

Biogénese e funções do circRNA

Daniel Eleutério (46932), Nuno Oliveira (47221)

Disciplina: Regulação da Expressão Génica

Professora: Luisa Cyrne



Resumo

RNAs circulares são moléculas que têm vindo a captar o interesse de investigadores pelas suas potenciais funções na célula. No entanto estudos aprofundados sobre os mecanismos de produção destas moléculas só começaram a ser estudados recentemente. O desenvolvimento de técnicas de sequenciação de RNA sem a cauda poliadenilada foi o principal responsável pela possibilidade de realizar estudos mais aprofundados sobre estas moléculas. ^[1]

Nesta monografia pretende-se elucidar quais as características dos genes que originam circRNA e os mecanismos envolvidos na sua biogénese. De seguida aprofundar-se-ão as funções destas moléculas no organismo e identificam-se exemplos já descritos na literatura. Apesar de muitos mecanismos e a extensão de aplicações sobre circRNA serem ainda desconhecidos, estas moléculas possuem já indícios de imenso potencial futuro.

Biogénese

CircRNA encontram-se maioritariamente presentes no citoplasma das células. ^[2] Estes podem ter como origem várias moléculas e processos associados a RNA, podem surgir a partir de rRNA ^[3], após rearranjos em tRNA ^[4] ou até no processo de libertação de intrões *lariat*, onde se formam RNAs intrónicos circulares (ciRNA). Porém a molécula mais estudada actualmente que leva à produção de circRNA é o pre-mRNA. ^[1]

Durante os fenómenos de *splicing* é possível que o pre-mRNA dê origem a um circRNA cujo *splice site* 5' a *downstream* se ligue ao *splice site* 3' em *upstream* através de uma ligação fosfodiéster 3'-5'. Dá-se então o nome de *back-splicing* a esta forma alternativa de *splicing* uma vez que a ligação formada tem a ordem inversa dos exões, no *splicing* canónico é a extremidade 5' *upstream* que se liga à extremidade 3' *downstream*.

Após o *back-splicing* é de notar que o RNA resultante ainda possui exões e intrões, pelo que pode ocorrer *splicing* canónico sobre o RNA circular formado (Fig. 1A). Tal como no processamento de pre-mRNA, na biogénese de circRNA foram igualmente detectadas inúmeras sequências de circRNA criadas a partir de um único gene. Esta descoberta evidenciou que a síntese desta forma de RNA sofria processos de *splicing* alternativo muito semelhantes aos do *splicing* canónico, justificando assim a abundância de circRNA diferentes. ^[1] (Fig. 1B)

Apesar das grandes descobertas acerca do processamento que levava o pre-mRNA a transformar-se em circRNA, o *back-splicing* continuava a ser menos eficiente do que o *splicing* canónico, provando que haveriam mais características que levavam à formação do RNA circular. [5]

