

• 医药生物技术 •

# $m^6A$ 修饰调控 PLK1 蛋白表达及其对有丝分裂的影响

常晓丽<sup>1</sup>, 严昕<sup>1</sup>, 杨镇宇<sup>2</sup>, 程书文<sup>3</sup>, 朱晓锋<sup>4</sup>, 唐展通<sup>5</sup>, 田文霞<sup>1,6</sup>,  
赵宇军<sup>1</sup>, 潘永柏<sup>5,7\*</sup>, 高山<sup>5\*</sup>

1 山西农业大学 动物医学学院, 山西 晋中 030801

2 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 生物医学检验技术重点实验室, 江苏 苏州 215163

3 南京大学 医学院, 江苏 南京 210046

4 贵州大学 医学院, 贵州 贵阳 550025

5 东南大学 中大医院 生命科学与技术学院 生命健康高等研究院, 江苏 南京 210096

6 山西高等创新研究院 功能蛋白结构解析山西省重点实验室, 山西 太原 030032

7 广东省医学科学院 广东省人民医院 广东省心血管研究所, 广东 广州 510080

常晓丽, 严昕, 杨镇宇, 程书文, 朱晓锋, 唐展通, 田文霞, 赵宇军, 潘永柏, 高山.  $m^6A$  修饰调控 PLK1 蛋白表达及其对有丝分裂的影响[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1559-1572.

CHANG Xiaoli, YAN Xin, YANG Zhenyu, CHENG Shuwen, ZHU Xiaofeng, TANG Zantong, TIAN Wenxia, ZHAO Yujun, PAN Yongbo, GAO Shan.  $m^6A$  modification regulates PLK1 expression and mitosis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1559-1572.

**摘要:**  $N^6$ -甲基腺苷( $N^6$ -methyladenosine,  $m^6A$ )修饰在细胞周期调控中起着关键作用。为了研究  $m^6A$  调控有丝分裂的机制, 本研究首先进行了液相色谱-串联质谱和  $m^6A$  斑点印迹试验, 发现细胞内总  $m^6A$  修饰水平在有丝分裂期间升高。通过免疫荧光技术, 发现沉默甲基转移酶样蛋白 3 (methyltransferase-like 3, METTL3)和甲基转移酶样蛋白 14 (methyltransferase-like 14, METTL14)会导致有丝分裂延迟、纺锤体组装异常和染色体分离缺陷。之后对 HeLa 细胞中转录组范围内的  $m^6A$  靶点进行分析, 发现 polo 样蛋白激酶 1 (polo-like kinase 1, PLK1)是调节有丝分裂的关键  $m^6A$  修饰基因。最后, 采用免疫印记和 RNA pulldown 试验, 发现 *PLK1* mRNA 的  $m^6A$  修饰被 YTH 结构域家族蛋白 1 (YTH  $N^6$ -methyladenosine RNA binding protein 1, YTHDF1)结合并抑制 *PLK1* 的蛋白表达, 从而调控

资助项目: 国家自然科学基金(82103230, 82203348, 82150114); 中国博士后科学基金(2023M730741); 山西省科技创新青年人才团队项目(202204051001022); 山西省“1331 工程”(20211331-13); 功能蛋白结构解析山西省重点实验室项目(202104010910006)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82103230, 82203348, 82150114), the China Postdoctoral Science Foundation (2023M730741), the Special Funding for Shanxi Province Science and Technology Innovation Talent Team (202204051001022), the Shanxi “1331 Project” (20211331-13), and the Shanxi Key Laboratory of Protein Structure Determination (202104010910006).

\*Corresponding authors. E-mail: PAN Yongbo, pyb2013@seu.edu.cn; GAO Shan, gaos@sibet.ac.cn

Received: 2024-09-24; Accepted: 2024-11-28; Published online: 2024-11-29

细胞周期。*PLK1* mRNA 的去甲基化提高了 *PLK1* 蛋白的表达，导致有丝分裂异常。本研究揭示了 m<sup>6</sup>A 在有丝分裂调控中的关键作用及其作为癌症等疾病的治疗靶点的潜力。

**关键词：**甲基转移酶样蛋白 3；polo 样蛋白激酶 1；有丝分裂；细胞周期

## m<sup>6</sup>A modification regulates PLK1 expression and mitosis

CHANG Xiaoli<sup>1</sup>, YAN Xin<sup>1</sup>, YANG Zhenyu<sup>2</sup>, CHENG Shuwen<sup>3</sup>, ZHU Xiaofeng<sup>4</sup>, TANG Zhantong<sup>5</sup>, TIAN Wenxia<sup>1,6</sup>, ZHAO Yujun<sup>1</sup>, PAN Yongbo<sup>5,7\*</sup>, GAO Shan<sup>5\*</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

2 Key Laboratory of Bio-Medical Diagnostics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China

3 Medical School of Nanjing University, Nanjing 210046, Jiangsu, China

4 Medical College, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

5 Advanced Institute for Life and Health, School of Life Sciences and Technology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210096, Jiangsu, China

6 Shanxi Provincial Key Laboratory of Protein Structure Determination, Shanxi Academy of Advanced Research and Innovation, Taiyuan 030032, Shanxi, China

7 Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, Guangdong, China

**Abstract:** *N*<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) modification plays a critical role in cell cycle regulation, while the mechanism of m<sup>6</sup>A in regulating mitosis remains underexplored. Here, we found that the total m<sup>6</sup>A modification level in cells increased during mitosis by the liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry and m<sup>6</sup>A dot blot assays. Silencing methyltransferase-like 3 (METTL3) or METTL14 results in delayed mitosis, abnormal spindle assembly, and chromosome segregation defects by the immunofluorescence. By analyzing transcriptome-wide m<sup>6</sup>A targets in HeLa cells, we identified *polo-like kinase 1* (*PLK1*) as a key gene modified by m<sup>6</sup>A in regulating mitosis. Specifically, through immunoblotting and RNA pulldown, m<sup>6</sup>A modification inhibits *PLK1* translation via YTH *N*<sup>6</sup>-methyladenosine RNA binding protein 1, thus mediating cell cycle homeostasis. Demethylation of *PLK1* mRNA leads to significant mitotic abnormalities. These findings highlight the critical role of m<sup>6</sup>A in regulating mitosis and the potential of m<sup>6</sup>A as a therapeutic target in proliferative diseases such as cancer.

**Keywords:** methyltransferase-like 3 (METTL3); polo-like kinase 1 (PLK1); mitosis; cell cycle

细胞增殖必须通过 G<sub>1</sub> 期(DNA 合成前期)、S 期(DNA 合成期)和 G<sub>2</sub> 期(DNA 合成后期)，然后进行有丝分裂，分裂成 2 个子代细胞。细胞分裂的所有步骤都严格受到 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 或有丝分裂期检查点蛋白的控制<sup>[1-2]</sup>。这些蛋白通常受到翻译后修饰的调控，如蛋白的磷酸化修饰<sup>[3-4]</sup>。在这些调控因子中，*PLK1* 主要在有丝分裂过程

中起着关键作用<sup>[5]</sup>。它促进有丝分裂纺锤体的正常形成，确保染色体的正常分离，并磷酸化各种底物，以启动中期-后期过渡和胞质分裂<sup>[6]</sup>。尽管 *PLK1* 和其他蛋白修饰在细胞周期调控中发挥了关键的作用，但 RNA 表观转录在调控有丝分裂进程中的作用仍有许多未知之处。

RNA 表观转录是 RNA 转录后修饰的研究，

揭示了新的基因表达调控层面，其中  $m^6A$  修饰是真核 mRNA 中最普遍的化学修饰<sup>[7-8]</sup>。 $m^6A$  修饰在多种生物过程中起着关键作用，包括 mRNA 的剪接、翻译和定位等<sup>[9-10]</sup>。 $m^6A$  甲基化过程主要由甲基转移酶样蛋白 3/14/16 (methyltransferase-like 3/14/16, METTL3/14/16) 催化，而去甲基化则由脂肪质量和肥胖相关蛋白 (fat mass and obesity associated, FTO) 和脱甲基化酶 5 (AlkB homolog 5, ALKBH5) 调控。ALKBH5 可以有效介导  $m^6A$  修饰的去甲基化，来保持  $m^6A$  调节系统的可逆性以响应细胞信号<sup>[11-14]</sup>。虽然已有研究表明  $m^6A$  修饰与细胞周期调控有关<sup>[15-16]</sup>，但  $m^6A$  调控有丝分裂的详细机制尚不清楚。

