MARIA GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

**Regulação da biogênese de microRNAs
por proteínas hnRNPs**

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

São Paulo

2019

MARIA GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

**Regulação da biogênese de microRNAs
por proteínas hnRNPs**

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

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento

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

2019

RESUMO

DOS SANTOS, M.G.P. **Regulação da biogênese de microRNAs por proteínas hnRNPs**. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O *splicing* é um processo crítico para expressão gênica em eucariotos, pois os genes são transcritos como pré-mRNAs, os quais são compostos por *exons* (sequências que permanecem nos mRNAs maduros) e *introns* (sequências intermediárias). O processo de *splicing* envolve a excisão de *introns* e a ligação de *exons*, resultando em transcritos maduros (mRNA). Este processo é realizado por uma maquinaria complexa chamada spliceossomo, que é composta por cinco pequenos RNAs associados a proteínas (snRNAs) e mais de 100 proteínas, sendo que algumas podem associar-se transitoriamente a componentes de spliceossomo ou aos pré-mRNAs. As hnRNPs são proteínas que podem associar-se ao complexo spliceossomo, desempenhando um papel regulador nos locais de *splicing* e frequentemente envolvidas na mediação de *splicing* alternativo. No genoma humano, mais de 70% dos miRNAs estão localizados em *introns*, portanto, é possível que o processo de *splicing* seja importante para sua maturação. O aumento da expressão do *cluster* de miRNAs *miR-17-92* já foi relacionado ao desenvolvimento de muitas patologias, como câncer de tireoide, câncer de pulmão e linfoma. Estudos anteriores mostraram que a hnRNP A1 é importante para a maturação de do *miR-18a*. Neste trabalho nós investigamos a potencial associação das proteínas hnRNP A1 e hnRNP G aos miRNAs do *cluster miR-17-92*. Os resultados mostraram que a hnRNP A1 está associada a outros membros do *cluster miR-17-92*, e que a superexpressão dessa proteína aumenta as capacidades proliferativa, migratória e invasiva em células de câncer papilífero de tireóide, BCPAP.

Palavras-chave: RNA. Splicing. Proteínas hnRNPs. MicroRNAs. *MiR-17-92*.

ABSTRACT

DOS SANTOS, M.G.P. **Regulation of microRNAs biogenesis by hnRNP proteins.** 2019. 68 p. Master thesis (Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Splicing is a critical process for gene expression in eukaryotes, as genes are transcribed as pre-mRNAs, which are composed of exons (sequences that remain in mature mRNAs) and introns (intermediate sequences). The splicing process involves intron excision and junction of exons, resulting in mature transcripts (mRNA). This process is performed by a complex machinery called spliceosome, which is composed by five snRNAs and more than 100 proteins, some of which may transiently associate with spliceosome components or pre-mRNAs. HnRNPs are proteins that can associate with the spliceosome complex, playing a regulatory role at splicing sites and often involved in alternative splicing mediation. In the human genome, over 70% of miRNAs are located in introns, therefore, it is possible that the splicing process is important for their maturation. Increased *miR-17-92* cluster expression levels have been related to the development of many pathologies, such as thyroid cancer, lung cancer and lymphoma. Previous studies have shown that hnRNP A1 is important for *miR-18a* maturation. We investigated the potential association of hnRNP A1 and hnRNP G proteins with miRNAs from the *miR-17-92* cluster. The results showed that hnRNP A1 is associated with other members of the *miR-17-92* cluster, and that overexpression of this protein increases the proliferative, migratory and invasive capabilities of papillary thyroid cancer cells, BCPAP.

Keywords: RNA. Splicing. HnRNPs proteins. MicroRNAs. *MiR-17-92*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Splicing*

Em eucariotos a grande maioria dos genes é composta por sequências codificadoras, os *exons*, separadas por sequências intermediárias denominadas *introns*. Ainda durante sua transcrição no núcleo, os precursores de RNAs (pré-RNAs) são processados para remoção dos *introns* e união dos *exons*, um processo denominado *splicing*, gerando sequências de RNAs maduras, prontas para serem traduzidas. As diversas reações necessárias para que os *introns* dos pré-mRNAs sejam removidos são catalisadas por uma grande maquinaria ribonucleoproteica (RNP), chamada spliceossomo (Lee, Wang and Rio 2018; Hoskins and Moore 2012). O spliceossomo é composto por 5 pequenos RNAs nucleares associados a proteínas (snRNPs), denominados U1, U2, U4, U5 e U6, e por mais de 150 outras proteínas. O spliceossomo atua por meio de interação com sítios conservados localizados nas fronteiras entre *introns* e *exons*, e principalmente por sítios contidos em *introns* (Will and Luhrmann 2011).

Durante o processo de *splicing*, primeiramente ocorre o reconhecimento do snRNP U1 ao sítio de *splicing* (figura 1) localizado na extremidade 5' do *intron* (sequência consenso GUAUGU). Em seguida, ocorre a ligação do snRNP U2 ao sítio de ramificação (*branchpoint*) no *intron* (sequência consenso UACUAAC), ocorrendo o recrutamento dos snRNPs U4/U6-U5. A partir disso há diversos rearranjos que promovem a dissociação dos snRNPs U1 e U4, formando um complexo catalítico capaz de mediar 2 reações consecutivas de transesterificação, sendo a primeira responsável pela liberação do *exon* 5', e a segunda pela junção dos *exons* e liberação do laço intrônico (Staley and Guthrie 1998; Vigevani et al. 2017).

O spliceossomo é montado *de novo* a cada novo *intron*, tornando assim o processo de *splicing* extremamente dinâmico. Importante ressaltar que a composição da maquinaria varia a cada etapa do processo, o que consequentemente requer uma grande disponibilidade de snRNPs livres e prontos para serem recrutados de acordo com a demanda. Com isso, a quantidade de cada

complexo integrante do spliceossomo é altamente dependente da taxa de reciclagem dos snRNPs (Fourmann et al. 2013). Paralelamente a isso, os *introns*, por sua vez, podem ser direcionados para degradação no final do processo, mas cada vez mais estudos mostram que muitos RNAs não codificadores estão contidos nestes *introns*, e, portanto, é possível que uma grande parte deles seja processada (Westholm and Lai 2011). A proteína DRB1 é uma importante peça para a reciclagem dos snRNPs, além de auxiliar na linearização do laço intrônico, possibilitando assim o processamento de *introns*. Baixos níveis de DRB1 levam a menores taxas de reciclagem de alguns snRNPs, refletindo na disponibilidade dos complexos do spliceossomo, sugerindo assim que essa proteína possui um papel regulatório (Han, Tang and Smith 2010).

