

GUILHERME HENRIQUE GATTI DA SILVA

Estudo funcional da proteína RNF-113A (ZNF183) no spliceossomo em células de mamíferos

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pereira Coltri

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

RESUMO

Silva GHG. Estudo funcional da proteína RNF-113A (ZNF183) no spliceossomo em células de mamíferos [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O *splicing* do pré- RNAm é o processo pelo qual os *introns* são removidos e os *exons* são unidos para produzir um RNAm maduro. Esse processo é catalisado por um complexo denominado spliceossomo. RNF113A é uma proteína detectada em complexos pré- e pós-catalíticos. Neste trabalho analisamos a participação de RNF113A no spliceossomo de mamíferos e suas interações com outros componentes do spliceossomo. Nossos resultados mostraram que a super- expressão de RNF113A em células HEK293T aumentam o nível dos U-RNAs U1, U2, U5 e U6 e de PRPF19. A imunoprecipitação de RNF113A revelou maior concentração de PRPF19, hBRR2 e SF3b2. Além disso, observamos maior quantidade dos U-RNAs U5 e U6 associados à RNF113A. As frações de imunoprecipitação foram analisadas por espectrometria de massas e mostraram interação de RNF113A com proteínas que participam na transcrição, ubiquitinação, maturação do pré-RNAm e *splicing*. Estes resultados indicam que a associação de RNF113A ao spliceossomo ocorre a partir de suas interações com os U-RNAs U5 e U6 e com proteínas relacionadas, como a hBRR2.

Palavras chaves: Células cultivadas de tumor. RNA. *Splicing*. RNF113A. ZNF183. CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

Silva GHG. Functional study of RNF113A (ZNF183) in mammalian cells spliceosomes [Master thesis (Cell and Tissue Biology)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Splicing of pre-mRNA is the process by which introns are removed and exons are joined together to produce a mature mRNA competent for translation. It is catalyzed by the complex called spliceosome. RNF113A is a protein detected in pre- and post-catalytic complexes. In this work we analyzed RNF113A participation on spliceosome and its interactions with other spliceosome components. Our results showed that overexpression of RNF113A in HEK293T led to increased levels of U1, U2, U5, U6 U-RNAs and PRPF19. RNF113A also associates to PRPF19, hBRR2 and SF3b2, as observed by immunoprecipitation followed by RT-qPCR and *western blot*. Consistently, U5 and U6 U-RNAs were observed in association with RNF113A. Immunoprecipitation fractions were also analyzed by mass spectrometry and results showed interaction of RNF113A with proteins that participate in processes such as transcription, ubiquitination, pre-mRNA maturation and splicing. These results suggest RNF113A associates to spliceosome by interacting with U5 and U6 U-RNAs and with related proteins, for example hBRR2.

Keywords: Tumor culture cells. RNA. *Splicing*. RNF113A. ZNF183. CRISPR/Cas9.

1 INTRODUÇÃO

Os eventos de transcrição e tradução são dependentes de diferentes RNAs e proteínas, os quais formam sucessivos complexos ribonucleoprotêicos (Coltri, Effenberger et al., 2011). Tais complexos ribonucleoprotêicos são essenciais para a maturação e direcionamento de RNAs e proteínas na célula (Matera, Wang, 2014; Saley, Guthrie, 1998). A regulação da expressão gênica está diretamente relacionada à atividade destes complexos proteicos, e ao direcionamento que terão na célula.

Os genes são compostos por sequências denominadas *exons*, e por sequências intermediárias denominadas *introns*. Estas sequências são transcritas em precursores de RNA, pré-RNAs, que devem ser processados e maturados antes de serem exportados do núcleo ao citoplasma para serem traduzidos e executarem sua função celular. Ainda durante a transcrição, os precursores de RNA são processados para adição de um *cap* na extremidade 5' e para a retirada de *introns* e ligação dos *exons* em um processo denominado *splicing* (Hoskins, Moore, 2012). Além disso, estes precursores também sofrem a adição de uma cauda poli-A na sua extremidade 3'. Este processamento é fundamental para que o RNA mensageiro maduro (RNAm) seja transportado para o citoplasma, onde será traduzido em proteína, e direcionado para funcionamento adequado da célula.

A importância do processo de *splicing* nos eucariotos reflete-se no fato de que mutações envolvendo proteínas que compõem o spliceossomo ou que participam do *splicing* estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças, entre elas a fibrose cística, atrofia muscular esquelética, retinite pigmentosa e alguns tipos de câncer (Singh, Cooper., 2012). Em mamíferos, a grande maioria dos transcritos sofre *splicing* e mais de 95% destes transcritos sofrem *splicing* alternativo, aumentando a diversidade protéica e permitindo regulação precisa e temporal da expressão gênica (Nilsen, Graveley, 2010; Schneider, Will, 2010).

