UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

André Anversa Oliveira Reis

Estudo da regulação por microRNAs do RNA longo não codificador de proteínas *TUG1* envolvido em processos tumorigênicos

Versão corrigida da Dissertação defendida

SÃO PAULO

31/03/2016

André Anversa Oliveira Reis

Estudo da regulação por microRNAs do RNA longo não codificador de proteínas *TUG1* envolvido em processos tumorigênicos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Área de Concentração: Bioquímica
Orientador: Dr. Sergio Verjovski-Almeida

São Paulo
2016

André Anversa Oliveira Reis

Estudo da regulação por microRNAs do RNA longo não codificador de proteínas *TUG1* envolvido em processos tumorigênicos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família sem a qual esta dissertação não seria possível. Seja pelo suporte financeiro, logístico ou emocional, obrigado José, Christian, Rafael e Lucas, vocês são as pessoas mais importantes e é um prazer e uma honra poder dividir este Mundo com vocês.

Ao professor Dr. Sergio Verjovski-Almeida com quem tanto aprendi e que me desafiou a ser uma pessoa melhor, na vida e nos estudos, e ao Dr. Murilo Sena Amaral, mestre, idealizador e grande colaborador na maior parte deste projeto. Saio mais maduro dessa jornada pela convivência e lições passadas por estes dois grandes homens.

Aos amigos de vida Bruna Rodrigues, Guilherme Raposo Medeiros, Carol Raniero, Maria Luisa de Menezes, Jamil e Morgana Mouallem, Rafael Gonçalves e Aline Abrantes pela torcida e motivação.

Aos amigos de trabalho Dr. Felipe Beckedorff e Dra. Ana Carolina Ayupe pelos ensinamentos, discussões, companhia nos finais de semana e ajuda diária no laboratório. À Dra. Adriana Andrade, ao MSc. Lucas Silva e ao Dr. Elton Vasconcelos pela paciência, humor e irmandade ao longo destes mais de dois anos. À Ester Bertoldi, ao Diogo Pellegrina e ao Dr. David Pires, pessoas de fino trato cuja convivência me gerou prazerosas horas de conversa no “puxadinho” e no aquário da bioinformática. Ao João Russo Romano e ao Felipe Panício, futuros cientistas que me fazem ter esperança nos jovens da graduação.

Aos colegas de laboratório Dr. Carlos DeOcesano Pereira, Dra. Monete Rajão Gomes, MSc. Alexandre Videira, MSc Omar Julio, MSc Luís Bruno Cruz, MSc Vinícius Paixão, e Natália Rocha, que tornaram os dias mais agradáveis.

Ao professor Dr. Eduardo Reis, pelas conversas e disposição em ajudar e aos professores doutores que tanto me ensinaram Mari Cleide Sogayar, Sandro Marana e Bayardo Torres, sempre gentis. Levarei muitos ensinamentos pela vida.

À Bianca Dazzani Marcolino que muito me ajudou no início do mestrado, e à Ana Paula Vidal e ao Jefferson Santos pela retaguarda no laboratório.

Aos funcionários do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, concursados ou terceirizados, tão importantes na manutenção de um ambiente seguro e confortável, além da responsabilidade no andamento burocrático da instituição.

Ao Instituto de Química cujo firmamento, paredes e teto me abrigaram por tantos dias, tardes, noites e madrugadas. Um local fundado na ciência, casa de grandes mentes e espíritos.

Ao Instituto Butantan, local de vivência agradável, de surpresas diárias e que se tornou uma terceira casa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, por meio da bolsa de Mestrado no. 132558/2014-9.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro à pesquisa do laboratório.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e aos meus irmãos, minha família amada.

RESUMO

Reis, A. A. O. **Estudo da regulação por microRNAs do RNA longo não codificador de proteínas *TUG1* envolvido em processos tumorigênicos.** 2016. 87 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

No final do século passado, avanços ocorridos no campo da Biologia Molecular levantaram questionamentos sobre como organismos complexos, com poucos genes a mais que organismos relativamente mais simples, regulariam seu desenvolvimento e funções celulares tão mais intrincadas. A descoberta dos RNAs não codificadores de proteínas e suas funções lançou nova luz ao entendimento da regulação da expressão gênica em organismos superiores. Apesar do conhecimento adquirido nos últimos anos, pouco ainda é sabido sobre a regulação destes RNAs. MicroRNAs, por outro lado, são uma espécie bem estudada de pequenos RNAs preditos como possíveis reguladores de mais de 60 % dos genes codificadores de proteínas no genoma humano, considerados importantes reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional. O presente projeto estudou a possível regulação do gene não codificador de proteínas *TUG1*, envolvido em proliferação celular e apoptose, por miRNAs e o papel desta regulação em processos tumorigênicos. Para isto foram utilizadas técnicas que superexpressaram e silenciaram miRNAs e técnicas de PCR quantitativo em tempo real para medir o nível de *TUG1* nas amostras tratadas. Verificou-se a possibilidade de regulação do *TUG1* por microRNAs em diferentes linhagens celulares sendo que, no entanto, esta regulação não parece ser importante em nível fisiológico.

Palavras-chaves: RNA longo não codificador de proteínas, *TUG1*,microRNAs, regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

Reis, A. A. O. **MicroRNAs regulation of the long noncoding RNA *TUG1* involved in tumorigenic processes.** 2016. 87 p. MSc Dissertation – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

At the end of the last century, advances occurred in the Molecular Biology field raised questions about how complexes organisms, with few more genes than relatively simpler organisms, regulate it so intricate development and cellular functions. The discovery of long non-protein coding RNAs and it functions gave light to the understanding of gene expression regulation in superior organisms. Despite the knowledge acquired in the last years, few is yet known about the regulation of these RNAs. MicroRNAs, other way, are a well-studied tiny RNAs specie. They are predicted as possible regulators of more than 60 % of protein-coding genes in the human genome and considered important regulators of gene expression regulation at post-transcriptional level. This project studied the possible regulation of the non protein-coding gene *TUG1,* involved in cell proliferation and apoptosis, by microRNAs and the role of this regulation in tumorigenic processes. In order to do this we used techniques that superexpressed and silenced miRNAs and techniques of real time quantitative PCR to measure the *TUG1* levels in the treated samples. We find the possibility of regulation of *TUG1* by microRNAs in different cell lineages but this regulation does not seems to be important in a physiologic context.

Keywords: Long non protein-coding RNA, *TUG1*, microRNAs, gene expression regulation.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 10
1.1 A complexidade genômica e da regulação da expressão gênica em eucariotos 10
1.2 RNAs longos não codificadores de proteínas 14
1.3 *Taurine Upregulated Gene1* 18
1.4 microRNAs 20
1.4.1 Breve história 20
1.4.2 Características, organização genômica e biogênese 22
2. OBJETIVOS 28
2.1 Objetivo geral 28
2.2 Objetivos específicos 28
3. MATERIAIS E MÉTODOS 29
3.1 Busca por miRNAs candidatos a reguladores de *TUG1* 29
3.2 Linhagens celulares humanas e condições de cultivo 29
3.3 Extração, verificação da qualidade do RNA e transcrição reversa 31
3.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) 32
3.5 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers)* 33
3.6 Superexpressão de miRNAs 34
3.7 Imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos – RIP 35
3.8 Simulação do pareamento miRNA/ *TUG1* e medida de ΔG de interação 36
3.9 Silenciamento de miRNAs 36
3.10 Indução de dano ao DNA 37
3.11 Curvas de crescimento 38
3.12 Viabilidade celular 38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
4.1 – Escolha do lncRNA *TUG1* como possível RNA regulado por miRNAs 40
4.2 – Escolha dos miRNAs candidatos a reguladores do lncRNA *TUG1* 43
4.3 – Transfecção de células da linhagem HeLa com mímicos dos miRNAs selecionados 45
4.4 – Busca pela conservação na regulação de *TUG1* por miRNAs em novas linhagens celulares 48

4.5 – Transfecções de células das linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1 com mímicos dos miRNAs 22 e 194 53

4.6 – Simulação da interação entre os miRNAs transfectados e o lncRNA *TUG1* 57

4.7 – Verificação do enriquecimento de *TUG1* ligado a proteínas Ago2 de células das linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1 59

4.8 –Transfecções de inibidores dos miRNAs nas linhagens celulares HeLa, MIA-PaCa-2 e PANC-1 61

4.9 –Indução de dano ao DNA e medida dos níveis de *TUG1* e dos miRNAs candidatos nas linhagens celulares trabalhadas 65

4.10 –Curvas de crescimento 68

4.11 –Viabilidade celular 71

5. CONCLUSÃO 75

6. REFERÊNCIAS 76

1. INTRODUÇÃO

1.1 A complexidade genômica e da regulação da expressão gênica em eucariotos

O entendimento sobre a dinâmica da transferência de informação nos seres vivos tem se modificado enormemente desde o início dos estudos sobre biologia molecular. O próprio DNA, a molécula armazenadora de informação nos organismos, só foi identificado em 1944 como possuidor desta função por Oswald Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty (Avery *et al.* 1944), e isto ocorreu 75 anos depois da descoberta dos ácidos nucleicos, em 1869, por Johann Friederich Miescher. Miescher na época nomeara a substância como "nucleína", já tendo verificado sua localização no núcleo celular de células eucarióticas (Dahm 2005).

Nove anos depois da descoberta de Avery e seus colaboradores, em 1953, James Watson e Francis Crick ajudados por Rosalind Franklin, desvendaram a estrutura de dupla hélice do DNA (Watson and Crick 1953), contribuindo muito para o desenvolvimento da genética e da biologia molecular. Tal fato lançou grande atenção sobre os jovens cientistas, na época, o que inclusive rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1962 para Watson e Crick. No entanto, a pequena quantidade de informação disponível no período levou Crick a elaborar a hipótese de que o fluxo da informação genética se dava unicamente no sentido DNA→RNA→Proteína, o que ficou conhecido como o dogma central da biologia molecular (Crick 1958). Adiante veremos que esta hipótese teve que ser ajustada e ampliada. Na época pensava-se que os RNAs eram importantes moléculas que atuavam na transferência de informação, e tinham papel limitado a elementos intermediários, enquanto as proteínas seriam os responsáveis finais, que exerciam a maior parte das funções estruturais, catalíticas e regulatórias das células (Crick 1958). O entendimento sobre a programação genética de seres humanos e outros organismos complexos ficou parcialmente descrito por cerca de 50 anos (Mattick 2011).

Francis Crick ainda responderia a críticas sobre a aparente simplicidade do que fora chamado o dogma central, esclarecendo a sua intenção inicial e atualizando o conceito de modo que o RNA não mais deveria ser considerado um elemento funcional de propósito unidirecional. Seria possível que a informação fluísse de volta para o genoma (Crick 1970) conferindo um papel mais versátil ao RNA. Mesmo com o avanço e revisão de conceitos no campo da genética, o papel funcional dos RNAs como produto dos genes permaneceu por muito tempo focado na produção de proteínas (Gingeras 2007). De fato as proteínas sempre chamaram a atenção dos pesquisadores na área da bioquímica e eram consideradas as biomoléculas mais importantes nos organismos vivos, mesmo nos processos de transferência de informação, até as descobertas de Oswald Avery.

Até próximo de meados da década de 1990, o entendimento que se tinha sobre os RNAs se resumia ao conhecimento dos seguintes tipos: (i) RNAs mensageiros (mRNAs), moléculas intermediárias da informação genética que transferem, do núcleo para o citoplasma, a informação para a síntese de proteínas; (ii) RNAs ribossomais (rRNAs), que atuam na montagem dos complexos ribonucleoproteicos responsáveis pela síntese de proteínas, os ribossomos; (iii) RNAs transportadores (tRNAs) que se ligam a aminoácidos livres no meio celular e os levam para a formação de cadeias proteicas nos ribossomos; e (iv) pequenos RNAs nucleares (*small nuclear* RNAs, snRNA e *small nucleolar* RNAs, snoRNA), que exercem funções estruturais e catalíticas no processamento de mRNAs ou na tradução de proteínas. Sabe-se hoje, no entanto, que apenas uma pequena fração do genoma humano, cerca de 2,2 % do seu total, corresponde a informação que origina este restrito grupo de produtos funcionais, praticamente os únicos conhecidos até pouco mais de 20 anos atrás (Frith *et al.* 2005).

Uma nova noção de que outros tipos de RNAs deveriam apresentar funções importantes e diversas em organismos superiores começou a ser desenhada com o

sequenciamento de diversos genomas, inclusive com o estabelecimento de um consórcio internacional para o sequenciamento do genoma humano, iniciado em 1990 e terminado em 2003 (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Análises comparativas dos genomas de diversos organismos mostravam que a complexidade biológica de uma determinada espécie não era diretamente relacionada ao número de genes codificadores de proteínas presentes em seu genoma (Taft *et al.* 2007). Por exemplo, o número de genes codificadores de proteínas estimado para eucariotos mais complexos, como humanos e camundongos, é de 20.000 a 25.000 (Waterston *et al.* 2002; International Human Genome Sequencing Consortium 2004), um número total de genes bastante próximo do número de genes de eucariotos menos complexos como *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans,* os quais possuem 13.000 e 19.000 genes, respectivamente (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998; Adams *et al.* 2000). Com este tipo de verificação começou a surgir a noção de que deveria haver diversos fatores atuando na regulação do desenvolvimento de diferentes organismos, inclusive levando à expressão de numerosas e diferentes isoformas para um mesmo gene no genoma de organismos superiores.

O problema da não correlação aparente entre a complexidade de um organismo e o número de genes presentes em seu genoma foi chamado na época de “paradoxo do valor c”. A resposta para este enigma começou a surgir com investigações nas partes não codificadoras de proteínas dos genomas já sequenciados que, como não possuíam evidência de gerarem proteínas, eram chamadas de “DNA lixo” (Palazzo and Gregory 2014). Para genomas de organismos procariotos, a porção de DNA não codificador de proteínas representa apenas 0,25 % do total, enquanto que para eucariotos este valor chega a 98 % (Taft *et al.* 2007).

As respostas para os complexos enigmas da organização genômica dos organismos começaram a surgir com o andamento de um projeto denominado ENCODE (acrônimo de *Encyclopedia of DNA Elements*), que, iniciado em 2007, analisou num primeiro momento 1 %

do genoma humano e estimou que ao menos 90 % do DNA genômico total seria transcrito em diferentes células humanas, sendo que desta fração apenas 1,2 % é capaz de codificar para proteínas (Birney *et al.* 2007). Num segundo momento, esta análise foi estendida para todo o genoma e os autores observaram que mais de 50 % dos transcritos anotados não tinham potencial de codificar proteínas (ENCODE 2011). Por fim, no ano seguinte, com novas verificações, a porção do genoma humano com evidências de transcrição foi definida em aproximadamente 75 % (Djebali *et al.* 2012).

Dessa forma, o estudo da porção até então chamada de "DNA lixo" evidenciou transcrição generalizada de genes não codificadores de proteínas no genoma eucariótico (Mattick 2011). Esses transcritos podem ser expressos à partir de ambas as fitas do DNA, em regiões intrônicas de genes codificadores de proteínas ou intergênicas, podendo apresentar sítios alternativos de início de transcrição e de terminação, *splicing* alternativo e expressão tecido específica (Frith *et al.* 2005; Birney *et al.* 2007; Kapranov *et al.* 2007; Nakaya *et al.* 2007; Ponting *et al.* 2009).

Apesar de hipóteses levantadas na época de que os diversos genes não codificadores de proteínas transcritos ao longo do genoma tratavam-se de ruídos transcricionais ou artefatos técnicos, usando-se de argumentos como uma não funcionalidade aparente de muitos dos RNAs formados e os baixos níveis de expressão destas novas formas (Struhl 2007; van Bakel *et al.* 2010), um crescente número de estudos de transcriptoma em larga escala passou a apontar genes não codificadores de proteína como possíveis alvos para pesquisa e, após investigações profundas, foram identificadas e caracterizadas novas classes de RNAs.

Atualmente, o entendimento da biologia molecular sobre o repertório de RNAs existente está completamente reformulado. Além dos antigos RNAs conhecidos, toda uma gama de RNAs não codificadores de proteínas (ncRNA) é objeto de estudo de grupos de pesquisa. Os ncRNAs são convencionalmente classificados em ncRNAs longos (lncRNAs),

quando maiores que 200 nucleotídeos, e ncRNAs curtos, quando menores que 200 nucleotídeos. Essa classificação aparentemente arbitrária na realidade foi estabelecida com base em uma prática conveniente dos protocolos de purificação de RNA, onde os RNAs menores de 200 nucleotídeos são normalmente excluídos (Mercer *et al.* 2009). Os lncRNAs, em suas várias classes, serão discutidos com maior profundidade mais adiante. Dentre os ncRNAs curtos (< 200 nt) incluem-se várias classes como os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs interferentes (siRNAs), *piwi-interacting* RNAs (piRNAs), pequenos RNAs associados à regiões promotoras e de iniciação da transcrição, entre outros (Girard *et al.* 2006; Carthew and Sontheimer 2009; Fejes-Toth *et al.* 2009; Taft *et al.* 2009).

A noção construída pela biologia molecular ao longo de várias décadas de estudo revela, portanto, uma paisagem extremamente complexa no que diz respeito à organização do genoma e regulação da expressão gênica, sobretudo em organismos eucarióticos superiores. A regulação dos genes envolve a expressão de fatores de transcrição e mecanismos epigenéticos, através de metilação de DNA e adição de grupos diversos a histonas. Além disso, hoje sabe-se que diversas espécies de ncRNAs estão presentes no genoma e são expressas, atuando por sua vez sobre a regulação da expressão de diversos genes, codificadores de proteínas ou não, e contribuindo para todo o processo de desenvolvimento e manutenção das funções dos organismos superiores. O tempo dirá se a descoberta dos ncRNAs e suas funções resolve de maneira completa o enigma da complexidade destes organismos.

1.2 RNAs longos não codificadores de proteínas

Conforme descrito na seção anterior, RNA longo não codificador de proteínas (lncRNA) é o nome geral dado a um ncRNA que possui mais de 200 nucleotídeos. O primeiro lncRNA foi descoberto em 1990 a partir do estudo de um grupo da Universidade de Princetown sobre o gene *H19*. Na época verificou-se que o produto gênico final do *H19* era um RNA transcrito pela RNA polimerase II (Pol II), que passava pelo processo de *splicing*,

era poliadenilado e não era traduzido (Brannan *et al.* 1990). Os trabalhos sobre lncRNAs na literatura ainda são poucos em relação ao número de trabalhos sobre RNAs curtos, como miRNAs, entretanto, nos últimos anos tem havido grande aumento no número de estudos que têm reportado a funcionalidade e diversidade de lncRNAs que mapeiam em regiões intrônicas e intergênicas (Birney *et al.* 2007; Nakaya *et al.* 2007; Dinger *et al.* 2009; Kapranov *et al.* 2010).

Atualmente, já foram descritas algumas diferentes classes ou categorias de lncRNAs (Wright and Bruford 2011; Chen *et al.* 2016) como RNAs longos não codificadores de proteínas intergênicos, intrônicos, senso, antissenso e circulares, sendo algumas delas mais bem estudadas. Os (i) lncRNAs intergênicos (lincRNAs) são definidos como lncRNAs transcritos em uma região distante pelo menos 1 Kb de algum gene codificador de proteína; (ii) lncRNAs senso possuem sobreposição com regiões exônicos e/ou intrônicas de genes codificadores de proteínas; (iii) lncRNAs antissenso (lncRNA-AS), estão localizados sobrepostos a regiões exônicas e/ou intrônicas a genes codificadores de proteina, na fita oposta a que codifica estes genes; (iv) os lncRNAs intrônicos estão presentes sobrepostos a regiões intrônicas de genes codificadores de proteínas; e (v) RNAs intrônicos circulares, transcritos que formam estruturas sem extremidades livre. Essas classes de lncRNAs (com exceção da última) podem sofrer modificações semelhantes às dos mRNAs, tais como inserção da estrutura *cap* na extremidade 5’ do RNA e poliadenilação, além de poderem passar pelo processo de *splicing* (Ma *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013). Também já foi demonstrado que lncRNAs podem se localizar especificamente no núcleo celular, no citoplasma ou em ambos os compartimentos celulares (Kapranov *et al.* 2007; Kapranov *et al.* 2010). Para muitos lncRNAs já foi verificada transcrição a partir de uma região promotora independente (por meio de marcas de histonas, H3K4me3), e presença da RNA Polimerase II no sítio de início de transcrição (TSS) (Guttman *et al.* 2009; Conley and King Jordan 2012), o

que sugere a importância da atuação destes RNAs, já que estão, muitas vezes, sujeitos a mecanismos independentes de regulação.

Os genes que codificam lncRNAs normalmente apresentam níveis de expressão muito mais baixos do que genes codificadores de proteínas, e são tecido-específicos (Birney *et al.* 2007; Cabili *et al.* 2011). Já existem evidências do envolvimento de lncRNAs com vários processos biológicos como desenvolvimento e diferenciação de células (Hu *et al.* 2013), resposta ao dano do DNA (Wan *et al.* 2013), adipogênese (Sun *et al.* 2013) entre outros, e desta forma, evidências têm surgido sobre o envolvimento de lncRNAs com diversas doenças humanas (Taft *et al.* 2010; Esteller *et al.* 2011; Wapinski and Chang 2011; Lee and Bartolomei 2013), inclusive no desenvolvimento de câncer (Beltran *et al.* 2008; Reis and Verjovski-Almeida 2012; Beckedorf *et al.* 2013; DeOcesano-Pereira *et al.* 2014).

Os mecanismos moleculares de atuação dos lncRNAs são diversos. Existem evidências de que a ação de lncRNAs se dê pela interação com complexos proteicos (Khalil and Rinn 2011), especialmente através de proteínas que compõem complexos remodeladores da cromatina com funções tanto ativadoras como repressoras da expressão gênica (Khalil *et al.* 2009; Flynn and Chang 2012). Existe a possibilidade, inclusive, de que lncRNAs promovam a ativação de complexos proteicos alvo mediante modificações alostéricas (Mattick 2012). Os lncRNAs também podem atuar modulando padrões de *splicing* alternativo por pareamento com regiões a serem excisadas do transcrito alvo, gerando pequenos RNAs interferentes (siRNAs) ou outros pequenos RNAs, alterando a localização de proteínas e participando de complexos ribonucleoproteicos com função estrutural ou organizacional (Wilusz *et al.* 2009).

Diferentemente da velocidade com que se tem avançado no entendimento das funções e nos mecanismos de ação dos lncRNAs, mecanismos de regulação da expressão e da degradação que atuam sobre estes ncRNAs ainda são pouco estudados. O entendimento destes

mecanismos, no entanto, é de fundamental importância para a biologia molecular já que pode contribuir significativamente no estudo de doenças em que lncRNAs tenham sido identificados atuando.

Dentre os principais mecanismos de regulação já conhecidos para lncRNAs, destacam-se, até o momento, mecanismos que atuam em nível transcricional. Por exemplo, o lncRNA loc285194, um lncRNA que atua como supressor tumoral em osteosarcoma, diminuindo o crescimento celular, é regulado pela proteína e fator de transcrição p53 (Liu *et al.* 2013). Foi mostrado também que em células tronco embrionárias de camundongos, fatores de transcrição Oct4 (*Octamer-binding Transcription Factor 4*) e Nanog (*Nanog homeobox*) regulam a expressão de diversos lncRNAs (Sheik Mohamed *et al.* 2010).

Outra possibilidade é a regulação da expressão de lncRNAs por mecanismos epigenéticos como metilação do DNA e modificação de histonas. O lncRNA LOC554202, gene hospedeiro do miRNA 31, é regulado por hipermetilação de ilhas CpG na sua região promotora (Augoff *et al.* 2012). Também existem estudos mostrando que a regulação da expressão de vários lncRNAs pode se dar por metilação das lisinas 4, 27 e 36 da histona H3 (H3K27) (Guttman *et al.* 2009; Wu *et al.* 2010; Conley and Jordan 2012).

Por fim, existem estudos mostrando a regulação de lncRNAs por resposta a hormônios. Em trabalho publicado por nosso grupo em 2007 foi mostrado que a exposição de células humanas de adenocarcinoma de próstata LNCaP ao hormônio andrógeno alterou significativamente os níveis de expressão de 39 lncRNAs intrônicos. Foi mostrado que o hormônio se liga a elementos regulatórios ARE (*Androgen Response Elements*) na região genômica dos lncRNAs, ativando a transcrição destes genes (Louro *et al.* 2007).

A regulação da expressão de lncRNAs em nível pós-transcricional, entretanto, é menos entendida do que em nível transcricional. Um trabalho de 2013 demonstrou a possibilidade de que um lncRNA associado com o desenvolvimento de câncer de mama, o GAS5 (*Growth*

Arrest Specific) seja regulado negativamente pelo miR-21. O miRNA por sua vez teria também seus níveis determinados pelo lncRNA num mecanismo de regulação recíproca (Zhang *et al.* 2013).

Recentemente, outro estudo demonstrou a possibilidade de regulação de um lncRNA por um miRNA (Chiyomau *et al.* 2014). O *HOTAIR* (*Hox Transcript Antisense RNA*), um dos lncRNAs mais bem estudados até o momento e que se liga ao complexo de modificação da cromatina PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) para depositar marcas que silenciam a transcrição ao longo de 40 Kb do *locus HOXD* (Rinn *et al.* 2007) é regulado pelo miR-141 pelo mecanismo clássico de silenciamento induzido por miRNAs (que será discutido adiante). Entretanto, esta é uma possibilidade ainda pouco estudada e não se sabe se a regulação de miRNAs sobre lncRNAs é um mecanismo difundido em organismos complexos.

1.3 *Taurine Upregulated Gene1*

O *Taurine Upregulated Gene 1* (*TUG1*) (também conhecido como TI-227H; Linc00080; ncRNA00080) é um gene não codificador de proteínas que origina um ncRNA classificado como RNA longo intergênico não codificador de proteínas (lincRNA), com 7.541 nt e com o número de acesso NR_002323 (RefSeq, GenBank). O *TUG1* está localizado no braço longo do cromossomo 22, região 1, banda 2.2 (chr22q12.2), e ocupa um locus com 10.184 nucleotídeos determinado entre as bases 30.969.211 e 30.979.394 da fita "+" do cromossomo 22 (GRCh38, versão hg38). Este lincRNA, após transcrito, passa pelo processo de *splicing* e adição de cauda poli(A) (Young *et al.* 2005). É provável que o *TUG1* apresente três isoformas com tamanhos variando entre 7.528 e 7.598 nucleotídeos (RefSeq, versão de 04/03/2016). A expressão de *TUG1* apresenta-se bastante difundida ao longo dos diversos tecidos que compõem o corpo humano (Lukk *et al.* 2010).

O *TUG1* foi identificado pela primeira vez por um grupo da Universidade de Harvard em 2005 (Young *et al.* 2005) como um lincRNA regulado por taurina (aminoetanossulfônico

– um ácido orgânico encontrado em diversos tecidos de animais) e mostrou-se essencial para o correto desenvolvimento e diferenciação de células fotorreceptoras da retina de camundongos.

Posteriormente, no ano de 2009, o *TUG1* foi identificado associado ao complexo modificador de cromatina *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) e verificou-se o aumento de expressão do *TUG1* a partir da indução do dano ao DNA de maneira dependente do fator de transcrição p53 (Khalil *et al.* 2009). Foi verificado que o *TUG1* provavelmente atuaria reprimindo a expressão de diversos genes envolvidos no ciclo-celular e apoptose.

Nos últimos anos, diversos estudos têm correlacionado níveis de expressão alterados de *TUG1* com o desenvolvimento de doenças ou com quadros agravados de doenças, tendo sido verificadas diferentes formas de atuação deste lincRNA, como descrito abaixo.

Tratando especificamente de *TUG1* associado ao câncer, no ano de 2013 foram verificados altos níveis de expressão de *TUG1* para carcinoma urotelial de bexiga em relação aos níveis de expressão em tecidos normais (Han *et al.* 2013). O *knockdown* de *TUG1* para as células tumorais de bexiga inibiu a proliferação celular e levou à indução da apoptose, o que demonstra o *TUG1* atuando como um proto-oncogene para este tipo de tecido (Han *et al.* 2013). No mesmo ano, os mesmos efeitos de diminuição de proliferação e indução de apoptose foram verificados para células de osteosarcoma onde os níveis de *TUG1* em células tumorais também se mostraram mais altos que em células normais (Zhang *et al.* 2013) e sugeriu-se novamente a atuação de *TUG1* como proto-oncogene.

No ano seguinte, em um grande estudo sobre câncer de pulmão de células não pequenas, uma relação diferente entre os níveis de expressão de *TUG1* e desenvolvimento tumoral foi encontrada. Este estudo mostrou baixos níveis de *TUG1* associados com um pior estadiamento TNM para os tumores de câncer de pulmão, e correlacionou altos níveis de *TUG1* com uma sobrevida prolongada dos pacientes participantes do estudo, indicando o

TUG1 como um supressor tumoral (Zhang *et al.* 2014). Foi mostrado neste estudo também, pela primeira vez, o completo mecanismo de ação do *TUG1*: este lincRNA é regulado por p53 (em resposta ao dano no DNA), liga-se ao complexo de modificação da cromatina PRC2 e o direciona para o locus genômico do gene *HOXB7* onde são depositadas marcas de trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), reprimindo a expressão do gene *HOXB7* e inibindo cascatas de *MAPK* e *AKT*, genes envolvidos na proliferação celular (Zhang *et al.* 2014).

