

METTL3对皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖和分化的影响研究

周仁鹏 王琛 傅秀军 王丹茹 盛玲玲 梁奕敏*

(上海交通大学医学院附属第九人民医院, 上海 200025)

摘要 皮肤鳞状细胞癌来源于表皮干细胞的自我更新和分化的平衡失调。近来研究表明, 甲基转移酶3(METTL3)介导的m⁶A修饰在多种癌症研究中成为前沿热点。然而, METTL3在皮肤鳞状细胞癌中的作用尚未报道。该研究目的在于了解METTL3在皮肤鳞状细胞癌发生中的作用。通过构建shRNA敲低皮肤鳞状细胞癌中METTL3, 研究其对WTAP、METTL14以及m⁶A修饰水平的作用。此外, 应用免疫组化、免疫印迹、qPCR以及裸鼠荷瘤实验, 在体外和体内水平研究敲低METTL3对鳞状细胞癌增殖、分化和自我更新的影响。结果显示, METTL3在鳞状细胞癌细胞中表达上调。敲低METTL3能降低METTL14以及m⁶A修饰水平。敲低METTL3促进癌细胞的分化, 并增加IKK α 的表达; 同时抑制癌细胞的增殖和自我更新, 降低自我更新相关基因的表达。综上, 该实验证明了METTL3在调节皮肤鳞状细胞癌细胞分化和自我更新中的关键作用。该研究也为皮肤鳞状细胞癌的治疗提供一个新的靶点。

关键词 METTL3; m⁶A修饰; 皮肤鳞状细胞癌; 肿瘤发生

The Effect of METTL3 on the Proliferation and Differentiation of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma

Zhou Renpeng, Wang Chen, Fu Xiujun, Wang Danru, Sheng Lingling, Liang Yimin*

(Shanghai 9th People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract The cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) originates from epithelial stem cells through the dysregulation of self-renewal and differentiation. Recently, methyltransferase-like 3 (METTL3)-mediated N⁶-methyladenosine (m⁶A) modification emerges as a new frontier of research in several cancers. However, little is known about METTL3 in cSCC. This study is aimed to investigate the role of METTL3 in the tumorigenesis of cSCC. We investigated the effect of METTL3 knock down on the WTAP, METTL3 and METTL14 complex and m⁶A modification levels in cSCC. And we investigated the cell differentiation, proliferation and self-renewal in cSCC *in vitro* and *in vivo*. The results demonstrated that the expression of METTL3 was up-regulated in cSCC cells. METTL3 knock down reduced the METTL14 protein levels and m⁶A modification levels. METTL3 knock down promoted cSCC cell differentiation and increased the expression of IKK α . Also, METTL3 knock down inhibited the cell proliferation and self-renewal and decreased the expression of self-renewal associated genes. In conclusion, we demonstrated a crucial function for METTL3 in regulating cell differentiation and self-renewal in cSCC. Thus, a

收稿日期: 2019-06-10 接受日期: 2019-06-28

国家自然科学基金(批准号: 81671923、81501668)资助的课题

*通讯作者. Tel: 021-23271699-5118, E-mail: acho_liang@hotmail.com

Received: June 10, 2019 Accepted: June 28, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81671923, 81501668)

*Corresponding author. Tel: +86-21-23271699-5118, E-mail: acho_liang@hotmail.com

网络出版时间: 2019-07-16 16:59:07 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1658.032.html>

novel target for cSCC treatment could have been provided.

Keywords METTL3; m⁶A modification; cutaneous squamous cell carcinoma; tumorigenesis

皮肤鳞状细胞癌是表皮角质形成细胞来源的恶性肿瘤。紫外照射、慢性创面或溃疡可导致皮肤鳞状细胞癌的发生发展^[1]。尽管分化良好的皮肤鳞状细胞癌可以治愈,分化不良或未分化的皮肤鳞状细胞癌往往有转移的倾向。

在传统的表观遗传领域, DNA和组蛋白的修饰在皮肤鳞癌的发生中发挥着重要的作用^[2-3]。然而,在RNA水平发生的表观修饰是否同样发挥重要作用目前尚无报道。m⁶A是RNA的腺嘌呤第6位N上发生的甲基化修饰,是真核生物信使RNA中最广泛的修饰方式^[4-5]。在人来源细胞中,已知有7 000以上的信使RNA存在m⁶A位点^[6]。在m⁶A甲基转移酶复合体中,甲基化转移酶3(methyltransferase-like 3, METTL3)发挥功能亚基作用,甲基化转移酶14(METTL14)主要负责识别RNA并与METTL3形成异二聚体^[7-9]。Wilms瘤相关蛋白(Wilms tumor 1 associated protein, WTAP)则发挥调节亚基的作用^[10]。近来研究表明,甲基转移酶复合体除上述3个公认的蛋白外,可能还包含VIRMA和RBM15^[11]。作为甲基转移酶复合体的关键组分, METTL3能影响信使RNA的合成、降解、可变剪切以及转运^[12]。近来研究表明, METTL3在白血病、脑胶质细胞瘤和肝细胞肝癌等多种肿瘤中发挥致癌基因的作用^[13-15]。而METTL3在皮肤鳞状细胞癌中的作用尚无报道。

因此我们构建shRNA敲低皮肤鳞癌细胞中METTL3研究其对皮肤鳞癌细胞增殖和分化的影响,为临床治疗皮肤鳞癌提供新的方向和依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

