Marcelo Machado Paiva

**Identificação de proteínas reguladoras do
splicing associadas à microRNAs**

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

São Paulo
2016

Marcelo Machado Paiva

**Identificação de proteínas reguladoras do
splicing associadas à microRNAs**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento 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
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução parcial

Paiva, Marcelo Machado.

Identificação de proteínas reguladoras do splicing associadas à
microRNAs / Marcelo Machado Paiva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Patrícia Pereira Coltri.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do
Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.
Linha de pesquisa: Regulação de splicing em eucariotos.

Versão do título para o inglês: Identification of splicing regulatory
proteins associated to microRNAs

1. RNA 2. Células cultivadas de tumor 3. Splicing 4. MicroRNA 5.
miR-17-92 6. I. Coltri, Patrícia Pereira II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB098/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcelo Machado Paiva.

Título da Dissertação: Identificação de proteínas reguladoras do splicing
associadas à microRNAs.

Orientador(a): Patrícia Pereira Coltri.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **653/14** referente ao projeto intitulado: "*Identificação de proteínas reguladoras do splicing associados a microRNAs*" sob a responsabilidade de **Marcelo Paiva**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 26 de março de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico aos meus familiares, amigos e a quem habita meu coração, com amor, gratidão e admiração por todo apoio emocional, físico e mental durante todo o período de execução desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Patricia Pereira Coltri, pelos ensinamentos e orientação de toda elaboração desse trabalho.

À Gisela Ramos pelo apoio técnico ao Laboratório.

A todos os colegas do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica em Eucariotos (425) pela companhia e ajuda em diversos procedimentos.

À Profa. Dra. Edna Teruko Kimura, por nos conceder espaço e itens para execução da pesquisa.

Ao Dr. César Fuziwara por compartilhar conhecimentos científicos e auxiliar nas culturas.

À Kelly Saito pelo apoio durante a utilização de equipamento de Real Time PCR.

À Profa. Dra. Carla C. Oliveira por nos ceder espaço para Real Time PCR e FPLC.

Ao LNBio por nos ceder o espaço para utilização do espectrômetro de massas.

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de mestrado e apoio financeiro para realização desta pesquisa.

“Não entre em pânico. ”

Douglas Adams

RESUMO

Paiva MM. Identificação de proteínas reguladoras do *splicing* associadas à microRNAs [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Splicing é o processo de remoção de *introns* e ligação de *exons* em eucariotos. É realizado pelo spliceossomo, um complexo macromolecular composto por RNAs e mais de cem proteínas. A maioria destas proteínas são componentes do núcleo central do complexo, e são importantes para a montagem e catálise da reação de *splicing*. Alguns *introns* possuem microRNAs (miRNAs), os quais devem ser processados para gerar moléculas maduras. O *cluster* intrônico miR-17-92 é composto por sete miRNAs que têm sido associados ao desenvolvimento de diferentes tumores em vários tecidos. Neste trabalho, o *splicing* de dois miRNAs deste *cluster* foi analisado em três linhagens de células diferentes, HeLa, BCPAP e TPC-I. Os resultados mostraram que *introns* que possuem miR19a tem o *splicing* mais eficiente do que aqueles com miR18a, em todas as três células analisadas. Além disso, a composição dos complexos de *splicing* montados nestes *introns* foi analisada por espectrometria de massas. Entre as principais proteínas encontradas, destaca-se a presença das hnRNPs, como hnRNP_A1 e hnRNP_A2/B1. Estes resultados são importantes para entender como esses miRNAs são processados, e quais são os principais componentes recrutados em diferentes tipos celulares. Por fim, estes resultados contribuem para explicar os diferentes níveis de expressão destes miRNAs em diferentes células.

Palavras-chave: RNA. Células cultivadas de tumor. *Splicing*. MicroRNA. miR-17-92.

ABSTRACT

Paiva MM. Identification of splicing regulatory proteins associated to microRNAs [Master thesis (Cell and Tissue Biology)] - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Pre-mRNA splicing is the process of intron removal and exon ligation in eukaryotes. It is performed by the spliceosome, a multi-megadalton machinery composed of RNAs and more than a hundred proteins. Most of these are core components of the complex being important for assembly and splicing catalysis. Some proteins are required for specific pre-mRNA substrates, defining an important regulatory feature of this complex. Intronic microRNAs (miRNAs) must be processed from the host gene to generate mature molecules. miR-17-92 is an intronic cluster composed of seven miRNAs which have been associated to the development of different tumors, in several different cells. In this work, we analyzed the splicing of two miRNAs belonging to this cluster in three different cell lines. Interestingly, we observed miR19a is more efficiently spliced than miR18a in all three cells analyzed. We also searched for specific proteins that can be involved in their respective splicing process. We observed hnRNP proteins are especially concentrated in spliceosomes assembled in introns containing these miRNAs, based on results of mass spectrometry. These results are important to understand how these miRNAs are spliced and matured and also can explain their different expression levels in different cells.

Keywords: RNA. Tumour cultivated cells. Splicing. MicroRNA. miR-17-92.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O processo de <i>splicing</i>	11
1.2 Processamento dos miRNAs	14
1.3 O <i>cluster</i> miR17-92	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 METODOLOGIA	18
3.1 Construção de vetores e clonagem	18
3.2 Linhagens celulares	20
3.2.1 <i>Cultura e transfecção</i>	20
3.3 Análise de <i>Splicing</i>	21
3.3.1 <i>Extração de RNA total e síntese de cDNA</i>	21
3.3.2 <i>RT-PCR e qPCR</i>	21
3.4 Expressão e purificação de MS2:MBP	22
3.5 Imunoprecipitação do complexo de <i>splicing</i>	22
3.6 Espectrometria de Massas	23
3.7 Análise de expressão gênica	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Análise de <i>splicing</i> em <i>introns</i> contendo miRNAs	25
4.2 Imunoprecipitação do complexo spliceossomo e identificação de proteínas	28
4.3 Análise de expressão gênica	34
5 DISCUSSÃO	37
5.1 Composição dos spliceossomos	38
5.2 Proteínas da classe das hnRNPs	39
6 CONCLUSÕES	43
7 PERSPECTIVAS	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

As funções celulares dependem de inúmeros RNAs codificadores e não-codificadores de proteínas, além de proteínas de ligação ao RNA associadas a eles, que formam complexos de ribonucleoproteínas (RNPs) (Wahl et al., 2009). Mutações nestas sequências de RNA ou em sequências codificadoras para as proteínas necessárias para montagem dos RNPs podem ser deletérias (Cooper et al., 2009). Em eucariotos, muitos genes são transcritos como precursores de RNAs mensageiros (pré-mRNAs) contendo *introns* e *exons*. Os *exons* são sequências que permanecem nos RNAs maduros, e são intercaladas por sequências intermediárias, chamadas de *introns*. O processo de *splicing*, exclusivo de células eucarióticas, consiste na remoção de *introns* e ligação dos *exons* para formação de um RNA mensageiro maduro (mRNA). Esse processo depende de uma complexa maquinaria ribonucleoprotéica chamada de spliceossomo (Staley, Guthrie, 1998).

1.1 O processo de *splicing*

O spliceossomo é composto por 5 snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*), U1, U2, U4, U5 e U6 e mais de 100 proteínas que podem associar-se de forma definitiva ou transitória ao complexo. Os snRNPs são compostos por um snRNA (*small nuclear RNA*) rico em uridinas e, no mínimo, um grupo de cinco proteínas da família Sm, ou Lsm no caso do snRNP U6 (Will, Luhrmann, 2011). O *splicing* depende de sequências conservadas nos *exons*, *introns* e nas fronteiras entre eles. Este processo inicia-se com o reconhecimento do sítio conservado na extremidade 5' do *intron* (consenso GUAUGU) pelo snRNP U1. Em seguida ocorre a associação do snRNP U2 ao sítio de ramificação (*branchpoint*) no *intron* (consenso UACUAAC) em uma reação dependente de ATP. Algumas proteínas associadas ao snRNP U2 auxiliam no recrutamento da partícula tri-snRNP U4/U6-U5. Uma série de rearranjos estruturais, possivelmente iniciados pela atividade de RNA-helicases dependentes de ATP, causa mudanças nas interações RNA-RNA e RNA-proteína levando à dissociação dos snRNPs U1 e U4. Essa dinâmica leva ao pareamento dos snRNPs U6 e U2 (Grainger, Beggs, 2005), formando o centro catalítico do spliceossomo, onde ocorrem duas reações sucessivas de trans-esterificação envolvendo o *exon* 5', o sítio de ramificação e o

exon 3'. A primeira reação direciona o grupo 2'OH da adenina do sítio de ramificação ao ataque nucleofílico do sítio de *splicing* 5'. A segunda reação do *splicing* ocorre quando o fosfato 3' do *intron* no sítio consenso de *splicing* yAG (sendo “y” uma pirimidina) é atacado pela hidroxila do *exon 5'* clivado. Esta reação gera dois produtos, o *intron* clivado em forma de laço (*intron lariat*), e os *exons* ligados, formando o mRNA maduro (Figura 1) (Hoskins, Moore, 2012; Jurica, Moore, 2003).