Por fim, em 2015 novos artigos demonstraram a provável atuação de *TUG1* como um proto-oncogene. Grupos de Nanjing, China, demonstraram a correlação entre altos níveis de expressão de *TUG1* e aumento de proliferação e migração de carcinoma de células escamosas de esôfago (Xu *et al.* 2015), e altos níveis de expressão de *TUG1* e crescimento celular e inibição de apoptose em carcinoma hepatocelular (Huang *et al.* 2015). Este último grupo também verificou a possibilidade de regulação de *TUG1* por um novo fator de transcrição, o SP1.

Recentemente, outros grupos de pesquisa também identificaram diferentes funções para o *TUG1* como a regulação da permeabilidade da barreira sangue-tumor (Cai *et al.* 2015), e regulação de apoptose e secreção de insulina em ilhotas de Langerhans (Yin *et al.* 2015). Tais estudos mostram quão vasto pode ser o espectro de atuação de um mesmo lncRNA e reforçam a importância dos genes não codificadores de proteínas na regulação do desenvolvimento de organismos superiores.

1.4 microRNAs

1.4.1 Breve história

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs) que atuam na regulação da expressão gênica nos níveis pré e pós-transcricional. De certa maneira, é impressionante o quão recentemente foram descobertos estes RNAs e seus

mecanismos de ação, pois representam uma espécie presente em grande diversidade e abundância em diversos organismos superiores, de plantas e vermes a mamíferos.

O primeiro miRNA (*lin*-4) foi descoberto em 1993 atuando como repressor do gene *lin-14* no desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee *et al.*. 1993; Wightman *et al.*. 1993). O mecanismo de ação do gene que originava um pequeno ncRNA de 22 nucleotídeos fora, na época, considerado uma idiossincrasia do nematódeo (Lee *et al.*. 1993; Wightman *et al.*. 1993).

Somente sete anos mais tarde, no ano de 2000, um segundo miRNA seria descoberto, novamente atuando no desenvolvimento de *C. elegans* (Reinhart *et al.*. 2000). Nomeado *let-7*, o novo miRNA atuava de maneira semelhante ao *lin-4*, reprimindo a expressão de outro gene do verme cilíndrico (*lin-41*). O *let-7* se mostrou presente e altamente conservado em diversas outras espécies naquele mesmo ano (Pasquinelli *et al.*. 2000) e conferiu, desta forma, grande notoriedade para a classe de RNAs recém-descoberta.

Os miRNAs, agora extensivamente investigados, foram, já no ano seguinte (2001) encontrados em grande quantidade em diversos organismos (Lagos-Quintana *et al.*. 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee and Ambros, 2001). Seu papel regulatório se mostrou extremamente difundido e, consequentemente, importantíssimo na medida em que estudos passaram a demonstrar o amplo efeito da superexpressão e silenciamento de determinados miRNAs sobre o padrão de expressão de diversos genes codificadores de proteínas (Lim *et al.* 2005; Selbach *et al.* 2008). Esta nova camada da regulação da expressão gênica indicava tratar-se claramente de um ajuste muito fino como mostrado por estudos que verificaram a expressão dos miRNAs como altamente tecido-específica (Lagos-Quintana *et al.* 2002) e dependente do contexto celular (Erhard *et al.* 2014).

Os miRNAs foram então descobertos atuando na regulação da secreção de insulina (Poy el al 2004), regulação do metabolismo energético (Mersey *et al.* 2005, Esau *et al.*, 2006),

desenvolvimento celular (Mendell 2005) e em pouco tempo tornou-se clara a associação da desregulação dos níveis de expressão de miRNAs e o desenvolvimento de diversas doenças, inclusive o câncer (Lee *et al.* 2007; Musilova and Mraz 2014).

Com a crescente associação de miRNAs a patologias, diversos grupos de pesquisa verificaram o potencial destas moléculas como biomarcadores e, até mesmo, passaram a investigar a possibilidade do uso terapêutico destes RNAs (Trang *et al.* 2009; Li *et al.* 2009). O primeiro medicamento com mecanismo de ação baseado no funcionamento de miRNAs, o Miravirsen, desenvolvido para o tratamento de Hepatite C, encontra-se atualmente em fase 3 de testes clínicos e apresenta excelentes expectativas para o tratamento desta doença (Gebert *et al.* 2013).

De acordo com a base de dados miRBase, atualmente 1.881 diferentes miRNAs são conhecidos para seres humanos (Griffiths-Jones *et al.* 2006; Kozomara and Griffiths-Jones 2013) e há pelo menos 163 doenças associadas à desregulação da expressão de miRNAs conforme a base de dados curada manualmente miR2Disease Base (Jiang *et al.* 2009).

1.4.2 Características, organização genômica e biogênese

O tamanho médio dos miRNAs maduros pode variar entre 21 e 25 nucleotídos, sendo o tamanho mais comumente encontrado de 22 nucleotídeos, típico para aqueles miRNAs que passam pela chamada via canônica de biogênese (Bartel 2004), que será discutida adiante.

Com relação à organização genômica, são encontrados pelo menos sete tipos de loci gênicos para miRNAs: (i) miRNAs intergênicos isolados, que não sobrepõem nenhum outro gene (codificador ou não de proteínas) e possuem região promotora independente; (ii) miRNAs intergênicos agrupados, que como o grupo anterior não sobrepõem outros genes mas, diferentes desse, possuem uma região promotora comum e cuja transcrição origina, em última instância, dois ou mais miRNAs maduros; (iii) miRNAs intrônicos isolados, genes que codificam miRNAs, estão sobrepostos a regiões intrônicas de outros genes e que podem ser

regulados pela região promotora do gene que sobrepõem ou por regiões promotoras próprias (Axtell *et al.* 2011); (iv) miRNAs intrônicos agrupados, que como o grupo anterior sobrepõem regiões intrônicas e podem ser regulados por promotores do gene que sobrepõem ou promotores próprios, podendo possuir promotores que originem um único ou vários miRNAs quando da transcrição a partir destes promotores e processamento (Aboobaker *et al.* 2005; Martinez *et al.* 2008; Isik *et al.* 2010); (v) miRNAs intrônicos ou miRtrons, genes sobrepostos a regiões intrônicas de outros genes sem possuírem promotores próprios, ou seja, regulados unicamente pelo promotor do gene que sobrepõem (Okamura *et al.* 2007, Ruby *et al.* 2007, Flynt *et al.* 2010); (vi) miRNA exônicos, presentes em éxons de outros genes, e que podem apresentar vias de regulação e maturação distintas das de outros miRNAs (Berezikov *et al.* 2011); e (vii) miRNAs encontrados sobrepostos a junções entre éxons e íntrons de outros genes.

Os miRNAs são normalmente transcritos pela RNA polimerase II (Pol II) (Lee *et al.* 2004), havendo também a possibilidade de transcrição pela RNA polimerase III (Pol III) (Borchert *et al.* 2006; Dieci *et al.* 2007). Para a formação do complexo de pré-iniciação (PIC) podem estar envolvidos diversos fatores de transcrição como p53, MYC, MYODI, ZEB1 e ZEB2, e pode haver regulação epigenética por metilação de DNA ou marcação de histonas (O'Donnell *et al.* 2005; He *et al.* 2007; Bandres *et al.* 2009).

Uma vez ocorrida a transcrição do gene que dá origem ao miRNA, o transcrito obtido, chamado transcrito primário ou pri-miRNA, que possui cerca de 1.000 nucleotídeos e uma estrutura de *stem-loop* com cerca de 35 pares de bases, sofre processamento por uma enzima nuclear chamada DROSHA (Lee *et al.* 2003), cuja ação depende de proteínas acessórias como a proteína PASHA (DGCR8) (Denli *et al.* 2004), numa primeira etapa de maturação chamada *cropping*, o que origina o agora chamado pre-miRNA de cerca de 70 nucleotídeos, composto por um *stem-loop* totalmente pareado ou com dois nucleotídeos livres em uma das

extremidades (normalmente UU). Este primeiro passo do processamento pode também ocorrer simultaneamente à transcrição (Morlando *et al.* 2008).

O pre-miRNA, ainda localizado no núcleo, pode ser transportado para o citoplasma por uma carioferina chamada Exportina-5 (Bohnsack *et al.* 2004) ou continuar no núcleo e sofrer os últimos passos do processamento que originam o miRNA maduro neste compartimento celular, uma vez que todos os fatores necessários para a maturação do miRNA e interferência de RNA (RNAi) estão também presentes e ativos no núcleo da célula (Gagnon *et al.* 2014). De qualquer forma, na via canônica de biogênese, o pre-miRNA, localizado no núcleo ou transportado para o citoplasma, sofre clivagem pela enzima DICER (Hutvágner *et al.* 2001) formando um duplex de fitas de RNA com 22 nucleotídeos, que deverá ser separado e carregado em uma das proteínas Argonauta, constituintes do complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), o qual passa a ser chamado de complexo de silenciamento induzido por miRNA carregado (miRISC*). A escolha da fita-guia (fita do duplex escolhida para o carregamento do miRISC) se dá por uma assinatura termodinâmica que indica baixa estabilidade nos primeiros 8 nucleotídeos e do décimo ao décimo quarto nucleotídeo do duplex no sentido 5’ para 3’ do *steem-loop* inicial (Khvorova *et al.* 2003).

Uma vez carregado o miRISC com o miRNA específico, o silenciamento por RNA ocorre com pareamento do miRNA tipicamente na região 3’ não traduzida (3’ UTR), podendo ocorrer entretanto na região 5’ não traduzida (5’ UTR) ou na região codificadora de mRNAs-alvo (Pasquinelli 2012). O miRNA é mantido ligado à proteína Argonauta por motivos MID e PAZ (respectivamente pelas extremidades 5’ e 3’) (Ender and Meister 2010) e ligado ao alvo pode ser translocado com o complexo formado para um compartimento subcelular chamado corpúsculo P (*P-bodies*) (Liu *et al.* 2005), onde o RNA alvo poderá ser degradado por exonucleases, ou indicar a clivagem do alvo pela própria proteína Argonauta, que possui um domínio PIWI, semelhante a RNase H – uma endonuclease não sequência específica

(Pasquinelli 2012) – para o caso da proteína Ago2 (até o momento, a única sabidamente com atividade endonucleásica).

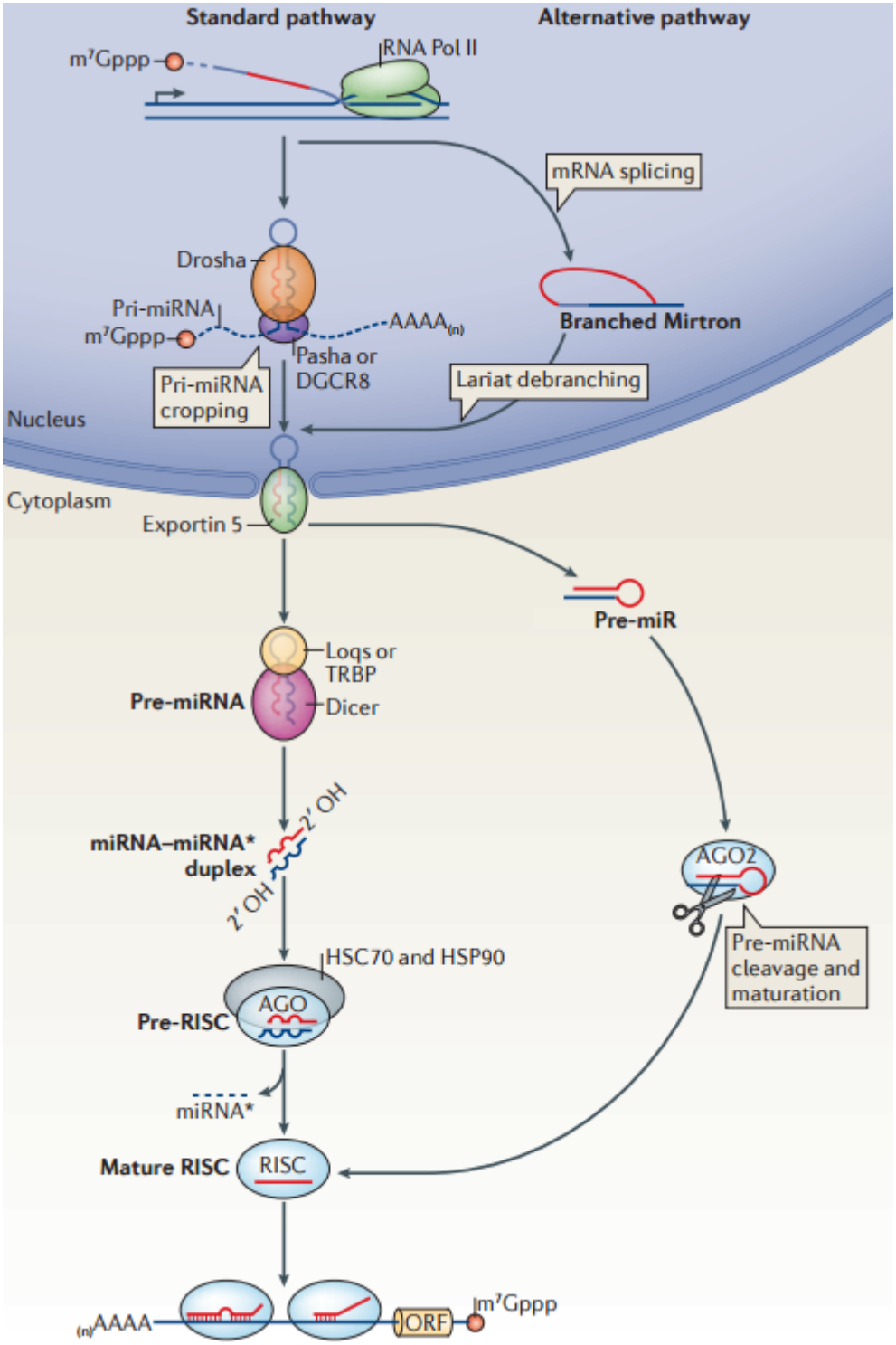

Figura 1. Esquema da via canônica de biogênese de miRNAs, via biogênica de mirtrons e via biogênica alternativa com clivagem de pre-miRNA por Ago2. Conforme explicitado no texto, são apresentadas as vias de biogênese de miRNAs. O caminho descrito como *Standard pathway* indica a

via canônica de biogênese de um miRNA. O caminho descrito como *Alternative pathway* indica a via biogênica de mirtrons. A situação de maturação divergente da via usual, indicada como uma rota alternativa a partir da transferência do pre-miRNA do citoplasma para o núcleo é menos comum e mostra atuação da proteína Ago2 na clivagem do pre-miRNA. Por conveniência, assumiu-se apenas que miRNAs sejam transcritos pela RNA Polimerase II, sendo possível haver transcrição a partir da RNA Polimerase III (Imagem modificada de Ameres and Zamore 2013).

Apesar de a via canônica de biogênese de miRNAs se mostrar atualmente a mais difundida, existe a possibilidade de que miRNAs sofram processamento por vias alternativas. Dentre os miRNAs, os chamados miRtrons que, como discutidos anteriormente, são aqueles sobrepostos a regiões intrônicas de outros genes e sem promotores próprios, são independentes do processamento pelas RNases III da via canônica (DROSHA e DICER), e sofrem processamento apenas pela maquinaria de recomposição (Westholm and Lai 2011). Há evidências também de que certos miRNAs sejam completamente processados no núcleo onde existiria uma participação importante da proteína Ago2 no processo de maturação destes miRNAs, pois atuaria no processamento clivando sequências e formando uma nova estrutura intermediária chamada ac-pre-miRNA (Diederichs and Haber 2007; Cifuentes el al 2010).

Por fim, além de diversos caminhos para a maturação dos miRNAs, as funções e formas de atuação também são numerosas. A atuação típica de um miRNA consiste no silenciamento gênico a partir da atuação do miRISC, das maneiras já citadas, entretanto, miRNAs podem também atuar na inibição da tradução de mRNAs (Huntzinger and Izaurralde 2011) no complexo polissômico, desestabilizar o transcrito alvo por deadenilação, ativar a tradução de mRNAs alvejando sítios nas regiões 5’UTR e 3’UTR (Pasquinelli 2012) e até mesmo aumentando o nível de expressão de genes alvo por ligação em regiões promotoras e estabilização do PIC (Zhang *et al.* 2014).

Com relação a eficiência do silenciamento de um gene a partir de um miRNA, existem vários aspectos do sítio de ligação do miRNA no transcrito alvo que podem indicar maior ou menor capacidade de interação. Dentre os fatores que indicam uma alta probabilidade de interação entre o miRNA e o sítio alvo estão a presença de um *seed* estringente, ou seja, com

alta complementariedade com o alvo (sendo o *seed* a região compreendida entre os nucleotídeos 1 a 8 a partir da extremidade 5' do miRNA), número de sítios de ligação para um mesmo miRNA, posicionamento preferencial do sítio de ligação na região 3' UTR para mRNAs, baixo conteúdo CG nas regiões próximas ao *seed* e alto grau de pareamento com o alvo na região 3' do miRNA (Bartel 2009).

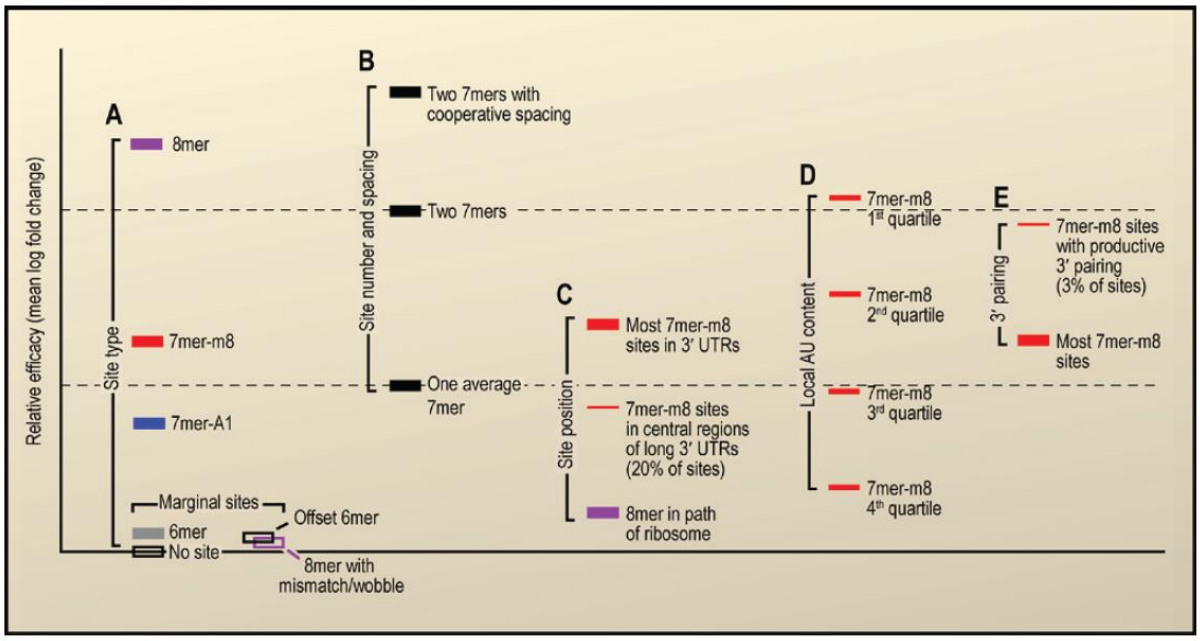

Figura 2. Eficiência relativa do alvejamento de sítios de ligação de transcritos alvo por miRNAs. São apresentados os fatores que influenciam na eficiência do silenciamento de genes por alvejamento de miRNAs em sítios de ligação. **(A)** Tipo/ estringência de *seed*; **(B)** Número de sítios de ligação; **(C)** Posicionamento do(s) sítio(s) de ligação; **(D)** Conteúdo AU local; **(E)** Pareamento na região 3' do miRNA (Imagem de Bartel 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a possível regulação do RNA longo não codificador de proteínas *TUG1* por microRNAs e o efeito desta regulação em processos tumorigênicos.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar a possibilidade de que o lncRNA *TUG1* seja regulado, em células da linhagem HeLa, por miRNAs através da transfecção de mímicos de miRNAs selecionados e medida dos níveis de expressão do lncRNA por RT–qPCR.
2. Avaliar o perfil de expressão, em linhagens celulares humanas diversas, do par regulatório *TUG1* – miRNA previamente identificado em busca de conservação da regulação do lncRNA por miRNAs.
3. Avaliar o possível efeito fenotípico, nas linhagens celulares humanas onde se encontrem evidências da regulação do *TUG1* por miRNAs, da superexpressão e silenciamento dos miRNAs selecionados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Busca por miRNAs candidatos a reguladores de *TUG1*

A fim de identificar os miRNAs possíveis reguladores do lncRNAs *TUG1*, encontrado ligado à proteína Ago2 nos sequenciamentos e, portanto, ao miRISC, foi feita uma busca no banco de dados miRCode (Jeggari *et al.* 2012) pelos miRNAs que possuem sítios de ligação identificados para o *TUG1*. O miRCode (Jeggari *et al.* 2012) busca computacionalmente e descreve um conjunto de possíveis sítios alvo de miRNAs no transcriptoma de RNAs não codificadores de proteínas longos, utilizando o GENCODE (Harrow *et al.* 2012) para busca. O alinhamento entre os miRNAs e seu suposto alvo *TUG1* foi visualizado com a ferramenta UCSC Genome Browser (http://genome.ucsc.edu) (Kent *et al.*. 2002).

3.2 Linhagens celulares humanas e condições de cultivo

Para a realização deste trabalho foram utilizadas diversas linhagens celulares humanas entre elas as linhagens de adenocarcinomas pancreáticos derivados de sítios metastáticos AsPC-1 (CRL-1682) e Capan-1 (HTB-79), carcinoma pancreático MIA-PaCa-2 (CRL-1420), carcinoma ductal pancreático PANC-1 (CRL-1469), adenocarcinomas renais 769-P (CRL-1933) e 786-O (CRL-1932), renal normal RC-124 (CLS300251), adenocarcinoma cervical HeLa (CCL-2), carcinoma cervical SIHA (HTB-35), carcinoma epidermóide cervical derivada de sítio metastático CASKI (CRL-1550), prostáticas normais PZ-HPV-7 (CRL-2221) e RWPE-1 (CRL-11610), carcinoma prostático DU145 (HTB-81) e adenocarcinoma prostático derivada de sítio metastático PC-3 (CRL-1435).

Todas as linhagem foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*) e cultivadas à 37 ºC em atmosfera de 5 % de CO_2 em meio de cultura apropriado, conforme recomendações da ATCC. O meio recomendado e utilizado para cada linhagem celular encontra-se listado na tabela 1, abaixo.

Linhagem celular	Meio de cultura	Soro Fetal Bovino
AsPC-1 (CRL-1682)	RPMI-1640	10 %
Capan-1 (HTB-79)	DMEM	20 %
MIA-PaCa-2 (CRL-1420)	DMEM	10 %
PANC-1 (CRL-1469)	DMEM	10 %
769-P (CRL-1933)	RPMI-1640	10 %
786-O (CRL-1932)	RPMI-1640	10 %
RC-124 (CLS300251)	DMEM	10 %
HeLa (CCL-2)	DMEM	10 %
SIHA (HTB-35)	MEM	10 %
CASKI (CRL-1550)	RPMI-1640	10 %
PZ-HPV-7 (CRL-2221)	K-SFM	-
RWPE-1 (CRL-11609)	K-SFM	-
DU145 (HTB-81)	DMEM	10 %
PC-3 (CRL-1435)	DMEM/ HAM F-12K	10 %

Tabela 1. Relação das linhagens celulares e o meio de cultura utilizado com concentração de soro fetal bovino (volume de meio/ volume SFB) adicionado para cada linhagem.

O meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Cultilab), foi suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino) (Cultilab) 10 % ou 20 %, bicarbonato de sódio 1,2 g/L, D-glicose 4,2 g/L, 10 mL de piruvato de sódio e com os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μg/mL).

O meio MEM (*Minimun's Eagle Medium*) (Cultilab), foi suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino) (Cultilab) 10 %, bicarbonato de sódio 2,2 g/L, D-glicose 3,0 g/L, 10 mL de piruvato de sódio, e com os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μg/mL).

O meio RPMI-1640 () foi suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino) (Cultilab) 10 %, bicarbonato de sódio 1,5 g/L, D-glicose 4,5 g/L, 10 mL de piruvato de sódio, 1,2 g de HEPES e com os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μg/mL).

O meio K-SFM foi utilizado como adquirido, sem adição de outras substâncias que não as disponíveis no próprio kit comercial.

O meio DMEN/ HAM F-12K foi preparado com adições iguais do meio DMEM, acima descrito, e do meio HAM F-12K, o qual foi suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino) (Cultilab) 10 %, bicarbonato de sódio 1,2 g/L, D-glicose 1,8 g/L, piruvato de sódio 10 mL e com os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μg/mL).

Para a manutenção das células em cultura, ao atingirem aproximadamente 80 % da densidade de saturação as células foram lavadas com solução salina PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 8 mM e KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,2) e subcultivadas após o uso de solução de tripsina-EDTA 0,1 % (Cultilab) para descolamento das células aderidas. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo com 10 % de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma) e armazenados em freezer a -80 ^{o}C.

3.3 Extração, verificação da qualidade do RNA e transcrição reversa

As células foram cultivadas nos frascos apropriados até a confluência aproximada de 80 %, lavadas com solução salina PBS e descoladas da superfície do frasco por tratamento com solução 0,1 % de tripsina-EDTA, sendo na sequência adicionado meio de cultura contendo SFB ou inibidor de tripsina para inativação da atividade desta enzima. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 325 x g por 5 minutos e o sobrenadante removido por decantação. O isolamento do RNA foi realizado utilizando TRizol (Invitrogen) juntamente com kits comerciais específicos para captura de RNA total, inclusive RNAs curtos (RNAs > 200 nt), miRNEasy Mini Kit (número de catálogo 217004, Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante, e eluído em volume de 50 μL de água tratada com DEPC

(Invitrogen). Em seguida, o RNA foi submetido a uma etapa de purificação e tratamento com DNaseI utilizando o kit RNase-Free DNase Set (número de catálogo 79254, Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante, com alteração do tempo de incubação da DNaseI de 45 minutos para 1 hora. O RNA purificado foi armazenado a -80°C.

As amostras de RNAs foram então testadas quanto à sua quantidade e pureza através de espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific) e quanto à sua integridade pela razão de abundância dos RNAs ribossomais 18S e 28S (através de eletroforese microfluídica, Bioanalyzer 2100 – Agilent Technologies).

Para confirmar a ausência de DNA genômico contaminante nas amostras isoladas, uma alíquota contendo 1 µg de RNA total de cada extração foi submetida à reação em cadeia de polimerase (PCR) em volume total de 50 µL, durante 40 ciclos e com primers desenhados para amplificação de um trecho específico do gene de α-Tubulina, não encontrado na forma de RNA devido ao processamento sofrido.

Na etapa de transcrição reversa, o DNA complementar foi gerado a partir de 1 µg de RNA total, primers *random*, tampão não específico para miRNAs, *HiFlex buffer* e transcriptase reversa (miRscript II RT Kit, Qiagen), segundo recomendações do fabricante. O DNA complementar gerado foi então diluído 10x para uso e armazenado a -20 °C.

3.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

As reações da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram feitas em triplicatas em um volume de 20 µL contendo 10 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 5 µL de cDNA da transcrição reversa (diluído 1:10) e 5 µL de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) *Foward* e *Reverse* específicos para cada gene em concentração 3,2 µM. As reações foram realizadas no aparelho 7500 Real–qTime PCR System (Applied Biosystems) utilizando os parâmetros padrão do aparelho.

O ciclo da PCR no qual a intensidade de fluorescência do *SYBR Green*, ligado à dupla fita de DNA amplificado, é detectada determina o Ct do gene (*Cycle threshold* – ciclo referência). Este Ct é uma medida relativa da quantidade inicial de moléculas do transcrito alvo presente no cDNA ou DNA genômico. Quanto menor o Ct, mais expresso é o transcrito. Para tornar as medidas de expressão comparáveis entre as amostras usa-se como referência o Ct de um gene constitutivo ou que não tenha sua expressão alterada nas diferentes condições de estudo.

Calcula-se o delta-Ct (ΔCt) pela diferença entre a média das triplicatas (réplicas técnicas) do Ct do gene em análise e o Ct médio do normalizador. A partir dos valores de ΔCt calcula-se o valor de delta-delta-Ct ($\Delta\Delta$Ct) que consiste na subtração do ΔCt obtido nas diferentes condições testadas (tratamento e controle). A diferença de expressão relativa do gene em estudo, *fold change*, é calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A significância estatística da diferença de expressão dos transcritos testados por qPCR entre condições distintas (tratamento e controle) foi medida utilizando o teste t de *Student* (pareado, monocaudal, homocedástico), considerando-se como limiar de significância p-valor $< 0,05$. Neste teste, foram considerados os valores médios de ΔCt de cada condição, referentes às, pelo menos, três réplicas biológicas.