本研究发现 METTL3/14 的缺失会导致有丝分裂异常。机制上，YTHDF1 依赖  $m^6A$  结合 *PLK1* 的 mRNA 从而抑制其蛋白表达，介导细胞周期稳态。本研究证明了  $m^6A$  在有丝分裂调控中的重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒构建

将 *METTL3*、*METTL14* 和 *YTHDF1* 的野生型(WT)序列以及 *METTL3* (D377A、D395A、N539A、E532A)、*METTL14* (K297E、R298E) 和 *YTHDF1* (K395A、Y397A) 克隆到 pLVX-IRES-Neo 载体中。将短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 克隆到 pSIH1-H1-Puro 载体中(相关信息已提交至国家微生物科学数据中心，编号为 SUB1732764209457)。 $dm^6A$  CRISPR-ALKBH5 系统为本课题组构建<sup>[17]</sup>。本研究设计了 2 种针对 *PLK1* mRNA 的 gRNAs，序列如下：

gRNA1：5'-CTATGTAATTAGGAGTCCCA  
CACAGGGTCTTCTTCCTCTC-3'；

gRNA2：5'-ATCATTGTAGAGGATGAGGC  
GTGTTGAGTCATTGAAGAGC-3'。

### 1.2 细胞系

人宫颈癌细胞 HeLa 细胞购自中国科学院上海细胞库，置于添加 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素(Invitrogen 公司)的 DMEM 培养基(Gibco)中，于 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的加湿培养箱中培养。

### 1.3 质粒转染和 shRNA 敲除(knock down, KD)

用转染试剂 Lipofectamine 3000 (Invitrogen 公司) 转染质粒，单质粒转染时按照说明书根据目的细胞(293T 细胞或 HeLa 细胞)培养皿大小来确定目的质粒与转染试剂的使用量；多质粒转染时在单质粒转染的基础上调整多个目的质粒之间的转染比例，Cas13b/dCas13b/ $dm^6A$  CRISPR-ALKBH5 与 gRNAs 的双质粒转染过程中采用的质粒比例为 1:3。本研究中 shRNA 敲除，包括基因 *METTL3/14* 与 *YTHDF1* 的敲除均采用慢病毒包装与感染的方法。目的质粒、包装载体 pMD2.G 和 psPAX2 以 8:3:6 的比例共转染 293T 细胞，转染 72 h 后收集上清液，4 000×g 离心 10 min 后取上清对 HeLa 细胞进行感染。确保目的基因的敲除效率达到 60% 以上再进行后续实验。

### 1.4 RNA 提取和实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)

用 RNAiso Plus (TaKaRa Bio Inc.) 提取总 RNA，用试剂盒 HiScript III RT SuperMix (Vazyme Biotech Co., Ltd.) 对提取的总 RNA 进行逆转录。荧光定量采用试剂盒 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix Kit (Vazyme Biotech Co., Ltd.) 进行，并使用 QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific 公司) 进行结果分析。qRT-PCR 结果记录为  $C_t$  值，并与 *GAPDH* 进行归一化处理。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析基因相对表达水平。所用引物已提交至国家微生物科学数据

中心, 编号为 SUB1732764209457)。

### 1.5 免疫印迹

裂解细胞, 用裂解缓冲液(150 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, pH 7.6, 2 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇, 1:100 蛋白酶抑制剂混合物)提取蛋白, 用 SDS-PAGE 分离目的蛋白, 其中实验组与对照组上样量保持一致, 将分离完毕的目的蛋白转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 然后用特异性抗体进行免疫印迹(SUB1732764209457)并于化学发光成像系统仪器中自动曝光并保存图片。GAPDH 作为内参蛋白。

### 1.6 RNA 免疫共沉淀联合定量聚合酶链反应 (RNA immunoprecipitation combined with quantitative polymerase chain reaction, RIP-qRT-PCR)

$\text{m}^6\text{A}$ -RIP qRT-PCR 和针对目的蛋白的 RIP-qRT-PCR 检测方法参考文献[17]。用于该实验的抗体信息已提交至国家微生物科学数据中心, 编号为 SUB1732764209457)。

### 1.7 双荧光素酶报告基因分析

双荧光素酶报告基因检测采用参考文献[18]方法。将 *PLK1* 的 mRNA 分为 4 个片段: 外显子 1–3 (exons 1–3) (722 bp), 外显子 4–6 (exons 4–6) (470 bp), 外显子 7–10 (exons 7–10) (620 bp), 3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR) (304 bp), 并插入到萤火虫荧光素酶(firefly luciferase, F-Luc)编码区后。分别将构建好的 pmirGLO-PLK1-exon 1–3、exon 4–6、exon 7–10 和 3' UTR 质粒转染到 *METTL3* 或 *METTL14* KD 细胞中 48 h。荧光素酶活性的测定使用 Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega Corporation 公司)。萤火虫荧光素酶的活性用海肾素荧光素酶(renilla luciferase, R-Luc)进行归一化。

为了评估 A1001 位点对 *PLK1* 表达的影响,

将 *PLK1* mRNA A1001 位点的野生型或突变型片段插入到萤火虫荧光素酶编码区后。将 pmirGLO-PLK1-A1001-WT 或 pmirGLO-PLK1-A1001-mutant 转染到 293T 细胞中, 并按上述方法测定荧光素酶活性。

### 1.8 单碱基延长和连接的 qRT-PCR 扩增技术(single-base elongation-and ligation-based qRT-PCR amplification method, SELECT qRT-PCR)

SELECT qRT-PCR 采用参考文献[19]方法进行。总 RNA 使用 Qubit 4.0 (ThermoFisher Scientific 公司) 进行定量, 将 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 用于 SELECT qRT-PCR 检测, 所用引物已提交至国家微生物科学数据中心, 编号为 SUB1732764209457)。 $C_t$  值归一化至对照组。所有检测均重复进行 3 次。

### 1.9 RNA pulldown

HeLa 细胞在含有 1% 蛋白酶抑制剂混合物的裂解缓冲液中裂解。生物素标记的 RNA 探针(已提交至国家微生物科学数据中心, 编号为 SUB1732764209457)在 100 °C 下变性 10 min, 将 2 nmol 的生物素化 RNA 探针与细胞提取物中 200  $\mu\text{g}$  的蛋白质孵育, 并且在 1× 蛋白质与 RNA 结合缓冲液(20 mmol/L Tris, pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1% 吐温-20) 中持续孵育 4 h。每个结合反应与 30  $\mu\text{L}$  洗涤过的 Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads (ThermoFisher Scientific 公司) 混合, 4 °C 孵育 2 h, 然后用洗涤缓冲液(20 mmol/L Tris, pH 7.5, 10 mmol/L NaCl, 0.1% 吐温-20) 洗涤 6 次。用免疫印迹法分析下拉的蛋白。

### 1.10 细胞周期同步化和免疫荧光技术

细胞周期同步化采用胸腺嘧啶核苷(thymidine, TdR)阻断法。TdR 的过量摄入, 能够干预 DNA 的合成过程, 从而将细胞阻滞在细胞周期的 S 期。阻断和释放的时间间隔应按照以下原则来设计: 一次阻断时长应大于 G<sub>2</sub> 期、

M 期和 G<sub>1</sub> 期时长的总和，释放时长应大于 S 期时长且小于 G<sub>2</sub> 期、M 期和 G<sub>1</sub> 期的时长总和，第 2 次阻断参照第 1 次。本研究以 HeLa 细胞(细胞周期总时长约 21 h, G<sub>1</sub> 期约为 10 h, S 期约为 7 h, G<sub>2</sub> 期约为 3 h, M 期约为 1 h)为例，如图 1E 所示，最终可得到有丝分裂中期细胞(蛋白酶体抑制剂 MG132 终浓度为 10 μmol/L，以防目的细胞退出有丝分裂中期进入后期)，如图 1H 所示，最终可得到有丝分裂后期细胞(释放时间为 10.5–11.0 h 较适合，否则细胞将会进入有丝分裂的末期和胞质分裂)。其中加入 TdR 的终浓度为 2 mmol/L，释放吸弃含 TdR 的培养基后需用 1×PBS 洗 2 次后再加入新鲜培养基。