Algumas proteínas envolvidas no processamento de RNA, como SF3A1, PRPF8 e PRPF19, e aproximadamente dez RNA helicases, como a SNRNP200, participam da formação do spliceossomo (Jurica and Moore 2003; Meyer and Vilardeell 2009). A SNRNP200 promove importante interação do snRNA U5 com os outros componentes associados ao snRNP U5. Esta proteína está associada aos processos de formação do núcleo catalítico do spliceossomo, e também à desmontagem e reciclagem do complexo (Absmeier, Santos and Wahl 2016; Zhang et al. 2015). A PRPF8 regula a atividade da RNA helicase SNRNP200 (Grainger and Beggs 2005). Mutações na região reguladora de PRPF8 estão ligadas ao desenvolvimento de retinite pigmentosa (Boon-Unge et al. 2007; Hoskins and Moore 2012; Mayerle and Guthrie 2016).

Figura 1. Processo de *splicing*. Representação esquemática do processo de *splicing* e a montagem dos complexos do spliceossomo. Na parte superior destacam-se os sítios de *splicing* presentes nos pré-mRNA, localizados nas regiões 5', 3' e sítio de ramificação, e que são conservados. A montagem do spliceossomo ocorre a partir do reconhecimento destes sítios pelas snRNPs (como descrito em 1.1), e após diversos rearranjos, há a formação do complexo C do spliceossomo, onde ocorrem as duas reações de transesterificação, culminando na excisão do *intron* e junção dos *exons* (Adaptado de Coltri, Dos Santos and da Silva 2019).

1.1.1 *Splicing* alternativo

A regulação do processo de *splicing* já foi associada à presença de proteínas que atuam de forma transitória no complexo. O *splicing* alternativo é um mecanismo pelo qual uma molécula de pré-RNA pode dar origem a diferentes RNAs maduros, através da remoção ou inclusão de *exons*, sendo essas novas moléculas conhecidas como transcritos alternativos ou isoformas. Cerca de 85% dos genes em eucariotos são submetidos ao *splicing* alternativo (Carazo, Romero and Rubio 2019; Chen and Weiss 2015; Nilsen and Graveley 2010).

O uso de sítios alternativos de *splicing* depende de regulação, muitas vezes executada por proteínas associadas a sequências regulatórias presentes nos pré-

mRNAs. Algumas das sequências regulatórias estão presentes nos *exons*, como os ESE (*exonic splicing enhancer*) e ESS (*exonic splicing silencer*), e outras estão contidas em *introns*, como os ISE (*intronic splicing enhancer*) e ISS (*intronic splicing silencer*). Algumas famílias de proteínas, como as hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) e proteínas SR (*serine-arginine rich*), são frequentemente associadas a tais sequências (Coltri et al. 2019). É possível obter-se transcritos alternativos e distintos dependendo da condição da célula, ou da etapa de desenvolvimento do organismo (Vigevani et al. 2017). A atuação das proteínas que modulam o *splicing* pode ainda interferir diretamente nas interações entre os componentes do spliceossomo e os RNAs (Han et al. 2010). Mutações nos sítios de *splicing* podem levar ao desenvolvimento de algumas doenças, como por exemplo esclerose lateral amiotrófica (ALS), autismo, demência Frontotemporal (DFT), Doença de Alzheimer, e diversos tipos de câncer (Geuens, Bouhy and Timmerman 2016; Scotti and Swanson 2016; Yoshida et al. 2011).

Existem diversos padrões alternativos de *splicing*. Um dos mais frequentes é conhecido como “*exon skipping*”. Caracteriza-se pela “não inclusão” de um *exon* na isoforma madura do mRNA em questão. A Distrofia muscular de Becker é causada por *splicing* alternativo no gene DMD: neste caso ocorre *exon skipping* do *exon 74*, o qual não é incluído no mRNA maduro (Keegan, Wilton and Fletcher 2019). A “retenção de *intron*” (*intron retention*) é um padrão de *splicing* alternativo que, como o próprio nome diz, caracteriza-se pela retenção parcial ou total de um *intron*. Esse padrão está geralmente associado com a regulação negativa de fatores de *splicing*, e é comum em células do sistema imune, como por exemplo na ativação de linfócitos T e na granulopoesse (Fiszbein and Kornblihtt 2017; Wong et al. 2013). Já o “*splicing* mutuamente exclusivo” (*mutually exclusive splicing*) é o padrão no qual um ou mais *exons* são removidos durante o processo de *splicing*, e, portanto, não permanecem no mRNA maduro. Geralmente ocorre quando há *exons* com sequências muito similares, porém, a exclusão de um ou mais *exons* acarreta em isoformas diferentes com funções distintas, o que aumenta significativamente o proteoma de eucariotos (Nilsen and Graveley 2010). Um outro padrão de alternativo de *splicing* ocorre quando há reconhecimento de um sítio críptico. Este, por sua vez, caracteriza-se por ser uma sequência similar às sequências consensos, porém localizado no meio de um *intron* ou um *exon*. Quando utilizado, leva a formação de isoformas parcialmente ou integralmente disfuncionais. Alguns tipos de câncer de

mama, e síndrome de Hutchinson-Gilford, por exemplo, são desencadeados pelo uso de sítios crípticos (DeBoever et al. 2015; Scaffidi and Misteli 2006).

Entre as proteínas que atuam na seleção e reconhecimento de sítios de *splicing* estão alguns componentes da família das hnRNP. Neste sentido, muitas hnRNP atuam como mediadoras do *splicing* alternativo (Martinez-Contreras et al. 2007).

