

# RNA m5C甲基化修饰及其检测技术在肿瘤中的研究进展

吴念<sup>1</sup>, 代鑫<sup>2</sup>, 龚建平<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>重庆市第五人民医院, 重庆

<sup>2</sup>重庆医科大学附属第二医院, 重庆

收稿日期: 2022年5月15日; 录用日期: 2022年6月3日; 发布日期: 2022年6月17日

## 摘要

RNA甲基化修饰作为转录后修饰的重要组成部分, 主要包括N6-甲基腺苷(m6A)、5-甲基胞嘧啶(m5C)、N1-甲基腺苷(m1A)三种修饰类型。以RNA亚硫酸氢盐测序(RNA-BisSeq)为代表的单碱基分辨率检测技术的发展推动了RNA m5C甲基化修饰的研究。由甲基转移酶、去甲基化酶以及甲基化识别蛋白三个主要成分构成的RNA m5C甲基化修饰调控网络, 参与包括肿瘤在内的多种疾病的发生发展。本文综述了RNA甲基化修饰的类型、m5C甲基化检测技术的分类与进展及m5C动态调控网络参与肿瘤发生发展的最新研究进展, 旨在为以RNA m5C调控网络为靶点的肿瘤治疗方案提供新思路。

## 关键词

RNA甲基化, 5-甲基胞嘧啶, 检测技术, 肿瘤

# Research Progress of RNA m5C Methylation Modification and Its Detection Technology in Tumors

Nian Wu<sup>1</sup>, Xin Dai<sup>2</sup>, Jianping Gong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>The Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing

<sup>2</sup>The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: May 15<sup>th</sup>, 2022; accepted: Jun. 3<sup>rd</sup>, 2022; published: Jun. 17<sup>th</sup>, 2022

\*通讯作者。

文章引用: 吴念, 代鑫, 龚建平. RNA m5C 甲基化修饰及其检测技术在肿瘤中的研究进展[J]. 临床医学进展, 2022, 12(6): 5407-5414. DOI: 10.12677/acm.2022.126783

## Abstract

As an important part of post transcriptional modification, RNA methylation mainly includes N6-methyladenosine (m6A), 5-methylcytosine (m5C) and N1-methyladenosine (m1A). The development of single base resolution detection technology represented by RNA-BisSeq has promoted the research of RNA m5C methylation modification. The regulatory network of RNA m5C methylation modification, which is composed of methyltransferase, demethylase and methylation recognition protein, is involved in the occurrence and development of a variety of diseases, including tumors. This paper reviews the types of RNA methylation modification, the classification and progress of m5C methylation detection technology and the latest research progress of dynamic regulatory network involved in tumorigenesis and development, in order to provide new ideas for tumor treatment targeting RNA m5C regulatory network.

## Keywords

RNA Methylation, 5-Methylcytosine, Detection Technology, Tumor

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

核苷酸甲基化修饰作为表观遗传调控的重要组成部分, 被证实参与多种基因的表达调控从而影响细胞增殖分化、免疫反应、肿瘤发生等重要生物进程。过去的研究更多地关注丰度较高的 m6A 修饰, 相较之下, 受限于检测技术的限制对丰度较低的 m5C 修饰尤其是发生在 RNA 水平的 m5C 的了解较少。与 m6A 类似, m5C 的甲基化水平通过甲基转移酶和去甲基化酶可逆调节, 其分子功能主要通过不同的识别蛋白结合而实现[1]。近年来随着 RNA 亚硫酸氢盐测序(RNA-BisSeq)等技术的发展, 研究者得以从全转录组水平以单碱基分辨率鉴定 RNA m5C 修饰位点及水平, 为后续 m5C 甲基化修饰参与肿瘤免疫、肿瘤转移等生物学功能探究以及在癌症诊断和治疗中的潜在临床应用提供了技术支持。大量研究揭示了 m5C 在 RNA 加工中的多种分子生物学功能, 如帮助 mRNA 输出、维持 RNA 稳定性、调控翻译进程等。本文总结了 RNA 可逆甲基化修饰类型、m5C 甲基化检测技术的分类与进展以及 RNA m5C 动态调控网络参与肿瘤发生发展的最新研究进展, 为以 RNA m5C 调控网络为靶点的肿瘤治疗方案提供新思路。