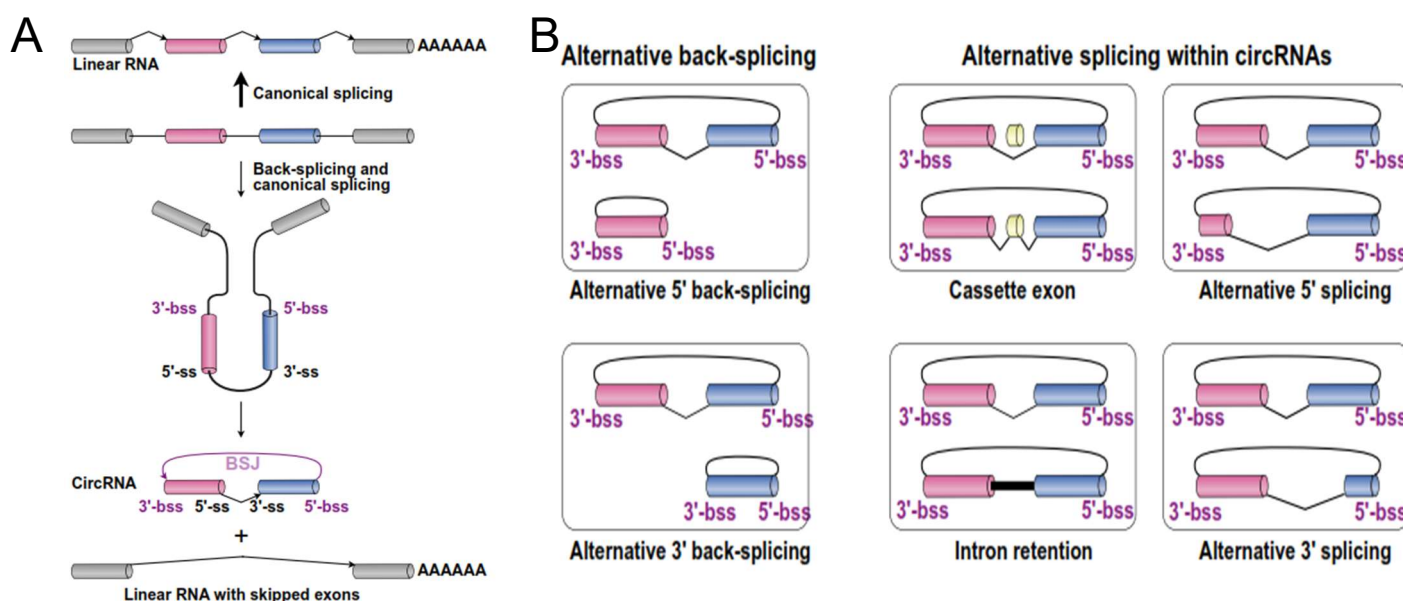


Figura 1:Processamento de pre-mRNA. **(A)** Processamento canónico de pre-mRNA (topo) e processamento por *back-splicing*. **(B)** Diversidade de *splicing* alternativo no processamento de circRNA.

Começou então a questionar-se que diferenças poderiam existir no processamento de circRNA, seria um spliceossoma novo o responsável pelo *back-splicing* ou será que este processamento utilizaria o spliceossoma canónico. Em estudos recentes foi revelado que o mecanismo de *back-splicing* requer a maquinaria de *splicing* canónico e que a regulação do circRNA depende de elementos reguladores *cis* e factores de acção *trans*. [1]

Possivelmente seria nos factores presentes em *cis* e *trans* do pre-mRNA que estaria a razão pela qual esta forma de *splicing* alternativo se torna eficiente ao ponto de não ser completamente substituída pelo *splicing* canónico.

Uma das primeiras características detectadas na sequência de pre-mRNA foi a necessidade de sinais canónicos de *splice-site* tanto em 5' como em 3' para que se desse o *back-splicing*. Uma vez que este tipo de *splicing* usa o spliceossoma canónico terá de ter as sequências respectivas para que os componentes interagem com o RNA. Ainda assim o mecanismo e as subunidades do spliceossoma canónico que intervêm no processo ainda não são conhecidos. [6] (Fig. 2A)

Outra característica detectada no pre-mRNA foi a presença de grandes intrões que flanqueiam a região que iria sofrer o *back-splicing*. A longa cadeia intrónica favorece o *back-splicing* uma vez que dificulta a montagem dos componentes do *splicing* canónico para que ocorra a remoção desse intrão. Desta forma a circularização consegue sobrepor-se ligeiramente ao processamento linear. [7]

Porém apenas a presença destes intrões longos não é suficiente para que se dê o *back-splicing*. Experiências com mutação de genes para introdução de intrões longos não levavam à produção de circRNA pelo que deverá haver outro factor que torna o *back-splicing* possível.

Ao sequenciar os genes que davam origem ao circRNA, foi descoberta outra característica dos intrões que ajudava a explicar a possibilidade de ocorrer o *back-splicing* nas células. A maioria dos genes que davam origem ao circRNA possuíam sequências intrónicas complementares (ICSs) nos intrões longos que flanqueiam a região que dá origem ao circRNA. A presença destas sequências e a sua complementaridade ajudam o pre-mRNA a formar um *loop*, aproximando o exão 5' *upstream* do exão 3' *downstream*.^[2] Em primatas, elementos *Alu* no genoma são exemplos destes pares de sequências complementares que podem emparelhar dando origem a *loops*. Em humanos, elementos *Alu* são bastante abundantes e constituem 11% do genoma humano de referência.^[1] (Fig. 2B)