同步化后的细胞在 4% 多聚甲醛中固定 15 min，用 0.5% Triton X-100 通透 15 min，用 4% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭 30 min。随后用一抗在 4 °C 下孵育过夜。用二抗孵育 1 h，然后加入 DAPI 避光孵育 10 min。载玻片用抗荧光猝灭剂密封，并使用激光共聚焦显微镜(Leica 公司)收集图像。

### 1.11 $m^6A$ 斑点印迹

将 HeLa 细胞传代培养至指数生长期后，再加入秋水仙碱(终浓度为 0.2 μg/mL) 8 h，以阻滞细胞处于有丝分裂中期。提取总 RNA，70 °C 处理 5 min。然后将等量的 RNA 稀释到相同的体积，上样到 Amersham Hybond N+ 膜中，并在紫外交联仪自动交联模式下处理 5 min，共 3 次。在室温下用 5% 的牛奶封闭 1 h，然后用抗  $m^6A$  抗体孵育过夜。与二抗孵育 1 h 后，使用化学发光成像系统捕获图像。

### 1.12 统计分析

数据以 mean±SEM 或 SD 表示。对照组和实验组的组间比较采用 Student's *t* 检验。采用 Spearman 相关法进行相关性分析。统计学意义

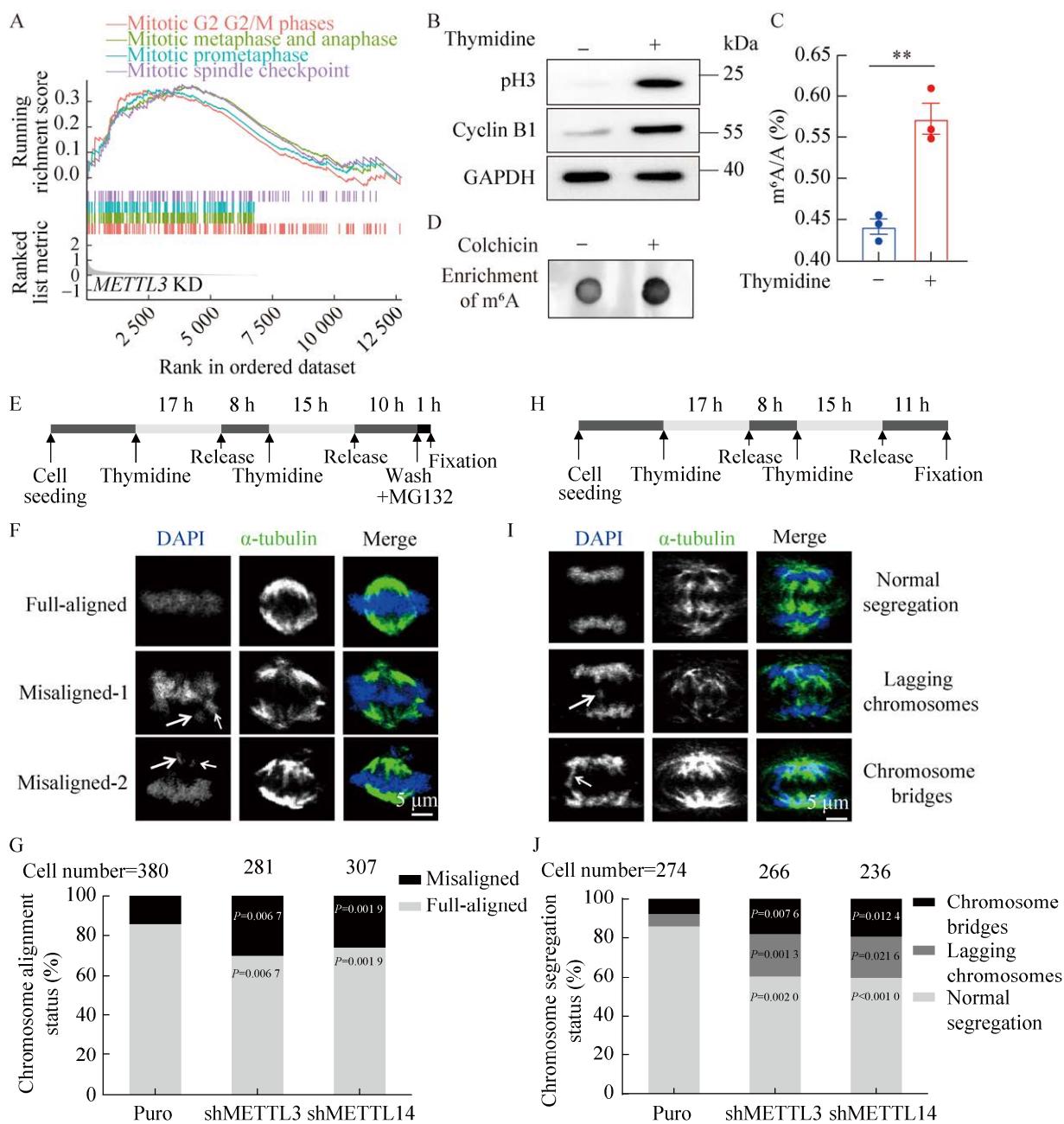
定义为 *P*<0.05。所有统计分析均采用 GraphPad Prism 8.0 进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 $m^6A$ 修饰调控有丝分裂

为了研究  $m^6A$  修饰是否参与有丝分裂，本研究使用在 HeLa 细胞中进行 METTL3 KD 的 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq)数据(来自 GEO 公共数据库 GSE117299)<sup>[20]</sup>进行基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)。结果显示，有丝分裂相关信号通路在 METTL3 KD 细胞中显著富集(图 1A)。将 HeLa 细胞进行同步化(图 1B)，并进行液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS)来测量  $m^6A/A$  比值。结果显示，与对照组相比，有丝分裂相关 RNA 表现出更高的  $m^6A/A$  比率(图 1C)。同样地， $m^6A$  斑点印迹结果分析显示，与对照组相比，有丝分裂组的  $m^6A$  水平显著升高(图 1D)。这些结果表明， $m^6A$  修饰可能调控有丝分裂。

为了研究  $m^6A$  修饰在有丝分裂中的作用，对敲除 METTL3/14 的 HeLa 细胞进行免疫印记分析鉴定(SUB1732764209457)，将 METTL3/14 KD HeLa 细胞用 TdR 同步化后进行了有丝分裂指数(mitotic index, MI)免疫荧光染色分析，结果显示，METTL3 或 METTL14 KD 细胞的磷酸化组蛋白 H3 (phospho-histone H3) 染色明显高于对照组的 HeLa 细胞(SUB1732764209457)，表明 METTL3 或 METTL14 KD 组的有丝分裂细胞数量较多。此外，METTL3 或 METTL14 KD 导致纺锤体组装异常，包括单极或多极纺锤体(SUB1732764209457)。冷稳定微管实验(cold-stable microtubule assay)结果显示，在同步化后的 HeLa 细胞中，METTL3 或 METTL14 KD



**图 1** m<sup>6</sup>A 修饰调控有丝分裂。A: 来自公共数据库中 *METTL3* KD HeLa 细胞的 RNA-seq 数据 (GSE117299) 的 GSEA 分析。B: 免疫印迹显示 TdR 处理后 HeLa 细胞的同步性。C: m<sup>6</sup>A 质谱验证对照组和同步化组 HeLa 细胞中的 m<sup>6</sup>A 修饰水平。\*\*:  $P<0.01$ 。D: m<sup>6</sup>A 斑点印迹检测对照组和同步化组 HeLa 细胞中 m<sup>6</sup>A 修饰水平。E–G: 免疫荧光显示对照组和 *METTL3/14* KD HeLa 细胞有丝分裂中期的染色体排列和缺陷, 细胞同步化流程示意图(E), 代表图(F), 以及统计数据(G)。比例尺为 5  $\mu$ m。箭头表示染色体没有在赤道板上对齐, Full-aligned 为对照组, Misaligned-1/2 为 *METTL3/14* KD HeLa 细胞中均可出现的 2 种缺陷代表图。H–J: 免疫荧光显示对照组或 *METTL3/14* KD HeLa 细胞的染色体排列和有丝分裂后期的缺陷, 细胞同步化流程示意图(H), 代表图(I), 以及统计数据(J)。比例尺为 5  $\mu$ m。箭头表示有异常分离的染色体, Normal segregation 为对照组, Lagging chromosomes 与 Chromosome bridges

为 METTL3/14 KD HeLa 细胞中均可出现的 2 种缺陷代表图。

Figure 1 m<sup>6</sup>A modification regulates mitosis. A: GSEA of RNA-seq data from METTL3 KD HeLa cells in public databases (GSE117299). B: Immunoblot showing the synchronization of HeLa cells after thymidine treatment. C: Evaluation of m<sup>6</sup>A modification levels in control and synchronized HeLa cells by m<sup>6</sup>A mass spectrometry. \*\*: P<0.01. D: m<sup>6</sup>A dot blot assay showing m<sup>6</sup>A modification levels in control and synchronized HeLa cells. E–G: Immunofluorescence showing chromosome arrangement and defects in mitotic metaphase in control and METTL3/14 KD HeLa cells. Cell synchronization (E), representative images (F), and statistics (G) are shown. Scale bars=5 μm. Arrows indicate chromosomes not aligned on the equatorial plate, full-aligned represents the control group, misaligned-1/2 represents two types of defects that can occur in METTL3/14 KD HeLa cells. H–J: Immunofluorescence showing chromosome arrangement and defects in mitotic anaphase in control or METTL3/14 KD HeLa cells. Cell synchronization (H), representative images (I), and statistics (J) are shown. Scale bars=5 μm. Arrows indicate chromosomes with abnormal segregation, normal segregation represents the control group, lagging chromosomes and chromosome bridges represent two types of defects that can occur in METTL3/14 KD HeLa cells.