3.5 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers)*

Para os ensaios de RT-qPCR, assim como para a verificação de contaminação de DNA genômico em amostras de RNA extraídas, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores cujo desenho já era estabelecido no laboratório, de forma que a especificidade e eficiência já era conhecida. As sequências seguem na tabela abaixo.

Alvo	Nome dos oligonucleotídeos iniciadores	Sequência
RT-qPCR		
GAPDH	GAPDH – F	TGCACCACCAACTGGCTTAGC
	GAPDH – R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
TUG1	*TUG1* – F	TAGCAGTTCCCCAATCCTTG
	TUG1 – R	CACAAATTCCCATCATTCCC
U1	U1 – F	TAATTTTGGTGCCGATTGAACG
	Primer universal (comercial)	Desconhecida
FOS	Primer commercial	Desconhecida
H19	*H19* – F	TTCAAAGCCTCCACGACTCT
	H19 – R	CTGAGACTCAAGGCCGTCTC
miR-1	miR-1	ACATACTTCTTTATATGCCCAT
miR-22	miR-22	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT
miR-103	miR-103	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
miR-148b	miR-148b	AAGTTCTGTTATACACTCAGGC
miR-194	miR-194	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA
PCR para verificação de contaminação por DNA genômico		
Tubulina	Tubulina_RT_F	TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG
	Tubulina_RT_R	AGTGCCAGTGCGAACTTCATC

Tabela 2. Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de RT-qPCR e PCR para verificação de contaminação por DNA genômico.

3.6 Superexpressão de miRNAs

Para a superexpressão dos miRNAs selecionados como possíveis reguladores do lncRNA *TUG1*, foram plaqueadas as células das linhagens a serem tratadas (HeLa, MIA-PaCa-2 ou PANC-1) em placas *multiwell* de 6 poços (Falcon Biotech) com confluência aproximada de 60 % (equivalente a aproximadamente $6x10^5$ células por poço) e meio de cultivo indicado pelo ATCC.

Após 24 horas do plaqueamento o meio de cultura foi removido, as células lavadas com solução salina de PBS e foi realizada transfecção de mímicos do miRNA que pretendia-se superexpressar. Para a transfecção foi utilizado meio OPTI-MEM (ThermoFisher Scientific), concentrações finais de 7,5 µL/mL de lipofectamina RNAi MAX e mímicos de

miRNAs *mirVana mimics* (ThermoFisher Scientific) em concentração final de 50 nM/mL, em volume de 1 mL/poço e durante 24 horas, exceto quando informado.

Os mímicos de miRNAs *mirVana mimics* são pequenos duplexes de RNAs, quimicamente modificados, de composição protegida por patentes, que mimetizam miRNAs endógenos. As modificações químicas dos mímicos miRvana inativam a fita passageira (fita *star*) complementar à fita guia, para ajudar a garantir que a fita guia (que representa o miRNA maduro desejado) seja incorporada pela Ago para produzir o efeito desejado do miRNA. Após a incorporação destes oligonucleotídeos pelas células espera-se que os mímicos passem pela fase final de biogênese de miRNAs sendo carregados no miRISC, o complexo de silenciamento induzido por miRNAs.

Após o período de transfecção o meio transfectante foi removido e as células coletadas com 0,1 % de tripsina, seguido da adição de meio de cultura contendo SFB. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 325 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. As células sedimentadas foram utilizadas imediatamente para extração de RNA, conforme o item 3.3, e medidas dos níveis dos genes alvo, conforme o item 3.4.

3.7 Imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos – RIP

Células das linhagens celulares MIA-PaCa-2 e PANC-1 foram cultivadas em frascos apropriados até a confluência desejada, lavadas com PBS e descoladas da superfície do frasco por tratamento com 0,1 % de tripsina seguido da adição de meio de cultura contendo SFB. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 325 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. As células sedimentadas foram utilizadas imediatamente.

A imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos (RIP - *RNA-Binding Protein Immunoprecipitation*) foi realizada em $2x10^7$ células em triplicata, utilizando o kit comercial *Magna RIP RNA-Binding Protein Immunoprecipitation* (Millipore), segundo protocolo do fabricante.

Os seguintes anticorpos foram utilizados da Millipore: anti-Ago2 (04-642) e IgG de camundongo não imunizado (12-371). Os RNAs co-imunoprecipitados foram purificados por meio da utilização do mesmo protocolo descrito no item 3.3, sendo em seguido quantificados e sua qualidade avaliada conforme os mesmo procedimentos. Os RNAs alvos co-imunoprecipitados foram avaliados quanto ao seu nível de expressão e de ligação nos complexos proteicos por RT-qPCR conforme descrito nos itens 3.4.

3.8 Simulação do pareamento miRNA/ *TUG1* e medida de ΔG de interação

Para a simulação do pareamento entre os miRNAs possíveis reguladores de *TUG1* e os respectivos sítios de ligação no lincRNA, foi utilizado o programa *RNAhybrid 2.2.1*, disponível de forma gratuita na internet através do endereço http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/.

Foram feitas as submissões das sequências do *TUG1* e de cada miRNA e pedidas as simulações utilizando as condições padrão do programa. Os resultados são fornecidos em formato HTML e .jpg e as imagens recebidas foram recortadas e montadas, sem prejuízo das informações contidas, para uso no presente projeto.

3.9 Silenciamento de miRNAs

Para o silenciamento dos miRNAs selecionados como possíveis reguladores do lncRNA *TUG1*, foram plaqueadas as células das linhagens a serem tratadas (HeLa, MIA-PaCa-2 ou PANC-1) em placas *multiwell* de 6 poços (Falcon Biotech) com confluência aproximada de 60 % (equivalente a aproximadamente $6x10^5$ células por poço) e meio de cultivo indicado pelo ATCC.

Após 24 horas do plaqueamento o meio de cultura foi removido, as células lavadas com solução salina de PBS e foi realizada transfecção de inibidores do miRNA que pretendia-se silenciar. Para a transfecção foi utilizado meio OPTI-MEM (ThermoFisher Scientific) com

inibidores de miRNAs *mirVana inhibitors* (ThermoFisher Scientific) em concentração final de 50 nM, em volume de meio de 1 mL/poço e durante 24 horas, exceto quando informado.

Os inibidores de miRNAs *mirVana inhibitors* são pequenas moléculas simples-fita de RNA quimicamente modificadas e desenhadas especificamente para ligar a determinados miRNAs inibindo seu carregamento pelo miRISC, o complexo de silenciamento induzido por miRNA.

Após o período de transfecção o meio transfectante foi removido e as células coletadas com 0,1 % de tripsina, seguido da adição de meio de cultura contendo SFB. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 325 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. As células sedimentadas foram utilizadas imediatamente para extração de RNA, conforme o item 3.3, e medidas dos níveis dos genes alvo, conforme o item 3.4.

3.10 Indução de dano ao DNA

Para a indução de dano ao DNA nas linhagens em que foi verificada a possibilidade de regulação do lncRNA TUG por miRNAs, foram plaqueadas as respectivas células (HeLa, MIA-PaCa-2 ou PANC-1) em placas *multiwell* de 6 poços (Falcon Biotech) com confluência aproximada de 75 % (equivalente a aproximadamente $7{,}5 \times 10^5$ células por poço) e meio de cultivo indicado pelo ATCC.

Após 24 horas do plaqueamento o meio de cultura foi removido, as células lavadas com solução salina de PBS e foi realizado tratamento com doxorrubicina. Para o tratamento foi utilizado meio de cultivo indicado pelo ATCC para cada linhagem celular com doxorrubicina em concentração final de 1,5 μg/mL, em volume de 1 mL/poço e durante 24 horas.

Após o período de tratamento o meio foi removido e as células coletadas com 0,1 % de tripsina, seguido da adição de meio de cultura contendo SFB. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 325 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. As

células sedimentadas foram utilizadas imediatamente para extração de RNA, conforme o item 3.3, e medidas dos níveis dos genes alvo, conforme o item 3.4.

3.11 Curvas de crescimento

Para realização de curvas de crescimento, com o intuito de verificar possíveis efeitos fenotípicos relativos à superexpressão de miRNAs candidatos a reguladores de *TUG1*, foram plaqueadas $5x10^4$ células de cada linhagem celular estudada, em cada poço de placas *multiwell* de 6 poços.

Após 24 horas do plaqueamento foram contadas as células presentes em parte dos poços plaqueados e para os demais poços o meio de cultura foi removido, as células lavadas com solução salina de PBS e foi realizada transfecção de mímicos do miRNA que pretendia-se superexpressar. As transfecções foram realizadas conforme o item 3.6.

Após o período de 24 horas de transfecção, o meio transfectante foi removido, as células foram lavadas com solução salina de PBS, contou-se as células presentes em parte dos poços plaqueados e para os demais poços foi adicionado novo meio de cultura sem material transfectante. As placas restantes foram novamente encubadas e as células foram contadas a cada 24 horas durante o período de 48 horas seguintes. Foram traçadas então as curvas representando o crescimento das células ao longo do ensaio. Todas as contagens foram realizadas em triplicatas.

3.12 Viabilidade celular

Para realização dos ensaios de viabilidade celular, com o intuito de verificar possíveis efeitos fenotípicos relativos à superexpressão de miRNAs candidatos a reguladores de *TUG1*, foram plaqueadas 400 células de cada linhagem celular estudada, em cada poço de placas *multiwell* de 6 poços, tomando-se sempre o cuidado de homogeneizar a suspensão de células de forma que, após o plaqueamento, as células observadas no microscópio apresentassem-se isoladas umas das outras.

Após 24 horas do plaqueamento meio de cultura foi removido, as células lavadas com solução salina de PBS e foi realizada transfecção de mímicos do miRNA que pretendia-se superexpressar. As transfecções foram realizadas conforme o item 3.6.

Após o período de 24 horas de transfecção, o meio transfectante foi removido, as células foram lavadas com solução salina de PBS, e foi adicionado novo meio de cultura sem material transfectante. As placas restantes foram então incubadas por períodos que variaram entre 12 e 15 dias, até que se formassem colônias visíveis a olho nu na placa de cultura. O meio de cultura foi substituído a cada período de 48 horas.

O meio de cultura foi então completamente removido, as células lavadas com solução salina PBS e fixadas com formaldeído 3,7 % por 5 minutos. Em seguida adicionou-se solução de cristal violeta por 5 minutos e seguiu-se à nova lavagem com solução salina PBS. As colônias foram contadas e foi determinada a razão de colônias entre amostras controle e tratadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Escolha do lncRNA *TUG1* como possível RNA regulado por miRNAs

Dados preliminares de nosso grupo, obtidos em 2013 e ainda não publicados (Amaral *et al.* 2016, em preparo), mostraram uma grande quantidade de lncRNAs ligados à proteína Argonauta 2 (Ago2), o centro catalítico do complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), em células da linhagem HeLa (Figura 3A). Estes dados foram obtidos a partir do sequenciamento de frações celulares imunoprecipitadas com anticorpo Anti-Ago2 (RIP-Seq Anti-Ago2) comparado ao sequenciamento de frações imunoprecipitadas com anticorpo inespecífico (RIP-Seq IgG - IgG normal de camundongo não imunizado). Nesta etapa, os RNAs co-imunoprecipitados extraídos da fração imunoprecipitada foram separados em gel pelo tamanho dos fragmentos, e sequenciados separadamente e em paralelo os RNAs longos (> 200 nt) e os RNAs curtos (< 200 nt).

A análise da RIP-Seq Anti-Ago2 dos RNAs longos indicou 2046 mRNAs e RNAs longos não codificadores (lncRNAs) ligados exclusivamente a Ago2, quando em comparação à análise da RIP-Seq IgG controle (Figura 3A). A comparação das sequencias dos transcritos obtidas contra o banco de lncRNAs presentes no **GENCODE v.14** permitiu identificar algumas centenas de lncRNAs em três classes diferentes, os lincRNAs, os RNAs antissenso e os pseudogenes (Figura 3B). Além desses, mais de 1300 RNAs codificadores de proteínas estavam ligados a Ago2, e não foram objeto de nosso estudo.

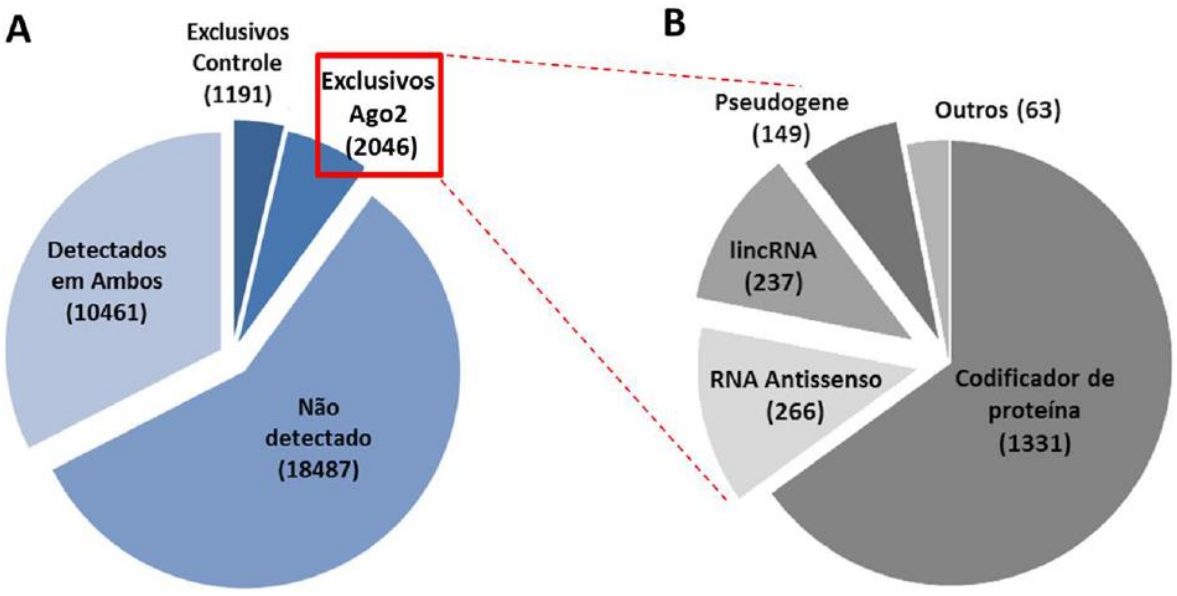

Figura 3. Detecção dos transcritos anotados no GENCODE v.14 (Harrow *et al.* 2012) nos sequenciamentos RIP-Anti-Ago2 e RIP-Controle. (A) São apresentados o número de transcritos não detectados em nenhum sequenciamento, assim como o número de transcritos detectados somente na RIP-Anti-Ago2, somente na RIP-Controle ou em ambos os sequenciamentos. (**B)** Os números de transcritos detectados somente nos sequenciamentos RIP-Anti-Ago2 são mostrados de acordo com as suas classes. (Dados de Amaral *et al.* 2016, em preparo).

Além dos RNAs longos presentes exclusivamente na fração de imunoprecipitação com Ago2, cerca de 10.000 outros RNAs longos foram encontrados em ambas as situações com diferentes enriquecimentos relativos em cada uma delas (Figura 3A). A determinação do enriquecimento dos transcritos nos sequenciamentos foi feita a partir da razão entre os RPKMs (*reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) de ambas as condições (Mortavazi *et al.* 2008). Foi determinada uma linha arbitrária de corte para o enriquecimento, onde se separaram cerca de 3.000 RNAs encontrados na RIP-Seq Anti-Ago2 em proporção quatro vezes maior do que na RIP-Seq IgG (Figura 4).

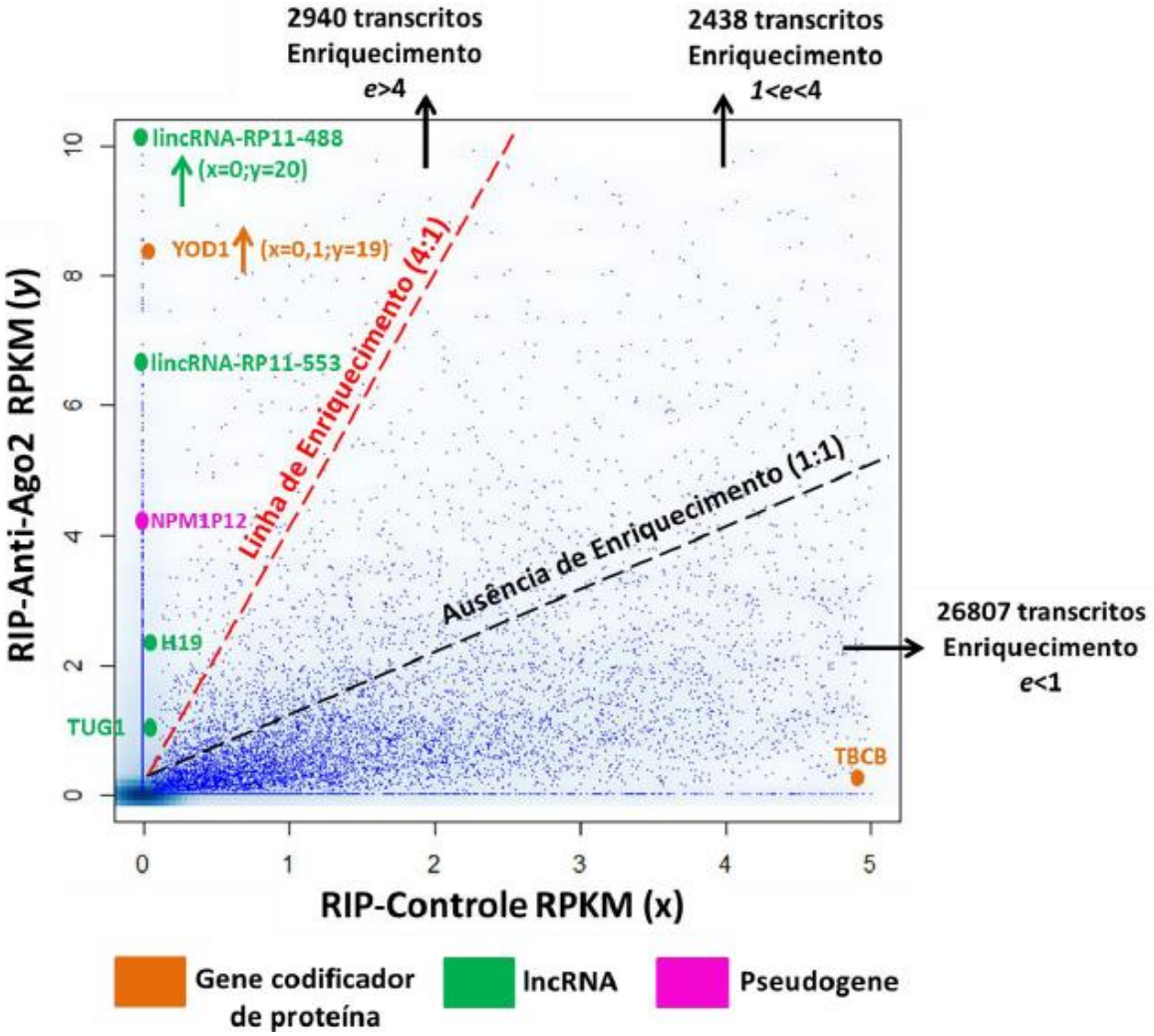

Figura 4. Transcritos presentes na versão 14 do banco de dados GENCODE (Harrow *et al.* 2012) e detectados nos sequenciamentos RIP-Anti-Ago2 e/ou RIP-Controle. Estão mostrados todos os transcritos detectados nos sequenciamentos e que estão anotados no GENCODE, incluindo mRNAs codificadores de proteínas e lncRNAs. A abundância dos transcritos detectados nos sequenciamentos RIP-Anti-Ago2 e/ou RIP-Controle foi avaliada por meio do cálculo do valor de RPKM (*reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) para cada transcrito. O gráfico de dispersão mostra cada transcrito (pontos azuis) de acordo com seus valores de RPKM no sequenciamento RIP-Anti-Ago2 (eixo y) e no sequenciamento RIP-Controle (eixo x). A linha pontilhada preta mostra a relação de abundância 1:1 (Ago2:Controle), ou seja, ausência de enriquecimento. A linha vermelha mostra a relação 4:1 (Ago2:Controle), tomada como o limite para ser considerada como evidência de enriquecimento - segundo (Zhao *et al.* 2010). Os quatro lncRNAs selecionados como de interesse estão coloridos em verde, e possuem uma relação Ago2:Controle bem acima do limite arbitrário 4:1. Um pseudogene de interesse (lilás) e dois genes codificadores de proteína selecionados como controle (laranja) também estão indicados, um controle positivo e outro controle negativo. (Dados de Amaral *et al.* 2016, em preparo).

Dentre os vários RNAs longos do grupo de exclusivos ou enriquecidos para a RIP-Seq Anti-Ago2 encontrava-se o RNA longo não codificador de proteínas *Taurine Upregulated Gene 1* (*TUG1*), já identificado na literatura como envolvido na regulação do ciclo celular e

apoptose, como descrito na Introdução, além de diversos miRNAs que possuíam sítios de ligação neste lncRNA, conforme analisado mais abaixo.

Tais observações sugeriam a possibilidade de regulação do *TUG1* por miRNAs, o que passou a ser investigado por nosso grupo, como descrito nesta Dissertação.

4.2 – Escolha dos miRNAs candidatos a reguladores do lncRNA *TUG1*

Em uma primeira análise, utilizando a ferramenta disponibilizada gratuitamente na internet, miRcode (Jeggari *et al*. 2012), foram identificados 65 sítios de ligação para 47 diferentes miRNAs em *TUG1*.

Em seguida olhamos para as sequencias dos RNAs curtos (< 200 nt) que haviam sido imunoprecipitados com Anti-Ago2 ou IgG controle, derivados das mesmas amostras para as quais haviam sido feitos os sequenciamentos de RNAs longos. Entre estes RNAs curtos identificados, 19 eram miRNAs com sítios de ligação em *TUG1* previstos na análise *in silico*, e foram encontrados exclusivamente no RIP-Seq Anti-Ago2. Desta forma, inicialmente, o número de possíveis candidatos a serem testados foi diminuído para 19, o que representa cerca de um terço do total de miRNAs possíveis reguladores do *TUG1*.

Em seguida, utilizando critérios como conservação do(s) sítio(s) de ligação, número de sítios de ligação e estringência do *seed* (Tabela 3), foram selecionados cinco miRNAs para os ensaios iniciais de transfecção em células da linhagem celular HeLa, quatro deles encontrados no sequenciamento para RNAs curtos na imunoprecipitação com Anti-Ago2 (miR-22, miR-103, miR-148b e miR-194) e um quinto miRNA, o miR-1, não encontrado neste sequenciamento mas considerado um candidato importante com a consideração dos demais critérios.

			conservação	
miRNA	*seed type*	nº sítios	primatas	mamíferos
1a/b	7-mer-A1	2	78%/67%	70%/0%
22	7-mer-A1	1	67%	74%
103a/b	7-mer-A1	2	67%/22%	43%/13%
148b	7-mer-m8	1	100%	74%
194	7-mer-m8	2	78%/78%	35%/30%

Tabela 3. Valores dos critérios de seleção dos miRNAs escolhidos para ensaios de transfecção. São apresentados os parâmetros analisados nas predições *in silico*: o tipo de *seed* do miRNA em interação com o lncRNA *TUG1*, o número de sítios de ligação preditos e a conservação dos sítios de ligação para primatas e mamíferos. Para miRNAs com dois sítios, são mostrados os percentuais de conservação de cada um dos dois.

Outro aspecto considerado para a escolha destes miRNAs para os ensaios seguintes foi o fato dos sítios de ligação preditos estarem bastante dispersos ao longo dos transcritos de *TUG1* (Figura 5). Como ainda é muito restrita a literatura sobre interação de miRNAs e lncRNAs, não havia uma previsão sobre uma região do lncRNA alvo que eventualmente fosse gerar mais efeitos quando da ligação do miRNA como, por exemplo, mais próximo da extremidade 5' ou 3'. Por isso consideramos favorável a predição da ligação dos miRNAs ao longo de toda a sequencia do lncRNA *TUG1*.

Dentre os miRNAs escolhidos, três deles se destacaram por aparecerem em diversos artigos com atuação como supressores tumorais em difentes tipos de câncer.

O miR-1 é um miRNA com expressão bastante específica para tecido muscular e existem evidências que o apontam como supressor tumoral em câncer de tireóide (Leone *et al.* 2011), câncer de bexiga (Yoshino *et al.* 2011) e hepatocarcinoma (Li *et al.* 2012).

O miR-22 é um miRNA com expressão ubíqua e é apontado como supressor tumoral em câncer de estômago (Guo *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014) e câncer de pulmão (Ling *et al.* 2012).

Finalmente, o miR-194 é um miRNA que também apresenta expressão tecido-específica e abundância variável ao longo dos diversos tipos celulares humanos. O miR-194 é apontado como supressor tumoral em câncer de estômago (Song *et al.* 2012), carcinoma renal (Khella *et al.* 2013), carcinoma ductal pancreático (Zhang *et al.* 2013) e osteosarcoma (Han *et al.* 2014).

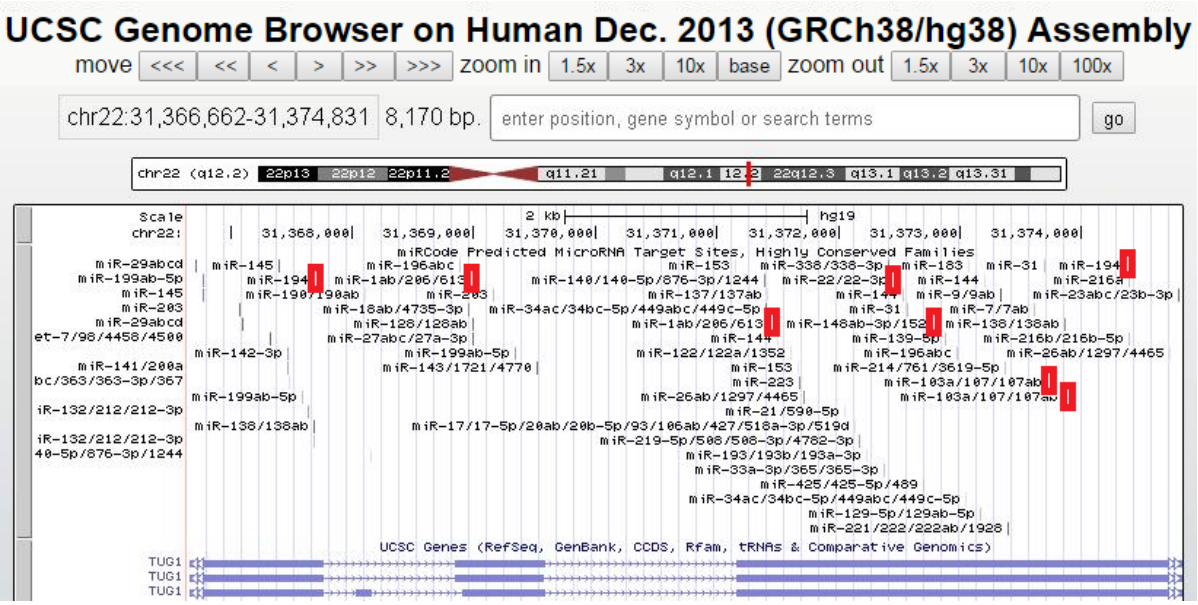

Figura 5. Distribuição dos sítios de ligação dos miRNAs selecionados ao longo dos transcritos de *TUG1*. São mostrados nas caixas vermelhas os oito sítios de ligação dos cinco diferentes miRNAs em *TUG1* (com suas isoformas representadas em azul na parte inferior da figura), de acordo com a predição *in silico*.

4.3 – Transfecção de células da linhagem HeLa com mímicos dos miRNAs selecionados

Uma vez selecionados os miRNAs que eram considerados os candidatos mais prováveis a reguladores do lncRNA *TUG1*, foram realizados ensaios de transfecção dos mímicos destes miRNAs em células da linhagem celular HeLa, visando sua superexpressão. Estas transfecções foram realizadas utilizando-se sempre concentrações finais de 7,5 µL/mL de lipofectamina RNAi MAX e 50 µM do respectivo mímico de miRNA por 24 horas. Como controle foi utilizado um inibidor do miR-1, um miRNA com expressão específica para tecido

muscular o qual não se espera que seja expresso em HeLa, e que portanto o inibidor de miR-1 não altere a expressão de quaisquer miRNAs ou outros genes para a linhagem utilizada.