## 2. 可逆的 RNA 甲基化修饰类型

真核生物中存在着广泛的核苷酸修饰, 包括甲基化、乙酰化、糖基化等, 目前有超过 100 种发生在 RNA 水平上的修饰, 而 RNA 甲基化修饰约占所有 RNA 修饰的 60%, 并广泛分布于各种类型的 RNA 中 [2]。主要包括 N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)修饰, 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m5C)修饰以及 N1-甲基腺苷(N1-methyladenosine, m1A)修饰三种类型。

### 2.1. N6-甲基腺苷

m6A 修饰是 RNA 中丰度最高甲基化修饰类型, 约占 RNA 甲基化修饰的 80%, 已被证实受到 m6A 修饰调节的 RNA 类别包括 mRNA、lncRNA、rRNA 和 miRNA [3]。在 m6A 甲基转移酶复合物的作用下

由 S-腺苷基甲硫氨酸(SAM)提供的甲基取代腺嘌呤第 6 位氮原子所连接的氢, 形成 N6-甲基腺苷。m6A 修饰现已确定与许多生物过程和疾病密切相关, 如 RNA 代谢相关的基因表达调节、DNA 损伤修复、细胞发育和分化、细胞周期、免疫反应, 以及参与癌症的进展[4]。

## 2.2. 5-甲基胞嘧啶

m5C 修饰在 DNA 中非常常见, 但因为其丰度较低, 在 RNA 中的 m5C 并没有得到足够的重视。但随着高通量测序方法的发展, m5C 被确定广泛分布在各种 RNA 亚型中, 包括 tRNA、rRNA、mRNA、ncRNA 等, 并执行多种功能[5]。m5C 修饰主要集中于 CpG 岛和翻译起始位点下游的区域, 在转录组中具有高度保守、组织特异性和动态调控等特征[6]。催化 RNA 中 m5C 修饰的甲基化酶主要是 NOL1/NOP2/Sun 结构域酶家族(NSUN)以及 tRNA 天冬氨酸甲基转移酶 1 (TRDMT1) [7]。NSUN 家族的主要靶点是 tRNA 的各种胞嘧啶和 mRNA 的 3'非翻译区。NSUN2 作为最著名的 NSUN 家族成员, 可能通过靶向人类鳞状细胞癌和乳腺癌等一系列肿瘤中已知的 tRNA, 参与细胞周期进程和肿瘤生长[8]。

## 2.3. N1-甲基腺苷

m1A 修饰已被证实在哺乳动物细胞和组织中具有广泛的转录组分布, 其生物学效主要是维持 RNA 稳定性和参与 RNA 加工[9]。最近的研究显示, mRNA 上的 m1A 修饰位点主要富集于翻译起始位点附近, 这可能与促进翻译的启动功能相关[10]。除了 mRNA 中的许多靶点外, m1A 还存在于 tRNA 和线粒体基因中, 线粒体 tRNA 中的 m1A 水平在各种人类癌症中发生显著改变, 并与临床预后相关[11]。但作为 mRNA 和 tRNA 中新发现的甲基化修饰类型, 其调控网络及生物学功能仍需进一步研究。

## 3. RNA m5C 甲基化修饰的检测方法

早期的研究普遍使用液相色谱 - 质谱(LC-MS)识别鉴定 m5C, 但由于其敏感性和可靠性的限制, 其对低丰度 m5C 的识别十分有限[12]。近年来随着高通量测序技术的发展即各种衍生技术的出现, 可以在转录组中很好的识别对包括 m5C 在内的各种核苷酸甲基化修饰, 一些特定的 RNA 修饰可以基于不同的衍生方法进行精确或相对量化。检测技术的更新极大的推进了转录组表观遗传学的研究进展, 为 m5C 甲基化修饰参与肿瘤免疫、肿瘤转移等生物学功能探究以及在癌症诊断和治疗中的潜在临床应用提供了技术支持。

m5C 检测技术的最新发展, 包括单碱基分辨率测序: RNA 亚硫酸氢盐测序(RNA bisulfite sequencing, RNA-BisSeq)、Tet 辅助的过氧钨酸盐氧化测序(TET-Assisted peroxotungstate oxidation sequencing, TAWO-seq)、5-氮杂胞苷介导的 RNA 免疫沉淀测序(5-azacytidine mediated RNA immunoprecipitation sequencing, AZA-IP-seq)、甲基化单核苷酸交联免疫沉淀测序(methylation individual nucleotide resolution crosslinking and immunoprecipitation sequencing, miCLIP-seq)和基于 m5C 抗体的测序:m5C RNA 免疫沉淀测序(m5C RNA immunoprecipitation sequencing, m5C-RIP-seq)。根据检测原理可将这些技术分为两大类: 1) 使用 m5C 或 m5C 甲基转移酶特异性抗体进行基于免疫沉淀的测序; 2) 使用亚硫酸氢盐或过钨酸盐进行化学依赖性测序。

