

DOI: 10.13376/j.cbls/2017126

文章编号: 1004-0374(2017)10-0939-07



陈大华, 博士, 研究员 / 教授, 博士生导师, 中科院“百人计划”引进的学术带头人, 国家杰出青年基金获得者, 科技部国家重大科学研究计划首席科学家, 教育部“长江学者奖励计划”特聘教授, 中科院动物研究所膜生物学国家重点实验室副主任。2016年度中科院杰出科技成就奖(个人)及谈家桢生命科学创新奖获得者。实验室以果蝇、斑马鱼和小鼠等为模型, 系统地研究生殖细胞发育和成体干细胞命运的调控机制, 以及核酸修饰的表观调控机制等。首次证明了DNA 6mA修饰的存在, 并发现6mA修饰在发育过程中受去甲基酶DMAD的精确调控。近年来, 陈大华研究员在*Cell*、*Dev Cell*、*PLoS Biol*、*J Cell Biol*、*Curr Biol*、*PLoS Genet*、*Hum Mol Genet*、*Development*等主流杂志上发表一系列研究性论文, 在国内外产生了重要的影响。

真核生物基因组DNA 6mA表观修饰研究进展

张国强, 陈大华*

(中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 众所周知, DNA的6mA修饰在原核生物中, 特别是细菌中发挥重要的作用, 它控制着许多重要的生物学过程, 但这种DNA碱基修饰在真核生物中的存在与生物学功能一直还不清楚。近来的一系列研究表明, 6mA在真核生物中不仅存在, 并且可能是真核生物的一种新表观遗传学标记, 具有重要的表观调控功能。现对最新的真核生物6mA修饰研究进展进行简要综述, 回顾并展望这种真核生物新表观修饰的基本特征、潜在生物学功能及未来的研究方向。

关键词: DNA甲基化; 6mA; 甲基转移酶; 去甲基化酶; 真核生物

中图分类号: Q523 **文献标志码:** A

N^6 -methyladenine DNA modification in eukaryotic genomes

ZHANG Guo-Qiang, CHEN Da-Hua*

(State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: It has been widely accepted that DNA N^6 -methyladenine (6mA) plays an important role in controlling numerous biological functions in prokaryotes. However, the prevalence and function of this modification in eukaryotes are largely unknown. Recent studies highlight that 6mA does indeed occur, and plays an important epigenetic role in eukaryotes. Here, we briefly review the latest research discoveries of 6mA in eukaryotes. We also perform an analysis of the potential functions of 6mA, widening understanding of this new epigenetic mark in higher eukaryotes, and hence suggesting future studies in this field.

Key words: DNA methylation; 6mA; methyltransferase; demethylase; eukaryote

收稿日期: 2017-08-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(91019022, 31671498)

*通信作者: E-mail: chendh@ioz.ac.cn

DNA 甲基化是表观遗传机制中一种重要的调控方式, 主要包括 5-methylcytosine (5mC)、N4-methylcytosine (4mC) 及 N6-methyladenine (6mA) 等^[1-3]。5mC 存在于原核生物和绝大多数真核生物中, 是脊椎动物中主要的修饰, 参与调控染色体高级结构维持、X 染色体失活, 以及细胞功能的维持、胚胎发育, 乃至疾病的发生发展等过程^[4-6]。4mC 是存在于原核生物中的一种修饰, 用以保护自身的基因组 DNA 免受限制性内切酶的切除^[1]。6mA 主要以高丰度存在于原核生物及一些低等的真核生物^[2,7-8]。细菌中的 6mA 修饰在 DNA 复制^[9]、碱基修复^[10]、基因表达调控^[11]、转座子调控^[12] 及宿主与病原体之间的相互拮抗^[13] 等方面具有重要的调控功能。真核生物基因组内 6mA 丰度比原核生物基因组的 6mA 丰度低, 长期以来, 人们一直认为 6mA 在真核生物中可能是一种非典型的 DNA 碱基修饰形式。因此, 真核生物, 特别是高等真核生物中 6mA 修饰的产生、去除、分布、解读及功能长期以来一直被忽视。最近两年, 随着检测分析等研究手段的不断进步, 相关研究有了突飞猛进的发展, 取得了一系列重要的研究成果, 使沉寂多年的 6mA 修饰研究重新引起广泛重视^[14]。目前普遍认为, DNA 6mA 是真核生物基因组中一种新的表观遗传修饰^[15-19]。本文主要对真核生物基因组 DNA 6mA 表观修饰的最新研究进展进行简要论述。