O *splicing* consiste em duas reações de transesterificação e depende principalmente de sequências conservadas localizadas nas fronteiras entre os *exons* e *introns* e dentro dos *introns*. Este processo é realizado pelo complexo

spliceossomo, montado a cada novo *intron*. A ativação do spliceossomo ocorre a partir de uma série de interações dinâmicas entre os RNAs e mais de 300 proteínas auxiliaadoras. Os snRNAs, também conhecidos por U-RNAs, associam-se às proteínas Sm, sendo estas proteínas semelhantes para U1, U2, U4 e U5. Já o U6 associa-se às proteínas LSm (“like Sm”). Estas partículas ribonucleoprotéicas associam-se às regiões conservadas do pre-RNA, sequencialmente. Inicialmente, o U1 reconhece um sítio conservado na extremidade 5’ do *intron* (consenso GUAUGU), formando o complexo E (“*early*”). A ligação do RNU2 à adenina do sítio de ramificação (*branchpoint*) no *intron* (consenso 5’ UACUAAC 3’) em uma reação dependente de ATP leva à formação do complexo A. O complexo B é formado a partir da ligação do tri-RNU4/U6-U5. Uma série de rearranjos estruturais são desencadeados pela atividade das helicases dependentes de ATP, causando mudanças nas interações RNA-RNA e RNA-proteína e levando à dissociação dos snRNPs U1 e U4 e à formação de novas interações, como o pareamento dos U6 e U2 (Grainger, Beggs, 2005; Hoskins, Moore, 2012), formando o complexo B^{act} (Fabrizio, Dannenberg et al., 2009). O U6 passa a interagir especificamente com o sítio de *splicing* 5’ e assim é formado o complexo catalítico, ou C, do spliceossomo. O processo de *splicing* gera o *intron* clivado em forma de laço (*intron lariat*), e os *exons* ligados, que formarão um mRNA maduro (Staley, Guthrie, 1998). Um esquema representando a formação do complexo spliceossomo está na Figura 1.

