

ФУНКЦИИ N6-МЕТИЛАДЕНОЗИНА РНК В КЛЕТОЧНОМ ЯДРЕ

Обзор

© 2024 Н.А. Жигалова¹, К.Ю. Олейникова¹, А.С. Рузов¹, А.С. Ермаков^{1,2*}

¹ Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук,
119071 Москва, Россия; электронная почта: ermakov99@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 23.07.2023

После доработки 24.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

N6-Метиладенозин (m^6A) является одной из наиболее распространённых модификаций матричных РНК (мРНК) в эукариотических и прокариотических организмах. В течение последних лет был накоплен большой объём экспериментальных данных по участию m^6A -метилирования в регуляции стабильности и трансляции различных мРНК, причём до недавнего времени большинство таких исследований было сфокусировано на цитоплазматических функциях этой модификации. Данный обзор посвящён рассмотрению ряда новых работ, раскрывающих роль N6-метиладенозина в процессах, происходящих в клеточном ядре, таких как транскрипция, организация хроматина, сплайсинг, ядерно-цитоплазматический транспорт и метаболизм РНК:ДНК гибридов. Основываясь на этом анализе, мы предлагаем рассматривать модификации ядерных РНК как дополнительную детерминанту регуляции экспрессии генов, которая наряду с метилированием ДНК и модификациями гистонов определяет структуру и функции хроматина в различных биологических контекстах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: модификации РНК, N6-метиладенозин (m^6A), метилтрансферазы METTL3 и METTL14, деметилазы FTO и ALKBH5, m^6A -связывающие белки семейства YTHDF и YTHDC, хроматин, R-петли.

DOI: 10.31857/S0320972524010099 EDN: YRBLDZ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно около 170 различных неканонических нуклеотидов, встречающихся в составе РНК эукариотических и прокариотических организмов [1]. Подобно модификациям ДНК, большинство модификаций РНК являются обратимыми и могут быть вовлечены в быструю регуляцию различных биологических процессов [2]. Аденозин может быть метилирован по трём атомам азота в положениях N1, N2 или N6. Присутствие в биологических системах РНК с аденозином, метилированным по атому азота в позиции N6 (N6-ме-

тиладенозин, m^6A), было открыто в 1970-х гг. [3, 4]. m^6A является наиболее распространённой модификацией эукариотических мРНК. Примерно 25% мРНК млекопитающих содержат от одной до трёх таких модификаций на транскрипт [3, 5, 6]. Присутствие m^6A в составе мРНК эволюционно консервативно, этот нуклеозид был обнаружен в РНК прокариот [7], а также различных групп эукариот, включая дрожжи, насекомых и растения [8–10]. В большинстве случаев m^6A встречается в контексте последовательности (G/A)(m^6A)C [11, 12]. Сайты m^6A -метилирования, как правило, обогащены консенсусным мотивом RRACH (R = G или A и H = A, C или U) и чаще обнаруживаются в 3'-нетранслируемых областях, а также присутствуют вокруг стоп-кодонов, в 3'-участках экзонов и в 5'-нетранслируемых областях (UTR) в транскриптах человека и мыши [13, 14]. Помимо мРНК, m^6A присутствует в длинных некодирующих РНК (днкРНК, lncРНК), таких как *Xist*, а также малых ядерных

Принятые сокращения: днкРНК – длинные некодирующие РНК; сарРНК – chromosome associated regulatory RNAs, ассоциированные с хромосомами регуляторные РНК; m^6A – N6-метиладенозин; m^6A -мРНК – m^6A -модифицированная мРНК.

* Адресат для корреспонденции.

и рибосомных РНК [15–18]. Поскольку её введение является динамически обратимым процессом, m^6A -метка может быть добавлена с помощью метилтрансфераз (известных как «писатели») и удалена с помощью деметилаз (известных как «стиратели») [19–24]. Кроме того, существуют специфические белки, распознающие m^6A (известные как «считыватели»), которые могут напрямую или косвенно через белки-партнёры связывать последовательности, содержащие эту модификацию, влияя на метаболизм различных мРНК [25–27]. Такая обратимость m^6A -метилирования вносит дополнительную гибкость в регуляцию экспрессии генов. Многочисленные исследования показали, что m^6A -метилирование, вероятно, является ключевым регулятором целого ряда важных биологических процессов, таких как эмбриональное развитие, обновление и дифференцировка стволовых клеток, иммунный ответ, а также участвует в опухолеобразовании и патогенезе метаболических заболеваний [19, 28–32]. Примечательно, что большинство работ, посвящённых исследованию m^6A -метилирования, до недавнего времени было преимущественно сосредоточено на исследовании цитоплазматических функций этой модификации, таких как регуляция стабильности и трансляция мРНК в различных модельных системах. Это положение вещей изменилось в последние годы с появлением исследований роли m^6A -метилирования в метаболизме различных ядерных РНК. Так как количество таких исследований постоянно увеличивается, мы считаем своевременным обзор и осмысление этих результатов. Основываясь на этом, в данном обзоре мы приводим анализ современных представлений об участии m^6A в регуляции биологических процессов, происходящих в ядре эукариотических клеток, уделяя внимание механизмам хранения и реализации генетической информации, в первую очередь – организации хроматина. Также мы рассматриваем участие m^6A в организации R-петель – структур, образуемых в клеточном ядре в результате формирования РНК:ДНК гибридных гетеродимеров.

m^6A -«ПИСАТЕЛИ», «СТИРАТЕЛИ» И «СЧИТЫВАТЕЛИ»

На данный момент охарактеризованы метилтрансферазы и деметилазы, которые обеспечивают установку и удаление m^6A из разных типов РНК [20]. Для мРНК и других транскриптов, которые синтезируются РНК-полимеразой II (таких как большинство малых РНК, микроРНК, миРНК), описан комплекс метилтрансфераз METTL3–METTL14–WTAP, ответственный за внесение m^6A во вновь синтезированные РНК в ядре

клетки [18]. METTL3, основной компонент с метилтрансферазной активностью, в присутствии S-аденозилметионина (SAM) может катализировать метилирование РНК в ядре во время транскрипции. METTL14 является аллостерическим активатором и действует как РНК-связывающая платформа, образуя стабильный гетеродимер с METTL3 и усиливая таким образом его каталитический эффект [21, 22]. WTAP-Белок, ассоциированный с опухолью Вильмса 1, взаимодействует с METTL3 и METTL14 и важен как для локализации данного метилтрансферазного комплекса в ядерных регионах, обогащённых факторами процессинга пре-мРНК, так и для каталитической активности METTL3 [23]. WTAP может также связываться с другими белками, обладающими метилтрансферазной активностью [24]. Например, белок RBM15/15B, связываясь с WTAP, привлекает метилтрансферазный комплекс к сайтам модификации аденина на мРНК. Этот процесс важен для контроля инактивации X-хромосомы [16, 33]. Недавно открытая метилтрансфераза 5 (METTL5) была идентифицирована как новая метилтрансфераза, ответственная за m^6A -метилирование 28S рРНК и 18S рРНК [31]. Уменьшение уровня METTL5 приводит к нарушению сборки 80S рибосомы и снижению трансляции мРНК, участвующих в метаболизме жирных кислот [34]. Другой фермент – METTL16 (метилтрансфераза 16) – катализирует образование метилированного аденина в малой ядерной РНК U6 (мяРНК), участвующей в сплайсинге и входящей в группу ядерных мРНК [35]. В отличие от комплекса METTL3–METTL14, METTL16 может метилировать только ограниченное количество мРНК, содержащих специфический структурный элемент вместе с последовательностью 5'-UACAGAGAA-3' [35–37]. В последние годы были обнаружены и другие «писатели» m^6A , в том числе ZC3H13, VIRMA, ZCSC4 и NAKAI [38]. Многие из них связаны с процессами опухолеобразования, например, экспрессия ZC3H13 коррелирует с уровнем клинико-патологических факторов, наблюдающихся при некоторых видах рака почки [39], а метилтрансфераза VIRMA (KIAA1429) выступает как онкоген в злокачественных опухолях молочной железы, гепатоцеллюлярной карциноме (НСС), немелкоклеточном раке лёгкого и остеосаркоме [40]. Несмотря на многообразие вновь открывающихся потенциальных m^6A -метилтрансфераз, комплекс METTL3–METTL14–WTAP остаётся главным и основным ответственным за внесение m^6A во вновь синтезированные РНК в ядре клетки.

Удаление m^6A из РНК может осуществляться двумя различными деметилазами: FTO (белок жировой массы и ожирения) и ALKBH5 (гомолог 5 альфа-кетоглутарат-зависимой диоксигеназы AlkB *E. coli*) [41, 42]. Между двумя m^6A -деметилазами

существует функциональная разница. Так, ГТО деметирует m^6A , находящийся во внутренних районах мРНК, наряду со «стиранием» целого ряда других РНК-модификаций (U6 РНК, N6, 2-О-диметиладенозин (m^6Am) на мРНК, N1-метиладенозин (m^1A) на тРНК, 3-метилтимин (m^3T) на одноцепочечных ДНК (оцДНК) и 3-метилурацил (m^3U) на оцРНК), а ALKBH5 отвечает только за катализ удаления m^6A на оцРНК [41–44]. Примечательно, что ALKBH5 локализован в ядерных регионах, обогащённых факторами процессинга мРНК. Этот факт подтверждает то, что именно ядерные РНК являются основными субстратами ALKBH5 [42].

m^6A -Метилазы и -деметилазы играют важные роли в процессах, происходящих в ядрах эукариотических клеток. METTL14 и ALKBH5 могут способствовать развитию рака, регулируя уровни m^6A в ключевых транскриптах генов эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), а также в транскриптах, связанных с ангиогенезом, включая TGF- β [45]. Panneerdoss et al. показали, что METTL14 и ALKBH5 определяют статус метилирования аденозина генов-мишеней, контролируя экспрессию друг друга. Наличие гипоксии в опухолях изменяет уровень модификации m^6A , что приводит к повышению экспрессии транскриптов-мишеней METTL14 и ALKBH5 в раковых клетках [45]. Например, в клетках рака молочной железы гипоксия стимулирует HIF-1 α - и HIF-2 α -зависимую экспрессию ALKBH5 (HIF – гипоксически индуцируемый фактор), которая деметирует мРНК транскрипционного фактора NANOG. Это приводит к увеличению экспрессии мРНК и белка NANOG, онкологической трансформации стволовых клеток и развитию рака молочной железы (BCSC) [46].