1 6mA的含量与分布特征

脊椎动物中 5mC 在整个基因组中所占比例通常为 1%~6%, 其中绝大多数 5mC 位点分布在 CpG 二核苷酸胞嘧啶的 C5 位置上, 在某些 5mC 含量较低的区域, 多个 CpG 富集形成 CpG 岛, 主要倾向于分布在基因的第一外显子和启动子区域内, CpG 岛与基因的转录调控关系十分密切^[6,20]。借助于新

的定量分析检测手段, 研究者目前已对多种真核生物及不同组织的 6mA 修饰在基因组上的含量和分布进行了精确检测, 发现不同真核生物中以及同一物种的不同发育阶段或不同组织中 6mA 的含量差异较大, 并且随生物发育阶段的不同而改变^[21-24]。目前已定量的结果大概范围为 0.0001%~2.8% (6mA/dA) 不等 (表 1)。其中, 低等的单细胞真核生物中 6mA 含量相对较高, 如 Mondo 等^[24] 发现真菌早期分化谱系中的 *Hesseltinella vesiculosa* 基因组中 2.8% 的腺嘌呤发生了甲基化, 这远远超过其他真核生物和衍生真菌中观察到的水平, 为目前在真核生物中发现的含量最高的物种; 四膜虫中 6mA 含量大约为 0.8%, 并且仅分布于大核, 小核中没有信号^[25]; 绿藻中的含量则为 0.4%~0.6%^[26]。在更高等的真核生物, 特别是哺乳动物中, 6mA 的含量降低, 仅以较高丰度存在于发育的特定时间以及特异的生物学过程中, 如线虫中的 6mA 含量波动较大, 在 0.01%~0.4% 范围之内^[27]; 植物小麦中的 6mA 含量约为 0.1%^[28]; 在果蝇的头部、卵巢及胚胎发育的后期阶段存在比较弱的 6mA 信号 (0.001%), 而在胚胎发育的早期阶段 0.75 h 有较强的信号 (0.07%), 表明 6mA 在果蝇胚胎的早期阶段含量很高, 但随着胚胎发育的进展迅速下降至比较低的水平^[23]; 同样, 斑马鱼和猪的早期胚胎基因组中 6mA 的含量 (0.1%~0.17%) 也显著高于其他发育阶段的组织 (0.001%~0.004%)^[22]; 小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) DNA 的 6mA 含量极低 (0.0006%), 而使用 H2A.X 抗体富集的 DNA 中 6mA 同样富集, 含量显著提高了 4 倍^[29]; 免疫荧光染色发现, 在绝大部分的小鼠心脏细胞中检测不到 6mA 信号的存在, 而其中一小部分的心肌细胞中却有明显的信号^[21]。

除了含量差异较大外, 6mA 在不同物种基因组上的分布位点差异也较大 (表 1), 在进化上具有

表1 真核生物基因组中6mA修饰的含量、分布及功能

| 物种 | 6mA含量(6mA/dA) | 基因组分布区域 | 功能 |
|---|---------------|-------------------|--------------------|
| 真菌 <i>H. vesiculosa</i> ^[24] | 2.8% | TSS周围成簇分布 | 与基因的激活成正相关性 |
| 四膜虫 ^[25] | 0.8% | 核小体的连接处TSS | 决定核小体的位置 |
| 绿藻 ^[26] | 0.4%~0.6% | 核小体的连接处TSS | 决定核小体的位置, 并激活基因的表达 |
| 秀丽线虫 ^[27] | 0.01%~0.4% | 广泛分布, 没有明显的位点倾向性 | 加快跨代生育能力丧失 |
| 小麦 ^[28] | 0.1% | — | — |
| 黑腹果蝇 ^[23] | 0.001%~0.07% | 基因组的重复序列上 | 促进生殖细胞的分化, 激活转座子表达 |
| 非洲爪蟾 ^[54] | 0.009% | 外显子区域缺失该修饰 | — |
| 斑马鱼 ^[22] | 0.002%~0.1% | 基因组的重复序列上 | — |
| 小鼠 ^[29] | 0.0007% | 基因间区, 且主要在LINE元件上 | ES细胞中可能抑制基因表达 |

