

EL EPITRANSCRIPTOMA: ESCRIBIENDO, BORRANDO Y LEYENDO LA METILACIÓN EN EL RNA MENSAJERO*

Ana Gabriela López Pérez, Alberto de la Cruz Piedra, José Luis Reyes Taboada y Claudia Díaz Camino**

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Cuernavaca, Morelos, México

**Autor de correspondencia correo E: cdiaz.camino@gmail.com

RESUMEN

La metilación en la posición N6 de la adenosina (m⁶A) es la modificación más frecuente encontrada en el RNA mensajero (mRNA) en eucariotes. Es un mecanismo conservado de regulación postranscripcional de la expresión génica que regula el destino y función del mRNA. En esta revisión, se analizan y resumen los avances más recientes sobre m⁶A, así como su papel en la regulación genética. La modificación reversible de m⁶A en los mRNA representa un marcador epigenético novedoso con papeles regulatorios en procesos biológicos fundamentales.

ABSTRACT

Adenosine methylation at position N6 (m⁶A) is the most frequent modification in messenger RNA (mRNA) in eukaryotes. It is a conserved post-transcriptional mechanism that regulates the fate and function of mRNA. In this review, we analyze and summarize the latest developments in m⁶A, as well as its role in gene regulation. The reversible modification of m⁶A in mRNAs represents a novel epigenetic marker with regulatory roles in fundamental biological processes.

PALABRAS

CLAVE:

N6-metil-adenosina (m⁶A), metabolismo de mRNA, regulación genética en eucariotes.

KEY WORDS:

N6-methyl-adenosine (m⁶A), mRNA metabolism, gene regulation in eukaryotes.

Introducción

La información genética que se encuentra en el ácido desoxirribonucleico (DNA), debe ser decodificada para dirigir la síntesis de proteínas celulares. Esta información pasa por un intermediario conocido como RNA mensajero (mRNA). El mRNA a su vez está sujeto a múltiples procesos de regulación, entre los cuales existen diversas modificaciones químicas.

Se han identificado más de 150 distintas modificaciones químicas en el RNA celular (1). Entre este tipo de modificaciones, la metilación de la adenosina en la posición N6 (m⁶A) es la modificación interna más frecuente en mRNA de eucariotes (2-5). Esta modificación, que se encontró inicialmente en mRNA de mamíferos en los años 70's (2, 3), también se ha encontrado en plantas (4, 5) y virus (6); más tarde se reportó en levadura (7) y mucho más recientemente en bacterias (8), pero debido a la falta de métodos de detección y cuantificación eficientes,

sus implicaciones funcionales no se lograron elucidar en ese momento.

El estudio de m⁶A adquirió aún más interés al descubrirse que su adición puede ser revertida, sugiriendo que esta marca es dinámica (9). Posteriormente, en el 2012, dos grupos de investigación describieron un método de detección por anticuerpos acoplado a secuenciación de alto rendimiento, que es capaz de localizar los sitios m⁶A en todos los transcritos de mRNA en una condición biológica particular (10, 11). Este método de identificación reveló que solo ciertos mRNA contienen la marca m⁶A, y que además, esta modificación química suele localizarse cerca de los codones de paro y en las regiones 3' no traducidas (3'UTR) del mRNA (Figura 1). En estos estudios también se demostró que la adenosina (A) que se metila está presente en la secuencia consenso RRACH [donde R puede ser guanósina (G) ó adenosina, y H puede ser adenosina, citosina (C) ó uracilo (U)]. A partir de

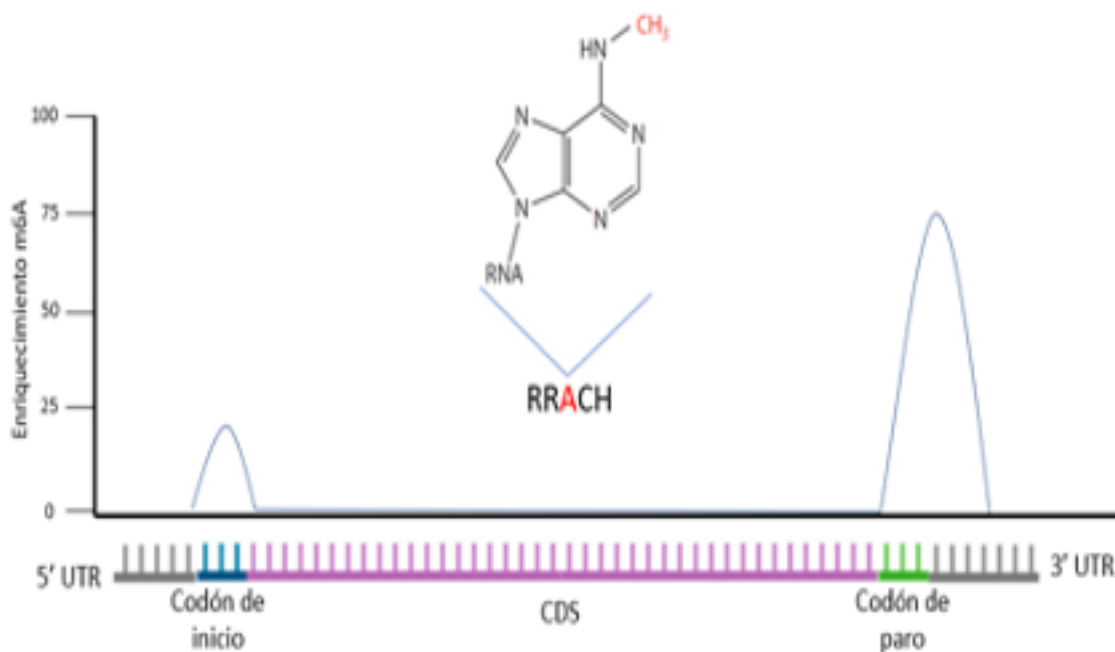


Figura 1. Distribución de la modificación de m⁶A en los mRNA. La modificación se encuentra con mayor frecuencia en la región 3' UTR y cerca del codón de paro (en verde), además de presentarse en menor proporción en el codón de inicio (en azul), como se muestra en la gráfica que representa la abundancia de m⁶A, como se ha descrito en diversos estudios (ver texto para mayor detalle). La modificación dependiente del complejo de metilación se coloca en la secuencia RRACH, donde la adenosina es el nucleósido que se metila en la posición 6 (en rojo en el esquema superior). Imagen tomada y modificada de Luo et al., 2014 (12).

ese momento, otros métodos de detección se han desarrollado, incluyendo aquellos que son capaces de detectar la modificación m⁶A a nivel de un sólo nucleótido. En la Tabla 1 se presentan algunas de las técnicas más utilizadas de mapeo y medición de la modificación m⁶A.

¿Qué procesos biológicos son afectados por m⁶A?

Se ha demostrado que la metilación m⁶A afecta diferentes y variados destinos del metabolismo del mRNA. En mamíferos, la modificación m⁶A tiene un papel importante en distintos procesos de la maduración del mRNA, en la regulación de su estabilidad, en el mecanismo de transporte del mRNA del núcleo al citoplasma, en la regulación de la traducción del mRNA por los ribosomas, e incluso puede afectar el plegamiento y estructura secundaria del mRNA (para estos y otros ejemplos favor de consultar la referencia 13). Por el contrario, se conoce muy poco acerca de la función y regulación de la modificación m⁶A en el mRNA de plantas. Los estudios realizados a la fecha se limitan a entender cómo la marca m⁶A regula la estabilidad del mRNA (14, 15).

