

**GUILHERME HENRIQUE GATTI DA SILVA**

**Análise da regulação do splicing de microRNAs do cluster miR-17-92**

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

**Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual**

**Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pereira Coltri**

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

**São Paulo  
2021**

## RESUMO

Silva GHG. **Análise da regulação do splicing de microRNAs do cluster miR-17-92**. 2021. 147 p. Tese de Doutorado (Biologia dos Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O controle da expressão gênica é um processo essencial em eucariotos. Após a transcrição, ocorrem eventos dependentes de diferentes proteínas e RNAs, os quais, associados, formam complexos ribonucleoproteicos que auxiliam na maturação e direcionamento dos mRNAs. Os genes são compostos por regiões denominadas *exons*, presentes no RNA maduro, e por sequências intermediárias denominadas *introns*. Estas sequências são transcritas em precursores de RNA, pré-mRNAs, que devem sofrer splicing antes de serem exportados para o citoplasma para serem traduzidos e executarem sua função celular. O processo de splicing de pré-mRNAs é essencial em eucariotos e alterações nos sítios de splicing ou em componentes do complexo spliceossomo estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças. No genoma humano, aproximadamente 70% dos microRNAs (miRNAs) são transcritos a partir de introns e devem sofrer splicing. O cluster de miRNAs *miR-17-92*, composto por 7 miRNAs diferentes, está localizado no intron do gene *MIR17HG* no cromossomo 13. Alterações na sua expressão já foram relacionadas aos cânceres de pulmão, ovário, tireóide, linfomas e leucemias. É possível que a regulação do splicing dos miRNAs deste cluster esteja relacionada ao desenvolvimento destes diferentes tipos de câncer. Sendo assim, o principal objetivo desta tese foi investigar o papel das proteínas de ligação ao RNA (RBPs), especialmente HuR e proteínas da classe das hnRNP na regulação da biogênese deste cluster. Para isso, induzimos alterações na expressão destas proteínas e verificamos a expressão dos miRNAs desse cluster. Além disso, verificamos se os miRNAs induzidos por ELAVL1/HuR são funcionais, a partir de um sistema repórter do splicing. Com o sistema repórter foi possível verificar a eficiência deste processo e a maturação dos miRNAs do cluster. Verificamos também que a indução da expressão destes miRNAs, especialmente *miR-19a* e *miR-19b*, desencadeiam aumento na proliferação, migração e invasão celulares em células de tumor de tireóide. Foi também construída uma biblioteca de miRNAs em células nocaute para proteínas de ligação ao RNA, a fim de refinar a compreensão sobre a regulação da expressão destas moléculas. Nossos dados comprovam que o *miR-34* possui expressão alterada na maioria das células analisadas, e o *miR-221/222*, mostrou

possuir uma afinidade maior a proteínas da família das hnRNPs e TIA/TIAL1. Em conjunto, nossos dados mostram que proteínas de ligação a RNA, como a ELAVL1/HuR e hnRNP C, podem associar-se a miRNAs provenientes de introns, estimular sua biogênese e maturação, e levar a modificações celulares associadas com o câncer.

Palavras chaves: microRNA, cluster *miR-17-92*, ELAVL1/HuR, RBPs, Câncer, *RNAseq*.

## ABSTRACT

Silva GHG. **Analysis of microRNA splicing regulation of the miR-17-92 cluster.** 2021. 147 p. PhD thesis (Systems Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Control of gene expression is an essential step in eukaryotes. After transcription, events depend on different proteins and RNAs, which, in association, form ribonucleoprotein complexes that help in mRNA traffic and maturation. Genes are composed of *exons* and intermediate sequences called *introns*, which are absent from mature mRNAs. These sequences are transcribed into RNA precursors, pre-mRNAs, which must undergo splicing before being exported to the cytoplasm to be translated and carry out their cellular function. The pre-mRNA splicing process is essential in eukaryotes, and changes in splice sites or mutations in components of the spliceosome complex are associated with the development of several diseases. In the human genome, approximately 70% of microRNAs are transcribed from *introns* and must undergo splicing. The *miR-17-92* miRNA cluster comprises 7 different miRNAs and is transcribed from MIR17HG *intron* on chromosome 13. Changes in its expression have already been related to lung, ovarian, thyroid, lymphoma and leukemia cancers. We hypothesized that splicing of the miRNAs in this cluster might be related to development of different types of cancer. Therefore, the main objective of this thesis was to investigate the role of RNA binding proteins (RBPs), especially HuR and hnRNPs in the regulation of this cluster biogenesis. To address that, we induced changes in the expression of these proteins and verified the expression of miRNAs in this cluster. Furthermore, we verified that the HuR-induced miRNAs are processed and functional by using a reporter system for splicing control. We also found that the induction of expression of these miRNAs, especially *miR-19a* and *miR-19b*, triggers an increase in cell proliferation, migration and invasion in thyroid tumor cells. A miRNA library was also constructed using knockout cells for different RNA binding proteins to refine these molecules' expression comprehension. Our data also confirms that *miR-34* has altered expression in most of the cells analyzed, and *miR-221/222* showed increased affinity to proteins of the hnRNPs and TIA/TIAL1 family. Taken together, our data show that RNA-binding proteins such as ELAVL1/HuR and hnRNP C can bind to *intronic* miRNAs, stimulate their biogenesis and maturation, and trigger cancer-associated cell modifications.

Key words: microRNA, cluster *miR-17-92*, ELAVL1/HuR, RBPs, Câncer, *RNAseq*.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Processo de *splicing*

Em eucariotos, os eventos de transcrição e tradução são dependentes de diferentes complexos formados por RNAs e proteínas, os quais são essenciais para a maturação e direcionamento de RNAs e proteínas na célula (Staley and Guthrie 1998, Matera and Wang 2014). A regulação da expressão gênica está diretamente relacionada à atividade destes complexos proteicos, e ao direcionamento que terão na célula. A maioria dos genes são compostos por sequências presentes nos RNAs maduros, os *exons*, e por sequências intermediárias denominadas *introns*. Estas sequências intermediárias foram descobertas na década de 1970 (Berget, Moore et al. 1977) e atualmente sabe-se que são sequências longas e que podem transcrever diversos RNAs não codificadores.

Os genes codificadores de proteínas são transcritos pela RNA polimerase II em precursores de RNA (pré-mRNAs) que devem ser processados antes de serem exportados do núcleo ao citoplasma para serem traduzidos e executarem sua função celular. Ainda durante a transcrição, os pré-mRNAs transcritos pela RNA polimerase II sofrem adição de um *cap* na extremidade 5', e a retirada de *introns* e ligação dos *exons* em um processo denominado *splicing* (Hoskins and Moore 2012). Além disso, estes precursores também sofrem a adição de uma cauda poli-A na sua extremidade 3'. Este processamento é fundamental para que o RNA mensageiro maduro (mRNA) seja capacitado para exportação.

A importância do processo de *splicing* nos eucariotos reflete-se no fato de que mutações em proteínas que compõem o spliceossomo ou que participam do *splicing* estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças, entre elas a fibrose cística, distrofia muscular, retinite pigmentosa, esclerose lateral amiotrófica (ELA) e diferentes tipos de câncer (Esteller 2011, Singh and Cooper 2012). A investigação dos mecanismos moleculares envolvidos com essas doenças tem revelado uma grande variedade de novos alvos terapêuticos, principalmente baseados no processamento e amadurecimento do RNA.

O *splicing* consiste em duas reações de transesterificação e depende principalmente do reconhecimento de sequências conservadas localizadas nas fronteiras entre os *exons* e *introns*, e também dentro dos *introns*. Este processo é realizado pelo spliceossomo, um complexo macromolecular de aproximadamente 2 MDa, montado a cada novo *intron* (Yan, Hang et al. 2015,

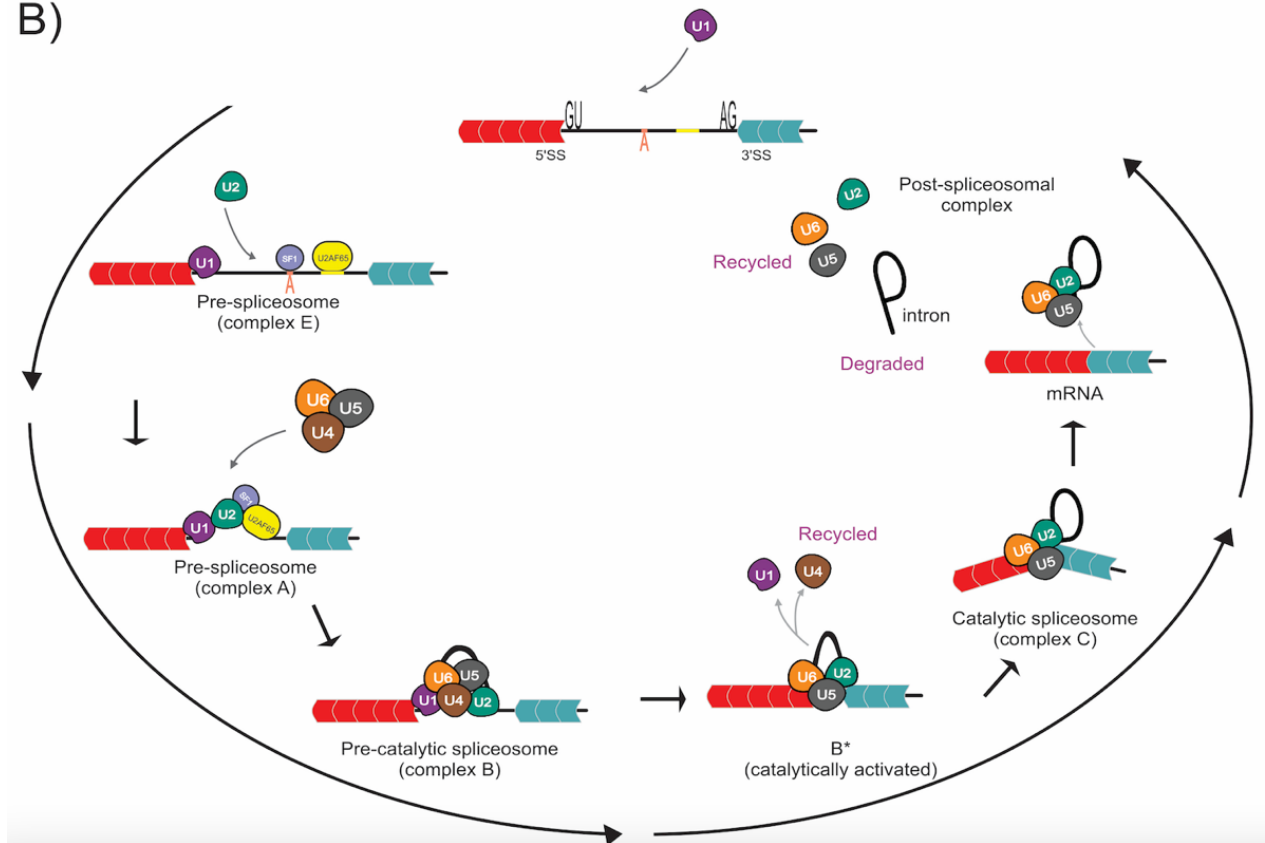
Zhang, Yan et al. 2017, Plaschka, Lin et al. 2018). A montagem do spliceossomo ocorre a partir de uma série de interações dinâmicas entre os RNAs e mais de 150 proteínas. Os snRNAs ou pequenos RNAs nucleares, também conhecidos por U-RNAs, compõem esse complexo associados às proteínas Sm, ou LSm (“like Sm”), no caso do snRNA U6 (Zhang, Yan et al. 2017). Estas partículas ribonucleoprotéicas associam-se às regiões conservadas do pré-mRNA, localizadas nas extremidades 5' e 3' dos *introns*, com os consensos GU e AG, respectivamente. O sítio de ramificação (BP), localizado no *intron* a cerca de 50 pb à jusante do sítio 3' de *splicing* possui sempre uma adenina central, e é seguido por uma sequência rica em pirimidinas (Figura 1). A montagem do spliceossomo inicia-se com o reconhecimento do sítio de *splicing* na extremidade 5' do *intron* pelo snRNP U1 (consenso GUAUGU), formando o complexo E (“*early*”).