一定的规律性。单细胞真核生物中, 6mA 主要位于转录起始位点 (transcription start site, TSS) 附近, 如真菌 *H. vesiculosus* 的 6mA 修饰主要对称出现在 ApT 二核苷酸处, 并且在 TSS 周围出现密集的 6mA 簇, 其分布与 5mC 的分布呈负相关^[24]; 四膜虫^[25] 和绿藻^[26] 基因组的 6mA 位点同样主要存在于 TSS 附近的 ApT。有意思的是, 绿藻中基因 TSS 附近的 6mA 富集峰之间的距离在 200 bp 左右, 正好等于 1 个核小体所缠绕的 DNA 大小, 暗示在单细胞真核生物中, 6mA 修饰与核小体相位 (nucleosome positioning) 和 TSS 位点决定之间存在某种相关性。在多细胞真核生物, 如线虫中 6mA 在基因组上广泛分布, 没有明显的位点倾向性^[27]; 果蝇卵巢基因组 DNA 的 6mA 则更多地富集于转座子元件区域^[23]; 斑马鱼早期胚胎中 6mA 绝大部分位于基因组的重复序列上^[22]; 小鼠 ES 细胞 6mA 主要富集在基因间区, 且主要在 LINE 元件上, 特别是长 LINE 元件上^[29]。以上结果反映了 6mA 修饰在真核生物中分布及潜在功能的多样性。

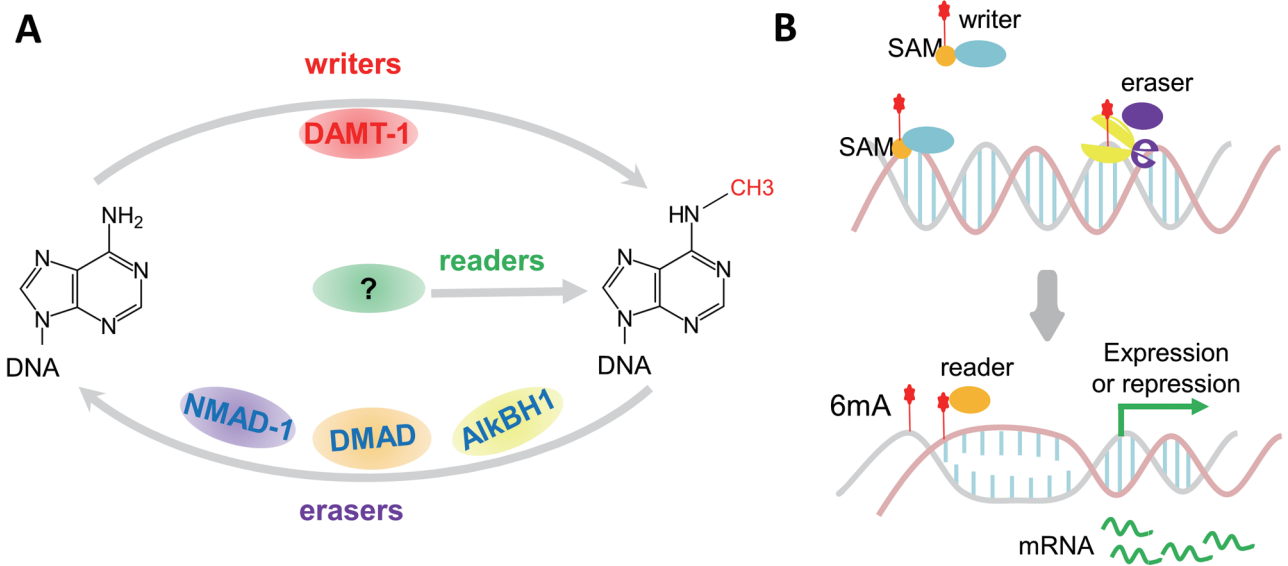
2 6mA修饰酶及阅读器蛋白

确定 6mA 是不是一种新表观遗传学标记一个重要的证据是体内是否具有完整的 6mA 催化酶学系统和表观信号识别系统, 即甲基转移酶 (writer)、去甲基化酶 (eraser) 和阅读器蛋白 (reader)(图 1)。