Los cambios que ocasiona la marca m⁶A en el destino del mRNA se traducen en una gran variedad

de cambios fisiológicos en los organismos en donde se ha estudiado. En humanos, la desregulación de la marca m⁶A está vinculada a numerosas enfermedades, incluyendo distintos tipos de cáncer, como el de pulmón y de mama (16, 17); defectos en la regulación del metabolismo y obesidad (18-20); desórdenes neurológicos como la depresión, adicciones, epilepsia, déficit de atención y otros (21-27). Algunos desórdenes reproductivos, infecciones virales e inflamación, también se encuentran entre las enfermedades influenciadas por alteraciones en m⁶A (28-33). En otros animales también se ha estudiado el efecto de alterar los niveles de m⁶A. Por ejemplo, se determinó que cambios en la modificación de m⁶A en un solo mRNA están relacionados con la determinación del sexo en la mosca de la fruta (34, 35), uno de los primeros organismos en los que se detectó m⁶A en el mRNA (36). En el pez cebra, mutaciones en la maquinaria de adición de m⁶A causan defectos en el desarrollo (37, 38), mientras que en ratón, mutaciones en el mecanismo de eliminación de m⁶A causan defectos en la espermatogénesis, provocando infertilidad (39). Por otro lado, en plantas, la reducción en los niveles de m⁶A durante el desarrollo afecta la embriogénesis, los patrones de crecimiento y la dominancia apical

TABLA 1
Métodos de detección de la metilación m⁶A en el mRNA

TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Basados en la detección por anticuerpos		
meRIP-seq/m⁶A-seq (<i>Methylated RNA immunoprecipitation sequencing</i>)	Detecta sitios de m ⁶ A a lo largo del mRNA. Se basa en el uso de anticuerpos para inmunoprecipitar mRNA metilado con m ⁶ A, acoplado a secuenciación de alto rendimiento. La técnica permite una vista global de la distribución de la marca m ⁶ A en el transcriptoma.	Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012
miCLIP (<i>m⁶A individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation</i>)	Detecta sitios m ⁶ A por secuenciación, identificando mutaciones generadas al entrecruzar mRNA metilado con anticuerpos específicos empleando luz UV. Es una técnica que puede detectar sitios m ⁶ A con resolución de un sólo nucleótido.	Linder et al., 2015
Basados en la digestión de RNA		
LC-MS (<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>)	La técnica involucra digestión total del mRNA y detección de m ⁶ A con luz UV, basándose en sus propiedades físico-químicas. Este método cuantitativo permite estimar la abundancia de m ⁶ A. Sin embargo, la técnica no provee información sobre la secuencia en la que se localiza m ⁶ A.	Thüring et al., 2017
SCARLET (<i>Site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography</i>)	Método utilizado para cuantificar m ⁶ A. Se realiza un corte específico de cada sitio que contiene m ⁶ A y una ligación sitio-específica. Se utiliza cromatografía de capa fina para cuantificar la abundancia de m ⁶ A. Esta técnica tiene un alto nivel de precisión, ya que se detecta un sitio con m ⁶ A por mRNA.	Liu & Pan, 2015
Desoxirribosimas específicas de m⁶A	El método utiliza enzimas sintéticas hechas de DNA que cortan RNA (desoxirribosimas) diseñadas para reconocer m ⁶ A en la secuencia consenso RRACH en el RNA y cortar la secuencia adyacente. De esta forma se identifican sitios que contienen m ⁶ A.	Sednev et al., 2018
MAZTER-seq (<i>m⁶A-sensitive RNA digestion and sequencing</i>)	Método que permite la identificación y cuantificación de m ⁶ A con resolución de un nucleótido. Se basa en la capacidad de la endonucleasa MazF de cortar RNA en sitios no metilados dentro de la secuencia ACA, acoplado a secuenciación masiva.	Garcia-Campos et al., 2019
Basados en la interrupción de la síntesis de DNA		
4SedTTP-RT	Método que utiliza al nucleótido 4Sed-dTTP durante la síntesis <i>in vitro</i> de DNA complementario a partir de una muestra de RNA. Este nucleótido hibrida con el RNA en posiciones que contienen A, pero no m ⁶ A, interrumpiendo la retro-transcripción (RT). La técnica detecta sitios de m ⁶ A con resolución de un nucleótido.	Hong et al., 2018
SELECT (<i>Single base elongation-and ligation-based qPCR amplification</i>)	Esta técnica utiliza a la <i>Bst</i> DNA polimerasa que al encontrarse con m ⁶ A en el RNA templado, termina la síntesis de DNA complementario. El fragmento interrumpido no es incorporado por la DNA ligasa en un producto final de DNA que puede cuantificarse por qPCR.	Xiao et al., 2018
Basados en la identificación directa de m⁶A en RNA		
Nanopore	El método detecta la presencia de m ⁶ A en el mRNA mientras éste es secuenciado en tiempo real, sin requerir amplificación por PCR o retro-transcripción previa. La técnica provee información del número y posición de los sitios con m ⁶ A por transcrito.	Garalde et al., 2018