皮肤鳞状细胞癌细胞系A431和正常人表皮角质形成细胞分别购于中国科学院细胞库(上海)和ATCC。健康4周雌性裸鼠6只,由上海交通大学医学院附属第九人民医院动物中心提供。实验材料包括:胎牛血清(Gibco, 美国)、磷酸盐缓冲液、0.25%胰蛋白酶(Hyclone)、pLKO.1质粒、pCMV-VSVG质粒和pCMV-dR8.9质粒(Addgene)、序列合成(铂尚生物技术有限公司)、嘌呤霉素(Sigma公司)、Trizol(Invitrogen公司)、MTT(Sigma公司)、兔抗鼠抗

体K14(abcam公司)、K10(abcam公司)、loricrin(abcam公司)、结晶紫染色液(上海碧云天生物技术有限公司)、BrdU(Sigma公司)、ECL试剂(Thermofisher公司)。

1.2 转染

METTL3合成的对照shRNA序列和实验组序列如下。空白对照(crambled) shRNA 5'-ACT CAA AAG GAA GTG ACA AGA-3'; METTL3 shRNA1 5'-GCT GCA CTT CAG ACG AAT T-3'; METTL3 shRNA2 5'-GCC AAG GAA CAA TCC ATT GT-3'。上述序列克隆进pLKO.1质粒。上述质粒共同转染293T细胞,获得病毒上清液。再用三组病毒上清液感染人皮肤鳞状细胞癌细胞系A431,并用1 μg/mL的嘌呤霉素培养筛选获得稳转株。

1.3 m⁶A点杂交

细胞总RNA用Trizol抽提后,再用信使RNA纯化试剂盒纯化得到mRNA。40 μg的mRNA用于点杂交分析,用抗m⁶A抗体进行一抗孵育,获得信号用ImageJ软件进行灰度分析。

1.4 BrdU标记

细胞接种于24孔板的玻片上,用10 μmol/L的BrdU孵育2 h。细胞用4%多聚甲醛固定后,用3 mol/L盐酸变性,0.1 mol/L的硼酸钠中和,用PBST洗后进行常规免疫细胞学染色。

1.5 免疫组化

对于免疫细胞学染色,无菌24孔板规格玻片置于24孔板中,并以3 000个细胞每孔的密度接种。对荷瘤组织、瘤组织常规脱水及石蜡包埋后切成5 μm,抗原热修复后进行免疫染色。10%驴血清室温封闭1 h,一抗孵育4 °C过夜。一抗如下:兔抗鼠抗体K14(1:500, abcam)、兔抗鼠抗体K10(1:500, abcam)。PBST清洗后,二抗室温孵育1 h, DAPI染色后于荧光镜下拍摄。

1.6 MTT检测

细胞接种于96孔板,加入20 μL的5 mg/mL MTT孵育4 h,再加入100 μL的DMSO。最终溶液在波长为570 nm处检测吸光度。

1.7 克隆形成实验

细胞以3 000个每35 mm培养皿的密度接种并培养15天。15天后用PBS清洗培养皿并以4%多聚甲

醛固定15 min。固定的细胞用0.1%结晶紫溶液染色。多于50个细胞的细胞团记为克隆。克隆形成能力以克隆形成数目进行比较。

1.8 Western blot检测

细胞裂解后离心得上清。以25 μg的蛋白上样量用10% SDS-PAGE胶进行蛋白电泳,并转至PVDF膜。室温封闭后,一抗4 °C过夜, PBST洗3次,每次10 min,再相应二抗室温孵育1 h, PBST清洗后, ECL发光试剂盒进行蛋白半定量检测。

1.9 实时荧光定量PCR检测

总RNA用Trizol提取后,取500 ng RNA进行反转录得到cDNA,并荧光染料检测细胞中*METTL3*、*METTL14*、*WTAP*、*K14*、*K10*、*Sox2*、*ΔNp63*、*Nrf2*、*Krtdap*、*Notch1*、*c-Myc*、*IKKα*的相应表达情况。引物序列见表1。

1.10 裸鼠荷瘤实验

4周雌性裸鼠饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院动物房,动物实验由上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理委员会批准。2×10⁶鳞癌细胞用150 μL DMEM重悬后,皮下注入裸鼠两侧背部。肿瘤体积用游标卡尺测量并按1/2(长径×短径×短径)公式计算。荷瘤15天后,裸鼠安乐死并取出肿瘤组织进行免疫组化分析。

1.11 TCGA数据库分析

基于TCGA数据库中503个肺鳞状细胞癌和

520个头颈部鳞状细胞癌,应用UALCAN进行分析*METTL3*的表达水平^[16]。

1.12 统计学分析

所有实验重复3次,结果以均数±标准差的方式表达,并用*t*检验进行统计学分析。*P*<0.05为有统计学差异。

2 结果

2.1 *METTL3*在人皮肤鳞癌细胞系中表达上调

我们首先应用qPCR检测人皮肤鳞癌细胞系A431中*METTL3*的水平,结果显示,*METTL3*在鳞癌细胞系A431中表达上调(图1A)。此外,TCGA数据库数据分析显示,*METTL3*在肺鳞癌和头颈部鳞癌中同样表达上调(图1B)。

