

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/02/2023.

Investigação da função biológica dos eventos de *arm switching* de microRNAs e sua potencial associação com a metilação de RNA m⁶A utilizando *zebrafish* como organismo modelo

Arthur Casulli de Oliveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Investigação da função biológica dos eventos de *arm switching* de microRNAs e sua potencial associação com a metilação de RNA m⁶A utilizando *zebrafish* como organismo modelo

Candidato: Arthur Casulli de Oliveira

Orientador: Danillo Pinhal

Co-orientador: Luiz Augusto Bovolenta

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Arthur Casulli de.

Investigação da função biológica dos eventos de *arm switching* de microRNAs e sua potencial associação com a metilação de RNA m⁶A utilizando *zebrafish* como organismo modelo / Arthur Casulli de Oliveira. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Danillo Pinhal

Coorientador: Luiz Augusto Bovolenta

Capes: 20204000

1. Biologia computacional. 2. Bioinformática.
3. MicroRNAs. 4. Sequenciamento de nucleotídeo. 5. *Zebrafish*.
6. miRNAs.

Palavras-chave: Biogênese de miRNAs; Bioinformática;
Modificação de RNAs; RNA-seq; RNAs não-codificadores.

Dedico este trabalho à minha mãe e aos meus avós, que me forneceram todo carinho e suporte necessário no decorrer do meu doutorado e à minha noiva, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, me incentivando e me fazendo crescer.

Agradeco

Ao meu orientador, Prof. Dr. Danillo Pinhal, pelo suporte, orientao científica e amizade durante todos estes anos em que fui seu aluno e por sempre me incentivar a encarar novos desafios nesta jornada acadêmica.

À minha mãe, Fernanda Bressanelli Casulli, por todo amor e carinho e por sempre estar ao meu lado me apoiando e educando, nos momentos felizes e tristes da minha vida.

Aos meus avós, Ida Maria e Pilade, por todo amor, carinho e suporte que sempre me deram durante todos os anos da minha vida e, principalmente, durante anos de graduação e pós-graduação.

Ao meu irmão, Victor Casulli de Oliveira, por todos estes anos de amizade, brincadeiras e brigas e por sempre estar ao meu lado, nas risadas e nas tristezas.

À minha noiva e amor da minha vida, Karina Gabriele Alves Dias (Nuros), por ser essa pessoa incrível e mostrar todo o amor e carinho que você tem comigo, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, me apoiando, me incentivando, me ajudando e me mostrando como crescer e ser sempre alguém melhor, e por querer compartilhar sua vida e seu futuro comigo. Te amo para sempre.

Aos meus sogros, Régis e Dona Melita e minha cunhada Melissa, por todo o carinho que sempre me deram e por terem me acolhido na família, me fazendo sempre me sentir em casa.

A todos os colegas do Laboratório Genômica e Evolução Molecular pelas conversas e discussões sobre os mais variados temas relacionados à pesquisa e à ciência.

Aos amigos de trabalho Luiz (Chokito), Lucas Di Pietro e Lucas Alves, por todas as brincadeiras, risadas e colaborações realizadas durante todo o período do meu doutorado e por sempre estarem dispostos a colaborarem durante o desenvolvimento deste projeto.

A todos os amigos feitos em meu novo hobby jogos de tabuleiro, que me abriu novas portas de conhecimento e crescimento pessoal e profissional.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação por todo trabalho realizado e dúvidas esclarecidas.

Ao Laboratório Genômica e Evolução Molecular, ao Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, à Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Universidade Estadual Paulista pela estrutura cedida para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização e finalização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2017/17510-2, cujo o apoio financeiro foi essencial para realização dessa pesquisa.

.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

- Isaac Newton

Resumo

Os microRNAs (miRNAs) são atualmente conhecidos como uma ampla classe de moléculas de RNAs reguladores da expressão gênica. Durante a biogênese, uma fita ("braço") do miRNA *duplex* é preferencialmente selecionada como um miRNA funcionalmente maduro, enquanto a outra fita é usualmente degradada. Eventos de *arm switching* ocorrem quando há mudança na preferência do braço selecionado. Isso se reflete na alteração do braço identificado como transcrito funcional, e varia de forma bastante dinâmica entre estágios do desenvolvimento, tipos de tecidos e mesmo entre espécies. Devido às particularidades de seu mecanismo de ação, os *arm switching* concedem aos miRNAs um ampliado potencial regulatório ao modificar o conjunto de alvos e, comumente, os processos biológicos por eles regulados. Entretanto, os mecanismos moleculares que promovem episódios de *arm switching* ainda necessitam ser melhor caracterizados. A identificação de metilações m⁶A em pri-miRNAs de linhagens celulares humanas reportada na literatura forneceu indícios de que este tipo de metilação poderia estar envolvida no processo de *arm switching*, principalmente devido à alteração que m⁶A promove na estrutura secundária de RNAs. Para testar esta hipótese, utilizamos o *zebrafish*, um vertebrado modelo, para avaliar se a metilação m⁶A poderia estar influenciando na ocorrência de *arm switching* nesta espécie. Para isso, confrontamos o perfil global de expressão dos braços 5p e 3p dos miRNAs pela análise de uma ampla coleção de dados de RNA-seq de períodos iniciais do desenvolvimento embrionário e diversos tecidos adultos de *zebrafish* obtidos da literatura. Adicionalmente, aplicamos a técnica de sequenciamento de metilações m⁶A (m⁶A-seq) no transcriptoma para identificar potencial correlação entre os picos de metilação presentes nos miRNAs e os eventos de *arm switching* identificados. Este conjunto de análises nos conduziu à inédita identificação de 14 eventos de *arm switching* em *zebrafish*. Pelo estudo detalhado destes casos e sua comparação aos eventos descritos em outras espécies verificamos que eventos de *arm switching* estão majoritariamente associados ao desenvolvimento ontogenético dos vertebrados. Adicionalmente, nossas análises sugerem que a expressão diferencial de isoformas de miRNAs (isomiRs) pode ser um importante modulador na prevalência dos braços. Também demonstramos, via análises de predição de alvos e enriquecimento funcional, que os eventos de *arm switching* de fato potencializam a regulação exercida pelos miRNAs, ao aumentarem o número de genes alvos, redes regulatórias e funções biológicas aos quais estão associados. No entanto, surpreendentemente, a análise criteriosa dos dados de m⁶A-seq nos forneceu indícios de que os pri-miRNAs de *zebrafish* não são efetivamente metilados, ainda que contenham sítios de metilação m⁶A em suas sequências. A

discrepância entre os resultados obtidos neste trabalho e aqueles reportados em humanos e, mais recentemente, em *Arabidopsis thaliana*, sugerem que pressões seletivas atuantes na biogênese dos miRNAs poderiam estar ocorrendo em diferentes estágios nestas espécies. Ainda, considerando dados recentes da literatura sobre a interação entre a proteína efetora de metilações m⁶A e moléculas de RNA, conjecturamos que a estrutura secundária dos pri-miRNAs pode ser um fator permissivo desta modulação. Nesse contexto, concluímos que o *arm switching* é um fenômeno conservado e que está majoritariamente associado ao desenvolvimento ontogenético dos organismos. Também não encontramos evidências de que a metilação m⁶A interfira na prevalência dos braços de miRNAs em *zebrafish*, dada sua ausência aparente nos transcritos de pri-miRNAs desta espécie. Os resultados obtidos neste estudo trazem novas contribuições para a compreensão de mecanismos regulatórios inerentes à atividade funcional de miRNAs. Adicionalmente, fornecem subsídios para pesquisas futuras interessadas em explorar os mecanismos moleculares subjacentes às diferentes taxas de metilação e sua interferência na função e dinâmica evolutiva dos miRNAs nos metazoários.