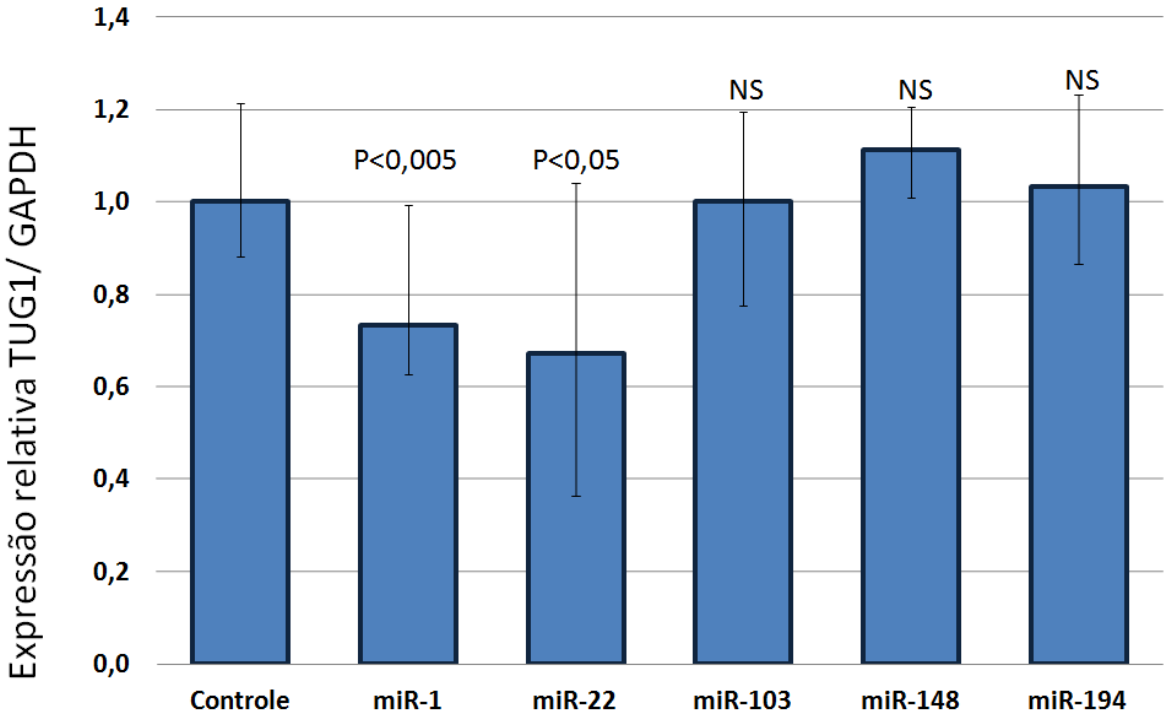

Figura 6. Nível de expressão relativo do lncRNA *TUG1* em células da linhagem celular HeLa após transfecções com mímicos de miRNAs. As barras azuis referem-se à expressão relativa do lncRNA *TUG1* para o controle e para amostras transfectadas com os mímicos de miRNAs: miR-1, miR-22, miR-103, miR-148b e miR-194, normalizadas pela expressão de GAPDH e referenciadas pelo controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para alterações significativas e a sigla NS para alterações não significativas.

Após os ensaios de transfecção verificou-se a diminuição dos níveis de expressão do lncRNA *TUG1* para os tratamentos com os miRNAs 1 e 22 (Figura 6). Para o miR-1 a redução média dos níveis do *TUG1* foi de 27 %, considerada significativa no teste t unicaudal de Student (teste t), com valor p = 0,0015. Para o miR-22 a redução média dos níveis de *TUG1* foi de 33 %, considerada significativa no teste t, com valor p = 0,0384. Estes resultados indicam, inicialmente, a possibilidade de que o *TUG1* seja regulado pelos miRNAs 1 e 22.

Os ensaios realizados com os demais miRNAs mantiveram inalterados ou aumentaram ligeiramente os níveis de expressão do *TUG1*. O tratamento com o miR-103 não resultou em alterações na expressão deste lncRNA, o tratamento com o miR-148b aumentou os níveis médios de *TUG1* em 11 % e o tratamento com o miR-194 aumentou os níveis médios de *TUG1* em 3 %. Os valores de p para os ensaios foram, respectivamente, de 0,1686, 0,1047 e 0,2606, indicando alterações não significativas.

Para confirmação da eficiência da transfecção dos miRNAs, foram medidos os níveis de expressão normais destes miRNAs na linhagem celular transfectada e comparados aos níveis encontrados nas amostras tratadas. O miR-1 apresentou aumento médio de 150.000 vezes para a amostra tratada em relação ao controle, um valor esperado uma vez que os níveis endógenos deste miRNA podem ser considerados virtualmente nulos para a linhagem celular HeLa. O miR-22 apresentou aumento médio de 100 vezes, um valor não muito pronunciado sendo, no entanto, esperado, uma vez que este miRNA é relativamente abundante nesta e em outras linhagens celulares. O miR-103 apresentou aumento médio de 370 vezes, o miR-148b de 970 vezes e o miR-194 de 310 vezes nas amostras tratadas em relação ao controle (Figura 7). Os valores p para as alterações dos níveis de expressão dos miRNAs transfectados são de, respectivamente, 0,0206, 0,0010, 0,0029, 0,0030 e 0,0003, todos significativos e indicando eficiência na transfecção e superexpressão dos miRNAs.

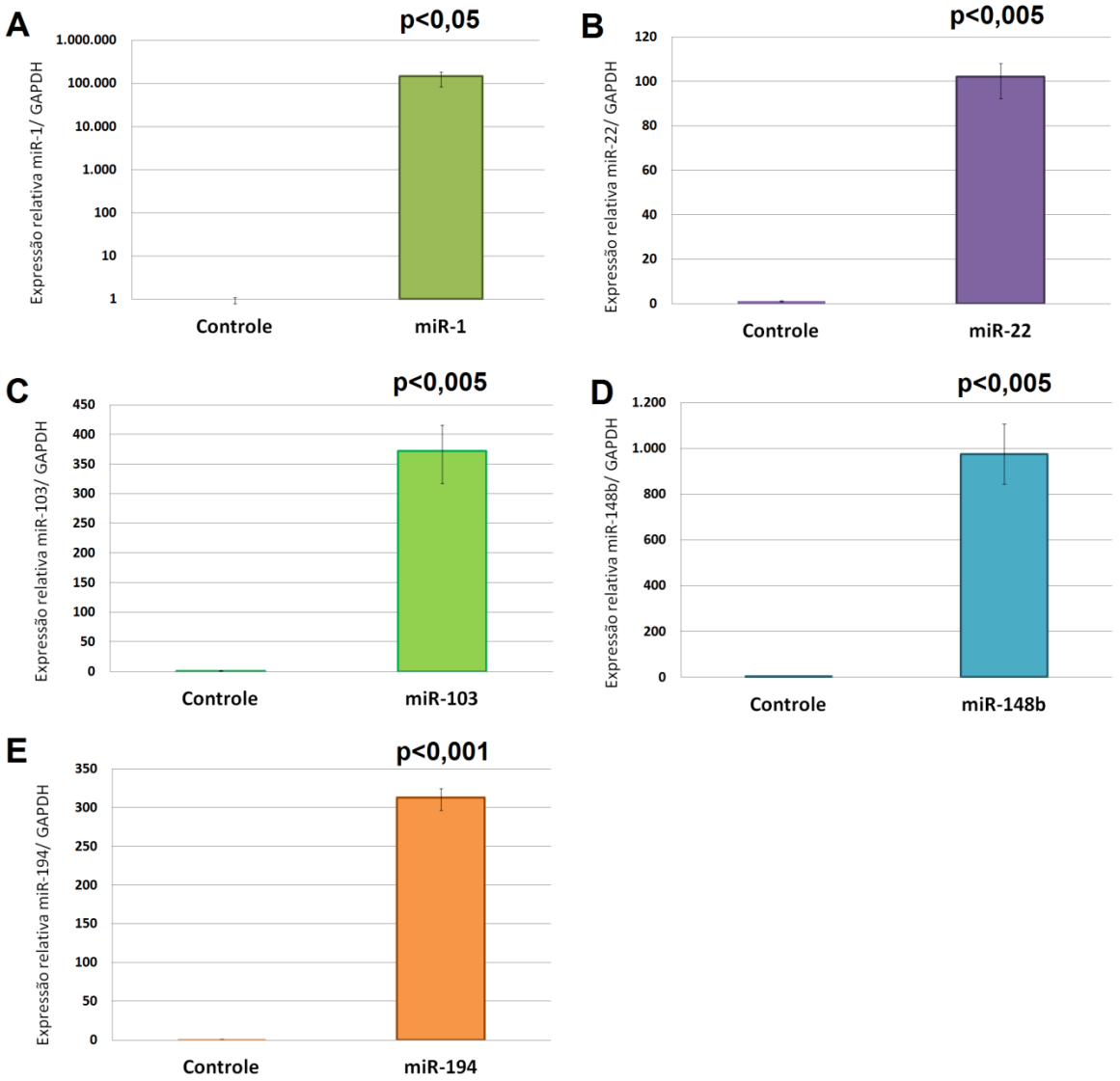

Figura 7. Nível de expressão relativo dos miRNAs nos controles e amostras transfectadas, em células da linhagem celular HeLa. São mostrados os níveis de expressão relativos nas amostras controle e amostras tratadas com os miRNAs: **(A)** miR-1, **(B)** miR-22, **(C)** miR-103, **(D)** miR-148b, **(E)** miR-194, em células da linhagem HeLa transfectadas com mímicos destes miRNA, referenciados pelo controle e normalizados pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos superiores e inferiores obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas.

4.4 – Busca pela conservação na regulação de *TUG1* por miRNAs em novas linhagens celulares

Constatada a possibilidade de regulação do *TUG1* pelos miRNAs 1 e 22 em células da linhagem HeLa, buscou-se a conservação da regulação deste lncRNA em outras linhagens celulares. Para isto, inicialmente foram cultivadas células de diversas linhagens originárias de vários tecidos e medidos os níveis de expressão de *TUG1* em cada tipo celular (Figura 8).

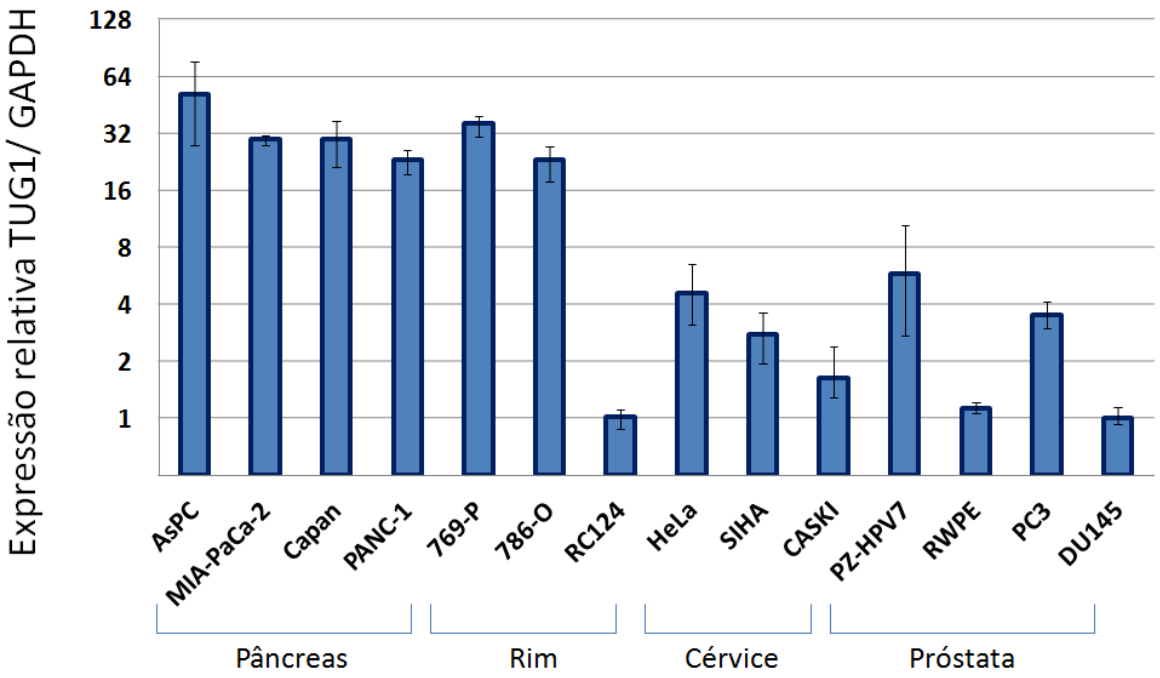

Figura 8. Nível de expressão relativo do lncRNA *TUG1* nas diversas linhagens celulares cultivadas. As barras referem-se à expressão relativa do lncRNA *TUG1* para várias linhagens celulares oriundas de diversos tecidos, normalizada pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos.

Verificou-se que o gene não codificador de proteínas *TUG1* apresenta nível de expressão bastante variado entre as linhagens celulares estudadas podendo variar até cerca de 32 vezes dentro de tipos celulares com mesma origem biológica ou origens biológicas diversas. As linhagens celulares de pâncreas apresentaram os mais altos níveis relativos de *TUG1*, o que pode significar um papel importante deste lncRNA na fisiologia celular destas. Por outro lado, as linhagens de cérvice e próstata apresentaram os níveis mais baixos deste RNA.

Novos ensaios foram então realizados para verificar os níveis de expressão dos miR-22 e 194 (Figuras 9 e 11), além do miR-103 (Figura 10), um miRNA que, apesar de não encontrado nas transfecções iniciais como possível regulador de *TUG1*, foi verificado como

sendo altamente enriquecido em diversos RIP-Seq realizados com anticorpos Anti-Ago2 (Vlachos *et al.* 2014).

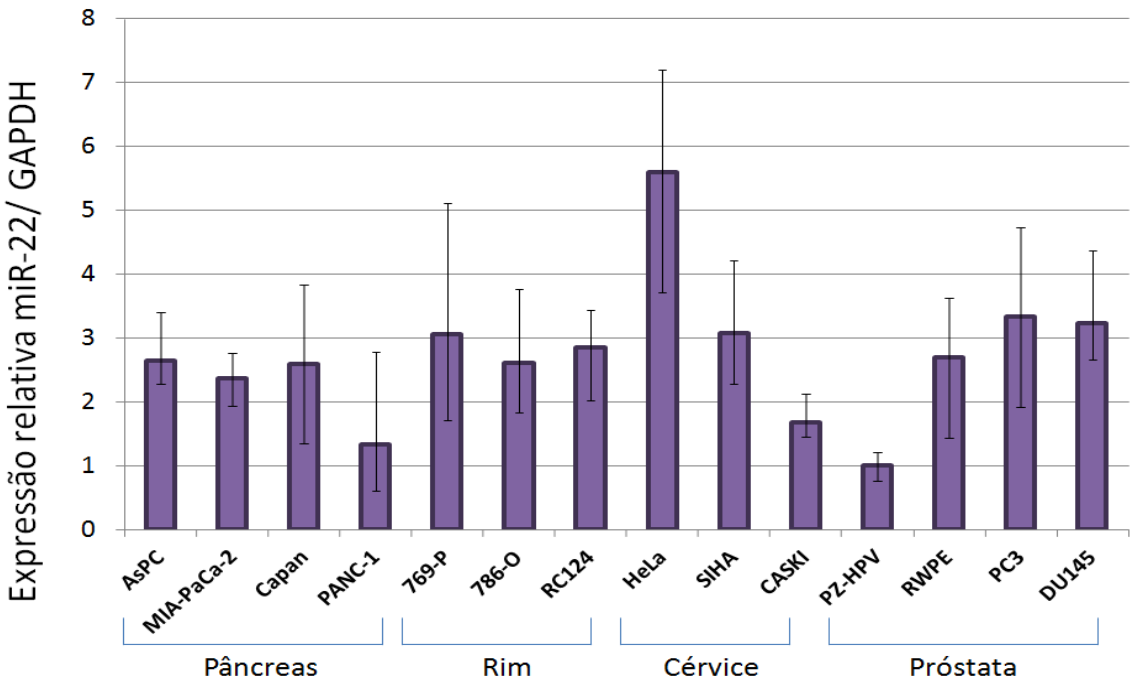

Figura 9. Nível de expressão relativo do miRNA 22 nas diversas linhagens celulares cultivadas. As barras referem-se à expressão relativa do miR-22 para várias linhagens celulares oriundas de diversos tecidos, normalizada pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos.

O miR-22 apresentou níveis altos nas linhagens celulares estudadas (Figura 9). Os níveis relativos podem ser considerados bastante uniformes variando, em média, não mais do que seis vezes entra a linhagem com o menor nível de expressão e a linhagem com o maior nível. Não foi verificado nenhum padrão invertido muito pronunciado quando comparando as expressões relativas do *TUG1* e do miR-22, entretanto, a linhagem HeLa, que apresenta níveis de *TUG1* baixos em comparação às outras linhagens, apresentou o mais alto nível de miR-22, o que poderia ser considerada uma evidência favorável a uma regulação por este miRNA. Linhagens com altos níveis de *TUG1* como as originárias de pâncreas, por outro lado, apresentaram níveis bem mais baixos do miR-22 que os de HeLa.

O miR-103, por sua vez, apresentou níveis absolutos mais baixos que os do miR-22 nas linhagens celulares estudadas (Figura 10). Os níveis de expressão relativos se mostraram ainda mais uniformes do que os deste último miRNA. As células da linhagem celular Capan apresentaram os níveis mais altos contrastando com as demais linhagens celulares de pâncreas com níveis médios de 4 a 9 vezes mais baixos.

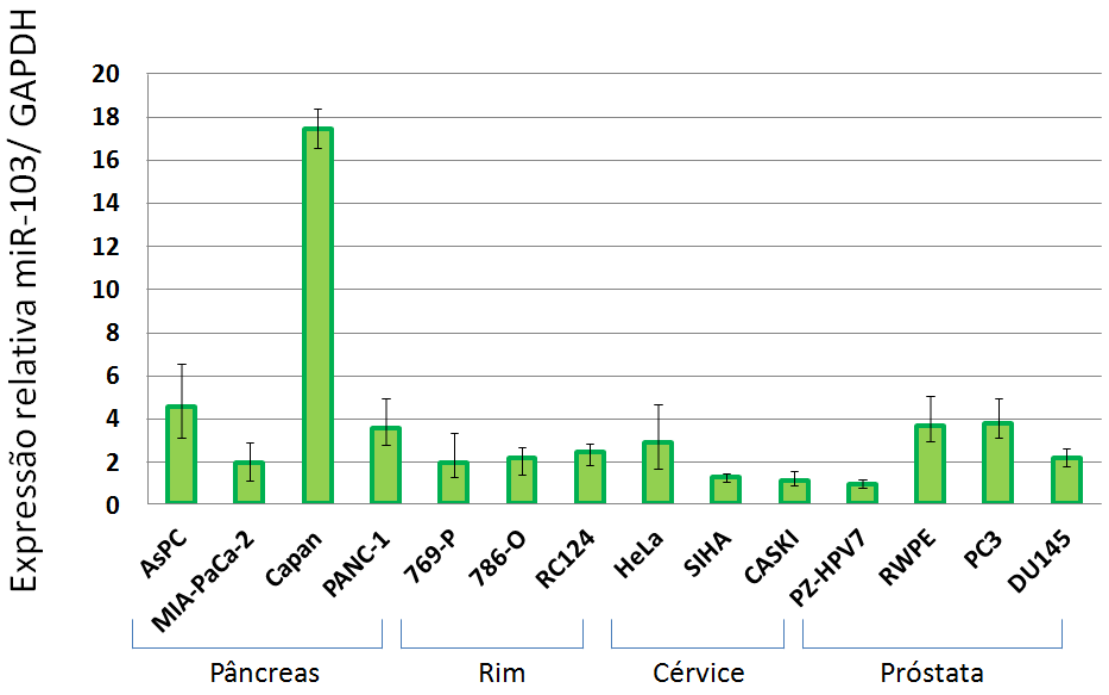

Figura 10. Nível de expressão relativo do miRNA 103 nas diversas linhagens celulares cultivadas. As barras referem-se à expressão relativa do miR-103 para várias linhagens celulares oriundas de diversos tecidos, normalizada pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos.

O miR-194 apresentou os níveis de expressão relativos menos uniformes dentre os miRNAs estudados (Figura 11). As linhagens celulares apresentaram, em sua maioria, níveis relativos variados, porém baixos. As linhagens originárias de pâncreas AsPC e Capan apresentaram os níveis relativos mais altos deste miRNA. Por outro lado, as linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1 apresentaram níveis muito baixos de miR, num padrão de expressão invertido em relação ao de *TUG1*.

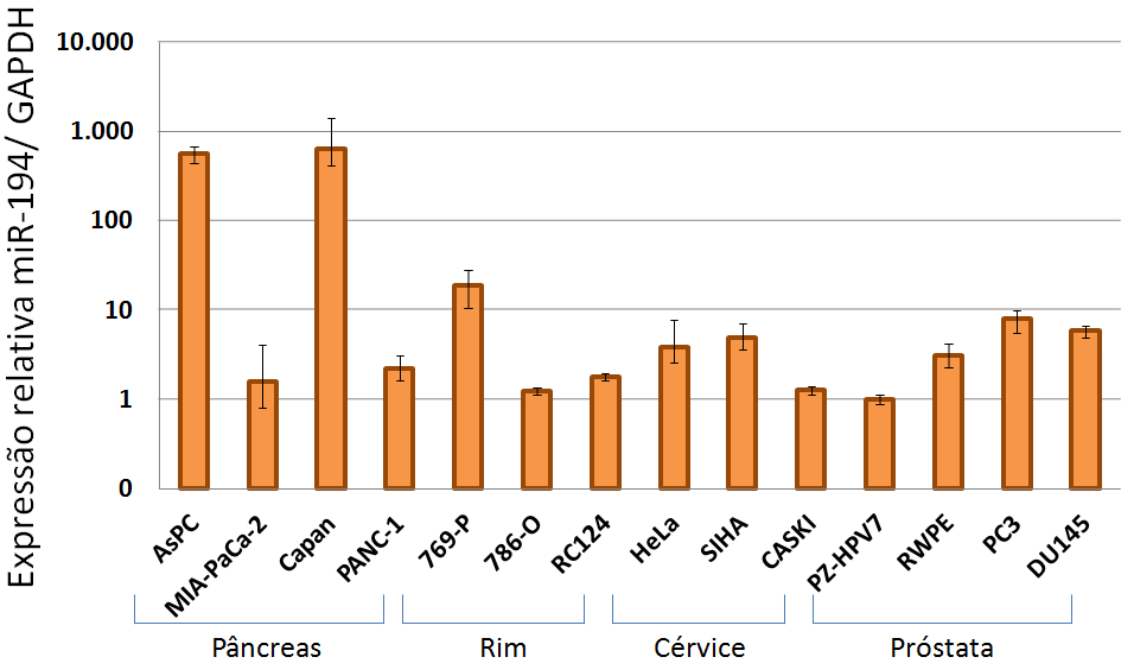

Figura 11. Nível de expressão relativo do miRNA 194 nas diversas linhagens celulares cultivadas. As barras referem-se à expressão relativa do miR-194 para várias linhagens celulares oriundas de diversos tecidos, normalizada pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos.

Em resumo, as linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1 se mostraram as mais promissoras, como ilustrado na Figura 12 abaixo. Considerando os altos níveis relativos de *TUG1* nestas linhagens de pâncreas e os baixos níveis relativos dos miRNAs 22 e 194, representando um padrão de expressão invertido e, portanto, esperado numa situação de regulação entre as diferentes espécies de RNAs, decidiu-se prosseguir com ensaios de transfecção destes miRNAs nestas linhagens celulares.

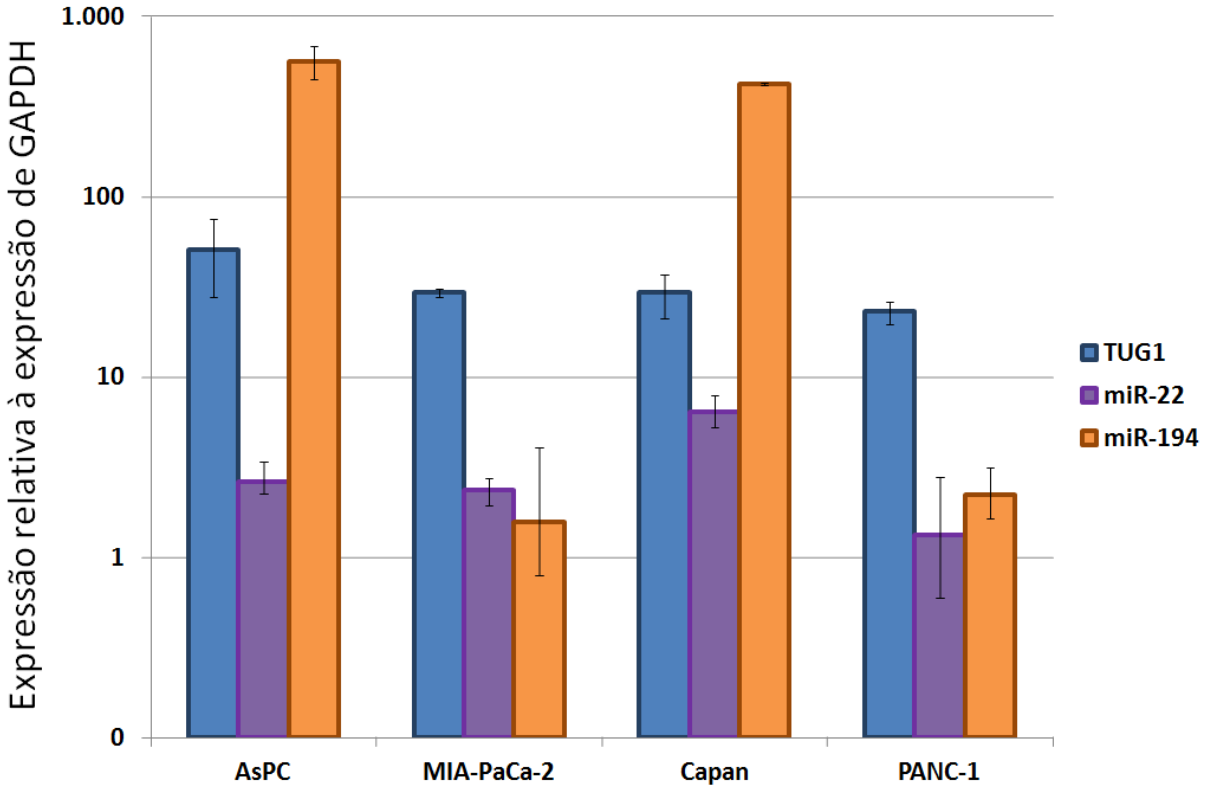

Figura 12. Nível de expressão relativo do *TUG1*, miR-22 e miR-194 nas linhagens celulares MIA-PaCa-2 e PANC-1, comparados com as outras duas linhagens de tumor de pâncreas. As barras azuis, roxas e laranja referem-se à expressão relativa do lncRNA *TUG1*, do miR-22 e miR-194 para as linhagens celulares AsPC, MIA-PaCa-2, Capan e PANC-1. A expressão dos genes foi normalizada pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos.

4.5 – Transfecções de células das linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1 com mímicos dos miRNAs 22 e 194

Escolhidas as linhagens celulares e os miRNAs candidatos para novas buscas de regulação do lncRNA *TUG1*, foram realizados novos ensaios de transfecção. Os ensaios foram realizados utilizando-se as mesmas concentrações de lipofectamina e de mímicos dos miRNAs que as utilizadas para HeLa sendo o tempo de tratamento, entretanto, aumentado de 24 para 72 horas.

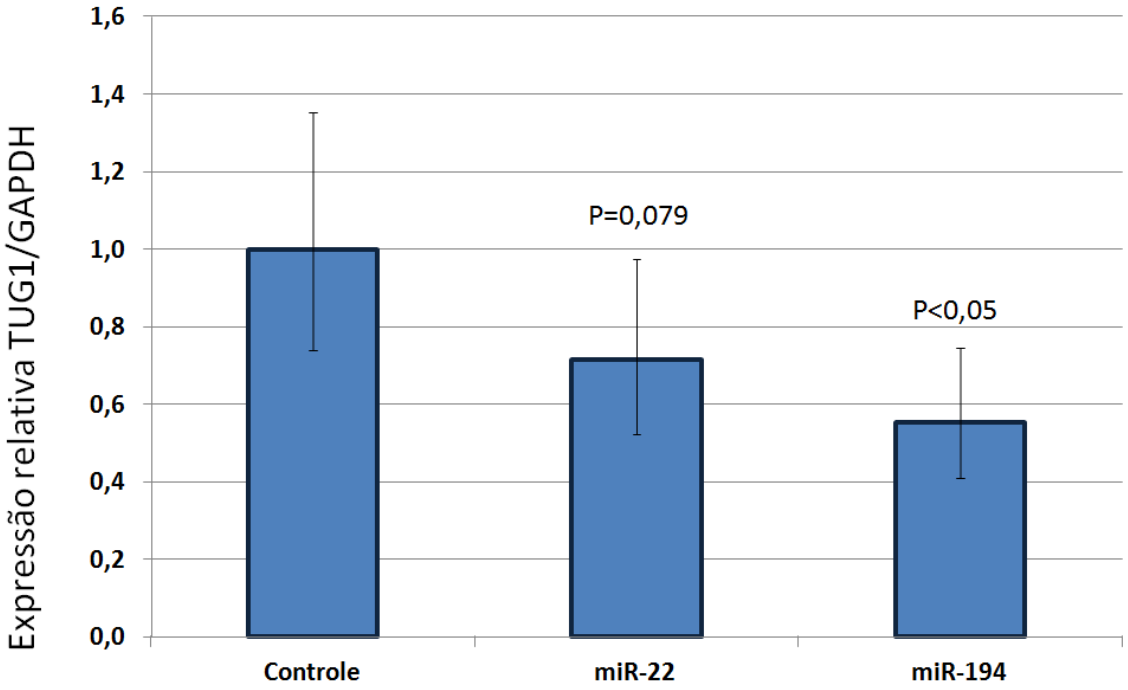

Figura 13. Nível de expressão relativo do lncRNA *TUG1* em células da linhagem celular MIA-PaCa-2 após transfecções com mímicos dos miRNAs 22 e 194. As barras referem-se à expressão relativa do lncRNA *TUG1* para o controle e transfecção dos miRNAs 22 e 194, nas amostras tratadas em relação ao controle, normalizada pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações nos níveis de expressão.