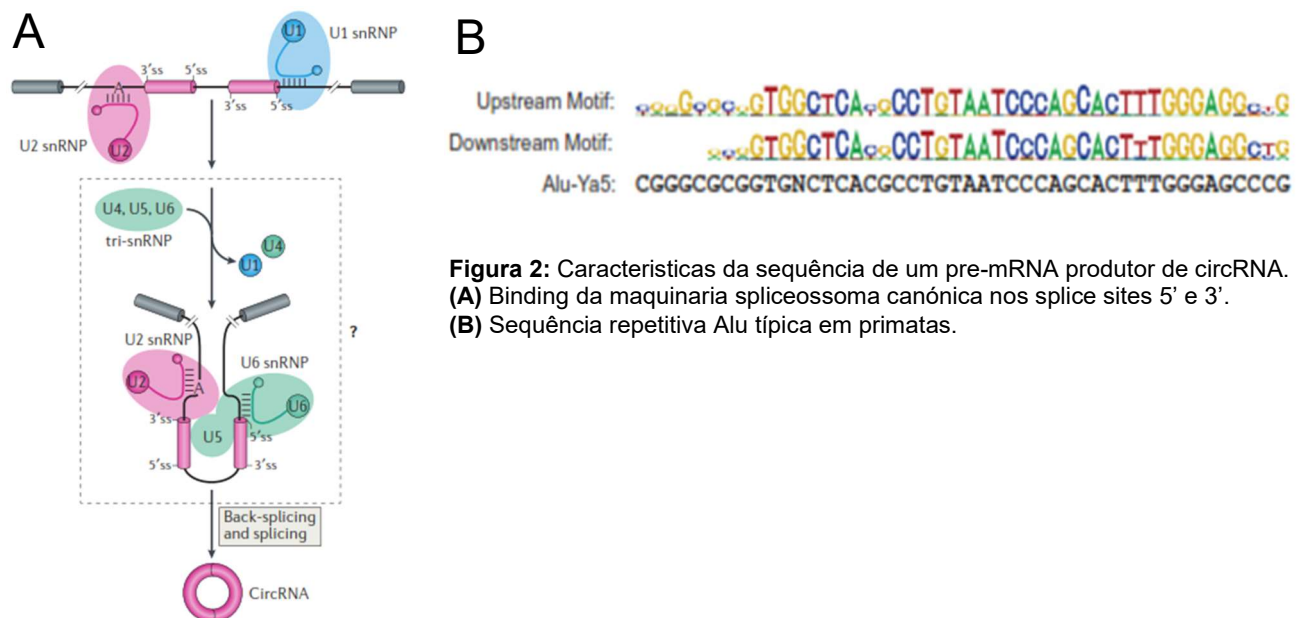


Figura 2: Características da sequência de um pre-mRNA produtor de circRNA. **(A)** Binding da maquinaria spliceossoma canónica nos splice sites 5' e 3'. **(B)** Sequência repetitiva Alu típica em primatas.

Para além das sequências complementares intrónicas, existe outro mecanismo de se obter a formação do *loop* de pre-mRNA, através do binding de *RNA Binding Proteins* (RBP) às regiões intrónicas flanqueadoras.

Tipicamente estas RBPs são *double-stranded RBPs* (dsRBPs) que se ligam ao RNA e estabilizam a forma *double-stranded* deste e por consequência o *back-splicing*. Um exemplo estudado deste tipo de proteínas é o factor imune NF90 que contém dois domínios dsRNA.^[8]

Para além das dsRBPs, RBPs que dimerizam após ligar ao RNA podem também favorecer a formação do *loop* e do *back splicing*. Ligando-se a regiões específicas do RNA e posteriormente dimerizando com outras RBPs em *downstream* dá-se a formação do loop que torna mais eficaz o *back-splicing* em comparação com o *splicing* canónico. Um exemplo de uma proteína deste tipo é o factor de *splicing* *Quaking* (QKI).^[9] (Fig 3A)

A presença da regulação da formação de circRNA através das RBPs torna a expressão de circRNA distinta entre tecidos. Visto estes serem reguladores *trans*, dependendo da quantidade de produção de certas RBPs podem haver circRNAs que sejam inibidos ou promovidos, diferenciando assim os seus níveis tendo em conta o tecido ou função que a célula está a executar. O factor *Quaking* regula a produção de circRNA no processo *epithelial-mesenchymal transition*.^[9]

A existência destas regiões na sequência do pre-mRNA que têm um papel fundamental na formação do loop necessário ao *back-splicing* aponta para que estas sejam fulcrais na regulação da produção de circRNA. Evidências experimentais demonstram que o gene *GCN1L1* produz circRNA apenas em humanos e não em murganhos, apesar dos exões do gene serem iguais. A sequenciação demonstrou que o locus de murganho não existiam ICSs nos intrões flangeadores e esta ausência impedia o *back-splicing* de acontecer.^[10] (Fig. 3B)