Palavras-chave: RNAs não-codificadores, biogênese de miRNAs, modificação de RNAs, bioinformática, RNA-seq, m⁶A-seq.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are currently known as a large class of regulatory RNAs. During biogenesis, one strand ("arm") of the duplex miRNA is preferably selected as a functionally mature miRNA, while the other strand is usually degraded. Arm switching events occur when there is a change in the preference of the selected arm. This is reflected in the alteration of the arm identified as the most expressed and functional transcript, and has a dynamically variation between stages of development, types of tissues and even between species. Due to the particularities of their mechanism of action, arm switching grants miRNAs an increased regulatory potential by modifying the set of targets and, commonly, the biological processes they regulate. However, the molecular mechanisms that promote arm switching episodes still need to be better characterized. The identification of m⁶A methylations in pri-miRNAs from human cell lines reported in the literature provided evidence that this type of methylation could be involved in the arm switching process, mainly due to the change that m⁶A promotes in the secondary structure of RNAs. To test this hypothesis, we used zebrafish, a model vertebrate, to assess whether m⁶A methylation could be influencing the occurrence of arm switching in this species. This way, we compared the global expression profile of the miRNAs 5p and 3p arms by analyzing a wide collection of RNA-seq data from early periods of embryonic development and various adult zebrafish tissues obtained from the literature. Additionally, we applied the m⁶A methylation sequencing technique (m⁶A-seq) in the transcriptome to identify potential correlation between the methylation peaks present in the miRNAs and the identified arm switching events. This set of analyzes led us to the unprecedented identification of 14 arm switching events in zebrafish. Through the detailed study of these cases and their comparison with the events described in other species, we verified that arm switching events are mostly associated with the ontogenetic development of vertebrates. Additionally, our data suggest that the differential expression of miRNA isoforms (isomiRs) may be an important modulator in the prevalence of arms. We have also demonstrated, via target prediction and functional enrichment analyzes, that arm switching events in fact enhance the regulation exercised by miRNAs, by increasing the number of target genes, regulatory networks and biological functions with which they are associated. However, surprisingly, careful analysis of the m⁶A-seq data provided us with evidence that zebrafish pri-miRNAs are not effectively methylated, even though they contain m⁶A methylation sites in their sequences. The discrepancy between the results obtained in this work and those reported in humans and, more recently, in *Arabidopsis thaliana*, suggest

that selective pressures acting on the biogenesis of miRNAs may be occurring at different stages in these species. Still, considering recent data from the literature on the interaction between the m⁶A methylating reader protein and RNA molecules, we conjecture that the secondary structure of the pri-miRNAs may be a permissive factor in this modulation. In this context, we conclude that arm switching is a conserved phenomenon and that it is mostly associated with the ontogenetic development of organisms. We also found no evidence that m⁶A methylation interferes with the prevalence of miRNA arms in zebrafish, given their aparent absence in pri-miRNA transcripts of this species. The results obtained in this study bring new contributions to the understanding of regulatory mechanisms inherent to the functional activity of miRNAs. Additionally, they provide subsidies for future research interested in exploring the molecular mechanisms underlying the different m⁶A methylation rates and their interference in the miRNAs function and evolutionary dynamics in metazoans.

Key-words: non-coding RNAs, miRNA biogenesis, RNA modifications, bioinformatics, RNA-seq, m⁶A-seq.

Lista de Figuras

Figura 1. Via canônica de biogênese dos miRNAs	21
Figura 2. Resumo das atividades realizadas referentes aos resultados discutidos no Capítulo 1	28
Figura 3. Amostras utilizadas para identificação de miRNAs e detecção de padrões de arm switching.....	30
Figura 4. Esquema de alinhamento para identificação dos braços 5p e 3p dos miRNAs	31
Figura 5. Estratégia de obtenção dos valores de energia livre do duplex miRNA-5p/miRNA-3p	34
Figura 6. Panorama geral dos dados de RNA-seq	35
Figura 7. Eventos de arm switching identificados durante fases do desenvolvimento e em tecidos adultos de zebrafish.....	37
Figura 8. Distribuição de eventos de arm switching entre zebrafish, tilápia do Nilo, galinha e camundongo.....	39
Figura 9. Razão da expressão dos braços 5p e 3p de eventos de arm switching ocorrendo durante os períodos de desenvolvimento estudados	41
Figura 10. Eventos de arm switching entre cópias parálogas dos miRNAs dre-mir-92a and dre-mir-153.....	44
Figura 11. Enriquecimento funcional dos alvos do dre-miR-27b expressos no embrião 24hpf.....	47
Figura 12. Padrões de isomiR do dre-miR-153a-2 expressos no cérebro	50
Figura 13. Análise das propriedades do duplex dos miRNAs.....	53
Figura 14. Resumo das atividades realizadas referentes aos resultados discutidos no Capítulo 2 ..	55
Figura 15. Verificação do sucesso do enriquecimento da fração nuclear nas amostras de RNA.....	58
Figura 16. Identificação de motifs m6A em pri-miRNAs.....	63
Figura 17. Panorama geral dos dados de m6A-seq	65
Figura 18. Funções biológicas da metilação m6A ao longo do mRNA	66

Figura 19. Genes diferencialmente expressos e diferencialmente metilados entre o cérebro e embrião 24hpf.....	67
Figura 20. Lista de miRNAs com picos de metilação m6A detectados	68
Figura 21. Picos de metilação associados à pri-miRNAs.....	70
Figura 22. Picos de metilação falso positivos associados à pri-miRNAs.....	70
Figura 23. Níveis de metilação m6A em diferentes estruturas secundárias	72

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de alvos preditos para os braços 5p e 3p dos miRNAs dre-mir-27b-1/-2, dre-mir-135b, dre-miR-137b-1/-2 e dre-mir-31 no cérebro e no embrião 24 hpf.....	46
Tabela 2. Reads representativas dos braços 5p e 3p nos tecidos embrião 24hpf e cérebro.....	50
Tabela 3. Concentração e pureza das amostras de RNA nuclear	59
Tabela 4. Qualidade das amostras de RNA nuclear	60

