UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Carlos DeOcesano-Pereira

INXS, um longo RNA não codificador de proteínas mediador da apoptose

SÃO PAULO

Data do Depósito na SPG:

27/11/2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

DeOcesano-Pereira, Carlos
D418i *INXS*, um longo RNA não codificador de proteínas mediador da apoptose / Carlos DeOcesano-Pereira. -- São Paulo, 2014.
115p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Verjovski-Almeida, Sergio

1. Biologia molecular 2. Expressão gênica 3. RNA 4. Apoptose 5. Câncer I. T. II. Verjovski-Almeida, Sergio, orientador.

574.88 CDD

Carlos DeOcesano-Pereira

INXS, um longo RNA não codificador de proteínas mediador da apoptose

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

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

São Paulo
2014

Carlos DeOcesano-Pereira

***INXS*, um longo RNA não codificador de proteínas mediador da apoptose**

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, particularmente aos meus pais, pela constante presença e compreensão diante das minhas escolhas. Afinal, eles sabem que a Ciência, ao lado da Arte, é o que dá vazão à minha inquietação nesse universo.

Ao Prof. Dr. Sergio Verjovski-Almeida, pela oportunidade de desenvolver essa tese de doutorado sob sua orientação. Obrigado pelos ensinamentos, críticas construtivas, liberdade científica e estímulos à criatividade.

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos, com os quais eu tive a oportunidade de conhecer, conviver e aprender.

À Prof. Dra. Mari Cleide Sogayar, por me acolher no NUCEL durante uma fase importante e difícil da minha vida. Obrigado pelos conselhos profissionais e pessoais, e por me mostrar que a Ciência só faz sentido se for compartilhada.

A todos os amigos e colegas do NUCEL, um ambiente que por si só faz jus ao nome que possui.

Ao Prof. Dr. Eduardo Reis e a todos os membros do seu laboratório. Foi um grande prazer dividir com vocês tantos momentos agradáveis e produtivos.

À minha amiga Lauren Camargo, um “espelho meu” de luz própria.

Ao Ricardo Cesar Cintra, meu “*brother*”.

À Ana Paula Lopes Vidal, pela eficiência burocrática que por diversas vezes tornou a minha vida mais fácil.

Ao grande cientista Charles Robert Darwin (1809 – 1882), uma fonte viva e eterna de inspiração para os amantes da Ciência.

A todos os funcionários do Instituto de Química e do Departamento de Bioquímica pelos diversos serviços prestados.

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

"Renunciar ao mundo sem conhecê-lo, é terminar numa solidão estéril, talvez melancólica. Isso nada tem em comum com a solidão da vida contemplativa do pensador: quando ele escolhe essa solidão não quer de modo nenhum renunciar; seria para ele, pelo contrário, abandono, melancolia, destruição de si próprio permanecer na vida prática - ele renuncia a esta, porque a conhece, porque se conhece. É assim que dá um mergulho em sua água, é assim que conquista sua serenidade."

Friedrich Nietzsche (1844 – 1900)

RESUMO

DeOcesano-Pereira, C. ***INXS*, um longo RNA não codificador de proteínas mediador da apoptose.** 2014. 112 p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X* produz duas isoformas de mRNAs com funções antagônicas, a pró-apoptótica *BCL-XS* e a anti-apoptótica *BCL-XL*, cujo balanço regula a homeostasia celular. Entretanto, o mecanismo que regula esse processamento ainda é desconhecido. Nesse trabalho, nós identificamos e caracterizamos um longo RNA não codificador de proteínas (lncRNA) nomeado *INXS*, que é transcrito a partir da fita oposta do *locus* genômico de *BCL-X*, sendo menos abundante em linhagens celulares tumorais e tecidos tumorais de pacientes quando comparados com os respectivos pares não tumorais. *INXS* é um RNA *unspliced* de 1903 nts, é transcrito pela RNA Polimerase II, possui cap 5', está enriquecido na fração nuclear das células e se liga à proteína Sam68 do complexo modulador de *splicing*. O tratamento de células tumorais 786-O com cada um de três agentes indutores de apoptose aumentou a expressão endógena do *INXS*, levando ao aumento expressivo da proporção entre os mRNAs de *BCL-XS* / *BCL-XL*, e ativação das caspases 3, 7 e 9. Estes efeitos foram anulados na presença do *knockdown* do *INXS*. Da mesma forma, a super-expressão ectópica do *INXS* causou uma mudança no *splicing* favorecendo a isoforma *BCL-XS* e ativação das caspases, aumentando os níveis da proteína *BCL-XS* e conduzindo as células à apoptose. Utilizando um modelo *in vivo*, cinco injeções intra-tumorais do *INXS* durante 15 dias causaram uma regressão acentuada no volume dos xenotumores. Portanto, *INXS* é um lncRNA que induz a apoptose, sugerindo que essa molécula seja um possível alvo a ser explorado na terapia contra o câncer.

Palavras-chaves: RNA não codificador antisenso; apoptose; *splicing* alternativo; *BCL-X*.

ABSTRACT

DeOcesano-Pereira, C. ***INXS*, a long noncoding RNA that mediates apoptosis.** 2014. 112 p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BCL-X mRNA alternative splicing generates pro-apoptotic *BCL-XS* or anti-apoptotic *BCL-XL*, whose balance regulates cell homeostasis. However, the mechanism that regulates the splice shifting is incompletely understood. Here, we identified and characterized a long noncoding RNA (lncRNA) named *INXS*, transcribed from the opposite genomic strand of *BCL-X*, that was less abundant in tumor cell lines and patient tumor tissues compared with non-tumors. *INXS* is an unspliced 1903 nt-long RNA, is transcribed by RNA Polymerase II, 5'-capped, nuclear enriched and binds Sam68 splicing-modulator. The treatment of tumor cell line 786-O with each of three apoptosis-inducing agents increased endogenous *INXS* lncRNA, increased *BCL-XS* / *BCL-XL* mRNA ratio, and activated caspases 3, 7 and 9. These effects were abrogated in the presence of *INXS* knockdown. Similarly, ectopic *INXS* overexpression caused a shift in splicing towards *BCL-XS* and activation of caspases, increasing the levels of BCL-XS protein and then leading the cells to apoptosis. In a mouse xenograft model, five intra-tumor injections of *INXS* along 15 days caused a marked regression in tumor volume. *INXS* is an lncRNA that induces apoptosis, suggesting that *INXS* is a possible target to be explored in cancer therapies.

Keywords: Antisense long noncoding RNA; apoptosis; alternative splicing; *BCL-X*.

Lista de abreviaturas e siglas

ANRASSF1:	*Antisense Noncoding RNA RASSF1*
ASO:	*Antisense Oligonucleotide*
ATCC:	*American Type Culture Collection*
BCL-2:	*B-cell lymphoma 2*
BCL2L1:	*BCL2-like 1*
BCL-XL:	*B-cell lymphoma-extra large*
BCL-XS:	*B-cell lymphoma-small*
Cap 5':	7-metilguanosina na extremidade 5' de RNAs
cDNA:	DNA complementar
ChIP:	Imunoprecipitação da cromatina
COBEA:	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPC:	*Coding Potential Calculator*
Ct:	*Threshold cycle*
DEPC:	Dicarbonato de dietila
DMSO:	Dimetil-sulfoxido
DNA:	*Deoxyribonucleic Acid*
ENCODE:	*Encyclopedia of DNA Elements*
EST:	*Expressed sequence tag*
H3K4me3:	Trimetilação da lisina 4 da histona 3
IgG:	Imunoglobulina G
INXS:	*Intronic BCL-XS-inducing Long Noncoding RNA*
kb:	kilobases
lincRNA:	RNA longo e intergênico não codificador de proteínas
lncRNA:	RNA longo não codificador de proteínas
miRNA:	microRNAs
mRNA:	RNA mensageiro
MYC:	*Myc proto-oncogene protein*
ncRNA:	RNA não codificador de proteínas
Nt:	Nucleotídeos
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
piRNA:	*Piwi-interacting RNA*
PRC2:	Complexo repressivo polycomb 2
qPCR:	PCR quantitativa
RACE:	*Rapid Amplification of cDNA Ends*
RASSF1A:	*RAS association domain family 1A*
RIN:	*RNA Integrity Number*
RIP:	Imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos
RNA:	*Ribonucleic acid*
RNAP II:	RNA Polimerase II
RNAP III:	RNA Polimerase III
RNA-Seq:	Sequenciamento em larga escala de RNA
rRNA:	RNA ribossomal

RT:	Transcriptase reversa
RT-qPCR:	Transcrição reversa sequida de PCR quantitativa
SCRB:	*Scrambled*
SF:	*Splicing factors*
SFB:	Soro fetal bovino
SFN:	D,L-Sulforafano
siRNA:	Pequeno RNA de interferência
snoRNA:	Pequeno RNA nucleolar
snRNA:	Pequeno RNA nuclear
TAP:	*Tobacco Acid Pyrophosphatase*
tRNA:	RNA transportador
TSS:	Sítio de início da transcrição
UTR:	*Untranslated region*
VDAC2:	*Voltage-Dependent Anion-selective Channel*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 12
1.1. O gene *BCL-X* e suas isoformas.....12
1.2. O transcriptoma eucariótico e sua complexidade 14
1.3. Longos RNAs não codificadores de proteínas em eucariotos.....18
1.4. Longos RNAs não codificadores de proteínas e apoptose 20
2. OBJETIVOS 22
2.1. Objetivo geral 22
2.2. Objetivos específicos 22
3. MATERIAIS E MÉTODOS 23
3.1. Linhagens celulares humanas e condições de cultivo 23
3.2. Biogênese pela RNA Polimerase II e ensaio de estabilidade.....24
3.3. Análise da presença de modificação cap 5' por ensaio enzimático 25
3.4. Amostras dos pacientes com tumores de rim.....26
3.5. Animais.....26
3.6. Extração de RNA, purificação e tratamento com DNase.....26
3.7. Avaliação da integridade do RNA 27
3.8. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*).....28
3.9. Transcrição reversa e síntese de cDNA 31
3.9.1. Transcrição reversa com oligo-dT(20) 31
3.9.2. Transcrição reversa fita específica 31
3.10. Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR).....32
3.10.1. PCR 32
3.10.2.PCR quantitativa em tempo real – quantificação relativa 32
3.10.3.PCR quantitativa em tempo real – quantificação absoluta 34
3.11. RACE-PCR 35
3.12. Fracionamento celular 35
3.13. Indução da expressão endógena do lncRNA *INXS*.....36
3.14. Clonagem molecular.....37
3.15. Ensaio de gene repórter para o promotor do *INXS* 38
3.16. Super-expressão transiente dos plasmídeos.....40
3.17. Transfecção com oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs).....41
3.18. Determinação fluorimétrica da atividade de caspases 43
3.19. Ensaio de morte celular por apoptose 43

3.20. Microscopia de fluorescência 44
3.21. *Western blotting* 45
3.22. Imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos - RIP 47
3.23. Ensaios de tumorigênese *in vivo* usando camundongos 47
3.24. Imageamento dos animais 48
3.25. Histologia dos xenotumores 49
3.26. Análise estatística 49
4. RESULTADOS 50
4.1. *INXS* é um longo RNA não codificador de proteínas *unspliced* e antisenso ao gene *BCL-X* 50
4.2. *INXS* é menos abundante em um conjunto de linhagens celulares humanas tumorais e tecidos tumorais de rim quando comparados com células e tecidos não tumorais 52
4.3. Caracterização estrutural do lncRNA *INXS* 56
4.3.1. Biogênese do *INXS* 56
4.3.2. O *INXS* possui a estrutura cap 5' 58
4.3.3. Estimativa da meia-vida do *INXS* 59
4.3.4. *INXS* encontra-se predominantemente enriquecido na fração nuclear 60
4.3.5. A expressão endógena do *INXS* é dirigida por um promotor independente e unidirecional 61
4.4. O *knockdown* do *INXS* em uma linhagem celular não tumoral leva à uma redução significativa da proporção entre as isoformas *BCL-XS* / *BCL-XL* 63
4.5. Agentes indutores de apoptose levam ao aumento da expressão endógena do *INXS* 64
4.6. *INXS* é um lncRNA mediador do processo de morte celular causada por agentes indutores de apoptose 68
4.7. A super-expressão do *INXS* altera o *splicing* do gene *BCL-X* aumentando a abundância da isoforma *BCL-XS* e levando as células à apoptose 74
4.8. A super-expressão do *INXS* aumenta os níveis da proteína *BCL-XS* e ativa as caspases 3, 7 e 9..... 81
4.9. *INXS* se liga com a proteína Sam68 do complexo modulador de *splicing*, porém a super-expressão ou *knockdown* do lncRNA não altera o *splicing* de outros genes alvos de Sam68 85
4.10. *INXS* induz a regressão tumoral *in vivo* utilizando modelos animais 87
5. DISCUSSÃO 93
6. CONCLUSÃO 100
7. REFERÊNCIAS 101

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gene *BCL-X* e suas isoformas

BCL-X (*BCL2L1*) é um gene que codifica um membro chave da família de proteínas BCL-2 capaz de controlar o crescimento das células tumorais e o processo de morte celular por apoptose (Cory and Adams 2002; Tait and Green 2010; Kelly and Strasser 2011). O *splicing* alternativo do exon 2 no pré-mRNA de *BCL-X* produz duas isoformas, um mRNA denominado de isoforma longa (*BCL-XL*) e outro de isoforma curta (*BCL-XS*), que foram inicialmente descritaos como exercendo funções antagônicas na via apoptótica (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993) (Figura 1). O mecanismo que regula o deslocamento do *splicing* entre estas duas isoformas não é completamente compreendido, porém sabe-se que o balanço da abundância entre as mesmas caracteriza a homeostasia celular, disparando ou não o mecanismo de apoptose (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993). *BCL-XL*, o mRNA correspondente à isoforma anti-apoptótica, é altamente expresso em um grande número de tumores (Plati, Bucur et al. 2011) e os níveis elevados desse mRNA estão frequentemente associados com a agressividade de tumores e / ou com a quimioresistência (Kelly and Strasser 2011; Zeuner, Francescangeli et al. 2014). De maneira oposta, a abundância do mRNA correspondente à isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* é muito baixa nas células tumorais, e a super-expressão da proteína derivada desse mRNA mais curto é capaz de sensibilizar as células tumorais à agentes quimioterapêuticos (Sumantran, Ealovega et al. 1995; Minn, Boise et al. 1996; Taylor, Zhang et al. 1999; Mercatante, Bortner et al. 2001), induzindo a apoptose em células de melanoma (Hossini, Eberle et al. 2003; Plotz, Gillissen et al. 2012).

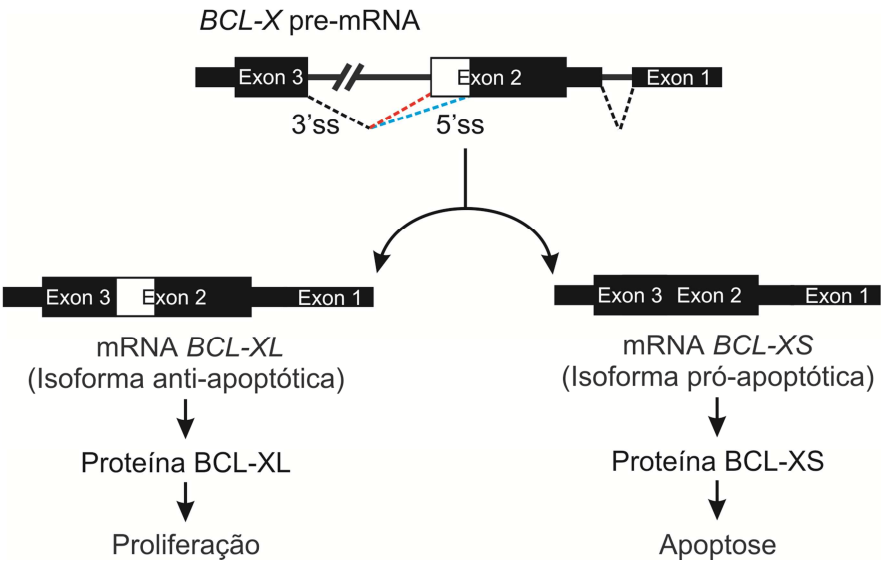

Figura 1. *Splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X*. O uso de um sítio 5' doador de *splicing* alternativo distal (5'-*splice site* (5'ss), linha descontínua azul) presente no exon 2 produz a isoforma mais curta, a variante de *splicing* pró-apoptótica, *BCL-XS*. Por outro lado, o uso do sítio 5' doador de *splicing* proximal (5'-*splice site* (5'ss), linha descontínua vermelha) resulta na síntese da isoforma mais longa, a variante anti-apoptótica, *BCL-XL*. Ao contrário da proteína BCL-XL, a proteína BCL-XS leva as células à morte celular por apoptose. Retângulos pretos mais espessos: exons codificadores de proteína; retângulos pretos mais finos: UTRs (3'e 5'); linhas sólidas e pretas: introns; retângulo espesso e branco: região do exon 2 (189 nts) presente somente no pré-mRNA e na isoforma longa.

Tem sido demonstrado que o processamento alternativo do pré-mRNA de *BCL-X* envolve uma série de proteínas, tais como os fatores moduladores de *splicing* (*SF*, *splicing factors*), componentes do complexo de junção dos exons (Massiello, Roesser et al. 2006; Paronetto, Achsel et al. 2007; Zhou, Ou et al. 2008; Moore, Wang et al. 2010; Michelle, Cloutier et al. 2012; Montes, Cloutier et al. 2012), ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs) (Garneau, Revil et al. 2005; Revil, Pelletier et al. 2009), e também alguns motivos chamados de *cis*-elementos presentes no pré-mRNA de *BCL-X* (Massiello, Salas et al. 2004; Lee, Zhou et al. 2012). Apesar disso, pouco é conhecido sobre a regulação do mecanismo molecular do *splicing* de *BCL-X*.

1.2. O transcriptoma eucariótico e sua complexidade

Nos últimos 50 anos, a programação genética dos humanos e de outros organismos complexos tem sido interpretada de maneira incompleta (Mattick 2011). Em parte esse equívoco se deve ao conceito de que o fluxo da informação genética se dava principalmente no sentido DNA→RNA→proteína, isto é, de maneira canônica e unidirecional, o que era conhecido como o dogma central da biologia molecular (Crick 1958). Até então, argumentava-se que os RNAs tinham um papel limitado a elementos intermediários desse processo, enquanto as proteínas seriam as responsáveis por exercer a maior parte das funções estruturais, catalíticas e regulatórias das células (Crick 1958). Alguns anos depois, Crick respondeu às críticas de que o dogma central era uma simplificação excessiva e esclareceu a sua intenção inicial. Ele atualizou o conceito inicial, de modo que o RNA não deveria ser considerado apenas como um elemento funcional de propósito único, mas teria um papel mais versátil, o que possibilitaria que a informação fluísse de volta para o genoma (Crick 1970).

Embora o cenário da genética tenha amadurecido bastante nas últimas décadas, o papel funcional dos RNAs permaneceu por muito tempo focado exclusivamente na produção de proteínas, com poucas exceções notáveis (Gingeras 2007). Acreditava-se que o transcriptoma dos eucariotos era composto por RNAs mensageiros (mRNAs), RNAs transportadores (tRNAs), RNAs ribossomais (rRNAs), e pequenos RNAs nucleares (*small nuclear* RNAs, snRNA; *small nucleolar* RNAs, snoRNA), que exercem funções estruturais e catalíticas no processamento do mRNA ou na tradução das proteínas. Entretanto, apenas uma pequena fração do genoma humano, cerca de 2,2%, corresponde a esses produtos funcionais, onde estão presentes principalmente os mRNAs (Frith, Pheasant et al. 2005).

O sequenciamento de diversos genomas e os avanços recentes de análises genômicas em larga escala tem revelado que a complexidade biológica não está diretamente relacionada ao número de genes codificadores de proteínas de seu genoma (Taft, Pheasant 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 - 25,000 (Waterston, Lindblad-Toh et al. 2002; Collins, Lander et al. 2004), sendo próximo do número de genes de eucariotos ancestrais menos complexos como *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*, que possuem 13,000 e 19,000, respectivamente (Consortium 1998; Adams, Celniker et al. 2000). Apesar das enormes diferenças fenotípicas na complexidade entre esses organismos, ainda não está totalmente claro onde estão armazenadas as informações que programam o desenvolvimento e como estas se diferem entre esses organismos.

O aumento das taxas de *splicing* alternativo, o uso de promotores e sítios de terminação alternativos, e os eventos de edição de RNAs em organismos mais complexos parecem responder pelas discrepâncias que existem entre a complexidade dos organismos e sua diversidade genética, permitindo assim a expressão de um conjunto maior de isoformas de proteínas (Nagasaki, Arita et al. 2005; Gingeras 2007; Taft, Pheasant et al. 2007; Farajollahi and Maas 2010). Outro aspecto que pode responder essas pergunta, é o aumento da proporção de DNA não codificador de proteínas presente no genoma dos organismos, que pode variar de 0,25% do DNA total no genoma de procariotos até mais que 98% do DNA total no genoma humano (Taft, Pheasant et al. 2007). Estas observações sugerem que novos RNAs não codificadores (ncRNAs) originados destas regiões possam fornecer um repertório maior de moléculas com funções regulatórias que permitiram o desenvolvimento dos eucariotos (Mattick 2007; Taft, Pheasant et al. 2007).

Diversas técnicas de estudo, baseadas em clonagem e sequenciamento de bibliotecas de cDNAs (Numata, Kanai et al. 2003; Ota, Suzuki et al. 2004; Carninci, Kasukawa et al. 2005; Katayama, Tomaru et al. 2005), *tilling arrays* (Kapranov, Cawley et al. 2002; Rinn, Euskirchen et al. 2003; Bertone, Stolc et al. 2004; Kampa, Cheng et al. 2004) e mais recentemente sequenciamento em larga escala (Guttman, Garber et al. 2010; Kapranov, St

Laurent et al. 2010; Almeida, Amaral et al. 2012; Mercer, Gerhardt et al. 2012), têm sido utilizadas para investigar em larga escala a transcrição do genoma eucariótico humano, ou por exemplo de *Schistosoma mansoni*, demonstrando que o transcriptoma de eucariotos é surpreendentemente complexo. Ficou evidente que a transcrição ocorre principalmente em regiões não codificadoras de proteínas, indicando que esta acontece de forma generalizada no genoma eucariótico (Mattick 2011). Esses transcritos podem ser expressos em ambas as fitas, 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, Pheasant et al. 2005; Birney, Stamatoyannopoulos et al. 2007; Kapranov, Willingham et al. 2007; Nakaya, Amaral et al. 2007; Ponting, Oliver et al. 2009).

O projeto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements Consortium*), em 2007, analisou 1% do genoma humano através de várias técnicas, incluindo *tiling arrays* genômicos e sequenciamento de bibliotecas de cDNA, demonstrando que, se os dados fossem extrapolados para o restante do genoma, pelo menos 90% do DNA genômico seria transcrito em diferentes células humanas, sendo que desta fração apenas 1,2% é capaz de codificar proteínas (Birney, Stamatoyannopoulos et al. 2007). Mais recentemente essa análise foi estendida para todo o genoma e os autores observaram que mais de 50% dos transcritos anotados, que se originam de 75 % de todo o genoma, não tem potencial de codificar proteínas (ENCODE, 2011). Do mesmo modo, a análise do transcriptoma de outros organismos eucarióticos mostrou que a transcrição generalizada do genoma não é restrita apenas à humanos, mas tem revelado, por exemplo, que pelo menos 70% do genoma de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, levedura e camundongo são transcritos (Carninci, Kasukawa et al. 2005; David, Huber et al. 2006; Amaral and Mattick 2008; Gerstein, Lu et al. 2010; Roy, Ernst et al. 2010).

Essas descobertas têm alterado e expandido a compreensão da organização dos genomas eucarióticos, e têm sido utilizadas como argumento para apoiar a ideia de que os ncRNAs contribuem com funções regulatórias essenciais para o ganho de complexidade, de modo análogo aos mecanismos já bem descritos de *splicing* alternativo, utilização de promotores e sítios de terminação alternativos e modificações pós-transcricionais (Taft, Pheasant et al. 2007). Dessa forma, vários estudos têm mostrado que os ncRNAs são regulados durante o desenvolvimento, possuem expressão tecido específica, localizam-se em compartimentos subcelulares, são regulados durante o ciclo celular, estão associados com uma ampla variedade de doenças humanas, incluindo o câncer, e se associam a complexos proteicos remodeladores da cromatina (Reis, Nakaya et al. 2004; Nakaya, Amaral et al. 2007; Sunwoo, Dinger et al. 2009; Taft, Pang et al. 2010; Guttman, Donaghey et al. 2011; Hung, Wang et al. 2011; Tahira, Kubrusly et al. 2011). Além disso, evidências de seleção evolutiva têm sido observadas em alguns ncRNAs (Ponjavic, Ponting et al. 2007; Guttman, Amit et al. 2009; Ponting, Oliver et al. 2009; Marques and Ponting 2014; Necsulea, Soumillon et al. 2014).

Contudo, existe um debate intenso na literatura sobre o real significado biológico da transcrição generalizada do genoma, motivado pelo fato de que a maioria dos ncRNAs é expressa em baixos níveis na célula, e de que a maior parte destes transcritos ainda não foi caracterizada funcionalmente. Essas questões têm levantado a hipótese de que estes transcritos possam na verdade ser possíveis ruídos transcricionais ou artefatos técnicos (Struhl 2007; van Bakel, Nislow et al. 2010). Recentemente, uma nova técnica denominada RNA *Capture-Seq,* que combina microarranjo de captura de cDNA e sequenciamento em larga escala para aumentar a sensibilidade de detecção do transcriptoma em *loci* específicos (Mercer, Gerhardt et al. 2012), possibilitou uma rápida resposta aos questionamentos levantados principalmente por van Bakel e colaboradores. Esses dados confirmaram que as

regiões intergênicas expressam uma grande variedade de transcritos, e ainda revelaram novos transcritos, que até então não tinham sido detectados por nenhuma técnica disponível, assim como identificaram novas isoformas até agora desconhecidas, mesmo para genes codificadores de proteínas já bem caracterizados, tais como *p53* e *p73* (Mercer, Gerhardt et al. 2012).

1.3. Longos RNAs não codificadores de proteínas em eucariotos

RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs) são convencionalmente classificados em ncRNAs longos (lncRNAs), quando possuem mais de 200 nucleotídeos, e ncRNAs curtos, quando possuem menos de 200 nucleotídeos. Essa classificação foi estabelecida com base em uma prática conveniente dos protocolos de purificação de RNA, onde os RNAs menores que 200 nucleotídeos geralmente são excluídos (Mercer, Dinger et al. 2009). Dentre os ncRNAs curtos (< 200 nt) incluem-se os miRNAs, siRNAs, *piwi-interacting* RNAs (piRNAs), pequenos RNAs associados à regiões promotoras e de iniciação da transcrição, entre outros (Girard, Sachidanandam et al. 2006; Carthew and Sontheimer 2009; Fejes-Toth, Sotirova et al. 2009; Taft, Glazov et al. 2009).

A literatura encontra-se muito bem povoada por trabalhos de ncRNAs curtos (< 200 nt), porém, nos últimos anos tem havido um aumento significativo no número de estudos que têm reportado a funcionalidade e diversidade de lncRNAs (> 200 nt) que mapeiam em regiões intrônicas e intergênicas (Birney, Stamatoyannopoulos et al. 2007; Nakaya, Amaral et al. 2007; Dinger, Amaral et al. 2009; Kapranov, St Laurent et al. 2010). A definição e a nomeação dos lncRNAs ainda estão em processo de evolução na literatura, e diferentes classes ou categorias de lncRNAs têm sido descritas (Wright and Bruford 2011).

Algumas classes de lncRNAs já têm sido bem estudadas e caracterizadas. Uma delas é a dos ncRNAs longos intergênicos (lincRNA), definidos como transcritos em uma região distante pelo menos 1 kb de algum gene codificador de proteína, e que podem ou não sofrer

splicing. Outra classe é a dos ncRNAs longos antisenso (lncRNA-AS), que possuem sobreposição com introns de genes codificadores de proteina, e podem ou não sofrer *splicing*. Essas duas classes de lncRNAs apresentam características semelhantes a dos mRNAs codificadores de proteínas tais como: a presença da estrutura cap na ponta 5' do RNA, transcrição a partir de uma região promotora independente (identificada por meio da marca de histona H3K4me3) e presença da RNA Polimerase II no sítio de início de transcrição (TSS) (Guttman, Amit et al. 2009; Conley and King Jordan 2012). Além disso, alguns trabalhos têm mostrado que esses transcritos podem ou não ser poli-adenilados, e que podem se acumular diferentemente no compartimento nuclear ou citoplasmático da célula (Kapranov, Cheng et al. 2007; Kapranov, St Laurent et al. 2010).

Apesar do grande repertório dos lncRNAs no transcriptoma, essas moléculas apresentam de maneira geral uma baixa expressão quando comparada à dos genes codificadores de proteínas, e muitos possuem expressão tecido específica (Birney, Stamatoyannopoulos et al. 2007; Cabili, Trapnell et al. 2011). Além disso, evidências têm apontado para o envolvimento de lncRNAs com diversas doenças humanas (Taft, Pang et al. 2010; Esteller 2011; Wapinski and Chang 2011), especialmente com o câncer (Prensner and Chinnaiyan 2011; Reis and Verjovski-Almeida 2012; Spizzo, Almeida et al. 2012; Cheetham, Gruhl et al. 2013).

Os lncRNAs podem desempenhar papéis regulatórios e estruturais em importantes processos biológicos, podendo atuar por meio de diversos mecanismos moleculares (Clark and Mattick 2011; Wang, Song et al. 2011). De maneira geral, há fortes evidências que o mecanismo de ação dos lncRNAs envolve a interação entre esses RNAs e proteínas (Khalil and Rinn 2011), especialmente proteínas que compõem complexos remodeladores da cromatina com funções tanto ativadoras como repressoras da expressão gênica (Khalil, Guttman et al. 2009; Flynn and Chang 2012). Alguns trabalhos têm indicado que além de

interagir com estes complexos proteicos remodeladores da cromatina, os lncRNAs se ligam ao DNA formando um híbrido RNA / DNA, guiando os complexos para sítios específicos do genoma para executar sua função (Chu, Qu et al. 2011; Mattick 2012; Beckedorff, Ayupe et al. 2013). Por fim, alguns lncRNA podem promover a ativação dos complexos proteicos alvos mediante modificações alostéricas (Mattick 2012).

1.4. Longos RNAs não codificadores de proteínas e apoptose

LncRNAs são protagonistas de grande importância no câncer (Huarte and Rinn 2010; Hung, Wang et al. 2011; Nie, Wu et al. 2012; Cheetham, Gruhl et al. 2013; Luo, Tang et al. 2014). Apesar de já terem sido bem reconhecidos como reguladores finos da expressão gênica, principalmente através do recrutamento de enzimas modificadoras de histonas e de proteínas moduladoras de ligação à DNA que atuam sobre diferentes genes e vias (Guttman and Rinn 2012; Beckedorff, Amaral et al. 2013; Kung, Colognori et al. 2013), o controle do *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X* por lncRNAs ainda não foi investigado.

Alguns lncRNAs potencialmente oncogênicos (ou pró-oncogênicos) ou com funções anti-apoptóticas tais como os lncRNAs *PCGEM1*, *PANDA* e *CARLo-5* já foram identificados (Mourtada-Maarabouni, Pickard et al. 2009; Huarte, Guttman et al. 2010; Luo, Tang et al. 2014), mas nenhum deles atua sobre a família de genes anti-apoptóticos de *BCL-2*. Do mesmo modo, embora quatro lncRNAs com atividades supressoras de tumor ou pró-apoptóticas tenham sido bem caracterizados, os quais foram nomeadaos de *lincRNA-p21*, *GAS5*, ncRNA *CCND1* e *MEG3* (Wang, Arai et al. 2008; Mourtada-Maarabouni, Pickard et al. 2009; Huarte, Guttman et al. 2010; Zhang, Rice et al. 2010), nenhum deles atua diretamente sobre membros da via apoptóica de *BCL-2*.

Desde muito tempo já é conhecido que os pequenos RNAs nucleares (snRNAs) são essenciais para a modulação do *splicing* alternativo, juntamente com as proteínas *SF* e hnRNPs, que são componentes do *spliceossomo*. Embora uma análise computacional tenha

revelado uma extensa relação entre a expressão de lncRNAs e o *splicing* alternativo no genoma humano (Morrissy, Griffith et al. 2011), apenas um número muito limitado de lncRNAs são capazes de modular diretamente o processamento alternativo de pré-mRNAs, e são mencionados a seguir. Assim, foi mostrado que um transcrito endógeno e antisenso para o *N-myc* forma um duplex RNA / RNA o que leva à retenção do intron 1 no mRNA de *N-myc* (Krystal, Armstrong et al. 1990), no entanto, o significado funcional desse *splicing* alternativo ainda não foi elucidado (Krystal, Armstrong et al. 1990).

Além disso, o *splicing* alternativo do gene que codifica a proteína Fas é influenciado pela transcrição antisenso do lncRNA *Saf* (Yan, Hong et al. 2005), o que torna as células mais resistentes à apoptose mediada por Fas, caracterizando o *Saf* como um lncRNA com função anti-apoptótica (Yan, Hong et al. 2005). De um modo semelhante, um transcrito antisenso regula o *splicing* de *Zeb2*, e contribui para o aumento na produção da proteína oncogênica Zeb2 em tumores humanos (Beltran, Puig et al. 2008). *MALAT1* é o único exemplo de um lncRNA com potencial oncogênico (Ji, Diederichs et al. 2003; Tripathi, Shen et al. 2013) que age indiretamente sobre o *splicing* alternativo através da modulação da fosforilação da proteína SR (Tripathi, Ellis et al. 2010).

