分类号 O657　　密级

U D C　　编号 10486

武漢大學

博士学位论文

基于液相色谱-质谱联用技术的RNA中腺苷修饰的鉴定和功能研究

研究生姓名：游　雪　娇

指导教师姓名、职称：袁　必　锋　教授

学科、专业名称：化　学、分析化学

研究方向：色谱-质谱分析

二〇二二年五月

中国知网 https://www.cnki.net

Ph.D Dissertation

Identification and functional studies of adenosine modifications in RNA by liquid chromatography-mass spectrometry

Xue-jiao You

Directed by
Professor Bi-Feng Yuan

Wuhan University
May, 2022

中国知网 https://www.cnki.net

本论文创新点

本工作利用液相色谱-质谱联用技术，在哺乳动物转运 RNA（transfer RNA，tRNA）中鉴定了一种新型的双甲基修饰腺苷，揭示了 tRNA 可逆甲基化修饰调控转录后基因表达的新机制，提出了 RNA 表观遗传修饰参与 6-硫鸟嘌呤（6-thioguanine，6TG）介导细胞死亡的新机制。本论文的主要创新点如下：

1. 哺乳动物 tRNA 中新型双甲基修饰腺苷 *N*1,*N*^{6}-二甲基腺苷（*N*1,*N*^{6}-dimethyladenosine，m^{1,6}A）的发现和鉴定。建立了液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）分析腺苷甲基化修饰的方法。利用该方法，在哺乳动物细胞 tRNA 中发现并鉴定了一种全新的双甲基修饰腺苷：m^{1,6}A。研究发现 m^{1,6}A 普遍存在于哺乳动物细胞和组织的 tRNA 中，是一种依赖 *S*-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体的内源性修饰。此外，与相邻的癌旁组织相比，人类乳腺癌组织 tRNA 中 m^{1,6}A 的含量显著升高，暗示 m^{1,6}A 可能参与调控癌症的形成和发展。m^{1,6}A 的发现和鉴定扩大了哺乳动物 RNA 的修饰种类，增加了 RNA 修饰介导的基因表达调控的多样性。

2. 哺乳动物 tRNA 中新型双甲基修饰腺苷 m^{1,6}A 的功能研究。通过 LC-MS/MS 分析，发现 m^{1,6}A 修饰发生在 tRNA 的第 58 位，推测是该位置 *N*1-甲基腺苷（*N*1-methyladenosine，m^{1}A）的进一步 *N*6 位甲基化修饰产物。定量结果表明 tRNA 第 58 位的 m^{1}A 约 0.2%转化为 m^{1,6}A。体内和体外的分子生物学实验证实 m^{1,6}A 是动态可逆的，由去甲基化酶 ALKBH3 催化去甲基。研究揭示了 tRNA 中一种新的可逆修饰，是 tRNA 可逆甲基化修饰调控基因表达的新层面。

3. RNA 腺苷编辑（adenosine-to-inosine，A-to-I）在 6TG 介导的细胞死亡中的功能研究。通过 LC-MS/MS 和测序分析，发现 6TG 处理细胞会诱导脱氨酶 ADAR2 的表达增加，导致 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑增加。此外，细胞实验表明 ADAR2 介导 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑能调控细胞活力，且高编辑的 *BLCAP* 会促进细胞的死亡。该研究表明药物 6TG 可通过上调 ADAR2 的表达提高 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑来诱导细胞死亡增加，为 6TG 诱导细胞死亡的细胞毒性提供了一种新的机制，同时也为 RNA 表观遗传修饰在疾病治疗中的潜在功能提供了新的基础。

总之，本论文研究工作主要利用液相色谱-质谱联用技术，鉴定了哺乳动物 RNA 中的新型腺苷修饰，并对腺苷修饰的生物学功能进行了研究。研究工作增加了 RNA 修饰的多样性，提高了对 RNA 修饰调控基因表达的认识，为破译 RNA 表观遗传修饰的生物学功能提供了基础。

中国知网 https://www.cnki.net

目　录

第一章 绪论.....1
1.1 表观遗传学.....1
1.2 DNA 修饰.....2
1.3 RNA 修饰.....6
1.3.1 单甲基修饰腺苷.....7
1.3.2 双甲基修饰腺苷.....14
1.3.3 A-to-I 编辑.....17
1.4 RNA 中腺苷修饰分析方法.....19
1.4.1 RNA 中腺苷修饰的定性及定量分析.....19
1.4.2 RNA 中腺苷修饰的定位分析.....22
1.5 论文选题依据、意义及研究内容.....28
第二章 基于液相色谱-质谱联用技术的哺乳动物RNA中新修饰$m^{1,6}A$的鉴定.....31
2.1 前言.....31
2.2 实验部分.....33
2.2.1 化学试剂.....33
2.2.2 $m^{1,6}A$ 标准品的合成与纯化.....34
2.2.3 生物样本.....34
2.2.4 不同类型 RNA 的提取与纯化.....35
2.2.5 RNA 的酶解.....36
2.2.6 LC-MS/MS 分析腺苷甲基化修饰.....36
2.2.7 高分辨质谱分析.....37
2.2.8 稳定同位素示踪分析.....38
2.2.9 实时定量 PCR.....38
2.2.10 统计学分析.....39
2.3 结果与讨论.....39
2.3.1 $m^{1,6}A$ 标准品的合成与表征.....39
2.3.2 哺乳动物细胞 RNA 中 $m^{1,6}A$ 的鉴定.....43
2.3.3 细胞代谢标记分析.....47
2.3.4 方法学验证.....50
2.3.5 哺乳动物细胞和组织中 $m^{1,6}A$ 的定量分析.....51
2.3.6 乳腺癌组织中 $m^{1,6}A$ 的分析.....52
2.4 结论.....54
第三章 哺乳动物 tRNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的功能研究.....55

中国知网 https://www.cnki.net

3.1 前言.....55
3.2 实验部分.....56
3.2.1 化学试剂.....56
3.2.2 细胞和细菌的培养.....57
3.2.3 含有 m^1A58 的特定类型 t RNA 的提取.....57
3.2.4 含有 m^1A58 的特定 t RNA 片段的提取.....58
3.2.5 LC-MS/MS 分析核苷.....59
3.2.6 重组蛋白的表达与纯化.....60
3.2.7 重组蛋白的生物活性测定.....60
3.2.8 细胞中 ALKBH1 和 ALKBH3 的过表达.....61
3.2.9 细胞中 ALKBH1 和 ALKBH3 的敲低.....61
3.2.10 蛋白质印迹分析.....62
3.2.11 统计学分析.....62
3.3 结果与讨论.....63
3.3.1 含有 m^1A58 特定类型 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的检测.....63
3.3.2 含有 m^1A58 特定 tRNA 片段中 $m^{1,6}A$ 的检测.....64
3.3.3 METTL16 催化 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 形成的研究.....66
3.3.4 ALKBH3 催化 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 去甲基化的研究.....69
3.3.5 $m^{1,6}A$ 参与 $tRNA^{i\,Met}$ 中 m^1A 介导的表观遗传调控.....74
3.4 结论.....76
第四章 A-to-I 编辑在 6-硫鸟嘌呤介导的细胞死亡中的功能研究....77
4.1 前言.....77
4.2 实验部分.....79
4.2.1 化学试剂.....79
4.2.2 细胞培养和 6-硫鸟嘌呤处理.....80
4.2.3 RNA 的提取和酶解.....80
4.2.4 LC-MS/MS 分析腺苷修饰.....81
4.2.5 BLCAP 转录本中 A-to-I 编辑的分析.....81
4.2.6 细胞中 ADAR2 和 BLCAP 的过表达.....82
4.2.7 细胞中 ADAR2 的敲低.....82
4.2.8 实时定量 PCR.....83
4.2.9 蛋白质印迹分析.....83
4.2.10 统计学分析.....84
4.3 结果与讨论.....84
4.3.1 6-硫鸟嘌呤掺入 RNA.....84
4.3.2 6-硫鸟嘌呤诱导 mRNA 中 A-to-I 编辑水平增加.....86
4.3.3 6-硫鸟嘌呤诱导 BLCAP 转录本中 A-to-I 编辑增加.....88
4.3.4 ADAR2 介导 BLCAP 转录本的 A-to-I 编辑能调节细胞 .91

中国知网 https://www.cnki.net

4.3.5 BLCAP 转录本的 A-to-I 编辑能调节细胞活力.....93
4.4 结论.....95
第五章 总结与展望.....96
5.1 总结.....96
5.2 展望.....97
5.2.1 博士研究工作的展望.....97
5.2.2 RNA 修饰领域的展望.....98
参考文献.....100

中国知网 https://www.cnki.net

缩略词

缩写	中文全称	英文全称
ncRNA	非编码 RNA	non-coding RNA
5mC	5-甲基胞嘧啶	5-methylcytosine
DNMT	DNA 甲基转移酶	DNA methyltransferase
5hmC	5-羟甲基胞嘧啶	5-hydroxymethylcytosine
5fC	5-醛基胞嘧啶	5-formylcytosine
5caC	5-羧基胞嘧啶	5-arboxylcytosine
TDG	胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶	thymine DNA glycosylase
BER	碱基切除修复	base excision repair
5gmC	5-甘油基甲基胞嘧啶	5-glyceryl-methylcytosine
4mC	N^4-甲基胞嘧啶	N^4-methylcytosine
SMRT	单分子实时	single-molecule real-time
6mA	N^6-甲基腺嘌呤	N^6-methyladenine
METTL	甲基转移酶	methyltransferase
ALKBH	alkB 同源蛋白	alkB homologue
5hmU	5-羟甲基尿嘧啶	5-hydroxymethyluracil
5fU	5-醛基尿嘧啶	5-formyluracil
ROS	活性氧	reactive oxygen species
OG	8-氧-7,8-二氢鸟嘌呤	8-oxo-7,8-dihydroguanine
PT	硫代磷酸酯	phosphorothioate
A	腺嘌呤核苷	adenosine
G	鸟嘌呤核苷	guanosine
C	胞嘧啶核苷	cytidine
U	尿嘧啶核苷	uridine
rRNA	核糖体 RNA	ribosomal RNA
mRNA	信使 RNA	messenger RNA
tRNA	转运 RNA	transfer RNA
miRNA	微小 RNA	microRNA
snRNA	小核 RNA	small nuclear RNA
snoRNA	小核仁 RNA	small nucleolar RNA
m^1A	*N*1-甲基腺苷	*N*1-methyladenosine
m^6A	N^6-甲基腺苷	N^6-methyladenosine
Am	2'-*O*-甲基腺苷	2'-*O*-methyladenosine

中国知网 https://www.cnki.net

FTO	肥胖相关蛋白	fat mass and obesity-associated protein
UTRs	非翻译区	untranslated regions
mt-mRNA	线粒体 mRNA	mitochondrial mRNA
CDS	编码区	coding sequence t
hm^{6}A	*N*^{6}-羟甲基腺苷	*N*^{6}-hydroxymethyladenosine
f^{6}A	*N*^{6}-醛基腺苷	*N*^{6}-formyladenosine
YTHDF	YTH 结构域蛋白	YTH domain family proteins
TRMT	tRNA 甲基转移酶	tRNA methyltransferase
Nm	2’-*O*-甲基化修饰	2’-*O*-methylation
Gm	2’-*O*-甲基鸟苷	2’-*O*-methylguanosine
Cm	2’-*O*-甲基胞苷	2’-*O*-methylcytidine
Um	2’-*O*-甲基尿苷	2’-*O*-methyluridine
m^{7}G	*N*7-甲基鸟苷	*N*7-methylguanosine
m^{6,6}A	*N*^{6},*N*^{6}-二甲基腺苷	*N*^{6},*N*^{6}-dimethyladenosine
m^{6}Am	*N*^{6},2’-*O*-二甲基腺苷	*N*^{6},2’-*O*-dimethyladenosine
m^{2,2,7}G	*N*^{2},*N*^{2},*N*7-三甲基鸟苷	*N*^{2},*N*^{2},*N*7-trimethylguanosine
I	肌苷	inosine
ADARs	RNA 腺苷脱氨酶	adenosine deaminases acting on RNA
dsRNA	双链 RNA	double-stranded RNA
A-to-I	腺苷编辑	adenosine to inosine
ADATs	tRNA 腺苷脱氨酶	adenosine deaminases acting on tRNAs
TLC	薄层色谱	thin-layer chromatography
2D-TLC	二维薄层色谱	two-dimensional thin layer chromatography
HPLC	高效液相色谱	high-performance liquid chromatography
UPLC	超高效液相色谱	ultra-performance liquid chromatography
LC-MS/MS	液相色谱-串联质谱	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
hm^{6}dA	*N*^{6}-羟甲基-2’脱氧腺苷	*N*^{6}-hydroxymethyl-2’-deoxyadenosine
hm^{2}G	*N*^{2}-羟甲基鸟苷	*N*^{2}-hydroxymethylguanosine

中国知网 https://www.cnki.net

m^4Cm	*N*^{4},2'-*O*-二甲基胞苷	*N*^{4},2'-*O*-dimethylcytidine
m^3Cm	3,2'-*O*-二甲基胞苷	3,2'-*O*-dimethylcytidine
HRMS	高分辨质谱	high-resolution mass spectrometry
RT	逆转录	reverse transcription
DTT	二硫苏糖醇	dithiothreitol
a^6A	*N*^{6}-烯丙基腺苷	*N*^{6}-allyladenosine
$m^{1,6}A$	*N*1,*N*^{6}-二甲基腺苷	*N*1,*N*^{6}-dimethyladenosine
ALL	急性淋巴细胞白血病	acute lymphoblastic leukemia
6TG	6-硫鸟嘌呤	6-thioguanine
SAM	*S*-腺苷甲硫氨酸	*S*-adenosyl-L-methionine
^SG	6-硫鸟苷	6-thioguanosine
DMS	硫酸二甲酯	dimethyl sulfate
Me_3SI	三甲基碘化硫	trimethylsulfoniumiodide
CIAP	碱性磷酸酶	calf intestine alkaline phosphatase
FBS	胎牛血清	fetal bovine serum
D_3-Met	D_3-甲硫氨酸	L-methionine-(methyl-D_3)
DMF	*N*,*N*-二甲基甲酰胺	*N*,*N*-dimethylformamide
OB	嗅球	olfactory bulb
CE	小脑	cerebellum
MED	髓质	medulla
MID	间脑	midbrain
THA	丘脑	thalamus
HYP	下丘脑	hypothalamus
HP	海马	hippocampus
ST	纹状体	striatum
CC	大脑皮层	cerebral cortex
SEC	尺寸排阻色谱	size-exclusion chromatography
MRM	多反应监测	multiple reaction monitoring
CID	碰撞诱导解离	collision-induced dissociation
CE	碰撞电压	collision energy
siRNA	小干扰 RNA	small interfering RNA
Met	甲硫氨酸	L-methionine
m^1Am	*N*1,2'-*O*-二甲基腺苷	*N*1,2'-*O*-dimethyladenosine
LODs	检出限	limits of detection
LOQs	定量限	limits of quantification

中国知网 https://www.cnki.net

RE	相对误差	relative error
RSD	相对标准偏差	relative standard deviation
m^5C	5-甲基胞苷	5-methylcytidine
m^3C	*N*3-甲基胞苷	*N*3-methylcytidine
hALKBH3	人源 ALBKH3 蛋白	human ALKBH3
mALKBH3	鼠源 ALBKH3 蛋白	mouse ALKBK3
MAT	甲硫氨酸腺苷转移酶	methionine adenosyltransferase
MMR	错配修复	mismatch repair
BLCAP	膀胱癌相关蛋白	bladder cancer-associated protein
DMSO	二甲基亚砜	dimethyl sulfoxide

中国知网 https://www.cnki.net

摘要

RNA 修饰是表观遗传调控的重要层面。迄今为止，已在 RNA 分子中鉴定了 170 多种转录后修饰。RNA 修饰可发生在不同类型的 RNA 中，对 RNA 的稳定性、核糖体的生物发生和翻译的起始有着重要的影响。腺苷甲基化修饰是哺乳动物 RNA 中普遍的修饰。其中，甲基化修饰不仅可以发生在腺嘌呤上形成 *N*1-甲基腺苷（*N*1-methyladenosine，m^1A）和 N^6-甲基腺苷（N^6-methyladenosine，m^6A），而且可以发生在核糖 2'OH 位置形成 2'-*O*-甲基腺苷（2'-*O*-methyladenosine，Am）。进一步的研究发现腺苷的甲基化修饰除了以单一甲基化的形成存在外，还能以双甲基化的形式存在。N^6,N^6-二甲基腺苷（N^6,N^6-dimethyladenosine，$m^{6,6}A$）是甲基化同时发生在腺嘌呤 *N*6 位置的双甲基修饰腺苷，而 N^6,2'-*O*-二甲基腺苷（N^6,2'-*O*-dimethyladenosine，m^6Am）是甲基化同时发生在腺嘌呤 *N*6 位置和核糖 2'OH 位置的双甲基修饰核苷。m^1A 和 m^6A 普遍存在于各种类型的 RNA 中，是重要的表观遗传修饰，在多种生理过程中发挥着重要作用。生物体内是否存在腺嘌呤 *N*1 和 *N*6 位置同时发生甲基化的修饰，即 *N*1,N^6-二甲基腺苷（*N*1,N^6-dimethyladenosine，$m^{1,6}A$），目前尚不清楚。

RNA 修饰不仅对基因的表达具有重要的调控作用，而且与多种疾病的发生和发展密切相关。其中，信使 RNA（messenger RNA，mRNA）中的腺苷修饰，如 m^1A、m^6A、腺苷编辑（adenosine-to-inosine，A-to-I）等，参与多种疾病和癌症的发生，涉及的机理也已被广泛研究。通过抑制 RNA 修饰相关酶来调控 RNA 修饰在体内的变化，是一种潜在的疾病治疗方法。除了了解修饰本身在疾病发生发展过程中的致病机理外，破译 RNA 修饰在疾病的药物治疗中发挥的作用也是值得探索的方向。6-硫鸟嘌呤（6-thioguanine，6TG）是治疗急性淋巴细胞白血病最成功的化疗药物之一。6TG 进入细胞后通过代谢进入到 DNA 中触发碱基错配修复机制来诱导细胞死亡。研究表明 6TG 处理细胞后会影响 DNA 修饰的水平。与 DNA 表观遗传修饰类似，RNA 分子中的腺苷修饰也可以调节许多生物过程。然而，6TG 是否会影响 RNA 腺苷修饰以及 RNA 腺苷修饰在 6TG 介导的细胞死亡中发挥怎样的生理功能仍然未知。

液相色谱-质谱联用技术，具有灵敏度高、定性能力强等优点，适用于核酸新修饰的探索和核酸修饰的动态变化分析。基于此，本论文的主体思路为：以液相色谱-质谱联用技术为主要分析手段，探索哺乳动物 RNA 中的新型双甲基修饰腺苷，并研究腺苷修饰在 6TG 介导的细胞死亡中的功能。具体内容如下：

1. 哺乳动物转运 RNA（transfer RNA，tRNA）中新型双甲基修饰腺苷

中国知网 https://www.cnki.net

$m^{1,6}A$ 的发现和鉴定。建立了液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）分析腺苷甲基化修饰的方法。利用该方法，在 tRNA 中发现并鉴定了一种全新的双甲基修饰腺苷：$m^{1,6}A$。该修饰普遍存在于哺乳动物细胞和组织的 tRNA 中，是一种依赖 *S*-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体的内源性修饰。定量结果表明哺乳动物 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量为 0.0049%~0.047%。此外，通过对人类乳腺癌组织的分析结果显示，与相邻的癌旁组织相比，癌组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量显著升高，暗示 $m^{1,6}A$ 可能参与调控乳腺癌的发生和发展。该研究发现和鉴定了一种新的修饰类型，扩大了哺乳动物 RNA 的修饰种类，增加了 RNA 修饰介导的基因表达调控多样性。

2. 哺乳动物 tRNA 中新型双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$ 的功能研究。通过 LC-MS/MS 进一步探索 tRNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的位置和生物合成途径。质谱结果表明 $m^{1,6}A$ 修饰发生在 tRNA 的第 58 位，推测是该位置 m^1A 的进一步 *N*6 位甲基化修饰产物。定量结果表明 tRNA 第 58 位的 m^1A 约 0.2%转化为 $m^{1,6}A$。体内 *ALKBH3* 的过表达和敲低以及体外 ALKBH3 蛋白孵育的实验证实新修饰 $m^{1,6}A$ 是动态可逆的，由去甲基化酶 ALKBH3 催化去甲基。此外，还发现 $tRNA^{iMet}$ 中的 $m^{1,6}A$ 可能参与 m^1A 介导的表观遗传调控。总之，该研究揭示了 tRNA 中一种新的可逆修饰，为 tRNA 可逆甲基化调控转录后基因表达提供了新的机制。

3. A-to-I 编辑在 6TG 介导的细胞死亡中的功能研究。通过 LC-MS/MS 探索了药物 6TG 处理急性淋巴细胞白血病细胞后对 mRNA 中腺苷修饰的影响。定量结果表明 6TG 处理会诱导脱氨酶 ADAR2 的表达增加，导致 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑增加。此外，体内细胞实验表明 ADAR2 介导 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑能调控细胞活力，且高编辑的 *BLCAP* 会促进细胞的死亡。总之，该研究表明药物 6TG 进入细胞后可通过上调 ADAR2 的表达提高 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑来诱导细胞死亡增加，为 6TG 诱导细胞死亡的细胞毒性提供了一种新的机制，同时也为 RNA 表观遗传修饰在疾病治疗中的潜在功能提供了新的基础。

通过以上研究，我们鉴定了哺乳动物 tRNA 中的一种新型双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$，并发现该修饰在体内是动态可逆的，可能参与 m^1A 介导的表观遗传调控。此外，我们研究了 RNA 中腺苷修饰在 6TG 介导的细胞死亡中发挥的潜在作用，发现 A-to-I 编辑参与 6TG 介导的细胞死亡，表明 RNA 腺苷修饰在疾病发生和疾病治疗中都具有重要的调控功能。

关键词：RNA 修饰；甲基化修饰；双甲基修饰腺苷；A-to-I 编辑；液相色谱-质谱联用

中国知网 https://www.cnki.net

Abstract

RNA modification is an important aspect of epigenetic regulation. To date, more than 170 post-transcriptional modifications have been identified in RNA molecules. These modifications occur in different types of RNA, with important effects on RNA stability, ribosome biogenesis, and translation initiation. Adenosine methylation is a common modification in mammalian RNA. Among them, methylation can occur not only on adenine to form *N*1-methyladenosine (m^1A) and N^6-methyladenosine (m^6A), but also on ribose 2' OH to form 2'-*O*-methyladenosine (Am). Further research found that adenosine methylation modifications can exist not only in the form of single methylation, but also in the form of dual methylation. N^6,N^6-dimethyladenosine is a dimethylation modification of adenosine which dual methylation occurs simultaneously at the *N*6 position of adenine, while N^6,2'-*O*-dimethyladenosine is a dimethylation modification of adenosine that dual methylation occurs simultaneously at the *N*6 position of adenine and 2' OH of ribose. m^1A and m^6A are universal modifications in various types of RNAs and are important epigenetic modifications that play important roles in a variety of physiological processes. Whether there is a modification of dual methylation occuring simultaneously at the *N*6 position and *N*1 position of adenine in organisms, namely *N*1,N^6-dimethyladenosine ($m^{1,6}A$), is still unclear.

RNA modification not only plays an important role in regulating gene expression, but also is closely related to the occurrence and development of various diseases. Among them, important adenosine modifications on messenger RNA (mRNA), such as m^1A, m^6A, adenosine-to-inosine (A-to-I) editing, etc., are involved in the occurrence and development of various diseases and cancers, and the mechanisms have also been extensively explored. Regulating the changes of modifications *in vivo* by inhibiting related enzymes of modifications is a potential disease treatment way. In addition to understanding the pathogenic mechanism of modifications in the process of disease development, deciphering the role of the modifications in the drug treatment of the diseases is also a direction worth exploring. 6-thioguanine (6-thioguanine, 6TG) is one of the most successful chemotherapy drugs in the treatment of Acute lymphoblastic leukemia. 6TG triggers the base mismatch repair pathway and induces cell death by incorporation into DNA. Further studies have shown that 6TG treatment of cells affects the level of genomic DNA modifications. Similar to DNA

中国知网 https://www.cnki.net

epigenetic modifications, the chemical modifications in RNA molecules can also delicately regulate numerous biological processes. However, whether 6TG treatment affects RNA adenosine modifications and what physiological functions RNA adenosine modifications play in 6TG-mediated cell death remains unknown.

Liquid chromatography-mass spectrometry has the advantages of high sensitivity, and strong qualitative ability, and is suitable for the exploration of new modifications and the analysis of dynamic changes of modifications. Based on this, the main idea of this paper is using liquid chromatography-mass spectrometry as main analytical means to explore novel dimethylated adenosine in mammalian RNA, and study the role of adenosine modifications in 6TG-mediated cell death. The details are as follows:

1. Discovery and identification of a novel dual methylation modification of adenosine $m^{1,6}A$ in mammalian transfer RNA (tRNA). A method for analyzing methylation modifications of adenosine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was established. Using this method, novel dimethylated adenosine $m^{1,6}A$ was discovered and identified in mammalian cellular tRNA. The discovered modification is ubiquitous in tRNA of mammalian cells and tissues, and is an endogenous modification that relies on *S*-adenosyl-L-methionine as the methyl donor. The quantitative results showed that the content of $m^{1,6}A$ in mammalian tRNA was 0.0049%~0.047%. In addition, the analysis results of human breast cancer tissues showed that compared with tumor-adjacent normal tissues, the content of $m^{1,6}A$ in tRNA of human breast cancer tissues was significantly increased, suggesting that $m^{1,6}A$ may be involved in regulating the occurrence and development of breast cancer. This study discovered and identified a new type of modification, expanding the types of modifications in mammalian RNA, and increasing diversity of RNA modification-mediated regulation of gene expression.

2. Functional study of novel dimethyled adenosine $m^{1,6}A$ in mammalian tRNA. The location and biosynthetic pathway of $m^{1,6}A$ in tRNA were further explored by LC-MS/MS analysis. The mass spectrometry results showed that $m^{1,6}A$ occurred at position 58 of tRNA, which was presumed to be the product of further *N*6 methylation modification of m^1A at this position. The quantitative results showed that about 0.2% of m^1A at position 58 of tRNA was converted to $m^{1,6}A$. The overexpression and knockdown of *ALKBH3 in vivo* and ALKBH3 protein incubation experiments *in vitro* confirmed that the novel modification $m^{1,6}A$ is reversible and demethylated by the demethylase ALKBH3. In addition, $m^{1,6}A$ in $tRNA^{iMet}$ was also found to be involved

中国知网 https://www.cnki.net

in m^1A-mediated epigenetic regulation. In conclusion, this study revealed a novel reversible modification in tRNA, providing a new mechanism for the regulation of post-transcriptional gene expression by reversible methylation of tRNA.

3. Functional study of A-to-I editing in 6TG-mediated cell death. The effect of the drug 6TG on adenosine modifications in mRNA after treatment of acute lymphoblastic leukemia cells was explored by LC-MS/MS analysis. Quantitative results indicated that 6TG treatment induced increased expression of the deaminase ADAR2, resulting in increased A-to-I editing at positions 5 and 14 in *BLCAP* transcript. In addition, cell experiments *in vivo* showed that ADAR2-mediated A-to-I editing at sites 5 and 14 of *BLCAP* transcript could regulate cell viability, and highly edited-*BLCAP* promoted cell death. In conclusion, this study showed that the increased expression of ADAR2 upon drug 6TG treatment increased A-to-I editing at sites 5 and 14 of *BLCAP* transcript, which contributed to increased cell death. The study reveals a new mechanism of the cytotoxicity of 6TG in inducing cell death, and also provides new foundation for the potential function of RNA epigenetic modifications in disease treatment.

Through the above studies, we identified a novel adenosine dual methylation modification, i.e., $m^{1,6}A$ in mammalian tRNA and found that this modification is dynamically reversible *in vivo* and $m^{1,6}A$ may be involved in m^1A-mediated epigenetic regulation. Furthermore, we investigated the potential role of RNA adenosine modifications in 6TG-mediated cell death and found that A-to-I editing was involved in 6TG-mediated cell death, suggesting that RNA adenosine modifications have important regulatory functions in both disease development and disease treatment.

Keywords: RNA modification, methylation modification, dimethyled adenosine, A-to-I editing, liquid chromatography-mass spectrometry

中国知网 https://www.cnki.net

第一章 绪论

1.1 表观遗传学

表观遗传学是研究基因序列不发生改变的情况下，基因的表达发生可遗传变化的一门学科。表观遗传学由 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑和非编码 RNA（non-coding RNA，ncRNA）调节等组成[1]。在过去数十年间，表观遗传学研究取得了许多突破性的进展。表观遗传学与染色体的失活、胚胎的发育、基因的沉默和表达、以及疾病的发生密切相关[2]。随着表观遗传学的深入研究，人们发现遗传信息从 DNA 流向 RNA 再到蛋白质的过程中会发生化学修饰，这些修饰会影响 DNA 的转录、RNA 的翻译和蛋白质的功能，从而调控基因的表达（**图 1-1**）。这些修饰统称为表观遗传修饰，主要包括 DNA 修饰、RNA 修饰和组蛋白修饰。表观遗传修饰的研究推动了基因组学、转录组学和蛋白质组学的研究。其中，DNA 修饰和 RNA 修饰是近些年表观遗传修饰研究的重点。目前，已在 DNA 中鉴定了十几种修饰，在 RNA 中鉴定了 170 多种修饰。这些化学修饰不仅对基因的表达具有重要的调控作用，还参与疾病的发生和发展过程[3]。因此，破译表观遗传修饰的生物学功能是表观遗传学的核心内容，也是研究的最终目标。

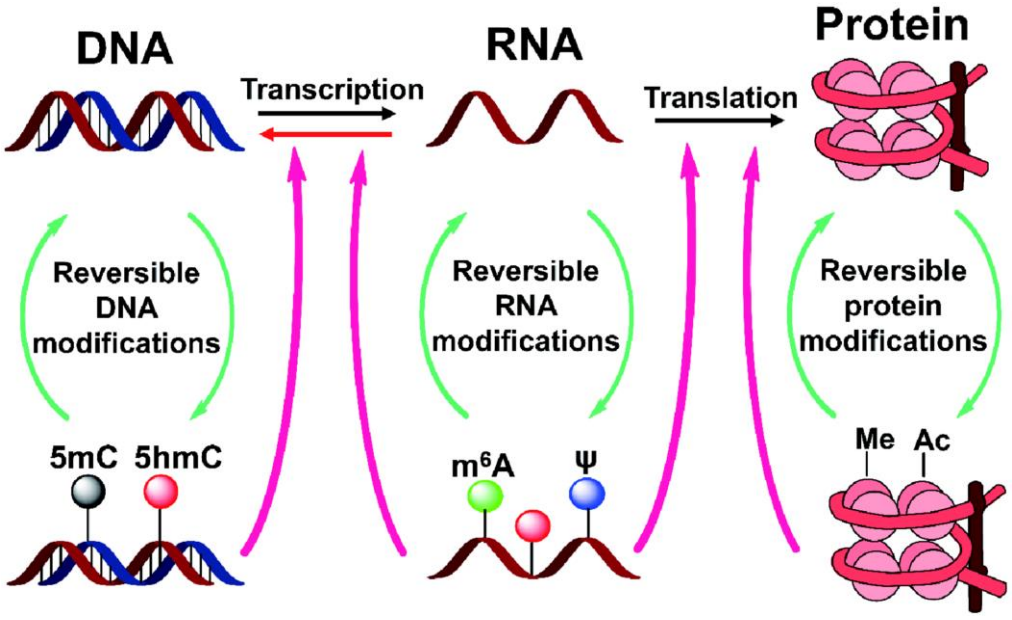


图 1-1 DNA 修饰、RNA 修饰和蛋白质修饰动态调控基因表达的示意图[4]。

中国知网 https://www.cnki.net

1.2 DNA 修饰

DNA 分子利用鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶来编码生命系统中的遗传信息。除了这四种正常碱基以外，DNA 分子中还存在一些修饰的碱基[5]（**图 1-2**）。这些 DNA 修饰会调节染色质结构和 DNA 转录，从而实现对基因表达和疾病发生的调控。

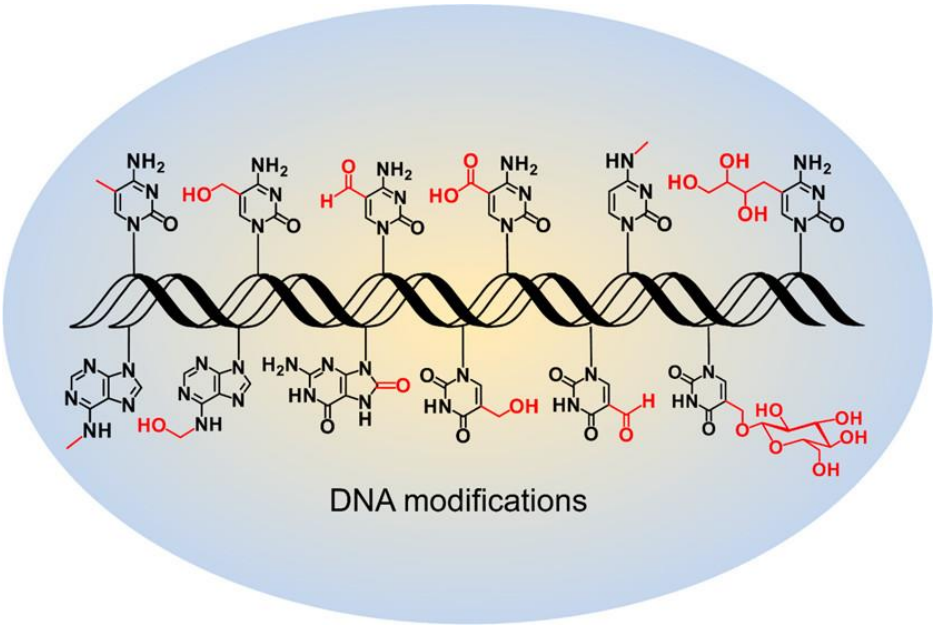


图 1-2 DNA 上的不同化学修饰[5]。

甲基化修饰是 DNA 中最普遍的修饰。胞嘧啶 C5 位的甲基化修饰，即 5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine，5mC）是 DNA 中最典型的表观遗传修饰之一，广泛存在于动物、植物和真菌中[6, 7]。在脊椎动物中，5mC 通常由 DNA 甲基转移酶（DNA methyltransferase，DNMT）催化生成。其中，DNMT3A 和 DNMT3B 负责甲基化的形成，DNMT1 负责甲基化的维持[8]。5mC 修饰参与多种生理过程，包括调节染色体的完整性和失活，以及影响 DNA 的转录等。此外，研究还发现异常的 5mC 修饰会造成疾病的发生[9, 10]。

进一步的研究表明 5mC 修饰在生物体内是动态的和可逆的（**图 1-3**）。5mC 在 TET（ten-eleven translocation）蛋白的连续氧化作用下，会生成羟甲基修饰（5-hydroxymethylcytosine，5hmC）和醛基修饰（5-formylcytosine，5fC），并最终生成羧基修饰（5-arboxylcytosine，5caC）[11, 12]（**图 1-3**）。5fC 和 5caC 可以通过胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶（thymine DNA glycosylase，TDG）特异性识别和切割形成 AP 位点；形成的 AP 位点能在碱基切除修复（base excision repair，

中国知网 https://www.cnki.net

BER）机制中被恢复为正常的胞嘧啶[13, 14] （**图 1-3**）。最近的一项研究表明，5caC 除了通过 BER 途径外，还能在体内直接脱羧形成正常的胞嘧啶[15-17]（**图 1-3**）。5mC 的氧化衍生物 5hmC、5fC 和 5caC 除了作为 DNA 活性去甲基化途径中的中间产物外，还被认为是表观遗传修饰，在多种生理过程中具有额外的调控作用[18-21]。此外，最近报道了一种来自衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）的 5mC 衍生物 5-甘油基甲基胞嘧啶（5-glyceryl-methylcytosine，5gmC）[22]。5gmC 是由 TET 蛋白同系物 CMD1（5mC-modifying enzyme）催化 5mC 形成，在光保护过程中起着关键作用[22]。

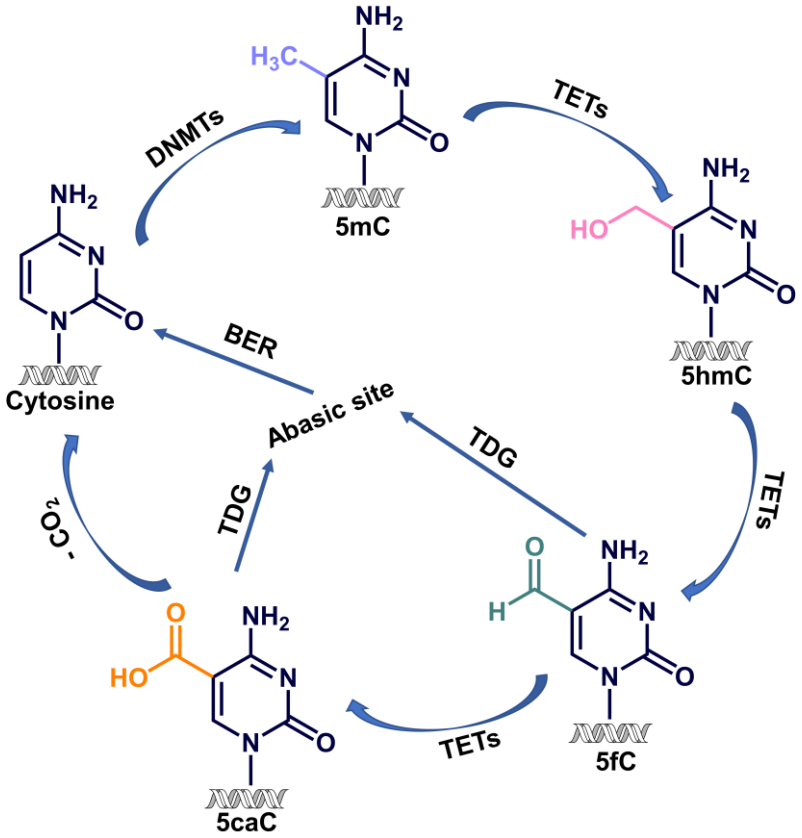


图 1-3 DNA 中 5mC 的动态可逆过程。

作为 DNA 中另一种胞嘧啶甲基化修饰，N^4-甲基胞嘧啶（N^4-methylcytosine，4mC）在 20 世纪 80 年代首次被发现存在于细菌基因组 DNA 中[23]。4mC 主要存在嗜热细菌中，并参与细菌限制修饰系统[24]。DNA 甲基转移酶 BcnI 和 M.SmaI 催化细菌基因组中 4mC 的形成[23, 25]。到目前为止，还没有研究报道真核生物基因组中存在 4mC。高通量测序技术的发展推动了 4mC 的全基因组定位分析。建立的单碱基分辨测序方法[26]和单分子实时（Single-molecule real-time, SMRT）测序方法[27, 28]已在细菌中鉴定了数个 4mC 的位点，有助于探索

中国知网 https://www.cnki.net

4mC 除了作为细菌限制修饰系统的部分之外的其他生理功能。进一步的研究表明细菌 DNA 中 4mC 和 5mC 的甲基转移酶可以同时识别相同或重叠序列的相同胞嘧啶残基，产生 *N*4 位和 C5 位双甲基化形式的胞嘧啶修饰：N^4,5-双甲基胞嘧啶（N^4,5-dimethylcytosine）[29, 30]。

除了胞嘧啶的甲基化修饰之外，腺嘌呤的甲基化修饰（N^6-methyladenine，6mA）也是 DNA 中另一种重要的甲基化修饰。6mA 最早被发现在细菌的 DNA 中，是原核生物中普遍的表观遗传修饰[31]。随着人们对 6mA 的研究深入，发现该修饰不仅仅存在于原核生物基因组中，也同样广泛存在于真核生物基因组中，包括线虫（*Caenorhabditis elegans*）[32]、果蝇（*Drosophila melanogaster*）[33]、真菌[34]、植物[35, 36]和哺乳动物[37-39]等。进一步的研究表明哺乳动物 DNA 中的 6mA 修饰是动态可逆的，由甲基转移酶 METTL4（methyltransferase-like 4）和 N6AMT1（N6 adenine methyltransferase 1）催化形成，通过去甲基化酶 ALKBH1（alkB homologue 1）和 ALKBH4（alkB homologue 4）介导去甲基化[38-40]。基因组 DNA 中 6mA 含量的降低会促进肿瘤的发生[39]（**图 1-4**）。此外，基因组中的 6mA 还参与核小体定位和染色质相互作用[41]。最近，有报道反对 6mA 作为哺乳动物细胞 DNA 中可遗传的表观遗传标记。该研究表明 DNA 中的 6mA 来自于 RNA，通过核苷酸补救途径和 DNA 聚合酶错误整合到哺乳动物基因组中[42, 43]。高通量测序技术和 SMRT 测序技术的出现促进了基因组中 6mA 的研究[28, 39, 44, 45]。测序结果表明，6mA 在不同生物中的分布不同，具有物种特异性[39]。在人类细胞中，6mA 位点主要富集在外显子编码区，并以(G/C)AGG(C/T)作为基序[39]。最近的一项研究表明哺乳动物线粒体 DNA 中也存在 6mA，且丰度比基因组 DNA 高 1300 倍[46]。该研究还提出 6mA 的存在可以抑制线粒体转录因子与 DNA 的结合，并参与调节线粒体中的应激反应[46]。

中国知网 https://www.cnki.net

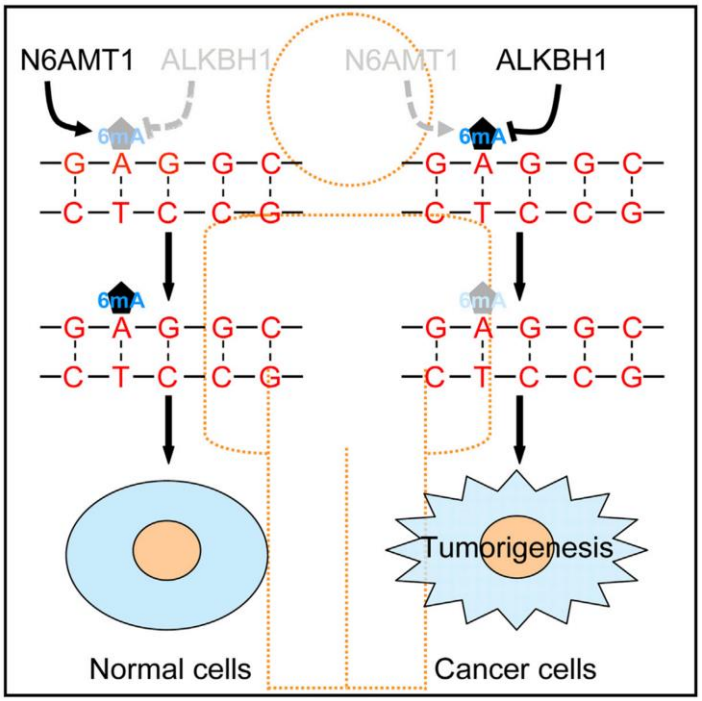


图 1-4 DNA 中的 6mA 动态调控肿瘤的形成[39]。

除了甲基化修饰以外，一些其他类型的修饰也存在于生物体的基因组中。5-羟甲基尿嘧啶（5-hydroxymethyluracil，5hmU）是存在于多种生物体中的胸腺嘧啶修饰。现已在噬菌体[47]、甲藻[48]、利什曼原虫（*Leishmania*）[49]和哺乳动物[50]等基因组中发现了 5hmU。TET 蛋白可以氧化哺乳动物基因组 DNA 中的胸腺嘧啶，形成 5hmU 和 5-醛基尿嘧啶（5-formyluracil，5fU）[50]。另一种尿嘧啶修饰 base J（β-d-glucosyl-5-hydroxymethyluracil）于 1993 年首次在布鲁氏锥虫（*Trypanosoma brucei*）的核 DNA 中被发现[51]。JBP（J-binding protein）可以将胸腺嘧啶转化为 5hmU，5hmU 在葡萄糖基转移酶的作用下进一步被糖基化形成新的核碱基 base J[52-54]。定量结果显示 base J 取代了基因组中约 1%的胸腺嘧啶，主要存在于端粒中[55-59]。

细胞好氧代谢产生的活性氧（reactive oxygen species，ROS）可氧化 DNA 造成氧化损伤，8-氧-7,8-二氢鸟嘌呤（8-oxo-7,8-dihydroguanine，OG）是主要的氧化损伤产物[60]。基因组中的 OG 可以通过 BER 机制进行修复，基因组中 OG 水平的增加与 BER 途径中增加的基因表达密切相关[61-64]。此外，OG 被认为在基因表达中具有调节作用和表观遗传特性[65, 66]。OG 可以通过促进 DNA 启动子中 G-四链体的形成来激活 mRNA 合成，并影响细胞的表型[64]。

在细菌和古细菌的 DNA 中还发现了硫代磷酸酯（phosphorothioate，PT）修饰[67, 68]。在 PT 修饰中，DNA 链磷酸基团中的非桥接氧被硫取代。人病原体的 DNA 中也存在 PT 修饰[69]。到目前为止，PT 修饰尚未在真核生物的

中国知网 https://www.cnki.net

DNA 中被发现。细菌 DNA 中的 PT 修饰是动态的，能调控基因表达和细胞应激反应，并维持细胞氧化还原稳态[70-72]。此外，一些 2'-脱氧-7-脱氮杂环鸟嘌呤修饰，例如，2'-脱氧-7-酰胺-7-脱氮杂环鸟嘌呤，2'-脱氧-7-氰基-7-脱氮杂环鸟嘌呤和 2'-脱氧-7-氨甲基-7-脱氮杂环鸟嘌呤，也被发现存在于细菌和噬菌体 DNA 中[73, 74]。这些特殊的 DNA 修饰能保护噬菌体 DNA 免受宿主限制性内切酶的酶切[74]。

1.3 RNA 修饰

遗传信息从 DNA 到 RNA，再到蛋白质。RNA 中除了四种正常核苷：腺嘌呤核苷（adenosine，A）、鸟嘌呤核苷（guanosine，G）、尿嘧啶核苷（uridine，U）和胞嘧啶核苷（cytidine，C）外，还包含各种各样的修饰核苷[75]。RNA 中的修饰比 DNA 中更加丰富多样，迄今为止已在 RNA 中鉴定出 170 多种化学修饰[76]。修饰可发生在不同类型的 RNA 中，包括核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）、信使 RNA（messenger RNA，mRNA）、转运 RNA（transfer RNA，tRNA）、小核 RNA（small nuclear RNA，snRNA）、微小 RNA（microRNA，miRNA）、小核仁 RNA（small nucleolar RNA，snoRNA）、环状 RNA 等[4]（**图 1-5**）。RNA 修饰是表观遗传修饰的重要组成部分，参与多种生理过程的调控，并与疾病的发生和发展密切相关[3]。

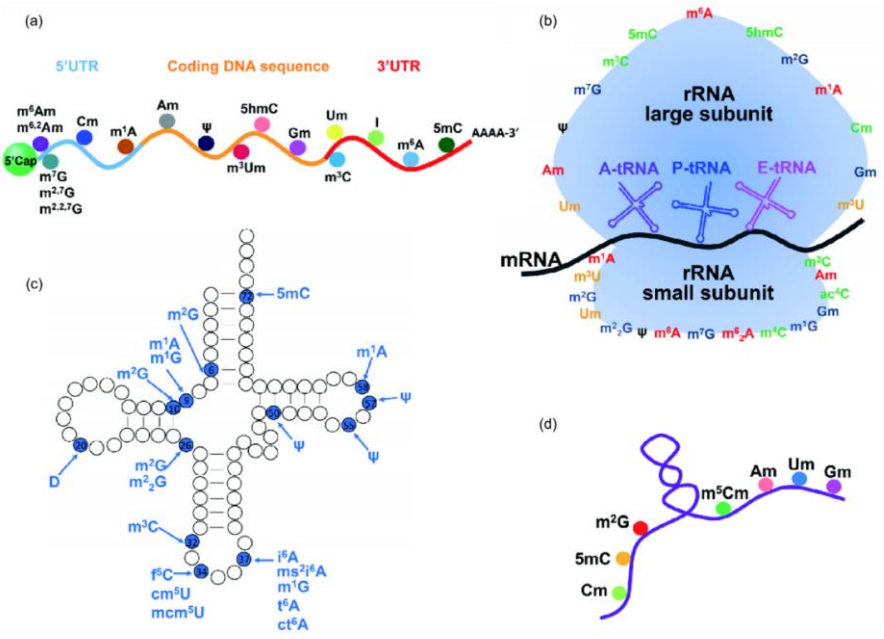


图 1-5 不同类型 RNA 中的化学修饰[4]。

中国知网 https://www.cnki.net

1.3.1 单甲基修饰腺苷

甲基化修饰是 RNA 中最普遍的修饰类型，可发生在不同碱基的不同位置。其中，腺苷的单甲基化修饰不仅可以发生在碱基上，还能发生在核糖上。腺嘌呤碱基 *N*1 位置被甲基化形成 *N*1-甲基腺苷（*N*1-methyladenosine，m^1A），腺嘌呤碱基 *N*6 位置被甲基化形成 N^6-甲基腺苷（N^6-methyladenosine，m^6A）。此外，腺苷核糖的 2'-OH 位置也会发生甲基化修饰形成 2'-*O*-甲基腺苷（2'-*O*-methyladenosine，Am）。这三种单甲基修饰腺苷普遍存在于哺乳动物的 RNA 中，是重要的表观遗传修饰。

1.3.1.1 m^1A

腺嘌呤 *N*1 位置上发生的甲基化（m^1A）是一种重要的腺苷甲基化修饰。1961 年，m^1A 首次在总 RNA 中被发现[77]。后续的研究表明 m^1A 是普遍发生在三个生命系统中的甲基化修饰[78]。

哺乳动物细胞 28S rRNA 中只包含一个 m^1A 修饰位点，位于 A_{1322} 位置，并由甲基转移酶 NML（nucleomethylin）催化形成[79]。tRNA 中含有丰富的 m^1A 修饰[80]。人类细胞 tRNA 中的 m^1A 主要位于保守 TΨC loop 环上的第 58 位，由 tRNA 甲基转移酶（tRNA methyltransferase，TRMT）复合物 TRMT6/61A 催化形成[81, 82]。tRNA 第 58 位的 m^1A 会影响 tRNA 的稳定性[80]。2016 年，Liu 等[83]鉴定了哺乳动物 tRNA 中第一个 m^1A 的去甲基化酶 ALKBH1，表明 tRNA 中的 m^1A 是一种可逆的甲基化修饰。ALKBH1 介导的 tRNA 中 m^1A 的去甲基化会影响翻译起始和翻译延伸，揭示了 tRNA 的可逆甲基化作为转录后基因表达调控的新机制[83]（**图 1-6**）。2018 年，He 等[84]系统地研究了 RNA 去甲基化酶 FTO（fat mass and obesity-associated protein）的广泛底物，发现 tRNA 中的 m^1A 也是 FTO 的底物之一。随后，另一个去甲基化酶 ALKBH3（alkB homologue 3）也被报道能够催化 tRNA 中 m^1A 的去甲基[85]。该研究还表明 ALKBH3 介导的 tRNA 中 m^1A 的去甲基化通过产生 tRNA 衍生的小 RNA（tRNA-derived small RNAs，tDRs）促进癌症的发展[85]。

中国知网 https://www.cnki.net

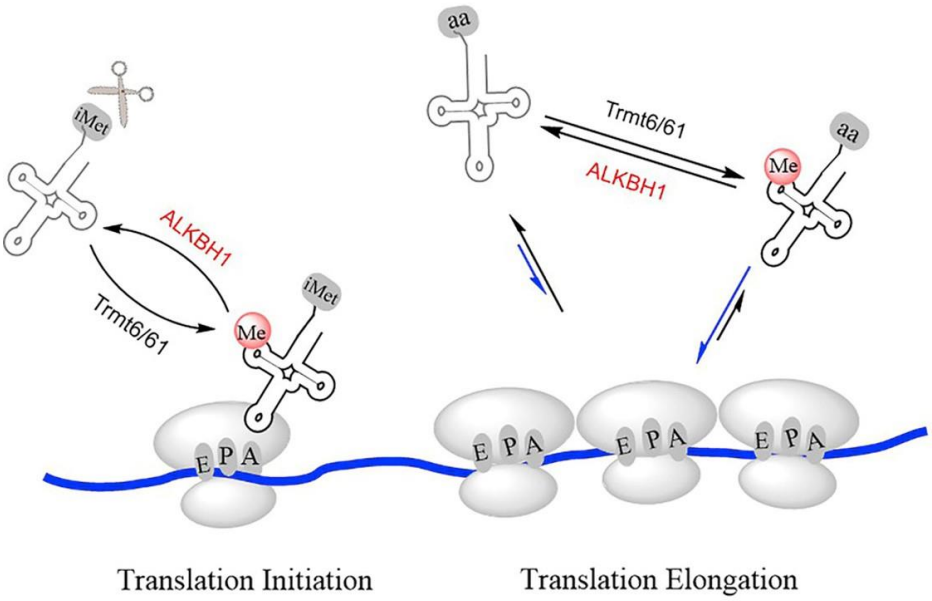


图 1-6 tRNA 中的 m^1A 动态调控翻译[83]。

此外，m^1A 也可发生在 tRNA 的第 14 位，目前只在 $tRNA^{Phe}$ 中被报道，且含量非常低[78]，然而高通量测序并未在此位点检测到 m^1A[86]。类似地，Clark 等[87]还在 $tRNA^{Asp(GUC)}$的第 9 位发现了 m^1A，后续的高通量测序也验证了该位点[86, 87]。除了细胞质 tRNA，线粒体 tRNA 的第 9 位和第 58 位也包含 m^1A 修饰，分别由甲基转移酶 TRMT10C 和 TRMT61B 催化产生[88, 89]。

随着高灵敏分析方法的发展，m^1A 被发现不仅存在于非编码 RNA 中，还存在于 mRNA 中[90]。开发的一系列基于高通量测序的单碱基定位分析方法在真核生物 mRNA 中鉴定了数个 m^1A 位点[86, 91-93]。测序结果表明 m^1A 富集在 5’非翻译区（5’ untranslated regions，5’UTRs），并促进 mRNA 的翻译[86, 91]。Li 等[86]揭示了甲基转移酶复合物 TRMT6/61A 能够甲基化 mRNA 中与 tRNA 中 m^1A 相似基序 GUUCRA（R=A/G）的位点。类似地，高通量测序在线粒体 mRNA（mitochondrial mRNA，mt-mRNA）中鉴定了 10 个转录本中的 m^1A，这些 m^1A 位点主要分布在编码区（coding sequence，CDS）[86]。与细胞质 mRNA 中的 m^1A 不同，mt-mRNA 中的 m^1A 会抑制翻译，潜在的机制仍有待探索[86]。mt-mRNA 中 m^1A 的水平可被甲基转移酶 TRMT61B 调控[86]。此外，Safra 等[93]还在 mt-ND5 mRNA 中确定了一个由 TRMT10C 催化产生的 m^1A 位点。

mRNA 中的 m^1A 是动态的，能动态响应生理条件和外界刺激[90]。进一步的研究证明 mRNA 中的 m^1A 也是可逆的，由去甲基化酶 ALKBH3 介导[91]。在卵巢癌细胞中，ALKBH3 介导的 mRNA 中 m^1A 的去甲基化会增加 *CSF-1* 转录本的稳定性，但是影响含有 m^1A 的 mRNA 稳定性的识别蛋白还未被鉴定[94]。