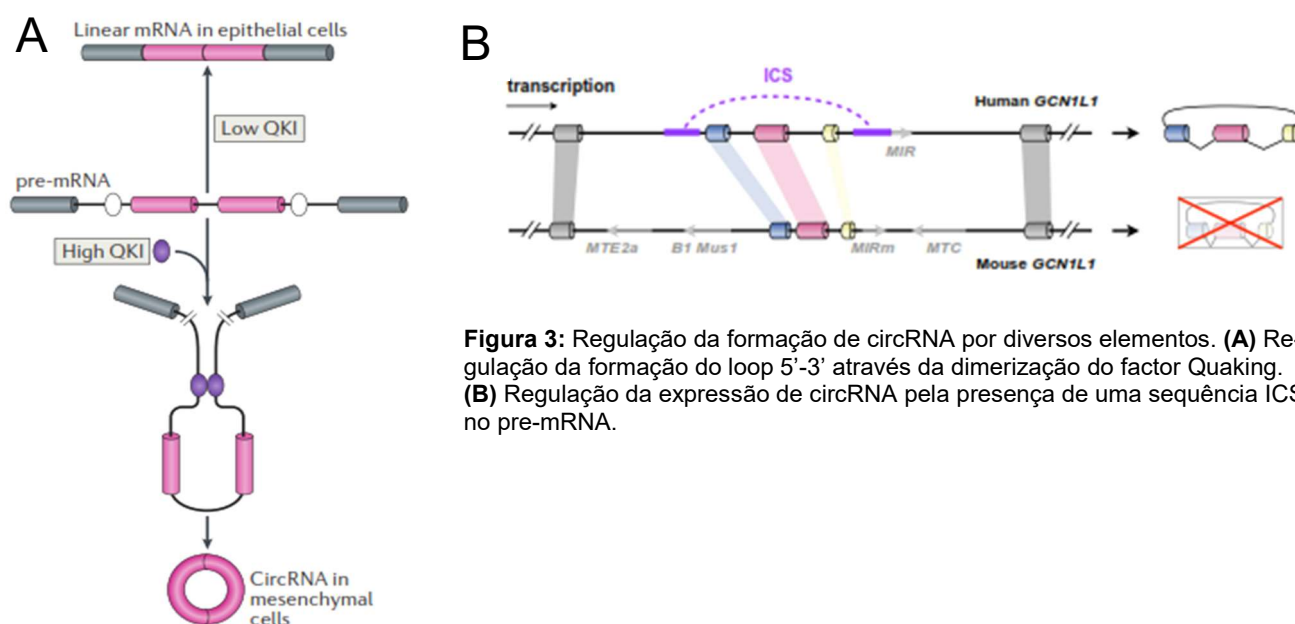


Figura 3: Regulação da formação de circRNA por diversos elementos. **(A)** Regulação da formação do loop 5'-3' através da dimerização do factor Quaking. **(B)** Regulação da expressão de circRNA pela presença de uma sequência ICS no pre-mRNA.

Outras evidências demonstram que a acção do enzima *adenosina deaminase 1 acting on RNA* (ADAR1) suprime a expressão de circRNA ao converter o nucleótido adenosina em Imina nos pares de RNA que flanqueiam os exões, diminuindo assim a sua estabilidade na forma emparelhada.^[11]

Foi descoberto que a produção desta molécula pode ser tanto co-transcricional^[7] como pós-transcricional. No entanto foi verificado que maioritariamente o *back-splicing* ocorria pós-transcricionalmente.^[5]

Após discutir quais as características do *splicing* e da sequência que dá origem à molécula circular de RNA, existe ainda um elemento importante a focar na biogénese desta molécula.

Do estudo de mRNA linear é conhecido que o processamento do pre-mRNA é influenciado pela transcrição da RNA polimerase II e que a taxa de elongação deste enzima é determinante no resultado dos eventos de *splicing*.^[1] Assim sendo, visto a biogénese de circRNA ser um evento de *splicing*, é importante também abordar este aspecto.

Nestes estudos observou-se também que os genes com as características necessárias para produzir circRNA eram transcritos pela RNA polimerase II a taxas superiores aos genes sem capacidade de produzir circRNA, 2.90 kb/min comparado aos 2.29 kb/min, respectivamente. ^[5] A velocidade superior de elongação da transcrição tem a consequência benéfica de tornar mais eficiente o emparelhamento das ICSs dos intrões flanqueadores, levando assim à formação de *loops* e maior probabilidade de ocorrer *back-splicing*. Para solidificar este resultado estudos com mutantes do RNA Polimerase II foram executados e foi obtida uma correlação positiva entre a velocidade do RNA polimerase II e a abundância de circRNA nas células. ^[5] Com este estudo verificou-se então que aumentando a velocidade de transcrição, o *back-splicing* tornava-se mais eficiente.

Em suma, a biogénese desta molécula tem origem no processamento do pre-mRNA através de um mecanismo de *back-splicing*. Por sua vez o *back-splicing* é executado pela maquinaria spliceossomal canónica e requer a presença de *splice-sites* em 5' e 3' do pre-mRNA. A existência de intrões longos flanqueadores que possuam sequências intrónicas complementares aumenta a eficiência do *back-splicing* uma vez que o seu emparelhamento forma loops. RBPs podem regular a biogénese de circRNA, fomentando a formação de *loops*, e ainda diferenciar os níveis de expressão em tecidos e em processos. Finalmente a taxa de elongação da transcrição do enzima RNA polimerase II é também um factor determinante para a eficiência do *back-splicing*. Todos estes aspectos são susceptíveis de sofrerem processos de regulação que levam a potenciar ou inibir a formação dos circRNA.

Turnover de circRNA

Tendo descrito as características que levam à formação de circRNA, é importante dedicar algum tempo ao turnover desta molécula. Embora o *back-splicing* não seja tão eficiente como o *splicing* canónico ^[10], como discutido anteriormente, estas moléculas podem acumular-se em elevadas quantidades nas células. Isto deve-se à sua elevada estabilidade por serem resistentes a uma grande parte da maquinaria de decomposição de RNA. Esta resistência torna o tempo de semi-vida do circRNA muito superior ao da sua forma linear, 18.8-23.7 horas, em comparação com as 4.0-7.4 horas, respectivamente. ^[12]