1.2 Proteínas hnRNP

As hnRNPs são proteínas que possuem domínios de ligação a RNAs e compreendem uma grande família associada a transcritos produzidos pela RNA polimerase II, participando de vários aspectos do metabolismo de ácidos nucleicos (Geuens et al. 2016). Uma característica importante dessas proteínas é a presença de domínios (*motifs*) que lhes permitem interagir de maneira muito específica com os RNAs, como os domínios RRM (*RNA-recognition motif*), que devido a sua estrutura tridimensional formada por α -hélices e folhas- β , permitem que estas proteínas se associem com grande afinidade aos RNAs. Além deste, as hnRNPs contêm os domínios RGG, que são domínios auxiliares constituídos por diversos resíduos de arginina e glicina, e que podem interagir direta ou indiretamente com RNAs (Chen et al. 2013). Essas proteínas podem ser submetidas a diversas modificações pós-traducionais, como metilação, ubiquitinação e fosforilação, o que permite maior regulação de suas atividades na especificidade das ligações aos RNAs e interações com outros fatores celulares. Além disso, tais modificações podem alterar a localização celular dessas proteínas. A maioria das hnRNPs estão localizadas no núcleo, pois possuem o sinal de localização nuclear (NSL). Entretanto, após algumas modificações pós-traducionais, ou até mesmo pelo estímulo de outras hnRNPs, elas podem migrar para o citosol (Han et al. 2010).

Inicialmente essas proteínas foram relacionadas às funções de “empacotamento” dos transcritos recém-sintetizados, de modo que eram observadas associadas aos precursores de mRNAs em estruturas organizadas de maneira muito semelhante aos nucleossomos. De fato, as hnRNPs possuem papéis regulatórios importantes, seja por meio de ligações às sequências regulatórias presentes nos transcritos, seja por associação a outros fatores regulatórios (Beyer et al. 1977; Pinol-Roma et al. 1988).

Dentre outras atividades desempenhadas por hnRNPs estão a promoção de *splicing* alternativo, estabilização de RNAs mensageiros (mRNAs) e regulação de transcrição e tradução (Geuens et al. 2016). Mutações em algumas proteínas hnRNPs podem levar ao desenvolvimento de diversas patologias degenerativas, tais como esclerose lateral amiotrófica, degeneração lobar frontotemporal e atrofia muscular espinhal (Kapeli, Martinez and Yeo 2017; Moursy, Allain and Clery 2014). Além disso, os níveis de expressão das hnRNPs encontram-se alterados em diversos tipos de câncer, como por exemplo câncer de mama e neuroblastoma (Geuens et al. 2016; Huelga et al. 2012; Pino et al. 2003; Tauler et al. 2010).

As hnRNPs modulam o *splicing* alternativo de diversos pré-mRNAs, e são conhecidas como “reguladores negativos”, devido a sua capacidade de reconhecerem principalmente os sítios silenciadores nos *exons* e *introns*. Na maioria dos casos, a associação das hnRNP “esconde” ou “bloqueia” os sítios de *splicing*, levando a diferentes configurações de *splicing* alternativo. O padrão de “*exon skipping*” é o mais frequentemente encontrado (Martinez-Contreras et al. 2007; Sharma et al. 2008). Algumas hnRNPs, entretanto, já foram associadas à inclusão de *exons* em alguns transcritos, como as hnRNP F, H1, M e U (Huelga et al. 2012). De maneira geral, as hnRNPs são cooperativas e tem alta sobreposição nos alvos em que podem se ligar, o que faz com que o resultado do *splicing* dependa de uma combinação das proteínas presentes (Huelga et al. 2012).

1.2.1 hnRNP G

A proteína hnRNP G, também conhecida como RBMX (*RNA binding motif gene, X chromosome*), é transcrita a partir do gene RBMX, localizado no cromossomo X, e possui um parálogo (RBMX) no cromossomo Y (Elliott 2004; Kanhoush et al. 2010). Esta sequência codificadora, de 1176 pb, resulta em proteína de massa molecular de aproximadamente 42 kDa e 391 aminoácidos (www.uniprot.org).

Essa proteína está envolvida na regulação da expressão gênica por meio da promoção de *splicing* alternativo, através do reconhecimento das sequências AAUG e CC(A/C) no pré-mRNA (Dreyfuss et al. 1993; Heinrich et al. 2009; Hirschfeld et al. 2015). A hnRNP G controla a seleção de sítios de *splicing* em células somáticas (Soulard et al. 1993), e inibe o *splicing* do *exon* 10 do gene MAPT, cuja

desregulação dos níveis de expressão está associada ao desenvolvimento de demência frontotemporal (Wang et al. 2011). Por outro lado, elevados níveis de hnRNP G estão associados a melhores prognósticos de pacientes com câncer endometrial, por meio da regulação de *splicing* alternativo do *exon 7* dos receptores de estrógeno alfa ER- α (Hirschfeld et al. 2015).

A proteína hnRNP G também regula de forma negativa o *splicing* de mRNAs do HPV 16 (*Human papilloma virus*), inibindo a inclusão de alguns *exons* aos mRNAs maduros (Yu et al. 2018). Estudos mostraram que o HPV 16 aumenta a expressão do gene DNMT1, que por sua vez diminui a expressão de *miR-375*, que tem papel importante na regulação da proliferação de alguns tipos celulares. Desse modo, a presença desse vírus está associada ao desenvolvimento de processos carcinogênicos (Jayamohan et al. 2019; Liu et al. 2016; Yu et al. 2018).