导致动粒和微管之间附着不稳定与连接强度降低(相关信息已提交至国家微生物科学数据中心, 编号为 SUB1732764209457)。接下来, 评估 m<sup>6</sup>A 对 TdR 和 MG132 处理的中期 HeLa 细胞有丝分裂染色体形态的影响(图 1E)。结果显示, METTL3 或 METTL14 KD 均导致染色体排列明显异常(图 1F、1G)。此外, 在后期 HeLa 细胞中(图 1H), METTL3 或 METTL14 KD 均导致了显著的染色体分离异常(图 1I、1J)。这些结果表明, m<sup>6</sup>A 修饰影响有丝分裂。

## 2.2 PLK1 是 m<sup>6</sup>A 修饰调控有丝分裂的关键靶点

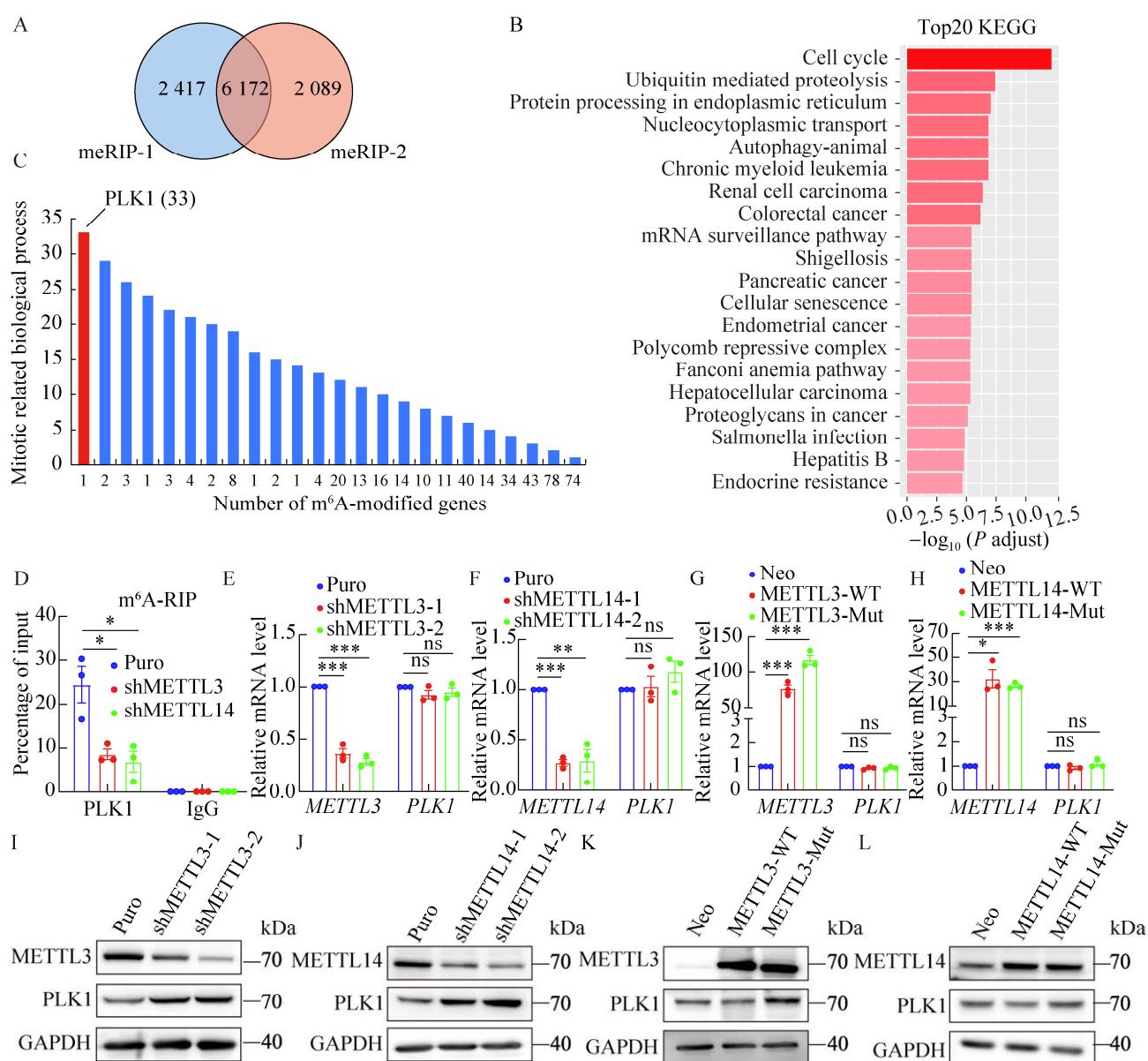
为了研究 m<sup>6</sup>A 修饰如何调控有丝分裂, 本研究分析了 HeLa 细胞的甲基化 RNA 免疫沉淀测序(methylated RNA immunoprecipitation with high throughput sequencing, meRIP-seq)数据集<sup>[21–22]</sup>, 鉴定到了 6 172 个高可信的 m<sup>6</sup>A 修饰基因(图 2A)。京都基因与基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析显示, “细胞周期”是这些 m<sup>6</sup>A 修饰基因中最显著富集的信号通路(图 2B)。基因本体论(gene ontology, GO)富集分析显示, 47 个与“有丝分裂”术语相关的生物过程(biological process, BP)显著富集(SUB1732764209457), 共鉴定出 399 个 m<sup>6</sup>A 修饰的基因参与了这些生物过程,

包括有丝分裂的关键调控因子 PLK1<sup>[23]</sup>, PLK1 是参与最多的基因(图 2C)。因此, 将 PLK1 作为有丝分裂调控的潜在 m<sup>6</sup>A 靶点。

为了验证 m<sup>6</sup>A 对 PLK1 的修饰, 进行了 m<sup>6</sup>A-RIP qRT-PCR 检测。结果显示, PLK1 转录本上的 m<sup>6</sup>A 修饰水平在 METTL3 或 METTL14 KD HeLa 细胞中显著降低(图 2D)。接下来, 探究 m<sup>6</sup>A 是否影响 PLK1 的表达。qRT-PCR 结果显示, METTL3 和 METTL14 KD 或过表达(over expression, OE)对 PLK1 的 mRNA 水平均无显著影响(图 2E–2H)。然而, 免疫印迹分析显示, METTL3 和 METTL14 KD 均显著提高了 PLK1 蛋白水平(图 2I、2J)。相比之下, 野生型 METTL3 和 METTL14 的 OE 显著降低了 PLK1 蛋白水平(图 2K、2L), 而突变型无明显变化。这些数据表明, PLK1 的 mRNA 具有 m<sup>6</sup>A 修饰, 该修饰抑制其蛋白表达。

