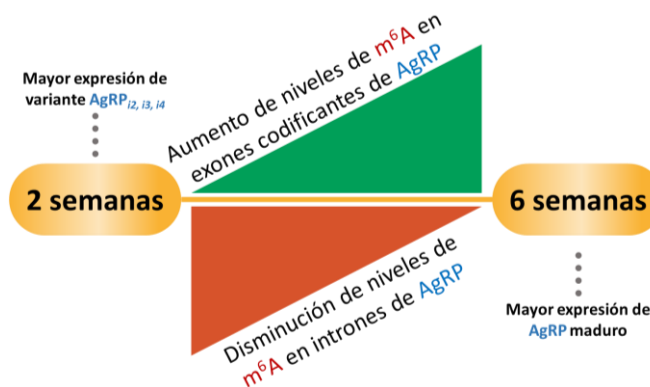


Imagen 12. El transcrito de AgRP se metila, y los niveles de metilación son mayores a las 2 semanas que a las 6 semanas.

### PERSPECTIVAS

- Generar bibliotecas de m<sup>6</sup>A mediante las técnicas de MeRIP-seq y miCLIP-seq. en núcleo arqueado de ratón de 0, 7, 14 y 21 días postnatales para determinar obtener el paisaje de metilación a estas edades y obtener los cambios de los patrones y enriquecimientos de m<sup>6</sup>A.
- Determinar cuál de los anticuerpos comerciales es el óptimo para la técnica de miCLIP-seq.
- Validación de bibliotecas mediante técnicas colorimétricas.
- Determinar los cambios de los patrones y enriquecimientos de m<sup>6</sup>A sobre los transcritos de AgRP, NPY, POMC, CART y LEPR a lo largo del desarrollo del núcleo arqueado, así la expresión diferencial de estos genes, la retención de intrones y los patrones de los elementos génicos intrónicos y exónicos.
- Purificar la porción de RNA asociado a ribosomas de los transcritos de AgRP, NPY, POMC, CART y LEPR para determinar si existe alguna relación entre su grado de madurez, traducción y metilación.

### REFERENCIAS

1. Alarcón, C., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., & Tavazoie, S. (2015). HNRNPA2B1 Is a Mediator of m<sup>6</sup>A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell*, 162(6), 1299–1308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.011>
2. Angelova, M. T., Dimitrova, D. G., Dinges, N., Lence, T., Worpenberg, L., Carré, C., & Roignant, J. Y. (2018). The Emerging Field of Epitranscriptomics in Neurodevelopmental and Neuronal Disorders. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00046>
3. Anreiter, I., Mir, Q., Simpson, J. T., Janga, S. C., & Soller, M. (2021). New Twists in Detecting mRNA Modification Dynamics. *Trends in Biotechnology*, 39(1), 72-89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.06.002>
4. Bartesaghi, L., Wang, Y., Fontanet, P., Wanderoy, S., Berger, F., Wu, H., Akkuratova, N., Bouçanova, F., Médard, J. J., Petitpré, C., Landy, M. A., Zhang, M. D., Harrer, P., Stendel, C., Stucka, R., Dusl, M., Kastriti, M. E., Croci, L., Lai, H. C., . . . Chrast, R. (2019). PRDM12 Is Required for Initiation of the Nociceptive Neuron Lineage during Neurogenesis. *Cell Reports*, 26(13), 3484-3492.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.098>
5. Batista, P., Molinie, B., Wang, J., Qu, K., Zhang, J., Li, L., Bouley, D., Lujan, E., Haddad, B., Daneshvar, K., Carter, A., Flynn, R., Zhou, C., Lim, K. S., Dedon, P., Wernig, M., Mullen, A., Xing, Y., Giallourakis, C., & Chang, H. (2014). m<sup>6</sup>A RNA Modification Controls Cell Fate Transition in Mammalian Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 15(6), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.019>
6. Bertero, A., Brown, S., Madrigal, P., Osnato, A., Ortmann, D., Yangou, L., Kadiwala, J., Hubner, N. C., de Los Mozos, I. R., Sadée, C., Lenaerts, A. S., Nakanoh, S., Grandy, R., Farnell, E., Ule, J., Stunnenberg, H. G., Mendjan, S., & Vallier, L. (2018). The SMAD2/3 interactome reveals that TGF $\beta$  controls m<sup>6</sup>A mRNA methylation in pluripotency. *Nature*, 555(7695), 256–259. <https://doi.org/10.1038/nature25784>
7. Brain Map - brain-map.org. (s. f.). Allen Brain Map. <https://portal.brain-map.org/>