Figura 1 - Montagem do spliceossomo e o processo de *splicing* de pre-mRNAs (Adaptado de Alberts et al.,(2008)).

Entre as proteínas que compõem o spliceossomo estão as helicases dependentes de ATP, que atuam em vários momentos permitindo os rearranjos do complexo de *splicing*, como por exemplo PRP2, PRP16, BRR2 e PRP22 (Hoskins, Moore, 2012). Outras proteínas importantes para a formação do complexo

spliceossomo são por exemplo PRP8 e PRP19. A proteína PRP8 atua ligada à partícula tri-snRNP U4/U6-U5, e permanece ligada ao snRNP U5 durante todo o processo de *splicing*, inclusive após a desmontagem do complexo (Grainger, Beggs, 2005; Hang et al., 2015). A PRP19, por sua vez, forma um grande complexo proteico denominado NTC (*nineteen complex*), composto principalmente por CDC5L, SYF1, SYF2 e SYF3, NTC20, entre outras (Hogg et al., 2010). Além de participar da montagem da partícula tri-snRNP (Makarov et al., 2002), o NTC também participa da ativação do complexo catalítico do *splicing*, reorganizando interações entre os snRNPs e destes com as proteínas (Chan et al., 2003).

Além destas, diversas proteínas do tipo “hnRNP” (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein*) estão associadas a vários componentes do spliceossomo e podem também associar-se ao pre-mRNA durante o processo de *splicing* (Geuens et al., 2016). Proteínas da classe das “SR” (*serine-arginine rich*) também associam-se a alguns precursores específicos e podem atuar promovendo o *splicing* alternativo. De forma geral, as hnRNPs associam-se aos *introns* e atuam como repressoras do *splicing*, possivelmente bloqueando sítios de *splicing* e dificultando a montagem do complexo. As SR, por outro lado, associam-se à sequências nos *exons*, e auxiliam no recrutamento de fatores importantes para o *splicing*, promovendo a reação. A combinação destes dois tipos de proteínas determina a taxa de *splicing* em determinado pre-mRNA e pode ser um importante fator para promover o *splicing* alternativo, processo comum em eucariotos superiores (Nilsen, Graveley, 2010). É possível que a associação destas proteínas também esteja relacionada à características dos pre-mRNAs e ao tipo celular. As proteínas da classe das hnRNPs foram identificadas, por exemplo, associadas a *introns* contendo miRNAs (Geuens et al., 2016; Havens et al., 2014).

Embora a maior parte das proteínas relacionadas com a montagem e atividade do spliceossomo seja conhecida, as características que direcionam o spliceossomo para diferentes RNAs apenas começaram a ser exploradas. É possível que algumas proteínas específicas direcionem o complexo para alguns RNAs, dependendo de suas características específicas, por exemplo a presença de miRNAs nos *introns*. Entre os fatores do spliceossomo, é possível que alguns sejam recrutados para o complexo especificamente durante o *splicing* de *introns* que contém ncRNAs (*non-coding RNAs*) ou miRNAs (Hoskins, Moore, 2012; Smith et al., 2008).

1.2 Processamento dos miRNAs

Além dos mRNAs, outros tipos de RNA também devem sofrer *splicing* durante sua maturação. Entre estes estão os miRNAs, que são uma classe abundante de pequenos RNAs não-codificadores (ncRNAs). Os miRNAs funcionam, em muitos casos, para regular a expressão de genes em nível pós-transcricional (Mercer et al., 2009). Embora suas funções tenham sido originalmente descritas durante o desenvolvimento normal, miRNAs surgiram como parte integrante da rede de supressores oncogênicos, os quais regulam quase todos os processos celulares alterados durante a formação tumoral (Romero-Cordoba et al., 2014).

A expressão de miRNAs depende do seu processamento pelo complexo “microprocessor”, que ocorre entre o núcleo e citoplasma. O processo inicia-se com a transcrição pela RNA polimerase II gerando um miRNA primário, ou pri-miRNA (Lee et al., 2004). O microprocessor, um complexo composto pelas proteínas Drosha e DGCR8, atua no pri-miRNA ainda no núcleo. Nesta etapa, as proteínas deste complexo realizam algumas modificações moleculares dando origem ao pre-miRNA (precursor de miRNA). A etapa nuclear encerra-se com o transporte do pre-miRNA para o citoplasma através da proteína Exportina-5, a qual interage com nucleoporinas, do complexo de poro nuclear (Nguyen et al., 2015; Romero-Cordoba et al., 2014).

No citoplasma, um complexo proteico composto pela Dicer e TRBP, associa-se ao pre-miRNA, terminando sua maturação e gerando um miRNA maduro. Após esse processo, o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), cuja principal proteína componente é a Argonata, associa-se ao miRNA maduro para seu endereçamento ao seu alvo de regulação, um mRNA. Neste caso, pode ocorrer a inibição da tradução ou então a degradação do mRNA alvo, interferindo diretamente na expressão gênica (Kramann, Moeller, 2011). Algumas proteínas da classe das hnRNPs podem associar-se aos miRNAs durante esse processamento, como é o caso da hnRNP_A1 que participa do processamento do miR18a junto com o microprocessor (Guil, Caceres, 2007).

1.3 O *cluster* miR17-92

O *cluster* de miRNAs miR-17-92 está presente no *intron* 3 do gene C13orf25 (Mir17GH) no cromossomo XIII (Figura 2), e é composto por 7 miRNAs (miR17-5, miR17-3, miR18a, miR19a, miR20a, miR19b-1 e miR92a), em sua maioria envolvidos no desenvolvimento de tumores em diferentes tecidos (He et al., 2005; Li et al., 2012). Este *cluster* é considerado um dos mais potentes miRNAs oncogênicos (Olive et al., 2009). Entre os alvos dos miRNAs deste *cluster* estão proteínas envolvidas com ciclo celular, como por exemplo E2F1, E2F2 e E2F3, receptor II de TGF- β , além de diversas moléculas responsáveis pela morte celular como PTEN e IRF1, e outras moléculas relacionadas a proliferação celular como SMAD2 e SMAD4. Estes miRNAs também interferem na expressão de diversas moléculas atuantes no desenvolvimento específico de órgãos como pulmão e coração (Mogilyansky, Rigoutsos, 2013).

Figura 2 - Estrutura do *cluster* miR17-92 contido no *intron* do gene C13orf25 (Mir17GH) no cromossomo XIII. (Fonte: *Bioinformatic and Researching computing* (Bioinformatic, 2009)).

Recentemente foi demonstrado que a superexpressão do *cluster* miR-17-92 promove a expansão de células progenitoras hematopoiéticas multipotentes em ratos. A linhagem celular derivada dessa superexpressão é capaz de realizar diferenciação em linhagens mielóide e linfóide, e a superexpressão individual do *locus* miR-19a ou miR-92a, resulta em hiperplasia de células B e eritroleucemia, respectivamente (Li et al., 2012). Estes resultados comprovaram que a expressão desequilibrada deste *cluster* transforma diretamente o compartimento hematopoiético, e que a análise da expressão dos miRNAs desse *cluster* pode auxiliar no diagnóstico e tratamento de câncer. Este *cluster* de miRNAs também já

foi associado ao desenvolvimento do câncer de tireoide (Fuziwara, Kimura, 2014). Células das lesões tumorais da tireoide apresentavam superexpressão dos *loci* miR17-3p e miR17-5p (Takakura et al., 2008). Após a supressão de miR-17-3p, foi observado uma parada no crescimento do tumor, provavelmente devido à ativação de algumas enzimas, resultando em apoptose. Inibidores de miR-17-5p e de miR-19a também induziram forte redução do crescimento, mas apenas o inibidor de miR-17-5p levou à senescência celular. Por outro lado, o inibidor de miR-18a apenas atenuou o crescimento celular. Estes dados sugerem que o *cluster* de miR-17-92 desempenha um papel importante em certas formas de câncer de tireoide anaplásico e podem ser um novo alvo para o seu tratamento (Takakura et al., 2008).