中国知网 https://www.cnki.net

最近，鉴定了两个潜在的 m^1A 识别蛋白 YTHDF2（YTH domain-containing protein 2）和 YTHDF3（YTH domain-containing protein 3），能促进含有 m^1A 靶 mRNA 的降解[95, 96]（**图 1-7**）。

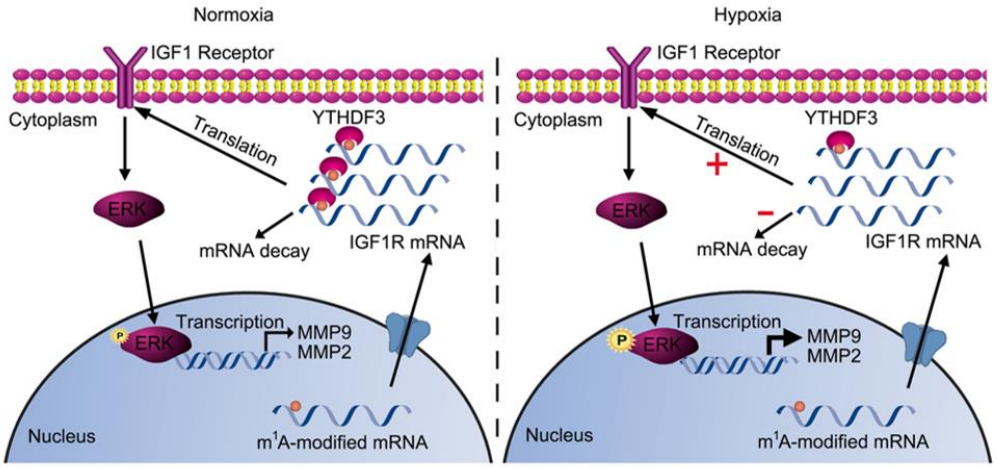


图 1-7 YTHDF3 通过促进携带 m^1A 的 *IGF1R* mRNA 降解来降低 IGF1R 的表达从而抑制滋养层侵袭的工作模型[96]。

1.3.1.2 m^6A

m^6A 发生在各种生物体中，是真核生物 mRNA 中含量最丰富的修饰[78]。1974 年，m^6A 首次在 mRNA 中被发现[97]。随后的研究发现 m^6A 修饰普遍存在于 mRNA、rRNA、miRNA 及其前体中[3, 78]。m^6A 修饰在调节 RNA 加工、剪接、核出口、稳定性和翻译方面起着关键作用，并参与调节多种疾病和癌症的发生和发展[3, 76, 98]（**图 1-8**）。

m^6A 的全转录组图谱揭示了 m^6A 主要存在于 3’未翻译区域（3’ untranslated regions，3’UTRs）和终止密码子区域[99, 100]。甲基转移酶复合物负责 mRNA 中的 m^6A 的形成，该复合物由 METTL3（methyltransferase-like 3）、METTL14（methyltransferase-like 14）、RBM15/15B（RNA-binding motif protein 15/15B）、ZC3H13（zinc fnger CCCH-type containing 13）、VIRMA（vir-like m6A methyltransferase-associated protein）、WTAP（Wilms tumor 1 associated protein）等组成[76]（**图 1-9**）。研究表明 METTL3 亚基具有催化活性[101]，METTL14 亚基可以促进 RNA 的结合增强酶的活性[101]，RBM15/15B 亚基结合富含 U 的区域[102]，ZC3H13 亚基[103]和 WTAP 亚基[104]有助于甲

中国知网 https://www.cnki.net

基转移酶复合物的核定位，VIRMA 亚基对 3'UTRs 区域 m^{6}A 的富集至关重要[105]。METTL3/METTL14 是 mRNA 中 m^{6}A 的主要甲基转移酶，识别催化的序列基序是 RRACH（R=A/G；H=A/C/U）[106]。此外，还鉴定了另一种 m^{6}A 甲基转移酶 METTL16（methyltransferase-like 16），该酶的结合位点与 METTL3/METTL14 甲基转移酶的结合位点没有重叠[107]。METTL16 不仅可以作用于 mRNA 前体的内含子区域，还能识别 U6 snRNA 和其他高度结构化的非编码 RNA[107]。

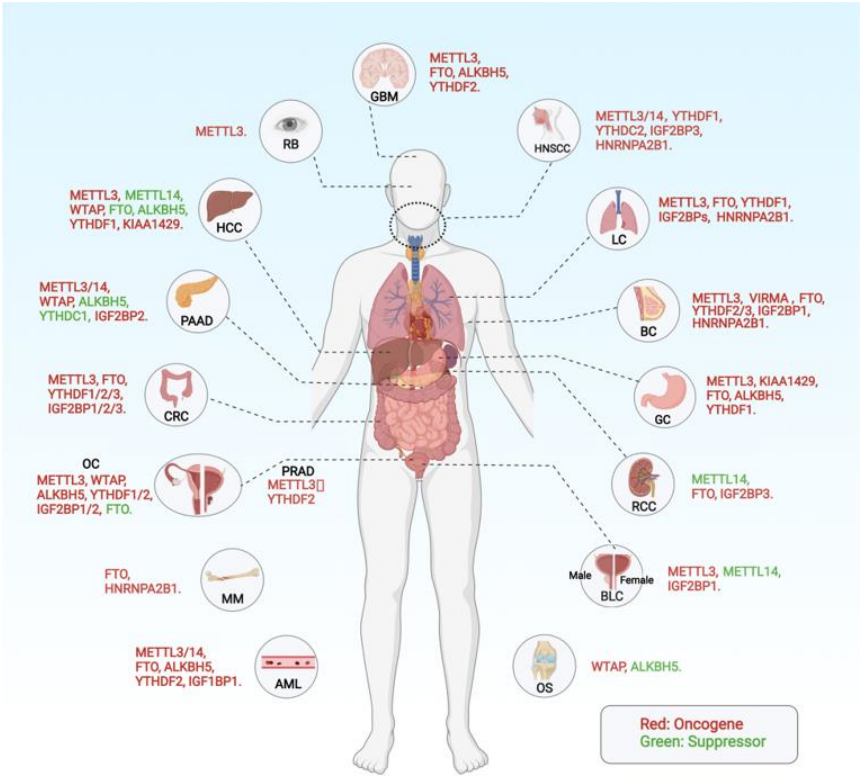


图 1-8 RNA 中的 m^{6}A 参与调节多种疾病和癌症的发生[98]。

mRNA 中的 m^{6}A 是动态的和可逆的，是 RNA 中发现的第一个可逆的表观遗传修饰[108]。m^{6}A 的去甲基化过程由去甲基化酶 FTO 和 ALKBH5（alkB homologue 5）催化完成（**图 1-9**）。FTO 对 m^{6}A 的去甲基化是依赖于其氧化功能，将 m^{6}A 进一步氧化为羟甲基修饰腺苷（*N*^{6}-hydroxymethyladenosine，hm^{6}A）和醛基修饰腺苷（*N*^{6}-formyladenosine，f^{6}A）[108]。FTO 介导的 m^{6}A 去甲基化过程参与癌症的发生和发展，因此 FTO 抑制剂的设计和开发是探索抗癌药物的途径之一[3, 76, 98]。ALKBH5 是另一种 m^{6}A 去甲基化酶，通过去甲基化 m^{6}A 修饰来调节 mRNA 的输出和代谢[109]。

m^{6}A 的结合蛋白是 m^{6}A 发挥生理功能的关键蛋白（**图 1-9**）。含 YTH 结构

中国知网 https://www.cnki.net

域的蛋白质（YTH domain family proteins），包括 YTHDF1、YTHDF2 和 YTHDF3，它们可以调节含有 m^6A 转录本的降解和翻译[110]。YTHDF1 在促进细胞质基质翻译方面起着至关重要的作用，而 YTHDF2 通过介导靶转录本的寿命来调节 mRNA 降解[111, 112]。此外，基因表达、细胞死亡和存活与 YTHDF2 介导的 RNA 过程有关[113, 114]。YTHDF3 与 YTHDF1 和 YTHDF2 合作分别影响 m^6A 修饰 mRNA 的翻译和降解，并反向调节其功能[115]。另一个含有 YTH 结构域的蛋白质 YTHDC1 调节 mRNA 的剪接[116, 117]和核输出[118]，而 YTHDC2 调节靶基因的翻译和丰度[119]。mRNA 的结合蛋白 IGF2BPs（insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins）包括 IGF2BP1、IGF2BP2 和 IGF2BP3，它们主要促进靶标 mRNA 的稳定性和翻译[120]。由 *FMR1* 基因编码的 RNA 结合蛋白 FMRP（fragile X mental retardation protein）可以促进 m^6A 修饰的 mRNA 的稳定性[121]和核输出[122]。EIF3（eukaryotic initiation factor 3）优先与 m^6A 修饰的 mRNA 结合，并参与 mRNA 的翻译过程[123]。另一类 m^6A 结合蛋白 HNRNP（heterogeneous nuclear ribonucleoprotein）家族包含 HNRNPA2B1，HNRNPC 和 HNRNPG[124]。HNRNPA2B1 识别 m^6A 修饰的 miRNA 前体并刺激 miRNA 加工[125]，而 HNRNPC 识别 m^6A 来诱导 mRNA 二级结构中的剪接[126]。PRRC2A（proline rich coiled-coil 2A）是一种新型的 m^6A 识别蛋白，可以与 *Olig2* 编码序列中的共识基序 GGACU 结合以稳定 *Olig2* mRNA[127]。

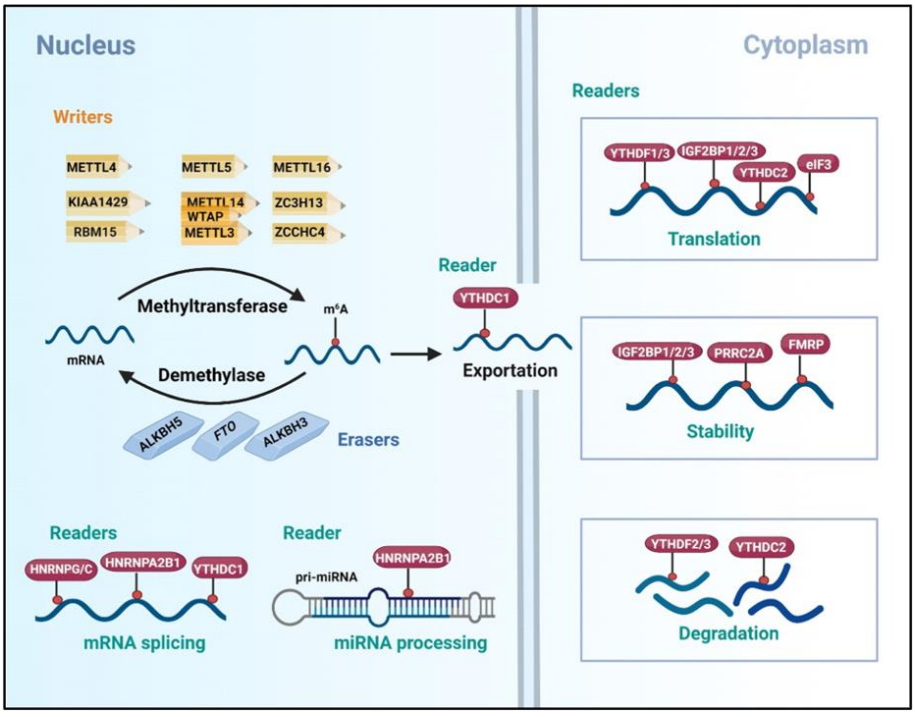


图 1-9 不同类型 RNA 中 m^6A 的调节功能[98]。

中国知网 https://www.cnki.net

随着分析技术的不断革新，如高通量测序、高灵敏质谱和原子分辨率冷冻电镜的出现，我们对 rRNA 上修饰的了解正在迅速增强。除了 mRNA 外，m^6A 还存在于核糖体的保守位点，分别是人类 18S rRNA 上的 m^6A_{1832} 位点和人类 28S rRNA 上的 m^6A_{4220} 位点[128]。最近的研究表明甲基转移酶 METTL5（methyltransferase-like 5）负责 18S rRNA 上 m^6A_{1832} 位点的形成[129]。METTL5 通过与已知的甲基转移酶激活剂 TRMT112（tRNA methyltransferase activator subunit 11-2）形成异源二聚体复合物，以维持细胞中的代谢稳定性[129]。METTL5/TRMT112 的进一步晶体结构解析显示，其与 RNA 的结合模式不同与其他 m^6A 甲基转移酶[129]。类似的一项研究提出甲基转移酶 ZCCHC4（zinc finger CCHC-type containing 4）负责 28S rRNA 中 m^6A_{4220} 位点的甲基化[130, 131]。该研究发现敲除 *ZCCHC4* 会降低 28S rRNA 中的 m^6A_{4220} 修饰，减少全局翻译，并抑制细胞增殖[130]。此外，ZCCHC4 蛋白在肝细胞癌肿瘤中过表达，*ZCCHC4* 敲除显著减小了异种移植小鼠模型中的肿瘤大小[130]。该研究强调了 rRNA 中 m^6A 在翻译和肿瘤生物学中的的重要意义。

tRNA 中也存在 m^6A 修饰，但是对其在 tRNA 中的具体位置和功能还不了解[78]。研究表明 tRNA 中的 m^6A 由去甲基化酶 ALKBH3 介导去甲基化，暗示 tRNA 中的 m^6A 也是一种可逆修饰[132]。目前，还没有发现负责 tRNA 中 m^6A 的甲基转移酶和识别蛋白，这阻碍了研究人员对 tRNA 中 m^6A 的生理功能和调控机制的研究。

1.3.1.3 Am

甲基化修饰除了发生在碱基上以外，还可以发生在核糖上。核糖的 2’OH 位置的甲基化是真核生物中普遍发生的修饰。不同核苷的核糖上均可被甲基化生成相应的 2’-*O*-甲基化修饰核苷（2’-*O*-methylation，Nm），分别为 Am、2’-*O*-甲基鸟苷（2’-*O*-methylguanosine，Gm）、2’-*O*-甲基胞苷（2’-*O*-methylcytidine，Cm）和 2’-*O*-甲基尿苷（2’-*O*-methyluridine，Um）。Nm 广泛存在于各种类型的 RNA 中，包括 rRNA、mRNA、tRNA、snRNA 等[133-137]。

rRNA 是真核细胞中含量最多的一类 RNA，其中 Nm 是 rRNA 中最丰富的修饰，占 rRNA 总修饰的 50%以上[138]。迄今为止，已在 rRNA 中鉴定了 105 个 Nm 位点[138]，这些 2’-*O*-甲基化修饰能稳定 rRNA 的多级结构，有益于核糖体的生物发生[139]。此外，rRNA 中的 2’-*O*-甲基化还与生物体的发育和多种疾病相关[133, 134]。FBL 蛋白（Fibrillarin）是一种分子量为 34 kDa 的 2’-*O*-甲基

中国知网 https://www.cnki.net

转移酶，可催化 rRNA 中 2’-*O*-甲基化的形成[134]。FBL 是一种必需的核仁蛋白，参与了 rRNA 前体的处理[140]。研究发现 β-地中海贫血性状携带者的 FBL 蛋白表达水平升高，同时发现 28S rRNA 中 Nm 的含量发生改变，暗示 FBL 介导的 2’-*O*-甲基化可能参与调节地中海贫血疾病的发生[141]。另一种参与 rRNA 中 2’-*O*-甲基化修饰的酶是 FTSJ2（mitochondrial rRNA methyltransferase 2）[142, 143]。FTSJ2 与细胞的增殖有关，在肺癌细胞中高度表达，已被确定为一种新的肺癌候选基因[134, 144]。最近，Ringeard 等[145]鉴定了一种作用于 HIV 病毒 RNA 的 2’-*O*-甲基转移酶 FTSJ3（FtsJ RNA 2’-*O*-methyltransferase 3），提出 HIV 病毒通过 FTSJ3 介导的 2’-*O*-甲基化逃避先天免疫识别的机制。

tRNA 分子包含了非常丰富的修饰[146]。其中，2’-*O*-甲基化是 tRNA 中最丰富的修饰之一，它们的功能取决于修饰的位置，对 tRNA 的稳定和翻译都有影响[134, 137]。FTSJ1（FtsJ RNA 2’-*O*-methyltransferase 1）是一种人 tRNA 的 2’-*O*-甲基转移酶，靶向反密码子环中的 C_{32} 和 N_{34} 位置[147, 148]。

真核生物中的 mRNA 前体在成熟前需要经过 *N*7-甲基鸟苷（*N*7-methylguanosine，m^7G）加帽修饰，此过程对于 mRNA 的稳定、核出口和帽依赖性蛋白质合成至关重要[149-151]。m^7G 修饰后的 mRNA 帽子初级结构为 m^7G5’ppp5’NN（Cap 0），随后第一个和第二个核苷酸均会进一步发生 2’-*O*-甲基化修饰形成相应的结构 m^7G5’ppp5’NmN（p 表示磷酸基团，Nm 和 N 分别表示 2’-*O*-甲基化核苷酸和核苷酸）（Cap 1）和 m^7G5’ppp5’NmNm（Cap 2）（**图 1-10**）。甲基转移酶 CMTR1（cap methyltransferase 1）催化第一个核苷酸处的 2’-*O*-甲基化[152, 153]，甲基转移酶 CMTR2（cap methyltransferase 2）催化第二个核苷酸处的 2’-*O*-甲基化[154]。一般来说高等真核生物具有“Cap 2”，而低等真核生物具有“Cap 1”[134, 155, 156]。高通量测序结果显示 mRNA 内部也含有 Nm 位点[136, 157, 158]。研究表明 mRNA 内部的 2’-*O*-甲基化修饰由 snoRNA 引导，并且这些 2’-*O*-甲基化修饰可以调节 mRNA 和蛋白质的表达[157, 159]。除此之外，一些 snRNA 的帽子末端的第一个 A 也被报道经过了核糖的甲基化修饰形成 Am[160, 161]。

中国知网 https://www.cnki.net

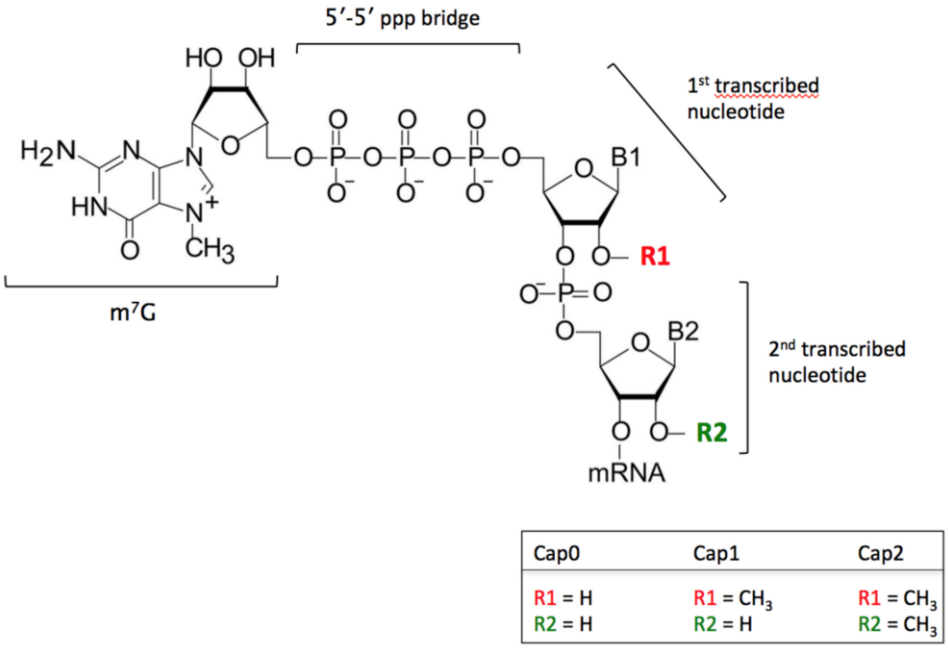


图 1-10 mRNA 的帽子结构[134]。

1.3.2 双甲基修饰腺苷

腺苷上除了发生单一的甲基化修饰外，还能发生双甲基化修饰。双甲基修饰既可发生在碱基的同一个位置，也可同时发生在碱基和核糖 2’OH 位置上。

1.3.2.1 $m^{6,6}A$

腺苷的嘌呤环上除了发生单一的甲基化修饰外，还可以发生双甲基化修饰。N^6,N^6-二甲基腺苷（N^6,N^6-dimethyladenosine，$m^{6,6}A$）是腺嘌呤 *N*6 位置发生的双重甲基化修饰。$m^{6,6}A$ 是小亚基 rRNA 上高度保守的修饰，通常发生在 rRNA 3’末端相邻的两个腺苷上，对核糖体的生物发生和功能有重要影响[162-164]。

$m^{6,6}A$ 位于细菌 16S rRNA 保守发卡环中相邻的 A_{1518} 和 A_{1519}，由双甲基转移酶 ksgA（rRNA small subunit methyltransferase A）催化形成[165, 166]。研究表明 *ksgA* 突变体中的 16S rRNA 无法进行双重甲基化，导致对抗生素产生抗性[165]。非双重甲基化的 16S rRNA 会影响蛋白质的起始合成和延伸，导致 *ksgA* 突变体的生长速率略有下降[165, 167]。此外，ksgA 对于核糖体的生物发生很重要，是 rRNA 前体加工所必需的[168-170]。酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中保守的双甲基修饰发生在 18S rRNA 的 A_{1781} 和 A_{1782}，由双甲基转移酶 Dim1

中国知网 https://www.cnki.net

（putative dimethyladenosine transferase）催化形成[171]。Dim1 介导的双重甲基化修饰也是酵母 18S rRNA 前体加工中必需的，参与核糖体的生物发生[172]。在植物拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中，Dim1 同源蛋白 DIM1A（ribosomal RNA adenine dimethylase family protein）介导的 rRNA 双重甲基化是低温下根生长、表皮图案化和叶绿体发育所必需的[173, 174]。

$m^{6,6}A$ 修饰发生在人类 18S rRNA 中相邻的两个腺苷 A_{1850} 和 A_{1851}[128]。两个相邻的 $m^{6,6}A$ 位于 40S 核糖体小亚基和 60S 大亚基之间的界面，在翻译过程中可接触 tRNA 和 mRNA[175]。这两个 $m^{6,6}A$ 位点在 18S rRNA 中几乎完全甲基化（约 96%）[167, 176]。人类中的 $m^{6,6}A$ 修饰是由 DIMT1（DIM1 rRNA methyltransferase and ribosome maturation factor）蛋白催化产生的[176]。核糖体复合物的结构研究表明，DIMT1 通过与核糖体的小亚基相互作用阻止真核翻译起始因子过早参与翻译[177-179]。与细菌和植物不同，DIMT1 的催化活性不是 18S rRNA 前体加工和核糖体组装所必需的[176]。最近的一项研究表明 DIMT1 的催化活性对于细胞活力和翻译保真度是必不可少的[180]。该研究指出核糖体缺乏 DIMT1 介导的 18S rRNA 中 $m^{6,6}A$ 的一个位点，会容易受到程序性核糖体移码的影响，并损害内部核糖体进入位点依赖性翻译[180] （**图 1-11**）。这一发现强调了 18S rRNA 中腺苷双甲基化修饰的重要功能。后续的研究表明 m^6A 的去甲基化酶 ALKBH5 在体外也能介导 $m^{6,6}A$ 的去甲基化，但是能否去甲基化体内 18S rRNA 上的 $m^{6,6}A$ 尚且未可知[181]。

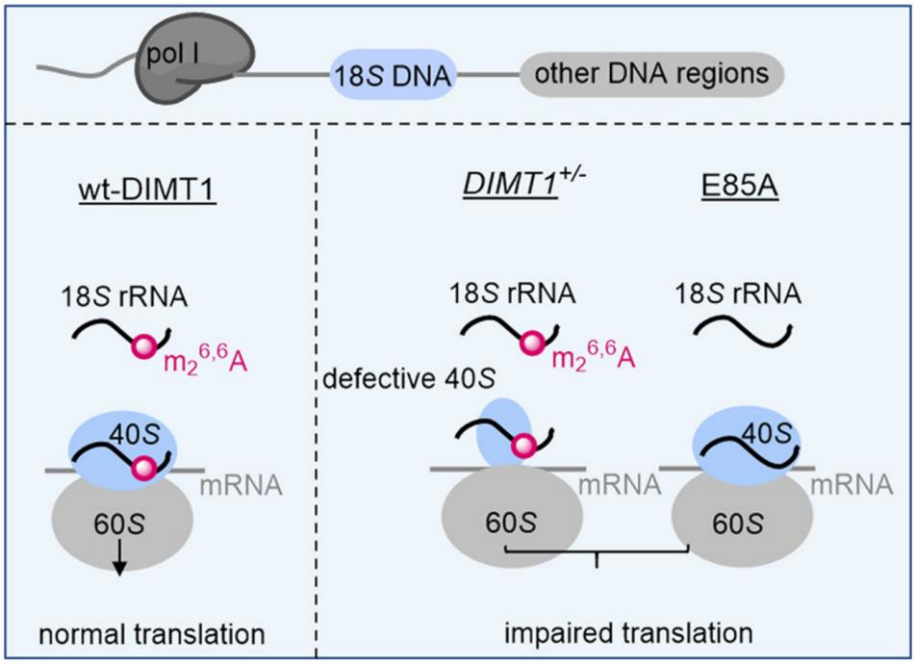


图 1-11 人类 DIMT1 催化作用的示意图[180]。

中国知网 https://www.cnki.net

1.3.2.2 m^6Am

腺苷的碱基和核糖不仅可以单独地发生甲基化修饰，而且可以同时发生甲基化修饰。*N*^{6},2'-*O*-二甲基腺苷（*N*^{6},2'-*O*-dimethyladenosine，m^6Am）是甲基同时发生在腺苷的碱基和核糖 2'OH 位置上的双甲基化修饰。1975 年，m^6Am 首次在动物细胞和病毒的 mRNA 被鉴定[182]。与 m^6A 作为 mRNA 的内部修饰不同，m^6Am 在高等真核生物中作为 mRNA 帽子的末端修饰[183]。mRNA 经 m^7G 加帽后修饰的结构可主要分为三种类型：m^7G5'ppp5'NmN、m^7G5'ppp5'NN 和 m^7G5'ppp5'NmNmN[155, 184-186]。研究表明，当与 m^7G 相邻的第一个核苷酸是 Am 时，它可以进一步被 *N*6 甲基化修饰为 m^6Am，且修饰的概率高达 92%[182]。m^7G5'ppp5'm^6AmpNp 的结构占所有结构的 20%-30%[182]。类似地，与 m^7G 相邻的第二个核苷酸 Am 也可以发生 m^6Am 修饰，但是概率较低[187]。

mRNA 帽子末端的 m^6Am 修饰来自于 Am 的进一步甲基化，1978 年纯化出了一个分子量约为 78 kD 的 m^6Am 甲基转移酶[188]。直到 2019 年，才鉴定了第一个 m^6Am 甲基转移酶：PCIF1（phosphorylated CTD-interacting factor 1）[189]。该酶通过 WW 结构域直接结合 RNA 聚合酶 II 的末端结构域 CTD（phosphorylated carboxyl-terminal domain），也被称为帽特异性腺苷甲基转移酶（cap-specific adenosine methyltransferase，CAPAM）[189-191]。PCIF1 只能催化 mRNA 帽子 5'端的甲基化，不能催化内部 m^6A 的生成[192]。与以甲基转移酶复合物形式工作的 m^6A 合成机制不同，PCIF1 是一种独立的 RNA 甲基转移酶，并依赖 m^7G 帽发挥催化作用[193]。m^6Am 的全转录组分布显示 m^6Am 与 m^6A 的位点没有重叠，暗示 mRNA 上的 m^6Am 发挥着与 m^6A 不同的生理功能[183, 192]。研究表明 PCIF1 介导的 m^6Am 不会改变 mRNA 的稳定性或影响 mRNA 的转录，但会对甲基化 mRNA 的帽依赖性翻译产生负面影响[192]。此外，m^6Am 还可以通过防止 DCP2（decapping mRNA 2）介导的脱帽和 miRNA 介导的 mRNA 降解来稳定 mRNA[81, 194]。

mRNA 上的 m^6Am 也是一种可逆的修饰。研究发现 m^6A 的去甲基化酶 FTO 也能介导 m^6Am 的去甲基化[194, 195]。尽管 mRNA 内部的 m^6A 和 mRNA 帽子端的 m^6Am 都能被 FTO 识别并催化，但是这两个底物的优先级仍然存在争议。Mauer 等[194]发现 FTO 不能有效地去甲基化 mRNA 内部的 m^6A，而是优先去甲基化 m^6Am。此外，他们还进一步指出 ALKBH5 靶向 mRNA 内部的 m^6A，而 FTO 可能靶向 m^6Am。随后，He 等[84]揭示了 FTO 对 m^6A 和 m^6Am 的亲和力根据细胞类型的差异表现出不同的亲和力，同时还提出了 FTO 的其他 RNA 底物，包括 U6 snRNA 内部的 m^6A、snRNA 内部和帽子端的 m^6Am 以及 tRNA

中国知网 https://www.cnki.net

中的 m^1A。最近，Zhang 等[195]通过 FTO 结合底物的晶体学结构破译了 FTO 对多种 RNA 底物的去甲基化机制，提出 FTO 在体内和体外对 mRNA 内部的 m^6A 和帽子端的 m^6Am 显示出广泛的去甲基活性。

snRNA 是剪接体的核心成分并介导 mRNA 前体的剪接。snRNA 在成熟前也会发生加帽修饰 m^7G[196]，m^7G 还会进一步甲基化形成 $N^2,N^2,N7$-三甲基鸟苷（$N^2,N^2,N7$-trimethylguanosine，$m^{2,2,7}G$）[197-199]。与 mRNA 类似，snRNA 帽子末端的第一个核苷酸 Am 能被进一步甲基化生成 m^6Am。随后的研究表明 snRNA 帽子中的 m^6Am 是由去甲基化酶 FTO 调控的可逆修饰[200]。FTO 介导的 m^6Am 的可逆甲基化参与调控 snRNA 的生物合成，暗示 snRNA 中的表观转录修饰可能影响 mRNA 的剪接[200]（**图 1-12**）。最近，Goh 等[201] 报道了催化 U2 snRNA 中 m^6Am 形成的甲基转移酶 METTL4。

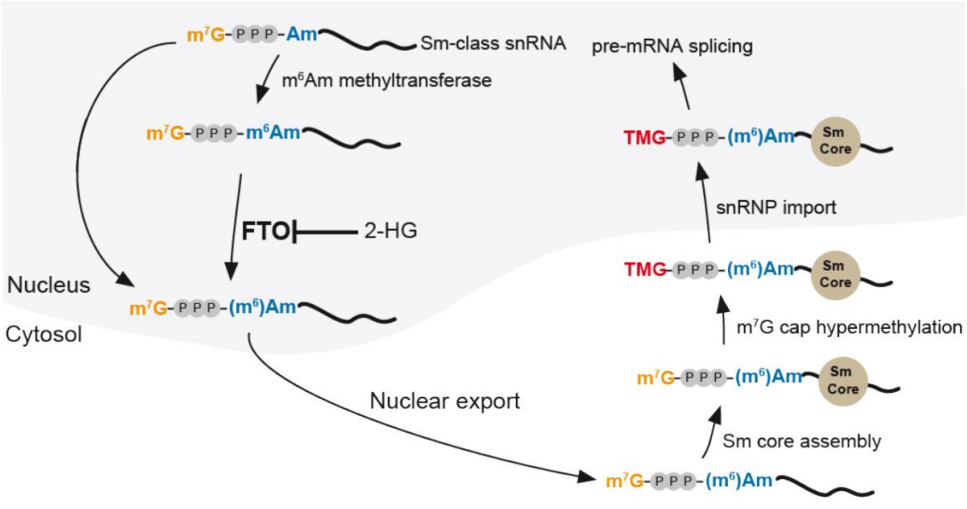


图 1-12 FTO 介导的 m^6Am 的可逆甲基化参与调控 snRNA 的生物合成[200]。

1.3.3 A-to-I 编辑

除了甲基化修饰外，肌苷（inosine，I）也是生物体内普遍存在的修饰[202]。RNA 中的 I 发生在双链区域，是通过作用于 RNA 的腺苷脱氨酶（adenosine deaminases acting on RNA，ADARs）水解脱氨双链 RNA（double-stranded RNA，dsRNA）中的腺苷而形成的，这一过程称为腺苷到肌苷（A-to-I）的编辑[202]。ADARs 家族包含 ADAR1、ADAR2 和 ADAR3，其中 ADAR3 缺乏编辑活性[202, 203]。由于 I 优先与 C 配对而不是 U 配对，因此 I 在核糖体翻译中常被读作 G。A-to-I 的编辑具有广泛的功能，包括改变密码子[204-206]、调节剪接

中国知网 https://www.cnki.net

[207]、修饰 RNA 的二级结构[208]、调节 RNA 结合蛋白识别[209]、以及调节 miRNA 介导的基因沉默[210-212]（**图 1-13**）。A-to-I 的编辑主要存在于 mRNA、tRNA 和 miRNA 中。

A-to-I 编辑是 mRNA 中常见的修饰之一[202]。全转录组测序鉴定了不同生物中的大量 A-to-I 编辑位点，包括人类[213-217]、小鼠[218, 219]、真菌[220, 221]和细菌[222, 223]。研究表明人类 A-to-I 编辑位点比其他动物更丰富[219, 224]，这些位点主要富集在 mRNA 的内含子和 3'UTRs 区域[215, 225]。其中，人类 90%的 A-to-I 编辑位点存在于 Alu 元件中，由 ADAR1 优先识别和编辑[216, 226]。尽管 ADAR1 介导的 A-to-I 编辑在 Alu 元件中的功能仍然难以捉摸，但最近的研究表明，它可以通过阻止 Alu 衍生的 dsRNA 被传感器 MDA5 识别来拮抗先天免疫反应[227-229]，从而影响自身炎症性疾病的发生[230]。此外，某些 miRNA 的前体也经过 A-to-I 编辑，导致成熟 miRNA 的表达减少和功能改变[212]。ADAR1 或者 ADAR2 介导的 mRNA 和 miRNA 中 A-to-I 编辑与多种疾病和癌症的发生密切相关，已被广泛研究[231-233]。

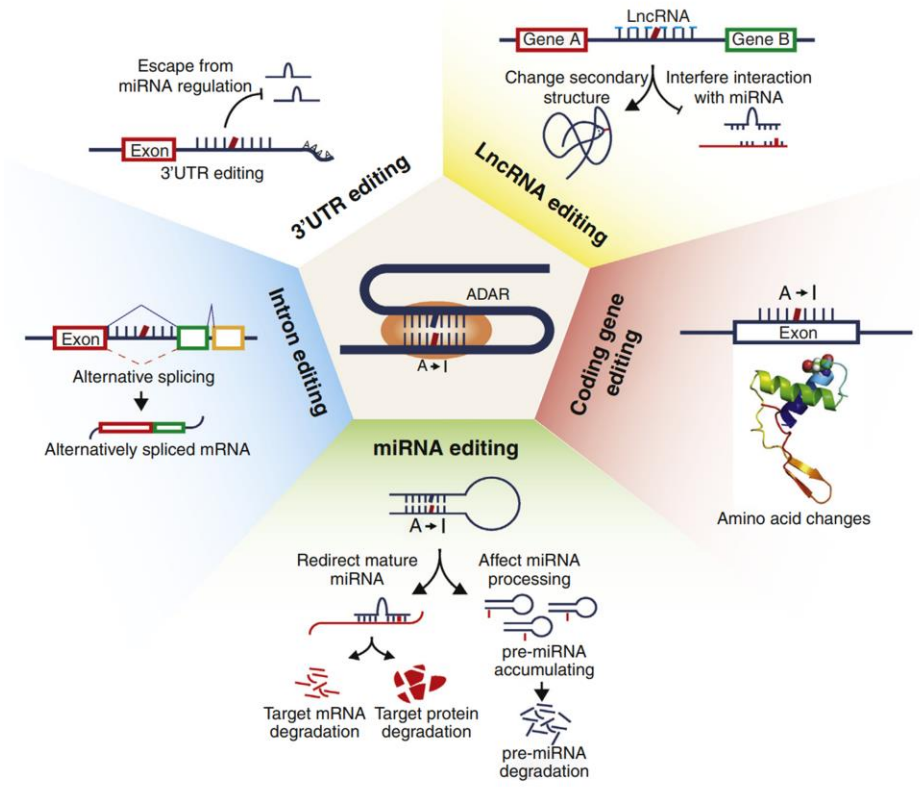


图 1-13 不同类型 RNA 中 A-to-I 编辑的功能[232]。

A-to-I 编辑不仅发生在 mRNA 中，还发生在真核生物和原核生物的 tRNA 中[234, 235]。摆动反密码子环第 34 位是保守的 A-to-I 编辑，存在于高等真核生

中国知网 https://www.cnki.net

物的八个细胞质 tRNA 中，以及细菌和植物叶绿体的单个 tRNA（$tRNA^{Arg}$）中[221]。此外，真核生物 $tRNA^{Ala}$ 的反密码子环中的第 37 位也经历 A-to-I 编辑[221]。催化 tRNA 中腺苷脱氨的酶被命名为 ADATs（adenosine deaminases acting on tRNAs）。其中，真核生物 tRNA 的 I_{34} 由 ADAT2 和 ADAT3 亚基组成的异源二聚体复合物催化形成，ADAT2 是催化亚基，而 ADAT3 可能仅在 tRNA 底物识别中起结构作用[235, 236]。此外，细菌和植物叶绿体中 $tRNA^{Arg}$ 的 A_{34} 通过 TadA（ADATa）同源二聚体催化脱氨形成 I_{34}[235, 236]。真核生物 $tRNA^{Ala}$ 反密码子环中的 I_{37} 由 ADAT1 催化形成[235]。

1.4 RNA 中腺苷修饰分析方法

为了破译 RNA 中腺苷修饰的生物学功能，需要对 RNA 中的腺苷修饰进行系统地分析。不仅需要鉴定腺苷修饰的类型，还需要分析特定腺苷修饰在 RNA 中的含量，最重要的是还要了解该修饰在 RNA 中的具体位置。随着质谱技术的不断发展，其高选择性、高灵敏度的优点促使基于质谱的方法成为研究 RNA 中腺苷修饰的主流方法。通过质谱分析，我们不仅能够准确定量已知的腺苷修饰，还能够发现一些新的腺苷修饰。高通量测序技术的出现极大地推动了腺苷修饰的定位分析，实现了单碱基分辨率鉴定腺苷修饰。了解腺苷修饰的具体位置，有利于深入研究其在各种生理过程以及疾病发生发展过程中的作用。

1.4.1 RNA 中腺苷修饰的定性及定量分析

腺苷修饰的定性和定量分析是研究的基础。目前已经开发了多种分析方法用于腺苷修饰的定性和定量分析，包括薄层色谱分析法、免疫检测法、液相色谱分析法、液相色谱-串联质谱分析法等。

薄层色谱分析法 薄层色谱（thin-layer chromatography，TLC）最早被用于核酸修饰的定性和定量分析[237]。基于 TLC 分析核酸修饰的方法灵敏度较低，通常需要引入放射性同位素（如 ^{32}P）标记以提高方法的检测灵敏度[238]。TLC 方法只适用于核酸修饰的初步检测，结合质谱的鉴定会更加准确。TLC 的分离不仅可以在一维中完成，而且能在二维（two-dimensional thin layer chromatography，2D-TLC）中实现[239]。相比于普通的 TLC，2D-TLC 提高了检测的分辨率，更加适用于 RNA 中腺苷修饰的分析[240]。Zhong 等[241]通过 2D-TLC 在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）mRNA 中鉴定并定量了 m^6A 修饰。总

中国知网 https://www.cnki.net

的来说，基于 TLC 的方法灵敏度和准确度都相对较低，无法被广泛用于 RNA 中腺苷修饰的研究。

免疫检测法 以抗原-抗体特异性结合为基础的免疫方法也能用于 RNA 中腺苷修饰的分析[242, 243]。基于抗体的免疫方法，能直接鉴定腺苷修饰的类型，也能初步定量腺苷修饰的含量。此外，抗体还能富集含有腺苷修饰的 RNA，结合 RNA 测序或者质谱检测能实现对低丰度腺苷修饰的有效分析。其中，斑点杂交（dot blot）是一种依赖特异性抗体的有效检测腺苷修饰的分析方法[244]。该方法操作简单，且成本低，不仅能分析不同种类 RNA 中腺苷修饰的水平，还能分析腺苷修饰的变化。但是，当含有腺苷修饰的 RNA 丰度较低时，方法的灵敏度会降低。为此，Nagarajan 等[244]建立了一种改进的 dot blot 分析 RNA 中 m^6A 的方法（**图 1-14**）。在该方法中，添加了免疫沉淀步骤来富集 m^6A 修饰的 RNA，结合 dot blot 可实现特定 RNA 中 m^6A 的灵敏定量检测。基于免疫的分析方法同样存在灵敏度较低的问题，且方法高度依赖分析物的特异性抗体。目前，能用于腺苷修饰的商品化抗体比较有限，阻碍了该方法的应用。

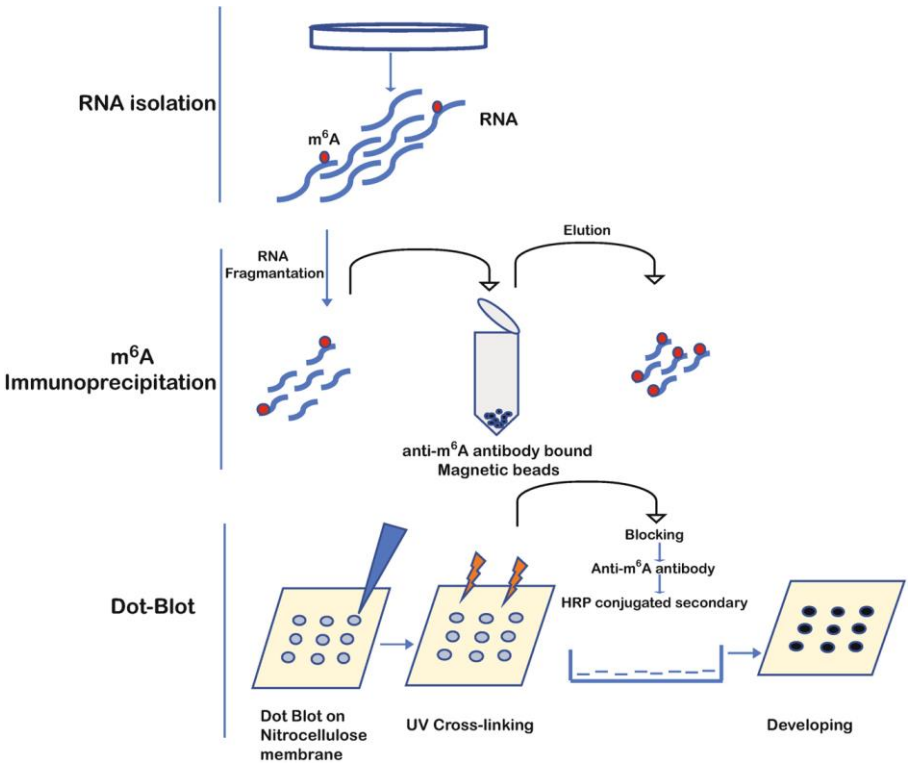


图 1-14 基于 dot blot 分析 RNA 中 m^6A 的流程图[244]。

液相色谱分析法 高效液相色谱（high-performance liquid chromatography，HPLC）是 1970 年代早期开发的一种相对成熟的分离技术，已被广泛用来分析腺苷修饰。液相色谱的分离对象可以是寡核苷酸片段，也可以是单个核苷酸或

中国知网 https://www.cnki.net

者核苷或者碱基。超高效液相色谱（ultra-performance liquid chromatography，UPLC）的出现增加了分析的通量和灵敏度，同时也提高了分离的分辨率。液相色谱结合不同检测器能实现 RNA 中腺苷修饰的准确定量分析。mRNA 中重要的修饰 m^6A 首次被发现和鉴定是通过液相色谱方法实现的[97]。液相色谱除了采用早期的紫外检测器和荧光检测器之外，更多的是采用质谱作为检测器。质谱是一种以离子质荷比作为分析对象的检测器，不仅定性能力强、灵敏度高，而且分析速度快，是鉴定化合物（相对分子量测定、化学式的确定、结构鉴定）的最有力工具之一。

液相色谱-串联质谱分析法 液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry， LC-MS/MS）凭借其优秀的选择性和灵敏度，已被广泛用于 RNA 腺苷修饰研究领域[245-258]。利用 LC-MS/MS，研究人员不仅确定了已有修饰在新的 RNA 类型中的存在，还发现和鉴定了一些新的修饰类型。最近，我们课题组通过 LC-MS/MS 在哺乳动物细胞和组织中发现并鉴定了两种新型的羟甲基修饰核苷，分别是 N^2-羟甲基鸟苷（N^2-hydroxymethylguanosine，hm^2G）[254]和 N^6-羟甲基-2’脱氧腺苷（N^6-hydroxymethyl-2’-deoxyadenosine，hm^6dA）[252]。此外，我们课题组利用 UPLC 的高灵敏度和高分辨率，结合质谱分析发现和鉴定了哺乳动物 18S rRNA 中的新型双甲基修饰胞苷 N^4,2’-*O*-二甲基胞苷（N^4,2’-*O*-dimethylcytidine，m^4Cm）以及小 RNA（< 200 nt）中的新型双甲基修饰胞苷 3,2’-*O*-二甲基胞苷（3,2’-*O*-dimethylcytidine，m^3Cm）[258]。高分辨质谱（high-resolution mass spectrometry，HRMS）较普通的质谱能提供更加精确的分子量，成为新修饰的鉴定中更权威的分析手段。Helm 等[259]采用同位素代谢标记结合 LC-MS/MS 方法全分析了大肠杆菌（*Escherichia coli*）中的 RNA 修饰，发现了 37 种潜在的新修饰化合物，通过 HRMS 鉴定了一种新型的腺苷修饰。

由于胞苷和尿苷的质谱响应比腺苷和鸟苷低，为了实现低丰度胞苷修饰和尿苷修饰的检测，化学衍生结合 LC-MS/MS 的方法已被开发用于多种胞苷修饰和尿苷修饰的同时定量分析[256, 257, 260]。衍生化试剂的使用可以改善修饰核苷的色谱分离，还能大大地提高它们的质谱检测灵敏度。通过建立的方法，我们不仅准确定量了多种已知的修饰核苷，还发现了新的修饰核苷。目前建立的化学衍生-LC-MS/MS 方法大多针对胞苷修饰和尿苷修饰，用于腺苷修饰的衍生化试剂尚未开发，一定程度上阻碍了腺苷新修饰的发现。

中国知网 https://www.cnki.net

1.4.2 RNA 中腺苷修饰的定位分析

过去十几年，表观转录组学的兴起刺激了方法的革新。对腺苷修饰的研究已经不限于简单的定性和定量分析，研究人员更多地关注腺苷修饰在转录组中的具体位置。高通量测序技术的发展，极大地推动了腺苷修饰的全转录组分布研究。目前已建立了多种用于 RNA 中腺苷修饰定位分析的方法，包括核酸酶消化分析法、质谱分析法、高通量测序分析法、单分子测序分析法、冷冻电镜分析法等（**图 1-15**）。

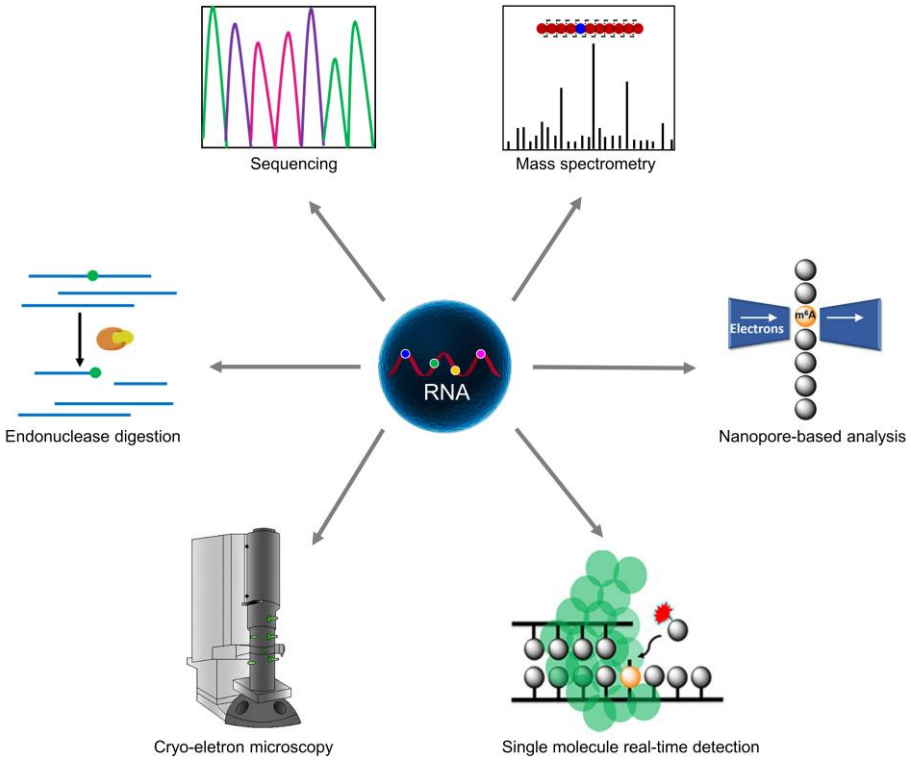


图 1-15 腺苷修饰的定位分析方法[251]。

核酸酶消化分析法 基于核酸内切酶的方法最早是用于 DNA 中甲基化修饰的研究[261]。随着腺苷修饰的出现，也开发了核酸内切酶的方法用于腺苷修饰的定位分析。Morse 等[262]利用核酸酶 RNase T1 的特异性切割，结合化学试剂乙二醛处理，在小鼠大脑 mRNA 中鉴定了两个 A-to-I 的编辑位点，为 RNA 中 I 的定位分析提供了一种有效的方法。此外，RNA 中 2'-*O*-甲基化的定位分析也可采用核酸内切酶的方法。不同的是，研究 RNA 中 2'-*O*-甲基化的位点是通过另一种核酸酶 RNase H 实现的[263, 264]。基于核酸内切酶的方法需要的样本量较多，不太适用于低丰度 RNA 中腺苷修饰的分析。为此，Pan 等[265]建立了一

中国知网 https://www.cnki.net

种新的方法 SCARLET（site-specific cleavageandradioactive - labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography），能在单碱基分辨率下分析 mRNA 中 m^6A 的修饰状态（**图 1-16**）。该方法利用多种核酸酶消化，结合连接酶连接，提供了一种简单快速分析 m^6A 的方法[265]。由于核酸内切酶的序列特异性和修饰特异性，限制了其在腺苷修饰定位分析中的应用。

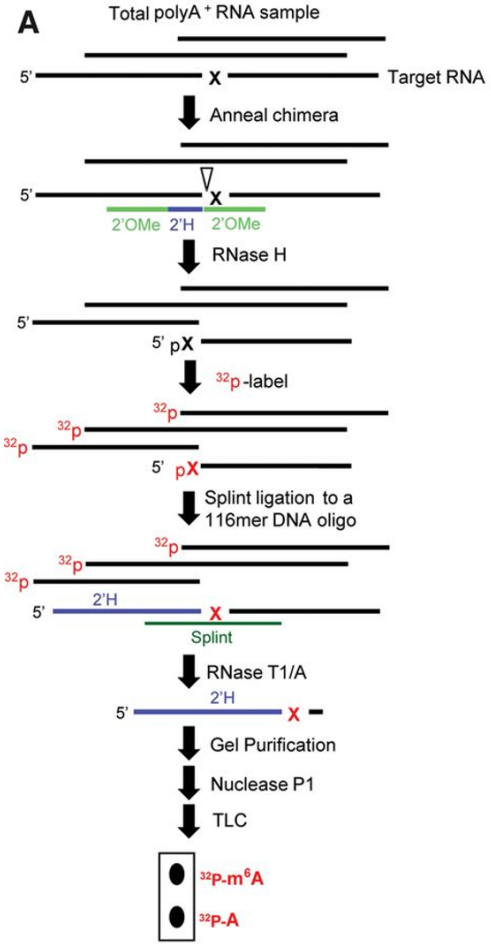


图 1-16 SCARLET 方法定位分析 mRNA 中 m^6A 的流程图[265]。

质谱分析法 基于质谱的分析方法不仅能提供修饰的结构和含量信息，还能提供修饰的位置信息。利用质谱定位分析腺苷修饰，通常需要将 RNA 特异性酶切成相应的寡核苷酸片段后再进行质谱分析[266]。通过质谱分析能够知道寡核苷酸片段的具体碱基组成，再通过数据库中 RNA 序列的比对即可确定片段上修饰的类型和位置。然而，这种方法只适合小 RNA 上修饰的分析，例如 tRNA、5S rRNA 等[267-269]。这是由于大 RNA 产生的酶切片段较为繁多，质谱数据会变得复杂，不利于解谱和序列比对。为了实现对 RNA 的直接分析，研究人员开发了 Top-down 质谱分析法。该方法无需核酸酶消化 RNA，结合不同的质谱碎裂方式即可直接分析完整的 RNA 分子。通过 Top-down 质谱分析，我们不仅能够获得具体的 RNA 序列信息，而且能够了解 RNA 中修饰的类型、修饰的含量

中国知网 https://www.cnki.net

和修饰的位置信息。Glasner 等[270]使用 Top-down 质谱法定量、定位分析了 RNA 中的腺苷修饰 m^6A。基于质谱的定位分析方法对样品和仪器的要求较高，限制了其在腺苷修饰定位分析中的应用。随着质谱技术的不断改进，相信未来我们可以仅通过质谱即可实现 RNA 腺苷修饰的同时定性、定量和定位分析。