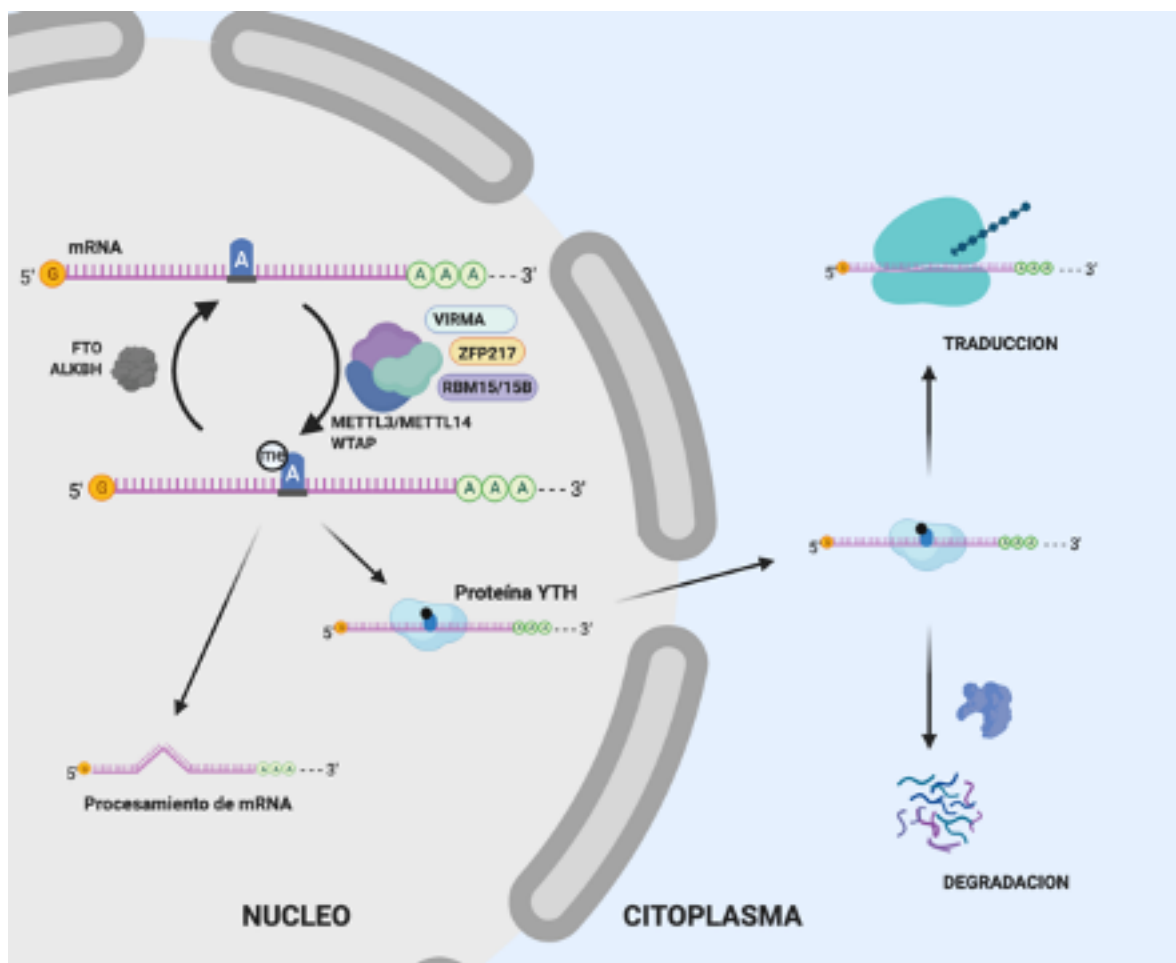


Figura 2. El "ciclo de vida" de un mRNA modificado por m⁶A. La adición o remoción de m⁶A ocurre en el núcleo, en donde se localiza tanto el complejo escritor m⁶A (que comprende a METTL3/METTL14, WTAP y a sus adaptadores), como proteínas borradoras (como ALKBH5 o FTO). El trayecto comienza durante la transcripción del gen, pues la maquinaria de metilación interactúa con la RNA polimerasa II. En el núcleo, los transcritos modificados con m⁶A se unen a proteínas lectoras específicas, lo que puede afectar su edición u otros procesos nucleares. Al exportarse al citoplasma, estos transcritos son reconocidos por proteínas lectoras que afectan su traducción a proteínas por los ribosomas, degradación y/o localización en la célula.

(14, 40-42). También se ha encontrado que los patrones de m⁶A en el mRNA difieren entre órganos de la misma planta, lo que sugiere que esta modificación afecta su desarrollo y funciones de manera específica (43), tal y como se ha observado en el desarrollo de tricomas y de hojas (44-46), o en la regulación del tiempo de floración (47).

Como podrá apreciar el lector, los defectos en la correcta adición, eliminación e interpretación de la marca m⁶A en el mRNA tienen diversas consecuencias en distintos aspectos de la biología de los organismos en los que se ha estudiado. Por ello, el descubrimiento de las proteínas involucradas en la regulación de m⁶A ha sido uno de los logros más significativos de las últimas dos décadas para entender la regulación de la expresión génica. Existen

proteínas *escritoras* (m⁶A-metil-transferasas que instalan m⁶A), *borradoras* (m⁶A-desmetilasas, que eliminan m⁶A) y *lectoras* (efectores que reconocen m⁶A). Las proteínas *escritoras* y *borradoras* determinan la prevalencia y distribución de la marca m⁶A sobre el mRNA, mientras que las proteínas *lectoras* reconocen y determinan su destino en la célula (Figura 2). En las siguientes secciones hablaremos de ellas y el lector puede consultar mayores detalles sobre la maquinaria de m⁶A en Shi et al., 2019 y Zaccara et al., 2019 (13, 48).

¿Quién se encarga de añadir m⁶A en los transcritos?

La modificación m⁶A se añade al mRNA por un complejo escritor compuesto de múltiples subuni-

dades. Las proteínas individuales tienen funciones particulares e integran diferentes señales celulares para regular esta modificación sobre el mRNA (13). Las subunidades principales se componen de un heterodímero formado por la metiltransferasa tipo 3 (METTL3) y la metiltransferasa tipo 14 (METTL14) (49, 50). En el heterodímero, METTL3 es la subunidad catalítica que utiliza como sustrato donador del grupo metilo a la S-adenosil-metionina, mientras que METTL14 es un componente esencial que facilita la unión al mRNA (51-53). Por otro lado, se han caracterizado algunas subunidades adicionales, revelando como contribuyen a la actividad y especificidad del complejo escritor. La proteína asociada al tumor 1 de Wilms (WTAP) une a METTL3/14 y se requiere para el reclutamiento óptimo del mRNA sustrato y la localización de METTL3/14 en el núcleo (37, 42). La metiltransferasa asociada a m⁶A tipo Vir (VIRMA o KIAA1429) es necesaria para depositar la marca m⁶A específicamente en las regiones 3' UTR (54). La proteína de dedos de zinc CCCH-tipo 13 (ZC3H13), facilita la localización nuclear del complejo escritor (55). Adicionalmente, las proteínas con motivo de unión al RNA 15/15B (RBM15/15B), unen regiones ricas en U de ciertos RNAs, facilitando su metilación (55). Finalmente, la proteína CBL11 (o HAKAI), una ubiquitina ligasa tipo E3, se identificó recientemente como otro componente del complejo escritor (41). En conjunto, estos factores contribuyen al funcionamiento del complejo de metiltransferasa, y esto se ve reflejado en los distintos procesos en que las proteínas individuales se han visto involucradas.

METTL3 es una proteína altamente conservada en vertebrados, con homólogos en múltiples especies, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* (IME4), *Drosophila melanogaster* (IME4) y *Arabidopsis thaliana* (MTA). En humanos, la deficiencia de METTL3 afecta el desarrollo embrionario, la reprogramación celular y espermatogénesis (57-59), mientras que su eliminación en ratón causa letalidad embrionaria temprana, afecta la homeóstasis de células T y afecta la transición endotelial-hematopoyética (60-62). En *A. thaliana*, la deficiencia de MTA afecta el desarrollo y el crecimiento (40, 42), mientras que en *S. cerevisiae*, IME4 tiene un papel esencial regulatorio durante la meiosis y esporulación (7, 63, 64). En *Drosophila*, la mutación de IME4 deteriora la función neuronal y afecta la determinación del sexo (65, 66).

De manera similar a METTL3, la falta de METTL14 afecta diversos procesos biológicos. Se ha observado que la ausencia de METTL14 bloquea la auto-renovación y diferenciación de las células madre, causa defectos en el desarrollo embrionario, y afecta la gametogénesis de varios organismos (62, 67,

68). También se sabe que en conjunto con METTL3, METTL14 participa en la regulación del ciclo celular durante la neurogénesis cortical de las células gliales radiales (69). También se ha descrito su participación en el desarrollo de glioblastomas (tumores cerebrales) y en la leucemia (70, 71). En *A. thaliana* MTB es el ortólogo de METTL14. Se ha demostrado la interacción física de MTB con MTA (el ortólogo de METTL3 en *A. thaliana*), y que se encuentra en el complejo escritor con otras proteínas como VIRMA, HAKAI y FIP37 (el ortólogo de WTAP). Además, se demostró que plantas mutantes con actividad reducida en MTB presentan bajos niveles de m⁶A en el mRNA así como defectos fenotípicos similares a los observados en plantas con una baja actividad de MTA (41).

La falta de WTAP también causa defectos en los distintos sistemas en los que se ha estudiado. Los embriones de pez cebra que carecen de WTAP o METTL3 experimentan un mayor grado de muerte celular programada (37). También se ha asociado con el desarrollo de leucemia mieloide aguda en humanos (72). En *A. thaliana*, la pérdida completa de FIP37 resulta en un fenotipo de letalidad a nivel embrionario, mientras que su pérdida parcial conduce a una sobre-proliferación celular en el meristemo apical del brote (14).

La ausencia de VIRMA en células humanas A549 tiene como consecuencia una disminución en los niveles de m⁶A en el mRNA, lo que sugiere que esta proteína regula al complejo escritor (73). Por otro lado, la pérdida parcial de VIRILIZER (el homólogo de VIRMA en *A. thaliana*) conduce a defectos en la emergencia de raíces laterales, en su gravitropismo y en el desarrollo de los cotiledones (41). En este mismo reporte se describió a HAKAI, una E3 ubiquitina ligasa que es parte del complejo escritor, cuya ausencia también conduce a una disminución de los niveles de m⁶A (41).

La falta de los componentes antes descritos tiene una clara consecuencia en la fisiología y el desarrollo de los organismos. La base de estos defectos debe entonces estar relacionada con una alteración en los sitios sobre ciertos mRNAs particulares en los que se coloca la modificación m⁶A. Pero en este contexto... ¿Qué determina en qué sitios se adiciona esta modificación?