Devido ao fato deste ser um *cluster* encontrado dentro de *introns*, o processamento e maturação destes miRNAs está fortemente associado à atividade do spliceossomo. O presente trabalho baseou-se na hipótese de que proteínas específicas podem ser recrutadas para o processamento e endereçamento desses miRNAs a partir de íntrons. Desta maneira, investigamos dois aspectos importantes sobre a regulação da expressão destes miRNAs: a eficiência do *splicing* em um transcrito cujo *intron* contém estes miRNAs e a composição do spliceossomo formado em *introns* que contem ou não os miRNAs deste *cluster*. Em especial, foram analisados os complexos formados em transcritos contendo miR18a e miR19a. Recentemente a proteína hnRNP_A1, componente do spliceossomo, foi identificada como componente específico do spliceossomo em *introns* contendo o miR18a (Guil, Caceres, 2007). A presença de proteínas especificamente recrutadas para o *splicing* de miRNAs poderá ser um fator importante de sinalização relacionado, inclusive, ao desenvolvimento tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar proteínas associadas à regulação do *splicing* de *introns* contendo miRNAs 18 e 19 em células HeLa, BCPAP e TPC-I.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a eficiência do *splicing* de transcritos precursores contendo miRNAs em seus *introns* em células tumorais (nas linhagens HeLa, e de câncer de tireoide BCPAP e TPC-I).
- Identificar proteínas associadas aos miR18a e miR19a durante o *splicing* em células tumorais.

3 METODOLOGIA

3.1 Construção de vetores e clonagem

Para identificação de proteínas reguladoras do *splicing*, os pre-miR18a e pre-miR19a, pertencentes ao *cluster* miR17-92 (He et al., 2005), foram amplificados utilizando primers específicos (Tabela 1) e em seguida clonados em vetor pGEM-T (Promega). Estes vetores foram sequenciados utilizando primers M13F e R (Promega). Com as sequências confirmadas, os fragmentos de pre-miR18a e pre-miR19a foram sub-clonados entre os sítios de XhoI e HindIII no vetor pHMS388 (cedido por M. Jurica, *University of California*, Santa Cruz, CA, EUA), gerando os vetores pHMS-miR18a e pHMS-miR19a. O vetor pHMS388 contém a sequência para um precursor de RNA derivado do AdML (*Adenovirus Major Late*) (Das et al., 2000). Os sítios utilizados estão localizados dentro da sequência do *intron*. Além disso, este vetor contém sítios para ligação da proteína MS2, para realização de ensaios subsequentes de imunoprecipitação. Uma representação esquemática desta construção está na Figura 3.

Tabela 1 - Primers utilizados neste trabalho.

Primer	Sequência	Alvo
PC11	ATAGCCTCGAGTGTCTAAGG	direto pre-miR18
PC12	ATGATAAGCTTTGCCAGAAGG	reverso pre-miR18
PC13	ATAGCCTCGAGGCAGTCCTCTGTTAG	direto pre-miR19
PC14	ATGATAAGCTTGCAGGCCACCATCAG	reverso pre-miR19
PC17	TCTCTTCCGCATCGCTGTCT	direto <i>exon</i> 1 pHMS388
PC18	CCCTGATGGTGTACGGATAT	reverso <i>exon</i> 2 pHMS388
PC19	AGCTGTTGGGCTGCAGGTCG	direto “ <i>exon junction</i> ” pHMS388
PC32	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	M13F
PC33	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	M13Rev
PC166	AATCCCATCACCATCTTCCAG	GAPDH_F
PC167	AAATGAGCCCCAGCCTTC	GAPDH_R
PC162	TGCAAACCCACGAAACCAAG	direto hnRNP A1
PC163	GCTTCCCTGTCACTTCTCTG	reverso hnRNP A1
PC164	AGAGTTCTAGGAGTGGAAGAGG	direto hnRNP A2/B1
PC165	CCCATTATAGCCATCCCCAAA	reverso hnRNP A2/B1
PC182	GCCAGAGAGCTTATCAAAGT	direto DDX17
PC183	GAGAACGACCACCCCC	reverso DDX17
PC184	CAGGCACAGATCACAAGAAC	direto hnRNP L
PC185	GGGTCATCGTAGTTCTCCAAG	reverso hnRNP L
PC186	GACTACAGGTTTGTCCAGAG	direto ELAV1
PC187	GGGGGTTTATGACCATTGAA	reverso ELAV1
PC188	TGAGTCTATAACTCGGAGCC	direto PTBP 1
PC189	ATATCTGGGACAATGCCGTC	reverso PTBP 1

Figura 3 - Representação esquemática do precursor de RNA construído (à esquerda), contendo o microRNA, e do RNA maduro (à direita). Os primers utilizados para analisar a eficiência de *splicing* estão representados por setas. *indica o sítio de ligação da proteína MS2.

3.2 Linhagens celulares

HeLa é uma linhagem tumoral derivada de câncer cervical. É amplamente utilizada e apresenta facilidade de manipulação e transfecção. BCPAP e TPC-I são derivadas de câncer de tireoide (cedidas pela Profa Dra Edna Teruko Kimura, Depto. de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP). As células BCPAP pertencem a uma linhagem de carcinoma papilífero de tireoide com mutação no oncogene BRAF (BRAF^{T1799A}) atuante na via MAPK. Esta linhagem difere da linhagem TPC-I no tipo de mutação, já que esta última é uma linhagem de carcinoma papilífero de tireoide com rearranjo no oncogene RET/PTC-1 também atuante na via MAPK. Essas linhagens são bastante utilizadas em pesquisas relacionadas ao câncer de tireoide e foram selecionadas para este estudo devido à grande quantidade de publicações relacionando miRNAs (em especial do *cluster* miR17-92) à ocorrência do tumor.

3.2.1 Cultura e transfecção

As linhagens foram cultivadas utilizando os mesmos procedimentos. As células foram mantidas em placas de 100 mm em 4-5 mL de meio DME/F12 com 10% de soro fetal bovino; 1,2 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃); em estufa de atmosfera úmida e controlada (95% ar, 5% CO₂) a 37 °C. O meio de cultura foi substituído cerca de três vezes por semana. Os subcultivos foram realizados pouco antes da confluência com solução de Tripsina/EDTA. A solução contendo as células e a Tripsina/EDTA foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento de células foi ressuspensionado em meio DME/F12 sem soro fetal bovino e distribuído igualmente em placas de 100 mm. A transfecção de pHMS-miR18 e pHMS-miR19 e do controle pHMS388 vazio foi realizada com lipofectamina 2000® (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. As transfecções foram realizadas em triplicata biológica, utilizando células com diferentes passagens.

3.3 Análise de *Splicing*

3.3.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Após lise celular realizada em tampão A gelado (10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES pH 7,5, 0,5 mM DTT) utilizando-se um homogeneizador (*Douncer*), o RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) e precipitado com isopropanol e acetato de sódio 3 M pH 5.2. Este material foi então submetido à síntese de cDNA utilizando-se o kit Superscript System (Invitrogen) e primers randômicos, de acordo com as instruções do fabricante. Esses cDNAs foram utilizados em reações de RT-PCR e qPCR para verificar eficiência de *splicing* e nível de expressão gênica.

3.3.2 RT-PCR e qPCR

Os cDNAs sintetizados foram utilizados em reação de RT-PCR convencional e qPCR com o uso de dois pares de primers: PC17 e PC18 (RNA total); PC18 e PC19 (RNA maduro) (Tabela 1, Figura 3). O primeiro par de primers anela na extremidade de cada um dos *exons* do “cassete” do plasmídeo pHMS388, e amplifica o precursor de RNA ou o RNA maduro, por isso foi denominado “RNA total”. O segundo par de primers é constituído por primer direto (PC19) que anela na junção dos *exons* e pelo primer reverso do *exon* 2 (PC18), dessa forma detectando somente o “RNA maduro”. Uma representação esquemática do anelamento dos primers está na Figura 3.

RT-qPCR foi realizado utilizando-se 100 ng de cDNA, os primers mencionados anteriormente, reagente SYBR Green® (Thermo), e analisados em um equipamento ABI 7300 (Applied Biosystems). A eficiência do *splicing* foi calculada com base nos valores de C_T's (*cycle threshold*, ciclos de amplificação) obtidos com os resultados das reações de RNAs maduro e total. O cálculo de eficiência do *splicing* foi realizado considerando o nível de *splicing* do plasmídeo controle (pHMS388 vazio) como normal. Desta forma todos os dados de C_T de amostras contendo miR18a e miR19a foram normalizadas para o C_T do controle. Esse mesmo cálculo foi utilizado para normalizar os dados derivados de resultados com primers para RNA maduro. Assim, a quantidade de C_T's de RNA total e maduro

foram comparadas calculando-se da seguinte forma: $C_T \text{ normal total} - C_T \text{ normal maduro}$. Os resultados obtidos indicaram a quantidade relativa de material total que sofreu *splicing*, gerando RNA maduro.