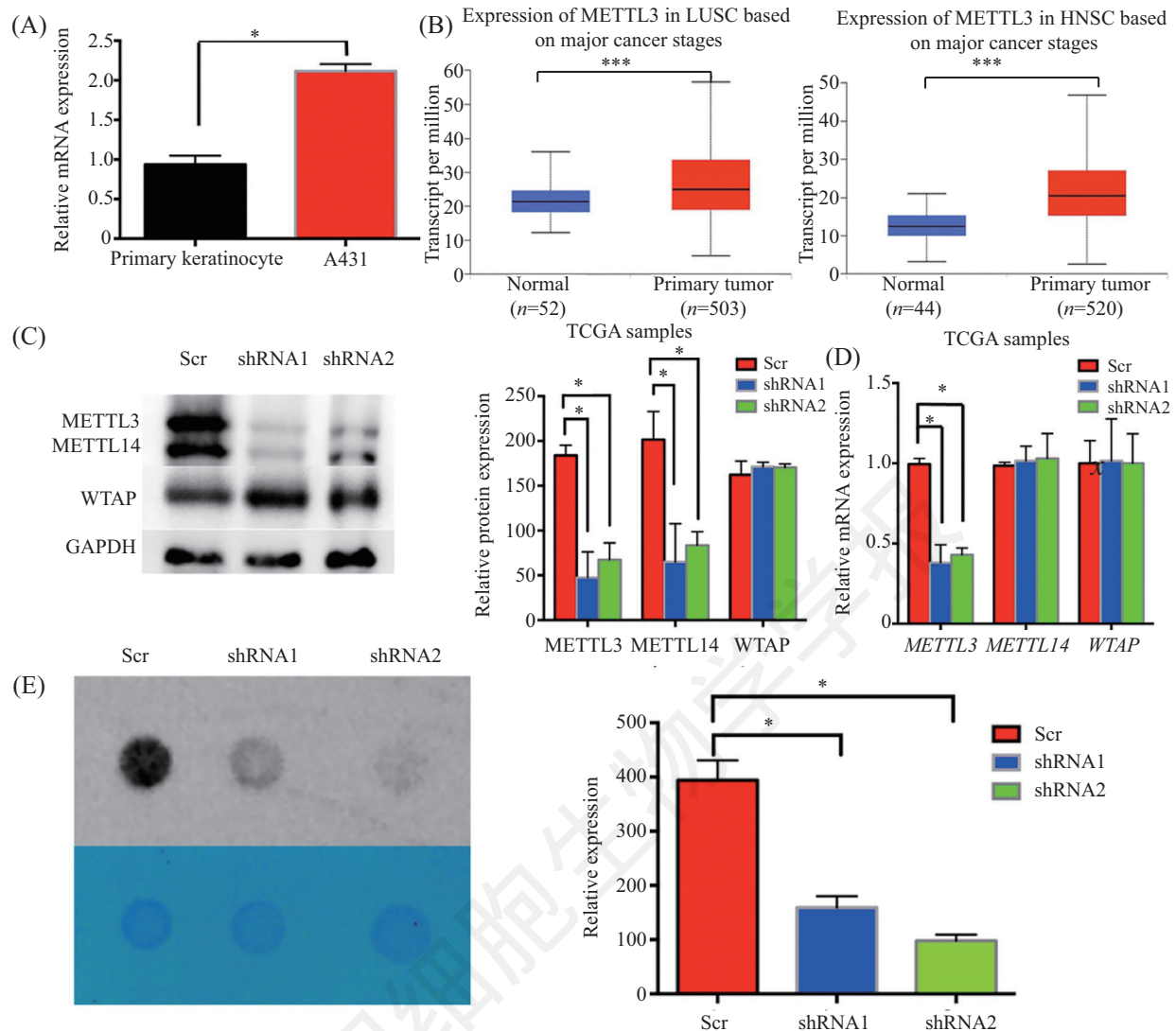
2.2 敲低*METTL3*影响*METTL14*和m⁶A修饰水平

为研究*METTL3*在皮肤鳞癌中作用,我们构建shRNA特异敲低*METTL3*,Western blot和qPCR结果显示,在鳞癌细胞的蛋白和mRNA水平成功敲低*METTL3*(图1C和图1D)。由于*METTL3*和*METTL14*、*WTAP*共同形成甲基转移酶复合体,我们进一步研究敲低*METTL3*对其余二者的影响。Western blot结果显示,敲低*METTL3*能降低*METTL14*的蛋白水平,而对*WTAP*的蛋白水平表达无明显影响(图1C)。而qPCR结果则提示,*METTL14*的mRNA水平并没有变化(图1D),而敲低*METTL3*能显著降低皮肤鳞癌中