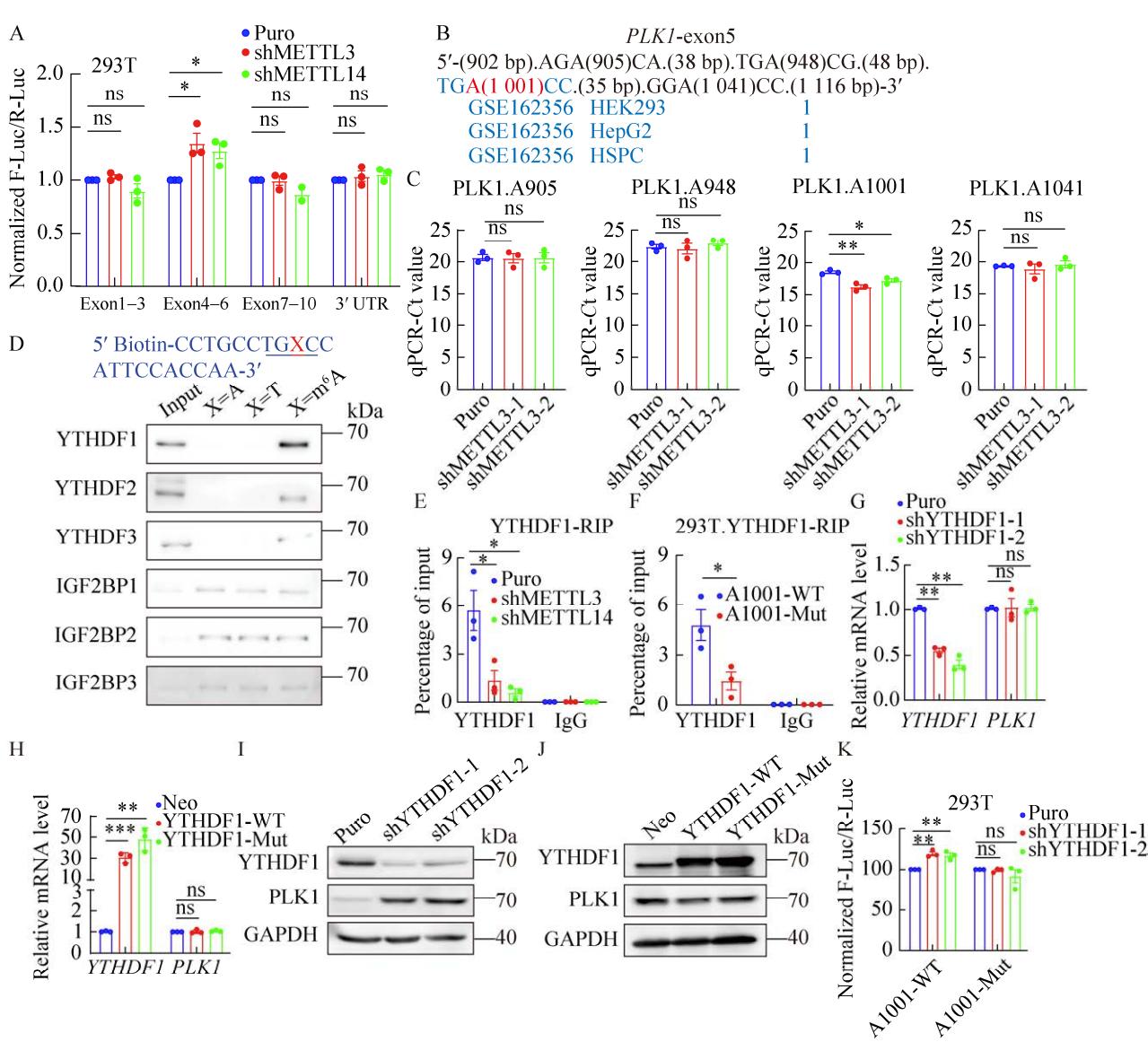
## 2.3 YTHDF1 依赖 m<sup>6</sup>A 结合 PLK1 mRNA 并抑制其蛋白表达

为了确定 PLK1 mRNA 中具有功能的 m<sup>6</sup>A 修饰位点, 构建了几个截断的 pmirGLO-PLK1 荧光素酶报告基因。双荧光素酶检测显示, METTL3 或 METTL14 KD 显著增加了 PLK1 mRNA 的 exon 4–6 报告载体的荧光素酶活性(图 3A)。根据 m<sup>6</sup>A 基序的一致序列(RRACH), 在



**图 2 PLK1 是 m<sup>6</sup>A 修饰调控有丝分裂的关键靶点** A: 通过对 2 个 meRIP-seq 数据集(GSE174420, GSE162199)的分析, 鉴定了潜在的 m<sup>6</sup>A 修饰基因。B: 对 m<sup>6</sup>A 修饰基因的 KEGG 通路富集分析, 显示了前 20 个信号通路。C: 条形图显示了与有丝分裂生物过程相关的基因的数量。D: RIP-qRT-PCR 显示 m<sup>6</sup>A 修饰在 PLK1 mRNA 上的富集。E–H: METTL3 和 METTL14 KD (E, F) 或 OE (G, H) 的 HeLa 细胞中 PLK1 mRNA 的 qRT-PCR 分析。I–L: METTL3 和 METTL14 KD (I, J) 或 OE (K, L) 的 HeLa 细胞中 PLK1 的免疫印迹分析。\*: P<0.05; \*\*: P<0.01; \*\*\*: P<0.001; ns: 不显著。

Figure 2 PLK1 is a key target for m<sup>6</sup>A modification in the regulation of mitosis. A: Identification of potential m<sup>6</sup>A modification genes through analysis of two meRIP-seq datasets (GSE174420, GSE162199) for HeLa cells. B: KEGG pathway enrichment analysis of m<sup>6</sup>A modified genes, showing the top 20 signaling pathways. C: Bar plot showing the number of genes associated with mitosis-related biological processes. D: RIP-qRT-PCR showing the enrichment of m<sup>6</sup>A modification in PLK1 mRNA. E–H: qRT-PCR analysis of PLK1 mRNA in METTL3 and METTL14 KD (E, F) or OE (G, H) HeLa cells. I–L: Immunoblot analysis of PLK1 in METTL3 and METTL14 KD (I, J) or OE (K, L) HeLa cells. \*: P<0.05; \*\*: P<0.01; \*\*\*: P<0.001; ns: Not significant.



**图 3 YTHDF1 依赖  $m^6A$  结合 *PLK1* mRNA 并抑制其蛋白表达**

A: 双荧光素酶检测显示了 293T 细胞中 *PLK1* mRNA CDS 区域和 3'UTR 的荧光素酶活性。B: 紫外交联免疫沉淀结合高通量测序 (cross-linking and immunoprecipitation high throughput sequencing, CLIP-seq) 数据集显示了 *PLK1* mRNA 的第 5 个外显子中的  $m^6A$  修饰位点。C: qRT-PCR 的阈值循环 ( $C_t$ ) 显示了 METTL3 KD HeLa 细胞中 *PLK1* mRNA 的 A905、A948、A1001 和 A1041 位点的选择结果。D: 免疫印迹检测 HeLa 细胞 *PLK1* mRNA 的第 5 个外显子与非  $m^6A$  或  $m^6A$  探针在 RNA 下拉结果中 YTHDFs 和 IGF2BPs 的富集情况。E: RIP-qRT-PCR 显示 YTHDF1 在 METTL3 或 METTL14 KD 的 HeLa 细胞中 *PLK1* 转录本上的富集情况。F: RIP-qRT-PCR 检测 293T 细胞中 *PLK1* mRNA 第 5 个外显子碱基位点 A1001 的野生型和单位点突变型中 YTHDF1 的富集情况。G-H: YTHDF1 KD (G) 或 OE (H) HeLa 细胞中 *PLK1* mRNA 的 qRT-PCR 分析。I-J: YTHDF1 KD (I) 或 OE (J) HeLa 细胞中 *PLK1* 的免疫印迹分析。K: 双荧光素酶检测显示 OE A1001 位点野生型和突变型的 293T 细胞的荧光素酶活性。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: 不显著。

Figure 3 YTHDF1 relies on  $m^6A$  binding to *PLK1* mRNA and inhibits its protein expression. A:

Dual-luciferase assays showing luciferase activities of *PLK1* mRNA CDS regions and 3'UTR in 293T cells. B: CLIP-seq datasets reveal the m<sup>6</sup>A modification sites in exon 5 of *PLK1* mRNA. C: Threshold cycle ( $C_t$ ) of qRT-PCR showing SELECT results of A905, A948, A1001, and A1041 sites of *PLK1* mRNA in *METTL3* KD HeLa cells. D: Immunoblot detecting the enrichment of YTHDFs and IGF2BPs in RNA pulldown results using non-m<sup>6</sup>A or m<sup>6</sup>A *PLK1*-exon 5 probes in HeLa cells. E: RIP-qRT-PCR showing YTHDF1 enrichment on *PLK1* mRNA transcripts in *METTL3* or *METTL14* KD HeLa cells. F: RIP-qRT-PCR showing YTHDF1 enrichment in WT or A1001 site point mutant of *PLK1*-exon 5 OE 293T cells. G–H: qRT-PCR analysis of *PLK1* mRNA in YTHDF1 KD (G) or OE (H) HeLa cells. I–J: Immunoblot analysis of PLK1 in YTHDF1 KD (I) or OE (J) HeLa cells. K: Dual-luciferase assays showing luciferase activities of WT or A1001 site point mutant of *PLK1*-exon 5 OE 293T cells. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: Not significant.