2.1 6mA甲基转移酶

DNA 的甲基化修饰是生物体在受到不同内源及外源性因子的刺激作用下, 以 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 为甲基供体, 通过甲基转移酶的生物催化, 将甲基基团转移到 DNA 碱基上。在细菌中, 6mA 的甲基转移酶主要有 Dam、CcrM 等, 它们识别的催化位点分别为 GATC 和 GANTC^[30-31], 5mC 的甲基转移酶主要为 Dcm^[32]。哺乳动物中 DNA 的 5mC 甲基转移酶主要有 DNMT1 和 DNMT3A/B/L, 其中 DNMT1 催化刚合成的双链 DNA 中的新合成链上与母链内 5mC 相应的胞嘧啶的甲基化; DNMT3A 和 DNMT3B 为从头甲基转移酶, DNMT3L 则没有单独的催化活性, 是 DNMT3A、DNMT3B 的调节因子^[33-34]。

而真核生物中 DNA 6mA 甲基转移酶长期以来都是空白, 有研究对原核生物的甲基转移酶在真核生物中的同源基因进行了模拟分析, 预测了可能的甲基转移酶^[30]。其中, 细菌 M.MunI 在真核生物中的同源物 MT-A70 结构域家族蛋白最为保守, 已报道的 mRNA m6A 甲基转移酶 METTL3 和 METTL14 即属于这个家族蛋白^[35-36]。Liu 等^[36] 报道表明, METTL3 和 METTL14 在体外对 DNA 也有弱的 6mA 甲基化活性。2015 年, Greer 等^[27] 研究发现, 在线虫中敲低 DAMT-1 (MT-A70 家族蛋白) 能够显著降低基因组的 6mA 含量, 而在昆虫细胞中过表



A: DAMT-1为线虫的6mA甲基转移酶, 催化dA形成6mA; NMAD-1、DMAD及AikBH1分别是线虫、果蝇和小鼠基因组中6mA修饰的去甲基化酶, 催化6mA的去甲基化。目前在真核生物中尚未发现特异性的DNA 6mA阅读器蛋白。B: 在真核生物中, 6mA的甲基化酶、去甲基化酶和阅读器蛋白协同作用于基因组DNA, 参与调控基因的表达。

图1 真核生物基因组中6mA的动态可逆调控过程

达 DAMT-1 能够提高基因组的 6mA 含量, 过表达酶活区突变的 DAMT-1 则没有明显变化。尽管目前还缺乏直接的体外酶活的证据, 以上结果已表明 DAMT-1 可能为线虫的 6mA 甲基转移酶 (图 1A)。METTL4 是 DAMT-1 在哺乳动物中的同源物, 而其是否也具有 6mA 催化活性目前尚不清楚, 对其酶活及功能还有待进一步的研究。

2.2 6mA 去甲基化酶

DNA 甲基化修饰往往是一个受调控的动态可逆过程, 即存在去甲基过程。去甲基化主要包括主动去甲基化和被动去甲基化作用, 其中主动去甲基化指的是一种去除甲基基团或对其进行修饰的酶促过程。在脊椎动物中, TET 家族蛋白 (TET1、TET2 和 TET3) 能够把 5mC 催化为 5hmC, 及进一步催化 5hmC 为 5fC 和 5caC, 并最终通过碱基切除修复完成主动去甲基化过程^[37-40]。