8. Brown, G. M., & Attardi, G. (1965). Methylation of nucleic acids in Hela cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20(3), 298–302. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(65\)90363-3](https://doi.org/10.1016/0006-291x(65)90363-3)
9. Carranza-Quishpe, L. E. (2016). Fisiología del apetito y el hambre. *Physiology of appetite and hunger. Enfermería Investiga-Vol. 1 No. 3*.
10. Chen, C., Liu, W., Guo, J., Liu, Y., Liu, X., Liu, J., Dou, X., Le, R., Huang, Y., Li, C., Yang, L., Kou, X., Zhao, Y., Wu, Y., Chen, J., Wang, H., Shen, B., Gao, Y., & Gao, S. (2021). Nuclear m<sup>6</sup>A reader YTHDC1 regulates the scaffold function of LINE1 RNA in mouse ESCs and early embryos. *Protein & Cell*, 12(6), 455–474. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00837-8>
11. Chen, X., Wyler, S. C., Li, L., Arnold, A. G., Wan, R., Jia, L., Landy, M. A., Lai, H. C., Xu, P., & Liu, C. (2020). Comparative Transcriptomic Analyses of Developing Melanocortin Neurons Reveal New Regulators for the Anorexigenic Neuron Identity. *The Journal of Neuroscience*, 40(16), 3165–3177. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0155-20.2020>
12. Coronado Monroy, P. D. (2020). Caracterización de un modelo celular de neuronas POMC/CART de núcleo arqueado de ratón. Universidad Nacional Autónoma de México. [https://tesionam.dgb.unam.mx/F/ECNSHB9REKSKVKTQHR9XX47NIXBCVXANMPTU T9GBI5URY6PN78-42717?func=full-set-set&set\\_number=288583&set\\_entry=000001&format=999](https://tesionam.dgb.unam.mx/F/ECNSHB9REKSKVKTQHR9XX47NIXBCVXANMPTU T9GBI5URY6PN78-42717?func=full-set-set&set_number=288583&set_entry=000001&format=999)
13. Darnell, R. B., Ke, S., & Darnell, J. E. (2017). Pre-mRNA processing includes N6 methylation of adenosine residues that are retained in mRNA exons and the fallacy of "RNA epigenetics". *RNA*, 24(3), 262–267. <https://doi.org/10.1261/ma.065219.117>
14. Deem, J. D., Faber, C. L., & Morton, G. J. (2021). AgRP neurons: Regulators of feeding, energy expenditure, and behavior. *The FEBS Journal*, 289(8), 2362–2381. <https://doi.org/10.1111/febs.16176>
15. Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., & Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m<sup>6</sup>A RNA methylomes revealed by m<sup>6</sup>A-seq. *Nature*, 485(7397), 201–206. <https://doi.org/10.1038/nature11112>

16. Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., Ma, J., & Wu, L. (2016). YTHDF2 destabilizes m<sup>6</sup>A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4–NOT deadenylase complex. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms12626>
17. Du, K., Zhang, Z., Zeng, Z., Tang, J., Lee, T. & Sun, T. (2021). Distinct roles of Fto and Mettl3 in controlling development of the cerebral cortex through transcriptional and translational regulations. *Cell Death & Disease*, 12(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03992-2>
18. Edupuganti, R. R., Geiger, S., Lindeboom, R. G. H., Shi, H., Hsu, P. J., Lu, Z., Wang, S. Y., Baltissen, M. P. A., Jansen, P. W. T. C., Rossa, M., Müller, M., Stunnenberg, H. G., He, C., Carell, T., & Vermeulen, M. (2017). N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(10), 870–878. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3462>
19. Figueroa, A., Kotani, H., Toda, Y., Mazan-Mamczarz, K., Mueller, E. C., Otto, A., Disch, L., Norman, M., Ramdasi, R. M., Keshtgar, M., Gorospe, M., & Fujita, Y. (2009). Novel Roles of Hakai in Cell Proliferation and Oncogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 20(15), 3533–3542. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0845>
20. Frye, M., Harada, B. T., Behm, M., & He, C. (2018). RNA modifications modulate gene expression during development. *Science*, 361(6409), 1346–1349. <https://doi.org/10.1126/science.aau1646>
21. Fu, Y., Jia, G., Pang, X., Wang, R. N., Wang, X., Li, C. J., Smemo, S., Dai, Q., Bailey, K. A., Nobrega, M. A., Han, K. L., Cui, Q. & He, C. (2013). FTO-mediated formation of N<sup>6</sup>-hydroxymethyladenosine and N<sup>6</sup>-formyladenosine in mammalian RNA. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms2822>
22. Galarce Sosa, E. I. (2020). Análisis de cambios en la expresión de reguladores de m<sup>6</sup>A en los subtipos moleculares de cáncer de mama y su relación con la supervivencia. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/10274>
23. Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y. S., Ben-Haim, M. S., Eyal, E., Yunger, S., Pinto, Y., Jaitin, D. A., Viukov, S., Rais, Y., Krupalnik, V., Chomsky, E., . . .

- Hanna, J. H. (2015). m<sup>6</sup>A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 347(6225), 1002–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1261417>
24. Gómez Montalvo, J. (2021). Bioinformatic analysis of the expression pattern of an intron-retaining isoform of the *AgRP* transcript in arcuate nucleus neurons of mice. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. <https://hdl.handle.net/11285/647271>
25. Hsu, P. J., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y., Qi, M., Lu, Z., Shi, H., Wang, J., Cheng, Y., Luo, G., Dai, Q., Liu, M., Guo, X., Sha, J., Shen, B., & He, C. (2017). Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, 27(9), 1115–1127. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.99>
26. Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Zhao, B. S., Mesquita, A., Liu, C., Yuan, C. L., Hu, Y. C., Hüttelmaier, S., Skibbe, J. R., Su, R., Deng, X., Dong, L., Sun, M., Li, C., Nachtergaele, S., . . . Chen, J. (2018). Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature Cell Biology*, 20(3), 285–295. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0045-z>
27. Huang, H., Weng, H., Zhou, K., Wu, T., Zhao, B. S., Sun, M., Chen, Z., Deng, X., Xiao, G., Auer, F., Klemm, L., Wu, H., Zuo, Z., Qin, X., Dong, Y., Zhou, Y., Qin, H., Tao, S., Du, J., . . . Chen, J. (2019). Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m<sup>6</sup>A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*, 567(7748), 414–419. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1016-7>
28. Ignatova, V. V., Stolz, P., Kaiser, S., Gustafsson, T. H., Lastres, P. R., Sanz-Moreno, A., Cho, Y. L., Amarie, O. V., Aguilar-Pimentel, A., Klein-Rodewald, T., Calzada-Wack, J., Becker, L., Marschall, S., Kraiger, M., Garrett, L., Seisenberger, C., Höfler, S. M., Borland, K., van de Logt, E., . . . Schneider, R. (2020). The rRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL5 is involved in pluripotency and developmental programs. *Genes & Development*, 34(9–10), 715–729. <https://doi.org/10.1101/gad.333369.119>
29. Jain, D., Puno, M. R., Meydan, C., Lailier, N., Mason, C. E., Lima, C. D., Anderson, K. V., & Keeney, S. (2018). *ketu* mutant mice uncover an essential meiotic function for the ancient RNA helicase YTHDC2. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/elife.30919>