### 3.1. 基于免疫沉淀的测序

#### 3.1.1. m5C-RIP-seq

与 m6A 的甲基化测序类似, m5C-RIP-seq 使用特异性识别 m5C 修饰位点的抗体, 与含有 m5C 位点的 RNA 片段结合, 利用抗体亲和层析富集含有 m5C 的 RNA 片段进行文库构建和测序[13]。虽然 m5C-RIP-seq 能够很好地识别高甲基化水平的 RNA 片段, 但由于抗体富集的 RNA 片段长约 100~150 nt,

与其他单核苷酸分辨率的测序方法相比, 峰的分辨率要低得多, 并且不能得到 m5C 在转录组中的精确位置和绝对水平。此外, 由于统计分析对覆盖率低的区域相对不敏感, 因而 m5C RIP-seq 无法识别低丰度 mRNA 上的甲基化。

### 3.1.2. miCLIP-seq

另一种基于抗体的测序技术, miCLIP-seq, 使用针对 NSUN2 的抗体, 而不是 m5C 抗体, 特异性捕获 NSUN2 靶向 RNA 片段。由于 NSUN2 氨基酸序列中 271 位(C271)的半胱氨酸对甲基化 RNA 的释放至关重要, Hussain 等人通过紫外线交联过度表达的突变 NSUN2, 以获得具有强共价键的 RNA-蛋白质复合物, 从而在 RT-PCR 期间诱导截断或突变。通过在测序数据中识别这些单核苷酸突变或截断, 从而定位 m5C 修饰位点[14]。目前, 通过针对 NSUN2 的免疫沉淀, Bansal 及其同事能够成功地检测 RNA 中 NSUN2 介导的 m5C 修饰[15], 这也可以应用于其他 RNA m5C 甲基转移酶。但目前的研究结果表明, NSUN2 仅催化部分 RNA 亚群中的 m5C 形成, 因此使用针对单一 RNA m5C 甲基转移酶的抗体无法得到全面的转录组学图谱。此外, 该技术需要 m5C 释放结构域突变的 NSUN2 的过度表达, 这将造成异常的细胞内环境并将应用局限与体外培养的细胞[16]。

### 3.1.3. AZA-IP-seq

AZA-IP-seq 技术通过在细胞生长期间将核苷酸类似物 5-氮杂胞苷(5-azaC)引入新合成的 RNA 中以替换胞嘧啶, 利用 5-azaC 和甲基转移酶之间形成可逆共价键的特性, 然后使用甲基转移酶抗体通过免疫沉淀来拉下其靶向 RNA [17]。结合高通量测序, 来确定精确的 m5C 位点。然而, 5-azaC 对培养细胞和动物都具有高毒性, 并诱导细胞发生应激反应, 可能导致细胞代谢和功能异常。与 miCLIP-seq 类似, 该技术仅能检测针对单一 RNA m5C 甲基转移酶催化的部分 RNA 亚群中的 m5C 位点, 得到不全面的转录组学图谱。同时, 其检测结果取决于 5-azaC 的引入效率, 导致对低丰度 RNA m5C 位点的敏感性降低[18]。

## 3.2. 化学依赖性测序

### 3.2.1. RNA-BisSeq

RNA-BisSeq 是目前最成熟应用最广泛的 RNA m5C 甲基化修饰的检测方法。其检测原理依赖于亚硫酸氢盐处理后对非甲基化胞嘧啶的化学脱氨作用, 将非甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶, 并在后续 PCR 过程中转化为胸腺嘧啶。结合生物信息学分析, 通过检测未转化的胞嘧啶来检测 m5C 修饰位点, 同时, 还可以通过计算未转化的胞嘧啶比率来估算 m5C 甲基化水平[19]。该技术在单核苷酸分辨率和甲基化水平的精确预测方面具有显著优势, 且避免了其他技术中的一些缺点, 如 m5C RIP 中对 RNA 丰度的需求, 5-氮杂胞苷在 AZA-IP 中对细胞功能和代谢的影响, 或在 miCLIP 中突变体 NSUN2 过度表达。因此, RNA-BisSeq 鉴定的体外亚硫酸氢盐处理样品的 m5C 图谱应反映转录组甲基化的真实状态。该技术的缺陷主要存在于两方面。首先, RNA BisSeq 无法很好地区分未转化的胞嘧啶是来自 m5C 或是 5-羟甲基胞嘧啶(hm5C), 尽管 hm5C 的丰度很低。其次, 由于亚硫酸氢盐只能转化单链胞嘧啶, 一些未转化的胞嘧啶可能来源于部分 RNA 形成双链结构引起的不完全胞嘧啶-尿嘧啶转化, 由此产生的未转化胞嘧啶将被错误地识别为甲基化胞嘧啶。