La proteína METTL3 metila selectivamente a las secuencias GAC y ACC en RNAs sintéticos en ensayos *in vitro* (74, 75). Además, una especificidad similar se observa sobre la secuencia motivo RRACH que ha sido validada en numerosos estudios *in vivo* (consultar la referencia 10). A pesar de observarse esta actividad, no todos los sitios RRACH en un transcrito son modificados, posiblemente debido a que otros procesos contribuyen a determinar los

sitios que serán metilados. Como la adición de m⁶A al mRNA es un proceso co-transcripcional (7), se ha propuesto que el reclutamiento del complejo escritor a promotores específicos mediado por factores de transcripción o por su interacción con la RNA polimerasa II (76-78), podría regular la metilación del RNA naciente. Alternativamente, se ha discutido que la interacción descrita entre METTL14 y la trimetilación de la lisina 3 en la histona H3 (H3K36me3), podría guiar al complejo escritor al RNA naciente y a regiones específicas del transcrito (79, 80). Por otro lado, también es posible que eventos posteriores a la transcripción influyan en seleccionar qué sitios RRACH son metilados en el mRNA; por ejemplo, las subunidades RBM15/15B del complejo escritor de m⁶A contienen dominios de unión a secuencias de RNA ricas en U cercanos a los sitios m⁶A en el algunos RNAs (56). Esto sugiere que algunas subunidades del complejo escritor pueden facilitar el reclutamiento del complejo y así dirigir la metilación a sitios puntuales dentro del mRNA. Sin embargo, el patrón de metilación final de un mRNA no está determinado exclusivamente por la actividad complejo escritor, también puede definirse por la eliminación de m⁶A.

¿Se vale borrar?

La modificación m⁶A en el mRNA se puede revertir mediante la actividad de proteínas desmetilasas (proteínas *borradoras*), que convierten m⁶A en A. En 2011 se descubrió la primera desmetilasa de m⁶A, la proteína FTO (*Fat mass and obesity-associated protein*) (9), y poco después se identificó a otra desmetilasa: ALKBH5 (*Alkylation Repair Homolog 5*) (39). Ambas proteínas pertenecen a la familia Alkb de dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato/Fe (II) (9, 39) y realizan una desmetilación oxidativa utilizando RNA de cadena sencilla como sustrato (81). El descubrimiento de estas actividades reveló que la modificación postranscripcional m⁶A no es estática y puede ser reversible.

La desregulación de FTO se ha asociado con ciertos tipos de cáncer. Al inhibir FTO en ciertos subtipos específicos de leucemia, se produce un incremento de hasta el 20% en los niveles de m⁶A en el mRNA total (82), y un efecto similar se ha observado en líneas celulares humanas (9). Sin embargo, FTO desmetila a m⁶A dentro o fuera de la secuencia consenso RRACH, lo cual indica que FTO no es específica para esta vía de regulación (9, 83, 84). FTO se localiza tanto en núcleo como en citoplasma (85, 86), sugiriendo que tiene distintos sustratos dependiendo del compartimiento celular donde se encuentre. En este sentido, se ha reportado que FTO tiene preferencia por RNAs que contienen m⁶A que además están metilados en la posición 2' de la

ribosa, es decir, m⁶Am (87). Esta modificación se encuentra comúnmente en la estructura del *cap*, el nucleótido modificado que se añade al inicio de los mRNAs, y en otros RNAs como snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) y snRNAs (*small nuclear RNAs*), por lo que éstos y el *cap* se han considerado como los sustratos principales de FTO. Aún más, un estudio llevado a cabo en líneas celulares humanas en las que se alteró la expresión de FTO, no mostró cambios significativos en los niveles de m⁶A en el mRNA, lo cual si ocurrió cuando se sobre-expresó ALKBH5 (88).

ALKBH5 fue la segunda desmetilasa de m⁶A identificada (39). Mutaciones en el gen de ALKBH5 en ratón resultan en defectos en la espermatogénesis; se sabe que esta proteína se encuentra enriquecida en órganos reproductivos, lo que sugiere que participa en un evento de desmetilación del RNA importante en el desarrollo de células germinales (39). Además, se sabe que ALKBH5 tiene un papel importante en la respuesta inmune a infecciones virales en macrófagos (89) y en la patogénesis del cáncer (17, 90). Se ha demostrado que ALKBH5 realiza la desmetilación de m⁶A en el contexto específico de la secuencia RRACH (39, 91). ALKBH5 se localiza principalmente en el núcleo y su eliminación induce la acumulación global de RNAs poliadenilados en el citoplasma (39), lo que sugiere que la actividad de ALKBH5 está vinculada a la regulación del transporte del mRNA del núcleo al citoplasma. En *Arabidopsis* se han descubierto dos desmetilasas, ALKBH9B y ALKBH10B (47, 92). ALKBH9B desmetila RNA de cadena sencilla *in vitro* y su ausencia en plantas mutantes resulta en el aumento de los niveles de m⁶A en el RNA genómico del virus del mosaico de alfalfa, lo que disminuye su grado de infección (92). Por otra parte, ALKBH10B desmetila mRNAs que incluyen aquellos que codifican al regulador maestro de floración *FLOWERING LOCUS* (FT), así como SPL3 y SPL9, estabilizándolos y evitando un retraso en el tiempo de floración (47).

Considerando la variada participación de las desmetilasas de m⁶A en distintos contextos biológicos, es posible que existan otras proteínas con función similar que aún no se han caracterizado (por ejemplo, *Arabidopsis* tiene trece genes tipo ALKBH y los humanos nueve). Esto nos sugiere que la modificación m⁶A está regulada de manera específica por la desmetilación, lo que la convierte en una señal altamente regulada y dinámica.

¿Cómo se interpreta la marca m⁶A en un mRNA?

La modificación m⁶A afecta el ciclo de vida de los mRNAs mediante su interacción con factores que la reconocen ya sea de forma directa o indirecta.

Pero ¿qué es una proteína lectora de m⁶A? Esta pregunta es aparentemente fácil de responder cuando se trata de proteínas que poseen un dominio conservado llamado YTH (por su homología con el factor de *splicing* YT512-B) (93). Sin duda, la caracterización de estas proteínas ha proporcionado información valiosa sobre los mecanismos moleculares de la regulación génica postranscripcional mediada por m⁶A. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han dirigido al estudio de proteínas YTH de mamíferos, pero se ha demostrado que estas proteínas también realizan funciones esenciales en *S. cerevisiae*, en la mosca de la fruta, el pez cebra, y en *A. thaliana*.

En animales se han identificado 5 proteínas con el dominio YTH: YTHDC1, YTHDC2, YTHDF1, YTHDF2 y YTHDF3 (también conocidas como DC1-2, DF1-3). La ausencia de estas proteínas en algunos organismos se ha asociado con distintos defectos en el desarrollo. La eliminación de la proteína DC1 en la mosca de la fruta altera su comportamiento y determinación del sexo (65, 74), mientras que en ratón, la proteína DC2 es necesaria para que se lleve a cabo de manera correcta la maduración de células germinales (94). La falta de DF1 afecta la regeneración de axones del sistema nervioso periférico en ratones (95); en el pez cebra y en ratón, DF2 juega un papel importante en el mantenimiento y la diferenciación celular, lo cual es fundamental para un correcto desarrollo embrionario (62, 96). En levadura, se demostró que el producto del gen Pho92, que es homólogo a DF2, participa en el metabolismo celular del fosfato a través de la regulación de la estabilidad del transcrito de PHO4 (97). Finalmente, aunque no se han descrito los defectos que causa la ausencia de DF3, a nivel molecular se ha caracterizado su actividad promotora de la traducción de los mRNAs metilados que reconoce (98, 99). Con estas y otras evidencias que ilustran la importante función que realizan las proteínas YTH en diversos mecanismos celulares y fisiológicos, se ha iniciado su estudio en el desarrollo de distintas enfermedades, particularmente sobre su papel en infecciones virales y en distintos tipos de cáncer. Sin embargo, los estudios hasta ahora publicados, si bien demuestran que las proteínas YTH están involucradas en estos procesos, son aún insuficientes para definir su función exacta (100).