总体来讲, 真核生物基因组中 6mA 的含量很低, 其中一种可能是真核生物中 6mA 在甲基转移酶催化形成后很快被去甲基化酶去除, 从而在总体上维持一个低 6mA 的水平。这一过程中, 去甲基化酶在调控 6mA 整体动态水平中起主导作用, 因此, 发现 6mA 去甲基化酶是解开真核生物基因组 6mA 修饰研究的重要途径。在大肠杆菌中, 6mA 是 AlkB 双加氧酶的底物之一^[41]。AlkB 家族蛋白在进化上是非常保守的^[42], 目前研究表明人类基因组中 AlkB 家族至少存在 9 种同源物, 分别为 AlkBH1~8 及 FTO, 这其中的 FTO 和 AlkBH5 是 mRNA m6A 修饰的去甲基化酶^[43-44]。Greer 等^[27]研究表明, 敲除 NMAD-1 (AlkB 家族蛋白) 的线虫基因组 DNA 的 6mA 含量显著上升, 并且 NMAD-1 在体外也具有 6mA 去甲基化的活性, 因此, NMAD-1 可能为线虫的一种 6mA 去甲基化酶。还有研究发现 *Alkbh1* 基因缺失突变小鼠细胞中 6mA 含量增加, 并导致转录沉默, AlkBH1 也可能是小鼠中作用于 6mA 修饰的一种去甲基化酶^[29]。DMAD 作为哺乳动物 TET 家族蛋白在果蝇中的唯一同源物, 在果蝇体内并不具有催化 5mC 成为 5hmC 的活性; 相反, DMAD 突变体中 6mA 修饰含量与野生型相比显著上升, 特别是头部 6mA 的含量是野生型头部的 100 倍, 达到了 0.1%。体外实验也证明, DMAD 具有直接催化 6mA 修饰去甲基的活性, 以上证据表明 DMAD 为果蝇基因组中 6mA 修饰的去甲基化酶^[23] (图 1A)。真核生物中是否还存在其他的 DNA 6mA 去甲基化酶还有待今后进一步研究。

2.3 6mA 阅读器蛋白

在甲基修饰介导的调控过程中, 甲基阅读器蛋白能够特异识别并结合到修饰位点上, 招募其他重要分子而起到桥梁作用。在哺乳动物中, MBD 家族蛋白 (MBD1、MBD2、MBD3、MBD4 和 MeCP2) 是最早发现, 也是最主要的一类 5mC 甲基阅读蛋白, 这类蛋白通过募集各类复合物至 5mC 位点, 参与调控基因转录抑制及染色质高级结构的组装等过程^[45-47]。此外, 含有 YTH 功能结构域家族的蛋白 (YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3 和 YTHDC1) 能特异结合 mRNA 的 m6A 甲基化修饰序列, 在介导 mRNA 的代谢、选择性剪切及蛋白质翻译等生物学过程中发挥调控功能^[48-51]。有关真核生物的 DNA 6mA 研究在这两年才取得重要进展, 截至目前尚未发现特异性的 DNA 6mA 阅读器蛋白, 大规模筛选鉴定 6mA 阅读器蛋白是研究 6mA 修饰的调控网络和生物学功能的重要突破口。

3 6mA 的生物学功能

6mA 的生物学功能目前所知甚少, 已有证据表明其可能与基因转录表达、遗传信息传递、细胞分裂分化及早期胚胎发育等过程密切相关^[23-24, 26-27, 29]。

真菌 *H. vesiculosa* 的 5mC 和 6mA 在基因组上的分布存在着负相关性, 当 5mC 出现在基因组的重复区域时, 6mA 便会出现在启动子上, 并且 6mA 与基因的激活呈正相关^[24]。四膜虫中, 大核为多倍体营养核, 通过转录表达基因负责细胞的正常代谢、有丝分裂及分化控制, 二倍体的小核是基因的贮存地, 是转录失活的。而 6mA 主要存在于大核中, 可能直接决定大核中核小体的相位和基因的表达, 同样, 绿藻中的 6mA 修饰也可能具有类似功能^[26, 52]。在线虫中, H3K4me2 去甲基化酶 *spr-5* 突变体中的 6mA 要明显高于野生型, 并且 6mA 含量随隔代遗传增加, 去除 *spr-5* 和 DNA 去甲基转移酶 NMAD-1 都可以加快跨代生育能力丧失的步伐; 相反, 去除 6mA 甲基转移酶 DAMT-1 则显著抑制 *spr-5* 突变体隔代遗传的表型, 这表明在线虫中 6mA 和组蛋白 H3K4 甲基化有可能协同传递遗传信息^[27]。

在果蝇中, 6mA 去甲基化酶 DMAD 介导的 6mA 修饰促进早期生殖细胞的分化, 并可能通过减少转座子区域的 6mA 修饰来维持转座子的沉默, 在卵巢早期生殖细胞的调控中发挥重要功能^[23]。此外, 果蝇早期胚胎中 6mA 修饰含量较高, 并随着