表1 引物序列

Table 1 The sequence of primer

引物名称	序列(5'→3')	引物名称	序列(5'→3')
Primer name	Sequence (5'→3')	Primer name	Sequence (5'→3')
GAPDH F	GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC	GAPDH R	TGG TGA AGA CGC CAG TGG A
METTL3 F	TCA GCA TCG GAA CCA GCA AAG	METTL3 R	TCC TGA CTG ACC TTC TTG CTC
METTL14 F	AGA GAA CAA AGG AAC ACT GCC T	METTL14 R	AAT GAA GTC CCC GTC TGT GC
WTAP F	GGC GAG TAC TTC CAC CTT CC	WTAP R	GGT AAC ACT CCC CGT CCT TT
K10 F	GAC AAA GTT CGG GCT CTG GA	K10 R	CCC CTG ATG TGA GTT GCC AT
K14 F	GCC GAC CTG GAA GTG AAG	K14 R	CTG TGG CTG TGA GAA TCT TG
Sox2 F	AAC CAG CGC ATG GAC AGT TA	Sox2 R	CGA GCT GGT CATG GAG TTG T
ΔNp63 F	TGC CCA GAC TCA ATT TAG TGA G	ΔNp63 R	TCT GGA TGG GGC ATG TCT TTG C
Notch1 F	GGC CGT CAG ACT TGG CTC AG	Notch1 R	ACA TCT TGG GAC GCA TCT GG
Krtdap F	GGC CTT TAA CAC CCC GTT CC	Krtdap R	GTT GCG CTC CTC AGT CCT TT
Notch1 F	GGC CGT CAG ACT TGG CTC AG	Notch1 R	ACA TCT TGG GAC GCA TCT GG
c-Myc F	CCC TCC ACT CGG AAG GAC TA	c-Myc R	GCT GGT GCA TTT TCG GTT GT
IKKα F	TGG TAA CTC CTC AAG ATG GGG	IKKα R	GGG GAC AGT GAA CAA GTG ACA



A: A431细胞中METTL3表达上调; B: TCGA数据酷分析显示, METTL3在肺鳞癌和头颈部鳞癌中同样表达上调; C: METTL3敲低降低了METTL3蛋白水平, 不影响WTAP蛋白水平; D: qPCR提示 *METTL3*、*METTL14*和*WTAP*的mRNA水平无变化; E: 敲低METTL3降低皮肤鳞癌中m⁶A的修饰水平。LUSC: 肺鳞癌; HNSC: 头颈部鳞癌; **P*<0.05, ****P*<0.001。

A: the up-regulation expression of METTL3 in A431; B: METTL3 up-regulation was also found in TCGA LUSC and HNSC cohort; C: METTL3, METTL14 and WTAP protein expression were detected after stable knock down of METTL3; D: *METTL3*, *METTL14* and *WTAP* mRNA expression were detected after stable knock down; E: m⁶A levels decreased upon knock down of METTL3. LUSC: lung squamous cell carcinoma; HNSC: head and neck squamous cell carcinomas; **P*<0.05, ****P*<0.001.

图1 人皮肤鳞状细胞癌细胞中METTL3表达上调

Fig.1 Up-regulated expression of METTL3 in human cutaneous SCC (A431) cells

m⁶A的修饰水平(图1E)。

2.3 敲低METTL3促进皮肤鳞癌细胞的分化

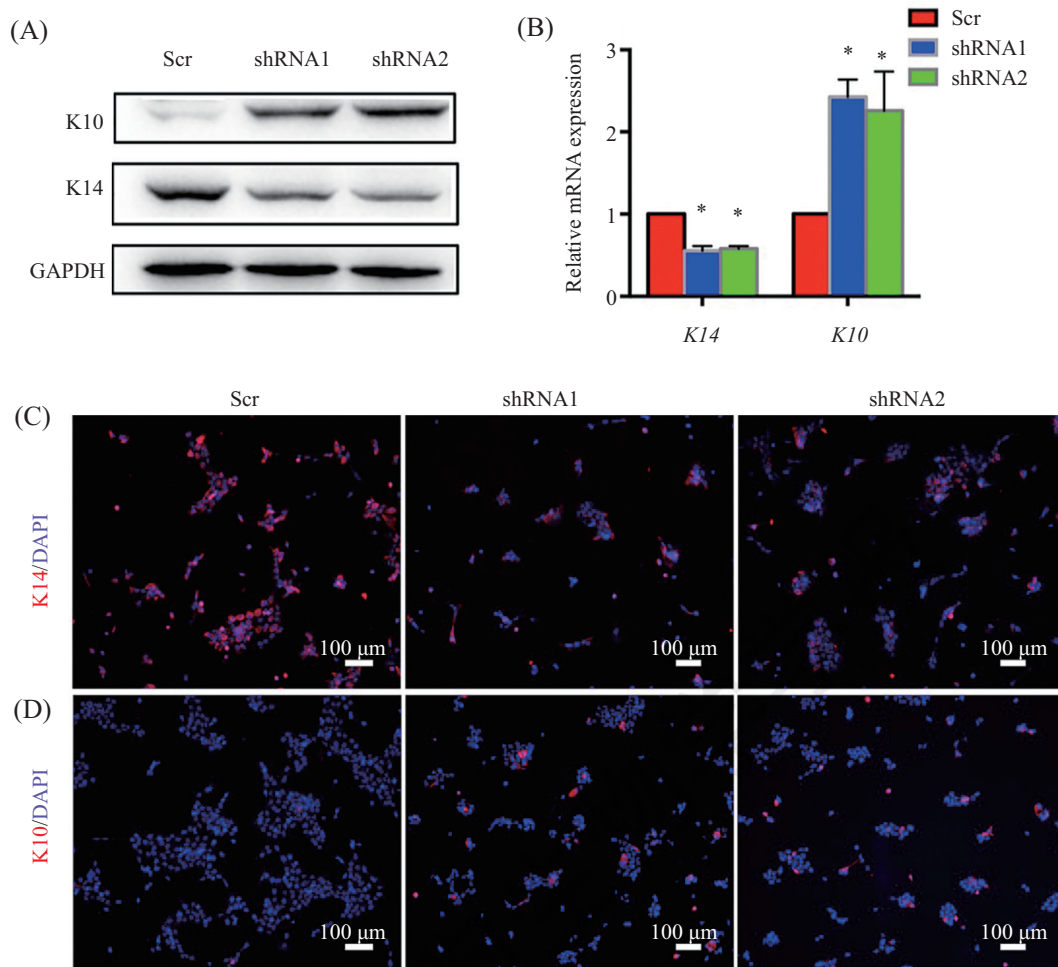
qPCR和Western blot结果显示, 敲低皮肤鳞癌细胞的METTL3显著降低未分化标记物K14的表达(图2A和图2B), 同时增加早期分化标记物K10的表达(图2A和图2B)。细胞免疫学染色结果同样证实, 敲低METTL3能促进皮肤鳞癌细胞的分化(图2C和图2D)。