A diferencia del bajo número de miembros que integran a esta familia en animales, en *A. thaliana* se han identificado 13 proteínas YTH. Sin embargo, a la fecha sólo se han estudiado pocas de ellas. Líneas mutantes en la proteína YTH llamada ECT2 (*Evolutionary conserved C-terminal region*) desarrollan tricomas más ramificados (46); que correlaciona

con un aumento en la cantidad de DNA en estas células, lo que sugiere que este fenotipo es provocado por una desregulación en el número de los ciclos de endoreduplicación, esto es, la replicación cromosómica sin pasar por ningún periodo mitótico intermedio. Además, la doble mutante en ECT2 y ECT3 presenta un retraso en el desarrollo de las hojas, lo que indica que estas *lectoras* participan en la correcta sincronización de su desarrollo. El análisis adicional de mutantes triples en ECT2, ECT3 y ECT4 reveló que el fenotipo de desarrollo foliar se acentúa (44), lo que sugiere que estas proteínas, que son muy similares entre sí, tienen funciones parcialmente redundantes en la planta.

Los análisis estructurales del dominio YTH muestran que la propiedad de unión a m⁶A se logra a través de un bolsillo hidrofóbico, donde residuos de triptófano interaccionan con el grupo metilo de la adenosina. Así, estas proteínas *lectoras* promueven la traducción del mRNA modificado con m⁶A mediante su interacción con factores de inicio de la traducción, como lo hacen los factores DF1 y 3 de humano (101); o en caso contrario, inducen la degradación del mRNA metilado mediante su reclutamiento a cuerpos de procesamiento nuclear (o cuerpos P), como lo hace DF2 (102) (Figura 2).

También se han descrito *lectoras* que no poseen un dominio YTH y que, sin embargo, pueden reconocer directamente a m⁶A en el mRNA, como las proteínas IGF2BPs (*Insulin growth factor 2 mRNA binding proteins*) (103) o subunidades del factor de inicio de la traducción eIF3 (104). Estos factores se han descrito en casos particulares, pero abren las puertas a pensar que otros factores similares pueden ser descubiertos en un futuro. Incluso METTL3, que es parte del complejo escritor y que también se ha encontrado en el citoplasma, puede reconocer directamente m⁶A y promover la traducción del transcrito blanco independientemente de su actividad de metiltransferasa (16).


En otros casos, m⁶A es reconocida de forma indirecta, es decir, depende de los cambios que su presencia causa en la estructura secundaria del RNA y no del reconocimiento directo de m⁶A. Por ejemplo, el apareamiento m⁶A:U es ligeramente menos estable que A:U, por lo que la metilación favorece una estructura de cadena sencilla en el RNA. De esta forma, algunos factores como hnRNP C, entre otros, puede tener acceso a secuencias cercanas al sitio m⁶A, sin reconocer la modificación directamente (105). En el caso contrario, la presencia de m⁶A puede alterar la estructura secundaria del mRNA, evitando así su unión a factores específicos, como hnRNP G y hnRNP A2B1 (106, 107). Esta forma de reconocimiento de m⁶A indirecta, pero efectiva, ha sido denominada m⁶A *switch*.

Conclusión y perspectivas

Quedan por resolver aún muchas preguntas sobre cómo se agrega o elimina m⁶A de los mRNA y cómo esta marca epitranscripcional regula la expresión génica. Además, aunque las técnicas de mapeo de m⁶A han sido fundamentales en la comprensión de este fenómeno, no proporcionan información sobre su dinámica, por lo que aún es imposible discernir entre los sitios m⁶A "regulados" y los "constitutivos". Al respecto, una comprensión mayor del funcionamiento de los diferentes componentes del complejo *escritor* y de su regulación será clave para comprender su especificidad y función de los sitios regulados por m⁶A. También será importante determinar con precisión qué residuos de A están bajo el control de los *borradores* de m⁶A. La capacidad de medir cuantitativamente los niveles de m⁶A en sitios específicos del mRNA proporcionará información valiosa sobre su regulación. Finalmente, para

comprender los detalles de la modificación m⁶A, será importante determinar si las proteínas *lectoras* pueden activarse para inducir la degradación, traducción y/o localización de los mRNAs que contienen m⁶A. También será importante comprender si las proteínas YTH median la mayoría de los efectos de m⁶A, y en qué medida otras vías contribuyen a este proceso.

Agradecimientos

El trabajo relativo al tema de metilación de RNAs mensajeros en plantas es llevado a cabo en nuestro grupo de trabajo gracias a un apoyo de DGAPA-PAPIIT (proyecto IN201418) otorgado a la Dra. Claudia Díaz Camino. Ana Gabriela López Pérez (CVU 582334) y Alberto de la Cruz Piedra (CVU 957282) pertenecen al programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y son actualmente becarios de CONACYT. 

REFERENCIAS

- Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki TK, de Crécy-Lagard V, Ross R, Limbach PA, Kotter A, Helm M, & Bujnicki JM (2018) MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res* 46:303–307.
- Desrosiers R, Friderici K, Rottman F (1974) Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 71:3971-3975.
- Perry RP, & Kelley DE (1974) Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells. *Cell* 1: 37–42.
- Kennedy TD, Lane BG (1979) Wheat embryo ribonucleates. XIII. Methyl-substituted nucleoside constituents and 5'-terminal dinucleotide sequences in bulk poly(AR)-rich RNA from imbibing wheat embryos. *Can J Biochem* 57:927-31.
- Nichols JL (1979) N6-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA. *Plant Sci Lett* 15:357–361.
- Krug RM, Morgan MA, Shatkin AJ (1976) Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *J Virol* 20:45-53.
- Clancy MJ, Shambaugh ME, Timpte CS, Bokar JA (2002) 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* 30:4509-4518.
- Deng X, Chen K, Luo GZ, Weng X, Ji Q, Zhou T, He C (2015) Widespread occurrence of N6-methyladenosine in bacterial mRNA. *Nucleic Acids Res* 43:6557-6567.
- Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C (2011) N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol* 7:885-887.
- 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 m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* 485:201-206.
- Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 149:1635-1646.
- Luo GZ, MacQueen A, Zheng G, Duan H, Dore LC, Lu Z, Liu J, Chen K, Jia G, Bergelson J, He C (2014) Unique features of the m6A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 5:5630.
- Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR (2019) Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:608–624.