В качестве так называемых «считывателей» m^6A выступают члены семейства m^6A -связывающих белков, содержащие домен YTH (семейства YTHDF и YTHDC), гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (HNRNP) и белки, связывающие мРНК инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2BP) [47–49]. Семейство YTHDF включает три паралога (YTHDF1, YTHDF2 и YTHDF3), каждый из которых имеет разные функции. Основная роль YTHDF1 заключается в увеличении скорости трансляции m^6A -модифицированных мРНК (m^6A -мРНК) путём стимулирования сборки рибосомы на m^6A -содержащих мРНК и взаимодействия с фактором инициации трансляции ELF3C, YTHDF1 избирательно распознаёт m^6A -РНК в последовательности GRm⁶AC (где R представляет собой G или A) [26]. Сайты связывания YTHDF1 чаще всего располагаются вблизи стоп-кодонов и в 3'-нетранслируемых регионах (3'-UTR) [50]. Основная функция YTHDF2 – регулирование стабильности m^6A -РНК. Карбоксиконцевой домен YTHDF2 отвечает за связывание с m^6A -РНК, а аминоконцевой домен – за расположение YTHDF2 на мРНК в

местах её дальнейшей деградации [25, 51]. YTHDF3 усиливает и трансляцию, и деградацию транскриптов мРНК в различных биологических системах [25, 47]. Согласно преобладающей модели, наибольшая часть (~44%) m^6A -мРНК связывает только один из YTHDF-белков. Только около ~32% m^6A -мРНК связывают два паралога YTHDF одновременно. m^6A -мРНК, которые связывают все три паралога YTHDF, относительно редки (24%) [52]. Каждый из паралогов YTHDF опосредует эффекты m^6A , воздействуя на определённые когорты m^6A -мРНК, это приводит к тому, что разные паралоги YTHDF контролируют различные физиологические процессы [26, 51, 53–55].

К YTH-«считывателям» также относятся белки YTHDC1 и YTHDC2 [56, 57]. YTHDC1 – участник сигнального пути, который влияет на выбор сайта сплайсинга. Этот белок изменяет паттерны альтернативного сплайсинга в зависимости от своей концентрации и играет важную роль в процессинге транскриптов пре-мРНК в ядре [56, 57]. YTHDC1 может распознавать ассоциированные с хромосомами регуляторные РНК (chromosome associated regulatory RNAs, carRNAs, carРНК), модифицированные m^6A -РНК, и способствовать распаду и интерпретации этих РНК, регулируя степень компактизации хроматина, так же как и уровни транскрипции соответствующих генов [58]. YTHDC2 представляет собой белок со множеством разных доменов, который регулирует трансляцию, стабилизирует транскрипты и даже может выступать в качестве хеликазы [59].

В настоящее время выделяют ещё два семейства m^6A -связывающих белков: HNRNP-семейство (HNRNPC, HNRNPG и HNRNPA2B1) и белки, связывающие мРНК инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2BP1-3) [48, 49]. HNRNPC, HNRNPG и HNRNPA2B1 участвуют в сплайсинге пре-мРНК и регуляции стабильности мРНК, подобно YTH-белкам [48, 60]. HNRNPC и HNRNPG связывают m^6A -модифицированную РНК посредством механизма « m^6A -переключения», при котором m^6A -опосредованная дестабилизация шпильки РНК обнажает одноцепочечный мотив связывания белков HNRNPC и HNRNPG [60]. С другой стороны, белок HNRNPA2B1 распознаёт m^6A -модифицированный нуклеотид через прямое связывание метилированного консенсусного сайта Rgm⁶AC [60]. Взаимодействие HNRNPA2B1 с m^6A -РНК влияет на сплайсинг РНК и процессинг первичных микроРНК [60]. Повышенный уровень HNRNPA2B1 часто ассоциирован со злокачественными новообразованиями, большинство исследователей относят данный белок «считыватель» к онкогенам, и он представляет большой научный интерес в области изучения опухолеобразования [61]. До сих пор спорным остаётся вопрос о прямом или непрямом связыва-

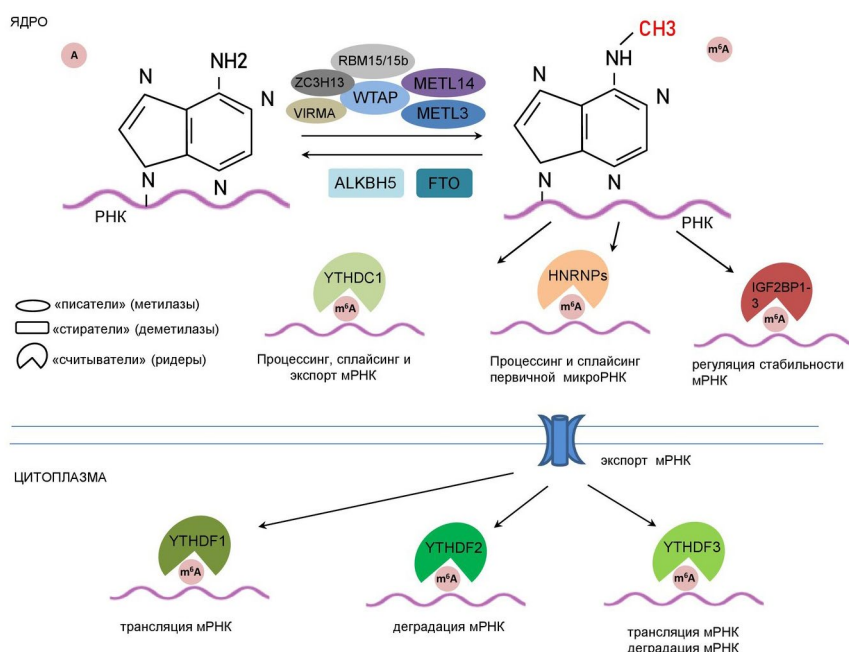


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая роль белков, участвующих в регуляции уровня m^6A и интерпретирующих данную модификацию в клетках эукариот. Метилирование аденозина осуществляется метилтрансферазным комплексом, состоящим из METTL3, METTL14 и белка WTAP. WTAP может взаимодействовать и с другими метилтрансферазами («писателями»): RBM15/15b, ZC3Y13, VIRMA. Деметилазы или «стиратели» ALKBH5 и FTO удаляют m^6A с мРНК. В ядре и цитоплазме m^6A -РНК может распознаваться и регулироваться различными «считывателями»: белками семейства YTH (YTHDC1, YTHDF1-3), семейства HNRNP (HNRNPC, HNRNPG и HNRNPA2B1) и IGF2BP1-3-факторами.

нии белков-«считывателей» и белков семейства IGF2BP1-3 с m^6A -содержащими РНК. Показано, что IGF2BP-белки выполняют важную функцию в стабилизации мРНК, сохранении её целостности. Так, например, при стрессовых состояниях в клетке IGF2BP1 формирует агрегаты с m^6A -мРНК, сохраняя тем самым мРНК в трансляционно неактивном состоянии [49].

Таким образом, для m^6A известны белки, которые регулируют уровень распределения этой модификации в клетке, а именно метилазы и деметилазы, а также m^6A -связывающие белки («считыватели»), интерпретирующие данную модификацию в различных биологических системах (рис. 1).