2.4 敲低METTL3抑制皮肤鳞癌细胞的自我更新为研究METTL3调节皮肤鳞癌细胞增殖作用,

我们应用MTT检测, 结果显示, 敲低METTL3能降低细胞数目(图3A)。BrdU标记染色同样显示敲低METTL3组中BrdU阳性率细胞显著减少(图3B和图3C)。克隆形成实验结果显示, 敲低METTL3的皮肤鳞癌细胞的克隆数目明显减少(图3D和图3E)。

2.5 敲低METTL3调节皮肤鳞癌细胞增殖和分化相关基因的表达

qPCR结果显示, 皮肤鳞癌细胞自我更新相关基因*ΔNp63*、*Sox2*和*Nrf2*在METTL3敲除组中明



A: Western blot显示敲低METTL3诱导K10表达上调而K14表达下降; B: qPCR结果与Western blot一致; C、D: ICC检测显示METTL3敲低促进cSCC细胞分化。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: Western blot detection showed that METTL3 knock down induced K10 up-regulation and suppressed expression of K14; B: qPCR analysis confirmed the Western blot results; C,D: ICC detection confirmed that the METTL3 knockdown promoted cSCC cell differentiation. * $P < 0.05$ compared with scramble group.

图2 敲低METTL3促进皮肤鳞癌细胞分化

Fig.2 Silencing METTL3 promoted cSCC cell differentiation

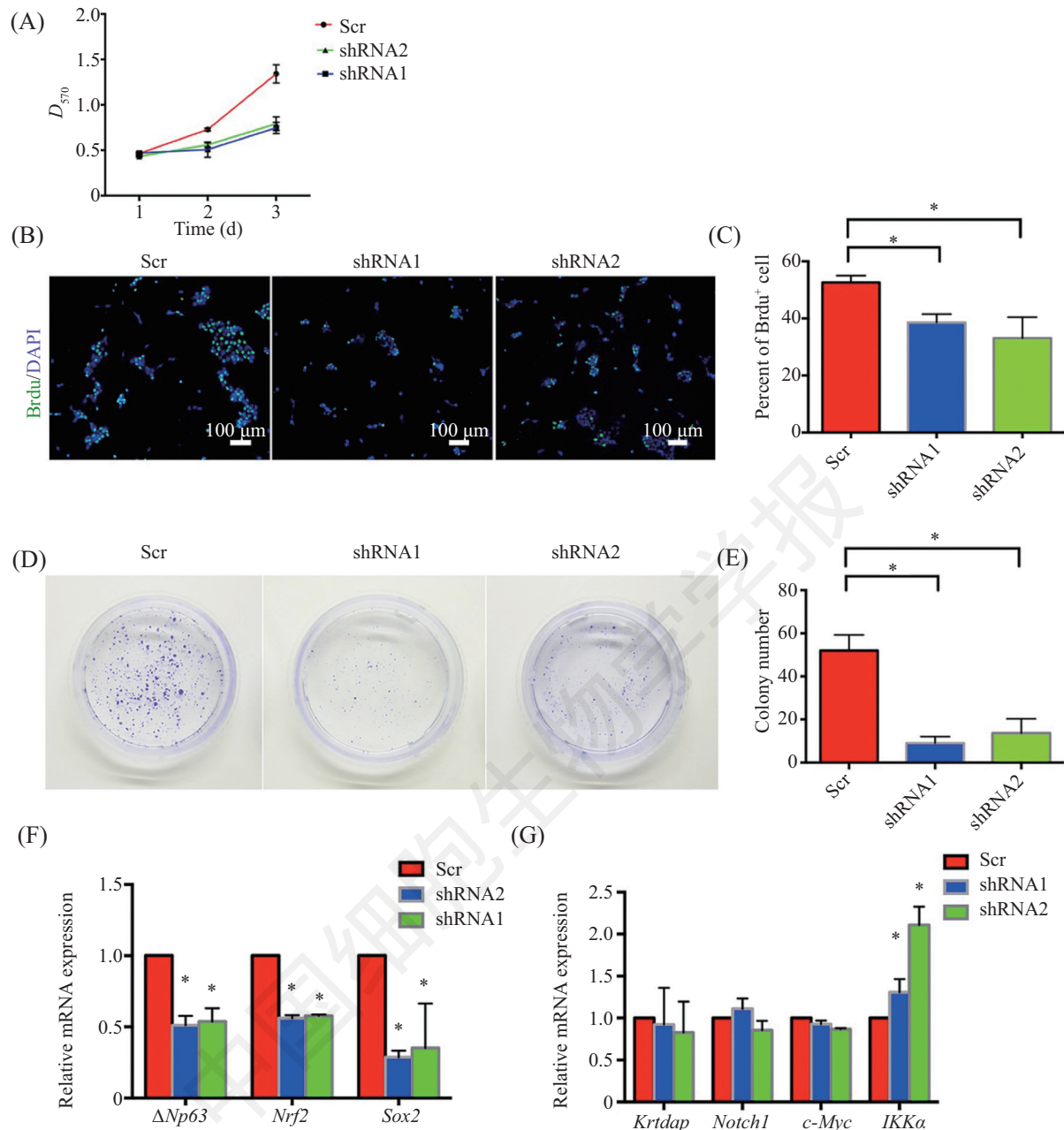
显降低(图3F)。而在皮肤鳞癌分化相关基因中, *IKKα*表达明显增加, *Krt14*、*c-Myc*和*Notch1*的表达没有明显变化(图3G)。