高通量测序分析法 高通量测序技术的出现取代了传统的定位分析方法，已成为定位分析腺苷修饰的主流方法[271]。RNA 的测序分析通常需要经历 RNA 逆转录（reverse transcription，RT）、PCR、文库构建、数据分析等过程。利用某些腺苷修饰的逆转录特性，结合高通量测序即可实现修饰的直接定位分析。例如，RNA 上的 I 修饰在 RT 过程中会与 C 错配，在后续的 PCR 过程中会被读做 G，由此产生 A 到 G 的突变，通过高通量测序即可实现 I 的全转录组分析[215]。进一步的研究发现测序误差和遗传异质性可能会影响 I 的测序结果。为了明确鉴定 I 的位点，开发了一种化学处理结合 RNA 测序的方法 ICE-Seq（inosine chemical erasing sequencing）[214, 272, 273]（**图 1-17**）。该方法采用丙烯腈处理 RNA，氰乙基化的 I 会导致 RT 提前终止，通过高通量测序可确定 I 的位点。此外，还有一些修饰可以通过影响碱基互补配对来影响 cDNA 的合成，造成 RT 终止或碱基的错配。m^1A 是 mRNA 中的一种重要修饰，在 RT 过程中会随着逆转录酶的不同和缓冲液环境的改变而产生不同的 RT 特征（错配或终止）[86, 274]。基于 m^1A 的 RT 特征，已开发了多种单碱基分辨率分析不同种类 RNA 中 m^1A 的测序方法[86, 91, 274]。此外，m^1A 在碱性条件下可发生 Dimroth 重排形成 m^6A，Dominissini 等[90]利用此性质建立了另一种全转录组分析 m^1A 的测序方法（**图 1-17**）。

一些腺苷修饰是 RT 沉默的，即修饰在正常条件下不会影响 RT 的延伸。为此，可以通过化学处理改变腺苷修饰的 RT 特征从而产生易于检测的信号。Am 是 RT 沉默的修饰之一。为了实现 Am 在全转录组范围内的位点鉴定，开发了名为 RiboMeth-seq（Ribose methylation sequencing）的测序方法[135, 275, 276]（**图 1-17**）。RiboMeth-seq 方法依赖 2'-*O*-甲基化修饰保护 3'相邻磷酸二酯键免受碱性水解，导致 2'-*O*-甲基化修饰位点不能被酶切。因此，在测序数据中 2'-*O*-甲基化修饰的标志是缺乏测序读数的位点。该方法已成功应用于单碱基分辨率检测 rRNA 和 tRNA 中的 Am 修饰位点[135, 137]。为了实现低丰度 RNA 中 Am 的分析，研究人员建立了新的 2'-*O*-甲基化修饰测序方法（2'-*O*-methylation sequencing，Nm-seq）[136]。Nm-seq 方法利用氧化裂解结合高通量测序，可用于 mRNA 中 Am 的定位分析[136, 158]。

中国知网 https://www.cnki.net

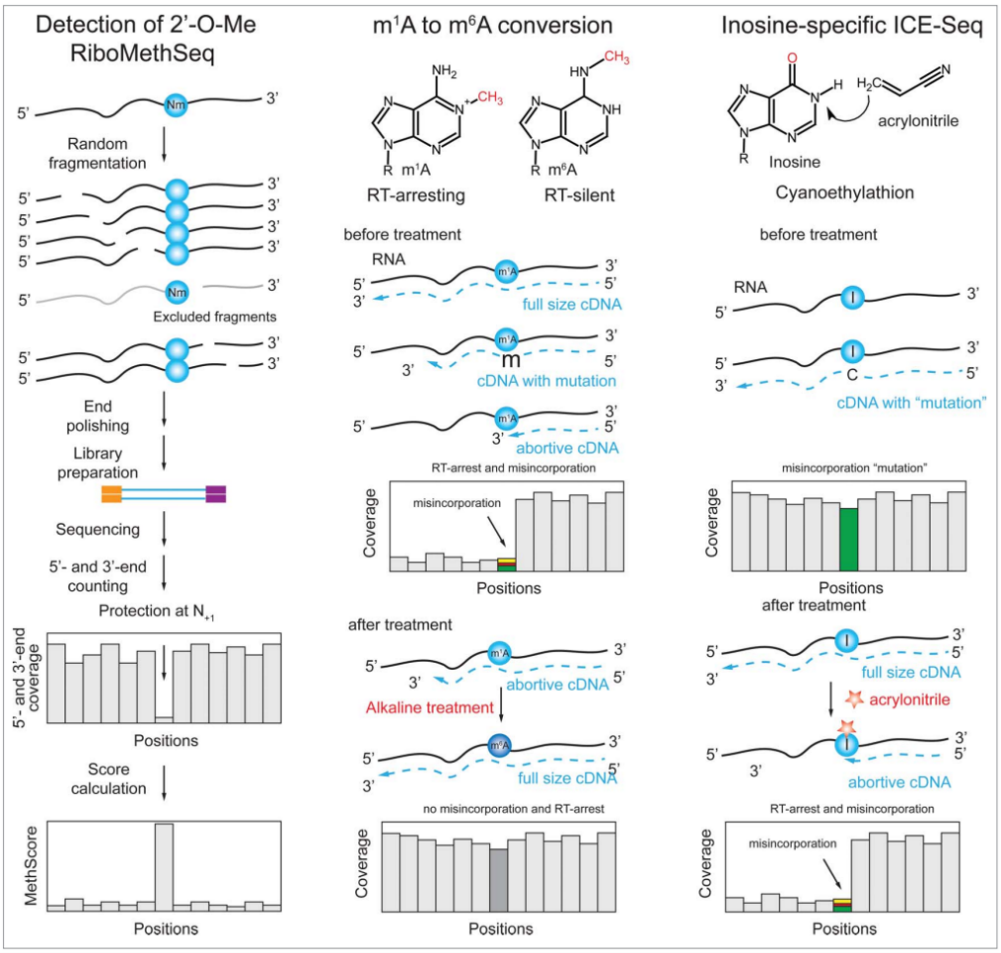


图 1-17 基于高通量测序单碱基定位分析 RNA 中 Am、m^1A 和 I 的流程图[271]。

除了通过化学处理改变腺苷修饰的 RT 特征外，还能采用酶促反应改变腺苷修饰的 RT 特征。m^6A 也是一种 RT 沉默修饰，在 RT 过程中与 T 正常配对，以致于无法区别 m^6A 和 A。基于此，Wang 等[277]开发了一种名为 m^6A-SEAL（FTO-assisted chemical labeling）的测序方法。在该方法中，首先利用 m^6A 的去甲基化酶 FTO 的氧化作用将 m^6A 氧化为 hm^6A，生成的 hm^6A 可被二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）特异性标记，最后利用生物素化的试剂与 DTT 标记产物反应后用于富集测序[277]。该方法特异性强、灵敏度高，但是无法实现单碱基定位分析。随后，Shu 等[278]通过代谢标记建立了 m^6A-label-seq（m^6A metabolic labeling）方法。在体内甲基转移酶的作用下，将非天然的 *S*-腺苷甲硫氨酸（*S*-adenosyl-L-methionine，SAM）引入 m^6A 的生物合成中，在 m^6A 的特定位点会形成 m^6A 的类修饰 N^6-烯丙基腺苷（N^6-allyladenosine，a^6A）[278]。再通过体外化学处理诱导 a^6A 成环，环化后的 a^6A 在 RT 过程中会导致碱基错配，结合高通量测序即可单碱基定位分析 m^6A[278]（**图 1-18**）。除了利用体内的酶促反应外，还可以在体外利用酶促反应修饰 m^6A。最近，Hu 等[279]利用 $m^{6,6}A$ 的特异性甲基转移酶和非天然 SAM 在体外将 m^6A 转化为 $m^{6,6}A$ 的类修饰

中国知网 https://www.cnki.net

a^6m^6A（N^6-allyl,N^6-methyladenosine），形成的 a^6m^6A 经诱导环化后会造成 RT 碱基配对，由此在高通量测序中精确识别 m^6A 的位置。该方法不仅能单碱基定位分析 RNA 中的 m^6A，还能定量分析特定 m^6A 位点的甲基化水平和变化，为了解 m^6A 在多种生物过程的功能提供了一个有效的平台。

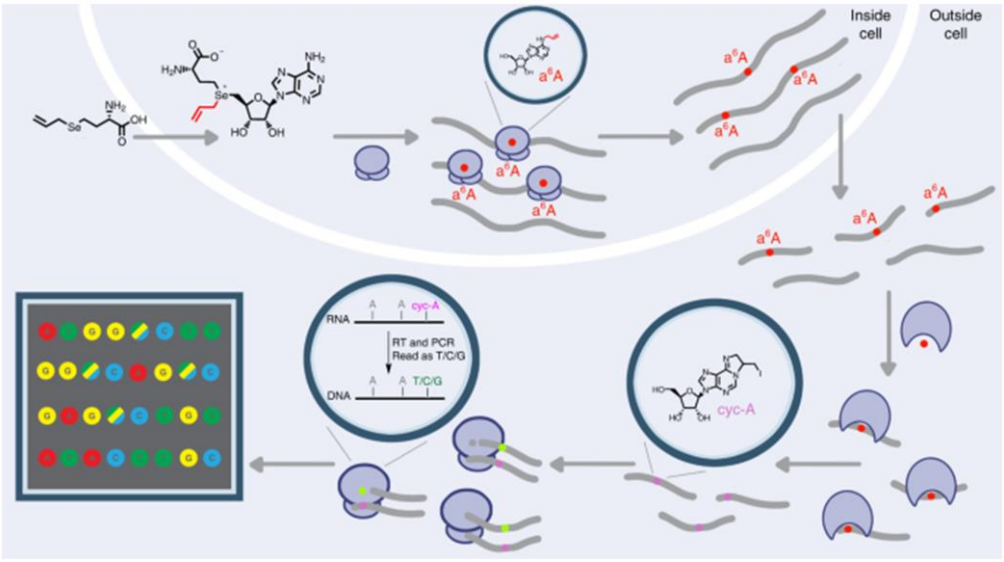


图 1-18 m^6A-label-seq 方法定位分析 RNA 中 m^6A 的原理图[278]。

大多数腺苷修饰在生物体内的丰度较低，直接测序分析会比较困难，为此需要使用与修饰特异性结合的试剂富集含有修饰的 RNA。迄今为止，在大多数情况下该试剂以抗体的形式存在。基于抗体富集的高通量测序方法已被广泛用于全转录组中 m^1A、m^6A 和 m^6Am 的定位分析[86, 90, 91, 99, 100, 183, 280, 281]。在所得到的测序数据中，甲基化修饰位点的标志是使用抗体富集后在 RNA 的特定区域产生读数的积累。与以单碱基分辨率精确定位修饰位点的测序方法相比，基于抗体的测序方法只能提供修饰可能存在的区域，无法达到单碱基分辨率。为此，可以将不同类别的方法结合起来，以提高检测的特异性和敏感性。特别是，将修饰片段的预富集与 RT 突变分析相结合已被证明是更有效的定位分析方法。为此，研究人员开发了基于抗体的 m^6A 单碱基分辨定位方法（m^6A individual-nucleotide-resolution cross-linking and immunoprecipitation，miCLIP）[183, 282, 283]。在该方法中，抗 m^6A 的抗体通过紫外线与 RNA 交联，所产生的共价加合物会导致 m^6A 修饰位点在 RT 过程中发生突变[183, 282, 283]。使用这种组合方法既可以预先富集甲基化修饰片段，降低测序覆盖率要求，还能提供单碱基分辨率的 RT 特征，结合高通量测序可实现 m^6A 的单碱基分析。

最近，还开发了基于核酸内切酶的测序方法。内切酶 MazF 是一种 m^6A 敏

中国知网 https://www.cnki.net

感的核糖核酸内切酶，能特异性识别并切割 ACA 基序，而不能切割修饰的 m^6ACA 基序。基于此，Zhang 等[284]和 Miguel Angel 等[285]建立了一种不依赖抗体的 m^6A 单碱基定位分析方法。该方法不仅能单碱基分辨率识别 m^6A 位点，还能量化特定位点的甲基化水平。由于内切酶的序列特异性，该方法只适用于 ACA 基序中 m^6A 的分析。

单分子测序分析法 尽管高通量测序会由于各种问题导致测序结果的偏倚，但仍不能否认其在腺苷修饰研究中的重要地位。第三代测序技术的出现不仅扩充了测序方法，也为研究人员提供了另一种定位分析核酸修饰的方法。第三代测序又名单分子测序，能够对 RNA 分子进行直接测序，成为腺苷修饰的定位分析中有潜力的方法[286]。第三代测序技术主要包含 SMRT 测序、单分子纳米孔测序[271]（**图 1-19**）。SMRT 测序是监测 DNA 聚合酶对目标链上不同碱基产生的不同的动力学信号，单分子纳米孔测序则是监测不同核苷通过纳米孔时形成的不同离子电流。目前，已建立了 SMRT 测序和单分子纳米孔测序检测 RNA 中 m^6A 和 I 修饰的方法[287-289]。作为一种新的测序工具，单分子测序仍需长时间的改进和优化以实现核酸修饰的广泛研究。

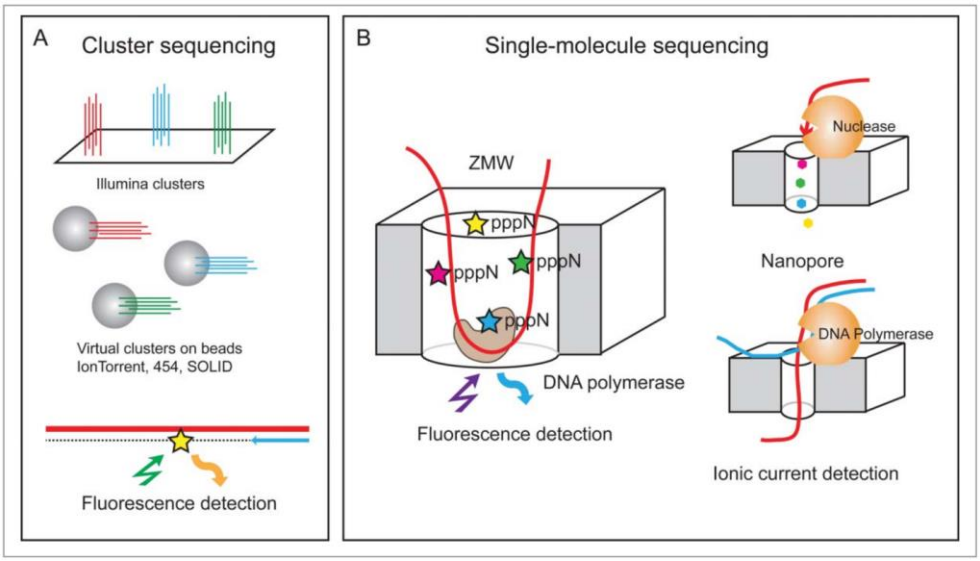


图 1-19 第二代测序技术和第三代测序技术的原理图[271]。

冷冻电镜分析法 除了基于测序的方法外，冷冻电镜技术也被用于腺苷修饰的分析中。相比于其他定位分析方法，冷冻电镜分析是一种更加直观的检测方法。通过冷冻电镜分析，研究人员已经获取了人类和大肠杆菌（*Escherichia coli*）的完整核糖体结构图，以及 rRNA 上修饰的位置信息[128, 290, 291]（**图 1-20**）。

中国知网 https://www.cnki.net

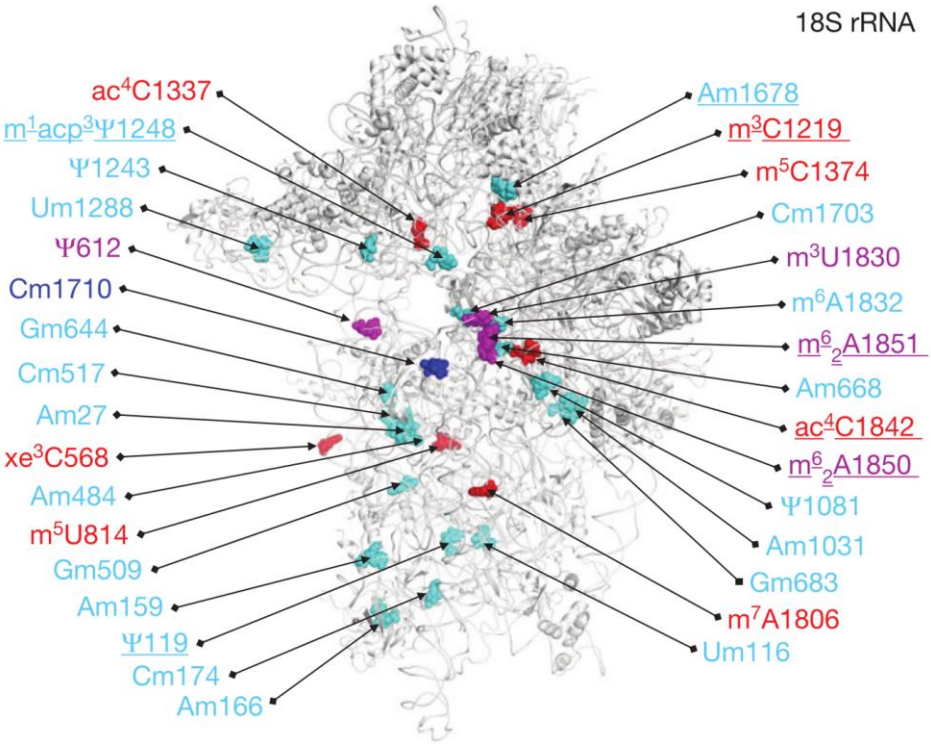


图 1-20 冷冻电镜分析 18S rRNA 中修饰的谱图[128]。

1.5 论文选题依据、意义及研究内容

RNA 修饰是表观遗传调控的重要层面。迄今为止，已在不同类型的 RNA 中鉴定了 170 多种修饰。这些修饰发生在不同类型的 RNA 中，对 RNA 的稳定性、核糖体的生物发生和翻译的起始有重要的影响。其中，甲基化修饰是哺乳动物 RNA 中最普遍的修饰。腺苷的甲基化修饰可以发生在腺嘌呤上形成 m^1A 和 m^6A，也可以发生在核糖上形成 Am。进一步的研究发现腺苷的甲基化修饰不仅可以以单一甲基化的形式（m^1A、m^6A 和 Am）存在，还能以双甲基化的形式（$m^{6,6}A$ 和 m^6Am）存在。m^1A 和 m^6A 普遍存在于各种类型的 RNA 中，是重要的可逆表观遗传修饰，在多种生理过程中发挥着重要作用。基于此，我们猜测生物体内可能存在除 $m^{6,6}A$ 和 m^6Am 以外的其他形式的双甲基修饰腺苷，如腺嘌呤 *N*1 和 *N*6 位置同时发生甲基化的修饰，即 $N1,N^6$-二甲基腺苷（$N1,N^6$-dimethyladenosine，$m^{1,6}A$）。根据 1.4.1 中对不同分析方法的介绍，我们知道 LC-MS/MS 的方法具有灵敏度高、定性能力强等优点，更加适用于 RNA 新修饰的探索。因此，我的研究工作主要是基于 LC-MS/MS 方法探索哺乳动物 RNA 中新型双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$。

RNA 修饰在表观遗传调控中起重要作用，不仅参与基因表达的调控，而且

中国知网 https://www.cnki.net

与多种疾病的发生和发展密切相关。其中，mRNA 上的腺苷修饰，如 m^1A、m^6A、A-to-I 编辑等，参与多种疾病和癌症的发生发展，涉及的机理也已被广泛研究。设计能够调控 RNA 腺苷修饰的相关酶抑制剂是治疗疾病的途径之一，也是现在研究的重要方向之一。除了了解 RNA 修饰本身在疾病发生发展过程中的致病机理外，破译 RNA 修饰是否在疾病的药物治疗中发挥着一定作用也是值得探索的方向。急性淋巴细胞白血病（acute lymphoblastic leukemia，ALL）是一种造血系统的恶行疾病。6-硫鸟嘌呤（6-thioguanine，6TG）是治疗 ALL 最成功的化疗药物之一。6TG 进入细胞后通过代谢进入到 DNA 中触发碱基错配修复机制来诱导细胞死亡。研究表明 6TG 处理细胞后会导致基因组 DNA 中 5mC 水平降低，表明 ^{S}G 掺入基因组 DNA 中会影响 DNA 修饰的水平。与 DNA 表观遗传修饰类似，RNA 分子中的腺苷修饰也可以调节许多生物过程。然而，6TG 是否会影响 RNA 腺苷修饰以及 RNA 腺苷修饰在 6TG 介导的治疗中发挥怎样的生理功能仍然未知。根据 1.4.1 中对不同分析方法的介绍，我们知道 LC-MS/MS 的方法具有灵敏度高、选择性好等优点，适用于 RNA 腺苷修饰的动态变化分析。因此，我的研究工作主要是基于 LC-MS/MS 方法考察 6TG 处理细胞对 RNA 腺苷修饰的影响以及探索 RNA 腺苷修饰在 6TG 诱导的细胞死亡中潜在的生物学功能。

综上，本论文的研究工作主要包括以下几个方面：

1. 哺乳动物 tRNA 中新型双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$ 的发现和鉴定。建立了 LC-MS/MS 分析腺苷甲基化修饰的方法。利用该方法，探索了哺乳动物细胞不同类型 RNA 中的双甲基修饰腺苷，结果在哺乳动物细胞 tRNA 中发现并鉴定了一种全新的双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$。该修饰普遍存在于哺乳动物细胞和组织的 tRNA 中，是一种依赖 *S*-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体的内源性修饰。定量结果表明哺乳动物细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量为 0.0049%~0.0084%，哺乳动物脑组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量为 0.019%~0.047%。此外，通过对人类乳腺癌组织的分析发现，与相邻的癌旁组织相比，癌组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量显著升高，暗示 $m^{1,6}A$ 可能具有调控乳腺癌发生和发展的潜在功能。该研究发现和鉴定了一种新的修饰类型，扩大了哺乳动物 RNA 的修饰种类，增加了 RNA 修饰介导的基因表达调控多样性。

2. 哺乳动物 tRNA 中新型双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$ 的功能研究。通过 LC-MS/MS 进一步探索 tRNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的位置和生物合成途径。DNA 探针杂交结合 S1 核酸酶消化策略的质谱分析结果表明 $m^{1,6}A$ 修饰发生在 tRNA 的第 58 位，推测是该位置 m^1A 的进一步 *N*6 位甲基化修饰产物。定量结果表明 tRNA 第 58 位的 m^1A 约 0.2%转化为 $m^{1,6}A$。体内 *ALKBH3* 的过表达和敲低以及体外

中国知网 https://www.cnki.net

ALKBH3 蛋白孵育的实验证明新修饰 $m^{1,6}A$ 是动态可逆的，由去甲基化酶 ALKBH3 催化去甲基。此外，还发现 $tRNA^{iMet}$ 中的 $m^{1,6}A$ 可能参与 m^1A 介导的表观遗传调控。总之，该研究揭示了 tRNA 中一种新的可逆修饰，为 m^1A 提供了另一种可逆通路，为 tRNA 可逆甲基化调控转录后基因表达提供了新的机制。

3. A-to-I 编辑在 6TG 介导的细胞死亡中的功能研究。通过 LC-MS/MS 考察了药物 6TG 处理急性淋巴细胞白血病细胞后 RNA 中 6-硫鸟苷（6-thioguanosine，^SG）的掺入，结果显示 ^SG 可以整合到不同类型的 RNA 中，其中 mRNA 含有最丰富的 ^SG。同时，探索了 6TG 处理对 mRNA 中腺苷修饰的影响，定量结果表明 6TG 处理会诱导脱氨酶 ADAR2 的表达增加，导致 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑增加。此外，体内细胞实验表明 ADAR2 介导 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑能调控细胞活力，且高编辑的 *BLCAP* 会促进细胞的死亡。总之，该研究表明药物 6TG 进入细胞后可通过上调 ADAR2 的表达提高 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑来诱导细胞死亡增加，为 6TG 诱导细胞死亡的细胞毒性提供了一种新的机制，同时也为 RNA 表观遗传修饰在疾病治疗中的潜在功能提供了新的基础。

总之，本论文研究工作主要利用 LC-MS/MS 方法，鉴定了哺乳动物 RNA 中的新型腺苷修饰，并对腺苷修饰的生物学功能进行了研究。研究工作增加了 RNA 修饰的多样性，提高了对 RNA 修饰调控基因表达的认识，为破译 RNA 表观遗传修饰的生物学功能提供了基础。

中国知网 https://www.cnki.net

第二章 基于液相色谱-质谱联用技术的哺乳动物 RNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的鉴定

2.1 前言

RNA 中除了四种正常核苷：腺嘌呤核苷（adenosine，A）、鸟嘌呤核苷（guanosine，G）、尿嘧啶核苷（uridine，U）、胞嘧啶核苷（cytidine，C）外，还包含丰富多样的修饰核苷[75]。迄今为止，已在 RNA 中鉴定出 170 多种化学修饰[76]。修饰可发生在不同类型的 RNA 中，包括信使 RNA（messenger RNA，mRNA）、核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）、转运 RNA（transfer RNA，tRNA）等[4]。

腺苷甲基化修饰是哺乳动物 RNA 中普遍的修饰。其中，甲基化不仅可以发生在腺嘌呤碱基上形成 *N*1-甲基腺苷（*N*1-methyladenosine，m^1A）和 N^6-甲基腺苷（N^6-methyladenosine，m^6A），还可以发生在核糖 2’OH 位置形成 2’-*O*-甲基腺苷（2’-*O*-methyladenosine，Am）。m^1A 普遍存在不同类型的 RNA 中，能动态调控 tRNA 的翻译[83]和 mRNA 的稳定性[86, 91]。mRNA 上的 m^6A 是重要的表观遗传修饰，在调节 RNA 加工、剪接、核出口、稳定性和翻译方面起着关键作用，并参与调节多种疾病和癌症的发生[3, 76, 98] 。Am 参与修饰 mRNA 的帽子结构，促进帽子的进一步修饰[187, 292]。

进一步的研究发现腺苷的甲基化修饰不仅可以以单一甲基化的形成存在，还能以双甲基化的形式存在。N^6,N^6-二甲基腺苷（N^6,N^6-dimethyladenosine，$m^{6,6}A$）是甲基化同时发生在腺嘌呤 *N*6 位置的双甲基修饰腺苷，而 N^6,2’-*O*-二甲基腺苷（N^6,2’-*O*-dimethyladenosine，m^6Am）是甲基化同时发生在腺嘌呤 *N*6 位置和核糖 2’OH 位置的双甲基修饰核苷。$m^{6,6}A$ 是小亚基 rRNA 上高度保守的修饰，通常发生在 rRNA 3’末端相邻的两个腺苷上，对核糖体的生物发生和功能有重要影响[162, 164, 178, 293]。m^6Am 是另外一种可逆的甲基化修饰，主要位于 mRNA 和小核 RNA（small nuclear RNA，snRNA）帽子中，对 mRNA 的稳定性、翻译和 snRNA 的生物合成至关重要[81, 192, 194, 200]。除了 $m^{6,6}A$ 和 m^6Am 外，生物体内是否存在其他形式的双甲基修饰腺苷，如腺嘌呤 *N*1 和 *N*6 位置同时发生甲基化的修饰，即 *N*1,N^6-二甲基腺苷（*N*1,N^6-dimethyladenosine，$m^{1,6}A$），目前尚不清楚。

新修饰的发现是非常困难的，因为新修饰很可能是以极低含量的形式存在生物体内，并且大量的正常核苷也会干扰它们的检测。因此，高灵敏和高选择

中国知网 https://www.cnki.net

的分析方法用于新型双甲基修饰腺苷的探索是必要的。到目前为止，研究人员已经建立了多种用于腺苷修饰的分析方法，如薄层色谱分析法[241]、液相色谱分析法[97]、基于抗体的免疫检测法[244]、基于质谱检测法[259]等。由于良好的选择性和较高的灵敏度，液相色谱-质谱联用技术已被广泛用于腺苷修饰研究领域[251, 254, 294]。

此外，新修饰的鉴定还存在缺乏标准品进行比对的难点。特别是从未被报道过的新结构，标准品的合成、纯化和表征都是具有挑战性的。

为了对哺乳动物 RNA 中的新型双甲基修饰腺苷进行探索，我们成功地合成了 $m^{1,6}A$ 标准品并建立了液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）分析腺苷甲基化修饰的方法。通过 LC-MS/MS 分析和标准品比对，我们在哺乳动物细胞 tRNA 中发现并鉴定了一种全新的双甲基修饰腺苷：$m^{1,6}A$（**图 2-1**）。我们发现 $m^{1,6}A$ 普遍存在于哺乳动物细胞和组织的 tRNA 中，是一种以 *S*-腺苷甲硫氨酸（*S*-adenosyl-L-methionine，SAM）作为甲基供体的内源性修饰。此外，我们还对人类乳腺癌组织中 $m^{1,6}A$ 的含量进行了分析，发现乳腺癌组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量显著升高，暗示 $m^{1,6}A$ 具有调控乳腺癌发生和发展的潜在功能。

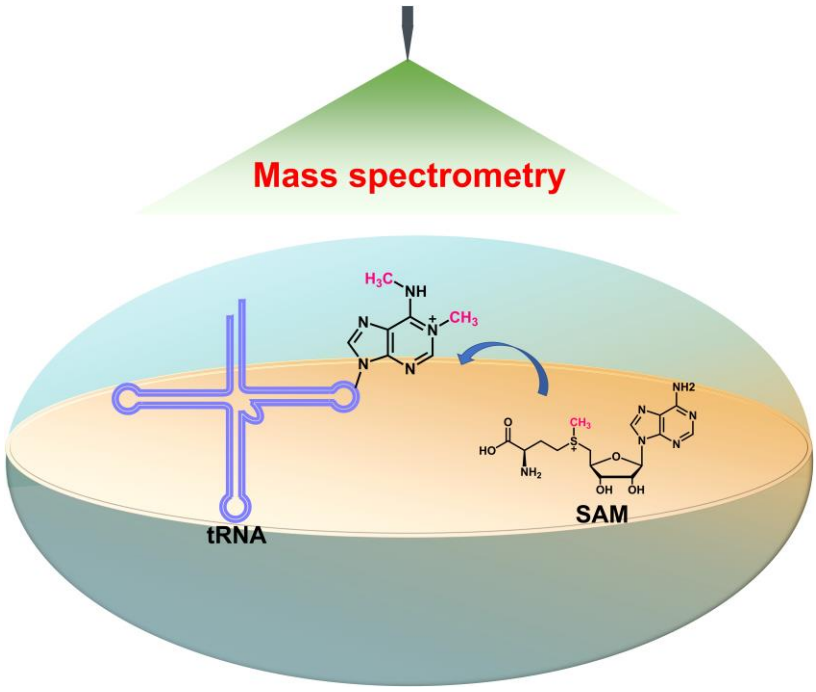


图 2-1 通过 LC-MS/MS 分析 tRNA 中新型双甲基修饰腺苷。

中国知网 https://www.cnki.net

2.2 实验部分

2.2.1 化学试剂

本章实验所需的核苷标准品如下：腺嘌呤核苷（adenosine，A）、鸟嘌呤核苷（guanosine，G）、尿嘧啶核苷（uridine，U）、胞嘧啶核苷（cytidine，C）、*N*1-甲基腺苷（*N*1-methyladenosine，m^1A）、N^6-甲基腺苷（N^6-methyladenosine，m^6A）、N^6,N^6-二甲基腺苷（N^6,N^6-dimethyladenosine，$m^{6,6}A$）。这 7 种核苷标准品均购买自不同公司，它们的详细信息，包括分子式、CAS 号、分子量等可见下**表 2-1**。*N*1,N^6-二甲基腺苷（*N*1,N^6-dimethyladenosine，$m^{1,6}A$）是自己合成的。硫酸二甲酯（dimethyl sulfate，DMS）和三甲基碘化硫（trimethylsulfoniumiodide，Me_3SI）分别购自上海麦克林生化科技有限公司（上海，中国）和上海毕得医药科技有限公司（上海，中国）。

表 2-1 核苷标准品的详细信息。

Nucleosides	Abbreviation	CAS number	Molecular formula	Molecular weigh	Company
cytidine	C	65-46-3	$C_9H_{13}N_3O_5$	243.22	Sigma-Aldrich
uridine	U	58-96-8	$C_9H_{12}N_2O_6$	244.20	Sigma-Aldrich
guanosine	G	118-00-3	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283.24	Sigma-Aldrich
adenosine	A	58-61-7	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.24	Sigma-Aldrich
*N*1-methyladenosine	m^1A	15763-06-1	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	281.27	J&K Scientific Ltd.
N^6-methyladenosine	m^6A	1867-73-8	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	281.27	Hanhong Chemical
N^6,N^6-dimethyladenosine	$m^{6,6}A$	2620-62-4	$C_{12}H_{17}N_5O_4$	295.29	J&K Scientific Ltd.
*N*1,N^6-dimethyladenosine	$m^{1,6}A$	-	$C_{12}H_{17}N_5O_4$	295.29	Synthesized in the current study

蛇毒磷酸二酯酶 I 购买自 Sigma-Aldrich 公司（上海，中国）。碱性磷酸酶（calf intestine alkaline phosphatase，CIAP）和 S1 核酸酶均购买于 Takara Biotechnology 公司（大连，中国）。DMEM 培养基（Dulbecco's Modified Eagle Medium）、RPMI-1640 培养基（Roswell Park Memorial Institute）、青霉素和链霉素均购买自 Thermo-Fisher Scientific 公司（北京，中国）。胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购买自 Biological Industries 公司（上海，中国）。D_3-甲硫氨酸（L-methionine-(methyl-D_3)，D_3-Met）购买自 Aladdin 公司（上海，中国）。

中国知网 https://www.cnki.net

分析纯的甲酸和 *N*,*N*-二甲基甲酰胺（*N*,*N*-dimethylformamide，DMF）购自 Sinopharm 公司（上海，中国）。色谱纯的甲醇（MeOH）购自 Merck 公司（Darmstadt，Germany）。本章研究所使用的超纯水均取自 Millipore 公司（Bedford，MA）的 Milli-Q 纯水仪。

2.2.2 $m^{1,6}A$ 标准品的合成与纯化

$m^{1,6}A$ 标准品的合成采用了两种方案。以 DMS 作为甲基化试剂，m^6A 作为底物时的合成路线如**图 2-2A** 所示。具体来说，将 2 μL 的 m^6A（200 μM）加入到 16 μL 不同 pH 值的缓冲液中，再加入 2 μL 的 DMS，最后将该混合物在 37ºC 下震荡反应 1 h。以 DMS 作为甲基化试剂，m^1A 作为底物时的合成路线如**图 2-2B** 所示。合成方法与上述类似，即将 2 μL 的 m^1A（200 μM）、16 μL 不同 pH 值的缓冲液与 2 μL 的 DMS 混匀在 37ºC 下震荡反应 1 h。

以 Me_3SI 作为甲基化试剂，m^6A 作为底物时的合成路线如**图 2-3A** 所示。简而言之，30 mg 的 Me_3SI 与 6 mg 的 m^6A 在 DMF 中于 85ºC 反应 3.5 h。通过高效液相色谱（Shimadzu LC-20A，Tokyo，Japan）分离纯化生成的 $m^{1,6}A$。Weltech 公司（武汉，中国）的 Hisep C18-T 色谱柱（5 μm，4.6×250 mm）被用于产物的分离。流动相由 H_2O（溶剂 A）和 MeOH（溶剂 B）组成。在 1 mL/min 的流速下，采用 90% A 和 10% B 的等度洗脱作为液相分离条件。将对应于 $m^{1,6}A$ 的馏分收集起来，并通过高分辨率质谱和核磁共振分析对合成的 $m^{1,6}A$ 进行表征。纯化的 $m^{1,6}A$ 标准品通过 Metash 公司（上海，中国）的超微量紫外分光光度计 B-500 测定并计算浓度。

2.2.3 生物样本

人类肾胚胎细胞系（HEK293T）、人类肝癌细胞系（HepG2）、人类子宫颈癌细胞系（HeLa）、人类乳腺腺癌细胞系（MCF-7）、小鼠神经母细胞瘤 N2a 细胞系（Neuro-2a）、人类肝细胞系（HL-7702）、人类慢性髓系白血病细胞系（K562）和人类急性 T 淋巴细胞白血病细胞系（Jurkat-T）均购自中国典型培养物保藏中心。HEK293T、HeLa、MCF-7、HepG2 和 Neuro-2a 细胞在含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中生长。HL-7702、Jurkat-T 和 K562 细胞则在含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中生长。所有细胞均在 37ºC、5%CO_2 环境中

中国知网 https://www.cnki.net

培养。

大鼠大脑组织和小鼠大脑组织均取自于中国科学院武汉物理与数学研究所。对大鼠和小鼠进行麻醉安乐死，快速取出脑组织于-80ºC 冷藏。其中，大鼠的脑组织按部位被分成 9 个区域，分别是：嗅球（olfactory bulb，OB）、小脑（cerebellum，CE）、髓质（medulla，MED）、间脑（midbrain，MID）、丘脑（thalamus，THA）、下丘脑（hypothalamus，HYP）、海马（hippocampus，HP）、纹状体（striatum，ST）、大脑皮层（cerebral cortex，CC）。动物实验严格按照规程，并经中国科学院精密测量科学技术创新研究院动物伦理委员会批准。

乳腺癌患者的组织样本采集自湖北省肿瘤医院，分别是 5 对乳腺癌组织和匹配的肿瘤邻近正常组织。样本的详细信息见**表 2-2**。该研究符合赫尔辛基的声明，并严格遵守湖北省肿瘤医院伦理委员会的规定和指导方针。

表 2-2 乳腺癌病人的性别和年龄。

Number	Gender	Age	Diagnosis
1	Female	46	Breast Cancer
2	Female	39	Breast Cancer
3	Female	66	Breast Cancer
4	Female	62	Breast Cancer
5	Female	58	Breast Cancer

2.2.4 不同类型 RNA 的提取与纯化

生物样本的总 RNA 采用 TRIzol 试剂（Sigma Aldrich，北京，中国）直接提取。根据之前报道的方法，通过尺寸排阻色谱（size-exclusion chromatography，SEC）进一步分离获得的总 RNA 来提取 18S rRNA 和 28S rRNA。该实验采用安捷伦科技公司的 Bio SEC-5 生物柱（5 mm, 1000 Å，4.6×150 mm）作为色谱分离柱，100 mM NH_4Ac（pH 7.0）作为流动相，0.35 mL/min 作为流速，在柱温为 35ºC 下进行分离。将分别对应于 18S rRNA 和 28S rRNA 的馏分收集并使用 E.Z.N.A. MiRNA 试剂盒（Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA）进一步除盐纯化。

生物样本中的大 RNA（> 200 nt）和小 RNA（< 200 nt）均采用 E.Z.N.A. MiRNA 试剂盒按照操作手册从样本中直接提取。将提取的小 RNA（< 200 nt）通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析来纯化生物样本的总 tRNA、5S rRNA 和 5.8S

中国知网 https://www.cnki.net

rRNA。本章节采用浓度为 10%的 Urea-PAGE，以 180 V、90 min 的条件进行电泳分析。电泳结束后，将凝胶在 GelRed（Invitrogen，上海，中国）中染色 15 min，并通过凝胶记录系统（Tanon，上海，中国）进行可视化。将特定的对应于 tRNA、5S rRNA 和 5.8S rRNA 的条带分别从凝胶上切下，胶块被捣碎后加入 buffer 在 50ºC 下孵育 3 h，之后离心取上清，最后使用乙醇沉淀回收上清中的总 tRNA、5S rRNA 和 5.8S rRNA。

生物样本中 mRNA 的提取是通过 PolyATtract® mRNA Isolation System 试剂盒（Promega, Madison, WI, USA）对提取的大 RNA（> 200 nt）进行连续两次的分离。

通过 Metash 公司（上海，中国）的超微量紫外分光光度计 B-500 对提取出的不同类型 RNA 进行浓度和纯度的检测。此外，通过 10%的 Urea-PAGE 对纯化出的总 tRNA、5S rRNA 和 5.8S rRNA 进行检验。

2.2.5 RNA 的酶解

采用实验室建立的中性酶解方法酶解 RNA[254]。取 0.5~3ug RNA 溶解于 24.5 μL H_2O 中，加入 3 μL 10×缓冲液（500 mM Tris–HCl，pH 7.0，10 mM $ZnSO_4$，10 mM $MgCl_2$，100 mM NaCl），1 μL S1 核酸酶（180 U/μL），1 μL 蛇毒磷酸二酯酶 I（0.001 U/μL），和 0.5 μL CIAP（30 U/μL）。将上述混合物在 37ºC 水浴中孵育 4 h。随后加入 270 μL H_2O 和 300 μL 氯仿，涡旋 3 min，12,000 rpm 高速离心 5 min。收集上层水相，重复氯仿抽提蛋白过程共 3 次直至完全除去蛋白。将最终收集的含有核苷的水相通过冷冻离心浓缩仪浓缩后进行 LC-MS/MS 分析。

2.2.6 LC-MS/MS 分析腺苷甲基化修饰

腺苷甲基化修饰的分析是在 LC-MS/MS 系统上进行的。该系统由配备电喷雾电离源的 Shimadzu 8045 质谱仪（Kyoto，Japan）和 Shimadzu LC-30AD 超高效液相色谱（ultra-performance liquid chromatography，UPLC）仪（Tokyo，Japan）组成。核苷的色谱分离是通过 Shimadzu 公司的 Shim-pack GIST 色谱柱（100 mm×2.1 mm i.d.，2.0 μm）在 40ºC 的柱温下完成的。采用含有 0.05%甲酸的 H_2O（v/v，溶剂 A）和 MeOH（溶剂 B）作为流动相，在流速为 0.2 mL/min 的条件下对核苷进行梯度洗脱。流动相梯度设置如下：0-2 min, 5% B；

中国知网 https://www.cnki.net

2-10 min，5-80% B；10-12 min，80% B；12-13 min，80-5% B；13-20 min，5% B。核苷的质谱检测采用的是正离子模式和多反应监测(multiple reaction monitoring，MRM)模式。优化各核苷分析物的 MRM 参数作为最佳检测条件，最终的参数见**表 2-3**。

表 2-3 LC-MS/MS 分析腺苷甲基化修饰的 MRM 质谱参数

Nucleosides	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)	RT (min)
C	244.1	112.1	-	-30.0	-	2.0
U	245.1	113.1	-	-30.0	-	3.1
G	284.1	152.1	-	-40.0	-	4.9
A	268.1	136.1	-	-50.0	-	4.8
m^1A	282.1	150.1	-11.0	-18.0	-29.0	2.2
m^6A	282.1	150.1	-11.0	-18.0	-29.0	6.4
$m^{6,6}A$	296.1	164.1	-11.0	-18.0	-28.0	7.8
$m^{1,6}A$	296.1	164.1	-11.0	-18.0	-28.0	3.2
D_3-$m^{1,6}A$	296.1	164.1	-11.0	-18.0	-28.0	3.2
D_6-$m^{1,6}A$	296.1	164.1	-11.0	-18.0	-28.0	3.2

2.2.7 高分辨质谱分析

高分辨质谱分析由 Dionex Ultimate 3000 UPLC 系统（Thermo Fisher Scientic，Waltham，MA，USA）和 LTQ-Orbitrap Elite 质谱仪（Thermo Fisher Scientic，Waltham，MA，USA）共同完成。核苷的液相分离条件与上述的 LC-MS/MS 系统中所用的相同。核苷的质谱分析均在分辨率为 60000 和正离子模式下进行。首先采用全扫描模式（full scan）在 *m/z* 100–350 范围内对核苷进行检测。随后采用碰撞诱导解离（collision-induced dissociation，CID），以 $m^{1,6}A$ 的分子量（*m/z* 296.1）作为前体离子在碰撞电压（collision energy，CE）为 16 eV 下进行二级质谱（MS^2）分析。此外，将 $m^{1,6}A$ 特征的二级碎片离子（*m/z* 164.1）作为前体离子在 CE 为 35 eV 的条件下对 $m^{1,6}A$ 进行进一步的三级质谱（MS^3）分析。离子源和离子传输参数设置如下：毛细管温度：350°C，加热器温度：300°C，鞘气流量：35，辅助气体流量：15，喷雾电压：3.5 kV，毛细管电压：35 V，S 镜头射频电平：60%。使用 Xcalibur v3.0.63 软件进行数据分析。

中国知网 https://www.cnki.net

2.2.8 稳定同位素示踪分析

在含有 0.2 mM 未标记甲硫氨酸（L-methionine，Met）的 DMEM 培养基中，添加 0.3 mM 氘代标记的甲硫氨酸（D_3-Met）。将 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞在上述制备的培养基中培养 72 h 后收获。分别提取 HEK293T 细胞和 HeLa 细胞中的总 tRNA 进行酶解，随后进行 LC-MS/MS 分析。

2.2.9 实时定量 PCR

使用商品化的试剂盒 Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus)（翌圣生物科技股份有限公司，上海，中国）对从乳腺癌组织和癌旁组织中提取的总 RNA 进行逆转录。首先通过试剂盒里的 gDNA digester mix 处理 RNA 模板中残留的基因组 DNA 污染。具体地，含有 1 μg（2 μL）总 RNA、3 μL 5×gDNA digester mix 和 10 μL H_2O 的混合液（15 μL）在 42ºC 下反应 10 min。随后采用试剂盒中的 Hifair® III Reverse Transcriptase 对上述去除 DNA 污染后的总 RNA 进行逆转录。具体地，在上述混合液（15 μL）中，加入 5 μL 的 4×Hifair® III SuperMix plus，随后按照以下程序完成逆转录反应：25ºC 5 min；55ºC 30 min；85ºC 5 min。

采用试剂盒 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix（翌圣生物科技股份有限公司，上海，中国）通过 CFX96 实时 PCR 检测系统（Bio-Rad Laboratories，Hercules，USA）完成实时定量 PCR。具体地，取 2 μL 逆转录溶液，分别加入 1 μL 的基因正向引物（10 μM）、1 μL 的基因反向引物（10 μM）、8.5 μL 的 H_2O 和 12.5 μL 的 2×Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix，最终反应体系总体积为 25 μL。PCR 条件为 95ºC 30 s；95ºC 5 s，60ºC 30 s，72ºC 1 min，40 cycles；65ºC 5 s。将 *GAPDH* 作为参考基因对待测基因表达的相对含量进行归一化。待测基因的 PCR 引物均购自生工生物工程股份有限公司（上海，中国），详细的序列见**表 2-4**。

中国知网 https://www.cnki.net

表 2-4 实时定量 PCR 引物序列。

Name	Sequence (5’ to 3’)
GAPDH forward primer	CTGGGCTACACTGAGCACC
GAPDH reverse primer	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG
ALKBH1 forward primer	AGAAGCGACTAAACGGAGACC
ALKBH1 reverse primer	GGGAAAGGTGTGTAATGATCTGC
ALKBH3 forward primer	AGGACCGGCATCAGAGAGG
ALKBH3 reverse primer	CAATGCGGTTCTTTAGTGTGC
TRMT6 forward primer	CTGTCTTTGCTGGACTTTGTGGC
TRMT6 reverse primer	AGACAGCCTGAGGTTGATGACC
TRMT61A forward primer	TCCTCTACTCCACAGACATCGC
TRMT61A reverse primer	CAATGGTGCGGATGATGGCGTG

2.2.10 统计学分析

数据分析通过 Origin 8.5 软件进行，采用 t 检验的方法评估乳腺癌组织和癌旁组织中修饰核苷含量的差异。所有的 p 值都采取双边（two-sided）检验，$p < 0.05$ 认为具有统计学差异。

2.3 结果与讨论

2.3.1 $m^{1,6}A$ 标准品的合成与表征

为了实现哺乳动物细胞 RNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的探索，需要获取 $m^{1,6}A$ 标准品。由于缺乏商品化的 $m^{1,6}A$ 标准品，因此我们首先需要合成 $m^{1,6}A$ 标准品。据文献报道，在不同 pH 条件下 DMS 能甲基化腺苷的 *N*1 位或者 *N*6 位生成相应的产物[295]。基于此，为了获得 *N*1 和 *N*6 双甲基化的形式，我们分别采用 m^6A 和 m^1A 为底物，在不同 pH 条件下与 DMS 反应（**图 2-2A** 和 **B**）。反应后对反应混合物进行 LC-MS/MS 分析。如**图 2-2C** 所示，不同 pH 下，m^6A 与 DMS 反应均能生成 $m^{1,6}A$，其中在弱酸性和碱性条件下反应的选择性很高，几乎没有副产物，然而反应效率太低。此外，以 m^1A 为底物时也生成了 $m^{1,6}A$，但是反应效率很低，且反应选择性低，生成了主要副产物 *N*1,2’-*O*-二甲基腺苷（*N*1,2’-*O*-

中国知网 https://www.cnki.net

dimethyladenosine，m^1Am）和少量无法鉴定的其他副产物（**图 2-2D**）。

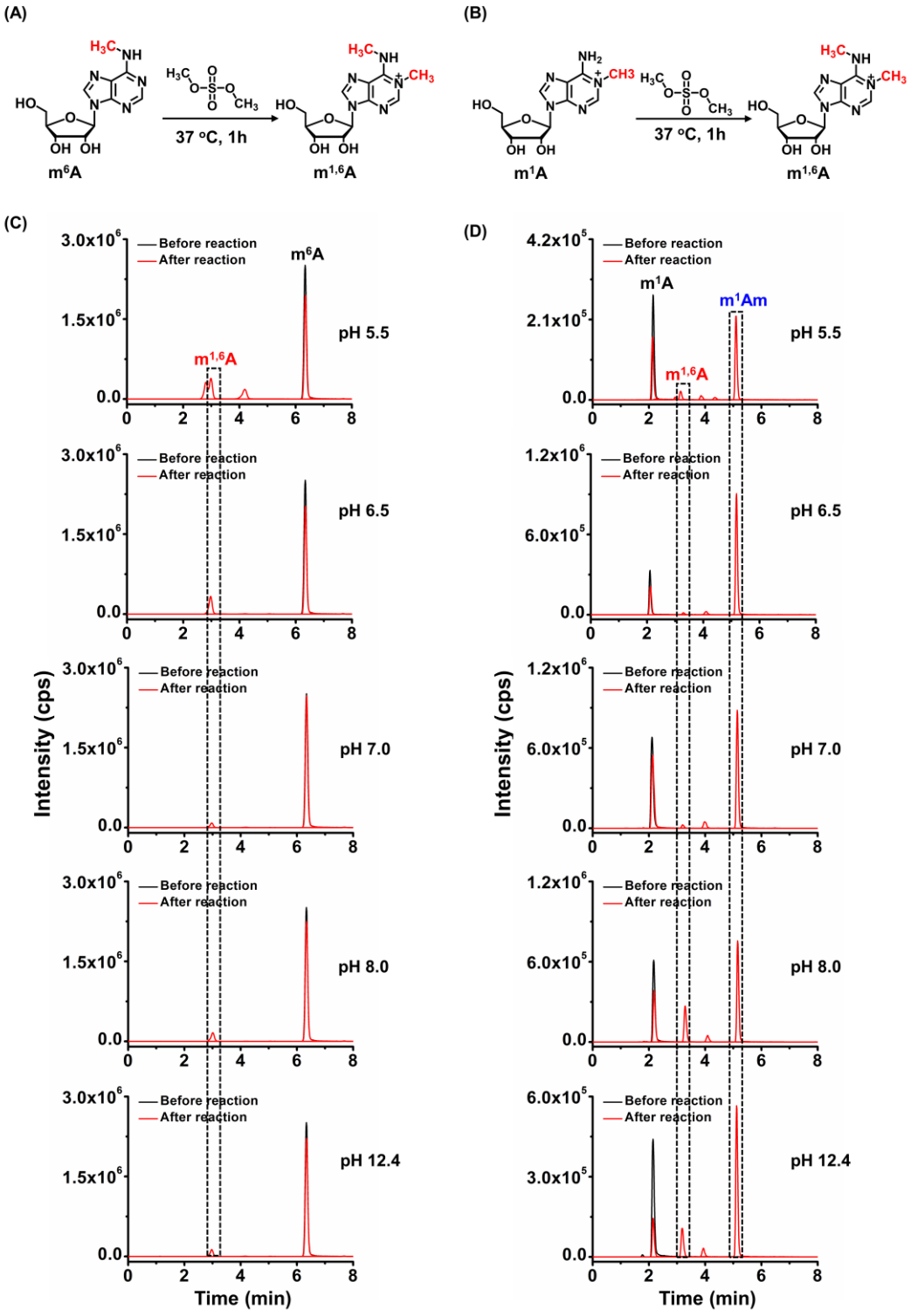


图 2-2 以 DMS 作为甲基化试剂的 $m^{1,6}A$ 标准品的合成。（A）以 m^6A 为底物合成 $m^{1,6}A$ 的化学反应式。（B）以 m^1A 为底物合成 $m^{1,6}A$ 的化学反应式。（C）不同 pH 条件下 DMS 甲基化 m^6A 的产物提取离子色谱图。（D）不同 pH 条件下 DMS 甲基化 m^1A 的产物提取离子色谱图。

中国知网 https://www.cnki.net

为了获取高纯度的 $m^{1,6}A$ 标准品，我们采取了另一种高选择性和高活性的甲基化试剂 Me_3SI，该试剂能特异性甲基化腺苷的 *N*1 位形成 m^1A，反应效率高达 88%[296]。为此，我们采用 m^6A 为反应底物，Me_3SI 为甲基化试剂合成 $m^{1,6}A$（**图 2-3A**）。高效液相色谱用于产物的分离和纯化。如**图 2-3B** 所示，除了底物 m^6A 的色谱峰以外（24.0 min），我们发现反应液多出了一个单一的色谱峰（5.0 min）。将产物色谱峰对应的馏分收集起来进行高分辨质谱鉴定（**图 2-3C**）。质谱分析结果显示合成的产物的前体分子离子（*m/z* 296.1356）和二级碎片分子离子（*m/z* 164.0930）的精确分子量与 $m^{1,6}A$ 的理论计算值（*m/z* 296.1356，*m/z* 164.0931）基本吻合（**图 2-3D**），表明我们合成的化合物为 $m^{1,6}A$。

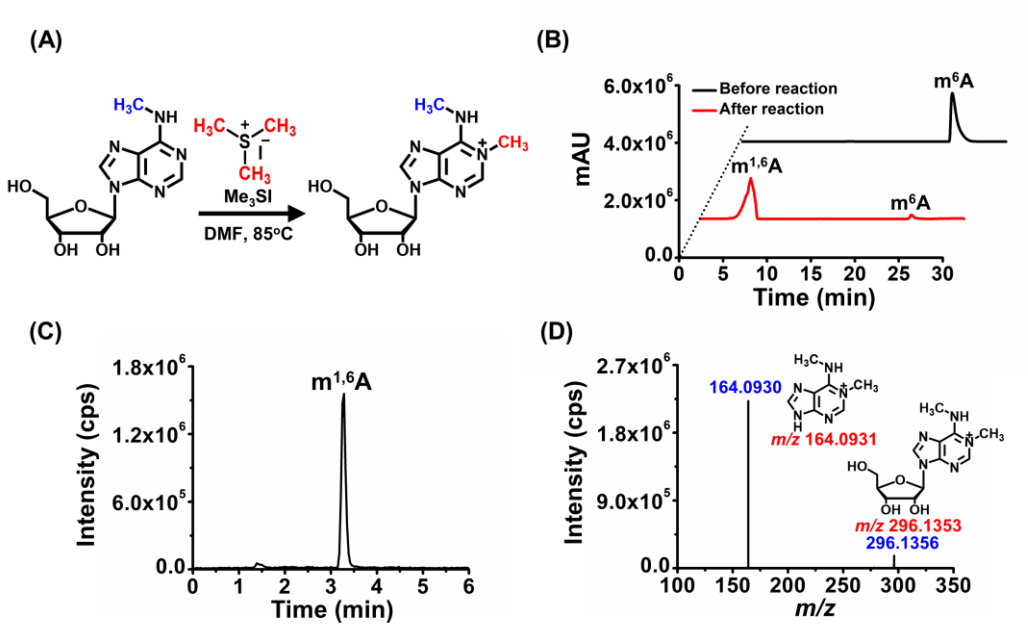


图 2-3 以 Me_3SI 作为甲基化试剂的 $m^{1,6}A$ 标准品的合成与高分辨质谱表征。（A）以 m^6A 为底物合成 $m^{1,6}A$ 的化学反应式。（B）高效液相色谱分离纯化 $m^{1,6}A$ 的色谱图。（C）高分辨率质谱分析合成产物 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图。（D）高分辨率质谱分析合成产物 $m^{1,6}A$ 的二级质谱图。红色显示的是 *m/z* 理论值；蓝色显示的是 *m/z* 测量值。