1.2.2 hnRNP A1

A proteína hnRNPA1 é a mais estudada da família das hnRNPs, e também faz parte da subfamília hnRNP A / B, que compreende um dos grupos mais abundantes de proteínas nucleares nas células em proliferação (Barraud and Allain 2013). A sequência codificadora, de 963 pb, é transcrita a partir do gene HNRNPA1 localizado na região 12q13.1 do cromossomo 12. A proteína possui 372 aminoácidos, e massa molecular de aproximadamente 38 kDa. A hnRNP A1 possui 2 domínios RRM próximos ao N-terminal, que são divididos nos “*submotifs*” RNP-1 e RNP-2. Estes domínios são essenciais para promover a interação desta proteína com RNAs. Além disso, possui uma cauda flexível rica em glicina próximo ao C-terminal, na qual encontra-se uma sequência denominada M9, responsável por sua importação e exportação nuclear (He and Smith 2009). A hnRNP A1 associa-se ao DNA telomérico através de seus domínios RRM 1 e RRM 2, estimulando a atividade da enzima telomerase, e consequentemente auxiliando no alongamento das regiões teloméricas, atividade importante nas transformações celulares malignas (Roy et al. 2017).

Estudos baseados em análises proteômicas comprovaram que a hnRNP A1 participa de todas as etapas do processo de montagem do complexo do spliceossomo, além de auxiliar na distinção de sítios de *splicing* crípticos e funcionais (Tavanez et al. 2012; Zhou et al. 2002). Além disso, a hnRNP A1 é uma

importante mediadora de *splicing* alternativo. A exemplo disso, a hnRNP A1 regula o *splicing* alternativo de genes chaves como CD44 e c-MYC. CD44 codifica um receptor de membrana celular que está frequentemente superexpresso em diversos tipos de câncer, promovendo taxas aumentadas de migração e invasão celular. O gene c-MYC é um oncogene e codifica uma proteína conhecida por ser uma grande reguladora de processos tumorigênicos, e por estar envolvida no controle da proliferação e metabolismo celular. Deste modo, a proteína hnRNP A1 é potencialmente um componente de grande relevância em diversas etapas da progressão do tumor (Lee et al. 2018; Loh et al. 2015; Miller et al. 2012; Senbanjo and Chellaiah 2017). Diversos estudos apontaram que a própria hnRNP A1 está superexpressa em muitos tipos de tumores sólidos e hematológicos, como o linfoma de Burkitt, leucemia, mieloma múltiplo, câncer de próstata e câncer de pulmão (Brockstedt et al. 1998; Carabet et al. 2019; Shi et al. 2011).

De forma interessante, a hnRNP A1 parece ser também um elemento significativo para a maturação de alguns miRNAs. A exemplo disso, estudos prévios mostraram que esta proteína está associada ao *miR-18a*, associando-se ao *loop* terminal do pri-miR-18a (figura 2), promovendo a desestabilização da estrutura secundária do miRNA e facilitando, assim, a clivagem pela Drosha (Guil and Caceres 2007; Kooshapur et al. 2018).

Figura 2. Representação esquemática da associação entre hnRNP A1 e pri-miR-18a. Do lado esquerdo da figura há a representação da estrutura do pri-miR18a, destacando-se em cor-de-rosa a região do *loop* terminal. À direita estão representados os domínios RRM1 e RMM2 da hnRNP A1 associados ao *loop* terminal do pri-miR-18a, promovendo um “relaxamento” (indicado pelas setas horizontais) dessa estrutura, facilitando assim a atividade catalítica realizada pela Drosha (Adaptado de Kooshapur et al. 2018).

1.3 miRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA de 18-25 nucleotídeos, não-codificadoras, que possuem funções reguladoras de expressão gênica (Jones et al. 2012), desde o remodelamento da cromatina até o controle da tradução de mRNAs específicos (Bartel 2004). Os miRNAs também estão envolvidos em inúmeros processos biológicos, tais como embriogênese e desenvolvimento, além de participarem de processos relacionados ao controle do ciclo celular, como a regulação da proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. Tais processos são de extrema importância no surgimento e progressão do câncer, e por esse motivo, muitos estudos já demonstraram que os miRNAs estão associados ao processo de tumorigênese (Cai et al. 2015).

Aproximadamente 70% dos miRNAs humanos são transcritos a partir de *introns*, de maneira que os mecanismos envolvidos com a regulação do *splicing* são importantes para compreender a maturação dos miRNAs (Franca, Vibranovski and Galante 2016). O processo de biogênese dos miRNAs (figura 3) é iniciado através de transcrição mediada pela RNA polimerase II, gerando um miRNA primário (pri-miRNA). Em seguida, o pri-miRNA é processado por um complexo que inclui a endonuclease Drosha e DGCR8 denominado microprocessador, dando origem ao miRNA precursor (pré-miRNA), ainda no núcleo (Nguyen et al. 2013). Após isso, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma com o auxílio da molécula Ran-GTP e da proteína Exportina-5. Já no citoplasma, um complexo proteico do qual a Dicer faz parte, atua neste pré-miRNA gerando o miRNA maduro, um RNA dupla fita (duplex) de aproximadamente 20 nucleotídeos associado ao complexo RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) (Lin, Miller and Ying 2006).

O mecanismo de ação dos miRNAs está diretamente relacionado ao grau de complementaridade no pareamento com a sequência alvo nos mRNAs. Isto é, pareamentos com altos níveis de complementariedade entre miRNAs e a sequência alvo, culminam na degradação do RNA. Por outro lado, pareamentos com baixos níveis de complementariedade, ou pareamentos “imperfeitos”, levam ao bloqueio da tradução, impedindo a passagem do ribossomo (Mohr and Mott 2015). A ação dos miRNAs pode variar dependendo do seu gene alvo. A atividade do miRNA depende muito do tipo de mRNA que ele terá como alvo. Em caso do alvo ser um supressor tumoral, a expressão do miRNA poderá levar ao fenótipo de maior proliferação

celular. Do mesmo modo, se o alvo for um oncogene, a presença do miRNA pode reduzir o crescimento celular (Esquela-Kerscher and Slack 2006; Treiber, Treiber and Meister 2019). Diversas alterações na expressão de miRNAs foram reportadas em câncer de pulmão, pâncreas, estômago, ovário e leucemias (Lu et al. 2005; Volinia et al. 2006).