*PLK1* mRNA 的第 5 个外显子中发现了 4 个潜在的 m<sup>6</sup>A 修饰位点(图 3B)。SELECT-qRT-PCR<sup>[19]</sup>结果显示, *METTL3* KD HeLa 细胞中 A1001 位点的 m<sup>6</sup>A 水平显著降低, 而其他 3 个位点(A905、A948、A1041)无显著变化(图 3C)。已发表的 m<sup>6</sup>A-SAC-seq 数据集<sup>[24]</sup>进一步证实了 *PLK1* mRNA 的 A1001 位点被 m<sup>6</sup>A 修饰(图 3C)。

为了检测 m<sup>6</sup>A 阅读蛋白 YTHDFs<sup>[9]</sup>和 IGF2BPs<sup>[10]</sup>是否与 *PLK1* mRNA 的 A1001 m<sup>6</sup>A 位点结合, 使用生物素标记和 m<sup>6</sup>A 修饰的 RNA 探针进行了 RNA pulldown 试验。结果表明, YTHDF1 在 m<sup>6</sup>A 探针组有特异性富集, 而在非 m<sup>6</sup>A 和突变体探针组中没有特异性富集(图 3D)。相比之下, YTHDF2 和 YTHDF3 的结合能力较弱, 但 IGF2BP 家族蛋白没有与该探针特异性结合(图 3D)。RIP-qRT-PCR 分析显示, YTHDF1 在 *PLK1* mRNA 的第 5 个外显子中显著富集, 而在 *METTL3* 和 *METTL14* KD HeLa 细胞中, 这些富集量显著降低(图 3E)。此外, YTHDF1 与 *PLK1* mRNA 第 5 个外显子的野生型结合比突变型结合更显著(图 3F)。这些结果表明, YTHDF1 以 m<sup>6</sup>A 依赖的方式与 *PLK1* 转录本的第 5 个外显子结合。

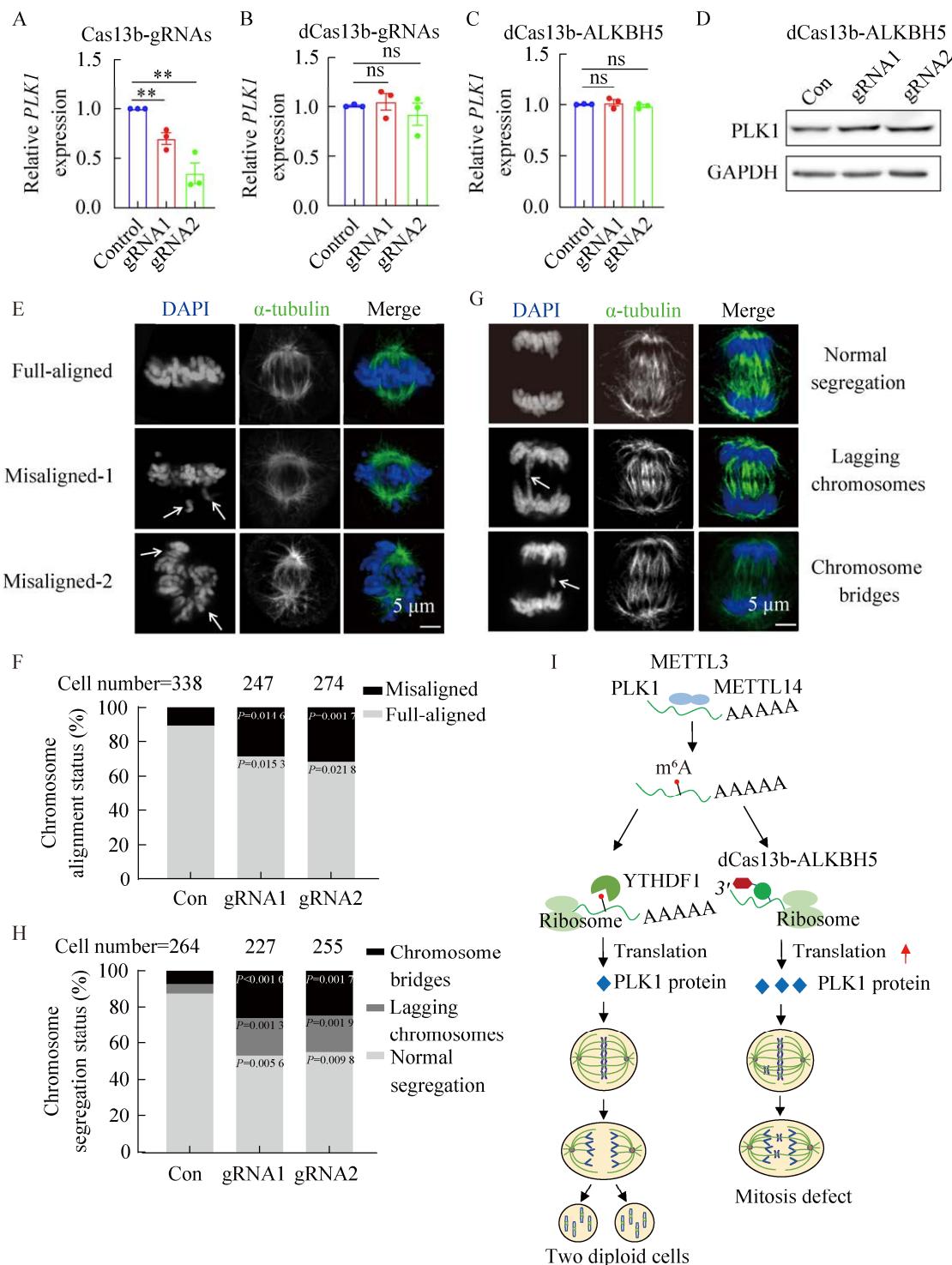
进一步检测了 YTHDF1 对 *PLK1* 表达的影响, 发现 YTHDF1 KD 和 OE 对 *PLK1* mRNA 的表达均无显著影响(图 3G、3H)。然而, YTHDF1 KD 导致了 *PLK1* 蛋白水平的显著升高(图 3I)。相反, YTHDF1-WT OE 降低了 HeLa 细胞中

*PLK1* 蛋白的表达, 而 YTHDF1-mut 则没有显著影响 *PLK1* 蛋白的表达(图 3J)。此外, 双荧光素酶检测显示, YTHDF1 KD 显著提高了 *PLK1* mRNA 第 5 个外显子报告基因的荧光素酶活性, 而没有影响 A1001 m<sup>6</sup>A 位点突变体荧光素酶活性(图 3K)。这些结果表明, YTHDF1 是 *PLK1* mRNA 的 m<sup>6</sup>A 阅读蛋白, 并调控其蛋白表达。

## 2.4 m<sup>6</sup>A 修饰 *PLK1* mRNA 调控有丝分裂

使用 dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 系统<sup>[25]</sup>特异性的将 *PLK1* mRNA 的 m<sup>6</sup>A 甲基化去除, 以确认 m<sup>6</sup>A 对其表达的影响。根据之前的研究<sup>[17]</sup>设计了 2 种 gRNAs。qRT-PCR 分析显示, 与野生型 Cas13b 共转染的 2 种 gRNAs 显著降低了 *PLK1* 的 mRNA 水平(图 4A), 而 dCas13b 则不能(图 4B), 表明这 2 种 gRNAs 能有效识别 *PLK1* mRNA。测试了 *PLK1* mRNA 的第 5 个外显子去甲基化对其表达的影响, 发现 dm<sup>6</sup>A CRISPR 靶向 *PLK1* mRNA 导致 HeLa 细胞的 *PLK1* 蛋白水平显著上调, 而没有改变 *PLK1* 的 mRNA 水平(图 4C、4D), 表明 *PLK1* mRNA 的 A1001 m<sup>6</sup>A 位点调控其蛋白表达。