14. Shen L, Liang Z, Gu X, Chen Y, Teo ZW, Hou X, Cai WM, Dedon PC, Liu L, Yu H (2016) N⁶-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in Arabidopsis. *Dev Cell* 38:186-200.
15. Anderson SJ, Kramer MC, Gosai SJ, Yu X, Vandivier LE, Nelson ADL, Anderson ZD, Beilstein MA, Fray RG, Lyons E, Gregory BD (2018) N⁶-Methyladenosine Inhibits Local Ribonucleolytic Cleavage to Stabilize mRNAs in Arabidopsis. *Cell Rep* 25:1146-1157.
16. Lin S, Choe J, Du P, Triboulet R, Gregory RI (2016) METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell* 62:335-345.
17. Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, He X, Semenza GL (2016) Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:2047-2056.
18. Merkestein M, Laber S, McMurray F, Andrew D, Sachse G, Sanderson J, Li M, Usher S, Sellayah D, Ashcroft FM, Cox RD (2015) FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. *Nat Commun* 6:6792.
19. Zhang M, Zhang Y, Ma J, Guo F, Cao Q, Zhang Y, Zhou B, Chai J, Zhao W, Zhao R (2015) The Demethylase Activity of FTO (Fat Mass and Obesity Associated Protein) Is Required for Preadipocyte Differentiation. *PLoS One* 10:0133788.
20. Zhao X, Yang Y, Sun BF, Shi Y, Yang X, Xiao W, Hao YJ, Ping XL, Chen YS, Wang WJ, Jin KX, Wang X, Huang CM, Fu Y, Ge XM, Song SH, Jeong HS, Yanagisawa H, Niu Y, Jia GF, Wu W, Tong WM, Okamoto A, He C, Rendtlew Danielsen JM, Wang XJ, Yang YG (2014) FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res* 24:1403-1419.
21. Choudhry Z, Sengupta SM, Grizenko N, Thakur GA, Fortier ME, Schmitz N, Joobar R (2013) Association between obesity-related gene FTO and ADHD. *Obesity (Silver Spring)* 21:738-744.
22. Du T, Rao S, Wu L, Ye N, Liu Z, Hu H, Xiu J, Shen Y, Xu Q (2015) An association study of the m⁶A genes with major depressive disorder in Chinese Han population. *J Affect Disord* 183:279-286.
23. Milaneschi Y, Lamers F, Mbarek H, Hottenga JJ, Boomsma DI, Penninx BWJH (2014) The effect of FTO rs9939609 on major depression differs across MDD subtypes. *Mol Psychiatry* 19:960-962.
24. Rivera M, Cohen-Woods S, Kapur K, Breen G, Ng MY, Butler AW, Craddock N, Gill M, Korszun A, Maier W, Mors O, Owen MJ, Preisig M, Bergmann S, Tozzi F, Rice J, Rietschel M, Rucker J, Schosser A, Aitchison KJ, Uher R, Craig IW, Lewis CM, Farmer AE, McGuffin P (2012) Depressive disorder moderates the effect of the FTO gene on body mass index. *Mol Psychiatry* 17:604-611.
25. Rowles J, Wong M, Powers R, Olsen M (2012) FTO, RNA epigenetics and epilepsy. *Epigenetics* 7:1094-1097.
26. Samaan Z, Anand SS, Zhang X, Desai D, Rivera M, Pare G, Thabane L, Xie C, Gerstein H, Engert JC, Craig I, Cohen-Woods S, Mohan V, Diaz R, Wang X, Liu L, Corre T, Preisig M, Kutalik Z, Bergmann S, Vollenweider P, Waeber G, Yusuf S, Meyre D (2013) The protective effect of the obesity-associated rs9939609 A variant in fat mass- and obesity-associated gene on depression. *Mol Psychiatry* 18:1281-1286.
27. Sobczyk-Kopciol A, Broda G, Wojnar M, Kurjata P, Jakubczyk A, Klimkiewicz A, Ploski R (2011) Inverse association of the obesity predisposing FTO rs9939609 genotype with alcohol consumption and risk for alcohol dependence. *Addiction* 106:739-748.
28. Casalegno-Garduño R, Schmitt A, Wang X, Xu X, Schmitt M (2010) Wilms' tumor 1 as a novel target for immunotherapy of leukemia. *Transplant Proc* 42:3309-3311.
29. Kennedy EM, Bogerd HP, Kornepati AV, Kang D, Ghoshal D, Marshall JB, Poling BC, Tsai K, Gokhale NS, Horner SM, Cullen BR (2016) Posttranscriptional m(6)A Editing of HIV-1 mRNAs Enhances Viral Gene Expression. *Cell Host Microbe* 19:675-685.
30. Lichinchi G, Gao S, Saletore Y, Gonzalez GM, Bansal V, Wang Y, Mason CE, Rana TM (2016) Dynamics of the human and viral m(6)A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nat Microbiol* 1:16011.
31. Song DK, Lee H, Oh JY, Hong YS, Sung YA (2014) FTO gene variants are associated with PCOS susceptibility and hyperandrogenemia in young Korean women. *Diabetes Metab J* 38:302-310.
32. Tirumuru N, Zhao BS, Lu W, Lu Z, He C, Wu L (2016) N⁶-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *Elife* 5:15528.
33. Utsch B, Kaya A, Özburun A, Lentze MJ, Albers N, Ludwig M (2003) Exclusion of WTAP and HOXA13 as Candidate Genes for Isolated Hypospadias. *Scand J Urol Nephrol* 37:498-501.

34. Granadino B, Campuzano S, Sánchez L (1990) The *Drosophila melanogaster* fl(2)d gene is needed for the female-specific splicing of Sex-lethal RNA. *EMBO J* 9:2597-2602.
35. Granadino B, Penalva LO, Sánchez L (1996) The gene fl(2)d is needed for the sex-specific splicing of transformer pre-mRNA but not for double-sex pre-mRNA in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 253:26-31.
36. Levis R, Penman S (1978) 5'-Terminal structures of poly(A)⁺ cytoplasmic messenger RNA and of poly(A)⁺ and poly(A)⁻ heterogeneous nuclear RNA of cells of the dipteran *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* 120:487-515.
37. Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, Adhikari S, Shi Y, Lv Y, Chen YS, Zhao X, Li A, Yang Y, Dahal U, Lou XM, Liu X, Huang J, Yuan WP, Zhu XF, Cheng T, Zhao YL, Wang X, Rendtlew Danielsen JM, Liu F, Yang YG (2014) Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res* 24:177-189.
38. Walser CB, Lipshitz HD (2011) Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. *Curr Opin Genet Dev* 21:431-443.
39. Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vågbo CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, Lu Z, Bosmans RP, Dai Q, Hao YJ, Yang X, Zhao WM, Tong WM, Wang XJ, Bogdan F, Furu K, Fu Y, Jia G, Zhao X, Liu J, Krokan HE, Klungland A, Yang YG, He C (2013) ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell* 49:18-29.
40. Bodi Z, Zhong S, Mehra S, Song J, Graham N, Li H, May S, Fray RG (2012) Adenosine Methylation in *Arabidopsis* mRNA is Associated with the 3' End and Reduced Levels Cause Developmental Defects. *Front Plant Sci* 3:48.
41. Růžička K, Zhang M, Campilho A, Bodi Z, Kashif M, Saleh M, Eeckhout D, El-Showk S, Li H, Zhong S, De Jaeger G, Mongan NP, Hejátko J, Helariutta Y, Fray RG (2017) Identification of factors required for m⁶A mRNA methylation in *Arabidopsis* reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol* 215:157-172.
42. Zhong S, Li H, Bodi Z, Button J, Vespa L, Herzog M, Fray RG (2008) MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell* 20:1278-88.
43. Wan Y, Tang K, Zhang D, Xie S, Zhu X, Wang Z, Lang Z (2015) Transcriptome-wide high-throughput deep m⁶A-seq reveals unique differential m⁶A methylation patterns between three organs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 16:272.
44. Arribas-Hernández L, Bressendorff S, Hansen MH, Poulsen C, Erdmann S, Brodersen P (2018) An m⁶A-YTH Module Controls Developmental Timing and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 30:952-967.
45. Scutenaire J, Deragon JM, Jean V, Benhamed M, Raynaud C, Favory JJ, Merret R, Bousquet-Antonelli C (2018) The YTH Domain Protein ECT2 Is an m⁶A Reader Required for Normal Trichome Branching in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 30:986-1005.
46. Wei LH, Song P, Wang Y, Lu Z, Tang Q, Yu Q, Xiao Y, Zhang X, Duan HC, Jia G (2018) The m⁶A Reader ECT2 Controls Trichome Morphology by Affecting mRNA Stability in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 30:968-985.
47. Duan HC, Wei LH, Zhang C, Wang Y, Chen L, Lu Z, Chen PR, He C, Jia G (2017) ALKBH10B Is an RNA N⁶-Methyladenosine Demethylase Affecting *Arabidopsis* Floral Transition. *Plant Cell* 29:2995-3011.
48. Shi H, Wei J, He C (2019) Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers. *Mol Cell* 74:640-650.
49. Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, Matera AG, Rottman FM (1997) Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N⁶-adenosine)-methyltransferase. *RNA* 3:1233-1247.
50. 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 (2014) A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nat Chem Biol* 10:93-95.
51. Śledź P, Jinek M (2016) Structural insights into the molecular mechanism of the m⁶A writer complex. *Elife* 5:18434.
52. Wang P, Doxtader KA, Nam Y (2016) Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Mol Cell* 63:306-317.
53. Wang X, Feng J, Xue Y, Guan Z, Zhang D, Liu Z, Gong Z, Wang Q, Huang J, Tang C, Zou T, Yin P (2016) Structural basis of N(6)-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature* 534:575-578.
54. 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 m⁶A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov* 4:10.

