



杨运桂, 中国科学院北京基因组研究所研究员、中国科学院特聘研究员。主要研究RNA甲基化表观转录组学特征和规律及其调控发育与疾病关联性, 参与发现RNA甲基化修饰酶, 证明RNA甲基化修饰的动态可逆性, 揭示其调控基因剪接和出核等新机制, 以及RNA甲基化调控干细胞定向分化和组织器官发育等重要作用。

http://sourcedb.big.cas.cn/zw/zjrc/yjy/201311/t20131116_3979415.html

RNA m⁶A甲基化修饰概述

张丽媛¹ 杨运桂^{1,2,3*}

¹中国科学院北京基因组研究所精准基因组医学重点实验室, 北京 100101;

²中国科学院干细胞创新研究院, 北京 100101; ³中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 RNA上存在多种修饰形式, 如6-甲基腺嘌呤(m⁶A)、5-甲基胞嘧啶(m⁵C)、1-甲基腺嘌呤(m¹A)和假尿嘧啶等。m⁶A是真核生物mRNA中丰度最高的甲基化修饰形式, 也是目前研究最为透彻的一种RNA修饰类型。随着m⁶A修饰检测和测序技术的发展以及单碱基分辨率等新兴技术的兴起, 多种m⁶A修饰相关的调控蛋白被鉴定, 其调控的生物学功能也得到了更深入的解析。该文主要介绍了m⁶A甲基化修饰的调控蛋白、分布特征及规律、检测技术、生物学功能及其与肿瘤的关联, 并对目前该研究领域面临的主要机遇与挑战进行了讨论。

关键词 RNA修饰; 调控蛋白; 分布特征; 检测技术; RNA生物学功能;

Overview of RNA m⁶A Methylation Modification

Zhang Liyuan¹, Yang Yungui^{1,2,3*}

¹Key Laboratory of Genomic and Precision Medicine, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²Institute of Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract RNA contains multiple modifications, such as N⁶-methyladenosine (m⁶A), 1-methyladenine (m¹A), 5-methylcytosine (m⁵C), pseudouridylation (Ψ), etc., among which m⁶A is the most abundant one that has been most thoroughly studied so far. As the development of m⁶A detecting techniques and the emerging of other novel technologies, such as single base resolution sequencing, a variety of m⁶A modification-related regulatory enzymes have been identified, facilitating the interpretation of their potential biological functions. Here, we mainly focus on the m⁶A regulatory proteins, its distribution features and detecting techniques, as well as its biological functions and correlation with different histological cancers. Future challenges and perspectives of RNA m⁶A modification are also discussed.

Keywords RNA modification; regulatory proteins; distribution features; detecting techniques; RNA biological functions

国家杰出青年科学基金(批准号: 31625016)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-84097642, E-mail: ygyang@big.ac.cn

This work was supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (Grant No.31625016)

*Corresponding author. Tel: +86-10-84097642, E-mail: ygyang@big.ac.cn

网络出版时间: 2019-06-13 17:43:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1743.012.html>

在中心法则中,遗传信息通过转录过程由DNA流向RNA,再通过翻译过程流向蛋白质。随着技术的发展,研究发现DNA、RNA和蛋白质上都存在着化学修饰,其中RNA的化学修饰最为丰富^[1]。目前已鉴定的RNA修饰超过150种,广泛分布于信使RNA(mRNA)、转运RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、非编码小RNA(small non-coding RNA)和长链非编码RNA(lncRNA)等各类RNA上。RNA修饰的种类繁多,不同类型的RNA修饰的含量和功能存在较大差异。RNA甲基化修饰约占RNA修饰的60%以上,是RNA修饰的主要形式之一。常见的RNA甲基化修饰类型有6-甲基腺嘌呤(m⁶A)、5-甲基胞嘧啶(m⁵C)、1-甲基腺嘌呤(m¹A)、5-羟甲基胞嘧啶(hm⁵C)、假尿嘧啶(Ψ)等,它们在胞内行使不同的生物学功能。

m⁶A是真核生物mRNA中丰度最高的甲基化修饰形式,也是目前研究最为透彻的一种RNA修饰类型。mRNA上m⁶A修饰位点附近的序列具有高度保守性,主要发生在RRACH(R: 嘌呤; A: m⁶A; H: 非鸟嘌呤)序列的腺嘌呤上,其功能由甲基转移酶(编码器)、去甲基化酶(消码器)和结合蛋白(读码器)共同调控。目前已发现的甲基转移酶复合物的主要成分包括METTL3、METTL14、WTAP和KIAA1429等,而FTO和ALKBH5作为去甲基化酶可去除甲基化。m⁶A修饰的生物学功能主要通过m⁶A结合蛋白发挥RNA转录后调控作用,目前已知的结合蛋白有YTH结构域蛋白(YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、YTHDC1和YTHDC2)和核不均一核糖核蛋白HNRNP家族蛋白(HNRNPA2B1、HNRNPC和HNRNPG)。近年来,随着RNA修饰检测技术的发展,越来越多的研究表明,m⁶A修饰可以功能性地调节真核生物的转录组,如mRNA的剪接、出核、定位、翻译和稳定等。此外,m⁶A参与了多种生物学过程,如干细胞分化、细胞分裂、配子发生和生物节律等,以及多种疾病的发生,包括肿瘤、肥胖和不育等^[2]。本文从m⁶A修饰出发,论述m⁶A修饰的调控蛋白、分布规律、检测技术、生物学功能及其调控的病理效应。

1 m⁶A修饰及其调控蛋白

细胞中存在着多种RNA甲基转移酶和去甲基化酶,以及各种甲基结合蛋白。在它们的共同作用下,不同种类的RNA经历甲基化和去甲基化的动态变化,进而调节着各种生理过程。m⁶A修饰是迄今

为止研究最为透彻的一种RNA甲基化修饰类型,随着分子生物学检测技术的发展,科学家们相继发现多种m⁶A修饰相关的酶和调控蛋白,并表明它们在发育及病理调控中发挥着重要的作用(表1)。