评估 *PLK1* mRNA 的 A1001 m<sup>6</sup>A 位点对有丝分裂染色体形态的影响, 结果显示, 特异性去除 *PLK1* mRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰导致中期 HeLa 细胞的染色体排列明显异常(图 4E、4F), 后期 HeLa 细胞出现明显的染色体分离异常(图 4G、4H)表明 *PLK1* mRNA 的 m<sup>6</sup>A 修饰在有丝分裂中起着调控作用。



**图4  $\text{m}^6\text{A}$  修饰 *PLK1* mRNA 调控有丝分裂** A–B:qRT-PCR 分析用 gRNAs 联合 Cas13b (A)或 dCas13b (B)转染的 HeLa 细胞中 *PLK1* mRNA 的水平。C–D: 转染 dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 系统的 HeLa 细胞中 *PLK1* mRNA 的 qRT-PCR 分析(C)和蛋白的免疫印迹分析(D)。E–F: 免疫荧光显示转染了 dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 系统的 HeLa 细胞的染色体排列和有丝分裂中期的缺陷, 代表图(E)和统计图(F)。比

例尺为 5  $\mu\text{m}$ 。箭头表示染色体没有在赤道板上对齐, Full-aligned 为对照组, Misaligned-1/2 为转染了 dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 系统的 HeLa 细胞中均可出现的 2 种缺陷代表图。G–H: 免疫荧光显示转染了 dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 系统的 HeLa 细胞的染色体排列和有丝分裂后期的缺陷, 代表图(G)和统计图(H)。比例尺为 5  $\mu\text{m}$ 。箭头表示有异常分离的染色体, Normal segregation 为对照组, Lagging chromosomes 与 Chromosome bridges 为转染了 dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 系统的 HeLa 细胞中均可出现的 2 种缺陷代表图。I: 通过 METTL3/14/YTHDF1/PLK1 轴调控细胞有丝分裂的模型。\*\*:  $P<0.01$ ; ns: 不显著。

Figure 4 m<sup>6</sup>A modified *PLK1* mRNA regulates mitosis. A–B: qRT-PCR analysis of *PLK1* mRNA expression in HeLa cells transfected with gRNAs combined with Cas13b (A) or dCas13b (B). The same below. C–D: qRT-PCR and immunoblot analysis of mRNA (C) and protein (D) expression of *PLK1* in HeLa cells transfected with the dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 system. E–F: Immunofluorescence showing chromosome arrangement and defects in mitotic metaphase in HeLa cells transfected with the dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 system. Representative images (E) and statistics (F) are shown. Scale bars=5  $\mu\text{m}$ . Arrows indicate chromosomes not aligned on the equatorial plate, full-aligned represents the control group, misaligned-1/2 represents two types of defects that can occur in HeLa cells transfected with the dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 system. G–H: Immunofluorescence showing chromosome arrangement and defects in mitotic anaphase in HeLa cells transfected with the dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 system. Representative images (G) and statistics (H) are shown. Scale bars=5  $\mu\text{m}$ . Arrows indicate chromosomes with abnormal segregation, normal segregation represents the control group, lagging chromosomes and chromosome bridges represent two types of defects that can occur in HeLa cells transfected with the dm<sup>6</sup>A CRISPR-ALKBH5 system. I: A model for the regulation of cell mitosis by the METTL3/14/YTHDF1/PLK1 axis. \*\*:  $P<0.01$ ; ns: Not significant.

### 3 讨论与结论

细胞周期进程是由一个复杂的细胞周期相关基因网络和检查点控制的<sup>[26]</sup>。蛋白质磷酸化一直被认为是细胞周期调控的关键机制<sup>[3]</sup>。近年来, m<sup>6</sup>A 在转录水平上调控细胞周期的作用引起了研究人员的关注<sup>[27–28]</sup>。METTL3 是一种关键的 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶, 参与了各种细胞周期过程<sup>[29–31]</sup>, 但其在有丝分裂中的具体机制仍不明晰。本研究发现 METTL3 通过对 *PLK1* 进行 m<sup>6</sup>A 修饰, 在有丝分裂调控中起关键作用(图 4I)。

*PLK1* 在有丝分裂过程中至关重要, 如中心体成熟、胞质分裂、双极纺锤体形成和染色体分离<sup>[23]</sup>。其表达受到严格调控, 在 G2/M<sup>[32]</sup>期达到峰值。然而, *PLK1* 的 OE 会导致有丝分裂缺陷和基因组不稳定性<sup>[33–34]</sup>。本研究发现, *METTL3* 和 *METTL14* KD 导致 *PLK1* 表达升高, 从而导致有丝分裂缺陷。最近的一项研究表明, YTHDF1 以 m<sup>6</sup>A 依赖的方式提高了 *PLK1* 的翻

译效率, 并促进了前列腺癌肿瘤的发生和转移<sup>[35]</sup>。相反, 本研究表明, YTHDF1 抑制了 HeLa 细胞中 *PLK1* 蛋白的表达, 提示了 YTHDF1 对 *PLK1* 表达的细胞类型特异性调控机制。此外, IGF2BP2 与 *PLK1* mRNA 3' UTR 的 m<sup>6</sup>A 修饰结合, 上调 *PLK1* 蛋白的表达<sup>[28]</sup>, 但 *PLK1* 在调节有丝分裂中的作用尚未得到详细研究。SELECT-qRT-PCR<sup>[19]</sup>可针对性地对特定位点进行 m<sup>6</sup>A 修饰定量, 样本间修饰丰度差异分析以及鉴定目标位点是否存在 m<sup>6</sup>A 修饰。因此, 本研究通过 SELECT-qRT-PCR 证明 *PLK1* mRNA 第 5 个外显子上的 A1001 碱基位点为 m<sup>6</sup>A 修饰位点, RNA pulldown 实验也同样证实了这一点。后续将采用点突变实验进一步验证该位点 m<sup>6</sup>A 修饰的存在。

综上所述, 本研究鉴定了 HeLa 细胞中一个调控 *PLK1* 蛋白表达的 m<sup>6</sup>A 修饰位点, 即 *PLK1* mRNA 第 5 个外显子上的 A1001 碱基位

点,且发现 YTHDF1 与该位点通过  $m^6A$  修饰特异性结合并抑制 PLK1 蛋白的表达,进一步调控有丝分裂的进程,为治疗癌症等疾病提供了一个全新的潜在靶点。

## 作者贡献声明

常晓丽: 实验操作、数据管理、稿件润色修改; 严昕、杨镇宇、程书文、朱晓锋、唐展通: 实验操作; 田文霞、赵宇军: 材料提供, 经费支持; 潘永柏、高山: 方案设计、监督指导、经费支持、初稿写作、稿件润色修改。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## REFERENCES