值得注意的是，该产物在 LC-MS/MS 分析中的色谱保留时间为 3.2 min，与另一个同分异构体的腺苷修饰 $m^{6,6}A$ 的保留时间（7.8 min）完全不同，排除了产物是 $m^{6,6}A$ 的可能（**图 2-4**）。

中国知网 https://www.cnki.net

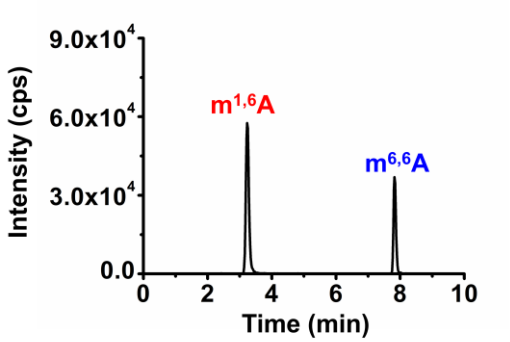
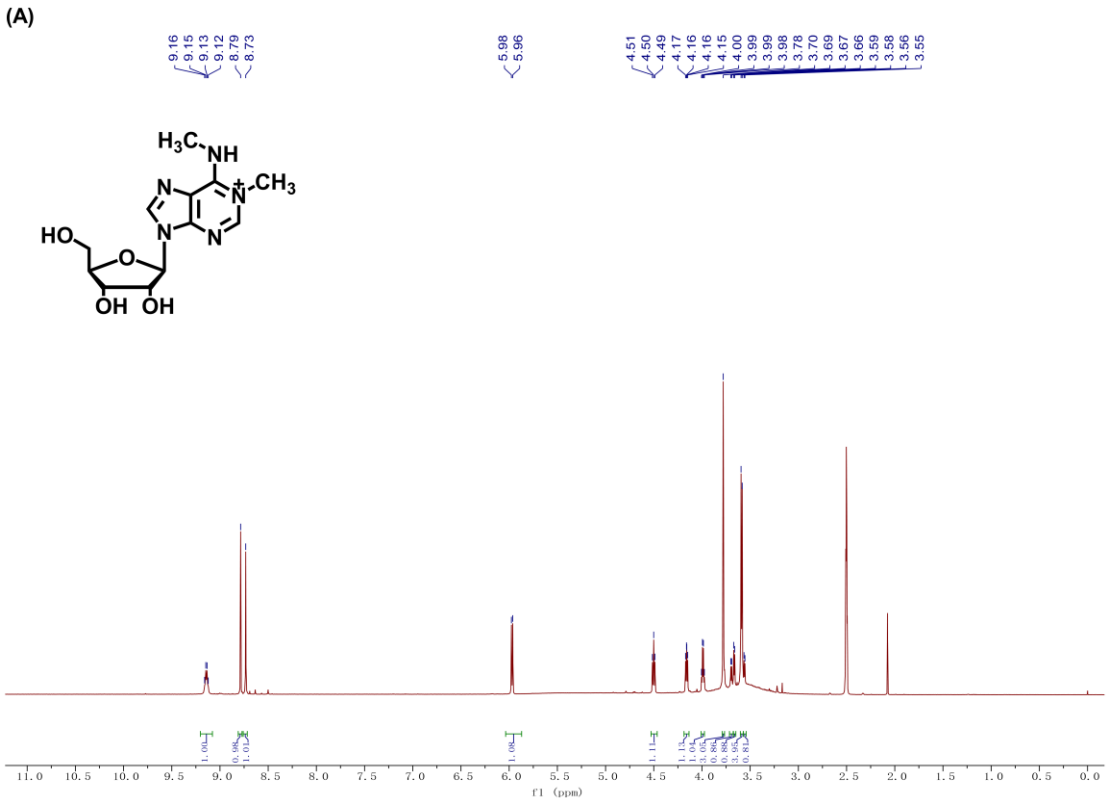


图 2-4 $m^{1,6}A$ 标准品与 $m^{6,6}A$ 标准品的提取离子色谱图。

为了进一步鉴定合成的 $m^{1,6}A$，我们还进行了核磁共振分析。氢谱和碳谱的结果均表明该物质是 $m^{1,6}A$（**图 2-5**）。综上，我们成功地合成了 $m^{1,6}A$ 标准品。



（接下页）

中国知网 https://www.cnki.net

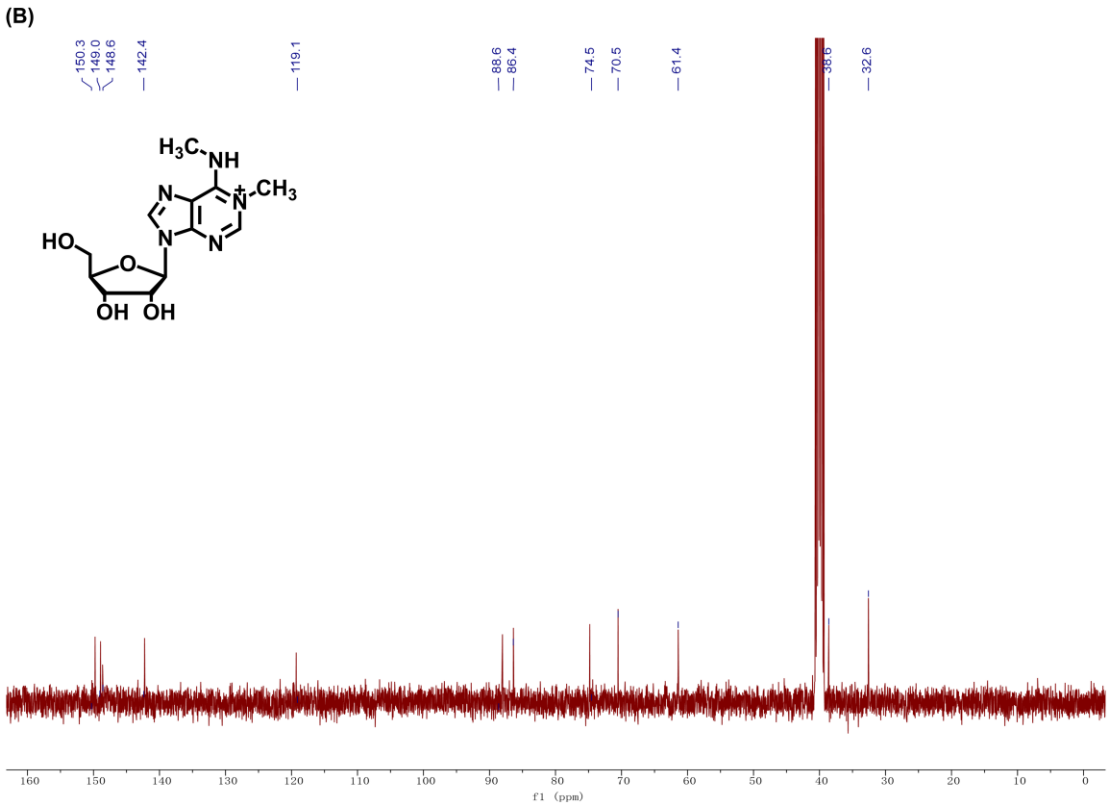


图 2-5 $m^{1,6}A$ 标准品的核磁表征。（A）^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.14 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 5.97 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.50 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.16 (dd, *J* = 4.9, 3.8 Hz, 1H), 3.99 (q, *J* = 3.9 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.70 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 3.67 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 3.59 (d, *J* = 4.7 Hz, 4H), 3.56 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H)。（B）^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 150.3, 149.0, 148.6, 142.4, 119.1, 88.6, 86.4, 74.5, 70.5, 61.4, 38.6, 32.6。

2.3.2 哺乳动物细胞 RNA 中 $m^{1,6}A$ 的鉴定

由于 LC-MS/MS 方法具有较好的选择性和较高的灵敏度，常被用于核酸修饰的分析和新修饰的探索。为此，我们利用合成的 $m^{1,6}A$ 标准品通过 LC-MS/MS 分析方法探索哺乳动物 RNA 中是否存在 $m^{1,6}A$ 修饰。首先，我们对从 HEK293T 细胞中提取的总 RNA 进行了分析。我们在 MRM 通道（296.1→164.1）中检测到了一个保留时间为 3.2 min 的色谱峰，与 $m^{1,6}A$ 标准品的保留时间基本一致，暗示 HEK293T 细胞的总 RNA 中可能存在 $m^{1,6}A$ 修饰（**图 2-6**）。值得注意的是，在空白 H_2O 样品和只加酶不含 RNA 的样品中没有监测到该修饰，说明 $m^{1,6}A$ 不是来自其它污染而是来自于 RNA 本身（**图 2-6**）。为了进一步确认总 RNA 中检测到的物质是 $m^{1,6}A$，我们进行了加标实验。在总 RNA 的酶解核苷中加入 $m^{1,6}A$ 标准品进行 LC-MS/MS 分析。结果显示 RNA 样品中 3.2 min 的

中国知网 https://www.cnki.net

物质的保留时间在加标前后保持一致，且加标后该物质的色谱峰强度得到了相应的增加，进一步证明我们在总 RNA 中检测到的化合物为 $m^{1,6}A$（**图 2-6**）。

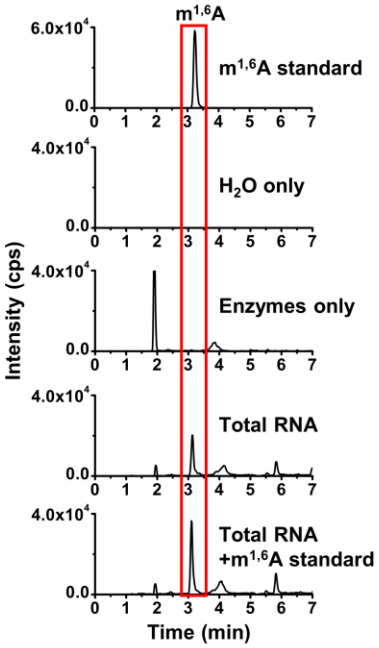


图 2-6 不同样品中 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图（从上到下依次为 $m^{1,6}A$ 标准品、水空白样品、酶空白样品、总 RNA、总 RNA 加 $m^{1,6}A$ 标准品）。

总 RNA 由各种类型的 RNA 组成，包括 mRNA、tRNA、rRNA 等。为了进一步探索 $m^{1,6}A$ 修饰存在的 RNA 类型，我们分离纯化了不同类型的 RNA。首先，我们根据 RNA 的长度将总 RNA 粗分为大 RNA（> 200 nt）和小 RNA（< 200 nt）。通过 LC-MS/MS 分析，我们在小 RNA（< 200 nt）中检测到了 $m^{1,6}A$，而在大 RNA（> 200 nt）没有检测到 $m^{1,6}A$（**图 2-7**）。

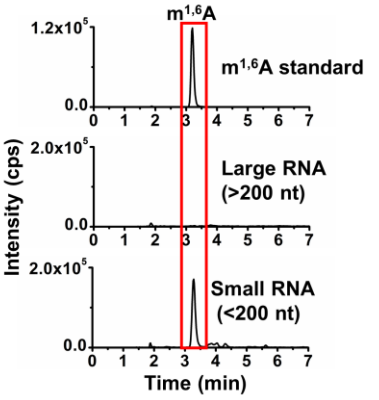


图 2-7 不同样品中 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图（从上到下依次为 $m^{1,6}A$ 标准品、大 RNA（> 200 nt）、小 RNA（< 200 nt））。

中国知网 https://www.cnki.net

大 RNA（> 200 nt）里主要包含 28S rRNA、18S rRNA，和微量的 mRNA。为此，我们进一步提取了 28S rRNA、18S rRNA 和 mRNA（**图 2-8A**）。质谱结果均表明 28S rRNA、18S rRNA 和 mRNA 中不存在 $m^{1,6}A$（**图 2-8B**）。

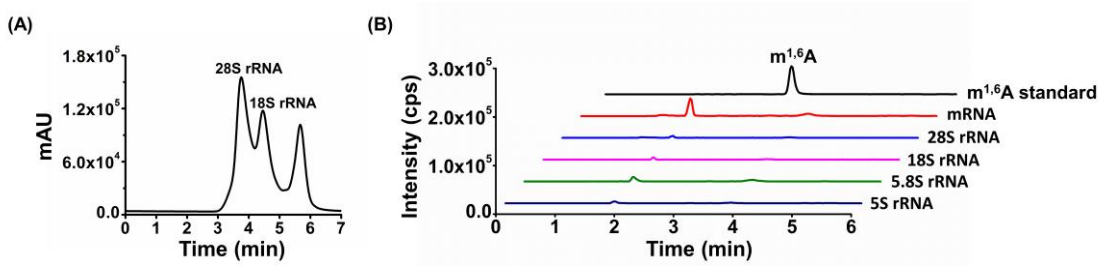


图 2-8 （A）高效液相色谱分离纯化 28S rRNA 和 18S rRNA 的色谱图。（B）不同样品中 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图（从上到下依次为 $m^{1,6}A$ 标准品、mRNA、28S rRNA、18S rRNA、5.8S rRNA、5S rRNA）。

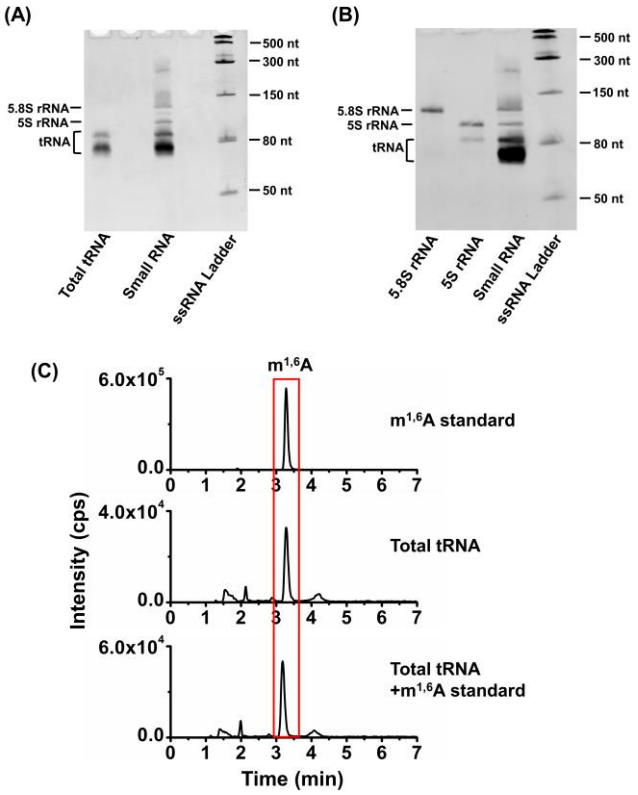


图 2-9 HEK293T 细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的检测。（A）纯化的 tRNA 的凝胶电泳分析（从左到右的泳道分别为纯化的 tRNA、小 RNA（< 200 nt）、RNA marker）。（B）纯化的 5.8S rRNA 和 5S rRNA 的凝胶电泳分析（从左到右的泳道分别为纯化的 5.8S rRNA、纯化的 5S rRNA、小 RNA（< 200 nt）、RNA marker）。（C）不同样品中 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图（从上到下依次为 $m^{1,6}A$ 标准品、tRNA、tRNA 加 $m^{1,6}A$ 标准品）。

中国知网 https://www.cnki.net

小 RNA（< 200 nt）主要由 tRNA、5S rRNA 和 5.8S rRNA 组成。为了进一步鉴定 $m^{1,6}A$ 的来源，我们对小 RNA（< 200 nt）进行了细分。已知，tRNA 的长度为 70-90 nt 左右，5S rRNA 的长度为 120 nt 左右，5.8S rRNA 的长度为 150 nt 左右。根据 tRNA、5S rRNA 和 5.8S rRNA 长度的差异，我们采用凝胶电泳进行分离和纯化。如**图 2-9A** 所示，凝胶电泳可以很好地将这三种 RNA 区分开。将相应的条带切下并通过回收可获得较纯的 tRNA、5S rRNA 和 5.8S rRNA。纯化后的 RNA 再通过凝胶电泳进行验证，结果表明条带位置基本与理论相符且条带单一（**图 2-9A** 和 **B**）。将提取的 tRNA、5S rRNA 和 5.8S rRNA 进行 LC-MS/MS 分析，结果显示 $m^{1,6}A$ 只存在 tRNA 中，而不存在于其他类型 RNA 中（**图 2-9C** 和 **2-8B**）。进一步的加标实验也证明了 tRNA 中存在 $m^{1,6}A$（**图 2-9C**）。

此外，我们还通过高分辨质谱进一步鉴定 tRNA 中检测到的 $m^{1,6}A$。基于现有腺苷甲基化修饰标准品的质谱碎裂规律，我们推测了 $m^{1,6}A$ 的二级碎片和三级碎片。$m^{1,6}A$ 经过 CID 解离后会先丢掉 132 Da 的核糖基团产生 *m/z* 164.0931 的碎片分子离子，对该分子离子进一步解离后会丢掉 41 Da 的 C_2H_2N 基团产生 *m/z* 123.0665 的碎片分子离子（**图 2-10**）。

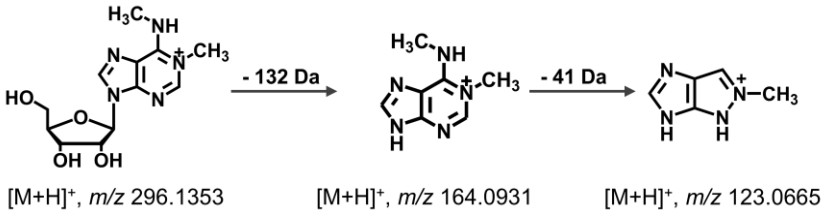


图 2-10 推测的 $m^{1,6}A$ 的质谱碎裂途径。

随后，我们对合成的 $m^{1,6}A$ 标准品以及 HEK293T 细胞 tRNA 中检测到的 $m^{1,6}A$ 分别进行了高分辨质谱分析。如**图 2-11** 所示，从 HEK293T 细胞 tRNA 中检测到的 $m^{1,6}A$ 与 $m^{1,6}A$ 标准品的色谱峰保留时间一致，且它的前体分子离子和二级碎片分子离子的测量值（*m/z* 以蓝色显示）与标准品的测量值（*m/z* 以蓝色显示）和理论值（*m/z* 以红色显示）基本吻合，误差在 10 ppm 以内（**图 2-11A-D**）。此外，对 $m^{1,6}A$ 标准品的二级碎片分子离子进行进一步的 CID 解离，产生的特征三级碎片分子离子（*m/z* 以蓝色显示）不仅与理论计算值（*m/z* 以红色显示）符合，还与 tRNA 中检测到的（*m/z* 以蓝色显示）基本一致（**图 2-11E** 和 **F**）。这些结果综合证明我们在 HEK293T 细胞 tRNA 中检测到的新修饰是 $m^{1,6}A$。

中国知网 https://www.cnki.net

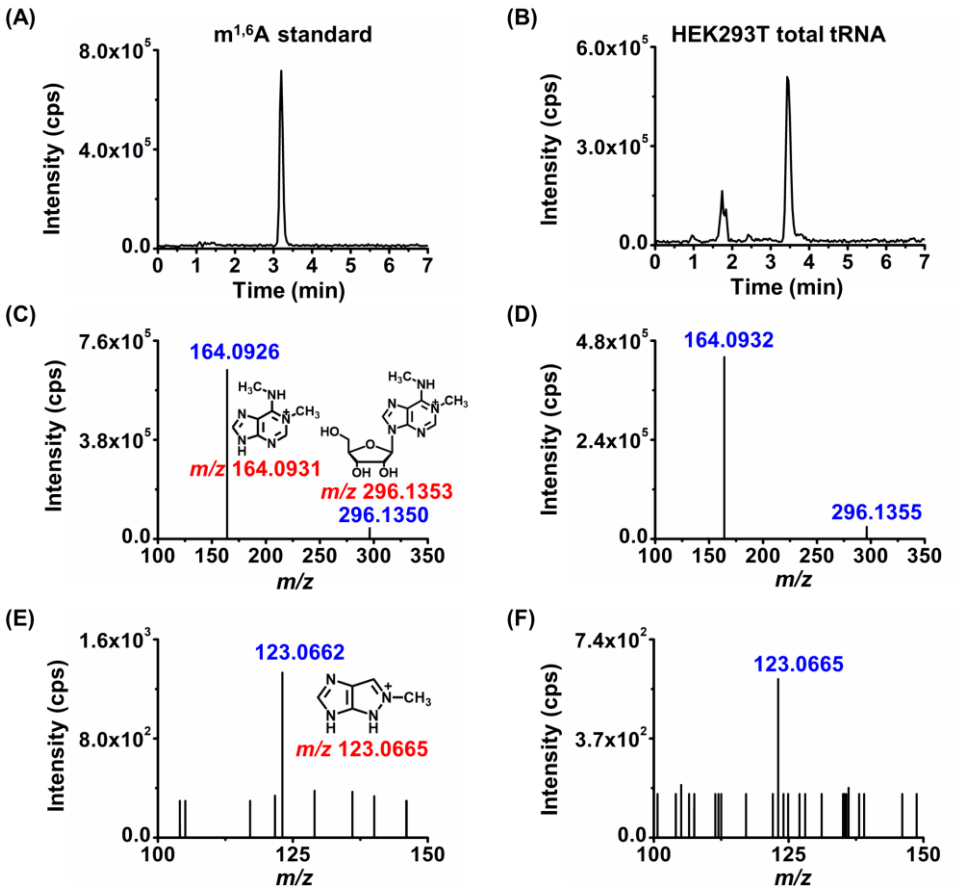


图 2-11 高分辨质谱鉴定 HEK293T 细胞 tRNA 中的 $m^{1,6}A$。（A）$m^{1,6}A$ 标准品的提取离子色谱图。（B）HEK293T 细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图。（C）$m^{1,6}A$ 标准品的二级质谱图。（D）HEK293T 细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的二级质谱图。（E）$m^{1,6}A$ 标准品的三级质谱图。（F）HEK293T 细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的三级质谱图。红色显示的是 *m/z* 理论值；蓝色显示的是 *m/z* 测量值。

综上，我们在哺乳动物细胞 RNA 中发现并鉴定了一种新型的双甲基修饰腺苷：$m^{1,6}A$，并发现该新修饰只存在于 tRNA 中。

2.3.3 细胞代谢标记分析

为了探究哺乳动物细胞 tRNA 中鉴定的新型双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$ 是否内源性甲基化修饰，我们进行了细胞代谢标记实验用于 $m^{1,6}A$ 的稳定同位素示踪分析。*S*-腺苷甲硫氨酸（*S*-adenosyl-L-methionine，SAM）是体内一种重要的中间代谢产物，也是绝大部分内源性 RNA 甲基化修饰的甲基供体。因此，为了验证 $m^{1,6}A$ 的内源性我们需要证明 $m^{1,6}A$ 的甲基供体是 SAM。SAM 在体内是通过

中国知网 https://www.cnki.net

甲硫氨酸（Met）和 ATP 在甲硫氨酸腺苷转移酶的作用下转化形成的。若 $m^{1,6}A$ 修饰存在于哺乳动物细胞 RNA 中，当我们在 HEK293T 细胞的 DMEM 培养基中添加有氘代标记的甲硫氨酸（D_3-Met），由此产生的氘代标记的 SAM（D_3-SAM）会在甲基转移酶的作用下将 CD_3 基团转移到 $m^{1,6}A$ 的甲基上生成相应的氘代产物。根据文献报道，甲基转移酶可以转移 CD_3 基团到甲基化修饰的任何位置。换而言之，$m^{1,6}A$ 可以是 *N*1 位带上 CD_3 基团，或者 *N*6 位带上 CD_3 基团，也可以是 *N*1 位和 *N*6 位同时带上 CD_3 基团。因此细胞经过 D_3-Met 处理后，RNA 中会产生 4 种 $m^{1,6}A$ 化合物，分别为：$m^{1,6}A$，D_3-$m^{1,6}A$（CD_3 标记在 *N*1 位）、D_3-$m^{1,6}A$（CD_3 标记在 *N*6 位）和 D_6-m^3Cm（CD_3 标记同时在 *N*1 位和 *N*6 位）（**图 2-12**）。

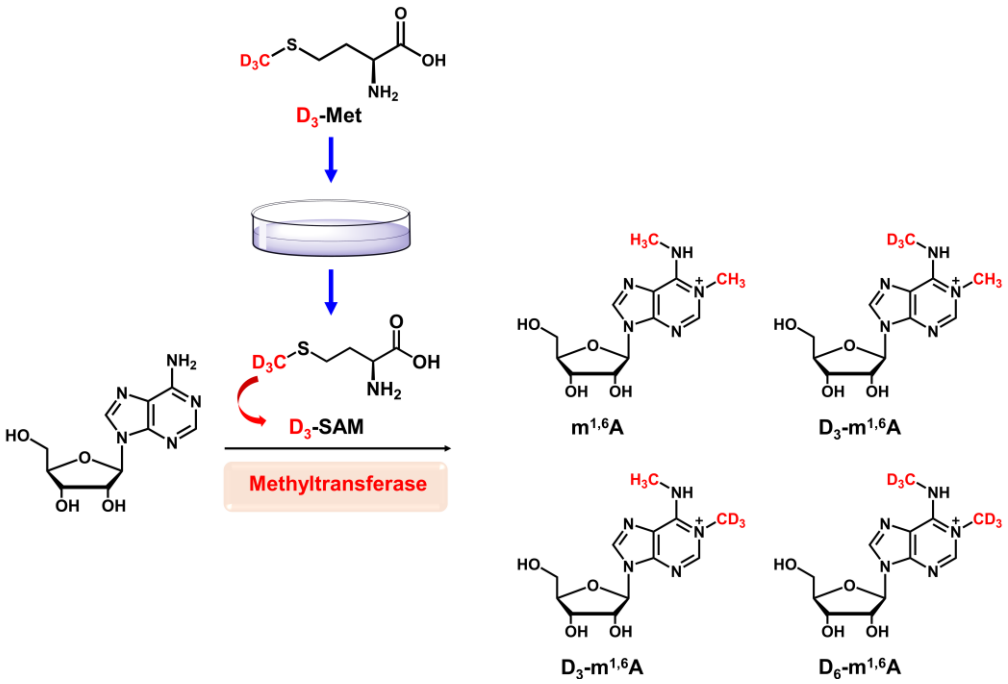


图 2-12 细胞代谢标记用于 $m^{1,6}A$ 的稳定同位素示踪产物分析。

将经过上述代谢标记后的 HEK293T 细胞进行 tRNA 的提取和 LC-MS/MS 分析。如**图 2-13** 所示，除了 $m^{1,6}A$（MRM：296.1→164.1）外，我们还分别检测到了 D_3-$m^{1,6}A$（MRM：299.1→167.1，由于两种氘代产物的色谱分离无法实现，所有无法区分是来自于 *N*1 位的 CD_3 标记还是 *N*6 位的 CD_3 标记）和 D_6-$m^{1,6}A$（MRM：302.1→170.1）两种氘代产物（**图 2-13A-C**）。该结果与我们的假设一致，表明 SAM 是 $m^{1,6}A$ 的甲基供体。我们在含有 0.2 mM 未标记 Met 的正常 DEME 培养基中，添加了 0.3 mM 的 D_3-Met，即培养基中 D_3-Met 的含量占总 Met 的 60%（D_3-Met/（D_3-Met + Met））。通过对 tRNA 中检测到的三种 $m^{1,6}A$

中国知网 https://www.cnki.net

化合物进行定量分析，结果显示大约 60%的 $m^{1,6}A$ 带有 CD_3 基团，与培养基中氘代的比例一致，表明检测到的 $m^{1,6}A$ 氘代产物上的 CD_3 基团来源于体内生成的 D_3-SAM（**表 2-5**）。此外，我们还在 HeLa 细胞中进行了同样的细胞代谢标记实验，结果与在 HEK293T 细胞中观察到的一致（**图 2-13D-E**）。总而言之，我们证明了 $m^{1,6}A$ 是哺乳动物细胞 tRNA 中的内源性甲基化修饰，且 SAM 是这个新修饰的甲基供体。

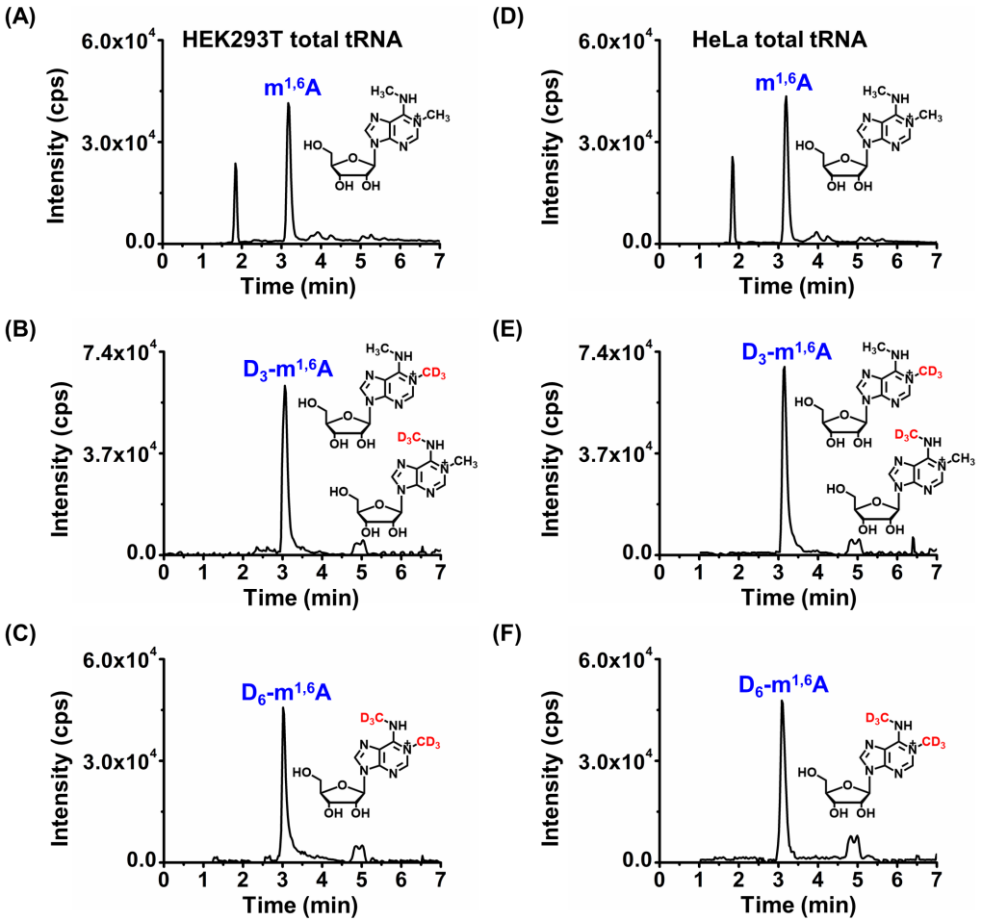


图 2-13 细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的稳定同位素示踪分析。（A）-（C）HEK293T 细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$（MRM：296.1→164.1）、D_3-$m^{1,6}A$（MRM：299.1→167.1）和 D_6-$m^{1,6}A$（MRM：302.1→170.1）的提取离子色谱图。（D）-（F）HeLa 细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$（MRM：296.1→164.1）、D_3-$m^{1,6}A$（MRM：299.1→167.1）和 D_6-$m^{1,6}A$（MRM：302.1→170.1）的提取离子色谱图。

表 2-5 细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的的氘代标记效率。

Cell	Deuteration labeling percentage of nucleobase (%)
HEK293T	61.8±2.2
HeLa	56.7±2.2

中国知网 https://www.cnki.net

2.3.4 方法学验证

为了定量分析 tRNA 中的腺苷修饰 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$，我们构建了 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的标准工作曲线。我们分别配置了一系列浓度（修饰核苷/正常核苷）范围的标准品溶液，通过分析物的峰面积比（修饰核苷/正常核苷）相对于分析物的浓度（修饰核苷/正常核苷）构建标准曲线。m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 标准曲线的线性相关系数 R^2 均大于 0.99（**表 2-6**），表明定量方法具有良好的线性。将信噪比为 3 时对应的值设定为检出限（limits of detection，LODs），将信噪比为 10 时对应的值设定为定量限（limits of quantification，LOQs）。m^1A 的 LOD 为 0.036 fmol，LOQ 为 0.12 fmol；m^6A 的 LOD 为 0.084 fmol，LOQ 为 0.28 fmol；$m^{1,6}A$ 的 LOD 为 0.071 fmol，LOQ 为 0.24 fmol（**表 2-6**）。通过相对误差（relative error，RE）和日内、日间相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）评估该方法的准确性和可重复性，结果显示 RE 和 RSD 分别小于 11.2% 和 12.4%（**表 2-7**），表明该方法具有良好的准确性和可重复性。

表 2-6 LC-MS/MS 分析腺苷甲基化修饰的方法学线性、检测限和定量限。

Nucleoside molar ratio	Linear range (%)	Calibration curve data			LODs (fmol)	LOQs (fmol)
		Slope	Intercept	R^2 value		
m^1A/G	0.02-20	0.2763	8.640×10^{-3}	0.9998	0.036	0.12
m^6A/G	0.002-2	0.1281	1.930×10^{-3}	0.9987	0.084	0.28
$m^{1,6}A/G$	0.0002-0.2	8.783	-1.135×10^{-4}	0.9999	0.071	0.24

表 2-7 LC-MS/MS 分析腺苷甲基化修饰的准确度和精确度。

Nucleoside molar ratio	QCs	Theoretical Value (%)	Measured Value (%)	Relative Error (%)	Intra-day RSD%, n=3	Inter-day RSD%, n=3
m^1A/G	Low	0.020	0.022	9.6	4.5	7.6
	Medium	1.0	1.0	3.5	3.1	6.5
	High	20.0	18.8	-6.1	2.8	8.7
m^6A/G	Low	0.0020	0.0019	-4.9	5.7	9.3
	Medium	0.10	0.10	2.7	1.0	3.3
	High	2.0	2.1	6.9	9.5	12.4
$m^{1,6}A/G$	Low	0.00020	0.00018	-9.1	7.8	13.1
	Medium	0.010	0.011	5.6	2.1	4.2
	High	0.20	0.18	-11.2	8.9	10.8

中国知网 https://www.cnki.net

2.3.5 哺乳动物细胞和组织中 $m^{1,6}A$ 的定量分析

为了证明 $m^{1,6}A$ 是哺乳动物细胞 RNA 中一种普遍存在的修饰，我们还对其它细胞系（HEK293T、HeLa、MCF-7、HepG2、Neuro-2a、HL-7702、Jurkat-T、K562 细胞）tRNA 中的 $m^{1,6}A$ 进行了检测。如**图 2-14A** 所示，这些细胞系的 tRNA 中均存在 $m^{1,6}A$，表明 $m^{1,6}A$ 普遍存在于哺乳动物细胞中。此外，我们还分析了小鼠脑组织和大鼠脑组织不同部位（OB、CE、MED、MID、THA、HYP、HP、ST、CC）tRNA 中的 $m^{1,6}A$，结果表明这些哺乳动物组织中普遍存在 $m^{1,6}A$（**图 2-14B**）。

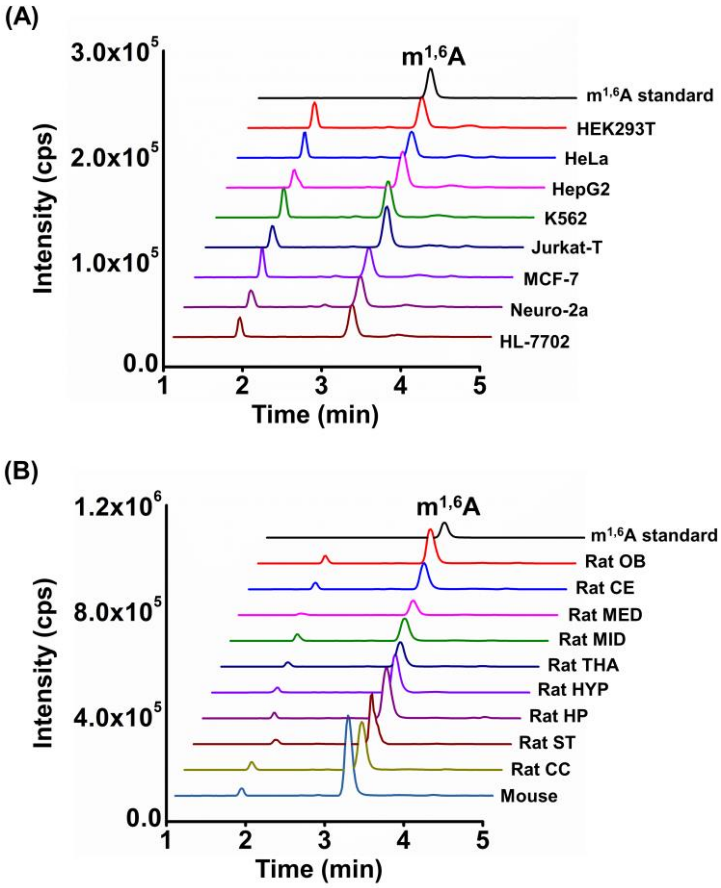


图 2-14 哺乳动物细胞和组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的检测。（A）不同细胞系 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的检测。（B）小鼠和大鼠脑组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的检测。

接着，我们用建立的方法对不同细胞系和不同组织 tRNA 中的腺苷甲基化修饰 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 进行定量分析。定量结果表明，哺乳动物细胞 tRNA 中 m^1A 的含量为 1.9%~2.6%（**图 2-15A**），与文献中报道的含量相当[83, 85]，表明我们的方法具有良好的准确性。此外，哺乳动物细胞 tRNA 中测得的 m^6A

中国知网 https://www.cnki.net

含量为 0.26%~0.53%（**图 2-15A**），$m^{1,6}A$ 含量为 0.0049%~0.0084%（**图 2-15B**）。哺乳动物脑组织 tRNA 中 m^1A 和 m^6A 的水平与细胞中的水平相当（**图 2-15C**），而脑组织中 $m^{1,6}A$ 的含量在 0.019%~0.047%之间（**图 2-15D**），大约是细胞中的数倍。

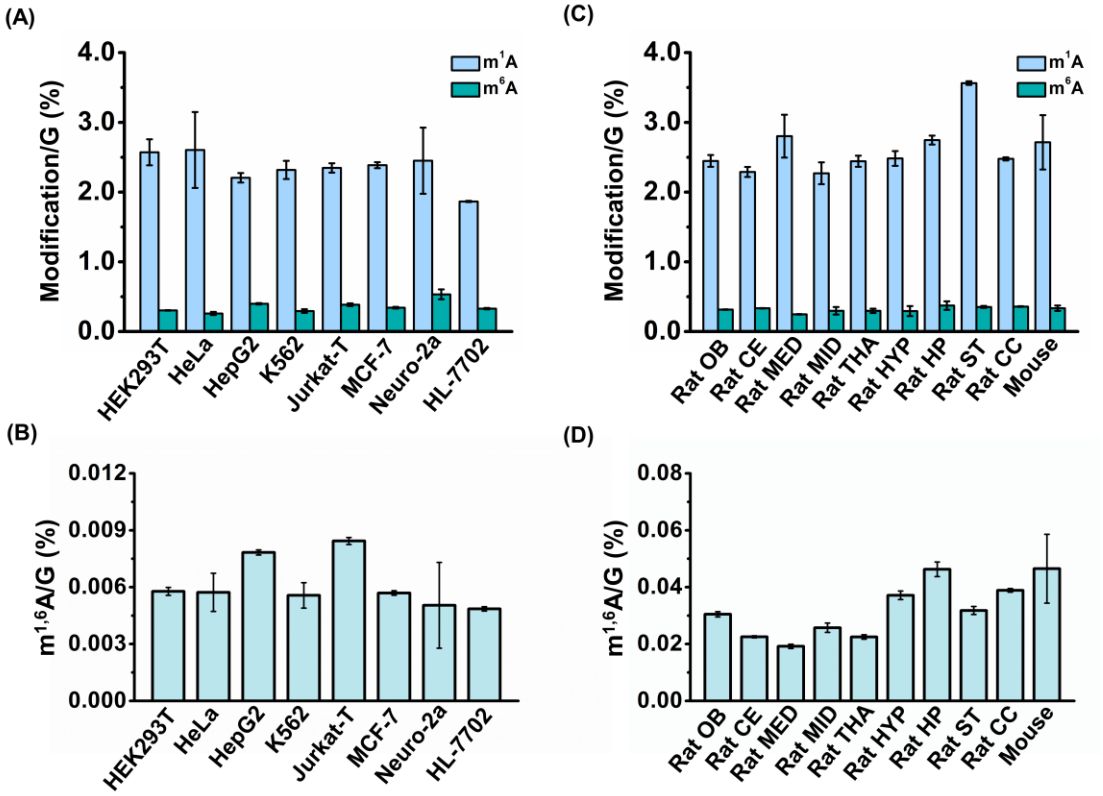


图 2-15 哺乳动物细胞和组织 tRNA 中腺苷甲基化修饰的定量分析。（A）-（B）哺乳动物不同细胞系 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的定量分析。（C）-（D）哺乳动物不同脑组织 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的定量分析。

2.3.6 乳腺癌组织中 $m^{1,6}A$ 的分析

RNA 修饰是重要的表观遗传修饰，与癌症的发生和发展密切相关[3]。为了进一步破译 $m^{1,6}A$ 潜在的生理学功能，我们对乳腺癌组织中的 $m^{1,6}A$ 进行了分析。利用建立的方法，我们定量分析了来自乳腺癌患者的 10 个组织样本（5 对肿瘤组织和肿瘤邻近的正常组织）tRNA 中的腺苷甲基化修饰，包括单甲基化修饰 m^1A、m^6A 以及双甲基化修饰 $m^{1,6}A$。统计结果显示，与肿瘤相邻的正常组织相比，m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的含量在乳腺癌组织中显著增加，表明 tRNA 中的 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 可能参与调控乳腺癌的发生和发展（**图 2-16**）。值得注意的是，

中国知网 https://www.cnki.net

癌组织中 $m^{1,6}A$ 的变化趋势与 m^1A 和 m^6A 的变化趋势一致，暗示 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的生物合成可能与 m^1A 和 m^6A 有关。

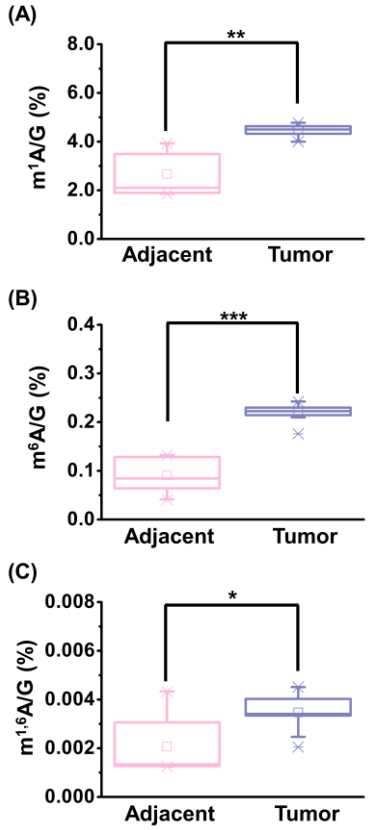


图 2-16 乳腺癌组织 tRNA 中 m^1A（A）、m^6A（B）和 $m^{1,6}A$（C）的定量分析。* $p < 0.05$，** $p < 0.01$，*** $p < 0.001$。

为了探索导致乳腺癌组织 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 含量增加的潜在原因，我们考察了组织中 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 基因的表达。因为 ALKBH1 可以催化 tRNA 中 m^1A 的去甲基化[83]，ALKBH3 可以同时催化 tRNA 中 m^1A 和 m^6A 的去甲基化[132]。实时定量 PCR 结果显示，与肿瘤邻近的正常组织相比，乳腺癌组织中 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 的 mRNA 水平普遍下调（**图 2-17A** 和 **B**），表明 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 在乳腺癌组织中的表达降低可能是导致乳腺癌组织 tRNA 中 m^1A 和 m^6A 的含量上调的因素之一。此外，m^1A 普遍位于哺乳动物细胞质 tRNA 的第 58 位，由甲基转移酶复合物 TRMT6/61A 催化形成[81, 82]。基于此，我们还检测了乳腺癌组织中 *TRMT6* 和 *TRMT61A* 基因的表达。实时定量 PCR 结果显示，与肿瘤邻近的正常组织相比，*TRMT6* 和 *TRMT61A* 的 mRNA 水平在乳腺癌组织中略有升高（**图 2-17C** 和 **D**），相较于 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 的变化不是那么显著。

中国知网 https://www.cnki.net

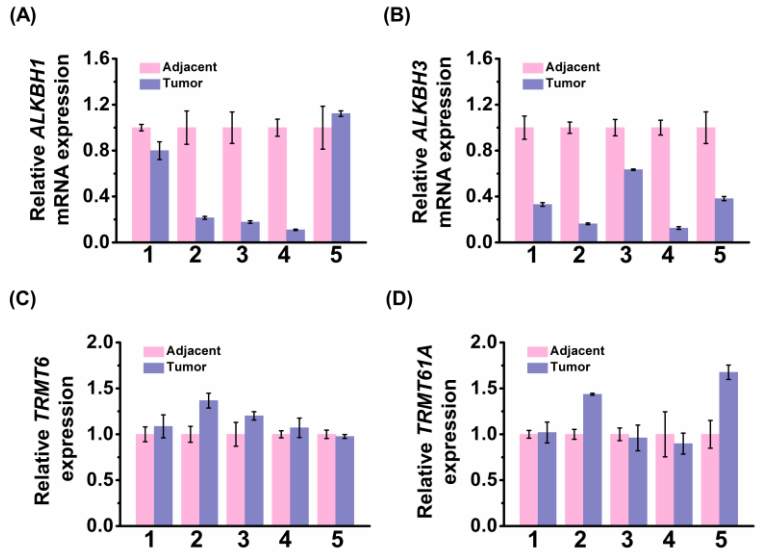


图 2-17 乳腺癌组织中 *ALKBH1*（A）、*ALKBH3*（B）、*TRMT6*（C）、*TRMT61A*（D）的 mRNA 表达水平分析。

这些结果综合表明乳腺癌组织 tRNA 中 m^1A 和 m^6A 的含量增加主要是由乳腺癌组织中 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 的表达降低所致，暗示 ALKBH1 和 ALKBH3 介导的 tRNA 中 m^1A 和 m^6A 的去甲基化可能参与调控乳腺癌的发生和发展。此外，鉴于 $m^{1,6}A$ 的含量在乳腺癌组织和正常组织中的显著性差异，tRNA 中的 $m^{1,6}A$ 可能也在乳腺癌的形成中发挥一定的作用。基于上述的实验现象，我们猜测乳腺癌组织中 $m^{1,6}A$ 含量的变化可能也是 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 的表达变化引起的。换句话说，$m^{1,6}A$ 的生物合成酶可能与 m^1A 和 m^6A 有关，即 ALKBH1 和 ALKBH3 可能对 $m^{1,6}A$ 也有去甲基化活性，这还需要进一步的验证。

2.4 结论

我们建立了 LC-MS/MS 分析腺苷甲基化修饰的方法。通过该方法，我们在哺乳动物 tRNA 中发现并鉴定了一种全新的双甲基腺苷修饰：$m^{1,6}A$。我们发现 $m^{1,6}A$ 是一种以 SAM 作为甲基供体的内源性修饰，普遍存在于哺乳动物细胞和组织的 tRNA 中。定量结果表明哺乳动物细胞 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量为 0.0049%~0.0084%，哺乳动物脑组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量为 0.019%~0.047%。此外，我们还发现乳腺癌组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量相较于正常组织显著升高，暗示 $m^{1,6}A$ 在乳腺癌发生和发展中的潜在作用。该研究发现和鉴定了一种新的修饰类型，扩大了哺乳动物 RNA 的修饰种类，增加了 RNA 修饰介导的基因表达调控多样性。

中国知网 https://www.cnki.net

第三章 哺乳动物 tRNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的功能研究

3.1 前言

RNA 中除了四种正常核苷腺嘌呤核苷（adenosine，A）、鸟嘌呤核苷（guanosine，G）、尿嘧啶核苷（uridine，U）和胞嘧啶核苷（cytidine，C）外，还包含丰富多样的化学修饰[75]。迄今为止，已在 RNA 中鉴定出 170 多种化学修饰[76]。进一步的研究表明 RNA 中的修饰是可逆的，能动态调控基因的表达，并最终调节多种生理过程和疾病的发展[297-299]。了解 RNA 修饰在生物内的功能可以提高人们对表观遗传修饰调控机制的认识。

转运 RNA（transfer RNA，tRNA）上的化学修饰是最丰富多样的，对 tRNA 的稳定性、解码和翻译有重要的影响[146, 300-303]。其中，腺嘌呤 *N*1 位置上发生的甲基化（*N*1-methyladenosine，m^1A）是一种重要的腺苷甲基化修饰，普遍存在于三个生命系统的 tRNA 中[78]。人类细胞 tRNA 中的 m^1A 主要位于保守 TΨC loop 环上的第 58 位，由甲基转移酶复合物 TRMT6/61A 催化形成[81, 82]。进一步的研究表明 tRNA 中的 m^1A 是动态可逆的，由去甲基化酶 ALKBH1[83]、ALKBH3[85]和 FTO[84]催化去甲基。tRNA 第 58 位的 m^1A 对 $tRNA^{iMet}$ 的稳定性至关重要[80]，ALKBH1 介导的 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A 的去甲基化会影响翻译起始和翻译延伸，揭示了 tRNA 的可逆甲基化作为转录后基因表达调控的新机制[83]。此外，ALKBH3 介导的 tRNA 中 m^1A 的去甲基化通过产生 tRNA 衍生的小 RNA（tRNA-derived small RNAs，tDRs）促进癌症的发展[85]。位于 tRNA 反密码子环和可变环上的修饰参与调控 tRNA 的解码和蛋白质的翻译[304-306]。tRNA 中修饰的位置往往与其相应的生物学功能有关，即位置决定功能[300, 303, 307]。

除了腺苷的单一甲基化修饰外，我们还在哺乳动物 tRNA 中鉴定了一种新型的腺苷双甲基化修饰：*N*1,N^6-二甲基腺苷（*N*1,N^6-dimethyladenosine，$m^{1,6}A$）。此外，我们还发现 $m^{1,6}A$ 在乳腺癌组织中的含量比癌旁组织高，暗示 $m^{1,6}A$ 可能也是一种 RNA 表观遗传修饰，具有调控乳腺癌发生发展的潜在功能。然而 $m^{1,6}A$ 在 tRNA 中发挥着什么作用并不清楚。由于 $m^{1,6}A$ 在 tRNA 中的具体位置和生物合成途径尚不可知，阻碍了我们对其功能的研究。

为了破译 $m^{1,6}A$ 的生物学功能，我们通过液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）进一步探索 tRNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的位置和生物合成途径。我们发现 $m^{1,6}A$ 修饰发生在 tRNA 的第 58

中国知网 https://www.cnki.net

位，推测是该位置的保守修饰 m^1A 的进一步 *N*6 位甲基化修饰产物。此外，我们还证明了新修饰 $m^{1,6}A$ 是动态可逆的，由去甲基化酶 ALKBH3 催化去甲基（**图 3-1**）。

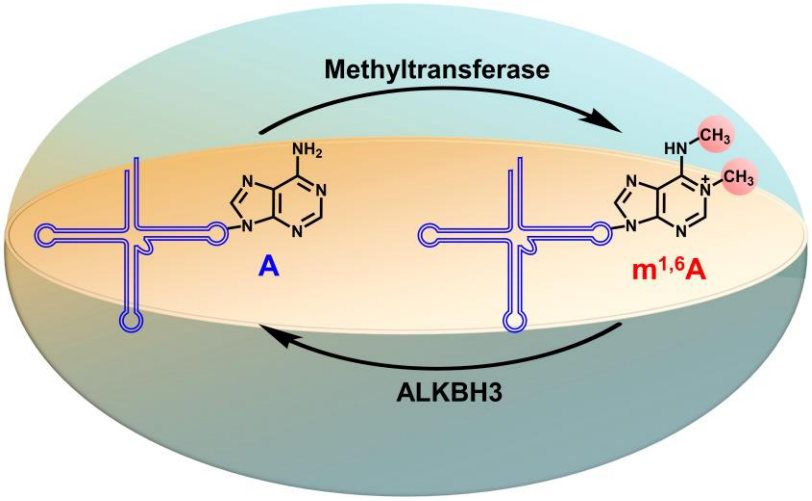


图 3-1 $m^{1,6}A$ 是发生在 tRNA 第 58 位的可逆修饰。

3.2 实验部分

3.2.1 化学试剂

本实验所需的核苷标准品如下：腺嘌呤核苷（adenosine，A）、鸟嘌呤核苷（guanosine，G）、尿嘧啶核苷（uridine，U）、胞嘧啶核苷（cytidine，C）、*N*1-甲基腺苷（*N*1-methyladenosine，m^1A）、N^6-甲基腺苷（N^6-methyladenosine，m^6A）、*N*7-甲基鸟苷（*N*7-methylguanosine，m^7G）、5-甲基胞苷（5-methylcytidine，m^5C）、*N*3-甲基胞苷（*N*3-methylcytidine，m^3C）。这些核苷标准品均购买自不同公司，它们的详细信息，包括分子式、CAS 号、分子量等可见**表 3-1**。N^1,N^6-二甲基腺苷（N^1,N^6-dimethyladenosine，$m^{1,6}A$）是自己合成的。

DMEM 培养基（Dulbecco's Modified Eagle Medium）、青霉素和链霉素均购买自 Thermo-Fisher Scientific 公司（北京，中国）。胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购买自 Biological Industries 公司（上海，中国）。蛇毒磷酸二酯酶 I 购买自 Sigma-Aldrich 公司（上海，中国）。碱性磷酸酶（calf intestine alkaline phosphatase，CIAP）、S1 核酸酶和 *S*-腺苷甲硫氨酸（*S*-adenosyl-L-methionine，SAM）均购买于 Takara Biotechnology 公司（大连，中国）。D_3-甲硫氨酸（L-methionine-(methyl-D_3)，D_3-Met）购买自 Aladdin 公司（上海，中国）。蛋白酶