2.6 敲低METTL3抑制皮肤鳞癌细胞体内肿瘤形成

为了研究METTL3在体内对皮肤鳞癌细胞的作用, 我们进行了裸鼠荷瘤实验。敲低METTL3明显减小肿瘤形成的体积和重量(图4A~图4C)。在组织学上, 与对照组相比, 敲低METTL3的鳞癌肿瘤呈现分化良好的形态^[17], 角化程度更高, 细胞质/细胞核比更大(图4D)。为此, 我们进一步进行免疫荧光染色, 结果显示, 敲低METTL3的鳞癌组织中早期分化标志物K10和晚期分化标志物Ioricrin表达明显增加(图4E和图4F)。

3 讨论

本研究发现, METTL3在人皮肤鳞癌细胞中表达上调, 同时TCGA数据库分析显示, METTL3在其他鳞癌组织中同样表达增加。在敲低METTL3后, 本研究发现, 有METTL14的蛋白水平降低, 而不影响WTAP的表达水平。由于METTL3和METTL14在细胞内形成异二聚体, METTL14的下调可能是敲低METTL3后, 由于METTL3蛋白的低表达导致二聚体不稳定最终导致METTL14的蛋白降解。先前有报道在小鼠胚胎干细胞中敲低METTL3导致METTL14蛋白的表达下调^[18]; 而在293T细胞中, 敲低METTL3并不影响METTL14或WTAP的表达^[19]。这些结果提示在不同细胞中, 甲基转移酶复合体中



A: MTT检测细胞增殖情况; B、C: BrdU标记检测细胞增殖情况; D、E: METTL3敲低削弱了细胞克隆形成能力; F: METTL3敲低使得细胞自我更新相关基因表达降低; G: METTL3敲低使得*IKK α* 表达上调, 而*Krt14*、*Notch1*和*c-Myc*表达不受影响。* $P < 0.05$, 与对照组相比。

A: measurement of cell proliferation by MTT assay; B,C: measurement of cell proliferation by BrdU labeling; D,E: knock down of METTL3 impaired colony-formation ability; F: METTL3 knock down led to down-regulation of self-renewal associated genes; G: METTL3 knock down led to up-regulation of *IKK α* (differentiation-associated gene), whereas *Krt14*, *Notch1* and *c-Myc* were not affected. * $P < 0.05$ compared with scramble group.

图3 敲低METTL3抑制皮肤鳞癌细胞增殖和自我更新

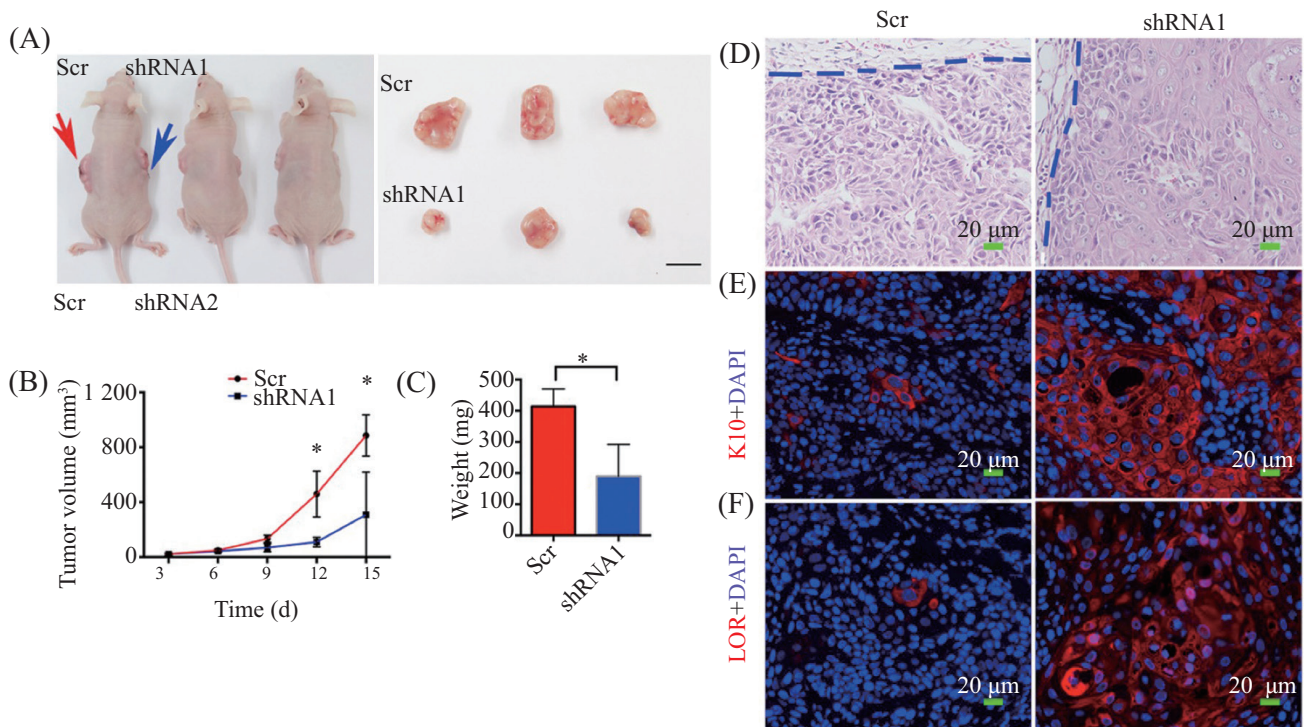
Fig.3 METTL3 knock down inhibited the proliferation and self-renewal of cSCC cells