Para as células da linhagem MIA-PaCa-2 houve diminuição nos níveis de expressão de *TUG1* apenas para a transfecção com o miR-194 (Figura 13). Para o miR-22 houve uma tendência de redução nos níveis médios do lncRNA de 26 % com um valor p = 0,0787 para o teste t, sendo uma variação não significativa. Para o miR-194 a redução nos níveis médios do *TUG1* foi de 45 % com valor p = 0,0166 para teste t, sendo uma alteração significativa.

Para confirmação da eficiência da transfecção dos miRNAs foram medidos os níveis de expressão destes na linhagem celular nas amostras controle e comparados aos níveis de expressão nas amostras tratadas (Figura 14). O miR-22 apresentou aumento médio aproximado de 300 vezes e o miR-194 de 1.300 vezes com valores p respectivos de 0,0156 e 0,0006 para teste t, sendo alterações significativas, e confirmando a eficiência da transfecção.

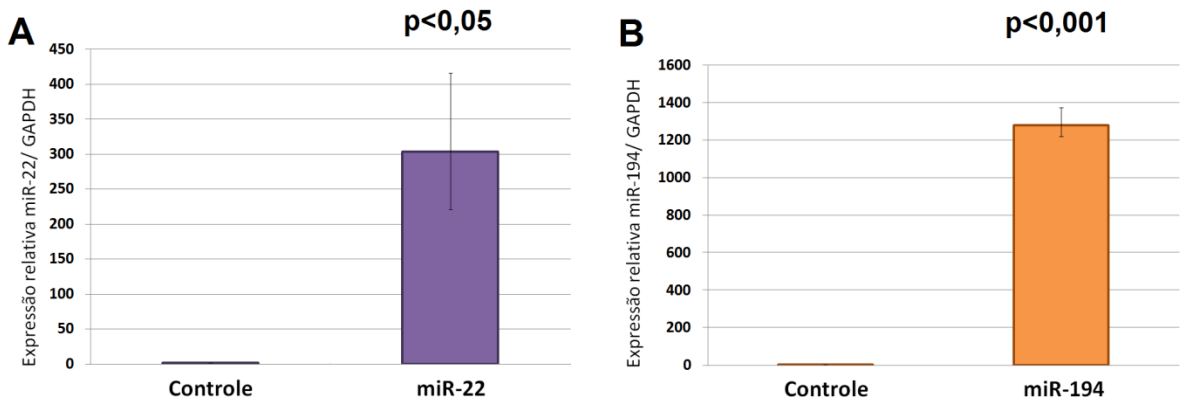

Figura 14. Nível de expressão relativo dos miRNAs transfectados em células da linhagem celular MIA-PaCa-2. (A) Nível de expressão do miR-22, em células da linhagem celular MIA-PaCa-2 transfectadas com mímicos deste miRNA, em relação ao controle e normalizado pela expressão de GAPDH. **(B)** Nível de expressão do miR-194, em células da linhagem celular MIA-PaCa-2 transfectadas com mímicos deste miRNA, em relação ao controle e normalizado pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos superiores e inferiores obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas.

Para as células da linhagem PANC-1 foi verificada a diminuição nos níveis de expressão de *TUG1* para as transfecções com ambos os miRNAs utilizados (Figura 15). Para o miR-22 a redução nos níveis médios do lncRNA foi de 32 % com valor p = 0,0196 para teste t, sendo uma alteração significativa. Para o miR-194 a redução nos níveis médios do *TUG1* foi de 46 % com valor p de 0,0379 para teste t, sendo também uma alteração significativa.

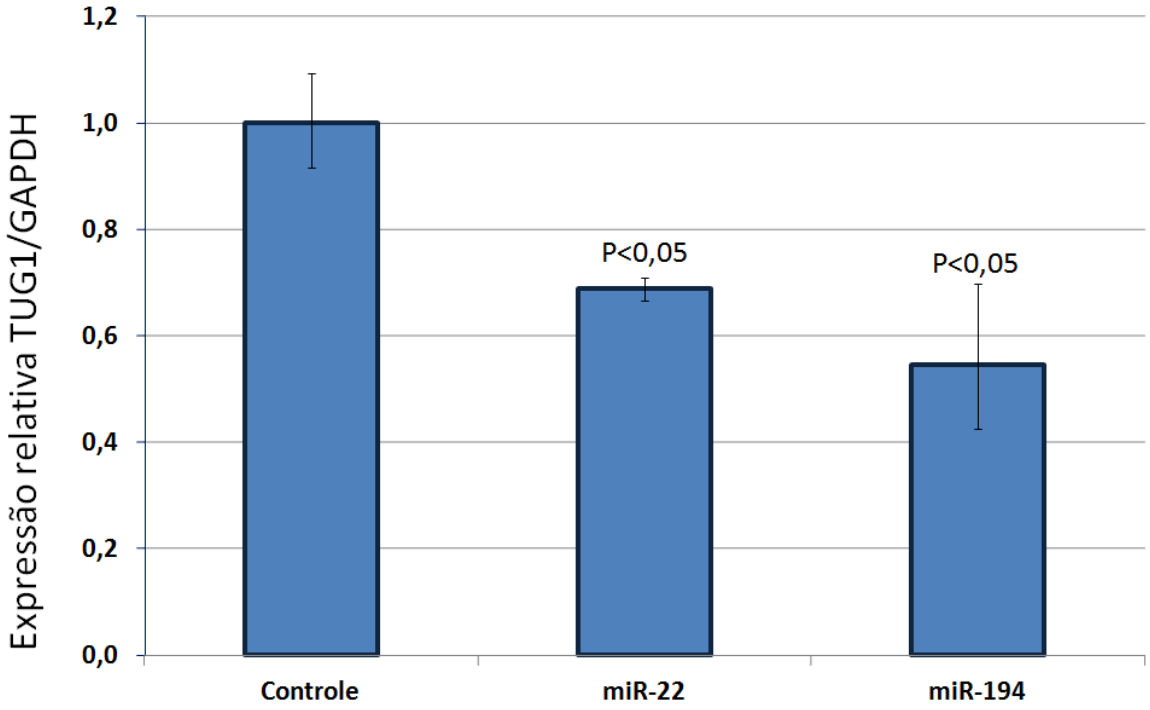

Figura 15. Nível de expressão relativo do lncRNA *TUG1* em células da linhagem celular PANC-1 após transfecções com mímicos dos miRNAs 22 e 194. As barras referem-se à expressão relativa do lncRNA *TUG1* para o controle e transfecção dos miRNAs 22 e 194, nas amostras tratadas em relação ao controle, normalizada pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas nos níveis de expressão.

Para confirmação da eficiência da transfecção dos miRNAs, foram medidos os níveis de expressão destes nas amostras controle e comparados aos níveis de expressão nas amostras tratadas (Figura 16). O miR-22 apresentou aumento médio aproximado de 200 vezes e o miR-194 de 1.300 vezes com p valores respectivos de 0,0002 e 0,0126 para teste t de Student, sendo alterações significativas, e confirmando a eficiência da transfecção.

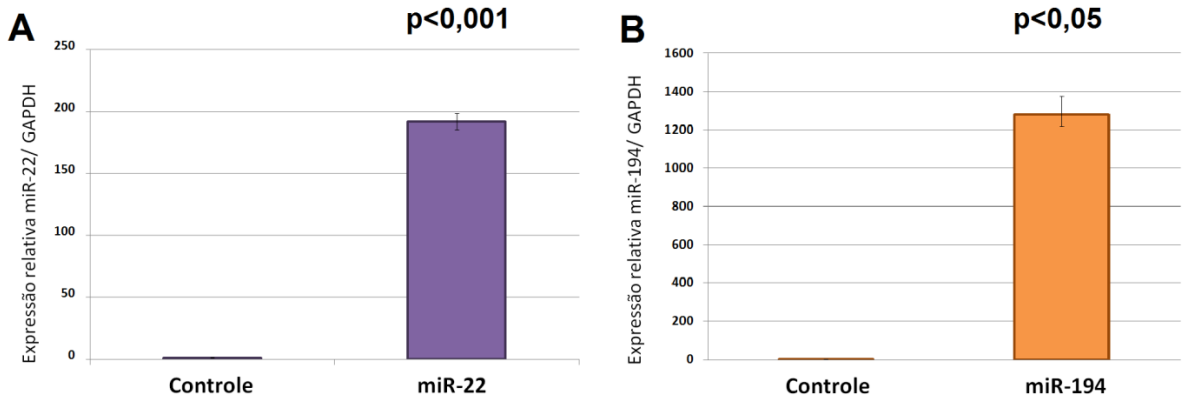

Figura 16. Nível de expressão relativo dos miRNAs transfectados em células da linhagem celular PANC-1. (A) Nível de expressão do miR-22, em células da linhagem celular PANC-1 transfectadas com mímicos deste miRNA, em relação ao controle e normalizado pela expressão de GAPDH. **(B)** Nível de expressão do miR-194, em células da linhagem celular PANC-1 transfectadas com mímicos deste miRNA, em relação ao controle e normalizado pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos superiores e inferiores obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas.

Levados em conjunto, estes resultados indicam a possibilidade de regulação do lncRNA *TUG1* pelo miR-194 para a linhagem celular MIA-PaCa-2 e pelos miR-22 e miR-194 para a linhagem celular PANC-1 e demonstram uma possível conservação da regulação observada para a linhagem celular HeLa.

4.6 – Simulação da interação entre os miRNAs transfectados e o lncRNA *TUG1*

Com o intuito de verificar a interação prevista entre os miRNAs transfectados que apresentaram potencial de reguladores de *TUG1* e os sítios de ligação preditos pela ferramenta disponível pelo miRcode, simulamos as interações entre os miRNAs e o lncRNA através da ferramenta RNAhybrid 2.1.2 (Rehmsmeier *et al.* 2004). O RNAhybrid é um programa gratuito, disponível na internet que deve ser alimentado com a sequência de um miRNA e de um alvo suposto, apresentando a predição da variação de energia livre das interações e fornecendo então as possíveis estruturas resultantes da ligação entre ambos (Figuras 17 e 18).

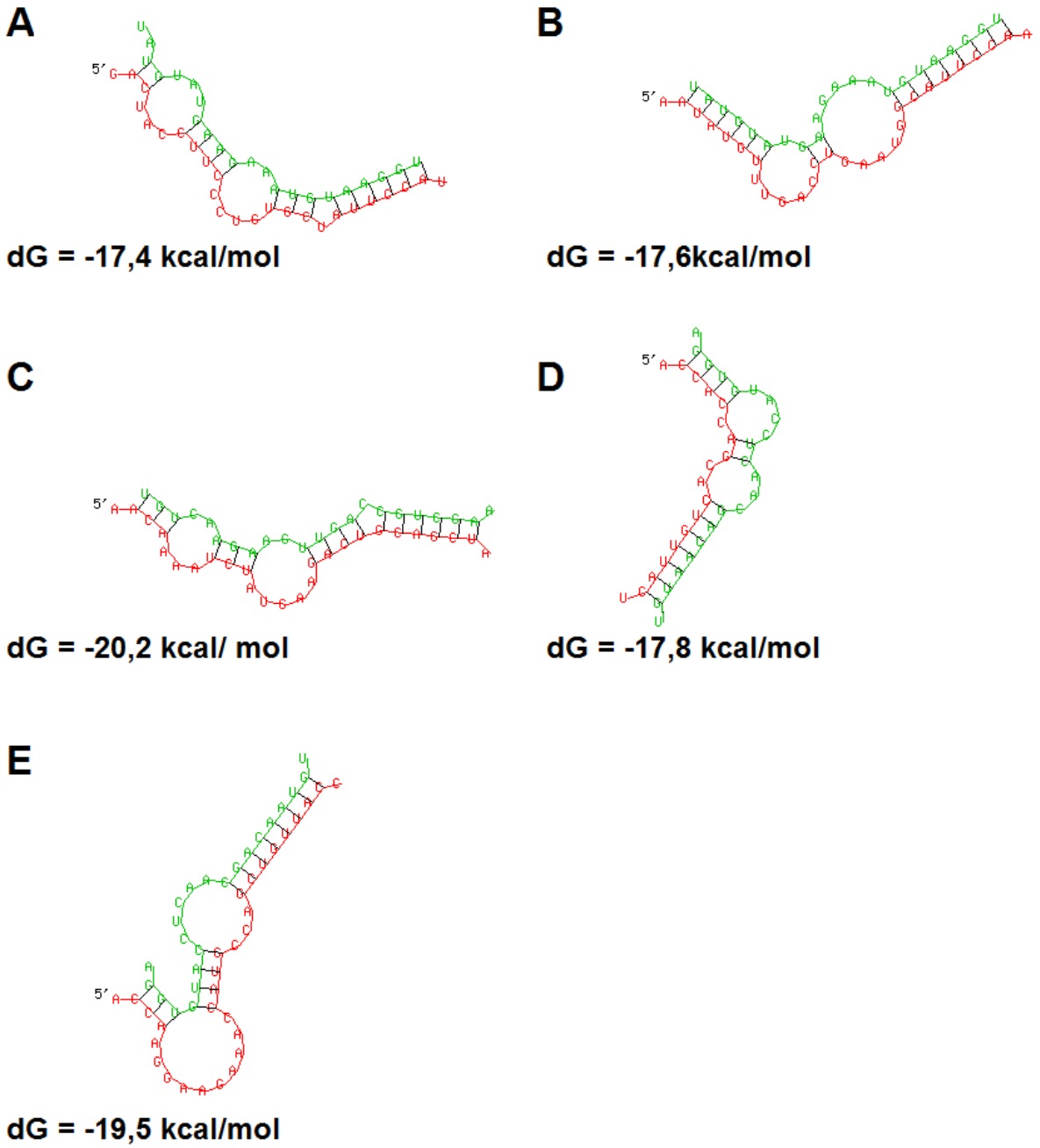

Figura 17. Estrutura prevista na simulação da interação entre miRNAs e *TUG1* e variação de energia livre de ligação. (A) Simulação da interação entre miR-1 e sítio de ligação 1 em *TUG1* para este miRNA. **(B)** Simulação da interação entre miR-1 e sítio de ligação 2 em *TUG1* para este miRNA. **(C)** Simulação da interação entre miR-22 e seu sítio de ligação em *TUG1*. **(D)** Simulação da interação entre miR-194 e sítio de ligação 1 em *TUG1* para este miRNA. **(E)** Simulação da interação entre miR-194 e sítio de ligação 2 em *TUG1* para este miRNA.

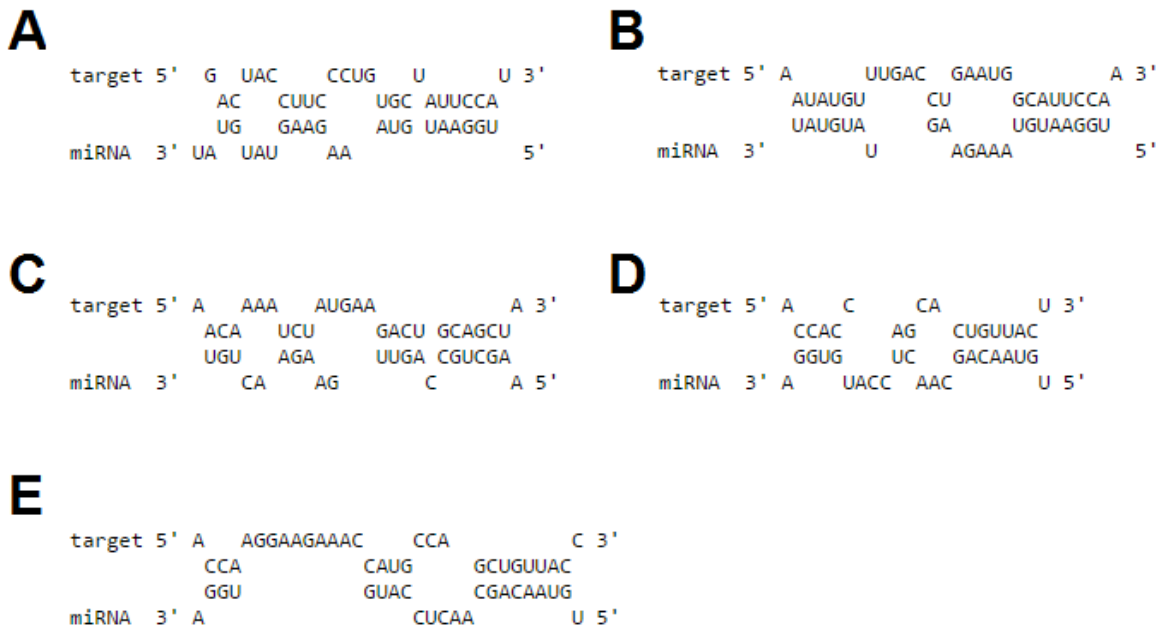

Figura 18. Pareamento de bases previsto na simulação da interação entre miRNAs e *TUG1*. (A) Simulação da interação entre miR-1 e sítio de ligação 1 em *TUG1* para este miRNA. **(B)** Simulação da interação entre miR-1 e sítio de ligação 2 em *TUG1* para este miRNA. **(C)** Simulação da interação entre miR-22 e seu sítio de ligação em *TUG1*. **(D)** Simulação da interação entre miR-194 e sítio de ligação 1 em *TUG1* para este mIRNA. **(E)** Simulação da interação entre miR-194 e sítio de ligação 2 em *TUG1* para este miRNA.

Conforme verificado, as interações entre os miRNAs e os respectivos sítios de ligação apresentam complementaridade parcial ao longo da extensão total do miRNA e a região correspondente no *TUG1* sendo, porém, estringente na região da *seed* e com variação de energia de livre de interação altamente negativa. Tais constatações foram interpretadas como evidências favoráveis da interação entre os miRs e o lncRNA e, por conseguinte, consistentes com a possibilidade de regulação do *TUG1* pelos miRNAs.

4.7 – Verificação do enriquecimento de *TUG1* ligado a proteínas Ago2 de células das linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1

Apesar de já termos medido o enriquecimento de *TUG1* ligado a proteína Ago2, constituinte do complexo miRISC, em células da linhagem celular HeLa, não haviam ainda

evidências diretas do enriquecimento deste lncRNA ligado à proteína Ago2 para as demais linhagens celulares onde verificamos a possibilidade de regulação de *TUG1* por miRNAs.

Para avaliar a capacidade de interação do *TUG1* com o complexo miRISC, realizamos ensaios de imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos seguidos de PCR quantitativo em tempo real (RIP-qPCR) de extratos celulares das linhagens MIA-PaCa-2 (Figura 19) e PANC-1 (Figura 20) e comparamos o enriquecimento de *TUG1* nas amostras imunoprecipitadas com anticorpo Anti-Ago2 em relação às amostras imunoprecipitadas com anticorpo inespecífico IgG.

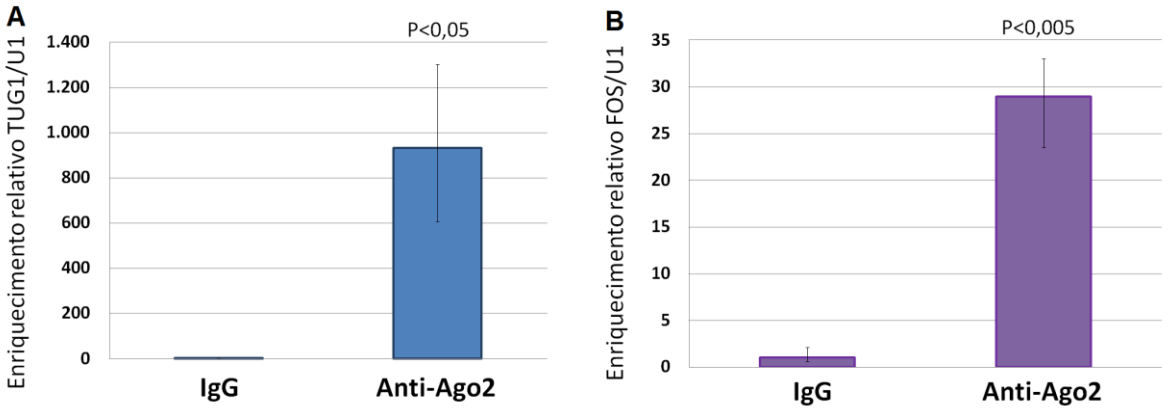

Figura 19. Enriquecimento de *TUG1* e FOS ligados a proteínas Ago2 em relação a IgG para a linhagem celular MIA-PaCa-2. (A) Enriquecimento relativo do lncRNA *TUG1* ligado a proteínas Ago2 em relação a IgG e normalizado pela presença de U1. **(B)** Enriquecimento relativo do mRNA FOS ligado a proteínas Ago2 em relação a IgG e normalizado pela presença de U1. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos superiores e inferiores obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas.

Para a linhagem celular MIA-PaCa-2 constatou-se enriquecimento relativo médio de 930 vezes do lncRNA *TUG1* ligado à proteína Ago2 em relação ao controle. O controle positivo utilizado, o mRNA FOS, sabidamente ligado à proteína Ago2, mostrou-se enriquecido em média 30 vezes. Os valores p para teste t dos enriquecimentos verificados foram, respectivamente, de 0,0199 e 0,0046, sendo enriquecimentos significativos.

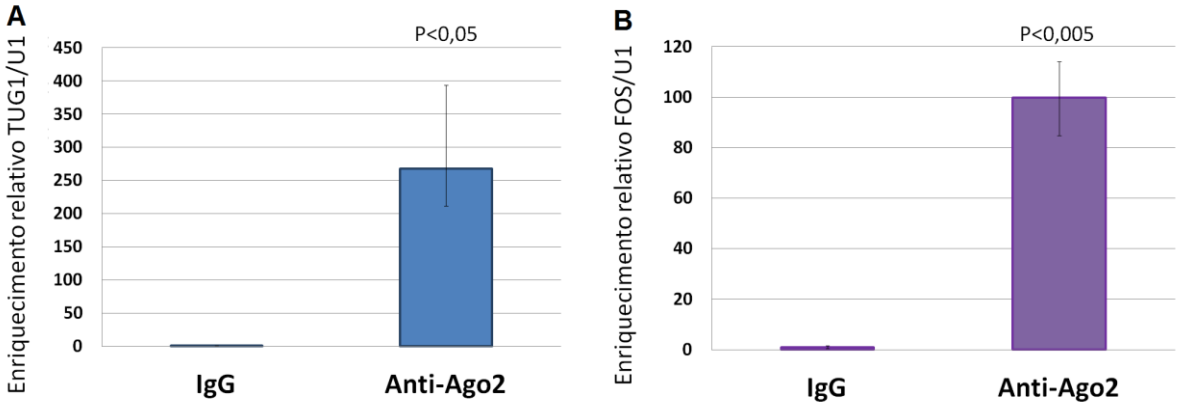

Figura 20. Enriquecimento de *TUG1* e FOS ligados a proteínas Ago2 em relação a IgG para a linhagem celular PANC-1. (A) Enriquecimento relativo do lncRNA *TUG1* ligado a proteínas Ago2 em relação a IgG e normalizado pela presença de U1. **(B)** Enriquecimento relativo do mRNA FOS ligado a proteínas Ago2 em relação a IgG e normalizado pela presença de U1. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos superiores e inferiores obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas.

Para a linhagem celular PANC-1 constatou-se enriquecimento relativo médio de 270 vezes do lncRNA *TUG1* ligado à proteína Ago2 em relação ao controle. O controle positivo utilizado, o mRNA FOS, sabidamente ligado à proteína Ago2, mostrou-se enriquecido em média 100 vezes. Os valores p para os enriquecimentos verificados foram, respectivamente, de 0,0205 e 0,0038, sendo ambos os enriquecimentos significativos.

Os resultados obtidos mostram a presença do lncRNA *TUG1* ligado à proteína Ago2, proteína essencial para o silenciamento induzido por miRNA, em células das linhagens celulares MIA-PaCa-2 e PANC-1, corroborando para a hipótese de regulação deste ncRNA por miRNAs, em especial os miR-22 e miR-194, em ambas as linhagens celulares.

4.8 –Transfecções de inibidores dos miRNAs nas linhagens celulares HeLa, MIA-PaCa-2 e PANC-1

Para verificar se a regulação do *TUG1* por miRNAs é um mecanismo fisiológico importante nas linhagens celulares estudadas, foram realizadas transfecções de inibidores do

miR-22 para as linhagens HeLa, MIA-PaCa-2 e PANC-1 e transfecções de inibidores do miR-194 para as linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1, com o intuito de silenciar estes miRNAs nos respectivos tipos celulares tratados. Os padrões de concentração e duração do tratamento foram os mesmos que os utilizados para as transfecções do item 4.3.

Para os ensaios realizados com a linhagem celular HeLa, a transfecção de anti-miR-22 diminuiu os níveis deste miR 82 %, em média, uma alteração significativa, com valor-p = 0,0055 para teste t. Os níveis do *TUG1*, entretanto, tiveram uma tendência de aumento médio de apenas 21 %, não significativa (valor p = 0,1046 para teste t) (Figura 21).

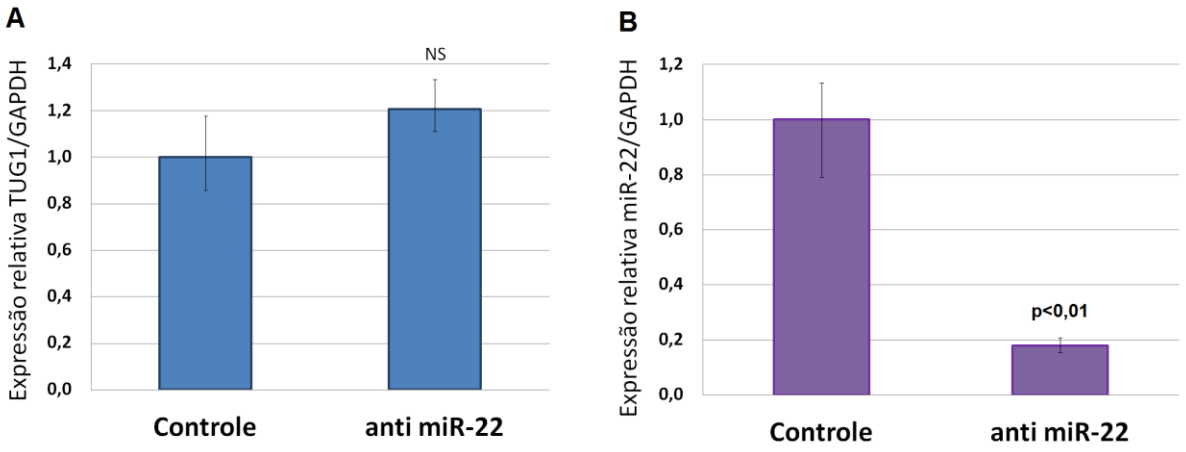

Figura 21. Nível de expressão *TUG1* e miR-22 para transfecções com anti-miR-22 em células da linhagem HeLa. (A) Nível de expressão relativo do *TUG1* para o controle e transfecção do anti-miR-22 na amostra tratada em relação ao controle. **(B)** Nível de expressão relativo do miR-22 para o controle e transfecção com anti-miR-22 na amostra tratada em relação ao controle. Ambas as amostras foram normalizadas pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações nos níveis de expressão.

Para os ensaios realizados com a linhagem celular MIA-PaCa-2, a transfecção com anti-miR-22 diminuiu os níveis deste miR 86 %, em média, enquanto a transfecção com anti-miR-194 diminuiu os níveis deste miR em 72 %, em média. Ambas as alterações foram significativas, com valores p de 0,0007 e 0,0006 para teste t. Os níveis médios do *TUG1*

apresentaram tendência de redução de apenas 10 e 15 %, respectivamente, sendo variações não significativas (valor p = 0,1570 e 0,0927 para teste t) (Figura 22).