No presente trabalho, nós caracterizamos um novo lncRNA cujos níveis endógenos podem favorecer o acúmulo da isoforma pró-apoptótica da proteína *BCL-XS*, tendo assim uma atividade supressora de tumor. Este lncRNA é transcrito a partir do *locus* genômico de *BCL-X*, porém no sentido antisenso em relação ao mRNA de *BCL-X*, e foi nomeado de *INXS*, para *intronic BCL-XS-induzing lncRNA*. Os nossos resultados apontam fortemente o *INXS* como um mediador fundamental da apoptose, que integra as condições ambientais prejudiciais à célula aos eventos moleculares que levam à morte celular (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho buscou caracterizar estrutural e funcionalmente o *INXS*, um longo RNA não codificador de proteínas intrônico e *unspliced*, expresso na orientação antisenso ao gene *BCL-X*. Para isso, foi investigado o envolvimento desse lncRNA nos mecanismos regulatórios que levam ao *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X* e o fenótipo gerado por esse tipo de controle pós-transcricional.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar o *INXS* quanto à sua expressão antisenso, seu possível tamanho completo, sua biogênese, presença da modificação cap 5', estabilidade, localização subcelular e abundância absoluta e relativa em linhagens celulares;
2. Identificar e caracterizar a região promotora do *INXS* para validar este lncRNA como uma unidade transcricional independente;
3. Avaliar os efeitos da super-expressão e do *knockdown* do *INXS* sobre a expressão das isoformas de *BCL-X;*
4. Identificar o possível mecanismo de regulação do *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X* pelo lncRNA *INXS*;
5. Identificar o fenótipo da super-expressão ou *knockdown* do *INXS* em culturas de células humanas tumorais e não tumorais e o efeito funcional desse lncRNA como um possível supressor tumoral *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares humanas e condições de cultivo

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas 14 linhagens celulares humanas diferentes. Todas as linhagens foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*) e cultivadas a 37 ^{o}C em atmosfera de 5% de CO_2 em meio de cultura apropriado e específico, conforme determinado pela ATCC. A principal linhagem celular humana utilizada foi a 786-O, derivada de adenocarcinoma de células claras de rim, que é amplamente utilizada pela comunidade científica para diversos estudos. As demais linhagens celulares utilizadas foram HEK293 (célula embrionária de rim); RC-124 (célula não tumoral de rim); HK2 (célula não tumoral de rim); CaKi-1 (célula tumoral de rim); 769-P (célula tumoral de rim); THLE-3 (célula não tumoral de fígado); HepG2 (célula tumoral de fígado); MCF10A (célula não tumoral de mama); MCF7 (célula tumoral de mama); HeLa (célula de adenocarcinoma cervical); RWPE-1 (célula não tumoral de próstata); LNCaP (célula tumoral de próstata); DU145 (célula tumoral de próstata) e PC3 (célula tumoral de próstata). Este conjunto de linhagens foi utilizado nos experimentos de RT-PCR fita-específica descrito no item 3.9.2 e a linhagem 786-O também foi utilizada nos experimentos de apoptose descritos no item 3.19 e nos ensaios de tumorigênese *in vivo* no item 3.23.

O meio de cultura recomendado e utilizado para a linhagem 786-O foi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Cultilab) suplementado com 10% de SFB (v/v) (soro fetal bovino) (Cultilab), bicarbonato de sódio 1,2 g/L, glicose 4,2 g/L e com os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As linhagens HK2, RC-124, HepG2, 769-P, CaKi-1, MCF7, HEK293 e HeLa foram mantidas em meio de cultura DMEM (Cultilab) contendo 10% de SFB (v/v) (Cultilab). A linhagem PC3 foi mantida em meio de cultura DMEM/F12 (Cultilab). THLE-3 foi mantida em meio BEGM Bullet Kit (*Bronchial Epithelial Growth Medium*) (Lonza) sem a adição de gentamicina/anfotericina (GA), com a

adição de 5 ng/mL de epinefrina (Sigma) e 70 ng/mL de EGF (Sigma) contendo 10% de SFB (v/v) (Cultilab). MCF10A foi mantida em meio HAM/F12 (Cultilab) suplementado com EGF (Sigma), toxina colérica (Sigma), insulina (Sigma), hidrocortisona (Sigma) e 5% de soro de cavalo (v/v) (Cultilab). RWPE-1 foi mantida em meio K-SFM (*Keratinocyte Serum Free Medium*) (Gibco), suplementado com BPE (Gibco) e EGF (Gibco). A linhagem LNCaP foi mantida em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (Gibco) suplementado com 10% de SFB (v/v) (Cultilab). Para a manutenção das células em cultura, ao atingirem 80% de confluência da densidade de saturação elas foram lavadas com solução salina PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, pH 7,2) e subcultivadas após o uso de solução de tripsina-EDTA 0,1% (Cultilab). Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo com 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma) e armazenados em freezer a -80 ^{o}C.

3.2. Biogênese pela RNA Polimerase II e ensaio de estabilidade

Para os experimentos de inibição da RNA Polimerase II (RNAP II), as células foram semeadas (2 x 10^6 células da linhagem HeLa em placas de 56 cm^2) e cultivadas por 24 h, quando o meio de cultura foi trocado por meio fresco contendo α-amanitina (Sigma) 50 µg/mL ou com o veículo (H_2O MilliQ estéril) e tratadas por 9 h (Lee, Kim et al. 2004; Nakaya, Amaral et al. 2007; Raha, Wang et al. 2010). Para os experimentos de meia vida, as células foram semeadas (2 x 10^6 células HeLa em placas 56 cm^2) e cultivadas por 24 h, quando o meio de cultura foi trocado por meio fresco com actinomicina-D (Invitrogen) 10 µg/mL ou com o veículo (DMSO) e coletadas em diferentes tempos: 0, 1, 3, 6 e 8 h (Ebralidze, Guibal et al. 2008). Após os tratamentos, as células foram coletadas e o RNA total foi extraído conforme descrito no item 3.6.

Para o ensaio de inibição da RNAP II, RT-qPCR foi realizado para *INXS*, *ACTB* e *MYC*, sendo que os dois últimos foram utilizados como controles positivos, pois são

transcritos pela RNAP II. Em paralelo, também realizamos RT-qPCR para os transcritos *pré-tRNA^{Tyr}* (tRNA da tirosina) e *7SK* (um pequeno RNA nuclear), ambos transcritos pela RNA Polimerase III (RNAP III) e portanto foram utilizados como controles negativos. Os resultados foram normalizados utilizando o nível de *5S RNA*. Para o ensaio de decaimento, em cada ponto de tempo os níveis do *INXS* e *MYC* foram medidos utilizando RT-qPCR. Nesse caso, os dados de expressão foram normalizados por uma amostra não tratada. O gene *MYC* foi utilizado como controle experimental, já que a estimativa de sua meia-vida é bem documentada (Dani, Blanchard et al. 1984; He, Liu et al. 2000). Os oligonucleotídeos iniciadores usados estão listados na Tabela 1.

3.3. Análise da presença de modificação cap 5' por ensaio enzimático

A enzima *Tobacco Acid Pyrophospahatase* (TAP; Epicentre Biotechnologies) cliva a ligação pirofosfato entre o 5’P do nucleotídeo mais 5’do RNA com o 5’P da estrutura cap, uma guanosina-5’P metilada 5'-terminal, eliminando o cap e deixando um 5’-monofosfato livre na extremidade 5' do RNA. A enzima *Terminator 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease* (5'-Exo; Epicentre Biotechnologies) é uma exonuclease altamente processiva na direção 5' → 3' que digere RNAs 5'- monofosfato, mas não digere RNAs com cap 5’. Inicialmente, 5 µg de RNA total de células HeLa foram tratados com 15 U da enzima *Tobacco* (TAP), na presença de 40 U do inibidor de RNAse RNAseOUT (Invitrogen) durante 2 h a 37 ^{o}C. Em paralelo, foram feitos dois tratamentos sem a enzima TAP, sendo que um deles foi utilizado como controle negativo e o outro foi submetido à próxima etapa de clivagem enzimática pela 5'-Exo (TAP^{-}/5'-Exo^{+}). Após isso, as 3 amostras foram purificadas usando RNeasy Micro Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA recuperado após o tratamento com TAP foi submetido ao tratamento com a enzima 5'-Exo (1 U para 1 µg de RNA), na presença de 40 U de RNAseOUT (Invitrogen) (TAP^{+}/5'-Exo^{+}), 2 h a 37 ^{o}C. A amostra TAP^{-}/5'-Exo^{+} foi sujeita ao mesmo tratamento enzimático com 5'-Exo, enquanto o controle

negativo foi novamente submetido às mesmas condições da reação, exceto pelo fato de não ter sido tratado com as enzimas (TAP$^-$/5'-Exo$^-$). Posteriormente, as amostras foram purificadas usando RNeasy Micro Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

3.4. Amostras dos pacientes com tumores de rim

Amostras dos tecidos de carcinoma de células renais e dos tecidos não tumorais adjacentes foram cedidas pelo do banco de tecidos recém-congelados do Hospital do Câncer, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro. Essas amostras foram obtidas com o consentimento formal dos pacientes antes de serem submetidos à nefrectomia radical e foram congelados em nitrogênio líquido em menos de 10 min da ressecção. As amostras foram analisadas de forma anônima. A extração de RNA dos tecidos, a verificação da integridade do RNA e os ensaios de RT-qPCR foram feitos como descrito nos itens 3.6, 3,7 e 3.10.2.

3.5. Animais

Camundongos atímicos da linhagem BALB/c Nude do sexo feminino entre 4 e 6 semanas de idade, pesando 20 - 24g, foram obtidos a partir da Área de Produção Animal do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram monitorados diariamente e mantidos sob condições específicas isentos de agentes patogênicos. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes e regulamentos nacionais, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação de Animais adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esses ensaios também foram aprovados pelo Comitê Interno de Cuidados no Uso de Animais do Instituto de Química, Universidade de São Paulo (Anexo II).

3.6. Extração de RNA, purificação e tratamento com DNase

As células foram cultivadas em frascos e / ou garrafas apropriadas até a confluência desejada, lavadas com PBS e descoladas da superfície do frasco com 0,1% de tripsina-EDTA

seguida da adição de meio de cultura contendo SFB, ou apenas removida do frasco raspando as células com *cell scraper* na presença de PBS (no caso dos tratamentos com α-amanitina e actinomicina-D, itens 3.2 e 3.3). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 325 x g por 5 min e o sobrenadante foi removido. Os sedimentos de células foram utilizados imediatamente (no caso do fracionamento celular, item 3.12) ou mantidos a -80 ^{o}C até a extração de RNA total. O isolamento do RNA foi realizado utilizando TRizol (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante, e eluído em um volume de 100 µL de água tratada com DEPC (Invitrogen). Posteriormente, o RNA foi submetido a uma etapa de purificação e tratamento com DNAseI utilizando o kit RNAspin (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante, alterando-se apenas o tempo de incubação com a DNAseI de 15 min para 1 h. O RNA purificado foi armazenado a -80 ^{o}C.

3.7. Avaliação da integridade do RNA

As amostras de RNA foram quantificadas por sua densidade óptica a 260nm, e sua pureza atestada pela razão 260/280nm. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

O RNA foi analisado quanto à sua integridade utilizando-se o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), que realiza uma eletroforese capilar de alta resolução. A integridade das amostras foi avaliada com o programa 2100 Expert (Agilent Technologies). Este programa atribui um valor de integridade de RNA (*RNA Integrity Number*, RIN), que permite uma estimativa da integridade das amostras de RNA por meio da análise das intensidades das bandas de todo o traçado eletroforético da amostra, e não apenas da razão entre as bandas dos RNAs ribossomais. Apenas amostras que tinham uma boa integridade (RIN > 7) foram utilizadas em todos os experimentos.

Por outro lado, apenas RNAs que não apresentaram contaminação residual com DNA genômico foram utilizados para todos os ensaios descritos nesse trabalho. Para certificar a

ausência de DNA genômico nas amostras de RNA, foi realizada uma PCR *end-point* (50 µL, com 40 ciclos) do gene α-Tubulina (*TUBA1C*) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1), que flanqueiam um intron do gene, e 1 µg de RNA total de cada amostra, sem transcrição reversa, como molde para a PCR (conforme será descrito no item 3.10.1).

3.8. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos PCRs dos ensaios de transcrição reversa fita-específica, de confirmação de clonagem, da presença da modificação estrutural 5'cap, devRACE-PCR e de detecção do RNA na imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos (RIP) foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (Rozen and Skaletsky 2000) e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos PCRs dos experimentos de RT-fita específica, clonagem, ensaio para a presença de 5'cap, RACE-PCR e RIP.

Alvo	**Nome dos oligonucleotídeos iniciadores**	**Sequência**
RT-fita específica		
INXS	INXS_Senso/Forward	CCCCCTCCAGGTACCAGAAC
	INXS_Antisenso/Reverse	CCACTGGTGCTTTCGATTTGA
Clonagem (em vetores de super-expressão do *INXS* e de ensaio de promotor)		
INXS	INXS_NheI_F§	AGTAGCTAGCGTGGTGAAATGAGGCCAGTC
	INXS_XhoI_R§	TTATCTCGAGCAGGAAAACGTGGTCTCAGC
Promotor antisenso	Prom_INXS_HindIII_AS-F§	AGTAAAGCTTTGCCAGCAAACAGTGCTT
	Prom_INXS_NheI_AS_R§	TTATGCTAGCAAGAGGTTAACTCCTTGGAAATAC
Promotor senso	Prom_INXS_NheI_S_F§	TTATGCTAGCTGCCAGCAAACAGTGCTT
	Prom_INXS_HindIII_S_R§	AGTAAAGCTTAAGAGGTTAACTCCTTGGAAATAC
Fragmento antisenso	Frag_Prom_INXS_AS_F§	AGTAAAGCTTTGCCAGCAAACAGTGCTT
	Frag_Prom_INXS_AS_R§	TTATGCTAGCTGAGAATTGTCAGATTTTGGG
PCR (para avaliar contaminação com DNA genômico)		
TUBA1C	α-Tubulina_RT_F	TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG
	α-Tubulina_RT_R	AGTGCCAGTGCGAACTTCATC

Ensaio da presença da estrutura 5'cap		
INXS	INXS_RT_F	CCCCCTCCAGGTACCAGAAC
	INXS_RT_R	CCACTGGTGCTTTCGATTTGA
ACTB	ACTB_RT_F	CGAGGCCCCCCTGAAC
	ACTB_RT_R	GCCAGAGGCGTACAGGGATA
MYC	MYC_RT_F	TCAAGAGGTGCCACGTCTCC
	MYC_RT_R	TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT
pre-tRNA^{Tyr}	pre-tRNA^{Tyr}_RT_F	AAAAAACCGCACTTGTCTCCTTCG
	pre-tRNA^{Tyr}_RT_R	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAG
7SK	7SK_RT_F	GACATCTGTCACCCCATTGA
	7SK_RT_R	GCGCAGCTACTCGTATACCC
RACE-PCR		
INXS	5'RACE_Outer	CTCCTCTCCCGACCTGTGATACAAAAG
	5'RACE_Inner	GAGATTCAGAGTCCACTGGTGCTTTCG
INXS	3'RACE_Outer	CCTAAAGGGACTTCTCAATGGGGTTC
	3'RACE_Inner	CTTCTCGAGCTCACTAGGCCGGGTA
Detecção do RNA na imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos (RIP)		
INXS	INXS_RT_RIP_F	CCCCCTCCAGGTACCAGAAC
	INXS_RT_RIP_R	CCACTGGTGCTTTCGATTTGA
BCL-X	BCL-X_RT_RIP_F	ATGTCTCAGAGCAACCGGGAGCTG
	BCL-X_RT_RIP_R	TCATTTCCGACTAAGGTGAGCC
BCL-2	BCL-2_RT_RIP_F	GGTGGAGCTCTTCAGG
	BCL-2_RT_RIP_R	ACAGTTCCAAGGCATCC

[§] A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores contendo os sítios de restrição das endonucleases utilizadas nas clonagens pode ser vista pelas sequências sublinhadas.

Para os experimentos que utilizaram a técnica de PCR quantitativo (qPCR), os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados no programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems), de acordo com os parâmetros padrão, e estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as qPCRs.

Alvo	**Nome dos oligonucleotídeos iniciadores**	**Sequência**
qPCR		
INXS	INXS_RT_F	CCCCCTCCAGGTACCAGAAC
	INXS_RT_R	CCACTGGTGCTTTCGATTTGA
BCL-XL	BCL-XL_RT_F	TAAACTGGGGTCGCATTGTG
	BCL-XL_RT_R	AGGTAAGTGGCCATCCAAGC
BCL-XS	BCL-XS_RT_F	GCAGTAAAGCAAGCGCTGAG
	BCL-XS_RT_R	GTTCCACAAAAGTATCCTGTTCAAAG
BCL-X	BCL-X_RT_F	CACAGCAGCAGTTTGGATGC
	BCL-X_RT_R	ATATGCTGTCCCTGGGGTGA
ANRASSF1	ANRASSF1_RT_F	GGCAATTAGAACGCTCCTTG
	ANRASSF1_RT_R	CTGTGCTAGGCGATAGAGATCC
CCDN1-v1	CCDN1-v1_RT_F	CCAGAGTGATCAAGTGTGAC
	CCDN1-v1_RT_R	GGGACATCACCCTCACTTAC
SRSF1-v1	SRSF1-v1_RT_F	TGCTACGGCTTCTGCTACGA
	SRSF1-v1_RT_R	GATCTCATGAGGGAGAAACTGCC
SRSF1-v2	SRSF1-v2_RT_F	CCCGGATGTAGGCAGTTTCT
	SRSF1-v2_RT_R	TTCAGGCAAGGTTGTCCAAG
SNORD15A	SNORD15A_RT_F	GAAGAGATGATGACGAGTCTGACT
	SNORD15A_RT_R	GAAATTACTTCAACCAGGGCTCTTT
TUBA1C	TUBA1C_RT_F	TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG
	TUBA1C_RT_R	AGTGCCAGTGCCAACTTCATC
pre-tRNA^{Tyr}	pre-tRNA^{Tyr}_RT_F	AAAAAACCGCACTTGTCTCCTTCG
	pre-tRNA^{Tyr}_RT_R	CCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAG
5S-rRNA	5S-rRNA_RT_F	AGGCGCCTCCTTCAGCGTCT
	5S-rRNA_RT_R	CAGGCGGTCTCCCATCCAAG
18S rRNA	18S rRNA_RT_F	GCAGGCGCGGGTAACC
	18S rRNA_RT_R	AAGCTTATGACCCGCACTTACTG
7SK	7SK_RT_F	GACATCTGTCACCCCATTGA
	7SK_RT_R	GCGCAGCTACTCGTATACCC
ACTB	ACTB_RT_F	CGAGGCCCCCCTGAAC
	ACTB_RT_R	GCCAGAGGCGTACAGGGATA
MYC	MYC_RT_F	TCAAGAGGTGCCACGTCTCC
	MYC_RT_R	TCTTGGCAGCAGGATAGTCCTT
GAPDH	GAPDH_RT_F	TGCACCACCAACTGCTTAGC
	GAPDH_RT_R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

HPRT1	HPRT1_RT_F	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT
	HPRT1_RT_R	GAGCACACAGAGGGCTACAA

3.9. Transcrição reversa e síntese de cDNA

3.9.1. Transcrição reversa com oligo-dT(20)

Para a transcrição reversa e síntese de cDNA fita simples foi utilizado 1 µg de RNA total de cada condição experimental. Cada amostra foi transcrita com o kit SuperScript III First Strand Synthesis Mix (Invitrogen), utilizando oligonucleotídeos iniciadores oligo-dT(20), segundo as recomendações do fabricante, com incubação à 50 ^{o}C. É importante mencionar que uma pré-incubação de 3 min a 85 ^{o}C foi introduzida no protocolo, antes da fase de anelamento, para desnaturar completamente o RNA. Após o término da fase de anelamento, a reação foi mantida a 50 ^{o}C, para a adição da enzima em tampão pré-aquecido à 50 ^{o}C, eliminando-se a etapa de resfriamento no gelo descrita no protocolo do fabricante.

3.9.2. Transcrição reversa fita específica

Para validar a hipótese de que o *INXS* era um transcrito antisenso, foi realizada uma transcrição reversa fita-específica utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos complementares à sequência genômica da fita mais ou da fita menos no *locus* do gene *INXS*, em regiões que tivessem sobreposição apenas com os introns do gene codificador de proteínas *BCL-X*, conforme indicado na Figura 2. Para essas reações, foi utilizado 3 µg de RNA total das linhagens de células testadas e a *Transcriptase Reversa* (SuperScript III First Strand Synthesis Mix, Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante, com incubação a 58 ^{o}C. Uma pré-incubação de 3 min a 85 ^{o}C foi introduzida no protocolo durante a fase de anelamento, para desnaturar completamente o RNA. Após o término desta fase a reação foi mantida a 58 ^{o}C, para então acrescentar a enzima, eliminando-se a etapa de resfriamento no gelo. Como controle adicional, uma transcrição reversa sem oligonucleotídeos iniciadores (-*primer*) foi incluída para mostrar que o cDNA gerado não é um artefato causado por

iniciadores gerados a partir do auto-anelamento de um RNA. Em paralelo, também foi feito um outro controle contendo todos os elementos necessários à síntese do cDNA, exceto a enzima Transcriptase Reversa (- RT), para verificarmos a ausência de DNA genômico nas amostras de RNA.

3.10. Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR)

3.10.1. PCR

Para amplificação dos transcritos de interesse, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se 0,2 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada transcrito, 5 µL do produto da reação de RT descrita acima, e 1 U de *Taq Polimerase* em 10 µL de *GoTaq Green Master Mix* (Promega), segundo as instruções do fabricante. Utilizou-se 250 ng de DNA genômico de células 786-O como controle positivo das reações e H_2O DEPC (Invitrogen) como controle negativo. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,7% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM). O produto da reação foi visualizado em um fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems) sob luz UV e as imagens foram adquiridas através do programa GelCapture (DNR Bio-Imaging Systems).

3.10.2. PCR quantitativa em tempo real – quantificação relativa

As reações das PCRs em tempo real (qPCR) para a quantificação relativa foram feitas em triplicata em um volume de 20 µL contendo 10 µL de *Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems), 5 µL de cDNA da transcrição reversa (RT) (diluído 1:8) e 3,2 µM de oligonucleotídeos iniciadores *Foward* e *Reverse* específicos para cada gene. A reação foi realizada no aparelho 7500 Real–Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando os parâmetros padrão do equipamento.

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 analisado. Quanto menor o Ct, mais abundante 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. O *5S rRNA* foi utilizado como normalizador no experimento de α-amanitina, o gene *GAPDH* como normalizador nos demais experimentos em que utilizou-se cDNA, exceto nos RNAs extraídos a partir dos xenotumores parafinizados, onde utilizamos como referência o gene *HPRT1*.

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 gene normalizador. A partir dos valores de ΔCt calcula-se o valor de delta-delta-Ct (ΔΔCt) 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (considerando-se que os iniciadores possuem uma eficiência similar e alta, como previamente testada). Para a análise de meia-vida, o *fold change* foi calculado a partir do delta-Ct obtido pela diferença entre a média do Ct detectado para o gene em análise das células tratadas com actinomicina-D e o Ct médio do mesmo gene detectado em células controle não tratadas. 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, bicaudal, homocedástico), considerando-se como limiar de significância *p*-valor <0,05. Neste teste, foram considerados os valores médios de ΔCt de cada condição, referentes à pelo menos 3 réplicas biológicas independentes.

3.10.3. PCR quantitativa em tempo real – quantificação absoluta

Foi quantificado o número absoluto de moléculas do transcrito *INXS* em diferentes linhagens celulares tumorais e não tumorais. As moléculas de *INXS* foram medidas em amostras de cDNAs obtidas a partir de RNAs extraídos de um painel de linhagens celulares usando *Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems). Para isso, foi construída previamente uma curva de calibração a partir do produto de PCR obtido pela amplificação de um fragmento do *INXS*. Conhecendo-se o tamanho do *amplicon*, a quantidade em ng do produto obtido da PCR e a massa molar de um par de bases, nós calculamos o número de moléculas presentes em cada ponto da curva obtida após uma diluição seriada (fator de diluição 10 vezes a cada diluição da série). A partir disso, fomos capazes de inferir por interpolação na curva de calibração quantas moléculas do *INXS* estavam presentes em cada linhagem celular avaliada. Foi utilizado cDNA gerado através de transcrição reversa (RT) fita-específica usando 3 µg de RNA total em um volume de 20 µL de RT usando a Transcriptase SuperScript III (Invitrogen) e os iniciadores específicos para o *INXS* (*Antisense/Reverse*), seguido por qPCR com o mesmo oligonucleotídeo iniciador (*Antisense/Reverse*) mais o iniciador *Sense/Forward* (como descrito na Tabela 1). Foram usados 5 µL da reação de RT depois de diluída 8 vezes em H_2O DEPC. Esse é um método interessante, pois além de ser bem reprodutível elimina a necessidade de um gene de referência que funcione bem entre todas as linhagens celulares em estudo.

Para estimar o número de cópias de *INXS* e das isoformas do *BCL-X* na linhagem celular tumoral 786-O, assumiu-se 20 pg de RNA total por célula; o nível absoluto de *INXS* (236 cópias por ng de RNA total) corresponde a cerca de 5 cópias do *INXS* por célula. Usando as abundâncias relativas (valores de Ct) do *INXS*, *BCL-XS* e *BCL-XL* que foram medidos sob as mesmas condições na linhagem 786-O (oligo-dT usado na transcrição reversa e a mesma quantidade de *input* de cDNA no qPCR) estimou-se aproximadamente 2 vezes o número de

cópias do *BCL-XS* por célula (12 cópias por célula) enquanto o *BCL-XL* foi 35 vezes mais elevada em comparação com o *INXS* (167 cópias por célula).

3.11. RACE-PCR

Para determinar o tamanho completo do transcrito, ensaios de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) foram realizados para obtenção da sequência das extremidades 5´e 3´ do *INXS*. Foi utilizado cDNA comercial de rim de fetos humanos (*Human Fetal Marathon-Ready cDNA*; Clontech, No. 639323) preparado a partir de RNA poliA (+) extraído de um *pool* de 59 rins de fetos abortados espontaneamente, além da *Advantage 2 Polymerase* (Clontech). Essa biblioteca de cDNA contem 2 adaptadores diferentes, um em cada uma das extremidades dos transcritos. O protocolo de amplificação por RACE (5´ e 3´) foi feito de acordo com as recomendações do fabricante. Dois oligonucleotídeos específicos complementares à sequência do *INXS* foram desenhados ancorados em suas pontas, orientados para as extremidades da mensagem, de forma a possibilitar a utilização de cada oligonucleotídeo em reações de PCR sequenciais (*Nested*), em par com o nucleotídeo complementar ao adaptador da biblioteca; as reações *nested* aumentam a especificidade dos produtos gerados; os oligonucleotídeos estão descritos na tabela 1.

Além disso, para obter a possível sequência final da extremidade 5´ do transcrito realizamos predições *in silico* para identificar o possível local do início da transcrição (TSS) do *INXS* com o programa TSSW (http://www.softberry.com), utilizando como entrada a sequencia da região identificada como provável promotora do gene *INXS*, ver item 3.15.

3.12. Fracionamento celular

Para a obtenção de RNAs que estejam enriquecidos no núcleo e no citoplasma das células, realizamos o fracionamento celular de acordo com o protocolo descrito por Topisirovic et al. (Topisirovic, Culjkovic et al. 2003). As células (3×10^7) foram coletadas e sedimentadas, em seguida foram lavadas em PBS pH 7,4 gelado, ressuspendidas gentilmente

em tampão de lise (Tris pH 8,4 10 mM, NaCl 140 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,5% NP-40, DTT (ditiotreitol) 1 mM, e RNasin 100 U/mL) (Promega)) e incubadas em gelo durante 5 min. A eficiência da lise, presença de células intactas *versus* núcleos livres, foi verificada através da análise de uma alíquota de 1 µL do lisado por microscopia de luz visível, utilizando o microscópio Olympus CKX41. Em seguida, as suspensões celulares foram centrifugadas a 1.000 g durante 5 min à 4 ^{o}C e o sobrenadante foi coletado como fração citoplasmática. Os sedimentos (frações nucleares) foram ressuspendidos em tampão de lise acrescido de 3,3% de deoxicolato de sódio e 6,6% de Tween 40 e submetidos à uma nova centrifugação a 1.000 g para remoção completa de prováveis resquícios da fração citoplasmática. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi coletado como fração nuclear. As frações nucleares e citoplasmáticas foram ressuspendidas em 1 mL e 4 mL de TRizol (Invitrogen), respectivamente, e armazenadas a -80 ^{o}C. O RNA foi utilizado para a transcrição reversa e qPCR como descrito no item 3.10.2. Os resultados foram normalizados em relação ao nível de expressão do *GAPDH* detectado na mesma fração, quer citoplasmática ou nuclear (de Almeida, Garcia-Sacristan et al. 2010). Como controles foram utilizados o enriquecimento do *MALAT1* (Tripathi, Ellis et al. 2010) e do *45S rRNA* na fração nuclear por RT-qPCR e do *18S rRNA* na fração citoplasmática. Foi feito também *western blotting* dos extratos proteicos das frações, e detectamos a proteína GAPDH (Sigma, G8795 anti-GAPDH Ab) apenas na fração citoplasmática e a histona H3 (Millipore, 06-599B anti-acetil-histona H3 Ab) apenas na fração nuclear.

3.13. Indução da expressão endógena do lncRNA *INXS*

As células tumorais da linhagem 786-O foram semeadas em placas de 100 mm e posteriormente expostas à radiação UV-C por 40 s a 1 $Jm^2.s^{-1}$ imediatamente após a substituição do meio de cultura por PBS. Subsequentemente, essas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB (v/v) por até 24 h. Para

knockdown do *INXS* seguido da sua indução por UV-C, foram usadas placas de 60 mm com células em uma confluência de 80%, e o *knockdown* do *INXS* (ver item 3.17) foi feito imediatamente antes da exposição à luz UV-C. Para o ensaio do carenciamento de SFB, as células foram cultivadas durante 24 h em diferentes concentrações de SFB (v/v), tal como indicado nas figuras. Para o tratamento com a droga anti-tumoral sulforafano (SFN), 50 µM de D,L-sulforafano (Sigma) foi adicionado às células em meio DMEM com 10% de SFB (v/v) e cultivadas por até 24 h.

3.14. Clonagem molecular

Após a amplificação dos transcritos de interesse por PCR, o produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,7% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM). O produto da reação no gel de agarose foi visualizado em um fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems) sob luz UV. As bandas correspondentes aos produtos de PCR obtidos foram cortadas do gel e purificadas com o kit Quiack Gel Extraction (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. Os produtos da PCR purificados foram clonados em pGEM-T Easy Vector System (Promega), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Em seguida, foi realizada a diálise das reações de ligação (plasmídeo + inserto) por 2 h utilizando-se uma membrana VS de 0,025 µm (Millipore) para a remoção dos sais da reação. A reação dialisada foi utilizada para a transformação de células competentes de *Escherichia coli*, cepa DH10B (Invitrogen), via eletroporação. Imediatamente após a eletroporação, 400 µL de meio SOC (bacto-triptona 20 mg/mL, extrato de levedura 5 mg/mL, NaCl 0,584 mg/mL, KCl 0,186 mg/mL, $MgCl_2$ 10 mM, MgSO4 10 mM, glicose 20 mM, pH 7,0) foram adicionados às células recuperadas das cubetas de eletroporação, as quais foram incubadas a 37 ^{o}C por 1 h. Posteriormente, as bactérias foram semeadas em meio LB-ágar (peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, ágar bacteriológico 1,4%, pH 7,0) contendo ampicilina (10 mg/mL), X-Gal

20 mg/mL (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside*) e IPTG 20 mg/mL (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*), e então mantidas a 37 ^{o}C durante 14 h. As colônias selecionadas foram coletadas e inoculadas em 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (10 mg/mL) a 37 ^{o}C, durante uma noite, com agitação constante de 250 RPM. A extração do DNA plasmidial contendo o inserto foi realizada com o Plasmid Mini Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por sua densidade óptica a 260nm e sua pureza foi atestada pela razão 260/280nm. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). As construções foram utilizadas para a preparação dos vetores de transfecção do ensaio de promotor e super-expressão do *INXS*, como descrito a seguir nos itens 3.15 e 3.16 e para sequenciamento dos produtos de amplificação por PCR.

O sequenciamento foi realizado no aparelho ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante, sendo que as reações de sequenciamento foram realizadas com *Big dye terminator mix* (Perkin Elmer) de acordo com as instruções do fabricante.

3.15. Ensaio de gene repórter para o promotor do *INXS*

Uma busca *in silico* nos permitiu identificar um putativo promotor para o *INXS* utilizando a ferramenta descrita por Davuluri e colaborares (Davuluri, Grosse et al. 2001). Essa região promotora compreende o possível sítio de inicio de transcrição (TSS) do *INXS* (denominada aqui de “promotor antisenso”; está na fita + do DNA genômico) e sua sequência complementar (denominada aqui de “promotor senso”; está na fita menos do DNA genômico). Por outro lado, mapeamos e caracterizamos *in silico* uma região mínima do promotor (denominada aqui de “frag-promotor antisenso”, está na fita + do DNA genômico). Essa região compreende a porção 5’ do promotor antisenso onde não estão presentes os sítios *TATA-Box* e *GC-Box*, caracteristicamente constituintes de promotores fortes. Os sítios *TATA-*

Box e *GC-Box* foram preditos através de uma busca por regiões conservadas e consenso via programa *AliBaba2.1*, que usa como banco de dados o *TRANSFAC*.