- [1] BERTOLI C, SKOTHEIM JM, de BRUIN RAM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(8): 518-528.
- [2] de GOOIJER MC, van den TOP A, BOCKAJ I, BEIJNEN JH, WÜRDINGER T, van TELLINGEN O. The G2 checkpoint-a node-based molecular switch[J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(4): 439-455.
- [3] MATTHEWS HK, BERTOLI C, de BRUIN RAM. Cell cycle control in cancer[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23(1): 74-88.
- [4] WANG YC, PETERSON SE, LORING JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells[J]. *Cell Research*, 2014, 24(2): 143-160.
- [5] TAKAKI T, TRENZ K, COSTANZO V, PETRONCZKI M. Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis: cytokinesis, DNA damage response, and development[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2008, 20(6): 650-660.
- [6] STREBHARDT K, ULLRICH A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(4): 321-330.
- [7] YANG Y, HSU PJ, CHEN YS, YANG YG. Dynamic transcriptomic  $m^6A$  decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism[J]. *Cell Research*, 2018, 28(6): 616-624.
- [8] JIA GF, FU Y, HE C. Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation[J]. *Trends in Genetics*, 2013, 29(2): 108-115.
- [9] WANG X, LU ZK, GOMEZ A, HON GC, YUE YN, HAN DL, FU Y, PARISIEN M, DAI Q, JIA GF, REN B, PAN T, HE C.  $N^6$ -methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability[J]. *Nature*, 2014, 505(7481): 117-120.
- [10] HUANG HL, WENG HY, SUN WJ, QIN X, SHI HL, WU HZ, ZHAO BS, MESQUITA A, LIU C, YUAN CL, HU YC, HÜTTELMAIER S, SKIBBE JR, SU R, DENG XL, DONG L, SUN M, LI CY, NACHTERGAELE S, WANG YG, et al. Recognition of RNA  $N^6$ -methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation[J]. *Nature Cell Biology*, 2018, 20(3): 285-295.
- [11] JIA GF, FU Y, ZHAO X, DAI Q, ZHENG GQ, YANG Y, YI CQ, LINDAHL T, PAN T, YANG YG, HE C.  $N^6$ -methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(12): 885-887.
- [12] XIAO W, ADHIKARI S, DAHAL U, CHEN YS, HAO YJ, SUN BF, SUN HY, LI A, PING XL, LAI WY, WANG X, MA HL, HUANG CM, YANG Y, HUANG N, JIANG GB, WANG HL, ZHOU Q, WANG XJ, ZHAO YL, et al. Nuclear  $m^6A$  reader YTHDC1 regulates mRNA splicing[J]. *Molecular Cell*, 2016, 61(4): 507-519.
- [13] ROUNDTREE IA, LUO GZ, ZHANG ZJ, WANG X, ZHOU T, CUI Y, SHA JH, HUANG XX, 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.
- [14] ZHANG SC, ZHAO BS, ZHOU AD, LIN KY, ZHENG SP, LU ZK, CHEN YH, SULMAN EP, XIE KP, BÖGLER O, MAJUMDER S, HE C, HUANG SY.  $m^6A$  demethylase ALKBH5 maintains tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells by sustaining FOXM1 expression and cell proliferation program[J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(4): 591-606.e6.
- [15] FEI QL, ZOU ZY, ROUNDREE IA, SUN HL, HE C. YTHDF2 promotes mitotic entry and is regulated by cell cycle mediators[J]. *PLoS Biology*, 2020, 18(4): e3000664.
- [16] PAN YB, FENG HL, ZHOU JL, ZHANG WX, LIU YF, ZHENG JB, WANG JJ, GAO S, LI Y.  $m^6A$  modification enhances the stability of *CDC25A* promotes tumorigenicity of esophagogastric junction adenocarcinoma via cell cycle[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2024, 20(11): 4209-4221.
- [17] PAN YB, GU YM, LIU TH, ZHANG QQ, YANG FC, DUAN LQ, CHENG SW, ZHU XF, XI YB, CHANG XL, YE QN, GAO S. Epitranscriptic regulation of *HRAS* by  $N^6$ -methyladenosine drives tumor progression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(14): e2302291120.
- [18] YANG XW, WEN Y, LIU SM, DUAN LQ, LIU TF, TONG Z, WANG Z, GU YM, XI YB, WANG XD, LUO DS, ZHANG RB, LIU YJ, WANG Y, CHENG TY, JIANG SY, ZHU XF, YANG XH, PAN YB, CHENG SW, et al. *LCDR* regulates the integrity of lysosomal membrane by hnRNP K-stabilized *LAPTM5* transcript and promotes cell survival[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(5): e2110428119.
- [19] XIAO Y, WANG Y, TANG Q, WEI LH, ZHANG X, JIA GF. An elongation- and ligation-based qPCR amplification method for the radiolabeling-free detection of locus-specific  $N^6$ -methyladenosine

- modification[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(49): 15995-16000.
- [20] CHOE J, LIN SB, ZHANG WC, LIU Q, WANG LF, RAMIREZ-MOYA J, DU P, KIM W, TANG SJ, SLIZ P, SANTISTEBAN P, GEORGE RE, RICHARDS WG, WONG KK, LOCKER N, SLACK FJ, GREGORY RI. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis[J]. *Nature*, 2018, 561(7724): 556-560.
- [21] SEPICH-POORE C, ZHENG Z, SCHMITT E, WEN KL, ZHANG ZS, CUI XL, DAI Q, ZHU AC, ZHANG LD, SANCHEZ CASTILLO A, TAN HY, PENG JM, ZHUANG XX, HE C, NACHTERGAELE S. The METTL5-TRMT112 N<sup>6</sup>-methyladenosine methyltransferase complex regulates mRNA translation via 18S rRNA methylation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(3): 101590.
- [22] HE PC, WEI JB, DOU XY, HARADA BT, ZHANG ZJ, GE RQ, LIU C, ZHANG LS, YU XB, WANG S, LYU RT, ZOU ZY, CHEN MJ, HE C. Exon architecture controls mRNA m<sup>6</sup>A suppression and gene expression[J]. *Science*, 2023, 379(6633): 677-682.
- [23] KALOUS J, ALESHKINA D. Multiple roles of PLK1 in mitosis and meiosis[J]. *Cells*, 2023, 12(1): 187.
- [24] HU LL, LIU S, PENG Y, GE RQ, SU R, SENEVIRATHNE C, HARADA BT, DAI Q, WEI JB, ZHANG LS, HAO ZY, LUO LZ, WANG HY, WANG YR, LUO MK, CHEN MJ, CHEN JJ, HE C. m<sup>6</sup>A RNA modifications are measured at single-base resolution across the mammalian transcriptome[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(8): 1210-1219.
- [25] LI JX, CHEN ZJ, CHEN F, XIE GY, LING YY, PENG YX, LIN Y, LUO N, CHIANG CM, WANG HS. Targeted mRNA demethylation using an engineered dCas13b-ALKBH5 fusion protein[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(10): 5684-5694.
- [26] WANG ZX. Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling[J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3327.
- [27] LI L, SUN Y, DAVIS AE, SHAH SH, HAMED LK, WU MR, LIN CH, DING JB, WANG S. Mettl14-mediated m<sup>6</sup>A modification ensures the cell-cycle progression of late-born retinal progenitor cells[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(6): 112596.
- [28] TATEKAWA S, TAMARI K, CHIJIMATSU R, KONNO M, MOTOOKA D, MITSUFUJI S, AKITA H, KOBAYASHI S, MURAKUMO Y, DOKI Y, EGUCHI H, ISHII H, OGAWA K. N(6)-methyladenosine methylation-regulated polo-like kinase 1 cell cycle homeostasis as a potential target of radiotherapy in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 11074.
- [29] WEI XJ, HUO Y, PI JN, GAO YF, RAO S, HE MM, WEI QL, SONG P, CHEN YY, LU DX, SONG W, LIANG JB, XU LJ, WANG HX, HONG GL, GUO YH, SI YM, XU JY, WANG XS, MA YN, et al. METTL3 preferentially enhances non-m<sup>6</sup>A translation of epigenetic factors and promotes tumorigenesis[J]. *Nature Cell Biology*, 2022, 24(8): 1278-1290.
- [30] LUO HY, LIU WJ, ZHANG YL, YANG YQ, JIANG X, WU SQ, SHAO LQ. METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification regulates cell cycle progression of dental pulp stem cells[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1): 159.
- [31] ZHANG CF, CHEN LP, PENG D, JIANG A, HE YR, ZENG YR, XIE C, ZHOU HX, LUO XT, LIU HY, CHEN L, REN J, WANG WG, ZHAO Y. METTL3 and N<sup>6</sup>-methyladenosine promote homologous recombination-mediated repair of DSBs by modulating DNA-RNA hybrid accumulation[J]. *Molecular Cell*, 2020, 79(3): 425-442.e7.
- [32] GHEGHIANI L, LOEW D, LOMBARD B, MANSFELD J, GAVET O. PLK1 activation in late G2 sets up commitment to mitosis[J]. *Cell Reports*, 2017, 19(10): 2060-2073.
- [33] de CÁRCER G, VENKATESWARAN SV, SALGUEIRO L, EL BAKKALI A, SOMOGYI K, ROWALD K, MONTAÑES P, SANCLEMENTE M, ESCOBAR B, de MARTINO A, McGRANAHAN N, MALUMBRES M, SOTILLO R. Plk1 overexpression induces chromosomal instability and suppresses tumor development[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3012.
- [34] KONG D, FARMER V, SHUKLA A, JAMES J, GRUSKIN R, KIRIYAMA S, LONCAREK J. Centriole maturation requires regulated Plk1 activity during two consecutive cell cycles[J]. *Journal of Cell Biology*, 2014, 206(7): 855-865.
- [35] LI PZ, SHI YP, GAO DJ, XU H, ZOU Y, WANG Z, LI WZ. ELK1-mediated YTHDF1 drives prostate cancer progression by facilitating the translation of polo-like kinase 1 in an m<sup>6</sup>A dependent manner[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(16): 6145-6162.