ЯДЕРНЫЕ ФУНКЦИИ N6-МЕТИЛАДЕНОЗИНА

Сплайсинг и созревание пре-мРНК. РНК-Полимераза II синтезирует пре-мРНК, которая, проходя через события посттранскрипционного процессинга во время созревания, такие как 5'-кэпирование, сплайсинг и 3'-полиаденилирование, трансформируется в зрелую мРНК [62]. При сплайсинге из длинной молекулы РНК удаляются участки, соответствующие интронам, и в новой молекуле РНК остаются участки, соответствующие экзонам. Ещё в 1976 г. было показано, что m^6A более распростра-

нена в пре-мРНК, чем в зрелой мРНК, что предполагает возможную значимость этой модификации для процесса сплайсинга [63]. В этом контексте также интересен факт того, что m^6A обычно появляется в экзонных областях до или вскоре после определения экзона в формирующейся пре-мРНК, а метилирование и деметилирование, происходящие в цитоплазматической мРНК, количественно незначительны. При этом добавление m^6A в формирующийся транскрипт является детерминантой стабильности цитоплазматической мРНК. Carrol et al. показали, что интрон-специфическая последовательность молекулы РНК пролактина содержит m^6A , при этом преобладающий сайт метилирования находится в пределах консенсусной последовательности AG m^6A CU [64]. m^6A -Связывающий белок YTHDC1 является участником сигнального пути, который влияет на выбор сайта сплайсинга, изменяя паттерны альтернативного сплайсинга в зависимости от концентрации, и взаимодействует с факторами процессинга 3'-конца пре-мРНК, CPSF6, SRSF3 и SRSF7 [57]. Исследования на *Drosophila melanogaster* [9, 65] и клеточных линиях человека [66] показали, что YTHDC1 связывается непосредственно напрямую с m^6A -модифицированной мРНК и регулирует альтернативный сплайсинг путём привлечения фактора сплайсинга SRSF3, который способствует включению экзона, ингибируя связывание фактора сплайсинга

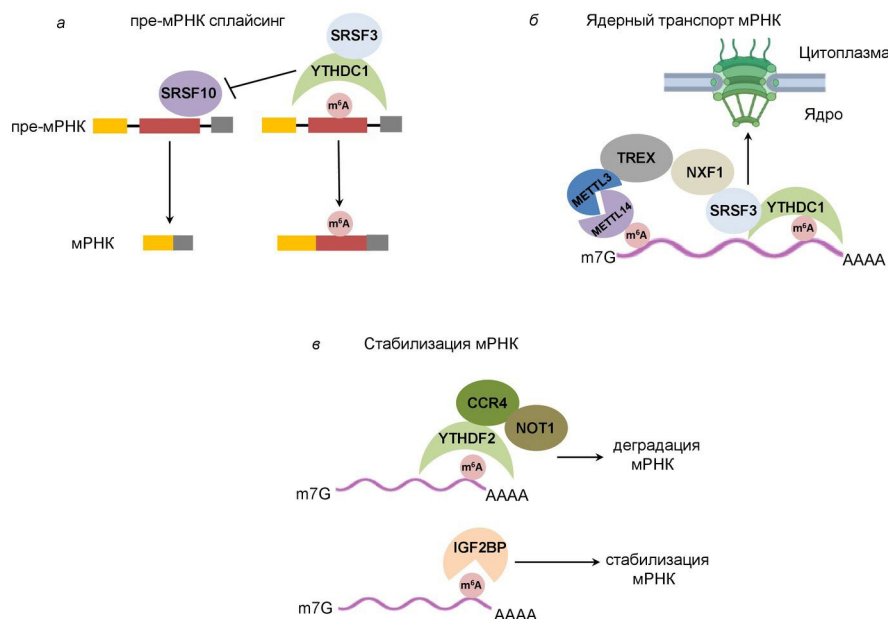


Рис. 2. Функциональные роли m^6A в клеточном ядре. *а* – m^6A регулирует сплайсинг пре-мРНК. Связывание YTHDC1 с m^6A приводит к вырезанию экзона за счёт блокирования связывания фактора сплайсинга SRSF10 с пре-мРНК. В отсутствии N6-метилирования аденозина белок SRSF10 связывается с пре-мРНК, что приводит к пропуску экзона. *б* – N6-Метилирование аденозина способствует ядерному экспорту мРНК за счёт взаимодействия YTHDC1 с комплексом белков SRSF3/NXF1; в свою очередь, комплекс TREX может привлекать метилтрансферазы к сайтам метилирования аденина мРНК. *в* – m^6A может как усиливать деградацию различных мРНК, так и стабилизировать их. YTHDF2 способствует деградации m^6A -модифицированных транскриптов, привлекая к таргетной мРНК CCR4–NOT1-комплекс деаденилаз. В свою очередь, IGF2BP (белок, связывающий мРНК инсулиноподобного фактора роста 2) связывается с m^6A -содержащими мРНК и, напротив, защищает их от деградации

SRSF10, что приводит к пропуску экзонов в мРНК (рис. 2, *а*). Kasowitz et al. показали, что YTHDC1 играет критическую роль в процессинге транскриптов пре-мРНК в ядре ооцитов. Недостаток YTHDC1 приводит к дефектам альтернативного сплайсинга в ооцитах, и развитие YTHDC1-дефицитных ооцитов останавливается на стадии первичного фолликула. При этом большинство наблюдаемых дефектов сплайсинга было возможно устранить путём введения в ооциты YTHDC1 дикого типа [57].

Метилтрансфераза METTL3 и белок WTAP также регулируют экспрессию и альтернативный сплайсинг генов, участвующих в транскрипции и процессинге РНК. Удаление METTL3 в половых клетках приводит к торможению дифференцировки сперматогоний и блокирует инициацию мейоза [67]. Эти события сопряжены с нарушением сплайсинга и нестабильностью мРНК генов, функционирующих в сперматогенезе. Экспрессия генов и сплайсинг мРНК также могут регулироваться m^6A -деметиلاзой FTO, которая контролирует экзонный сплайсинг адипогенного регуляторного фактора RUNX1T1, специфически понижая уровни m^6A вокруг сплайс-сайтов [68].

Ядерно-цитоплазматический транспорт и стабилизация мРНК. Одним из наиболее важных механизмов регуляции экспрессии генов является

экспорт зрелой мРНК из ядра через ядерную пору в цитоплазму. Процесс экспорта мРНК из ядра в цитоплазму связывает транскрипцию и процессинг мРНК в ядре с экспрессией генов в цитоплазме. В начале 1980-х гг. было показано, что обработка клеток, заражённых вирусом SV40, циклолейцином (ингибитором метилирования) практически не изменяет общего количества вирусной мРНК в ядре, но приводит к значительному снижению её уровней в цитоплазме, что указывает на возможную роль m^6A в модуляции связанного с процессингом транспорта мРНК из ядра в цитоплазму [69]. В ряде работ показано, что m^6A способствует ядерному экспорту мРНК [70]. m^6A присутствует в пре-мРНК, и некоторые из факторов, вовлечённых в процесс модификации РНК, были обнаружены в ядерных спеклах [23]. Модифицированная мРНК экспортируется из ядра независимым от Ran способом посредством комплекса TREX. TREX представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс (мРНК), содержащий белковые факторы, необходимые для связывания мРНК с экспортным рецептором NXF1 [70–72] (рис. 2, *б*). Было показано, что комплекс TREX привлекается к m^6A -модифицированным мРНК, и этот процесс необходим для эффективного экспорта мРНК. TREX стимулирует привлечение m^6A -связывающего белка YTHDC1

к мРНК [70]. Roundtree et al. обнаружили, что m^6A -связывающий белок YTHDC1 опосредует экспорт метилированной мРНК из ядра и взаимодействует с фактором сплайсинга и адаптерным белком ядерного экспорта SRSF3, облегчая связывание РНК как с SRSF3, так и с NXF1. Недостаток YTHDC1 приводит к задержке экспорта ядерной m^6A -мРНК [73]. Известно, что SRSF3 связывает NXF1, поэтому было предположено, что YTHDC1 может привлекать NXF1 и способен запускать селективный экспорт m^6A -модифицированных мРНК [74] (рис. 2, б). Lesbirel et al. обнаружили, что комплекс TREX взаимодействует с комплексом белков, устанавливающих модификацию m^6A (WTAP, KIAA1429, METTL3, METTL14), и этот процесс важен для эффективного экспорта мРНК. TREX стимулирует привлечение m^6A -связывающего белка YTHDC1 к мРНК [70]. С другой стороны, показана роль деметилаз m^6A в экспорте мРНК и сборке факторов процессинга мРНК в ядерных спеклах. Например, уменьшение количества ALKBH5 ускоряет транслокацию мРНК из ядра в цитоплазму и приводит к избыточному накоплению мРНК в этом клеточном компартменте [42]. Важная роль ALKBH5 в ядерном транспорте была показана при изучении механизма ингибирования продукции интерферонов типа I. При вирусной инфекции клеток хеликаза DDX46 привлекала деметилазу ALKBH5 к молекуле РНК, что, в свою очередь, стимулировало деметилирование m^6A -модифицированных противовирусных транскриптов, приводило к их удержанию в ядре, соответственно, предотвращая их трансляцию и, как следствие, ингибируя продукцию интерферона [75]. Важно отметить, что нарушение процессинга и экспорта мРНК связано с метастазированием [76], и, согласно ряду исследований, удаление METTL3 приводило к снижению m^6A , тем самым ухудшая миграцию, инвазию и ЭМП раковых клеток [77].

Процессинг мРНК и ядерный экспорт играют важную роль в циркадном ритме. Примечательно, что ингибирование метилирования аденозина удлиняет циркадный период. Fustin et al. идентифицировали сайты m^6A на многих транскриптах генов, связанных с регуляцией суточных ритмов. Специфическое ингибирование метилирования аденозина путём подавления m^6A -метилтрансферазы METTL3 было достаточным для задержки процессинга РНК. В таком случае происходило нарушение динамики установленных ритмов изменения уровней пре-мРНК и мРНК белков-регуляторов суточных ритмов, Per2 и Arntl, что подразумевало понижение скорости экспорта зрелой мРНК этих белков из ядра в цитоплазму [78].