Embora representem apenas 1% do genoma de mamíferos, grande parte dos miRNAs estão localizados em regiões associadas à amplificação e translocação em cânceres (He et al. 2005). Os miRNAs também podem ser encontrados em regiões pouco estáveis no genoma. A exemplo temos os miRNAs 15 e 16-1, que estão em uma determinada região do cromossomo 13 frequentemente deletada em pacientes com alguns tipos de câncer hematológicos (Calin et al. 2002; Esquela-Kerscher and Slack 2006).

Figura 3. Processamento de miRNAs. Representação esquemática da biogênese de miRNAs através da via canônica. Os miRNAs são transcritos a partir de diferentes origens, como por exemplo a partir de genes próprios, que podem ser monocitrônicos ou policitrônicos, e de *introns*. Os pri-miRNAs são primeiramente processados pelo microprocessador, formando os pré-miRNAs, que são exportados para o citoplasma através da Exportina 5. No citoplasma os pré-miRNAs são processados pela Dicer, formando os duplex de miRNAs. Estes então são direcionados ao complexo RISC, finalizando o processamento, e então os miRNAs maduros podem se associar aos seus mRNAs alvos (Adaptado de Treiber et al. 2019).

1.4 MiR-17-92

Os miRNAs podem ser transcritos de forma única ou então em *clusters*, gerando transcritos de pri-miRNA policistrônicos. O *cluster* de miRNAs *miR-17-92* é transcrito a partir de um *intron* do gene MIR17HG (cromossomo 13), e é composto pelos miRNAs *miR-17-5p*, *miR-17-3p*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR19b* e *miR-92-1* (figura 4) (He et al. 2005; Venturini et al. 2007).

O *cluster miR-17-92* é um componente-chave de diversas patologias, por meio da regulação de um gene alvo comum através da ativação da via PI3K/AKT. Essa via está relacionada com a proliferação celular, por meio da fosforilação de AKT por PI3K ativado. O inibidor fisiológico dessa via é o PTEN, que desfosforila PI3K, impedindo a ativação de AKT, e, portanto, limitando a proliferação celular (Bian et al. 2013; Hemmings and Restuccia 2012). O *cluster miR-17-92* atua regulando de maneira negativa a transcrição do PTEN, permitindo que as células proliferem de forma exacerbada, o que pode acarretar em processos tumorigênicos (Bai et al. 2019).

A expressão aberrante desses miRNAs está relacionada a diversos tipos de doenças, tais como Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), câncer de pulmão, linfomas e fibrose cística (He et al. 2005). O gene c-MYC é um potente regulador e estimula a transcrição desse *cluster*, e o fator de transcrição E2F1 é um dos alvos desses miRNAs (Concepcion, Bonetti and Ventura 2012; Mihailovich and Bonaldi 2016).

Uma característica particular deste *cluster* é que os seus componentes são processados de forma independente, e, de fato, concentrações diferentes de cada miRNA podem ser observadas em algumas patologias. Por exemplo, determinados miRNAs deste *cluster* podem ser encontrados superexpressos em alguns tipos de câncer, enquanto os outros componentes estão expressos em níveis basais. O *miR-19a* é considerado um dos principais componentes oncogênicos do *cluster miR-17-92*, e está relacionado ao desenvolvimento de linfomas (Olive et al. 2009). *MiR-92a*, por outro lado, é o principal componente desse cluster associado ao desenvolvimento de câncer colorretal (Tsuchida et al. 2011).

Figura 4. Representação esquemática da estrutura secundária do pri-miR-17-92. As sequências dos pré-miRNAs estão em diferentes cores, seguindo a sequência pela qual são transcritas. As linhas verticais paralelas (preto) correspondem às sequências dos miRNAs maduros. NMSL (*non-miRNA containing stem-loop*) é uma estrutura que não resulta em um miRNA (Adaptado de Chaulk et al. 2011).

Considerando-se que o *cluster miR-17-92* é intrônico, é possível que a regulação de sua expressão esteja relacionada à atividade do spliceossomo. Recentemente, dados obtidos em nosso laboratório revelaram a presença de proteínas da família das hnRNPs em complexos spliceossomo isolados a partir de células tumorais de tireoide (Paiva, Kimura and Coltri 2017). Proteínas como hnRNP G, L, R, U e A1 foram observadas apenas em spliceossomos isolados formados a partir de *introns* com miRNAs do *cluster*. Desta forma, nossa hipótese para esse trabalho foi de que é possível que as proteínas hnRNPs estejam associadas a *introns* contendo miRNAs, e que possam mediar seu *splicing* em células tumorais.

6 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

- i. A superexpressão de hnRNP A1 aumenta os níveis dos miRNAs *miR-17a*, *miR-18a* e *miR-19a*.
- ii. A proteína hnRNP A1 está associada ao *miR-18a*, e também aos miRNAs *miR-17a* e *miR-19a*.
- iii. A proteína hnRNP A1 regula o *splicing* do gene MIR17HG, estimulando a produção de isoforma que contém o *intron 3* (transcrito 203).
- iv. A superexpressão de hnRNP A1, e o consequente aumento dos níveis de expressão do *cluster miR-17-92*, elevam as taxas de proliferação, migração e invasão celulares, possivelmente associando o aumento da biogênese destes miRNAs ao desenvolvimento de neoplasias malignas.