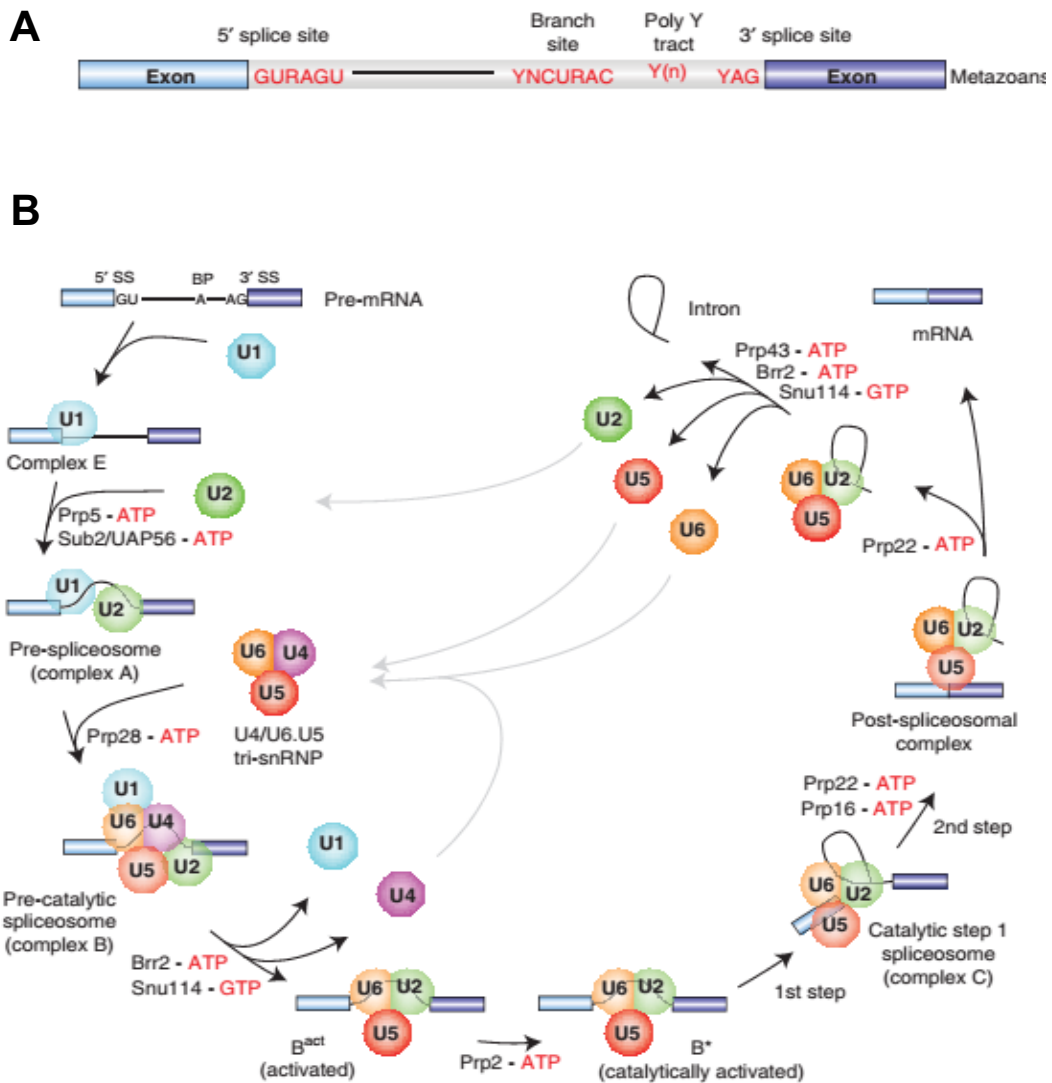


Figura 1- Representação dos complexos formados durante o splicing. **A.** Esquema do pré-mRNA, destacando sítios conservados de *splicing* em metazoários nas regiões 5', 3' e no sítio de ramificação. **B.** A montagem dinâmica do spliceossomo ocorre a partir da associação dos U-RNPs ao pré-RNA, em uma série de complexos (E, A, B, Bact, C e Pós-*splicing*). As reações de transesterificação ocorrem no complexo catalítico C (adaptado de (Will and Luhrmann 2011)).

O complexo spliceossomo possui cerca de 2 MDa, e é composto por cinco pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP), sendo elas U1, U2, U4/U6 e U5, e mais cerca de 300 proteínas, entre as quais muitas associam-se

de forma transitória ao complexo. Além das proteínas Sm ou LSm, cada U-RNA associa-se a um grupo diferente de proteínas, as quais podem auxiliar nas alterações estruturais ou na interação entre RNAs e proteínas (Figura 2). O spliceossomo é conservado entre os eucariotos (Jurica, Moore, 2003; Meyer, Vilardell, 2009; Hoskins, Moore, 2012). Muitos estudos funcionais foram realizados utilizando-se leveduras (*S. cerevisiae*) como organismo modelo (Stevens, Ryan et al., 2002; Fabrizio, Dannenberg et al., 2009). Grande parte das proteínas que compõem este complexo possuem estrutura e sequências conservadas, como é o caso de RNF113A, Hsp73, hBRR2 (SNRP200), PRPF8 e PRPF19, por exemplo (Coltei, Effenberger et al., 2011; Fabrizio, Dannenberg et al., 2009; Nancollis, Ruckshanthi et al., 2013).

Entre as proteínas que participam do spliceossomo estão DExH-helicases dependentes de ATP (como a hBRR2), fatores gerais do *splicing* (como SF3b2) GTPases, peptidil-prolil isomerases, além das PRP's e proteínas do sub-complexo NTC (Will, Luhrmann, 2011). As helicases, em geral, são motores moleculares dependentes de ATP que desenovelam as duplas fitas de DNA e são essenciais para processos como replicação e transcrição do DNA. Oito helicases são necessárias durante a formação do complexo de *splicing*, entre as quais estão PRPF2, PRPF16, PRPF43, hBRR2 e PRPF22. A atuação destas proteínas é fundamental para os eventos de remodelamento entre moléculas de RNA, e destes com proteínas, pelos quais o complexo passa antes e durante sua ativação (Hahn, Beggs, 2010; Veith, Mangerich, 2014).