Como os valores de C_T são inversamente proporcionais à quantidade de material presente na amostra, resultados positivos indicam maior valor de C_T total do que C_T maduro. Isto significa que há mais produto de amplificação nas amostras de RNA maduro do que total, de forma que resultados positivos representam melhor eficiência do *splicing*. Por outro lado, resultados negativos indicam o maior valor de C_T maduro, portanto menos produto amplificado, o que pode indicar menor eficiência do *splicing*.

3.4 Expressão e purificação de MS2:MBP

Para indução da expressão da proteína MS2:MBP, o plasmídeo contendo a sequência MS2:MBP foi transformado em *E. coli* BL21(DE3) e esta bactéria foi cultivada em meio de cultura LB líquido. Após isso, foi realizada a indução de expressão utilizando 0,5 mM de IPTG por 4 h a 37 °C. As células de bactérias foram lisadas em sonicador (QSonica – Q125) e em seguida o extrato celular foi incubado por duas horas com resina Dextrose-sepharose (GE Healthcare) sob agitação. A resina foi lavada em tampão SCB2 (20 mM HEPES pH 7,9, 150 mM KCl, 0,5 mM EDTA) e eluída em tampão SCB2 contendo maltose (10 mM). Para melhorar a purificação da proteína, as amostras foram submetidas a cromatografia de troca iônica utilizando coluna de heparina, e eluídas por gradiente iônico de 0 – 1 M KCl (tampão HB1: 20 mM HEPES pH 7,9, 1 mM EDTA e tampão HB2: 20 mM HEPES pH 7,9, 1 M KCl, 1 mM EDTA).

3.5 Imunoprecipitação do complexo de *splicing*

Para isolar o complexo de *splicing* associado aos miRNAs nas células transfectadas, foi realizada imunoprecipitação utilizando-se a proteína MS2:MBP. O extrato celular foi incubado com 10 μ M MS2:MBP previamente purificada (conforme descrito acima) por duas horas a 4 °C, e então incubada novamente por mais duas horas com resina Dextrose-sepharose, a 4 °C. A resina foi separada do

sobrenadante por centrifugação (10.000 rpm por 10 min a 4 °C) e em seguida lavada por 3 vezes com tampão SCB2. A fusão MS2:MBP, agora presa ao pre-RNA, o qual por sua vez está complexado no spliceossomo, foi eluída em tampão SCB2 contendo 10 mM de maltose. Estas amostras foram utilizadas para extração de proteínas e subsequente análise por espectrometria de massas.

3.6 Espectrometria de Massas

Após imunoprecipitação, as frações da eluição foram submetidas a tripsinização que ocorreu em duas etapas: inicialmente, foi adicionada uma solução 8 M de uréia (1:1), após isso, foi adicionada uma solução de 5 mM DTT e as amostras foram incubadas durante 25 min a 56 °C. Após esse período, foi realizada a alquilação com uma solução de 14 mM IAA. A solução foi incubada por 30 min em temperatura ambiente e protegida da luz. Depois desse período foi realizado o “*quench*” da IAA livre, adicionando novamente 5 mM DTT e incubando por mais 15 min a temperatura ambiente e protegido da luz. As amostras foram então diluídas na proporção de 1:5 em uma solução 50 mM de bicarbonato de amônio para reduzir a uréia a 1,6 M. Posteriormente foi adicionada uma solução de 1 mM de cloreto de cálcio. Assim, as amostras foram submetidas a digestão com tripsina, utilizando-se Tripsina *sequencing grade* (Promega). Essa solução de tripsina foi previamente preparada diluindo-se 20 µg em 1 mL de bicarbonato de amônio 50 mM gelado. Assim, a concentração final de tripsina foi de 20 ng/µL. Essa solução foi adicionada às amostras na proporção 1:50 de enzima:substrato e a mistura foi incubada por 16 h a 37 °C.

Na segunda etapa, as reações foram interrompidas com uma solução TFA (ácido trifluoacético) 0,4% e centrifugadas a 2500 g por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi liofilizado e então as amostras foram armazenadas a -20 °C até a análise em espectrômetro de massas QTOF Premier (LNBio – CNPEM, Campinas – SP). Os dados foram processados e analisados com base em informações do banco de dados (UNIPROT)(www.uniprot.org).

Para avaliar a sua predominância em complexos com ou sem miRNAs, o número de peptídeos identificados foi utilizado para criar um “índice de peptídeo”. Este índice foi calculado dividindo-se o número total de peptídeos observados em spliceossomos formados em precursores contendo miRNAs pelo número total de

peptídeos observados (incluindo o controle sem miRNA) para determinada proteína. Desta maneira, índices mais próximos de zero indicam que a proteína foi identificada de forma majoritária em spliceossomos montados em precursores sem miRNAs no *intron*. De forma similar, índices mais próximos de 1 indicam proteínas predominantes em spliceossomos isolados a partir de precursores contendo miRNAs.

3.7 Análise de expressão gênica

Após a análise por espectrometria de massas, algumas proteínas foram selecionadas para uma análise de expressão em células transfectadas com miR18a e miR19a. As proteínas SF1, hnRNP_G, hnRNP_A1, hnRNP_A2/B1, DDX17, hnRNP_L, ELAV1 e PTBP_I apresentaram resultados relevantes tanto em relação a função desempenhada no processo de *splicing*, quanto na sua relação com miRNAs em *introns*. Desta forma foram desenhados primers específicos para estas proteínas (Tabela 1) e foi realizada análise de qPCR em amostras de cDNA, sintetizados a partir de RNAs das três linhagens celulares transfectadas. Foi utilizado primer para GAPDH como normalizador. O resultado foi obtido através do método do $\Delta\Delta Ct$, calculando o nível de expressão em comparação com o normalizador GAPDH e com relação ao controle com plasmídeo pHMS388 vazio.

4 RESULTADOS

4.1 Análise de *splicing* em *introns* contendo miRNAs

A eficiência do *splicing* em *introns* contendo miRNAs foi estimada utilizando-se RT-qPCR, conforme descrito na Metodologia. Resultados mais positivos indicam um número menor de C_T 's encontrado nas amplificações com primers para RNA maduro, portanto, melhor eficiência do *splicing*. Da mesma forma, resultados mais negativos indicam menor quantidade de RNA maduro na amostra.

Em células HeLa, o processo de *splicing* foi eficiente em todas as réplicas biológicas e na presença de ambos os miRNAs testados, como observado nas Figuras 4 e 5. Considerando-se que a mesma quantidade de células foi utilizada para extração do RNA e que quantidades similares de cDNA foram utilizados nas reações, pode-se observar que a diferença na intensidade das bandas em gel de agarose indica predominância na presença de RNA maduro (Figura 4A). Estes dados foram confirmados por meio de RT-qPCR (Figura 5A). Nesta figura, pode-se observar que amostras contendo miR19a em seus *introns* apresentaram maior eficiência de *splicing* em relação às amostras contendo miR18a, em todas as réplicas biológicas testadas. A eficiência de *splicing* é diretamente proporcional às barras do gráfico. Barras com valor negativo não indicam que o *splicing* não ocorreu, mas sim que há uma maior quantidade de produto de RNA total em comparação com o RNA maduro, indicando assim menor eficiência no *splicing*.

Nas análises com células BCPAP, todas as réplicas biológicas de amostras contendo miR18a, miR19a e com plasmídeo vazio apresentaram *splicing* eficiente, como mostrado na Figura 4B. Os dados de RT-qPCR indicam maior eficiência no *splicing* de amostras contendo miR19a nos *introns* em relação à precursores contendo miR18a, em duas réplicas biológicas (Figura 5B). Estes dados indicam que o *splicing* em precursores contendo miR19a funcionou melhor do que naqueles precursores com miR18a. Em relação ao *splicing* de precursores contendo miR18a em células BCPAP, observou-se menor eficiência em todas as réplicas biológicas, não tendo sido observado nenhum valor positivo, indicando que a quantidade de RNA maduro detectada era menor do que a quantidade de RNA total. Esse resultado pode indicar que o miR19a é preferencialmente processado neste tipo de célula, entretanto estudos mais detalhados são necessários para comprovar isso.

Em células TPC-I, o *splicing* foi eficiente em todas as réplicas biológicas e em todos os tratamentos, como mostrado na Figura 4C. Com relação aos resultados obtidos por RT-qPCR, novamente foi possível observar melhor eficiência em precursores contendo miR19a. Porém, em células TPC-I, amostras contendo miR18a mostraram-se mais eficientes em realizar *splicing* em comparação com as outras linhagens tumorais testadas (Figura 5C).

A análise da eficiência de *splicing* é importante e os resultados obtidos demonstraram que todas as linhagens celulares utilizadas podem realizar o processo normalmente, mesmo quando há um miRNA inserido no *intron*. Outro dado importante é que observou-se uma diferença entre as eficiências do *splicing* na presença de miRNAs diferentes. É possível que a identidade do miRNA no *intron* interfira na eficiência do *splicing* e que isso esteja relacionado ao potencial oncogênico dessas moléculas.