### 3.2.2. TAWO-seq

为了弥补 RNA-BisSeq 无法区分 m5C 和 hm5C 的不足, 实现在单碱基分辨率下直接识别 m5C 和 hm5C, 研究者开发了 TAWO-seq 技术, 在 TET 脱甲基酶的作用下先将 m5C 转化为 hm5C, 使用过氧钨酸氧化 hm5C 为三羟甲基化胸腺嘧啶(thT), 再利用热稳定性 II 组内含子逆转录酶(TGIRT)在 cDNA 合成期间将 thT 转化为 T, 而原始的 hm5C 可以用  $\beta$ -葡萄糖基转移酶( $\beta$ -GT)标记, 以防止转化为 thT, 进而实现 m5C 与

hm5C 的区分。以专门检测 hm5C 修饰位点[20]。由于 TAWO-seq 仅将修饰的胞嘧啶(原始 m5C)转化为 thT, 因此大量的常规胞嘧啶不会受到影响, 这表明 TAWO-seq 与 RNA0-BisSeq 相比, 有可能将假阳性问题降至最低。然而, 化学转化效率仍然是 RNA-BisSeq 和 TAWO-seq 的关键, 这将直接影响假阳性率, 也是未来技术改进的方向。

## 4. RNA m5C 甲基化调控网络及其在肿瘤中的研究进展

近年来, RNA m5C 甲基化修饰被发现与包括肿瘤在内的多种疾病有关, 其参与肿瘤发生发展的分子机制以及与临床预后之间的关系受到越来越多的关注。甲基化酶与去甲基化酶共同参与多种 RNA m5C 的动态调节, m5C 修饰位点被下游的甲基化识别蛋白识别并结合最终发挥其生物学功能。阐明复杂调控网络中的分子生物学机制将为临床肿瘤治疗提供潜在的治疗靶点。

### 4.1. 甲基化酶及其在肿瘤中的研究进展

目前已知有包括 NOL1/NOP2/Sun RNA 结构域酶家族(NOP2/Sun domain family, NSUN)、DNA 甲基转移酶 2 (DNA methyltransferase-2, DNMT2)在内的 10 余种甲基转移酶参与 RNA m5C 修饰。这些酶利用 SAM 作为甲基供体催化 RNA 的 m5C 修饰。虽然大多数 RNA 甲基转移酶已被证明在 rRNA, tRNA, 线粒体 tRNA 和增强子 RNA 的甲基化中发挥作用, 但在 mRNAs、miRNAs 和 tRNAs 的甲基化中发挥主要作用的是 NSUN2 [21]。RNA 甲基转移酶的异常表达, 在癌症的发展和发病机制中发挥重要作用。已有研究表明, 在肺鳞状细胞癌患者中 NSUN2 酶家族的异常表达与患者的临床病理特征及生存率相关, 并参与调节肿瘤免疫微环境[22]。DNMT3A 的表达水平与胰腺癌患者的临床分级显著相关, 其低表达与患者的不良预后相关[23]。