1.1 m⁶A甲基转移酶——编码器

m⁶A的形成是由多种蛋白组成的甲基转移酶复合物完成的,该复合物包括METTL3、METTL14、WTAP、KIAA29、RBM15/RBM15B、METTL16和ZC3H3蛋白^[3-13]。METTL3是最早被鉴定的m⁶A甲基转移酶组分,也是甲基转移酶复合物的核心组分。研究表明,METTL3通过影响特定靶基因的甲基化修饰,进而调控胚胎发育、细胞重编程、精子发生、T细胞稳态、内皮-造血转化等重要生物学过程。METTL3是高度保守的蛋白,在多个物种中都存在其同源蛋白,并对拟南芥发育和生长、酵母的减数分裂和出芽以及果蝇的神经功能和性别决定都起着重要的调控作用^[14-29]。

METTL14是m⁶A甲基转移酶复合体的另一组分,可与METTL3以1:1的比例形成二聚体直接相互作用,从而增强二者的催化能力^[5]。与METTL3一样,METTL14也参与多种生物学过程的调控。METTL14缺失会导致胚胎干细胞的自我更新和分化受阻、胚胎发育缺陷、配子发生异常^[9,16,30]。METTL14在肿瘤中可能具有组织或肿瘤特异性,前人研究表明,METTL14缺失促进恶性胶质瘤干细胞的生长和自我更新,从而促进肿瘤生长进程^[31];与此不同的是,在急性髓性白血病中METTL14高表达,对其发展和维持起到促进作用^[32]。

WTAP也是甲基转移酶复合物中的一个组分,可与METTL3和METTL14形成复合物,加速m⁶A甲基化的形成并调控其动态变化^[4-5]。WTAP缺失会导致组织分化缺陷,Wtap缺失的斑马鱼胚胎凋亡增加^[4]。在超过30%的急性髓性白血病病人中,WTAP的表达上调,暗示其可能扮演着促癌因子的作用^[33]。

研究还发现了m⁶A甲基转移酶复合体的另一新亚基KIAA1429,能够催化mRNA中m⁶A的形成。果蝇中KIAA1429的同源蛋白和WTAP的同源蛋白相互作用,通过影响Sxl基因的pre-mRNA选择性剪接调控性别决定^[34-35]。人A549细胞中KIAA1429也发挥重要作用,敲低KIAA1429导致m⁶A修饰水平的降低,且降低程度大于METTL3和METTL14敲低后引起的m⁶A水平变化^[6]。

表1 m⁶A调节蛋白的主要功能
Table 1 The functions of m⁶A regulatory proteins

蛋白类型	调节蛋白	主要功能	参考文献
Protein types	Regulatory proteins	Main functions	References
Methyltransferases/writers	METTL3	Modulates embryonic development in association with METTL1	[7]
		Regulates cell reprogramming	[5,14]
		Regulates the spermatogenesis process	[12]
		Regulates T-cell homeostasis	[15]
		Regulates endothelial-to-hematopoietic transition in zebrafish	[16]
	METTL14	Involved in embryonic stem cell self-renewal and differentiation	[14]
		Involved in gametogenesis in multiple organisms	[28]
		Plays a critical oncogenic role in the progression and maintenance of AML	[30]
	WTAP	Involved in zebrafish embryo development and tissue differentiation	[2]
		Involved in AML oncogenesis	[31]
	KIAA1429	Involved in the <i>Drosophila</i> sex determination pathway	[32-33]
RBM15/RBM15B	Directs the methylation of adenosine residues in both mRNAs and the lncRNA like XIST	[8]	
METTL16	Controls cellular SAM level and installs m ⁶ A onto the U6 small nuclear RNA	[1]	
ZC3H3	Involved in mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation	[10]	
	Involved in the <i>Drosophila</i> sex determination pathway	[11]	
Demethylases/erasers	FTO	Regulates pre-adipocyte differentiation in mice adipose tissue	[35]
		Promotes cell growth and self-renewal of human glioblastoma stem cells	[18]
		Associated with increased body mass and obesity in human	[34,36-37]
	ALKBH5	Impacts mouse spermatogenesis and fertility	[38]
		Required for the proliferation and tumorigenesis of glioblastoma stem cells and predicts poor patient survival	[39]
	Impacts tumor initiation in human breast cancer cells	[40]	
Binding proteins/readers	YTHDF1	Interacts with the translation initiation machinery and enhances the translation efficiency of its target RNAs	[41]
	YTHDF2	Accelerates the degradation of m ⁶ A-modified transcripts	[42]
		Accelerates the m ⁶ A-modified maternal mRNA clearance in zebrafish	[43]
		Involved in the endothelial-to-hematopoietic transition in zebrafish	[16]
		Determines oocyte competence and early zygotic development in mouse	[44]
	YTHDF3	Regulates mRNA translation, together with YTHDF1	[44-45]
		Mediates mRNA decay by directly interacting with YTHDF2	[44]
	YTHDC1	Promotes exon inclusion by selectively recruiting or inhibiting different splicing factors	[49]
		Recognizes m ⁶ A on XIST and promotes XIST-mediated X-chromosome silencing	[8]
Facilitates the nuclear export of m ⁶ A-modified mRNAs		[50]	
YTHDC2	Involved in spermatogenesis and oogenesis	[47-48]	
HNRNPA2B1	Binds on m ⁶ A-modified RNA, regulates alternative splicing events, and plays a key role in primary microRNA processing	[51]	
HNRNPC/HNRNPG	Regulates the processing of m ⁶ A-modified RNA transcripts	[52-53]	

近期研究还发现, RBM15及RBM15B参与一些 mRNA和非编码RNA XIST上的m⁶A形成^[10]。此外, METTL3的同源蛋白METTL16, 能够介导U6 snRNA的m⁶A形成, 及其mRNA的甲基化^[3]。2018年, 在小鼠和果蝇中分别鉴定到了m⁶A甲基化复合物的一个新