METTL3和METTL14的相互作用可能存在细胞类型差异性。

我们结果显示, 敲低皮肤鳞癌细胞的METTL3能降低癌细胞的 m^6A 修饰水平。近来有研究表明, METTL3有不依赖于甲基转移酶活性的翻译调控能力^[20], 尽管 m^6A 修饰在诸多肿瘤中发挥重要作用^[13-15],

在皮肤鳞癌细胞中, 癌细胞表型和 m^6A 修饰的直接联系有待进一步研究。

在体外和体内实验中, 敲低METTL3能抑制皮肤鳞癌细胞的增殖和肿瘤形成。Sox2被认为是皮肤鳞状细胞癌的一个肿瘤起始标志物, 在皮肤鳞癌中明显上调^[21-22]。 ΔNp63 同样能促进皮肤鳞癌的发生



A: 裸鼠异种移植肿瘤模型(左)和切除的肿瘤(右)。红箭头表示对照组, 蓝箭头表示METTL3 shRNA1异种移植组; 标尺=1 cm; B: 肿瘤生长曲线; C: 15天的肿瘤重量; D: 肿瘤HE染色; E、F: 分化标记物K10和loricrin在METTL3敲低瘤体中表达显著增高。虚线表示肿瘤边界; * $P < 0.05$, 与scramble组比较。

A: nude mice carrying xenograft tumors (left) and the dissected tumors (right). Red arrow indicates the scrambled-treated xenografts; blue arrow indicates the xenografts in METTL3 shRNA1 group; scale bars=1 cm; B: the curve of tumor growth; C: the tumor weights at day 15; D: the representative H&E staining of tumor. Dotted lines, border of the tumor; E,F: the representative micrographs showed that differentiated markers K10 and loricrin staining were excessively expressed in the METTL3 knock down groups. Dotted lines, border of the tumor; * $P < 0.05$ compared with scramble group.

图4 敲低METTL3抑制体内皮肤鳞癌的肿瘤发生

Fig.4 Knock down of METTL3 inhibited tumorigenesis of CSCC *in vivo*

发展^[23]。Sox2和*ΔNp63*能相互作用,并在皮肤鳞癌细胞中发挥致癌基因作用^[24]。Nrf2作为转录因子,在皮肤鳞癌的发生发展中发挥重要作用^[25]。在本研究中,结果显示,敲低METTL3能降低上述转录因子的表达,提示敲低METTL3抑制皮肤鳞癌的增殖与上述转录因子相关。

在体外和体内实验中,敲低METTL3能促进皮肤鳞癌细胞的分化。尽管*c-Myc*和*Notch1*决定表皮角质形成细胞的分化^[26],但我们没有检测到其表达水平的改变,不过,在敲低METTL3的皮肤鳞癌细胞中,*IKKα*的表达显著上调。*IKKα*与鳞癌细胞分化相关^[27-28],这些结果提示,METTL3可能通过调节*IKKα*从而调节癌细胞的分化。

鳞状细胞癌的发生发展与表皮角质来源的干细胞的自我更新和分化的失衡密切相关。皮肤鳞状细胞癌以角质形成细胞过度的细胞增殖和自我更

新、分化的抑制为特征。为此,本研究主要在敲低METTL3后,对调控表皮鳞状细胞癌细胞自我更新和分化相关的基因表达进行分析(图5),初步探讨了敲低METTL3影响癌细胞的m⁶A修饰水平,从而分别促进癌细胞分化、抑制癌细胞自我更新的作用和机制。

在本研究中,我们发现,敲低皮肤鳞状细胞癌的METTL3能降低METTL14的表达,而METTL3和METTL14都是甲基转移酶复合体中组分,因此敲低METTL3导致的癌细胞表型可能与METTL14降低也有一定关系,我们已开展进一步实验来阐释该问题。

综上,本研究发现,在皮肤鳞癌细胞中敲低METTL3能降低METTL14和m⁶A修饰的水平。*METTL3*在皮肤鳞癌细胞中,通过调节癌细胞的分化、增殖和自我更新,发挥致癌基因的作用。METTL3可能成为临床上治疗皮肤鳞状细胞癌的潜在靶点。