A ligação do snRNP U2 à adenina do sítio de ramificação no *intron* (consenso 5' UACU AAC 3') em uma reação dependente de ATP leva à formação do complexo A. O complexo B é formado a partir da ligação do tri-snRNP U4/U6-U5 ao complexo. Uma série de rearranjos estruturais são desencadeados pela atividade das helicases dependentes de ATP, causando mudanças nas interações RNA-RNA e RNA-proteína e levando à dissociação dos snRNPs U1 e U4 e à formação de novas interações, como o pareamento dos snRNAs U6 e U2 (Grainger and Beggs 2005, Hoskins and Moore 2012), formando o complexo B<sup>act</sup> (Fabrizio, Dannenberg et al. 2009). O U6 também pareia com o sítio de *splicing* 5' e assim é formado o complexo catalítico, ou C, do spliceossomo. O processo de *splicing* gera o *intron* clivado em forma de laço (*intron lariat*), e os *exons* ligados, que formarão um mRNA maduro (Staley and Guthrie 1998) (Figura 1).

A)



B)



**Figura 1.** Representação esquemática do processo de *splicing* e montagem do complexo spliceossomo. (A) Na parte superior, os *exons* estão representados como retângulos coloridos, interrompidos pelo *intron*. Estão destacados os sítios de *splicing* presentes nos pré-mRNAs, localizados nas extremidades 5' e 3' dos *introns*, com consensos GU e AG, respectivamente. O sítio de ramificação, localizado no *intron* a cerca de 50 pb à jusante do sítio 3' de *splicing* possui sempre uma adenina central, e é seguido por uma sequência rica em pirimidinas. A proteína U2AF reconhece a sequência de poli-pirimidinas, localizada logo após o sítio de ramificação, e auxilia na ligação do U2 snRNP para formação do complexo A. (B) A montagem do complexo spliceossomo está ilustrada, em sentido anti-horário, iniciando a partir do reconhecimento destes sítios, e após diversos rearranjos conformacionais levando à formação do complexo catalítico (complexo C) onde



ocorrem duas reações de transesterificação, culminando na remoção do *intron* e junção dos *exons* (Adaptado de (Coltri, Dos Santos et al. 2019).

Um processo muito frequente em eucariotos superiores é o *splicing* alternativo. Cerca de 85% dos genes eucarióticos sofrem *splicing* alternativo, mecanismo pelo qual uma única molécula de pré-mRNA pode dar origem a diferentes mRNAs maduros. Este processo ocorre através da remoção ou inclusão de *exons* (*exon skipping* ou *retention*) na sequência madura final, ou retenção parcial ou total dos *introns* (*intron retention*) no mRNA maduro. As moléculas de RNA geradas são conhecidas como transcritos alternativos (Nilsen and Graveley 2010, Fu and Ares 2014, Coltri, Dos Santos et al. 2019), os quais podem ou não ser funcionais. O padrão mais frequente de *splicing* alternativo em eucariotos é conhecido como “*exon skipping*”, caracterizado pela não inclusão de um *exon* na isoforma madura do mRNA. A doença genética distrofia muscular de Duchenne é causada pelo *splicing* alternativo no gene DMD, a partir do *exon skipping* do *exon 74*, o qual não é incluído no mRNA maduro (Keegan, Wilton et al. 2019). Um outro padrão de *splicing* alternativo ocorre quando há o reconhecimento de um sítio críptico, ou seja, uma sequência similar às sequências consensos contidas no pré-mRNA, porém localizadas no meio de um *intron* ou um *exon*. Estes sítios são reconhecidos pela maquinaria do *splicing* na presença de mutações ou regulação alterada do complexo, levando à formação de isoformas parcialmente ou integralmente disfuncionais dependendo do gene. O uso de sítios crípticos pode desencadear vários tipos de cânceres e outras síndromes genéticas e imunológicas, como por exemplo o câncer de mama e a doença granulomatosa crônica (Kapustin, Chan et al. 2011, de Boer, van Leeuwen et al. 2019).

## 1.2 Proteínas de ligação ao RNA (RBPs)

Centenas de proteínas associam-se ao complexo do spliceossomo durante sua montagem e ativação (Martinez-Contreras, Fiset et al. 2006, Moran-Jones, Grindlay et al. 2009, Rauhut, Fabrizio et al. 2016, Sun 2020). Além dos componentes centrais que participam da maquinaria e da catálise do *splicing*, estão muitas proteínas de ligação a RNAs (RBP).

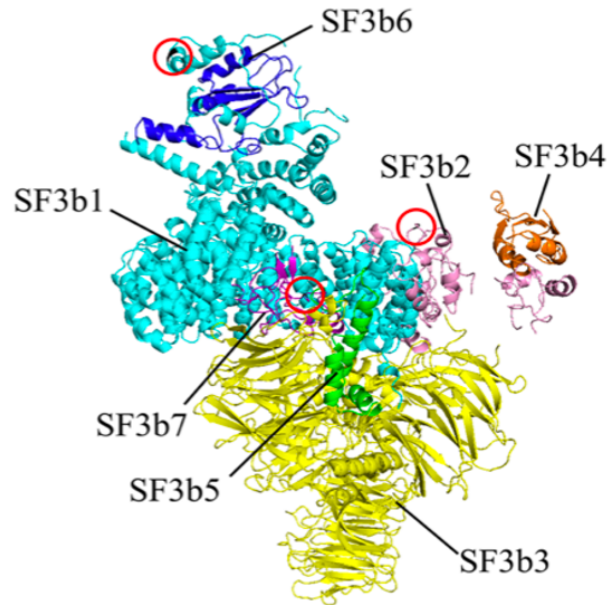
Estas proteínas podem participar da regulação de diversos aspectos da expressão gênica, incluindo o *splicing*, poliadenilação, adição do cap 5', localização sub- celular e tradução (Martinez-Contreras, Fiset et al. 2006, Moran-Jones, Grindlay et al. 2009). As associações específicas entre as RBPs e suas sequências- alvo nos RNAs são tipicamente mediadas por um ou mais domínios de

ligação, como por exemplo o domínio de reconhecimento de RNA (RRM), domínios *zinc-finger* e domínios de homologia a heteronucleoproteína K (KH), ou motivos ricos em arginina (R) e glicina (G) (RGG) (Ray, Kazan et al. 2013). Os domínios RRM permitem que estas moléculas se associem com grande afinidade ao RNA, devido à sua estrutura tridimensional formada por  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  (Pabis, Popowicz et al. 2019).

### 1.2.1 Fatores gerais do *splicing*

Os fatores gerais do *splicing* SF3a e SF3b auxiliam na montagem e remodelamento da partícula snRNP U2, além de atuarem no reconhecimento da sequência de ramificação presente nos *introns* (Hoskins and Moore 2012, Matera and Wang 2014, De Waele, Akova et al. 2018). A purificação e caracterização do complexo SF3b indicou que ele consiste em sete diferentes proteínas variando de 10 a 155 kDa em tamanho molecular (Figura 2) (Das, Xia et al. 1999, Will, Urlaub et al. 2002). SF3b1 é a maior proteína do complexo SF3b, com uma região contendo 20 repetições em sequência (tandem) denominadas domínio HEAT (Rauhut, Fabrizio et al. 2016). Além disso, SF3b1 abriga um domínio putativo de ligação ao U2AF em seu N-terminal, encontrado em várias proteínas, como Tat-SF1/Cus2 (Kielkopf, Lucke et al. 2004). SF3b2 não possui domínios estruturais putativos, exceto para a região rica em prolina (PR) proeminente em seu N-terminal e outra, bastante curta e conservada, dentro de sua parte C-terminal (Golas, Sander et al. 2003, Cretu, Schmitzova et al. 2016).

Por outro lado, SF3b4 contém dois domínios de reconhecimento de RNA na sua região N-terminal (RRMs) e um domínio rico em prolina (PR) na região C-terminal. Os três componentes restantes do complexo SF3b são proteínas menores, SF3b5 não possui domínio estrutural característico, SF3b6 possui um domínio RRM, e SF3b7 um domínio *zinc finger* (ZnF) (Will, Urlaub et al. 2002, Cretu, Schmitzova et al. 2016).



**Figura 2.** Estrutura do complexo SF3b conforme modelo estrutural a partir de análises de cristalografia. As proteínas componentes estão representadas em cores diferentes (SF3b1, ciano; SF3b2, rosa; SF3b3, amarelo; SF3b4, laranja; SF3b5, verde; SF3b6, azul; e SF3b7, roxo) (Adaptado de (Sun 2020)).