的组分ZC3H13, 其通过促进m⁶A甲基化调控小鼠胚胎干细胞的自我更新及其果蝇的性别决定^[11-13]。m⁶A修饰可能还存在更多的甲基转移酶, 有待被发掘。

1.2 m⁶A的去甲基化酶——消码器

m⁶A修饰具有动态性和可逆性, 主要通过去甲

基化酶FTO或ALKBH5催化主动完成去甲基化。目前已经鉴定到两个m⁶A去甲基化酶FTO和ALKBH5,两者均属于ALKB双加氧酶家族蛋白,并依赖辅因子Fe²⁺和 α -酮戊二酸行使催化功能。FTO是最早发现的m⁶A去甲基化酶,FTO催化m⁶A去甲基化的过程要经历两步反应,产生两种中间产物hm⁶A和fm⁶A^[36]。在小鼠脂肪前体细胞中,FTO通过调控脂肪因子的m⁶A水平影响剪接因子SRSF2的结合来调控mRNA前体(pre-mRNA)剪接,进而调控小鼠脂肪前体细胞分化^[37]。在人恶性胶质瘤干细胞中,FTO促进细胞生长、自我更新和肿瘤发生^[20]。此外,FTO调节异常与肥胖、大脑畸形和生长迟缓相关,揭示m⁶A可能对这些疾病具有重要的调节作用^[36,38-39]。FTO去甲基化作用的发现首次揭示了RNA化学修饰存在可逆性,奠定了RNA甲基化表观转录组学研究新领域的理论基础。

ALKBH5是ALKB家族中另一个被发现具有去甲基化作用的成员,以RNAaseA敏感的方式与核小斑(nuclear speckle)共定位。与FTO的氧化去甲基化不同,ALKBH5可直接催化m⁶A甲基化腺苷去除甲基化,而不产生中间产物^[40]。ALKBH5在多种组织中均有表达,其中睾丸中的表达最高,Alkbh55敲除小鼠表现出精子发生障碍和雄性不育^[40]。此外,ALKBH5高表达是恶性胶质瘤干细胞的增殖和肿瘤形成所必需的^[41];ALKBH5敲低的人乳腺癌细胞MDA-MB-231,其肿瘤生成能力明显降低^[42]。除了FTO和ALKBH5,更多的m⁶A去甲基化酶有待进一步发现。

1.3 m⁶A结合蛋白——读码器

m⁶A广泛存在于生物体内并发挥着重要的生物学功能,其修饰水平受到甲基转移酶和去甲基化酶活性的动态调控。m⁶A修饰的RNA序列结构倾向于保持单链状态,可能与其结合蛋白的识别及协同作用相关。目前,已知的哺乳动物中存在的m⁶A结合蛋白主要有细胞质内的m⁶A结合蛋白YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3和YTHDC2,以及细胞核内的结合蛋白YTHDC1、HNRNPA2B1、HNRNPC和HNRNPG。

YTHDF1可促进m⁶A修饰的mRNA分子的核糖体加载,并且通过与翻译起始因子相互作用提高靶mRNA的翻译效率^[43]。YTHDF2与介导mRNA翻译的rRNA竞争性结合甲基化的转录本,进而影响RNA的半衰期,加速RNA的降解,影响mRNA的稳定

性^[44]。YTHDF2对斑马鱼母源mRNA的清除、内皮-造血转化过程中造血干细胞的产生、小鼠早期合子发育以及热激过程中的翻译调控至关重要^[18,45-47]。YTHDF3与YTHDF1和YTHDF2的相互作用,可增强YTHDF3和YTHDF1对底物m⁶A-mRNA的结合,进而促进m⁶A-mRNA的蛋白翻译效率或者降解^[48-49]。YTHDC2也位于细胞质中,可通过结合m⁶A保守基序而增强底物的翻译效率^[50]。YTHDC2的m⁶A结合能力及招募5'→3'核酸外切酶XRM1的能力在维持精子发育过程中减数分裂相关基因的正确表达中发挥重要作用^[51-52]。

YTHDC1定位在细胞核中的YT小体,其在核小斑处形成特定结构,并与mRNA剪接因子相互作用调控含有m⁶A的外显子的剪接^[53];YTHDC1也能够促进XIST介导的X染色体沉默过程^[10];YTHDC1还可以与SRSF3和RNA出核因子1(NXF1)互作,从而促进m⁶A修饰的mRNA出核^[54]。此外,HNRNP家族成员HNRNPA2B1在体内和体外均能结合m⁶A修饰的RNA底物,并调控mRNA的选择性剪接和前体miRNA的加工^[55];而HNRNPC和HNRNPG虽不能直接结合m⁶A位点,但可通过识别并结合m⁶A依赖的结构开关,介导含有m⁶A甲基化修饰的转录本的选择性剪接过程^[56-57]。除了目前已知的这些结合蛋白,其他可能存在的m⁶A结合蛋白也在探索发现中。

2 m⁶A修饰的分布特征

m⁶A是mRNA中除了5' m⁷G帽子结构外,含量最高的甲基化修饰。为了研究m⁶A修饰的位置和分布特征,研究人员采用一种基于m⁶A抗体富集结合高通量测序的MeRIP-seq或m⁶A-seq方法首次绘制了m⁶A修饰在人类和小鼠整个转录组范围内的分布图谱,并揭示了它们的分布特征及规律^[58-59]。m⁶A修饰在mRNA上的分布具有序列特异性,倾向于发生在保守基序RRACH(R=G、A; H=A、C或U)中。其在mRNA上的分布具有一定偏好性,主要分布在转录起始区(TSS)、序列编码区(coding sequence, CDS)和3'非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR),特别是在CDS的终止密码子附近以及3'UTR的前1/4处显著富集,且该分布特征在人类及小鼠中是高度保守的。mRNA的3'UTR区域是miRNA的靶向结合区域,表明m⁶A修饰可能参与调控miRNA的功能^[43,58-59]。此外,研究还发现,m⁶A修饰位点在剪接位点附近的外显子

区间、初级miRNA(pri-miRNA)和转录本的最后一个外显子(last exon)中也存在高度富集^[53,55,60-61]。

除了人类和小鼠,拟南芥和水稻等植物以及酵母的m⁶A分布特征及规律近年也得到了揭示。在拟南芥中,m⁶A富集在起始密码子、终止密码子附近和3'UTR区域,并含有保守基序RRACH,且不同生态环境选取的两种拟南芥甲基化位点高度一致^[62]。在水稻中,通过m⁶A-seq技术对水稻愈伤组织与叶片组织进行全转录组m⁶A的深度测序,揭示了水稻m⁶A修饰谱的基本特征,即平均每个mRNA中有2~3个m⁶A修饰位点,并主要分布在序列编码区、3'UTR区和起始密码子区^[63]。此外,研究发现,无论在拟南芥还是水稻中,m⁶A的甲基化均存在组织或细胞的特异性和选择性。在酵母中,m⁶A修饰倾向于分布在转录本的3'端,并含有保守基序RGAC,且在两种酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*和*S. mikatae*)中是保守存在的^[29]。