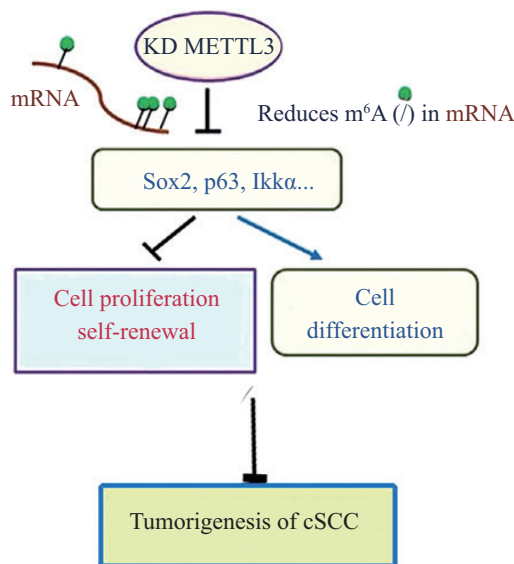


图5 敲低METTL3影响皮肤鳞癌发生发展模式图

Fig.5 The diagram of effects of knock down METTL3 on cSCC tumorigenesis

参考文献 (References)

- Green AC, Olsen CM. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. *Br J Dermatol* 2017; 177(2): 373-81.
- Darr OA, Colacino JA, Tang AL, McHugh JB, Bellile EL, Bradford CR, *et al.* Epigenetic alterations in metastatic cutaneous carcinoma. *Head Neck* 2015;37(7): 994-1001.
- Adhikary G, Grun D, Balasubramanian S, Kerr C, Huang JM, Eckert RL. Survival of skin cancer stem cells requires the Ezh2 polycomb group protein. *Carcinogenesis* 2015; 36(7): 800-10.
- Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation. *Nat Rev Genet* 2014; 15(5): 293-306.
- Niu Y, Zhao X, Wu YS, Li MM, Wang XJ, Yang YG. N6-methyladenosine (m⁶A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2013; 11(1): 8-17.
- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, *et al.* Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature* 2012; 485(7397): 201-6.
- Wang P, Doxtader KA, Nam Y. Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Mol Cell* 2016; 63(2): 306-17.
- Śledź P, Jinek I. Structural insights into the molecular mechanism of the m(6)A writer complex. *Elife* 2016; 14(5): e18434.
- Wang X, Feng J, Xue Y, Guan Z, Zhang D, Liu Z, *et al.* Structural basis of N(6)-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature* 2016; 534(7608): 575-8.
- Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, *et al.* Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res* 2014; 24(2): 177-89.
- Deng X, Su R, Weng H, Huang H, Li Z, Chen J. RNA N6-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives. *Cell Res* 2018; 28(5): 507-17.
- Wu R, Jiang D, Wang Y, Wang X. N⁶-methyladenosine (m⁶A) methylation in mRNA with a dynamic and reversible epigenetic modification. *Mol Biotechnol* 2016; 58(7): 450-9.
- Deng X, Su R, Feng X, Wei M, Chen J. Role of N6-methyladenosine modification in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2018; 48: 1-7.
- Visvanathan A, Patil V, Arora A, Hegde AS, Arivazhagan A, Santosh V, *et al.* Essential role of METTL3-mediated m6A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene* 2018; 37(4): 522-33.
- Chen M, Wei L, Law CT, Tsang FH, Shen J, Cheng CL, *et al.* RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology* 2018; 67(6): 2254-70.
- Chandrashekar DS, Bashel B2, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I, Chakravarthi BVSK, *et al.* UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia* 2017; 19(8): 649-58.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992; 166(4): 375-81.
- Wang Y, Li Y, Toth JI, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2014; 16(2): 191-8.
- Sorci M, Ianniello Z, Cruciani S, Larivera S, Ginistrelli LC, Capuano E, *et al.* METTL3 regulates WTAP protein homeostasis. *Cell Death Dis* 2018; 9(8): 796.
- Lin S, Choe J, Du P, Triboulet R, Gregory RI. The m(6)A methyltransferase METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell* 2016; 62(3): 335-45.
- Siegle JM, Basin A, Sastre-Perona A, Yonekubo Y, Brown J, Sennett R, *et al.* SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat*

- Commun 2014; 5: 4511.
- 22 Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, *et al.* SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 2014; 511(7508): 246-50.
- 23 Candi E, Dinsdale D, Rufini A, Salomoni P, Knight RA, Mueller M, *et al.* TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle* 2007; 6(3): 274-85.
- 24 Watanabe H, Ma Q, Peng S, Adelmant G, Swain D, Song W, *et al.* SOX2 and p63 colocalize at genetic loci in squamous cell carcinomas. *J Clin Invest* 2014; 124(4): 1636-45.
- 25 Kim YR, Oh JE, Kim MS, Kang MR, Park SW, Han JY, *et al.* Oncogenic NRF2 mutations in squamous cell carcinomas of oesophagus and skin. *J Pathol* 2010; 220(4): 446-51.
- 26 Kolly C, Suter MM, Müller EJ. Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals. *J Invest Dermatol* 2005; 124(5): 1014-25.
- 27 Descargues P, Sil AK, Karin M. IKKalpha, a critical regulator of epidermal differentiation and a suppressor of skin cancer. *EMBO J* 2008; 27(20): 2639-47.
- 28 Liu B, Xia X, Zhu F, Park E, Carbajal S, Kiguchi K, *et al.* IKKalpha is required to maintain skin homeostasis and prevent skin cancer. *Cancer Cell* 2008; 14(3): 212-25.