As possíveis regiões promotoras foram amplificadas por PCR conforme descrito no item 3.10.1 utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1) e DNA genômico como molde, clonadas no vetor pGEM-T Easy (Promega) conforme descrito item 3.14. Em seguida, esses insertos foram excisados desse vetor pelas endonucleases *Nhe*I e *Hind*III (New England Biolabs) conforme a descrição do fabricante e então inseridas no plasmídeo pGL3-Basic Vector (Promega). O plasmídeo pGL3-Basic foi previamente digerido com as mesmas endonucleases, garantindo a orientação de ligação dos insertos através da estratégia de clonagem sítio-dirigida. As sequências dos promotores antisenso, senso e do fragmento antisenso curto foram inseridas a montante da região do vetor pGL3-Basic que codifica para a enzima *Firefly luciferase* derivada do vagalume *Photinus pyralis*, cuja luminescência será quantificada no ensaio de promotor. A ligação do produto da excisão no pGL3-Basic Vector, transformação de bactérias competentes com os plasmídeos e extração dos vetores das bactérias foram realizadas conforme descrito no item 3.14.

Os ensaios de atividade promotora foram realizados nas linhagens celulares humana HEK293 e DU145, cujas células foram semeadas em placas de 24 poços (4×10^5 células), e as transfecções foram realizadas com o reagente FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), segundo as instruções do fabricante. As células foram transfectadas em triplicatas biológicas com um dos plasmídeos pGL3_promotor-antisenso, pGL3_promotor-senso, pGL3_frag-promotor-antisenso, pGL3-SV40 (controle positivo) ou pGL3-vazio (controle negativo) e todas foram co-transfectadas com o plasmídeo pRL-SV40 (Promega). Este último plasmídeo expressa a *Renilla luciferase* (enzima do cnidário *Renilla reniformis*) cuja media é utilizada para a normalização dos valores da atividade da *Firefly luciferase*, a fim de reduzir as

variações decorrentes de diferenças nas eficiências de transfecção, uma vez que ao transfectar cada construção co-transfectamos com o plasmídeo pRL-SV40.

Para avaliação da atividade de promotor, foi utilizado o sistema *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega), segundo instruções do fabricante. As reações foram realizadas em placa branca opaca (Falcon) de 96 poços e as medidas de emissão de luz foram obtidas em luminômetro *MicroLumat Plus* (Microplate Luminometer LB – Berthold Technologies) com o programa *WinGlow* (Berthold Technologies) utilizando-se os seguintes parâmetros: intervalo de medida 1 de 10 s, intervalo de medida 2 de 1 s e temperatura de 25 °C. A razão do valor obtido para cada medida das luciferases *Firefly* e *Renilla* de cada poço foi calculada (Atividade relativa da Luciferase), assim como a média aritmética da razão de três réplicas biológicas da transfecção com cada plasmídeo.

3.16. Super-expressão transiente dos plasmídeos

O transcrito *full-lenght INXS* foi amplificado por PCR conforme descrito item 3.10 utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1) e como molde para a amplificação foi utilizado cDNA proveniente de RT-fita específica do *INXS* conforme descrito no item 3.10.3. O produto da reação de PCR foi clonado no pGEM-T Easy Vector (Promega) conforme descrito no item 3.14. Em seguida, o *INXS* foi excisado desse plasmídeo pelas endonucleases *Nhe*I e *Xho*I (New England Biolabs) conforme recomendação do fabricante e então inserido no plasmídeo pCEP4 (Invitrogen), previamente digerido com as mesmas endonucleases. A utilização dessas enzimas de restrição foi estratégica no sentido de permitir a clonagem sítio dirigida do *INXS*. O plasmídeo pCEP4 possui o gene que confere resistência ao antibiótico Higromicina B, que poderia ser utilizado na etapa de seleção das células transfectadas no caso de um método integrativo. Entretanto, optamos pela transfecção transiente das células, onde não ocorre integração do plasmídeo ao DNA das células transfectadas. A ligação do produto da excisão no plasmídeo pCEP4, transformação de

bactérias competentes e extração dos plasmídeos foram realizadas conforme descrito no item 3.14.

As células foram plaqueadas e mantidas em cultura até atingirem a confluência de 80%, e em seguida foram misturadas aos vetores pCEP4-INXS ou do pCEP4-vazio, previamente diluídos em FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), segundo instruções do fabricante. Foram realizadas 3 transfecções independentes para cada construção, pCEP4-INXS e pCEP-vazio (controle), obedecendo sempre a relação de 3 µg de DNA plasmideal para 1 x 10^6 células a serem transfectadas. Essas células foram mantidas por até 24 h em cultura para os ensaios de RT-qPCR, imunoprecipitação de proteínas seguida de *western blotting* e apoptose. Em paralelo, também transfectamos células nas mesmas condições com o plasmídeo pCEP4-ANRASSF1, o qual foi utilizado como um controle adicional não-correlacionado, nos experimentos de super-expressão.

Para o ensaio da super-expressão temporal do *INXS*, as células foram transfectadas com 1 µg de plasmídeo por 10^6 células com FuGENE HD (Promega). Em seguida, elas foram cultivadas durante os períodos de tempo indicados nas figuras antes das RT-qPCRs. Para o ensaio de titulação dos plasmídeos nas transfecções transientes, as células foram transfectadas com diferentes quantidades de plasmídeo como indicados nas figuras, e os ensaios foram realizados depois de 24 h.

3.17. Transfecção com oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs)

Para o silenciamento transiente do lncRNA *INXS*, as células foram semeadas e mantidas em cultura em placas de 60 mm de diâmetro em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (v/v), até atingirem uma confluência de 50 – 60%. Em seguida, essas células foram transfectadas separadamente com dois oligonucleotídeos 20-mer antisenso modificados (ASOs) (500 nM, de concentração final, IDT) complementares a diferentes regiões do transcrito *INXS* (ASO-INXS-1 e ASO-INXS-2) ou um oligo embaralhado modificado ASO-

scrambled (ASO-SCRB, controle) (IDT) usando *Lipofetamine RNAimax* (Invitrogen), na presença de OPTI-MEM (Invitrogen). As transfecções foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante e as células foram mantidas em cultura por 24 h. As sequências dos ASOs estão indicadas na Tabela 3.

Em paralelo, foi titulada a eficiência dos 2 ASOs sobre a redução dos níveis de expressão do *INXS* na linhagem tumoral 786-O após a indução do lncRNA por exposição à luz UV-C, depois de 24 h em cultura. As concentrações dos ASOs utilizadas para titulação foram 50, 100 e 200 nM, cada um separadamente (ASO-INXS-1 e ASO-INXS-2) ou ambos em combinação na forma de *pool* (ASO-INXS-1 + ASO-INXS-2). Concomitantemente, fizemos as mesmas titulações para o oligo controle (ASO-SCRB).

Finalmente, também foram feitos outros ensaios fenotípicos transfectando as células 786-O com os ASOs seguidos do tratamento com três agentes indutores de apoptose (UV-C, privação de SFB e sulforafano). Depois de transfectadas e a apoptose induzida, as células foram mantidas em cultura por 24 h. Para esse ensaio foram utilizados os oligonucleotídeos antisenso separadamente (ASO-INXS-1, ASO-INXS-2 e ASO-SCRB) na concentração final de 500 nM.

Para todos os casos anteriores, após 24 h do tratamento o RNA total das células em cultura foi extraído conforme descrito no item 3.6 e avaliada a expressão dos alvos por RT-qPCR conforme descrito no item 3.10.2.

Tabela 3. Sequências utilizadas nas transfecções das células com os ASOs (oligonucleotídeos antisenso modificados).

Alvo	**Nome do oligonucleotídeo**	**Sequência**
INXS	ASO-INXS-1	mG*mC*mC*mU*mC*A*C*C*C*T*C*A*C*C*C*mA*mG*mU*mC*mU
INXS	ASO-INXS-2	mC*mA*mC*mC*mU*C*C*T*C*T*C*C*C*G*A*mC*mC*mU*mG*mU
Controle	ASO-SCRB	mA*mC*mU*mA*mC*C*G*A*T*C*C*A*C*A*C*mU*mC*mU*mU*mU

(*) = Modificação do tipo fosfotioato;

(m) = Modificação do tipo 2'-*O*-Metil.

3.18. Determinação fluorimétrica da atividade de caspases

Células da linhagem tumoral 786-0 (4 x 10^6 células) depois de induzidas a apoptose com UVC, carência de SFB ou pelo tratamento com a droga sulforafano, foram coletadas por centrifugação, lavadas 2 vezes com PBS gelado e lisadas em 50 µL de tampão de lise gelado (NaCl 150 mM, 20 mM Tris pH 7,5, 1% de Triton X-100, 10 µg/mL de leupeptina, 5 µg/mL de aprotinina e 100 µM de PMSF). Os lisados celulares foram incubados em gelo seco durante 1 min, seguido de 10 min de incubação à 4 °C, e os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação à 15.000 g durante 15 min à 4 °C. Alíquotas de 50 µL do sobrenadante dos lisados foram então transferidas para uma microplaca de 96 poços de fundo plano contendo 100 µL dos substratos fluorigênicos para a enzima caspase-3 (Ac-DEVD-AFC), a caspase-7 (Ac-VDVAD-AFC), a caspase-8 (Ac-IETD-AFC) ou a caspase-9 (Ac-LEHD-AFC), na presença ou na ausência de 20 µM do respectivo inibidor de cada caspase (Kamiya Companhia Biomedical). As amostras foram interrogadas e a fluorescência captada por um fluorímetro (SpectroMax, GEMINI XS, Molecular Device) no comprimentos de 400nm de excitação e 505nm de emissão.

3.19. Ensaio de morte celular por apoptose

Para verificarmos se o efeito fenotípico da super-expressão do *INXS* seria a indução da morte celular por apoptose, células transientemente transfectadas com pCEP4-INXS ou seus respectivos controles foram submetidas à citometria de fluxo, utilizando os citômetros Coulter FC500 MPL (Beckman) ou FACSAria II cell sorter (BD Biosciences).

As células foram transientemente transfectadas com o vetor pCEP4-INXS, com o pCEP4-ANRASSF1 ou pCEP4-vazio, e mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB (v/v). Depois de 24 h de transfecção, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas usando uma solução tripsina-EDTA diluída 10X em PBS e finalmente, ressuspendidas numa concentração de 2-3 x 10^6 células/mL no tampão de ligação da Anexina-V FITC: 10 mM

HEPES / NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl (Merck); 2,5 mM $CaCl_2$ (Merck). Alíquotas de células (100 µL/tubo) foram misturadas gentilmente com 3 µL de Anexina-V FITC (Invitrogen) e incubadas por 15 min à temperatura ambiente protegidas da luz. Nesse passo, foi adicionado Iodeto de Propídeo (PI) (Sigma) numa concentração final de 5 µg/mL nos últimos 5 min para distinguir as células necróticas. Em seguida, 400 µL do tampão de ligação da Anexina-V FITC foram adicionados a cada tubo e as células foram submetidas à análise no citômetro de fluxo dentro de 1 h. Os parâmetros de compensação entre as marcações e a análise do percentual de células apoptóticas, necro-apoptóticas e necróticas foram estabelecidos e calculados usando o programa WinMDI ou o software FlowJo. Para cada transfecção foram feitas pelo menos 3 réplicas biológicas independentes.

3.20. Microscopia de fluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência, células transfectadas com pCEP4-INXS ou pCEP4-vazio foram coletadas depois de 24 h após a transfecção e fixadas com 2% de p-formaldeído, durante 15 min. As células foram plaqueadas em lâminas, incubadas durante 5 min com TBS-0,1% e Triton X-100 para permeabilização e depois bloqueadas com TBS-0,1%, Triton X-100 e 1% de BSA durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos anti-caspase-3 clivada (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb (9664, Cell Signaling) e anti-α-tubulina (Santa Cruz Biotechnology, sc-53646). A visualização da caspase-3 clivada foi realizada com anti-IgG específico conjugado com Alexa Fluor-555 (A-21422, Molecular Probes) e da α-tubulina com Alexa Fluor-488 (A-11001, Molecular Probes). O DNA nuclear foi corado com 20 ng/mL de *Hoechst* 33342 (H1399, Invitrogen). As imagens foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse E600 e deconvoluídas usando o software de processamento de imagem Essencial Huygens.

3.21. *Western blotting*

Em paralelo com o ensaio RIP, as proteínas imunoprecipitadas e ligadas às *beads* foram analisadas por *western blotting* usando o anticorpo anti-Sam68 (Santa Cruz Biotechnology) através do método de detecção ECL (Amersham, GE Healthcare). Para isso, durante os procedimentos de RIP as *beads* foram lavadas e antes das etapas de extração de RNA, 10% do volume final contendo os complexos *bead*-anticorpo do ensaio RIP foi aliquotado para a realização do *western blotting* visando detectar a proteína Sam68. As *beads* foram ressuspendidas em tampão de amostra Laemmli e incubadas a 95 °C por 5 min. Em seguida elas foram brevemente centrifugadas e o sobrenadante foi carregado em um gel de SDS-PAGE 10%, corrido à 90 V durante 2 h. Cerca de 1% do lisado celular foi aliquotado antes da imunoprecipitação (*input*) e carregado em um SDS-PAGE 10% em paralelo, servindo como um controle experimental positivo. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra (Amersham Biosciences) utilizando o transferidor semi-seco TE 77 PWR (Amersham Biosciences) e incubadas com o anticorpo anti-Sam68 (Santa Cruz Biotechnology) (diluição 1:200) e reveladas utilizando o método de detecção ECL (Amersham, GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a detecção das proteínas BCL-XS e BCL-XL, optamos por realizar antes do *western blotting* uma imunoprecipitação do lisado celular na presença do anticorpo contras as proteínas BCL-X. Células 786-O (1 x 10^6) 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-EDTA seguido da adição de meio de cultura contendo SFB. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 325 x g por 5 min e o sobrenadante foi removido. O sedimento de células foi lavado com PBS, novamente sedimentado por centrifugação a 325 x g por 5 min e o sobrenadante foi removido. O sedimento de células obtido foi ressuspenso em tampão de lise gelado RIPA (imidazol 20 mM, pH 7.2; EDTA 1

mM; sacarose 250 mM com *complete protease inhibitor cocktail* (Roche)) e sonicado no aparelho Sonic Dismembrator Model 500 (Fischer Scientific), submetido a três pulsos de 10 segundos com amplitude de 30% e intervalo de 30 segundos no gelo. Aproximadamente 100 µL do lisado celular de cada amostra foram misturados a 30 µL de uma suspensão conjugada de proteína A-Sepharose 4B (Invitrogen) durante 1 h. Em seguida, a resina foi descartada e o sobrenadante obtido foi novamente incubado a 4 ^{o}C *overnight* com 1 µL de anticorpo anti-BCL-X (556361, BD Pharmingen) e 50 µL da resina A-Sepharose 4B (Invitrogen). Subsequentemente, a resina foi lavada 3X com 1 mL de Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) e fervida durante 10 min em 25 µL de tampão de corrida. O sobrenadante obtido (cerca de 20 µL) foi aplicado em um SDS-PAGE 15% e a corrida foi feita durante 2 h à 90 V. Depois de transferidas para a membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra (Amersham Biosciences) utilizando o transferidor semi-seco TE 77 PWR (Amersham Biosciences) as proteínas foram detectadas com o mesmo anticorpo anti-BCL-X (556361, BD Pharmingen) (diluição 1:750) seguidas por incubação com o anticorpo secundário anti-*rabbit* (Alexa Fluor 750 Goat Anti-Rabbit IgG; Molecular Probes). O sinal de fluorescência foi analisado através da digitalização da membrana com o *scanner* Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

As intensidades relativas das bandas BCL-XS e BCL-XL foram quantificadas com o Odyssey Software Aplicativo v3 (LI-COR Biosciences). O valor de densitometria foi definido como a razão entre as médias das medidas das intensidades de BCL-XS e BCL-XL em cada condição (super-expressando *INXS* ou controle) em um total de três réplicas biológicas. A significância estatística da diferença entre as condições comparadas foi medida utilizando o test *t* de Student (pareado, bicaudal, homocedástico), considerando-se como limiar de significância *p*-valor <0,05.

3.22. Imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos - RIP

As células foram cultivadas em frascos apropriados até a confluência desejada (80%), lavadas com PBS e descoladas da superfície do frasco por tratamento com 0,1% de tripsina-EDTA seguido da adição de meio de cultura contendo SFB. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 325 x g por 5 min e o sobrenadante foi removido. Os sedimentos de células foram utilizados imediatamente.

A imunoprecipitação nativa de complexos ribonucleoproteicos (RIP - *RNA-Binding Protein Immunoprecipitation*) foi realizada com 2 x 10^7 células HEK293 em triplicata, utilizando o Magna RIP RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit (Millipore), segundo o protocolo do fabricante. Foram utilizados 5 µg de cada um dos seguintes anticorpos: IgG de coelho purificada (Millipore, PP64B) e anti-Sam68 (Santa Cruz Biotechnology, sc-333). Os complexos anticorpo-*beads* foram lavados seis vezes, e ressuspendidos em tampão de lavagem RIP. Antes da purificação de RNA, 10% de cada um dos complexos anticorpo-*beads* foram aliquotados e utilizados para *western blotting* com o anticorpo anti-Sam68. Os RNAs co-imunoprecipitados foram extraídos a partir da amostra remanescente, tratados com DNase TURBOTM (Ambion) a 37 °C durante 30 min, purificados utilizando o Kit RNeasy Micro (Qiagen) e quantificados utilizando o reagente RiboGreen (Invitrogen) conforme protocolo do fabricante. Os RNAs alvos imunoprecipitados foram avaliados quanto ao seu nível de expressão e de ligação aos complexos proteicos por RT-PCR conforme descrito nos itens 3.9.1, 3.9.2 e 3.10.

3.23. Ensaios de tumorigênese *in vivo* usando camundongos

10^7 células viáveis da linhagem tumoral humana de rim 786-O, conforme determinado por coloração com azul de tripano (Merck), foram ressuspendidas em 200 µL de DMEM (Cultilab) na ausência de SFB e injetadas subcutaneamente em um dos flancos de camundongos da linhagem BALB/c Nude. Depois de aproximadamente 15 - 20 dias foram

perceptíveis a presença de tumores palpáveis nos animais. Quando cada um dos tumores atingiu um volume médio de 250 mm^3, os camundongos foram aleatoriamente designados para um dos dois grupos experimentais, e as injeções contendo os plasmídeos pCEP4-vazio (*n* = 6) ou pCEP4-INXS (*n* = 6) foram iniciadas (dia zero). O delineamento experimental consistiu em injetar intra-tumoralmente uma solução contendo 10 µg do plasmídeo em 50 µL (volume final) do reagente de transfecção *in vivo* TurboFect (Fermentas), de acordo com o protocolo do fabricante. A primeira injeção foi aplicada no dia 0 (zero) e a cada três dias após à primeira injeção ao longo de um período de 15 dias. O tamanho do tumor foi medido em dois diâmetros perpendiculares, com um paquímetro, antes de cada injeção. O volume do tumor foi calculado utilizando a fórmula de 0,5 X (maior diâmetro longitudinal) x (maior diâmetro transversal)^2 (Tomayko and Reynolds 1989). Os animais foram sacrificados 8 - 11 semanas após o implante do tumor, através da inalação de CO_2, quando o volume tumoral excedeu 600 mm^3 nos animais tratados com pCEP4-vazio (controle). As autópsias foram realizadas e os tumores foram pesados e fotografados.

3.24. Imageamento dos animais

Os tumores dos animais foram monitorados por imageamento óptico *in vivo* com o *scanner* Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Cada camundongo foi injetado com 1 nmol do traçador *IRDye 800CW EGF Optical Probe* (LI-COR, Biosciences) dissolvido em PBS através da veia caudal. Os animais foram anestesiados com uma combinação de ketamina (100 mg/mL) (Vetbrands) e Xilazina (1,95 mg/mL) (Vetbrands) durante o procedimento de imageamento dos tumores *in vivo*. Os parâmetros utilizados para o escâner foram: resolução de 169 µm; qualidade média; *offset* de 1 minuto com o canal de 800nm. O tempo de escaneamento utilizando esses parâmetros foi de 27 minutos. A fluorescência *in vivo* dos tumores nos animais foi acompanhada nos dias 0, 9 e 15 considerando a primeira injeção intra-tumoral com os plasmídeos e monitorada após 12 h da

injeção intravenosa do traçador. As imagens foram obtidas de acordo com o protocolo do fabricante.

3.25. Histologia dos xenotumores

Os xenotumores foram removidos cirurgicamente após a eutanásia dos animais, pesados e fotografados. Depois de fixados em formalina (Sigma), esses tumores foram observados por microscopia de luz utilizando o microscópio Olympus CKX41 após a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) (Sigma) e então embebidos em parafina. O RNA total dessas amostras parafinadas foi extraído com o kit miRNeasy FFPE (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, quantificado em ND-1000 (NanoDrop) e a sua integridade foi avaliada em um Bioanalyzer (Agilent). Em seguida, o RNA foi convertido em cDNA e utilizado para análise do perfil de expressão de genes por RT-qPCR como descrito nos itens 3.9.1 e 3.10.2.

3.26. Análise estatística

Os dados estão representados como a média ± o desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. A significância estatística foi calculada usando *two-way* ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni como um pós-teste ou usando um test *t* de Student (pareado, bicaudal, homocedástico). $P < 0{,}05$ foi considerado significativo, e a significância estatística está indicada nas figuras com um asterisco ($P < 0{,}05$), dois asteriscos ($P < 0{,}01$) ou três asteriscos ($P < 0{,}001$).

4. RESULTADOS

4.1. *INXS* é um longo RNA não codificador de proteínas *unspliced* e antisenso ao gene *BCL-X*

Visando identificar possíveis RNAs longos não codificadores de proteínas que pudessem ter um envolvimento na regulação do processo de morte celular programada (apoptose), procuramos nos bancos de dados públicos por ESTs e mRNAs que mapeavam em *loci* de genes que codificavam para proteínas da família BCL-2. Uma análise detalhada do *locus* genômico do *BCL-X*, um gene presente no cromossomo humano 20, revelou que pelo menos 70 ESTs *unspliced* cobriam esse *locus* e delimitavam uma região de 1291 pb (Figura 2A, retângulo preto e fino na parte superior). Essa região de sobreposição cobre a porção 5'-UTR do gene *BCL-X*.

Para verificarmos se essas ESTs não orientadas poderiam se estender ainda mais para regiões intrônicas do *locus* do gene *BCL-X*, realizamos ensaios de RACE-PCR 5’ e 3’ usando uma biblioteca comercial de cDNA de rim fetal humano. Após esses experimentos, o produto amplificado foi clonado e sequenciado caracterizando um transcrito *unspliced* de 1903 nt, e que se estendia além das ESTs por 537 nt (direção 5’) e 75 nt (direção 3’) (Figura 2A, retângulos cinzas e finos na parte superior). O transcrito completo se estendeu para além dos exons 1 e 2 do *BCL-X*, sobrepondo ao intron 1 e também cobrindo algumas das regiões genômicas a montante do *BCL-X* (Figura 2A). Esse transcrito corresponde à fita [+] do genoma, ou seja, ele é antisenso em relação ao mRNA do gene *BCL-X* que é transcrito a partir da fita [-] do genoma. Essa orientação antisenso foi confirmada por experimentos de RT-PCR fita-específica em três linhagens de células humanas (Figura 2B): 786-O (linhagem tumoral de rim), DU145 (linhagem tumoral de próstata) e HepG2 (linhagem tumoral de fígado), e a identidade dos produtos das PCRs obtidas foi confirmada por sequenciamento. Vale a pena notar que nenhuma transcrição foi observada nos controles na orientação senso (Figura 2B), o

que demonstra a ausência de DNA genômico contaminante, e também que os níveis de pré-mRNA do gene *BCL-X* não se acumulam nessas linhagens. Uma análise *in silico* utilizando a ferramenta CPC (*Coding Potential Calculator*) (Kong, Zhang et al. 2007) evidencia a ausência do potencial codificador de proteínas para esse transcrito longo, *unspliced* e antisenso. Portanto, esse RNA foi nomeado de *INXS*, para *intronic BCL-XS-inducing lncRNA*. A sequência do lncRNA *INXS* foi depositada no *GenBank*, e seu *Accession Number* é KC505631.

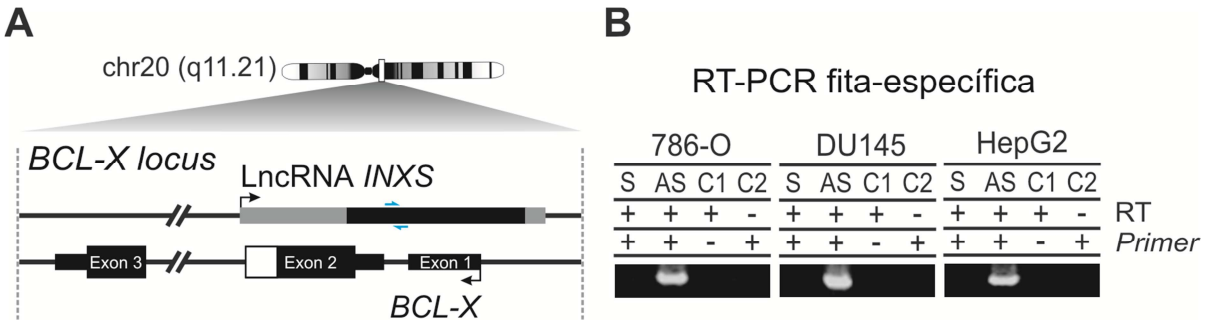

Figura 2. Identificação e caracterização do *INXS* como um lncRNA intrônico, *unspliced* e transcrito a partir do *locus* do gene *BCL-X*. (A) Organização genômica do *locus* do gene *BCL-X* no cromossomo 20 com o mRNA codificador da proteína *BCL-X* transcrito a partir da fita [-] do genoma e do lncRNA *INXS* transcrito a partir da região intrônica na fita oposta do genoma, fita [+]. Os retângulos de cor cinza no *INXS* indicam as regiões do transcrito obtidas por RACE-PCR, enquanto o retângulo de cor preta indica a predição inicial do *INXS*, feita a partir de ESTs públicas. Pequenas setas azuis ao lado do *INXS* indicam as posições dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas PCRs. Já para o *BCL-X*, os retângulos pretos e mais espessos indicam os exons, enquanto os retângulos pretos e mais finos as UTRs. O retângulo branco presente no exon 2 é retido exclusivamente na isoforma longa anti-apoptótica *BCL-XL*, sendo excisado durante o processamento do pre-mRNA do *BCL-X* para dar origem a isoforma curta pró-apoptótica *BCL-XS*. **(B)** A transcrição antisenso [AS] do lncRNA *INXS* foi confirmada por RT-PCR fita-específica nas linhagens celulares humanas 786-0, DU145 e HepG2. A transcrição na orientação senso [S] não foi detectada na região do *locus* do gene *BCL-X*. C1 e C2 são os controles negativos: sem oligonucleotídeos iniciadores (- *primer*) e sem transcriptase reversa (- RT), respectivamente. Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.2. *INXS* é menos abundante em um conjunto de linhagens celulares humanas tumorais e tecidos tumorais de rim quando comparados com células e tecidos não tumorais

Linhagens humanas de células tumorais de rim, fígado, mama e próstata mostraram uma expressão endógena do *INXS* de 5 a 9 vezes mais baixa em comparação com linhagens de células não tumorais derivadas dos mesmos tecidos (Figura 3A) quando analisadas por RT-qPCR pelo método de quantificação absoluta. Em paralelo, foi medida a abundância relativa do mRNA de *BCL-X* em todas as linhagens celulares estudadas, e percebemos que a expressão de *BCL-X* tinha um padrão oposto, isto é, o mRNA é mais expresso nas linhagens celulares tumorais quando comparada com as linhagens tumorais de mesma origem histológica (Figura 3B). Curiosamente, a isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* apresentou uma abundância relativa mais baixa nas linhagens tumorais quando comparada às linhagens tumorais derivadas dos quatro tecidos estudados (Figura 3B, barras pretas).

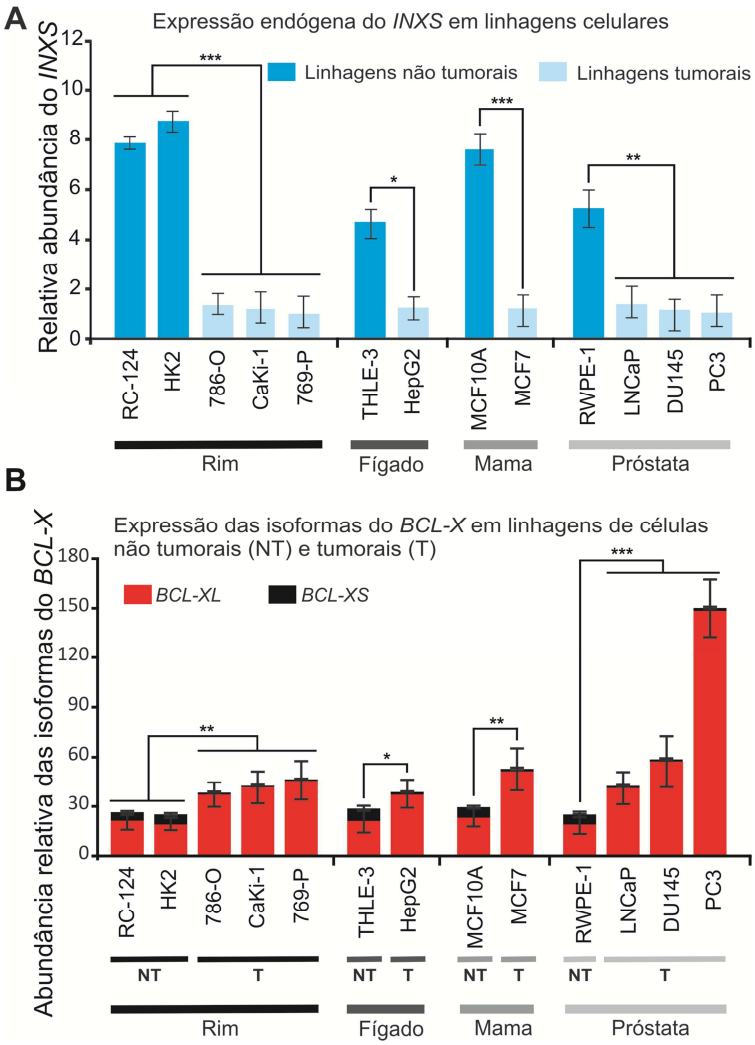

Figura 3. Níveis absolutos de expressão do *INXS* e relativos das isoformas de *BCL-X* em um painel de linhagens celulares tumorias e não tumorais e em tecidos de pacientes com cancer de rim. (A) Abundância relativa do *INXS* através de um painel de linhagens celulares tumorais (barras azul claro) e não tumorais (barras azul escuro) derivadas de células do rim, do fígado, da mama e da próstata. A quantificação absoluta do número de moléculas do *INXS* foi obtida para cada linhagem celular e os dados estão apresentados como a abundância relativa do valor absoluto do *INXS* relativizado pelo número de moléculas obtido na linhagem celular CaKi-1 (175 moléculas por ng de RNA total). **(B)** Abundância relativa de expressão das isoformas dos mRNAs de *BCL-XS* (barras pretas) e *BCL-XL* (barras vermelhas) no mesmo painel de linhagens celulares mostrado em (A). Os níveis de abundância das isoformas foram plotados em relação à expressão da isoforma de *BCL-XS* na linhagem celular CaKi-1. Os dados apresentados referem-se à média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. *(P <0,05), **(P <0,01) e ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Uma vez que a razão da abundância relativa do *INXS* entre as linhagens de rim não tumorais / tumorais foi menor quando comparadas com as demais linhagens celulares de outras origens histológicas estudadas aqui, nós escolhemos a linhagem tumoral de rim 786-O como um modelo para a caracterização da indução da expressão endógena do *INXS* nos experimentos subsequentes. Nesta linhagem de células o número absoluto de moléculas do *INXS* corresponde a cerca de 5 cópias por célula, enquanto que a isoforma *BCL-XS* é 2 vezes mais elevada (~12 cópias por célula) e *BCL-XL* é 35 vezes maior do que o *INXS* (~167 cópias por célula) .

Em seguida, analisamos a expressão endógena de *INXS* nas amostras de tecidos de rim pós-nefroctomia de 13 pacientes com carcinoma de células renais, e observamos níveis muito variáveis na expressão relativa de *INXS* (Figura 4A). É interessante ressaltar que em todas as amostras dos pacientes, quando o nível do *INXS* no tecido não tumoral foi ajustado para 1, verificou-se que seus níveis foram de 2 a 60 vezes menor nos tecidos tumorais quando comparados com os tecidos não tumorais pareados (Figura 4B). Mais uma vez, a abundância relativa do mRNA de *BCL-X* mostrou um padrão oposto em relação ao *INXS*, sendo significativamente mais elevada nos tumores do que nos tecidos não tumorais pareados (Figura 4C). A isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* foi significativamente menos abundante nos tecidos tumorais quando comparados aos tecidos não tumorais pareados (Figura 4C, barras pretas) em todas as amostras de pacientes com câncer de rim.