Uma vez que a ativação catalítica do spliceossomo é iniciada, o complexo SF3b (presente na partícula snRNP U2) é removido do sítio BP junto com várias outras proteínas através da ação da DHX16, uma ATPase, liberando a molécula para as reações de transesterificação (Jurica, Licklider et al. 2002, Bertram, Agafonov et al. 2017). Aproximadamente oito diferentes RNA helicases participam da formação e controle do spliceossomo (Meyer and Vilardeell 2009). Estas proteínas medeiam muitos rearranjos conformacionais durante a montagem do complexo e são importantes para catalisar rearranjos, utilizando energia a partir da hidrólise do ATP. Entre as oito helicases comumente encontradas no spliceossomo, três delas pertencem à família DEAD-box (DDX46, UAP56 e DDX23), quatro pertencem à família DEAH-box (DHX16, DHX38, HRH1 e DHX15) e uma pertence à família Ski-2 (Brr2 ou SNRNP200) (Cordin and Beggs 2013, De, Schmitzova et al. 2016, De Bortoli, Espinosa et al. 2021).

A SNRNP200 promove importante interação do snRNA U5 com outros componentes associados ao snRNP U5, como a PRPF8. Esta proteína está envolvida com os processos de formação do núcleo catalítico do spliceossomo, e com a desmontagem e reciclagem do complexo U4/U6 (Absmeier, Santos et al. 2016, Zhang, Yan et al. 2017). Por ser uma proteína central no

complexo, SNRNP200 pode executar múltiplas funções, a primeira de helicase e a segunda como uma plataforma de interação proteína-proteína, participando também do controle da progressão do *splicing*, por meio da interação sequencial de seus parceiros com seu domínio C-terminal (van Nues and Beggs 2001, Zhang, Xu et al. 2009). A doença genética retinite pigmentosa pode levar ao desenvolvimento da cegueira, e está diretamente ligada a mutações na região reguladora da proteína PRPF8, outra componente do snRNP U5 (Boon-Unge, Yu et al. 2007, Mayerle and Guthrie 2016).

### 1.2.2 Ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNP)

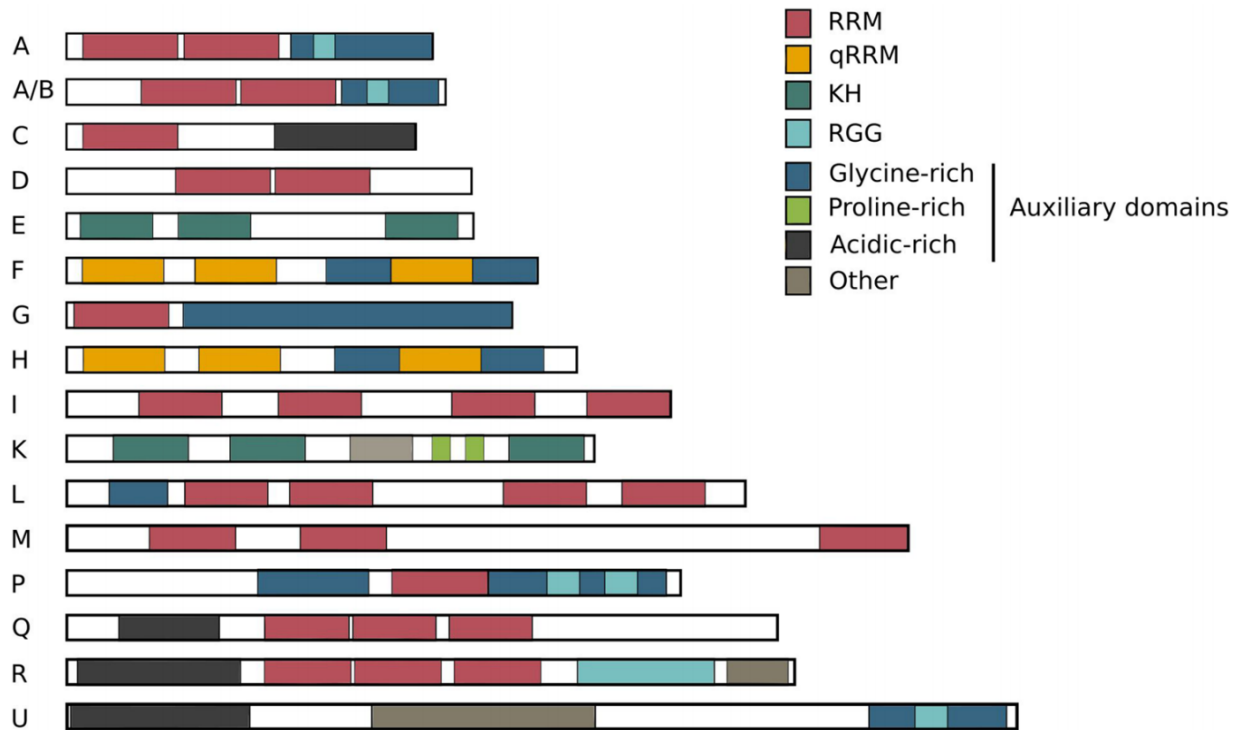
Muitas outras proteínas associam-se de modo transitório ao spliceossomo e são importantes para a regulação e interação com diferentes sítios nos pré-mRNAs. Entre estas estão as componentes da família das hnRNP (“*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*”), conhecidas por seu papel no reparo de DNA e sua associação ao RNA em vários processos (Geuens, Bouhy et al. 2016). As hnRNPs podem associar-se aos pré-mRNAs na montagem inicial do spliceossomo, e foram associadas à maturação dos microRNAs (miRNAs) (Guil and Caceres 2007, Han, Tang et al. 2010). Outra função importante é a de ligar-se nas IRES (sítio de entrada interno do ribossomo) presente no mRNA aumentando assim a tradução, sendo o mRNA do *c-Myc* um exemplo bem descrito na literatura (Sella, Gerlitz et al. 1999, Schepens, Tinton et al. 2007).

A família de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs) inclui uma série de RBPs que contribuem para vários aspectos do metabolismo dos ácidos nucleicos. Entre suas funções estão o auxílio no controle da maturação de RNAs nucleares heterogêneos recém-formados (pré-mRNAs) em RNAs mensageiros maduros (mRNAs), a estabilização do mRNA durante seu transporte celular e controle de sua tradução (Dreyfuss, Matunis et al. 1993, Geuens, Bouhy et al. 2016). Como citado anteriormente, cerca de 85% dos genes eucarióticos sofrem *splicing* alternativo, mecanismo pelo qual uma única molécula de pré-mRNA pode dar origem a diferentes mRNAs maduros. O *splicing* alternativo depende da regulação executada por proteínas associadas a sequências regulatórias presentes nos *introns*, como as ISE (*intronic splicing enhancer*) e ISS (*intronic splicing silencer*), e outras contidas nos *exons*, como as ESE (*exonic splicing enhancer*) e ESS (*exonic splicing silencer*) (Nilsen and Graveley 2010). Muitas proteínas da família das hnRNPs são conhecidas como reguladoras negativas, devido a sua capacidade de reconhecerem principalmente os sítios silenciadores nos *exons* e *introns* (Martinez-Contreras, Fisette et al. 2006, Martinez-Contreras, Cloutier et al. 2007). A modulação executada pelas hnRNPs no *splicing* tem

consequências no perfil celular, e em muitos casos o nível de expressão de hnRNPs é alterado em vários tipos de cânceres, sugerindo um papel importante destas proteínas na tumorigênese (Zhang, Chen et al. 2017) (submetido (Dos Santos, da Silva et al. 2021)).

Além disso, algumas estão associadas a doenças neurodegenerativas, como hnRNP A2B1 e hnRNP K na doença de Alzheimer, e hnRNP A1 na esclerose lateral amiotrófica (ALS) (Lee, Kim et al. 2010, Mohagheghi, Prudencio et al. 2016). Resultados do nosso grupo indicam que concentrações elevadas de hnRNP A1 aumentam a capacidade migratória e invasiva de células de câncer papilífero de tireóide (BCPAP), de forma que é possível que esta proteína seja importante para a evolução do fenótipo maligno destas células (submetido (Dos Santos, da Silva et al. 2021)).

As hnRNPs possuem diferentes pesos moleculares (entre 34 e 120 kDa) e são nomeadas em ordem alfabética, iniciando com a hnRNP A1 até a hnRNP U. São compostas por quatro domínios (*motifs*) únicos de ligação a RNA (RBDs), um RRM (*RNA recognition motif*), um *quasi*-RRM (qRRM), um domínio de homologia KH e o domínio de ligação de RNA consistindo em repetições dos resíduos de arginina e glicina (Arg-Gly-Gly; RGG) (Figura 3) (Dreyfuss, Philipson et al. 1988, Geuens, Bouhy et al. 2016). Outra característica importante é a presença de um sinal de localização nuclear na sua sequência (NLS). Com base na alta afinidade e interação específica aos RBDs, as hnRNPs foram categorizadas em grupos definidos (Dreyfuss, Matunis et al. 1993). Por exemplo, as proteínas de ligação a poli-(C) conhecidas como PCBPs, são agrupadas em dois subgrupos. O primeiro subgrupo abrange as hnRNPs K/J e o segundo, hnRNP E (Ostareck-Lederer, Ostareck et al. 1998, Chaudhury, Chander et al. 2010).



**Figura 3.** Representação da composição estrutural das proteínas da família de proteínas da classe hnRNP. Possuem diferentes tamanhos e são nomeadas em ordem alfabética (hnRNP A1 até hnRNP U). Conforme mostrado na figura esta classe de proteínas compartilha domínios estruturais, são constituídas por quatro domínios únicos de ligação ao RNA (RBDs), um RRM (vermelho escuro), um quasi-RRM (amarelo escuro), um domínio de homologia KH (verde água) e o domínio de ligação de RNA consistindo em repetições dos resíduos de arginina e glicina (Arg-Gly-Gly; azul claro) e os domínios auxiliares (azul escuro, verde claro, preto e cinza) (Adaptado de (Geuens, Bouhy et al. 2016)).

A hnRNP C é a provável fundadora da família das hnRNPs, por ter sido a primeira a ser relacionada a diversos processos, como *splicing*, estabilização do mRNA, transporte e tradução (Gorlach, Wittekind et al. 1992, Han, Friend et al. 2010). Duas isoformas humanas foram identificadas, e possuem 13 aminoácidos de diferença. hnRNP C1 é a forma mais abundante e a hnRNP C2 a de maior tamanho (Park, Hwang et al. 2012). hnRNP C contém apenas um domínio de ligação à RNA, o qual é rico em resíduos de carga ácida, podendo estar localizado na região N- ou C-terminal da proteína (Figura 3) (Cienikova, Jayne et al. 2015, Geuens, Bouhy et al. 2016).