甲基化酶参与肿瘤发生发展的分子机制表现出组织和环境依赖性, 在不同的肿瘤类型中显示出不同的 RNA 底物偏好, 但表现出一致的致癌倾向。tRNA 是 NSUN2 酶家族的主要作用靶点。小鼠肿瘤细胞中 NSUN2 的缺失导致 tRNA 的低甲基化水平, 并造成 tRNA 对血管生成素的敏感性增加, 从而导致 tRNA 片段化的累积[24]。片段化的 tRNA 在肿瘤中的异常增加中可能表明其在肿瘤发生发展中具有重要的调节功能, 但目前对其功能的理解仍处于起步阶段。有研究表明, tRNA 的 5'片段可以通过调节翻译起始因子与翻译起始复合物的结合来调控翻译的进程, 有利于细胞启动应激反应[25]。在 NSUN2 缺乏的小鼠肿瘤细胞中, 核糖体分析数据也显示与应激反应途径相关的基因翻译增加, NSUN2 的缺乏使肿瘤干细胞处于自我更新所必需的未分化状态并引起其对应激的敏感性增加[26]。同时, NSUN2 缺陷的皮肤肿瘤干细胞对 5-氟尿嘧啶和顺铂等化疗药物更加敏感, 而使用血管生成素抑制剂处理后可降低其对化疗药物的敏感性, 将 NSUN2 抑制剂等片段化 tRNA 生成增强剂与化疗药物联合运用, 可增强对肿瘤干细胞杀伤作用[27]。这些研究表明, 肿瘤干细胞与肿瘤细胞需要严格控制 tRNA 甲基化水平及片段化 tRNA 的累积, 以调节对应激的应答和维持肿瘤体积。而 tRNA 甲基化抑制剂作为有效的肿瘤干细胞对化疗药物的增敏剂, 其与多种化疗药物的联用将为肿瘤化疗开辟新的道路。在 NSUN2 敲除的小鼠模型中, DNMT2 的缺失通过降低 tRNA 甲基化水平导致翻译保真度降低从而影响特定的 mRNA [28]。这对 tRNA 修饰参与对细胞增值和分化的影响提供了更多的支持。目前甲基化酶缺失导致的 tRNA 片段化增加造成的潜在生物学影响仍然完全未被探索, 还需要更深入的研究去阐明 tRNA 片段丰度对肿瘤细胞表型的影响。

在许多研究中, NSUN2 的过度表达被证明可以通过调控抑癌基因或原癌基因单一转录本的命运, 从而促进增殖[29]。一项研究显示, NSUN2 介导的原癌基因 - 肝素结合生长因子(heparin binding growth factor, HDGF)的 mRNA 3'UTR 处异常甲基化可通过与 YBX1 相互作用增加其稳定性[30]。但目前仍无法明确 NSUN2 在肿瘤发生发展中的潜在作用是否由 mRNA 修饰介导。

## 4.2. 去甲基化酶及其在肿瘤中的研究进展

可逆的甲基化修饰是动态调节的基础,目前对 m5C 甲基转移酶已有广泛研究,但对去甲基化酶的分类及定义仍有争论。TET 家族蛋白,包括 TET1、TET2 和 TET3,最初被鉴定为 DNA 双加氧酶。Fu 等人的研究发现 TETs 也可以作为 RNA 去甲基酶发挥作用, TETs 在  $\alpha$ -酮戊二酸及铁离子的协同下催化 m5C 转化为 hm5C, hm5C 作为 m5C 去甲基化过程中的中间体,其进一步被 TETs 转化为 5-氟胞嘧啶(5-fC)和 5-羧基胞嘧啶(5-caC),最后通过碱基切除修复途径(BER)最终将该位点转化为胞嘧啶[31]。因为 TETs 诱导的去甲基化的本质是通过促进后续氧化来取代修饰,所以对 TETs 的“m5C 清除剂”的功能定义仍有争议。

hm5C 也被发现在多种肿瘤中发生改变, TETs 的突变或异常表达与某些恶性肿瘤高度相关。例如, TET2 突变与淋巴瘤细胞白血病和髓系白血病相关[32]。TET1 在胶质母细胞瘤中表达上调[33],而 TET3 在胶质瘤中的表达受到表观遗传学修饰的抑制[34]。虽然去甲基化酶参与肿瘤进程普遍被认为与 DNA 去甲基化或羟甲基化异常有关,但 TETs 也被证明会将 RNA 中的 m5C 氧化为 hm5C,这表明去甲基化酶也可能通过调节 RNA 的去甲基化过程从而调控肿瘤的进程。

## 4.3. 甲基化识别蛋白及其在肿瘤中的研究进展

RNA 发生 m5C 修饰后的生物学功能实现,需要甲基化识别蛋白特异性地识别并结合到修饰位点,引发后续的生物进程调节。ALYREF 是第一个在细胞核中识别出的 mRNA m5C 识别蛋白,其活性受到靶 mRNA 甲基化状态的影响,作为 mRNA 出口蛋白复合物的一部分参与 mRNA 由胞核向胞质的运输[35]。在 HeLa 细胞中敲除 ALYREF 导致 m5C 修饰的 mRNA 在胞核中保留增加,这表明 m5C 介导的 mRNA 输出依赖于 ALYREF [33]。与 ALYREF 不同, YBX1 被鉴定为胞质中的 mRNA m5C 识别蛋白,通过 YBX1 冷休克结构域中的残基 Trp45 识别和结合 m5C 修饰的 mRNA [36]。