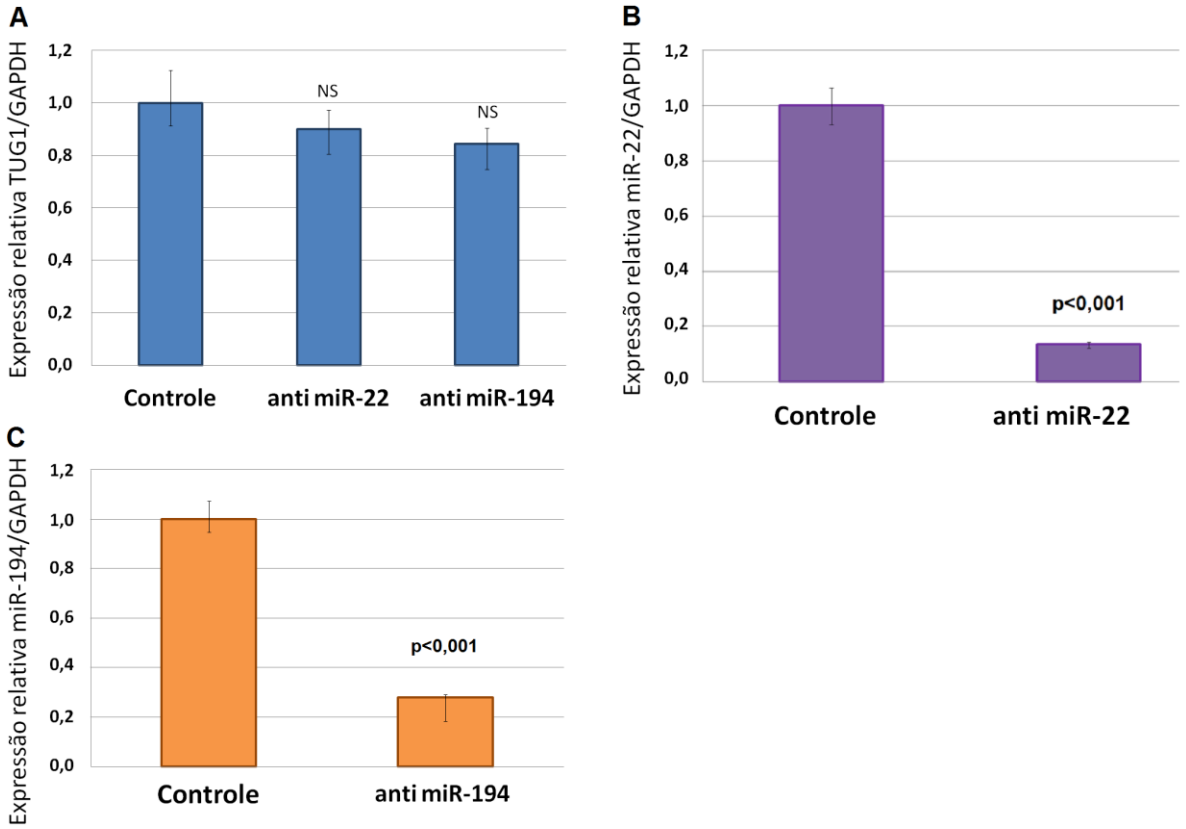

Figura 22. Nível de expressão *TUG1*, miR-22 e miR-194 para transfecções com anti-miR-22 e anti-miR-194 em células da linhagem MIA-PaCa-2. (A) Nível de expressão relativo do *TUG1* para o controle e transfecção dos anti-miR-22 e 194 na amostra tratada em relação ao controle. **(B)** Nível de expressão relativo do miR-22 para o controle e transfecção com anti-miR-22 na amostra tratada em relação ao controle. **(C)** Nível de expressão relativo do miR-194 para o controle e transfecção com anti-miR-194 na amostra tratada em relação ao controle. Todas as amostras foram normalizadas pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para alterações significativas e a sigla NS para alterações não significativas.

Nos ensaios realizados com a linhagem celular PANC-1, a transfecção com anti-miR-22 diminuiu os níveis deste miR 85 %, em média, enquanto a transfecção com anti-miR-194 diminuiu os níveis deste miR em 59 %, em média. Ambas as alterações foram significativas, com valores p de 0,0140 e 0,0360 para teste t. Os níveis médios do *TUG1* apresentaram uma

tendência de aumento de 16 e 9 %, respectivamente, sendo variações não significativas (valor p = 0,0847 e 0,2435 para teste t) (Figura 23).

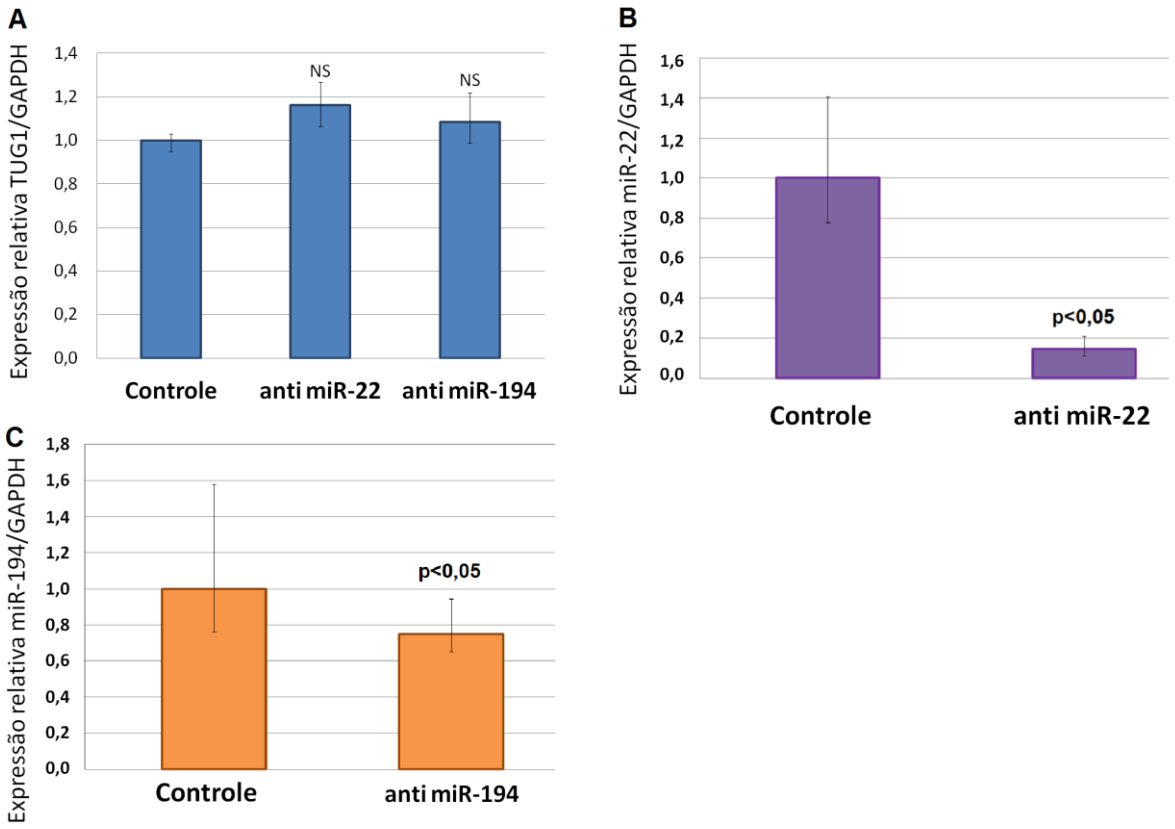

Figura 23. Nível de expressão *TUG1*, miR-22 e miR-194 para transfecções com anti-miR-22 e anti-miR-194 em células da linhagem PANC-1. (A) Nível de expressão relativo do *TUG1* para o controle e transfecção dos anti-miR-22 e 194 na amostra tratada em relação ao controle. **(B)** Nível de expressão relativo do miR-22 para o controle e transfecção com anti-miR-22 na amostra tratada em relação ao controle. **(C)** Nível de expressão relativo do miR-194 para o controle e transfecção com anti-miR-194 na amostra tratada em relação ao controle. Todas as amostras foram normalizadas pela expressão de GAPDH Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para alterações significativas e a sigla NS para alterações não significativas.

Apesar dos resultados apontarem para uma possível regulação direta do *TUG1* pelo aumento dos miRNAs, uma diminuição dos miRNAs a partir de sua concentração fisiológica não afeta os níveis do *TUG1*, havendo apenas a tendência de um pequeno aumento não significativo do *TUG1* em algumas das situações de diminuição dos níveis dos miRNAs possíveis reguladores deste lncRNA. Os resultados parecem demonstrar que os níveis

fisiológicos de *TUG1* não dependem da regulação especificamente por este conjunto de miRNAs, uma vez que o efeito sobre os níveis de *TUG1* causado pela redução nos níveis dos miRNAs pelo silenciamento é bem menos marcante que o efeito sobre o *TUG1* causado pela superexpressão desses miRNAs.

4.9 –Indução de dano ao DNA e medida dos níveis de *TUG1* e dos miRNAs candidatos nas linhagens celulares trabalhadas

Como uma segunda maneira de avaliar a relevância fisiológica da possível regulação do *TUG1* por miRNAs, as linhagens celulares foram submetidas à tratamento com Doxorrubicina 1,5 μL/mL por 24 horas. A Doxorrubicina é uma droga que causa dano ao DNA o que deveria resultar no aumento de expressão de *TUG1* por consequência do aumento de expressão de seu fator de transcrição, a proteína p53 (Zhang *et al.* 2014).

Para o tratamento em células da linhagem HeLa verificou-se um pequeno aumento médio de 11 % na expressão relativa de *TUG1* (valor p = 0,0396) (Figura 24). No entanto, a expressão do miR-22 mostrou-se virtualmente inalterada, com tendência a redução média de apenas 1,5 % não significativa (valor p = 0,3942), o que poderia ser considerado como evidência contrária a um papel fisiológico importante desta regulação não fosse, no entanto, a pequena modificação da expressão de *TUG1* causada pelo tratamento.

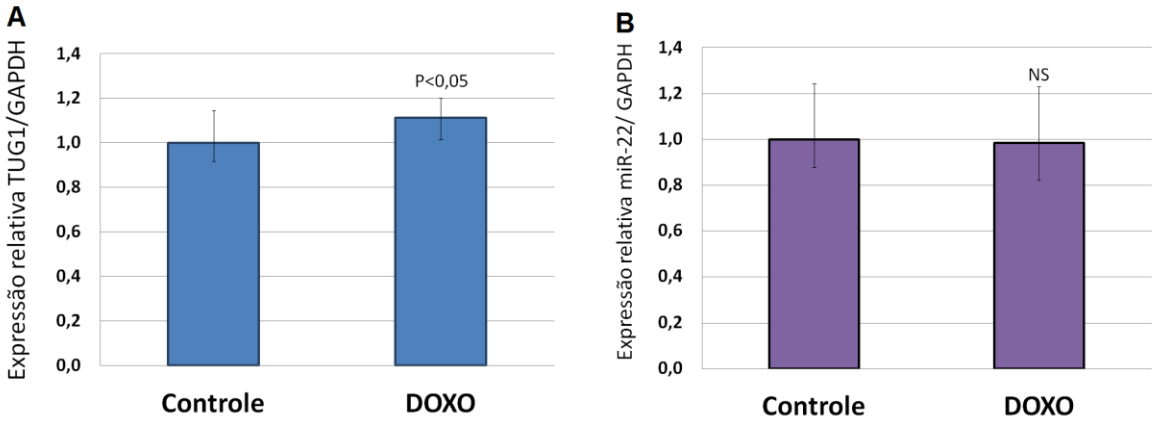

Figura 24. Nível de expressão *TUG1* e miR-22 para tratamento com Doxorrubicina em células da linhagem HeLa. (A) Nível de expressão relativo do *TUG1* para o controle e tratamento com Doxorrubicina na amostra tratada em relação ao controle. **(B)** Nível de expressão relativo do miR-22 para o controle e tratamento com Doxorrubicina na amostra tratada em relação ao controle. Ambas as amostras foram normalizadas pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas nos níveis de expressão ou a sigla NS para alterações não significativas.

Para o mesmo tratamento realizado em células da linhagem celular MIA-PaCa-2 o efeito foi bastante diferente do observado em HeLa sendo constatada uma diminuição média de 89 % na expressão relativa de *TUG1* (valor p = 0,0120) (Figura 25). Os níveis de expressão médios do miR-22 aumentaram 19 vezes (valor p = 0,0146), e os níveis de expressão médios do miR-194 aumentaram 8 vezes (valor p = 0,0090).

Estes resultados sugerem um esquema fisiológico de regulação entre o *TUG1* e os miR-22 e 194 na linhagem celular MIA-PaCa-2. No entanto, diferente do proposto por Zhang e colaboradores (2014), este lncRNA parece atuar como oncogênico, uma vez que a indução de dano ao DNA causou uma drástica redução nos seus níveis.

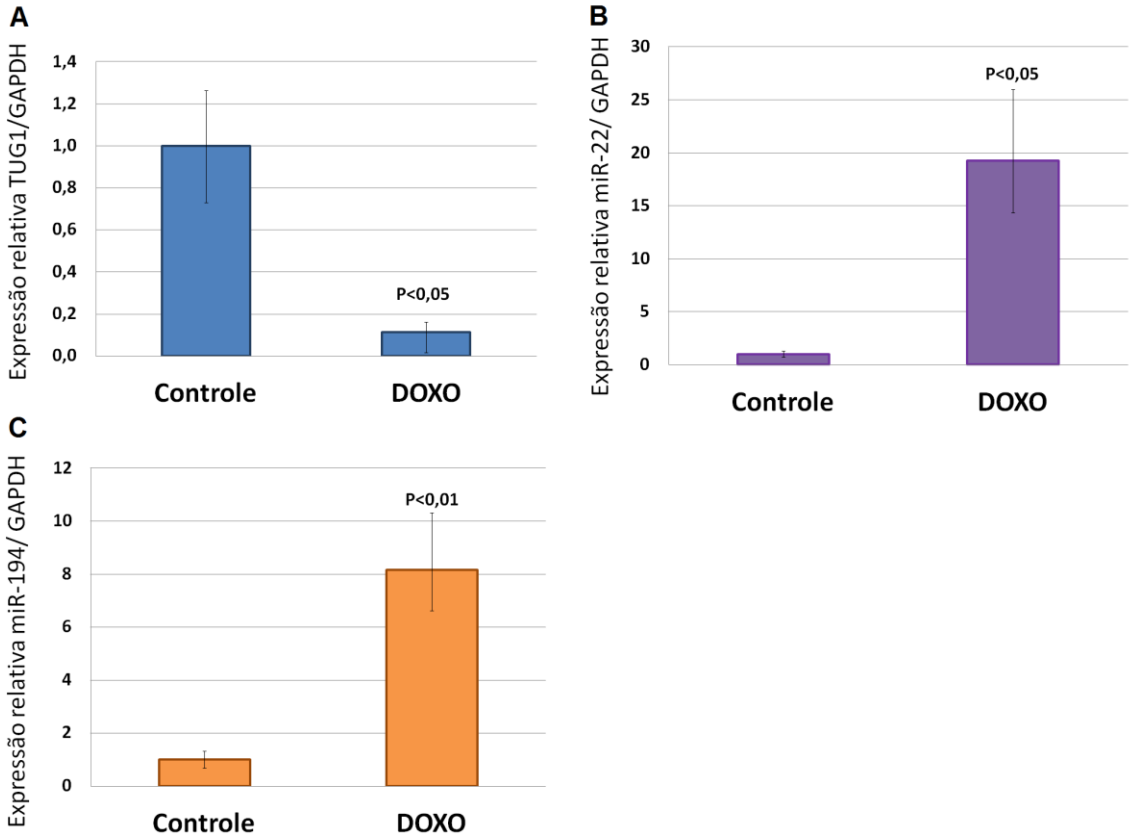

Figura 25. Nível de expressão *TUG1*, miR-22 e miR-194 para tratamento com Doxorrubicina em células da linhagem MIA-PaCa-2. (A) Nível de expressão relativo do *TUG1* para o controle e tratamento com Doxorrubicina na amostra tratada em relação ao controle. **(B)** Nível de expressão relativo do miR-22 para o controle e tratamento com Doxorrubicina na amostra tratada em relação ao controle. **(C)** Nível de expressão relativo do miR-194 para o controle e tratamento com Doxorrubicina na amostra tratada em relação ao controle. Todas as amostras foram normalizadas pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas nos níveis de expressão.

Por fim, para o tratamento de Doxorrubicina realizado em células da linhagem celular PANC-1 o efeito foi o mesmo para o observado em MIA-PaCa-2 para os níveis de *TUG1* que sofreram uma diminuição média de 70 % em sua expressão relativa (valor p = 0,0309) (Figura 26). Os níveis de expressão médios do miR-22, no entanto, mostraram tendência não significativa de diminuição de 33 % e os níveis de expressão médios do miR-194 de 29 % (valores p de 0,1065 e 0,1298).

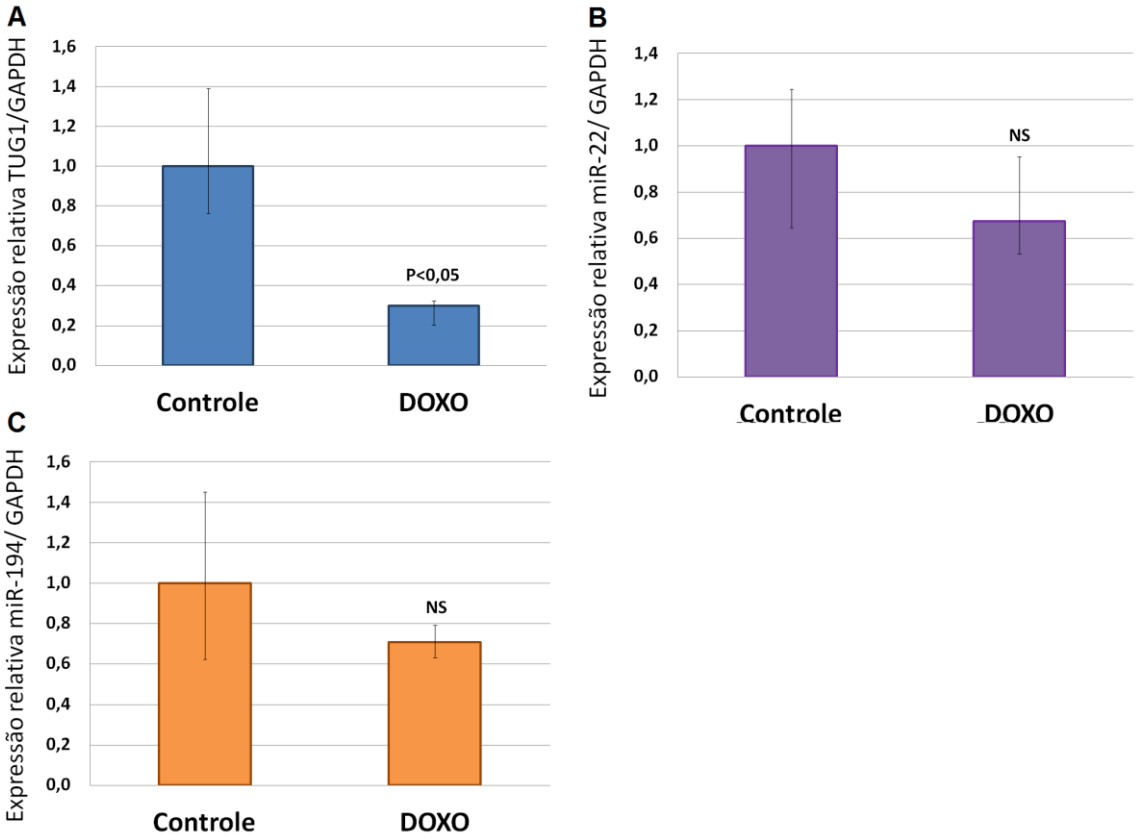

Figura 26. Nível de expressão *TUG1*, miR-22 e miR-194 para tratamento com Doxorrubicina em células da linhagem PANC-1. (A) Nível de expressão relativo do *TUG1* para o controle e tratamento

com Doxorrubicina na amostra tratada em relação ao controle. **(B)** Nível de expressão relativo do miR-22 para o controle e tratamento com Doxorrubicina na amostra tratada em relação ao controle. **(C)** Nível de expressão relativo do miR-194 para o controle e tratamento com Doxorrubicina na amostra tratada em relação ao controle. Todas as amostras foram normalizadas pela expressão de GAPDH. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o valor p para as alterações significativas nos níveis de expressão ou a sigla NS para alterações não significativas.

Estes resultados parecem sugerir novamente que o *TUG1* atue como oncogene, desta vez em PANC-1, não mostrando, entretanto, a alteração esperada dos miR-22 e 194, caso houvesse um papel fisiológico importante na regulação do *TUG1* por estes miRNAs, dessa forma talvez até mesmo excluindo esta possibilidade quando levado em conjunto com os resultados nesta linhagem celular no item 4.8.

4.10 –Curvas de crescimento

Com o intuito de verificar o efeito fenotípico da diminuição dos níveis de *TUG1* nas linhagens celulares estudadas, foram realizados ensaios de curva de crescimento para transfecção com oligonucleotídeo controle e os miRNAs que se mostraram reduzindo a expressão deste lncRNA.

Para as células da linhagem HeLa, a superexpressão do miR-1 apesar de diminuir o nível de proliferação médio das células (Figura 27), não afetou significativamente o crescimento celular das amostras tratadas em relação às amostras controle. A superexpressão do miR-22, entretanto, diminuiu significativamente o crescimento celular (Figura 27), em média 21 % com valor p = 0,0282 para teste t.

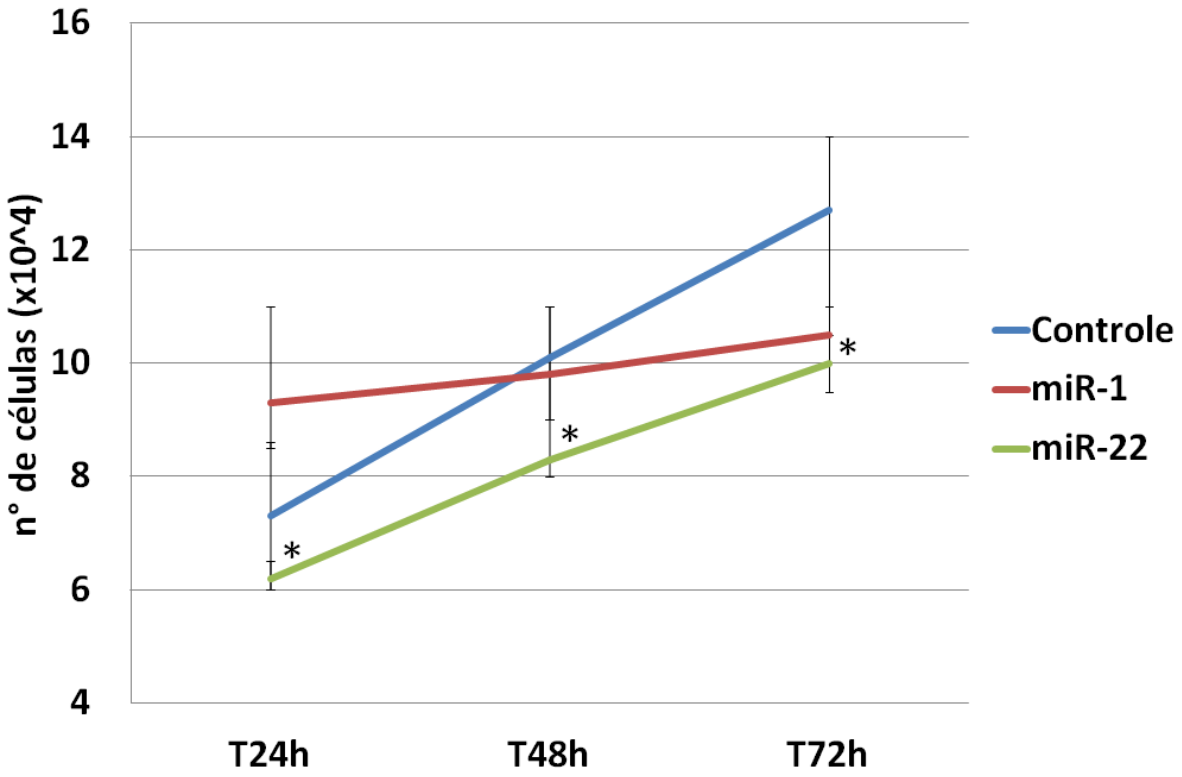

Figura 27. Curva de crescimento para células da linhagem celular HeLa transfectadas com oligonucleotídeo controle, miR-1 e miR-22. As linhas mostram o número médio de células contadas após 24 horas da transfecção (T24h), 48 horas após a transfecção (T48h) e 72 horas após a transfecção (T72h). Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o sinal "*" para as alterações significativas no número de células.

Para as células da linhagem MIA-PaCa-2 houve redução no crescimento médio das células para ambos os tratamentos em todos os períodos de tempo analisados. A superexpressão do miR-22 diminuiu significativamente o nível de proliferação médio das células apenas após 72 horas do tratamento com número de células aproximadamente 31 % menor nas amostras tratadas em relação ao controle e valor p = 0,049 (Figura 28). A superexpressão do miR-194 diminuiu significativamente o crescimento celular (Figura 28), em até 61 % para 72 horas após o tratamento, com valor p = 0,0013.

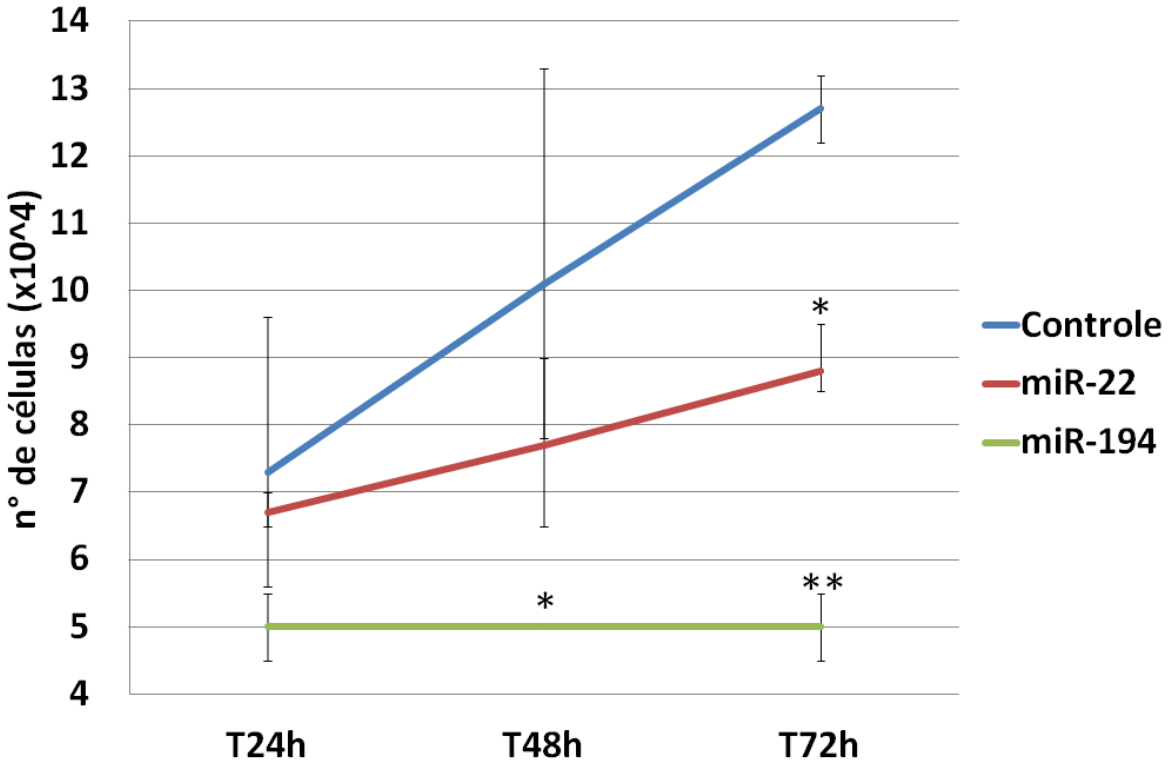

Figura 28. Curva de crescimento para células da linhagem celular MIA-PaCa-2 transfectadas com oligonucleotídeo controle, miR-22 e miR-194. As linhas mostram o número médio de células contadas após 24 horas da transfecção (T24h), 48 horas após a transfecção (T48h) e 72 horas após a transfecção (T72h). Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o sinal "*" para as alterações significativas no número de células.

Para as células da linhagem celular PANC-1, apenas a superexpressão do miR-194 diminuiu o crescimento celular significativamente, apesar de também haver redução média em ambas as situações (Figura 29). O valor médio da redução foi de 42 % para 72 horas após o tratamento, com valor p = 0,0227.