REFERÊNCIAS*

- Absmeier, E., K. F. Santos & M. C. Wahl (2016) Functions and regulation of the Brr2 RNA helicase during splicing. *Cell Cycle*, 15, 3362-3377.
- Bai, X., S. Hua, J. Zhang & S. Xu (2019) The MicroRNA Family Both in Normal Development and in Different Diseases: The miR-17-92 Cluster. *Biomed Res Int*, 2019, 9450240.
- Barraud, P. & F. H. Allain (2013) Solution structure of the two RNA recognition motifs of hnRNP A1 using segmental isotope labeling: how the relative orientation between RRM s influences the nucleic acid binding topology. *J Biomol NMR*, 55, 119-38.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97.
- Beyer, A. L., M. E. Christensen, B. W. Walker & W. M. LeSturgeon (1977) Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell*, 11, 127-38.
- Bian, S., J. Hong, Q. Li, L. Schebelle, A. Pollock, J. L. Knauss, V. Garg & T. Sun (2013) MicroRNA cluster miR-17-92 regulates neural stem cell expansion and transition to intermediate progenitors in the developing mouse neocortex. *Cell Rep*, 3, 1398-1406.
- Bjersand, K., T. Seidal, I. Sundstrom-Poromaa, H. Akerud & I. Skirnisdottir (2017) The clinical and prognostic correlation of HRNPM and SLC1A5 in pathogenesis and prognosis in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*, 12, e0179363.
- Boon-Unge, K., Q. Yu, T. Zou, A. Zhou, P. Govitrapong & J. Zhou (2007) Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem Biol*, 14, 1386-92.
- Brockstedt, E., A. Rickers, S. Kostka, A. Laubersheimer, B. Dorken, B. Wittmann-Liebold, K. Bommert & A. Otto (1998) Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem*, 273, 28057-64.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- Bruun, G. H., T. K. Doktor, J. Borch-Jensen, A. Masuda, A. R. Krainer, K. Ohno & B. S. Andresen (2016) Global identification of hnRNP A1 binding sites for SSO-based splicing modulation. *BMC Biol*, 14.
- Cai, H., H. Zhao, J. Tang & H. Wu (2015) Serum miR-195 is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *J Surg Res*, 194, 505-10.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich & C. M. Croce (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15524-9.
- Carabet, L. A., E. Leblanc, N. Lallous, H. Morin, F. Ghaidi, J. Lee, P. S. Rennie & A. Cherkasov (2019) Computer-Aided Discovery of Small Molecules Targeting the RNA Splicing Activity of hnRNP A1 in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Molecules*, 24.
- Carazo, F., J. P. Romero & A. Rubio (2019) Upstream analysis of alternative splicing: a review of computational approaches to predict context-dependent splicing factors. *Brief Bioinform*, 20, 1358-1375.
- Castellone, R. D., N. R. Leffler, L. Dong & L. V. Yang (2011) Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor. *Cancer Lett*, 312, 197-208.
- Chaulk, S. G., G. L. Thede, O. A. Kent, Z. Xu, E. M. Gesner, R. A. Veldhoen, S. K. Khanna, I. S. Goping, A. M. MacMillan, J. T. Mendell, H. S. Young, R. P. Fahlman & J. N. Glover (2011) Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol*, 8, 1105-14.
- Chen, J. & W. A. Weiss (2015) Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene*, 34, 1-14.
- Chen, Q., M. Jin, J. Zhu, Q. Xiao & L. Zhang (2013) Functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in stem cell potency and differentiation. *Biomed Res Int*, 2013, 623978.
- Chen, S., J. Zhang, L. Duan, Y. Zhang, C. Li, D. Liu, C. Ouyang, F. Lu & X. Liu (2014) Identification of HnRNP M as a novel biomarker for colorectal carcinoma by quantitative proteomics. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306, G394-403.

Chen, Y., J. Liu, W. Wang, L. Xiang, J. Wang, S. Liu, H. Zhou & Z. Guo (2018) High expression of hnRNPA1 promotes cell invasion by inducing EMT in gastric cancer. *Oncol Rep*, 39, 1693-1701.

Coltri, P. P., M. G. P. Dos Santos & G. H. G. da Silva (2019) Splicing and cancer: Challenges and opportunities. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 10, e1527.

Concepcion, C. P., C. Bonetti & A. Ventura (2012) The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J*, 18, 262-7.

DeBoever, C., E. M. Ghia, P. J. Shepard, L. Rassenti, C. L. Barrett, K. Jepsen, C. H. Jamieson, D. Carson, T. J. Kipps & K. A. Frazer (2015) Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancers. *PLoS Comput Biol*, 11, e1004105.

Dery, K. J., S. Gaur, M. Gencheva, Y. Yen, J. E. Shively & R. K. Gaur (2011) Mechanistic control of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) splice isoforms by the heterogeneous nuclear ribonuclear proteins hnRNP L, hnRNP A1, and hnRNP M. *J Biol Chem*, 286, 16039-51.

Dreyfuss, G., M. J. Matunis, S. Pinol-Roma & C. G. Burd (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem*, 62, 289-321.

Elliott, D. J. (2004) The role of potential splicing factors including RBMY, RBMX, hnRNPG-T and STAR proteins in spermatogenesis. *Int J Androl*, 27, 328-34.

Esquela-Kerscher, A. & F. J. Slack (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 259-69.

Evan, G. I. & K. H. Vousden (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411, 342-8.

Fielding, P., L. Turnbull, W. Prime, M. Walshaw & J. K. Field (1999) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: a clinical marker of early lung cancer detection. *Clin Cancer Res*, 5, 4048-52.

Fiszbein, A. & A. R. Kornblihtt (2017) Alternative splicing switches: Important players in cell differentiation. *Bioessays*, 39.

Floor, S. L., J. E. Dumont, C. Maenhaut & E. Raspe (2012) Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med*, 18, 509-15.

Fourmann, J. B., J. Schmitzova, H. Christian, H. Urlaub, R. Ficner, K. L. Boon, P. Fabrizio & R. Luhrmann (2013) Dissection of the factor requirements for spliceosome disassembly and the elucidation of its dissociation products using a purified splicing system. *Genes Dev*, 27, 413-28.

Franca, G. S., M. D. Vbranovski & P. A. Galante (2016) Host gene constraints and genomic context impact the expression and evolution of human microRNAs. *Nat Commun*, 7, 11438.

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

Grainger, R. J. & J. D. Beggs (2005) Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *Rna*, 11, 533-57.

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

Han, S. P., Y. H. Tang & R. Smith (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J*, 430, 379-92.

Hanahan, D. & R. A. Weinberg (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.

Havens, M. A., A. A. Reich & M. L. Hastings (2014) Drosha promotes splicing of a pre-microRNA-like alternative exon. *PLoS Genet*, 10, e1004312.

He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon & S. M. Hammond (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435, 828-33.

He, Y. & R. Smith (2009) Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1239-56.