有研究发现 17 号染色体上 ALYREF 基因的异常拷贝与神经母细胞瘤患者的 MYCN 富集相关[37]。另一项研究表明, ALYREF 与丙酮酸激酶同工酶 M2 (PKM2) mRNA 的 m5C 修饰位点结合稳定其 mRNA,通过 PKM2 介导的糖酵解促进膀胱癌细胞增殖[38]。但目前仍无研究表明 ALYREF 通过其识别 m5C 修饰位点参与 mRNA 转运的功能参与癌症进展。

## 5. 总结与展望

m5C 作为三种 RNA 甲基化修饰中丰度较低的类型,在检测技术的进步下其修饰位点已被鉴定广泛存在于多种核苷酸分子上,最新的 TAWO-seq 技术已能在单碱基分辨率下区分 m5C 和 hm5C,但其检测能力仍受限于过钨酸盐的氧化效率,同时  $\beta$ -GT 对原始 hm5C 的标记效率也会影响其假阳性率。我们仍在期待方法学的进步为研究者带来更精确全面的转录组 m5C 修饰图谱。

m5C 动态调控网络中复杂的分子生物学机制,参与人类肿瘤的发生、增殖、转移等生物进程。鉴于 RNA m5C 修饰展现出的多肿瘤相关性,通过修改关键 RNA m5C 甲基化酶(如 NSUN2)的基因序列,从而减少 RNA 甲基化水平以干预肿瘤进展的基因治疗具有一定的前景。但考虑到基因治疗的非特异性,基于分子机制开发特异的抑制剂以降低特定 RNA m5C 甲基化酶的活性并逆转肿瘤的进展,具有更好的安全性。抑制 m6A 甲基化酶的药物已用于癌症治疗。而目前尚未开发出特异性靶向 RNA m5C 甲基转移酶的抑制剂。但有研究表明,现有的使用胞嘧啶化学类似物用于干扰 DNA m5C 的几种药物,其同样可能会干扰 RNA 甲基化[39]。Lyko 等人的研究中,用氮杂胞苷可有效降低肿瘤细胞中 DNMT2 介导的 tRNA m5C 修饰水平,并抑制肿瘤细胞的增殖[40]。但这类药物潜在的非选择性影响多个靶点的甲基化,具有潜在的未知风险。此外,影响 RNA m5C 调控网络的上游分子也是具有潜力的治疗靶点。例如,极光激酶 B 可

调控 NSUN2 的磷酸化并降低 RNA 甲基化水平[41]。为了全面了解 RNA m5C 修饰在肿瘤发生发展中的功能并开发其靶向药物应用于临床治疗,仍需要对其修饰位点和功能途径进行更多的研究。