Помимо ядерно-цитоплазматического транспорта, m^6A -метилирование может ускорять деградацию или стабилизацию ядерных мРНК. Так, метил-РНК-связывающий белок-«считыватель»

YTHDF2 распознаёт m^6A -РНК в сайтах связывания с консенсусной последовательностью «GAAC», привлекая деаденилазный комплекс CCR4–NOT1, что приводит к деградации мРНК [79]. В то же время белки-«считыватели» m^6A семейства IGF2BP распознают АТ-обогащённые участки m^6A -РНК, стабилизируя и сохраняя её в нетранслируемом состоянии (рис. 2, в) [49]. Интересно, что высокий уровень экспрессии этих белков характерен для различных видов рака [77].

m^6A -РНК и организация структуры хроматина. С хроматином могут физически связываться различные типы РНК, включая ассоциированные с промотором РНК (пРНК), энхансерные РНК (эРНК) и повторяющиеся РНК, транскрибируемые с транспозонов [80]. сагРНК принимают участие в регуляции организации хроматина, влияя таким образом на уровень транскрипции соответствующих генов и пространственную структуру ядерных субдоменов. Согласно недавнему исследованию, РНК-модификации, присутствующие на сагРНК, регулируют локальную доступность хроматина и транскрипцию [58]. Удаление METTL3 в эмбриональных стволовых клетках мыши повышает стабильность сагРНК, приводя к более открытому состоянию хроматина и активации транскрипции целого ряда генов. Снижение уровня метилирования m^6A , вызванное удалением метилтрансферазы METTL3, а также сайт-специфическое деметилирование m^6A -обогащённых областей увеличивают уровень сагРНК и способствуют формированию открытой конформации хроматина. Таким образом, уровень m^6A в РНК, ассоциированных с хроматином, влияет на организацию хроматина и транскрипцию [58]. Авторы другого исследования обнаружили, что m^6A селективно обогащены зарождающиеся РНК (nascent RNA), продуцируемые регуляторными элементами транскрипции, включая антисмысловые РНК, связывающиеся с областью выше промотора, и эРНК. Примечательно, что m^6A -эРНК характерны для высокоактивных энхансеров [81].

ДнкРНК являются критическими регуляторами эпигенетических механизмов [82]. Например, днкРНК *XIST* имеет решающее значение для поддержания компенсации дозы экспрессии генов между полами, полностью «покрывая» одну из X-хромосом у женщин и подавляя экспрессию генов в одной из копий X-хромосомы [83]. Недавняя работа показала, что для функциональной активности *XIST* необходимы химические модификации IncРНК [16]. Используя метод, позволяющий картировать m^6A с разрешением до отдельных нуклеотидов (miCLIP), Patil et al. выявили 78 предполагаемых сайтов m^6A на *XIST* рядом с областью повтора аденина (A) и показали, что в процесс метилирования аденозина в *XIST*-РНК, а также в клеточных мРНК вовлечены РНК-связывающий

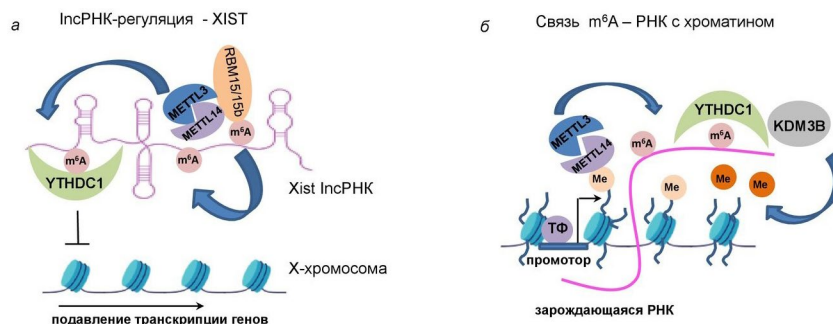


Рис. 3. Роль m⁶A в организации структуры хроматина. а – m⁶A регулирует активность и конформацию длинных некодирующих РНК (днкРНК). ДнкРНК *Xist* содержит N6-аденозин, который через RBM15/15b-YTHDC1-зависимый механизм способствует опосредованной *Xist* репрессии генов и инактивации X-хромосомы. б – YTHDC1 может связываться как с m⁶A-модифицированными транскриптами, так и с деметилазой лизина 9 гистона H3 (H3K9), KDM3B, что приводит к деметилированию гистонов и повышению доступности хроматина в активно транскрибируемых регионах

белок 15 (RBM15) и его паралог RBM15B [16]. Эксперименты по ко-иммунопреципитации показали взаимодействие между RBM15/RBM15B и METTL3, зависимое от присутствия WTAP. Используя доксициклин-индуцируемую систему экспрессии *XIST*, авторы продемонстрировали, что нокдауны RBM15 и RBM15B не влияли на подавление экспрессии мишеней *XIST*, *Gpc4* и *Atrx*, тогда как двойной нокдаун RBM15/RBM15B приводил к существенному увеличению транскрипции *Gpc4* и *Atrx* [16]. Эти результаты предполагают, что функции RBM15 и RBM15B существенно пересекаются. Кроме того, нокдаун RBM15/RBM15B значительно понижал количество m⁶A на *XIST*-РНК. Взаимодействие RBM15/RBM15B с *XIST*-РНК привлекает остальных членов метилтрансферазного комплекса, что, в свою очередь, приводит к метилированию аденозиновых нуклеотидов в соседних консенсусных мотивах. С такими участками может связываться белок YTHDC1 и, как результат, подавлять транскрипцию *XIST*-РНК [16] (рис. 3, а).

Метилтрансферазы METTL3/METTL14 также участвуют в регуляции метилирования гистонов специфической модификации H3K9me2 [84]. Так, модификация H3K9me2 может быть специфически удалена путём индукции m⁶A-модифицированных транскриптов. Недавняя работа показала полногеномную корреляцию между распределением m⁶A в зарождающихся, связанных с хроматином, транскриптах и деметилазой H3K9me2, KDM3B. Авторы этого исследования обнаружили, что белок-считыватель m⁶A, YTHDC1, взаимодействует с KDM3B и привлекает этот белок к m⁶A-обогащённым районам хроматина, способствуя деметилированию H3K9me2 и активации экспрессии генов [85] (рис. 3, б). YTHDC1 участвует в деградации m⁶A-модифицированной РНК, в частности LINE1 (long-interspersed element-1)-повторов, посредством механизма, опосредованного белком NEXT в клеточном ядре [58].

В подтверждение роли m⁶A-метилирования в регуляции структуры хроматина недавние исследования показали, что METTL3 вовлечён в регуляцию структуры хроматина в ходе дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши в кардиомиоциты [85]. Удаление METTL3 в мышечных эмбриональных стволовых клетках изменяет степень компактности хроматина как в промоторных областях, так и в кодирующих районах генов, что увеличивает восприимчивость стволовых клеток к сигналам дифференцировки в направлении кардиомиоцитов [85]. Ещё один механизм регуляции состояния хроматина связан с FTO-зависимым деметилированием РНК LINE1-повторов [86] в эмбриональных стволовых клетках мыши. Присутствие LINE1-РНК способствует формированию открытого состояния LINE1-содержащих областей хроматина, а дефицит деметилазы FTO приводит к увеличению содержания m⁶A в LINE1-РНК и, как следствие, к её дестабилизации, что в итоге приводит к компактизации хроматина и снижению уровня транскрипции [86].

Более того, в другой работе было показано, что m⁶A-метилирование вовлечено в регуляцию стабильности некодирующих РНК (non-coding RNAs) в хроматине [87]. При дефиците гистона H1 наблюдается усиление транскрипции некодирующих РНК и, параллельно с этим, снижение уровня m⁶A в этих РНК, что приводит к более высокой степени ассоциации некодирующих РНК с хроматином. Высокий уровень m⁶A в некодирующих РНК коррелировал с их низким уровнем экспрессии и высоким содержанием гистона H1 в клетках дикого типа. В клетках, нокаутных по METTL3, где ожидаемо снижалось содержание m⁶A, наблюдалось повышение уровней экспрессии некодирующих РНК. Совокупность этих данных позволяет говорить о том, что m⁶A-метилирование играет ключевую роль в процессе регуляции круговорота некодирующих РНК в хроматине [87].

Помимо влияния на структурную укладку и степень компактизации хроматина, m^6A -метилирование также, вероятно, вовлечено в регуляцию метилирования ДНК (5-метилцитозин, 5mC). В одной из недавних работ было показано, что в эмбриональных стволовых клетках человека m^6A -считыватель YTHDC2 связывается с ассоциированными с хроматином m^6A -содержащими РНК LTR7/HERV-H-транспозонов [88]. При этом YTHDC2 привлекает ДНК-деметилазу TET1 в соответствующие локусы, что ведёт к их деметилированию и активации транскрипционной активности в этих областях [88].

Роль m^6A в регуляции метаболизма R-петель.

R-Петли – это трёхцепочечные структуры, которые формируются из свободной одноцепочечной цепи ДНК и РНК:ДНК гибрида. Эти структуры присутствуют во всех живых организмах, от бактерий до эукариот, и составляют порядка 5, 8 и 10% от полного генома человека, дрожжей и *Arabidopsis thaliana* соответственно [89–91].