除了mRNA之外,多种非编码RNA,如tRNA、rRNA、snRNA、snoRNA及lncRNA也存在m⁶A的修饰,m⁶A对这些非编码RNA结构以及功能的发挥有着非常重要的意义。m⁶A在初级miRNA(pri-miRNA)中显著富集,并可以通过结合蛋白HNRNPA2B1的结合进而招募DGCR8促进miRNA的加工成熟^[55,61]。研究还发现,在XIST、MALAT1等长链非编码上也存在m⁶A修饰,并表明m⁶A修饰可以影响MALAT1茎环结构的形成,且促进XIST招募结合蛋白YTHDC1,进而影响X染色体基因的转录抑制^[10,56]。

3 RNA m⁶A修饰的检测技术

为了检测RNA修饰的含量和位置,研究人员利用液相色谱、质谱和高通量测序等技术开发了多种定量或定点的RNA修饰检测方法。目前,常用的RNA定量检测的技术主要包括二维纤维素薄层析(two-dimensional cellulose thin-layer chromatography, 2D-TLC)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和液相色谱与质谱联用(coupling of liquid chromatography to mass spectrometry, LC-MS)三种方法。RNA定点检测技术从过去的通量较低的引物延伸技术和SCARLE技术,逐步发展到现在常用的高通量测序技术。目前较为成熟的高通量测序技术为基于m⁶A抗体的MeRIP-seq(methylated RNA immunoprecipitation sequencing)、m⁶A-seq、

PA-m⁶A-seq(photo-crosslinking-assisted m⁶A sequencing)和miCLIP(methylation individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation)等技术。

3.1 RNA m⁶A修饰的定量检测技术

二维纤维素薄层析技术分离法(2D-TLC)进行RNA修饰检测的原理是基于不同的碱基极性不同,结合³²P标记的高灵敏性,实现对于不同核苷酸修饰的分离以及定量^[64]。该方法具有便于操作和灵敏度高的优点,由于实验中需要使用RNase进行酶切,而RNase酶在消化时有碱基偏好性,并且³²P对于不同的修饰标记效率也有所差异,因此2D-TLC的检测结果有碱基偏好性的缺点。

高效液相色谱检测技术(HPLC)也是基于不同核苷的极性差异的特点来实现分离,该方法可以快速检测和定量RNA修饰^[65]。与2D-TLC相比,其大大节省单次反应的时间,但是由于UV分光光度计的灵敏度有限,HPLC只适用于高丰度RNA修饰的研究。此外,HPLC利用保留时间对核苷进行分离及鉴定,因此该方法并不适用保留时间相近的核苷。

液相色谱与质谱联用检测技术(LC-MS)是一种基于HPLC的研究手段,但与HPLC利用UV分光光度计对核苷进行检测不同。该方法是在HPLC分离后,使用质谱对核苷进行检测,进而大大提高检测的灵敏度。利用液相色谱与质谱联用技术,不仅可以定量检测高丰度的tRNA上的修饰在不同刺激条件下的动态变化,还可以检测含量较低的mRNA上的修饰^[66]。

3.2 RNA m⁶A修饰的高通量测序技术

MeRIP-seq和m⁶A-seq技术是最早开发和应用最广的m⁶A测序技术。这两种方法首先片段化RNA,并通过IP获得只含有m⁶A的片段,随后与使用IgG做IP的对照样本进行对比,即可以看到m⁶A附近区域的富集峰。峰的宽度和片段化的长度有关,通常在100~200 nt。由于m⁶A在碱基配对中也是和胸腺嘧啶配对,只能通过之前已知的m⁶A的特异周围序列RRACH(R=purine, H=A, C或U)来进行推测,通常在一个峰中会存在1~3个可能的m⁶A位点^[29,58-59]。因此,此类方法获得的m⁶A分辨率较低。

PA-m⁶A-seq技术是将传统的m⁶A-seq技术和PAR-CLIP技术相结合,开发出高分辨率的m⁶A测序技术^[67]。PAR-CLIP技术的主要特点是运用具有光活

性的核糖核苷类似物如4-硫尿苷(4-thiouridine, 4sU)或者6-硫鸟嘌呤(6-thioguanosine, 6sG)处理细胞,从而使新生成的mRNA上会被掺入这些类似物^[68]。经365 nm的紫外光短时间照射后,具有光活性的类似物会与RNA结合蛋白上位置接近的氨基酸残基发生反应,而反应产物会在反转录反应中导致碱基错配,据此可以比较精确地确定RNA与蛋白的作用位点。PA-m⁶A-seq技术基于m⁶A-seq和PAR-CLIP的原理,首先使用4sU对HeLa细胞进行适当时间的处理,然后用oligo-dT的磁珠纯化得到含有4sU的mRNA,随后针对全长的mRNA,用m⁶A抗体进行免疫沉淀。在抗体和RNA孵育之后,用365 nm的紫外光照射IP体系来诱导交联,然后用RNase T1消化RNA到30 nt左右。根据4sU交联后会产生突变的特性,在数据分析时,可以根据富集峰中是否存在T到C的突变来去除假阳性;此外,交联后RNase T1的高效切割使得PA-m⁶A-seq可以达到23 nt左右的分辨精度。相较于MeRIP-seq和m⁶A-seq技术,PA-m⁶A-seq技术在测序精度上有了突破性的进步。

为了精确测定m⁶A位点的具体位置,miCLIP和m⁶A-CLIP技术应运而生^[60,69]。基于在iCLIP技术中,利用m⁶A抗体可能在紫外交联后共价结合在碱基上的氨基酸残基可以导致反转录终止的特点,从而可以作为特异识别标记用来确定m⁶A的位点。miCLIP技术开发过程中的研究发现,Abcam公司的抗体倾向于在m⁶A的3'端后一位引入C到T的碱基错配,而SySy公司的抗体则会有大概率引入特异性的反转录终止,因此,miCLAP技术中一般采用SySy公司的抗体。利用筛选到的抗体,对mRNA样品进行处理和测序文库构建。生物信息学分析结果显示,该方法可以准确地得到m⁶A的位置,同时具有很高的信噪比和敏感性。此外,对于其他有高特异性抗体的修饰,也可以参考此方法建立类似的单碱基分辨率测序方法。