胚胎的发育迅速下降到很低的水平, 在斑马鱼及猪的早期胚胎中同样如此^[22]。这表明在这些物种的早期胚胎中可能存在6mA的主动去甲基化过程, 6mA与其他表观调控因子协同作用, 共同推动早期胚胎发育的基因表达由母型向合子型转变。

此外, 研究人员在哺乳动物中采用RNA-seq对敲除*Alkbh1*的ES细胞进行转录组测序分析, 结果显示550个基因表达下调, 其中大部分为发育因子或种系特异性基因, 并且这些下调基因明显集中于X染色体上, 这表明ES细胞中6mA增多会导致基因沉默, 6mA抑制了基因表达, 这与之前在其他物种中发现的6mA作用有所不同^[29]。

表观遗传学研究中一个很大的热点和难点, 是表观遗传如何去实现跨代遗传。从目前为数不多的研究结果来看, 线虫基因组中的DNA 6mA修饰具有跨代遗传的表型。在果蝇、斑马鱼和猪等多细胞真核生物中, DNA 6mA修饰似乎是在卵子发生过程中, 提前“预设”在卵子基因组中, 并跨代传递给合子。作为一种新的表观遗传修饰, DNA 6mA是否是跨代遗传的一种重要机制, 值得进一步深入研究。此外, 6mA在脊椎动物中的生物学功能备受关注。现有的研究结果一方面表明, 6mA可能在重编程或其他一些分化过程(5mC缺失的发育节点)中作为替代的DNA标记发挥重要的调控功能; 另一方面, 虽然大部分的脊椎动物基因组受5mC的调控抑制, 但其中也有很多区域, 特别是重复序列元件中没有CpG或CpG很少, 6mA在这些区域的分布表明这些区域的调控可能并不依赖5mC, 而受6mA的调控。因此, 尽管整个基因组水平的6mA含量很低, 特定位置6mA的富集分布依然发挥着重要调控功能。

总之, 6mA作为真核生物基因组DNA上一种新的表观修饰标记, 在真核生物的进化演变过程中并不保守, 含量与分布的种属及组织差异性较大, 并可能与其他的表观修饰体系存在着复杂的协同修饰关系, 从而使得它在不同进化等级的物种中具有多样化的生物学功能。

4 6mA检测分析技术

早期的6mA研究由于受到检测技术手段的限制进展较为缓慢, 而随着近几年来新技术的不断出现, 使相对处于低丰度的6mA修饰的研究成为可能, 研究手段也更为多样化。首先, 基于6mA抗体的点杂交(Dot-blot)及免疫荧光技术可以对6mA的含

量及分布进行初步的分析^[23,27]; 超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MRM-MS/MS)可以将6mA的检测分辨率精确到 10^{-6} , 实现了对组织样品中微量6mA修饰的精确定量^[23,29,53]; 基于6mA抗体免疫共沉淀和高通量测序技术(MeDIP-Seq)及6mA敏感的CviAII、DpnI及DpnII酶切和高通量测序技术(6mA-RE-seq), 研究者可以初步获得基因组上的6mA修饰数量和分布特征^[23,26,54-56]; 而更为精确的6mA单碱基分辨率技术开发也在不断探索当中, 如SMRT(single-molecule real-time sequencing)技术已被开发用于6mA修饰的单碱基位点的分析, 如细菌^[57-58]、真菌^[24]、线虫^[27]及小鼠ES细胞^[29,59]等的6mA修饰位点。但该方法目前还存在测序成本高、无法区分1mA和6mA以及数据分析困难等缺点。相信随着今后仪器的不断升级、测序成本的下降及分析算法的不断完善, 该方法将逐步被研究者广泛使用。此外, Hong等^[60]最近发现 Ag^+ 能够选择性地稳定A-C错配, 相反会使6mA-C错配变得不稳定, 利用此特性也可通过PCR扩增对6mA修饰进行单碱基水平的位点分析。

5 展望

尽管近两年来对真核生物6mA修饰已进行了较多的研究, 但其具体功能还知之甚少。今后针对高等真核生物, 特别是哺乳动物6mA修饰的研究势必会引起更多科学家的重视, 成为表观遗传领域的研究热点之一。