55. Wen J, Lv R, Ma H, Shen H, He C, Wang J, Jiao F, Liu H, Yang P, Tan L, Lan F, Shi YG, He C, Shi Y, Diao J (2018) Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m⁶A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Mol Cell* 69:1028-1038.
56. Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, Jaffrey SR (2016) m(6) A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature* 537:369-373.
57. Aguilo F, Zhang F, Sancho A, Fidalgo M, Di Cecilia S, Vashisht A, Lee DF, Chen CH, Rengasamy M, Andino B, Jahouh F, Roman A, Krig SR, Wang R, Zhang W, Wohlschlegel JA, Wang J, Walsh MJ (2015) Coordination of m(6) A mRNA Methylation and Gene Transcription by ZFP217 Regulates Pluripotency and Reprogramming. *Cell Stem Cell* 17:689-704.
58. Chen T, Hao YJ, Zhang Y, Li MM, Wang M, Han W, Wu Y, Lv Y, Hao J, Wang L, Li A, Yang Y, Jin KX, Zhao X, Li Y, Ping XL, Lai WY, Wu LG, Jiang G, Wang HL, Sang L, Wang XJ, Yang YG, Zhou Q (2015) m(6)A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell* 16:289-301.
59. Xu K, Yang Y, Feng GH, Sun BF, Chen JQ, Li YF, Chen YS, Zhang XX, Wang CX, Jiang LY, Liu C, Zhang ZY, Wang XJ, Zhou Q, Yang YG, Li W (2017) Mettl3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Res* 27:1100-1114.
60. Lv J, Zhang Y, Gao S, Zhang C, Chen Y, Li W, Yang YG, Zhou Q, Liu F (2018) Endothelial-specific m⁶A modulates mouse hematopoietic stem and progenitor cell development via Notch signaling. *Cell Res* 28:249-252.
61. Li HB, Tong J, Zhu S, Batista PJ, Duffy EE, Zhao J, Bailis W, Cao G, Kroehling L, Chen Y, Wang G, Broughton JP, Chen YG, Kluger Y, Simon MD, Chang HY, Yin Z, Flavell RA (2017) m⁶A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature* 548:338-342.
62. Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, Mansour AA, Kol N, Salmon-Divon M, Hershkovitz V, Peer E, Mor N, Manor YS, Ben-Haim MS, Eyal E, Yunger S, Pinto Y, Jaitin DA, Viukov S, Rais Y, Krupalnik V, Chomsky E, Zerbib M, Maza I, Rechavi Y, Massarwa R, Hanna S, Amit I, Levanon EY, Amariglio N, Stern-Ginossar N, Novershtern N, Rechavi G, Hanna JH (2015) Stem cells. m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science* 347:1002-1006.
63. Bodi Z, Button JD, Grierson D, Fray RG (2010) Yeast targets for mRNA methylation. *Nucleic Acids Res* 38:5327-5335.
64. Schwartz S, Agarwala SD, Mumbach MR, Jovanovic M, Mertins P, Shishkin A, Tabach Y, Mikkelsen TS, Satija R, Ruvkun G, Carr SA, Lander ES, Fink GR, Regev A (2013) High-resolution mapping reveals a conserved, widespread, dynamic mRNA methylation program in yeast meiosis. *Cell* 155:1409-1421.
65. Haussmann IU, Bodi Z, Sanchez-Moran E, Mongan NP, Archer N, Fray RG, Soller M (2016) m⁶A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust Drosophila sex determination. *Nature* 540:301-304.
66. Lence T, Akhtar J, Bayer M, Schmid K, Spindler L, Ho CH, Kreim N, Andrade-Navarro MA, Poeck B, Helm M, Roignant JY (2016) m⁶A modulates neuronal functions and sex determination in Drosophila. *Nature* 540:242-247.
67. Lin Z, Hsu PJ, Xing X, Fang J, Lu Z, Zou Q, Zhang KJ, Zhang X, Zhou Y, Zhang T, Zhang Y, Song W, Jia G, Yang X, He C, Tong MH (2017) Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N⁶-methyladenosine modulates murine spermatogenesis. *Cell Res* 27:1216-1230.
68. Wang Y, Li Y, Toth JI, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC (2014) N⁶-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 16:191-198.
69. Yoon KJ, Ringeling FR, Vissers C, Jacob F, Pokrass M, Jimenez-Cyrus D, Su Y, Kim NS, Zhu Y, Zheng L, Kim S, Wang X, Doré LC, Jin P, Regot S, Zhuang X, Canzar S, He C, Ming GL, Song H (2017) Temporal Control of Mammalian Cortical Neurogenesis by m⁶A Methylation. *Cell* 171:877-889.
70. Cui Q, Shi H, Ye P, Li L, Qu Q, Sun G, Sun G, Lu Z, Huang Y, Yang CG, Riggs AD, He C, Shi Y (2017) m⁶A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep* 18:2622-2634.
71. Weng H, Huang H, Wu H, Qin X, Zhao BS, Dong L, Shi H, Skibbe J, Shen C, Hu C, Sheng Y, Wang Y, Wunderlich M, Zhang B, Dore LC, Su R, Deng X, Ferchen K, Li C, Sun M, Lu Z, Jiang X, Marcucci G, Mulloy JC, Yang J, Qian Z, Wei M, He C, Chen J (2018) METTL14 Inhibits Hematopoietic Stem/Progenitor Differentiation and Promotes Leukemogenesis via mRNA m⁶A Modification. *Cell Stem Cell* 22:191-205.
72. Bansal H, Yihua Q, Iyer SP, Ganapathy S, Proia DA, Penalva LO, Uren PJ, Suresh U, Carew JS,