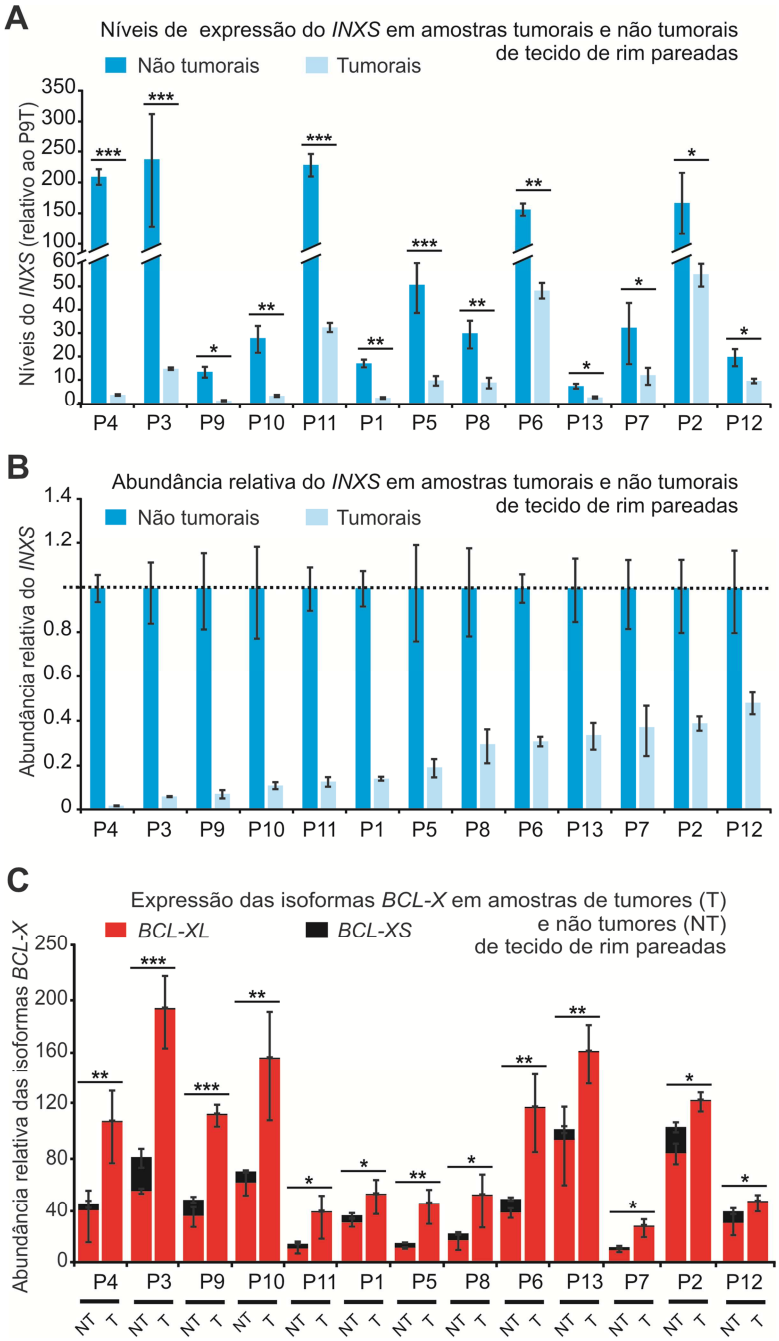

Figura 4. Níveis de expressão do lncRNA *INXS* e das isoformas de mRNA do *BCL-X* em amostras tumorais e não tumorais provenientes de pacientes com cancer de rim. (A) Níveis de expressão do *INXS* em tecidos não tumorais (barras azul escuro) e tumorais (barras azul claro) em um painel de amostras de 13 pacientes com carcinoma renal de células claras (P1 ao P13). A expressão do *INXS* para cada paciente está mostrada em relação à amostra de tumor P9. Os dados representam a média ± o desvio padrão de três réplicas técnicas. **(B)** A expressão do *INXS* nas amostras não tumorais (barras azul escuro) de cada paciente é definida como 1 e a expressão do *INXS* nas amostras tumorais pareadas (barras azul claro) é calculada em relação ao seu par não tumoral. Os pacientes estão classificados em ordem crescente do nível de expressão relativa do *INXS* nos tumores. **(C)** Abundância relativa de expressão do mRNA das isoformas *BCL-XS* (barras pretas) e *BCL-XL* (barras vermelhas) nos tecidos não

tumorais (NT) e tumorais (T) nas mesmas 13 amostras de tecidos pareados dos pacientes com carcinoma de rim. Os níveis de expressão das isoformas estão mostrados em relação à expressão da isoforma *BCL-XS* nos tecidos tumorais (T) de cada paciente. Os dados representam a média ± o desvio padrão de três réplicas técnicas. *(P <0,05), **(P <0,01) e ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

De acordo com os dados anteriores, percebemos que existe uma correlação positiva entre a expressão do lncRNA *INXS* e do mRNA *BCL-XS* tanto entre as linhagens celulares estudadas nesse trabalho quanto entre os tecidos de rim dos pacientes. Ambos, o *INXS* e o mRNA *BCL-XS*, são menos abundantes nas linhagens celulares tumorais e nos tumores de rim dos pacientes, quando comparados com as linhagens não tumorais e os tecidos não tumorais dos pacientes. Por outro lado, o mRNA de *BCL-XL* é mais abundante nas células e tecidos tumorais, onde o *INXS* é menos expresso. Esse perfil de correlação positiva de expressão entre o *INXS* e mRNA de *BCL-XS* e de correlação negativa entre o *INXS* e o mRNA de *BCL-XL* sugere que o *INXS* pode desempenhar um importante papel na regulação do *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X*.

4.3. Caracterização estrutural do lncRNA *INXS*

O lncRNA *INXS* foi caracterizado quanto à sua biogênese, quanto à presença da estrutura cap 5', estabilidade, localização celular e avaliação da atividade do seu possível promotor.

4.3.1. Biogênese do *INXS*

Uma análise detalhada dos dados de ChiP-seq do projeto ENCODE (ENCODE, 2012) indicou um forte enriquecimento da presença da marca na cromatina da RNA polimerase II (RNAP II) no local putativo de início da transcrição do *INXS*, dentro do *locus* genômico do *BCL-X*. Para determinar se o lncRNA *INXS* é transcrito pela RNAP II, células da linhagem HeLa foram tratadas com α-amanitina, um inibidor de RNAP II. A α-amanitina é um peptídeo cíclico de oito aminoácidos que na concentração usada em nossos experimentos inibe a

enzima RNAP II bloqueando sua translocação sobre o DNA durante a elongação da transcrição (Bushnell, Cramer et al. 2002; Gong, Nedialkov et al. 2004). Realizamos a extração do RNA de três réplicas biológicas de células HeLa tratadas ou não-tratadas (controle) com α-amanitina (10 μg/mL) durante 9 h, seguindo essencialmente os protocolos de trabalhos já publicados (Lee, Kim et al. 2004; Nakaya, Amaral et al. 2007; Raha, Wang et al. 2010). Como controle negativo e normalizador do experimento (RT-qPCR), utilizamos o transcrito *pre-tRNA*^{Tyr} e o *7SK*, que são sintetizados pela RNAP III, que não é sensível a baixas concentrações de α- amanitina, tais como as utilizadas nestes experimentos (Jacob, Sajdel et al. 1970; Kedinger, Gniazdowski et al. 1970; Lindell, Weinberg et al. 1970). Através de RT-qPCR, vimos que o *INXS* é transcrito pela RNAP II, visto que houve uma diminuição de 90% de sua abundância após o tratamento com α-amanitina (Figura). Resultados semelhantes foram observados para os controles positivos, *ACTB* e *MYC* (Figura), genes sabidamente transcritos pela RNAP II.

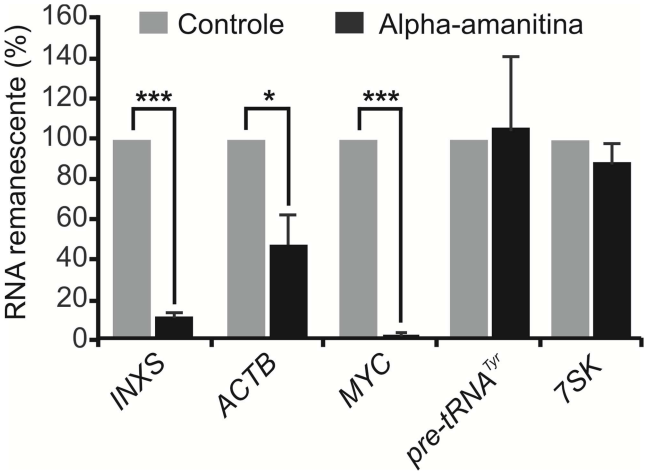

Figura 5. O lncRNA *INXS* é transcrito pela RNAP II. Células HeLa foram tratadas com o inibidor de RNA Polimerase II (RNAP II) α-amanitina (barras pretas) ou com o veículo (barras cinzas) por 24 h. A abundância do transcrito *INXS* foi medida por RT-qPCR. Os resultados foram normalizados pelo nível de *5S RNA*, que é transcrito pela RNAP III. O mRNA de *ACTB* e *MYC*, que são transcritos pela RNAP II, foram utilizados como controles positivos. Em paralelo o *pre-tRNA*^{tyr} e o *7SK*, que são transcritos pela RNAP III, foram utilizados como controles negativos. Foram realizadas três réplicas biológicas; as barras de erro referem-se ao desvio padrão. Asteriscos indicam diminuição significativa do *INXS* após o tratamento com o inibidor de RNAP II. *(P <0,05) e ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.3.2. O *INXS* possui a estrutura cap 5’

Para investigar se *INXS* possui a modificação 7-metil guanosina na extremidade 5' (cap 5'), característica de mRNAs transcritos pela RNAP II, foi utilizado o tratamento enzimático para remoção do cap 5' com a enzima *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) e posterior digestão dos RNAs por uma enzima 5'-exonuclease (5'-Exo), que digere RNAs que possuem 5'-monofosfato. Os RNAs com a extremidade 5' protegida pela presença de cap 5' são resistentes à digestão pela 5'-Exo, enquanto RNAs sem cap 5' ou parcialmente degradados são digeridos pela enzima. Foram feitas duas condições de tratamento: i) amostra tratada com TAP e 5'-Exo (TAP^+/5'-Exo^+) e ii) amostra tratada apenas com 5'-Exo (TAP^-/5'-Exo^+). A amostra TAP^-/5'-Exo^+ foi submetida à incubação com o mesmo tampão e temperatura da amostra a ser tratada com a enzima TAP, previamente ao tratamento com a enzima 5´-Exo, o que assegura que as amostras em estudo (TAP^+/5'-Exo^+ e TAP^-/5'-Exo^+) ficassem sujeitas as mesmas condições e portanto, susceptíveis ao mesmo nível de degradação inespecífica do RNA por RNases contaminantes.

A detecção da presença ou ausência de cap 5' via tratamento enzimático (TAP/5'-Exo) foi verificada através de RT-qPCR. A Figura 6 mostra que *INXS* possui cap na sua extremidade 5´, por não ser degradado com tratamento apenas com 5'-Exo. Ao removermos o cap 5' com a enzima TAP e depois tratarmos essa fração com a 5'-Exo, observamos uma diminuição do 80% do RNA *INXS* em relação ao tratamento apenas com 5'-Exo. O mesmo foi observado no controle positivo com *TUBA1C*, um gene que sabidamente possui cap 5’, demonstrando que as condições de tratamento com as enzimas foram eficientes na remoção do cap 5´.

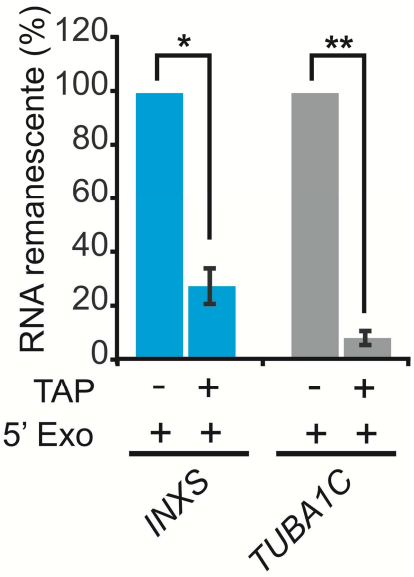

Figura 6. O lncRNA *INXS* possui a estrutura cap 5'. RNA total de células HeLa foi digerido exclusivamente com 5'-exonuclease (5'-Exo) ou em combinação com tobacco acid pyrophosphatase (TAP), como indicado. Subsequentemente, as amostras foram submetidas à transcrição reversa seguida de qPCR, com oligonucleotídeos iniciadores específicos para *INXS* e *TUBA1C* (controle positivo) como indicado. Foram realizadas três réplicas biológicas; as barras de erro referem-se ao desvio padrão. Asteriscos indicam uma diminuição significativa do *INXS* após o tratamento com TAP^+/5'-Exo^+ (barras azul) e *TUBA1C* (barras cinza). *(P <0,05) e **(P <0,01). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.3.3. Estimativa da meia-vida do *INXS*

Para estudar a estabilidade de *INXS*, medimos a mudança de sua expressão após a inibição da transcrição com actinomicina-D, durante cinco diferentes tempos de tratamento (0, 1, 3, 6 e 8 h). A actinomicina-D é um antibiótico polipeptídico cíclico, que forma um complexo estável com o DNA fita simples no complexo de iniciação da transcrição, bloqueando a elongação da transcrição pelas RNA polimerases (Sobell 1985). Para este experimento, foi extraído RNA de três réplicas biológicas independentes de células HeLa tratadas com actinomicina-D ou com seu veículo (DMSO; controle) e realizado RT-qPCR em cada condição e tempo. a partir destas medidas foi calculada a meia-vida do *INXS* por meio do modelo de *one-phase exponential decay* (Graphpad 5.02), segundo descrito em (Clark, Johnston et al. 2012). A meia vida ($t_{1/2}$) do *INXS* foi de aproximadamente 3 h (Figura 7, círculos azul) e a meia-vida do mRNA de *MYC*, controle do experimento, foi de 29 min (Figura 7, círculos preto), compatível com medidas de estabilidade já descritas na literatura para este mRNA (Dani, Blanchard et al. 1984; He, Liu et al. 2000).

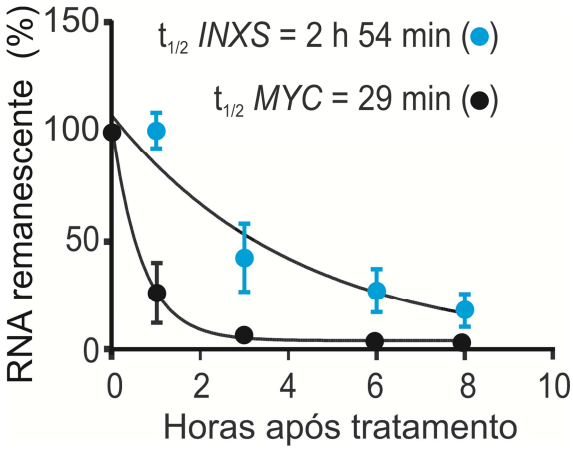

Figura 7. Estimativa da estabilidade da meia-vida do *INXS*. Células HeLa foram tratadas com o inibidor transcricional actinomicina-D ou com o veículo (DMSO) por 0, 1, 3, 6 e 8 h. Os níveis do *INXS* e *MYC* foram medidos por RT-qPCR e normalizados por uma amostra não tratada. Foram realizadas três réplicas biológicas; as barras de erro referem-se ao desvio padrão. A meia-vida ($t_{1/2}$) obtida para cada uma das curvas ajustadas usando o método *one-phase exponential decay* está mostrada. Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.3.4. *INXS* encontra-se predominantemente enriquecido na fração nuclear

Para identificar a localização subcelular do *INXS*, foram realizados experimentos de fracionamento celular para obtenção de frações nucleares e citoplasmáticas de células HeLa, por meio de lise em condições que rompem a membrana plasmática, mas mantém o envelope nuclear intacto. Foi realizado RT-qPCR de amostras de RNA obtidas de cada compartimento, utilizando oligonucleotídeos iniciadores para o lncRNA *INXS* e os respectivos controles. O *MALAT1* foi usado como controle de um lncRNA que é bem documentado como retido no núcleo (Tripathi, Ellis et al. 2010). O precursor *45S rRNA*, que é sabidamente nuclear, e o *18S rRNA*, que é descrito como retido na fração citoplasmática, foram utilizados como controles dos seus respectivos compartimentos celulares. A quantificação feita por RT-qPCR mostra uma razão núcleo / citoplasma (N/C) de detecção do *INXS* de 8, demonstrando que o mesmo encontra-se predominantemente enriquecido nas frações nucleares (Figura 8A).

Como controles adicionais, foram feitos *western blotting* de extratos proteicos de ambos os compartimentos celulares, núcleo e citoplasma (Figura 8B). Foi detectada a proteína GAPDH apenas na fração citoplasmática e a histona H3 apenas na fração nuclear, proteínas já descritas na literatura como retidas no citoplasma e no núcleo, respectivamente.

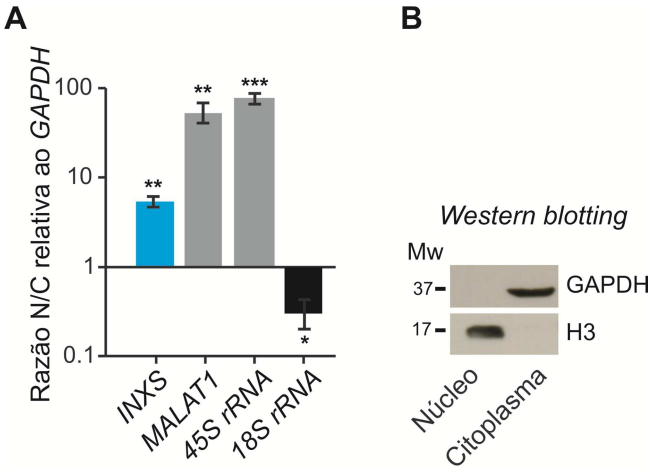

Figura 8. *INXS* é enriquecido na fração nuclear das células. (A) Abundância relativa do transcrito *INXS* nos compartimentos mostrando a razão núcleo/citoplasma (N/C). Quantidades iniciais comparáveis de cada fração foram usadas nas RT-qPCR para medir *o INXS* (barra azul). O lncRNA *MALAT1* e o *45S rRNA* foram usados como controles das frações nucleares e o *18S rRNA* como um controle da fração citoplasmática. Frações celulares enriquecidas em RNAs nucleares ou citoplasmáticos foram preparadas em triplicatas. Os dados apresentados referem-se à média ± o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo *(P <0,05), **(P <0,01) e ***(P <0,001). **(B)** Como controle adicional, *western blotting* dos extratos proteicos das frações foi realizado, detectando GAPDH apenas na fração citoplasmática, e histona H3 apenas na fração nuclear. Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.3.5. A expressão endógena do *INXS* é dirigida por um promotor independente e unidirecional

Finalizando a caracterização estrutural do lncRNA, identificamos um possível promotor na região que abrange o sítio de início de transcrição do *INXS*, que foi denominada de promotor antisenso, em relação ao gene *BCL-X* (senso) e ao lncRNA *INXS* (que também é antisenso) do mesmo *locus* (Figura 9A). Esse possível promotor foi predito *in silico* utilizando busca por regiões conservadas e consenso com o programa *AliBaba2.1*, que usa como banco de dados o *TRANSFAC*. Baseado em predições *in silico*, esse possível promotor contem um *GC-Box* e um *TATA-Box*, dentro da região genômica prevista para o promotor de 670 pb, localizados à montante do local do início da transcrição do *INXS* (Figura 9A).

Para avaliação da atividade promotora, foi utilizado o *Dual-Luciferase Reporter Assay System*, que realiza a medida da atividade da enzima *Firefly luciferase*, seguida da inativação desta enzima e posterior medição da atividade da *Renilla luciferase*. Esta segunda medida é utilizada para a normalização dos valores da atividade *Firefly luciferase*, a fim de reduzir as

variações decorrentes de diferenças nas eficiências de transfecção das células. O promotor candidato antisenso, assim como a mesma sequencia promotora porém clonada invertida (promotor senso), e um fragmento antisenso menor, foram clonados no plasmídeo pGL3 a montante do gene da *luciferase*, e a quantificação da atividade do promotor foi feita medindo-se a intensidade luminosa emitida pela *luciferase* após a reação com seu substrato. Também foram utilizados nos ensaios de atividade de promotor, como controle positivo e negativo, os plasmídeos pGL3-SV40 e pGL3-vazio, respectivamente.

A atividade do possível promotor antisenso do *INXS* foi detectada (Figura 9B) em células da linhagem HEK293 e DU145 (barras verdes). Os resultados demonstram que o promotor antisenso do *INXS* possui uma forte atividade unidirecional, sendo responsável pela transcrição do lncRNA. Esses dados detectam um promotor específico para o *INXS*, o que indica que esse lncRNA representa uma unidade transcricional independente.

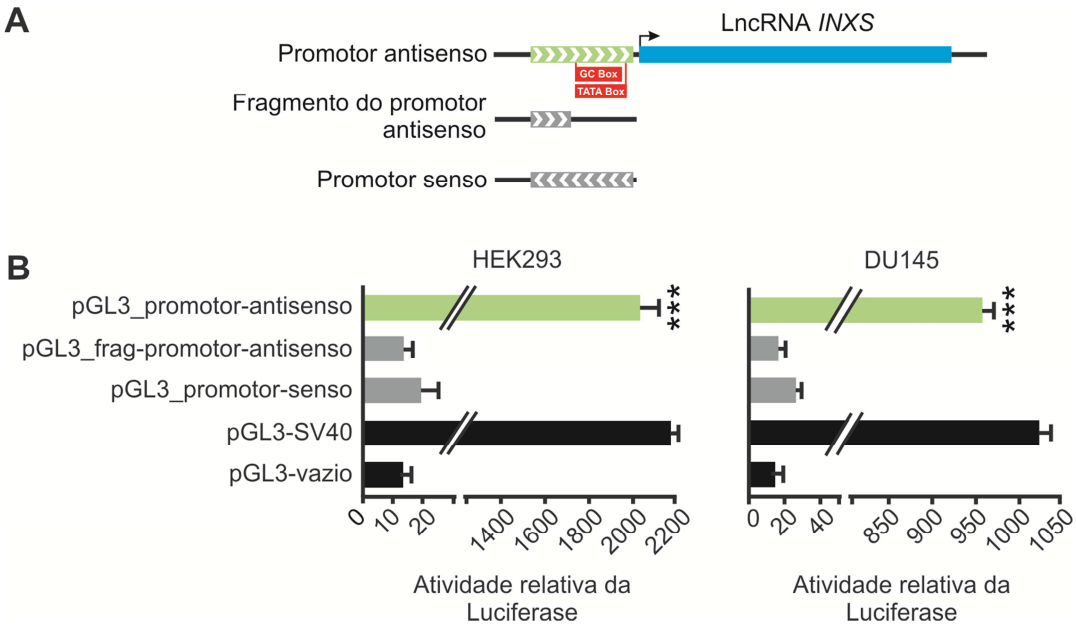

Figura 9. Ensaio da atividade promotora do *INXS*. (A) Localização genômica dos três segmentos de DNA (barras verde e cinza com setas no interior) utilizados na construção dos vetores baseados no sistema pGL3 para transfecção das células. As pontas das setas dentro das barras verde e cinza indicam a orientação da sequência utilizada na construção dos vetores. **(B)** Atividade da *luciferase* das diversas construções medidas em unidades relativas de luz. Os plasmídeos pGL3-SV40 e pGL3-vazio foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os dados representam a média ± o desvio padrão de três

experimentos independentes. ***(*P* <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.4. O *knockdown* do *INXS* em uma linhagem celular não tumoral leva à uma redução significativa da proporção entre as isoformas *BCL-XS* / *BCL-XL*

Para testar se o *INXS* poderia ser um regulador da expressão de *BCL-X*, realizamos o *knockdown* do lncRNA na linhagem celular não tumoral de rim RC-124, que apresenta níveis relativamente mais elevados de expressão endógena do *INXS* quando comparada com as linhagens tumorais de rim (Figura 3A e Figura 10A). Baseado também na correlação de expressão que verificamos entre o *INXS* e as isoformas do *BCL-X* (Figura 3B) acompanhamos o efeito desse *knockdown* sobre os níveis do mRNA de *BCL-XS* e *BCL-XL*. Após o silenciamento utilizando oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs), verificamos uma redução de 60% no nível endógeno do *INXS* (*P* <0,05) (Figura 10A) causando uma redução significativa de expressão do mRNA da isoforma *BCL-XS* (*P* <0,05) (Figura 10B) que pode ser visualizada através da razão *BCL-XS* / *BCL-XL* que foi significativamente reduzida de 0,25 para 0,15 (*P* <0,01) (Figura 10C). Esses resultados mostram que o lncRNA *INXS* regula o balanço de expressão entre as isoformas de *BCL-X*.

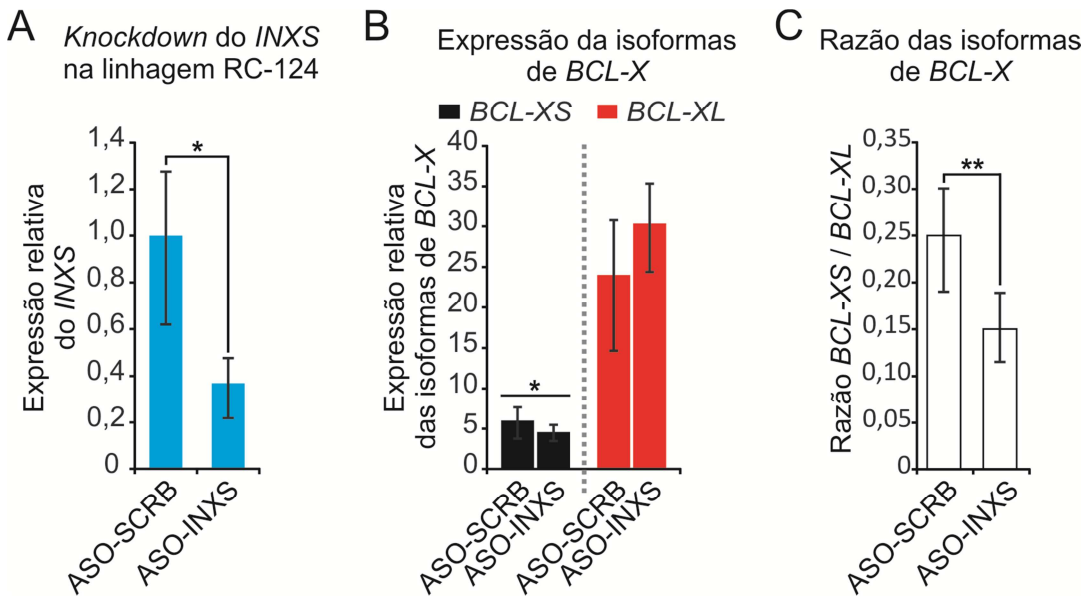

Figura 10. O *knockdown* do lncRNA *INXS* na linhagem celular não tumoral de rim RC-124 reduz significativamente a razão entre as isoformas *BCL-XS* / *BCL-XL*. (A) Células RC-124 foram transfectadas com dois oligonucleotídeos antisenso modificados (ASO-INXS-1 e -2) e depois de 24 h de transfeção foi realizado RT-qPCR. O *knockdown* reduziu em 60% os níveis endógenos do lncRNA *INXS* em relação ao oligonucleotídeo ASO *scrambled* (ASO-SCRB). **(B)** Os níveis de mRNA das isoformas *BCL-XS* (barras pretas) e *BCL-XL* (barras vermelhas) foram medidos por RT-qPCR nas mesmas condições de transfecção das células. **(C)** A razão entre os mRNAs de *BCL-XS* / *BCL-XL* nestas mesmas células foi significativamente reduzida de 0,25 para 0,15 após 24 h de transfecção com os oligonucleotídeos que alvejam o *INXS* (ASO-INXS-1 e -2). Os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. *(P <0,05), **(P <0,01). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.5. Agentes indutores de apoptose levam ao aumento da expressão endógena do *INXS*

Considerando-se a premissa de que a expressão do lncRNA *INXS* correlaciona-se positivamente com a expressão da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* e negativamente com a expressão da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* (Figuras 3 e 4), fomos avaliar se os níveis endógenos do transcrito *INXS* poderiam ser modulados por eventos que sabidamente levam à morte celular programada através do *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X*. Para isso, células da linhagem tumoral de rim 786-O foram tratadas com cada um de três agentes

classicamente conhecidos por serem bons indutores de apoptose, e os níveis desses transcritos foram avaliados.

O primeiro indutor de morte celular utilizado foi a exposição das células 786-O (~1 x 10^7 células) à 40 J / m^2 de luz UV-C, sendo que as células foram mantidas em cultura por até 24 h após o tratamento. Amostras de RNA foram coletadas nos tempos de 0, 6, 12 e 24 h após a exposição. Observamos um aumento temporal da expressão do *INXS*, como pode ser visto na Figura 11A, onde se verifica um aumento de 5 vezes em 24 h após a exposição à luz UV-C. Quando olhamos para as isoformas de *BCL-X*, percebemos que a isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* aumentou 7 vezes (Figura 11B, barras pretas), acompanhada por uma redução concomitante na isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* (Figura 11B, barras vermelhas). O resultado final foi um aumento de 10 vezes da razão *BCL-XS* / *BCL-XL*, que foi de 0,06 no tempo 0 h para 0,6 no tempo 24 h após a exposição à luz UV-C (Figura 11C). Em seguida, para confirmar que de fato as células haviam morrido por apoptose, foram medidas as atividades das caspases, induzidas pelo aumento nos níveis de mRNA da isoforma *BCL-XS*. Na verdade, Plotz et (Plotz, Gillissen et al. 2012) já demonstraram que um aumento no mRNA de *BCL-XS* resulta em um aumento da abundância da proteína BCL-XS, favorecendo a interação proteína-proteína entre BCL-XS e VDAC2 (*voltage-dependent anion channel 2*) com a consequente liberação de BAK1 do canal VDAC2. Este fenômeno desencadeia a apoptose por ativação das caspases 3 e 9 (Plotz, Gillissen et al. 2012). Por isso medimos o mRNA de *BCL-XS* e as caspases como indicadores do desencadeamento da apoptose.

Resumindo, o aumento do mRNA de *BCL-XS* causado pela exposição à radiação UV-C levou à ativação da via intrínseca da apoptose, conforme visto pelos aumentos de 10 e 3,5 vezes na atividade das caspases efetoras 3 (Figura 11D) e 7 (Figura 12A), respectivamente, e da caspase iniciadora 9 (Figura 11D). A caspase-8, que faz parte da via extrínseca da apoptose, não foi ativada pela exposição à UV-C (Figura 12A).

Um padrão similar de expressão aumentada do lncRNA *INXS* foi obtido após 24 h de manutenção das células em meio de cultura com carência de SFB (Figura 11E). Células 786-O foram mantidas em cultura na presença de concentrações diferentes de SFB que variaram de 10% até 0,5% (v/v) (Figura 11E). Esse carenciamento resultou em uma dose-resposta de expressão aumentada do *INXS* acompanhada pelo aumento da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* e concomitante redução da expressão da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* (Figura 11E, F e G). De maneira geral, os padrões de expressão e a razão entre as isoformas observados foram similares àqueles vistos na exposição à UV-C (Figura 11C e Figura 11G). Olhando agora para o perfil de ativação das caspases, percebemos um padrão também semelhante em relação à exposição das células à radiação UV-C (Figura 11H e Figura 12B).

O tratamento com o agente anti-tumoral sulforafano (SFN) induz a parada do ciclo celular e apoptose, causando uma redução na expressão da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* (Yeh and Yen 2005). Após 24 h do tratamento das células 786-O com SFN (50 µM), houve um aumento de 10 vezes na expressão *INXS* (Figura 11I), que foi novamente acompanhado por alterações semelhantes no padrão de expressão entre as isoformas de *BCL-X* e na ativação de caspases (Figura 11J, K, L, e 12C).

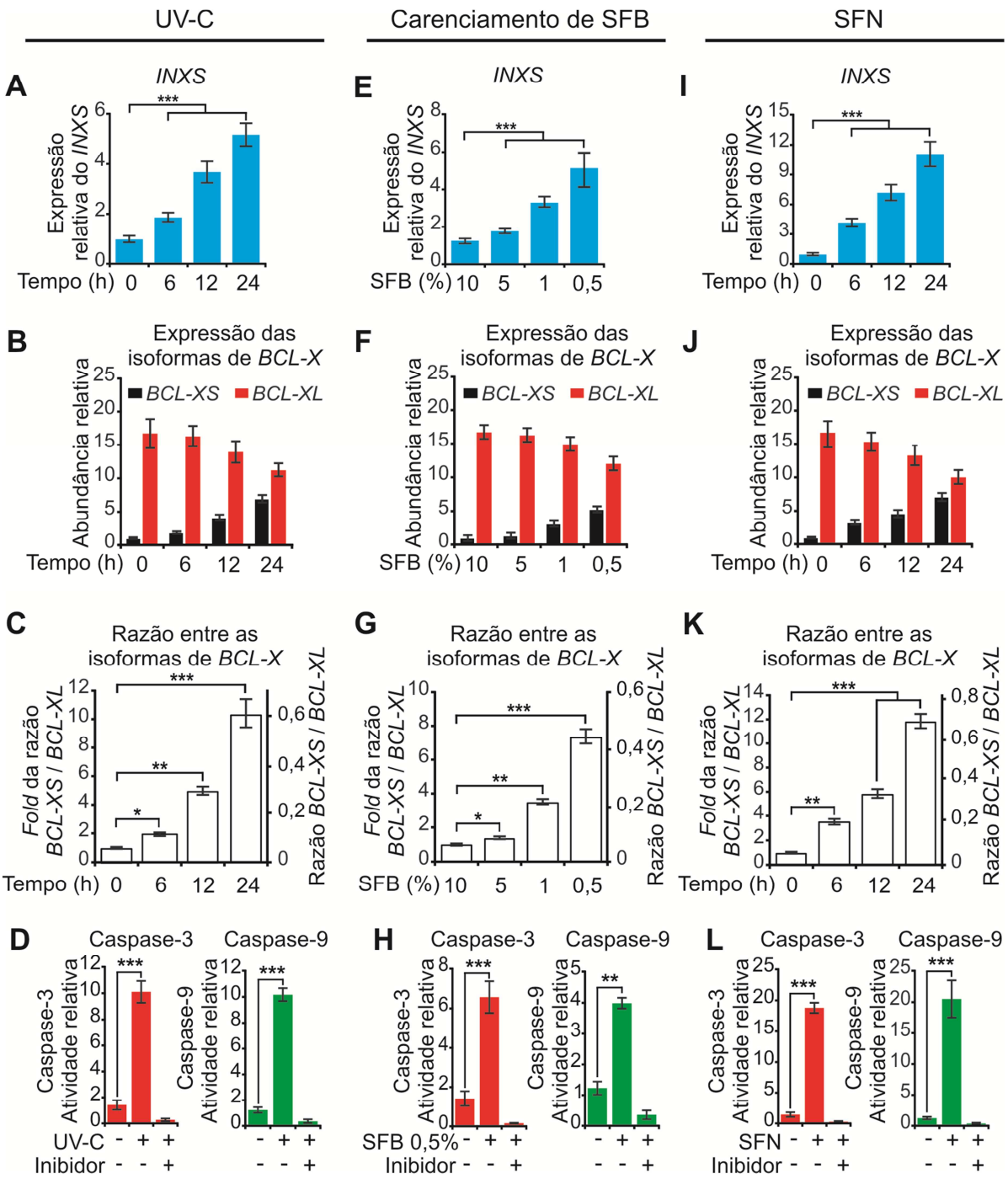

Figura 11. A indução da expressão endógena do lncRNA *INXS* por agentes indutores de apoptose está associada ao aumento da expressão da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* e ativação das caspases-3 e -9. (A, E, I) Células da linhagem tumoral humana 786-O apresentaram uma expressão temporal aumentada do *INXS* induzida por (A) exposição à 40 J / m^2 de irradiação UV-C, (E) redução na concentração de soro fetal bovino (SFB) e (I) tratamento com 50 µM do fármaco anti-tumoral sulforafano (SFN). Os dados representam medidas de RT-qPCR. **(B, F, J)** Níveis da abundância relativa de expressão da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* (barras pretas) e da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* (barras vermelhas) nas mesmas células por RT-qPCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma delas. **(C, G, K)** Razão e *fold change* da razão entre as isoformas *BCL-XS* / *BCL-XL*

nas mesmas células. **(D, H, G)** Ensaio fluorimétrico da ativação da caspase-3 (barras vermelhas) e da caspase-9 (barras verdes) em células 786-O 24 h após a exposição (D) à 40 J / m^2 de UV-C, (H) à SFB 0,5% e (L) à 50 µM de SFN. Os dados apresentados referem-se à média ± o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo *(*P* <0,05), **(*P* <0,01) e ***(*P* <0,001). A ativação ou não das demais caspases (caspase-7 e -8) está mostrada na Figura 14. Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.6. *INXS* é um lncRNA mediador do processo de morte celular causada por agentes indutores de apoptose

A transfecção das células 786-O com dois oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs) e complementares ao lncRNA *INXS* aboliu significativamente o aumento dos níveis do *INXS* causado por cada um dos três agentes indutores de apoptose, testados depois 24 h: exposição à luz UV-C (Figura 12A), carenciamento de SFB a 0,5% (Figura 12E) ou tratamento com 50 µM de SFN (Figura 12I). O *knockdown* do *INXS* aboliu o aumento da expressão do mRNA da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* frente à cada um dos três tratamentos das células com os indutores de morte (Figura 12B, F e J, barras pretas). O oposto aconteceu com o mRNA da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL*, antes diminuída pelos tratamentos e que depois do *knockdown* tiveram seus níveis aumentados (Figura 12B, F e J, barras vermelhas). Essa reversão também pode ser vista pela alteração da relação de *BCL-XS* / *BCL-XL* em que a isoforma pró-apoptótica de *BCL-XS* foi significativamente reduzida em cada uma das três condições testadas, sempre acompanhada pelo aumento concomitante da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* (Figura 12C, G e K). Como consequência do *knockdown* do *INXS*, tanto a ativação da caspase-3 efetora (Figura 12D, H e L, barras vermelhas) quanto da caspase-9 iniciadora (Figura 12D, H e L, barras verdes) foram significativamente abolidas em cada uma das três condições testadas. As atividades das caspases-7 e -8 foram menos afetadas ou não afetadas pelo *knockdown* do *INXS* (Figura 14D, E e F).