目前, 研究者已发现部分物种的可能的6mA甲基转移酶和去甲基化酶, 而要揭示整个完整的酶学系统还需要有大量的工作, 这也是能否深入研究6mA机制和功能的重要突破口。另外, 到目前为止还未找到相关的6mA阅读器蛋白, 而这些蛋白可以通过结合甲基化位点, 从而招募其他的重要分子发挥相应的功能, 对研究6mA的调控机制和功能有着重要的推进作用。由于目前分析测序技术限制, 6mA的单碱基位点鉴定仍面临着很大的挑战, 还需要有更多新技术的产生与完善, 相信这方面新技术的广泛开发及应用势必会推动该领域的发展。不同物种中6mA的含量分布及功能差异较大, 呈现多样性的特征, 那么这些修饰在进化过程中是如何保持和演变的, 又是如何与其他表观修饰协同进化的, 这些问题的回答都将对揭开6mA修饰在复杂调控网络中的生物学功能具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Cheng X. Structure and function of DNA methyltransferases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1995, 24: 293-318
- [2] Ratel D, Ravanat JL, Berger F, et al. N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *BioEssays*, 2006, 28: 309-15
- [3] Wion D, Casadesús J. N6-methyladenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 183-92
- [4] Bird AP. Functions for DNA methylation in vertebrates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1993, 58: 281-5
- [5] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 204-20
- [6] Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, 2014, 156: 45-68
- [7] Gorovsky MA, Hattman S, Pleger GL. (6N)methyl adenine in the nuclear DNA of a eucaryote, *Tetrahymena pyriformis*. *J Cell Biol*, 1973, 56: 697-701
- [8] Hattman S. DNA-[adenine] methylation in lower eukaryotes. *Biochemistry*, 2005, 70: 550-8
- [9] Campbell JL, Kleckner N. *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from *dam* methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell*, 1990, 62: 967-79
- [10] Pukkila PJ, Peterson J, Herman G, et al. Effects of high levels of DNA adenine methylation on methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. *Genetics*, 1983, 104: 571-82
- [11] Wallecha A, Munster V, Correnti J, et al. Dam- and OxyR-dependent phase variation of *agn43*: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation. *J Bacteriol*, 2002, 184: 3338-47
- [12] Roberts D, Hoopes BC, McClure WR, et al. IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell*, 1985, 43: 117-30
- [13] Smith JD, Arber W, Kuhnlein U. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. XIV. The role of nucleotide methylation in *in vivo* B-specific modification. *J Mol Biol*, 1972, 63: 1-8
- [14] Heyn H, Esteller M. An adenine code for DNA: a second life for N6-methyladenine. *Cell*, 2015, 161: 710-3
- [15] Luo GZ, Blanco MA, Greer EL, et al. DNA N(6)-methyladenine: a new epigenetic mark in eukaryotes? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 705-10
- [16] Luo GZ, He C. DNA N6-methyladenine in metazoans: functional epigenetic mark or bystander? *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24: 503-6
- [17] Summerer D. N6-methyladenine: a potential epigenetic mark in eukaryotic genomes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 10714-6
- [18] O'Brown ZK, Greer EL. N6-methyladenine: a conserved and dynamic DNA mark. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 945: 213-46
- [19] Huang S, Chen D. N6-methyladenine: a potential epigenetic mark in eukaryotes. *Oncotarget*, 2015, 6: 15744-5
- [20] Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 1986, 321: 209-13
- [21] Sun Q, Huang S, Wang X, et al. N6-methyladenine functions as a potential epigenetic mark in eukaryotes. *BioEssays*, 2015, 37: 1155-62
- [22] Liu J, Zhu Y, Luo GZ, et al. Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig. *Nat Commun*, 2016, 7: 13052
- [23] Zhang G, Huang H, Liu D, et al. N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 2015, 161: 893-906
- [24] Mondo SJ, Dannebaum RO, Kuo RC, et al. Widespread adenine N6-methylation of active genes in fungi. *Nat Genet*, 2017, 49: 964-8
- [25] Wang Y, Sheng Y, Liu Y, et al. N6-methyladenine DNA modification in the unicellular eukaryotic organism *Tetrahymena thermophila*. *Eur J Protistol*, 2017, 58: 94-102
- [26] Fu Y, Luo GZ, Chen K, et al. N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell*, 2015, 161: 879-92
- [27] Greer EL, Blanco MA, Gu L, et al. DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell*, 2015, 161: 868-78
- [28] Vanyushin BF, Alexandrushkina NI, Kirnos MD. N6-Methyladenine in mitochondrial DNA of higher plants. *FEBS Lett*, 1988, 233: 397-9
- [29] Wu TP, Wang T, Seetin MG, et al. DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 2016, 532: 329-33
- [30] Iyer LM, Abhiman S, Aravind L. Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2011, 101: 25-104
- [31] Wion D, Casadesús J. N6-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4: 183-92
- [32] Hanck T, Schmidt S, Fritz HJ. Sequence-specific and mechanism-based crosslinking of Dcm DNA cytosine-C5 methyltransferase of *E. coli* K-12 to synthetic oligonucleotides containing 5-fluoro-2'-deoxycytidine. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 303-9
- [33] Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 481-514
- [34] Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 805-11
- [35] Bokar JA, Shambaugh ME, Polayes D, et al. Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 1997, 3: 1233-47
- [36] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93-5
- [37] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 2009, 324: 930-5
- [38] Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 2013, 502: 472-9