中国知网 https://www.cnki.net

K 购自购自生工生物工程股份有限公司（上海，中国）。分析纯的甲酸购自 Sinopharm 公司（上海，中国），色谱纯的甲醇（MeOH）购自 Merck 公司（Darmstadt，Germany）。本章研究所使用的超纯水均取自 Millipore 公司（Bedford，MA）的 Milli-Q 纯水仪。

表 3-1 核苷标准品的详细信息。

Nucleosides	Abbreviation	CAS number	Molecular formula	Molecular weigh	Company
cytidine	C	65-46-3	$C_9H_{13}N_3O_5$	243.22	Sigma-Aldrich
uridine	U	58-96-8	$C_9H_{12}N_2O_6$	244.20	Sigma-Aldrich
guanosine	G	118-00-3	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283.24	Sigma-Aldrich
adenosine	A	58-61-7	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.24	Sigma-Aldrich
*N*3-methylcytidine	m^3C	2140-64-9	$C_{10}H_{15}N_3O_5$	257.24	Carbosynth
5-methylcytidine	m^5C	2140-61-6	$C_{10}H_{15}N_3O_5$	257.24	Sigma-Aldrich
*N*1-methyladenosine	m^1A	15763-06-1	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	281.27	J&K Scientific Ltd.
N^6-methyladenosine	m^6A	1867-73-8	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	281.27	Hanhong Chemical
*N*7-methylguanosine	m^7G	20244-86-4	$C_{11}H_{15}N_5O_5$	297.27	Carbosynth
*N*1,N^6-dimethyladenosine	$m^{1,6}A$	-	$C_{12}H_{17}N_5O_4$	295.29	Synthesized in the current study

3.2.2 细胞和细菌的培养

人类肾胚胎细胞系（HEK293T）购买自中国典型培养物菌种保藏管理中心。HEK293T 细胞在含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中于 37ºC、5% CO_2 环境中培养。

用于表达重组蛋白和质粒提取的细菌 BL21 (DE3)菌株购买自生工生物工程股份有限公司（上海，中国）。菌株在 LB 培养基中于 37ºC 在摇床中过夜培养 16 h。

3.2.3 含有 m^1A58 的特定类型 tRNA 的提取

通过 E.Z.N.A.MiRNA 试剂盒（Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA）按照操作手册提取 HEK293T 细胞的小 RNA（< 200 nt）。将提取的小 RNA

中国知网 https://www.cnki.net

（< 200 nt）通过 10%的 Urea-PAGE 进一步分离并纯化 HEK293T 细胞的总 tRNA。

参考文献，设计与 tRNA 的 3’端基因序列互补的 DNA 探针用于特定 tRNA 的纯化[83]。在该方案中，DNA 探针的 5’端被带上生物素标签，与 tRNA 杂交后通过链霉亲和素磁珠捕获生物素化的 tRNA/DNA 杂合体，再经蛋白酶 K 消化从磁珠上释放 tRNA/DNA 杂合体从而实现对特定 tRNA 的提取。

具体来说，首先取 20 μL PuriMag G-Streptavidin 磁珠（普睿迈格生物科技有限公司，厦门，中国）于磁力架上，用 100 μL 的 1×binding buffer（20 mM Tris-HCl，pH 8.0，0.5 M NaCl）洗涤磁珠 3 次，最后使磁珠重悬于 100 μL 的 1×binding buffer 中。接着，取 50 μL 的生物素化的 DNA 探针（40 μM）与 50 μL 等体积的 2×binding buffer（40 mM Tris-HCl，pH 8.0，1 M NaCl）混合，并将混合物加入到上述磁珠中轻轻混合，在室温下转动结合 30 min。结合完成后，使用 200 μL 的 1×binding buffer 清洗磁珠 4 次，并重悬于 100 μL 的 1×binding buffer 中。将 40 μL 凝胶纯化的总 tRNA（2.5 μg/μL）与 50 μL 的 2×binding buffer 混合并在 75ºC 加热 10 min 以破坏 tRNA 的二级结构。随后立即加入 10 μL 的 NaCl（5 M），混合后加入 DNA 探针包被的磁珠中，再在 75ºC 加热 10 min。此后，将混合液在室温下转到孵育 3 h，使 tRNA 与磁珠上互补的 DNA 探针完全结合。孵育完成后，使用 wash buffer（7 mM Tris-HCl，pH 8.0，0.17 M NaCl）洗涤磁珠数次，直至洗涤液在 260 nm 处的吸光度接近于零。最后加入 50 μL 无酶水和 2 μL 蛋白酶 K，在 55ºC 水浴下加热 40 min 把 tRNA 从磁珠上洗脱下来。提取的特定类型的 tRNA 通过 10%的 Urea-PAGE 进行检验。用于不同类型 tRNA 提取的 DNA 探针购自生工生物工程股份有限公司（上海，中国），序列如下：

tRNA $^{Gly(GCC)}$：5’ biotin-TGCATTGGCCGGGAATCGAACCCGGGCCTC；

tRNA $^{His(GUG)}$：5’ biotin-TGCCGTCACTCGGATTCGAACCGAGGTTGCTG；

tRNA $^{iMet(CAU)}$：5’ biotin-TAGCAGAGGATGGTTTCGATCCATCA。

3.2.4 含有 m^1A58 的特定 tRNA 片段的提取

为了获得 tRNA 的特定寡核苷酸片段，我们采用了 DNA 探针杂交结合 S1 核酸酶消化的策略。具体而言，将 600 ng 纯化的 tRNA$^{Gly(GCC)}$和 5 μM 22-mer 生物素标记的寡核苷酸（5’ biotin-GGCCGGGAATCGAACCCGGGCC）添加到缓冲液（50 mM Tris-Hcl，pH 7.0，5 mM $MgCl_2$）中，并使混合物在 70ºC 下加热 10 min，然后缓慢退火和杂交。随后，使用 10 U 的 S1 核酸酶在 23ºC 水浴下孵

中国知网 https://www.cnki.net

育 15 min 以消化 tRNA 中其他未杂交的片段以及溶液中过量的 DNA 探针。最后，根据上述磁珠纯化方法，使用 PuriMag G-Streptavidin 磁珠分离和提取含有 m^1A58 特定片段的 22-bp RNA/DNA 杂合体。提取的 22-bp RNA/DNA 杂合体通过 10%的 PAGE 进行验证。

3.2.5 LC-MS/MS 分析核苷

核苷的分析是在 LC-MS/MS 系统上进行的。该系统由配备电喷雾电离源的 Shimadzu 8045 质谱仪（Kyoto，Japan）和 Shimadzu LC-30AD 超高效液相色谱（ultra-performance liquid chromatography，UPLC）仪（Tokyo，Japan）组成。核苷的色谱分离是通过 Shimadzu 公司的 Shim-pack GIST 色谱柱（100 mm×2.1 mm i.d.，2.0 μm）在 40°C 的柱温下完成的。采用含有 0.05%甲酸的 H_2O（v/v，溶剂 A）和 MeOH（溶剂 B）作为流动相，在流速为 0.2 mL/min 的条件下对核苷进行梯度洗脱。流动相梯度设置如下：0-2 min, 5% B；2-10 min，5-80% B；10-12 min，80% B；12-13 min，80-5% B；13-20 min，5% B。核苷的质谱检测采用的是正离子模式和多反应监测(multiple reaction monitoring，MRM)模式。优化各核苷分析物的 MRM 参数作为最佳检测条件，最终的参数见**表 3-2**。

表 3-2 LC-MS/MS 分析核苷的 MRM 质谱参数。

Nucleosides	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)	RT (min)
C	244.1	112.1	-	-30.0	-	2.0
U	245.1	113.1	-	-30.0	-	3.1
G	284.1	152.1	-	-40.0	-	4.9
A	268.1	136.1	-	-50.0	-	4.8
m^3C	258.1	126.1	-21.0	-13.0	-22.0	2.0
m^5C	258.1	126.1	-21.0	-13.0	-22.0	2.4
m^1A	282.1	150.1	-11.0	-18.0	-29.0	2.2
m^6A	282.1	150.1	-11.0	-18.0	-29.0	6.4
m^7G	298.1	166.1	-12.0	-14.0	-17.0	2.8
$m^{1,6}A$	296.1	164.1	-11.0	-18.0	-28.0	3.2

中国知网 https://www.cnki.net

3.2.6 重组蛋白的表达与纯化

为了在 *E. coli* 菌株中表达重组人源 ALBKH3 蛋白（human ALKBH3，hALKBH3）、鼠源 ALBKH3 蛋白（mouse ALKBK3，mALKBH3）和人源 ALKBH1 蛋白，我们分别将 h*ALKBH3*、m*ALKBH3* 和 *ALKBH1* 基因克隆到含有谷胱甘肽 S-转移酶（Glutathione S-transferase，GST）标签的质粒 pGEX-4T1 中。人源 METTL16 蛋白的表达，则是将 *METTL16* 基因的催化结构域（1-310，简称 MTD16）插入到质粒 pET28 (a)中。这些用于表达蛋白质的质粒均购自擎科生物科技有限公司（北京，中国），并通过 DNA 测序确认构建体。将构建的载体转化到 BL21 (DE3)菌株中，在 37ºC 的 LB 培养基中生长。等到细菌的 OD 600 达到 0.8-1.2 之间，加入 0.5 mM 异丙基硫代半乳糖苷（isopropylβ-D-thiogalactopyranoside，IPTG），并在 16ºC 下继续培养细菌 20 h 以诱导蛋白的表达。最后通过离心（3300 rpm，4ºC，20 min）收获细菌。

对于蛋白 ALKBH1、hALKBH3 和 mALKBH3 的纯化，将细菌收集在含有蛋白酶抑制剂的 PBS 缓冲液（136 mM NaCl，2.6 mM KCl，8 mM Na_2HPO_4，2 mM KH_2PO_4，2 mM DTT）中。通过超声破碎细菌后进行离心取上清，用 GST 亲和磁珠纯化上清液中的蛋白。使用 PBS 缓冲液洗涤异源蛋白后,加入 Cryonase™ Cold-Active Nuclease（Takara Biotechnology Co., Ltd, 大连, 中国）在 4ºC 反应 1 h 去除核酸污染。最后通过 20 mM 还原型谷胱甘肽洗脱重组蛋白。对于 MTD16 蛋白的纯化，首先将细菌收集在裂解缓冲液（20 mM Tris-HCl 8.0，150 mM NaCl）中，随后通过 Ni-NTA 的亲和性纯化蛋白，最后用 20 mM Tris-HCl（pH 8.0）、150 mM NaCl 和 250 mM 咪唑洗脱蛋白。纯化的重组蛋白通过 SDS-PAGE 验证，储存在-80ºC 冰箱。

3.2.7 重组蛋白的生物活性测定

重组蛋白的体外生物活性测定参考文献并稍作修改[83, 85, 308, 309]。对于去甲基化活性测定，反应体系（20 μL）由 10 μM 重组 ALKBH1 或 hALKBH3 或 mALKBH3 蛋白、600 ng 总 tRNA、100 mM KCl、2 mM $MgCl_2$、RNase Inhibitor（0.2 U/μL）、2 mM L-抗坏血酸、1 mM α-酮戊二酸、150 mM $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2·6H_2O$ 和 50 mM Tris-HCl（pH 7.0）组成，混合物在 37ºC 水浴中反应 3 h。对于甲基化活性测定，含有 50 mM Tris-HCl（pH 8.0）、200 mM NaCl、2 mM $MgCl_2$、1 mM DTT、RNase Inhibitor（0.2 U/μL）、1 mM *S*-腺苷甲硫氨酸

中国知网 https://www.cnki.net

（*S*-adenosyl-L-methionine，SAM）、20 μM 重组 MTD16 蛋白和 5 pmol 的 hairpin RNA（5’-CUUGUUGGCGUAGGCUACAGAAAAGCCUUCAAG-3’）或 100 ng 总 tRNA 的反应溶液，在 37ºC 水浴下反应 3 h。将经过 95ºC 加热 10 min 后失活的蛋白作为阴性对照。所有反应的终止均通过 95ºC 加热 10 min。

D_3-SAM 是通过体外酶促反应合成的。具体来说，含有 150 mM Tris-HCl（pH 8.0）、8 mM 还原型谷胱甘肽、20 mM $MgCl_2$、200 mM KCl、5 mM ATP、10 mM D_3-Met 和 10 μg 甲硫氨酸腺苷转移酶（methionine adenosyltransferase，MAT，Ambition Biotechnology Co., Ltd，北京，中国）的混合物（100 μL），在 37ºC 下孵育 1 h 后通过 LC-MS 监测产物。

3.2.8 细胞中 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 的过表达

为了实现 HEK293T 细胞中 *ALKBH1*、*hALKBH3* 和 *mALKBH3* 的过表达，我们构建了含有 *ALKBH1* 基因的质粒 pCMV-ALKBH1-EGFP、含有 *hALKBH3* 基因的质粒 pCMV Sport6-hALKBH3 和含有 *mALKBH3* 基因的质粒 pCMV Sport6-mALKBH3。质粒均购自生工生物工程股份有限公司（上海，中国），并通过测序确认。按照制造商推荐的方法，采用转染试剂 lipofectamine 3000（Invitrogen，USA）将质粒转入 HEK293T 细胞中。相应的不含目标基因的空质粒（pCMV-EGFP 和 pCMV Sport6）作为阴性对照转入 HEK293T 细胞中。细胞转染 8 h 后更换新鲜培养基，之后继续培养 40 h 收集细胞并提取总 tRNA 用于 LC-MS/MS 分析。

3.2.9 细胞中 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 的敲低

为了实现 HEK293T 细胞中 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 的敲低，我们采用了 RNA 干扰技术。小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）双链能够特异性沉默目标基因，达到降低基因表达的目的。为此，我们设计并合成了特异性靶向人类 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* mRNA 的 siRNA，以及非靶向的阴性对照 siRNA。所有的 siRNA 均购自擎科生物科技有限公司（北京，中国），详细的序列见**表 3-3**。根据制造商的说明，使用 Lipofectamine 2000 试剂（Invitrogen，USA）将 *ALKBH1* siRNA、*ALKBH3* siRNA 和相应的对照 siRNA 转染至 HEK293T 细胞中。细胞转染 8 h 后更换新鲜培养基，之后继续培养 40 h 收集细胞并提取总 tRNA 用于 LC-MS/MS 分析。

中国知网 https://www.cnki.net

表 3-3 用于细胞中敲低 *ALKBH1* 和 *ALKBH3* 的 siRNA 序列。

Name	Sequence
ALKBH1 siRNA	5’-GGAUGACCAGAAUAGCGAATT-3’
	3’-TTCCUACUGGUCUUAUCGCUU-5’
Control siRNA	5’-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3’
	3’-TTAAGAGGCUUGCACAGUGCA-5’
ALKBH3 siRNA	5’ -GAGAGAAGCUUCACUGAAATT-3’
	3’-TTCUCUCUUCGAAGUGACUUU-3’
Control siRNA	5’-AUCCGCGCGAUAGUACGUATT-3’
	3’-TTUAGGCGCGCUAUCAUGCAU-5’

3.2.10 蛋白质印迹分析

基因过表达和敲低的 HEK293T 细胞转染 72 h 后收获用于蛋白质印迹（Western Blot）分析。首先使用 RIPA 裂解缓冲液（Beyotime Biotechnology，Shanghai，China）裂解 HEK293T 细胞，并使用 BCA 试剂盒（Beyotime Biotechnology，Shanghai，China）按照说明书测定蛋白质浓度。随后通过 SDS-PAGE 分析蛋白质并将蛋白质从凝胶转移到 PVDF 膜（Millipore）。接着使用含有 5% BSA 固体的 TBST 缓冲液（50 mM Tris-HCl，pH 7.6，150 mM NaCl 和 0.1% Tween-20）在室温下封闭膜 1 h。封闭结束后，使用适当稀释度的一抗在室温下孵育 2 h。一抗孵育结束后，用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次（每次 5 min），接着用 HRP 偶联的二抗在室温下继续孵育 1 h。二抗孵育结束后，用 TBST 缓冲液洗涤 3 次（每次 5 min）。最后使用 ECL 蛋白质印迹底物试剂盒（ComWin Biotech Co.，Ltd.，北京，中国）产生化学发光信号，并通过 Tanon-4600SF 化学发光检测器（Tanon，上海，中国）检测信号。特异性识别 ALKBH1（Abcam，ab12889，Cambridge，MA）、ALKBH3（Abcam，ab93174，Cambridge，MA）和 GAPDH （Cell Signaling Technology，Danvers，MA）的抗体分别经 1:2000、1:2000 和 1:3000 稀释后使用。以 1:10000 的稀释度使用 HRP 偶联的山羊抗兔二抗（Abcam，ab6721，Cambridge，MA）。

3.2.11 统计学分析

通过 Origin 8.5 软件对数据进行分析，并采用 t 检验的方法评估数据间的差

中国知网 https://www.cnki.net

异。所有的 p 值都采取双边（two-sided）检验，$p < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3.3 结果与讨论

3.3.1 含有 m^1A58 特定类型 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的检测

基于 $m^{1,6}A$ 的结构，我们不难发现它的生物合成与 tRNA 中的 m^1A 和 m^6A 紧密相关。鉴于此，我们对 $m^{1,6}A$ 的生物合成过程有两种假设：一种是 m^1A 经过进一步 *N*6 位甲基化形成 $m^{1,6}A$；另一种是 m^6A 经过进一步 *N*1 位甲基化形成 $m^{1,6}A$。两种过程均涉及到 m^1A 的甲基转移酶和 m^6A 的甲基转移酶。

目前几乎没有关于 tRNA 中 m^6A 位置信息和甲基转移酶的相关报道。tRNA 第 58 位的 m^1A（m^1A58）是哺乳动物细胞质 tRNA 中的一种高度保守的修饰，几乎发生在所有 tRNA 中[86]。tRNA 中的 m^1A58 是由甲基转移酶复合物 TRMT6/61A 催化生成的[81, 82]。进一步的研究对该甲基转移酶复合物与 tRNA 结合的晶体结构进行了解析，发现该甲基转移酶复合物对底物 tRNA 的二级结构高度保守，即只能催化位于 tRNA TΨC loop 环上第 58 位的腺苷[82]。基于 m^1A 甲基转移酶复合物 TRMT6/61A 的催化特性，我们认为不可能在 tRNA 除第 58 位以为的其他位置发生 *N*1 位甲基化修饰。因此我们猜测 tRNA 中的新修饰 $m^{1,6}A$ 上的 *N*1 位甲基化修饰来自于第 58 位，即 $m^{1,6}A$ 也发生在 tRNA 的第 58 位（$m^{1,6}A58$）。此外，没有文献报道 tRNA 第 58 位存在 m^6A 修饰，因此我们认为 $m^{1,6}A58$ 是 m^1A58 经过进一步 *N*6 甲基化所形成的。

综上，我们认为 $m^{1,6}A58$ 存在于含有 m^1A58 的 tRNA 中。为了验证我们的猜想，我们通过 DNA 探针分别纯化了三种含有 m^1A58 的 tRNA：$tRNA^{Gly(GCC)}$、$tRNA^{His(GUG)}$、$tRNA^{iMet(CAU)}$，并对其进行 LC-MS/MS 分析（**图 3-2A**）。结果表明三种 tRNA 均含有 $m^{1,6}A$（**图 3-2B**）。此外，定量结果显示特定类型 tRNA 中 m^1A 的含量为 2.6%~3.2%（**图 3-2C**），$m^{1,6}A$ 的含量为 0.0016%~0.0060%（**图 3-2D**），暗示约有 0.1%~0.2%的 m^1A 被进一步甲基化为 $m^{1,6}A$。该实验证明了 $m^{1,6}A$ 存在于含有 m^1A58 的 tRNA 中，但是 $m^{1,6}A$ 是否来源于 m^1A58 是否也位于 tRNA 的第 58 位还需进一步实验验证。

中国知网 https://www.cnki.net

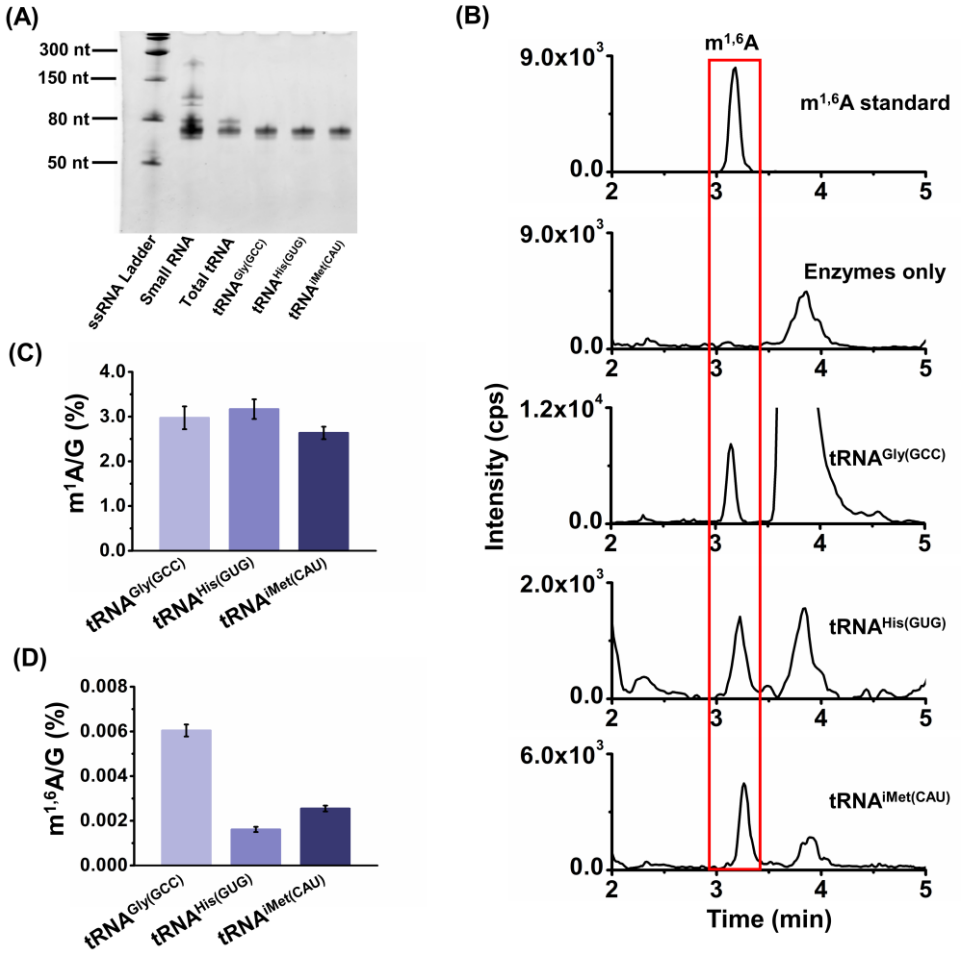


图 3-2 不同类型 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的检测。（A）提取的不同类型 tRNA 的凝胶电泳分析（从左到右的泳道依次为 RNA marker、小 RNA（< 200 nt）、$tRNA^{Gly(GCC)}$、$tRNA^{His(GUG)}$、$tRNA^{iMet(CAU)}$）。（B）不同样品中 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图（从上到下分别为 $m^{1,6}A$ 标准品、酶空白样品、$tRNA^{Gly(GCC)}$、$tRNA^{His(GUG)}$、$tRNA^{iMet(CAU)}$）。（C）不同类型 tRNA 中 m^1A 的定量分析。（D）不同类型 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的定量分析。

3.3.2 含有 m^1A58 特定 tRNA 片段中 $m^{1,6}A$ 的检测

为了进一步证实我们关于 $m^{1,6}A$ 生物合成路径的猜想，我们接下来探索 $m^{1,6}A$ 是否位于 tRNA 的第 58 位。为此，我们采用 $tRNA^{Gly(GCC)}$作为研究对象，因为 $tRNA^{Gly(GCC)}$拥有一段仅包含一个腺苷（m^1A58）的 22-nt 寡核苷酸片段（**图 3-3**A）。为了验证 $m^{1,6}A$ 是否发生在 tRNA 的第 58 位，我们采用了 DNA 探针杂交结合 S1 核酸酶消化的策略。在该策略中，首先设计一段生物素标记的 DNA 探针与 tRNA 中含有 m^1A58 的 22-nt 寡核苷酸片段退火杂交，之后采用微

中国知网 https://www.cnki.net

量的 S1 核酸酶对未杂交的 tRNA 中其他区域进行消化，剩下生物素标记的含有 m^1A58 的 22-bp RNA/DNA 杂合体，最后利用链霉亲和素磁珠纯化和蛋白酶 K 消化获得含有 m^1A58 的 22-bp RNA/DNA 杂合体（**图 3-3B**）。

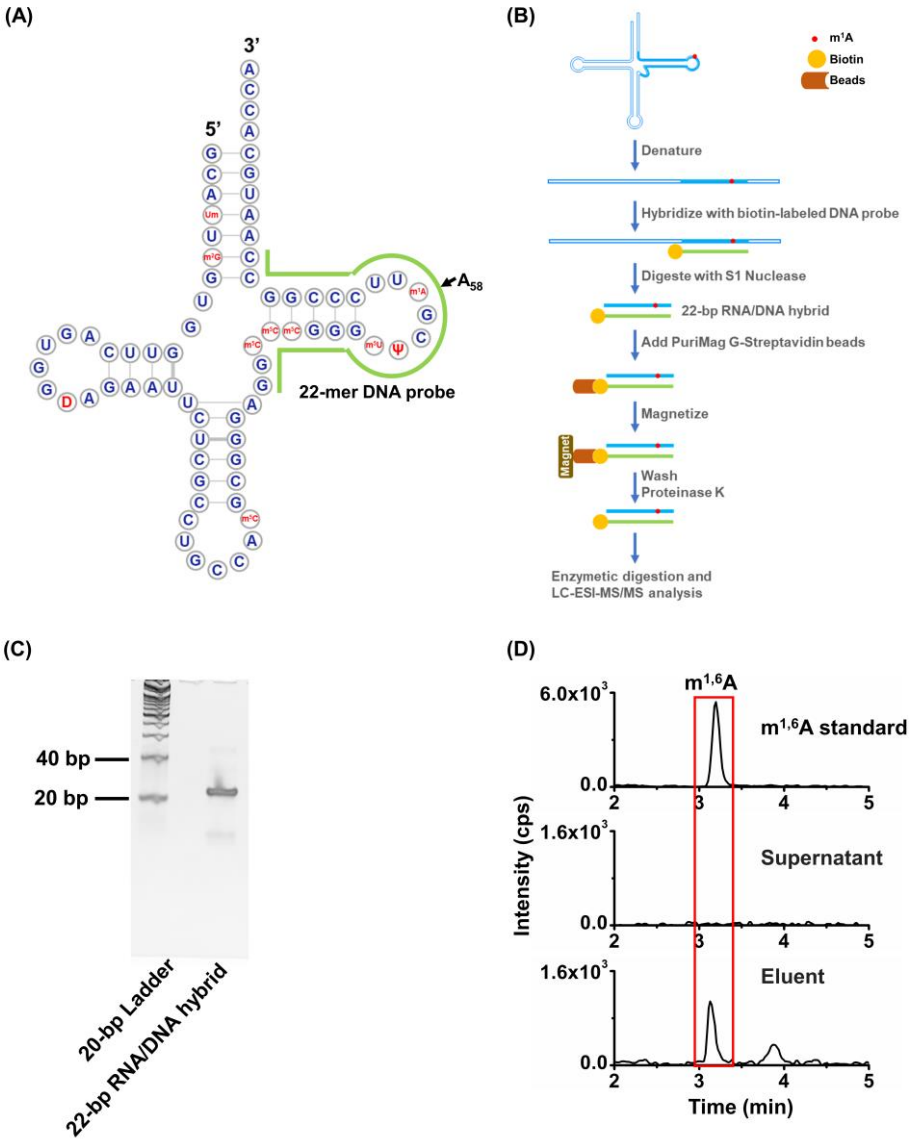


图 3-3 含有 m^1A58 特定 tRNA 片段中 $m^{1,6}A$ 的检测。（A）$tRNA^{Gly(GCC)}$的结构和序列示意图。绿色现条包围的区域为 DNA 探针杂交的区域，红色代表不同的化学修饰。（B）DNA 探针杂交结合 S1 核酸酶消化策略提取含有 m^1A58 特定 tRNA 片段的流程图。（C）提取的 22-bp RNA/DNA 杂合体的凝胶电泳分析。（D）不同样品中 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图（从上到下分别为 $m^{1,6}A$ 标准品、磁珠结合后的上清 RNA、洗脱的 22-bp RNA/DNA 杂合体）。

我们通过凝胶电泳验证了提取的含有 m^1A58 的 22-bp RNA/DNA 杂合体的长度，与预期符合（**图 3-3C**）。将该杂合体酶解进行质谱分析，结果显示洗脱

中国知网 https://www.cnki.net

的 22-bp RNA/DNA 杂合体（包含 m^1A58）中含有 $m^{1,6}A$，与之相反的磁珠结合后的上清即未被杂交的 tRNA 其他区域（不包含 m^1A58）并未检测到 $m^{1,6}A$（**图 3-3D**），表明 $tRNA^{Gly(GCC)}$ 中的 22-nt 寡核苷酸片段（包含 m^1A58）含有 $m^{1,6}A$。由于该 22-nt 寡核苷酸片段上只含有一个位于第 58 位的腺苷，因此我们检测到的 $m^{1,6}A$ 理论上来自于该位点，即 $m^{1,6}A$ 发生在 tRNA 的第 58 位。定量结果显示该片段上 m^1A 的含量约为 9.0%，$m^{1,6}A$ 的含量约为 0.020%，表明 tRNA 的第 58 位约有 0.2%的 m^1A 转化为 $m^{1,6}A$（**表 3-4**）。该结果与上述特定类型 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 与 m^1A 的相对定量结果基本保持一致。综上，$m^{1,6}A$ 发生在 tRNA 的第 58 位，推测是源于 m^1A58 的进一步 *N*6 位甲基化。

表 3-4 不同样品中 m^1A 和 $m^{1,6}A$ 的定量分析。

Sample	m^1A (%)	$m^{1,6}A$ (%)
Eluent Repeat 1	9.2	0.025
Eluent Repeat 2	8.8	0.022
Eluent Repeat 3	8.9	0.020

3.3.3 METTL16 催化 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 形成的研究

之前的研究表明 tRNA 中的新修饰 $m^{1,6}A$ 是一种内源性的依赖 SAM 的腺苷双甲基化修饰。为了更好地了解它的生物学功能我们需要探索该修饰在体内的生物合成酶。从上述的定位分析中我们发现 $m^{1,6}A$ 位于 tRNA 的第 58 位（$m^{1,6}A58$），推测是来自于 m^1A58 的进一步 *N*6 甲基化，即 $m^{1,6}A58$ 的生物合成是腺苷先经过 *N*1 甲基化形成 m^1A58，再经过 *N*6 甲基化形成 $m^{1,6}A58$。由于 tRNA 中 m^1A58 的生物合成酶已被报道是甲基转移酶复合物 TRMT6/61A[81, 82]。因此，探索 $m^{1,6}A$ 的生物合成酶，我们需要探索能识别 m^1A58 并在 *N*6 位置发生进一步甲基化形成 $m^{1,6}A$ 的甲基转移酶。简而言之，我们需要探索 tRNA 中 m^6A 甲基转移酶对 m^1A58 的潜在 *N*6 位甲基化活性。

目前没有关于 tRNA 中 m^6A 甲基转移酶的报道。m^6A 是真核生物 mRNA 中一种重要的表观遗传修饰，已被研究得较为透彻[76]。mRNA 中的 m^6A 由甲基转移酶复合物催化形成，该复合物以 METTL3/METTL14 为核心，并伴随多个亚基组成[98]。进一步的晶体学研究表明，METTL3/METTL14 是相互协同作用的稳定复合物，其中 METTL3 是具有催化活性的亚基，METTL14 可以促进复合物与 RNA 的结合[101]。m^6A 全转录组测序结果揭示了 METTL3/METTL14 复合物的结合位点拥有共同基序 RRAC（R=A/G）[106]。此外，甲基转移酶

中国知网 https://www.cnki.net

METTT16 也可作用于 mRNA 前体的内含子区域生成相应的 m^6A[107]。METTL16 结合位点的全转录组图谱也发现了 METTT16 的其他靶标 RNA，包括 U6 snRNA 和其他高度结构化的非编码 RNA，表明 METTL16 可以识别具有特定二级结构特征的底物[107]。除了 mRNA 中存在 m^6A 外，18S rRNA 和 28S rRNA 也存在 m^6A，分别由甲基转移酶 METTL5/TRMT112[129] 和 ZCCHC415[130]催化形成。

tRNA 中的 m^1A58 位于 tRNA 的 TΨC loop 环，具有 GUUCRA（R=A/G）基序[86]。因此，tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的 *N*6 位甲基转移酶要能够识别这样的基序和二级结构。从已报道的 m^6A 的各种甲基转移酶中我们可以发现甲基转移酶 METTL3/METTL14 复合物、METTL5/TRMT112 复合物和 ZCCHC4 都具有很强的底物特异性，不适用于 tRNA 中 m^1A58 的进一步 *N*6 甲基化。值得注意的是，METTL16 甲基转移酶的底物较为广泛，没有明显的识别基序，且能够识别具有二级结构的底物，可以作为 $m^{1,6}A$ 上 *N*6 位甲基转移酶的最佳候选蛋白。

为此，我们体外表达并纯化了重组的 METTL16 蛋白的截短蛋白 MTD16（**图 3-4**A），MTD16 具有与 METTL16 蛋白相似的活性[308, 309]。通过一段合成的带有 MTD16 识别位点（AC<u>A</u>GA）的 hairpin RNA 验证 MTD16 蛋白的活性（**图 3-4**B）。具体来说，通过 LC-MS/MS 监测 hairpin RNA 经 MTD16 蛋白孵育后 m^6A 的生成。与 95°C 灭活 MTD16 蛋白的对照组相比，实验组中 MTD16 蛋白能甲基化 hairpin RNA 特定位点的 A 形成 m^6A，甲基化效率高达 60%（**图 3-4C**）。该结果表明纯化的 MTD16 蛋白具有较强的活性，能用于后续的实验。

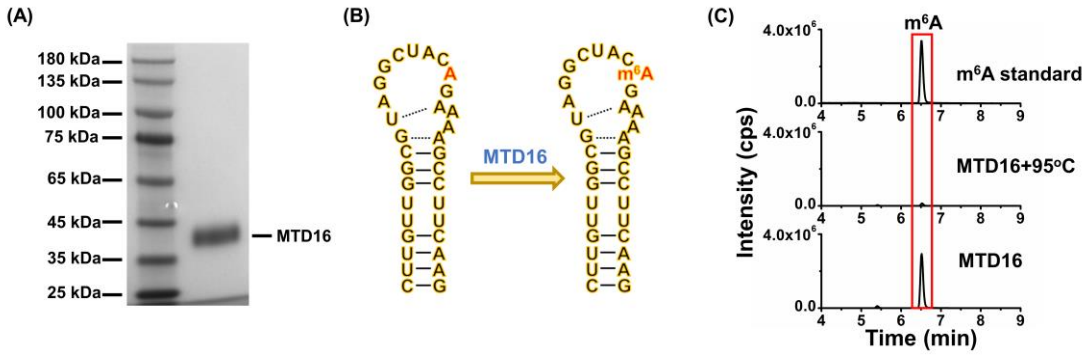


图 3-4 体外重组蛋白 MTD16 的活性测定。（A）体外重组蛋白 MTD16 的 SDS-PAGE 验证。（B）重组蛋白 MTD16 催化 hairpin RNA 中特定位点 m^6A 形成的示意图。（C）不同样品中 m^6A 的提取离子色谱图（从上到下依次为 m^6A 标准品、95°C 灭活 MTD16 蛋白孵育的 hairpin RNA、MTD16 蛋白孵育的 hairpin RNA）。

中国知网 https://www.cnki.net

随后，我们将从 HEK293T 细胞中纯化出的 tRNA 在 SAM 存在下与 MTD16 蛋白孵育，并通过 LC-MS/MS 监测 $m^{1,6}A$ 的变化。如**图 3-5** 所示，对照组和实验组 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量没有明显差异，m^6A 也没有明显变化，表明 METTL16 不是 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 和 m^6A 的 *N*6 位甲基转移酶。

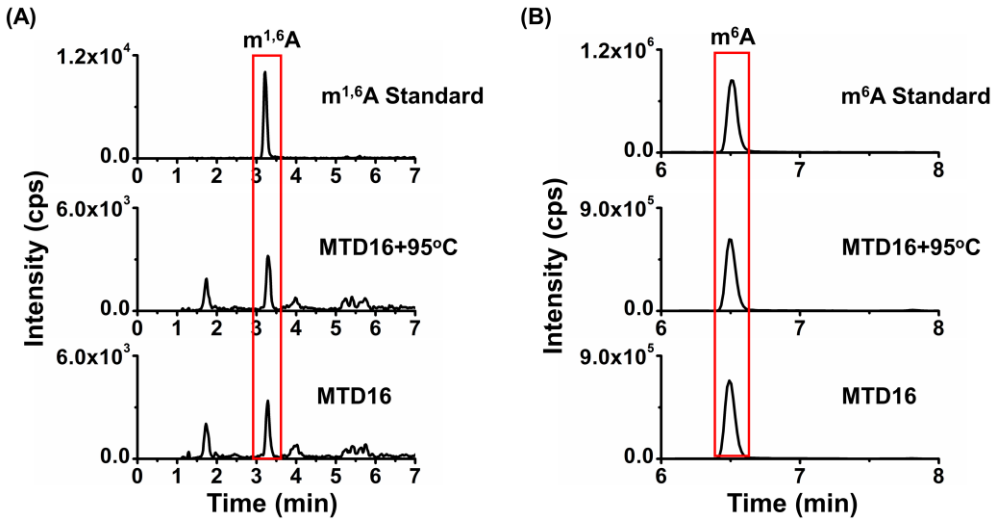


图 3-5 重组蛋白 MTD16 对 tRNA 的甲基化活性测定（SAM 作为甲基供体）。（A）不同样品中 $m^{1,6}A$ 的提取离子色谱图（从上到下依次为 $m^{1,6}A$ 标准品、95°C 灭活 MTD16 蛋白孵育的总 tRNA、MTD16 蛋白孵育的总 tRNA）。（B）不同样品中 m^6A 的提取离子色谱图（从上到下依次为 m^6A 标准品、95°C 灭活 MTD16 蛋白孵育的总 tRNA、MTD16 蛋白孵育的总 tRNA）。

为了更直观地观察 $m^{1,6}A$ 的生成，我们决定采用 D_3-SAM 作为甲基供体检测 D_3-$m^{1,6}A$ 的生成。如果 METTL16 是 $m^{1,6}A$ 的 *N*6 位甲基转移酶，D_3-SAM 会在 METTL16 的催化下将 CD_3 基团转移到 $m^{1,6}A$ 的 *N*6 位置形成 D_3-$m^{1,6}A$。首先我们利用 D_3-Met 和 ATP 在体外通过酶促反应合成 D_3-SAM，并通过 LC-MS 监测 D_3-SAM 的生成（**图 3-6A**）。如**图 3-6B** 和 **C** 所示，与未加 ATP 只加 D_3-Met 和 MAT 的样品相比，加入 ATP 后出现了一个 *m/z* 402.1 的质谱峰，与 D_3-SAM 的理论计算值吻合，表明我们成功地合成了 D_3-SAM。随后将合成的 D_3-SAM 代替 SAM 加入到 MTD16 蛋白与 tRNA 的孵育中进行 LC-MS/MS 分析。同样地，我们没有监测到任何 D_3-$m^{1,6}A$ 的生成，进一步证明 METTL16 不是 $m^{1,6}A$ 的 *N*6 位甲基转移酶（**图 3-6D**）。

从 $m^{1,6}A58$ 的定量结果中，我们发现只有大约 0.2%的 m^1A58 进一步甲基化为 $m^{1,6}A58$，暗示 *N*6 位甲基转移酶对 m^1A58 可能具有较低的活性。换而言之，任何 *N*6 位甲基转移酶都有可能识别 m^1A58 生成 $m^{1,6}A58$，哪怕 m^1A58 不是它

中国知网 https://www.cnki.net

的最优底物。未来可以继续探索 tRNA 中 m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的 *N*6 位甲基转移酶，这对于破译新修饰 $m^{1,6}A$ 在体内的动态调控至关重要。

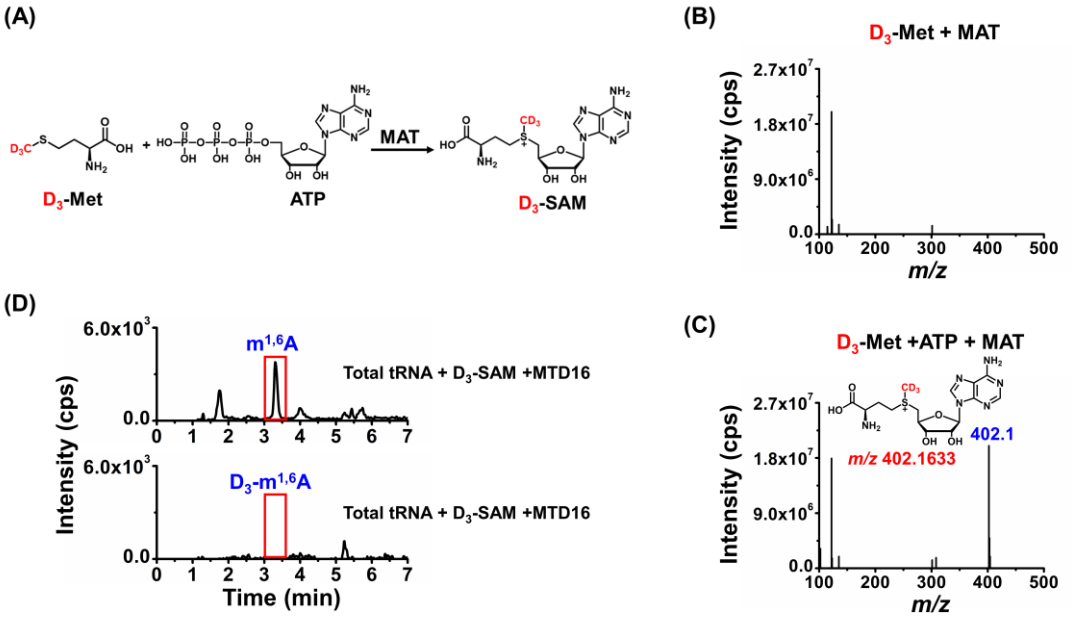


图 3-6 重组蛋白 MTD16 对 tRNA 的甲基化活性测定（D_3-SAM 作为甲基供体）。（A）体外酶促反应合成 D_3-SAM 的反应式。（B）D_3-Met 和 MAT 的反应混合物的全扫描质谱图。（C）D_3-Met、ATP 和 MAT 的反应混合物的全扫描质谱图。红色显示的是 *m/z* 理论值；蓝色显示的是 *m/z* 测量值。（D）总 tRNA 与 MTD16 蛋白和 D_3-SAM 孵育后，$m^{1,6}A$（上图 MRM：296.1→164.1）和 D_3-$m^{1,6}A$（下图 MRM：299.1→167.1）的提取离子色谱图。

3.3.4 ALKBH3 催化 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 去甲基化的研究

RNA 上的一些修饰是可逆的，可以动态调节各种生理过程[3]。为了更好地了解 $m^{1,6}A$ 的生物学功能我们需要探索该修饰在体内是否是动态可逆的。tRNA 中的 m^1A58 是动态可逆的，由甲基转移酶复合物 TRMT6/61A 介导形成[81, 82]，并由去甲基化酶 FTO、ALKBH1、ALKBH3 介导去甲基化[83-85]。基于上述 $m^{1,6}A$ 的定位分析，$m^{1,6}A$ 可能是源自 tRNA 中的 m^1A58，因此我们想探索 m^1A58 的去甲基化酶是否也能作用于 $m^{1,6}A$。

基于此，我们首先考察了 ALKBH1 对 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的去甲基化活性。我们在体外表达并纯化了重组的 ALKBH1 蛋白（**图 3-7A**），将其与 HEK293T 细胞中提取的 tRNA 进行孵育并进行 LC-MS/MS 分析。与孵育前 95°C 灭活 ALKBH1 蛋白的对照组相比，实验组中 m^1A 的含量显著降低，而 tRNA 中的其

中国知网 https://www.cnki.net

他甲基化修饰如 m^6A、m^7G 和 m^5C 没有显著变化（**图 3-7B**）。该结果与文献中报道的 ALKBH1 对 tRNA 中 m^1A 具有很强的去甲基化活性一致[83]。遗憾的是，ALKBH1 蛋白的孵育并没有造成 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 含量的明显变化（**图 3-7C**），表明 ALKBH1 在体外不能催化 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的去甲基化。

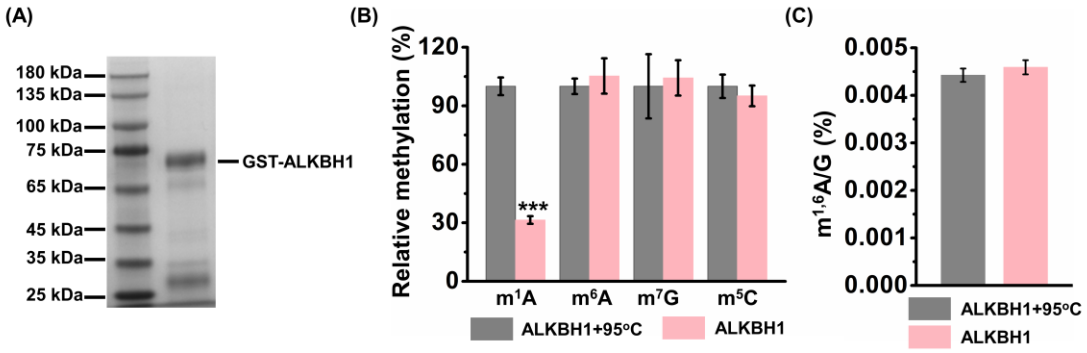


图 3-7 体外重组蛋白 ALKBH1 的活性测定。（A）体外重组蛋白 ALKBH1 的 SDS-PAGE 验证。（B）-（C）重组蛋白 ALKBH1 对 tRNA 中甲基化修饰 m^1A、m^6A、m^7G、m^5C 和 $m^{1,6}A$ 的去甲基化活性测定。*** $p < 0.001$。

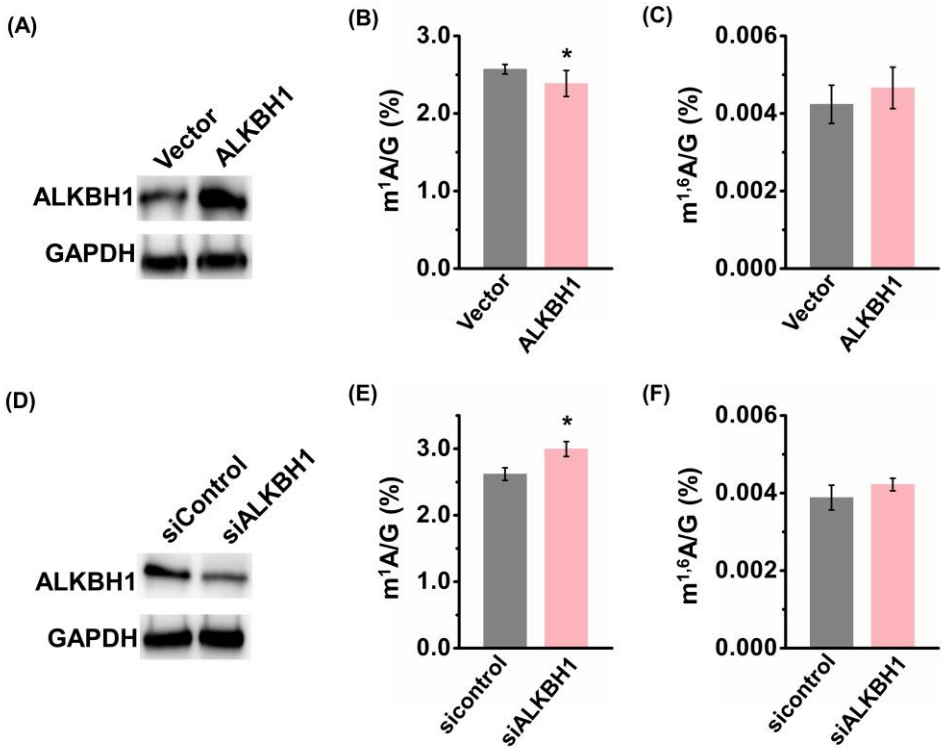


图 3-8 *ALKBH1* 过表达与敲低后 tRNA 中 m^1A 和 $m^{1,6}A$ 的含量变化。（A）*ALKBH1* 过表达后细胞的 Western Blot 分析。（B）-（C）*ALKBH1* 过表达后 tRNA 中 m^1A 和 $m^{1,6}A$ 的定量分析。（D）*ALKBH1* 敲低后细胞的 Western Blot 分析。（E）-（F）*ALKBH1* 敲低后 tRNA 中 m^1A 和 $m^{1,6}A$ 的定量分析。* $p < 0.05$。

中国知网 https://www.cnki.net

为了进一步验证 ALKBH1 在生物体内对 m^1A 和 $m^{1,6}A$ 的去甲基化作用，我们在体内进行了 *ALKBH1* 基因的过表达和敲低实验。将含有 *ALKBH1* 基因的质粒 pCMV-ALKBH1-EGFP 转入 HEK293T 细胞中，与转入 pCMV-EGFP 空质粒相比，*ALKBH1* 基因的表达明显升高（**图 3-8A**）。*ALKBH1* 过表达后，tRNA 中 m^1A 的含量明显的降低（**图 3-8B**），但是 $m^{1,6}A$ 没有明显的变化（**图 3-8C**）。相反，我们通过 *ALKBH1* siRNA 降低 *ALKBH1* 的表达后（**图 3-8D**），发现 tRNA 中的 m^1A 含量明显的升高（**图 3-8E**），而 $m^{1,6}A$ 还是没有明显的变化（**图 3-8F**）。体内和体外结果均表明 ALKBH1 能催化 tRNA 中 m^1A 的去甲基化，却不能催化 m^1A 的进一步 *N*6 位甲基化产物 $m^{1,6}A$ 的去甲基化。造成该结果的原因可能是 *N*6 位的甲基化影响了 ALKBH1 的去甲基化活性，阻碍了 ALKBH1 对 *N*1 位的去甲基化，这还需要进一步的晶体结构证实。

除了 ALKBH1 之外，ALKBH3 同样能催化 tRNA 中 m^1A58 的去甲基化[85]，值得注意的是，ALKBH3 还能介导 tRNA 中 m^6A 的动态可逆[132]。为此，我们探索了 ALKBH3 能否去甲基化 tRNA 中的 $m^{1,6}A$。首先，我们在体外表达并纯化了重组的 hALKBH3 蛋白，将其与 tRNA 进行孵育观察 $m^{1,6}A$ 的含量变化（**图 3-9A**）。相比于 95°C 灭活蛋白的对照组，实验组的结果显示 hALKBH3 蛋白的孵育会导致 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 m^3C 的含量显著降低，而 tRNA 中的其他甲基化修饰 m^7G 和 m^5C 没有明显变化（**图 3-9B**）。该结果表明 hALKBH3 对 tRNA 中的 m^1A、m^6A 和 m^3C 有很强的去甲基化活性，而对 tRNA 中的 m^7G 和 m^5C 基本没有去甲基化活性，与文献报道的 hALKBH3 活性一致[85]。值得注意的是，hALKBH3 蛋白孵育后的 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量也有显著降低（**图 3-9C**），表明 hALKBH3 在体外能催化 $m^{1,6}A$ 的去甲基化，暗示 hALKBH3 可能是 $m^{1,6}A$ 的去甲基化酶。

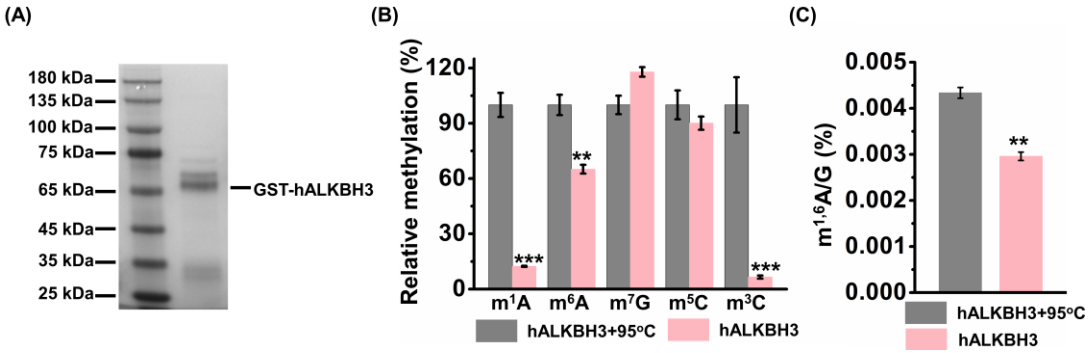


图 3-9 体外重组蛋白 hALKBH3 的活性测定。（A）体外重组蛋白 hALKBH3 的 SDS-PAGE 验证。（B）-（C）重组蛋白 hALKBH3 对 tRNA 中 m^1A、m^6A、m^7G、m^5C、m^3C 和 $m^{1,6}A$ 的去甲基化活性测定。** $p < 0.01$，*** $p < 0.001$。

中国知网 https://www.cnki.net

为了更好地了解 hALKBH3 对三种底物 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的去甲基化活性，我们进行了 hALKBH3 蛋白的稳态动力学研究。从稳态动力学 Michaelis-Menten 曲线图中，我们发现 hALKBH3 对 m^1A 较 m^6A 和 $m^{1,6}A$ 有更强的去甲基化活性，在 3 h 的时候去甲基化效率达到 90%（**图 3-10**）。此外，我们还发现 m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的变化趋势基本一致，去甲基化程度只能到达 40%左右（**图 3-10**），该结果暗示 hALKBH3 对 $m^{1,6}A$ 的可逆去甲基可能发生在 *N*6 位。