### 1.2.3 ELAVL1/HuR

ELAVL1/HuR é uma proteína que preferencialmente interage com elementos ricos em U (UREs) e AU (AREs) abundantes nas regiões 3' não traduzidas (3'UTRs) de mRNAs (Galban, Kuwano et al. 2008, Abdelmohsen and Gorospe 2010). ELAVL1/HuR (Hu antígeno R, ELAVL1) é membro da família embrionária letal, que também inclui as proteínas neuronais HuB, HuC e HuD (ELAVL2, ELAVL3 e ELAVL4, respectivamente) (Abdelmohsen and Gorospe 2010). Estas proteínas são predominantes nos neurônios. ELAVL1/HuR possui aproximadamente 36 kDa e contém três domínios clássicos de ligação a RNA (RRM1, RRM2 e RRM3): os dois primeiros foram relacionados ao reconhecimento de AU e o terceiro participa na ligação da cauda poli-A de mRNAs alvo (Lu, Chang et al. 2014). Embora não seja um componente integral do spliceossomo, HuR/ELAVL1 está associada a componentes deste complexo e tem sido relacionada à estabilização das etapas de processamento de miRNA (Manzoni, Zucal et al. 2018). É encontrada altamente expressa em diversos tipos de cânceres e reduzida em células normais (Dai, Zhang et al. 2012, Lu, Chang et al. 2014, Chang, Ge et al. 2017, Zhang, Cai et al. 2019).

ELAVL1/HuR pode promover a tumorigênese ao interagir com mRNAs que codificam proteínas associadas à proliferação celular, migração, angiogênese e metástase (Wang, Yang et al. 2001, Abdelmohsen and Gorospe 2010, Latorre, Carelli et al. 2016). ELAVL1/HuR regula as respostas celulares de senescência, diferenciação, secreção de fatores inflamatórios e estimulação do sistema imune, controlando diretamente o destino pós-transcricional de mRNAs específicos (Wang, Yang et al. 2001, Legnini, Morlando et al. 2014, Lu, Chang et al. 2014, Lee, Jung et al. 2018). A interação de ELAVL1/HuR aos mRNAs contendo ARE ocorre durante o *splicing* no núcleo, e então o complexo HuR-mRNA é transportado para o citoplasma (Janakiraman, House et al. 2017, Lin and Ying 2018). Apesar de ser localizada principalmente no núcleo, esta proteína pode ser translocada para o citoplasma após perturbação celular, como por exemplo sob estresse oxidativo. A localização de ELAVL1/HuR é de extrema importância na célula devido à sua capacidade de estabilização dos mRNAs no núcleo (Westmark, Gourronc et al. 2005, Abdelmohsen and Gorospe 2010, Pabis, Popowicz et al. 2019). No câncer de bexiga, o aumento dos níveis citoplasmáticos de ELAVL1/HuR foi diretamente proporcional ao aumento do potencial maligno, progressão tumoral e pior prognóstico (Miyata, Watanabe et al. 2013). Por outro lado, não é observada uma associação linear dos níveis nucleares de ELAVL1/HuR e o prognóstico (Zhang, Yao et al. 2018). ELAVL1/HuR também se liga à região 3'UTR do mRNA do transportador de aminoácido catiônico (CAT-1), bloqueando o sítio de ligação ao *miR-122* e permitindo o

processamento e a saída do mRNA de CAT-1 dos corpos citoplasmáticos (corpos P) para induzir a expressão da proteína CAT-1 (Wang, Bhattacharya et al. 2015). Em contraste, a ligação de *let-7b/c* ao 3' UTR do c-Myc é fortemente induzida quando ELAVL1/HuR se liga a um ARE próximo (Lu, Chang et al. 2014).

Além disso, em macrófagos murinos, a interação de ELAVL1/HuR com *miR-200b* regula de forma negativa a expressão do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e a angiogênese (Chang, Lu et al. 2013). A ausência da proteína ELAVL1/HuR também tem um potencial efeito antitumorigênico no câncer de ovário. A indução do silenciamento de ELAVL1/HuR usando tecnologia de RNAi resultou na redução da proliferação, migração e invasão de células tumorais ovarianas (Huang, Peng et al. 2016). Esses estudos indicaram que ELAVL1/HuR pode se tornar um importante biomarcador de câncer.

### 1.3 miRNAs

Os miRNAs constituem uma classe abundante de pequenas sequências de RNA não codificadores (ncRNA) com cerca de 20 nucleotídeos (Bartel 2009, Dang, Le et al. 2020). Inicialmente, os miRNAs foram descritos como parte integrante da rede de supressores oncogênicos na tumorigênese, regulando quase todos os processos celulares alterados durante a formação do tumor (Ambros 2004, He, Thomson et al. 2005, Zamore and Haley 2005, Li, Bengtson et al. 2008).

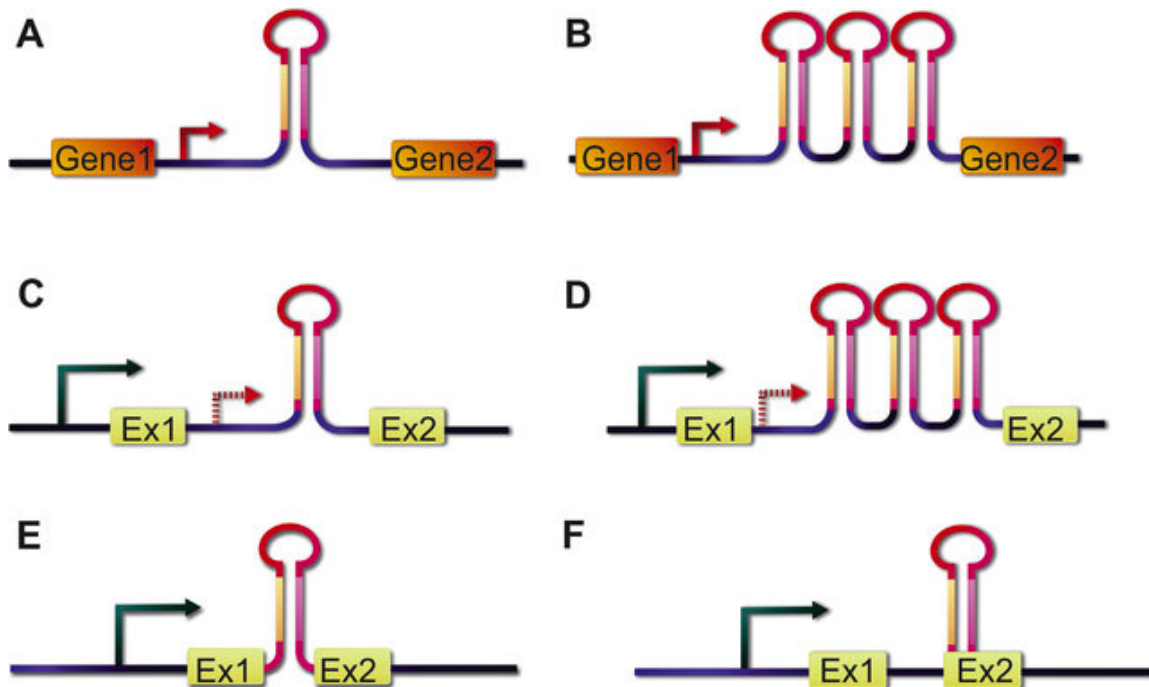
A principal função dos miRNAs está relacionada à regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional, uma vez que interferem diretamente no processo de tradução (Jaskiewicz and Filipowicz 2008, Guo, Ingolia et al. 2010). Cerca de 70% dos miRNAs humanos são codificados a partir de *introns* (Franca, Vibranovski et al. 2016). Desta forma, o *splicing* e a atividade do spliceossomo podem ser críticos para a biogênese, maturação e processamento destes miRNAs. É possível que transcritos contendo RNA não codificadores (ncRNA) ou miRNAs estejam sujeitos à regulação específica por determinadas proteínas do spliceossomo (Schwab and Voinnet 2009, Lehrbach and Miska 2011).

Os miRNAs podem ser transcritos a partir de promotores próprios ou a partir de sequências intragênicas, e, em muitos casos estão localizados em *introns* (Figura 4). No caso de miRNAs intragênicos, os genes hospedeiros podem ser codificadores de proteína ou também de RNAs longos não codificadores (*lncRNA*). No caso de genes hospedeiros que codificam proteínas, os miRNAs são frequentemente codificados a partir dos *introns*. Existem exceções, como por exemplo,



miRNAs que se encontram em *exons* ou miRNAs que mantêm um ou mais nucleotídeos da cauda poli-A, e são regulados por meio de *splicing* alternativo. Já os miRNAs presentes em lncRNAs, podem estar tanto nos *introns* quanto nos *exons* em frequências similares (Curtis, Sibley et al. 2012, Rorbach, Unold et al. 2018, Titov and Vorozheykin 2018, Zia and Flynt 2018).

Alguns miRNAs são codificados a partir do *intron* inteiro e são denominados "*mirtrons*" (Figura 4). Estudos de *knockdown* comprovaram que esta via de processamento gera pré-miRNAs processados pelo spliceossomo, ignorando assim o processamento pela Drosha. *Mirtrons* foram identificados em diversos animais, incluindo moscas, vermes e humanos (Okamura, Phillips et al. 2008, Reimao-Pinto, Ignatova et al. 2015). O produto do *intron* inicialmente produzido não é linear, mas sim um laço no qual o ponto de ramificação 3' está ligado à extremidade 5' do íntron (Figura 4) (Hayashita, Osada et al. 2005, Chaulk, Thede et al. 2011, Seow, Sibley et al. 2012). Na maioria dos casos em mamíferos, a extremidade dos *mirtrons* é caracterizada pela presença de caudas de oligouridina devido à uridilação, no entanto, o significado funcional desta característica em mamíferos ainda não está claro (Menezes, Balzeau et al. 2018).