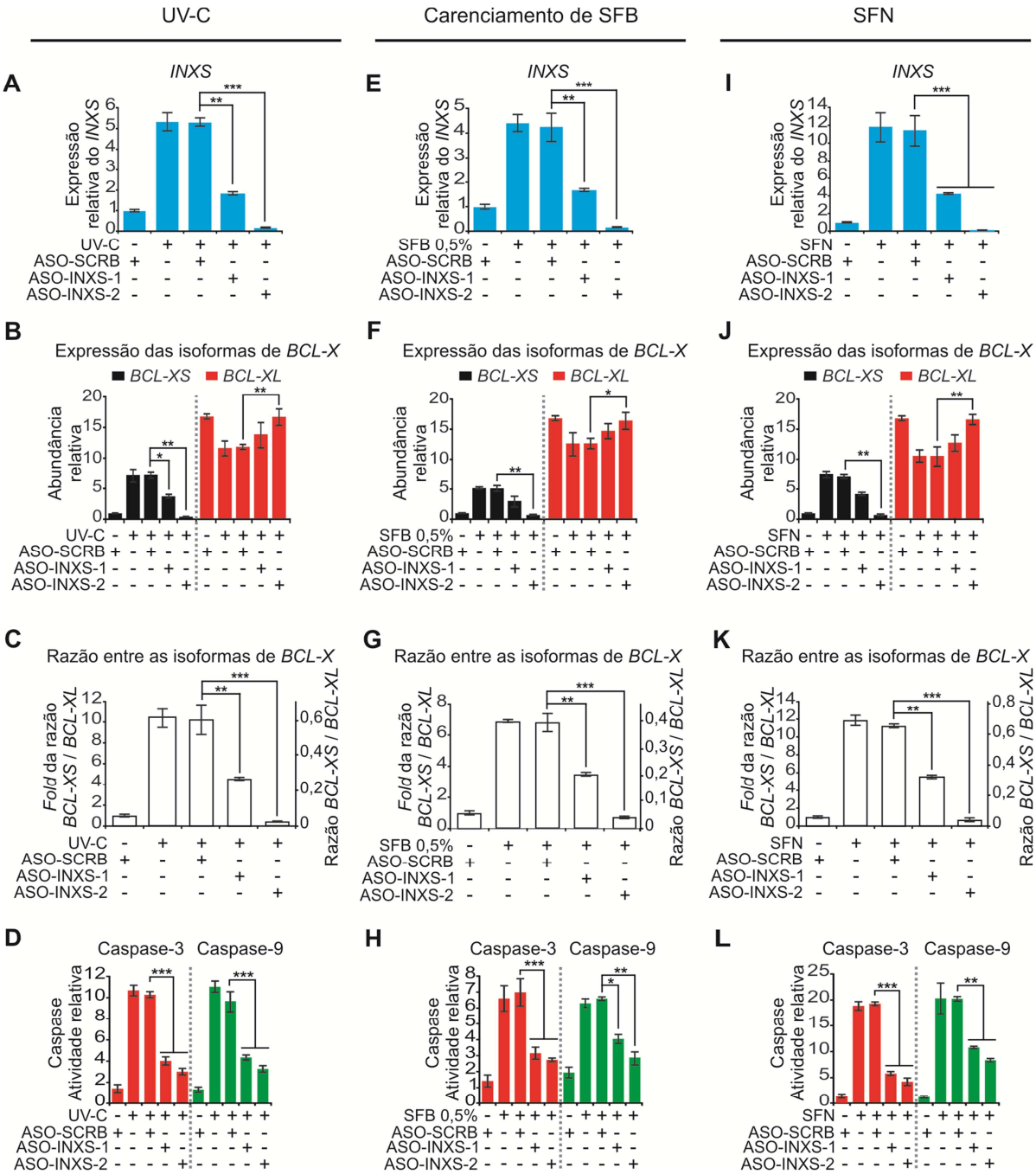

Figura 12. O *knockdown* do *INXS* anula em grande parte o efeito causado por agentes indutores de apoptose em células 786-O. (A, E, I) Reversão da indução da expressão endógena do *INXS* pelos dois oligonucleotídeos antisenso (ASOs) que alvejam o lncRNA *INXS* (ASO-INXS-1 ou -2) em uma concentração final de 500 nM cada. RT-qPCR foi realizado em células 786-O depois de submetidas (A) à luz UV-C 40 J / m^2, (e) carenciamento de soro fetal bovino (SFB) ou (I) tratamento com o fármaco anti-tumoral sulforafano (SFN). Essas células foram previamente transfectadas com os ASOs contra o *INXS* ou o ASO-SCRB controle. **(B, F, J)** O aumento do mRNA da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* (barras pretas) acompanhado da diminuição do mRNA da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* (barras vermelhas) induzidos pelos agentes apoptóticos são abolidos na presença dos oligonucleotídeos antisenso que levam ao *knockdown* do *INXS* (ASO-INXS-1 ou -2). **(C, G,**

K) A mudança (*fold change*) da razão entre os mRNAs *BCL-XS* / *BCL-XL* foi significativamente abolida nas células transfectadas com os ASOs que levam ao *knockdown* do *INXS* (ASO-INXS-1 ou -2). **(D, H, G)** Eliminação da ativação das caspase-3 e -9, na presença dos diferentes oligonucleotídeos antisenso contra o lncRNA *INXS* (ASO-INXS-1 ou -2). Em todos os painéis, os dados estão relativizados pelas medidas obtidas nas células transfectadas com o oligonucleotídeo controle *scrambled* (ASO-SCRB). Os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo *(P <0,05), **(P <0,01) e ***(P <0,001). A eliminação ou não da ativação das demais caspases (caspase-7 e -8) está mostrada na Figura 14. Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Curiosamente, não houve alteração na abundância total do mRNA de *BCL-X* em nenhum dos tratamentos: exposição à UV-C (Figura 13A), carenciamento de SFB (Figura 13B) ou tratamento com SFN (Figura 13C). Esse mesmo resultado é visto durante o silenciamento do *INXS* utilizando os oligonucleotídeos antisenso modificados (ASO-INXS-1 ou -2) que levaram à proteção das células contra a morte celular, pelo menos em parte, apesar dos tratamentos com os indutores de apoptose (Figura 13D, E e F). Isso acontece porque o *knockdown* do *INXS,* que assim deixa de ser aumentado nas células sob os diferentes estímulos, passa a não causar mais o aumento da expressão da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS*.

Tomados juntos, esses dados sugerem que o aumento da expressão endógena do *INXS* é o agente mediador que leva ao *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X*, favorecendo a expressão do *BCL-XS* e induzindo a apoptose.

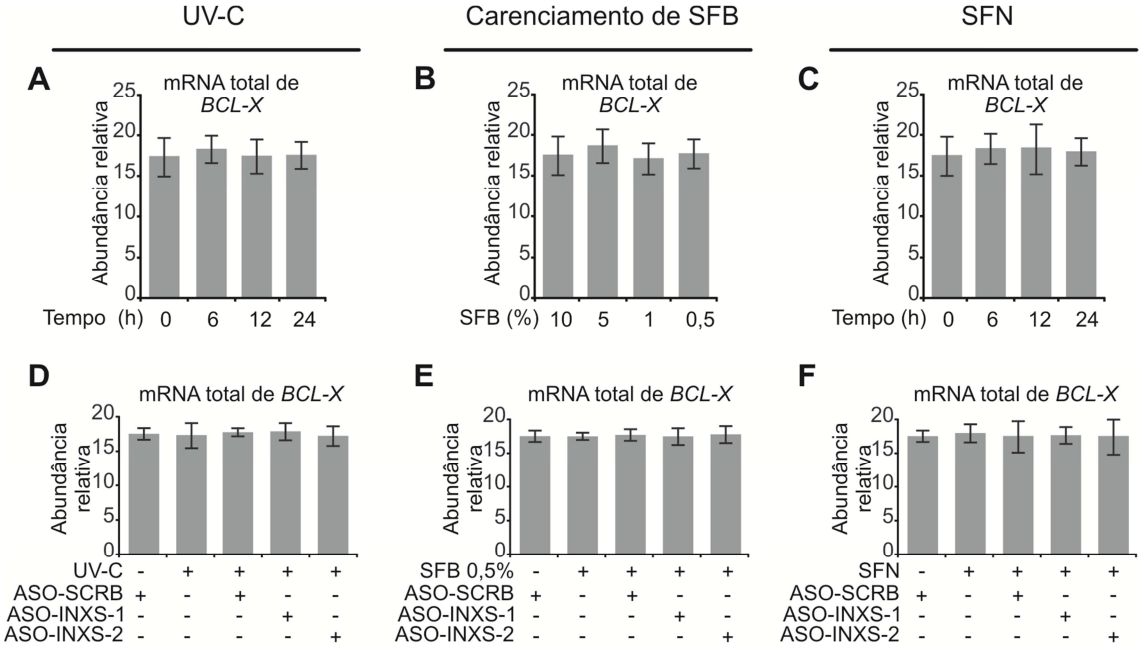

Figura 13. Níveis do mRNA total de *BCL-X* em células 786-O expostas à agentes de indutores de apoptose na ausência ou na presença de ASOs contra o lncRNA *INXS*. (A, B, C) Experimentos de RT-qPCR a partir de RNA total extraído de células 786-O expostas à (A) 40 J / m^2 de luz UV-C, (B) carenciamento de soro fetal bovino (SFB) ou (C) tratamento com 50 µM de sulforafano (SFN) mostram que os níveis do mRNA total de *BCL-X* não foram alterados. Os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. **(D, E, F)** Os níveis do mRNA total de *BCL-X* não são alterados em células 786-O transientemente transfectadas com os dois oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs) que alvejam o *INXS* (ASO-INXS-1 e -2) em relação ao respectivo controle *scrambled* (ASO-SCRB), seguidos da exposição à (D) 40 J / m^2 luz UV-C, (e) carenciamento de SFB ou (F) com o tratamento com 50 µM de SFN. Os dados apresentados referem-se à média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Para todos os experimentos de indução da apoptose na linhagem 786-O com UV-C, com carenciamento de SFB ou com tratamento com o fármaco SFN, na ausência ou na presença dos oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs), medimos a atividade da caspase-7 (efetora) e da caspase-8 (envolvida na via extrínseca da apoptose) (Figura 14).

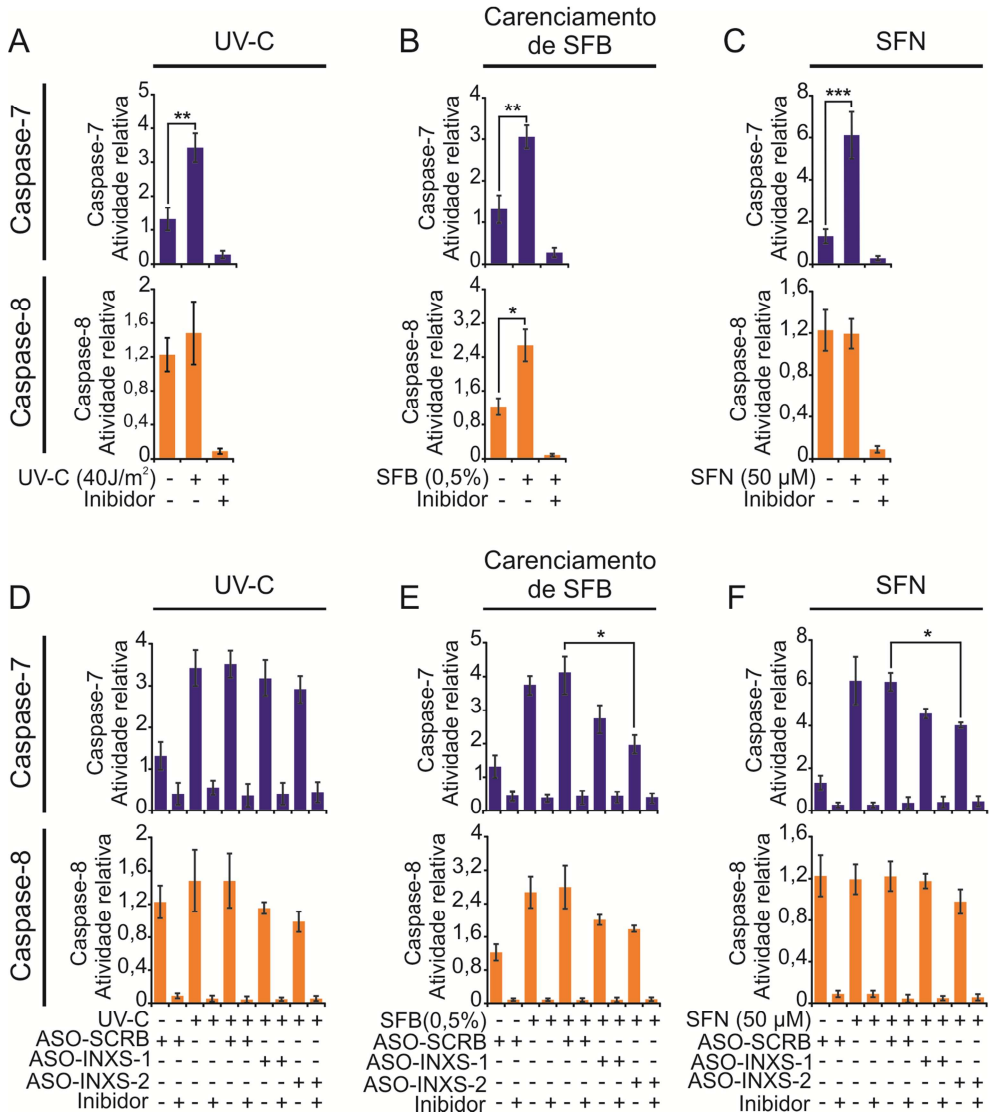

Figura 14. Ensaio enzimático de ativação das caspases 7 e 8 na linhagem 786-O após a exposição das células à agentes indutores de apoptose na ausência ou na presença do *knockdown* do *INXS*. (A) A caspase-7 (barras azuis) é ativada em 24 h após a exposição à 40 J / m^2 de luz UV-C, enquanto a atividade da caspase-8 (barras laranja) não é afetada. **(B)** A caspase-7 (barras azuis) e a caspase-8 (barras laranja) são ativadas após 24 h de cultivo das células em meio contendo apenas 0,5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). **(C)** A caspase-7 (barras azuis) é ativada após 24 h de tratamento das células com sulforafano (SFN; 50 µM), enquanto a caspase-8 (barras laranja) não é afetada. **(D)** A presença de dois oligonucleotídeos antisenso que disparam a degradação do *INXS* (ASO-INXS-1 ou -2) não afeta a ativação da caspase-7 (barras azuis) e da caspase-8 (barras laranja) causada pela exposição das células à 40 J / m^2 de luz UV-C. **(E)** A presença do ASO-INXS-2 mas não a do ASO-INXS-1, que alvejam o *INXS* (ou -2), abole significativamente a ativação da caspase-7 causada pelo carenciamento das células com 0,5% de SFB. A atividade da caspase-8 (barras laranja) não é afetada. **(F)** A presença do ASO-INXS-2 mas não do ASO-INXS-1, que alvejam o *INXS*, anula significativamente a ativação da caspase-7 causada pelo tratamento das células com SFN (50 µM). A caspase-8 (barras laranja) não é afetada. Para todos os casos, os dados são comparados com o oligonucleotídeo controle *scrambled* (ASO-SCRB). Em todos os painéis, os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo

*(*P* <0,05), **(*P* <0,01) e ***(*P* <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Paralelamente, fomos titular a eficiência dos diferentes ASOs utilizados anteriormenre na redução dos níveis do *INXS* na linhagem 786-O após a indução da expressão endógena do lncRNA por exposição à luz UV-C (Figura 15). Para isso, transfectamos as células com dois oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs) nas concentrações finais de 50, 100 e 200 nM, separadamente ou combinados (na forma de *pool*). Foi observada uma redução dose-dependente nos níveis do lncRNA *INXS* (Figura 15A); quanto maior a concentração final do ASO, menor é a detecção do *INXS*. Observamos uma mudança progressiva no perfil de expressão das isoformas do *BCL-X*; essas mudanças estão resumidas no Painel B da Figura 15, onde verificamos uma progressiva redução da relação *BCL-XS* / *BCL-XL* com o aumento da concentração de ASOs utilizada. Padrões similares de redução na razão entre as isoformas após o *knockdown* do *INXS* também foram obtidos quando utilizamos cada um dos dois ASOs separadamente, porém em uma concentração final de 500 nM cada (Figura 12A). Apesar de termos obtido um efeito do *knockdown* do *INXS* mais pronunciado usando a combinação ASO-INXS-1 + ASO-INXS-2 (Figura 15), optamos por utilizar os oligonucleotídeos ASOs separadamente nos experimentos da Figura 12, a fim de ampliarmos nossa margem de segurança experimental, porque assim poderíamos detectar eventuais efeitos fenotípicos diferentes provocados por cada um deles, o que apontaria para um efeito fora-do-alvo (*off-target effects*). Ao analisarmos cada ASO em separado, e observarmos o mesmo efeito fenotípico para cada um deles, acumulamos evidências de que aquilo que estamos documentando é de fato um efeito específico relacionado ao *knockdown* do *INXS*.

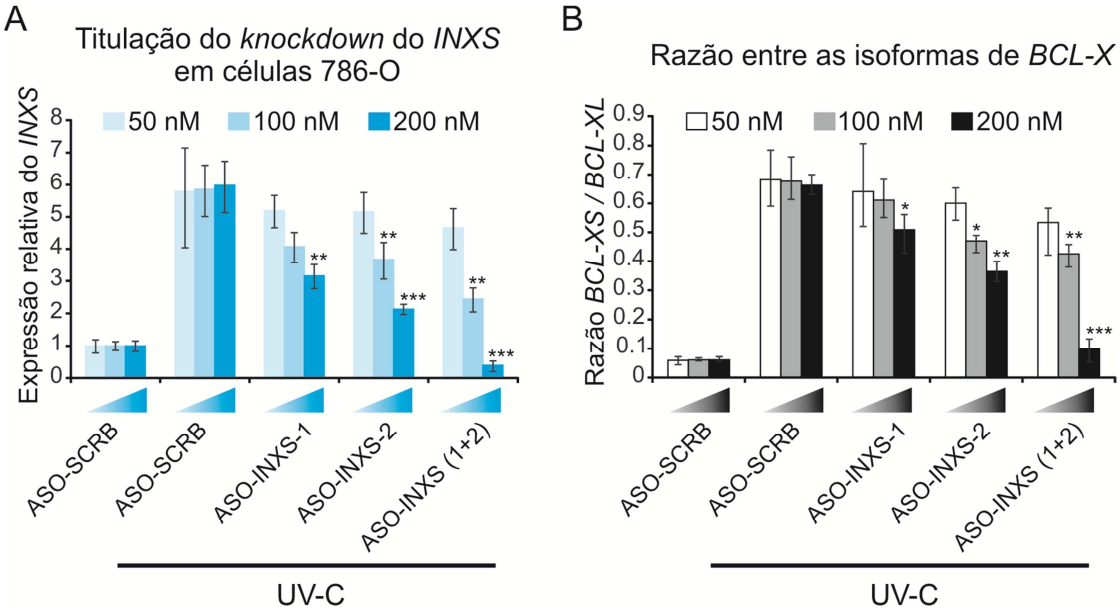

Figura 15. Titulação do *knockdown* de *INXS* com os oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs) que alvejam o *INXS* na linhagem celular 786-O exposta à luz UV-C. (A) Os níveis do lncRNA *INXS* foram obtidos por RT-qPCR a partir de células 786-O transfectadas com os oligonucleotídeos antisenso modificados (ASOs) seguido da exposição à luz UV-C. As células foram mantidas em cultura por 24 h depois de expostas à 40 J / m^2 de luz UV-C. Essas células foram previamente transfectadas com os ASOs nas concentrações finais de 50 nM (barras azul claras), 100 nM (barras azuis) ou 200 nM (barras azul escuras), separadamente (ASO-INXS-1 ou ASO-INXS-2) ou em conjunto (ASO-INXS-1 + ASO-INXS-2). **(B)** Para cada uma das transfecções seguidas de exposição à luz UV-C, os níveis do mRNA das isoformas de *BCL-XS* e *BCL-XL* foram medidos por RT-qPCR e a razão *BCL-XS* / *BCL-XL* está mostrada. Tanto para o painel (A) quanto para o painel (B), o gradual aumento no tom da coloração indica o aumento da concentração final dos ASOs utilizados nas transfecções. As medidas de ambos os painéis são comparadas àquelas onde foi utilizado o oligonucleotídeo controle *scrambled* (ASO-SCRB) na ausência de UV-C. Os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo *(P <0,05), **(P <0,01) e ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.7. A super-expressão do *INXS* altera o *splicing* do gene *BCL-X* aumentando a abundância da isoforma *BCL-XS* e levando as células à apoptose

Para testar o efeito da super-expressão ectópica do lncRNA *INXS* no mecanismo de *splicing* alternativo do gene *BCL-X*, células 786-O foram transfectadas transientemente com concentrações crescentes do vetor pCEP4-INXS e seu respectivo controle pCEP4-vazio; após 24 h, as células transfectadas mostraram um aumento de 15 a 40 vezes na abundância de *INXS* quando comparadas com o nível endógeno de expressão do lncRNA em células não transfectadas (Figura 16A, barras azuis). A abundância de mRNA da isoforma anti-apoptótica

BCL-XL foi reduzida em até quatro vezes nas células transfectadas com 3 µg de vetor pCEP4-INXS em comparação com as células não transfectadas (Figura 16A, barras vermelhas). Curiosamente, os níveis de mRNA da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* mostraram um aumento de até 20 vezes em relação aos níveis presentes nas células do tipo selvagem (786-O parental) (Figura 16A, barras pretas). É importante notar que a proporção relativa da razão de abundância entre *BCL-XS* / *BCL-XL* foi marcadamente aumentada à medida que as células foram transfectadas com quantidades crescentes do plasmídeo pCEP4-INXS, alcançando um patamar de até 60 vezes (Figura 16B); a razão entre as isoformas foi de 0,06 (em células transfectadas com o pCEP4-vazio) para 3,3 (em células super-expressando o lncRNA *INXS*); nenhuma alteração nos níveis totais do mRNA de *BCL-X* (Figura 16C) foi observada. Os níveis mais elevados do *INXS* foram onde claramente predominou a expressão da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* (~80% de todos os mRNAs de *BCL-X* da célula).

Tendo verificado que a super-expressão do *INXS* altera o padrão de *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X* em células 786-O, aumentando significativamente a abundância de um mRNA que sabidamente está relacionado ao processo de morte celular programada, fomos examinar a apoptose nessas células após a super-expressão do lncRNA *INXS*. A análise por citometria de fluxo, usando células duplamente marcadas com Anexina-V FITC (AV) e iodeto de propídeo (PI), mostrou um aumento da apoptose dose-dependente nas células super-expressando o *INXS*; a apoptose aumentou de 15% nas células 786-O transfectadas com 1 µg do plasmídeo pCEP4-INXS (Figura 16D, painel inferior esquerdo) para ~42% nas células transfectadas com 3 µg do plasmídeo (Figura 16D, painel direito inferior). A apoptose induzida pela super-expressão do *INXS* foi altamente reprodutível entre três réplicas biológicas (Figura 16E), e a média da quantificação de apoptose entre os experimentos (AV^+ PI^- e AV^+ PI^+) na população de células aumentou significativamente de ~15% nas células

transfectadas com 1 µg de pCEP4-INXS para ~40% nas células transfectadas com 3µg (Figura 16E).

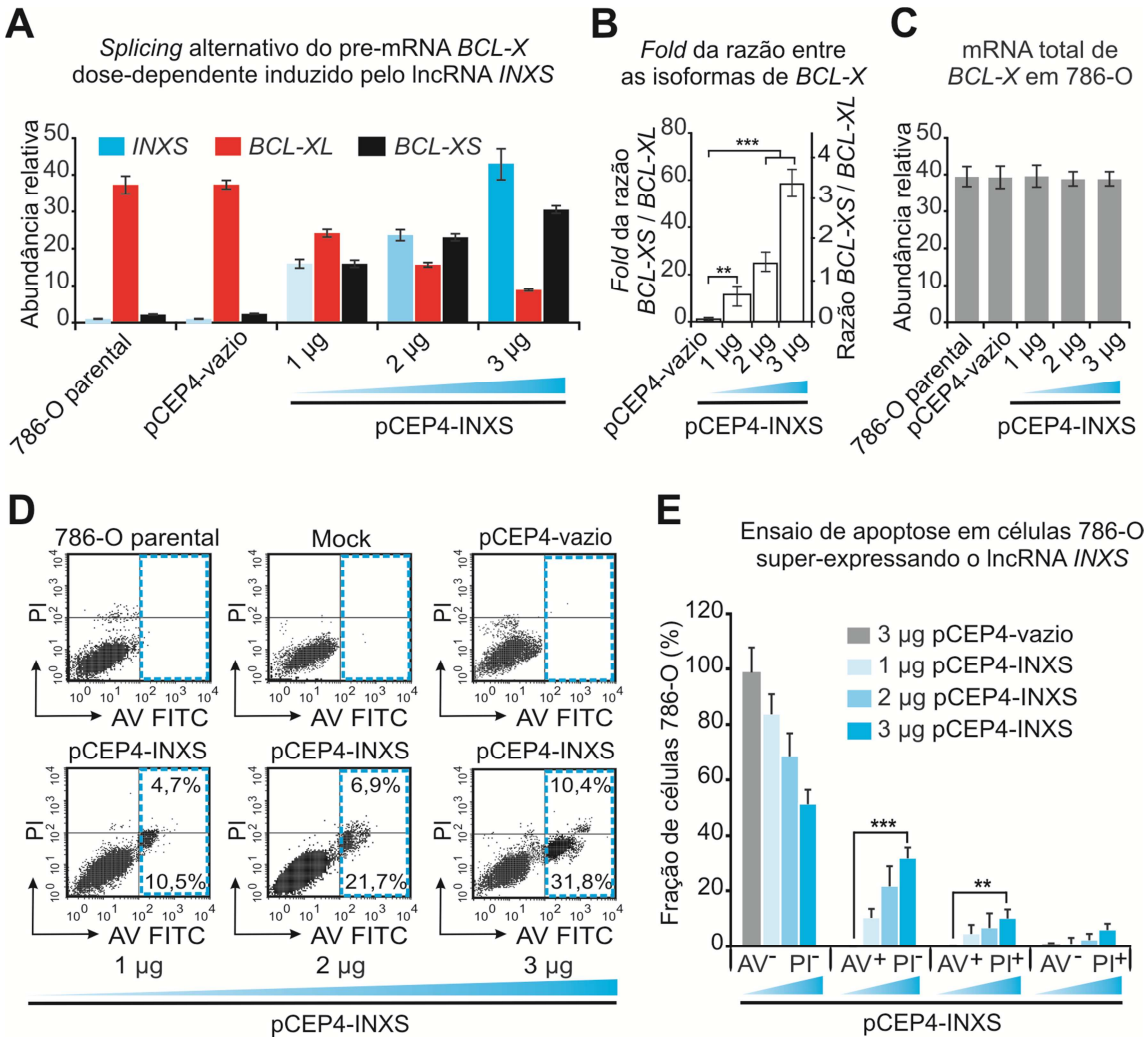

Figura 16. A super-expressão do *INXS* induz uma mudança no padrão de *splicing* de *BCL-X* e promove a apoptose em células tumorais MCF7 e PC3. (A, F) Níveis do lncRNA *INXS* (barras azuis), mRNA de *BCL-XS* (barras pretas) e mRNA de *BCL-XL* (barras vermelhas) obtidos por RT-qPCR em linhagens de (A) células tumorais de mama MCF7, e (F) células tumorais de próstata PC3 após 24 h de transfecção transiente com quantidades crescentes do plasmídeo pCEP4-INXS (barras azuis). Em paralelo, estes RNAs foram medidos em células controle: as respectivas parentais de cada uma das duas linhagens ou células transfectadas com o plasmídeo vazio (pCEP4-vazio). Todos os níveis de expressão estão mostrados como "abundância relativa" em relação aos níveis endógenos do *INXS* nas células parentais de cada linhagem. **(B, G)** Para ambas as linhagens celulares testadas, a mudança (*fold change*) da proporção entre as isoformas *BCL-XS* / *BCL-XL* foi dependente do aumento gradual de super-expressão do lncRNA *INXS*. **(C, H)** Nas duas linhagens celulares, os níveis totais do mRNA de *BCL-X* não acompanharam as mudanças da super-expressão do *INXS*, permanecendo inalterados. **(D, I)** A apoptose foi detectada em ambas as linhagens celulares transfectadas com 3 µg de DNA plasmidial do pCEP4-INXS, ou do controle pCEP4-

vazio. Estes resultados foram obtidos por citometria de fluxo utilizando dupla marcação com Anexina-V FITC (AV-FITC, eixo-x) e iodeto de propídeo (PI, eixo-y). A porcentagem de células que foram marcadas com AV-FITC está mostrada nos quadrantes ressaltados com linhas azuis tracejadas. **(E, J)** Os resultados de cada quadrante em D e I estão apresentados como a fração das células marcadas (%) em relação ao total. Para ambas as linhagens, os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. **(*P* <0,01) e ***(*P* <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

A eficiência da super-expressão ectópica do *INXS* afetando o *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X* foi testada em outras duas linhagens de células tumorais adicionais: em MCF7, uma linhagem tumoral de mama (Figura 17A, B e C), e em PC3, uma linhagem tumoral de próstata (Figura 17F, G e H), mostrando padrões semelhantes de aumento do mRNA de *BCL-XS* dose-dependente da super-expressão ectópica do *INXS*, com a respectiva diminuição da isoforma *BCL-XL*, sem alterar os níveis totais do mRNA de *BCL-X*. Ensaios de apoptose, similares àqueles mostrados para as células 786-O, também foram realizados com a linhagem tumoral de mama MCF7 (Figura 17D e E) e a linhagem tumoral de próstata PC3 (Figura 17I e J), utilizando citometria de fluxo, e os resultados obtidos de aumento da apoptose induzida pela super-expressão do *INXS* foram semelhantes nestas duas linhagens de células, quando comparados com os resultados de 786-O.