R-Петли могут быть образованы в ряде случаев: (1) в ходе процесса репликации, когда праймаза DnaG синтезирует РНК-праймеры фрагментов Оказаки [92], или (2) из транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой [93]. R-Петли встречаются преимущественно в районах транскрибируемых генов [94], могут накапливаться в повторяющихся последовательностях генома, таких как центромеры, теломеры и ретротранспозоны [95–97], а также участвуют в целом ряде ключевых биологических процессов, таких как инициация и терминация транскрипции, репликация, поддержание стабильности теломер и рекомбинация иммуноглобулинов [98, 99]. Тем не менее эти структуры также являются мощными индукторами повреждения ДНК и препятствуют репарации, тем самым действуя как источник нестабильности генома [100]. Поэтому регуляция уровня R-петель в клетке имеет решающее значение для её жизнедеятельности и достигается либо предотвращением их образования, либо через удаление этих структур специфическими нуклеазами (например, рибонуклеазой H – РНКазой H) и хеликазами (например, сенатаксином и белком Fanconi Anemia (FA) Complementation Group M, FANCM) [101]. R-Петли являются источником геномной нестабильности и репликативного стресса. Оба эти явления, в свою очередь, являются факторами канцерогенеза и клеточной трансформации. Таким образом, R-петли могут вносить свой вклад в образование опухолей в клетках млекопитающих [89, 102–104]. В свете вышеизложенного очевидно, что существует большое число факторов метаболизма как ДНК, так и РНК, которые препятствуют образованию R-петель в эукариотических клетках. Дисфункция таких факторов вызывает накопление R-петель, которые, в свою очередь, могут

не только увеличивать геномную нестабильность и репликативный стресс, но также подавлять экспрессию генов и вести к перестройкам хроматина, которые часто ассоциированы с различными генетическими заболеваниями [102].

Исторически роль R-петель в физиологии бактерий (в частности, в организме кишечной палочки *Escherichia coli*) была впервые продемонстрирована группой во главе с Томицава в 1980-х гг. Исследования учёных показали, что в процессе репликации плазмиды ColE1 РНК-полимераза II формирует R-петли, которые впоследствии расщепляются РНКазой H (фермент, который специфически расщепляет РНК-компонент РНК:ДНК гибридов), образуя 3'-ОН-концы, необходимые для инициации синтеза ДНК [93].

Другая группа показала, что клетки *E. coli* с дефицитом RecG (хеликаза, которая способна «разрешить», т.е. распутать структуру R-петель) или РНКазы H характеризуются явлением, названным авторами «конститутивной стабильной репликацией ДНК», когда образованные в процессе транскрипции R-петли опосредуют постоянное формирование репликационных вилков, приводя к активной безостановочной репликации хромосомной ДНК [105].

Та же группа исследователей также показала, что мутанты, дефектные как по RecG, так и по РНКазе H, являются нежизнеспособными. Таким образом, R-петли, постоянно образующиеся в геноме *E. coli*, летальны до тех пор, пока они не будут «разрешены», т.е. устранены [105].

Кроме того, другая исследовательская группа (во главе с Drolet) продемонстрировала убедительные результаты, подтверждающие, что образование R-петель представляет собой основную причину физиологических аномалий, наблюдаемых в мутантах *E. coli* с дефицитом топоизомеразы I [106, 107].

Роль m^6A в метаболизме R-петель была задокументирована на уровне различных клеточных процессов во множестве организмов, в том числе в эукариотических геномах [108]. Abakir et al., используя метод иммунопреципитации со специфическими антителами к РНК:ДНК гибридам (метод DRIP) и к модификации m^6A (метод m^6A -ДНК-иммунопреципитации, или m^6A -DIP), показали, что m^6A детектируется в большинстве РНК:ДНК гибридов в плюрипотентных стволовых клетках человека [108]. Более того, белок-считыватель m^6A YTHDF2, который способствует деградации мРНК [25], также взаимодействует с участками генома, обогащёнными R-петлями, а нокаут YTHDF2 вызывает повышение уровня содержания R-петель в геноме, замедление скорости клеточного роста и накопление фосфорилированной формы гистона H2AX (γ H2AX), который является

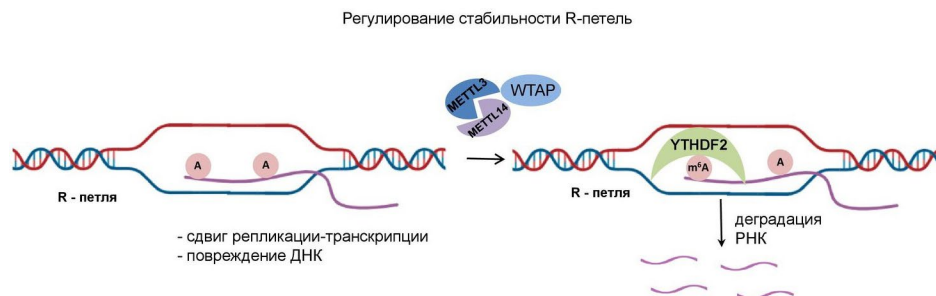


Рис. 4. Регуляция стабильности R-петель в клетке: формирование РНК:ДНК гибридов может приводить к конфликтам репликации и транскрипции, повреждению ДНК и двухцепочечным разрывам. N6-Метилирование аденозина в РНК-компонентах R-петель приводит к YTHDF2-зависимой деградации РНК:ДНК гибридов, снижая таким образом уровень геномной нестабильности

маркером двухцепочечных разрывов ДНК в эукариотических клетках [108]. Результаты этого и других исследований позволили заключить, что YTHDF2 предотвращает накопление m^6A -содержащих РНК:ДНК гибридов и, таким образом, ингибирует вызванное R-петлями повреждение ДНК, играя важную роль обеспечения стабильности генома в клетках млекопитающих [101, 108, 109] (рис. 4). Эти результаты указывают на то, что m^6A является важным составным компонентом R-петель и принимает участие во многих процессах, в которые вовлечены эти структуры [97]. Примечательно и то, что выводы, полученные в данном исследовании, также подтверждаются рядом работ, показывающих роль m^6A , локализованного на РНК:ДНК гибридах, в репарации ДНК [110], а также присутствие этой модификации на хромосом-ассоциированных регуляторных РНК [95]. Несмотря на это, данные о функциональной роли этой модификации в биологии R-петель в данный момент противоречивы. Так, например, Yang et al. показали, что в случае уменьшения количества метилтрансферазы METTL3 в клетках HELa наблюдается значительное снижение общего уровня R-петель в этой системе [111]. Интересно, что авторы этой работы показали существенное снижение уровня R-петель в регионах терминации транскрипции (TESs) генов, кодирующих m^6A -содержащие транскрипты (m^6A^+ генов). Кроме того, авторы показали, что чем ближе R-петли к сайтам m^6A , тем сильнее влияние дефицита METTL3 на снижение уровня R-петель [111]. Чтобы изучить влияние m^6A на R-петли и терминацию транскрипции, авторы создали репортёрную систему, в которой два гена – люциферазы Firefly (*Fluc*) и люциферазы Ренилла (*Rluc*) – разделены одним промотором с областью, образующей R-петлю и содержащей два сайта модификации m^6A дикого типа из терминатора MYC. В этой системе в случае формирования R-петли будут получены только транскрипты *Fluc*, в то время как уменьшение образования R-петли и дефектов терминации приведёт к получению

сквозных транскриптов. Авторы показали, что замена нуклеотида A на U приводила к уменьшению накопления R-петель. Эти результаты доказывают прямое влияние m^6A на динамику образования R-петель и на терминацию транскрипции [111].

Таким образом, результаты, полученные в работах Abakir et al. [107], противоречат результатам Yang et al. [111]: в первом случае накопление m^6A в РНК-компонентах РНК:ДНК гибридов ведёт к понижению уровня R-петель в геноме, а во втором, наоборот, стимулирует образование этих структур. Несколько других исследований также показали присутствие m^6A на РНК-компонентах R-петель. Эта модификация была найдена на сателлитных РНК (major satellite repeats, MSR), ассоциированных с гетерохроматином в эмбриональных стволовых клетках мыши [112]. Искусственное снижение уровня m^6A в MSR-транскриптах приводило к изменению состояния хроматина и снижению потенциала образования РНК:ДНК гибридов в этих геномных регионах [112]. Более того, в работе Chen et al. [113] было показано, что m^6A детектируется в субтеломерных областях на содержащей теломерные повторы РНК TERRA (Telomeric repeat-containing RNA; РНК, содержащая теломерные повторы). Авторы этого исследования показали, что m^6A -модифицированная TERRA образует R-петли и способствует гомологичной рекомбинации. Дефицит METL3 приводил к уменьшению образования R-петель, укорочению и нестабильности теломер. Кроме того, нокдаун YTHDC1, считывающего m^6A , усиливал деградацию TERRA [113]. В другой недавно вышедшей работе было показано, что белки IGF2BPs (insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins) могут стабилизировать R-петли, связываясь с их m^6A -модифицированными РНК-компонентами [114].

Таким образом, несмотря на возможные противоречия между отдельными исследованиями, на данный момент очевидно, что m^6A присутствует в составе R-петель в целом ряде биологических контекстов и играет важную роль в регуляции этих

структур через взаимодействие с различными белками-считывателями этой модификации (YTHDF2, YTHDC1, IGF2BPs).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

m⁶A является наиболее широко распространённой химической модификацией мРНК и участвует в регуляции целого ряда ключевых клеточных процессов и индивидуального развития живых организмов. До недавнего времени при изучении роли m⁶A в клеточных процессах основное внимание уделялось цитоплазматическим функциям этой модификации. Совокупность экспериментальных данных последних лет свидетельствует об участии m⁶A как в регуляции организации хроматина (R-петли и эпигенетическая модуляция), так и в процессах, определяющих первые этапы реализации генетической информации (транскрипция, процессинг и сплайсинг), а также ядерного экспорта, благодаря которому зрелые транскрипты перемещаются в цитоплазму, где затем могут также регулироваться с помощью цитоплазматических m⁶A-зависимых механизмов. Довольно противоречивой и интригующей на настоящий момент представляется роль m⁶A в метаболизме R-петель, поскольку наличие такой модификации в РНК, входящей в состав этих структур, по-видимому, может приводить в зависимости от биологического контекста как к стабилизации, так и к элиминированию РНК:ДНК гибридов, потенциально уменьшая или увеличивая степень геномной стабильности в той или иной системе. Несмотря на это, присутствие m⁶A в целом ряде РНК, ассоциированных с хроматином (сarРНК, днкРНК, РНК:ДНК гибриды, пре-мРНК), и участие этой модификации в таких ключевых процессах, как транскрипция, компактизация хроматина и регуляция R-петель, застав-

ляет нас рассматривать m⁶A и, потенциально, другие РНК-модификации в составе таких РНК как дополнительную детерминанту «эпигенетической» регуляции экспрессии генов, которая, наряду с метилированием ДНК и модификациями гистонов, определяет структуру и функции хроматина в различных типах клеток. Такая модель предполагает взаимное влияние других эпигенетических факторов (ДНК-метилирование, модификации гистонов) на модификацию различных ядерных РНК и интерпретацию РНК-модификаций различными белками-считывателями, присутствующими в ядре.