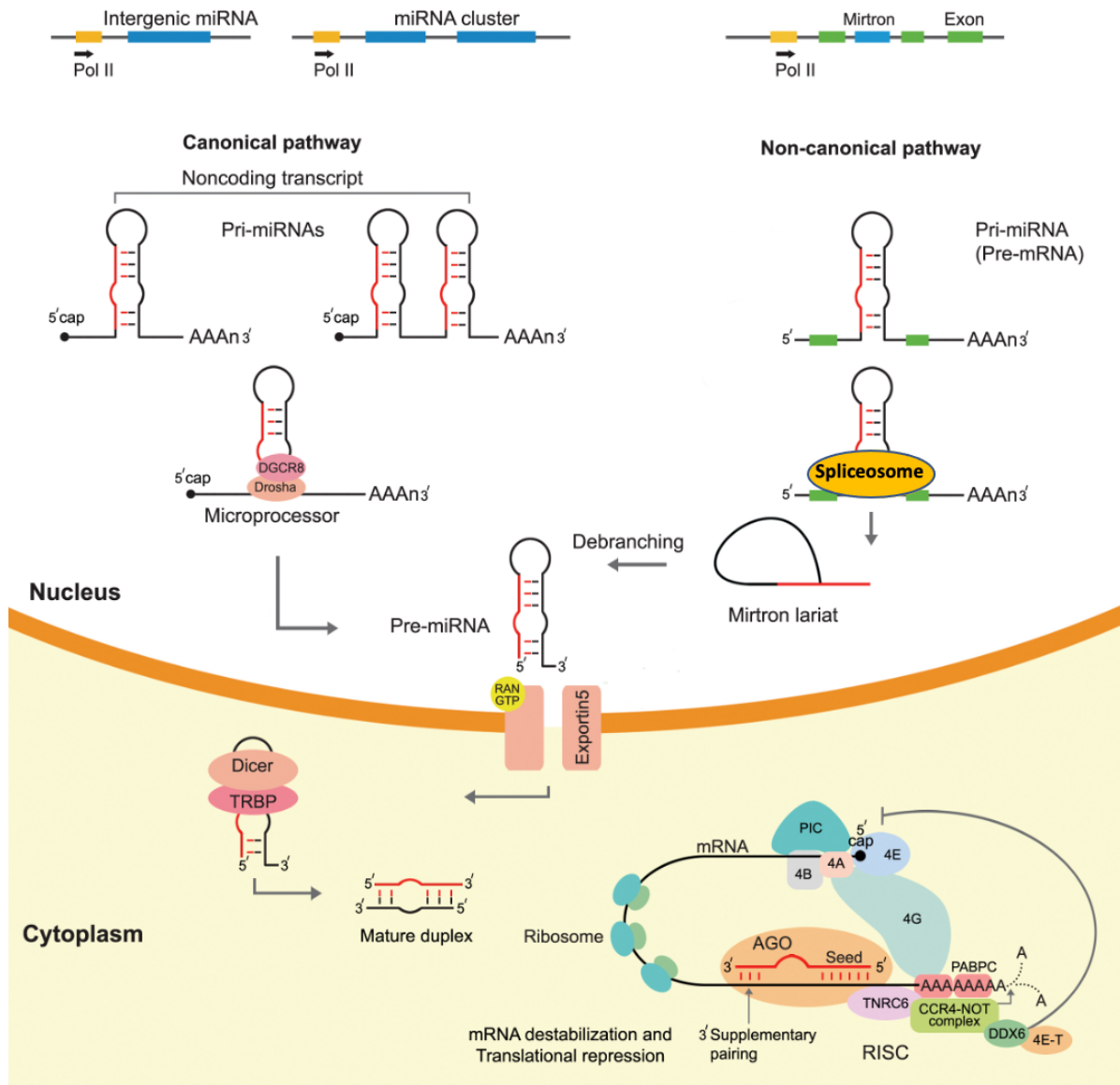
**Figura 4.** Organização genômica dos miRNA. Os miRNAs intergênicos são encontrados entre genes e podem possuir seus próprios promotores, podendo ser (A) monocitrônicos ou (B) policitrônicos. Os miRNAs

também podem ser codificados de forma intragênica e serem codificados a partir de *introns* ou *exons*. Os miRNAs intrônicos podem ser (C) monocistrônicos ou (D) policistrônicos, como é o caso do cluster *miR-17-92*. (E) *Mirtrons* são curtos grampos intrônicos expressos sob o promotor do gene hospedeiro e são formados pelo *intron* inteiro. (F) miRNAs exônicos estão localizados dentro de *exons* e são expressos sob o promotor do gene hospedeiro. Setas azuis representam o promotor do gene hospedeiro, setas vermelhas representam o promotor de miRNA e as setas pontilhadas representam um possível promotor específico de miRNAs (Adaptado de (Ratnadiwakara, Mohenska et al. 2018)).

Os miRNAs podem ser transcritos pela RNA polimerase II ou RNA polimerase III. Os miRNAs transcritos pela RNA polimerase II geram um longo transcrito primário (pri-miRNA) com cauda poli-A na extremidade 3' e *cap* na extremidade 5'. Os pri-miRNAs contêm uma ou várias estruturas em forma de grampo, as quais são importantes durante seu processamento. O processamento inicia-se com o complexo microprocessador no núcleo (Figura 5). O microprocessador no núcleo é formado pela ribonuclease Drosha e duas moléculas de DGCR8, e é responsável pelo processamento inicial dos pri-miRNAs em pré-miRNAs. O dímero DGCR8 se liga ao pri-miRNA por meio de seu domínio de ligação de RNA de fita dupla e favorece o posicionamento correto de Drosha na região pareada da estrutura de pri-miRNA. Esta é uma etapa crucial para as clivagens subsequentes (Bartel 2009, Nguyen, Jo et al. 2015). O pré-miRNA, com tamanho entre 50 e 75 nucleotídeos, é transportado para o citoplasma pelo complexo Exportin-5/RanGTP (Yi, Qin et al. 2003). No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela Dicer (RNase III) juntamente com a TRBP liberando um pequeno duplex de miRNA que é direcionado para o complexo da proteína Argonauta (proteínas Ago1- 4). Ago2 é a única a mediar as interações subsequentes com pre-miRNA (Okamura, Phillips et al. 2008, Okada, Yamashita et al. 2009, Koralewska, Hoffmann et al. 2016). Normalmente, uma única fita é preferencialmente incorporada ao complexo RISC, onde irá se emparelhar com complementaridade imperfeita de bases à 3' UTR de seus mRNAs alvo, resultando em desestabilização de mRNA e/ou inibição da tradução, como já citado acima (Menezes, Balzeau et al. 2018) (Figura 5).

Os miRNAs podem associar-se a diversas regiões nos mRNAs, mas há uma frequência maior de sequências-alvo presentes nas regiões 5' e 3' UTR de mRNAs. O grau de complementaridade no pareamento define a atuação do miRNA; pareamentos perfeitos ou quase perfeitos entre o miRNA e a sequência codificadora levam à degradação do RNA. Pareamentos imperfeitos normalmente ocorrem com as regiões 3' UTR de mRNAs e impedem a continuação da

tradução. Em ambos os casos, a presença do miRNA interfere na tradução e na expressão da proteína (Filipowicz, Bhattacharyya et al. 2008, Grosshans and Filipowicz 2008, Spadotto, Giambruno et al. 2020).



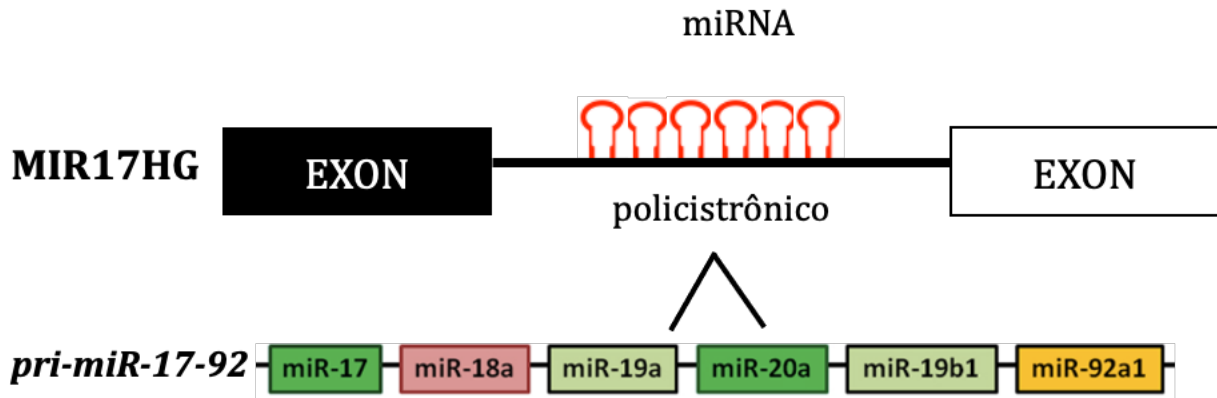
**Figura 5.** Representação esquemática da biogênese, processamento e maturação de miRNAs em mamíferos. À esquerda, a via canônica mostra o processamento de miRNAs gerados a partir de promotores próprios. À direita, a via não canônica mostra o processamento de mirtrons. Nesta via, após a transcrição, os miRNAs são clivados em pré-miRNAs com auxílio do spliceossomo, evitando o processamento pela Drosha.

Posteriormente, no citosol, os *miRtrons* podem atuar da mesma forma que os miRNAs canônicos (Adaptado de (Saliminejad, Khorram Khorshid et al. 2019)).

#### 1.4 O cluster *miR-17-92*

O cluster de miRNAs *miR-17-92* é encontrado no cromossomo 13q31, no *intron 3* do gene MIR17HG, e é composto por sete miRNAs (*miR-17-3p*, *miR-17-5p*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-19b*, *miR-20a*, e *miR-92a-1*) (Figura 6) (He, Thomson et al. 2005). MIR17HG é o gene hospedeiro e não codifica proteínas. A expressão dos miRNAs do *cluster* é alterada em histotipos tumorais mais agressivos, como os linfomas (Ota, Tagawa et al. 2004, Zamore and Haley 2005, Li, Vecchiarelli-Federico et al. 2012, Mogilyansky and Rigoutsos 2013). *miR-17-92* é um componente-chave de diversas patologias, e atua por meio da regulação da via PI3K/AKT. Esta via é importante para 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, Hong et al. 2013).

Alterações na expressão dos miRNAs deste *cluster* também estão relacionadas ao desenvolvimento de Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), câncer de pulmão, ovário, mama, tireóide, entre outros (Ota, Tagawa et al. 2004, Olive, Bennett et al. 2009, Fuziwara and Kimura 2014). Este cluster é considerado um dos mais potentes miRNAs oncogênicos e já recebeu a denominação de “*oncomiR-1*” (Olive, Jiang et al. 2010). Análises realizadas em 70 casos de linfomas de células-B humanas mostraram amplificação desta região gênica (Ota, Tagawa et al. 2004), de forma que compreender a regulação da expressão dos miRNAs desse cluster pode auxiliar no diagnóstico e tratamento de cânceres em diferentes tipos celulares.