Figura 4 - RT-PCR para verificar a eficiência do *splicing* em células (A) HeLa, (B) BCPAP e (C) TPC-I transfectadas com miR18a, miR19a e controle (vetor pHMS388 sem miRNA) em três réplicas biológicas. M, amplificação com primers para RNA maduro; T, amplificação com primers para RNA total; m, marcador de peso molecular 1 kb (A) e 50 pb (B e C). A seta aponta a região do RNA maduro.

Figura 5 - Gráficos com resultados das análises de eficiência do *splicing*. O RT-qPCR foi realizado em triplicata biológica (eixo x) com as amostras de células transfectadas com precursores contendo miR18a (preto), miR19a (cinza) e apenas com o vetor pHMS388, sem miRNA. Em (A), células HeLa, em (B) células BCPAP e em (C) células TPC-I.

4.2 Imunoprecipitação do complexo spliceossomo e identificação de proteínas

As células transfectadas com precursores contendo miR18a, miR19a e o controle sem miRNAs foram cultivadas por 48 h e utilizadas para preparação de extrato celular. Este extrato foi submetido à imunoprecipitação para isolar complexos de *splicing* montados nos precursores contendo os miRNAs. Para cada tipo celular, foram realizadas três réplicas biológicas de cultivo e imunoprecipitação de complexos. Após a imunoprecipitação, as amostras foram tratadas com tripsina e submetidas à análise por espectrometria de massas. Na Tabela 2 estão as proteínas encontradas em todas as amostras, separadas por linhagem celular. Os números correspondem ao número de peptídeos identificados no banco de dados ("Matches"). Embora a análise realizada não tenha sido quantitativa, esses números podem funcionar como indicativos de abundância de determinado peptídeo e proteína. A análise destes dados permite identificar diversas proteínas componentes

do spliceossomo e relacionadas ao processo de *splicing*. Os peptídeos isolados foram classificados em 4 categorias com base em similaridades de sequência identificadas nos bancos de dados: proteínas associadas ao *splicing*, proteínas associadas a RNA, proteínas da classe hnRNP e proteínas em geral .

Entre as proteínas associadas ao *splicing*, é possível destacar a presença de fatores clássicos, como a PRP19, SMD1 e SMD3 (proteínas componentes dos snRNPs), SNRP200 (U5-200), SNRP116, SF3b4 e *Splicing fator* (SF), indicando que a purificação e isolamento do complexo spliceossomo foi bem sucedida. Além destas, estão presentes helicases como a DDX17, DDX11, e também PTBP_I e proteínas da classe SR (SRSF10, SRSF3 e SRSF9). Neste trabalho, foram consideradas proteínas associadas a RNA aquelas que tem relação com processamento de RNA, mas não estão necessariamente associadas ao spliceossomo. Entre estas, pode-se destacar a proteína ELAV1, fatores de alongação do RNA e a proteína 14-3-3, além de fatores de transcrição. As proteínas da classe das hnRNPs são conhecidas por sua associação com diversos processos de maturação do RNA, miRNA, e também podem compor o spliceossomo (Golan-Gerstl et al., 2011; Guil, Caceres, 2007; Motta-Mena et al., 2010; Qu et al., 2015). Neste trabalho, foram identificadas 19 proteínas da classe das hnRNP, a maioria destas associadas a complexos formados em precursores contendo miRNAs.

A identificação destas proteínas em complexos isolados a partir de precursores contendo ou não miRNAs pode fornecer importantes indícios sobre sua função e atividade no *splicing*. Para avaliar a sua predominância em complexos com ou sem miRNAs, o número de peptídeos identificados foi utilizado para criar um “índice de peptídeo”. Este índice foi calculado conforme descrito na Metodologia. Valores mais próximos de zero indicam que a proteína foi identificada de forma majoritária em spliceossomos montados em precursores sem miRNAs no *intron*. De forma similar, índices mais próximos de 1 indicam proteínas predominantes em spliceossomos isolados a partir de precursores contendo miRNAs. Uma representação gráfica desse índice pode ser encontrada na Figura 6. É importante ressaltar que este índice foi calculado somente para aquelas proteínas que apresentaram ao menos 1 peptídeo em uma das amostras isoladas a partir de miRNA. Estes gráficos contemplam as 4 categorias de proteínas encontradas na tabela 2.

Em células HeLa, entre as proteínas associadas ao *splicing*, a maioria apresentou um índice de 1, indicando que estavam principalmente associadas a spliceossomos formados em precursores contendo miRNAs. Entre estas, é importante destacar proteínas como NONO, PPIA, PTBP_I, PRP19 e SF3B4. Somente SNRP200 (BRR2) e SRRM2 foram exclusivamente encontradas em spliceossomos montados em precursores sem miRNAs. Em células BCPAP, quase todos os peptídeos desta categoria foram encontrados somente em spliceossomos montados em precursores contendo miRNAs, à exceção de NONO. E em TPC-I a maioria dos peptídeos desta classe foram encontrados somente em spliceossomos contendo miRNAs, como SRSF10, SRSF3, SNRPE, SMD1 e SF3B4 (Figura 6A).

Entre as “proteínas associadas ao RNA”, a maioria foi detectada em spliceossomos formados em precursores contendo miRNAs e não no controle em células HeLa. Este foi o caso, por exemplo, de ELAV1 (HuR) e DDX17. As únicas proteínas encontradas em spliceossomos montados em precursores sem miRNAs foram GLN2, SART1 e EF1. Um padrão semelhante foi observado para células BCPAP, e de forma interessante, ELAV1 também foi exclusiva de spliceossomos montados em precursores contendo miRNAs. Os resultados para TPC-I foram mais variáveis. Somente 14-3-3 e PABPC1 foram encontrados exclusivamente na presença de miRNAs (Figura 6B). Entre as proteínas gerais, a maioria foi encontrada em complexos montados em precursores contendo miRNAs, em todas as células analisadas (Figura 6C).

Conforme apontado anteriormente, as hnRNPs estão intimamente ligadas ao processamento de RNAs durante o processo de *splicing* e algumas possuem um papel importante no processamento de miRNAs, este é o caso da hnRNP_A1, que está ligada a transcrição e maturação do miR18a (Guil, Caceres, 2007). De fato, a maioria das hnRNPs foi detectada em spliceossomos formados em precursores contendo miRNAs (Figura 6D).

Tabela 2 - Proteínas identificadas por espectrometria de massas em três linhagens diferentes. Números representam “matches” de proteínas e contém a somatória dos “matches” referentes a três réplicas biológicas.

Proteínas associadas ao <i>splicing</i>	HeLa			BCPAP			TPC-I		
	18	19	ctrl	18	19	ctrl	18	19	ctrl
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component				2					
ATP-dependent RNA helicase A	9	16	9						
Matrin-3 (Fragment)		14	13				3	3	5
Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NONO)	21	13				5			
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIA)	7	7			7		17		3
Polypyrimidine tract binding protein 1, isoform CRA_b (PTBP_I)	4	3					2	1	1
Polypyrimidine tract-binding protein 1 (Fragment) (PTBP_I)	14	7							
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX11		3							
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	25	9		2	4		8	7	5
PRP19	2								
Serine/arginine-rich- <i>splicing</i> factor 10 (SRSF10)							2		
Serine/arginine-rich- <i>splicing</i> factor 3 (SRSF3)		2	3		2		1		
Signal recognition particle 14 kDa protein	7				6		5		2
Signal recognition particle 9 kDa protein	4	1							
Small nuclear ribonucleoprotein E	1	2					1		
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1							1		
SMD1		2	1						
SMD3		1	1						
SNRP200 (U5-200)			1						
<i>Splicing</i> factor 3B subunit 4 (SF3B4)		1						3	
<i>Splicing</i> factor, proline- and glutamine-rich (SF)	15	12					1	3	2
SRRM2			2						
SRSF9		1							
Proteínas associadas ao RNA	HeLa			BCPAP			TPC-I		
	18	19	ctrl	18	19	ctrl	18	19	ctrl
14-3-3 protein epsilon (Fragment)							1	1	
14-3-3 protein zeta/delta					3		4	2	
cDNA FLJ51386		2	0	4	1	1			1
ELAV-like protein 1	2	3			5				
Elongation factor 1-alpha 1	30	19	3	5	13	13	31	36	40
elongation factor 1-alpha 1-like isoform 4			1						