- Karnad AB, Weitman S, Tomlinson GE, Rao MK, Kornblau SM, Bansal S (2014) WTAP is a novel oncogenic protein in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 28:1171-1174.
73. Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, Wang T, Maciag K, Bushkin GG, Mertins P, Ter-Ovanesyan D, Habib N, Cacchiarelli D, Sanjana NE, Freinkman E, Pacold ME, Satija R, Mikkelsen TS, Hacohen N, Zhang F, Carr SA, Lander ES, Regev A (2014) Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep* 8:284-296.
74. Kan L, Grozhik AV, Vedanayagam J, Patil DP, Pang N, Lim KS, Huang YC, Joseph B, Lin CJ, Despic V, Guo J, Yan D, Kondo S, Deng WM, Dedon PC, Jaffrey SR, Lai EC (2017) The m⁶A pathway facilitates sex determination in *Drosophila*. *Nat Commun* 8:15737.
75. Rottman FM, Bokar JA, Narayan P, Shambaugh ME, Ludwiczak R (1994) N⁶-Adenosine methylation in mRNA: Substrate specificity and enzyme complexity. *Biochimie* 76:1109-1114.
76. Barbieri I, Tzelepis K, Pandolfini L, Shi J, Millán-Zambrano G, Robson SC, Aspris D, Migliori V, Bannister AJ, Han N, De Braekeleer E, Ponstingl H, Hendrick A, Vakoc CR, Vassiliou GS, Kouzarides T (2017) Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m⁶A-dependent translation control. *Nature* 552:126-131.
77. Bertero A, Brown S, Madrigal P, Osnato A, Ortmann D, Yiangou L, Kadiwala J, Hubner NC, de Los Mozos IR, Sadée C, Lenaerts AS, Nakanoh S, Grandy R, Farnell E, Ule J, Stunnenberg HG, Mendjan S, Vallier L (2018) The SMAD2/3 interactome reveals that TGFβ controls m⁶A mRNA methylation in pluripotency. *Nature* 555:256-259.
78. Slobodin B, Han R, Calderone V, Vrielink JAFO, Loayza-Puch F, Elkon R, Agami R (2017) Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N⁶-adenosine Methylation. *Cell* 169:326-337.
79. Huang H, Weng H, Zhou K, Wu T, Zhao BS, 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, Liu J, Lu Z, Yin H, Mesquita A, Yuan CL, Hu YC, Sun W, Su R, Dong L, Shen C, Li C, Qing Y, Jiang X, Wu X, Sun M, Guan JL, Qu L, Wei M, Müschen M, Huang G, He C, Yang J, Chen J (2019) Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m⁶A RNA modification co-transcriptionally. *Nature* 567:414-419.
80. Kolasinska-Zwierz P, Down T, Latorre I, Liu T, Liu XS, Ahringer J (2009) Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat Genet* 41:376-381.
81. Fu Y, Jia G, Pang X, Wang RN, Wang X, Li CJ, Smemo S, Dai Q, Bailey KA, Nobrega MA, Han KL, Cui Q, He C (2013) FTO-mediated formation of N⁶-hydroxymethyladenosine and N⁶-formyladenosine in mammalian RNA. *Nat Commun* 4:1798.
82. Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, Huang H, Nachtergaele S, Dong L, Hu C, Qin X, Tang L, Wang Y, Hong GM, Huang H, Wang X, Chen P, Gurbuxani S, Arnovitz S, Li Y, Li S, Strong J, Neilly MB, Larson RA, Jiang X, Zhang P, Jin J, He C, Chen J (2017) FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N⁶-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer Cell* 31:127-141.
83. Wei CM, Moss B (1977) Nucleotide Sequences at the N⁶-Methyladenosine Sites of HeLa Cell Messenger Ribonucleic Acid. *Biochemistry* 16:1672-1676.
84. Zou S, Toh JDW, Wong KHQ, Gao YG, Hong W, Woon ECY (2016) N⁶-Methyladenosine: A conformational marker that regulates the substrate specificity of human demethylases FTO and ALKBH5. *Sci Rep* 6:1-12.
85. Aas A, Isakson P, Bindesbøll C, Alemu EA, Klungland A, Simonsen A (2017) Nucleocytoplasmic Shuttling of FTO Does Not Affect Starvation-Induced Autophagy. *PLoS One* 12:0168182.
86. Gulati P, Avezov E, Ma M, Antrobus R, Lehner P, O'Rahilly S, Yeo GS (2014) Fat mass and obesity-related (FTO) shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Biosci Rep* 34:00144.
87. Mauer J, Luo X, Blanjoie A, Jiao X, Grozhik AV, Patil DP, Linder B, Pickering BF, Vasseur JJ, Chen Q, Gross SS, Elemento O, Debart F, Kiledjian M, Jaffrey SR (2017) Reversible methylation of m⁶A_m in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* 541:371-375.
88. Garcia-Campos MA, Edelheit S, Toth U, Shachar R, Nir R, Lasman L, Brandis A, Hanna JH, Rossmanith W, Schwartz S (2019). Deciphering the "m⁶A Code" via Antibody-Independent Quantitative Profiling. *Cell* 178:731-747
89. Zheng Q, Hou J, Zhou Y, Li Z, Cao X (2017) The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m⁶A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus. *Nat Immunol* 18:1094-1103.

90. Zhang S, Zhao BS, Zhou A, Lin K, Zheng S, Lu Z, Chen Y, Sulman EP, Xie K, Böglér O, Majumder S, He C, Huang S (2017) m⁶A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program. *Cancer Cell* 31:591-606.
91. Koh CWQ, Goh YT, Goh WSS (2019) Atlas of quantitative single-base-resolution N⁶-methyl-adenine methylomes. *Nat Commun* 10:1-15.
92. Martínez-Pérez M, Aparicio F, López-Gresa MP, Bellés JM, Sánchez-Navarro JA, Pallás V (2017) Arabidopsis m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:10755-10760.
93. Stoilov P, Rafalska I, Stamm S (2002) YTH: A new domain in nuclear proteins. *Trends Biochem Sci* 27:495-497.
94. Abby E, Tourpin S, Ribeiro J, Daniel K, Messiaen S, Moison D, Guerquin J, Gaillard JC, Armengaud J, Langa F, Toth A, Martini E, Livera G (2016) Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nat Commun* 7:10324.
95. Weng YL, Wang X, An R, Cassin J, Vissers C, Liu Y, Liu Y, Xu T, Wang X, Wong SZH, Joseph J, Dore LC, Dong Q, Zheng W, Jin P, Wu H, Shen B, Zhuang X, He C, Liu K, Song H, Ming GL (2018) Epitranscriptomic m⁶A Regulation of Axon Regeneration in the Adult Mammalian Nervous System. *Neuron* 97:313-325.
96. Zhang C, Chen Y, Sun B, Wang L, Yang Y, Ma D, Lv J, Heng J, Ding Y, Xue Y, Lu X, Xiao W, Yang YG, Liu F (2017) m⁶A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature* 549:273-276.
97. Kang HJ, Jeong SJ, Kim KN, Baek IJ, Chang M, Kang CM, Park YS, Yun CW (2014) A novel protein, Pho92, has a conserved YTH domain and regulates phosphate metabolism by decreasing the mRNA stability of PHO4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 457:391-400.
98. Li A, Chen YS, Ping XL, Yang X, Xiao W, Yang Y, Sun HY, Zhu Q, Baidya P, Wang X, Bhattarai DP, Zhao YL, Sun BF, Yang YG (2017) Cytoplasmic m⁶A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res* 27:444-447.
99. Shi H, Wang X, Lu Z, Zhao BS, Ma H, Hsu PJ, Liu C, He C (2017) YTHDF3 facilitates translation and decay of N⁶-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res* 27:315-328.
100. Berlivet S, Scutenaire J, Deragon JM, Bousquet-Antonelli C (2019) Readers of the m⁶A epitranscriptomic code. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1862:329-342.
101. Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, Lu Z, Han D, Ma H, Weng X, Chen K, Shi H, He C (2015) N⁶-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell* 161:1388-99.
102. Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C (2014) N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* 505:117-20.
103. Huang H, Weng H, Sun W, Qin X, Shi H, Wu H, Zhao BS, Mesquita A, Liu C, Yuan CL, Hu YC, Hüttelmaier S, Skibbe JR, Su R, Deng X, Dong L, Sun M, Li C, Nachtergaele S, Wang Y, Hu C, Ferchen K, Greis KD, Jiang X, Wei M, Qu L, Guan JL, He C, Yang J, Chen J (2018) Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol* 20:285-295.
104. Meyer KD, Patil DP, Zhou J, Zinoviev A, Skabkin MA, Elemento O, Pestova TV, Qian SB, Jaffrey SR (2015) 5' UTR m⁶A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* 163:999-1010.
105. Liu N, Dai Q, Zheng G, He C, Parisien M, Pan T (2015) N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature* 518:560-564.
106. Liu N, Zhou KI, Parisien M, Dai Q, Diatchenko L, Pan T (2017) N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res* 45:6051-6063.
107. Wu B, Su S, Patil DP, Liu H, Gan J, Jaffrey SR, Ma J (2018) Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1. *Nat Commun* 9:420.