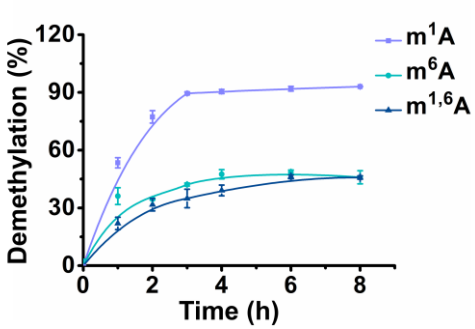


图 3-10 体外重组蛋白 hALKBH3 的稳态动力学 Michaelis-Menten 曲线。

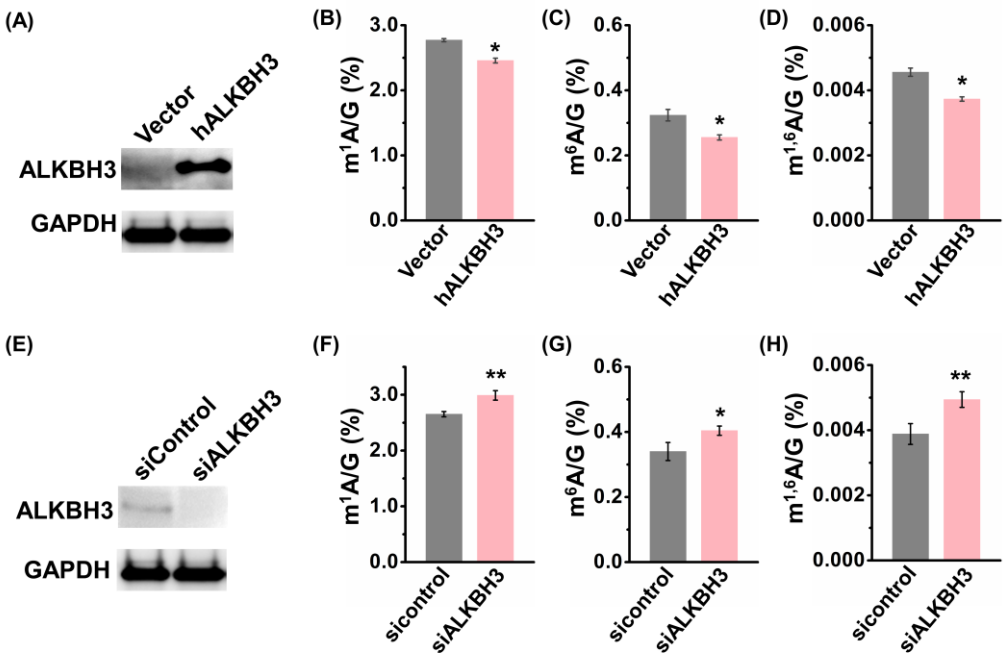


图 3-11 *hALKBH3* 过表达与敲低后 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的含量变化。（A）*hALKBH3* 过表达后细胞的 Western Blot 分析。（B）-（D）*hALKBH3* 过表达后 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的定量分析。（E）*ALKBH3* 敲低后细胞的 Western Blot 分析。（F）-（H）*ALKBH3* 敲低后 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的定量分析。* $p < 0.05$，** $p < 0.01$。

中国知网 https://www.cnki.net

为了在体内证实 hALKBH3 对 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的去甲基化作用，我们在 HEK293T 细胞中对 *hALKBH3* 基因进行了过表达或敲低。通过 Western Blot 分析证实了 *hALKBH3* 在体内的过表达和敲低（**图 3-11A** 和 **E**）。质谱分析结果表明，*hALKBH3* 的过表达导致 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 水平显著降低（**图 3-11B–D**）。相反，siRNA 介导的 *ALKBH3* 的敲低诱导了 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 含量的显著增加（**图 3-11F–H**）。体内实验结果揭示了 ALKBH3 可以在体内催化 $m^{1,6}A$ 的去甲基化。

小鼠基因组和人类基因组具有高度的同源性，因此我们还研究了小鼠 mALKBH3 蛋白对 $m^{1,6}A$ 的去甲基化能力。体内和体外的结果均表明，tRNA 中的 $m^{1,6}A$ 是 mALKBH3 的底物之一，且 mALKBH3 的去甲基化活性与 hALKBH3 相当（**图 3-12 和 3-13**）。

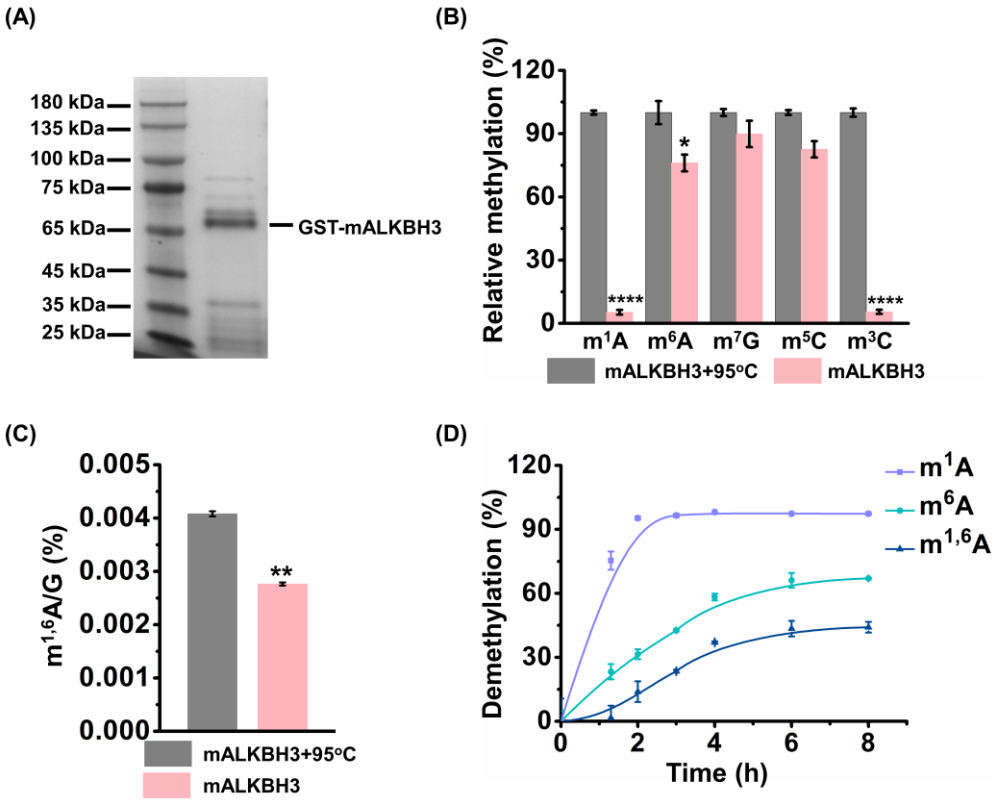


图 3-12 体外重组蛋白 mALKBH3 的活性测定。（A）体外重组蛋白 mALKBH3 的 SDS-PAGE 验证。（B）-（C）重组蛋白 mALKBH3 对 tRNA 中甲基化修饰 m^1A、m^6A、m^7G 、m^5C、m^3C 和 $m^{1,6}A$ 的去甲基化活性测定。（D）体外重组蛋白 mALKBH3 的稳态动力学 Michaelis-Menten 曲线。* $p < 0.05$，** $p < 0.01$，**** $p < 0.0001$。

中国知网 https://www.cnki.net

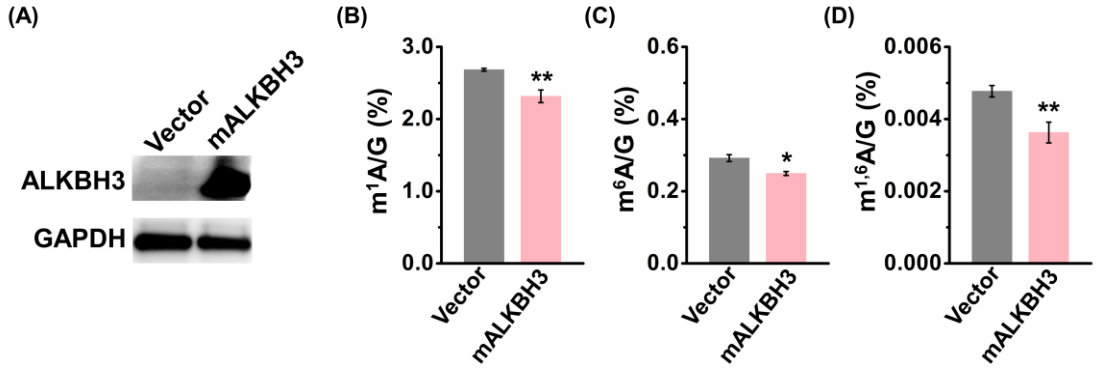


图 3-13 *mALKBH3* 过表达后 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的含量变化。（A）*mALKBH3* 过表达后细胞的 Western Blot 分析。（B）-（D）*mALKBH3* 过表达后 tRNA 中 m^1A、m^6A 和 $m^{1,6}A$ 的定量分析。* $p < 0.05$，** $p < 0.01$。

综上结果表明，ALKBH1 能催化 tRNA 中 m^1A 的去甲基化，不能催化 *N*1 位和 *N*6 位双甲基化形式的 $m^{1,6}A$ 的去甲基化。ALKBH3 不仅能催化 tRNA 中单甲基修饰腺苷 m^1A 和 m^6A 的去甲基化，还能催化双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$ 的去甲基化。目前的实验结果无法准确判断 ALKBH3 对 $m^{1,6}A$ 的去甲基化是优先发生在 *N*1 位还是 *N*6 位，未来需要更多的实验证据加以证明。此外，我们为 tRNA 中 m^1A58 的可逆调控提供了一条新的通路（**图 3-14**），即第 58 位的腺苷经甲基转移酶复合物 TRMT6/61A 作用形成 m^1A58，形成的 m^1A58 一方面可被去甲基化酶 FTO、ALKBH1 和 ALKBH3 可逆调控；另一方面可被进一步 *N*6 位甲基化修饰形成 $m^{1,6}A58$，形成的 $m^{1,6}A58$ 可通过 ALKBH3 催化去甲基。综上，我们鉴定了 tRNA 中一种新的可逆修饰 $m^{1,6}A$，揭示了 tRNA 可逆甲基化作为调控转录后基因表达的新机制。

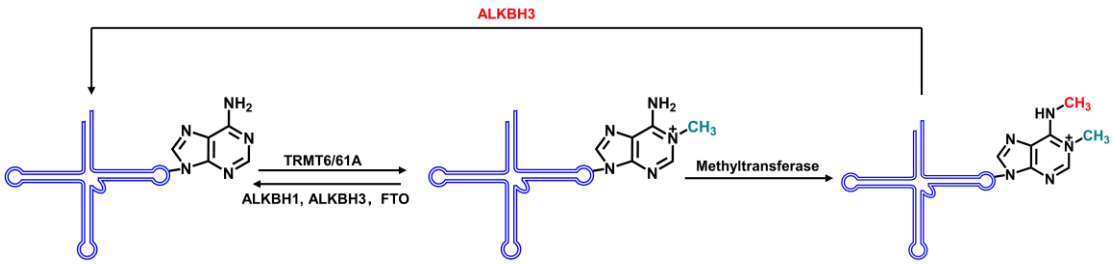


图 3-14 推测的 tRNA 中 m^1A58 的动态可逆通路。

3.3.5 $m^{1,6}A$ 参与 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A 介导的表观遗传调控

tRNA 中的 m^1A58 是一种重要的可逆修饰，参与表观遗传的调控。Liu 等

中国知网 https://www.cnki.net

[83]发现 $tRNA^{iMet}$ 中的 m^1A58 对 $tRNA^{iMet}$ 的稳定性至关重要，ALKBH1 介导的 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A58 的去甲基化会降低 $tRNA^{iMet}$ 的稳定性从而影响翻译的起始和细胞增殖。新修饰 $m^{1,6}A$ 也位于 tRNA 的第 58 位，推测是来自于 m^1A58 的进一步 *N*6 位甲基化。从上述对 $m^{1,6}A$ 的可逆研究中，我们发现 ALKBH1 不能催化 $m^{1,6}A$ 的去甲基化，暗示 $m^{1,6}A$ 的形成会阻止 ALKBH1 对 m^1A58 的去甲基化。如果该特性也发生在 $tRNA^{iMet}$ 上，那么 $m^{1,6}A$ 的形成可能会增强 $tRNA^{iMet}$ 的稳定性，从而对翻译造成影响。因此，我们想探索 $m^{1,6}A$ 是否会参与 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A58 的表观遗传调控。

首先，我们通过特定的 DNA 探针纯化出了 $tRNA^{iMet}$，并在 $tRNA^{iMet}$ 上监测到了 $m^{1,6}A$（**图 3-2**）。将体外表达的重组蛋白 ALKBH1 与纯化的 $tRNA^{iMet}$ 进行孵育，并通过 LC-MS/MS 分析。定量结果显示 ALKBH1 蛋白孵育能显著降低 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A 的含量，而不能降低 $m^{1,6}A$ 的含量（**图 3-15**）。该实验表明 ALKBH1 能催化 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A 的去甲基化而不能催化 $m^{1,6}A$ 的去甲基化，暗示 $tRNA^{iMet}$ 中的 m^1A 可以通过进一步 *N*6 位甲基化修饰来保护自己不被 ALKBH1 去甲基化，从而稳定 $tRNA^{iMet}$ 并促进翻译的起始（**图 3-16**）。该结论初步暗示 $m^{1,6}A$ 可能参与 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A 介导的表观遗传调控。

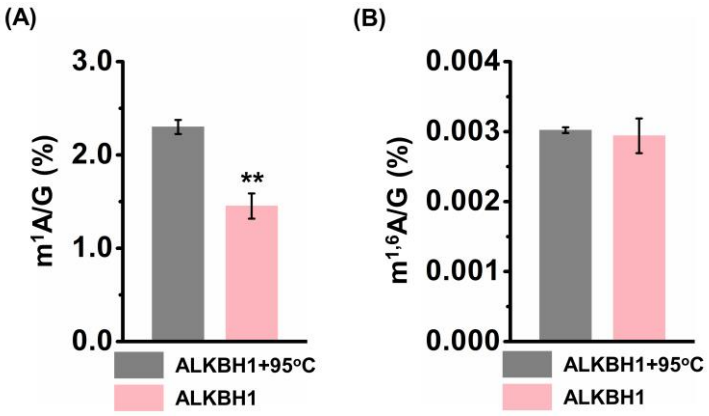


图 3-15 重组蛋白 ALKBH1 对 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A（A）和 $m^{1,6}A$（B）的去甲基化活性测定。** p <0.01。

$tRNA^{iMet}$ 中的 $m^{1,6}A$ 是否能稳定 $tRNA^{iMet}$ 以及是否能影响翻译的起始，还需要进一步在体内进行验证。通过改变 $m^{1,6}A$ 生物相关酶的表达影响体内 $m^{1,6}A$ 的生成，观察 $tRNA^{iMet}$ 的含量变化和翻译情况，从而证实 $m^{1,6}A$ 对 $tRNA^{iMet}$ 稳定性和翻译起始的调控。然而，目前我们找到的与 $m^{1,6}A$ 相关的生物酶 ALKBH3 也能作用与 m^1A，没办法通过改变 ALKBH3 的表达观察 $m^{1,6}A$ 对表观遗传的调控，因为这些改变很可能是由于 m^1A 所引起的。因此，我们需要找到与 m^1A 无关，但与 $m^{1,6}A$ 合成相关的生物酶，即 $m^{1,6}A$ 的 *N*6 位甲基转移酶，才能更好地

中国知网 https://www.cnki.net

研究 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的功能。

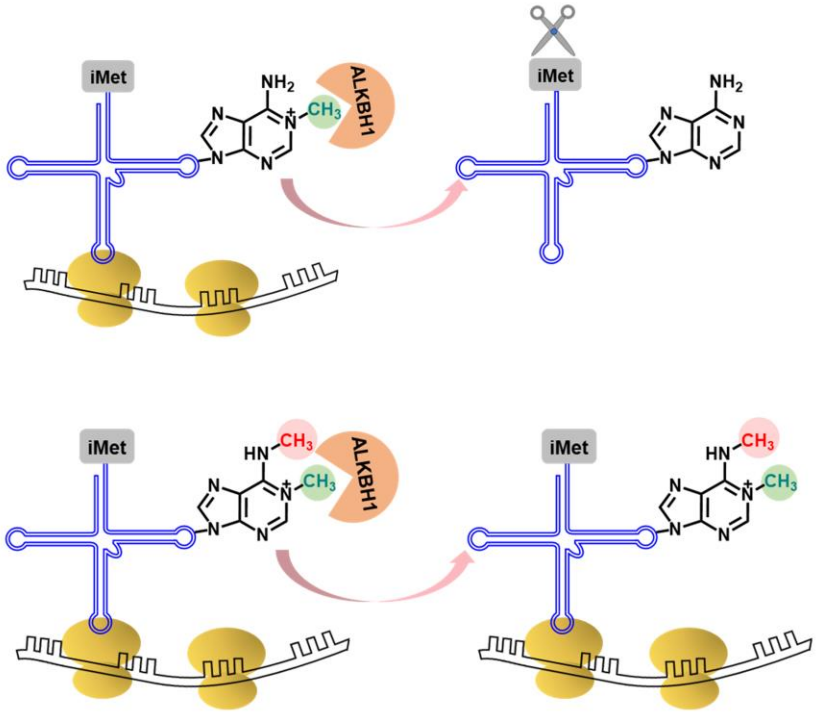


图 3-16 推测的 $m^{1,6}A$ 参与 $tRNA^{iMet}$ 中 m^1A 介导的表观遗传调控的机制。

3.4 结论

在当前的工作中，我们通过 LC-MS/MS 进一步探索 tRNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的功能。我们发现 $m^{1,6}A$ 修饰发生在 tRNA 的第 58 位，推测是该位置 m^1A 的进一步 *N*6 位甲基化修饰产物，约 0.2%的 m^1A 被转化为 $m^{1,6}A$。我们提出 METTL16 不是 $m^{1,6}A$ 的甲基转移酶。我们在体内和体外均证实了新修饰 $m^{1,6}A$ 是动态可逆的，由去甲基化酶 ALKBH3 催化去甲基。此外，我们还发现 $tRNA^{iMet}$ 中的 $m^{1,6}A$ 可能参与 m^1A 介导的表观遗传调控。总之，该研究揭示了 tRNA 中一种新的可逆修饰，为 tRNA 中 m^1A 的可逆调控提供了一条新的通路，同时也为 tRNA 可逆甲基化调控转录后基因表达提供了新的机制。未来对 $m^{1,6}A$ 甲基转移酶和识别蛋白的鉴定会促进我们对 $m^{1,6}A$ 功能的了解。

中国知网 https://www.cnki.net

第四章 A-to-I 编辑在 6-硫鸟嘌呤介导的细胞死亡中的功能研究

4.1 前言

6-硫鸟嘌呤（6-thioguanine，6TG）是最成功的化疗药物之一，可用于治疗包括急性淋巴细胞白血病（acute lymphoblastic leukemia，ALL）在内的多种人类疾病[310]。6TG 进入细胞后，在各种酶的作用下会转化为 6-硫鸟苷（6-thioguanosine，^{S}G）核苷酸，并通过 DNA 复制整合到基因组 DNA 中[311]。基因组 DNA 中的 ^{S}G 可以引入 ^{S}G:T 碱基对，从而触发复制后错配修复（mismatch repair，MMR）机制来诱导细胞死亡[312]。据报道，哺乳动物 MMR 因子可以识别 ^{S}G:T 碱基对，其程度与 G:T 错配相似[313-315]。缺乏 MMR 途径的细胞对 6TG 处理的抗性显著增加[316]。

此外，^{S}G 掺入基因组 DNA 中也会影响 DNA 修饰的水平。用 6TG 处理急性淋巴细胞白血病细胞（Jurkat-T）导致基因组 DNA 中 5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine，5mC）水平降低[317]。DNA 中甲基化 CpG 位点的 ^{S}G 抑制了其 5’相邻胞嘧啶的甲基化，而未甲基化 CpG 位点的 ^{S}G 增强了互补链中相对胞嘧啶的甲基化[317]。除 DNA 外，6TG 还可以通过转录过程掺入 RNA 中。与 DNA 表观遗传修饰类似，RNA 分子中的化学修饰也可以调节多种生物过程[76, 318, 319]。然而，6TG 可能如何影响 RNA 修饰仍然未知。

RNA 修饰是表观遗传调控的重要组成[298]。目前已经在各种类型的 RNA 中鉴定了 170 多种修饰，这些修饰主要存在丰富的核糖体 RNA（ribosomal RNA，rRNA）和转运 RNA（transfer RNA，tRNA）中[4, 76]。信使 RNA（messenger RNA，mRNA）中动态和可逆修饰的发现为 RNA 修饰介导的生物过程调节开辟了新的研究方向[320]。随着高灵敏方法和测序技术的革新，已在真核生物 mRNA 中发现了一系列修饰[294]。腺苷的甲基化是 mRNA 中最普遍的修饰，例如 N^6-甲基腺苷（N^6-methyladenosine，m^6A）[100]、$N1$-甲基腺苷（$N1$-methyladenosine，m^1A）[90]、N^6,2’-O-二甲基腺苷 N^6,2’-O-dimethyladenosine，m^6Am）[194]、和 2’-O-甲基腺苷（2’-O-methyladenosine，Am）[321]。进一步的研究表明，这些修饰在 mRNA 中有重要的生理功能，不仅能影响细胞的表观转录组学状态，还与疾病的发生和治疗密切相关[322, 323]。

除了甲基化修饰外，mRNA 中的腺苷编辑（adenosine-to-inosine，A-to-I）也是真核生物中常见的转录后修饰之一[324]。A-to-I 编辑由腺苷脱氨酶 ADAR

中国知网 https://www.cnki.net

（adenosine deaminase acting on RNA）家族催化产生[324]。已在人类中鉴定出三种 ADARs，分别是 ADAR1、ADAR2 和 ADAR3[325]。A-to-I 编辑有可能改变 RNA 序列，因为肌苷可以与胞苷配对，因此它们在翻译过程中被核糖体识别为鸟苷[326]。如果 A-to-I 编辑发生在编码区，蛋白质的序列、结构和功能均会发生改变[229]。因此，A-to-I 编辑在各种调控过程中发挥着重要作用，例如剪接[207]、mRNA 稳定性[327]、microRNA 加工[328]和 microRNA 靶向[329]。此外，异常的 A-to-I 编辑可能导致各种疾病的发生和发展[232, 330]，例如自身免疫性疾病[331]、心血管疾病[332]、神经系统疾病[333]和癌症[334]。已有证据表明，与正常组织相比，肿瘤组织中的 A-to-I 编辑发生了显著变化[232]。

膀胱癌相关蛋白（bladder cancer-associated protein，BLCAP）最初是从人膀胱癌中发现的[335]，它在膀胱癌、舌癌、肾癌、乳腺癌和其他恶性肿瘤中发挥抑癌功能[336, 337]。*BLCAP* 转录本含有多个 A-to-I 编辑位点[338]，且 *BLCAP* 转录本中的 A-to-I 编辑在癌症的发展中起着至关重要的作用[339]。与正常组织相比，在星形细胞瘤、膀胱癌和结直肠癌中经常观察到 *BLCAP* 转录本中 A-to-I 编辑水平降低[339]。

在本研究中，我们考察了 ^{S}G 掺入 RNA 对急性淋巴细胞白血病细胞 mRNA 中腺苷修饰的影响。我们发现 6TG 处理细胞后通过上调 ADAR2 的表达导致 *BLCAP* 转录本中 A-to-I 编辑升高，最终导致细胞死亡增加（**图 4-1**）。

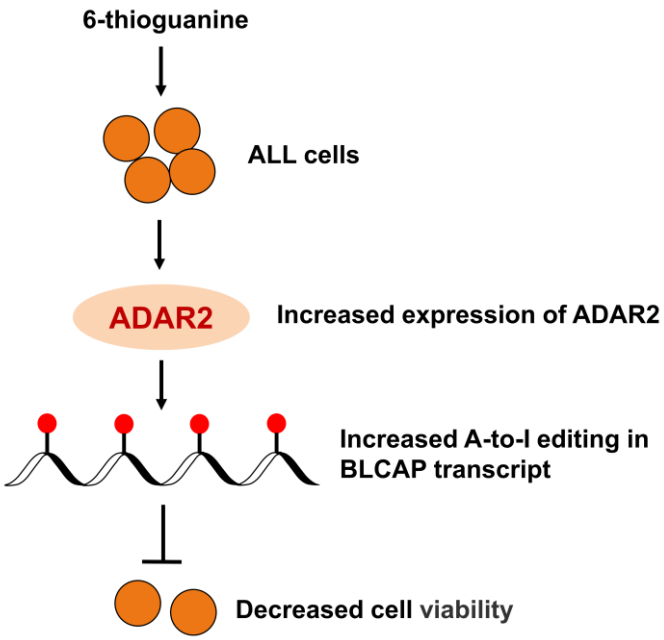


图 4-1 6TG 处理细胞后通过上调 ADAR2 的表达导致 *BLCAP* 转录本中 A-to-I 编辑升高从而降低细胞活力。

中国知网 https://www.cnki.net

4.2 实验部分

4.2.1 化学试剂

核苷标准品：腺嘌呤核苷（adenosine，A）、鸟嘌呤核苷（guanosine，G）、尿嘧啶核苷（uridine，U）、胞嘧啶核苷（cytidine，C）、6-硫鸟苷（6-thioguanosine，^{S}G）、*N*^{6}-甲基腺苷（*N*^{6}-methyladenosine，m^{6}A）、肌苷（inosine，I）、*N*1-甲基腺苷（*N*1-methyladenosine，m^{1}A）、*N*^{6},2'-*O*-二甲基腺苷（*N*^{6},2'-*O*-dimethyladenosine，m^{6}Am）、2'-*O*-甲基腺苷（2'-*O*-methyladenosine，Am）、和腺苷-$^{13}C_5$（adenosine-$^{13}C_5$，A-$^{13}C_5$）的详细信息如**表 4-1** 所示。

表 4-1 核苷标准品的详细信息。

Nucleosides	Abbreviation	CAS number	Molecular formula	Molecular weigh	Company
cytidine	C	65-46-3	$C_9H_{13}N_3O_5$	243.22	Sigma-Aldrich
uridine	U	58-96-8	$C_9H_{12}N_2O_6$	244.20	Sigma-Aldrich
guanosine	G	118-00-3	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283.24	Sigma-Aldrich
adenosine	A	58-61-7	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.24	Sigma-Aldrich
2'-*O*-methyladenosine	Am	2140-79-6	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	281.27	J&K Scientific Ltd.
*N*1-methyladenosine	m^{1}A	15763-06-1	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	281.27	J&K Scientific Ltd.
N^{6}-methyladenosine	m^{6}A	1867-73-8	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	281.27	Hanhong Chemical
N^{6},2'-*O*-dimethyladenosine	m^{6}Am	57817-83-1	$C_{12}H_{17}N_5O_4$	295.29	Granlen
inosine	I	58-63-9	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	268.23	Sigma-Aldrich
6-thioguanosine	^{S}G	345909-25-3	$C_{10}H_{13}N_5O_4S$	299.31	Toronto Research Chemicals
adenosine-$^{13}C_5$	A-$^{13}C_5$	159496-13-6	$^{13}C_5C_5H_{13}N_5O_4$	272.20	Toronto Research Chemicals

蛇毒磷酸二酯酶 I 和 6-硫鸟嘌呤（6-thioguanine，6TG）均购买自 Sigma-Aldrich 公司（上海，中国）。碱性磷酸酶（calf intestine alkaline phosphatase，CIAP）和 S1 核酸酶均购买于 Takara Biotechnology 公司（大连，中国）。RPMI-1640 培养基（Roswell Park Memorial Institute）、青霉素和链霉素均购买自 Thermo-Fisher Scientific 公司（北京，中国）。胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购买自 Biological Industries 公司（上海，中国）。分析纯的甲酸和二甲基

中国知网 https://www.cnki.net

亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）均购自 Sinopharm 公司（上海，中国）。色谱纯的甲醇（MeOH）购自 Merck 公司（Darmstadt，Germany）。本章研究所使用的超纯水均取自 Millipore 公司（Bedford，MA）的 Milli-Q 纯水仪。

4.2.2 细胞培养和 6-硫鸟嘌呤处理

人类急性 T 细胞白血病细胞系（Jurkat-T）购买自中国典型培养物菌种保藏管理中心。Jurkat-T 细胞在含有 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中于 37ºC 和 5% CO_2 环境中培养。待细胞生长至 70%融合后（密度为 6~7×10^5cells/mL），弃去旧的培养基，使细胞在含有 0 或 3 μM 6TG（溶于 DMSO）的 RPMI-1640 培养基中继续培养 24 h。 根据制造商推荐的程序，使用 CCK-8 试剂盒（Dojindo Laboratories，Dojindo，Japan）测量细胞活力。简而言之，将 Jurkat-T 细胞悬浮在 96 孔板中（100 μL/孔），然后向孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，并在 37ºC 培养箱中孵育 3 h。使用酶标仪在 450 nm 处测量溶液的吸光度作为细胞活力的指标。所有实验均独立进行 3 次。

4.2.3 RNA 的提取和酶解

根据制造商推荐的程序，使用 TRIzol 试剂（Ambion，Life Technologies）提取 Jurkat-T 细胞的总 RNA。使用 E.Z.N.A. MiRNA 试剂盒（Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA）提取 Jurkat-T 细胞的大 RNA（> 200 nt）和小 RNA（< 200 nt）。对于 mRNA 的提取，使用 PolyATtract® mRNA Isolation System 试剂盒（Promega，Madison，WI，USA）对获得的大 RNA（> 200 nt）进行连续两次分离以确保 mRNA 的高纯度。通过 Metash 公司（上海，中国）的超微量紫外分光光度计 B-500 对提取出的不同类型 RNA 进行浓度和纯度的检测。

根据我们之前描述的方法，在中性条件下对 RNA 进行酶解[254]。简而言之，30 μL 含有 1 μg 的 RNA、180 U 的 S1 核酸酶、0.001 U 的蛇毒磷酸二酯酶 I、15 U 的 CIAP 和 3 μL 的 10×buffer（500 mM Tris–HCl，pH 7.0，10 mM $ZnSO_4$，10 mM $MgCl_2$，100 mM NaCl）的混合物在 37ºC 水浴中孵育 4 h。随后加入 270 μL H_2O，使用 300 μL 氯仿连续萃取 3 次。最后收集上层水相，通过冷冻离心浓缩仪浓缩后进行 LC-MS/MS 分析。

中国知网 https://www.cnki.net

4.2.4 LC-MS/MS 分析腺苷修饰

腺苷修饰的分析是在 LC-MS/MS 系统上进行的。该系统由配备电喷雾电离源的 Shimadzu 8045 质谱仪（Kyoto，Japan）和 Shimadzu LC-30AD 超高效液相色谱（ultra-performance liquid chromatography，UPLC）仪（Tokyo，Japan）组成。核苷的色谱分离是通过 Shimadzu 公司的 Shim-pack GIST 色谱柱（100 mm×2.1 mm i.d.，2.0 μm）在 40°C 的柱温下完成的。采用含有 0.05%甲酸的 H_2O（v/v，溶剂 A）和 MeOH（溶剂 B）作为流动相，在流速为 0.2 mL/min 的条件下对核苷进行梯度洗脱。流动相梯度设置如下：0-2 min, 5% B；2-10 min，5-80% B；10-12 min，80% B；12-13 min，80-5% B；13-20 min，5% B。核苷的质谱检测采用的是正离子模式和多反应监测(multiple reaction monitoring，MRM)模式。优化各核苷分析物的 MRM 参数作为最佳检测条件，最终的参数见**表 4-2**。

表 4-2 LC-MS/MS 分析腺苷修饰的 MRM 质谱参数。

Nucleosides	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)	RT (min)
C	244.1	112.1	-	-30.0	-	2.0
U	245.1	113.1	-	-30.0	-	3.1
G	284.1	152.1	-	-40.0	-	4.9
A	268.1	136.1	-	-50.0	-	4.8
Am	282.1	136.1	-12.0	-18.0	-24.0	6.0
m^1A	282.1	150.1	-11.0	-18.0	-29.0	2.2
m^6A	282.1	150.1	-11.0	-18.0	-29.0	6.4
m^6Am	296.1	150.1	-11.0	-18.0	-28.0	7.3
I	269.1	137.1	-21.0	-12.0	-27.0	4.5
^SG	300.1	168.1	-13.0	-13.0	-17.0	5.5
A-$^{13}C_5$	273.1	136.1	-	-50.0	-	4.8

4.2.5 *BLCAP* 转录本中 A-to-I 编辑的分析

总 RNA（1 μg）通过 PrimeScript™ RT reagent with gDNA Eraser 试剂盒（Takara Biotechnology，大连，中国）逆转录生成 cDNA。以生成的 cDNA 作

中国知网 https://www.cnki.net

为模板，使用 Q5 高保真聚合酶（New England Biolabs，北京，中国）和特异性引物扩增 *BLCAP* 转录本。PCR 条件为：95ºC 5 min；5ºC 30 s，59ºC 30 s，72ºC 1 min，30 cycles；72ºC 5 min。PCR 产物进行 Sanger 测序以及单克隆测序分析（擎科生物科技有限公司，武汉，中国）。每个样品挑取 50 个阳性克隆进行测序，并统计分析 *BLCAP* 转录本中编码区第 5 位和第 14 位处的 A-to-I 编辑。PCR 引物序列如下：

BLCAP-CD-forward primer：5’-CAGCTCCTGGAGAGTGAGGGT-3’；

BLCAP-CD-reverse primer：5’-ACATCACAGGCCAAAAAGGCG-3’。

4.2.6 细胞中 *ADAR2* 和 *BLCAP* 的过表达

为了实现 Jurkat-T 细胞中 *ADAR2* 和 *BLCAP* 的过表达，我们构建了含有 *ADAR2* 基因的质粒 pcDNA3.1(+)-ADAR2 和含有 *BLCAP* 基因的质粒 pcDNA3.1(+)-unedited-BLCAP、pcDNA3.1(+)-edited-BLCAP。质粒均购自生工生物工程有限公司（中国，上海），并通过测序确认。将相应的不含目标基因的空质粒（pcDNA3.1(+)）作为阴性对照。使用转染试剂 Entranster^{TM}-D4000（Engreen Biosystem Co.，Ltd.，北京，中国）严格按照说明书将质粒转染入 Jurkat-T 细胞。细胞转染后 96 h，每隔 24 h 收集一次细胞检测细胞活力。

4.2.7 细胞中 *ADAR2* 的敲低

为了实现 Jurkat-T 细胞中 *ADAR2* 的敲低，我们设计并合成了靶向 *ADAR2* mRNA 的 siRNA 以及非靶向的阴性对照 siRNA（生工生物工程股份有限公司，上海，中国）。*ADAR2* 的靶向 siRNA 和非靶向对照 siRNA 双链的序列分别为 5’-CAGGCACAGAUGUUAAAGATT-3’/3’-TTGUCCGUGUCUACAAUUUCU-5’ 和 5’-CAGGAUUCCUUGAUCAAGATT-3’/3’-TTGUCCUAAGGAACUAGUUCU-5’。根据制造商的说明，使用转染试剂 Rfect^{SP} siRNA（Baidai biotechnology，广州，中国）将 *ADAR2* siRNA 和对照 siRNA 分别转染入 Jurkat-T 细胞。细胞转染后 96 h，每隔 24 h 收集一次细胞检测细胞活力。

中国知网 https://www.cnki.net

4.2.8 实时定量 PCR

总 RNA（1 μg）通过 PrimeScript™ RT reagent with gDNA Eraser 试剂盒（Takara Biotechnology，大连，中国）逆转录生成 cDNA。根据制造商的说明，使用 SYBR® Premix Ex Taq II 试剂盒（Takara Biotechnology，大连，中国）和 CFX96 实时 PCR 检测系统（Bio-Rad Laboratories，Hercules，USA）进行实时定量 PCR。将 *GAPDH* 作为参考基因对待测基因表达的相对含量进行归一化。待测基因的 PCR 引物均购自生工生物工程股份有限公司（上海，中国），详细的序列见**表 4-3**。

表 4-3 实时定量 PCR 引物序列。

Name	Sequence (5’ to 3’)
GAPDH forward primer	CTGGGCTACACTGAGCACC
GAPDH reverse primer	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG
ADAR1 forward primer	CCAAACAAGGAAAGCTCCGC
ADAR1 reverse primer	GCAGGAAGTGGGTCAACAG
ADAR2 forward primer	GTGAAGGAAAACCGCAATCTGG
ADAR2 reverse primer	CAGGAGTGTGTACTGCAAACC
BLCAP forward primer	CTGTGGTTCAGCCACTCCAT
BLCAP reverse primer	ATTCTGGAAGCGGGGAATCG

4.2.9 蛋白质印迹分析

ADAR2 基因过表达和敲低的 Jurkat-T 细胞转染 72 h 后收获用于蛋白质印迹（Western Blot）分析。首先使用 RIPA 裂解缓冲液（Beyotime Biotechnology，上海，中国）裂解 Jurkat-T 细胞。随后通过 SDS-PAGE 分析蛋白质并将蛋白质从凝胶转移到 PVDF 膜（Millipore）。接着使用含有 5% BSA 固体的 TBST 缓冲液（50 mM Tris-HCl，pH 7.6，150 mM NaCl 和 0.1% Tween-20）在室温下封闭膜 1 h。封闭结束后，使用适当稀释度的一抗在室温下孵育 2 h。然后用 TBST 缓冲液洗涤膜 3 次（每次 5 min），并用 HRP 偶联的二抗在室温下继续孵育 1 h。经 TBST 缓冲液洗涤 3 次（每次 5 min）后，使用 ECL 蛋白质印迹底物试剂盒（ComWin Biotech Co.，Ltd.，北京，中国）产生化学发光信号，并通过 Tanon-4600SF 化学发光检测器（Tanon，上海，中国）检测信号。特异性识别 ADAR2

中国知网 https://www.cnki.net

（Abbkine，California，MA）和 GAPDH（Cell Signaling Technology，Danvers，MA）的抗体分别经 1:2000 和 1:3000 稀释后使用。以 1:10000 的稀释度使用 HRP 偶联的山羊抗兔二抗（Abcam，ab6721，Cambridge，MA）。

4.2.10 统计学分析

通过 Origin 8.5 软件对数据进行分析，并采用 t 检验的方法评估数据间的差异。所有的 *p* 值都采取双边（two-sided）检验，$p < 0.05$ 认为具有统计学差异。

4.3 结果与讨论

4.3.1 6-硫鸟嘌呤掺入 RNA

6-硫鸟嘌呤（6-thioguanine，6TG）是最成功的化疗药物之一，可用于治疗包括急性淋巴细胞白血病在内的多种人类疾病[310]。6TG 的细胞毒性与 ^{S}G 核苷酸的形成及其随后掺入 DNA 有关。除 DNA 外，6TG 还可以通过转录过程整合到 RNA 中。在该研究中，我们用 6TG 处理了人类急性 T 细胞白血病细胞系 Jurkat-T 细胞，考察了不同类型 RNA 中 ^{S}G 的掺入情况。首先，我们考察了 3 μM 的 6TG 对细胞毒性的影响，从**图 4-2** 中可以看出用 3 μM 的 6TG 处理 Jurkat-T 细胞 24 h 会导致细胞活力显著降低。

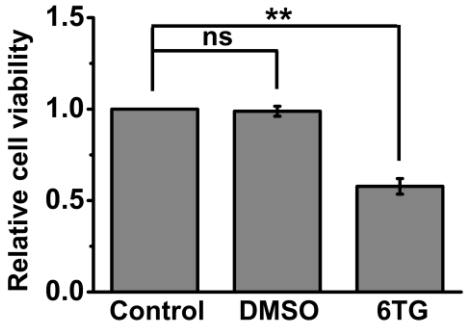


图 4-2 6TG 处理细胞对细胞活力的影响。** p <0.01，ns 代表没有显著性差异。

随后，我们评估了 ^{S}G 在不同类型 RNA 中的掺入。为此，我们从 6TG 处理后的 Jurkat-T 细胞中分离出 mRNA、大 RNA（> 200 nt）和小 RNA（< 200 nt）

中国知网 https://www.cnki.net

进行酶解，并进行 LC-MS/MS 分析。如**图 4-3 所示**，mRNA、大 RNA（> 200 nt）和小 RNA（< 200 nt）中均能检测到 ^{S}G。定量数据显示，mRNA、大 RNA（> 200 nt）和小 RNA（< 200 nt）中 ^{S}G 的含量（^{S}G/G）分别约为 2.4%、0.4% 和 1.2%（**图 4-3D**）。这些结果清楚地表明，^{S}G 可以掺入到不同类型的 RNA 中，其中 mRNA 含有最丰富的 ^{S}G。我们推断 mRNA 比其他 RNA 具有更快的周转率，这导致 mRNA 中掺入的 ^{S}G 更多。

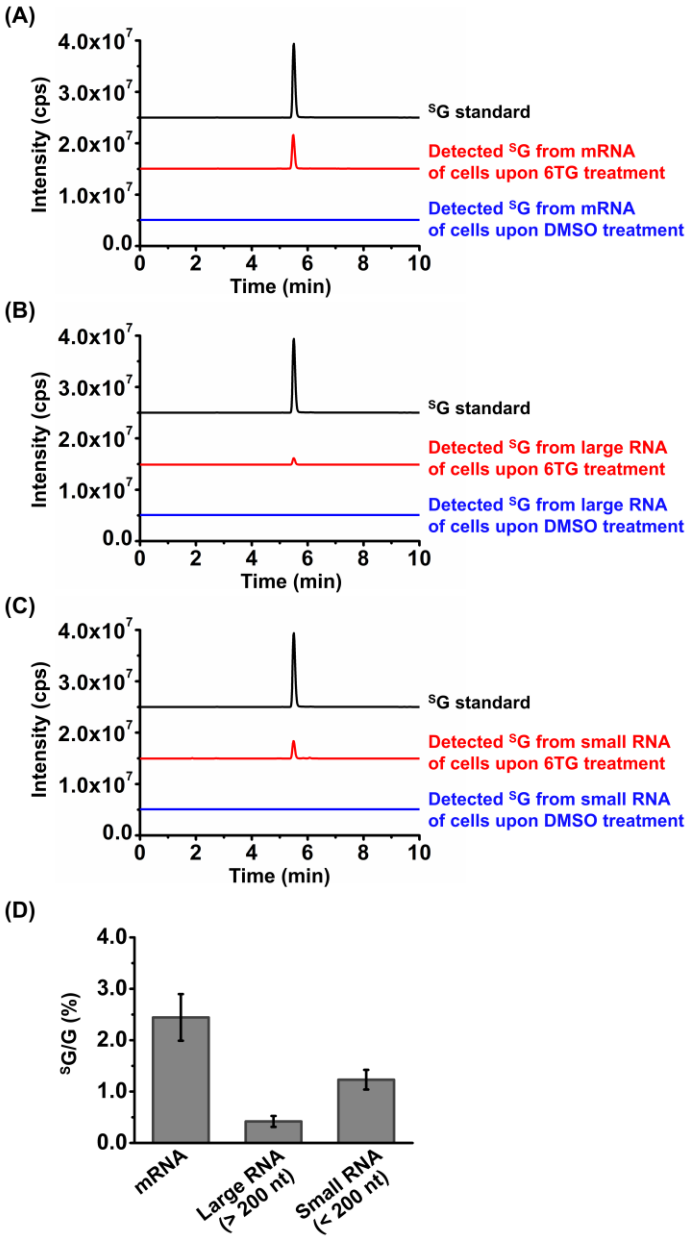


图 4-3 不同类型 RNA 中 ^{S}G 的检测。（A）-（C）mRNA、大 RNA（> 200 nt）和小 RNA（< 200 nt）中 ^{S}G 的提取离子色谱图（黑色代表 ^{S}G 标准品；红色代表 6TG 处理后细胞的 RNA 样品；蓝色代表 DMSO 处理后细胞的 RNA 样品）。（D）不同类型 RNA 中 ^{S}G 的定量分析。

中国知网 https://www.cnki.net

4.3.2 6-硫鸟嘌呤诱导 mRNA 中 A-to-I 编辑水平增加

mRNA 中的腺苷修饰在调节多种生理过程中发挥关键作用，包括基因的表达和癌症的发生[3, 318]。在这里，我们进一步研究了 6TG 的掺入对 mRNA 中腺苷修饰的影响。目前已在真核生物 mRNA 中鉴定了 5 种腺苷修饰，包括 m^6A、m^1A、m^6Am、Am 和 I。我们通过 LC-MS/MS 对 Jurkat-T 细胞经 6TG 处理前后 mRNA 中的这 5 种腺苷修饰进行了分析（**图 4-4**）。定量结果显示，6TG 处理会导致 mRNA 中 m^1A、Am 和 I 的含量显著增加（**图 4-5** 和**图 4-6**），表明 6TG 可以影响 mRNA 中腺苷修饰的水平。

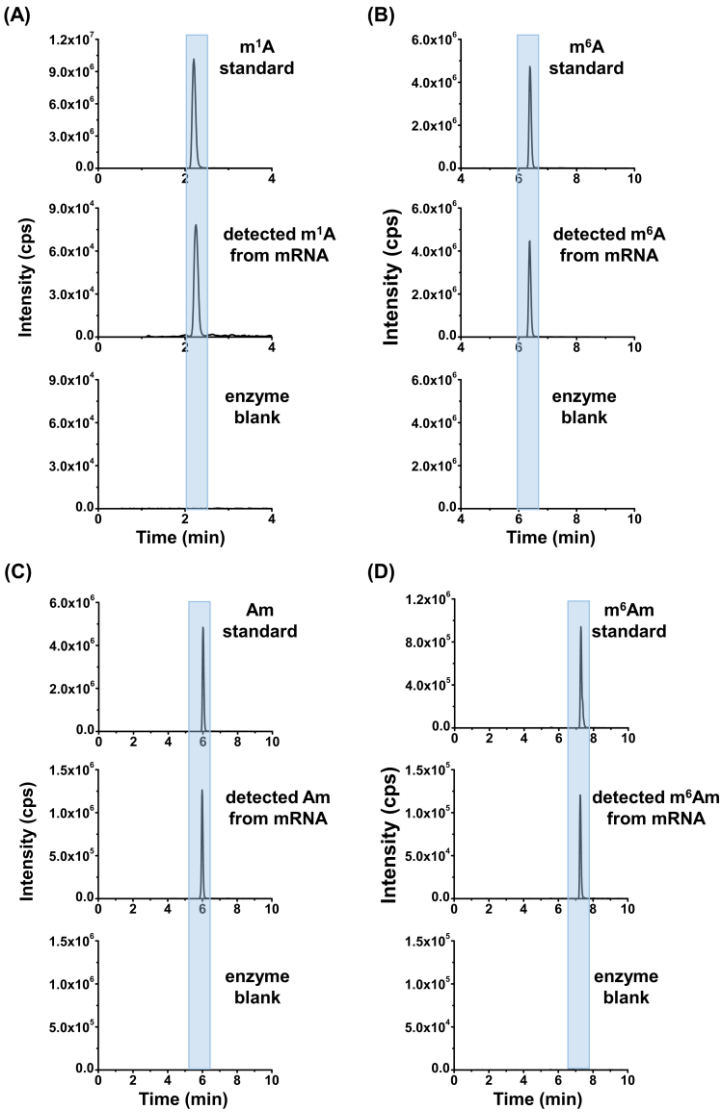


图 4-4 mRNA 中腺苷修饰 m^1A（A）、m^6A（B）、Am（C）和 m^6Am（D）的提取离子色谱图（从上到下依次为核苷标准品、mRNA、酶空白样品）。酶空白样品代表不含 RNA，只加核酸酶的样品。

中国知网 https://www.cnki.net

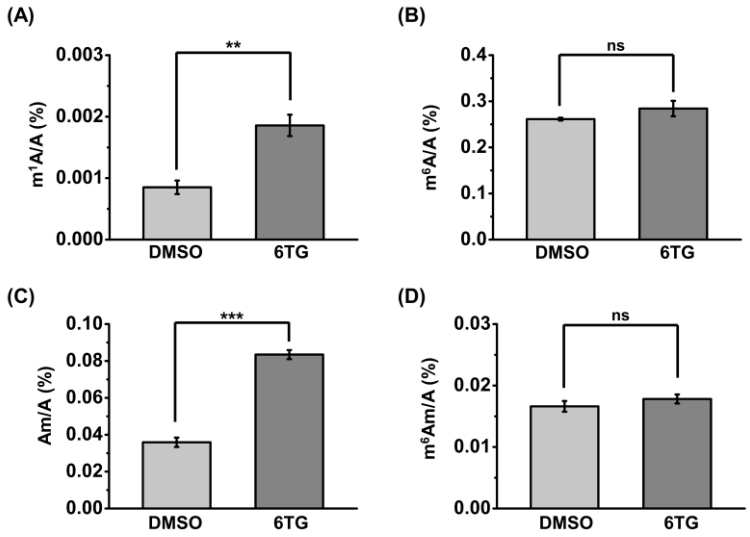


图 4-5 6TG 处理细胞前后 mRNA 中腺苷修饰 m^1A（A）、m^6A（B）、Am （C）和 m^6Am（D）的定量分析。** $p < 0.01$，*** $p < 0.001$，ns 代表没有显著性差异。

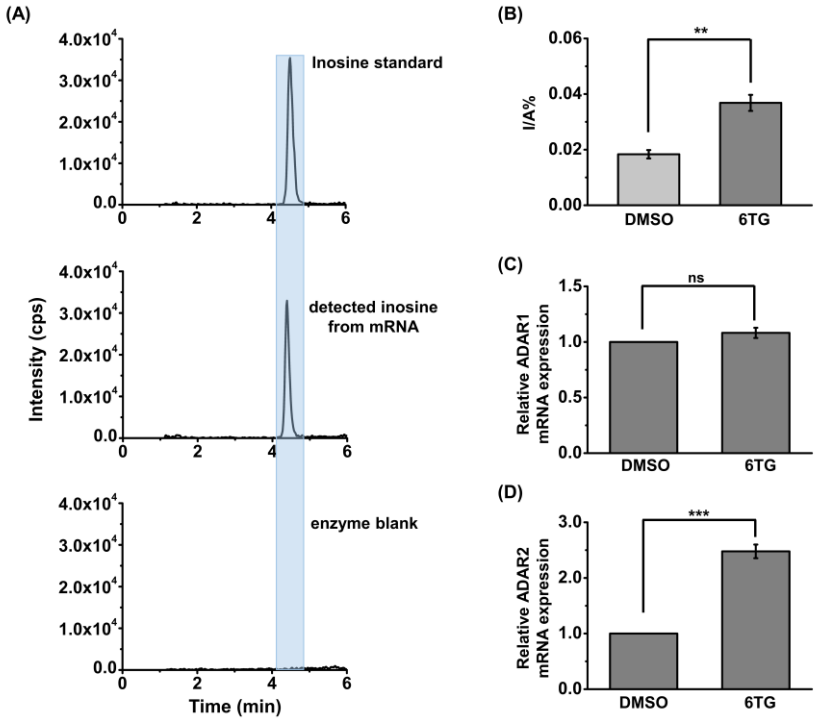


图 4-6 6TG 处理细胞后对 mRNA 中 A-to-I 编辑的影响。（A）不同样品中 I 的提取离子色谱图（从上到下依次为 I 标准品、mRNA、酶空白样品）。酶空白样品代表不含 RNA 样品，只加核酸酶的样品。（B）6TG 处理细胞前后 mRNA 中腺苷修饰 I 的定量分析。（C）6TG 处理细胞前后 *ADAR1* mRNA 的表达水平分析。（D）6TG 处理细胞前后 *ADAR2* mRNA 的表达水平分析。** $p < 0.01$，*** $p < 0.001$，ns 代表没有显著性差异。

中国知网 https://www.cnki.net

已知 ADAR1 和 ADAR2 负责 mRNA 中的 A-to-I 编辑，我们接下来进一步评估了 *ADAR1* 和 *ADAR2* 在 6TG 处理前后的表达情况。通过实时定量 PCR 分析，我们发现 *ADAR2* mRNA 的表达水平在 6TG 处理后表现出显著的增加，而 *ADAR1* mRNA 的表达水平没有明显变化（**图 4-6**）。因此，我们推断 6TG 处理后 mRNA 中 A-to-I 编辑水平的增加是由 *ADAR2* 的表达增加所致。

4.3.3 6-硫鸟嘌呤诱导 *BLCAP* 转录本中 A-to-I 编辑增加

BLCAP（bladder cancer-associated protein）被认为是一种肿瘤抑制基因。据报道，*BLCAP* 转录本含有多个 A-to-I 编辑位点[338]。与正常组织相比，星形细胞瘤、膀胱癌和结直肠癌中 *BLCAP* 转录本的 A-to-I 编辑水平总体呈下降趋势[339]。此外，还有研究表明编码区的特定碱基替换可以改变蛋白质的功能。例如，Glu-B 的谷氨酸受体亚基需要 ADAR2 在 Arg6807 中进行编辑才能发挥正常的生理功能，而未经编辑的受体亚基会推动胶质母细胞瘤的发展[340]。值得注意的是，ADAR2 能催化 *BLCAP* 转录本的 A-to-I 编辑[338] （**图 4-7A**）。6TG 处理细胞后 mRNA 中 A-to-I 编辑水平的增加以及 *ADAR2* 表达的增加激发了我们进一步研究 6TG 处理对特定 *BLCAP* 转录本中 A-to-I 编辑的影响。

鉴于此，我们考察了 6TG 处理细胞后 *BLCAP* 转录本中的 A-to-I 编辑，重点关注 *BLCAP* 编码区的的 A-to-I 编辑。值得注意的是，6TG 处理并未改变 *BLCAP* mRNA 的表达水平（**图 4-7B**）。由于 I 在逆转录过程中可以与 C 配对，在后续的 PCR 中被读作 G，因此我们可以通过测序分析 *BLCAP* 转录本中的 A-to-I 编辑。Sanger 测序结果显示，*BLCAP* 转录本中第 5 位的 A 有少量被读成 G，表明 *BLCAP* 转录本的第 5 位发生了 A-to-I 编辑。此外，我们还发现 6TG 处理细胞后的 *BLCAP* 转录本中第 5 位的 A 被读成 G 的比例明显增加，表明 6TG 处理导致 *BLCAP* 转录本第 5 位的 A-to-I 编辑增加（**图 4-7C**）。