## 参考文献

- [1] Nombela, P., Miguel-López, B., Blanco, S., *et al.* (2021) MODOMICS: A Database of RNA Modification Pathways. 2021 Update. *Molecular Cancer*, **20**, 18. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01263-w>
- [2] Boccaletto, P., Stefaniak, F., Ray, A., *et al.* (2022) MODOMICS: A Database of RNA Modification Pathways. 2021 Update. *Nucleic Acids Research*, **50**, 231-235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1083>
- [3] Roundtree, I.A., Evans, M.E., Pan, T., *et al.* (2017) Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*, **169**, 1187-1200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.045>
- [4] Wang, T.Y., Kong, S., Tao, M., *et al.* (2020) The Potential Role of RNA N6-Methyladenosine in Cancer Progression. *Molecular Cancer*, **19**, 88. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01204-7>
- [5] Bohnsack, K., Höbartne, C. and Bohnsack, M. (2019) Eukaryotic 5-methylcytosine (m5C) RNA Methyltransferases: Mechanisms, Cellular Functions, and Links to Disease. *Genes*, **10**, 102. <https://doi.org/10.3390/genes10020102>
- [6] Song, J., Zhai, J.J., Bian, E., *et al.* (2018) Transcriptome-Wide Annotation of m5C RNA Modifications Using Machine Learning. *Frontiers in Plant Science*, **9**, Article No. 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00519>
- [7] Motorin, Y., Lyko, F. and Helm, M. (2009) 5-methylcytosine in RNA: Detection, Enzymatic Formation and Biological Functions. *Nucleic Acids Research*, **38**, 1415-1430. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1117>
- [8] Frye, M., Drggani, I., Chin, S.F., *et al.* (2010) Genomic Gain of 5p15 Leads to Over-Expression of Misu (NSUN2) in Breast Cancer. *Cancer Letters*, **289**, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.08.004>
- [9] Xiong, X.S., Li, X.Y., Yi, C.Q., *et al.* (2018) N1-methyladenosine Methylome in Messenger RNA and Non-Coding RNA. *Current Opinion in Chemical Biology*, **45**, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.06.017>
- [10] Dominissini, D., Nachtergale, S., Sharon, M.M., *et al.* (2016) The Dynamic N1-Methyladenosine Methylome in Eukaryotic Messenger RNA. *Nature*, **530**, 441-446. <https://doi.org/10.1038/nature16998>
- [11] Idaghdour, Y. and Hodgkinson, A. (2017) Integrated Genomic Analysis of Mitochondrial RNA Processing in Human Cancers. *Genome Medicine*, **9**, 36. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0426-0>
- [12] Limbach, P.A. and Paulines, M.J. (2018) Going Global: The New Era of Mapping Modifications in RNA. *WIREs RNA*, **8**, 1. <https://doi.org/10.1002/wrna.1367>
- [13] Cui, X.A., Liang, Z., Shen, L.S., *et al.* (2017) 5-Methylcytosine RNA Methylation in Arabidopsis Thaliana. *Molecular Plant*, **9**, 13. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.013>
- [14] Hussain, S., Sajini, A.A., Blanco, S., *et al.* (2013) NSun2-Mediated Cytosine-5 Methylation of Vault Noncoding RNA Determines Its Processing into Regulatory Small RNAs. *Cell Reports*, **4**, 255-261. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.029>
- [15] Haute, L.V., Lee, S.Y., McCann, B.J., *et al.* (2019) NSUN2 Introduces 5-Methylcytosines in Mammalian Mitochondrial tRNAs. *Nucleic Acids Research*, **47**, 8720-8733. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz559>
- [16] Trixl, L. and Lusser, A. (2019) The Dynamic RNA Modification 5-methylcytosine and Its Emerging Role as an Epi-transcriptomic Mark. *WIREs RNA*, **10**, 1510. <https://doi.org/10.1002/wrna.1510>
- [17] Khoddami, V. and Cairns, B.R. (2014) Transcriptome-Wide Target Profiling of RNA Cytosine Methyltransferases Using the Mechanism-Based Enrichment Procedure Aza-IP. *Nature Protocols*, **9**, 337-361. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.014>
- [18] Khoddami, V. and Cairns, B.R. (2013) Identification of Direct Targets and Modified Bases of RNA Cytosine Methyltransferases. *Nature Biotechnology*, **31**, 458-464. <https://doi.org/10.1038/nbt.2566>
- [19] Schaefer, M. (2013) RNA 5-Methylcytosine Analysis by Bisulfite Sequencing. *Methods in Molecular Biology*, **1870**, 237-248.
- [20] Yuan, F., Bi, Y., Paulina, S.Z., *et al.* (2019) Bisulfite-Free and Base-Resolution Analysis of 5-Methylcytidine and 5-hydroxymethylcytidine in RNA with Peroxotungstate. *ChemComm*, **55**, 2328-2331. <https://doi.org/10.1039/C9CC00274J>
- [21] Schumann, U., Zhang, H.N., Sibbritt, T., *et al.* (2020) Multiple Links between 5-methylcytosine Content of mRNA and Translation. *BMC Biology*, **18**, Article No. 40. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00769-5>
- [22] Pan, J., Huang, Z.D., Xu, Y.Q., *et al.* (2021) m5C RNA Methylation Regulators Predict Prognosis and Regulate the Immune Microenvironment in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, **11**, Article ID: 657466. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.657466>