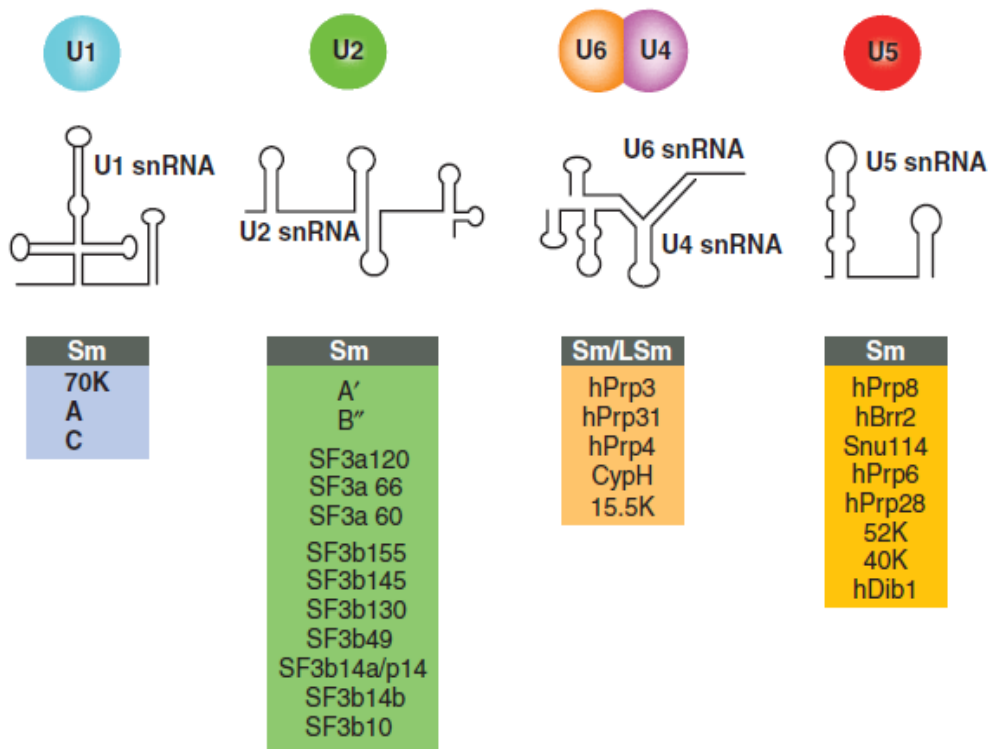


Figura 2- Esquema da estrutura secundária dos U-RNAs U1, U2, U6/U4 e U5. Na parte inferior, estão destacadas as principais proteínas componentes dos U-RNPs de humanos (adaptado de (Will and Luhrmann 2011)).

Proteínas como a PRPF8 tem uma atuação importante na formação do complexo, já que associa-se ao U-RNP U5 e permanece no centro catalítico do complexo durante o *splicing* (Grainger, Beggs, 2005). Proteínas associadas à PRPF19, isoladas em um sub-complexo denominado NTC (Nineteen Complex) podem ter função na ativação e estabilização do spliceossomo (de Almeida, O'Keefe, 2015; Chan, Kao et al., 2003; Song, Werner et al., 2010). A ativação do spliceossomo foi relacionada à presença das proteínas deste sub-complexo e de ATPases específicas que são moduladas por outros fatores do spliceossomo, como a PRPF8, SNU114 e hBRR2 (Hahn, Beggs, 2010; Hang, Wan et al., 2015; Kuhn, Li et al., 1999; Small, Leggett et al., 2006). Além de estabilizar as interações dos U-RNPs U5 e U6 com o pré-RNA_m, o NTC também desestabiliza a interação do RNU6 com as proteínas LSm, expondo a sua extremidade 3' ao contato com o *intron* e levando ao rearranjo do U-RNP

U5, auxiliando a formação do centro catalítico do complexo (Hoskins, Moore, 2012).

1.1 A proteína RNF113A

O gene CRCh38.p7 presente no cromossomo Xq24 codifica a proteína RNF113A, composta de 1297 pb. A proteína RNF113A possui 38,78 kDa e é encontrada principalmente no núcleo das células eucarióticas. Esta proteína foi identificada por análises de espectrometria de massas no complexo spliceossomo de mamíferos, concentrada principalmente nos complexos intermediários B, B^{act} e pós- catalítico (Agafonov, Deckert et al., 2011; Coltri, Effenberg et al., 2011; Fabrizio, Dannerberg et al., 2009; Ilagan, Chalkley et al., 2013). A organização estrutural de RNF113A indica que possui um domínio “RING”- finger e um “zinc-finger”, similar à sua ortóloga de leveduras (Cwc24). O domínio RING, abreviação de “Really Interesting New Gene”, está presente em um grande número de proteínas em células eucarióticas e possui oito resíduos de histidina e cisteína (Cys3-His-Cys4) conservados (Burroughs, Iyer et al., 2011; Lee, Alpi et al., 2013; Nakamura, 2011). O domínio “zinc-finger” coordena um átomo de zinco em sua estrutura e está associado à interação com lipídeos e especialmente com ácidos nucleicos na poliadenilação do pré-RNA_m, *splicing* alternativo, biogênese de pequenos RNAs e tradução. O domínio RING pode mediar interações entre proteínas (Marfatia, Crafton et al., 2003; Murn, Teplova et al., 2016). Ambos podem estar envolvidos no controle transcricional, interferindo diretamente na transcrição ou recrutando co-ativadores ou co-repressores da transcrição (Burroughs, Iyer et al., 2011; Gamsjaeger, Liew et al., 2007; Halbach, Scheer et al., 2000; Hiratani, Mochizuki et al., 2001).