中国知网 https://www.cnki.net

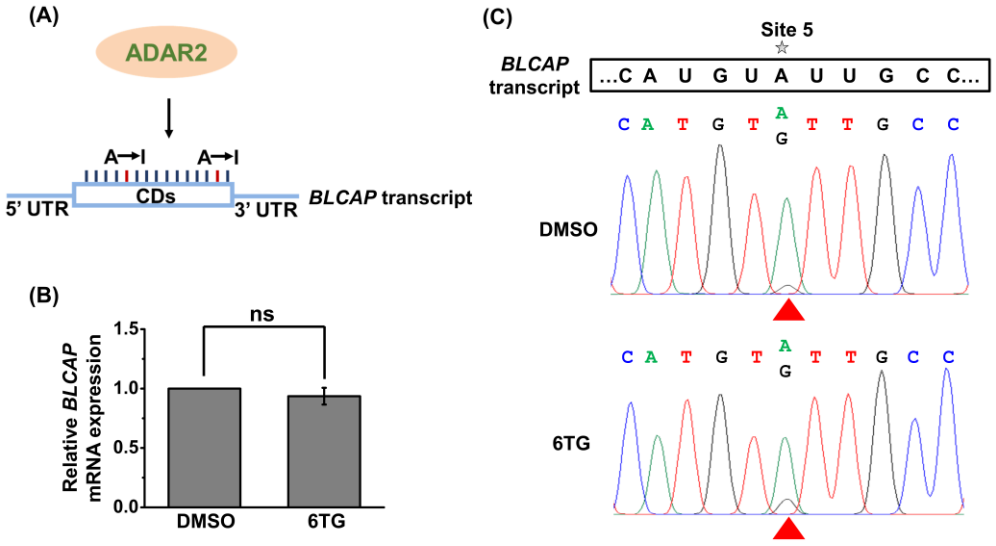
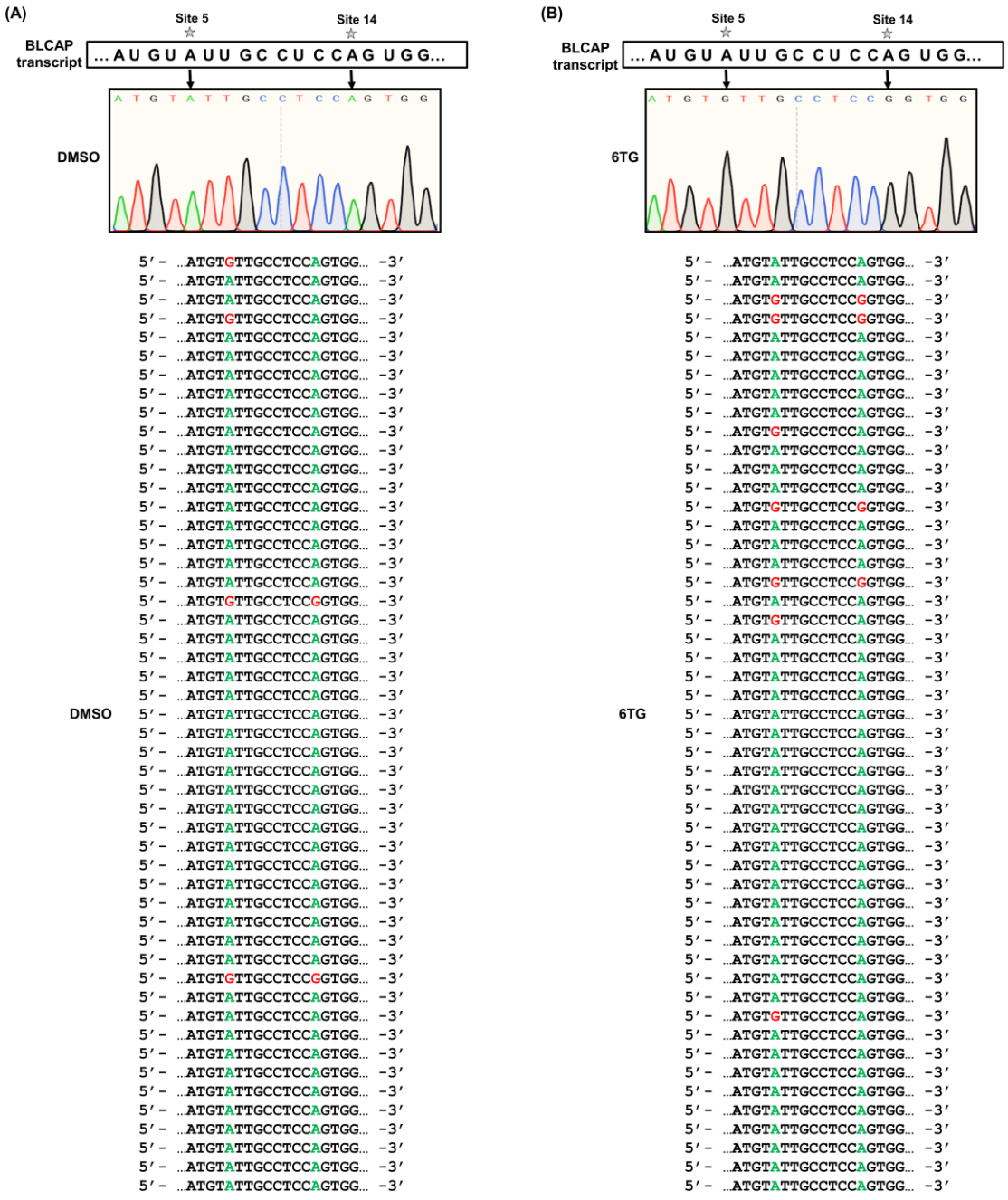


图 4-7 6TG 处理细胞后对 *BLCAP* 转录本中 A-to-I 编辑的影响。（A）ADAR2 在 *BLCAP* 转录本中进行 A-to-I 编辑的示意图。（B）6TG 处理细胞前后 *BLCAP* mRNA 的表达水平分析。（C）通过 Sanger 测序考察 6TG 处理细胞前后 *BLCAP* 转录本中第 5 位 A-to-I 编辑的变化（上图为对照 DMSO 处理细胞后 *BLCAP* 转录本的 Sanger 测序图，下图为 6TG 处理细胞后 *BLCAP* 转录本的 Sanger 测序图）。ns 代表没有显著性差异。

为了定量分析 *BLCAP* 转录本第 5 位的 A-to-I 编辑水平变化，我们进行了单克隆测序分析。我们对 6TG 处理前后 *BLCAP* 转录本的 50 个阳性克隆子分别进行了 Sanger 测序分析（**图 4-8**）。单克隆测序的统计结果显示，6TG 处理后 *BLCAP* 转录本第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑分别从 8%增加到 14%和从 4%增加到 8%（**图 4-9**）。总的来说，这些结果表明 6TG 处理不会改变 *BLCAP* 转录本的表达，但是可以提高 *BLCAP* 转录本编码区第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑水平。

中国知网 https://www.cnki.net


(A)
Site 5
Site 14
BLCAP transcript
... A U G U A U U G C C U C C A G U G G...
DMSO
5′ – ...ATGTGTTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTGTTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTGTTGCCTCCGGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
DMSO 5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′
5′ – ...ATGTATTGCCTCCAGTGG... –3′

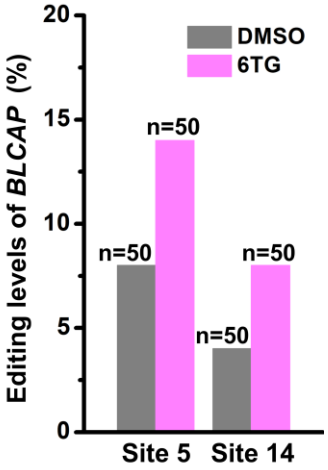


图 4-9 通过单克隆测序定量分析 6TG 处理细胞前后 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑水平。

4.3.4 ADAR2 介导 *BLCAP* 转录本的 A-to-I 编辑能调节细胞活力

据报道，ADAR2 在脑癌[341]和肝细胞癌[342]中起肿瘤抑制基因的作用。ADAR2 的过表达可诱导食管鳞状细胞癌细胞凋亡[343]。ADAR2 能催化包括 *BLCAP* 转录本在内的多个靶标的 A-to-I 编辑[338]。此外，*BLCAP* 转录本中的 A-to-I 编辑水平在星形细胞瘤、膀胱癌和结直肠癌中总体呈下降趋势[339]。这些研究暗示 ADAR2 介导 *BLCAP* 转录本的 A-to-I 编辑可能参与调控癌症的发生。

从上面的研究中我们发现 6TG 处理 Jurkat-T 细胞后在降低细胞活性的同时，也会诱导 *ADAR2* mRNA 的表达升高和 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑增加。沿着这条线，我们猜测 *ADAR2* 的表达增加可以提高 *BLCAP* 转录物中的 A-to-I 编辑，最终诱导细胞死亡。基于此，我们首先通过在 Jurkat-T 细胞中过表达 *ADAR2* 来评估细胞活力（**图 4-10A**）。正如预期的那样，*ADAR2* 的过表达降低了细胞活力（**图 4-10B**）。我们接下来分析了 *ADAR2* 过表达的 Jurkat-T 细胞中 *BLCAP* 转录本中的 A-to-I 编辑。Sanger 测序分析表明，*ADAR2* 的过表达导致 *BLCAP* 转录本第 5 位的 A-to-I 编辑增加（**图 4-10C**）。单克隆测序的统计结果表明，*ADAR2* 过表达会导致第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑分别从 8%增加到 28%和从 4%增加到 10%（**图 4-10D**）。

中国知网 https://www.cnki.net

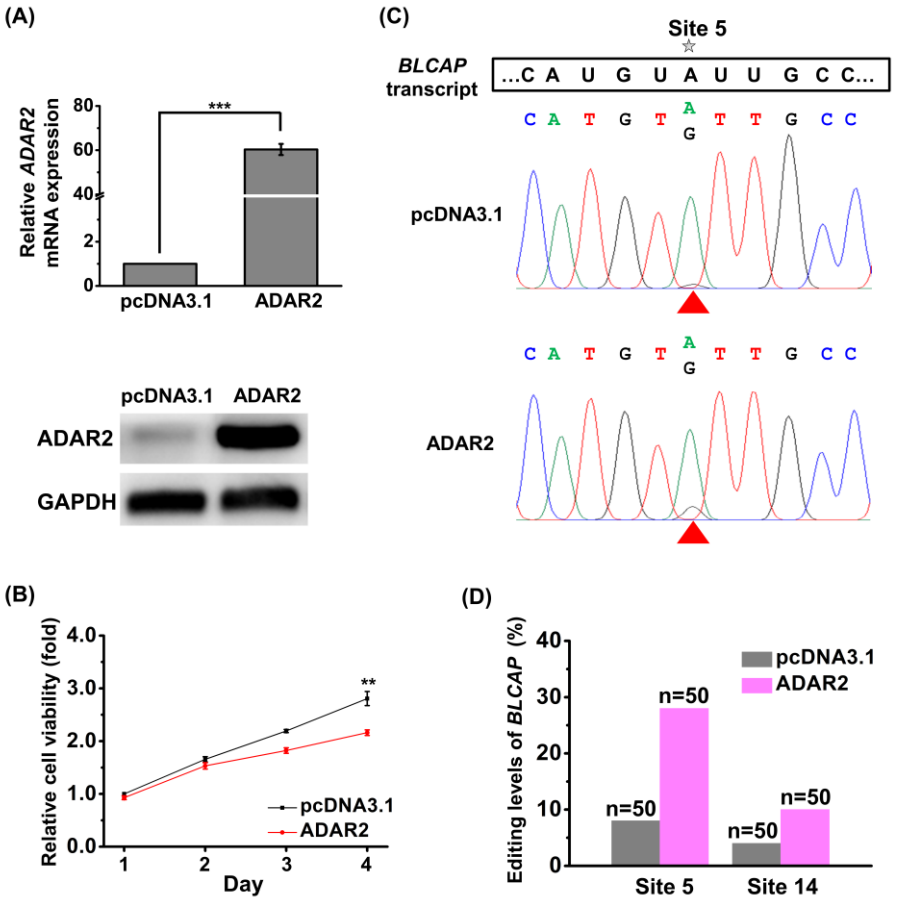


图 4-10 *ADAR2* 过表达对细胞活力和 *BLCAP* 转录本 A-to-I 编辑的影响。（A）通过实时定量 PCR 和 Western Blot 评估 *ADAR2* 的过表达。（B）*ADAR2* 过表达对细胞活力的影响。（C）通过 Sanger 测序考察 *ADAR2* 过表达前后 *BLCAP* 转录本中第 5 位 A-to-I 编辑的变化（上图为对照空质粒转入细胞后 *BLCAP* 转录本的 Sanger 测序图，下图为含有 *ADAR2* 的质粒转入细胞后 *BLCAP* 转录本的 Sanger 测序图）。（D）通过单克隆测序定量分析 *ADAR2* 过表达前后 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑。** $p < 0.01$，*** $p < 0.001$。

此外，我们还评估了 *ADAR2* 的敲低对细胞活力和 *BLCAP* 转录本 A-to-I 编辑的影响。如**图 4-11** 所示，*ADAR2* 敲低后略微增加了细胞活力，同时降低了了 *BLCAP* 转录本第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑水平。

综上，ADAR2 的表达会影响细胞的活力和 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑。此外，我们发现 *ADAR2* 过表达对细胞的影响与 6TG 处理细胞相似，即 6TG 处理和 *ADAR2* 的过表达都会增加 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑并导致细胞死亡（**图 4-2**、**图 4-9** 和**图 4-10**）。因此，我们猜测 ADAR2 介导的 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑能调节细胞活力，且此通路参与 6TG 介导的细胞死亡中。

中国知网 https://www.cnki.net

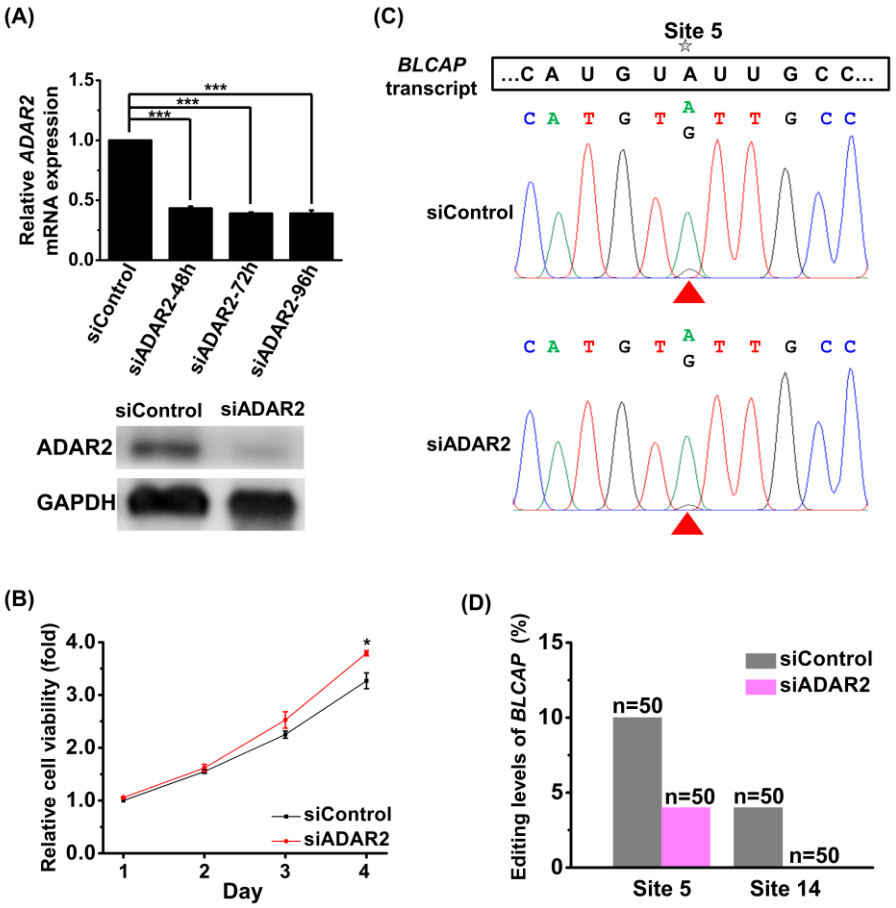


图 4-11 *ADAR2* 敲低对细胞活力和 *BLCAP 转录本* A-to-I 编辑的影响。（A）通过实时定量 PCR 和 Western Blot 评估 *ADAR2* 的敲低。（B）*ADAR2* 敲低对细胞活力的影响。（C）通过 Sanger 测序考察 *ADAR2* 敲低前后 *BLCAP* 转录本中第 5 位 A-to-I 编辑的变化（上图为对照 siRNA 转入细胞后 *BLCAP* 转录本的 Sanger 测序图，下图为靶向 *ADAR2* 的 siRNA 转入细胞后 *BLCAP* 转录本的 Sanger 测序图）。（D）通过单克隆测序定量分析 *ADAR2* 敲低前后 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑。* $p < 0.05$，*** $p < 0.001$。

4.3.5 *BLCAP* 转录本的 A-to-I 编辑能调节细胞活力

为了验证 ADAR2 是通过改变 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑来调节细胞活力，我们直接考察了 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑对细胞活力的影响。鉴于 I 与 C 错配，导致 A-to-I 编辑在翻译中被读成 G，从而改变 BLCAP 蛋白的氨基酸序列。为此，我们构建了两个质粒，以进一步探索 *BLCAP* 转录本中 A-to-I 编辑的生物学意义。其中一个质粒在 *BLCAP* 转录本的第 5 位和第 14 位用 G 取代 A，代表完全编辑的 *BLCAP*（命名为 edited-

中国知网 https://www.cnki.net

BLCAP）；另一个质粒在 *BLCAP* 转录本的第 5 位和第 14 位保留 A，代表未编辑的 *BLCAP*（命名为 unedited-BLCAP）（**图 4-12A**）。我们分别将两个质粒转入 Jurkat-T 细胞，发现 edited-BLCAP 的过表达会降低细胞活力，然而 unedited-BLCAP 的过表达并没有影响细胞活力（**图 4-12B** 和 **C**）。该结果表明，*BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑对于诱导细胞死亡有重要的作用，具体的机制仍需进一步研究。

总的来说，我们的研究结果表明 ADAR2 能通过增加 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑来诱导细胞死亡。此外，该研究还表明 6TG 处理细胞后可以诱导 ADAR2 的表达升高，导致 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑增加，并最终导致细胞死亡增加。这一发现为 6TG 治疗急性淋巴细胞白血病提供了新的机制。此外，ADAR2-BLCAP 通路可能成为未来临床治疗急性淋巴细胞白血病的潜在靶点。

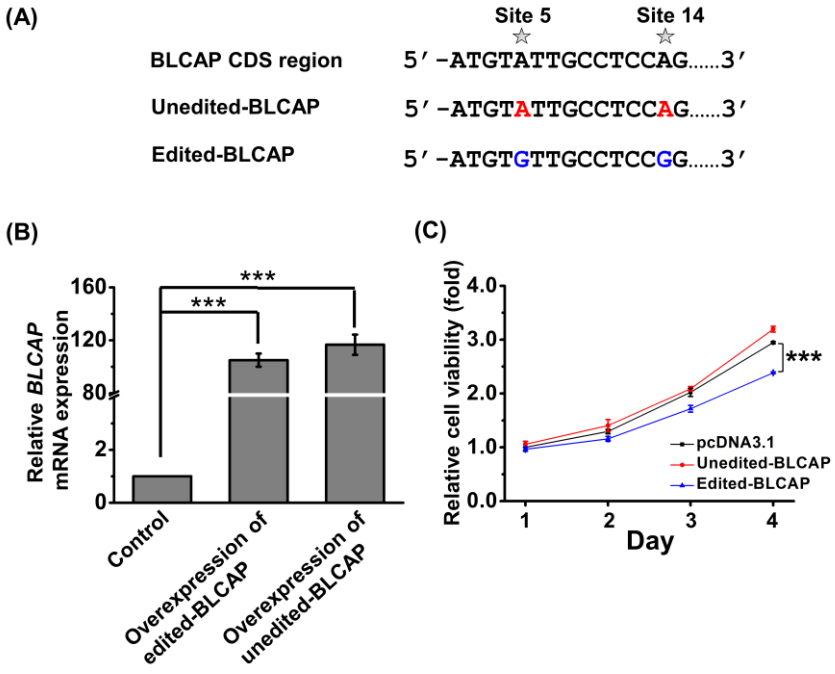


图 4-12 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑对细胞活力的影响。（A）构建的质粒 edited-BLCAP 和 unedited-BLCAP 的序列示意图。（B）通过实时定量 PCR 评估 *BLCAP* 的过表达。（C）*BLCAP* 过表达对细胞活力的影响。*** $p < 0.001$。

中国知网 https://www.cnki.net

4.4 结论

在本章研究中，我们评估了 6TG 与 RNA 的结合，并研究了其对急性淋巴细胞白血病细胞中 mRNA 腺苷修饰的影响。LC-MS/MS 结果表明 ^{S}G 可以掺入不同类型的 RNA 中，其中 mRNA 含有最丰富的 ^{S}G。此外，我们发现 6TG 处理可以诱导 ADAR2 的表达增加，从而提高 mRNA 中 A-to-I 编辑的水平。值得注意的是，我们证明 A-to-I 的编辑会参与 6TG 介导的细胞死亡中。具体而言，6TG 处理细胞后会增加 ADAR2 的表达，从而增加靶标 *BLCAP* 转录本第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑水平，最终导致细胞死亡增加。该研究提出了 6TG 诱导细胞死亡的细胞毒性新机制，揭示了 6TG 治疗急性淋巴细胞白血病的新机制。此外，ADAR2-BLCAP 通路可能成为未来临床治疗急性淋巴细胞白血病的潜在靶点。未来对 6TG 处理细胞后 A-to-I 编辑的全转录组分析将进一步促进我们对 6TG 通过 RNA 修饰诱导细胞毒性的分子机制的理解。

中国知网 https://www.cnki.net

第五章 总结与展望

5.1 总结

RNA 修饰是表观遗传调控的重要层面，不仅在基因表达的调控中发挥重要作用，而且与多种疾病的发生和发展密切相关。本论文主要基于液相色谱-质谱联用技术，结合分子生物学等手段，鉴定了哺乳动物 RNA 中的新型双甲基修饰腺苷，并对腺苷修饰的生物学功能进行了研究。具体包括以下几个方面：

1. 哺乳动物转运 RNA（transfer RNA，tRNA）中新型双甲基修饰腺苷 *N*1,N^6-二甲基腺苷（*N*1,N^6-dimethyladenosine，$m^{1,6}A$）的发现和鉴定。建立了液相色谱-串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）分析腺苷甲基化修饰的方法。利用该方法，在哺乳动物细胞 tRNA 中发现并鉴定了一种全新的双甲基修饰腺苷：$m^{1,6}A$。该修饰普遍存在于哺乳动物细胞和组织的 tRNA 中，是一种依赖 *S*-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体的内源性修饰。定量结果表明哺乳动物 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量为 0.0049%~0.047%。此外，通过对人类乳腺癌组织的分析，发现癌组织 tRNA 中 $m^{1,6}A$ 的含量相较于癌旁组织显著升高，暗示 $m^{1,6}A$ 可能参与调控乳腺癌的发生和发展。该研究发现和鉴定了一种新的修饰类型，扩大了哺乳动物 RNA 的修饰种类，增加了 RNA 修饰介导的基因表达调控多样性。

2. 哺乳动物 tRNA 中新型双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$ 的功能研究。通过 LC-MS/MS 进一步探索 tRNA 中新修饰 $m^{1,6}A$ 的位置和生物合成途径。质谱结果表明 $m^{1,6}A$ 修饰发生在 tRNA 的第 58 位，推测是该位置的 *N*1-甲基腺苷（*N*1-methyladenosine，m^1A）的进一步 *N*6 位甲基化修饰产物。定量结果表明 tRNA 第 58 位的 m^1A 约 0.2%转化为 $m^{1,6}A$。体内和体外的分子生物学实验证实新修饰 $m^{1,6}A$ 是动态可逆的，由去甲基化酶 ALKBH3 催化去甲基化。此外，还发现 $tRNA^{iMet}$ 中的 $m^{1,6}A$ 可能参与 m^1A 介导的表观遗传调控。总之，该研究揭示了 tRNA 中一种新的可逆修饰，为 tRNA 可逆甲基化调控转录后基因表达提供了新的机制。

3. RNA 腺苷编辑（adenosine-to-inosine，A-to-I）在 6-硫鸟嘌呤（6-thioguanine，6TG）介导的细胞死亡中的功能研究。通过 LC-MS/MS 考察了药物 6TG 处理急性淋巴细胞白血病细胞后 RNA 中 6-硫鸟苷（6-thioguanosine，^SG）的掺入，结果显示 ^SG 可以整合到不同类型的 RNA 中，其中 mRNA 含有最丰富的 ^SG。同时，探索了 6TG 处理对 mRNA 中腺苷修饰的影响，定量结果表明 6TG 处理会诱导脱氨酶 ADAR2 的表达增加，导致 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第

中国知网 https://www.cnki.net

14 位的 A-to-I 编辑增加。此外，体内细胞实验表明 ADAR2 介导 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑能调控细胞活力，且高编辑的 *BLCAP* 会促进细胞的死亡。总之，该研究表明药物 6TG 进入细胞后可通过上调 ADAR2 的表达提高 *BLCAP* 转录本中第 5 位和第 14 位的 A-to-I 编辑来诱导细胞死亡增加，为 6TG 诱导细胞死亡的细胞毒性提供了一种新的机制，同时也为 RNA 表观遗传修饰在疾病治疗中的潜在功能提供了新的基础。

通过以上研究，我们鉴定了哺乳动物 tRNA 中的一种新型双甲基修饰腺苷 $m^{1,6}A$，并发现该修饰在体内是动态可逆的，可能参与 m^1A 介导的表观遗传调控。此外，我们研究了 RNA 腺苷修饰在 6TG 介导的细胞死亡中发挥的潜在作用，发现 A-to-I 编辑参与 6TG 介导的细胞死亡，表明 RNA 腺苷修饰在疾病发生和疾病治疗中都具有重要的调控功能。

5.2 展望

5.2.1 博士研究工作的展望

我的博士研究工作主要是围绕腺苷修饰进行研究。我们在哺乳动物 tRNA 中鉴定了一种全新的可逆修饰 $m^{1,6}A$，但是关于它在生物内发挥的作用还不清楚。这主要是由于我们没有鉴定出 $m^{1,6}A$ 的修饰酶和结合蛋白。未来可以从这个角度出发继续探索 $m^{1,6}A$ 的修饰酶和结合蛋白，进一步研究它的生理功能。基于此，首先采用免疫交联结合质谱蛋白质组学分析找到与 $m^{1,6}A$ 相作用的蛋白质，再通过数据库搜索进一步筛查满足甲基化催化或者甲基化结合的相关蛋白质，随后通过体外和体内的分子生物学实验对蛋白质的活性进行更深层次的鉴定，最后找到 $m^{1,6}A$ 的修饰酶和结合蛋白。除了鉴定修饰酶和结合蛋白外，准确定位 $m^{1,6}A$ 在各种 tRNA 中的位置对于破译其生理学功能也是必要的。在本研究工作中只探索了特定类型 tRNA 中的 $m^{1,6}A$，未来可以结合已经建立的 m^1A 和 m^6A 的单碱基定位分析方法开发灵敏准确的 $m^{1,6}A$ 高通量定位分析技术，更为系统深入地揭示 $m^{1,6}A$ 在 tRNA 中的修饰位点。此外，我们还发现 A-to-I 编辑通过调控 *BLCAP* 的编辑参与 6TG 介导的细胞死亡中，但是更深层次的机理以及是否还有其他转录本中的 A-to-I 编辑参与调控还不清楚。未来对 6TG 处理后 A-to-I 编辑的全转录组分析将进一步促进我们对 6TG 通过 RNA 修饰诱导细胞毒性的分子机制的理解。该研究不仅暗示 A-to-I 编辑可能参与 6TG 介导的急性淋巴细胞白血病治疗中，另一方面，也暗示我们 A-to-I 编辑可能也与急性淋巴细胞

中国知网 https://www.cnki.net

白血病的发生和发展有关。当然，这还需要进一步的实验验证。未来对急性淋巴细胞白血病病人 A-to-I 编辑的全转录组分析将会帮助我们了解 A-to-I 编辑在急性淋巴细胞白血病发生和发展中的生理功能，也会为急性淋巴细胞白血病的治疗提供有效可靠的理论依据。

5.2.2 RNA 修饰领域的展望

自从 RNA 可逆修饰的发现以来，对 RNA 修饰的探索一直是研究热点。质谱技术和高通量测序技术的迅速发展，推动了 RNA 修饰领域的进展。越来越多的证据显示 RNA 修饰在多种生理过程中发挥着重要的作用，特别是在疾病和癌症的发展中扮演着关键的角色。但是，目前对 RNA 修饰的研究仍处于初级阶段，未来对 RNA 修饰的研究可从以下几个方面努力：

1. RNA 修饰的定性和定量分析。目前已在 RNA 中鉴定了 170 多种化学修饰，这些修饰分布在不同类型的 RNA 中。对于已发现的 RNA 修饰，准确地定量它们在生物体内的含量是研究的基石。一些 RNA 修饰是动态可逆的，因此了解修饰在不同生理阶段的含量变化有利于破译它们在生物体内的动态调控作用。特别是，与人类密切相关的各种疾病和癌症，它们的发生和发展也和 RNA 修饰密切相关，会是未来研究的重点。RNA 修饰不仅可以独立地发挥其生物学功能，还能协同相互作用。不同修饰在生物体内的丰度不一，有些甚至差别较大，开发能同时检测不同修饰的分析方法将有利于研究 RNA 修饰在生命体中的相互作用。除了已发现的 RNA 修饰，未来需要开发高灵敏的分析方法用于鉴定更多新的修饰。对于未发现的 RNA 新修饰，不仅要扩展不同的修饰类型，还要补充已发现的修饰在不同物种和不同 RNA 类型中的覆盖。基于质谱的分析方法是探索新修饰最有力的工具，结合细胞代谢标记有望成为探索新修饰的潜力方法。同时，对于质谱响应较差的 RNA 修饰，采用衍生化结合质谱分析能提供更灵敏的检测方法，更有助于新修饰的发现。

2. RNA 修饰的定位分析。RNA 修饰有着广泛的生理功能。同一种修饰在不同 RNA 类型和不同区域中的功能是有差异的。为此，准确地知道修饰在 RNA 的具体位置对于深入剖析它们的功能是至关重要的。高通量测序技术的进步推动了 RNA 修饰的定位分析，基于测序的定位方法是目前的主流方法。特别是单碱基分辨率的方法，已被广泛地开发用于修饰的精确定位。不同修饰的结构不一样，修饰特性也不同，需要根据修饰的类型制定不同的测序方案。目前仅有少数几种 RNA 修饰能实现全转录组的单碱基定位分析。由于大多数修饰在生物体内的分布仍不清楚，这阻碍了我们对它们的功能研究。因此，未来的重点是拓展其他修饰的定位研究，针对性地开发高选择高灵敏的单碱基分析方法。

中国知网 https://www.cnki.net

同时，开发普适性较为广泛的方法用于不同修饰的定位分析，将更有助于我们了解 RNA 修饰在生命体中的相互作用。

就目前的测序方法而已，不同课题组采用不同方法鉴定出的修饰位点会有差异。这可能跟方法本身有关，也可能跟样本差异、建库流程、测序深度和生物信息学分析软件等有关。未来我们需要进一步标准化建库方法和优化生物信息学分析软件。仅仅依靠测序手段没办法准确定位修饰的位置，通常需要辅助适当的前处理过程，例如使用化学试剂标记、使用抗体富集、通过酶促标记等。其中，化学试剂标记和酶促标记都具有高选择性，能产生易于测序检测的信号，能实现 RNA 修饰的单碱基定位分析。然而，化学试剂的反应往往是比较剧烈的，会造成 RNA 降解，不利于后续的建库测序。在这方面，我们可以优化反应条件，也可以设计其他的温和高效反应。相反，酶促标记是温和的，更加适用于 RNA 修饰的分析。但是，由于酶的特异性，能用于修饰标记的酶是有限的，未来可以探索与修饰相关的酶建立更多的测序方法。基于抗体的测序方法，特别适用于低丰度修饰的分析，但是仍存局限性。首先，基于抗体的方法不能实现单碱基分析，可以与其他方法结合提高分辨率。其次，基于抗体的方法对于抗体的要求较高，未来可以提高抗体的特异性。另外，目前商品化的抗体种类比较少，限制了其的应用，未来可以开发更多的抗体用于不同修饰的分析。逆转录酶是 RNA 修饰定位分析中非常关键却最容易被忽视的蛋白质。不同的逆转录酶对同一种 RNA 修饰或者同一种逆转录酶对不同的 RNA 修饰产生的影响是不一样的，有时仅通过改变逆转录酶便可实现 RNA 修饰的单碱基定位分析。因此，未来需要更加重视逆转录酶在 RNA 修饰定位分析中的作用。

3. RNA 修饰的相关生物酶分析。RNA 修饰在生物体内是通过修饰酶催化形成的。同样，生物体内也存在能调控 RNA 修饰可逆状态的去修饰酶。此外，生物体内还存在各种修饰结合蛋白，它们是 RNA 修饰发挥不同生理功能的关键因子。探索 RNA 修饰的修饰酶、去修饰酶和结合蛋白能帮助我们了解 RNA 修饰在生物体中的动态调控机制。通过了解 RNA 修饰的动态调控机制，有利于破译它们在各种生理过程和疾病的发生中发挥的作用。此外，我们还可以通过设计小分子药物人为干预 RNA 修饰相关生物酶在体内的表达来调控 RNA 修饰的状态，最终影响疾病的发展。这已被证明是治疗相关疾病的有效途径之一。

总的来说，RNA 修饰的研究仍处于初步阶段，实现全转录组修饰的广泛分析需要更灵敏、更准确的高通量分析方法。除了 RNA 修饰，DNA 修饰和组蛋白修饰也是表观遗传修饰的重要组成部分。将基因组、转录组和蛋白质组联合分析将会推动我们对生命体完整调控机制的深入认识和了解。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] Chao Y L, Pecot C V. Targeting epigenetics in lung Cancer [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2021, 11(6): a038000.

[2] Kanherkar R R, Bhatia-Dey N, Csoka A B. Epigenetics across the human lifespan [J]. Front Cell Dev Biol, 2014, 2: 49.

[3] Barbieri I, Kouzarides T. Role of RNA modifications in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(6): 303-322.

[4] Liu T, Ma C J, Yuan B F, Feng Y Q. Modificaomics: deciphering the functions of biomolecule modifications [J]. Sci China Chem, 2018, 61(4): 381-392.

[5] Yuan B F. Assessment of DNA Epigenetic Modifications [J]. Chem Res Toxicol, 2020, 33(3): 695-708.

[6] Law J A, Jacobsen S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(3): 204-220.

[7] Feng S, Cokus S J, Zhang X, Chen P Y, Bostick M, Goll M G, Hetzel J, Jain J, Strauss S H, Halpern M E, Ukomadu C, Sadler K C, Pradhan S, Pellegrini M, Jacobsen S E. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(19): 8689-8694.

[8] Goll M G, Bestor T H. Eukaryotic cytosine methyltransferases [J]. Annu Rev Biochem, 2005, 74: 481-514.

[9] Robertson K D. DNA methylation and human disease [J]. Nat Rev Genet, 2005, 6(8): 597-610.

[10] Scarano M I, Strazzullo M, Matarazzo M R, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease [J]. J Cell Physiol, 2005, 204(1): 21-35.

[11] Ito S, Shen L, Dai Q, Wu S C, Collins L B, Swenberg J A, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine [J]. Science, 2011, 333(6047): 1300-1303.

[12] Tahiliani M, Koh K P, Shen Y, Pastor W A, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer L M, Liu D R, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1 [J]. Science, 2009, 324(5929): 930-935.

[13] He Y F, Li B Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song C X, Zhang K, He C, Xu G L. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA [J]. Science, 2011, 333(6047): 1303-1307.

[14] Maiti A, Drohat A C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites [J]. J Biol Chem,

中国知网 https://www.cnki.net

2011, 286(41): 35334-35338.

[15] Feng Y, Chen J J, Xie N B, Ding J H, You X J, Tao W B, Zhang X x, Yi C q, Zhou X, Yuan B F. Direct decarboxylation of ten-eleven translocation-produced 5-carboxylcytosine in mammalian genomes forms a new mechanism for active DNA demethylation [J]. Chem Sci, 2021, 12(34): 11322-11329.

[16] Feng Y, Xie N B, Tao W B, Ding J H, You X J, Ma C J, Zhang X x, Yi C q, Zhou X, Yuan B F. Transformation of 5-carboxylcytosine to cytosine through C–C bond cleavage in human cells constitutes a novel pathway for DNA demethylation [J]. CCS Chemistry, 2021, 3(4): 994-1008.

[17] Kamińska E, Korytiaková E, Reichl A, Müller M, Carell T. Intragenomic Decarboxylation of 5-Carboxy-2′-deoxycytidine [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2021, 60(43): 23207-23211.

[18] Bachman M, Uribe-Lewis S, Yang X, Williams M, Murrell A, Balasubramanian S. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification [J]. Nature chemistry, 2014, 6(12): 1049-1055.

[19] Song C X, Szulwach K E, Dai Q, Fu Y, Mao S Q, Lin L, Street C, Li Y, Poidevin M, Wu H, Gao J, Liu P, Li L, Xu G L, Jin P, He C. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming [J]. Cell, 2013, 153(3): 678-691.

[20] Munzel M, Globisch D, Carell T. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2011, 50(29): 6460-6468.

[21] Kellinger M W, Song C X, Chong J, Lu X Y, He C, Wang D. 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reduce the rate and substrate specificity of RNA polymerase II transcription [J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(8): 831-833.

[22] Xue J H, Chen G D, Hao F, Chen H, Fang Z, Chen F F, Pang B, Yang Q L, Wei X, Fan Q Q, Xin C, Zhao J, Deng X, Wang B A, Zhang X J, Chu Y, Tang H, Yin H, Ma W, Chen L, Ding J, Weinhold E, Kohli R M, Liu W, Zhu Z J, Huang K, Tang H, Xu G L. A vitamin-C-derived DNA modification catalysed by an algal TET homologue [J]. Nature, 2019, 569(7757): 581-585.

[23] Janulaitis A, Klimasauskas S, Petrusyte M, Butkus V. Cytosine modification in DNA by BcnI methylase yields N4-methylcytosine [J]. FEBS Lett, 1983, 161(1): 131-134.

[24] Wilson G G, Murray N E. Restriction and modification systems [J]. Annu Rev Genet, 1991, 25(1): 585-627.

[25] Klimasauskas S, Steponaviciene D, Maneliene Z, Petrusyte M, Butkus V, Janulaitis A. M.Smal is an N4-methylcytosine specific DNA-methylase [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6607-6609.

[26] Yu M, Ji L, Neumann D A, Chung D H, Groom J, Westpheling J, He C, Schmitz R J. Base-resolution detection of N4-methylcytosine in genomic DNA using 4mC-Tet-assisted-bisulfite-

中国知网 https://www.cnki.net

sequencing [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(21): e148.

[27] Clark T A, Murray I A, Morgan R D, Kislyuk A O, Spittle K E, Boitano M, Fomenkov A, Roberts R J, Korlach J. Characterization of DNA methyltransferase specificities using single-molecule, real-time DNA sequencing [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(4): e29.

[28] Ye P, Luan Y, Chen K, Liu Y, Xiao C, Xie Z. MethSMRT: an integrative database for DNA N6-methyladenine and N4-methylcytosine generated by single-molecular real-time sequencing [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D85-D89.

[29] Klimasauskas S, Gerasimaite R, Vilkaitis G, Kulakauskas S. N4,5-dimethylcytosine, a novel hypermodified base in DNA [J]. Nucleic Acids Res Suppl, 2002, 2: 73-74.

[30] Alexeeva M, Guragain P, Tesfahun A N, Tomkuviene M, Arshad A, Gerasimaite R, Ruksenaite A, Urbanaviciute G, Bjoras M, Laerdahl J K, Klungland A, Klimasauskas S, Bjelland S. Excision of the doubly methylated base N(4),5-dimethylcytosine from DNA by Escherichia coli Nei and Fpg proteins [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2018, 373(1748): 20170337.

[31] Heithoff D M, Sinsheimer R L, Low D A, Mahan M J. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence [J]. Science, 1999, 284(5416): 967-970.

[32] Greer E L, Blanco M A, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizabal-Corrales D, Hsu C H, Aravind L, He C, Shi Y. DNA Methylation on N(6)-Adenine in C. elegans [J]. Cell, 2015, 161(4): 868-878.

[33] Zhang G, Huang H, Liu D, Cheng Y, Liu X, Zhang W, Yin R, Zhang D, Zhang P, Liu J, Li C, Liu B, Luo Y, Zhu Y, Zhang N, He S, He C, Wang H, Chen D. N(6)-methyladenine DNA modification in Drosophila [J]. Cell, 2015, 161(4): 893-906.

[34] M S. Adenine N6-methylation in diverse fungi [J]. Nat Genet, 2017, 49(6): 823–824.

[35] Huang W, Xiong J, Yang Y, Liu S M, Yuan B F, Feng Y Q. Determination of DNA adenine methylation in genomes of mammals and plants by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. RSC Adv, 2015, 5(79): 64046-64054.

[36] Liang Z, Shen L, Cui X, Bao S, Geng Y, Yu G, Liang F, Xie S, Lu T, Gu X, Yu H. DNA N(6)-Adenine Methylation in Arabidopsis thaliana [J]. Dev Cell, 2018, 45(3): 406-416.

[37] Liu J, Zhu Y, Luo G Z, Wang X, Yue Y, Wang X, Zong X, Chen K, Yin H, Fu Y, Han D, Wang Y, Chen D, He C. Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig [J]. Nat Commun, 2016, 7(1): 1-7.

[38] Wu T P, Wang T, Seetin M G, Lai Y, Zhu S, Lin K, Liu Y, Byrum S D, Mackintosh S G, Zhong M, Tackett A, Wang G, Hon L S, Fang G, Swenberg J A, Xiao A Z. DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells [J]. Nature, 2016, 532(7599): 329-333.

[39] Xiao C L, Zhu S, He M, Chen, Zhang Q, Chen Y, Yu G, Liu J, Xie S Q, Luo F, Liang Z, Wang D P, Bo X C, Gu X F, Wang K, Yan G R. N(6)-Methyladenine DNA Modification in the Human

中国知网 https://www.cnki.net

Genome [J]. Mol Cell, 2018, 71(2): 306-318

[40] Kweon S M, Chen Y, Moon E, Kvederaviciutė K, Klimasauskas S, Feldman D E. An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing. [J]. Mol Cell, 2019, 74(6): 1138–1147.

[41] Wu K J. The epigenetic roles of DNA N(6)-Methyladenine (6mA) modification in eukaryotes [J]. Cancer Lett, 2020, 494(40-46.

[42] Liu X, Lai W, Li Y, Chen S, Liu B, Zhang N, Mo J, Lyu C, Zheng J, Du Y R, Jiang G, Xu G L, Wang H. N(6)-methyladenine is incorporated into mammalian genome by DNA polymerase [J]. Cell Res, 2021, 31(1): 94-97.

[43] Musheev M U, Baumgartner A, Krebs L, Niehrs C. The origin of genomic N(6)-methyl-deoxyadenosine in mammalian cells [J]. Nat Chem Biol, 2020, 16(6): 630-634.

[44] Koh C W Q, Goh Y T, Toh J D W, Neo S P, Ng S B, Gunaratne J, Gao Y G, Quake S R, Burkholder W F, Goh W S S. Single-nucleotide-resolution sequencing of human N6-methyldeoxyadenosine reveals strand-asymmetric clusters associated with SSBP1 on the mitochondrial genome [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(22): 11659-11670.

[45] Luo G Z, Wang F, Weng X, Chen K, Hao Z, Yu M, Deng X, Liu J, He C. Characterization of eukaryotic DNA N(6)-methyladenine by a highly sensitive restriction enzyme-assisted sequencing [J]. Nat Commun, 2016, 7(1): 1-6.

[46] Hao Z, Wu T, Cui X, Zhu P, Tan C, Dou X, Hsu K W, Lin Y T, Peng P H, Zhang L S, Gao Y, Hu L, Sun H L, Zhu A, Liu J, Wu K J, He C. N(6)-Deoxyadenosine Methylation in Mammalian Mitochondrial DNA [J]. Mol Cell, 2020, 78(3): 382-395.

[47] Kallen R G, Simon M, Marmur J. The new occurrence of a new pyrimidine base replacing thymine in a bacteriophage DNA:5-hydroxymethyl uracil [J]. J Mol Biol, 1962, 5: 248-250.

[48] Rae P M. Hydroxymethyluracil in eukaryote DNA: a natural feature of the pyrrophyta (dinoflagellates) [J]. Science, 1976, 194(4269): 1062-1064.

[49] Kawasaki F, Beraldi D, Hardisty R E, McInroy G R, van Delft P, Balasubramanian S. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethyluracil in the eukaryote parasite Leishmania [J]. Genome Biol, 2017, 18(1): 23.

[50] Pfaffeneder T, Spada F, Wagner M, Brandmayr C, Laube S K, Eisen D, Truss M, Steinbacher J, Hackner B, Kotljarova O, Schuermann D, Michalakis S, Kosmatchev O, Schiesser S, Steigenberger B, Raddaoui N, Kashiwazaki G, Muller U, Spruijt C G, Vermeulen M, Leonhardt H, Schar P, Muller M, Carell T. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA [J]. Nat Chem Biol, 2014, 10(7): 574-581.

[51] Gommers-Ampt J H, Van Leeuwen F, de Beer A L, Vliegenthart J F, Dizdaroglu M, Kowalak

中国知网 https://www.cnki.net

J A, Crain P F, Borst P. beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil: a novel modified base present in the DNA of the parasitic protozoan T. brucei [J]. Cell, 1993, 75(6): 1129-1136.

[52] Borst P, Sabatini R. Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions [J]. Annual review of microbiology, 2008, 62: 235-251.

[53] Bullard W, Lopes da Rosa-Spiegler J, Liu S, Wang Y, Sabatini R. Identification of the glucosyltransferase that converts hydroxymethyluracil to base J in the trypanosomatid genome [J]. J Biol Chem, 2014, 289(29): 20273-20282.

[54] Cliffe L J, Kieft R, Southern T, Birkeland S R, Marshall M, Sweeney K, Sabatini R. JBP1 and JBP2 are two distinct thymidine hydroxylases involved in J biosynthesis in genomic DNA of African trypanosomes [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(5): 1452-1462.

[55] van Leeuwen F, Wijsman E R, Kuyl-Yeheskiely E, van der Marel G A, van Boom J H, Borst P. The telomeric GGGTTA repeats of Trypanosoma brucei contain the hypermodified base J in both strands [J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(13): 2476-2482.

[56] van Leeuwen F, Wijsman E R, Kieft R, van der Marel G A, van Boom J H, Borst P. Localization of the modified base J in telomeric VSG gene expression sites of Trypanosoma brucei [J]. Genes Dev, 1997, 11(23): 3232-3241.

[57] van Leeuwen F, Taylor M C, Mondragon A, Moreau H, Gibson W, Kieft R, Borst P. beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil is a conserved DNA modification in kinetoplastid protozoans and is abundant in their telomeres [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2366-2371.

[58] Ekanayake D K, Cipriano M J, Sabatini R. Telomeric co-localization of the modified base J and contingency genes in the protozoan parasite Trypanosoma cruzi [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(19): 6367-6377.

[59] Liu S, Ji D, Cliffe L, Sabatini R, Wang Y. Quantitative mass spectrometry-based analysis of beta-D-glucosyl-5-hydroxymethyluracil in genomic DNA of Trypanosoma brucei [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2014, 25(10): 1763-1770.

[60] Greenberg M M. The formamidopyrimidines: purine lesions formed in competition with 8-oxopurines from oxidative stress [J]. Acc Chem Res, 2012, 45(4): 588-597.

[61] Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer [J]. Cell, 2017, 168(4): 644-656.

[62] Pan L, Zhu B, Hao W, Zeng X, Vlahopoulos S A, Hazra T K, Hegde M L, Radak Z, Bacsi A, Brasier A R, Ba X, Boldogh I. Oxidized Guanine Base Lesions Function in 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1-mediated Epigenetic Regulation of Nuclear Factor kappaB-driven Gene Expression [J]. J Biol Chem, 2016, 291(49): 25553-25566.

[63] Caglayan M, Horton J K, Dai D P, Stefanick D F, Wilson S H. Oxidized nucleotide insertion

中国知网 https://www.cnki.net

by pol beta confounds ligation during base excision repair [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14045.

[64] Fleming A M, Ding Y, Burrows C J. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(10): 2604-2609.

[65] Kwok C K, Merrick C J. G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application [J]. Trends Biotechnol, 2017, 35(10): 997-1013.

[66] Fleming A M, Burrows C J. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine, friend and foe: Epigenetic-like regulator versus initiator of mutagenesis [J]. DNA Repair (Amst), 2017, 56(75-83.

[67] Wang L, Chen S, Vergin K L, Giovannoni S J, Chan S W, DeMott M S, Taghizadeh K, Cordero O X, Cutler M, Timberlake S, Alm E J, Polz M F, Pinhassi J, Deng Z, Dedon P C. DNA phosphorothioation is widespread and quantized in bacterial genomes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(7): 2963-2968.

[68] Xiong L, Liu S, Chen S, Xiao Y, Zhu B, Gao Y, Zhang Y, Chen B, Luo J, Deng Z, Chen X, Wang L, Chen S. A new type of DNA phosphorothioation-based antiviral system in archaea [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1688.

[69] Howard S T, Newman K L, McNulty S, Brown-Elliott B A, Vasireddy R, Bridge L, Wallace R J. Insertion site and distribution of a genomic island conferring DNA phosphorothioation in the Mycobacterium abscessus complex [J]. Microbiology (Reading), 2013, 159(Pt 11): 2323-2332.

[70] Kellner S, DeMott M S, Cheng C P, Russell B S, Cao B, You D, Dedon P C. Oxidation of phosphorothioate DNA modifications leads to lethal genomic instability [J]. Nat Chem Biol, 2017, 13(8): 888-894.

[71] Tong T, Chen S, Wang L, Tang Y, Ryu J Y, Jiang S, Wu X, Chen C, Luo J, Deng Z, Li Z, Lee S Y, Chen S. Occurrence, evolution, and functions of DNA phosphorothioate epigenetics in bacteria [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(13): E2988-E2996.

[72] Wang L, Jiang S, Deng Z, Dedon P C, Chen S. DNA phosphorothioate modification-a new multi-functional epigenetic system in bacteria [J]. FEMS Microbiol Rev, 2019, 43(2): 109-122.

[73] Thiaville J J, Kellner S M, Yuan Y, Hutinet G, Thiaville P C, Jumpathong W, Mohapatra S, Brochier-Armanet C, Letarov A V, Hillebrand R, Malik C K, Rizzo C J, Dedon P C, Crécy-Lagard V d. Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(11): E1452-E1459.

[74] Hutinet G, Kot W, Cui L, Hillebrand R, Balamkundu S, Gnanakalai S, Neelakandan R, Carstens A B, Fa Lui C, Tremblay D, Jacobs-Sera D, Sassanfar M, Lee Y J, Weigele P, Moineau S, Hatfull G F, Dedon P C, Hansen L H, de Crecy-Lagard V. 7-Deazaguanine modifications protect phage DNA from host restriction systems [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5442.

[75] Ontiveros R J, Stoute J, Liu K F. The chemical diversity of RNA modifications [J]. Biochem J,

中国知网 https://www.cnki.net

2019, 476(8): 1227-1245.

[76] Wiener D, Schwartz S. The epitranscriptome beyond m(6)A [J]. Nat Rev Genet, 2021, 22(2): 119-131.

[77] Dunn D B. The occurrence of 1-methyladenine in ribonucleic acid [J]. Biochim Biophys Acta, 1961, 46(1): 198-200.

[78] Machnicka M A, Milanowska K, Osman Oglou O, Purta E, Kurkowska M, Olchowik A, Januszewski W, Kalinowski S, Dunin-Horkawicz S, Rother K M, Helm M, Bujnicki J M, Grosjean H. MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database issue): D262-D267.

[79] Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K, Kobayashi A, Shimizu T, Fukamizu A. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner [J]. J Cell Sci, 2016, 129(12): 2382-2393.

[80] Saikia M, Fu Y, Pavon-Eternod M, He C, Pan T. Genome-wide analysis of N1-methyl-adenosine modification in human tRNAs [J]. RNA, 2010, 16(7): 1317-1327.

[81] Ozanick S, Krecic A, Andersland J, Anderson J T. The bipartite structure of the tRNA m1A58 methyltransferase from S. cerevisiae is conserved in humans [J]. RNA, 2005, 11(8): 1281-1290.

[82] Finer-Moore J, Czudnochowski N, O'Connell J D, 3rd, Wang A L, Stroud R M. Crystal Structure of the Human tRNA m(1)A58 Methyltransferase-tRNA(3)(Lys) Complex: Refolding of Substrate tRNA Allows Access to the Methylation Target [J]. J Mol Biol, 2015, 427(24): 3862-3876.

[83] Liu F, Clark W, Luo G, Wang X, Fu Y, Wei J, Wang X, Hao Z, Dai Q, Zheng G, Ma H, Han D, Evans M, Klungland A, Pan T, He C. ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation [J]. Cell, 2016, 167(3): 816-828.

[84] Wei J, Liu F, Lu Z, Fei Q, Ai Y, He P C, Shi H, Cui X, Su R, Klungland A, Jia G, Chen J, He C. Differential m(6)A, m(6)Am, and m(1)A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm [J]. Mol Cell, 2018, 71(6): 973-985.

[85] Chen Z, Qi M, Shen B, Luo G, Wu Y, Li J, Lu Z, Zheng Z, Dai Q, Wang H. Transfer RNA demethylase ALKBH3 promotes cancer progression via induction of tRNA-derived small RNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(5): 2533-2545.

[86] Li X, Xiong X, Zhang M, Wang K, Chen Y, Zhou J, Mao Y, Lv J, Yi D, Chen X W, Wang C, Qian S B, Yi C. Base-Resolution Mapping Reveals Distinct m(1)A Methylome in Nuclear- and Mitochondrial-Encoded Transcripts [J]. Mol Cell, 2017, 68(5): 993-1005 e1009.

[87] Clark W C, Evans M E, Dominissini D, Zheng G, Pan T. tRNA base methylation identification and quantification via high-throughput sequencing [J]. RNA, 2016, 22(11): 1771-

中国知网 https://www.cnki.net

1784.

[88] Vilardo E, Nachbagauer C, Buzet A, Taschner A, Holzmann J, Rossmanith W. A subcomplex of human mitochondrial RNase P is a bifunctional methyltransferase--extensive moonlighting in mitochondrial tRNA biogenesis [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(22): 11583-11593.

[89] Chujo T, Suzuki T. Trmt61B is a methyltransferase responsible for 1-methyladenosine at position 58 of human mitochondrial tRNAs [J]. RNA, 2012, 18(12): 2269-2276.

[90] Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, Peer E, Kol N, Ben-Haim M S, Dai Q, Di Segni A, Salmon-Divon M, Clark W C, Zheng G, Pan T, Solomon O, Eyal E, Hershkovitz V, Han D, Dore L C, Amariglio N, Rechavi G, He C. The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA [J]. Nature, 2016, 530(7591): 441-446.

[91] Li X, Xiong X, Wang K, Wang L, Shu X, Ma S, Yi C Q. Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N(1)-methyladenosine methylome [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12(5): 311-316.

[92] Schwartz S. m(1)A within cytoplasmic mRNAs at single nucleotide resolution: a reconciled transcriptome-wide map [J]. RNA, 2018, 24(11): 1427-1436.

[93] Safra M, Sas-Chen A, Nir R, Winkler R, Nachshon A, Bar-Yaacov D, Erlacher M, Rossmanith W, Stern-Ginossar N, Schwartz S. The m1A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution [J]. Nature, 2017, 551(7679): 251-255.

[94] Woo H H, Chambers S K. Human ALKBH3-induced m(1)A demethylation increases the CSF-1 mRNA stability in breast and ovarian cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2019, 1862(1): 35-46.

[95] Seo K W, Kleiner R E. YTHDF2 Recognition of N(1)-Methyladenosine (m(1)A)-Modified RNA Is Associated with Transcript Destabilization [J]. ACS Chem Biol, 2020, 15(1): 132-139.

[96] Zheng Q, Gan H, Yang F, Yao Y, Hao F, Hong L, Jin L. Cytoplasmic m(1)A reader YTHDF3 inhibits trophoblast invasion by downregulation of m(1)A-methylated IGF1R [J]. Cell Discov, 2020, 6(1): 1-12.

[97] Desrosiers R, Friderici K, Rottman F. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974, 71(10): 3971-3975.

[98] Deng L J, Deng W Q, Fan S R, Chen M F, Qi M, Lyu W Y, Qi Q, Tiwari A K, Chen J X, Zhang D M, Chen Z S. m6A modification: recent advances, anticancer targeted drug discovery and beyond [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 52.