Elongation factor 1-beta	2			2					
Elongation factor 1-gamma	1								
Elongation factor 2	8	5		2	8	2	6	3	10
Eukaryotic initiation factor 4A-I (Fragment)	3								
Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding	3								
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	2	2		1					
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F							2	4	1
GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment)							1		
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 16							2		
NHP2-like protein 1	2			1					
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	1	2					2		
Nucleolar GTP-binding protein 2	1			1					
Nucleophosmin	6			13			3		
Poly(rC)-binding protein 1	3	1		1			3	1	5
Polyadenylate-binding protein 1 (Fragment)							3		
Putative eukaryotic translation initiation factor 2	1	2		1					
RNA binding motif protein, X-linked-like-1				6					
RNA-binding motif protein, X chromosome	7	1		2					
RNA-binding protein FUS	1	2							
SART-1	1								
Transcription factor HIVEP2				2					

hnRNP K	15	14		4		7	10	8	
hnRNP L	2	1							
hnRNP M	7	20	12	2	20	2	4	8	4
hnRNP R		6	5		2		2		
hnRNP U	6	12	10				1		
hnRNPA3 (FBNRP)	1	2	3						
hnRNPL		13	15						
	HeLa			BCPAP			TPC-I		
geral	18	19	ctrl	18	19	ctrl	18	19	ctrl
Chromobox protein homolog 3				7					
Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_a	5	8	0						
DNA repair protein XRCC3 (Fragment)		4							
E3 ubiquitin-protein ligase MARCH7		5					8		
E3 ubiquitin-protein ligase RNF125 (Fragment)								1	
Epiplakin	2								
Huntingtin-interacting protein 1-related protein									2
Hypermethylated in cancer 2 protein				3					
Importin subunit beta-1 (Fragment)	4	1			4				
Importin subunit beta-1	4								
Leucine-rich repeat-containing protein 59							4		
Probable phosphoglycerate mutase 4		1							
Profilin 1, isoform CRA_b	1								
Profilin-1		2							
Proliferation-associated protein 2G4	7	9							
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	5								
Telomere-associated protein RIF1			5						
X-ray repair cross-complementing protein 6	1						3	4	3
Zinc finger and BTB domain-containing protein 14		5							
Zinc finger and BTB domain-containing protein 48								2	
Zinc finger HIT domain-containing protein 2			3						

18. Complexos isolados a partir de precursores contendo miR18a; 19. Complexos isolados a partir de precursores contendo miR19a. ctrl., complexos isolados a partir de vetor sem miRNA.

Figura 6 - Distribuição de peptídeos detectados por espectrometria de massas, de acordo com o índice peptídico (eixo y), separados em diferentes categorias. (A) proteínas associadas ao *splicing*, (B) proteínas associadas a RNAs, (C) proteínas gerais e (D) hnRNPs.

4.3 Análise de expressão gênica

Com base nos resultados obtidos por espectrometria de massas, foram selecionadas algumas proteínas para análise de expressão gênica a partir de células transfectadas com os vetores contendo miRNAs nos *introns*. É importante ressaltar que este experimento não foi realizado com amostras derivadas de imunoprecipitação, mas sim de extratos celulares de células transfectadas com os plasmídeos contendo miRNAs em seus *introns*. O objetivo desse experimento era verificar a expressão das proteínas identificadas em células que transcrevem e processam os miRNAs analisados (miR18a e miR19a). Foram selecionadas as proteínas SF1, hnRNP_A1, hnRNP_A2/B1, hnRNP_G, DDX17, hnRNP_L, ELAV1 e PTBP_I (hnRNP I) e os resultados foram analisados conforme descrito na Metodologia.

Em todas as análises foi possível observar que somente as proteínas SF1 e hnRNP_A2/B1 apresentaram um aumento na expressão em relação ao controle com vetor sem miRNA (Figura 7). Em células HeLa, a expressão de SF1 aumentou cerca de 2 vezes na presença de ambos os miRNAs testados, confirmando o recrutamento desta proteína conforme havia sido observado por espectrometria de massas. A expressão de hnRNP_A2/B1 aumentou cerca de 3 vezes em células contendo precursores com miR18a no *intron*, mas não miR19a, o que é coerente com resultados obtidos por espectrometria de massas. Já no caso das demais proteínas, hnRNP_A1, hnRNP_G, DDX17, hnRNP_L, ELAV1 e PTBP_I observou-se uma redução na sua expressão na presença de ambos os miRNAs, com exceção da proteína PTBP_I que não foi detectada em nossas análises para célula HeLa (Figura 7A).

Para células BCPAP foi possível observar um aumento na expressão das proteínas hnRNP_A1, hnRNP_G, DDX17 e PTBP_I, em *introns* contendo miR18a, o que é coerente com resultados obtidos na espectrometria de massas à exceção de hnRNP_G, que não foi detectada. Por outro lado, embora tenham sido observados peptídeos para ELAV1, a análise de expressão não revelou o mesmo resultado (Figura 7B). Dentre as proteínas restantes que tiveram níveis de expressão menores ou iguais aos do controle, hnRNP_L não foi detectada nas análises de espectrometria de massas. A proteína hnRNP_A2/B1 apresentou maior número de peptídeos detectados na análise por espectrometria de massas na presença de ambos miRNAs. Porém, somente amostras que continham miR18a levaram a um aumento na expressão dessa proteína (Figura 7B).

Para células TPC-I foi possível observar aumento de expressão nas proteínas hnRNP_A2/B1, DDX17 e PTBP_I em células contendo *introns* com miR18a (Figura 7C). No caso de células transfectadas com vetores contendo miR19a nos *introns*, apenas hnRNP_A2/B1 apresentou aumento na expressão. O aumento na expressão de DDX17 e hnRNP_A2/B1 é coerente com os resultados observados por espectrometria de massas. A proteína PTBP_I não foi detectada para essa célula na análise por espectrometria de massas. Todas as outras proteínas que apresentaram redução na expressão (em relação ao controle) não foram detectadas nas análises por espectrometria de massas nesta linhagem.

Figura 7 - Gráficos com resultados de RT-qPCR para análise do nível de expressão de proteínas em (A) HeLa, (B) BCPAP e (C) TPC-I. Foram utilizados extratos de células transfectadas com precursores contendo miR18a no *intron* (cinza claro), miR19a no *intron* (cinza escuro) ou apenas o controle sem miRNA (pHMS388, preto). O desvio padrão foi calculado através de dados de triplicatas biológicas.

5 DISCUSSÃO

A composição dos spliceossomos formados em diferentes pre-RNAs era considerada idêntica até recentemente, quando alguns trabalhos reportaram que proteínas específicas poderiam ser recrutadas dependendo das características dos pre-RNAs (Pleiss et al., 2007; Smith et al., 2008). Neste trabalho, foram construídos pre-RNAs contendo miRNAs nos *introns*, e estes foram inseridos em três linhagens celulares diferentes: HeLa, BCPAP e TPC-I. Além de analisar a eficiência do *splicing* nestas células, os spliceossomos montados nestes pre-RNAs foram isolados e sua composição foi analisada por espectrometria de massas. A hipótese deste trabalho era de que *introns* contendo miRNAs recrutam proteínas específicas, formando spliceossomos com composições distintas. Tais proteínas poderiam facilitar o *splicing* nestes *introns* e também guiar a interação do complexo de *splicing* com o “microprocessador” (Havens et al., 2014; Wee et al., 2014). Neste sentido, os resultados deste trabalho contribuem para a ideia de que os spliceossomos possuem composição variável, e há proteínas específicas que podem ser recrutadas para o *splicing* de pre-RNAs diferentes.

Os resultados de RT-qPCR indicaram que precursores que contêm miRNAs em seus *introns* possuem eficiência do *splicing* diferente daqueles que não tem miRNAs. A eficiência do *splicing* em *introns* contendo miRNAs é reduzida em comparação com *introns* sem miRNAs. É interessante notar que pre-RNAs com miR19a em seus *introns* apresentam melhor eficiência do *splicing* do que aqueles com miR18a. Estes resultados são consistentes com dados da literatura, que mostram uma influência maior de miR19a na oncogênese de tumores de tireoide (Takakura et al., 2008). Além disso, foi confirmado que certos oncogenes podem estimular a expressão do *cluster* miR17-92, em especial, miR19a, interrompendo a sinalização de TGF- β em células de câncer de tireoide (Dews et al., 2010; Fuziwara, Kimura, 2014). Estes dados podem indicar que células tumorais de tireoide possuem os fatores necessários para o processamento de miRNAs pertencentes a esse *cluster*.

5.1 Composição dos spliceossomos

Uma vez que características dos pre-RNAs alteram a eficiência da reação de *splicing*, seria possível supor que os spliceossomos formados também tivessem composições diferentes. De fato, esta hipótese foi confirmada com os experimentos de imunoprecipitação seguidos pela análise por espectrometria de massas. Spliceossomos montados em precursores contendo tanto miR18a como miR19a apresentaram composições diferentes quando comparados a complexos montados na ausência de um miRNA. As proteínas identificadas foram classificadas em 4 categorias: proteínas associadas ao *splicing*, proteínas associadas ao RNA, proteínas da classe das hnRNPs e proteínas gerais. Entre as proteínas isoladas estão proteínas das classes Sm, SR, hnRNP, além de fatores de *splicing* (PRP19, SNRNP200, SF3B4) e helicases (DDX11, DDX17). Muitas destas proteínas estão especialmente concentradas em spliceossomos montados em pre-RNAs com miRNAs nos *introns*.