De acordo com bancos de dados de interação entre proteínas (The Biological General Repository for Interaction Datasets, BioGRID), RNF113A interage com UBE2U, uma ubiquitina- ligase do tipo E2 (Campbell, Edwards et al., 2012; Joazeiro, Weissman, 2000). A presença do domínio “RING” e sua interação com UBE2U podem indicar que RNF113A seja uma proteína da família ubiquitina-ligase E3, e seria possível que estivesse envolvida nos processos de ubiquitinação. No entanto até o momento a relação de RNF113A

com ubiquitinação no *splicing* não foi determinada. A ubiquitinação é uma modificação pós- traducional que medeia a ligação covalente de ubiquitina (Ub) a proteínas. Essa conjugação é catalisada por 3 enzimas, sendo elas a enzima de ativação-Ub (E1), enzima de conjugação-Ub (E2) e enzima de ligação-Ub (E3) (Nakamura, 2011). O grupo ubiquitina possui importante função na regulação e reciclagem de proteínas, marcando proteínas mal formadas para serem degradadas pelo proteassomo (Lee, Alpi et al., 2013; Li, Bengtson et al., 2008; Nakamura, 2011). Ainda, é possível que a degradação pelo sistema ubiquitina- proteassoma interfira em grande parte dos processos celulares, como endocitose, regulação imune, tráfego de membrana, autofagia e atividade mitocondrial (Lee, Alpi et al., 2013; Burroughs, Iyer et al., 2011; Nakamura, 2011).

Alguns trabalhos recentes têm mostrado que a sinalização por Ub tem também um papel não proteolítico, no transporte pela membrana, estrutura e transcrição da cromatina, reparo da dupla fita de DNA e, possivelmente, no *splicing* (Lee, Alpi et al., 2013; Nakamura, 2011; Pederiva, Bohm et al., 2016). A atividade de algumas proteínas do spliceossomo tem indicado que este complexo pode ser regulado também por ubiquitinação, porém esse mecanismo ainda não foi muito explorado (Bellare, Small et al., 2008; Pederiva, Bohm et al., 2016). Já se sabe que a ubiquitinação da proteína PRP3 modifica a afinidade e os rearranjos mediados pela proteína PRPF8 do U-RNP U5 (Song, Werner et al., 2010). Além disso, PRPF19, um dos principais componentes do NTC, é um provável alvo de ubiquitinação, o que pode indicar um papel importante desta modificação na ativação do complexo (de Almeida, O'Keefe, 2015).

Em humanos, cerca de 300 proteínas contém o domínio “RING“-*finger* (RNF), destas pelo menos 49 contem regiões hidrofóbicas preditas para domínios transmembranares, muitos dos quais estão localizados na membrana de compartimentos secretores e vias de endocitose, bem como na mitocôndria e peroxissomos (Nakamura, 2011). Estas proteínas são consideradas reguladores moleculares da organização e integridade das funções e arquitetura da membrana celular e organelas membranosas. Há evidências de que as RNFs transmembranares controlam a estabilidade, tráfego e atividade

das proteínas que estão envolvidas em muitos aspectos de processos celulares, como é o caso do *splicing* (Li, Bengtson et al., 2008; Nakamura, 2011).

A provável ortóloga de RNF113A em *S. cerevisiae* é Cwc24. Ambas apresentam similaridade na presença e organização dos domínios conservados “RING” e *zinc-finger* (Coltri, Oliveira, 2012; Goldfeder, Oliveira, 2008). Assim como Cwc24, RNF113A também está presente em maior quantidade nos complexos intermediários do spliceossomo B e B^{act}, permanecendo associada até as etapas posteriores à catálise (Agafonov, Deckert et al., 2011; Bessonov, Anokhina et al., 2010; Ilagan, Chalkley et al., 2013; Lee, Alpi et al., 2013). Cwc24 foi isolada em associação ao complexo NTC, o que pode indicar sua provável atividade no remodelamento e ativação do spliceossomo. A presença de Cwc24 é fundamental para o *splicing* de pre-RNAs que não possuem sítio de ramificação consenso, estabilizando as interações do snRNP U2 no complexo (Coltri, Oliveira, 2012). Recentemente, (Wu, Chung et al., 2016) mostraram que Cwc24 interage com o sítio 5' de *splicing*, e na sua ausência a fidelidade do reconhecimento do sítio 5' de *splicing* pode ser comprometida.