[99] 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. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq [J]. Nature, 2012, 485(7397): 201-206.

中国知网 https://www.cnki.net

[100] Meyer K D, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason C E, Jaffrey S R. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons [J]. Cell, 2012, 149(7): 1635-1646.

[101] Wang X, Feng J, Xue Y, Guan Z, Zhang D, Liu Z, Gong Z, Wang Q, Huang J, Tang C, Zou T, Yin P. Structural basis of N(6)-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex [J]. Nature, 2016, 534(7608): 575-578.

[102] Patil D P, Chen C K, Pickering B F, Chow A, Jackson C, Guttman M, Jaffrey S R. m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression [J]. Nature, 2016, 537(7620): 369-373.

[103] Wen J, Lv R, Ma H, Shen H, He C, Wang J, Jiao F, Liu H, Yang P, Tan L. Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m 6 A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal [J]. Mol Cell, 2018, 69(6): 1028-1038.

[104] Ping X L, Sun B F, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang W J, Adhikari S, Shi Y, Lv Y, Chen Y S, Zhao X, Li A, Yang Y, Dahal U, Lou X M, Liu X, Huang J, Yuan W P, Zhu X F, Cheng T, Zhao Y L, Wang X, Rendtlew Danielsen J M, Liu F, Yang Y G. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase [J]. Cell Res, 2014, 24(2): 177-189.

[105] Yue Y N, Liu J, Cui X L, Cao J, Luo G Z, Zhang Z Z, Cheng T, Gao M S, Shu X, Ma H H, Wang F Q, Wang X X, Shen B, Wang Y Z, Feng X H, He C, Liu J Z. VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3′UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation [J]. Cell Discov, 2018, 4(1): 1-17.

[106] 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. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N(6)-adenosine methylation [J]. Nat Chem Biol, 2014, 10(2): 93-95.

[107] Warda A S, Kretschmer J, Hackert P, Lenz C, Urlaub H, Hobartner C, Sloan K E, Bohnsack M T. Human METTL16 is a N(6)-methyladenosine (m(6)A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs [J]. EMBO Rep, 2017, 18(11): 2004-2014.

[108] Fu Y, Jia G, Pang X, Wang R N, Wang X, Li C J, Smemo S, Dai Q, Bailey K A, Nobrega M A, Han K L, Cui Q, He C. FTO-mediated formation of N(6)-hydroxymethyladenosine and N(6)-formyladenosine in mammalian RNA [J]. Nat Commun, 2013, 4(1): 1-8.

[109] Tang C, Klukovich R, Peng H, Wang Z, Yu T, Zhang Y, Zheng H, Klungland A, Yan W. ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(2): E325-E333.

[110] Zaccara S, Jaffrey S R. A Unified Model for the Function of YTHDF Proteins in Regulating m(6)A-Modified mRNA [J]. Cell, 2020, 181(7): 1582-1595.

中国知网 https://www.cnki.net

[111] Wang X, Zhao B S, Roundtree I A, Lu Z, Han D, Ma H, Weng X, Chen K, Shi H, He C. N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency [J]. Cell, 2015, 161(6): 1388-1399.

[112] Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon G C, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability [J]. Nature, 2014, 505(7481): 117-120.

[113] Li J, Xie H, Ying Y, Chen H, Yan H, He L, Xu M, Xu X, Liang Z, Liu B, Wang X, Zheng X, Xie L. YTHDF2 mediates the mRNA degradation of the tumor suppressors to induce AKT phosphorylation in N6-methyladenosine-dependent way in prostate cancer [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 152.

[114] Einstein J M, Perelis M, Chaim I A, Meena J K, Nussbacher J K, Tankka A T, Yee B A, Li H, Madrigal A A, Neill N J. Inhibition of YTHDF2 triggers proteotoxic cell death in MYC-driven breast cancer [J]. Mol Cell, 2021, 81(15): 3048-3064.

[115] Shi H, Wang X, Lu Z, Zhao B S, Ma H, Hsu P J, Liu C, He C. YTHDF3 facilitates translation and decay of N(6)-methyladenosine-modified RNA [J]. Cell Res, 2017, 27(3): 315-328.

[116] Xiao W, Adhikari S, Dahal U, Chen Y S, Hao Y J, Sun B F, Sun H Y, Li A, Ping X L, Lai W Y, Wang X, Ma H L, Huang C M, Yang Y, Huang N, Jiang G B, Wang H L, Zhou Q, Wang X J, Zhao Y L, Yang Y G. Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing [J]. Mol Cell, 2016, 61(4): 507-519.

[117] Roundtree I A, He C. Nuclear mA Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing [J]. Trends Genet, 2016, 32(6): 320-321.

[118] Roundtree I A, Luo G Z, Zhang Z, Wang X, Zhou T, Cui Y, Sha J, Huang X, Guerrero L, Xie P, He E, Shen B, He C. YTHDC1 mediates nuclear export of N(6)-methyladenosine methylated mRNAs [J]. Elife, 2017, 6: e31311.

[119] Hsu P J, Zhu Y, Ma H, Guo Y, Shi X, Liu Y, Qi M, Lu Z, Shi H, Wang J, Cheng Y, Luo G, Dai Q, Liu M, Guo X, Sha J, Shen B, He C. Ythdc2 is an N(6)-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis [J]. Cell Res, 2017, 27(9): 1115-1127.

[120] Huang H, Weng H, Sun W, Qin X, Shi H, Wu H, Zhao B S, Mesquita A, Liu C, Yuan C L, Hu Y C, Huttelmaier S, Skibbe J R, Su R, Deng X, Dong L, Sun M, Li C, Nachtergaele S, Wang Y, Hu C, Ferchen K, Greis K D, Jiang X, Wei M, Qu L, Guan J L, He C, Yang J, Chen J. Recognition of RNA N(6)-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(3): 285-295.

[121] Zhang F R, Kang Y, Wang M L, Li Y J, Xu T L, Yang W, Song H J, Wu H, Shu Q, Jin P. Fragile X mental retardation protein modulates the stability of its m6A-marked messenger RNA

中国知网 https://www.cnki.net

targets [J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(22): 3936-3950.

[122] Edens B M, Vissers C, Su J, Arumugam S, Xu Z, Shi H, Miller N, Ringeling F R, Ming G l, He C. FMRP modulates neural differentiation through m6A-dependent mRNA nuclear export [J]. Cell Rep, 2019, 28(4): 845-854.

[123] Choe J, Lin S, Zhang W, Liu Q, Wang L, Ramirez-Moya J, Du P, Kim W, Tang S, Sliz P, Santisteban P, George R E, Richards W G, Wong K K, Locker N, Slack F J, Gregory R I. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis [J]. Nature, 2018, 561(7724): 556-560.

[124] Zhao Y C, Shi Y F, Shen H F, Xie W Z. m6A-binding proteins: the emerging crucial performers in epigenetics [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 1-14.

[125] Alarcón C R, Goodarzi H, Lee H, Liu X, Tavazoie S, Tavazoie S F. HNRNPA2B1 is a mediator of m6A-dependent nuclear RNA processing events [J]. Cell, 2015, 162(6): 1299-1308.

[126] Liu N, Dai Q, Zheng G, He C, Parisien M, Pan T. N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions [J]. Nature, 2015, 518(7540): 560-564.

[127] Wu R, Li A, Sun B f, Sun J G, Zhang J h, Zhang T, Chen Y s, Xiao Y j, Gao Y h, Zhang Q y. A novel m6A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination [J]. Cell Res, 2019, 29(1): 23-41.

[128] Natchiar S K, Myasnikov A G, Kratzat H, Hazemann I, Klaholz B P. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure [J]. Nature, 2017, 551(7681): 472-477.

[129] van Tran N, Ernst F G M, Hawley B R, Zorbas C, Ulryck N, Hackert P, Bohnsack K E, Bohnsack M T, Jaffrey S R, Graille M, Lafontaine D L J. The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112 [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(15): 7719-7733.

[130] Ma H, Wang X, Cai J, Dai Q, Natchiar S K, Lv R, Chen K, Lu Z, Chen H, Shi Y G, Lan F, Fan J, Klaholz B P, Pan T, Shi Y, He C. N(6-)Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(1): 88-94.

[131] Ren W, Lu J, Huang M, Gao L, Li D, Wang G G, Song J. Structure and regulation of ZCCHC4 in m(6)A-methylation of 28S rRNA [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5042.

[132] Ueda Y, Ooshio I, Fusamae Y, Kitae K, Kawaguchi M, Jingushi K, Hase H, Harada K, Hirata K, Tsujikawa K. AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42271.

[133] Ayadi L, Galvanin A, Pichot F, Marchand V, Motorin Y. RNA ribose methylation (2'-O-methylation): Occurrence, biosynthesis and biological functions [J]. Biochim Biophys Acta Gene

中国知网 https://www.cnki.net

Regul Mech, 2019, 1862(3): 253-269.

[134] Dimitrova D G, Teysset L, Carre C. RNA 2'-O-Methylation (Nm) Modification in Human Diseases [J]. Genes, 2019, 10(2): 117.

[135] Krogh N, Jansson M D, Hafner S J, Tehler D, Birkedal U, Christensen-Dalsgaard M, Lund A H, Nielsen H. Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(16): 7884-7895.

[136] Dai Q, Moshitch-Moshkovitz S, Han D, Kol N, Amariglio N, Rechavi G, Dominissini D, He C. Nm-seq maps 2'-O-methylation sites in human mRNA with base precision [J]. Nat Methods, 2017, 14(7): 695-698.

[137] Galvanin A, Ayadi L, Helm M, Motorin Y, Marchand V. Mapping and Quantification of tRNA 2'-O-Methylation by RiboMethSeq [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1870(273-295.

[138] Piekna-Przybylska D, Przybylski P, Baudin-Baillieu A, Rousset J P, Fournier M J. Ribosome performance is enhanced by a rich cluster of pseudouridines in the A-site finger region of the large subunit [J]. J Biol Chem, 2008, 283(38): 26026-26036.

[139] Decatur W A, Fournier M J. rRNA modifications and ribosome function [J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(7): 344-351.

[140] Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt E C. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly [J]. Cell, 1993, 72(3): 443-457.

[141] Sornjai W, Lithanatudom P, Erales J, Joly P, Francina A, Hacot S, Fucharoen S, Svasti S, Diaz J J, Mertani H C. Hypermethylation of 28S ribosomal RNA in β-thalassemia trait carriers [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 94(Pt A): 728-734.

[142] Ching Y P, Zhou H J, Yuan J G, Qiang B Q, Kung H f, Jin D Y. Identification and characterization of FTSJ2, a novel human nucleolar protein homologous to bacterial ribosomal RNA methyltransferase [J]. Genomics, 2002, 79(1): 2-6.

[143] Lai C W, Chen H L, Lin K Y, Liu F C, Chong K Y, Cheng W T, Chen C M. FTSJ2, a heat shock-inducible mitochondrial protein, suppresses cell invasion and migration [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90818.

[144] Campbell J M, Lockwood W W, Buys T P, Chari R, Coe B P, Lam S, Lam W L. Integrative genomic and gene expression analysis of chromosome 7 identified novel oncogene loci in non-small cell lung cancer [J]. Genome, 2008, 51(12): 1032-1039.

[145] Ringeard M, Marchand V, Decroly E, Motorin Y, Bennasser Y. FTSJ3 is an RNA 2'-O-methyltransferase recruited by HIV to avoid innate immune sensing [J]. Nature, 2019, 565(7740):

中国知网 https://www.cnki.net

500-504.

[146] Torres A G, Batlle E, Ribas de Pouplana L. Role of tRNA modifications in human diseases [J]. Trends Mol Med, 2014, 20(6): 306-314.

[147] Pintard L, Lecointe F, Bujnicki J M, Bonnerot C, Grosjean H, Lapeyre B. Trm7p catalyses the formation of two 2′-O-methylriboses in yeast tRNA anticodon loop [J]. EMBO J, 2002, 21(7): 1811-1820.

[148] Guy M P, Shaw M, Weiner C L, Hobson L, Stark Z, Rose K, Kalscheuer V M, Gecz J, Phizicky E M. Defects in tRNA anticodon loop 2′-O-methylation are implicated in nonsyndromic X-linked intellectual disability due to mutations in FTSJ1 [J]. Hum Mutat, 2015, 36(12): 1176-1187.

[149] Reddy R, Singh R, Shimba S. Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions [J]. Pharmacol Ther, 1992, 54(3): 249-267.

[150] Shuman S. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(8): 619-625.

[151] Ramanathan A, Robb G B, Chan S H. mRNA capping: biological functions and applications [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(16): 7511-7526.

[152] Bélanger F, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Pelletier J. Characterization of hMTr1, a human Cap1 2′-O-ribose methyltransferase [J]. J Biol Chem, 2010, 285(43): 33037-33044.

[153] Inesta-Vaquera F, Chaugule V K, Galloway A, Chandler L, Rojas-Fernandez A, Weidlich S, Peggie M, Cowling V H. DHX15 regulates CMTR1-dependent gene expression and cell proliferation [J]. Life Sci Alliance, 2018, 1(3): e201800092.

[154] Werner M, Purta E, Kaminska K H, Cymerman I A, Campbell D A, Mittra B, Zamudio J R, Sturm N R, Jaworski J, Bujnicki J M. 2′-O-ribose methylation of cap2 in human: function and evolution in a horizontally mobile family [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(11): 4756-4768.

[155] Banerjee A K. 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids [J]. Microbiol Rev, 1980, 44(2): 175-205.

[156] Smietanski M, Werner M, Purta E, Kaminska K H, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Nowotny M, Bujnicki J M. Structural analysis of human 2′-O-ribose methyltransferases involved in mRNA cap structure formation [J]. Nat Commun, 2014, 5(1): 1-10.

[157] Gumienny R, Jedlinski D J, Schmidt A, Gypas F, Martin G, Vina-Vilaseca A, Zavolan M. High-throughput identification of C/D box snoRNA targets with CLIP and RiboMeth-seq [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(5): 2341-2353.

[158] Hsu P J, Fei Q, Dai Q, Shi H, Dominissini D, Ma L, He C. Single base resolution mapping of 2'-O-methylation sites in human mRNA and in 3' terminal ends of small RNAs [J]. Methods,

中国知网 https://www.cnki.net

2019, 156: 85-90.

[159] Elliott B A, Ho H-T, Ranganathan S V, Vangaveti S, Ilkayeva O, Abou Assi H, Choi A K, Agris P F, Holley C L. Modification of messenger RNA by 2′-O-methylation regulates gene expression in vivo [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1-9.

[160] Reddy R, Henning D, Epstein P, Busch H. Primary and secondary structure of U2 snRNA [J]. Nucleic Acids Res, 1981, 9(21): 5645-5658.

[161] Karijolich J, Yu Y-T. Spliceosomal snRNA modifications and their function [J]. RNA biology, 2010, 7(2): 192-204.

[162] Van Knippenberg P, Van Kimmenade J, Heus H. Phylogeny of the conserved 3′ terminal structure of the RNA of small ribosomal subunits [J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12(6): 2595-2604.

[163] Sloan K E, Warda A S, Sharma S, Entian K-D, Lafontaine D L, Bohnsack M T. Tuning the ribosome: the influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function [J]. RNA Biol, 2017, 14(9): 1138-1152.

[164] Poldermans B, Bakker H, Van Knippenberg P H. Studies on the function of two adjacent N6, N6-dimethyladenosines near the 3′ end of 16 S ribosomal RNA of Escherichia coli. IV. The effect of the methylgroups on ribosomal subunit interaction [J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(1): 143-152.

[165] Van Buul C, Van Knippenberg P. Nucleotide sequence of the ksgA gene of Escherichia coli: comparison of methyltransferases effecting dimethylation of adenosine in ribosomal RNA [J]. Gene, 1985, 38(1-3): 65-72.

[166] O'Farrell H C, Scarsdale J N, Rife J P. Crystal structure of KsgA, a universally conserved rRNA adenine dimethyltransferase in Escherichia coli [J]. J Mol Biol, 2004, 339(2): 337-353.

[167] Van Buul C, Visser W, Van Knippenberg P. Increased translational fidelity caused by the antibiotic kasugamycin and ribosomal ambiguity in mutants harbouring the ksgA gene [J]. FEBS Lett, 1984, 177(1): 119-124.

[168] Connolly K, Rife J P, Culver G. Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA [J]. Mol Microbiol, 2008, 70(5): 1062-1075.

[169] Mangat C S, Brown E D. Ribosome biogenesis; the KsgA protein throws a methyl-mediated switch in ribosome assembly [J]. Mol Microbiol, 2008, 70(5): 1051-1053.

[170] Boehringer D, O'Farrell H C, Rife J P, Ban N. Structural insights into methyltransferase KsgA function in 30S ribosomal subunit biogenesis [J]. J Biol Chem, 2012, 287(13): 10453-10459.

[171] Lafontaine D L, Preiss T, Tollervey D. Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis? [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(4): 2360-2370.

[172] Lafontaine D, Vandenhaute J, Tollervey D. The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast [J]. Genes Dev, 1995, 9(20): 2470-2481.

中国知网 https://www.cnki.net

[173] Tokuhisa J G, Vijayan P, Feldmann K A, Browse J A. Chloroplast development at low temperatures requires a homolog of DIM1, a yeast gene encoding the 18S rRNA dimethylase [J]. Plant Cell, 1998, 10(5): 699-711.

[174] Wieckowski Y, Schiefelbein J. Nuclear ribosome biogenesis mediated by the DIM1A rRNA dimethylase is required for organized root growth and epidermal patterning in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 2012, 24(7): 2839-2856.

[175] Shen H, Gonskikh Y, Stoute J, Liu K F. Human DIMT1 generates N26, 6A-dimethylation–containing small RNAs [J]. J Biol Chem, 2021, 297(4): 101146.

[176] Zorbas C, Nicolas E, Wacheul L, Huvelle E, Heurgué-Hamard V, Lafontaine D L. The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis [J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(11): 2080-2095.

[177] Strunk B S, Loucks C R, Su M, Vashisth H, Cheng S, Schilling J, Brooks III C L, Karbstein K, Skiniotis G. Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40 S assembly intermediates [J]. Science, 2011, 333(6048): 1449-1453.

[178] Sloan K E, Warda A S, Sharma S, Entian K-D, Lafontaine D L, Bohnsack M T. Tuning the ribosome: the influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function [J]. RNA Biol, 2017, 14(9): 1138-1152.

[179] Johnson M C, Ghalei H, Doxtader K A, Karbstein K, Stroupe M E. Structural heterogeneity in pre-40S ribosomes [J]. Structure, 2017, 25(2): 329-340.

[180] Shen H, Stoute J, Liu K F. Structural and catalytic roles of the human 18S rRNA methyltransferases DIMT1 in ribosome assembly and translation [J]. J Biol Chem, 2020, 295(34): 12058-12070.

[181] Ensfelder T T, Kurz M Q, Iwan K, Geiger S, Matheisl S, Muller M, Beckmann R, Carell T. ALKBH5-induced demethylation of mono- and dimethylated adenosine [J]. Chem Commun (Camb), 2018, 54(62): 8591-8593.

[182] Wei C, Gershowitz A, Moss B. N6, O2′-dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to the 5′ terminal of animal cell and virus mRNAs [J]. Nature, 1975, 257(5523): 251-253.

[183] Hawley B R, Jaffrey S R. Transcriptome-Wide Mapping of m(6) A and m(6) Am at Single-Nucleotide Resolution Using miCLIP [J]. Curr Protoc Mol Biol, 2019, 126(1): e88.

[184] Wei C M, Gershowitz A, Moss B. Methylated nucleotides block 5′ terminus of HeLa cell messenger RNA [J]. Cell, 1975, 4(4): 379-386.

[185] Adams J M, Cory S. Modified nucleosides and bizarre 5′-termini in mouse myeloma mRNA [J]. Nature, 1975, 255(5503): 28-33.

中国知网 https://www.cnki.net

[186] Furuichi Y, Morgan M, Shatkin A, Jelinek W, Salditt-Georgieff M, Darnell J. Methylated, blocked 5 termini in HeLa cell mRNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975, 72(5): 1904-1908.

[187] Wei C M, Gershowitz A, Moss B. 5'-Terminal and internal methylated nucleotide sequences in HeLa cell mRNA [J]. Biochemistry, 1976, 15(2): 397-401.

[188] Keith J M, Ensinger M J, Mose B. HeLa cell RNA (2'-O-methyladenosine-N6-)-methyltransferase specific for the capped 5'-end of messenger RNA [J]. J Biol Chem, 1978, 253(14): 5033-5039.

[189] Akichika S, Hirano S, Shichino Y, Suzuki T, Nishimasu H, Ishitani R, Sugita A, Hirose Y, Iwasaki S, Nureki O, Suzuki T. Cap-specific terminal N (6)-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase [J]. Science, 2019, 363(6423): eaav0080.

[190] Fan H, Sakuraba K, Komuro A, Kato S, Harada F, Hirose Y. PCIF1, a novel human WW domain-containing protein, interacts with the phosphorylated RNA polymerase II [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(2): 378-385.

[191] Sun H, Zhang M, Li K, Bai D, Yi C. Cap-specific, terminal N(6)-methylation by a mammalian m(6)Am methyltransferase [J]. Cell Res, 2019, 29(1): 80-82.

[192] Sendinc E, Valle-Garcia D, Dhall A, Chen H, Henriques T, Navarrete-Perea J, Sheng W, Gygi S P, Adelman K, Shi Y. PCIF1 Catalyzes m6Am mRNA Methylation to Regulate Gene Expression [J]. Mol Cell, 2019, 75(3): 620-630.

[193] Li Q H, He W L, Wan G H. Methyladenosine modification in RNAs: classification and roles in gastrointestinal cancers [J]. Front Oncol, 2021, 10: 586789.

[194] Mauer J, Luo X, Blanjoie A, Jiao X, Grozhik A V, Patil D P, Linder B, Pickering B F, Vasseur J J, Chen Q, Gross S S, Elemento O, Debart F, Kiledjian M, Jaffrey S R. Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability [J]. Nature, 2017, 541(7637): 371-375.

[195] Zhang X, Wei L H, Wang Y, Xiao Y, Liu J, Zhang W, Yan N, Amu G, Tang X, Zhang L, Jia G F. Structural insights into FTO's catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(8): 2919-2924.

[196] Dahlberg J E, Lund E. Structure and expression of U-snRNA genes [J]. Mol Biol Rep, 1987, 12(3): 139-143.

[197] Cory S, Adams J M. Modified 5′-termini in small nuclear RNAs of mouse myeloma cells [J]. Mol Biol Rep, 1975, 2(4): 287-294.

[198] Busch H, Reddy R, Rothblum L, Choi Y. SnRNAs, SnRNPs, and RNA processing [J]. Annu Rev Biochem, 1982, 51(1): 617-654.

[199] Mattaj I W. Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding [J]. Cell, 1986, 46(6): 905-911.

中国知网 https://www.cnki.net

[200] Mauer J, Sindelar M, Despic V, Guez T, Hawley B R, Vasseur J J, Rentmeister A, Gross S S, Pellizzoni L, Debart F, Goodarzi H, Jaffrey S R. FTO controls reversible m(6)Am RNA methylation during snRNA biogenesis [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(4): 340-347.

[201] Goh Y T, Koh C W Q, Sim D Y, Roca X, Goh W S S. METTL4 catalyzes m6Am methylation in U2 snRNA to regulate pre-mRNA splicing [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(16): 9250-9261.

[202] Nishikura K. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(2): 83-96.

[203] Wang Y, Zheng Y, Beal P A. Adenosine Deaminases That Act on RNA (ADARs) [J]. Enzymes, 2017, 41: 215-268.

[204] Burns C M, Chu H, Rueter S M, Hutchinson L K, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson R B. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing [J]. Nature, 1997, 387(6630): 303-308.

[205] Hoopengardner B, Bhalla T, Staber C, Reenan R. Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics [J]. Science, 2003, 301(5634): 832-836.

[206] Higuchi M, Single F N, Köhler M, Sommer B, Sprengel R, Seeburg P H. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency [J]. Cell, 1993, 75(7): 1361-1370.

[207] Rueter S M, Dawson T R, Emeson R B. Regulation of alternative splicing by RNA editing [J]. Nature, 1999, 399(6731): 75-80.

[208] Ivanov A, Memczak S, Wyler E, Torti F, Porath H T, Orejuela M R, Piechotta M, Levanon E Y, Landthaler M, Dieterich C. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals [J]. Cell Rep, 2015, 10(2): 170-177.

[209] Stellos K, Gatsiou A, Stamatelopoulos K, Matic L P, John D, Lunella F F, Jaé N, Rossbach O, Amrhein C, Sigala F. Adenosine-to-inosine RNA editing controls cathepsin S expression in atherosclerosis by enabling HuR-mediated post-transcriptional regulation [J]. Nat Med, 2016, 22(10): 1140-1150.

[210] Borchert G M, Gilmore B L, Spengler R M, Xing Y, Lanier W, Bhattacharya D, Davidson B L. Adenosine deamination in human transcripts generates novel microRNA binding sites [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(24): 4801-4807.

[211] Wang Q, Hui H, Guo Z, Zhang W, Hu Y, He T, Tai Y, Peng P, Wang L. ADAR1 regulates ARHGAP26 gene expression through RNA editing by disrupting miR-30b-3p and miR-573 binding [J]. RNA, 2013, 19(11): 1525-1536.

[212] Gommans W M. A-to-I editing of microRNAs: regulating the regulators? [J]. Semin Cell

中国知网 https://www.cnki.net

Dev Biol, 2012, 23(3): 251-257.

[213] Ramaswami G, Li J B. Identification of human RNA editing sites: A historical perspective [J]. Methods, 2016, 107: 42-47.

[214] Okada S, Ueda H, Noda Y, Suzuki T. Transcriptome-wide identification of A-to-I RNA editing sites using ICE-seq [J]. Methods, 2019, 156: 66-78.

[215] Levanon E Y, Eisenberg E, Yelin R, Nemzer S, Hallegger M, Shemesh R, Fligelman Z Y, Shoshan A, Pollock S R, Sztybel D. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(8): 1001-1005.

[216] Bahn J H, Lee J H, Li G, Greer C, Peng G d, Xiao X s. Accurate identification of A-to-I RNA editing in human by transcriptome sequencing [J]. Genome Res, 2012, 22(1): 142-150.

[217] Tan M H, Li Q, Shanmugam R, Piskol R, Kohler J, Young A N, Liu K I, Zhang R, Ramaswami G, Ariyoshi K. Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals [J]. Nature, 2017, 550(7675): 249-254.

[218] Danecek P, Nellåker C, McIntyre R E, Buendia-Buendia J E, Bumpstead S, Ponting C P, Flint J, Durbin R, Keane T M, Adams D J. High levels of RNA-editing site conservation amongst 15 laboratory mouse strains [J]. Genome Biol, 2012, 13(4): 1-12.

[219] Cattenoz P B, Taft R J, Westhof E, Mattick J S. Transcriptome-wide identification of A > I RNA editing sites by inosine specific cleavage [J]. RNA, 2013, 19(2): 257-270.

[220] Liu H q, Wang Q h, He Y, Chen L f, Hao C f, Jiang C, Li Y, Dai Y f, Kang Z s, Xu J R. Genome-wide A-to-I RNA editing in fungi independent of ADAR enzymes [J]. Genome Res, 2016, 26(4): 499-509.

[221] Bian Z, Ni Y, Xu J R, Liu H. A-to-I mRNA editing in fungi: occurrence, function, and evolution [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(2): 329-340.

[222] Bar-Yaacov D, Mordret E, Towers R, Biniashvili T, Soyris C, Schwartz S, Dahan O, Pilpel Y. RNA editing in bacteria recodes multiple proteins and regulates an evolutionarily conserved toxin-antitoxin system [J]. Genome Res, 2017, 27(10): 1696-1703.

[223] Bar-Yaacov D, Pilpel Y, Dahan O. RNA editing in bacteria: occurrence, regulation and significance [J]. RNA Biol, 2018, 15(7): 863-867.

[224] Paz-Yaacov N, Levanon E Y, Nevo E, Kinar Y, Harmelin A, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Eisenberg E, Rechavi G. Adenosine-to-inosine RNA editing shapes transcriptome diversity in primates [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(27): 12174-12179.

[225] Sakurai M, Ueda H, Yano T, Okada S, Terajima H, Mitsuyama T, Toyoda A, Fujiyama A, Kawabata H, Suzuki T. A biochemical landscape of A-to-I RNA editing in the human brain transcriptome [J]. Genome Res, 2014, 24(3): 522-534.

中国知网 https://www.cnki.net

[226] Bazak L, Haviv A, Barak M, Jacob-Hirsch J, Deng P, Zhang R, Isaacs F J, Rechavi G, Li J B, Eisenberg E. A-to-I RNA editing occurs at over a hundred million genomic sites, located in a majority of human genes [J]. Genome Res, 2014, 24(3): 365-376.

[227] Ahmad S, Mu X, Yang F, Greenwald E, Park J W, Jacob E, Zhang C Z, Hur S. Breaching self-tolerance to Alu duplex RNA underlies MDA5-mediated inflammation [J]. Cell, 2018, 172(4): 797-810.

[228] Chung H, Calis J J, Wu X, Sun T, Yu Y, Sarbanes S L, Thi V L D, Shilvock A R, Hoffmann H-H, Rosenberg B R. Human ADAR1 prevents endogenous RNA from triggering translational shutdown [J]. Cell, 2018, 172(4): 811-824.

[229] Liddicoat B J, Piskol R, Chalk A M, Ramaswami G, Higuchi M, Hartner J C, Li J B, Seeburg P H, Walkley C R. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself [J]. Science, 2015, 349(6252): 1115-1120.

[230] Rice G I, Kasher P R, Forte G, Mannion N M, Greenwood S M, Szynkiewicz M, Dickerson J E, Bhaskar S S, Zampini M, Briggs T A. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutieres syndrome associated with a type I interferon signature [J]. Nat Genet, 2012, 44(11): 1243-1248.

[231] Fritzell K, Xu L D, Lagergren J, Ohman M. ADARs and editing: The role of A-to-I RNA modification in cancer progression [J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 79: 123-130.

[232] Xu X, Wang Y, Liang H. The role of A-to-I RNA editing in cancer development [J]. Curr Opin Genet Dev, 2018, 48: 51-56.

[233] Peng X, Xu X, Wang Y, Hawke D H, Yu S, Han L, Zhou Z, Mojumdar K, Jeong K J, Labrie M, Tsang Y H, Zhang M, Lu Y, Hwu P, Scott K L, Liang H, Mills G B. A-to-I RNA Editing Contributes to Proteomic Diversity in Cancer [J]. Cancer Cell, 2018, 33(5): 817-828.

[234] Holley R W, Everett G A, Madison J T, Zamir A. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid [J]. J Biol Chem, 1965, 240(5): 2122-2128.

[235] Torres A G, Piñeyro D, Filonava L, Stracker T H, Batlle E, de Pouplana L R. A-to-I editing on tRNAs: biochemical, biological and evolutionary implications [J]. FEBS Lett, 2014, 588(23): 4279-4286.

[236] Gerber A P, Keller W. An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs [J]. Science, 1999, 286(5442): 1146-1149.

[237] Grippo P, Iaccarino M, Rossi M, Scarano E. Thin-Layer Chromatography of Nucleotides, Nucleosides and Nucleic Acid Bases [J]. Biochim Biophys Acta, 1965, 95: 1-7.

[238] Leonard S A, Wong S C, Nyce J W. Quantitation of 5-methylcytosine by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography [J]. J Chromatogr A, 1993, 645(1): 189-192.

[239] Keith G. Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer

中国知网 https://www.cnki.net

chromatography [J]. Biochimie, 1995, 77(1-2): 142-144.

[240] Grosjean H, Keith G, Droogmans L. Detection and quantification of modified nucleotides in RNA using thin-layer chromatography [J]. Methods Mol Biol, 2004, 265: 357-391.

[241] Zhong S, Li H, Bodi Z, Button J, Vespa L, Herzog M, Fray R G. MTA is an Arabidopsis messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor [J]. Plant Cell, 2008, 20(5): 1278-1288.

[242] Reynaud C, Bruno C, Boullanger P, Grange J, Barbesti S, Niveleau A. Monitoring of urinary excretion of modified nucleosides in cancer patients using a set of six monoclonal antibodies [J]. Cancer Lett, 1992, 61(3): 255-262.

[243] Fakruddin M, Wei F Y, Emura S, Matsuda S, Yasukawa T, Kang D, Tomizawa K. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio-N 6-isopentenyladenosine modification is absent from nuclear-derived RNA species [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(20): 11954-11961.

[244] Nagarajan A, Janostiak R, Wajapeyee N. Dot Blot Analysis for Measuring Global N(6)-Methyladenosine Modification of RNA [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1870: 263-271.

[245] Jiang H P, Liu T, Guo N, Yu L, Yuan B F, Feng Y Q. Determination of formylated DNA and RNA by chemical labeling combined with mass spectrometry analysis [J]. Anal Chim Acta, 2017, 981: 1-10.

[246] Yuan B F. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Analysis of RNA Adenosine Methylation [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1562: 33-42.

[247] Zeng H, Qi C B, Liu T, Xiao H M, Cheng Q Y, Jiang H P, Yuan B F, Feng Y Q. Formation and Determination of Endogenous Methylated Nucleotides in Mammals by Chemical Labeling Coupled with Mass Spectrometry Analysis [J]. Anal Chem, 2017, 89(7): 4153-4160.

[248] Chu J M, Ye T T, Ma C J, Lan M D, Liu T, Yuan B F, Feng Y Q. Existence of Internal N7-Methylguanosine Modification in mRNA Determined by Differential Enzyme Treatment Coupled with Mass Spectrometry Analysis [J]. ACS Chem Biol, 2018, 13(12): 3243-3250.

[249] Lan M D, Xiong J, You X J, Weng X C, Zhou X, Yuan B F, Feng Y Q. Existence of Diverse Modifications in Small-RNA Species Composed of 16-28 Nucleotides [J]. Chem-Eur J, 2018, 24(39): 9949-9956.

[250] Li Q Y, Yuan B F, Feng Y Q. Mass Spectrometry-based Nucleic Acid Modification Analysis [J]. Chem Lett, 2018, 47(12): 1453-1459.

[251] Chen B, Yuan B F, Feng Y Q. Analytical Methods for Deciphering RNA Modifications [J]. Anal Chem, 2019, 91(1): 743-756.

[252] Xiong J, Ye T T, Ma C J, Cheng Q Y, Yuan B F, Feng Y Q. N6-Hydroxymethyladenine: a hydroxylation derivative of N6-methyladenine in genomic DNA of mammals [J]. Nucleic Acids

中国知网 https://www.cnki.net

Res, 2019, 47(3): 1268-1277.

[253] Xiong J, Yuan B F, Feng Y Q. Mass Spectrometry for Investigating the Effects of Toxic Metals on Nucleic Acid Modifications [J]. Chem Res Toxicol, 2019, 32(5): 808-819.

[254] You X J, Liu T, Ma C J, Qi C B, Tong Y, Zhao X, Yuan B F, Feng Y Q. Determination of RNA Hydroxylmethylation in Mammals by Mass Spectrometry Analysis [J]. Anal Chem, 2019, 91(16): 10477-10483.

[255] Zhang Y F, Qi C B, Yuan B F, Feng Y Q. Determination of cytidine modifications in human urine by liquid chromatography - Mass spectrometry analysis [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1081: 103-111.

[256] Feng Y, Ma C J, Ding J H, Qi C B, Xu X J, Yuan B F, Feng Y Q. Chemical labeling - Assisted mass spectrometry analysis for sensitive detection of cytidine dual modifications in RNA of mammals [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1098: 56-65.

[257] Cheng Q Y, Xiong J, Ma C J, Dai Y, Ding J H, Liu F L, Yuan B F, Feng Y Q. Chemical tagging for sensitive determination of uridine modifications in RNA [J]. Chem Sci, 2020, 11(7): 1878-1891.

[258] Cheng M Y, You X J, Ding J H, Dai Y, Chen M Y, Yuan B F, Feng Y Q. Novel dual methylation of cytidines in the RNA of mammals [J]. Chem Sci, 2021, 12(23): 8149-8156.

[259] Dal Magro C, Keller P, Kotter A, Werner S, Duarte V, Marchand V, Ignarski M, Freiwald A, Müller R U, Dieterich C. A vastly increased chemical variety of RNA modifications containing a thioacetal structure [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2018, 57(26): 7893-7897.

[260] Huang W, Lan M D, Qi C B, Zheng S J, Wei S Z, Yuan B F, Feng Y Q. Formation and determination of the oxidation products of 5-methylcytosine in RNA [J]. Chem Sci, 2016, 7(8): 5495-5502.

[261] Hayashizaki Y, Hirotsune S, Okazaki Y, Hatada I, Shibata H, Kawai J, Hirose K, Watanabe S, Fushiki S, Wada S. Restriction landmark genomic scanning method and its various applications [J]. Electrophoresis, 1993, 14(1): 251-258.

[262] Morse D P, Bass B L. Detection of inosine in messenger RNA by inosine-specific cleavage [J]. Biochemistry, 1997, 36(28): 8429-8434.

[263] Lapham J, Yu Y T, Shu M D, Steitz J A, Crothers D M. The position of site-directed cleavage of RNA using RNase H and 2'-O-methyl oligonucleotides is dependent on the enzyme source [J]. RNA, 1997, 3(9): 950-951.

[264] Maden B E. Mapping 2'-O-methyl groups in ribosomal RNA [J]. Methods, 2001, 25(3): 374-382.

[265] Liu N, Parisien M, Dai Q, Zheng G, He C, Pan T. Probing N6-methyladenosine RNA

中国知网 https://www.cnki.net

modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA [J]. RNA, 2013, 19(12): 1848-1856.

[266] Suzuki T, Suzuki T. A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(11): 7346-7357.

[267] Yan T M, Pan Y, Yu M L, Hu K, Cao K Y, Jiang Z H. Full-Range Profiling of TRNA Modifications Using LC–MS/MS at Single-Base Resolution through a Site-Specific Cleavage Strategy [J]. Anal Chem, 2020, 93(3): 1423-1432.

[268] Yan T M, Hu K, Ren F, Jiang Z H. LC-MS/MS profiling of post-transcriptional modifications in ginseng tRNA purified by a polysaccharase-aided extraction method [J]. Biomolecules, 2020, 10(4): 621.

[269] Kirpekar F, Douthwaite S, Roepstorff P. Mapping posttranscriptional modifications in 5S ribosomal RNA by MALDI mass spectrometry [J]. RNA, 2000, 6(2): 296-306.

[270] Glasner H, Riml C, Micura R, Breuker K. Label-free, direct localization and relative quantitation of the RNA nucleobase methylations m6A, m5C, m3U, and m5U by top-down mass spectrometry [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(13): 8014-8025.

[271] Schwartz S, Motorin Y. Next-generation sequencing technologies for detection of modified nucleotides in RNAs [J]. RNA biology, 2017, 14(9): 1124-1137.

[272] Sakurai M, Yano T, Kawabata H, Ueda H, Suzuki T. Inosine cyanoethylation identifies A-to-I RNA editing sites in the human transcriptome [J]. Nat Chem Biol, 2010, 6(10): 733-740.

[273] Suzuki T, Ueda H, Okada S, Sakurai M. Transcriptome-wide identification of adenosine-to-inosine editing using the ICE-seq method [J]. Nat Protoc, 2015, 10(5): 715-732.

[274] Hauenschild R, Tserovski L, Schmid K, Thuring K, Winz M L, Sharma S, Entian K D, Wacheul L, Lafontaine D L, Anderson J, Alfonzo J, Hildebrandt A, Jaschke A, Motorin Y, Helm M. The reverse transcription signature of N-1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(20): 9950-9964.

[275] Birkedal U, Christensen-Dalsgaard M, Krogh N, Sabarinathan R, Gorodkin J, Nielsen H. Profiling of ribose methylations in RNA by high-throughput sequencing [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2015, 54(2): 451-455.

[276] Marchand V, Blanloeil-Oillo F, Helm M, Motorin Y. Illumina-based RiboMethSeq approach for mapping of 2'-O-Me residues in RNA [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(16): e135.

[277] Wang Y, Xiao Y, Dong S q, Yu Q, Jia G f. Antibody-free enzyme-assisted chemical approach for detection of N6-methyladenosine [J]. Nat Chem Biol, 2020, 16(8): 896-903.

[278] Shu X, Cao J, Cheng M h, Xiang S y, Gao M s, Li T, Ying X e, Wang F q, Yue Y n, Lu Z k, Dai Q, Cui X l, Ma L j, Wang Y z, He C, Feng X h, Liu J z. A metabolic labeling method detects

中国知网 https://www.cnki.net

m6A transcriptome-wide at single base resolution [J]. Nat Chem Biol, 2020, 16(8): 887-895.

[279] Hu L L, Liu S, Peng Y, Ge R Q, Su R, Senevirathne C, Harada B T, Dai Q, Wei J B, Zhang L s, Hao Z Y, Luo L Z, Wang H Y, Wang Y R, Luo M K, Chen M J, Chen J J, He C. m6A RNA modifications are measured at single-base resolution across the mammalian transcriptome [J]. Nat Biotechnol, 2022, doi: 10.1038/s41587-022-01243-z.

[280] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Amariglio N, Rechavi G. Transcriptome-Wide Mapping of N(6)-Methyladenosine by m(6)A-Seq [J]. Methods Enzymol, 2015, 560: 131-147.

[281] Linder B, Grozhik A V, Olarerin-George A O, Meydan C, Mason C E, Jaffrey S R. Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome [J]. Nat Methods, 2015, 12(8): 767-772.

[282] Chen K, Lu Z, Wang X, Fu Y, Luo G Z, Liu N, Han D, Dominissini D, Dai Q, Pan T, He C. High-resolution N(6) -methyladenosine (m(6) A) map using photo-crosslinking-assisted m(6) A sequencing [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2015, 54(5): 1587-1590.

[283] Chen K, Luo G Z, He C. High-Resolution Mapping of N(6)-Methyladenosine in Transcriptome and Genome Using a Photo-Crosslinking-Assisted Strategy [J]. Methods Enzymol, 2015, 560: 161-185.

[284] Zhang Z, Chen L Q, Zhao Y L, Yang C G, Roundtree I A, Zhang Z, Ren J, Xie W, He C, Luo G Z. Single-base mapping of m(6)A by an antibody-independent method [J]. Sci Adv, 2019, 5(7): eaax0250.

[285] Garcia-Campos M A, Edelheit S, Toth U, Safra M, Shachar R, Viukov S, Winkler R, Nir R, Lasman L, Brandis A. Deciphering the “m6A code” via antibody-independent quantitative profiling [J]. Cell, 2019, 178(3): 731-747.

[286] Schadt E E, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(R2): R227-R240.

[287] Liu H, Begik O, Lucas M C, Ramirez J M, Mason C E, Wiener D, Schwartz S, Mattick J S, Smith M A, Novoa E M. Accurate detection of m6A RNA modifications in native RNA sequences [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1-9.

[288] Vilfan I D, Tsai Y-C, Clark T A, Wegener J, Dai Q, Yi C q, Pan T, Turner S W, Korlach J. Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription [J]. J Nanobiotechnology, 2013, 11(1): 1-11.

[289] Ayub M, Bayley H. Individual RNA base recognition in immobilized oligonucleotides using a protein nanopore [J]. Nano Lett, 2012, 12(11): 5637-5643.

[290] Khatter H, Myasnikov A G, Natchiar S K, Klaholz B P. Structure of the human 80S ribosome [J]. Nature, 2015, 520(7549): 640-645.

中国知网 https://www.cnki.net

[291] Stojković V, Myasnikov A G, Young I D, Frost A, Fraser J S, Fujimori D G. Assessment of the nucleotide modifications in the high-resolution cryo-electron microscopy structure of the Escherichia coli 50S subunit [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(5): 2723-2732.

[292] Wei C, Gershowitz A, Moss B. N6, O2'-dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to the 5' terminal of animal cell and virus mRNAs [J]. Nature, 1975, 257(5523): 251-253.

[293] Sloan K E, Warda A S, Sharma S, Entian K D, Lafontaine D L, Bohnsack M T. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function [J]. RNA Biol, 2017, 14(9): 1138-1152.

[294] Chen B, Xiong J, Ding J H, Yuan B F, Feng Y Q. Analysis of the Effects of Cr(VI) Exposure on mRNA Modifications [J]. Chem Res Toxicol, 2019, 32(10): 2078-2085.

[295] Bredereck H, Haas H, Martini A. Über methylierte Nucleoside und Purine und ihre pharmakologischen Wirkungen, II. Mitteil.: Methylierung von Nucleosiden durch Dimethylsulfat [J]. Chem Ber, 1948, 81: 307-313.

[296] Yamauchi K, Nakagima T, Kinoshita M. Methylation Study of Ribonucleosides, Deoxyribonucleosides, and 2'-0-Methylribonucleosides with Trimethylsulphonium Hydroxide and Trimethylsulphonium Iodide. Influence of the 2‘-Hydroxy-groups on the Reactivity of the Base Moieties of Ribonucleosides [J]. J Chem Soc Perkin Trans, 1980, 1: 2787-2792.

[297] Yang Y, Hsu P J, Chen Y S, Yang Y G. Dynamic transcriptomic m(6)A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism [J]. Cell Res, 2018, 28(6): 616-624.

[298] Garber K. Epigenetics comes to RNA [J]. Science, 2019, 365(6448): 16-17.

[299] Delaunay S, Frye M. RNA modifications regulating cell fate in cancer [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(5): 552-559.

[300] Bjork G R, Hagervall T G. Transfer RNA Modification: Presence, Synthesis, and Function [J]. EcoSal Plus, 2014, 6(1):

[301] Machnicka M A, Olchowik A, Grosjean H, Bujnicki J M. Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs [J]. RNA Biol, 2014, 11(12): 1619-1629.

[302] Tuorto F, Lyko F. Genome recoding by tRNA modifications [J]. Open biology, 2016, 6(12): 160287.

[303] Pan T. Modifications and functional genomics of human transfer RNA [J]. Cell Res, 2018, 28(4): 395-404.

[304] Agris P F, Vendeix F A, Graham W D. tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification [J]. J Mol Biol, 2007, 366(1): 1-13.

[305] Kaneko T, Suzuki T, Kapushoc S T, Rubio M A, Ghazvini J, Watanabe K, Simpson L,

中国知网 https://www.cnki.net

Suzuki T. Wobble modification differences and subcellular localization of tRNAs in Leishmania tarentolae: implication for tRNA sorting mechanism [J]. EMBO J, 2003, 22(3): 657-667.

[306] Gustilo E M, Vendeix F A, Agris P F. tRNA's modifications bring order to gene expression [J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(2): 134-140.

[307] Lorenz C, Lunse C E, Morl M. tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation [J]. Biomolecules, 2017, 7(2): 35.

[308] Pendleton K E, Chen B, Liu K, Hunter O V, Xie Y, Tu B P, Conrad N K. The U6 snRNA m(6)A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention [J]. Cell, 2017, 169(5): 824-835.

[309] Doxtader K A, Wang P, Scarborough A M, Seo D, Conrad N K, Nam Y. Structural Basis for Regulation of METTL16, an S-Adenosylmethionine Homeostasis Factor [J]. Mol Cell, 2018, 71(6): 1001-1011.

[310] Pui C H, Jeha S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia [J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(2): 149-165.

[311] Lim S Z, Chua E W. Revisiting the Role of Thiopurines in Inflammatory Bowel Disease Through Pharmacogenomics and Use of Novel Methods for Therapeutic Drug Monitoring [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1107.

[312] Karran P, Bignami M. DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability [J]. Bioessays, 1994, 16(11): 833-839.

[313] Swann P F, Waters T R, Moulton D C, Xu Y Z, Zheng Q, Edwards M, Mace R. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine [J]. Science, 1996, 273(5278): 1109-1111.

[314] Waters T R, Swann P F. Cytotoxic mechanism of 6-thioguanine: hMutSalpha, the human mismatch binding heterodimer, binds to DNA containing S6-methylthioguanine [J]. Biochemistry, 1997, 36(9): 2501-2506.

[315] Krynetski E Y, Krynetskaia N F, Gallo A E, Murti K G, Evans W E. A novel protein complex distinct from mismatch repair binds thioguanylated DNA [J]. Mol Pharmacol, 2001, 59(2): 367-374.

[316] Aquilina G, Zijno A, Moscufo N, Dogliotti E, Bignami M. Tolerance to methylnitrosourea-induced DNA damage is associated with 6-thioguanine resistance in CHO cells [J]. Carcinogenesis, 1989, 10(7): 1219-1223.

[317] Wang H, Wang Y. 6-Thioguanine perturbs cytosine methylation at the CpG dinucleotide site by DNA methyltransferases in vitro and acts as a DNA demethylating agent in vivo [J]. Biochemistry, 2009, 48(10): 2290-2299.

中国知网 https://www.cnki.net

[318] Chen K, Zhao B S, He C. Nucleic Acid Modifications in Regulation of Gene Expression [J]. Cell Chem Biol, 2016, 23(1): 74-85.

[319] Boccaletto P, Machnicka M A, Purta E, Piatkowski P, Baginski B, Wirecki T K, de Crecy-Lagard V, Ross R, Limbach P A, Kotter A, Helm M, Bujnicki J M. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D303-D307.

[320] Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. Gene expression regulation mediated through reversible m(6)A RNA methylation [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(5): 293-306.

[321] Daffis S, Szretter K J, Schriewer J, Li J, Youn S, Errett J, Lin T Y, Schneller S, Zust R, Dong H, Thiel V, Sen G C, Fensterl V, Klimstra W B, Pierson T C, Buller R M, Gale M, Jr., Shi P Y, Diamond M S. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members [J]. Nature, 2010, 468(7322): 452-456.

[322] Netzband R, Pager C T. Epitranscriptomic marks: Emerging modulators of RNA virus gene expression [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2020, 11(3): e1576.

[323] Ranjan N, Leidel S A. The epitranscriptome in translation regulation: mRNA and tRNA modifications as the two sides of the same coin? [J]. FEBS Lett, 2019, 593(13): 1483-1493.

[324] Eisenberg E, Levanon E Y. A-to-I RNA editing - immune protector and transcriptome diversifier [J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(8): 473-490.

[325] Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases [J]. Annu Rev Biochem, 2010, 79: 321-349.

[326] Licht K, Hartl M, Amman F, Anrather D, Janisiw M P, Jantsch M F. Inosine induces context-dependent recoding and translational stalling [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(1): 3-14.

[327] Wang I X, So E, Devlin J L, Zhao Y, Wu M, Cheung V G. ADAR regulates RNA editing, transcript stability, and gene expression [J]. Cell Rep, 2013, 5(3): 849-860.

[328] Alon S, Mor E, Vigneault F, Church G M, Locatelli F, Galeano F, Gallo A, Shomron N, Eisenberg E. Systematic identification of edited microRNAs in the human brain [J]. Genome Res, 2012, 22(8): 1533-1540.

[329] Li L, Song Y, Shi X, Liu J, Xiong S, Chen W, Fu Q, Huang Z, Gu N, Zhang R. The landscape of miRNA editing in animals and its impact on miRNA biogenesis and targeting [J]. Genome Res, 2018, 28(1): 132-143.

[330] Gallo A, Vukic D, Michalik D, O'Connell M A, Keegan L P. ADAR RNA editing in human disease; more to it than meets the I [J]. Hum Genet, 2017, 136(9): 1265-1278.

[331] Roth S H, Danan-Gotthold M, Ben-Izhak M, Rechavi G, Cohen C J, Louzoun Y, Levanon E Y. Increased RNA Editing May Provide a Source for Autoantigens in Systemic Lupus Erythematosus [J]. Cell Rep, 2018, 23(1): 50-57.

中国知网 https://www.cnki.net

[332] Jain M, Mann T D, Stulic M, Rao S P, Kirsch A, Pullirsch D, Strobl X, Rath C, Reissig L, Moreth K, Klein-Rodewald T, Bekeredjian R, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Pablik E, Cimatti L, Martin D, Zinnanti J, Graier W F, Sibilia M, Frank S, Levanon E Y, Jantsch M F. RNA editing of Filamin A pre-mRNA regulates vascular contraction and diastolic blood pressure [J]. EMBO J, 2018, 37(19): e94813.

[333] Breen M S, Dobbyn A, Li Q, Roussos P, Hoffman G E, Stahl E, Chess A, Sklar P, Li J B, Devlin B, Buxbaum J D, CommonMind C. Global landscape and genetic regulation of RNA editing in cortical samples from individuals with schizophrenia [J]. Nat Neurosci, 2019, 22(9): 1402-1412.

[334] Han L, Diao L, Yu S, Xu X, Li J, Zhang R, Yang Y, Werner H M J, Eterovic A K, Yuan Y, Li J, Nair N, Minelli R, Tsang Y H, Cheung L W T, Jeong K J, Roszik J, Ju Z, Woodman S E, Lu Y, Scott K L, Li J B, Mills G B, Liang H. The Genomic Landscape and Clinical Relevance of A-to-I RNA Editing in Human Cancers [J]. Cancer Cell, 2015, 28(4): 515-528.

[335] Fan D G, Zhao F, Ding Y, Wu M M, Fan Q Y, Shimizu K, Dohjima T, Nozawa S, Wakahara K, Ohno T, Guo Y S, Ma B A, Jiang J L. BLCAP induces apoptosis in human Ewing's sarcoma cells [J]. Exp Biol Med, 2011, 236(9): 1030-1035.

[336] Rae F K, Stephenson S A, Nicol D L, Clements J A. Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display [J]. Int J Cancer, 2000, 88(5): 726-732.

[337] Evans H K, Weidman J R, Cowley D O, Jirtle R L. Comparative phylogenetic analysis of blcap/nnat reveals eutherian-specific imprinted gene [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(8): 1740-1748.

[338] Levanon E Y, Hallegger M, Kinar Y. Evolutionarily conserved human targets of adenosine to inosine RNA editing [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(4): 1162-1168.

[339] Galeano F, Leroy A, Rossetti C. Human BLCAP transcript: new editing events in normal and cancerous tissues [J]. Int J Cancer, 2010, 127(1): 127-137.

[340] Maas S, Patt S, Schrey M, Rich A. Underediting of glutamate receptor GluR-B mRNA in malignant gliomas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(25): 14687-14692.

[341] Galeano F, Rossetti C, Tomaselli S, Cifaldi L, Lezzerini M. ADAR2-editing activity inhibits glioblastoma growth through the modulation of the CDC14B/Skp2/p21/p27 axis [J]. Oncogene, 2013, 32(8): 998-1009.

[342] Chan T H, Lin C H, Qi L, Fei J, Li Y, Yong K J, Liu M, Song Y. A disrupted RNA editing balance mediated by ADARs (Adenosine DeAminases that act on RNA) in human hepatocellular carcinoma [J]. Gut, 2014, 63(5): 832-843.

[343] Chen Y B, Liao X Y, Zhang J B, Wang F, Qin H D, Zhang L, Shugart Y Y, Zeng Y X, Jia W

中国知网 https://www.cnki.net

H. ADAR2 functions as a tumor suppressor via editing IGFBP7 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2017, 50(2): 622-630.

中国知网 https://www.cnki.net