4 m⁶A 修饰的生物学功能

随着分子生物学的发展,越来越多的研究表明,m⁶A修饰在转录后水平上调控RNA的翻译、剪切、运输、定位和稳定性等。m⁶A修饰在斑马鱼早期发育、果蝇性别决定、T细胞稳态、抗病毒免疫、脑发育、生物节律、精子发生以及造血干细胞定向分化等真核生物的各种生物学过程和个体发育中发挥着非常

重要的作用。

4.1 m⁶A调控脑发育及记忆形成

在各个组织器官中,大脑是m⁶A及其识别蛋白表达最为丰富的器官之一。研究表明,m⁶A相关的调控蛋白在大脑皮层、突触的功能、轴突再生、神经干细胞自我更新以及小脑发育中行使重要的功能^[70-78]。研究发现,小鼠的中枢神经系统中特异地敲除*Mettl14*会严重影响小鼠大脑皮质的发育^[70],而特异地敲除*Mettl3*严重影响大脑皮层和小脑的发育,导致小鼠出现严重的运动功能障碍,并伴随哺乳期死亡^[71];随后的研究发现,小鼠前额叶中m⁶A丰度会随着学习训练增加,提示m⁶A修饰与小鼠记忆形成具有一定相关性^[72],且在乳鼠的皮层及海马区中特异性地敲除*Mettl3*,会引起小鼠学习能力明显下降^[73]。此外,m⁶A也可定位到树突中,通过调控局部转录组影响突触可塑性^[74]。近期的研究进一步发现,*Ythdf1*敲除的小鼠中,海马区相关的学习和记忆功能发生障碍,海马区神经元兴奋性突触的功能和可塑性也被损伤,进而影响了记忆的形成^[75]。该研究首次揭示了RNA的m⁶A修饰在学习记忆中的关键作用,为进一步探索记忆形成过程奠定了基础。

4.2 m⁶A与配子发生

METTL3普遍表达于人体组织,但在睾丸中的表达水平高得多。METTL3介导的m⁶A修饰调控精子发生过程相关基因的可变剪接和基因表达,从而调控精子发生过程。在酿酒酵母中,*METTL3*的同源基因*IME4*敲除导致啤酒酵母中m⁶A修饰减少,进而导致孢子形成缺陷^[24];拟南芥中,*METTL3*的同源基因*MTA*失活导致RNA m⁶A修饰缺陷,使种子形成致死表型或发育停滞在球形期^[25];果蝇中,*METTL3*的同源基因*IME4*对卵泡发育调控的Notch信号调节是必不可少的^[21]。小鼠中,*Mettl3*敲除小鼠呈现精原干细胞的异常分化和减数分裂起始受阻^[14]。

m⁶A去甲基化酶ALKBH5在小鼠睾丸中的表达水平远远高于其他组织。在小鼠中敲除*Alkbh5*导致睾丸萎缩,质量变轻,精子数量减少和质量下降,同时还会引起细胞凋亡、生育率下降等生殖功能障碍。进一步研究发现,*Alkbh5*基因敲除导致小鼠生精小管细胞中mRNA的m⁶A甲基化水平升高,并且精母细胞的减数分裂也受到影响,说明ALKBH5催化mRNA中m⁶A去甲基化在小鼠的精子发生等生理功能中起着重要的调控作用^[40]。近期研究发现,

YTHDF2调控雌性小鼠的生育能力。*Ythdf2*缺失不影响MII时期的卵子数目及受精过程,但可导致二细胞时期异常的微核和无核化胚胎的出现^[46]。此外,*Ythdc2*敲除使得小鼠丧失生育能力,雄性小鼠的睾丸和雌性小鼠的卵巢都显著减小。在野生型雄性小鼠睾丸中,减数分裂开始时,*Ythdc2*的表达上调,而*Ythdc2*敲除的小鼠睾丸中,生殖细胞被阻断在粗线期,不能产生正常的精子^[79]。

4.3 m⁶A调控造血干细胞的定向分化

脊椎动物的造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)是由生血内皮细胞,通过内皮-造血转化过程定向分化而来^[80-82]。已有的研究表明,m⁶A参与调控胚胎干细胞的命运决定过程^[16,83]。在斑马鱼胚胎中,*Mettl3*缺失导致造血干细胞不能正常产生,血管内皮的特性却有明显增强,意味内皮-造血转化过程受到阻断。结合m⁶A-Seq和RNA-Seq分析发现,一系列动脉内皮发育相关的基因,尤其是*notch1a*,在*Mettl3*缺失的胚胎中m⁶A修饰水平显著降低,而mRNA水平有显著升高,暗示着m⁶A在内皮-造血转化过程中内皮与造血基因表达的平衡调控过程中至关重要。进一步的YTHDF2-RIP-Seq和单碱基分辨率的m⁶A-miCLIP-Seq发现,m⁶A通过YTHDF2介导*notch1a* mRNA稳定性,来维持内皮-造血转化过程内皮细胞和造血细胞基因表达的平衡,进而调控造血干细胞的命运决定^[18]。此外,*Mettl3*敲除小鼠胚胎中也表现出相似的表型^[84]。

4.4 m⁶A与肿瘤

研究发现m⁶A修饰与神经胶质瘤的产生有关。敲除m⁶A甲基转移酶基因*METTL3*和*METTL14*,能够上调多种致癌基因如*ADAM19*、*EPHA3*、*KLF4*的表达,进而促进GSC细胞的生长增殖。相反,过表达*METTL3*或使用FTO选择性抑制剂甲氧苄二氧嘧啶(MA2),则能够抑制胶质瘤干细胞的生长,并延长肿瘤移植小鼠的存活周期^[31]。m⁶A去甲基化酶ALKBH5也参与GSC细胞的增殖和肿瘤产生,分析ALKBH5敲低后细胞基因表达和m⁶A丰度变化,发现细胞周期调控因子*FOXMI*是其下游的靶点,低甲基化促进*FOXMI*的表达上升,诱发神经胶质瘤^[41,85]。

m⁶A修饰也与白血病密切相关。研究发现,近32%的AML患者中WTAP高表达,敲除WTAP可以抑制AML细胞增殖,但具体机制还不清楚^[33]。siRNA降低FTO表达后的白血病细胞增殖减慢且凋亡增多,