- [39] He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 2011, 333: 1303-7
- [40] Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 2009, 324: 929-30
- [41] Li D, Delaney JC, Page CM, et al. Exocyclic carbons adjacent to the N6 of adenine are targets for oxidation by the *Escherichia coli* adaptive response protein AlkB. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8896-901
- [42] Fedeles BI, Singh V, Delaney JC, et al. The AlkB family of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases: repairing nucleic acid alkylation damage and beyond. *J Biol Chem*, 2015, 290: 20734-42
- [43] Jia G, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885-7
- [44] Zheng G, Dahl JA, Niu Y, et al. ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013, 49: 18-29
- [45] Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, et al. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 1765-74
- [46] Clouaire T, Stancheva I. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 1509-22
- [47] Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays*, 2001, 23: 1131-7
- [48] Wang X, Lu Z, Gomez A, et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 2014, 505: 117-20
- [49] Xu C, Wang X, Liu K, et al. Corrigendum: Structural basis for selective binding of m(6)A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 815
- [50] Wang X, Zhao BS, Roundtree IA, et al. N(6)-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 2015, 161: 1388-99
- [51] Li A, Chen YS, Ping XL, et al. Cytoplasmic m6A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Res*, 2017, 27: 444-7
- [52] Karrer KM, VanNuland TA. Methylation of adenine in the nuclear DNA of *Tetrahymena* is internucleosomal and independent of histone H1. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 1364-70
- [53] Huang W, Xiong J, Yang Y, et al. Determination of DNA adenine methylation in genomes of mammals and plants by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rsc Advances*, 2015, 5: 64046-54
- [54] Koziol MJ, Bradshaw CR, Allen GE, et al. Identification of methylated deoxyadenosines in vertebrates reveals diversity in DNA modifications. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23: 24-30
- [55] Luo GZ, Wang F, Weng X, et al. Characterization of eukaryotic DNA N(6)-methyladenine by a highly sensitive restriction enzyme-assisted sequencing. *Nat Commun*, 2016, 7: 11301
- [56] Chen K, Luo GZ, He C. High-resolution mapping of N(6)-mMethyladenosine in transcriptome and genome using a photo-crosslinking-assisted strategy. *Methods Enzymol*, 2015, 560: 161-85
- [57] Fang G, Munera D, Friedman DI, et al. Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 1232-9
- [58] Davis BM, Chao MC, Waldor MK. Entering the era of bacterial epigenomics with single molecule real time DNA sequencing. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16: 192-8
- [59] Ye P, Luan Y, Chen K, et al. MethSMRT: an integrative database for DNA N6-methyladenine and N4-methylcytosine generated by single-molecular real-time sequencing. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: D85-9
- [60] Hong T, Yuan Y, Wang T, et al. Selective detection of N6-methyladenine in DNA via metal ion-mediated replication and rolling circle amplification. *Chem Sci*, 2017, 8: 200-5