30. Jalili, V., Afgan, E., Gu, Q., Clements, D., Blankenberg, D., Goecks, J., Taylor, J. & Nekrutenko, A. (2020). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2020 update. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W395-W402. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa434>
31. Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y. G., & He, C. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
32. Jiang, X., Liu, B., Nie, Z., Duan, L., Xiong, Q., Jin, Z., Yang, C., & Chen, Y. (2021). The role of m<sup>6</sup>A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00450-x>
33. Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., & Wakabayashi, I. (2001). Chronic Central Infusion of Ghrelin Increases Hypothalamic Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein mRNA Levels and Body Weight in Rats. *Diabetes*, 50(11), 2438–2443. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2438>
34. Knuckles, P., Lence, T., Hausmann, I. U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S. H., Masiello, I., Hares, T., Villaseñor, R., Hess, D., Andrade-Navarro, M. A., Biggiogera, M., Helm, M., Soller, M., Bühler, M., & Roignant, J. Y. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m<sup>6</sup>A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes & Development*, 32(5–6), 415–429. <https://doi.org/10.1101/gad.309146.117>
35. Koh, C. W. Q., Goh, Y. T. & Goh, W. S. S. (2019). Atlas of quantitative single-base-resolution N6-methyl-adenine methylomes. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13561-z>
36. Kretschmer, J., Rao, H., Hackert, P., Sloan, K. E., Höbartner, C., & Bohnsack, M. T. (2018). The m<sup>6</sup>A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5′–3′ exoribonuclease XRN1. *RNA*, 24(10), 1339–1350. <https://doi.org/10.1261/ma.064238.117>
37. Li, A., Chen, Y. S., Ping, X. L., Yang, X., Xiao, W., Yang, Y., Sun, H. Y., Zhu, Q., Baidya, P., Wang, X., Bhattarai, D. P., Zhao, Y. L., Sun, B. F., & Yang, Y. G. (2017).



- Cytoplasmic m<sup>6</sup>A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Research*, 27(3), 444–447. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.10>
38. Li, H. D. (2018). GTFtools: a Python package for analyzing various modes of gene models. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/263517>
39. Li, H. D., Funk, C. C., & Price, N. D. (2020). iREAD: a tool for intron retention detection from RNA-seq data. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6541-0>
40. Lin, S., Liu, J., Jiang, W., Wang, P., Sun, C., Wang, X., Chen, Y., & Wang, H. (2019). METTL3 promotes the proliferation and mobility of gastric cancer cells. *Open Medicine*, 14(1), 25–31. <https://doi.org/10.1515/med-2019-0005>
41. Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., & He, C. (2013). A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N<sup>6</sup>-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
42. Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., & Pan, T. (2015). N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA–protein interactions. *Nature*, 518(7540), 560–564. <https://doi.org/10.1038/nature14234>
43. Lopez, N. Fisiología del apetito y el hambre. *Physiology of appetite and hunger*.
44. Lopez-Delisle, L., Rabbani, L., Wolff, J., Bhardwaj, V., Backofen, R., Grüning, B., Ramírez, F., & Manke, T. (2020). pyGenomeTracks: reproducible plots for multivariate genomic datasets. *Bioinformatics*, 37(3), 422–423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa692>
45. Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
46. Lv, X., Liu, X., Zhao, M., Wu, H., Zhang, W., Lu, Q., & Chen, X. (2021). RNA Methylation in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.696559>
47. Lv, X., Liu, X., Zhao, M., Wu, H., Zhang, W., Lu, Q., & Chen, X. (2021). RNA Methylation in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.696559>