首次揭示,m⁶A在白血病发病机制中的重要作用,且FTO还能抑制全反式维甲酸(ATRA)介导的AML细胞分化,降低ATRA的治疗效果^[86]。此外,*METTL3*缺失的人的造血祖细胞和髓性白血病细胞系细胞增殖减慢而分化加速^[87]。

m⁶A与肝细胞癌的发病密切相关。研究发现,肝癌组织中*METTL14*的表达下降,低*METTL14*可能通过降低成熟miRNA水平提高肝癌细胞转移和侵袭能力^[88-89]。研究还发现,miR-145能够作用于m⁶A识别蛋白YTHDF2 mRNA的3'非翻译区,导致YTHDF2的mRNA降低。miR-145与肝癌的发生密切相关并介导肝癌细胞的凋亡,因此,YTHDF2可能也参与肝细胞癌的发病过程^[90]。

此外,研究还发现m⁶A参与乳腺癌的发病机制。低氧刺激促进依赖低氧因子HIF的ALKBH5的高表达,引起多能因子*NANOG* mRNA上m⁶A的去甲基化,低甲基化增加了*NANOG* mRNA的稳定性,进而促进乳腺癌干细胞的维持和转移^[42]。随后,进一步的研究发现,低氧诱导乳腺癌细胞中依赖ZNF217的*NANOG*和*KLF4* mRNA上m⁶A甲基化抑制,且Alkbh5敲除显著降低免疫缺陷小鼠乳腺癌的转移^[91]。

5 结论与展望

m⁶A修饰是目前研究较为透彻的一种RNA修饰。近年来,随着酶学技术的发展,m⁶A修饰酶体系的构成,及其对RNA加工代谢、各种生物学过程以及疾病的调控作用均得到了揭示。然而,m⁶A甲基转移酶复合物的其他组分尚不清楚,细胞组织特异性的去甲基化酶也有待发掘,介导其生物学功能的结合蛋白也有待进一步的发现。另外,RNA修饰时空动态性和组织特异性有待深入验证,而单碱基、高分辨率的高通量测序技术也有待完善。

随着人们对m⁶A甲基化机制的研究逐渐深入,发现与其相关的RNA水平的调控变得更加复杂和多样。m⁶A的结合蛋白是一把“双刃剑”,既能促进mRNA的翻译,又能降低mRNA的稳定性从而加速降解。因此,m⁶A甲基化的双面调控作用,还需要进一步的研究。m⁶A甲基化水平与细胞内甲基转移酶和去甲基化酶的表达量相关,而结合蛋白的表达则影响m⁶A执行一系列生物学功能。在肿瘤生物学中,m⁶A相关的基因和蛋白表达水平的改变都将有可能成为肿瘤分子诊断的潜在标志物,也将为临床靶向

治疗药物的研发提供新的分子靶点。

参考文献 (References)

- 1 Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki TK, *et al.* MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(D1): D303-7.
- 2 Yang Y, Hsu PJ, Chen YS, Yang YG. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Res* 2018; 28(6): 616-24.
- 3 Pendleton KE, Chen B, Liu K, Hunter OV, Xie Y, Tu BP, *et al.* The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell* 2017; 169(5): 824-35.
- 4 Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, *et al.* Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res* 2014; 24(2): 177-89.
- 5 Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu Y, Zhang L, *et al.* A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat Chem Biol* 2014; 10(2): 93-5.
- 6 Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, Wang T, Maciag K, Bushkin GG, *et al.* Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at Internal and 5' sites. *Cell Rep* 2014; 8(1): 284-96.
- 7 Chen T, Hao YJ, Zhang Y, Li MM, Wang M, Han W, *et al.* m⁶A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2015; 16(3): 289-301.
- 8 Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, Narayan P, Rottman F. Characterization and partial purification of mRNA N⁶-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *J Biol Chem* 1994; 269(26): 17697-704.
- 9 Wang Y, Li Y, Toth JI, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC. N⁶-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2014; 16(2): 191-8.
- 10 Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M. *et al.* m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature* 2016; 537(7620): 369-73.
- 11 Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, Jacob D, Kreim N, Carl SH, *et al.* Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/FI(2)d. *Genes Dev* 2018; 32(5-6): 415-29.
- 12 Wen J, Lv R, Ma H, Shen H, He C, Wang J, *et al.* Zc3h13 regulates nuclear RNA m⁶A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell* 2018; 69(6): 1028-38.
- 13 Guo J, Tang HW, Li J, Perrimon N, Yan D. Xio is a component of the *Drosophila* sex determination pathway and RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(14): 3674-9.
- 14 Xu K, Yang Y, Feng GH, Sun BF, Chen JQ, Li YF, *et al.* Mettl3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Res* 2017; 27(9): 1100-14.
- 15 Aguilo F, Zhang F, Sancho A, Fidalgo M, Di Cecilia S, Vashisht A, *et al.* Coordination of m⁶A mRNA methylation and gene transcription by ZFP217 regulates pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2015; 17(6): 689-704.
- 16 Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, Mansour AA, Kol N, Salmon-Divon M, *et al.* m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation. *Science* 2015; 347(6225): 1002-6.
- 17 Li HB, Tong J, Zhu S, Batista PJ, Duffy EE, Zhao J, *et al.* m⁶A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature* 2017; 548(7667): 338-42.
- 18 Zhang C, Chen Y, Sun B, Wang L, Yang Y, Ma D, *et al.* m⁶A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature* 2017; 549(7671): 273-6.
- 19 Lence T, Akhtar J, Bayer M, Schmid K, Spindler L, Ho CH, *et al.* m⁶A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature* 2016; 540(7632): 242-7.
- 20 Haussmann IU, Bodi Z, Sanchez-Moran E, Mongan NP, Archer N, Fray RG, *et al.* m⁶A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust *Drosophila* sex determination. *Nature* 2016; 540(7632): 301-4.
- 21 Hongay CF, Orr-Weaver TL. *Drosophila* inducer of MEiosis 4 (IME4) is required for Notch signaling during oogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(36): 14855-60.
- 22 Clancy MJ, Shambaugh ME, Timpte CS, Bokar JA. Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N⁶-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the IME4 gene. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(20): 4509-18.
- 23 Shah JC, Clancy MJ. IME4, a gene that mediates MAT and nutritional control of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1992; 12(3): 1078-86.
- 24 Bodi Z, Button JD, Grierson D, Fray RG. Yeast targets for mRNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(16): 5327-35.
- 25 Zhong S, Li H, Bodi Z, Button J, Vespa L, Herzog M, *et al.* MTA is an Arabidopsis messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell* 2008; 20(5): 1278-88.
- 26 Agarwala SD, Blitzblau HG, Hochwagen A, Fink GR. RNA methylation by the MIS complex regulates a cell fate decision in yeast. *PLoS Genet* 2012; 8(6): e1002732.
- 27 Bodi Z, Zhong S, Mehra S, Song J, Graham N, Li H, *et al.* Adenosine methylation in Arabidopsis mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Front Plant Sci* 2012; 3: 48.
- 28 Bujnicki JM, Feder M, Radlinska M, Blumenthal RM. Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA : m⁶A methyltransferase. *J Mol Evol* 2002; 55(4): 431-44.
- 29 Schwartz S, Agarwala SD, Mumbach MR, Jovanovic M, Mertins P, Shishkin A, *et al.* High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation program in yeast meiosis. *Cell* 2013; 155(6): 1409-21.
- 30 Lin Z, Hsu PJ, Xing X, Fang J, Lu Z, Zou Q, *et al.* Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N⁶-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res* 2017; 27(10): 1216-30.
- 31 Cui Q, Shi H, Ye P, Li L, Qu Q, Sun G, *et al.* m⁶A RNA methylation regulates the self-renewal and tumorigenesis of