Дальнейшие исследования должны определить функциональные роли, которые играет m⁶A-метилирование ядерных РНК в различных биологических процессах, происходящих в специфических типах клеток на разных стадиях индивидуального развития организма и при патогенезе различных заболеваний.

Вклад авторов. Ермаков А.С. – формирование исходной концепции обзора; Жигалова Н.А., Олейникова К.Ю., Рузов А.С., Ермаков А.С. – сбор и обсуждение литературных данных, написание текста; Жигалова Н.А. и Ермаков А.С. – подготовка иллюстраций; Олейникова К.Ю., Рузов А.С., Ермаков А.С. – редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 22-65-00022, и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственного задания 122041100149-7), ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (часть «Введение»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boccaletto, P., Machnicka, M. A., Purta, E., Piatkowski, P., Baginski, B., et al. (2018) MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 303-307, doi: 10.1093/nar/gkx1030.
2. Frye, M., Harada, B. T., Behm, M., and He, C. (2018) RNA modifications modulate gene expression during development, *Science*, **361**, 1346-1349, doi: 10.1126/science.aau1646.
3. Desrosiers, R., Friderici, K., and Rottman, F. (1974) Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **10**, 3971-3975, doi: 10.1073/pnas.71.10.3971.
4. Perry, R. P., and Kelley, D. E. (1974) Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells, *Cell*, **1**, 37-42, doi: 10.1016/0092-8674(74)90153-6.
5. Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., et al. (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons, *Cell*, **149**, 1635-1646, doi: 10.1016/j.cell.2012.05.003.
6. Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., et al. (2012) Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq, *Nature*, **485**, 201-206, doi: 10.1038/nature11112.
7. Deng, X., Chen, K., Luo, G. Z., Weng, X., Ji, Q., et al. (2015) Widespread occurrence of N6-methyladenosine in bacterial mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 6557-6567, doi: 10.1093/nar/gkv596.

8. Clancy, M. J., Shambaugh, M. E., Timppte, C. S., and Bokar, J. A. (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, doi: 10.1093/nar/gkf573.
9. Lence, T., Akhtar, J., Bayer, M., Schmid, K., Spindler, L., et al. (2016) m⁶A modulates neuronal functions and sex determination in drosophila, *Nature*, **540**, 242-247, doi: 10.1038/nature20568.
10. Luo, G. Z., MacQueen, A., Zheng, G., Duan, H., Dore, L. C., et al. (2014) Unique features of the m⁶A methylome in arabidopsis thaliana, *Nat. Commun.*, **5**, 5630, doi: 10.1038/ncomms6630.
11. Schibler, U., and Perry, R. P. (1977) The 50-termini of heterogeneous nuclear RNA: a comparison among molecules of different sizes and ages, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4133-4149, doi: 10.1093/nar/4.12.4133.
12. Wei, C.-M., and Moss, B. (1977) Nucleotide sequences at the N⁶-methyladenosine sites of HeLa cell messenger ribonucleic acid, *Biochemistry*, **16**, 1672-1676, doi: 10.1021/bi00627a023.
13. Liu, N., and Pan, T. (2016) N⁶-methyladenosine-encoded epitranscriptomics, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 98-102, doi: 10.1038/nsmb.3162.
14. Ke, S., Alemu, E. A., Mertens, C., Gantman, E. C., Fak, J. J., et al. (2015) A majority of m⁶A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation, *Genes Dev.*, **29**, 2037-2053, doi: 10.1101/gad.269415.115.
15. Shimba, S., Bokar, J. A., Rottman, F., and Reddy, R. (1995) Accurate and efficient N⁶-adenosine methylation in spliceosomal U6 small nuclear RNA by HeLa cell extract *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2421-2426, doi: 10.1093/nar/23.13.2421.
16. Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., et al. (2016) m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression, *Nature*, **537**, 369-373, doi: 10.1038/nature19342.
17. Piekna-Przybylska, D., Decatur, W. A., and Fournier, M. J. (2008) The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 178-183, doi: 10.1093/nar/gkm855.
18. Konstantinos, B., and Lieberman, E. (2023) Biological roles of adenine methylation in RNA, *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 143-160, doi: 10.1038/s41576-022-00534-0.
19. Ma, Z., and Ji, J. (2020) N6-methyladenosine (m⁶A) RNA modification in cancer stem cells, *Stem Cells*, **38**, 1511-1519, doi: 10.1002/stem.3279.
20. Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T., and He, C. (2017) Dynamic RNA modifications in gene expression regulation, *Cell*, **169**, 1187-1200, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.045.
21. Sledz, P., and Jinek, M. (2016) Structural insights into the molecular mechanism of the m(6)A writer complex, *Elife*, **5**, e18434, doi: 10.7554/eLife.18434.
22. Wang, P., Doxtader, K. A., and Nam, Y. (2016) Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases, *Mol. Cell*, **63**, 306-317, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.041.
23. Ping, X. L., Sun, B. F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., et al. (2014) Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase, *Cell Res.*, **24**, 177-189, doi: 10.1038/cr.2014.3.
24. Huang, Q., Mo, J., Liao, Z., Chen, X., and Zhang, B. (2022) The RNA m⁶A writer WTAP in diseases: structure, roles, and mechanisms, *Cell Death Disease*, **13**, 852, doi: 10.1038/s41419-022-05268-9.
25. Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., et al. (2014) N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability, *Nature*, **505**, 117-120, doi: 10.1038/nature12730.
26. Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., et al. (2015) N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency, *Cell*, **161**, 1388-1399, doi: 10.1016/j.cell.2015.05.014.
27. Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., et al. (2015) 5' UTR m(6)A promotes cap-independent translation, *Cell*, **163**, 999-1010, doi: 10.1016/j.cell.2015.10.012.
28. Sun, W., Ming, S. T., Wu, R., and Ming, L. (2019) The role of m⁶A RNA methylation in cancer, *Biomed. Pharmacother.*, **112**, 108613, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108613.
29. Zhang, Y., Zhang, S., Shi, M., Li, M., Zeng, J., et al. (2022) Roles of m⁶A modification in neurological diseases, *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*, **47**, 109-115.
30. Ivanova, I., Much, C., Di Giacomo, M., Azzi, C., Morgan, M., et al. (2017) The RNA m⁶A reader YTHDF2 is essential for the post-transcriptional regulation of the maternal transcriptome and oocyte competence, *Mol. Cell*, **67**, 1059-1067. e4, doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.003.
31. Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A. F., Kol, N., et al. (2015) m⁶A mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation, *Science*, **347**, 1002-1006, doi: 10.1126/science.1261417.
32. Li, H. B., Tong, J., Zhu, S., Batista, P. J., Duffy, E. E., Zhao, J., et al. (2017) m(6)A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways, *Nature*, **548**, 338-342, doi: 10.1038/nature23450.
33. Wang, X., Tian, L., Li, Y., Wang, J., Yan, B., et al. (2021) RBM15 facilitates laryngeal squamous cell carcinoma progression by regulating TMIM6 stability through IGF2BP3 dependent, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **40**, 80, doi: 10.1186/s13046-021-01871-4.