Lista de abreviaturas

3'UTR – 3' <i>untranslated region</i>	hnRNPC – <i>heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C</i>
5' UTR – 5' <i>untranslated region</i>	Hsc70 – <i>heat shock cognate 71 kDa protein</i>
Ago – <i>Proteínas Argonautas</i>	Hhp90 – <i>heat shock protein 90</i>
BAM – <i>Binary Alignment Map</i>	Hpf – <i>Horas pós-fecundação</i>
BSA - <i>Bovine Serum Albumin</i>	Ints12 – <i>Integrator Complex Subunit 12</i>
cDNA – <i>DNA complementar</i>	IP – <i>imunoprecipitado</i>
CDS – <i>Coding Sequence Region</i>	Kb – <i>kilobase</i>
Coil – <i>Coilin</i>	KEGG – <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Covid-19 – <i>Corona Virus Disease 2019</i>	ncRNAs – <i>Non-coding RNAs</i>
Dgcr8 - <i>DGCR8 microprocessor complex subunit</i>	Nop10 – <i>NOP10 Ribonucleoprotein</i>
EAD – <i>Ensino a distância</i>	Notch – <i>Notch signaling pathway</i>
EDTA – <i>Acido etilenodiamino tetra-acético</i>	m ⁵ C – <i>5-methylcytosine</i>
Eftud2 – <i>Elongation Factor Tu GTP Binding Domain Containing 2</i>	m ⁶ A – <i>N6-methyladenosine</i>
eIF3 – <i>eukaryotic initiation factor 3</i>	miRNA – <i>microRNA</i>
eIF4F – <i>eukaryotic initiation factor 4F</i>	miRISC – <i>miRNA Induced Silence Complex</i>
EMT – <i>epithelial-to-mesenchymal transition</i>	MREs – <i>microRNA Recognition Elements</i>
FC – <i>fold-change</i>	mRNA – <i>RNA mensageiro</i>
FPKM – <i>Fragments Per Kilebase Million</i>	Mttl3 - <i>Methyltransferase Like 3</i>
GO – <i>Gene Ontology</i>	Mttl14 – <i>Methyltransferase Like 14</i>
hnRNPA2B1 – <i>heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	pré-miRNA – <i>microRNA precursor</i>
	pri-miRNA – <i>microRNA primário</i>
	Prpf4 – <i>Pre-MRNA Processing Factor 4</i>

RLC – *RISC Loading Complex*

RPM – Rotações por minuto

rRNA – RNA ribossomal

RVC - *ribonucleoside vanadyl complexes*

Snrpa1 - Small Nuclear Ribonucleoprotein

Polypeptide A

Snrpb2 – Small Nuclear Ribonucleoprotein

Polypeptide B2

SNRNP70 - Small Nuclear Ribonucleoprotein U1 Subunit 70

TGF- β – Transforming growth factor beta

TMMP – *Target mediated miRNA protection*

TS – Estabilidade termodinâmica

TUT4 - terminal uridylyltransferase 4

TUT7 - Terminal uridylyltransferase 7

Wnt – *Wnt signaling pathway*

Ythdc1 – YTH domain-containing protein 1

Sumário

1. Introdução	17
1.1. <i>MicroRNAs e seu papel na regulação gênica</i>	17
1.2. <i>A biogênese dos microRNAs e a origem dos eventos de arm switching</i>	19
1.3. <i>A metilação m⁶A e seu impacto na estrutura e biogênese de microRNAs</i>	22
1.4. <i>Hipótese do trabalho</i>	24
1.5. <i>O zebrafish como organismo modelo</i>	24
2. Objetivos	26
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	26
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	26
3. Capítulo I: <i>Arm switching</i> e seu impacto no potencial regulatório dos microRNAs	27
3.1. <i>Material e métodos</i>	28
3.1.1. <i>Resumo do workflow</i>	28
3.1.2. <i>Obtenção dos dados de RNA-seq</i>	29
3.1.3. <i>Tratamento das amostras, identificação de microRNAs e caracterização dos perfis de expressão dos braços 5p e 3p</i>	30
3.1.4. <i>Normalização dos dados e identificação dos eventos de arm switching</i>	32
3.1.5. <i>Análise de predição de alvos e enriquecimento funcional</i>	32
3.1.6. <i>Identificação e caracterização dos padrões de isomiRs dos microRNAs sob eventos de arm switching</i>	33
3.1.7. <i>Cálculo de prevalência e incorporação diferencial dos braços 5p e 3p pela Ago</i>	33
3.2. <i>Resultados e discussão</i>	35
3.2.1. <i>Visão geral dos dados de RNA-seq</i>	35
3.2.2. <i>Eventos de arm switching estão majoritariamente associados ao desenvolvimento ontogenético dos vertebrados</i>	36
3.2.3. <i>Arm switching é um fenômeno conservado, porém seus casos são pontuais e espécie-específicos</i>	42

3.2.4. <i>Arm switching amplia potencial regulatórios dos microRNAs em zebrafish, alterando os alvos e funções biológicas por eles controladas entre tecidos distintos</i>	45
3.2.5. <i>Expressão diferencial de isomiRs é capaz de alterar a isoforma representativa dos microRNAs</i>	49
4. Capítulo II: Metilação m ⁶ A e seu papel no mecanismo de atuação dos microRNAs	54
4.1. <i>Material e Métodos</i>	55
4.1.1. <i>Resumo do workflow</i>	55
4.1.2. <i>Cuidados com zebrafish e coleta de amostras</i>	55
4.1.3. <i>Enriquecimento de RNA nuclear</i>	56
4.1.4. <i>Imunoprecipitação m⁶A, preparação das bibliotecas de cDNA e m⁶A-seq</i>	59
4.1.5. <i>Tratamento dos dados de m⁶A-seq e identificação de picos de metilação</i>	61
4.2. <i>Resultados e discussão</i>	62
4.2.1. <i>Sequências motif de metilação m⁶A estão presentes nos pri-miRNAs de zebrafish</i> ..	62
4.2.2. <i>Visão geral dos dados de m⁶A-seq</i>	64
4.2.3. <i>Não há indícios da ocorrência efetiva de metilação m⁶A em pri-miRNAs de zebrafish, apesar do enriquecimento de sequências motif</i>	68
4.2.4. <i>Hipóteses alternativas sobre a ocorrência de arm switching em zebrafish e possibilidades de pesquisas futuras</i>	74
5. <i>Conclusões e considerações finais</i>	77
5.1. <i>Conclusões</i>	78
5.2. <i>Considerações finais</i>	79
6. <i>Referências bibliográficas</i>	80
7. <i>Apêndice</i>	93
7.1. <i>Material suplementar</i>	93
7.2. <i>Atividades acadêmicas realizadas durante o período de doutoramento</i>	93

1. Introdução

1.1. MicroRNAs e seu papel na regulação gênica

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores (ncRNAs) de aproximadamente 22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente. Primeiramente descritos como atuantes durante o desenvolvimento em *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993), possuem atualmente a reconhecida importância de participar do controle de virtualmente todos os processos celulares já caracterizados de animais, plantas e, inclusive, alguns vírus (Lee et al., 1993; Zhang et al., 2006; Jia et al., 2008). Estes processos perfazem desde o desenvolvimento ontogenético, proliferação, diferenciação e homeostasia celular, até respostas a estímulos ambientais e doenças tais como os diversos tipos de câncer (Qiu et al., 2012; Shenoy e Blelloch, 2014; Reddy, 2015; Gebert e MacRae, 2018).