O mecanismo exacto de degradação de circRNA ainda não é claro, algumas teorias apontam endonucleases que iniciam a quebra do circRNA mas até ao momento nenhum enzima deste género foi identificado. Outra hipótese é a possibilidade de circRNAs se ligarem a miRNA, propriedade abordada mais à frente, e a decomposição desta espécie ser mediada pelo *Ago2-mediated cleavage*. ^[13] Foi também demonstrado recentemente que a modificação N⁶-metiladenosine (m⁶-A), uma das modificações internas de RNA mais comuns, se encontra distribuída em CircRNA. ^[14] Verificou-se que circRNAs com a modificação m⁶-A estavam associados a mRNAs lineares sem a modificação e vice-versa, podendo esta modificação ser um sinal para a estabilidade ou instabilidade, porém mais estudos são necessários para confirmar este facto. ^[14]

Funções na célula

CircRNAs são preferencialmente *back-spliced* em genes neuronais, acumulam a níveis elevados em cérebros de mamíferos, em linhas celulares neuronais e envelhecimento de tecido neuronal em moscas.^[1]

Apesar dos níveis elevados de expressão no cérebro ser maioritariamente atribuído à sua acumulação pós-translacional, a expressão de circRNAs específicos de tecido neuronal é comum entre mosca, murganho e humano, indicando que têm uma função neuronal.^[15] Isto é apoiado por um estudo com murganhos knockout Cdr1a, que demonstraram disfunção de transmissão sináptica excitatória, associada com doenças neuropsiquiátricas.^[16]

Os circRNAs também foram reconhecidos como um vector em sistemas regulatórios contra o cancro. Centenas de circRNAs foram considerados importantes para a transição epitélio-mesênquima, revelando uma função importante na regulação de migração, invasão e metástase do cancro.^[9] Um estudo recente demonstrou que ao reduzir os níveis de circPVT1, um circRNA, em fibroblastos em proliferação, poderia desencadear senescência.^[17]

Relativamente à resposta imune inata, alguns estudos de transfecção *in vitro* com circRNAs em células de mamíferos levava a uma potente indução dos genes de imunidade inata que conferiam protecção contra infecção viral.^[18] Como é que este processo ocorre ainda não é entendido, mas foi demonstrado que circRNAs endógenos estão associados a um conjunto diverso de RBPs que permitem distinguir os próprios circRNAs dos não-próprios.^[18] Como mencionado anteriormente, a proteína NF90, juntamente com a NF10, pertencente à mesma família de proteínas, demonstraram que os níveis de expressão de circRNAs endógenos podem ser modulados por estes (factores nucleares 90 e 110, que são isoformas produzidas por pelo gene de ‘*enhancer binding factor*’ da interleucina humana 3 - ILF3), de modo a reduzir a formação de circRNAs e diminuir associação a estes factores quando na presença de uma infecção viral.^[8]

Existem outras vias em que os circRNAs estão envolvidos, como em risco associado a doenças, como no caso de circRNAs produzidos a partir do *locus* ANRIL no cromossoma 9p21 que estão positivamente correlacionados com o risco de aterosclerose.^[19]

Ocorre também um fenómeno curioso com os circRNAs, em que estes formam uma espécie de “esponja” com aderência a moléculas como outros RNAs e até proteínas. Um exemplo desta situação é com o Cdr1as, que é um dos circRNAs mais estudados, que actua como esponja para o miRNA-7 em tecidos neuronais^[20,21] e é bastante reduzido na doença de Alzheimer esporádica, indicando um sistema de má regulação de “ciRS-7-miRNA-7” nesta doença.^[22]