Heinrich, B., Z. Zhang, O. Raitskin, M. Hiller, N. Benderska, A. M. Hartmann, L. Bracco, D. Elliott, S. Ben-Ari, H. Soreq, J. Sperling, R. Sperling & S. Stamm (2009) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G regulates splice site selection by binding to CC(A/C)-rich regions in pre-mRNA. *J Biol Chem*, 284, 14303-15.

Hemmings, B. A. & D. F. Restuccia (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, a011189.

Hirschfeld, M., Y. Q. Ouyang, M. Jaeger, T. Erbes, M. Orlowska-Volk, A. Zur Hausen & E. Stickeler (2015) HNRNP G and HTRA2-BETA1 regulate estrogen receptor alpha expression with potential impact on endometrial cancer. *BMC Cancer*, 15, 86.

Hoskins, A. A. & M. J. Moore (2012) The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends Biochem Sci*, 37, 179-88.

Hovhannisyan, R. H. & R. P. Carstens (2007) Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. *J Biol Chem*, 282, 36265-74.

Huelga, S. C., A. Q. Vu, J. D. Arnold, T. Y. Liang, P. P. Liu, B. Y. Yan, J. P. Donohue, L. Shiue, S. Hoon, S. Brenner, M. Ares, Jr. & G. W. Yeo (2012) Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Rep*, 1, 167-78.

Jayamohan, S., M. Kannan, R. K. Moorthy, N. Rajasekaran, H. S. Jung, Y. K. Shin & A. J. V. Arockiam (2019) Dysregulation of miR-375/AEG-1 Axis by Human Papillomavirus 16/18-E6/E7 Promotes Cellular Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer. *Front Oncol*, 9, 847.

Jinesh, G. G. & A. S. Brohl (2019) The genetic script of metastasis. *Biol Rev Camb Philos Soc*.

Jones, K. B., Z. Salah, S. Del Mare, M. Galasso, E. Gaudio, G. J. Nuovo, F. Lovat, K. LeBlanc, J. Palatini, R. L. Randall, S. Volinia, G. S. Stein, C. M. Croce, J. B. Lian & R. I. Aqeilan (2012) miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res*, 72, 1865-77.

Jurica, M. S. & M. J. Moore (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell*, 12, 5-14.

Kanhoush, R., B. Beenders, C. Perrin, J. Moreau, M. Bellini & M. Penrad-Mobayed (2010) Novel domains in the hnRNP G/RBMX protein with distinct roles in RNA binding and targeting nascent transcripts. *Nucleus*, 1, 109-22.

Kapeli, K., F. J. Martinez & G. W. Yeo (2017) Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS. *Hum Genet*, 136, 1193-1214.

Keegan, N. P., S. D. Wilton & S. Fletcher (2019) Breakpoint junction features of seven DMD deletion mutations. *Hum Genome Var*, 6, 39.

Kimura, E. T., M. N. Nikiforova, Z. Zhu, J. A. Knauf, Y. E. Nikiforov & J. A. Fagin (2003) High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 63, 1454-7.

Kooshapur, H., N. R. Choudhury, B. Simon, M. Muhlbauer, A. Jussupow, N. Fernandez, A. N. Jones, A. Dallmann, F. Gabel, C. Camilloni, G. Michlewski, J. F. Caceres & M. Sattler (2018) Structural basis for terminal loop recognition and stimulation of pri-miRNA-18a processing by hnRNP A1. *Nat Commun*, 9, 2479.

Lee, Y. J., Q. Wang & D. C. Rio (2018) Coordinate regulation of alternative pre-mRNA splicing events by the human RNA chaperone proteins hnRNPA1 and DDX5. *Genes Dev*, 32, 1060-1074.

Lin, S. L., J. D. Miller & S. Y. Ying (2006) Intronic microRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol*, 2006, 26818.

Lin, Y. C., M. Boone, L. Meuris, I. Lemmens, N. Van Roy, A. Soete, J. Reumers, M. Moisse, S. Plaisance, R. Drmanac, J. Chen, F. Speleman, D. Lambrechts, Y. Van de Peer, J. Tavernier & N. Callewaert (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5, 4767.

Liu, S., L. Song, H. Yao, L. Zhang, D. Xu, F. Gao & Q. Li (2016) MiR-375 Is Epigenetically Downregulated by HPV-16 E6 Mediated DNMT1 Upregulation and Modulates EMT of Cervical Cancer Cells by Suppressing lncRNA MALAT1. *PLoS One*, 11, e0163460.

Loh, T. J., H. Moon, S. Cho, H. Jang, Y. C. Liu, H. Tai, D. W. Jung, D. R. Williams, H. R. Kim, M. G. Shin, D. J. Liao, J. Zhou, W. Shi, X. Zheng & H. Shen (2015) CD44 alternative splicing and hnRNP A1 expression are associated with the metastasis of breast cancer. *Oncol Rep*, 34, 1231-8.

Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz & T. R. Golub (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834-8.

Martinez-Contreras, R., P. Cloutier, L. Shkreta, J. F. Fiset, T. Revil & B. Chabot (2007) hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol*, 623, 123-47.

Martinez-Contreras, R., J. F. Fiset, F. U. Nasim, R. Madden, M. Cordeau & B. Chabot (2006) Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. *PLoS Biol*, 4, e21.

Mayerle, M. & C. Guthrie (2016) Prp8 retinitis pigmentosa mutants cause defects in the transition between the catalytic steps of splicing. *Rna*, 22, 793-809.

Meyer, M. & J. Vilardell (2009) The quest for a message: budding yeast, a model organism to study the control of pre-mRNA splicing. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 8, 60-7.

Mihailovich, M. & T. Bonaldi (2016) MS-analysis of SILAC-labeled MYC-driven B lymphoma cells overexpressing miR-17-19b. *Data Brief*, 7, 349-53.

Miller, D. M., S. D. Thomas, A. Islam, D. Muench & K. Sedoris (2012) c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res*, 18, 5546-53.