A via canônica de mecanismo de ação dos miRNAs ocorre pelo seu acoplamento com proteínas da família argonauta (*Ago*), formando o complexo miRISC (*miRNA Induced Silence Complex*), que por sua vez interage com transcritos de RNA mensageiro (mRNA) alvos, promovendo o silenciamento da expressão gênica. O pareamento dos miRNAs com seus alvos ocorre preferencialmente na região 3'UTR (3' *Untranslated region*) (Dexheimer e Cochella, 2020), embora também haja evidências de interação em éxons (Reckzo et al., 2012; Hausser et al., 2013) e na região 5'UTR (Devlin et al., 2010; Zhou e Rigoutsos, 2014).

Molecularmente, a interação miRNA-alvo ocorre pelo pareamento simples entre as bases nitrogenadas destas moléculas, geralmente apresentando complementaridade total nas plantas e parcial nos animais (embora haja exceções). Em animais, a complementaridade dos miRNAs com seus alvos se dá preferencialmente por uma sequência de sete nucleotídeos (nucleotídeos 2 a 8 na porção 5' do miRNA), chamada de sequência *seed*, embora interações menos comuns, não baseadas na *seed* também tenham sido reportadas (Chi et al., 2012; Clark et al., 2014) assim como foi demonstrado que a porção 3' de alguns miRNAs pode ser tão relevante quanto a região *seed* na detecção de seus alvos em animais (Broughton et al., 2016). Uma vez estabelecida a interação miRNA-alvo, a regulação da expressão gênica ocorre principalmente por meio da repressão da tradução – mediante à inibição do reconhecimento do 5'-Cap do mRNA alvo e desacoplamento prematuro do ribossomo – e pela degradação prematura do mRNA – via mecanismos de deadenilação (He e Hannon, 2004; Petersen et al., 2006; Mathonnet et al., 2007; Fabian et al., 2010).

Durante a biogênese dos miRNAs, uma importante etapa consiste no processamento da molécula precursora em um *duplex* de RNA que é reconhecido pelas proteínas *Ago* para formar o complexo miRISC (Lee et al., 2003). Neste reconhecimento, um dos braços do *duplex* é selecionado para incorporar o complexo miRISC, se tornando o miRNA funcional, enquanto o outro braço é liberado e rapidamente degradado (Griffiths-Jones et al., 2011). Para alguns miRNAs, um dos braços tende a acumular na célula, sendo preferencialmente selecionado pela *Ago*, enquanto o outro braço possui baixos níveis de acúmulo celular (Hutvagner, 2005; Griffiths-Jones et al., 2011). Já para outros miRNAs, verifica-se que as sequências precursoras podem ser processadas de maneira a produzir uma quantidade significativa de transcritos funcionais oriundos de ambos os braços (Hutvagner, 2005; Okamura et al., 2008; Griffiths-Jones et al., 2011). Entretanto, em alguns casos, o braço selecionado pela *Ago* para ser incorporado ao complexo miRISC e tornar-se o miRNA funcional é amplamente variável entre diferentes contextos biológicos, como por exemplo entre diferentes períodos do desenvolvimento, tecidos e condições fisiológicas. O resultado deste processo, que conduz à seleção diferencial de braço, é conhecido como *arm switching* (Ro et al., 2007; Wit et al., 2009; Griffiths-Jones et al., 2011; Ludwig et al., 2016; Kern et al., 2020).

Uma vez que o reconhecimento dos alvos pelos miRNAs ocorre devido à complementaridade entre suas sequências (especialmente entre a região *seed* dos miRNAs e os chamados *microRNA recognition elements* (MREs) ou sítios de interação, presentes no mRNA), a ocorrência de eventos de *arm switching* permite aos miRNAs modular um conjunto potencialmente diferente de alvos, a depender do braço preferencialmente expresso. De fato, análises de predição de alvos de miRNAs realizados em *Drosophila* e humano demonstram que os braços distintos de um mesmo miRNA tendem a regular transcritos diferentes de mRNAs. Adicionalmente, não só estes transcritos diferem entre si, como o papel biológico por eles desempenhados também tende a ser distinto (Marco et al., 2012). Desta maneira, os eventos de *arm switching* decorrentes da complexa biogênese dos miRNAs emergem como um poderoso mecanismo de regulação gênica, capaz de modular vias regulatórias envolvidas em múltiplas funções biológicas relevantes em diversos contextos normais e patológicos.

A ocorrência de *arm switching* já foi detectada em diversas espécies de vertebrados, tais como em humano (*Homo sapiens*), camundongo (*Mus musculus*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*) e galinha (*Gallus gallus*) (Ro et al., 2007; Glazov et al., 2008; Li et al., 2011; Guo et al., 2015); em espécies de invertebrados, como a mosca doméstica (*Drosophila melanogaster*) e o besouro marrom (*Tribolium castaneum*) (Griffiths Jones et al., 2011); entre diferentes

5.2. Considerações finais

Adicionalmente aos resultados obtidos, o desenvolvimento desta pesquisa e a realização das análises aqui descritas foram fundamentais para minha formação. Os desafios superados e discussões realizadas, bem como o aprendizado de diversas técnicas de bancada e computacionais ao longo de todo o período de doutoramento, proporcionaram a aquisição uma de rica experiência na área de biologia e evolução molecular. De maneira similar, as experiências obtidas durante este período me permitiram contribuir de maneira efetiva em diversas outras pesquisas, buscando sempre que possível transmitir os conhecimentos adquiridos aos colegas de laboratório.

A participação em atividades paralelas ao desenvolvimento da pesquisa deste projeto, como a realização de estágios docência, participação de eventos, ministração de palestras e aulas em disciplinas, co-orientação de alunos de graduação e mestrado, entre outras atividades, também foram fundamentais para minha formação acadêmica e profissional.