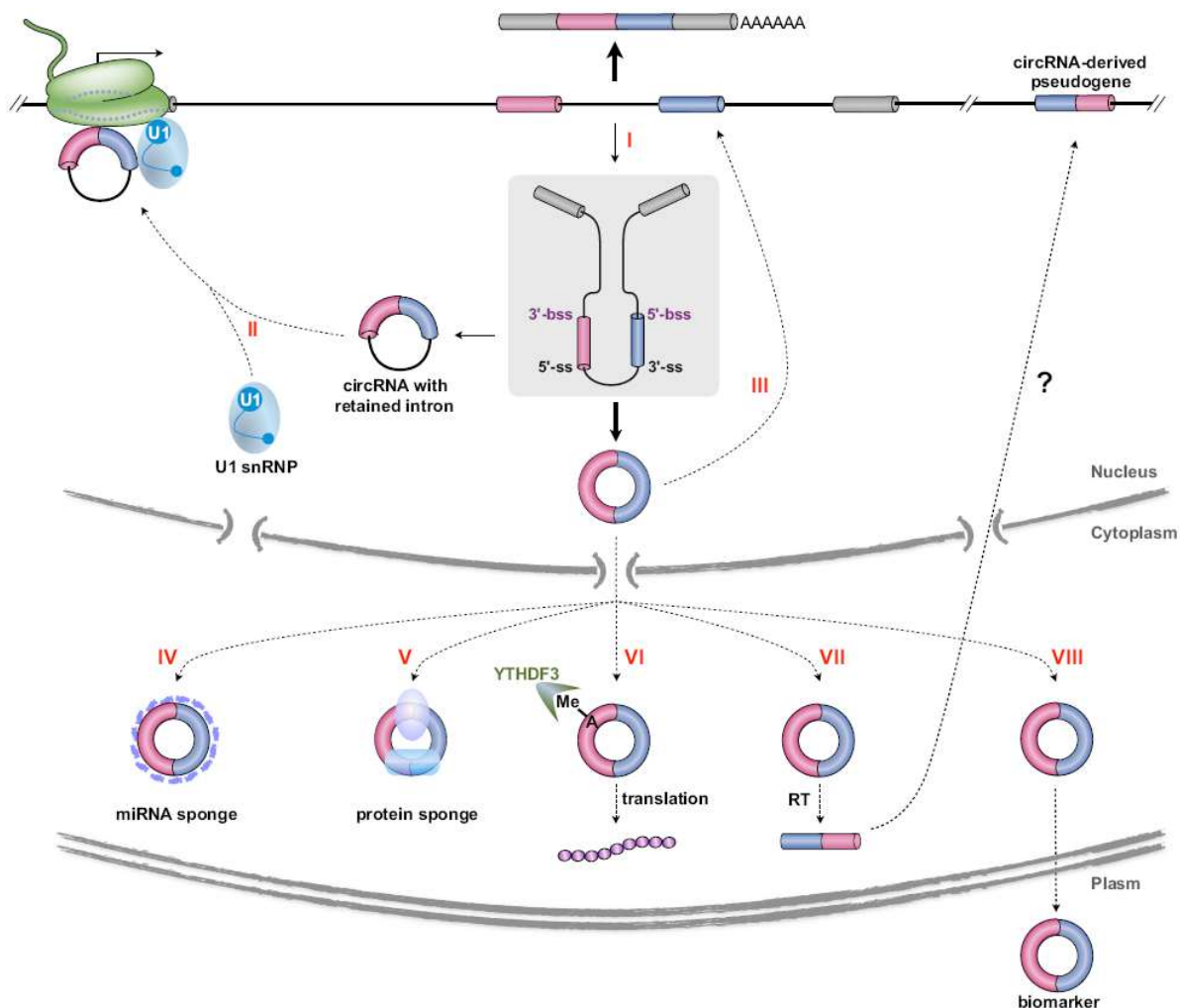


Figura 4: Possíveis funções de circRNAs. CircRNAs endógenos estão envolvidos na regulação de expressão génica através de mecanismos distintos. (I) O processamento de circRNAs afecta o *splicing* dos seus mRNA lineares homólogos. (II) circRNAs podem regular a transcrição dos seus genes parentais. (III) circRNAs podem regular o *splicing* dos seus parentes lineares. (IV) circRNAs podem actuar como esponjas. (V) circRNAs podem actuar através de associação com proteína. (VI) circRNAs podem ser traduzidos. (VII) circRNAs são recursos para derivação de pseudogenes. (VIII) circRNAs são biomarcadores promissores.

O processamento de circRNAs aparenta também influenciar o *splicing* dos seus conjugados lineares (Fig. 4, I). Verificou-se que apesar de *back-splicing* ser menos favorável que o *splicing* normal, a utilização de biogénese de circRNAs cadeia simples 5' para 3' pode competir com *splicing* do pre-mRNA, resultando em níveis reduzidos de mRNAs lineares com inclusão de exões. [7,10,24]

No entanto, nem todos os exões ignorados ("*skipped*") conseguiram produzir circRNAs, sugerindo que reguladores adicionais poderão afectar a circularização dos exões ou as isoformas lineares ignoradas. [23]

CircRNAs retidos no núcleo demonstraram estar envolvidos na regulação de *splicing* e transcrição (Fig. 4, II). Embora a maioria dos circRNAs se encontrar no citoplasma, circRNAs produzidos a partir de laços ("*lariats*") intrónicos (ciRNAs) ou a partir de *back-splicing* com intrões retidos (ElciRNAs) encontram-se restritos ao núcleo em células humanas. [2,8,10,24]

Em alguns estudos verificou-se que o knockdown de dois ElciRNAs podia reduzir a transcrição dos seus genes parentes. ElciRNAs podiam interagir com U1snRNPs (U1 ribonucleoproteínas nucleares pequenas) e o complexo ElciRNA-U1 snRNP associam-se com a Polimerase II nos promotores dos

seus genes parentes para aumentar os níveis de expressão génica. Ao bloquear interações RNA-RNA inviabilizava a interacção dos ElciRNAs com a Polimerase II e, com isso, verificou-se que os níveis de expressão dos genes parentais reduzia. [8]

Noutro estudo com *Arabidopsis* verificou-se que um circRNA retido no núcleo possuía funções de regulação de *splicing* (Fig. 4, III), através de ligação circRNA:DNA, que levava a *splicing* alternativo desse mRNA SEP3, com *skipping* de exão. [9]