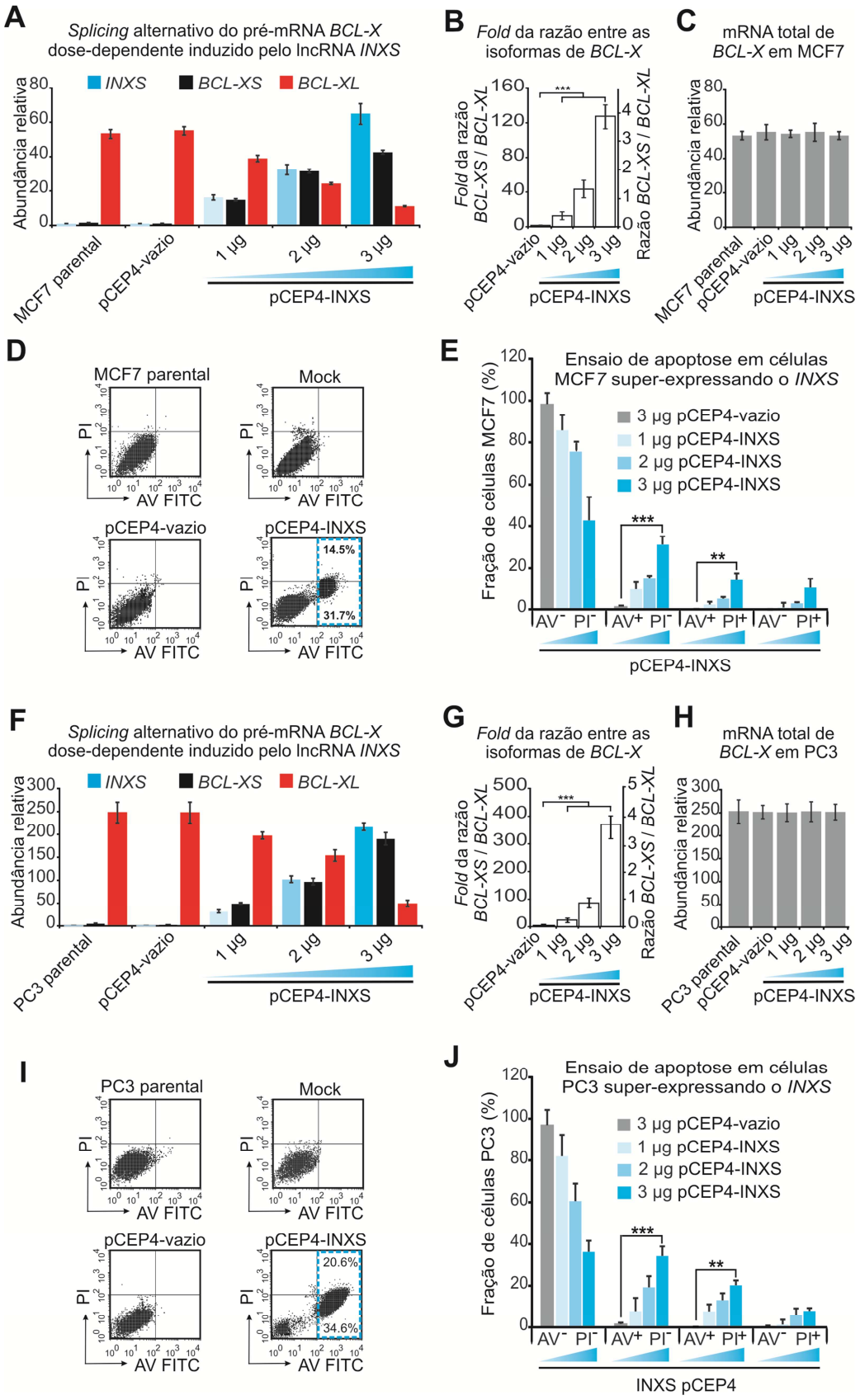

Figura 17. A super-expressão do *INXS* induz uma mudança no padrão de *splicing* de *BCL-X* e promove a apoptose em células tumorais MCF7 e PC3. (A, F) Níveis do lncRNA *INXS* (barras azuis), mRNA de *BCL-XS* (barras pretas) e mRNA de *BCL-XL* (barras vermelhas) obtidos por RT-qPCR em linhagens de (A) células tumorais de mama MCF7, e (F)

células tumorais de próstata PC3 após 24 h de transfecção transiente com quantidades crescentes do plasmídeo pCEP4-INXS (barras azuis). Em paralelo, estes RNAs foram medidos em células controle: as respectivas parentais de cada uma das duas linhagens ou células transfectadas com o plasmídeo vazio (pCEP4-vazio). Todos os níveis de expressão estão mostrados como "abundância relativa" em relação aos níveis endógenos do *INXS* nas células parentais de cada linhagem. **(B, G)** Para ambas as linhagens celulares testadas, o aumento da proporção entre as isoformas *BCL-XS* / *BCL-XL* foi dependente do aumento gradual de super-expressão do lncRNA *INXS*. **(C, H)** Nas duas linhagens celulares, os níveis totais do mRNA de *BCL-X* não acompanharam as mudanças da super-expressão do *INXS*, permanecendo inalterados. **(D, I)** A apoptose foi detectada em ambas as linhagens celulares transfectadas com 3 µg de DNA plasmidial do pCEP4-INXS, ou do controle pCEP4-vazio. Estes resultados foram obtidos por citometria de fluxo utilizando dupla marcação com Anexina-V FITC (AV-FITC, eixo-x) e iodeto de propídeo (PI, eixo-y). A porcentagem de células que foram marcadas com AV-FITC está mostrada nos quadrantes ressaltados com linhas azuis tracejadas. **(E, J)** Os resultados de cada quadrante em D e I estão apresentados como a fração das células marcadas (%) em relação ao total. Para ambas as linhagens, os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. **(P <0,01) e ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Para verificar a especificidade do efeito apoptótico de *INXS*, fizemos a super-expressão outro lncRNA *unspliced* não-relacionado ao *INXS*. Super-expressamos o lncRNA *ANRASSF1*, uma mensagem antisenso transcrita a partir do *locus* do gene *RASSF1A* em células tumorais de próstata (Beckedorff, Ayupe et al. 2013). O fenótipo resultante da super-expressão de *INXS* não foi observado quando super-expressamos o *ANRASSF1*. Após a super-expressão de *ANRASSF1* em células 786-O, nenhuma mudança nos níveis de expressão das isoformas *BCL-XL* ou *BCL-XS* foi detectada (Figura 18A, B). Além disso, não foi observada apoptose nessas células super-expressando o *ANRASSF1*, como visto pelo método de citometria de fluxo com as células duplamente marcadas com Anexina-V FITC e PI (Figura 18C), fornecendo um suporte adicional de especificidade do fenótipo apoptótico observado nas células super-expressando o lncRNA *INXS*.

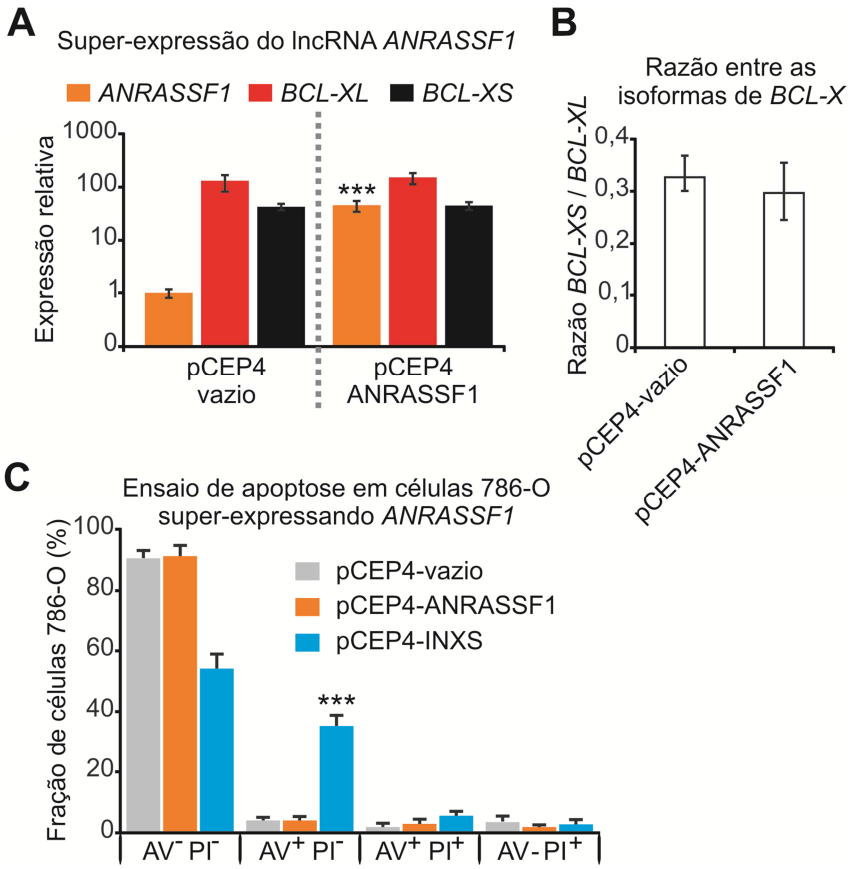

Figura 18. A super-expressão do lncRNA *ANRASSF1* não altera a abundância entre as isoformas de *BCL-X* e não induz as células à apoptose. (A) Os níveis do mRNA das isoformas *BCL-XS* (barras pretas) e *BCL-XL* (barras vermelhas) foram medidos por RT-qPCR na linhagem celular tumoral de rim 786-O após 24 h de transfecção transiente com o plasmídeo pCEP4-ANRASSF1 (níveis do lncRNA *ANRASSF1* = barras de cor laranja). **(B)** A relação de abundância dos mRNAs entre as isoformas de *BCL-XL* / *BCL-XS* nestas células não se altera após a super-expressão de *ANRASSF1*. **(C)** Após a transfecção das células 786-O com o plasmídeo pCEP4-ANRASSF1 (barras de cor laranja) ou com o pCEP4-vazio (barras cinzas), a apoptose foi medida por citometria de fluxo utilizando a dupla marcação com Anexina-V FITC (AV) e iodeto de propídeo (PI). O gráfico mostra a quantificação (%) da fração de células marcadas em relação ao total, considerando três transfecções independentes para cada plasmídeo. As células transfectadas com pCEP4-INXS (barras azuis) foram usadas como controle positivo. Os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.8. A super-expressão do *INXS* aumenta os níveis da proteína *BCL-XS* e ativa as caspases 3, 7 e 9

O efeito da super-expressão do lncRNA *INXS* sobre a abundância dos mRNAs correspondentes às isoformas do pré-mRNA de *BCL-X* foi visto em três linhagens celulares diferentes, mostrando uma correlação direta entre os níveis do lncRNA e o padrão de *splicing* do *BCL-X*. Finalmente, o próximo passo foi testar se esse efeito sobre os transcritos de *BCL-X* se reflete em uma mudança no perfil de expressão das duas proteínas BCL-XL e BCL-XS, provenientes da tradução das duas isoformas desse mRNA. Uma vez que muitas células mortas se acumulam após 24 h de transfecção com o plasmídeo pCEP4-INXS (3 µg do plasmídeo), notou-se que isso reduzia significativamente a capacidade de se obter células em condições viáveis para os ensaios de *western blotting*. Assim, fomos determinar o menor tempo em que ocorria a super-expressão transiente do lncRNA *INXS* seguida de mudança do *splicing* do *BCL-X* por RT-qPCR, previamente aos experimentos de *western blotting*. Células da linhagem 786-O foram transfectadas transientemente com o plasmídeo pCEP4-INXS (e o controle pCEP4-vazio) e coletadas depois de 1, 3, 6, 9, 12, 15 e 24 h da transfecção. Ao medir a resposta temporal da super-expressão do *INXS* e o aumento de mRNA correspondente a isoforma *BCL-XS* após a transfecção transiente de células 786-O (Figura 19A e B), verificou-se que depois de 15 h após a transfecção já havia um aumento de 22 vezes do *INXS* em comparação com os seus níveis de expressão endógena (Figura 19A), e um aumento de 18 vezes nos níveis do mRNA da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* (Figura 19B), com a concomitante redução de 2,5 vezes no mRNA da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* (Figura 19C). Após 15 h de transfecção transiente com o lncRNA *INXS* detectamos um aumento significativo de 18 vezes na razão entre as isoformas *BCL-XS* / *BCL-XL* (de 0,06 para 1,2) (Figura 19D).

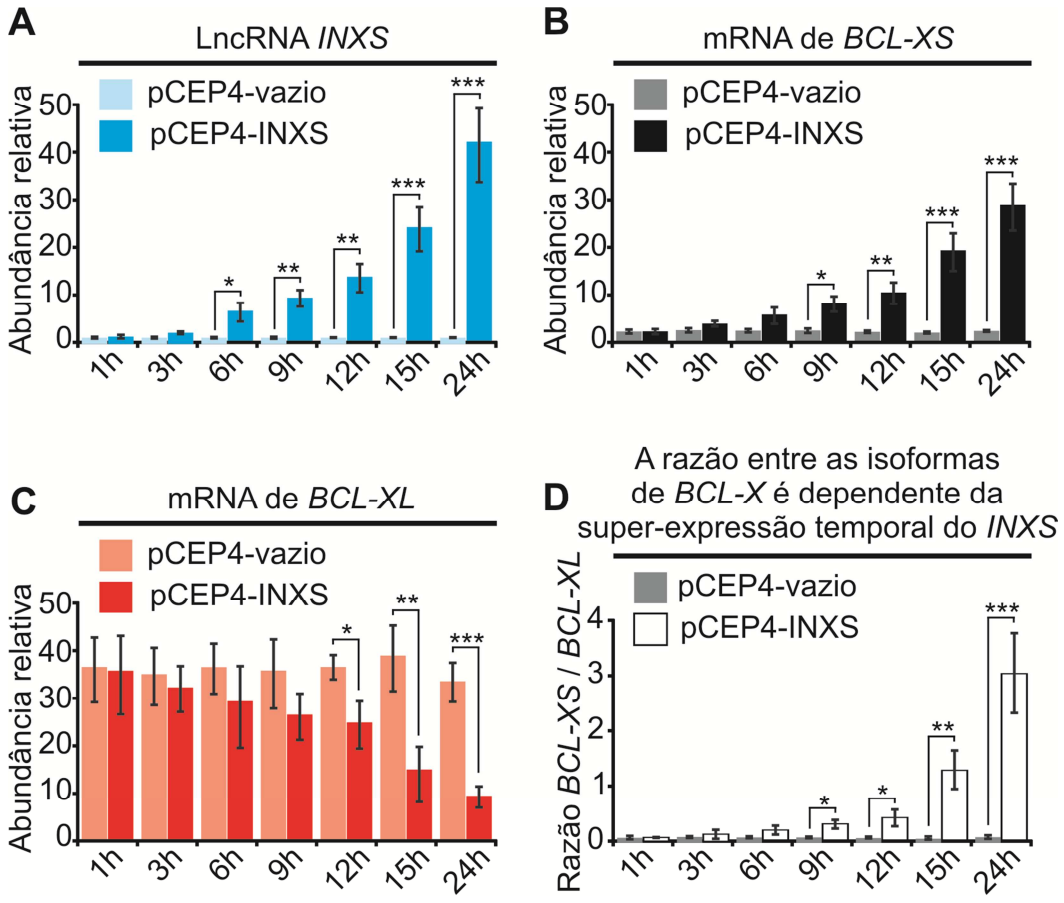

Figura 19. Curso temporal da super-expressão do lncRNA *INXS* e o efeito sobre as isoformas do pre-mRNA de *BCL-X* em células 786-O. (A) Níveis do lncRNA *INXS* em células 786-O transfectadas com o plasmídeo pCEP4-vazio (barras azul clara) ou com o pCEP4-INXS (barras azul escura). Os RNAs das células transfectadas foram coletadados depois dos tempos indicados (1 h até 24 h) e quantificados por RT-qPCR. **(B)** Níveis do mRNA correpondente à isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* foram medidos nas mesmas células mostradas no painel (A). **(C)** Níveis do mRNA correpondente à isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* foram medidos nas mesmas células mostradas no painel (A). **(D)** Relação das abundâncias de expressão entre os mRNAs das isoformas *BCL-XS* / *BCL-XL* nas mesmas células mostradas no painel (A). Em todos os painéis os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes, sendo *(P <0,05), **(P <0,01) e ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Uma vez determinado o tempo-resposta da super-expressão do lncRNA *INXS* que permitisse tanto a indução do *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X* quanto a presença ainda em cultura de células viáveis e/ou entrando recentemente em processo de morte celular, fomos avaliar a abundância entre as proteínas BCL-XS e BCL-XL após as transfecções. Assim, depois de 15 h de transfecção as células 786-O foram coletadas e lisadas para obtenção do

extrato proteico. Em seguida, as isoformas da proteína BCL-X foram imunoprecipitadas (IP) com o anticorpo anti-BCL-X e a fração IP foi analisada por *western blotting*. Uma banda distinta referente à isoforma da proteína BCL-XS foi detectada apenas nas células super-expressando o lncRNA *INXS* (pCEP4-INXS) mas não no controle, ou seja, células transfectadas com o vetor vazio (pCEP4-vazio) (Figura 20A). A relação entre os sinais de intensidade obtidos por densitometria entre as proteínas BCL-XS e BCL-XL aumentou significativamente de 0,2 nas células transfectadas com o vetor vazio para 2,8 nas células transfectadas com o vetor super-expressando o *INXS* (Figura 20B). A quantidade de proteínas referente à isoforma BCL-XL aparentemente não diminuiu após 15 h da super-expressão do *INXS* (Figura 20A), sugerindo que o *turnover* da proteína BCL-XL é maior que o *turnover* do mRNA de *BCL-XL* (Figura 19C). É interessante notar que a abundância das proteínas BCL-XS em células humanas não apoptóticas é ínfima, estando abaixo dos limites de detecção pelo método de *western blotting* nas linhagens celulares de melanoma (Bauman, Li et al. 2010; Plotz, Gillissen et al. 2012) ou adenocarcinoma de pulmão (Taylor, Zhang et al. 1999). As dificuldades na detecção da isoforma pró-apoptótica da proteína BCL-XS também foram observadas nesse trabalho utilizando células da linhagem tumoral de rim 786-O, o que nos levou à utilizar a abordagem de IP, seguida de *western blotting*.

A super-expressão do *INXS* causou uma significativa ativação das caspases 3, 7 e 9, que são as principais caspases envolvidas na via apoptótica mitocondrial, mas não teve efeito sobre a caspase-8, que está envolvida na morte celular pela via extrínseca (Figura 20C).

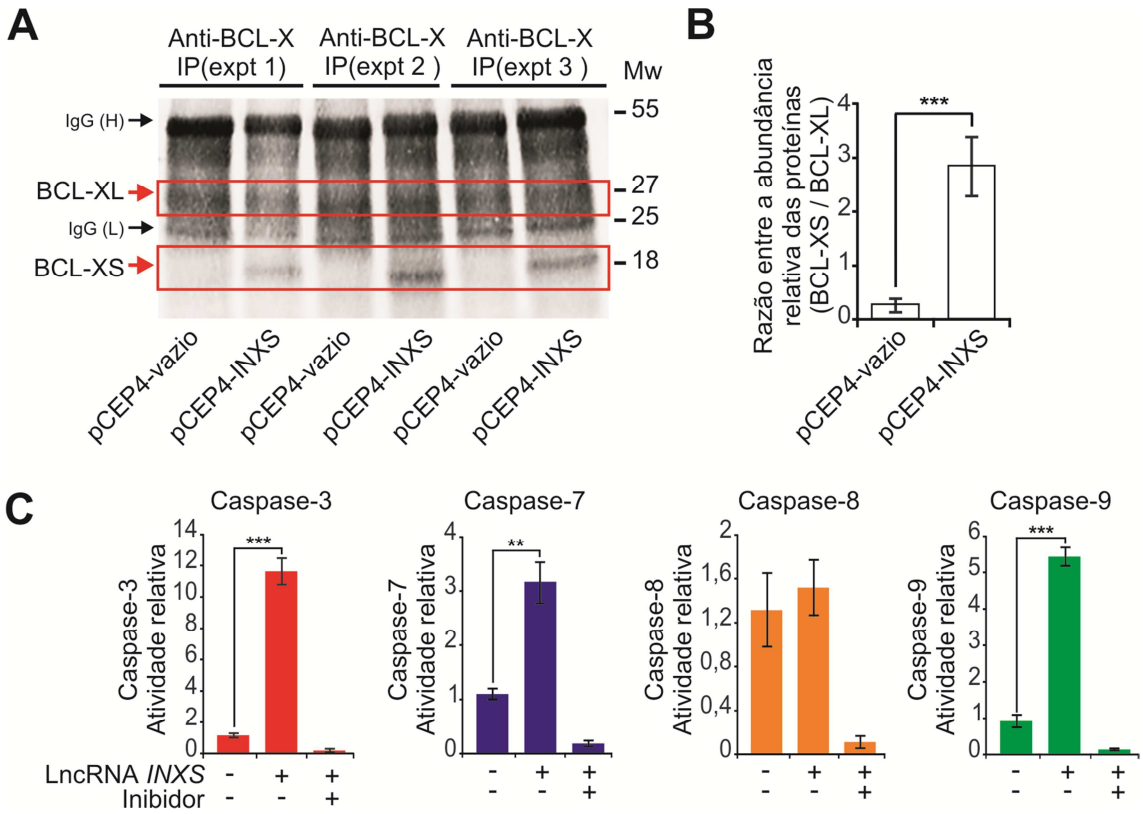

Figura 20. A super-expressão do lncRNA *INXS* leva ao aumento da abundância da proteína pró-apoptótica BCL-XS e consequentemente à ativação das caspases. (A) *Western blotting* detectou a isoforma da proteína BCL-XS mediante a super-expressão do *INXS* depois de 15 h de transfecção das células. Anticorpo anti-BCL-X foi utilizado para imunoprecipitação (IP) de lisados celulares da linhagem 786-O, e a fração imunoprecipitada foi analisada por *western blotting* utilizando o mesmo anticorpo da IP. Estão mostrados três experimentos independentes de transfecção seguida de IP e *western blotting* (expt 1, 2 e 3). **(B)** Está sendo mostrada a relação de intensidade entre os sinais das densitometrias das proteínas BCL-XL / BCL-XS obtidos a partir do painel (A). A intensidade do sinal de fundo (*background*) para a banda de BCL-XS foi utilizada nos casos onde as células foram transfectadas com o pCEP4-vazio. **(C)** Ensaio fluorimétrico de ativação das caspases 3, 7 e 9 mediante super-expressão do *INXS* (pCEP4-INXS) ou do controle (pCEP4-vazio) nas mesmas condições de transfecção mostradas no painel (A). Apenas a caspase-8 não teve sua atividade aumentada. Em todos os painéis os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. **(P <0,01) e ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

O fenótipo apoptótico foi ainda confirmado em paralelo por imunofluorescência utilizando o anticorpo específico para a forma ativa da caspase-3 (casp-3 clivada), que mostrou um forte sinal de fluorescência apenas nas células 786-O transfectadas com o vetor pCEP4-INXS quando comparado com o controle (pCEP4-vazio) (Figura 21). Estes resultados

estão inteiramente de acordo com o papel da proteína BCL-XS na ativação da apoptose mediada pela via mitocondrial (Plotz, Gillissen et al. 2012) após a super-expressão do lncRNA *INXS*.

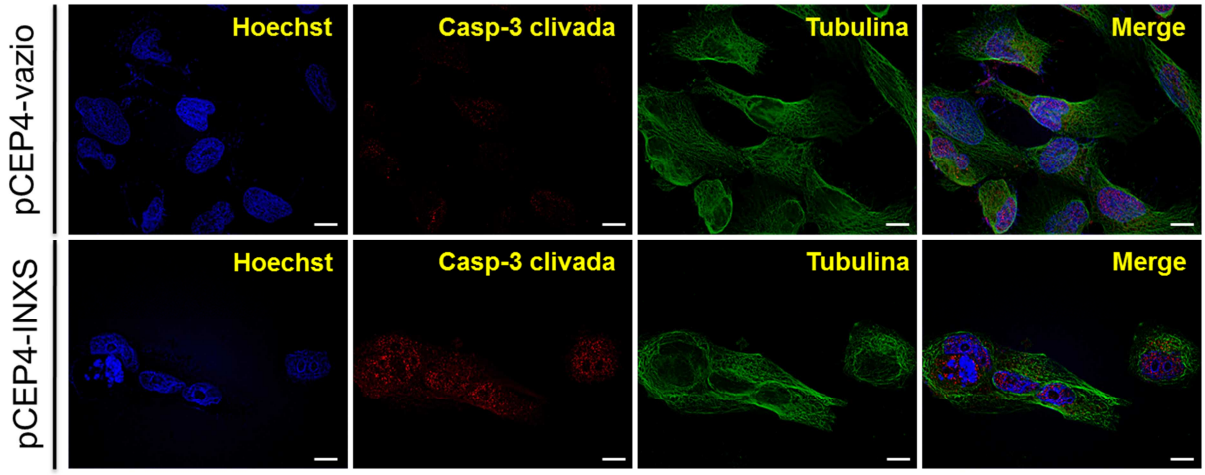

Figura 21. Detecção por imunofluorescência da caspase-3 ativa (clivada) em células 786-O após a super-expressão do lncRNA *INXS*. Os painéis superiores mostram as células transfectadas com o plasmídeo controle (pCEP4-vazio) após 24 h de transfecção, e os painéis inferiores mostram as células 24 h após a transfecção com o plasmídeo pCEP4-INXS. As células foram coradas com *Hoechst* (à esquerda), com anticorpo anti-caspase-3 clivada (centro-esquerda) e com anti-tubulina (centro-direita). No painel da direita, foi feita uma sobreposição das imagens. As barras de escala correspondem à 10 µm. Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.9. *INXS* se liga com a proteína Sam68 do complexo modulador de *splicing*, porém a super-expressão ou *knockdown* do lncRNA não altera o *splicing* de outros genes alvos de Sam68

Uma vez que o complexo modulador de *splicing* do qual a proteína Sam68 faz parte regula o *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X* (Paronetto, Achsel et al. 2007), realizamos uma imunoprecipitação nativa de complexos ribonucleoproteicos (RIP) utilizando um anticorpo anti-Sam68 para determinar se essa proteína se liga ao lncRNA *INXS* direta ou indiretamente. Uma vez imunoprecipitadas, as proteínas foram digeridas e os RNAs ligados à elas foram detectados (ou não) através de RT-PCR. Neste ensaio o *INXS* foi detectado como

ligado aos complexos nos quais a proteína Sam68 está presente (Figura 22A). Como controles positivos foram medidos os mRNAs de *BCL-XL* e *BCL-XS* (Figura 22A), os quais também foram detectados nas frações imunoprecitadas com anticorpo anti-Sam68, reproduzindo os dados da literatura (Paronetto, Achsel et al. 2007). Foi utilizado como controle negativo o mRNA de *BCL-2* (Paronetto, Achsel et al. 2007), que é conhecido por não se ligar à Sam68, e portanto não foi detectado na imunoprecipitação (Figura 22A). Como esperado, a proteína Sam68 foi encontrada na fração imunoprecipitada do ensaio de RIP anti-Sam68, por *western blotting*, com o mesmo anticorpo anti-Sam68 (Figura 22B).

Visto que o lncRNA *INXS* se liga ao complexo modulador do *splicing* de *BCL-X*, do qual a proteína Sam68 faz parte, fomos monitorar os efeitos da super-expressão ou *knockdown* do *INXS* sobre outros dois mRNAs que sabidamente são alvos de Sam68. Esses mRNAs adicionais são a ciclina D1 (*CCDN1-v1*) (Paronetto, Cappellari et al. 2010) e *SF2 / ASF* (*SRSF1-v1 e v2*) (Valacca, Bonomi et al. 2010). A super-expressão (Figura 22C) ou o *knockdown* (Figura 22D) do *INXS* não afetou o *splicing* da ciclina D1 (*CCDN1-v1*) ou de *SF2 / ASF* (*SRSF1-v1* e *v2*) nas linhagens 786-O (tumoral de rim) e RC-124 (não tumoral de rim), respectivamente. Esses dados demonstram que os efeitos da super-expressão ou *knockdown* do *INXS* estão relacionados exclusivamente ao controle do *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X*.

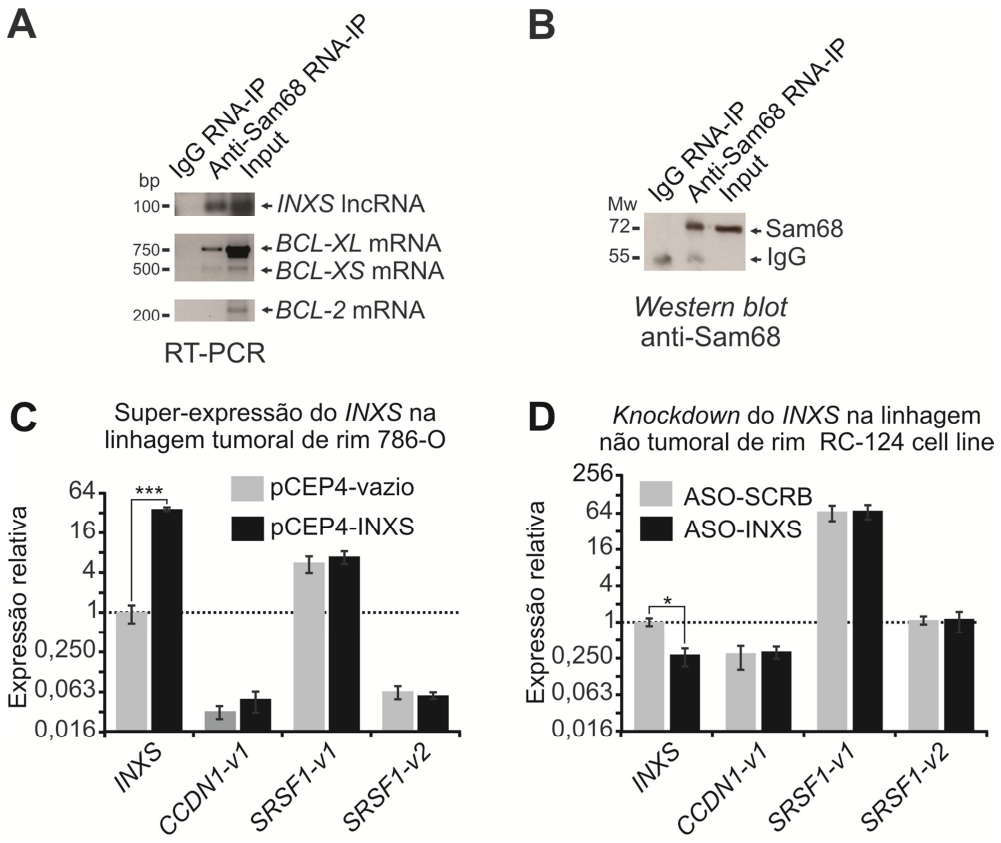

Figura 22. *INXS* interage com o complexo modulador de *splicing* através da proteína Sam68. (A) Ensaios de imunoprecipitação nativa de complexos ribonucleoproteicos (RIP) com o anticorpo anti-Sam68 (anti-Sam68 RNA-IP) foram realizados seguidos de RT-PCR com oligonucleotideos iniciadores específicos para os genes indicados. Um controle negativo, a partir de RNA imunoprecipitado com anticorpo anti-IgG (IgG RNA-IP), foi utilizado. Para a detecção do lncRNA *INXS*, um oligonucleotídeo iniciador fita-específica foi utilizado para as reações de transcrição reversa (RT). Para os controles positivos (mRNAs de *BCL-XL* e *BCl-XS*) e para o controle negativo (mRNA de *BCL-2*), foi usado oligo-dT para as reações de transcrição reversa (RT). **(B)** A fração de proteínas obtida a partir do ensaio de RIP nativa com anticorpo anti-Sam68 foi analisada por *western blotting*, usando o mesmo anticorpo anti-*BCL-X*. Uma amostra controle negativa, de RIP com IgG (IgG RNA-IP), também foi usada nos experimentos de *western blotting*. **(C)** Super-expressão do *INXS* na linhagem tumoral de rim 786-O com 3 µg de DNA plasmideal após 24 h de transfecção transiente seguido de RT-qPCR. Foram medidas as isoformas de *splicing* alternativo de dois mRNAs alvos de Sam68, *CCDN1-v1*, *SRSF1-v1* e *v2*. **(D)** *Knockdown* do *INXS* foi realizado na linhagem celular não tumoral de rim RC-124, e os níveis de expressão das isoformas *CCDN1-v1*, *SRSF1-v1* e *v2* foram medidos por RT-qPCR. Os dados representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes. ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

4.10. *INXS* induz a regressão tumoral *in vivo* utilizando modelos animais

Para determinar o potencial do lncRNA *INXS* em afetar ou não o crescimento de tumores *in vivo*, uma vez que o mesmo dispara a apoptose em culturas celulares, fomos

verificar o efeito da super-expressão ectópica do *INXS* em xenotumores derivados da linhagem tumoral de rim 786-O.

Células tumorais 786-O (10^7 células) foram inoculadas subcutaneamente em cada um de 12 camundongos no dia -63 (Figura 23A), e quando os tumores atingiram aproximadamente o mesmo volume de 250 mm^3 (dia zero), os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: em um dos grupos os animais receberam injeções contendo o plasmídeo pCEP4-INXS, e no outro grupo o pCEP4-vazio. Injeções intra-tumorais da solução transfectante contendo os plasmídeos começaram no dia zero e seguiram-se a cada três dias durante um total de 15 dias de tratamento (Figura 23A). O volume do tumor em cada animal foi medido com um paquímetro previamente à cada injeção contendo os plasmídeos (Figura 23B). No dia 15, todos os animais injetados com plasmídeo super-expressando o lncRNA *INXS* apresentaram redução do tamanho do tumor, com um volume médio do tumor reduzido para 70 mm^3 (Figura 23B); isto é, verificamos no dia 15 uma regressão média do volume dos tumores de 8 vezes em comparação com o volume médio dos tumores presentes no dia 15 nos animais controle, injetados com o vetor vazio (570 mm^3) (Figura 23B).