As recentes restrições oriundas da pandemia Covid-19, que iniciaram em abril de 2020 e perduram até os dias de hoje, prejudicaram a execução de algumas análises funcionais até o período de defesa do doutoramento. Entretanto, o tempo inicialmente destinado a estes experimentos pode ser convertido na execução de análises computacionais inicialmente não previstas, que geraram resultados inéditos e dados que ainda poderão ser explorados futuramente. Adicionalmente, a realização de estágio docência em meio a paralisação das aulas presenciais, no primeiro semestre de 2020, me possibilitou presenciar os desafios e mudanças didáticas requeridas no EAD, complementando a minha formação na área de educação.

6. Referências Bibliográficas

- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 12;4.
- Ahkin Chin Tai JK, Freeman JL (2020) Zebrafish as an integrative vertebrate model to identify miRNA mechanisms regulating toxicity. *Toxicol Rep*. 7:559-570.
- Aiello NM, Bajor DL, Norgard RJ, Sahmoud A, Bhagwat N, Pham MN, Cornish TC, Iacobuzio-Donahue CA, Vonderheide RH, Stanger BZ (2016) Metastatic progression is associated with dynamic changes in the local microenvironment. *Nat Commun*. 7:12819.
- Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF (2015a) N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*. 519(7544):482-5.
- Alarcón CR, Goodarzi H, Lee H, Liu X, Tavazoie S, Tavazoie SF (2015b) HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A- Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell*. 162(6):1299-308.
- An J, Lai J, Lehman ML, Nelson CC (2013) miRDeep*: an integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 41(2): 727–737.
- Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, Zon LI (2002) Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*. 1(3):229-31.
- Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, Zamore PD (2010) Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science*. 328(5985):1534-9.
- Axtell MJ (2013) ShortStack: Comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *RNA*. 19(6): 740–751.
- Babin PJ, Goizet C, Raldúa D (2014) Zebrafish models of human motor neuron diseases: advantages and limitations. *Prog Neurobiol*. 118:36-58.
- Bakkers J (2011) Zebrafish as model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 91(2):279-88.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136(2):215-33.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 37(Web Server issue):W202-8.
- Bailey TL, Machanick P (2012) Inferring direct DNA binding from ChIP-seq. *Nucleic Acids Res*. 40(17):e128.
- Beffagna G (2019) Zebrafish as a Smart Model to Understand Regeneration After Heart Injury: How Fish Could Help Humans. *Front Cardiovasc Med*. 6:107.
- Bhat SS, Bielewicz D, Gulanicz T, Bodi Z, Yu X, Anderson SJ, Szewc L, Bajczyk M, Dolata J, Grzelak N, et al. (2020) mRNA adenosine methylase (MTA) deposits m6A on pri-

- miRNAs to modulate miRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(35):21785-21795.
- Bokar JA (2005) The biosynthesis and functional roles of methylated nucleosides in eukaryotic mRNA. *Topics in Current Genetics*. 12:141–177.
- Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE (2016) Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*. 64(2):320-333.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 10(12):1957-66.
- Cao T, Zhen XC (2018) Dysregulation of miRNA and its potential therapeutic application in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther*. 24(7):586-597.
- Chatterjee S, Fasler M, Büssing I, Grosshans H (2011) Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Dev Cell*. 20(3):388-96
- Chávez MN, Morales RA, López-Crisosto C, Roa JC, Allende ML, Lavandero S (2020) Autophagy Activation in Zebrafish Heart Regeneration. *Sci Rep*. 10(1):2191.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 436: 740–744
- Chen T, Hao YJ, Zhang Y, Li MM, Wang M, Han W, Wu Y, Lv Y, Hao J, Wang L, Li A, Yang Y, Jin KX, Zhao X, Li Y, Ping XL, Lai WY, Wu LG, Jiang G, Wang HL, Sang L, Wang XJ, Yang YG, Zhou Q (2015) m(6)A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 16(3):289-301.
- Chen L, Sun H, Wang C, Yang Y, Zhang M, Wong G (2018) miRNA arm switching identifies novel tumour biomarkers. *EBioMedicine*. 38:37-46.
- Chi SW, Hannon GJ, Darnell RB (2012) An alternative mode of microRNA target recognition. *Nat Struct Mol Biol* 19: 321–32.
- Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Blelloch R, Schroth GP, Nusbaum C, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*. 24(10):992-1009.
- Clark PM, Loher P, Quann K, Brody J, Londin ER, Rigoutsos I. 2014. Argonaute CLIP-Seq reveals miRNA targetome diversity across tissue types. *Sci Rep* 4: 5947.
- Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S, Barbacioru C, Steptoe AL, Martin HC, Nourbakhsh E, et al. (2011) MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol*. 12(12):R126

- Colaiacono M, Bernardo L, Centomani I, Crosatti C, Giusti L, Orrù L, Tacconi G, Lamontanara A, Cattivelli L, Faccioli P (2012) A Survey of MicroRNA Length Variants Contributing to miRNome Complexity in Peach (*Prunus Persica* L.). *Front Plant Sci.*3:165.
- Coots RA, Liu XM, Mao Y, Dong L, Zhou J, Wan J, Zhang X, Qian SB (2017) m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation. *Mol Cell.* 68(3):504-514.e7.
- Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell.* 23(2):431-42.
- Cutting AD, Bannister SC, Doran TJ, Sinclair AH, Tizard MV, Smith CA (2012) The potential role of microRNAs in regulating gonadal sex differentiation in the chicken embryo. *Chromosome Res.* 20(1):201-13.
- de la Mata M, Gaidatzis D, Vitanescu M, Stadler MB, Wentzel C, Scheiffele P, Filipowicz W, Großhans H (2015) Potent degradation of neuronal miRNAs induced by highly complementary targets. *EMBO Rep.* 16(4):500-11.
- Devlin AH, Thompson P, Robson T, McKeown SR (2010) Cytochrome P450 1B1 mRNA untranslated regions interact to inhibit protein translation. *Mol Carcinog* 49: 190–199.
- Dexheimer PJ, Cochella L (2020) MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol.* 8:409.
- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, Sorek R, Rechavi G (2012) Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature.* 485(7397):201-6.
- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Salmon-Divon M, Amariglio N, Rechavi G (2013) Transcriptome-wide mapping of N6-methyladenosine by m6A-seq based on immunocapturing and massively parallel sequencing. *Nat Protoc.* 8(1):176-89. doi: 10.1038/nprot.2012.148.
- Drummond AE (2005) TGFbeta signalling in the development of ovarian function. *Cell Tissue Res.* 322(1):107-15.
- Enright AJ1, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 5(1):R1.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 79: 351-379.
- Fan YS, Hu YJ, Yang WX (2011) TGF- β superfamily: how does it regulate testis development. *Mol Biol Rep.* 39(4):4727-41.
- Fromm B, Domanska D, Høye E, Ovchinnikov V, Kang W, Aparicio-Puerta E, Johansen M, Flatmark K, Mathelier A, Hovig E, Hackenberg M, Friedländer MR, Peterson KJ. (2019) MirGeneDB 2.0: the metazoan microRNA complement. *Nucleic Acids Res.* 48(D1):D132-D141.