34. Zhang, W., Chen, Y., Zeng, Z., Peng, Y., Li, L., et al. (2022) The novel m⁶A writer METTL5 as prognostic biomarker probably associating with the regulation of immune microenvironment in kidney cancer, *Heliyon*, **8**, e12078, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12078.
35. Pendleton, K. E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O. V., Xie, Y., et al. (2017) The U6 snRNA m⁶A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention, *Cell*, **169**, 824-835.e14, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.003.
36. Mendel, M., Chen, K. M., Homolka, D., Gos, P., Pandey, R. R., et al. (2018) Methylation of structured RNA by the m⁶A Writer METTL16 is essential for mouse embryonic development, *Mol. Cell*, **71**, 986-1000.e11, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.004.
37. Duxtader, K. A., Wang, P., Scarborough, A. M., Seo, D., Conrad, N. K., et al. (2018) Structural basis for regulation of METTL16, an S-adenosylmethionine homeostasis factor, *Mol. Cell*, **71**, 1001-1011.e4, doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.025.
38. Yang, D., Zhao, G., and Zhang, H. M. (2023) m⁶A reader proteins: the executive factors in modulating viral replication and host immune response, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **13**, 1-20, doi: 10.3389/fcimb.2023.1151069.
39. Guo, T., Duan, H., Chen, J., Liu, J., Othmane, B., et al. (2021) N⁶-methyladenosine writer gene ZC3H13 predicts immune phenotype and therapeutic opportunities in kidney renal clear cell carcinoma, *Front. Oncol.*, **11**, 718644, doi: 10.3389/fonc.2021.718644.
40. Zhang, X., Li, M. J., Xia, L., and Zhang, H. (2022) The biological function of m⁶A methyltransferase KIAA1429 and its role in human disease, *PeerJ*, **10**, e14334, doi: 10.7717/peerj.14334.
41. Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., et al. (2011) N⁶-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 885-887, doi: 10.1038/nchembio.687.
42. Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.-M., et al. (2013) ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility, *Mol. Cell*, **49**, 18-29, doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.015.
43. Wei, J., Liu, F., Lu, Z., Fei, Q., Ai, Y., et al. (2018) Differential m⁶A, m⁶Am, and m¹A demethylation mediated by FTO in the cell nucleus and cytoplasm, *Mol. Cell*, **71**, 973-985.e975, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.011.
44. Kaur, S., Tam, N. Y., McDonough, M. A., Schofield, C. J., and Aik, W. S. (2022) Mechanisms of substrate recognition and N⁶-methyladenosine demethylation revealed by crystal structures of ALKBH5-RNA complexes, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 4148-4160, doi: 10.1093/nar/gkac195.
45. Panneerdoss, S., Eedunuri, V. K., Yadav, P., Timilsina, S., Rajamanickam, S., et al. (2018) Cross-talk among writers, readers, and erasers of m(6)A regulates cancer growth and progression, *Sci. Adv.*, **4**, 1-15, doi: 10.1126/sciadv.aar8263.
46. Zhang, C., Samanta, D., Lu, H., Bullen, J. W., Zhang, H., et al. (2016) Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m(6)A-demethylation of NANOG mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E2047-E2056, doi: 10.1073/pnas.1602883113.
47. Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., et al. (2017) YTHDF3 facilitates translation and decay of N(6)-methyladenosine-modified RNA, *Cell Res.*, **27**, 315-328, doi: 10.1038/cr.2017.15.
48. Alarcón, C. R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., et al. (2015) HNRNPA2B1 is a mediator of m⁶A-dependent nuclear RNA processing events, *Cell*, **162**, 1299-1308, doi: 10.1016/j.cell.2015.08.011.
49. Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., et al. (2018) Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation, *Nat. Cell Biol.*, **20**, 285-295, doi: 10.1038/s41556-018-0045-z.
50. Han, D., Liu, J., Chen, C., Dong, L., Liu, Y., et al. (2019) Anti-tumour immunity controlled through mRNA m⁶A methylation and YTHDF1 in dendritic cells, *Nature*, **566**, 270-274, doi: 10.1038/s41586-019-0916-x.
51. Liu, N., Zhou, K. I., Parisien, M., Dai, Q., Diatchenko, L., et al. (2017) N⁶-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6051-6063, doi: 10.1093/nar/gkx141.
52. Zaccara, S., and Jaffrey, S. R. (2020) A unified model for the function of YTHDF proteins in regulating m⁶A-modified mRNA, *Cell*, **181**, 1582-1595, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.012.
53. Shi, H., Zhang, X., Weng, Y. L., Lu, Z., Liu, Y., et al. (2018) m(6)A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1, *Nature*, **563**, 249-253, doi: 10.1038/s41586-018-0666-1.
54. Anders, M., Chelysheva, I., Goebel, I., Trenkner, T., Zhou, J., et al. (2018) Dynamic m⁶A methylation facilitates mRNA triaging to stress granules, *Life Sci. Alliance*, **1**, e201800113, doi: 10.26508/lsa.201800113.
55. Li, X., Xiong, X., and Yi, C. (2016) Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications, *Nat. Methods*, **14**, 23-31, doi: 10.1038/nmeth.4110.
56. Hartmann, A. M., Nayler, O., Schwaiger, F. W., Obermeier, A., and Stamm, S. (1999) The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn), *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3909-3926, doi: 10.1091/mbc.10.11.3909.
57. Kasowitz, S. D., Ma, J., Anderson, S. J., Leu, N. A., Xu, Y., et al. (2018) Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development, *PLoS Genet.*, **14**, 1-28, doi: 10.1371/journal.pgen.1007412.

58. Liu, J., Dou, X., Chen, C., Chen, C., Liu, C., et al. (2020) N⁶-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription, *Science*, **367**, 580-586, doi: 10.1126/science.aay6018.
59. Wojtas, M. N., Pandey, R. R., Mendel, M., Homolka, D., Sachidanandam, R., et al. (2017) Regulation of m⁶A transcripts by the 3'→5' RNA helicase YTHDC2 is essential for a successful meiotic program in the mammalian germline, *Mol. Cell*, **68**, 374-387.e12, doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.021.
60. Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., et al. (2015) N⁶-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions, *Nature*, **518**, 560-564, doi: 10.1038/nature14234.
61. Sun, M., Shen, Y., Jia, G., Deng, Z., Shi, F., et al. (2023) Activation of the HNRNPA2B1/miR-93-5p/FRMD6 axis facilitates prostate cancer progression in an m⁶A-dependent manner, *J. Cancer*, **14**, 1242-1256, doi: 10.7150/jca.83863.
62. Shatkin, A., and Manley, J. (2000) The ends of the affair: capping and polyadenylation, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1-5, doi: 10.1038/79583.
63. Salditt-Georgieff, M., Jelinek, W., Darnell, J. E., Furuichi, Y., Morgan, M., et al. (1976) Methyl labeling of HeLa cell hnRNA: a comparison with mRNA, *Cell*, **2**, 227-237, doi: 10.1016/0092-8674(76)90022-2.
64. Carroll, S. M., Narayan, P., and Rottman, F. M. (1990) N⁶-methyladenosine residues in an intron-specific region of prolactin pre-mRNA, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4456-4465, doi: 10.1128/mcb.10.9.4456-4465.1990.
65. Haussmann, I. U., Bodi, Z., Sanchez-Moran, E., Mongan, N. P., Archer, N., Fray, R. G. and Solter, M. (2016) m⁶A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust Drosophila sex determination, *Nature*, **540**, 301-304, doi: 10.1038/nature20577.
66. Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y. S., Hao, Y. J., et al. (2016) Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing, *Mol. Cell*, **61**, 507-519, doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.012.
67. Xu, K., Yang, Y., Feng, G. H., Sun, B. F., Chen, J. Q., et al. (2017) Mettl3-mediated m⁶A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation, *Cell Res.*, **9**, 1100-1114, doi: 10.1038/cr.2017.100.
68. Zhao, X., Yang, Y., Sun, B. F., Shi, Y., Yang, X., et al. (2014) FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis, *Cell Res.*, **24**, 1403-1419, doi: 10.1038/cr.2014.151.
69. Finkel, D., and Groner, Y. (1983) Methylations of adenosine residues (m⁶A) in pre-mRNA are important for formation of late simian virus 40 mRNAs, *Virology*, **131**, 409-425, doi: 10.1016/0042-6822(83)90508-1.
70. Lesbirel, S., and Wilson, S. A. (2019) The m⁶Amethylase complex and mRNA export, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **3**, 319-328, doi: 10.1016/j.bbagr.2018.09.008.
71. Viphakone, N., Hautbergue, G. M., Walsh, M., Chang, C.-T., Holland, A., et al. (2012) TREX exposes the RNA-binding domain of Nxf1 to enable mRNA export, *Nat. Commun.*, **3**, 1006, doi: 10.1038/ncomms2005.
72. Masuda, S., Das, R., Cheng, H., Hurt, E., Dorman, N., and Reed, R. (2005) Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing, *Genes Dev.*, **19**, 1512-1517, doi: 10.1101/gad.1302205.
73. Roundtree, I. A., Luo, G.-Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., et al. (2017) YTHDC1 mediates nuclear export of N⁶-methyladenosine methylated mRNAs, *eLife*, **6**, e31311, doi: 10.7554/eLife.31311.
74. Muller-McNicoll, M., Botti, V., de Jesus Domingues, A. M., Brandl, H., Schwich, O. D., et al. (2016) SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export, *Genes Dev.*, **30**, 553-566, doi: 10.1101/gad.276477.115.
75. Zheng, Q., Hou, J., Zhou, Y., Li, Z., and Cao, X. (2017) The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m⁶A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus, *Nat. Immunol.*, **18**, 1094-1103, doi: 10.1038/ni.3830.
76. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, *Cell*, **139**, 871-890, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
77. Lin, X., Chai, G., Wu, Y., Li, J., Chen, F., et al. (2019) RNA m⁶A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail, *Nat. Commun.*, **10**, 2065, doi: 10.1038/s41467-019-09865-9.
78. Fustin, J. M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., et al. (2013) RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock, *Cell*, **155**, 793-806, doi: 10.1016/j.cell.2013.10.026.
79. Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., et al. (2016) YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex, *Nat. Commun.*, **7**, 12626, doi: 10.1038/ncomms12626.
80. Li, X., and Fu, X. D. (2019) Chromatin-associated RNAs as facilitators of functional genomic interactions, *Nat. Rev. Genet.*, **20**, 503-519, doi: 10.1038/s41556-018-0045-z.
81. Lee, J. H., Wang, R., Xiong, F., Krakowiak, J., Liao, Z., et al. (2021) Enhancer RNA m⁶A methylation facilitates transcriptional condensate formation and gene activation, *Mol. Cell*, **81**, 3368-3385, doi: 10.1016/j.molcel.2021.07.024.
82. Wang, K. C., and Chang, H. Y. (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs, *Mol. Cell*, **43**, 904-914, doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.018.
83. Sahakyan, A., Yang, Y., and Plath, K. (2018) The role of Xist in X-chromosome dosage compensation, *Trends Cell Biol.*, **28**, 999-1013, doi: 10.1016/j.tcb.2018.05.005.
84. Li, Y., Xia, L., Tan, K., Ye, X., Zuo, Z., et al. (2020) N⁶-methyladenosine co-transcriptionally directs the demethylation of histone H₃K₉me₂, *Nat. Genet.*, **52**, 870-877, doi: 10.1038/s41588-020-0677-3.