**Figura 6.** Cluster *miR-17-92*. A. O cluster *miR-17-92* está localizado no íntron 3 do gene MIR17HG no cromossomo 13, e transcreve um longo miRNA primário policistrônico (*pri-miR-17-92*), composto pelos miRNAs *17-3p*, *17-5p*, *18a*, *19a*, *20*, *19b* e *92*.

Embora sejam transcritos em uma sequência contínua, o processamento, maturação e a função destes miRNAs é independente. Concentrações diferentes de cada miRNA podem ser observadas em algumas patologias. Os miRNAs deste cluster podem exercer funções distintas, por exemplo, o *miR-19a* é considerado o responsável pelo efeito oncogênico e anti-apoptótico observado em muitos linfomas (Olive, Bennett et al. 2009). Por outro lado, o desenvolvimento de câncer colo-retal foi associado ao aumento de *miR-92a* (Tsuchida, Ohno et al. 2011). Além disso, *miR-17-3p* e *miR-17-5p* estão aumentados em células das lesões tumorais da tireoide (Takakura, Mitsutake et al. 2008, Fuziwara and Kimura 2014). Após a supressão de *miR-17-3p*, foi observada uma parada no crescimento do tumor, muito provavelmente devido à ativação de algumas enzimas, resultando em apoptose. Dentre os diferentes alvos preditos para os miRNAs deste cluster, estão o receptor TGFBR1 e os transdutores (SMAD2, SMAD3, SMAD4) presentes na via de sinalização de TGF $\beta$ , uma importante via anti-mitogênica da célula tireoidiana (Takakura, Mitsutake et al. 2008, Dews, Fox et al. 2010, Mestdagh, Bostrom et al. 2010). O *cluster miR-17-92* desempenha um papel importante em certas formas de câncer de tireoide anaplásico e pode ser um novo alvo para o seu tratamento (Takakura, Mitsutake et al. 2008).

Algumas análises da regulação transcricional desse *cluster* evidenciaram o envolvimento da quinase pre- oncogênica Pim-1 na sua expressão. Foi demonstrado que o silenciamento dos genes responsáveis pela Pim-1 e por E2F3 podem regular a transcrição de *miR-17-92* (Thomas, Lange-Grunweller et al. 2013). Nas linhagens celulares K562 e HeLa, essa quinase pré- oncogênica afeta

negativamente a expressão do cluster, demonstrando a sua participação na maquinaria de regulação da transcrição do cluster *miR-17-92* (Thomas, Lange-Grunweller et al. 2013).

Considerando-se que o *cluster miR-17-92* é intrônico, é possível que a regulação de sua expressão esteja relacionada à atividade de proteínas presentes no spliceossomo. Recentemente, dados obtidos em nosso laboratório revelaram a presença das proteínas ELAVL1/HuR, SF3B4 e de diferentes hnRNPs em complexos de spliceossomo montados em pre-mRNAs contendo *miR-18a* e *miR-19a*, isolados a partir de células tumorais de tireoide (Paiva, Kimura et al. 2017). Desta forma, nossa hipótese para esse trabalho foi investigar a atuação de proteínas de ligação ao RNA na regulação do *splicing* destes miRNAs, transcritos a partir de *introns*, especificamente do *cluster miR-17-92*. Na segunda parte deste trabalho investigamos se as RBPs poderiam alterar a expressão dos miRNAs, a partir da análise de dados de sequenciamento de miRNA provenientes de células nocaute. De forma geral, é possível que proteínas de ligação a RNAs tenham um papel importante na modulação do *splicing* e da expressão de miRNAs, determinando diretamente os fenótipos celulares. Alterações em proteínas especificamente recrutadas para o *splicing* de miRNAs podem ser fatores importantes de sinalização durante o desenvolvimento do tumor.

## 6 CONCLUSÃO

Nossos resultados auxiliam na compreensão do papel funcional de proteínas de ligação ao RNA na biogênese e maturação de miRNAs. Com base em nossos resultados, propomos um modelo no qual a super-expressão de ELAVL1/HuR aumenta a biogênese e maturação de *miR-19a* e *miR-19b* por meio da associação com o pré-miRNA. Isto interfere diretamente nas vias regulatórias do ciclo celular, como proliferação, migração e invasão, em células BCPAP. A proteína hnRNP C associa-se a *miR-17* e *miR-18a* e pode modular a expressão do cluster também, levando a alterações na cinética celular, especialmente na proliferação. Nossos dados comprovaram que o *miR-34* apresenta expressão alterada na maioria das células analisadas, e o *miR-221/222* mostrou possuir uma afinidade maior a proteínas da família das hnRNPs e TIA/TIAL1. Já células *knockout* para os genes SRSF5 e PCBP2 não apresentam expressão do *miR-296*, comprovando uma possível interação entre estas moléculas. Considerando a rede de regulações promovida por proteínas de ligação a RNA, a proteína ELAVL1/HuR, e os miRNAs *miR-34*, *miR-221/222* e *miR-296* são atrativos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças como o câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmohsen, K. and M. Gorospe (2010). "Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR." Wiley Interdiscip Rev RNA **1**(2): 214-229.
- Absmeier, E., K. F. Santos and M. C. Wahl (2016). "Functions and regulation of the Brr2 RNA helicase during splicing." Cell Cycle **15**(24): 3362-3377.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." Nature **431**(7006): 350-355.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.
- Berget, S. M., C. Moore and P. A. Sharp (1977). "Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(8): 3171-3175.
- Bertram, K., D. E. Agafonov, W. T. Liu, O. Dybkov, C. L. Will, K. Hartmuth, H. Urlaub, B. Kastner, H. Stark and R. Luhrmann (2017). "Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing." Nature **542**(7641): 318-323.
- Bian, S., J. Hong, Q. Li, L. Schebelle, A. Pollock, J. L. Knauss, V. Garg and 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**(5): 1398-1406.
- Boon-Unge, K., Q. Yu, T. Zou, A. Zhou, P. Govitrapong and J. Zhou (2007). "Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism." Chem Biol **14**(12): 1386-1392.
- Chang, N., J. Ge, L. Xiu, Z. Zhao, X. Duan, L. Tian, J. Xie, L. Yang and L. Li (2017). "HuR mediates motility of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggered by sphingosine 1-phosphate in liver fibrosis." J Mol Med (Berl) **95**(1): 69-82.
- Chang, S. H., Y. C. Lu, X. Li, W. Y. Hsieh, Y. Xiong, M. Ghosh, T. Evans, O. Elemento and T. Hla (2013). "Antagonistic function of the RNA-binding protein HuR and miR-200b in post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor-A expression and angiogenesis." J Biol Chem **288**(7): 4908-4921.
- Chaudhury, A., P. Chander and P. H. Howe (2010). "Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles." RNA **16**(8): 1449-1462.
- 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 and J. N. Glover (2011). "Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis." RNA Biol **8**(6): 1105-1114.
- Cienikova, Z., S. Jayne, F. F. Damberger, F. H. Allain and C. Maris (2015). "Evidence for cooperative tandem binding of hnRNP C RRMs in mRNA processing." RNA **21**(11): 1931-1942.
- Coltri, P. P., M. G. P. Dos Santos and G. H. G. da Silva (2019). "Splicing and cancer: Challenges and opportunities." Wiley Interdiscip Rev RNA **10**(3): e1527.
- Cordin, O. and J. D. Beggs (2013). "RNA helicases in splicing." RNA Biol **10**(1): 83-95.
- Cretu, C., J. Schmitzova, A. Ponce-Salvatierra, O. Dybkov, E. I. De Laurentiis, K. Sharma, C. L. Will, H. Urlaub, R. Luhrmann and V. Pena (2016). "Molecular Architecture of SF3b and Structural Consequences of Its Cancer-Related Mutations." Mol Cell **64**(2): 307-319.
- Curtis, H. J., C. R. Sibley and M. J. Wood (2012). "Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA." Wiley Interdiscip Rev RNA **3**(5): 617-632.
- Dai, W., G. Zhang and E. V. Makeyev (2012). "RNA-binding protein HuR autoregulates its expression by promoting alternative polyadenylation site usage." Nucleic Acids Res **40**(2): 787-800.

Dang, T. L., C. T. Le, M. N. Le, T. D. Nguyen, T. L. Nguyen, S. Bao, S. Li and T. A. Nguyen (2020). "Select amino acids in DGCR8 are essential for the UGU-pri-miRNA interaction and processing." Commun Biol **3**(1): 344.

Das, B. K., L. Xia, L. Palandjian, O. Gozani, Y. Chyung and R. Reed (1999). "Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155." Mol Cell Biol **19**(10): 6796-6802.

de Boer, M., K. van Leeuwen, M. Hauri-Hohl and D. Roos (2019). "Activation of cryptic splice sites in three patients with chronic granulomatous disease." Mol Genet Genomic Med **7**(9): e854.

De Bortoli, F., S. Espinosa and R. Zhao (2021). "DEAH-Box RNA Helicases in Pre-mRNA Splicing." Trends Biochem Sci **46**(3): 225-238.

De, I., J. Schmitzova and V. Pena (2016). "The organization and contribution of helicases to RNA splicing." Wiley Interdiscip Rev RNA **7**(2): 259-274.

De Waele, J. J., M. Akova, M. Antonelli, R. Canton, J. Carlet, D. De Backer, G. Dimopoulos, J. Garnacho-Montero, J. Kesecioglu, J. Lipman, M. Mer, J. A. Paiva, M. Poljak, J. A. Roberts, J. Rodriguez Bano, J. F. Timsit, J. R. Zahar and M. Bassetti (2018). "Antimicrobial resistance and antibiotic stewardship programs in the ICU: insistence and persistence in the fight against resistance. A position statement from ESICM/ESCMID/WAAAR round table on multi-drug resistance." Intensive Care Med **44**(2): 189-196.

Dews, M., J. L. Fox, S. Hultine, P. Sundaram, W. Wang, Y. Y. Liu, E. Furth, G. H. Enders, W. El-Deiry, J. M. Schelter, M. A. Cleary and A. Thomas-Tikhonenko (2010). "The myc-miR-17~92 axis blunts TGF $\beta$  signaling and production of multiple TGF $\beta$ -dependent antiangiogenic factors." Cancer Res **70**(20): 8233-8246.

Dos Santos, M. G. P., G. H. G. da Silva and P. P. Coltri (2021). "hnRNP A1 and hnRNP C regulate oncogenic miRNAs biogenesis in thyroid cancer cells."