Em paralelo, acompanhamos o desenvolvimento temporal do volume dos tumores através do imageamento dos animais no espectro de luz próximo ao infravermelho, utilizando um aparato que permitisse a obtenção das imagens dos camundongos vivos. No dia da observação, foi injetado na veia caudal de cada animal um traçador fluorescente derivado da proteína EGF conjugada à um fluorocromo, e as imagens digitalizadas foram obtidas 12 h após. Três imagens para cada animal foram obtidas ao longo do tratamento, coincidentes com a injeção inicial (dia 0), com a injeção do meio (dia 9) e no final (dia 15). Imagens representativas de dois animais estão mostradas (Figura 23C). Uma redução considerável no volume dos tumores foi observada nos animais do grupo que recebeu o vetor pCEP4-INXS (Figura 23C, painéis inferiores), enquanto que o crescimento dos tumores ao longo do tempo

foi evidente no grupo controle inoculado com o vetor vazio (Figura 23C, painéis superiores). No dia 15, a diferença entre os volumes dos tumores pode ser claramente visualizada, como mostrado nas fotografias (Figura 23D).

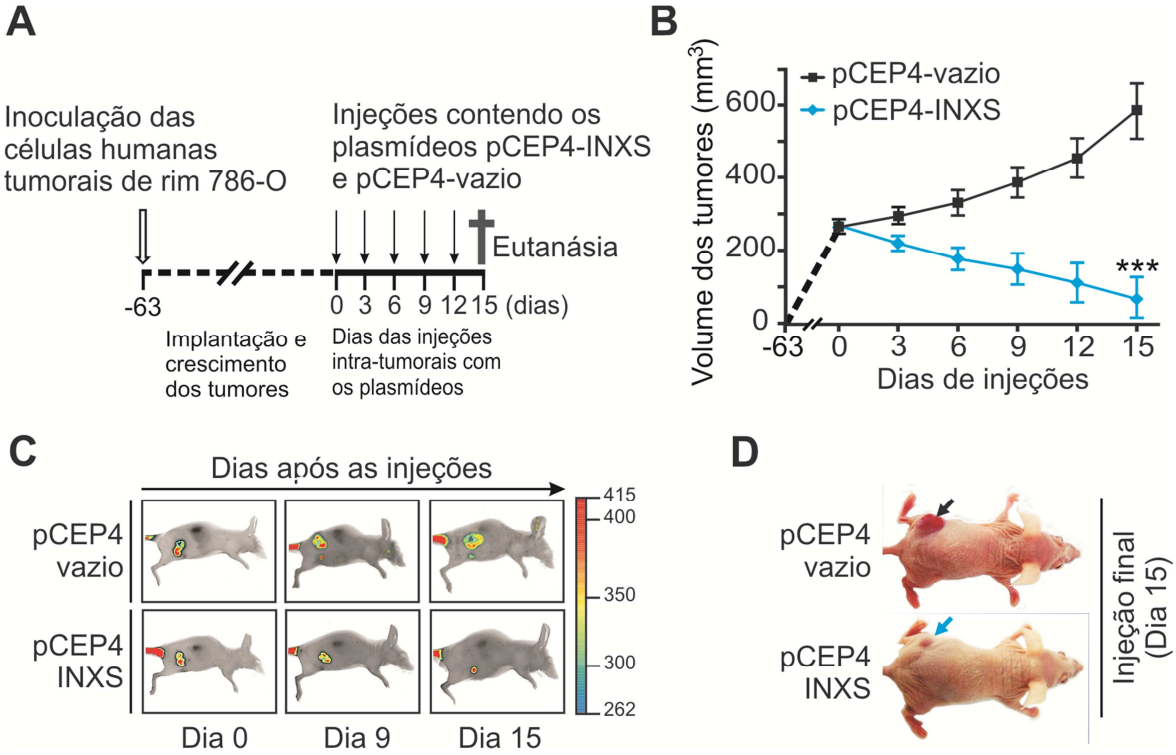

Figura 23. A super-expressão do lncRNA *INXS* induz a regressão tumoral *in vivo*. (A) Representação esquemática mostrando o delineamento experimental utilizado para o tratamento dos animais. Inicialmente realizamos a inoculação subcutânea de células da linhagem humana tumoral de rim 786-O no flanco dos camundongos BALB/c Nude (seta aberta, dia -63), seguindo-se um período de espera, implantação e crescimento dos xenotumores até todos atingirem o mesmo volume aproximado de 250 mm^3 (dia zero). Nesse dia iniciamos as injeções com os plasmídeos nos animais (setas verticais). Injeções intra-tumorais contendo os plasmídeos pCEP4-INXS ou pCEP4-vazio foram feitas à cada três dias ao longo de um período de 15 dias. **(B)** O volume dos tumores foi monitorado com um paquímetro previamente à cada injeção, nos dias indicados no gráfico. Os animais foram distribuídos aleatoriamentre em dois grupos, sendo que um recebeu o plasmídeo pCEP4-INXS (azul) e o outro o pCEP4-vazio (preto). Cada grupo tinha 6 animais do sexo feminino. Os dados representam a média ± o desvio padrão das medições dos volumes dos tumores feitas nos 6 animais de cada grupo; sendo ***(P <0,001). **(C)** Após 12 h da injeção via caudal de um traçador fluorescente conjugado à EGF, realizamos um escaneamento dos animais vivos nos dia 0, 9 e 15 após o tratamento com plasmídeos. A fluorescência foi detectada no espectro próximo ao infravermelho e as imagens digitalizadas foram obtidas no equipamento Odyssey. Apenas um camundongo representativo é mostrado para cada grupo de tratamento. **(D)** Fotografias tiradas no dia 15 de dois animais representativos de cada um dos dois grupos,

o de tumores injetados com o pCEP4-INXS ou o de tumores injetados com pCEP4-vazio. Note a diferença no tamanho entre os tumores dos dois animais, como indicado pelas setas. Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Todos os camundongos foram sacrificados no dia 15 e os xenotumores foram removidos e fotografados (Figura 24A). Posteriormente, esses tumores foram fixados em formalina, parafinados e observados por microscopia de luz depois de serem corados com hematoxilina e eosina (H&E) (Figura 24A). Curiosamente, nos tumores que receberam as injeções contendo o plasmídeo que super-expressa o *INXS* (pCEP4-INXS) o grau de vascularização nos tumores residuais foi consideravelmente reduzido em comparação com os controles (pCEP4-vazio) (Figura 24A).

Após o sacrifício dos camundongos, os tumores foram removidos cirurgicamente, pesados e fotografados. Detectamos uma redução drástica de 13 vezes entre a média do peso dos tumores injetados com o plasmídeo que super-expressa o *INXS* (27 mg), em comparação com a média do peso dos tumores que receberam o plasmídeo controle (339 mg) (Figura 24B). Um animal adicional, que recebeu apenas injeções contendo a solução de transfecção (veículo), apresentou um peso final do tumor de 351 mg (Figura 24B), semelhante ao dos tumores dos animais que receberam o vetor vazio.

O RNA total das amostras de tumores parafinadas foi extraído, e os níveis do lncRNA *INXS* e das isoformas de *BCL-X* foram medidos. Observamos um aumento significativo das mensagens do *INXS* (5 vezes) detectado nas células tumorais remanescentes dos tumores que foram injetados com o plasmídeo pCEP4-INXS em comparação com os níveis do lncRNA presente nos tumores dos animais que foram tratados com o plasmídeo pCEP4-vazio (Figura 24C). Por outro lado, foi detectado um aumento nos níveis do mRNA da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS* enquanto o mRNA da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL* foi reduzido nos tumores remanescentes dos animais transfectados com o pCEP4-INXS em comparação com os controles (Figura 24C). Vale a pena notar que, embora as medidas tenham sido realizadas

com as células que não morreram ao longo dos 15 dias em que os tumores dos animais receberam as injeções com o plasmídeo pCEP4-INXS, a razão entre *BCL-XS* / *BCL-XL* estava significativamente aumentada 4 vezes nestas células tumorais remanescentes (Figura 24D). As células que já haviam morrido ao longo dos 15 dias de tratamento, que são as responsáveis pela redução dramática no tamanho dos tumores, provavelmente foram aquelas que expressaram os níveis mais elevados do *INXS*. Somados, estes resultados mostram que o lncRNA *INXS* promoveu a regressão dos tumores *in vivo*, demonstrando assim uma atividade supressora de tumor.

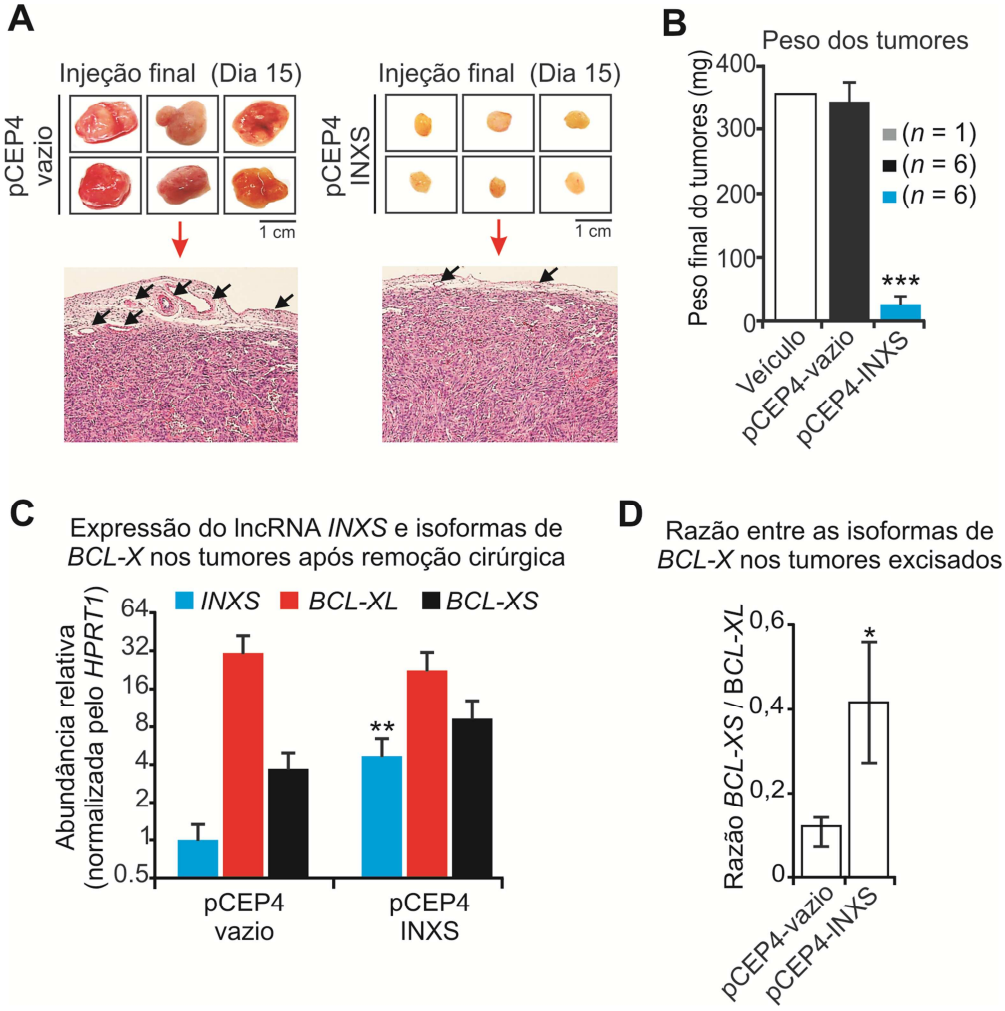

Figura 24. O lncRNA *INXS* apresenta uma função supressora de tumor *in vivo*. (A) No dia 15, isto é, depois de 15 dias após a primeira injeção com o plasmídeo pCEP4-INXS ou pCEP4-vazio, todos os animais foram sacrificados e os seus tumores foram removidos e fotografados. Os tumores obtidos foram fixados em formalina e incluídos em parafina,

corados com H&E e observados por microscopia de luz. As setas apontam as regiões de vascularização periférica dos tumores. **(B)** Uma vez removidos, e antes de fixados e parafinizados, todos os tumores foram pesados e o gráfico representa a média do peso dos tumores dentro de cada grupo de tratamento: pCEP4-INXS (barra azul) ou pCEP4-vazio (barra preta); foi incluido um animal no qual o tumor foi injetado apenas com o veículo (barra branca). Os dados representam a média ± o desvio padrão entre os 6 animais de cada grupo; sendo ***(P <0,001). **(C)** Os níveis dos transcritos do lncRNA *INXS* (barras azuis) e do mRNA das isoformas *BCL-XL* (barras vermelhas) e *BCL-XS* (barras pretas) foram obtidos por RT-qPCR nos xenotumores remanescentes, após extração do RNA dos tecidos parafinizados. **(D)** Razão entre a abundância das isoformas de mRNAs (*BCL-XS* / *BCL-XL*) nos tumores a partir das medidas em (C). Os dados representam a média ± o desvio padrão entre os 6 animais de cada grupo. *(P <0,05), **(P <0,01) e ***(P <0,001). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

5. DISCUSSÃO

Com os rápidos e recentes avanços nas técnicas de larga escala em genômica, cada vez mais tem sido documentada na literatura a ocorrência de transcrição de lncRNAs ao longo de mais de 90% de todo o genoma humano (Birney, Stamatoyannopoulos et al. 2007; Kapranov, Cheng et al. 2007), e tem sido demonstrado que estes lncRNAs podem agir por diversos mecanismos. Entretanto, apenas alguns desses RNAs foram caracterizados funcionalmente sob o ponto de vista molecular, como discutido em várias revisões recentes (Wilusz, Sunwoo et al. 2009; Wang, Song et al. 2011; Rinn and Chang 2012; Kung, Colognori et al. 2013). O mapa anatômico dos lncRNAs no genoma humano tem contribuído para que diferentes classes ou categorias de lncRNAs sejam descritas, uma vez que tanto a definição quanto a nomenclatura dos lncRNAs ainda encontra-se em evolução na literatura (Wright and Bruford 2011). Atualmente, a maioria dos grupos tem concentrado seus esforços no estudo de uma classe de lncRNAs *spliced*, que tem sido chamada da classe dos RNAs não codificadores longos intergênicos (lincRNAs). O fato dos lincRNAs sofrerem *splicing* e estarem fora do *locus* de genes codificadores de proteínas, contribui para que esse classe de RNAs tenha sido a mais estudada entre os lncRNAs, uma vez que isso possibilita uma maior segurança quanto à existência de um transcrito independente, ou seja, um transcrito que não resulta do pós-processamento de introns dos genes codificadores de proteínas. Já os lncRNAs intrônicos mono-exônicos (que não sofrem *splicing*) têm sido pouco caracterizados ou até descartados em muitos tipos de análises de transcriptoma, pois frequentemente suspeita-se de que eles sejam um possível artefato técnico de detecção de restos de introns não completamente degradados, um ruído transcricional, ou mesmo fragmentos de DNA genômico.

Contrastando com os trabalhos predominantes na literatura, o presente trabalho descreve e caracteriza estrutural e funcionalmente um lncRNA intrônico e *unspliced*, que é expresso na orientação antisenso em relação ao gene codificador de proteínas *BCL-X*. Esse

lncRNA caracteriza um novo membro da classe de lncRNAs que é capaz de regular a morte celular programada, neste caso através de um mecanismo de controle pós-transcricional em *trans* sobre o *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X*, portanto atuando como um mediador da apoptose (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Transcrito a partir do mesmo locus do *BCL-X*, porém em orientação antisenso, o lncRNA *INXS* apresenta um nível se expressão menor em todas as linhagens celulares tumorais testadas em comparação com as linhagens de células não tumorais provenientes do mesmo tecido. Resultados similares também foram obtidos a partir de amostras de carcinomas de células claras de rim de pacientes, quando comparados com os tecidos não tumorais adjacentes e pareados. Isto sugere que a *downregulation* do lncRNA *INXS* pode ser um dos fatores que conferem resistência das celulas tumorais à apoptose. O contrôle da expressão de *INXS* em tecido normal, e a perda de sua regulação nos tumores, devem ser o objeto de futuros estudos na área.

INXS é um dos milhares de lncRNAs *unspliced* que podem ser transcritos a partir de regiões intrônicas de 74% dos genes codificadores de proteínas (Nakaya, Amaral et al. 2007), fazendo parte da transcrição generalizada que não dá origem a proteínas, e que ocorre ao longo de pelo menos 75 a 90% de todo o genoma humano (Birney, Stamatoyannopoulos et al. 2007; Djebali, Davis et al. 2012). A apoptose mediada pelo *INXS*, e induzida pela proteína *BCL-XS*, exemplifica um novo papel funcional exercido por um membro dessa classe de lncRNAs antisensos e *unspliced*; essa classe até agora tinha uma implicação funcional na regulação da expressão gênica apenas em nivel transcricional, através do recrutamento de proteínas que fazem parte do *polycomb repressor complex 2* (PRC2) e modificam a histona H3K27, como descrito para o lncRNA *Kcnq1ot1* antisenso ao *locus KCNQ1*, que é capaz de regular e inibir a transcrição de um *cluster* de dez genes *imprinted* (Pandey, Mondal et al. 2008), e como descrito para o recrutamento de PRC2 pelo lncRNA *ANRASSF1* que inibe a

expressão do gene supressor de tumor *RASSF1A* (Beckedorff, Ayupe et al. 2013). Atuando em *trans* no nível pós-transcricional, já foi caracterizado o lncRNA antisenso *Saf*, que possui um papel anti-apoptótico modificando o *splicing* do gene *Fas* (Yan, Hong et al. 2005), porém o mecanismo molecular de sua ação não foi estudado. É previsível que a caracterização de membros adicionais dessa classe de transcritos intrônicos e antisenso leve à descoberta de novos papéis funcionais para lncRNAs atuando no controle da expressão gênica em nível pós-transcricional.

Nossos resultados mostraram que o aumento dos níveis do lncRNA *INXS* induziu a apoptose em três linhagens celulares tumorais distintas, alterando o *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X* e favorecendo a predominância da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS*, o que levou ao acúmulo da proteína *BCL-XS*. Também obtivemos evidências de que *INXS* interage com o complexo modulador de *splicing* via Sam68. Baseado no cenário de resultados obtidos, foi proposto um modelo para o mecanismo de ação molecular do lncRNA *INXS* conforme mostrado na Figura 25. Nesse modelo postulamos que a expressão endógena do *INXS* é induzida por agentes apoptóticos, e que o aumento da abundância dessa molécula na célula altera o padrão de *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X* em favor da geração da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS*. Quando o *INXS* está ausente ou é expresso em níveis muito baixos, como naturalmente acontece nos tumores, a isoforma predominante do *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X* é a anti-apoptótica *BCL-XL* (Figura 25, via 1). Em contraste, quando os níveis do *INXS* estão aumentados (Figura 25, via 2) o lncRNA poderá interferir no posicionamento e / ou na acessibilidade dos fatores de *splicing* (SF) ao se ligarem no sítio doador distal 5' presente no intron 2 do pré-mRNA (5'ss), favorecendo assim o posicionamento da maquinaria de *splicing* e direcionando a síntese da isoforma *BCL-XS*, levando ao aumento na proteína BCL-XS e à apoptose celular. A proteína Sam68 não é necessária para a acumulação da isoforma de *BCL-XL*, como determinado por Paronetto et al. (Paronetto, Achsel et al. 2007), e

o modelo proposto está de acordo com este achado. Ainda com relação ao mecanismo de regulação do *splicing* de *BCL-X*, é interessante notar que um artigo recente de Bielli et al. (Bielli, Busa et al. 2014) mostra que o fator de transcrição FBI-1 interage com Sam-68 e reduz a ligação de Sam68 ao mRNA de *BCL-X*, e que essa interação favorece a produção da isoforma anti-apoptótica *BCL-XL*.

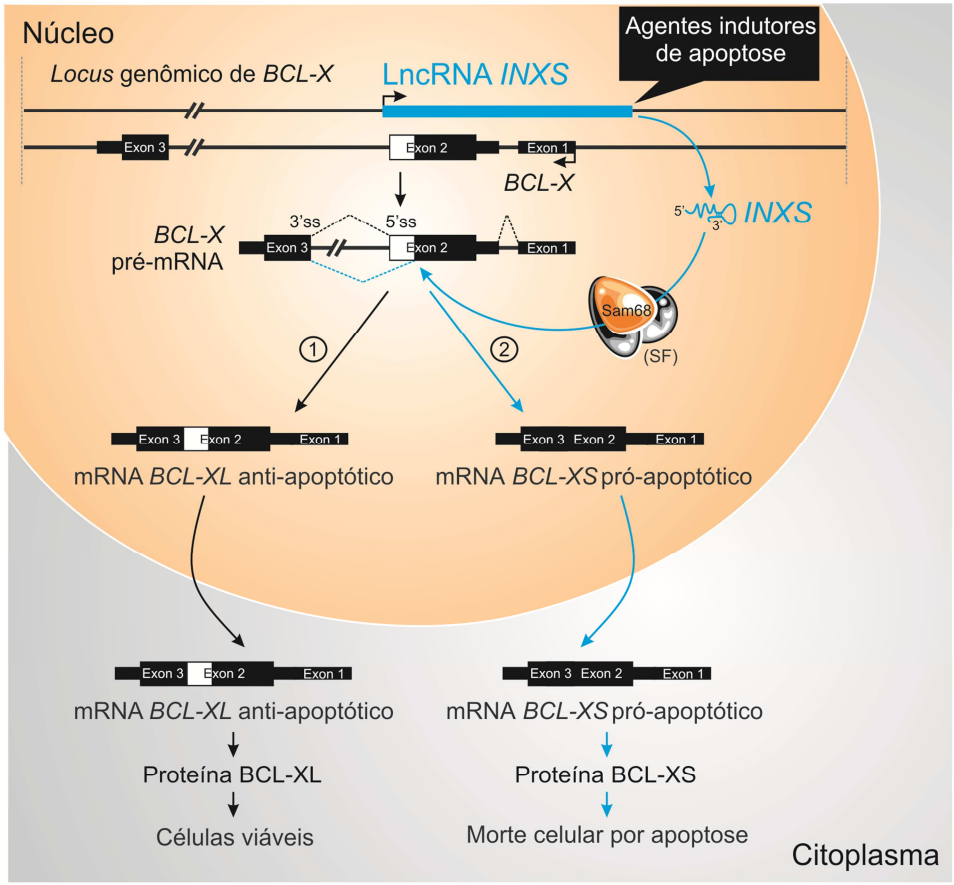

Figura 25. Modelo do mecanismo de ação proposto para o lncRNA *INXS*. O pré-mRNA de *BCL-X* sofre uma processamento alternativo dando origem a duas isoformas de mRNA: *BCL-XL*, com função anti-apoptótica, e *BCL-XS*, com função pró-apoptótica (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993). O *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X* se dá por duas vias diferentes: na via [1] a isoforma resultante é a anti-apoptótica *BCL-XL*, enquanto na via [2] a isoforma resultante é a pró-apoptótica *BCL-XS*. Aqui propomos que o controle que define qual das vias será ativada se dá por meio dos níveis do lncRNA *INXS*. Agentes indutores de apoptose, tais como a exposição à luz UV-C, privação de soro fetal bovino ou o tratamento com fármacos anti-tumorais levam ao aumento dos níveis endógenos do *INXS*. Estes níveis aumentados do *INXS* favorecem o posicionamento da Sam68 e de possíveis fatores de *splicing* adicionais (SF) perto do sítio 5' doador de *splicing* (5'ss, linhas pontilhadas azuis) localizado na região distal do pré-mRNA, favorecendo o *splicing* através da via [2], o

que em seguida conduz à síntese da proteína BCL-XS e dispara a morte celular por apoptose. Sabe-se que a presença da proteína Sam68 aumenta os níveis do mRNA da isoforma pró-apoptótica *BCL-XS*, enquanto que a ausência dessa proteína leva ao acúmulo da isoforma *BCL-XL* (Paronetto, Achsel et al. 2007). Adaptado de (DeOcesano-Pereira, Amaral et al. 2014).

Intervenções moleculares relacionadas ao *splicing* alternativo do pré-mRNA de *BCL-X* têm emergido como um possível alvo a ser explorado na terapia para o tratamento do câncer (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993; Taylor, Zhang et al. 1999; Mercatante, Bortner et al. 2001; Bauman, Li et al. 2010), como uma decorrência do trabalho pioneiro publicado por Boise et al (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993). Nesse trabalho os autores descrevem pela primeira vez a função antagônica existente entre as isoformas anti- e pró-apoptóticas provenientes do processamento alternativo de *BCL-X*, onde o balanço de expressão entre elas determina se a célula entre em processo de morte celular ou não (Boise, Gonzalez-Garcia et al. 1993). O potencial terapêutico *in vivo* da utilização de oligonucleotídeos capazes de direcionar e modular o *splicing* tem sido amplamente explorado em muitas doenças (Djebali, Davis et al. 2012; Spitali and Aartsma-Rus 2012), incluindo ensaios de modulação do *splicing* de *BCL-X* no câncer (Bauman, Li et al. 2010); no entanto, ainda existem grandes obstáculos que devem ser superados pensando no uso desses oligonucleotídeos na terapia contra algumas doenças. Uma dessas dificuldades é a de se conseguir alcançar uma melhor eficiência em matar as células através dessa estratégia, uma vez que foi mostrado que os oligonucleotídeos sozinhos são incapazes de promover uma modulação eficiente do *splicing* de *BCL-X*, e são incapazes de levar as células à apoptose (Taylor, Zhang et al. 1999; Mercatante, Bortner et al. 2001; Bauman, Li et al. 2010).

Portanto, o conjunto de dados apresentado no presente trabalho abre uma possibilidade original para a exploração terapêutica da indução da expressão endógena do lncRNA *INXS* como uma ferramenta contra o câncer, uma vez que essa molécula é extremamente eficaz e

dirige especificamente o *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X* favorecendo a expressão predominante da proteína BCL-XS seguida de apoptose.

Especulamos que o transcrito *INXS* de 1,9 kb cause tão eficientemente a apoptose porque este lncRNA provavelmente tem o potencial de adotar uma estrutura secundária / terciária complexa que poderia facilitar o recrutamento e ligação de moduladores de *splicing*, tais como a proteína Sam68, no pré-mRNA de *BCL-X*; isso sugere que talvez esse lncRNA tenha sido evolutivamente selecionado como parte de um mecanismo conservado e ajustado capaz de regular finamente a apoptose. A super-expressão ou *knockdown* do *INXS* não afetou o *splicing* de outros dois genes alvos já conhecidos de Sam68, isto é, a ciclina D1 (Paronetto, Cappellari et al. 2010) e *SF2* / *ASF* (Valacca, Bonomi et al. 2010), sugerindo que o *INXS* não exerça um papel global no *splicing* alternativo mediado por Sam68, e que essa especificidade pode ter surgido a partir de uma porção do lncRNA, que eventualmente estabelece um pareamento de bases RNA / RNA diretamente com o pré-mRNA alvo, no caso o *BCL-X*. Outros estudos sobre a modulação da expressão endógena do *INXS* e sobre o seu mecanismo molecular detalhado de ação são parte de uma promissora janela de estudos.

O efeito do lncRNA *INXS* no *splicing* do pré-mRNA de *BCL-X* provavelmente está associado à menos efeitos *off-target* quando comparado com muitas drogas anti-tumorais. Apesar de favorecerem a predominância da isoforma pró-apoptótica de *BCL-X*, essas drogas também são conhecidas por induzir as variantes de *splicing* anti-apoptóticas de muitos outros genes (Shkreta, Froehlich et al. 2008), o que é totalmente indesejado. Ainda dentro dessa linha de raciocínio, já foi demonstrado que a maioria dos 20 fármacos com propriedades anti-tumorais testados favorecem o processamento alternativo de gene *Fas* na direção da isoforma anti-apoptótica, enquanto a mudança no *splicing* de *BCL-X* apresenta diferentes graus de eficiência na formação da isoforma pró-apoptótica (Shkreta, Froehlich et al. 2008).

Numa perspectiva mais ampla, a identificação do *INXS* como o primeiro lncRNA que atua sobre o *splicing* de um gene e induz *per se* a apoptose, chama a atenção para a importância de se olhar para os papéis funcionais e modos de indução de outros lncRNAs que possivelmente agem sobre os eventos de *splicing* alternativo de genes apoptóticos. Além disso, os dados obtidos nos experimentos com os xenotumores nos camundongos que foram injetados com um plasmídeo que super-expressa o *INXS*, servem como uma prova de conceito de que a regressão de tumores pode ser eficazmente obtida *in vivo*. É tentador assumir que controlando e / ou aumentando condicionalmente a expressão do *INXS* em células tumorais poderíamos efetivamente induzir a apoptose, limitando assim a tumorigênese. Em suma, os dados apresentados nesse trabalho apontam para um cenário extremamente promissor envolvendo lncRNAs e doenças, demonstrando que o *INXS* pode representar um potente alvo molecular a ser explorado em terapias contra o câncer.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho identificou um lncRNA intrônico *unspliced* e antisenso ao gene *BCL-X*, denominado *INXS*, e caracterizou seu papel funcional na regulação pós-transcricional do *splicing* de *BCL-X*. Essa regulação ocorre através do recrutamento e / ou reposicionamento do complexo modular de *splicing* no sítio doador 5'ss distal presente no pré-mRNA de *BCL-X*, o que leva à formação predominante da isoforma de mRNA *BCL-XS* e consequentemente as células à apoptose. Esse processo de morte celular mediada por um lncRNA caracteriza uma via de controle pós-transcricional para o processamento alternativo de um gene apoptótico nunca antes mostrada na literatura, tanto *in vitro* com culturas de células, como também *in vivo*, através de experimentos com camundongos xenotransplantados com tumores humanos.

Além disso, os dados obtidos nesse trabalho trazem à tona a importância funcional dos lncRNAs intrônicos *unspliced*. Embora existam evidências de que esses lncRNAs sejam expressos no mesmo *locus* de 74% dos genes codificadores de proteína, a maior parte dos pesquisadores que trabalham com lncRNAs tem negligenciado o estudo desses lncRNAs intrônicos *unspliced*. É indiscutível que devem existir muitos outros lncRNAs intrônicos *unspliced* que atuem como moduladores específicos de eventos relacionados ao controle da expressão gênica tanto em nível transcricional como pós-transcricional, no mesmo *locus* em que são transcritos.

7. REFERÊNCIAS

(ENCODE, 2011). "A user's guide to the encyclopedia of DNA elements (ENCODE)." PLoS Biol **9**(4): e1001046.

(ENCODE, 2012). "An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome." Nature **489**(7414): 57-74.

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.

Almeida, G. T., M. S. Amaral, F. C. Beckedorff, J. P. Kitajima, R. DeMarco and S. Verjovski-Almeida (2012). "Exploring the Schistosoma mansoni adult male transcriptome using RNA-seq." Exp Parasitol **132**(1): 22-31.

Amaral, P. P. and J. S. Mattick (2008). "Noncoding RNA in development." Mamm Genome **19**(7-8): 454-492.

Bauman, J. A., S. D. Li, A. Yang, L. Huang and R. Kole (2010). "Anti-tumor activity of splice-switching oligonucleotides." Nucleic Acids Res **38**(22): 8348-8356.

Beckedorff, F. C., M. S. Amaral, C. Deocesano-Pereira and S. Verjovski-Almeida (2013). "Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics." Biosci Rep **33**(4).

Beckedorff, F. C., A. C. Ayupe, R. Crocci-Souza, M. S. Amaral, H. I. Nakaya, D. T. Soltys, C. F. Menck, E. M. Reis and 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 Genet **9**(8): e1003705.

Beltran, M., I. Puig, C. Pena, J. M. Garcia, A. B. Alvarez, R. Pena, F. Bonilla and A. G. de Herreros (2008). "A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition." Genes Dev **22**(6): 756-769.

Bertone, P., V. Stolc, T. E. Royce, J. S. Rozowsky, A. E. Urban, X. Zhu, J. L. Rinn, W. Tongprasit, M. Samanta, S. Weissman, M. Gerstein and M. Snyder (2004). "Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays." Science **306**(5705): 2242-2246.

Bielli, P., R. Busa, S. M. Di Stasi, M. J. Munoz, F. Botti, A. R. Kornblihtt and C. Sette (2014). "The transcription factor FBI-1 inhibits SAM68-mediated BCL-X alternative splicing and apoptosis." EMBO Rep **15**(4): 419-427.

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.

Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nunez and C. B. Thompson (1993). "bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death." Cell **74**(4): 597-608.

Bushnell, D. A., P. Cramer and R. D. Kornberg (2002). "Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 A resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1218-1222.

Cabili, M. N., C. Trapnell, L. Goff, M. Koziol, B. Tazon-Vega, A. Regev and J. L. Rinn (2011). "Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses." Genes Dev **25**(18): 1915-1927.

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.

Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell **136**(4): 642-655.

Cheetham, S. W., F. Gruhl, J. S. Mattick and M. E. Dinger (2013). "Long noncoding RNAs and the genetics of cancer." Br J Cancer **108**(12): 2419-2425.

Chu, C., K. Qu, F. L. Zhong, S. E. Artandi and H. Y. Chang (2011). "Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions." Mol Cell **44**(4): 667-678.

Clark, M. B., R. L. Johnston, M. Inostroza-Ponta, A. H. Fox, E. Fortini, P. Moscato, M. E. Dinger and J. S. Mattick (2012). "Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability." Genome Res **22**(5): 885-898.

Clark, M. B. and J. S. Mattick (2011). "Long noncoding RNAs in cell biology." Semin Cell Dev Biol **22**(4): 366-376.

Collins, F. S., E. S. Lander, J. Rogers, R. H. Waterston and I. H. G. S. Conso (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." Nature **431**(7011): 931-945.

Conley, A. B. and I. King Jordan (2012). "Epigenetic regulation of human cis-natural antisense transcripts." Nucleic Acids Res **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.

Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-656.

Crick, F. (1970). "Central dogma of molecular biology." Nature **227**(5258): 561-563.

Crick, F. H. (1958). "On protein synthesis." Symp Soc Exp Biol **12**: 138-163.

Dani, C., J. M. Blanchard, M. Piechaczyk, S. El Sabouty, L. Marty and P. Jeanteur (1984). "Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(22): 7046-7050.

David, L., W. Huber, M. Granovskaia, J. Toedling, C. J. Palm, L. Bofkin, T. Jones, R. W. Davis and L. M. Steinmetz (2006). "A high-resolution map of transcription in the yeast genome." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5320-5325.