- glioblastoma stem cells. *Cell Rep* 2017; 18(11): 2622-34.
- 32 Weng H, Huang H, Wu H, Qin X, Zhao BS, Dong L, *et al.* METTL14 inhibits hematopoietic stem/progenitor differentiation and promotes leukemogenesis via mRNA m⁶A modification. *Cell Stem Cell* 2018; 22(2): 191-205.
- 33 Bansal H, Yihua Q, Iyer SP, Ganapathy S, Proia DA, Penalva LO, *et al.* WTAP is a novel oncogenic protein in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2014; 28(5): 1171-4.
- 34 Ortega A, Niksic M, Bachi A, Wilm M, Sánchez L, Hastie N, *et al.* Biochemical function of female-lethal (2)D/Wilms' tumor suppressor-1-associated proteins in alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 2003; 278(5): 3040-7.
- 35 Granadino B, Campuzano S, Sanchez L. The *Drosophila melanogaster* fl(2)d gene is needed for the female-specific splicing of Sex-lethal RNA. *EMBO J* 1990; 9(8): 2597-602.
- 36 Fu Y, Jia G, Pang X, Wang RN, Wang X, Li CJ, *et al.* FTO-mediated formation of N⁶-hydroxymethyladenosine and N⁶-formyladenosine in mammalian RNA. *Nat Commun* 2013; 4: 1798.
- 37 Zhao X, Yang Y, Sun BF, Shi Y, Yang X, Xiao W, *et al.* FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res* 2014; 24(12): 1403-19.
- 38 Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, *et al.* Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007; 39(6): 724-6.
- 39 Boissel S, Reish O, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Sedgwick B, Yeo GS, *et al.* Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet* 2009; 85(1): 106-11.
- 40 Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, *et al.* ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell* 2013; 49(1): 18-29.
- 41 Zhang S, Zhao BS, Zhou A, Lin K, Zheng S, Lu Z, *et al.* m⁶A demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program. *Cancer Cell* 2017; 31(4): 591-606.
- 42 Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, *et al.* Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(14): E2047-56.
- 43 Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, *et al.* N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell* 2015; 161(6): 1388-99.
- 44 Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, *et al.* N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* 2014; 505(7481): 117-20.
- 45 Zhao BS, Wang X, Beadell AV, Lu Z, Shi H, Kuuspalu A, *et al.* m⁶A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature* 2017; 542(7642): 475-8.
- 46 Ivanova I, Much C, Di Giacomo M, Azzi C, Morgan M, Moreira PN, *et al.* The RNA m⁶A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence. *MolCell* 2017; 67(6): 1059-67.
- 47 Zhou J, Wan J, Gao X, Zhang X, Jaffrey SR, Qian SB. Dynamic m⁶A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature* 2015; 526(7574): 591-4.
- 48 Shi H, Wang X, Lu Z, Zhao BS, Ma H, Hsu PJ, *et al.* YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res* 2017; 27(3): 315-28.
- 49 Li A, Chen YS, Ping XL, Yang X, Xiao W, Yang Y, *et al.* Cytoplasmic m⁶A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res* 2017; 27(3): 444-7.
- 50 Wojtas MN, Pandey RR, Mendel M, Homolka D, Sachidanandam R, Pillai RS. Regulation of m⁶A transcripts by the 3'→5' RNA helicase YTHDC2 is essential for a successful meiotic program in the mammalian germline. *Mol Cell* 2017; 68(2): 374-87.
- 51 Abby E, Tourpin S, Ribeiro J, Daniel K, Messiaen S, Moison D, *et al.* Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nat Commun* 2016; 7: 10324.
- 52 Soh YQS, Mikedis MM, Kojima M, Godfrey AK, de Rooij DG, Page DC. Meioc maintains an extended meiotic prophase I in mice. *PLoS Genet* 2017; 13(4): e1006704.
- 53 Xiao W, Adhikari S, Dahal U, Chen YS, Hao YJ, Sun BF, *et al.* Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Mol Cell* 2016; 61(4): 507-19.
- 54 Roundtree IA, Luo GZ, Zhang Z, Wang X, Zhou T, Cui Y, *et al.* YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs. *eLife* 2017; 6: e31311.
- 55 Alarcon CR, Goodarzi H, Lee H, Liu X, Tavazoie S, Tavazoie SF, *et al.* HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell* 2015; 162(6): 1299-308.
- 56 Liu N, Dai Q, Zheng G, He C, Parisien M, Pan T. N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 2015; 518(7540): 560-4.
- 57 Liu N, Zhou KI, Parisien M, Dai Q, Diatchenko L, Pan T. N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(10): 6051-63.
- 58 Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, *et al.* Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature* 2012; 485(7397): 201-6.
- 59 Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 2012; 149(7): 1635-46.
- 60 Ke S, Alemu EA, Mertens C, Gantman EC, Fak JJ, Mele A, *et al.* A majority of m⁶A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev* 2015; 29(19): 2037-53.
- 61 Alarcon CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N⁶-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* 2015; 519(7544): 482-5.
- 62 Luo GZ, MacQueen A, Zheng G, Duan H, Dore LC, Lu Z, *et al.* Unique features of the m⁶A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 2014; 5: 5630.
- 63 Li Y, Wang X, Li C, Hu S, Yu J, Song S. Transcriptome-wide N⁶-methyladenosine profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors involved in selective mRNA modification. *RNA Biol* 2014; 11(9): 1180-8.
- 64 Grosjean H, Keith G, Droogmans L. Detection and quantification