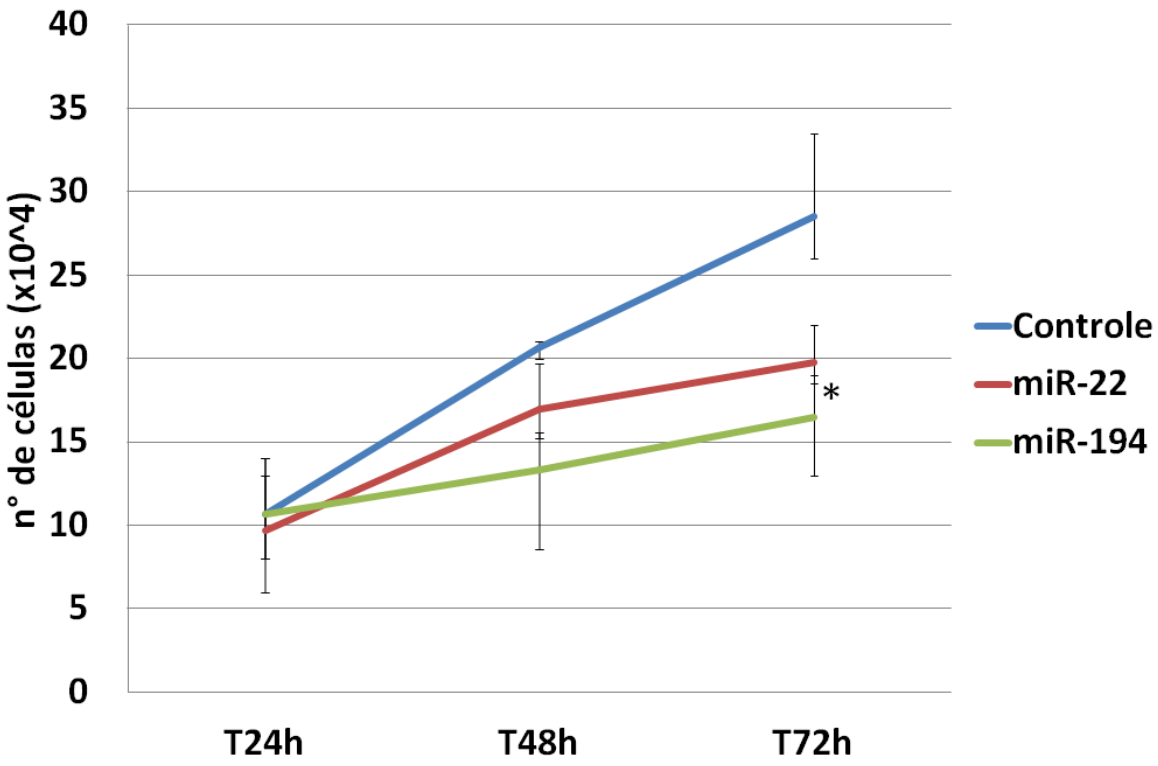

Figura 29. Curva de crescimento para células da linhagem celular PANC-1 transfectadas com oligonucleotídeo controle, miR-22 e miR-194. As linhas mostram o número médio de células contadas após 24 horas da transfecção (T24h), 48 horas após a transfecção (T48h) e 72 horas após a transfecção (T72h). Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. É mostrado o sinal "*" para as alterações significativas no número de células.

Assumindo que o *TUG1* tenha papel oncogênico nas linhagens celulares estudadas, como evidenciado em nossos dados e como mostrado na literatura para diversos tipos celulares, os resultados obtidos com todas as curvas de crescimento para todas as linhagens celulares tratadas parecem colaborar com a hipótese de que os miRNAs atuem na regulação deste lncRNA, diminuindo o papel oncogênico de *TUG1*. Na realidade, estes dois miRNAs já foram mostrados como sendo supressores tumorais em diversos outros tipos de tumores, não em pâncreas, como mostrado na Introdução.

4.11 –Viabilidade celular

Como um segundo ensaio para verificação do efeito fenotípico da diminuição dos níveis de *TUG1* nas linhagens celulares estudadas, foram realizados testes de eficiência de

plaqueamento em substrato sólido para transfecção com oligonucleotídeo controle e os miRNAs que se mostraram reduzindo a expressão deste lncRNA.

Para as células da linhagem HeLa, a superexpressão de ambos os miRNAs (miR-1 e miR-22) diminuiu significativamente a viabilidade celular (Figura 30). As diminuições médias foram de 24 % e 43 %, respectivamente, com valores p = 0,0198 e 0,0019 para teste t, sendo diminuições estatisticamente significativas.

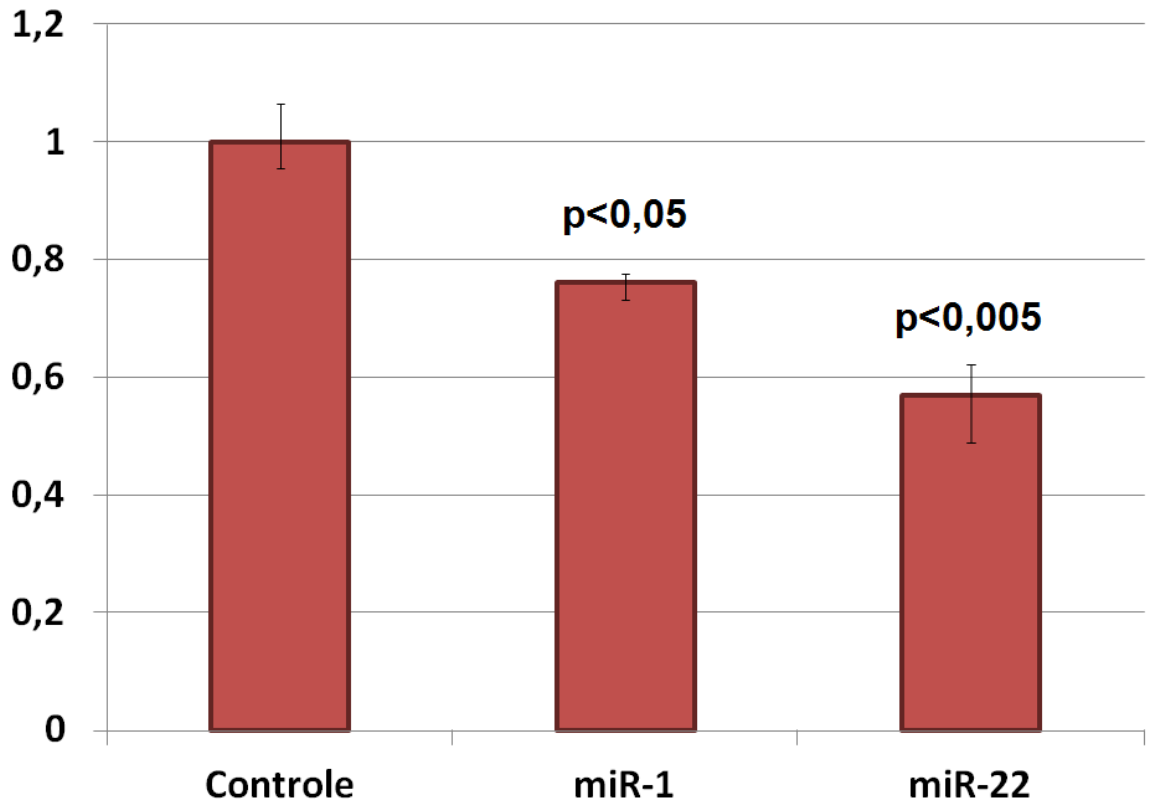

Figura 30. Ensaio de viabilidade celular para células da linhagem celular HeLa transfectadas com oligonucleotídeo controle, miR-1 e miR-22. As barras mostram a quantidade relativa de células viáveis após tratamento com oligonucleotídeo controle, miR-1 e miR-22. Foram realizados ensaios de eficiência de plaqueamento em substrato sólido. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. São mostrados os valores p para alterações significativas.

Para as células da linhagem MIA-PaCa-2, a superexpressão de ambos os miRNAs (miR-22 e miR-194) diminuiu significativamente a viabilidade celular (Figura 31). As

diminuições médias foram de 33 % e 58 %, respectivamente, com valores p = 0,0328 e 0,0029 para teste t, sendo diminuições estatisticamente significativas.

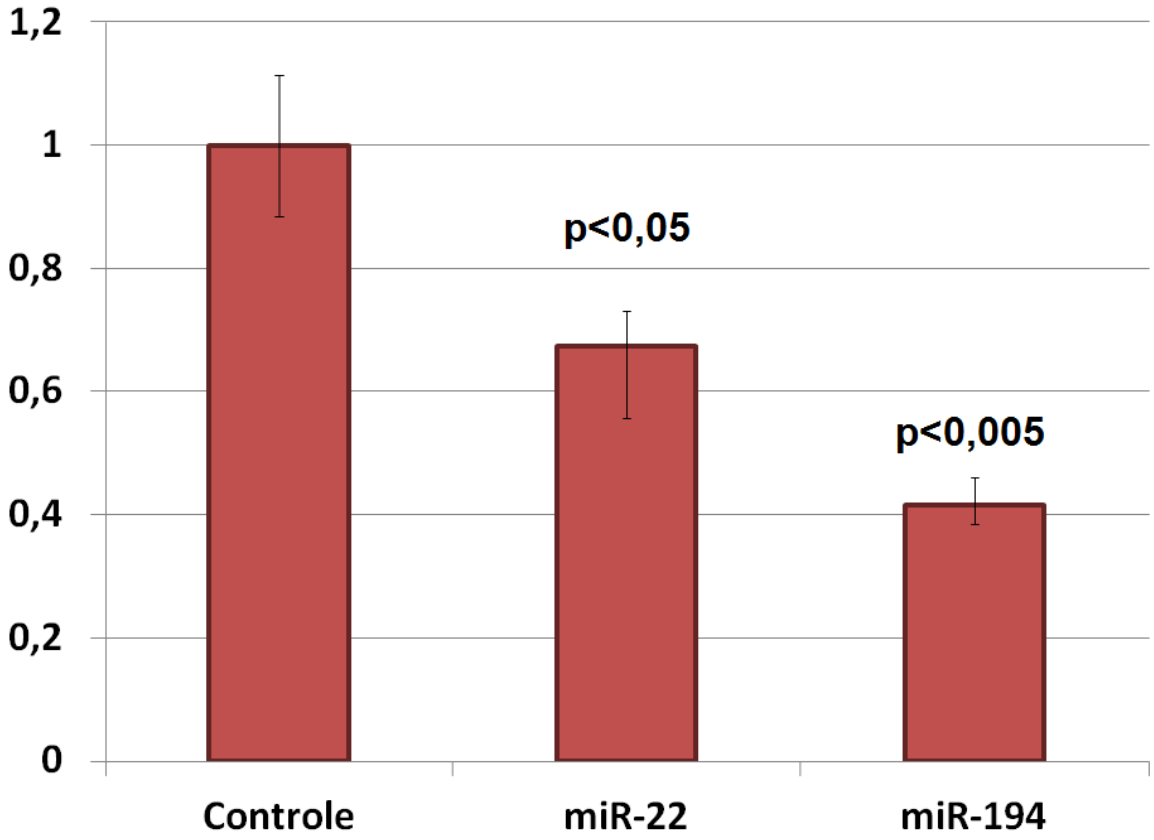

Figura 31. Ensaio de viabilidade celular para células da linhagem celular MIA-PaCa-2 transfectadas com oligonucleotídeo controle, miR-22 e miR-194. As barras mostram a quantidade relativa de células viáveis após tratamento com oligonucleotídeo controle, miR-22 e miR-194. Foram realizados ensaios de eficiência de plaqueamento em substrato sólido. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. São mostrados os valores p para alterações significativas.

Para as células da linhagem PANC-1, a superexpressão de ambos os miRNAs (miR-22 e miR-194) também diminuiu significativamente a viabilidade celular (Figura 32). As diminuições médias foram de 35 % e 40 %, respectivamente, com valores p = 0,0094 e 0,0047 para teste t, sendo diminuições estatisticamente significativas.

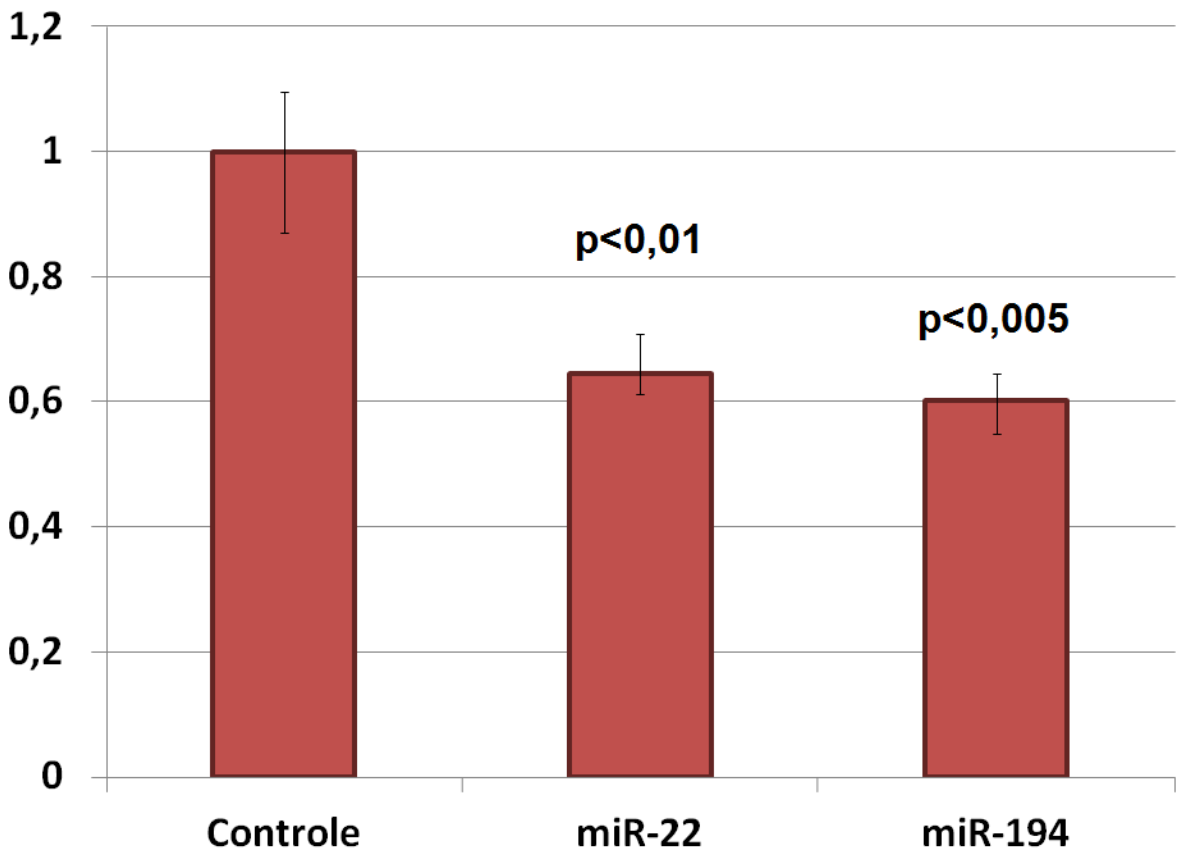

Figura 32. Ensaio de viabilidade celular para células da linhagem celular PANC-1 transfectadas com oligonucleotídeo controle, miR-22 e miR-194. As barras mostram a quantidade relativa de células viáveis após tratamento com oligonucleotídeo controle, miR-22 e miR-194. Foram realizados ensaios de eficiência de plaqueamento em substrato sólido. Os ensaios foram realizados em triplicatas e são mostradas as médias. As barras de erro indicam valores máximos e mínimos obtidos nos experimentos. São mostrados os valores p para alterações significativas.

Novamente temos que, caso *TUG1* possua papel oncogênico nas linhagens celulares estudadas, os resultados obtidos com os ensaios de viabilidade celular por eficiência de plaqueamento em substrato sólido para todas as linhagens tratadas parecem colaborar com a hipótese de que os miRNAs atuem na regulação deste lncRNA, diminuindo o papel oncogênico de *TUG1*.

5. CONCLUSÃO

Dado o exposto, concluiu-se a partir do presente projeto que o lincRNA *TUG1* pode sofrer regulação em nível pós-transcricional por miRNAs, causando diminuição no nível do lncRNA, sobretudo para os miR-1 e miR-22 em células da linhagem HeLa e para os miR-22 e miR-194 em células das linhagens MIA-PaCa-2 e PANC-1.

Aparentemente o lncRNA *TUG1* atua como um proto-oncogene nas linhagens celulares estudadas e os miRNAs 1, 22 e 194 parecem agir como supressores tumorais, possivelmente por uma variedade de mecanismos dentro os quais a atuação sobre os níveis de *TUG1*.

Com relação à importância fisiológica das regulações verificadas, parece pouco provável que estes mecanismos de regulação possuam um papel fisiológico importante nas linhagens celulares estudadas em situação normal, uma vez que apenas alterações de várias ordens de grandeza nos níveis normais dos miRNAs parecem interferir significativamente nos níveis de expressão do lincRNA *TUG1*.

6. REFERÊNCIAS

Aboobaker, A. A., P. Tomancak, N. Patel, G. M. Rubin, E. C. Lai (2005). "*Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development." Proceedings of the National Academy of Sciences **102** (50): 18077-18022.

Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. H. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeiffer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helt, C. R. Nelson, G. L. Gabor, J. F. Abril, A. Agbayani, H. J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R. M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, D. A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J. M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L. B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A. D. Mays, I. Dew, S. M. Dietz, K. Dodson, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A. E. Gabrielian, N. S. Garg, W. M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M. H. Wei, C. Ibegwam, M. Jalali, F. Kalush, G. H. Karpen, Z. Ke, J. A. Kennison, K. A. Ketchum, B. E. Kimmel, C. D. Kodira, C. Kraft, S. Kravitz, D. Kulp, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A. A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T. C. McIntosh, M. P. McLeod, D. McPherson, G. Merkulov, N. V. Milshina, C. Mobarry, J. Morris, A. Moshrefi, S. M. Mount, M. Moy, B. Murphy, L. Murphy, D. M. Muzny, D. L. Nelson, D. R. Nelson, K. A. Nelson, K. Nixon, D. R. Nusskern, J. M. Pacleb, M. Palazzolo, G. S. Pittman, S. Pan, J. Pollard, V. Puri, M. G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R. D. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B. C. Shue, I. Siden-Kiamos, M. Simpson, M. P. Skupski, T. Smith, E. Spier, A. C. Spradling, M. Stapleton, R. Strong, E. Sun, R. Svirskas, C. Tector, R. Turner, E. Venter, A. H. Wang, X. Wang, Z. Y. Wang, D. A. Wassarman, G. M. Weinstock, J. Weissenbach, S. M. Williams, WoodageT, K. C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q. A. Yao, J. Ye, R. F. Yeh, J. S. Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, X. H. Zheng, F. N. Zhong, W. Zhong, X. Zhou, S. Zhu, X. Zhu, H. O. Smith, R. A. Gibbs, E. W. Myers, G. M. Rubin and J. C. Venter (2000). "The genome sequence of Drosophila melanogaster." Science **287**(5461): 2185-2195.

Ameres, S. L., P. D. Zamore (2013). "Diversifying microRNA sequence and function." Molecular Cell Biology **14**: 475-488.

Augoff, K., B. McCue, E. F. Plow, K. Sossey-Alaouí (2012). "miR-31 and its host gene lncRNA LOC554202 are regulated by promoter hypermethylation in triple-negative breast cancer." Molecular Cancer **11**: 5.

Avery, O. T., C. M. MacLeod, M. McCarty (1944). "Studies on the chemical nature of the substance unducing transformation of Pneumococcal types." The Journal of Experimental Medicine **79**(2): 137-158.

Axtell, M. J., J. O. Westholm, E. C. Lai (2011). "Vive la diffeénce: Biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals." Genome Biology **12**: 221-233.

Bandres, E., X. Agirre, N. Bilarte, R. Zarate, J. Roman-Gomez, F. Prosper, J. Garcia-Foncillas (2009). "Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer." International Journal of Cancer **125**: 2737-2743.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function." Cell **116**: 281-297.

Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions." Cell **136**: 215-233.

Beckedorff, F. C., A. C. Ayupe, R. Crocci-Souza, M. S. Amaral, H. I. Nakaya, D. T. Soltys, C. F. M. Menck, E. M. Reis, S. Verjovski-Almeida (2013). "The intronic long noncoding RNA ANRASSF1 recruits PRC2 to the RASSF1A promoter, reducing the expression of RASSF1A and increasing cell proliferation." PLOS Genetics **9**: 8.

Beltran, M., I. Puig, C. Peña, J. M. García, A. B. Álvarez, R. Peña, F. Bonilla, A. G. Herreros (2008). "A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition." Genes & Development **22**: 756-769.

Bezerikov, E., N. Robine, A. Samsonova, J. O. Westholm, A. Naqvi, J. Hung, K. Okamura, Q. Dai, D. Bortolamiol-Becet, R. Martin, Y. Zhao, P. D. Zamore, G. J. Hannon, M. A. Marra, Z. Weng, N. Perrimon, E. C. Lai (2011). "Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence." Genome Research **21**: 203-215.

Birney, E., J. A. Stamatoyannopoulos, A. Dutta, R. Guigo, T. R. Gingeras, E. H. Margulies, Z. Weng, M. Snyder, E. T. Dermitzakis, R. E. Thurman, M. S. Kuehn, C. M. Taylor, S. Neph, C. M. Koch, S. Asthana, A. Malhotra, I. Adzhubei, J. A. Greenbaum, R. M. Andrews, P. Flicek, P. J. Boyle, H. Cao, N. P. Carter, G. K. Clelland, S. Davis, N. Day, P. Dhami, S. C. Dillon, M. O. Dorschner, H. Fiegler, P. G. Giresi, J. Goldy, M. Hawrylycz, A. Haydock, R. Humbert, K. D. James, B. E. Johnson, E. M. Johnson, T. T. Frum, E. R. Rosenzweig, N. Karnani, K. Lee, G. C. Lefebvre, P. A. Navas, F. Neri, S. C. Parker, P. J. Sabo, R. Sandstrom, A. Shafer, D. Vetrie, M. Weaver, S. Wilcox, M. Yu, F. S. Collins, J. Dekker, J. D. Lieb, T. D. Tullius, G. E. Crawford, S. Sunyaev, W. S. Noble, I. Dunham, F. Denoeud, A. Reymond, P. Kapranov, J. Rozowsky, D. Zheng, R. Castelo, A. Frankish, J. Harrow, S. Ghosh, A. Sandelin, I. L. Hofacker, R. Baertsch, D. Keefe, S. Dike, J. Cheng, H. A. Hirsch, E. A. Sekinger, J. Lagarde, J. F. Abril, A. Shahab, C. Flamm, C. Fried, J. Hackermuller, J. Hertel, M. Lindemeyer, K. Missal, A. Tanzer, S. Washietl, J. Korbel, O. Emanuelsson, J. S. Pedersen, N. Holroyd, R. Taylor, D. Swarbreck, N. Matthews, M. C. Dickson, D. J. Thomas, M. T. Weirauch, J. Gilbert, J. Drenkow, I. Bell, X. Zhao, K. G. Srinivasan, W. K. Sung, H. S. Ooi, K. P. Chiu, S. Foissac, T. Alioto, M. Brent, L. Pachter, M. L. Tress, A. Valencia, S. W. Choo, C. Y. Choo, C. Ucla, C. Manzano, C. Wyss, E. Cheung, T. G. Clark, J. B. Brown, M. Ganesh, S. Patel, H. Tammana, J. Chrast, C. N. Henrichsen, C. Kai, J. Kawai, U. Nagalakshmi, J. Wu, Z. Lian, J. Lian, P. Newburger, X. Zhang, P. Bickel, J. S. Mattick, P. Carninci, Y. Hayashizaki, S. Weissman, T. Hubbard, R. M. Myers, J. Rogers, P. F. Stadler, T. M. Lowe, C. L. Wei, Y. Ruan, K. Struhl, M. Gerstein, S. E. Antonarakis, Y. Fu, E. D. Green, U. Karaoz, A. Siepel, J. Taylor, L. A. Liefer, K. A. Wetterstrand, P. J. Good, E. A. Feingold, M. S. Guyer, G. M. Cooper, G. Asimenos, C. N. Dewey, M. Hou, S. Nikolaev, J. I. Montoya-Burgos, A. Loytynoja, S. Whelan, F. Pardi, T. Massingham, H. Huang, N. R. Zhang, I. Holmes, J. C. Mullikin, A. Ureta-Vidal, B. Paten, M. Seringhaus, D. Church, K. Rosenbloom, W. J. Kent, E. A. Stone, S. Batzoglou, N. Goldman, R. C. Hardison, D. Haussler, W. Miller, A. Sidow, N. D. Trinklein, Z. D. Zhang, L. Barrera, R. Stuart, D. C. King, A. Ameur, S. Enroth, M. C. Bieda, J. Kim, A. A. Bhinge, N. Jiang, J. Liu, F. Yao, V. B. Vega, C. W. Lee, P. Ng, A. Yang, Z. Moqtaderi, Z. Zhu, X. Xu, S. Squazzo, M. J. Oberley, D. Inman, M. A. Singer, T. A. Richmond, K. J. Munn, A. Rada-Iglesias, O. Wallerman, J. Komorowski, J. C. Fowler, P. Couttet, A. W. Bruce, O. M. Dovey, P. D. Ellis, C. F.

Langford, D. A. Nix, G. Euskirchen, S. Hartman, A. E. Urban, P. Kraus, S. Van Calcar, N. Heintzman, T. H. Kim, K. Wang, C. Qu, G. Hon, R. Luna, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, S. F. Aldred, S. J. Cooper, A. Halees, J. M. Lin, H. P. Shulha, M. Xu, J. N. Haidar, Y. Yu, V. R. Iyer, R. D. Green, C. Wadelius, P. J. Farnham, B. Ren, R. A. Harte, A. S. Hinrichs, H. Trumbower, H. Clawson, J. Hillman-Jackson, A. S. Zweig, K. Smith, A. Thakkapallayil, G. Barber, R. M. Kuhn, D. Karolchik, L. Armengol, C. P. Bird, P. I. de Bakker, A. D. Kern, N. Lopez-Bigas, J. D. Martin, B. E. Stranger, A. Woodroffe, E. Davydov, A. Dimas, E. Eyras, I. B. Hallgrimsdottir, J. Huppert, M. C. Zody, G. R. Abecasis, X. Estivill, G. G. Bouffard, X. Guan, N. F. Hansen, J. R. Idol, V. V. Maduro, B. Maskeri, J. C. McDowell, M. Park, P. J. Thomas, A. C. Young, R. W. Blakesley, D. M. Muzny, E. Sodergren, D. A. Wheeler, K. C. Worley, H. Jiang, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs, T. Graves, R. Fulton, E. R. Mardis, R. K. Wilson, M. Clamp, J. Cuff, S. Gnerre, D. B. Jaffe, J. L. Chang, K. Lindblad-Toh, E. S. Lander, M. Koriabine, M. Nefedov, K. Osoegawa, Y. Yoshinaga, B. Zhu and P. J. de Jong (2007). "Identification and analysis of functional elements in 1 % of the human genome by the ENCODE pilot project." Nature **447**(7146): 799-816.

Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, D. Görlich (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." RNA Journal **10**: 185-191.

Borchert, G. M., W. Lanier, B. L. Davidson (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." Nature Structural and Molecular Biology **13**(12): 1097-1101.

Brannan, C. I., E. C. Dees, R. S. Ingram, S. M. Tilghman (1990). "The product of the *H19* gene may function as an RNA." Molecular and Cellular Biology **10**(1): 28-36.

Cabili, M. N., C. Trapnell, L. Goff, M. Koziol, B. Tazon-Vega, A. Regev, J. L. Rinn (2011). "Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses." Genes and Development **25**: 1915-1927.

Cai, H., Y. Xue, P. Wang, Z. Wang, Z. Li, Y. Hu, Z. Li, X. Shang, Y. Liu (2015). "The long noncoding RNA *TUG1* regulates blood-tumor barrier permeability by target miR-144." Oncotarget **6**(23): 19759-19779.

Carthew, R. W., E. J. Sontheimer (2009). "Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell **136**: 642-655.

Carninci, P., T. Kasukawa, S. Katayama, J. Gough, M. C. Frith, N. Maeda, R. Oyama, T. Ravasi, B. Lenhard, C. Wells, R. Kodzius, K. Shimokawa, V. B. Bajic, S. E. Brenner, S. Batalov, A. R. Forrest, M. Zavolan, M. J. Davis, L. G. Wilming, V. Aidinis, J. E. Allen, A. Ambesi-Impiombato, R. Apweiler, R. N. Aturaliya, T. L. Bailey, M. Bansal, L. Baxter, K. W. Beisel, T. Bersano, H. Bono, A. M. Chalk, K. P. Chiu, V. Choudhary, A. Christoffels, D. R. Clutterbuck, M. L. Crowe, E. Dalla, B. P. Dalrymple, B. de Bono, G. Della Gatta, D. di Bernardo, T. Down, P. Engstrom, M. Fagiolini, G. Faulkner, C. F. Fletcher, T. Fukushima, M. Furuno, S. Futaki, M. Gariboldi, P. Georgii-Hemming, T. R. Gingeras, T. Gojobori, R. E. Green, S. Gustincich, M. Harbers, Y. Hayashi, T. K. Hensch, N. Hirokawa, D. Hill, L. Huminiecki, M. Iacono, K. Ikeo, A. Iwama, T. Ishikawa, M. Jakt, A. Kanapin, M. Katoh, Y. Kawasawa, J. Kelso, H. Kitamura, H. Kitano, G. Kollias, S. P. Krishnan, A. Kruger, S. K. Kummerfeld, I. V. Kurochkin, L. F. Lareau, D. Lazarevic, L. Lipovich, J. Liu, S. Liuni, S. McWilliam, M. Madan Babu, M. Madera, L. Marchionni, H. Matsuda, S. Matsuzawa, H. Miki, F. Mignone, S. Miyake, K. Morris, S. Mottagui-Tabar, N. Mulder, N. Nakano, H. Nakauchi, P. Ng, R. Nilsson, S. Nishiguchi, S. Nishikawa, F. Nori, O. Ohara, Y. Okazaki, V. Orlando, K. C. Pang, W. J. Pavan, G. Pavesi, G. Pesole, N. Petrovsky, S. Piazza, J. Reed, J. F. Reid, B. Z. Ring, M. Ringwald, B. Rost, Y. Ruan, S. L. Salzberg, A. Sandelin, C. Schneider, C. Schonbach,

K. Sekiguchi, C. A. Semple, S. Seno, L. Sessa, Y. Sheng, Y. Shibata, H. Shimada, K. Shimada, D. Silva, B. Sinclair, S. Sperling, E. Stupka, K. Sugiura, R. Sultana, Y. Takenaka, K. Taki, K. Tammoja, S. L. Tan, S. Tang, M. S. Taylor, J. Tegner, S. A. Teichmann, H. R. Ueda, E. van Nimwegen, R. Verardo, C. L. Wei, K. Yagi, H. Yamanishi, E. Zabarovsky, S. Zhu, A. Zimmer, W. Hide, C. Bult, S. M. Grimmond, R. D. Teasdale, E. T. Liu, V. Brusic, J. Quackenbush, C. Wahlestedt, J. S. Mattick, D. A. Hume, C. Kai, D. Sasaki, Y. Tomaru, S. Fukuda, M. Kanamori-Katayama, M. Suzuki, J. Aoki, T. Arakawa, J. Iida, K. Imamura, M. Itoh, T. Kato, H. Kawaji, N. Kawagashira, T. Kawashima, M. Kojima, S. Kondo, H. Konno, K. Nakano, N. Ninomiya, T. Nishio, M. Okada, C. Plessy, K. Shibata, T. Shiraki, S. Suzuki, M. Tagami, K. Waki, A. Watahiki, Y. Okamura-Oho, H. Suzuki, J. Kawai and Y. Hayashizaki (2005). "The transcriptional landscape of the mammalian genome." Science **309**(5740): 1559-1563.