Entretanto, as interações e o mecanismo de ação de RNF113A no spliceossomo humano ainda são pouco explorados. Estudos recentes mostraram que RNF113A interage com a proteína hBRR2, de 250 KDa, componente do snRNP U5 e pertencente à família das helicases (Hahn, Beggs, 2010; Nancollis, Ruckshanthi et al., 2013). Mutações que acarretam perda da interação de hBRR2 com a PRFP8 no spliceossomo levam ao desenvolvimento de retinite pigmentosa, uma doença que causa a morte das células fotorreceptores da retina (cones e bastonetes). Porém, os mecanismos moleculares envolvidos nesta interação estão pouco elucidados (Hahn, Beggs, 2010; Zhang, Li et al., 2015). hBRR2 tem uma estrutura incomum, com uma região N-terminal longa e um cassete de helicase na região C-terminal que pode levar à auto-inibição ou auto-ativação. Ambas regiões são essenciais, agem como dispositivos de interação proteína-proteína. A região N-terminal é necessária para a associação estável de hBRR2 com a partícula tri-snRNP do spliceossomo, estabilização do tri-snRNP e retenção de U5 e U6 durante a ativação do spliceossomo *in vivo* (Absmeier, Santos et al., 2016; Theuser, Hobartner et al., 2016). hBRR2 pode ser auto-inibida através do dobramento da

sua longa cauda N-terminal, e auto-ativada pela inativação da catálise na sua região C-terminal. Além disso, pode ser regulada pelo domínio Jab1 presente na proteína PRPF8, que por sua vez pode inibir hBRR2 pela inserção de uma nova cauda na região C-terminal (Absmeier, Becke et al., 2016). Atualmente, não está claro se esses mecanismos funcionalmente regulatórios interagem e até que ponto são conservados evolutivamente (Absmeier, Becke et al., 2016; Absmeier, Santos et al., 2016).

A RNF113A também pode interagir com o fator de *splicing* SF3b2, componente do snRNP U2 (Hegele, Kamburov et al., 2012; Ilagan, Chalkley et al., 2013), de acordo com dados obtidos por meio de ensaios de duplo-híbrido. Já se sabe que uma possível causa da leucemia linfocítica crônica (LLC) é a mutação no fator geral do *splicing* SF3b1, o que acarreta em problemas no enovelamento da proteína. Porém, o seu funcionamento na leucemogênese ainda não está claro. Assim como SF3b2, ambas proteínas são essenciais para formação do núcleo central do snRNP U2 e para o reconhecimento da região de ramificação (*branchpoint*) no íntron (Chen, Manley, 2009; Wang, Brooks et al., 2016). É possível e provável que esta proteína interaja com outros componentes do complexo, ainda desconhecidos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a super-expressão de RNF113A em células HEK293T leva a um aumento na expressão de RNU1, RNU2, RNU5 e RNU6, além de PRPF19 (componente central do NTC), evidenciado por RT-qPCR. Ensaios de *western blot* confirmaram o aumento da expressão de proteínas como PRPF19 e SF3b2 em células super-expressando RNF113A. A imunoprecipitação de RNF113A mostrou uma estreita associação desta proteína com os RNU5 e RNU6 e com as proteínas PRPF19, hBRR2 e SF3b2, evidenciados por RT-qPCR e por *western blot*. Em conjunto, os resultados obtidos indicam que a proteína RNF113A está presente nos complexos intermediários do spliceossomo antes da sua ativação, de forma que a sua atividade pode estar intimamente ligada a ativação deste complexo.

5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir neste trabalho que:

- RNF113A associa-se a proteínas relacionadas a transcrição e tradução, como os fatores MEF2b, EIF3E, EIF2A, proteínas de ubiquitinação, ADRMI e NUCKS. E também à proteínas envolvidas no metabolismo de RNA, como proteínas da família das hnRNPs, fatores gerais do splicing (SRSF e U21F1).
- Os dados permitem propor um modelo no qual RNF113A associa-se ao spliceossomo por meio da interação com hBRR2 e com o RNU5, possivelmente ainda no complexo B, antes da ativação do spliceossomo. É muito provável que a proteína permaneça no complexo após auxiliar na catálise do *splicing*.

REFERÊNCIAS*

Absmeier E, Becke C, Wollenhaupt J, Santos KF, Wahl MC. Interplay of cis- and trans-regulatory mechanisms in the spliceosomal RNA helicase Brr2. *Cell cycle*. 2016:0.

Absmeier E, Santos KF, Wahl MC. Functions and regulation of the Brr2 RNA helicase during splicing. *Cell cycle*. 2016:1-16.

Agafonov DE, Deckert J, Wolf E, Odenwalder P, Bessonov S, Will CL, et al. Semiquantitative proteomic analysis of the human spliceosome via a novel two-dimensional gel electrophoresis method. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(13):2667-82.

Bellare P, Small EC, Huang X, Wohlschlegel JA, Staley JP, Sontheimer EJ. A role for ubiquitin in the spliceosome assembly pathway. *Nature structural & molecular biology*. 2008;15(5):444-51.

Bessonov S, Anokhina M, Krasauskas A, Golas MM, Sander B, Will CL, et al. Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *Rna*. 2010;16(12):2384-403.