As RNA helicases são componentes importantes do spliceossomo. A proteína helicase A (ID Q08211) apresenta um aumento na frequência em amostras de spliceossomos montados em pre-RNAs contendo miR19a em comparação com o controle e com precursores contendo miR18a, que permaneceram com valores iguais em células HeLa. Essa proteína, assim como diversas outras helicases, pertence ao grupo proteico das DEAD-Box (DDX) e estudos mostraram que algumas DDX são recrutadas para o reconhecimento de um pri-miRNA pela Drosha (Fukuda et al., 2007). Esses dados indicam que esta proteína, isolada no complexo de *splicing*, poderia funcionar especificamente no processamento de miRNAs, especialmente do miR19a. Outras helicases semelhantes, como a DDX11 e DDX17, também foram identificadas neste trabalho, principalmente em spliceossomos montados em pre-RNAs contendo miRNAs.

Recentemente foi descrito o mecanismo pelo qual DDX5 e DDX17 cooperam com hnRNP_H para definir subprogramas de *splicing* epitélio- específico e mioblasto-específico (Dardenne et al., 2014). Ainda, observou-se que o “knock-down” de DDX5 e DDX17 durante miogênese e transição epitélio-mesenquimal contribui para a mudança de programas de *splicing* durante esses processos (Dardenne et al., 2014). Outro estudo revela uma grande importância da atividade de DDX5 e DDX17 na regulação do *splicing* a nível epigenético, em que uma diferença

no *splicing* da histona H2A1 aumenta o nível de invasão em células tumorais (Dardenne et al., 2012).

Alguns trabalhos confirmaram, ainda, que a proteína DDX5 regula a transcrição de miR21 e miR182 em células de tumor de mama. O alvo desses miRNAs são proteínas do citoesqueleto e podem levar a alteração de padrões de migração celular (Wang et al., 2012). Outro estudo revelou que o “knockdown” de DDX5/17 interferiu negativamente na maturação de miRNAs pela Drosha no “microprocessor”, um forte indicativo para atuação dessas proteínas no processamento de miRNAs (Gregory et al., 2004). O aumento na expressão da proteína DDX17, conforme observado por qPCR, e sua associação à Drosha e ao “microprocessor”, poderia correlacionar a presença desta proteína ao processamento dos miRNAs.

Outra importante proteína encontrada nas análises de espectrometria de massas foi ELAV1 (HuR). De acordo com os resultados, essa proteína apresentou maior número de peptídeos em amostras contendo miRNAs em relação ao controle tanto em células HeLa quanto em BCPAP. Foi identificado que a proteína caspase-2L é alvo de regulação da proteína ELAV1, de forma que o silenciamento desta proteína leva a um aumento significativo de caspase-2L, indicando seu potencial antitumorigênico (Winkler et al., 2014). É possível que ELAV1 aumente a estabilidade de mRNAs durante o transporte para o citoplasma (Brennan et al., 2000). Os dados de espectrometria de massas revelaram a presença de ELAV1 em spliceossomos isolados a partir de precursores contendo miRNAs. É possível que ELAV1 atue também na estabilidade dos miRNAs, ou até mesmo que elas estejam agindo de forma antitumorigênica conforme descrito anteriormente. Além disso, a presença de ELAV1 pode estar relacionada ao desenvolvimento tumoral nestas células.

5.2 Proteínas da classe das hnRNPs

Curiosamente, as análises por espectrometria de massas revelaram muitos peptídeos relacionados à proteínas da classe das hnRNPs, a maioria das quais estava associada à presença de um miRNA no *intron*. De fato, alguns trabalhos reportaram a presença específica de hnRNPs em spliceossomos montados em pre-RNAs contendo miRNAs (Geuens et al., 2016; Havens et al., 2014; Wee et al.,

2014). É possível que estas proteínas mediem a interação do spliceossomo com complexo “microprocessor”, responsável pelo processamento e maturação de miRNAs. Tais proteínas poderiam, por exemplo, guiar e regular o “microprocessor” para *introns* contendo miRNAs, facilitando também o *splicing*.

Além de sua possível atuação no processamento de miRNAs, as proteínas hnRNP atuam na montagem inicial do spliceossomo, e também foram associadas ao controle do *splicing* alternativo (Akerman et al., 2015; Xu et al., 2014). A associação destas proteínas ao pre-RNA pode bloquear o reconhecimento de sítios de *splicing* por componentes do spliceossomo, levando à inibição ou atraso no *splicing* em alguns substratos específicos (Caceres et al., 1997; Nilsen, Graveley, 2010). A proteína hnRNP_A1 foi identificada como componente específico de spliceossomos montados em precursores com miR18a (Guil, Caceres, 2007). No presente trabalho, foi identificada a sua associação também ao miR19a. Os experimentos de qPCR também mostraram aumento na expressão desta proteína em células contendo precursores com ambos miRNAs. Ainda, trabalhos anteriores reportaram que o domínio KH de hnRNP_A1 poderia ter afinidade à estrutura de grampo formada pelo miRNA, ativando a Drosha (Romero-Cordoba et al., 2014). É possível que hnRNP_A1 seja recrutada para o *splicing* deste *cluster*, o que poderia explicar sua associação com spliceossomos montados em precursores contendo tanto miR18a como miR19a. Entretanto, experimentos mais detalhados são necessários para confirmar sua associação ao *cluster*.

Um estudo recente sugere que hnRNP_A2/B1 associa-se à marcas m6A (modificador de mRNA por metilação) em um subconjunto de transcritos de pri-miRNA, interagindo com os componentes do “microprocessor” DGCR8 e Drosha, e promovendo o processamento de pri-miRNA (Alarcon et al., 2015). Os resultados obtidos indicaram que a proteína hnRNP_A2/B1 foi encontrada em abundância em todas as linhagens celulares testadas e em maior concentração em spliceossomos montados em precursores contendo miRNAs. O silenciamento desta proteína em células de camundongos inibiu a formação de glioblastoma, fazendo com que hnRNP_A2/B1 seja considerado um proto-oncogene e importante alvo de estudo na terapia deste câncer (Golan-Gerstl et al., 2011). Também foi demonstrada a expressão de hnRNP_A2/B1 em câncer de pulmão (Qu et al., 2015). Considerando-se que esta proteína está presente em outras linhagens tumorais, e que sua presença foi detectada principalmente nos spliceossomos isolados de precursores

contendo miRNAs, é possível que sua presença regule a expressão dos miRNAs e o desenvolvimento tumoral.

A proteína hnRNP_I (PTBP_I) apresentou mais peptídeos em spliceossomos isolados a partir de precursores contendo miR19a em células BCPAP. Dados da literatura indicam que essa proteína interage atua como reguladora de processos envolvendo RNAs, associando-se a pequenas sequências de pirimidinas. hnRNP_I também interage com miRNAs e com a proteína Argonata 2 (hAgo2), e pode ter participação na regulação gênica mediada por miRNAs, muitas vezes associando-se às regiões 3'UTR (3' *untranslated region*) de transcritos que possuem sequências-alvo para miRNAs (Engels et al., 2012).

A hnRNP_K possui o domínio proteico KH, típico de algumas proteínas de ligação ao RNA, e está associada ao *splicing* de miRNAs em todas as linhagens celulares analisadas neste trabalho. Este domínio age como regulador da estabilidade e/ou taxa de tradução de mRNA, podendo ser um importante regulador do *splicing* (Grishin, 2001). Foi identificado um papel de supressor de apoptose em carcinoma hepatocelular (HCC) da proteína hnRNP_K, independente do *status* de regulação da p53 e caspases (Xiao et al., 2013). Já em câncer renal, foi observado um acúmulo citoplasmático de hnRNP_K, o que promove uma maior invasão do tumor por meio do estímulo de TGF- β (Otoshi et al., 2015).

A proteína hnRNP_F foi observada em associação ao miR18a em células HeLa. Essa proteína está associada ao processo de *splicing* alternativo (Dominguez, Allain, 2006). Junto com a hnRNP_H, hnRNP_F participa de eventos importantes de *splicing* alternativo durante a diferenciação de oligodendrócitos e durante todo seu desenvolvimento *in vivo*. Esses resultados sugerem um forte envolvimento dessas proteínas no processo de *splicing* normal, além da oncogênese (Wang et al., 2012). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, hnRNP_H2 está presente em amostras controle, sem miRNA, e com miR19a, em células HeLa.