- of modified nucleotides in RNA using thin-layer chromatography. *Methods Mol Biol* 2004; 265: 357-91.
- 65 Nees G, Kaufmann A, Bauer S. Detection of RNA modifications by HPLC analysis and competitive ELISA. *Methods Mol Biol* 2014; 1169: 3-14.
- 66 Chan CT, Dyavaiah M, DeMott MS, Taghizadeh K, Dedon PC, Begley TJ. A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet* 2010; 6(12): e1001247.
- 67 Chen K, Lu Z, Wang X, Fu Y, Luo GZ, Liu N, *et al.* High-resolution N⁶-methyladenosine (m⁶A) map using photocrosslinking-assisted m(6) A sequencing. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015; 54(5): 1587-90.
- 68 Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 2010; 141(1): 129-41.
- 69 Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, Meydan C, Mason CE, Jaffrey SR. Single-nucleotide-resolution mapping of m⁶A and m⁶Am throughout the transcriptome. *Nat Methods* 2015; 12(8): 767-72.
- 70 Yoon KJ, Ringeling FR, Vissers C, Jacob F, Pokrass M, Jimenez-Cyrus D, *et al.* Temporal control of mammalian cortical neurogenesis by m⁶A methylation. *Cell* 2017; 171(4): 877-89.
- 71 Wang CX, Cui GS, Liu X, Xu K, Wang M, Zhang XX, *et al.* METTL3-mediated m⁶A modification is required for cerebellar development. *PLoS Biol* 2018; 16(6): e2004880.
- 72 Widagdo J, Zhao QY, Kempen MJ, Tan MC, Ratnu VS, Wei W, *et al.* Experience-Dependent accumulation of N⁶-Methyladenosine in the prefrontal cortex is associated with memory processes in mice. *J Neurosci* 2016; 36(25): 6771-7.
- 73 Zhang Z, Wang M, Xie D, Huang Z, Zhang L, Yang Y, *et al.* METTL3-mediated N⁶-methyladenosine mRNA modification enhances long-term memory consolidation. *Cell Res* 2018; 28(11): 1056-61.
- 74 Merkurjev D, Hong WT, Iida K, Oomoto I, Goldie BJ, Yamaguti H, *et al.* Synaptic N⁶-methyladenosine (m⁶A) epitranscriptome reveals functional partitioning of localized transcripts. *Nat Neurosci* 2018; 21(7): 1004-14.
- 75 Shi H, Zhang X, Weng YL, Lu Z, Liu Y, Lu Z, *et al.* m⁶A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1. *Nature* 2018; 563(7730): 249-53.
- 76 Wang Y, Li Y, Yue M, Wang J, Kumar S, Wechsler-Reya RJ, *et al.* N⁶-methyladenosine RNA modification regulates embryonic neural stem cell self-renewal through histone modifications. *Nat Neurosci* 2018; 21(2): 195-206.
- 77 Weng YL, Wang X, An R, Cassin J, Vissers C, Liu Y, *et al.* Epitranscriptomic m⁶A regulation of axon regeneration in the adult mammalian nervous system. *Neuron* 2018; 97(2): 313-25.
- 78 Ma C, Chang M, Lü H, Zhang ZW, Zhang W, He X, *et al.* RNA m⁶A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum. *Genome Biol* 2018; 19(1): 68.
- 79 Hsu P J, Zhu Y, Ma H, Guo Y, Shi X, Liu Y, *et al.* Ythdc2 is an N⁶-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res* 2017; 27(9): 1115-27.
- 80 Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 2010; 464(7285): 112-5.
- 81 Boisset JC, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E and Robin C. *In vivo* imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 2010; 464(7285): 116-20.
- 82 Bertrand JY, Chi NC, Santoso B, Teng S, Stainier DY and Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* 2010; 464(7285): 108-11.
- 83 Batista PJ, Molinie B, Wang J, Qu K, Zhang J, Li L, *et al.* m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 15(6): 707-19.
- 84 Lv JH, Zhang YF, Gao SW, Zhang CX, Chen YS, Li W, *et al.* Endothelial-specific m⁶A modulates mouse hematopoietic stem and progenitor cell development via Notch signaling. *Cell Res* 2018; 28(2): 249-52.
- 85 Visvanathan A, Patil V, Arora A, Hegde AS, Arivazhagan A, Santosh V, *et al.* Essential role of METTL3-mediated m⁶A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene* 2018; 37(4): 522-33.
- 86 Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, *et al.* FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N⁶-methyladenosine RNA demethylase. *Cancer Cell* 2017; 31(1): 127-41.
- 87 Vu LP, Pickering BF, Cheng Y, Zaccara S, Nguyen D, Minuesa G, *et al.* The N⁶-methyladenosine (m⁶A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells. *Nat Med* 2017; 23(11): 1369-76.
- 88 Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Brüning JC, *et al.* Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 2009; 458(7240): 894-8.
- 89 Ma JZ, Yang F, Zhou CC, Liu F, Yuan JH, Wang F, *et al.* METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N⁶-methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing. *Hepatology* 2017; 65(2): 529-43.
- 90 Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; 316(5826): 889-94.
- 91 Zhang C, Zhi WI, Lu H, Samanta D, Chen I, Gabrielson E, *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217- and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7(40): 64527-42.