O seu papel como “esponjas” de miRNA mencionado anteriormente também tem elevada relevância na regulação de expressão (Fig. 4, IV). O CDR1as é um exão simples circular, altamente conservado e abundante como circRNA em cérebros mamíferos. CDR1as contém mais de 60 locais de ligação para o miR-7. Verificou-se num estudo que este circRNA actua como esponja do miR-7, pois ao reduzir-se a expressão de CDR1as causou a redução de expressão de mRNAs contendo regiões de ligação ao miR-7, significando que CDR1as compete para *targeting* de miR-7 como esponja de miR-7 para participar na rede de expressão génica. [20,21]

Existem ainda outros circRNAs em mamíferos que actuam como esponjas, como o específico a tecido testicular, o circSRY, que contém 16 locais alvo para o miR-138 em ratinhos. [20] O circHIPK2 pode também actuar como esponja para o miR124-2HG para regular a activação de astrócitos (células da glia) através de autofagia de cooperação e stress no retículo endoplasmático (ER). [25] O circBIRC6 demonstrou modular a pluripotência e diferenciação de células estaminais embrionárias humanas, através da retenção de miR-34a e miR-145. [26]

Os circRNAs podem actuar através de associação a proteínas (Fig. 4, V). A proteína multifuncional MBL (*Mannose-binding lectin*) demonstrou promover a biogénese de circMbl que é produzido a partir do mesmo *locus*. Foi também especulado que existe um loop de feedback entre a produção do MBL e do circMbl. Quando esta proteína se encontra em excesso, diminui a produção do seu próprio mRNA através do estímulo de produção de circMbl. Este circRNA poderá então servir como esponja para o excesso de proteína MBL ao ligar-se a esta. [7]

Estas moléculas circulares podem serem traduzidas (Fig. 4, VI). Tradução de mRNA linear requer normalmente uma estrutura de cápsula de extremidade 5' com 7-metilguanosina (m7G) e uma cauda poli(A) na extremidade 3'. Visto os circRNAs não possuírem estas regiões, a tradução procede-se através de sequências que actuam como locais de entrada ribossomal (IRES) para promover a ligação directa de factores de iniciação ou o ribossoma aos circRNAs que permitem ser traduzidos. [8,9,27,28] O circZNF609 humano demonstrou ser regulado durante a diferenciação muscular e também aparentou representar um papel importante em controlar a proliferação de mioblastos. Este circRNA codifica uma proteína, como evidenciado pela sua associação com polissomas e tradução de transcritos circulares marcados de ambos os *locus* vectoriais e endógenos, no entanto, permanece desconhecido se este poli-péptido produzido por circZNF609 contribui para a proliferação de mioblastos. [29]

CircRNAs que poderão dar origem a pseudogenes (Fig. 4, VII). Geralmente estes pseudogenes derivam da integração de mRNAs (lineares) transcritos em reverse em genomas de hospedeiros. Estima-se que milhares de pseudogenes praticamente processados ao seu comprimento total foram criados a partir de mRNAs que estão localizados em cerca de 10% de genes em *loci* de humano e ratinho. [30,31] Dúzias de pseudogenes derivados de circRNAs foram identificados por recuperação de junções de sequências de *back-splicing* não-colineares, existindo em ambos os genomas de ratinhos e humanos. [32] Desse conjunto foram encontrados pseudogenes derivados de circRFWD2 em estirpes de ratinhos. A elevada densidade de repetições longas e terminais (LTRs) de sequências de transposição nas suas regiões flangeadoras indicam que o processo de retrotransposição de circRFWD2 é associado a LTRs. No entanto, o processo de como ocorre o retrotransposição de circRNA não é ainda conhecido.

Os circRNAs que circulam no organismo podem actuar como biomarcadores (Fig. 4, VIII). As características intrínsecas e circulares dos circRNAs tornam estes incomumente estáveis tanto dentro das células como em plasma extracelular, incluindo o sangue e saliva. [21,33,34] Também se verificou que estes circRNAs eram transportados, pelos exossomas, do corpo celular para o fluido extracelular. [34] Embora seja necessário ainda determinar se os circRNAs poderiam regular a expressão génica de células e tecidos distantes de onde foram produzidos, a existência de circRNAs que circulam pelo organismo sugere que circRNAs associados a doenças possam ser potenciais biomarcadores de diagnóstico.