- Fuchs Wightman F, Giono LE, Fededa JP, de la Mata M (2018) Target RNAs Strike Back on MicroRNAs. *Front Genet.* 9:435.
- Gebert LFR and MacRae IJ (2018) Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(1):21–37.
- Glazov EA, Cottee PA, Barris WC, Moore RJ, Dalrymple BP, Tizard ML (2008) A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome Res.* 18(6):957-64.
- Guo L, Chen F (2014) A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene.* 2014 Jul 1;544(1):1-7.
- Guo L, Yu J, Yu H, Zhao Y, Chen S, Xu C, Chen F (2015) Evolutionary and expression analysis of miR-#-5p and miR-#-3p at the miRNAs/isomiRs levels. *Biomed Res Int.* 168358.
- Guyon JR, Steffen LS, Howell MH, Pusack TJ, Lawrence C, Kunkel LM (2007) Modeling human muscle disease in zebrafish. *Biochim Biophys Acta.* 1772(2):205-15.
- Griffiths-Jones S, Hui JH, Marco A, Ronshaugen M (2011) MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO Rep.* 12(2):172-7.
- Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(8):509-24.
- Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 6: 961–967
- Han J, Wang JZ, Yang X, Yu H, Zhou R, Lu HC, Yuan WB, Lu JC, Zhou ZJ, Lu Q, Wei JF, Yang H (2019) METTL3 promote tumor proliferation of bladder cancer by accelerating pri-miR221/222 maturation in m6A-dependent manner. *Mol Cancer.* 18(1):110.
- Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C et al (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 32(Database issue):D258-61.
- Hason M, Bartunek P (2019) Zebrafish Models of Cancer-New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes (Basel).* 10(11):935.
- Haseeb A, Makki MS, Khan NM, Ahmad I, Haqqi TM (2017) Deep sequencing and analyses of miRNAs, isomiRs and miRNA induced silencing complex (miRISC)-associated miRNome in primary human chondrocytes. *Sci Rep.* 2017 Nov 9;7(1):15178.
- Hausser J, Syed AP, Bilen B, Zavolan M (2013) Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation. *Genome Res* 23: 604–615.
- He L e Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5: 522-531.

- Hu X, Chen W, Li J, Huang S, Xu X, Zhang X, Xiang S, Liu C (2018) ZFLNC: a comprehensive and well-annotated database for zebrafish lncRNA. Database (Oxford). 2018:bay114.
- Hutvagner G (2005) Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. FEBS Lett. 579: 5850–5857.
- Huyseune A, Thesleff I (2004) Continuous tooth replacement: the possible involvement of epithelial stem cells. Bioessays. 26(6):665-71.
- Iizasa H, Wulff BE, Alla NR, Maragkakis M, Megraw M, Hatzigeorgiou A, Iwakiri D, Takada K, Wiedmer A, Showe L, Lieberman P, Nishikura K (2010) Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. J Biol Chem. 285(43):33358-70
- Ji X, Jiang P, Luo J, Li M, Bai Y, Zhang J, Han B (2020) Identification and characterization of miRNAs involved in cold acclimation of zebrafish ZF4 cells. PLoS One. 15(1):e0226905.
- Jia W, Li Z, Lun Z (2008) Discoveries and functions of virus-encoded MicroRNAs. Chinese Science Bulletin. 53:169–177.
- Kaaij LJ, Hoogstrate SW, Berezikov E, Ketting RF (2013) piRNA dynamics in divergent zebrafish strains reveal long-lasting maternal influence on zygotic piRNA profiles. RNA. 19(3):345-56.
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 28(1):27-30.
- Kawahara Y, Zinshteyn B, Chendrimada TP, Shiekhattar R, Nishikura K (2007a) RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. EMBO reports. 8:763–769.
- Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, Iizasa H, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K (2007b) Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. Science. 315(5815):1137-40.
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. Genes Dev. 15: 2654–2659.
- Kern F, Amand J, Senatorov I, Isakova A, Backes C, Meese E, Keller A, Fehlmann T (2020) miRSwitch: detecting microRNA arm shift and switch events. Nucleic Acids Res. 48(W1):W268-W274.
- Kim H, Kim J, Yu S, Lee YY, Park J, Choi RJ, Yoon SJ, Kang SG, Kim VN. (2020) A Mechanism for microRNA Arm Switching Regulated by Uridylation. Mol Cell. 78(6):1224-1236.e5.
- Kim Y, Yeo J, Lee JH, Cho J, Seo D, Kim JS, Kim VN. Deletion of human tarbp2 reveals cellular microRNA targets and cell-cycle function of TRBP. Cell Rep. 9(3):1061-74.

- Kimmel CB (1989) Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet.* 5, 283–288.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115(2):209-16.
- Kontur C, Jeong M, Cifuentes D, Giraldez AJ (2020) Ythdf m6A Readers Function Redundantly during Zebrafish Development. *Cell Rep.* 33(13):108598.
- Kossack ME, Draper BW (2019) Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). *Curr Top Dev Biol.* 134:119-149.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* D152-7.
- Krol J, Sobczak K, Wilczynska U, Drath M, Jasinska A, Kaczynska D, Krzyzosiak WJ (2004) Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J Biol Chem.* 279(40):42230-9.
- Kuo WT, Su MW, Lee YL, Chen CH, Wu CW, Fang WL, Huang KH, Lin WC (2016) Bioinformatic Interrogation of 5p-arm and 3p-arm Specific miRNA Expression Using TCGA Datasets. *J Clin Med.* 4(9):1798-814.
- Kwak PB, Tomari Y (2012) The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol.* 19(2):145-51.
- Lakshmi SS, Agrawal S (2008) piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic acids res.* 36:D173–D177.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, et al. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 129(7):1401-14.
- Lee HY, Doudna JA (2012) TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA.* 18(11):2012-9.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75:843–54.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21(17):4663-70.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 425(6956):415-9.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23(20):4051-60.
- Li M, Hromowyk KJ, Amacher SL, Currie PD (2017) Muscular dystrophy modeling in zebrafish. *Methods Cell Biol.* 138:347-380.