A proteína hnRNP_L foi identificada em spliceossomos montados em precursores contendo miR19a e precursores sem miRNAs (controle) em células HeLa. Foi demonstrado que hnRNP_L reprime a inclusão do *exon* 4 de CD45 ao recrutar hnRNP_A1 para uma sequencia a montante do sitio 5' de *splicing*. Juntas, essas proteínas promovem o contato entre o sitio 5' de *splicing* e o snRNP U1, fazendo com que aproxime outras sequencias de *exons*, e por sua vez inibindo a

associação estável do snRNP U6, o que impede a reação do *splicing* (Chiou et al., 2013).

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que há proteínas específicas envolvidas no processamento de pre-RNAs contendo miRNAs nos *introns*. Além de hnRNP_A1, cuja atividade no *splicing* de miR18a já foi reportada (Guil, Caceres, 2007), hnRNP_A2/B1 é uma possível candidata. Esta proteína está presente no spliceossomo formado em pre-RNAs contendo miR18a e miR19a, especialmente em células relacionadas ao câncer de tireoide. Embora seu mecanismo de atividade no *splicing* destes precursores seja pouco explorado, esta proteína pode ser uma importante ligação entre o spliceossomo e o complexo “microprocessor”.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A presença de miR18a e miR19a nos *introns* reduziu a eficiência do *splicing* dos transcritos precursores em três diferentes linhagens celulares.
- As respostas obtidas em todos os testes realizados variaram de acordo com o tipo celular e com o tipo de miRNA.
- Proteínas específicas foram recrutadas para o spliceossomo formado em pre-RNAs contendo miR18a e miR19a, especialmente proteínas da classe das hnRNPs.

7 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados apresentados, novas questões poderão ser exploradas em trabalhos futuros. A investigação do papel específico das proteínas da classe das hnRNPs no *splicing* de precursores contendo miRNAs nos *introns* é um desdobramento natural deste trabalho. Ainda, utilizando algumas das proteínas encontradas especificamente associadas a miRNAs, um estudo sobre o efeito da variação na expressão dessas proteínas na eficiência do *splicing* nesses miRNAs poderá indicar sua relação destas com o processamento dos miRNAs.

Além disso, um estudo mais detalhado sobre a ocorrência dessas proteínas no câncer poderá abrir novas possibilidades de estudos relacionando o desenvolvimento de tumores com o processamento de miRNAs.

REFERÊNCIAS *

- Akerman M, Fregoso OI, Das S, Ruse C, Jensen MA, Pappin DJ, et al. Differential connectivity of splicing activators and repressors to the human spliceosome. *Genome Biol.* 2015;16:119.
- Alarcon CR, Goodarzi H, Lee H, Liu X, Tavazoie S, Tavazoie SF. HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell.* 2015;162(6):1299-308.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 5th Edition ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2008.
- Bioinformatic. Bioinformatic and Research computing [internet] <http://jura.wi.mit.edu/bio/education/HS2009/main.html2009> [cited 2009 06/12/2015].
- Brennan CM, Gallouzi IE, Steitz JA. Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol.* 2000;151(1):1-14.
- Caceres JF, Misteli T, Sreter GR, Spector DL, Krainer AR. Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol.* 1997;138(2):225-38.
- Chan SP, Kao DI, Tsai WY, Cheng SC. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science.* 2003;302(5643):279-82.
- Chiou NT, Shankarling G, Lynch KW. hnRNP L and hnRNP A1 induce extended U1 snRNA interactions with an exon to repress spliceosome assembly. *Mol Cell.* 2013;49(5):972-82.
- Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell.* 2009;136(4):777-93.
- Dardenne E, Pierredon S, Driouch K, Gratadou L, Lacroix-Triki M, Espinoza MP, et al. Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(11):1139-46.
- Dardenne E, Polay Espinoza M, Fattet L, Germann S, Lambert MP, Neil H, et al. RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Rep.* 2014;7(6):1900-13.
- Das R, Zhou Z, Reed R. Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol Cell.* 2000;5(5):779-87.
- Dews M, Fox J, Hultine S, Sundaram P, Wang W, Liu YY, et al. The myc-miR-17~92 axis blunts TGF{beta} signaling and production of multiple TGF{beta}-dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res.* 2010;70(20):8233-46.

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

Dominguez C, Allain FH. NMR structure of the three quasi RNA recognition motifs (qRRMs) of human hnRNP F and interaction studies with Bcl-x G-tract RNA: a novel mode of RNA recognition. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(13):3634-45.

Engels B, Jannot G, Remenyi J, Simard MJ, Hutvagner G. Polypyrimidine tract binding protein (hnRNP I) is possibly a conserved modulator of miRNA-mediated gene regulation. *PLoS One.* 2012;7(3):e33144.

Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K, et al. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2007;9(5):604-11.

Fuziwara CS, Kimura ET. High Iodine Blocks a Notch/miR-19 Loop Activated by the BRAFV600E Oncoprotein and Restores the Response to TGF β in Thyroid Follicular Cells. *Thyroid.* 2014;24(3):453-62.

Geuens T, Bouhy D, Timmerman V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet.* 2016;10.1007/s00439-016-1683-5 [doi] 10.1007/s00439-016-1683-5 [pii].

Golan-Gerstl R, Cohen M, Shilo A, Suh SS, Bakacs A, Coppola L, et al. Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma. *Cancer Res.* 2011;71(13):4464-72.

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

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004;432(7014):235-40.

Grishin NV. KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(3):638-43.

Guil S, Caceres JF. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(7):591-6.

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

Havens MA, Reich A, Hastings ML. Drosha Promotes Splicing of a Pre-microRNA-like Alternative Exon. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004312.

He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 2005;435(7043):828-33.

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

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

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

Kramann R, Moeller MJ. The next level of complexity: post-transcriptional regulation by microRNAs. *Kidney Int.* 2011;80(7):692-3.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J.* 2004;23(20):4051-60.

Li Y, Vecchiarelli-Federico LM, Li YJ, Egan SE, Spaner D, Hough MR, et al. The miR-17-92 cluster expands multipotent hematopoietic progenitors whereas imbalanced expression of its individual oncogenic miRNAs promotes leukemia in mice. *Blood.* 2012;119(19):4486-98.

Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, et al. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science.* 2002;298(5601):2205-8.

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet.* 2009;10(3):155-9.

Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ.* 2013;20(12):1603-14.

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

Nguyen TA, Jo MH, Choi YG, Park J, Kwon SC, Hohng S, et al. Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell.* 2015;161(6):1374-87.

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

Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, et al. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 2009;23(24):2839-49.

Otoshi T, Tanaka T, Morimoto K, Nakatani T. Cytoplasmic Accumulation of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Strongly Promotes Tumor Invasion in Renal Cell Carcinoma Cells. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145769.

Pleiss JA, Whitworth GB, Bergkessel M, Guthrie C. Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress. *Mol Cell.* 2007;27(6):928-37.

Qu XH, Liu JL, Zhong XW, Li XI, Zhang QG. Insights into the roles of hnRNP A2/B1 and AXL in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2015;10(3):1677-85.

Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(11):1444-55.

Smith DJ, Query CC, Konarska MM. "Nought may endure but mutability": spliceosome dynamics and the regulation of splicing. *Mol Cell.* 2008;30(6):657-66.

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

Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, Rogounovitch TI, et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci.* 2008;99(6):1147-54.

UNIPROT. [internet] <http://www.uniprot.org> [cited 2015 10/12/2015].

Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell.* 2009;136(4):701-18.

Wang D, Huang J, Hu Z. RNA helicase DDX5 regulates microRNA expression and contributes to cytoskeletal reorganization in basal breast cancer cells. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(2):M111 011932.

Wee CD, Havens MA, Jodelka FM, Hastings ML. Targeting SR Proteins Improves SMN Expression in Spinal Muscular Atrophy Cells. *PLoS One.* 2014;9(12):e115205.

Will CL, Luhrmann R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7):pii: a003707.

Winkler C, Doller A, Imre G, Badawi A, Schmid T, Schulz S, et al. Attenuation of the ELAV1-like protein HuR sensitizes adenocarcinoma cells to the intrinsic apoptotic pathway by increasing the translation of caspase-2L. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1321.

Xiao Z, Ko HL, Goh EH, Wang B, Ren EC. hnRNP K suppresses apoptosis independent of p53 status by maintaining high levels of endogenous caspase inhibitors. *Carcinogenesis.* 2013;34(7):1458-67.

Xu Y, Gao XD, Lee JH, Huang H, Tan H, Ahn J, et al. Cell type-restricted activity of hnRNPM promotes breast cancer metastasis via regulating alternative splicing. *Genes Dev.* 2014;28(11):1191-203.