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

Dreyfuss, G., L. Philipson and I. W. Mattaj (1988). "Ribonucleoprotein particles in cellular processes." J Cell Biol **106**(5): 1419-1425.

Esteller, M. (2011). "Non-coding RNAs in human disease." Nat Rev Genet **12**(12): 861-874.

Fabrizio, P., J. Dannenberg, P. Dube, B. Kastner, H. Stark, H. Urlaub and R. Luhrmann (2009). "The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome." Mol Cell **36**(4): 593-608.

Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya and N. Sonenberg (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-114.

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

Fu, X. D. and M. Ares, Jr. (2014). "Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins." Nat Rev Genet **15**(10): 689-701.

Fuziwara, C. S. and E. T. Kimura (2014). "High iodine blocks a Notch/miR-19 loop activated by the BRAF(V600E) oncoprotein and restores the response to TGF $\beta$  in thyroid follicular cells." Thyroid **24**(3): 453-462.

Galban, S., Y. Kuwano, R. Pullmann, Jr., J. L. Martindale, H. H. Kim, A. Lal, K. Abdelmohsen, X. Yang, Y. Dang, J. O. Liu, S. M. Lewis, M. Holcik and M. Gorospe (2008). "RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ." Mol Cell Biol **28**(1): 93-107.



Geuens, T., D. Bouhy and V. Timmerman (2016). "The hnRNP family: insights into their role in health and disease." *Hum Genet* **135**(8): 851-867.

Golas, M. M., B. Sander, C. L. Will, R. Luhrmann and H. Stark (2003). "Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b." *Science* **300**(5621): 980-984.

Gorlach, M., M. Wittekind, R. A. Beckman, L. Mueller and G. Dreyfuss (1992). "Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA." *EMBO J* **11**(9): 3289-3295.

Grainger, R. J. and J. D. Beggs (2005). "Prp8 protein: at the heart of the spliceosome." *RNA* **11**(5): 533-557.

Grosshans, H. and W. Filipowicz (2008). "Molecular biology: the expanding world of small RNAs." *Nature* **451**(7177): 414-416.

Guil, S. and J. F. Caceres (2007). "The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a." *Nat Struct Mol Biol* **14**(7): 591-596.

Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman and D. P. Bartel (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." *Nature* **466**(7308): 835-840.

Han, S. P., L. R. Friend, J. H. Carson, G. Korza, E. Barbarese, M. Maggipinto, J. T. Hatfield, J. A. Rothnagel and R. Smith (2010). "Differential subcellular distributions and trafficking functions of hnRNP A2/B1 spliceoforms." *Traffic* **11**(7): 886-898.

Han, S. P., Y. H. Tang and R. Smith (2010). "Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives." *Biochem J* **430**(3): 379-392.

Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido and T. Takahashi (2005). "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation." *Cancer Res* **65**(21): 9628-9632.

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 and S. M. Hammond (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." *Nature* **435**(7043): 828-833.

Hoskins, A. A. and M. J. Moore (2012). "The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine." *Trends Biochem Sci* **37**(5): 179-188.

Huang, Y. H., W. Peng, N. Furuuchi, J. Gerhart, K. Rhodes, N. Mukherjee, M. Jimbo, G. E. Gonye, J. R. Brody, R. C. Getts and J. A. Sawicki (2016). "Delivery of Therapeutics Targeting the mRNA-Binding Protein HuR Using 3DNA Nanocarriers Suppresses Ovarian Tumor Growth." *Cancer Res* **76**(6): 1549-1559.

Janakiraman, H., R. P. House, S. Talwar, S. M. Courtney, E. S. Hazard, G. Hardiman, S. Mehrotra, P. H. Howe, V. Gangaraju and V. Palanisamy (2017). "Repression of caspase-3 and RNA-binding protein HuR cleavage by cyclooxygenase-2 promotes drug resistance in oral squamous cell carcinoma." *Oncogene* **36**(22): 3137-3148.

Jaskiewicz, L. and W. Filipowicz (2008). "Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing." *Curr Top Microbiol Immunol* **320**: 77-97.

Jurica, M. S., L. J. Licklider, S. R. Gygi, N. Grigorieff and M. J. Moore (2002). "Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis." *RNA* **8**(4): 426-439.

Kapustin, Y., E. Chan, R. Sarkar, F. Wong, I. Vorechovsky, R. M. Winston, T. Tatusova and N. J. Dibb (2011). "Cryptic splice sites and split genes." *Nucleic Acids Res* **39**(14): 5837-5844.

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

Kielkopf, C. L., S. Lucke and M. R. Green (2004). "U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world." *Genes Dev* **18**(13): 1513-1526.

Koralewska, N., W. Hoffmann, M. Pokornowska, M. Milewski, A. Lipinska, K. Bienkowska-Szewczyk, M. Figlerowicz and A. Kurzynska-Kokorniak (2016). "How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing." *Acta Biochim Pol* **63**(4): 773-783.

Latorre, E., S. Carelli, I. Raimondi, V. D'Agostino, I. Castiglioni, C. Zucal, G. Moro, A. Luciani, G. Ghilardi, E. Monti, A. Inga, A. M. Di Giulio, A. Gorio and A. Provenzani (2016). "The Ribonucleic Complex HuR-MALAT1 Represses CD133 Expression and Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer." *Cancer Res* **76**(9): 2626-2636.

Lee, E. K., H. H. Kim, Y. Kuwano, K. Abdelmohsen, S. Srikantan, S. S. Subaran, M. Gleichmann, M. R. Mughal, J. L. Martindale, X. Yang, P. F. Worley, M. P. Mattson and M. Gorospe (2010). "hnRNP C promotes APP translation by competing with FMRP for APP mRNA recruitment to P bodies." *Nat Struct Mol Biol* **17**(6): 732-739.

Lee, J. H., M. Jung, J. Hong, M. K. Kim and I. K. Chung (2018). "Loss of RNA-binding protein HuR facilitates cellular senescence through posttranscriptional regulation of TIN2 mRNA." *Nucleic Acids Res* **46**(8): 4271-4285.

Legnini, I., M. Morlando, A. Mangiavacchi, A. Fatica and I. Bozzoni (2014). "A feedforward regulatory loop between HuR and the long noncoding RNA linc-MD1 controls early phases of myogenesis." *Mol Cell* **53**(3): 506-514.

Lehrbach, N. J. and E. A. Miska (2011). "Regulation of pre-miRNA Processing." *Adv Exp Med Biol* **700**: 67-75.

Li, W., M. H. Bengtson, A. Ulbrich, A. Matsuda, V. A. Reddy, A. Orth, S. K. Chanda, S. Batalov and C. A. Joazeiro (2008). "Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling." *PLoS One* **3**(1): e1487.

Li, Y., L. M. Vecchiarelli-Federico, Y. J. Li, S. E. Egan, D. Spaner, M. R. Hough and Y. Ben-David (2012). "The miR-17-92 cluster expands multipotent hematopoietic progenitors whereas imbalanced expression of its individual oncogenic miRNAs promotes leukemia in mice." *Blood* **119**(19): 4486-4498.

Lin, S. L. and S. Y. Ying (2018). "Mechanism and Method for Generating Tumor-Free iPS Cells Using Intronic MicroRNA miR-302 Induction." *Methods Mol Biol* **1733**: 265-282.

Lu, Y. C., S. H. Chang, M. Hafner, X. Li, T. Tuschl, O. Elemento and T. Hla (2014). "ELAVL1 modulates transcriptome-wide miRNA binding in murine macrophages." *Cell Rep* **9**(6): 2330-2343.

Manzoni, L., C. Zucal, D. D. Maio, V. G. D'Agostino, N. Thongon, I. Bonomo, P. Lal, M. Miceli, V. Baj, M. Brambilla, L. Cerofolini, S. Elezgarai, E. Biasini, C. Luchinat, E. Novellino, M. Fragai, L. Marinelli, A. Provenzani and P. Seneci (2018). "Interfering with HuR-RNA Interaction: Design, Synthesis and Biological Characterization of Tanshinone Mimics as Novel, Effective HuR Inhibitors." *J Med Chem* **61**(4): 1483-1498.

Martinez-Contreras, R., P. Cloutier, L. Shkreta, J. F. Fiset, T. Revil and B. Chabot (2007). "hnRNP proteins and splicing control." *Adv Exp Med Biol* **623**: 123-147.

Martinez-Contreras, R., J. F. Fiset, F. U. Nasim, R. Madden, M. Cordeau and B. Chabot (2006). "Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing." *PLoS Biol* **4**(2): e21.

Matera, A. G. and Z. Wang (2014). "A day in the life of the spliceosome." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(2): 108-121.

Mayerle, M. and C. Guthrie (2016). "Prp8 retinitis pigmentosa mutants cause defects in the transition between the catalytic steps of splicing." *RNA* **22**(5): 793-809.

Menezes, M. R., J. Balzeau and J. P. Hagan (2018). "3' RNA Uridylation in Epitranscriptomics, Gene Regulation, and Disease." *Front Mol Biosci* **5**: 61.

Mestdagh, P., A. K. Bostrom, F. Impens, E. Fredlund, G. Van Peer, P. De Antonellis, K. von Stedingk, B. Ghesquiere, S. Schulte, M. Dews, A. Thomas-Tikhonenko, J. H. Schulte, M. Zollo, A. Schramm, K. Gevaert, H. Axelson, F. Speleman and J. Vandesompele (2010). "The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma." *Mol Cell* **40**(5): 762-773.

Meyer, M. and 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**(1): 60-67.

Miyata, Y., S. Watanabe, Y. Sagara, K. Mitsunari, T. Matsuo, K. Ohba and H. Sakai (2013). "High expression of HuR in cytoplasm, but not nuclei, is associated with malignant aggressiveness and prognosis in bladder cancer." *PLoS One* **8**(3): e59095.

Mogilyansky, E. and I. Rigoutsos (2013). "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* **20**(12): 1603-1614.

Mohagheghi, F., M. Prudencio, C. Stuani, C. Cook, K. Jansen-West, D. W. Dickson, L. Petrucelli and E. Buratti (2016). "TDP-43 functions within a network of hnRNP proteins to inhibit the production of a truncated human SORT1 receptor." *Hum Mol Genet* **25**(3): 534-545.

Moran-Jones, K., J. Grindlay, M. Jones, R. Smith and J. C. Norman (2009). "hnRNP A2 regulates alternative mRNA splicing of TP53INP2 to control invasive cell migration." *Cancer Res* **69**(24): 9219-9227.