- Li SC, Liao YL, Chan WC, Ho MR, Tsai KW, Hu LY, Lai CH, Hsu CN, Lin WC (2011) Interrogation of rabbit miRNAs and their isomiRs. *Genomics*. 98(6):453-9.
- Li L, Song Y, Shi X, Liu J, Xiong S, Chen W, Fu Q, Huang Z, Gu N, Zhang R (2018) The landscape of miRNA editing in animals and its impact on miRNA biogenesis and targeting. *Genome Res*. 28(1):132-143.
- Lin MH, Chen YZ, Lee MY, Weng KP, Chang HT, Yu SY, Dong BJ, Kuo FR, Hung LT, Liu LF, Chen WS, Tsai KW (2018) Comprehensive identification of microRNA arm selection preference in lung cancer: miR-324-5p and -3p serve oncogenic functions in lung cancer. *Oncol Lett*. 15(6):9818-9826.
- Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M (2004) Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol*. 11(6):576-7.
- Liu B, Merriman DK, Choi SH, Schumacher MA, Plangger R, Kreutz C, Horner SM, Meyer KD, Al-Hashimi HM (2018) A potentially abundant junctional RNA motif stabilized by m6A and Mg²⁺. *Nat Commun*. 9(1):2761.
- Liu N, Dai Q, Zheng G, He C, Parisien M, Pan T (2015) N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*. 518(7540):560-4.
- Liu N, Pan T (2016) N6-methyladenosine-encoded epitranscriptomics. *Nat Struct Mol Biol*. 23(2):98-102.
- Liu N, Zhou KI, Parisien M, Dai Q, Diatchenko L, Pan T (2017) N6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Res*. 45(10):6051-6063.
- Long H, Wang X, Chen Y, Wang L, Zhao M, Lu Q (2018) Dysregulation of microRNAs in autoimmune diseases: Pathogenesis, biomarkers and potential therapeutic targets. *Cancer Lett*. 428:90-103.
- Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E. et al. (2016) Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res*. 44:3865–3877.
- Ma H, Wu Y, Choi JG, Wu H (2013) Lower and upper stem-single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site. *Proc. Natl Acad. Sci*. 110: 20687–20692.
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA (2006) Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*. 311(5758):195-8.
- Mao Y, Dong L, Liu XM, Guo J, Ma H, Shen B, Qian SB (2019) m6A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2. *Nat Commun*. 10(1):5332.
- Mathew S, Sivadas A, Sehgal P, Kaushik K, Vellarikkal SK, Scaria V, Sivasubbu S (2019) Methods to Study Long Noncoding RNA Expression and Dynamics in Zebrafish Using RNA Sequencing. *Methods Mol Biol*. 1912:77-110.

- Marco A, Macpherson JI, Ronshaugen M, Griffiths-Jones S (2012) MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. *Silence*. 27;3(1):8.
- Martin M (2011) Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet.journal*. 17:1.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. 317(5845):1764-7.
- Meiser N, Mench N, Hengesbach M (2020) RNA secondary structure dependence in METTL3-METTL14 mRNA methylation is modulated by the N-terminal domain of METTL3. *Biol Chem*. Online ahead of Print 2020 Oct 19
- Meng J, Lu Z, Liu H, Zhang L, Zhang S, Chen Y, Rao MK, Huang Y. A protocol for RNA methylation differential analysis with MeRIP-Seq data and exomePeak R/Bioconductor package. *Methods*. 2014 Oct 1;69(3):274-81.
- Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*. 22;149(7):1635-46.
- Milne I, Stephen G, Bayer M, Cock PJ, Pritchard L, Cardle L, Shaw PD, Marshall D (2013) Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Brief Bioinform*. 14(2):193-202.
- Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2006) A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*. 126(6):1203-17.
- Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, et al (2008) Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*. 18:610–21.
- Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP (2012) IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet*. 28(11):544-9.
- Novoa B, Figueras A (2012) Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. *Adv Exp Med Biol*. 946:253-75.
- Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T (2009) A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*. 326(5957):1275-9.
- Okamura K, Liu N, Lai EC (2009) Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Mol Cell*. 36: 431–444.

- Oliveira AC, Bovolenta LA, Nachtigall PG, Herkenhoff ME, Lemke N, Pinhal D (2017) Combining Results from Distinct MicroRNA Target Prediction Tools Enhances the Performance of Analyses. *Front Genet.* 8:59.
- Outtandy P, Russell C, Kleta R, Bockenhauer D (2019) Zebrafish as a model for kidney function and disease. *Pediatr Nephrol.* 34(5):751-762.
- Patel VD, Capra JA (2017) Ancient human miRNAs are more likely to have broad functions and disease associations than young miRNAs. *BMC Genomics.* 18(1):672.
- Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol.* 2015 Mar;33(3):290-5.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Moll. Cell.* 21: 533-542.
- Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, Adhikari S, Shi Y, Lv Y, Chen YS, et al. (2014) Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res.* 24(2):177-89.
- Pinhal D, Bovolenta LA, Moxon S, Oliveira AC, Nachtigall PG, Acencio, ML, Patton JG, Hilsdorf AWS, Lemke N, Martins C (2018) Genome-wide microRNA screening in Nile tilapia reveals pervasive isomiRs' transcription, sex-biased arm switching and increasing complexity of expression throughout development. *Sci. Rep.* 8(1):8248.
- Presslauer C, Tilahun Bizuayehu T, Kopp M, Fernandes JM, Babiak I (2017) Dynamics of miRNA transcriptome during gonadal development of zebrafish. *Sci Rep.* 7:43850.
- Qin Z, Li C, Mao L, Wu L (2014) Novel insights from non-conserved microRNAs in plants. *Front Plant Sci.* 5:586.
- Qiu C, Chen G, Cui Q (2012) Towards the understanding of microRNA and environmental factor interactions and their relationships to human diseases. *Sci Rep.* 2:318.
- Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG (2012) Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics.* 28(6):771-6.
- Reddy KB (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer. Cell. Int.* 15:38.
- Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H2, Vilo J (2016) g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res.* 44(W1):W83-9.
- Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W (2007) Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 35: 5944–5953.
- Robinson MD, Oshlack A (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11(3):R25.

- Ru W, Zhang X, Yue B, Qi A, Shen X, Huang Y, Lan X, Lei C, Chen H (2020) Insight into m6A methylation from occurrence to functions. *Open Biol.* 10(9):200091.
- Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC (2007) Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res.* 17: 1850–186.
- Russell AP, Ghobrial L, Ngo S, Yerbury J, Zacharewicz E, Chung R, Lamon S (2018) Dysregulation of microRNA biogenesis machinery and microRNA/RNA ratio in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Muscle Nerve.* 57(5):838-847.
- Sablok G, Srivastva AK, Suprasanna P, Baev V, Ralph PJ (2015) isomiRs: Increasing Evidences of isomiRs Complexity in Plant Stress Functional Biology. *Front Plant Sci.* 6:949.
- Saleem S, Kannan RR (2018) Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell Death Discov.* 4:45.
- Santoriello C, Zon LI (2012) Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest.* 122(7):2337-43.
- Sharma K, Sharma O, Tripathi M (1998) Female heterogamety in *Danio rerio* (Cypriniformes: Cyprinidae) *Proc Ind Natl Sci Acad.* 68:123–6
- Sharma, D., Sehgal, P., Mathew, S. et al (2019) A genome-wide map of circular RNAs in adult zebrafish. *Sci Rep.* 9:3432.
- Sharp PA (2009) The centrality of RNA. *Cell.* 136:577–580
- Shen Y, Guo X, Wang W (2017) Identification and characterization of circular RNAs in zebrafish. *FEBS Lett.* 591(1):213-220.
- Shenoy A, Blelloch RH (2014) Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(9):565-576.
- Sheu-Gruttadauria J, Pawlica P, Klum SM, Wang S, Yario TA, Schirle Oakdale NT, Steitz JA, MacRae IJ (2019) Structural Basis for Target-Directed MicroRNA Degradation. *Mol Cell.* 75(6):1243-1255.e7.
- Soh YQ1, Junker JP2, Gill ME1, Mueller JL3, van Oudenaarden A2, Page DC4 (2015) A Gene Regulatory Program for Meiotic Prophase in the Fetal Ovary. *PLoS Genet.* 17;11(9):e1005531.
- Staton KA, Edger PP, Puzey JR, Kinser T, Cheng P, Vernon DM, Forsthoefel NR, Cooley AM (2017) A Whole-Transcriptome Approach to Evaluating Reference Genes for Quantitative Gene Expression Studies: A Case Study in *Mimulus*. *G3.* 7(4): 1085–1095.
- Stocks MB, Moxon S, Mapleson D, Woolfenden HC, Mohorianu I, Folkes L, Schwach F, Dalmay T, Moulton V (2012) The UEA sRNA workbench: a suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. *Bioinformatics.* 28(15):2059-61.