Bi HS, Yang XY, Yuan JH, Yang F, Xu D, Guo YJ, et al. H19 inhibits RNA polymerase II-mediated transcription by disrupting the hnRNP U-actin complex. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(10):4899-906.

Burroughs AM, Iyer LM, Aravind L. Functional diversification of the RING finger and other binuclear treble clef domains in prokaryotes and the early evolution of the ubiquitin system. *Molecular bioSystems*. 2011;7(7):2261-77.

Campbell SJ, Edwards RA, Leung CC, Neculai D, Hodge CD, Dhe-Paganon S, et al. Molecular insights into the function of RING finger (RNF)-containing proteins hRNF8 and hRNF168 in Ubc13/Mms2-dependent ubiquitylation. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(28):23900-10.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniforme requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: sample references. [2011 July 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Chan SP, Kao DI, Tsai WY, Cheng SC. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science*. 2003;302(5643):279-82.

Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(11):741-54.

Choi HW, Kim HR, Baek HJ, Kook H, Cho D, Shin JH, et al. Alteration of the SETBP1 gene and splicing pathway genes SF3B1, U2AF1, and SRSF2 in childhood acute myeloid leukemia. *Annals of laboratory medicine*. 2015;35(1):118-22.

Coltri P, Effenberger K, Chalkley RJ, Burlingame AL, Jurica MS. Breaking up the C complex spliceosome shows stable association of proteins with the lariat intron intermediate. *PloS one*. 2011;6(4):e19061.

Coltri PP, Oliveira CC. Cwc24p is a general *Saccharomyces cerevisiae* splicing factor required for the stable U2 snRNP binding to primary transcripts. *PloS one*. 2012;7(9):e45678.

de Almeida RA, O'Keefe RT. The NineTeen Complex (NTC) and NTC-associated proteins as targets for spliceosomal ATPase action during pre-mRNA splicing. *RNA biology*. 2015;12(2):109-14.

Fabrizio P, Dannenberg J, Dube P, Kastner B, Stark H, Urlaub H, et al. The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Molecular cell*. 2009;36(4):593-608.

Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(2):63-70.

Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human genetics*. 2016;135(8):851-67.

Goldfeder MB, Oliveira CC. Cwc24p, a novel *Saccharomyces cerevisiae* nuclear ring finger protein, affects pre-snoRNA U3 splicing. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(5):2644-53.

Grainger RJ, Beggs JD. Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *Rna*. 2005;11(5):533-57.

Green MR, Sambrook JF. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2012.

Hahn D, Beggs JD. Brr2p RNA helicase with a split personality: insights into structure and function. *Biochemical Society transactions*. 2010;38(4):1105-9.

Halbach T, Scheer N, Werr W. Transcriptional activation by the PHD finger is inhibited through an adjacent leucine zipper that binds 14-3-3 proteins. *Nucleic acids research*. 2000;28(18):3542-50.

Han SP, Tang YH, Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *The Biochemical journal*. 2010;430(3):379-92.

Hang J, Wan R, Yan C, Shi Y. Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science*. 2015;349(6253):1191-8.

Hegele A, Kamburov A, Grossmann A, Surlis C, Wowro S, Weimann M, et al. Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Molecular cell*. 2012;45(4):567-80.

Hiratani I, Mochizuki T, Tochimoto N, Taira M. Functional domains of the LIM homeodomain protein Xlim-1 involved in negative regulation, transactivation, and axis formation in *Xenopus* embryos. *Developmental biology*. 2001;229(2):456-67.

Hogg R, McGrail JC, O'Keefe RT. The function of the NineTeen Complex (NTC) in regulating spliceosome conformations and fidelity during pre-mRNA splicing. *Biochemical Society transactions*. 2010;38(4):1110-5.

Hoskins AA, Moore MJ. The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends in biochemical sciences*. 2012;37(5):179-88.

Ilgan JO, Chalkley RJ, Burlingame AL, Jurica MS. Rearrangements within human spliceosomes captured after exon ligation. *Rna*. 2013;19(3):400-12.

Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*. 2000;102(5):549-52.

Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular cell*. 2003;12(1):5-14.

Kralovicova J, Vorechovsky I. Alternative splicing of U2AF1 reveals a shared repression mechanism for duplicated exons. *Nucleic acids research*. 2017;45(1):417-34.

Kuhn AN, Li Z, Brow DA. Splicing factor Prp8 governs U4/U6 RNA unwinding during activation of the spliceosome. *Molecular cell*. 1999;3(1):65-75.

Lee H, Alpi AF, Park MS, Rose A, Koo HS. C. elegans ring finger protein RNF-113 is involved in interstrand DNA crosslink repair and interacts with a RAD51C homolog. *PloS one*. 2013;8(3):e60071.

Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, Matsuda A, Reddy VA, Orth A, et al. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PloS one*. 2008;3(1):e1487.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Loh TJ, Moon H, Cho S, Jang H, Liu YC, Tai H, et al. CD44 alternative splicing and hnRNP A1 expression are associated with the metastasis of breast cancer. *Oncology reports*. 2015;34(3):1231-8.

Marfatia KA, Crafton EB, Green DM, Corbett AH. Domain analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, Nab2p. Dissecting the requirements for Nab2p-facilitated poly(A) RNA export. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(9):6731-40.

Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(2):108-21.

Mayeda A, Krainer AR. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell*. 1992;68(2):365-75.

Meyer M, Vilardell J. The quest for a message: budding yeast, a model organism to study the control of pre-mRNA splicing. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2009;8(1):60-7.

Motta-Mena LB, Heyd F, Lynch KW. Context-dependent regulatory mechanism of the splicing factor hnRNP L. *Molecular cell*. 2010;37(2):223-34.

Murn J, Teplova M, Zarnack K, Shi Y, Patel DJ. Recognition of distinct RNA motifs by the clustered CCCH zinc fingers of neuronal protein Unkempt. *Nature structural & molecular biology*. 2016;23(1):16-23.

Nakamura N. The Role of the Transmembrane RING Finger Proteins in Cellular and Organelle Function. *Membranes*. 2011;1(4):354-93.

Nancollis V, Ruckshanthi JP, Frazer LN, O'Keefe RT. The U5 snRNA internal loop 1 is a platform for Brr2, Snu114 and Prp8 protein binding during U5 snRNP assembly. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(12):2770-84.

Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*. 2010;463(7280):457-63.

Ohi MD, Link AJ, Ren L, Jennings JL, McDonald WH, Gould KL. Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(7):2011-24.

Ohi MD, Vander Kooi CW, Rosenberg JA, Ren L, Hirsch JP, Chazin WJ, et al. Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(1):451-60.

Park SJ, Lee H, Jo DS, Jo YK, Shin JH, Kim HB, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 post-transcriptionally regulates Drp1 expression in neuroblastoma cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1849(12):1423-31.

Pederiva C, Bohm S, Julner A, Farnebo M. Splicing controls the ubiquitin response during DNA double-strand break repair. *Cell death and differentiation*. 2016;23(10):1648-57.

Sashital DG, Venditti V, Angers CG, Cornilescu G, Butcher SE. Structure and thermodynamics of a conserved U2 snRNA domain from yeast and human. *Rna*. 2007;13(3):328-38.

Schneider M, Will CL, Anokhina M, Tazi J, Urlaub H, Luhrmann R. Exon definition complexes contain the tri-snRNP and can be directly converted into B-like precatalytic splicing complexes. *Molecular cell*. 2010;38(2):223-35.

Singh RK, Cooper TA. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends in molecular medicine*. 2012;18(8):472-82.

Small EC, Leggett SR, Winans AA, Staley JP. The EF-G-like GTPase Snu114p regulates spliceosome dynamics mediated by Brr2p, a DExD/H box ATPase. *Molecular cell*. 2006;23(3):389-99.

Song EJ, Werner SL, Neubauer J, Stegmeier F, Aspden J, Rio D, et al. The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome. *Genes & development*. 2010;24(13):1434-47.

Staley JP, Guthrie C. Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*. 1998;92(3):315-26.

Stevens SW, Ryan DE, Ge HY, Moore RE, Young MK, Lee TD, et al. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal pentasnrNP. *Molecular cell*. 2002;9(1):31-44.

Theuser M, Hobartner C, Wahl MC, Santos KF. Substrate-assisted mechanism of RNP disruption by the spliceosomal Brr2 RNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(28):7798-803.

Veith S, Mangerich A. RecQ helicases and PARP1 team up in maintaining genome integrity. *Ageing research reviews*. 2014.

Vu NT, Park MA, Shultz JC, Goehe RW, Hoeflerlin LA, Shultz MD, et al. hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(12):8575-84.

Wang L, Brooks AN, Fan J, Wan Y, Gambe R, Li S, et al. Transcriptomic Characterization of SF3B1 Mutation Reveals Its Pleiotropic Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer cell*. 2016;30(5):750-63.

Will CL, Luhrmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(7).

Wu NY, Chung CS, Cheng SC. The Role of Cwc24 in the First Catalytic Step of Splicing and Fidelity of 5' Splice Site Selection. *Molecular and cellular biology*. 2016.

Wu T, Fu XD. Genomic functions of U2AF in constitutive and regulated splicing. *RNA biology*. 2015;12(5):479-85.

Zhang L, Li X, Hill RC, Qiu Y, Zhang W, Hansen KC, et al. Brr2 plays a role in spliceosomal activation in addition to U4/U6 unwinding. *Nucleic acids research*. 2015;43(6):3286-97.