48. Ma, C., Chang, M., Lv, H., Zhang, Z. W., Zhang, W., He, X., Wu, G., Zhao, S., Zhang, Y., Wang, D., Teng, X., Liu, C., Li, Q., Klungland, A., Niu, Y., Song, S., & Tong, W. M. (2018). RNA m<sup>6</sup>A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum. *Genome Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1435-z>
49. Ma, H., Wang, X., Cai, J., Dai, Q., Natchiar, S. K., Lv, R., Chen, K., Lu, Z., Chen, H., Shi, Y. G., Lan, F., Fan, J., Klaholz, B. P., Pan, T., Shi, Y., & He, C. (2018). N6-Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation. *Nature Chemical Biology*, 15(1), 88–94. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0184-3>
50. Mauer, J., Sindelar, M., Despic, V., Guez, T., Hawley, B. R., Vasseur, J. J., Rentmeister, A., Gross, S. S., Pellizzoni, L., Debart, F., Goodarzi, H. & Jaffrey, S. R. (2019). FTO controls reversible m6Am RNA methylation during snRNA biogenesis. *Nature Chemical Biology*, 15(4), 340-347. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0231-8>
51. Méndez-Sánchez, N., Chávez-Tapia, N. C., & Uribe-Esquivel, M. (2006). La ghrelina y su importancia con el eje gastrohipotalámico. *Gaceta médica de México*, 142(1), 49-58
52. Meyer, K. D. & Jaffrey, S. R. (2017). Rethinking m<sup>6</sup>A Readers, Writers, and Erasers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1), 319-342. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060758>
53. Meyer, K. D., & Jaffrey, S. R. (2014). The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(5), 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm3785>
54. Meyer, K., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C., & Jaffrey, S. (2012). Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and near Stop Codons. *Cell*, 149(7), 1635–1646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>
55. Mona, B., Uruena, A., Kollipara, R. K., Ma, Z., Borromeo, M. D., Chang, J. C. & Johnson, J. E. (2017). Repression by PRDM13 is critical for generating precision in neuronal identity. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/elife.25787>

56. Nilsson, I., Johansen, J. E., Schalling, M., Hökfelt, T., & Fetissov, S. O. (2005). Maturation of the hypothalamic arcuate agouti-related protein system during postnatal development in the mouse. *Developmental Brain Research*, 155(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.01.009>
57. Padilla, S. L., Carmody, J. S., & Zeltser, L. M. (2010). Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. *Nature Medicine*, 16(4), 403–405. <https://doi.org/10.1038/nm.2126>
58. Park, O. H., Ha, H., Lee, Y., Boo, S. H., Kwon, D. H., Song, H. K., & Kim, Y. K. (2019). Endoribonucleolytic Cleavage of m<sup>6</sup>A-Containing RNAs by RNase P/MRP Complex. *Molecular Cell*, 74(3), 494–507.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.034>.
59. Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). m<sup>6</sup>A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>
60. Pendleton, K. E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O. V., Xie, Y., Tu, B. P., & Conrad, N. K. (2017). The U6 snRNA m<sup>6</sup>A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell*, 169(5), 824–835.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.003>
61. Peng, S., Xiao, W., Ju, D., Sun, B., Hou, N., Liu, Q., Wang, Y., Zhao, H., Gao, C., Zhang, S., Cao, R., Li, P., Huang, H., Ma, Y., Wang, Y., Lai, W., Ma, Z., Zhang, W., Huang, S., . . . Huang, N. (2019). Identification of entacapone as a chemical inhibitor of FTO mediating metabolic regulation through FOXO1. *Science Translational Medicine*, 11(488). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau7116>
62. Ping, X. L., Sun, B. F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W. J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y. S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y., Dahal, U., Lou, X. M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W. P., Zhu, X. F., . . . Yang, Y. G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research*, 24(2), 177–189. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>
63. Pinto, R., Vågbo, C. B., Jakobsson, M. E., Kim, Y., Baltissen, M. P., O'Donohue, M. F., Guzmán, U. H., Malecki, J. M., Wu, J., Kirpekar, F., Olsen, J. V., Gleizes, P. E., Vermeulen, M., Leidel, S. A., Slupphaug, G., & Falnes, P. (2019). The human methyltransferase ZCCHC4 catalyses N<sup>6</sup>-methyladenosine modification of 28S

- ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 48(2), 830–846. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1147>
64. Pollard, K. S., Hubisz, M. J., Rosenbloom, K. R., & Siepel, A. (2009). Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Research*, 20(1), 110–121. <https://doi.org/10.1101/gr.097857.109>
65. Ren, W., Lu, J., Huang, M., Gao, L., Li, D., Wang, G. G., & Song, J. (2019). Structure and regulation of ZCCHC4 in m<sup>6</sup>A-methylation of 28S rRNA. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12923-x>
66. Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
67. Roundtree, I. A., & He, C. (2016). Nuclear m<sup>6</sup>A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Trends in Genetics*, 32(6), 320–321. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.03.006>
68. Roundtree, I. A., Luo, G. Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., Cui, Y., Sha, J., Huang, X., Guerrero, L., Xie, P., He, E., Shen, B., & He, C. (2017). YTHDC1 mediates nuclear export of N<sup>6</sup>-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/elife.31311>
69. Ru, W., Zhang, X., Yue, B., Qi, A., Shen, X., Huang, Y., Lan, X., Lei, C., & Chen, H. (2020). Insight into m<sup>6</sup>A methylation from occurrence to functions. *Open Biology*, 10(9), 200091. <https://doi.org/10.1098/rsob.200091>
70. Shafik, A. M., Zhang, F., Guo, Z., Dai, Q., Pajdzik, K., Li, Y., Kang, Y., Yao, B., Wu, H., He, C., Allen, E. G., Duan, R., & Jin, P. (2021). N<sup>6</sup>-methyladenosine dynamics in neurodevelopment and aging, and its potential role in Alzheimer's disease. *Genome Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02249-z>
71. Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., Hsu, P. J., Liu, C., & He, C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N<sup>6</sup>-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*, 27(3), 315–328. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.15>
72. Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J. S., Hinrichs, A. S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L. W., Richards, S., Weinstock, G. M., Wilson, R. K., Gibbs, R. A., Kent, W. J., Miller, W., & Haussler, D. (2005). Evolutionarily conserved

- elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Research*, 15(8), 1034–1050. <https://doi.org/10.1101/gr.3715005>
73. Song, T., Yang, Y., Wei, H., Xie, X., Lu, J., Zeng, Q., Peng, J., Zhou, Y., Jiang, S., & Peng, J. (2019). Zfp217 mediates m<sup>6</sup>A mRNA methylation to orchestrate transcriptional and post-transcriptional regulation to promote adipogenic differentiation. *Nucleic Acids Research*, 47(12), 6130–6144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz312>
74. Stoilov, P., Rafalska, I., & Stamm, S. (2002). YTH: a new domain in nuclear proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(10), 495–497. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02189-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02189-8)
75. Van Tran, N., Ernst, F. G., Hawley, B. R., Zorbas, C., Ulryck, N., Hackert, P., Bohnsack, K. E., Bohnsack, M. T., Jaffrey, S. R., Graille, M., & Lafontaine, D. L. (2019). The human 18S rRNA m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Research*, 47(15), 7719–7733. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz619>
76. Wang, L., Egli, D., & Leibel, R. L. (2016). Efficient Generation of Hypothalamic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Current Protocols in Human Genetics*, 90(1). <https://doi.org/10.1002/cphg.3>
77. Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., & He, C. (2013). N<sup>6</sup>-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505(7481), 117–120. <https://doi.org/10.1038/nature12730>
78. Wang, X., Zhao, B., Roundtree, I., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., & He, C. (2015). N<sup>6</sup>-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*, 161(6), 1388–1399. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>
79. Wang, Y., Fontanet, P., Wanderoy, S., Berger, F., Wu, H., Akkuratova, N., Bouçanova, F., Médard, J. J., Petitpré, C., Landy, M. A., Zhang, M. D., Harrer, P., Stendel, C., Stucka, R., Dusl, M., Kastrić, M. E., Croci, L., Lai, H. C., Consalez, G. G., . . . Chrast, R. (2019). PRDM12 Is Required for Initiation of the Nociceptive Neuron Lineage during Neurogenesis. *Cell Reports*, 26(13), 3484–3492.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.098>
80. Wei, J., Liu, F., Lu, Z., Fei, Q., Ai, Y., He, P. C., Shi, H., Cui, X., Su, R., Klungland, A., Jia, G., Chen, J., & He, C. (2018). Differential m<sup>6</sup>A, m<sup>6</sup>Am, and m<sup>1</sup>A Demethylation

- Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. *Molecular Cell*, 71(6), 973–985.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.011>
81. Wen, J., Lv, R., Ma, H., Shen, H., He, C., Wang, J., Jiao, F., Liu, H., Yang, P., Tan, L., Lan, F., Shi, Y. G., He, C., Shi, Y., & Diao, J. (2018). Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m<sup>6</sup>A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Molecular Cell*, 69(6), 1028–1038.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.015>
82. Wojtas, M. N., Pandey, R. R., Mendel, M., Homolka, D., Sachidanandam, R., & Pillai, R. S. (2017). Regulation of m<sup>6</sup>A Transcripts by the 3'→5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germline. *Molecular Cell*, 68(2), 374–387.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.021>
83. Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y. S., Hao, Y. J., Sun, B. F., Sun, H. Y., Li, A., Ping, X. L., Lai, W. Y., Wang, X., Ma, H. L., Huang, C. M., Yang, Y., Huang, N., Jiang, G. B., Wang, H. L., Zhou, Q., Wang, X. J., . . . Yang, Y. G. (2016). Nuclear m<sup>6</sup>A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 61(4), 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>
84. Yoon, K. J., Ringeling, F. R., Vissers, C., Jacob, F., Pokrass, M., Jimenez-Cyrus, D., Su, Y., Kim, N. S., Zhu, Y., Zheng, L., Kim, S., Wang, X., Doré, L. C., Jin, P., Regot, S., Zhuang, X., Canzar, S., He, C., Ming, G. L., & Song, H. (2017). Temporal Control of Mammalian Cortical Neurogenesis by m<sup>6</sup>A Methylation. *Cell*, 171(4), 877–889.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.003>
85. Yu, J., Chen, M., Huang, H., Zhu, J., Song, H., Zhu, J., Park, J., & Ji, S. J. (2017). Dynamic m<sup>6</sup>A modification regulates local translation of mRNA in axons. *Nucleic Acids Research*, 46(3), 1412–1423. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1182>
86. Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., Cheng, T., Gao, M., Shu, X., Ma, H., Wang, F., Wang, X., Shen, B., Wang, Y., Feng, X., He, C., & Liu, J. (2018). VIRMA mediates preferential m<sup>6</sup>A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discovery*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0019-0>
87. Zhang, F., Kang, Y., Wang, M., Li, Y., Xu, T., Yang, W., Song, H., Wu, H., Shu, Q., & Jin, P. (2018). Fragile X mental retardation protein modulates the stability of its m<sup>6</sup>A-

- marked messenger RNA targets. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy292>
88. Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., & Liu, X. S. (2008). Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*, 9(9). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>
89. Zhao, Y., Li, M. C., Konaté, M. M., Chen, L., Das, B., Karlovich, C., Williams, P. M., Evrard, Y. A., Doroshov, J. H., & McShane, L. M. (2021). TPM, FPKM, or Normalized Counts? A Comparative Study of Quantification Measures for the Analysis of RNA-seq Data from the NCI Patient-Derived Models Repository. *Journal of Translational Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02936-w>
90. Zheng, G., Dahl, J., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C., Vågbo, C., Shi, Y., Wang, W. L., Song, S. H., Lu, Z., Bosmans, R., Dai, Q., Hao, Y. J., Yang, X., Zhao, W. M., Tong, W. M., Wang, X. J., Bogdan, F., . . . He, C. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>
91. Zhou, Y., Zeng, P., Li, Y. H., Zhang, Z., & Cui, Q. (2016). SRAMP: prediction of mammalian N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) sites based on sequence-derived features. *Nucleic Acids Research*, 44(10), e91. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw104E>