Cai, H., Y. Xue, P. Wang, Z. Wang, Z. Li, Y. Hu, Z. Li, X. Shang, Y. Liu (2015). "The long noncoding RNA *TUG1* regulates blood-tumor barrier permeability by target miR-144." Oncotarget **6**(23): 19759-19779.

Chen, J., A. A. Shishkin, X. Zhu, S. Kadri, I. Maza, M. Guttman, J. H. Hanna, A. Regev, M. Garber (2016). "Evolutionary analysis across mammals reveals distinct classes of long non-coding RNAs." Genome Biology **17**: 19.

Chiyomaru, T., S. Fukuhara, S. Saini, S. Majid, G. Deng, V. Shahryari, I. Chang, Y. Tanaka, H. Enokida, M. Nakagawa, R. Dahiya, S. Yamamura (2014). "Long non-coding RNA *HOTAIR* is targeted and regulated by miR-141 in human cancer cells." The Journal of Biological Chemistry **289**(18): 12550-12565.

Cifuentes D., H. Xue, D. W. Taylor, H. Patnode, Y. Mishima, S. Cheloufi, E. Ma, S. Mane, G. J. Hannon, N. D. Lawson, S. A. Wolfe, A. J. Giraldez (2010). "A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute 2 catalytic activity." Science **328**: 1694-1698.

Conley, A. B., I. King Jordan (2012). "Epigenetic regulation of human *cis*-natural antisense transcripts." Nucleic Acids Research **40**(4): 1438-1445.

Consortium, I. H. G. S. (1998). "Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology." Science **282**(5396): 2012-2018.

Crick, F. H. C. (1958). "On protein synthesis." Symposia of the Society for Experimental Biology Journal **12**: 138-163.

Crick, F. H. C. (1970). "Central Dogma of Molecular Biology." Nature **227**: 561-563.

Dahm, R. (2005). "Friedrich Miescher and the discorery of DNA." Developmental Biology **278**: 274-288.

Denli, A. M., B. B. J. Tops, R. H. A. Plasterk, R. F. Ketting, G. J. Hannin (2004). "Processing of primary microRNAs bu the microprocessor complex." Nature **432**: 231-235.

DeOcesano-Pereira, C., M. S. Amaral, K. S. Parreira, A. C. Ayupe, J. F. Jacysyn, G. P. Amarante-Mendes, E. M. Reis, S. Verjovski-Almeida (2014). "Long non-coding RNA *INXS* is a critical mediator of *BCL-XS* induced apoptosis." Nucleic Acids Research **42**(13): 8345-8355.

Dieci, G., G. Fiorino, M. Castelnuovo, M. Teichmann, A. Pagano (2007). "The expanding RNA polymerase III transcriptome." Trends in genectics **23**(12): 614-622.

Diederichs, S., D. A. Heber (2007). "Dual role for Argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression." Cell **131**: 1097-1108.

Dinger, M. E., P. P. Amaral, T. R. Mercer, J. S. Mattick (2009). "Pervasive transcription of the eukaryotic genome: functional indices and conceptual implications." Briefings in Functional Genomics and Proteomics **8**: 407-423.

Djebali, S., C. A. Davis, A. Merkel, A. Dobin, T. Lassmann, A. Mortazavi, A. Tanzer, J. Lagarde, W. Lin, F. Schlesinger, C. Xue, G. K. Marinov, J. Khatun, B. A. Williams, C. Zaleski, J. Rozowsky, M. Röder, F. Kokocinski, R. F. Abdelhamid, T. Alioto, I. Antoshechkin, M. T. Baer, N. S. Bar, P. Batut, K. Bell, I. Bell, S. Chakrabortty, X. Chen, J. Chrast, J. Curado, T. Derrien, J. Drenkow, E. Dumais, J. Dumais, R. Duttagupta, E. Falconnet, M. Fastuca, K. Fejes-Toth, P. Ferreira, S. Foissac, M. J. Fullwood, H. Gao, D. Gonzalez, A. Gordon, H. Gunawardena, C. Howald, S. Jha, R. Johnson, P. Kapranov, B. King, C. Kingswood, O. J. Luo, E. Park, K. Persaud, J. B. Preall, P. Ribeca, B. Risk, D. Robyr, M. Sammeth, L. Schaffer, L. See, A. Shahab, J. Skancke, A. M. Suzuki, H. Takahashi, H. Tilgner, D. Trout, N. Walters, H. Wang, J. Wrobel, Y. Yu, X. Ruan, W. Hayashizaki, J. Harrow, M. Gerstein, T. Hubbard, A. Reymond, S. E. Antonarakis, G. Hannon, M. C. Giddings, Y. Ruan, B. Wold, P. Carninci, R. Guigó, T. R. Gingeras (2012). "Landscape of transcription in human cells." Nature **489**: 101-108.

ENCODE Project Consortium (2011). "A user's guide to the encyclopedia of DNA elementes (ENCODE)." PLOS Biology **9**: 4.

Ender, C., G. Meister (2010). "Argonaute proteins at a glance." Journal of Cell Science **123**(11): 1819-1824.

Erhard, F., J. Hass, D. Lieber, G. Malterer, L. Jaskiewickz, M. Zavolan, L. Dölken, R. Zimmer (2014). "Widespread context dependency of microRNA-mediated regulation." Genome Research **24**: 906-919.

Esau, C., S. Davis, S. F. Murray, X. X. Yu, S. K. Pandey, M. Pear, L. Watts, S. L. Booten, M. Graham, R. McKay, A.Subramaniam, S. Propp, B. A. Lollo, S. Freier, C. F. Bennett, S. Bhanot, B. P. Monia (2006). "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting." Cell Metabolism **3**: 87-98.

Esteller, M. (2011). "Non-coding RNAs in human disease." Nature Reviews Genetics **12**(12): 861-874.

Fejes-Toth, K., V. Sotirova, R. Sachidanandam, G. Assaf and J. Hannon G (2009). "Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs." Nature **457**(7232): 1028-1032.

Flynn, R. A. and H. Y. Chang (2012). "Active chromatin and noncoding RNAs: an intimate relationship." Current Opinion in Genetics & Development **22**(2): 172-178.

Flynt, A. S., J. C. Greimann, W. Chung, C. D. Lima, E. C. Lai (2010). "MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*." Molecular Cell **38**: 900-907.

Frith, M. C., M. Pheasant, J. S. Mattick (2005). "The amazing complexity of the human transcriptome." European Journal of Human Genetics **13**: 894-897.

Gagnon, K. T., L. Li, Y. Chu, B. A. Janowski, D. R. Corey (2014). "RNAi factors are present and active in human cell nuclei." Cell Reports **6**: 211-221.

Gebert, L. F. R., M. A. E. Rebhan, S. E. M. Crivelli, R. Denzler, M. Stoffel, J. Hall (2014). "Miravirsen (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122." Nucleic Acids Research **42**(1): 609-621.

Gingeras, T. R. (2007). "Origin of phenotypes: Genes and transcripts." Genome Research **17**: 682-690.

Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon and M. A. Carmell (2006). "A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins." Nature **442**(7099): 199-202.

Griffiths-Jones S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, A. J. Enright (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." Nucleic Acids Research **34**: 140-144.

Guo, M., L. Hu, Y. Wang, P. Chen, J. Huang, N. Lu, J. He, C. Liao (2013). "MiR-22 is down-regulated in gastric cancer, and its overexpression inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor Sp1." Medical Oncology **30**: 542.

Guttman, M., I. Amit, M. Garber, C. French, M. F. Lin, D. Feldser, M. Huarte, O. Zuk, B. W. Carey, J. P. Cassady, M. N. Cabili, R. Jaenisch, T. S. Mikkelsen, T. Jacks, N. Hacohen, B. E. Bernstein, M. Kellis, A. Regev, J. L. Rinn and E. S. Lander (2009). "Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals." Nature **458**(7235): 223-227.

Han, K., T. Zhao, X. Chen, N. Bian, T. Yang, Q. Ma, C. Cai, Q. Fan, Y. Zhou, B. Ma (2014). "MicroRNA-194 supresses osteosarcoma cell proliferation and metastasis *in vitro* and *in vivo* by targeting CDH2 and IGF1R." International Journal of Oncology **45**: 1437-1449.

Han, Y., Y. Liu, Y. Gui, Z. Cai (2013). "Long intergenic non-coding RNA *TUG1* is overexpressed in urothelial carcinoma of the bladder." Journal of Surgical Oncology **107**: 555-559.

Harrow, J., A. Frankish, J.M. Gonzalez, E. Tapanari, M. Diekhans, F. Kokocinski, B. L. Aken, D. Barrell, A. Zadissa, S. Searle, I. Barnes, A. Bignell, V. Boychenko, T. Hunt, M. Kay, G. Mukherjee, J. Rajan, G. Despacio-Reyes, G. Saunders, C. Steward, R. Harte, M. Lin, C. Howald, A. Tanzer, T. Derrien, J. Chrast, N. Walters, S. Balasubramanian, B. Pei, M. Tress, J. M. Rodriguez, I. Ezkurdia, J. van Baren, M. Brent, D. Haussler, M. Kellis, A. Valencia, A. Reymond, M. Gerstein, R. Guigo, T. J. Hubbard (2012). "GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project." Genome Research **22**(9): 1760-1774.

He, L., X. He, S. W. Lowe, G. J. Hannon (2007). "microRNAs join the p53 network – Another piece in the tumor-supression puzzle." Nature Reviews **7**: 819-822.

Hu, G., Q. Tang, S. Sharma, F. Yu, T. M. Escobar, S. A. Muljo, J. Zhu, K. Zhao (2013). "Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs suring T cell development and differentiation." Nature Immunology **14**: 1190-1198.

Huang, M., W. Chen, F. Qi, M. Sun, T. Xu, P. Ma, Y. Shu (2015). "Long non-coding RNA *TUG1* is up-regulated in hepatocellular carcinoma and promotes cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of KLF2." Molecular Cancer **14**: 165.

Huntzinger, E., E. Izaurralde (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression mRNA decay." Nature Reviews Genetics **12**: 99-110.

Hutvágner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl, P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA." Science **293**: 834-838.

International Human Genome Sequencing Consortium (2004). “Finishing the euchromatic sequence of the human genome.” Nature **431**: 931-945.

Isik, M., H. C. Kosrwagen, E. Berezikov (2010). “Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*.” Science **1**: 5.

Jeggari, A., D. S. Marks, E. Larsson (2012). “miRcode: a map of putative microRNA target sites in the long non-coding transcriptome.” Bioinformatics **28**(15): 2062:2063.

Jiang, Q., Y. Wang, Y. Hao, L. Juan, M. Teng, X. Zhang, M. Li, G. Wang, Y. Liu (2009). “miR2Disease: A manually curated database for microRNA deregulation in human disease.” Nucleic Acids Research **37**: D98:D104.

Kapranov, P., J. Cheng, S. Dike, D. A. Nix, R. Duttagupta, A. T. Willingham, P. F. Stadler, J. Hertel, J. Hackermuller, I. L. Hofacker, I. Bell, E. Cheung, J. Drenkow, E. Dumais, S. Patel, G. Helt, M. Ganesh, S. Ghosh, A. Piccolboni, V. Sementchenko, H. Tammana and T. R. Gingeras (2007). "RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription." Science **316**(5830): 1484-1488.

Kapranov, P., G. St Laurent, T. Raz, F. Ozsolak, C. P. Reynolds, P. H. Sorensen, G. Reaman, P. Milos, R. J. Arceci, J. F. Thompson and T. J. Triche (2010). "The majority of total nuclear-encoded non-ribosomal RNA in a human cell is 'dark matter' un-annotated RNA." BMC Biology **8**: 149.

Kent, W. J., C. W. Sugnet, T. S. Furey, K. M. Roskin, T. H. Pringle, A. M. Zahler, D. Haussler (2002). "The human genome browser at UCSC." Genome Research **12**: 996:1006.

Khalil, A. M., M. Guttman, M. Huarte, M. Garber, A. Raj, D. R. Morales, K. Thomas, A. Presser, B. E. Bernstein, A. van Oudenaarden, A. Regev, E. S. Lander, J. L. Rinn (2009). "Many human large intergeni noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(28): 11667:11672.

Khalil, A. M. and J. L. Rinn (2011). "RNA-protein interactions in human health and disease." Seminars in Cell and Developmental Biology **22**(4): 359-365.

Khella, H. W. Z., M. Bakhet, G. Allo, M. A. S. Jewett, A. H. Girgis, A. Latif, H. Girgis, I. Von Both, G. A. Bjarnason, G. M. Yousef (2013). "MiR-192, miR-194 and miR-215: A convergent microRNA network supressing tumor progression in renal cell carcinoma." Carcinogenesis **34**(10): 2231-2239.

Khvorova A., A. Reynolds, S. D. Jayasena (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**: 209-216.

Kozomara, A., S. Griffiths-Jones (2014). "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data." Nucleic Acids Research **42**: 68-73.

Lagos-Quinta, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**: 853-858.

Lagos-Quinta, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, T. Tuschl (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Current Biology **12**: 735-739.

Lau, N. C., L. P. Lim, E. G. Weinstein, D. P. Bartel (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**: 858-862.

Lee, D. Y., Z. Deng, C. Wang, B. Yang (2007). "MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(51): 20350-20355.

Lee, J. T., M. S. Bartolomei (2013). "X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease." Cell **152**: 1308-1323.

Lee, R. C., V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**: 862-864.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, V. Ambros (1993). "The C. elegans heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**: 843-854.

Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, P. Provost, O. Rådmark, S. Kim, V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**: 415-419.

Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim (2004). "MicroRNAs genes are transcribed by RNA polymerase II." The European Molecular Biology Organization Journal **23**: 4051-4060.

Leone, V., D. D'Angelo, I. Rubio, P. M. de Freitas, A. Federico, M. Colamaio, P. Pallante, G. Medeiros-Neto, A. Fusco (2011). "MiR-1 is a tumor supressor in thyroid carcinogenesis targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1α." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **96**(9): E1388-E1398.

Li, C., Y. Feng, G. Coukos, L. Zhang (2009). "Therapeutic microRNA strategies in human cancer." American Association of Pharmaceutical Scientists **11**(4): 748-757.

Li, D., P. Yang, H. Li, P. Cheng, L. Zhang, D. Wei, X. Su, J. Peng, H. Gao, Y. Tan, Z. Zhao, Y. Li, Z. Qi, Y. Rui, T. Zhang (2012). "MicroRNA-1 inhibits proliferation of hepatocarcinoma cells by targeting endothelin-1." Life Sciences **91**: 440-447.

Lim, L. P., N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J. M. Schelter, J. Castle, D. P. Bartel, P. S. Linsley, J. M. Johnson (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." Nature **433**: 769-773.

Ling, B., G. Xue, G. Long, J. Qiu, Z. Hu (2012). "Tumor supressor miR-22 supresses ling cancer cell progression through post-transcriptional regulation of ErbB3." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **138**: 1355-1361.

Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon, R. Parker (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." Nature Cell Biology **7**(7): 719-723.

Liu, Q., J. Huang, N. Zhou, Z. Zhang, A. Zhang, Z. Lu, F. Wu, Y. Mo (2013). "LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor supressor." Nucleic Acids Research **41**(9): 4976-4987.

Louro, R., H. I. Nakaya, P. P. Amaral, F. Festa, M. C. Sogayar, A. M. da Silva, S. Verjovski-Almeida, E. M. Reis (2007). "Androgen resposive intronic non-coding RNAs." BMC Biology **5**: 4.

Lukk, M., M. Kapushesky, J. Nikkilä, H. Parkinson, A. Goncalves, W. Huber, S. Ukkonen, A. Brazma (2010). "A global map of human gene expression." Nature Biotechnology **28**(4): 322-324.

Ma, L., V. B. Bajic, Z. Zhang (2014). "On the classification of long non-coding RNAs." RNA Biology **10**(6): 1-10.

Martinez, N. J., M. C. Ow, J. S. Reece-Hoyes, M. I. Barrasa, V. R. Ambros, A. J. M. Walhout (2008). "Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity." Genome Research **18**: 2005-2015.

Mattick, J. S. (2011). "The central role of RNA in human development and cognition." Federation of European Biochemical Societies **585**: 1600-1616.

Mattick, J. S. (2012). "RNA driving the epigenetic bus." European Molecular Biology Organization Journal **31**(3): 515-516.

Mendell, J. T. (2005). "MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy." Cell Cycle **4**(9), 1179-1184.

Mercer, T. R., M. E. Dinger and J. S. Mattick (2009). "Long non-coding RNAs: insights into functions." Nature Reviews Genetics **10**(3): 155-159.

Mersey, B. D., P. Jin, D. J. Danner (2005). "Human microRNA (miR29b) expression controls the amount of branched chain α-ketoacid dehydrogenase complex in a cell." Human Molecular Genectics **14**(22): 3371-3377.

Morlando, M., M. Ballarino, N. Gromak, F. Pagano, I. Bozzoni, N. J. Proudfoot (2008). "Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally." Nature Structural & Molecular Biology **15**(9): 902-909.

Musilova, K., M. Kraz (2015) "MicroRNAs in β-cell lymphomas: How a complex biology gets more complex." Leukemia **29**(5): 1004-1017.

Nakaya, H. I., P. P. Amaral, R. Louro, A. Lopes, A. A. Fachel, Y. B. Moreira, T. A. El-Jundi, A. M. da Silva, E. M. Reis and S. Verjovski-Almeida (2007). "Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription." Genome Biology **8**(3): R43.

O'Donnell, K., E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, J. T. Mendell (2005) "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression." Nature **435**: 839-843.

Okamura, K., J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler, E. C. Lai (2007) "The Mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*." Cell **103**: 89-100.

Palazzo, A. F., T. R. Gregory (2014) "The case for junk DNA." PLOS Genetics **10**: 5.

Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Müller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson, G. Ruvkun (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA." Nature **408**: 86-89.

Pasquinelli, A. E (2012) "MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship." Nature Reviews Genetics **13**: 271-282.

Ponting, C. P., P. L. Oliver and W. Reik (2009). "Evolution and functions of long noncoding RNAs." Cell **136**(4): 629-641.

Poy, M. N., N. Eliasson, J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, X. Ma, P. E. MacDonald, S. Pfeffer, T. Tushcl, N. Rajewsky, P. Rorsman, M. Stoffel (2004). "A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion." Nature **432**: 226-230.

Rehmsmeier, M., P. Steffen, M. Höchsmann, R. Giegerich (2004). "Fast and effective prediction of microRNA/ target duplexes." RNA Journal **10**(10): 1508-1517.

Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, G. Ruvkun (2000). "The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**: 901-906.

Reis, E. M. and S. Verjovski-Almeida (2012). "Perspectives of Long Non-Coding RNAs in Cancer Diagnostics." Frontiers in Genetics **3**: 32.

Rinn, J. L., M. Kertesz, J. K. Wang, S. L. Squazzo, X. Xu, S. A. Brugmann, L. H. Goodnough, J. A. Helms, P. J. Farnham, E. Segal and H. Y. Chang (2007). "Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs." Cell **129**(7): 1311-1323.

Ruby, J. G., C. H. Jan, D. P. Bartel (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." Nature **448**: 83-87.

Selbach, M., B. Schwanhäusser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, N. Rajewsky (2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs." Nature **455**: 58-63.

Sheik Mohamed, J., P. M. Gaughwin, B. Lim, P. Robson, L. Lipovich (2010). "Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells." RNA **16**: 324-337.

Song, Y., F. Zhao, Z. Wang, Z. Liu, Y. Chiang, Y. Xu, P. Gao, H. Xu (2012). "Inverse association between miR-194 expression and tumor invasion in gastric cancer." Annals of Sugical Oncology **19**: S509-S517.

Struhl, K. (2007). "Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II." Nature Structural & Molecular Biology **14**(2): 103-105.

Sum, L., L. A. Goff, C. Trapnell, R. Alexander, K. A. Lo, E. Hacisuleyman, M. Sauvageau, B. Tazon-Veja, D. R. Kelley, D. G. Hendrickson, B. Yuan, M. Kellis, H. F. Lodish, J. L. Rinn (2013). "Long noncoding RNAs regulate adipogenesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(9): 3387-3392.

Taft, R. J., M. Pheasant and J. S. Mattick (2007). "The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity." BioEssays **29**(3): 288-299.

Taft, R. J., E. A. Glazov, N. Cloonan, C. Simons, S. Stephen, G. J. Faulkner, T. Lassmann, A. R. Forrest, S. M. Grimmond, K. Schroder, K. Irvine, T. Arakawa, M. Nakamura, A. Kubosaki, K. Hayashida, C. Kawazu, M. Murata, H. Nishiyori, S. Fukuda, J. Kawai, C. O. Daub, D. A. Hume, H. Suzuki, V. Orlando, P. Carninci, Y. Hayashizaki and J. S.

Mattick (2009). "Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals." Nature Genetics **41**(5): 572-578.

Taft, R. J., K. C. Pang, T. R. Mercer, M. Dinger and J. S. Mattick (2010). "Non-coding RNAs: regulators of disease." Journal of Pathology **220**(2): 126-139.

Trang, P., J. B. Weidhaas, F. J. Slack (2009). "MicroRNAs as potencial cancer therapeutics." Oncogene **27**: 52-57.

van Bakel, H., C. Nislow, B. J. Blencowe and T. R. Hughes (2010). "Most "dark matter" transcripts are associated with known genes." PLoS Biology **8**(5): e1000371.

Vlachos, I. S., M. D. Paraskevopoulou, D. Karagkouni, G. Georgakilas, T. Vergoulis, I. Kanellos, I. Anastasopoulos, S. Maniou, K. Karathanou, D. Kalfakakou, A. Fevgas, T. Dalamagas, A.G. Hatzigeorgiou (2014). “DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions.” Nucleic Acids Research 1-7.

Wan, G., X. Hu, Y. Liu, C. Han, A. K. Sood, G. A. Calin, X. Zhang, X. Lu (2013). "A novel non-coding RNA lncRNA-JADE connects DNA damage signalling to histone H4 acetylation." European Molecular Biology Organization Journal **32**: 2833-2847.

Wang, X., H. Yu, X. Lu, P. Zhang, M. Wang, Y. Hu (2014). "MiR-22 supresses the proliferation and invasion of gastric cancer cells by inhibiting CD151." Biochemical and Biophysical Research Communications **445**: 175-179.

Wapinski, O. and H. Y. Chang (2011). "Long noncoding RNAs and human disease." Trends in Cell Biology **21**(6): 354-361.

Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J. F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S. E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M. R. Brent, D. G. Brown, S. D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R. D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A. T. Chinwalla, D. M. Church, M. Clamp, C. Clee, F. S. Collins, L. L. Cook, R. R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K. D. Delehaunty, J. Deri, E. T. Dermitzakis, C. Dewey, N. J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D. M. Dunn, S. R. Eddy, L. Elnitski, R. D. Emes, P. Eswara, E. Eyras, A. Felsenfeld, G. A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W. N. Frankel, L. A. Fulton, R. S. Fulton, T. S. Furey, D. Gage, R. A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T. A. Graves, E. D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R. C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L. W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D. B. Jaffe, L. S. Johnson, M. Jones, T. A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E. K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W. J. Kent, A. Kirby, D. L. Kolbe, I. Korf, R. S. Kucherlapati, E. J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J. P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D. R. Maglott, E. R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J. H. Mayer, M. McCarthy, W. R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J. D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J. P. Mesirov, W. Miller, T. L. Miner, E. Mongin, K. T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J. C. Mullikin, D. M. Muzny, W. E. Nash, J. O. Nelson, M. N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M. J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E. Overton-Larty, L. Pachter, G. Parra, K. H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner, R. Plumb, C. S. Pohl, A. Poliakov, T. C. Ponce, C. P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B. A. Roe, K. M. Roskin, E. M. Rubin, A. G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M. S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J. B. Singer, G. Slater, A. Smit, D. R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N. Stange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D.

Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A. Ureta-Vidal, J. P. Vinson, A. C. Von Niederhausern, C. M. Wade, M. Wall, R. J. Weber, R. B. Weiss, M. C. Wendl, A. P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R. K. Wilson, E. Winter, K. C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S. P. Yang, E. M. Zdobnov, M. C. Zody and E. S. Lander (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." Nature **420**(6915): 520-562.

Watson, J. D., F. H. C. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids." Nature **171**: 737-738.

Westholm, J. O., E. C. Lai (2011). "Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing." Biochimie **93**(11): 1897-1904.

Wightman, B., I. Ha, G. Ruvkun (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in C. elegans." Cell **75**: 855-862.

Wilusz, J. E., H. Sunwoo and D. L. Spector (2009). "Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world." Genes & Development **23**(13): 1494-1504.

Wright, M. W. and E. A. Bruford (2011). "Naming 'junk': human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature." Human Genomics **5**(2): 90-98.

Wu, S. C., E. M. Kallin, Y. Zhang (2010). "Role of H3K27 methylation in the regulation of lncRNA expression." Cell Research **20**: 1109-1116.

Xu, Y., J. Wang, M. Qiu, L. Xu, M. Li, F. Jiang, R. Yin, L. Xu (2015). "Upregulation of the long noncoding RNA *TUG1* promotes proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma." Tumor Biology **36**: 1643-1651.

Yin, D., E. Zhang, L. You, N. Wang, L. Wang, F. Jin, W. Zhu, L. Cao, Q. Yuan, W. De, W. Tang (2015). "Downregulation of lncRNA *TUG1* affects apoptosis and insulin secretion in mouse pancreatic β cells." Cellular Physiology and Biochemistry **35**: 1892-1904.

Yoshino, H., H. Enokida, T. Chiyomaru, S. Tatarano, H. Hidaka, T. Yamasaki, T. Gotannda, T. Tachiwada, N. Nohata, T. Yamane, N. Seki, M. Nakagawa (2012). "Tumor supressive microRNA-1 mediated novel apoptosis pathways through direct inhibition of *splicing factor serine/ arginine-rich 9 (SRSF(/SRp30c)* in bladder cancer." Biochemical and Biophysical Research Communications **417**: 588-593.

Young, T. L., T. Matsuda, C. L. Cepko (2005). "The noncoding RNA *Taurine Upregulated Gene 1* is required for differentiation of the murine retina." Current Biology **15**: 501-512.

Zhang, E., D. Yin, M. Sun, R. Kong, X. Liu, L. You, L. Han, K. Wang, J. Yang, W. De, Y. Shu, Z. Wang (2014). "P53-regulated long non-coding RNA *TUG1* affects cell proliferation in human non-small cell lung cancer, partly through epigenetically regulating HOXB7 expression." Cell Death and Disease **5**: e1243.

Zhang, J., C. Zhao, S. Zhang, D. Yu, Y. Chen, Q. Liu, M. Shi, C. Ni, M. Zhu (2014). "Upregulation of miR-194 contributes to tumor growth and progression in pancreatic ductal adenocarcinoma." Oncology Reports **31**: 1157-1164.

Zhang, Q., P. Geng, P. Yin, X. Wang, J. Jia, J. Yao (2013). "Down-regulation of long non-coding RNA *TUG1* inhibits osteosarcoma cell proliferation and promotes apoptosis." Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **14**: 2311-2315.

Zhang, Y., X. Zhang, T. Chen, J. Xiang, Q. Yin, Y. Xing, S. Zhu, L. Yang, L. Chen (2013). "Circular intronic long noncoding RNAs." Molecular Cell **51**: 1-15.

Zhang, Y., M. Fan, X. Zhang, F. Huang, K. Wu, J. Zhang, J. Liu, Z. Huang, H. Luo, L. Tao, H. Zhang (2014). "Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs." RNA Journal **20**: 1878-1889.

Zhang, Z., Z. Zhu, K. Watabe, X. Zhang, C. Bai, M. Xu, F. Wu, Y. Mo (2013). "Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21." Cell Death and Differentiation **20**(11): 1558-1568.

Zhao, J., T. K. Ohsumi, J. T. Kung, Y. Ogawa, D. J. Grau, K. Sarma, J. J. Song, R. E. Kingston, M. Borowsky, J. T. Lee (2010). "Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-Seq." Molecular Cell **40**: 939-953.