Davuluri, R. V., I. Grosse and M. Q. Zhang (2001). "Computational identification of promoters and first exons in the human genome." Nat Genet **29**(4): 412-417.

de Almeida, S. F., A. Garcia-Sacristan, N. Custodio and M. Carmo-Fonseca (2010). "A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination." Nucleic Acids Res **38**(22): 8015-8026.

DeOcesano-Pereira, C., M. S. Amaral, K. S. Parreira, A. C. Ayupe, J. F. Jacysyn, G. P. Amarante-Mendes, E. M. Reis and S. Verjovski-Almeida (2014). "Long non-coding RNA INXS is a critical mediator of BCL-XS induced apoptosis." Nucleic Acids Res **42**(13): 8343-8355.

Dinger, M. E., P. P. Amaral, T. R. Mercer and J. S. Mattick (2009). "Pervasive transcription of the eukaryotic genome: functional indices and conceptual implications." Brief Funct Genomic Proteomic **8**(6): 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. Roder, 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. H. See, A. Shahab, J. Skancke, A. M. Suzuki, H. Takahashi, H. Tilgner, D. Trout, N. Walters, H. Wang, J. Wrobel, Y. Yu, X. Ruan, Y. Hayashizaki, J. Harrow, M. Gerstein, T. Hubbard, A. Reymond, S. E. Antonarakis, G. Hannon, M. C. Giddings, Y. Ruan, B. Wold, P. Carninci, R. Guigo and T. R. Gingeras (2012). "Landscape of transcription in human cells." Nature **489**(7414): 101-108.

Ebralidze, A. K., F. C. Guibal, U. Steidl, P. Zhang, S. Lee, B. Bartholdy, M. A. Jorda, V. Petkova, F. Rosenbauer, G. Huang, T. Dayaram, J. Klupp, K. B. O'Brien, B. Will, M. Hoogenkamp, K. L. Borden, C. Bonifer and D. G. Tenen (2008). "PU.1 expression is modulated by the balance of functional sense and antisense RNAs regulated by a shared cis-regulatory element." Genes Dev **22**(15): 2085-2092.

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

Farajollahi, S. and S. Maas (2010). "Molecular diversity through RNA editing: a balancing act." Trends Genet **26**(5): 221-230.

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." Curr Opin Genet Dev **22**(2): 172-178.

Frith, M. C., M. Pheasant and J. S. Mattick (2005). "The amazing complexity of the human transcriptome." Eur J Hum Genet **13**(8): 894-897.

Garneau, D., T. Revil, J. F. Fisette and B. Chabot (2005). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x." J Biol Chem **280**(24): 22641-22650.

Gerstein, M. B., Z. J. Lu, E. L. Van Nostrand, C. Cheng, B. I. Arshinoff, T. Liu, K. Y. Yip, R. Robilotto, A. Rechtsteiner, K. Ikegami, P. Alves, A. Chateigner, M. Perry, M. Morris, R. K. Auerbach, X. Feng, J. Leng, A. Vielle, W. Niu, K. Rhrissorrakrai, A. Agarwal, R. P. Alexander, G. Barber, C. M. Brdlik, J. Brennan, J. J. Brouillet, A. Carr, M. S. Cheung, H. Clawson, S. Contrino, L. O. Dannenberg, A. F. Dernburg, A. Desai, L. Dick, A. C. Dose, J. Du, T. Egelhofer, S. Ercan, G. Euskirchen, B. Ewing, E. A. Feingold, R. Gassmann, P. J. Good, P. Green, F. Gullier, M. Gutwein, M. S. Guyer, L. Habegger, T. Han, J. G. Henikoff, S. R. Henz, A. Hinrichs, H. Holster, T. Hyman, A. L. Iniguez, J. Janette, M. Jensen, M. Kato, W. J. Kent, E. Kephart, V. Khivansara, E. Khurana, J. K. Kim, P. Kolasinska-Zwierz, E. C. Lai, I. Latorre, A. Leahey, S. Lewis, P. Lloyd, L. Lochovsky, R. F. Lowdon, Y. Lubling, R. Lyne, M. MacCoss, S. D. Mackowiak, M. Mangone, S. McKay, D. Mecenas, G. Merrihew, D. M. Miller, 3rd, A. Muroyama, J. I. Murray, S. L. Ooi, H. Pham, T. Phippen, E. A. Preston, N. Rajewsky, G. Ratsch, H. Rosenbaum, J. Rozowsky, K. Rutherford, P. Ruzanov, M. Sarov, R. Sasidharan, A. Sboner, P. Scheid, E. Segal, H. Shin, C. Shou, F. J. Slack, C. Slightam, R. Smith, W. C. Spencer, E. O. Stinson, S. Taing, T. Takasaki, D. Vafeados, K. Voronina, G. Wang, N. L. Washington, C. M. Whittle, B. Wu, K. K. Yan, G. Zeller, Z. Zha, M. Zhong, X. Zhou, J. Ahringer, S. Strome, K. C. Gunsalus, G. Micklem, X. S. Liu, V. Reinke, S. K. Kim, L. W. Hillier, S. Henikoff, F. Piano, M. Snyder, L. Stein, J. D. Lieb and R. H. Waterston (2010). "Integrative analysis of the Caenorhabditis elegans genome by the modENCODE project." Science **330**(6012): 1775-1787.

Gingeras, T. R. (2007). "Origin of phenotypes: genes and transcripts." Genome Res **17**(6): 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.

Gong, X. Q., Y. A. Nedialkov and Z. F. Burton (2004). "Alpha-amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II." J Biol Chem **279**(26): 27422-27427.

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.

Guttman, M., J. Donaghey, B. W. Carey, M. Garber, J. K. Grenier, G. Munson, G. Young, A. B. Lucas, R. Ach, L. Bruhn, X. Yang, I. Amit, A. Meissner, A. Regev, J. L. Rinn, D. E.

Root and E. S. Lander (2011). "lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation." Nature **477**(7364): 295-300.

Guttman, M., M. Garber, J. Z. Levin, J. Donaghey, J. Robinson, X. Adiconis, L. Fan, M. J. Koziol, A. Gnirke, C. Nusbaum, J. L. Rinn, E. S. Lander and A. Regev (2010). "Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs." Nat Biotechnol **28**(5): 503-510.

Guttman, M. and J. L. Rinn (2012). "Modular regulatory principles of large non-coding RNAs." Nature **482**(7385): 339-346.

He, L., J. Liu, I. Collins, S. Sanford, B. O'Connell, C. J. Benham and D. Levens (2000). "Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression." EMBO J **19**(5): 1034-1044.

Hossini, A. M., J. Eberle, L. F. Fecker, C. E. Orfanos and C. C. Geilen (2003). "Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts." FEBS Lett **553**(3): 250-256.

Huarte, M., M. Guttman, D. Feldser, M. Garber, M. J. Koziol, D. Kenzelmann-Broz, A. M. Khalil, O. Zuk, I. Amit, M. Rabani, L. D. Attardi, A. Regev, E. S. Lander, T. Jacks and J. L. Rinn (2010). "A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response." Cell **142**(3): 409-419.

Huarte, M. and J. L. Rinn (2010). "Large non-coding RNAs: missing links in cancer?" Hum Mol Genet **19**(R2): R152-161.

Hung, T., Y. Wang, M. F. Lin, A. K. Koegel, Y. Kotake, G. D. Grant, H. M. Horlings, N. Shah, C. Umbricht, P. Wang, B. Kong, A. Langerod, A. L. Borresen-Dale, S. K. Kim, M. van de Vijver, S. Sukumar, M. L. Whitfield, M. Kellis, Y. Xiong, D. J. Wong and H. Y. Chang (2011). "Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters." Nat Genet **43**(7): 621-629.

Jacob, S. T., E. M. Sajdel and H. N. Munro (1970). "Specific action of alpha-amanitin on mammalian RNA polymerase protein." Nature **225**(5227): 60-62.

Ji, P., S. Diederichs, W. Wang, S. Boing, R. Metzger, P. M. Schneider, N. Tidow, B. Brandt, H. Buerger, E. Bulk, M. Thomas, W. E. Berdel, H. Serve and C. Muller-Tidow (2003). "MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer." Oncogene **22**(39): 8031-8041.

Kampa, D., J. Cheng, P. Kapranov, M. Yamanaka, S. Brubaker, S. Cawley, J. Drenkow, A. Piccolboni, S. Bekiranov, G. Helt, H. Tammana and T. R. Gingeras (2004). "Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22." Genome Res **14**(3): 331-342.

Kapranov, P., S. E. Cawley, J. Drenkow, S. Bekiranov, R. L. Strausberg, S. P. Fodor and T. R. Gingeras (2002). "Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22." Science **296**(5569): 916-919.

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 Biol **8**: 149.

Kapranov, P., A. T. Willingham and T. R. Gingeras (2007). "Genome-wide transcription and the implications for genomic organization." Nat Rev Genet **8**(6): 413-423.

Katayama, S., Y. Tomaru, T. Kasukawa, K. Waki, M. Nakanishi, M. Nakamura, H. Nishida, C. C. Yap, M. Suzuki, J. Kawai, H. Suzuki, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. Wells, M. Frith, T. Ravasi, K. C. Pang, J. Hallinan, J. Mattick, D. A. Hume, L. Lipovich, S. Batalov, P. G. Engstrom, Y. Mizuno, M. A. Faghihi, A. Sandelin, A. M. Chalk, S. Mottagui-Tabar, Z. Liang, B. Lenhard and C. Wahlestedt (2005). "Antisense transcription in the mammalian transcriptome." Science **309**(5740): 1564-1566.

Kedinger, C., M. Gniazdowski, J. L. Mandel, Jr., F. Gissinger and P. Chambon (1970). "Alpha-amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-pendent RNA polymerase activities from calf thymus." Biochem Biophys Res Commun **38**(1): 165-171.

Kelly, P. N. and A. Strasser (2011). "The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy." Cell Death Differ **18**(9): 1414-1424.

Khalil, A. M., M. Guttman, M. Huarte, M. Garber, A. Raj, D. Rivea Morales, K. Thomas, A. Presser, B. E. Bernstein, A. van Oudenaarden, A. Regev, E. S. Lander and J. L. Rinn (2009). "Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(28): 11667-11672.

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

Kong, L., Y. Zhang, Z. Q. Ye, X. Q. Liu, S. Q. Zhao, L. Wei and G. Gao (2007). "CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W345-349.

Krystal, G. W., B. C. Armstrong and J. F. Battey (1990). "N-myc mRNA forms an RNA-RNA duplex with endogenous antisense transcripts." Mol Cell Biol **10**(8): 4180-4191.

Kung, J. T., D. Colognori and J. T. Lee (2013). "Long noncoding RNAs: past, present, and future." Genetics **193**(3): 651-669.

Lee, J., J. Zhou, X. Zheng, S. Cho, H. Moon, T. J. Loh, K. Jo and H. Shen (2012). "Identification of a novel cis-element that regulates alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA." Biochem Biophys Res Commun **420**(2): 467-472.

Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-4060.

Lindell, T. J., F. Weinberg, P. W. Morris, R. G. Roeder and W. J. Rutter (1970). "Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin." Science **170**(3956): 447-449.

Luo, J., L. Tang, J. Zhang, J. Ni, H. P. Zhang, L. Zhang, J. F. Xu and D. Zheng (2014). "Long non-coding RNA CARLo-5 is a negative prognostic factor and exhibits tumor pro-oncogenic activity in non-small cell lung cancer." Tumour Biol **doi:10.1007/s13277-014-2442-7**.

Marques, A. C. and C. P. Ponting (2014). "Intergenic lncRNAs and the evolution of gene expression." Curr Opin Genet Dev **27**: 48-53.

Massiello, A., J. R. Roesser and C. E. Chalfant (2006). "SAP155 Binds to ceramide-responsive RNA cis-element 1 and regulates the alternative 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA." FASEB J **20**(10): 1680-1682.

Massiello, A., A. Salas, R. L. Pinkerman, P. Roddy, J. R. Roesser and C. E. Chalfant (2004). "Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide." J Biol Chem **279**(16): 15799-15804.

Mattick, J. S. (2007). "A new paradigm for developmental biology." J Exp Biol **210**(Pt 9): 1526-1547.

Mattick, J. S. (2011). "The central role of RNA in human development and cognition." FEBS Lett **585**(11): 1600-1616.

Mattick, J. S. (2012). "RNA driving the epigenetic bus." EMBO J **31**(3): 515-516.

Mercatante, D. R., C. D. Bortner, J. A. Cidlowski and R. Kole (2001). "Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death." J Biol Chem **276**(19): 16411-16417.

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

Mercer, T. R., D. J. Gerhardt, M. E. Dinger, J. Crawford, C. Trapnell, J. A. Jeddeloh, J. S. Mattick and J. L. Rinn (2012). "Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome." Nat Biotechnol **30**(1): 99-104.

Michelle, L., A. Cloutier, J. Toutant, L. Shkreta, P. Thibault, M. Durand, D. Garneau, D. Gendron, E. Lapointe, S. Couture, H. Le Hir, R. Klinck, S. A. Elela, P. Prinos and B. Chabot (2012). "Proteins associated with the exon junction complex also control the alternative splicing of apoptotic regulators." Mol Cell Biol **32**(5): 954-967.

Minn, A. J., L. H. Boise and C. B. Thompson (1996). "Bcl-x(S) anatagonizes the protective effects of Bcl-x(L)." J Biol Chem **271**(11): 6306-6312.

Montes, M., A. Cloutier, N. Sanchez-Hernandez, L. Michelle, B. Lemieux, M. Blanchette, C. Hernandez-Munain, B. Chabot and C. Sune (2012). "TCERG1 regulates alternative splicing of the Bcl-x gene by modulating the rate of RNA polymerase II transcription." Mol Cell Biol **32**(4): 751-762.

Moore, M. J., Q. Wang, C. J. Kennedy and P. A. Silver (2010). "An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis." Cell **142**(4): 625-636.

Morrissy, A. S., M. Griffith and M. A. Marra (2011). "Extensive relationship between antisense transcription and alternative splicing in the human genome." Genome Res **21**(8): 1203-1212.

Mourtada-Maarabouni, M., M. R. Pickard, V. L. Hedge, F. Farzaneh and G. T. Williams (2009). "GAS5, a non-protein-coding RNA, controls apoptosis and is downregulated in breast cancer." Oncogene **28**(2): 195-208.

Nagasaki, H., M. Arita, T. Nishizawa, M. Suwa and O. Gotoh (2005). "Species-specific variation of alternative splicing and transcriptional initiation in six eukaryotes." Gene **364**: 53-62.

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 Biol **8**(3): R43.

Necsulea, A., M. Soumillon, M. Warnefors, A. Liechti, T. Daish, U. Zeller, J. C. Baker, F. Grutzner and H. Kaessmann (2014). "The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods." Nature **505**(7485): 635-640.

Nie, L., H. J. Wu, J. M. Hsu, S. S. Chang, A. M. Labaff, C. W. Li, Y. Wang, J. L. Hsu and M. C. Hung (2012). "Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer." Am J Transl Res **4**(2): 127-150.

Numata, K., A. Kanai, R. Saito, S. Kondo, J. Adachi, L. G. Wilming, D. A. Hume, Y. Hayashizaki and M. Tomita (2003). "Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection." Genome Res **13**(6B): 1301-1306.

Ota, T., Y. Suzuki, T. Nishikawa, T. Otsuki, T. Sugiyama, R. Irie, A. Wakamatsu, K. Hayashi, H. Sato, K. Nagai, K. Kimura, H. Makita, M. Sekine, M. Obayashi, T. Nishi, T. Shibahara, T. Tanaka, S. Ishii, J. Yamamoto, K. Saito, Y. Kawai, Y. Isono, Y. Nakamura, K. Nagahari, K. Murakami, T. Yasuda, T. Iwayanagi, M. Wagatsuma, A. Shiratori, H. Sudo, T. Hosoiri, Y. Kaku, H. Kodaira, H. Kondo, M. Sugawara, M. Takahashi, K. Kanda, T. Yokoi, T. Furuya, E. Kikkawa, Y. Omura, K. Abe, K. Kamihara, N. Katsuta, K. Sato, M. Tanikawa, M. Yamazaki, K. Ninomiya, T. Ishibashi, H. Yamashita, K. Murakawa, K. Fujimori, H. Tanai, M. Kimata, M. Watanabe, S. Hiraoka, Y. Chiba, S. Ishida, Y. Ono, S. Takiguchi, S. Watanabe, M. Yosida, T. Hotuta, J. Kusano, K. Kanehori, A. Takahashi-Fujii, H. Hara, T. O. Tanase, Y. Nomura, S. Togiya, F. Komai,

R. Hara, K. Takeuchi, M. Arita, N. Imose, K. Musashino, H. Yuuki, A. Oshima, N. Sasaki, S. Aotsuka, Y. Yoshikawa, H. Matsunawa, T. Ichihara, N. Shiohata, S. Sano, S. Moriya, H. Momiyama, N. Satoh, S. Takami, Y. Terashima, O. Suzuki, S. Nakagawa, A. Senoh, H. Mizoguchi, Y. Goto, F. Shimizu, H. Wakebe, H. Hishigaki, T. Watanabe, A. Sugiyama, M. Takemoto, B. Kawakami, K. Watanabe, A. Kumagai, S. Itakura, Y. Fukuzumi, Y. Fujimori, M. Komiyama, H. Tashiro, A. Tanigami, T. Fujiwara, T. Ono, K. Yamada, Y. Fujii, K. Ozaki, M. Hirao, Y. Ohmori, A. Kawabata, T. Hikiji, N. Kobatake, H. Inagaki, Y. Ikema, S. Okamoto, R. Okitani, T. Kawakami, S. Noguchi, T. Itoh, K. Shigeta, T. Senba, K. Matsumura, Y. Nakajima, T. Mizuno, M. Morinaga, M. Sasaki, T. Togashi, M. Oyama, H. Hata, T. Komatsu, J. Mizushima-Sugano, T. Satoh, Y. Shirai, Y. Takahashi, K. Nakagawa, K. Okumura, T. Nagase, N. Nomura, H. Kikuchi, Y. Masuho, R. Yamashita, K. Nakai, T. Yada, O. Ohara, T. Isogai and S. Sugano (2004). "Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs." Nat Genet **36**(1): 40-45.

Pandey, R. R., T. Mondal, F. Mohammad, S. Enroth, L. Redrup, J. Komorowski, T. Nagano, D. Mancini-Dinardo and C. Kanduri (2008). "Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation." Mol Cell **32**(2): 232-246.

Paronetto, M. P., T. Achsel, A. Massiello, C. E. Chalfant and C. Sette (2007). "The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x." J Cell Biol **176**(7): 929-939.

Paronetto, M. P., M. Cappellari, R. Busa, S. Pedrotti, R. Vitali, C. Comstock, T. Hyslop, K. E. Knudsen and C. Sette (2010). "Alternative splicing of the cyclin D1 proto-oncogene is regulated by the RNA-binding protein Sam68." Cancer Res **70**(1): 229-239.

Plati, J., O. Bucur and R. Khosravi-Far (2011). "Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy." Integr Biol (Camb) **3**(4): 279-296.

Plotz, M., B. Gillissen, A. M. Hossini, P. T. Daniel and J. Eberle (2012). "Disruption of the VDAC2-Bak interaction by Bcl-x(S) mediates efficient induction of apoptosis in melanoma cells." Cell Death Differ **19**(12): 1928-1938.

Ponjavic, J., C. P. Ponting and G. Lunter (2007). "Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs." Genome Res **17**(5): 556-565.

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

Prensner, J. R. and A. M. Chinnaiyan (2011). "The emergence of lncRNAs in cancer biology." Cancer Discov **1**(5): 391-407.

Raha, D., Z. Wang, Z. Moqtaderi, L. Wu, G. Zhong, M. Gerstein, K. Struhl and M. Snyder (2010). "Close association of RNA polymerase II and many transcription factors with Pol III genes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(8): 3639-3644.

Reis, E. M., H. I. Nakaya, R. Louro, F. C. Canavez, A. V. Flatschart, G. T. Almeida, C. M. Egidio, A. C. Paquola, A. A. Machado, F. Festa, D. Yamamoto, R. Alvarenga, C. C. da

Silva, G. C. Brito, S. D. Simon, C. A. Moreira-Filho, K. R. Leite, L. H. Camara-Lopes, F. S. Campos, E. Gimba, G. M. Vignal, H. El-Dorry, M. C. Sogayar, M. A. Barcinski, A. M. da Silva and S. Verjovski-Almeida (2004). "Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer." Oncogene **23**(39): 6684-6692.

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

Revil, T., J. Pelletier, J. Toutant, A. Cloutier and B. Chabot (2009). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform." J Biol Chem **284**(32): 21458-21467.

Rinn, J. L. and H. Y. Chang (2012). "Genome Regulation by Long Noncoding RNAs." Annu Rev Biochem **81**: 145-166.

Rinn, J. L., G. Euskirchen, P. Bertone, R. Martone, N. M. Luscombe, S. Hartman, P. M. Harrison, F. K. Nelson, P. Miller, M. Gerstein, S. Weissman and M. Snyder (2003). "The transcriptional activity of human Chromosome 22." Genes Dev **17**(4): 529-540.

Roy, S., J. Ernst, P. V. Kharchenko, P. Kheradpour, N. Negre, M. L. Eaton, J. M. Landolin, C. A. Bristow, L. Ma, M. F. Lin, S. Washietl, B. I. Arshinoff, F. Ay, P. E. Meyer, N. Robine, N. L. Washington, L. Di Stefano, E. Berezikov, C. D. Brown, R. Candeias, J. W. Carlson, A. Carr, I. Jungreis, D. Marbach, R. Sealfon, M. Y. Tolstorukov, S. Will, A. A. Alekseyenko, C. Artieri, B. W. Booth, A. N. Brooks, Q. Dai, C. A. Davis, M. O. Duff, X. Feng, A. A. Gorchakov, T. Gu, J. G. Henikoff, P. Kapranov, R. Li, H. K. MacAlpine, J. Malone, A. Minoda, J. Nordman, K. Okamura, M. Perry, S. K. Powell, N. C. Riddle, A. Sakai, A. Samsonova, J. E. Sandler, Y. B. Schwartz, N. Sher, R. Spokony, D. Sturgill, M. van Baren, K. H. Wan, L. Yang, C. Yu, E. Feingold, P. Good, M. Guyer, R. Lowdon, K. Ahmad, J. Andrews, B. Berger, S. E. Brenner, M. R. Brent, L. Cherbas, S. C. Elgin, T. R. Gingeras, R. Grossman, R. A. Hoskins, T. C. Kaufman, W. Kent, M. I. Kuroda, T. Orr-Weaver, N. Perrimon, V. Pirrotta, J. W. Posakony, B. Ren, S. Russell, P. Cherbas, B. R. Graveley, S. Lewis, G. Micklem, B. Oliver, P. J. Park, S. E. Celniker, S. Henikoff, G. H. Karpen, E. C. Lai, D. M. MacAlpine, L. D. Stein, K. P. White and M. Kellis (2010). "Identification of functional elements and regulatory circuits by Drosophila modENCODE." Science **330**(6012): 1787-1797.

Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-386.

Shkreta, L., U. Froehlich, E. R. Paquet, J. Toutant, S. A. Elela and B. Chabot (2008). "Anticancer drugs affect the alternative splicing of Bcl-x and other human apoptotic genes." Mol Cancer Ther **7**(6): 1398-1409.

Sobell, H. M. (1985). "Actinomycin and DNA transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(16): 5328-5331.

Spitali, P. and A. Aartsma-Rus (2012). "Splice modulating therapies for human disease." Cell **148**(6): 1085-1088.

Spizzo, R., M. I. Almeida, A. Colombatti and G. A. Calin (2012). "Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research?" Oncogene **31**(43): 4577-4587.

Struhl, K. (2007). "Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II." Nat Struct Mol Biol **14**(2): 103-105.

Sumantran, V. N., M. W. Ealovega, G. Nunez, M. F. Clarke and M. S. Wicha (1995). "Overexpression of Bcl-XS sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis." Cancer Res **55**(12): 2507-2510.

Sunwoo, H., M. E. Dinger, J. E. Wilusz, P. P. Amaral, J. S. Mattick and D. L. Spector (2009). "MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles." Genome Res **19**(3): 347-359.

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." Nat Genet **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." J Pathol **220**(2): 126-139.

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.

Tahira, A. C., M. S. Kubrusly, M. F. Faria, B. Dazzani, R. S. Fonseca, V. Maracaja-Coutinho, S. Verjovski-Almeida, M. C. Machado and E. M. Reis (2011). "Long noncoding intronic RNAs are differentially expressed in primary and metastatic pancreatic cancer." Mol Cancer **10**: 141.

Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-632.

Taylor, J. K., Q. Q. Zhang, J. R. Wyatt and N. M. Dean (1999). "Induction of endogenous Bcl-xS through the control of Bcl-x pre-mRNA splicing by antisense oligonucleotides." Nat Biotechnol **17**(11): 1097-1100.

Tomayko, M. M. and C. P. Reynolds (1989). "Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice." Cancer Chemother Pharmacol **24**(3): 148-154.

Topisirovic, I., B. Culjkovic, N. Cohen, J. M. Perez, L. Skrabanek and K. L. Borden (2003). "The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth." EMBO J **22**(3): 689-703.

Tripathi, V., J. D. Ellis, Z. Shen, D. Y. Song, Q. Pan, A. T. Watt, S. M. Freier, C. F. Bennett, A. Sharma, P. A. Bubulya, B. J. Blencowe, S. G. Prasanth and K. V. Prasanth (2010).

"The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation." Mol Cell **39**(6): 925-938.

Tripathi, V., Z. Shen, A. Chakraborty, S. Giri, S. M. Freier, X. Wu, Y. Zhang, M. Gorospe, S. G. Prasanth, A. Lal and K. V. Prasanth (2013). "Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB." PLoS Genet **9**(3): e1003368.

Valacca, C., S. Bonomi, E. Buratti, S. Pedrotti, F. E. Baralle, C. Sette, C. Ghigna and G. Biamonti (2010). "Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene." J Cell Biol **191**(1): 87-99.

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

Wang, X., S. Arai, X. Song, D. Reichart, K. Du, G. Pascual, P. Tempst, M. G. Rosenfeld, C. K. Glass and R. Kurokawa (2008). "Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription." Nature **454**(7200): 126-130.

Wang, X., X. Song, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (2011). "The long arm of long noncoding RNAs: roles as sensors regulating gene transcriptional programs." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(1): a003756.

Wapinski, O. and H. Y. Chang (2011). "Long noncoding RNAs and human disease." Trends Cell Biol **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.

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

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

Yan, M. D., C. C. Hong, G. M. Lai, A. L. Cheng, Y. W. Lin and S. E. Chuang (2005). "Identification and characterization of a novel gene Saf transcribed from the opposite strand of Fas." Hum Mol Genet **14**(11): 1465-1474.

Yeh, C. T. and G. C. Yen (2005). "Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells." Carcinogenesis **26**(12): 2138-2148.

Zeuner, A., F. Francescangeli, P. Contavalli, G. Zapparelli, T. Apuzzo, A. Eramo, M. Baiocchi, M. L. De Angelis, M. Biffoni, G. Sette, M. Todaro, G. Stassi and R. De Maria (2014). "Elimination of quiescent/slow-proliferating cancer stem cells by Bcl-X inhibition in non-small cell lung cancer." Cell Death Differ **21**(12): 1877-1888.

Zhang, X., K. Rice, Y. Wang, W. Chen, Y. Zhong, Y. Nakayama, Y. Zhou and A. Klibanski (2010). "Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions." Endocrinology **151**(3): 939-947.

Zhou, A., A. C. Ou, A. Cho, E. J. Benz, Jr. and S. C. Huang (2008). "Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection." Mol Cell Biol **28**(19): 5924-5936.

8. ANEXO I – Súmula Curricular

Dados Pessoais

Nome: Carlos DeOcesano-Pereira
Nascimento: 09/01/1984; Naturalidade: Patos de Minas, MG; Nacionalidade: Brasileiro.
Endereço: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748 sala 1200, 05508-000 São Paulo, SP. Fone: (011) 3091-3815 R209.
E-mail: cardeo@iq.usp.br

Formação:

- Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
- Estudande de Doutorado Direto em Bioquímica, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo. Orientação Dr. Sergio Verjovski-Almeida.

Histórico profissional:

2007 - atual	**Laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos Superiores, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo - SP, Brasil** Professor Sergio Verjovski-Almeida Doutorado Direto - Projeto: “Functional characterization of entirely intronic long non-coding RNAs in cellular processes related to tumorigenesis.”
2013 - atual	**Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), Universidade de São Paulo - SP, Brasil** Professora Mari Cleide Sogayar Projeto: “Multipotent mesenchymal stem cells as tools for the optimization of human pancreatic islet transplantation.”
2004 - 2007	**Laboratório de Virologia Molecular de Plantas, Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais, Brasil** Professor Francisco Murilo Zerbini Júnior Projeto: "Molecular characterization of two begomoviruses that infect soybean (Glycine max) and construction of a viral vector to induce gene silencing."

Publicações

Artigos completos publicados em periódicos

DeOcesano-Pereira, Carlos, Murilo S. Amaral, Kleber S. Parreira, Ana C. Ayupe, Jacqueline F. Jacysyn, Gustavo P. Amarante-Mendes, Eduardo M. Reis and Sergio Verjovski-Almeida. Long non-coding RNA *INXS* is a critical mediator of *BCL-XS* induced apoptosis. *Nucleic Acids Research* (29 July 2014) 42 (13): 8343-8355. Advance Access published July 3, (2014). doi: 10.1093/nar/gku561.

Beckedorff, F. C., Amaral, M. S., DeOcesano-Pereira, C. and Verjovski‐Almeida, S. Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics. *Biosci. Rep.* (2013) 33(4):art:e00061. doi:10.1042/BSR20130054.

Resumos publicados em anais de congressos

DEOCESANO-PEREIRA, C., PARREIRA, K.S.; AMARAL, S.; AYUPE, A. AND VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Antisense Long Noncoding RNA ABALON Mediates BCL-X Induced Apoptosis and Promotes Tumor Regression In Vivo. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Noncoding RNAs in Development and Cancer. January 20-25, 2013. Vancouver, British Columbia Canada.

DEOCESANO-PEREIRA, C., CAMARGO, L., OLIVEIRA, A., PARREIRA, K.S., FACHEL, A.A. AND VERJOVSKI-ALMEIDA, S. A new ncRNA tumor supressor candidate regulator of BCL-X gene. XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society – SBBq Foz do Iguaçu, PR, Brazil, April 30 to May 3, 2011.

DEOCESANO-PEREIRA, C., FACHEL, A. A. AND VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Intronic Antisense Noncoding RNA as a Candidate Regulator of BCL2L1 Genes. XXXIX Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society – SBBq Foz do Iguaçu, PR, Brazil, May 18 to 21, 2010.

Premiações

Honorable Mention as Best Paper Presented by the Department of Plant Pathology at UFV entitled "Partial molecular characterization of two new begomovirus infecting soybean (Glycine max) and associated weeds" during the XV Symposium of Scientific Initiation, V Displays the Postgraduate and III Symposium University Extension - Research, Extension and Development. Federal University of Viçosa, UFV. Viçosa, MG. Brazil, in 2006.

Honorable Mention as Best Poster Presented entitled "Molecular construction of a viral vector based on a begomovirus genome for the study of VIGS in plants" during the VIII Research ICB / III ENAPEBI. Federal University of Minas Gerais, UFMG. Belo Horizonte, MG. Brazil, in 2005.

Atividades extras

2013 - Palestrante – *"ABALON*, um longo RNA não codificador de proteínas mediador da apoptose que promove a regressão tumoral". – Instituto de Química, Departamento de Bioquímica. Seminários Gerais do Departamento de Bioquímica.

2014 – Palestrante - "RNAs longos não codificadores de proteínas e a implicação funcional na apoptose" – Instituto de Química, Departamento de Bioquímica. Seminário para o Estágio Avançado de Bioquímica e Biologia Molecular.

Monitor no VI Curso de Inverno "Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular" – Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, 04/07 - 15/07 de 2011.

Monitor no VII Curso de Inverno "Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular" – Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, 16/07 - 27/07 de 2012.

Monitor no VIII Curso de Inverno "Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular" – Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, 15/07 - 26/07 de 2013.

Monitor do curso "Biologia Molecular da Transformação Malígna"- Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), Universidade de São Paulo - SP, Brasil, 30/06 – 17/08 de 2014.

9. ANEXO II – Certificado de aprovação do Comitê de Bioética em Experimentação Animal

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO Nº 14/2011

Certifico que o Projeto "Caracterização funcional de longos RNAs totalmente intrônicos não-codificadores (TIN RNAs)" em processos celulares relacionados a tumorigênese", desenvolvido sob responsabilidade do **Prof. Dr. Sergio Verjovski-Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 30/06/2011.

We attest that the project entitled "Caracterização funcional de longos RNAs totalmente intrônicos não-codificadores (TIN RNAs)" em processos celulares relacionados a tumorigênese", developed under the responsibility of Dr. **Sergio Verjovski-Almeida**, in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 6/30/2011.

São Paulo, 30 de setembro de 2011

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto
Coordenadora CEUA

10. ANEXO III – Manuscrito publicado contendo os resultados da Tese

DeOcesano-Pereira, Carlos, Murilo S. Amaral, Kleber S. Parreira, Ana C. Ayupe, Jacqueline F. Jacysyn, Gustavo P. Amarante-Mendes, Eduardo M. Reis and Sergio Verjovski-Almeida. Long non-coding RNA *INXS* is a critical mediator of *BCL-XS* induced apoptosis. *Nucleic Acids Research* (29 July 2014) 42 (13): 8343-8355. Advance Access published July 3, (2014). doi: 10.1093/nar/gku561.

Beckedorff, F. C., Amaral, M. S., DeOcesano-Pereira, C. and Verjovski‐Almeida, S. Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics. *Biosci. Rep.* (2013) 33(4):art:e00061. doi:10.1042/BSR20130054.

OBSERVAÇÃO: Todos os anexos encontram-se em arquivos no CD-ROM que acompanham essa tese.