Conclusão

Apesar dos circRNAs terem sido descobertos há já algum tempo, apenas recentemente se despertou o interesse por estas moléculas circulares e pelas implicações que demonstram perante vários mecanismos de regulação, tanto a nível intracelular como extracelular. Neste trabalho verificou-se as diversas correlações com os distintos mecanismos, no entanto, ainda muito se desconhece acerca destes. Recentemente, realizou-se um estudo de modo a compreender melhor este tipo de estrutura de RNA através de sequenciação de long-reads em moléculas simples com tecnologia nanoporo para RNA derivado de cérebro de humanos e ratinhos. Descobriu-se cerca de 3000 e 7000 moléculas novas de circRNA, respectivamente. Identificaram-se também mais de 200 exões, ainda não anotados, que tinham sido usados em circRNAs. Verificaram também que *splicing* alternativo de circRNAs era prevalente ao *splicing* linear de transcriptos, sugerindo que o *back-splicing* poderá ter uma influência na estabilização destas moléculas. [35] Esta técnica permite mapear as regiões exónicas específicas de circRNAs, impulsionando assim para a descoberta de regiões características deste *back-splicing*, de modo a esclarecer melhor este mecanismo futuramente.

Referências

1. Li X, Yang L, Chen LL. The Biogenesis, Functions, and Challenges of Circular RNAs. *Mol Cell*. 2018;71(3):428-442.
2. Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA*. 2013;19(2):141-57.
3. Danan, M., Schwartz, S., Edelheit, S., and Sorek, R. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40,3131–3142.
4. Soma, A., Onodera, A., Sugahara, J., et al. Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. *Science*. 2007; 318, 450–453.
5. Zhang, Y., Xue, W., Li, X., Zhang, J., et al. The Biogenesis of Nascent Circular RNAs. *Cell Rep*. 2016; 15, 611–624
6. Chen, L., Yang, L. Regulation of CircRNA biogenesis. *RNA Bio*. 2015; 12 :381-388
7. Ashwal-fluss R, Meyer M, Pamudurti NR, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA *splicing*. *Mol Cell*. 2014;56(1):55-66.
8. Li X, Liu CX, Xue W, et al. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. *Mol Cell*. 2017;67(2):214-227.e7.
9. Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell*. 2015;160(6):1125-34.
10. Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*. 2014;159(1):134-147.
11. Ivanov, A., Memczak, S., Wyler, E., et al. Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals. *Cell Rep*. 2015; 10(2), 170–177.
12. Enuka, Y., Lauriola, M., Feldman, M.E., et al. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(3), 1370–1383.
13. Hansen, T.B., Wiklund, E.D., Bramsen, J.B., et al. miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO J*. 2011; 30(21), 4414–4422.
14. Zhou, C., Molinie, B., Daneshvar, K., et al. Genome Wide Maps of m6A circRNAs Identify Widespread and Cell-Type-Specific Methylation Patterns that Are Distinct from mRNAs. *Cell Rep*. 2017; 20(9), 2262–2276.
15. Rybak-wolf A, Stottmeister C, Glažar P, et al. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol Cell*. 2015;58(5):870-85.
16. Piwecka M, Glažar P, Hernandez-miranda LR, et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*. 2017;357(6357)
17. Panda AC, Grammatikakis I, Kim KM, et al. Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(7):4021-4035.
18. Chen YG, Kim MV, Chen X, et al. Sensing Self and Foreign Circular RNAs by Intron Identity. *Mol Cell*. 2017;67(2):228-238.e5.
19. Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet*. 2010;6(12):e1001233.
20. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013;495(7441):384-8.
21. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*. 2013;495(7441):333-8.
22. Lukiw WJ. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD). *Front Genet*. 2013;4:307.
23. Kelly S, Greenman C, Cook PR, Papantonis A. Exon Skipping Is Correlated with Exon Circularization. *J Mol Biol*. 2015;427(15):2414-2417.
24. Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e30733.
25. Huang R, Zhang Y, Han B, et al. Circular RNA HIPK2 regulates astrocyte activation via cooperation of autophagy and ER stress by targeting MIR124-2HG. *Autophagy*. 2017;13(10):1722-1741.
26. Yu CY, Li TC, Wu YY, et al. The circular RNA circBIRC6 participates in the molecular circuitry controlling human pluripotency. *Nat Commun*. 2017;8(1):1149.
27. Chen CY, Sarnow P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*. 1995;268(5209):415-7.
28. Wang Y, Wang Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *RNA*. 2015;21(2):172-9.
29. Legnini I, Di timoteo G, Rossi F, et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol Cell*. 2017;66(1):22-37.e9.
30. Zhang Z, Harrison PM, Liu Y, Gerstein M. Millions of years of evolution preserved: a comprehensive catalog of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Res*. 2003;13(12):2541-58.
31. Zhang Z, Carriero N, Gerstein M. Comparative analysis of processed pseudogenes in the mouse and human genomes. *Trends Genet*. 2004;20(2):62-7.
32. Dong R, Ma XK, Chen LL, Yang L. Increased complexity of circRNA expression during species evolution. *RNA Biol*. 2017;14(8):1064-1074.
33. Bahn JH, Zhang Q, Li F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin Chem*. 2015;61(1):221-30.
34. Li Y, Zheng Q, Bao C, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res*. 2015;25(8):981-4.
35. Rahimi K, et al. Nanopore sequencing of full-length circRNAs in human and mouse brains reveals circRNA-specific exon usage and intron retention. *bioRxiv*. 2019. <https://doi.org/10.1101/567164>