Nguyen, T. A., M. H. Jo, Y. G. Choi, J. Park, S. C. Kwon, S. Hohng, V. N. Kim and J. S. Woo (2015). "Functional Anatomy of the Human Microprocessor." *Cell* **161**(6): 1374-1387.

Nilsen, T. W. and B. R. Graveley (2010). "Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing." *Nature* **463**(7280): 457-463.

Okada, C., E. Yamashita, S. J. Lee, S. Shibata, J. Katahira, A. Nakagawa, Y. Yoneda and T. Tsukihara (2009). "A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery." *Science* **326**(5957): 1275-1279.

Okamura, K., M. D. Phillips, D. M. Tyler, H. Duan, Y. T. Chou and E. C. Lai (2008). "The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution." *Nat Struct Mol Biol* **15**(4): 354-363.

Olive, V., M. J. Bennett, J. C. Walker, C. Ma, I. Jiang, C. Cordon-Cardo, Q. J. Li, S. W. Lowe, G. J. Hannon and L. He (2009). "miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92." *Genes Dev* **23**(24): 2839-2849.

Olive, V., I. Jiang and L. He (2010). "mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network." *Int J Biochem Cell Biol* **42**(8): 1348-1354.

Ostareck-Lederer, A., D. H. Ostareck and M. W. Hentze (1998). "Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2." *Trends Biochem Sci* **23**(11): 409-411.

Ota, A., H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, S. Kira, Y. Yoshida and M. Seto (2004). "Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma." *Cancer Res* **64**(9): 3087-3095.

Pabis, M., G. M. Popowicz, R. Stehle, D. Fernandez-Ramos, S. Asami, L. Warner, S. M. Garcia-Maurino, A. Schlundt, M. L. Martinez-Chantar, I. Diaz-Moreno and M. Sattler (2019). "HuR

biological function involves RRM3-mediated dimerization and RNA binding by all three RRMs." *Nucleic Acids Res* **47**(2): 1011-1029.

Paiva, M. M., E. T. Kimura and P. P. Coltri (2017). "miR18a and miR19a Recruit Specific Proteins for Splicing in Thyroid Cancer Cells." *Cancer Genomics Proteomics* **14**(5): 373-381.

Park, Y. M., S. J. Hwang, K. Masuda, K. M. Choi, M. R. Jeong, D. H. Nam, M. Gorospe and H. H. Kim (2012). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 controls the metastatic potential of glioblastoma by regulating PDCD4." *Mol Cell Biol* **32**(20): 4237-4244.

Plaschka, C., P. C. Lin, C. Charenton and K. Nagai (2018). "Prespliceosome structure provides insights into spliceosome assembly and regulation." *Nature* **559**(7714): 419-422.

Ratnadiwakara, M., M. Mohenska and M. L. Anko (2018). "Splicing factors as regulators of miRNA biogenesis - links to human disease." *Semin Cell Dev Biol* **79**: 113-122.

Rauhut, R., P. Fabrizio, O. Dybkov, K. Hartmuth, V. Pena, A. Chari, V. Kumar, C. T. Lee, H. Urlaub, B. Kastner, H. Stark and R. Luhrmann (2016). "Molecular architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* activated spliceosome." *Science* **353**(6306): 1399-1405.

Ray, D., H. Kazan, K. B. Cook, M. T. Weirauch, H. S. Najafabadi, X. Li, S. Gueroussov, M. Albu, H. Zheng, A. Yang, H. Na, M. Irimia, L. H. Matzat, R. K. Dale, S. A. Smith, C. A. Yarosh, S. M. Kelly, B. Nabet, D. Mecnas, W. Li, R. S. Laishram, M. Qiao, H. D. Lipshitz, F. Piano, A. H. Corbett, R. P. Carstens, B. J. Frey, R. A. Anderson, K. W. Lynch, L. O. Penalva, E. P. Lei, A. G. Fraser, B. J. Blencowe, Q. D. Morris and T. R. Hughes (2013). "A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation." *Nature* **499**(7457): 172-177.

Reimao-Pinto, M. M., V. Ignatova, T. R. Burkard, J. H. Hung, R. A. Manzenreither, I. Sowemimo, V. A. Herzog, B. Reichholf, S. Farina-Lopez and S. L. Ameres (2015). "Uridylation of RNA Hairpins by Tailor Confines the Emergence of MicroRNAs in *Drosophila*." *Mol Cell* **59**(2): 203-216.

Rorbach, G., O. Unold and B. M. Konopka (2018). "Distinguishing mirtrons from canonical miRNAs with data exploration and machine learning methods." *Sci Rep* **8**(1): 7560.

Saliminejad, K., H. R. Khorram Khorshid, S. Soleymani Fard and S. H. Ghaffari (2019). "An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods." *J Cell Physiol* **234**(5): 5451-5465.

Schepens, B., S. A. Tinton, Y. Bruynooghe, E. Parthoens, M. Haegman, R. Beyaert and S. Cornelis (2007). "A role for hnRNP C1/C2 and Unr in internal initiation of translation during mitosis." *EMBO J* **26**(1): 158-169.

Schwab, R. and O. Voinnet (2009). "miRNA processing turned upside down." *EMBO J* **28**(23): 3633-3634.

Sella, O., G. Gerlitz, S. Y. Le and O. Elroy-Stein (1999). "Differentiation-induced internal translation of c-sis mRNA: analysis of the cis elements and their differentiation-linked binding to the hnRNP C protein." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5429-5440.

Seow, Y., C. R. Sibley and M. J. Wood (2012). "Artificial mirtron-mediated gene knockdown: functional DMPK silencing in mammalian cells." *RNA* **18**(7): 1328-1337.

Singh, R. K. and T. A. Cooper (2012). "Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics." *Trends Mol Med* **18**(8): 472-482.

Spadotto, V., R. Giambruno, E. Massignani, M. Mihailovich, M. Maniaci, F. Patuzzo, F. Ghini, F. Nicassio and T. Bonaldi (2020). "PRMT1-mediated methylation of the microprocessor-associated proteins regulates microRNA biogenesis." *Nucleic Acids Res* **48**(1): 96-115.

Staley, J. P. and C. Guthrie (1998). "Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things." *Cell* **92**(3): 315-326.

Sun, C. (2020). "The SF3b complex: splicing and beyond." *Cell Mol Life Sci* **77**(18): 3583-3595.

Takakura, S., N. Mitsutake, M. Nakashima, H. Namba, V. A. Saenko, T. I. Rogounovitch, Y. Nakazawa, T. Hayashi, A. Ohtsuru and S. Yamashita (2008). "Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells." *Cancer Sci* **99**(6): 1147-1154.

Thomas, M., K. Lange-Grunweller, D. Hartmann, L. Golde, J. Schlereth, D. Streng, A. Aigner, A. Grunweller and R. K. Hartmann (2013). "Analysis of transcriptional regulation of the human miR-17-92 cluster; evidence for involvement of Pim-1." *Int J Mol Sci* **14**(6): 12273-12296.

Titov, II and P. S. Vorozheykin (2018). "Comparing miRNA structure of mirtrons and non-mirtrons." *BMC Genomics* **19**(Suppl 3): 114.

Tsuchida, A., S. Ohno, W. Wu, N. Borjigin, K. Fujita, T. Aoki, S. Ueda, M. Takanashi and M. Kuroda (2011). "miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer." *Cancer Sci* **102**(12): 2264-2271.

van Nues, R. W. and J. D. Beggs (2001). "Functional contacts with a range of splicing proteins suggest a central role for Brr2p in the dynamic control of the order of events in spliceosomes of *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **157**(4): 1451-1467.

Wang, W., X. Yang, V. J. Cristofalo, N. J. Holbrook and M. Gorospe (2001). "Loss of HuR is linked to reduced expression of proliferative genes during replicative senescence." *Mol Cell Biol* **21**(17): 5889-5898.

Wang, Z., A. Bhattacharya and D. N. Ivanov (2015). "Identification of Small-Molecule Inhibitors of the HuR/RNA Interaction Using a Fluorescence Polarization Screening Assay Followed by NMR Validation." *PLoS One* **10**(9): e0138780.

Westmark, C. J., F. A. Gourronc, V. B. Bartleson, U. Sayin, S. Bhattacharya, T. Sutula and J. S. Malter (2005). "HuR mRNA ligands expressed after seizure." *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(12): 1037-1045.

Will, C. L., H. Urlaub, T. Achsel, M. Gentzel, M. Wilm and R. Luhrmann (2002). "Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein." *EMBO J* **21**(18): 4978-4988.

Yan, C., J. Hang, R. Wan, M. Huang, C. C. Wong and Y. Shi (2015). "Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution." *Science* **349**(6253): 1182-1191.

Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* **17**(24): 3011-3016.

Zamore, P. D. and B. Haley (2005). "Ribo-gnome: the big world of small RNAs." *Science* **309**(5740): 1519-1524.

Zhang, F., Z. Cai, H. Lv, W. Li, M. Liang, X. Wei and F. Zhou (2019). "Multiple functions of HuR in urinary tumors." *J Cancer Res Clin Oncol* **145**(1): 11-18.

Zhang, L., Q. Chen, W. An, F. Yang, E. M. Maguire, D. Chen, C. Zhang, G. Wen, M. Yang, B. Dai, L. A. Luong, J. Zhu, Q. Xu and Q. Xiao (2017). "Novel Pathological Role of hnRNPA1 (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1) in Vascular Smooth Muscle Cell Function and Neointima Hyperplasia." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **37**(11): 2182-2194.

Zhang, L., T. Xu, C. Maeder, L. O. Bud, J. Shanks, J. Nix, C. Guthrie, J. A. Pleiss and R. Zhao (2009). "Structural evidence for consecutive Hel308-like modules in the spliceosomal ATPase Brr2." *Nat Struct Mol Biol* **16**(7): 731-739.

Zhang, X., C. Yan, J. Hang, L. I. Finci, J. Lei and Y. Shi (2017). "An Atomic Structure of the Human Spliceosome." *Cell* **169**(5): 918-929 e914.

Zhang, Z., Z. Yao, L. Wang, H. Ding, J. Shao, A. Chen, F. Zhang and S. Zheng (2018). "Activation of ferritinophagy is required for the RNA-binding protein ELAVL1/HuR to regulate ferroptosis in hepatic stellate cells." Autophagy **14**(12): 2083-2103.

Zia, M. F. and A. S. Flynt (2018). "Detection and Verification of Mammalian Mirtrons by Northern Blotting." Methods Mol Biol **1823**: 209-219.