85. Liu, X. M., Mao, Y., Wang, S., Zhou, J., and Qian, S. B. (2022) METTL3 modulates chromatin and transcription dynamics during cell fate transition, *Cell. Mol. Life Sci.*, **79**, 559, doi: 10.1007/s00018-022-04590-x.
86. Wei, J., Yu, X., Yang, L., Liu, X., Gao, B., et al. (2022) FTO mediates LINE1 m⁶A demethylation and chromatin regulation in mESCs and mouse development, *Science*, **376**, 968-973, doi: 10.1126/science.abe9582.
87. Fernández-Justel, J. M., Santa-María, C., Martín-Vírgala, S., Ramesh, S., Ferrera-Lagoa, A., et al. (2022) Histone H1 regulates non-coding RNA turnover on chromatin in a m⁶A-dependent manner, *Cell Rep.*, **40**, 111329, doi: 10.1016/j.celrep.2022.111329.
88. Sun, T., Xu, Y., Xiang, Y., Ou, J., Soderblom, E. J., et al. (2023) Crosstalk between RNA m⁶A and DNA methylation regulates transposable element chromatin activation and cell fate in human pluripotent stem cells, *Nat. Genet.*, **55**, 1324-1335, doi: 10.1038/s41588-023-01452-5.
89. Sanz, L. A., Hartono, S. R., Lim, Y. W., Steyaert, S., Rajpurkar, A., et al. (2016) Prevalent, dynamic, and conserved R-loop structures associate with specific epigenomic signatures in mammals, *Mol. Cell*, **1**, 167-178, doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.032.
90. Wahba, L., Costantino, L., Tan, F. J., Zimmer, A., and Koshland, D. (2016) S1-DRIP-seq identifies high expression and polyA tracts as major contributors to R-loop formation, *Genes Dev.*, **11**, 1327-1338, doi: 10.1101/gad.280834.116.
91. Xu, W., Xu, H., Li, K., Fan, Y., Liu, Y., et al. (2017) The R-loop is a common chromatin feature of the Arabidopsis genome, *Nat. Plants*, **9**, 704-714, doi: 10.1038/s41477-017-0004-x.
92. Kornberg, A., and Baker, T. A. (1992) DNA Replication, Vol. 3, W. H. Freeman and Co., NY.
93. Gowrishankar, J., Leela, J. K., and Anupama, K. (2013) R-loops in bacterial transcription: their causes and consequences, *Transcription*, **4**, 153-157, doi: 10.4161/trns.25101.
94. Ginno, P. A., Lott, P. L., Christensen, H. C., Korf, I., and Chédin, F. (2012) R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters, *Mol. Cell*, **45**, 814-825, doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.017.
95. Nadel, J., Athanasiadou, R., Lemetre, C., Wijetunga, N. A., Broin, Ó. P., et al. (2015) RNA:DNA hybrids in the human genome have distinctive nucleotide characteristics, chromatin composition, and transcriptional relationships, *Epigenetics Chromatin*, **8**, 46, doi: 10.1186/s13072-015-0040-6.
96. Pfeiffer, V., Crittin, J., Grolimund, L., and Lingner, J. (2013) The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and telomere shortening, *EMBO J.*, **21**, 2861-2871, doi: 10.1038/emboj.2013.217.
97. El Hage, A., Webb, S., Kerr, A., and Tollervey, D. (2014) Genome-wide distribution of RNA-DNA hybrids identifies RNase H targets in tRNA genes, retrotransposons and mitochondria, *PLoS Genet.*, **10**, e1004716, doi: 10.1371/journal.pgen.1004716.
98. Aguilera, A., and García-Muse, T. (2012) R-loops: from transcription byproducts to threats to genome stability, *Mol. Cell*, **46**, 115-124, doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.009.
99. Skourti-Stathaki, K., and Proudfoot, N. J. (2014) A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression, *Genes Dev.*, **28**, 1384-1396, doi: 10.1101/gad.242990.114.
100. Sollier, J., and Cimprich, K. A. (2015) Breaking bad: R-loops and genome integrity, *Trends Cell Biol.*, **9**, 514-522, doi: 10.1016/j.tcb.2015.05.003.
101. Chen, L., Chen, J. Y., Zhang, X., Gu, Y., Xiao, R., et al. (2017) R-ChIP using inactive RNase H reveals dynamic coupling of R-loops with transcriptional pausing at gene promoters, *Mol. Cell*, **68**, 745-757, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.008.
102. Santos-Pereira, J. M., and Aguilera, A. (2015) R loops: new modulators of genome dynamics and function, *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 583-597, doi: 10.1038/nrg3961.
103. Chédin, F. (2016) Nascent connections: R-loops and chromatin patterning, *Trends Genet.*, **12**, 828-838, doi: 10.1016/j.tig.2016.10.002.
104. Lu, W. T., Hawley, B. R., Skalka, G. L., Baldock, R. A., Smith, E. M., Bader, A. S., Malewicz, M., et al. (2018) Drosha drives the formation of DNA:RNA hybrids around DNA break sites to facilitate DNA repair, *Nat. Commun.*, **1**, 532, doi: 10.1038/s41467-018-02893-x.
105. Kogoma, T. (1997) Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2**, 212-223, doi: 10.1128/mmbr.61.2.212-238.1997.
106. Massé, E., and Drolet, M. (1999) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16659-16664, doi: 10.1074/jbc.274.23.16659.
107. Massé, E., and Drolet, M. (1999) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli* topA mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition, *J. Mol. Biol.*, **2**, 321-332, doi: 10.1006/jmbi.1999.3264.
108. Abakir, A., Giles, T. C., Cristini, A., Foster, J. M., Dai, N., et al. (2020) N⁶-methyladenosine regulates the stability of RNA:DNA hybrids in human cells, *Nat. Genet.*, **1**, 48-55, doi: 10.1038/s41588-019-0549-x.
109. Salas-Armenteros, I., Pérez-Calero, C., Bayona-Feliu, A., Tumini, E., Luna, R., et al. (2017) Human THO-Sin3A interaction reveals new mechanisms to prevent R-loops that cause genome instability, *EMBO J.*, **23**, 3532-3547, doi: 10.15252/embj.201797208.

110. Wei, J., and He, C. (2021) Chromatin and transcriptional regulation by reversible RNA methylation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **70**, 109-115, doi: 10.1016/j.ceb.2020.11.005.
111. Yang, X., Liu, Q. L., Xu, W., Zhang, Y. C., Yang, Y., et al. (2019) m⁶A promotes R-loop formation to facilitate transcription termination, *Cell Res.*, **12**, 1035-1038, doi: 10.1038/s41422-019-0235-7.
112. Duda, K. J., Ching, R. W., Jerabek, L., Shukeir, N., Erikson, G., et al. (2021) m⁶A RNA methylation of major satellite repeat transcripts facilitates chromatin association and RNA:DNA hybrid formation in mouse heterochromatin, *Nucleic Acids Res.*, **249**, 5568-5587, doi: 10.1093/nar/gkab364.
113. Chen, L., Zhang, C., Ma, W., Huang, J., Zhao, Y., et al. (2022) METTL3-mediated m⁶A modification stabilizes TERRA and maintains telomere stability, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 11619-11634, doi: 10.1093/nar/gkac1027.
114. Ying, Y., Tang, Y., Wu, Y., Yi, J., Liu, Z., et al. (2023) Epigenetic regulation of co-transcriptional R-loops via IGF2BPs drives SEMA3F-mediated prostate cancer growth retardation and docetaxel chemosensitivity enhancement, *Research Square*, doi: 10.21203/rs.3.rs-3111467/v1.

THE FUNCTIONS OF RNA N6-METHYLADENOSINE IN THE NUCLEUS

Review

N. A. Zhigalova¹, K. Yu. Oleynikova¹, A. S. Ruzov¹, and A. S. Ermakov^{1,2*}

¹ Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: ermakov99@mail.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

N6-methyladenosine (m⁶A) is one of the most abundant modifications of both eukaryotic and prokaryotic mRNAs. Recent years witnessed an accumulation of a large volume of experimental data on the involvement of m⁶A methylation in the regulation of stability and translation of different mRNAs. Remarkably, up until recently, the majority of such m⁶A-related studies have been focused on cytoplasmic functions of this modification. In this review, we overview a number of novel studies revealing the role of m⁶A in several key biological processes occurring in cellular nucleus, such as transcription, organization of chromatin, splicing, nuclear-cytoplasmic transport, and R-loop metabolism. Based on this analysis, we propose a model where modifications present on nuclear RNAs represent an additional layer of regulation of gene expression, that, together with DNA methylation and histone modifications, determines chromatin structure and function in various biological contexts.

Keywords: modifications of RNA, N6-methyladenosine (m⁶A), methyltransferases METTL3 and METTL14, demethylases FTO and ALKBH5, m⁶A-binding proteins of the YTHDF and YTHDC families, chromatin, R-loops