- [23] Yu, X., Zhang, Q.Y., Gao, F., *et al.* (2021) Predictive Value of m5C Regulatory Gene Expression in Pancreatic Adenocarcinoma. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 17529. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96470-w>
- [24] Blanco, S., Dietmann, S., Flores, J.V., *et al.* (2014) Aberrant Methylation of tRNAs Links Cellular Stress to Neuro-Developmental Disorders. *EMBO Journal*, **33**, 2020-2039. <https://doi.org/10.15252/embj.201489282>
- [25] Ivanov, P., Emara, M.M., Villen, J., *et al.* (2011) Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Molecular Cell*, **43**, 613-623. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.022>
- [26] Blanco, S., Bandiera, R., Popis, M., *et al.* (2016) Stem Cell Function and Stress Response Are Controlled by Protein Synthesis. *Nature*, **534**, 335-340. <https://doi.org/10.1038/nature18282>
- [27] Tuorto, F., Herbst, F., Alerasool, N., *et al.* (2015) The tRNA Methyltransferase Dnmt2 Is Required for Accurate Polypeptide Synthesis during Haematopoiesis. *EMBO Journal*, **34**, 2350-2362. <https://doi.org/10.15252/embj.201591382>
- [28] Wang, W.G. (2016) mRNA Methylation by NSUN2 in Cell Proliferation. *WIREs RNA*, **7**, 838-842. <https://doi.org/10.1002/wrna.1380>
- [29] Chen, X., Li, A., Sun, B.F., *et al.* (2019) 5-Methylcytosine Promotes Pathogenesis of Bladder Cancer through Stabilizing mRNAs. *Nature Cell Biology*, **21**, 978-990. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0361-y>
- [30] Fu, L.J., Guerrero, C.R., Zhong, N., *et al.* (2014) Tet-Mediated Formation of 5-Hydroxymethylcytosine in RNA. *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 11582-11585. <https://doi.org/10.1021/ja505305z>
- [31] Li, W. and Xu, L. (2019) Epigenetic Function of TET Family, 5-Methylcytosine, and 5-Hydroxymethylcytosine in Hematologic Malignancies. *Oncology Research and Treatment*, **42**, 309-318. <https://doi.org/10.1159/000498947>
- [32] Takai, H., Masuda, K., Sato, T., *et al.* (2014) 5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting the CHTOP-Methylosome Complex. *Cell Reports*, **9**, 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.071>
- [33] Carella, A., Tejedor, J.R., García, M.G., *et al.* (2020) Epigenetic Downregulation of TET3 Reduces Genome-Wide 5hmC Levels and Promotes Glioblastoma Tumorigenesis. *International Journal of Cancer*, **146**, 373-387. <https://doi.org/10.1002/ijc.32520>
- [34] Yang, X., Yang, Y., Sun, B.F., *et al.* (2017) 5-Methylcytosine Promotes mRNA Export—NSUN2 as the Methyltransferase and ALYREF as an m5C Reader. *Cell Research*, **27**, 606-625. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.55>
- [35] Dominissini, D. and Rechavi, G. (2017) 5-Methylcytosine Mediates Nuclear Export of mRNA. *Cell Research*, **27**, 717-719. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.73>
- [36] Yang, Y., Wang, L., Han, X., *et al.* (2019) RNA 5-Methylcytosine Facilitates the Maternal-to-Zygotic Transition by Preventing Maternal mRNA Decay. *Molecular Cell*, **75**, 1188-1202. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.033>
- [37] Nagy, Z., Seneviratne, J.A., Kanikevich, M., *et al.* (2021) An ALYREF-MYCN Coactivator Complex Drives Neuroblastoma Tumorigenesis through Effects on USP3 and MYCN Stability. *Nature Communications*, **2**, Article No. 1881. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22143-x>
- [38] Wang, J.Z., Zhu, W., Han, J., *et al.* (2021) The Role of the HIF-1 $\alpha$ /ALYREF/PKM2 Axis in Glycolysis and Tumorigenesis of Bladder Cancer. *Cancer Communications*, **41**, 560-575. <https://doi.org/10.1002/cac2.12158>
- [39] Cheng, J.X., *et al.* (2018) RNA Cytosine Methylation and Methyltransferases Mediate Chromatin Organization and 5-Azacytidine Response and Resistance in Leukaemia. *Nature Communications*, **9**, Article No. 1163. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03513-4>
- [40] Schaefer, M., Hagemann, S., Hanna, K., *et al.* (2009) Azacytidine Inhibits RNA Methylation at DNMT2 Target Sites in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, **69**, 8127-8132. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0458>
- [41] Sakita-Suto, S., Kanda, A., Suzuki, F.S., *et al.* (2007) Aurora-B Regulates RNA Methyltransferase NSUN2. *Molecular Biology of the Cell*, **18**, 1107-1117. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-11-1021>