- Mohr, A. M. & J. L. Mott (2015) Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*, 35, 3-11.
- Moursy, A., F. H. Allain & A. Clery (2014) Characterization of the RNA recognition mode of hnRNP G extends its role in SMN2 splicing regulation. *Nucleic Acids Res*, 42, 6659-72.
- Nguyen, T. H., J. Li, W. P. Galej, H. Oshikane, A. J. Newman & K. Nagai (2013) Structural basis of Brr2-Prp8 interactions and implications for U5 snRNP biogenesis and the spliceosome active site. *Structure*, 21, 910-19.
- Nilsen, T. W. & B. R. Graveley (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, 463, 457-63.
- Olive, V., M. J. Bennett, J. C. Walker, C. Ma, I. Jiang, C. Cordon-Cardo, Q. J. Li, S. W. Lowe, G. J. Hannon & L. He (2009) miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev*, 23, 2839-49.
- Paiva, M. M., E. T. Kimura & P. P. Coltri (2017) miR18a and miR19a Recruit Specific Proteins for Splicing in Thyroid Cancer Cells. *Cancer Genomics Proteomics*, 14, 373-381.
- Pino, I., R. Pio, G. Toledo, N. Zabalegui, S. Vicent, N. Rey, M. D. Lozano, W. Torre, J. Garcia-Foncillas & L. M. Montuenga (2003) Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer*, 41, 131-43.
- Pinol-Roma, S., Y. D. Choi, M. J. Matunis & G. Dreyfuss (1988) Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev*, 2, 215-27.
- Roy, R., Y. Huang, M. J. Seckl & O. E. Pardo (2017) Emerging roles of hnRNPA1 in modulating malignant transformation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 8.
- Scaffidi, P. & T. Misteli (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*, 312, 1059-63.
- Scotti, M. M. & M. S. Swanson (2016) RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet*, 17, 19-32.
- Senbanjo, L. T. & M. A. Chellaiah (2017) CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*, 5, 18.

Sharma, S., L. A. Kohlstaedt, A. Damianov, D. C. Rio & D. L. Black (2008) Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 183-91.

Shi, Y., P. Frost, B. Hoang, A. Benavides, J. Gera & A. Lichtenstein (2011) IL-6-induced enhancement of c-Myc translation in multiple myeloma cells: critical role of cytoplasmic localization of the rna-binding protein hnRNP A1. *J Biol Chem*, 286, 67-78.

Soulard, M., V. Della Valle, M. C. Siomi, S. Pinol-Roma, P. Codogno, C. Bauvy, M. Bellini, J. C. Lacroix, G. Monod, G. Dreyfuss & et al. (1993) hnRNP G: sequence and characterization of a glycosylated RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res*, 21, 4210-7.

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

Strober, W. (2015) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3.b.1-3.

Sun, H., T. Liu, D. Zhu, X. Dong, F. Liu, X. Liang, C. Chen, B. Shao, M. Wang & Y. Wang (2017) HnRNPM and CD44s expression affects tumor aggressiveness and predicts poor prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases. *Genes Chromosomes Cancer*, 56, 598-607.

Szybowska, P., M. Kostas, J. Wesche, A. Wiedlocha & E. M. Haugsten (2019) Cancer Mutations in FGFR2 Prevent a Negative Feedback Loop Mediated by the ERK1/2 Pathway. *Cells*, 8.

Tauler, J., E. Zudaire, H. Liu, J. Shih & J. L. Mulshine (2010) hnRNP A2/B1 modulates epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 70, 7137-47.

Tavanez, J. P., T. Madl, H. Kooshapur, M. Sattler & J. Valcarcel (2012) hnRNP A1 proofreads 3' splice site recognition by U2AF. *Mol Cell*, 45, 314-29.

Thomas, P., R. A. Forse & O. Bajenova (2011) Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. *Clin Exp Metastasis*, 28, 923-32.

Treiber, T., N. Treiber & G. Meister (2019) Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 5-20.

Tsuchida, A., S. Ohno, W. Wu, N. Borjigin, K. Fujita, T. Aoki, S. Ueda, M. Takanashi & M. Kuroda (2011) miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci*, 102, 2264-71.

Venturini, L., K. Battmer, M. Castoldi, B. Schultheis, A. Hochhaus, M. U. Muckenthaler, A. Ganser, M. Eder & M. Scherr (2007) Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood*, 109, 4399-405.

Vigevani, L., A. Gohr, T. Webb, M. Irimia & J. Valcarcel (2017) Molecular basis of differential 3' splice site sensitivity to anti-tumor drugs targeting U2 snRNP. *Nat Commun*, 8, 2100.

Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris & C. M. Croce (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2257-61.

Wang, Y., J. Wang, L. Gao, S. Stamm & A. Andreadis (2011) An SRp75/hnRNPG complex interacting with hnRNPE2 regulates the 5' splice site of tau exon 10, whose misregulation causes frontotemporal dementia. *Gene*, 485, 130-8.

Wang, Z. & C. B. Burge (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna*, 14, 802-13.

Westholm, J. O. & E. C. Lai (2011) Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93, 1897-904.

Will, C. L. & R. Luhrmann (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.

Wong, J. J., W. Ritchie, O. A. Ebner, M. Selbach, J. W. Wong, Y. Huang, D. Gao, N. Pinello, M. Gonzalez, K. Baidya, A. Thoeng, T. L. Khoo, C. G. Bailey, J. Holst & J. E. Rasko (2013) Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation. *Cell*, 154, 583-95.

Yoshida, K., M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W. K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H. P. Koefler, L. Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano & S. Ogawa (2011) Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478, 64-9.

Yu, H., L. Gong, C. Wu, K. Nilsson, X. Li-Wang & S. Schwartz (2018) hnRNP G prevents inclusion on the HPV16 L1 mRNAs of the central exon between splice sites SA3358 and SD3632. *J Gen Virol*.

Zhang, L., X. Li, R. C. Hill, Y. Qiu, W. Zhang, K. C. Hansen & R. Zhao (2015) Brr2 plays a role in spliceosomal activation in addition to U4/U6 unwinding. *Nucleic Acids Res*, 43, 3286-97.

Zhou, Z., L. J. Licklider, S. P. Gygi & R. Reed (2002) Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419, 182-5.