- Suzuki HI, Katsura A, Yasuda T, Ueno T, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K (2015) Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nat Struct Mol Biol.* 2015 Jul;22(7):512-21.
- Tang Y, Chen K, Song B, Ma J, Wu X, Xu Q, Wei Z, Su J, Liu G, Rong R, Lu Z, de Magalhães JP, Rigden DJ, Meng J (2021) m6A-Atlas: a comprehensive knowledgebase for unraveling the N6-methyladenosine (m6A) epitranscriptome. *Nucleic Acids Res.* 49(D1):D134-D143.
- Telonis AG, Magee R, Loher P, Chervoneva I, Londin E, Rigoutsos I (2017) Knowledge about the presence or absence of miRNA isoforms (isomiRs) can successfully discriminate amongst 32 TCGA cancer types. *Nucleic Acids Res.* 45(6):2973-2985.
- Treiber T, Treiber N, Meister G (2018). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(1):5-20.
- Tsai KW, Leung CM, Lo YH, Chen TW, Chan WC, Yu SY, Tu YT, Lam HC, Li SC, Ger LP, Liu WS, Chang HT (2016) Arm Selection Preference of MicroRNA-193a Varies in Breast Cancer. *Sci Rep.* 6:28176.
- Valenzuela-Muñoz V, Pereiro P, Álvarez-Rodríguez M et al (2019) Comparative modulation of lncRNAs in wild-type and rag1-heterozygous mutant zebrafish exposed to immune challenge with spring viraemia of carp virus (SVCV). *Sci Rep.* 9, 14174.
- Vaz C, Wee CW, Lee GPS, Ingham PW, Tanavde V, Mathavan S (2015) Deep sequencing of small RNA facilitates tissue and sex associated microRNA discovery in zebrafish. *BMC Genomics.* 16:950.
- Wang S, Zheng Z, Chen P, Wu M (2019) Tumor classification and biomarker discovery based on the 5'isomiR expression level. *BMC Cancer.* 19(1):127.
- Wei C, Salichos L, Wittgrove CM, Rokas A, Patton JG (2012) Transcriptome-wide analysis of small RNA expression in early zebrafish development. *RNA.* 18(5): 915–929.
- Wilson CA, High SK, McCluskey BM, Amores A, Yan YL, Titus TA, Anderson JL, Batzel P, Carvan MJ 3rd, Scharl M, Postlethwait JH (2014) Wild sex in zebrafish: loss of the natural sex determinant in domesticated strains. *Genetics.* 198(3):1291-308.
- Wingett SW, Andrews S (2018) FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *eCollection.* 7:1338.
- Wise SB, Stock DW (2010) bmp2b and bmp4 are dispensable for zebrafish tooth development. *Dev Dyn.* 239(10):2534-46.
- Wit E, Linsen S, Cuppen E, Berezikov E (2009) Repertoire and evolution of miRNA genes in four divergent nematode species. *Genome Res.* 19: 2064–2074.
- Woldemariam NT, Agafonov O, Høyheim B, Houston RD, Taggart JB, Andreassen R (2019) Expanding the miRNA Repertoire in Atlantic Salmon; Discovery of IsomiRs and miRNAs Highly Expressed in Different Tissues and Developmental Stages. *Cells.* 8(1). pii: E42.

- Wu H, Ye C, Ramirez D, Manjunath N (2009) Alternative processing of primary microRNA transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA. *PLoS One*. 4(10):e7566.
- Wulff BE, Nishikura K (2015) Modulation of microRNA expression and function by ADARs. *Curr Top Microbiol Immunol*. 353: 91–109
- Xiao W, Adhikari S, Dahal U, Chen YS, Hao YJ, Sun BF, Sun HY, Li A, Ping XL, Lai WY, et al. (2016) Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol Cell*. 61(4):507-519.
- Xia H, Zhong C, Wu X, Chen J, Tao B, Xia X, Shi M, Zhu Z, Trudeau VL, Hu W (2018) Mettl3 Mutation Disrupts Gamete Maturation and Reduces Fertility in Zebrafish. *Genetics*. 208(2):729-743
- Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, Nishikura K (2006) Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*. 13(1):13-21.
- Yu G, Wang LG, He QY (2015) ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics*. 31(14):2382-3.
- Zayed Y, Qi X, Peng C (2019) Identification of Novel MicroRNAs and Characterization of MicroRNA Expression Profiles in Zebrafish Ovarian Follicular Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 10:518.
- Zhang C, Chen Y, Sun B, Wang L, Yang Y, Ma D, Lv J, Heng J, Ding Y, Xue Y, Lu X, Xiao W, Yang YG, Liu F (2017) m6A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature*. 549(7671):273-276.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS (2008) Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*. 9(9):R137.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2006) Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol*. 289(1):3-16.
- Zhang Z, Pi J, Zou D, Wang X, Xu J, Yu S, Zhang T, Li F, Zhang X, Zhao H, Wang F, Wang D, Ma Y, Yu J (2019) microRNA arm-imbalance in part from complementary targets mediated decay promotes gastric cancer progression. *Nat Commun*. 10(1):4397.
- Zhao BS, Wang X, Beadell A, Beadell AV, Lu Z, Shi H, Kuuspalu A, Ho RK, He C (2017) m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature* 542, 475–478.
- Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2008) Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J*. 24, 138–148.
- Zhou H, Rigoutsos I (2014) MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. *RNA*. 2014 Sep;20(9):1431-9.

- Zhou X, Zuo Z, Zhou F, Zhao W, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Cheng H, Zhou R (2010) Profiling sex-specific piRNAs in zebrafish. *Genetics*. 186(4):1175-85.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 31(13):3406-15.