



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis de IncRNAs con interacción con fosfatidilinositol 4,5-

bisfosfato

Tesis que presenta

ANDREA BAYONA HERNÁNDEZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2024

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C. POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Andrea Bayona Hernández titulado **Análisis de IncRNAs con interacción con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato**, fue realizado en la unidad de Biología Integrativa, en la línea de investigación de biología celular y del desarrollo, en el laboratorio 23 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente Dr. José Luis Hernández Stefanoni

Dr. José Luis Hernández Stefanoni Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 30 de septiembre de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:

Nombre: Andrea Bayona Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Integrativa del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del trabajo titulado "Análisis de IncRNAs con interacción con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato" bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna.

AGRADECIMIENTOS

Centro de Investigación Científica de Yucatán por las instalaciones otorgadas para realizar mi doctorado.

A CONAHCYT por la beca otorgada que hizo posible la culminación del grado (CVU 833881).

A la Unidad de Biología Integrativa por las instalaciones brindadas y las facilidades que permitieron realizar este trabajo.

A mi asesor de tesis el Dr. Enrique Castaño de la Serna por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Su guía y apoyo han sido indispensables para el desarrollo de este proyecto y a su constante motivación que han sido pilares para incentivar mi interés en la labor científica y arte de hacer ciencia. Mi paso por este laboratorio ha dejado una huella imborrable en mi formación académica y personal.

A mi comité tutoral, el Dr. Luis Carlos Rodriguez Zapata y el Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por su apoyo y por contribuir con sus comentarios y consejos a la culminación de este trabajo de tesis durante estos cuatro años.

A mi comité de revisión de tesis conformado por el Dr. Felipe Vazquez Flota, el Dr. Oscar Moreno Valenzuela, el Dr. Alejandro Pereira Santana, el Dr. Fulgencio Alatorre Cobos, el Dr. Luis Carlos Rodriguez Zapata y el Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por su tiempo y dedicación a la revisión de documento así como a todos los invaluables comentarios y correcciones recibidas.

Al Instituto de Genética Molecular de Praga, Republica Checa por permitirme el uso de sus instalaciones en el laboratorio de núcleo celular. A su titular, el Dr. Pavel hozak que me permitió relizar diversos experimentos en su laboratorio, así como a sus estudiantes Ana y Ludovica y Pavel Krist como personal técnico que me recibieron siempre con los brazos abiertos, infinita paciencia y disposición para ayudar.

A la Dra. Cecilia Aquino Perez por sus consejos en técnicas de cultivo y microscopía. Por su hermosa amistad y por ser una inspiración de resiliencia y trabajo duro en el camino de la ciencia.

Al apoyo técnico de la Ing. Wilma González Kantun.

A mis compañeros del laboratorio 23 que han estado presentes en este viaje de aprendizaje.

A la Dra. Alma Laura Rodriguez Piña por su apoyo y opiniones profesionales asi como por su invaluable amistad.

A todas aquellas personas que han pasado por mi camino hacia culminar este proyecto de doctorado GRACIAS por inspirarme a seguir el camino de la investigación y por ser un pilar fundamental en este importante capítulo de mi vida.

DEDICATORIAS

A mis padres Candelaria Hernández Noh y Arnulfo Bayona Tosca por su amor y apoyo constante, sin los que no habría podido salir adelante, por sus consejos que vienen desde el amor y por hacerme sentir capaz de lograr lo que sea.

A mis hermanos Jose y Leonardo por estar conmigo a una llamada de distancia para hacerme sentir acompañada y sacarme una sonrisa.

A Jose German Ojeda Cruz, mi compañero de vida, por todos los años de apoyo incondicional que me mantuvieron de pie. Por creer en mí aun cuando yo dudé. Este logro, así como lo ha sido el camino, es de ambos.

A menina, que ha estado conmigo desde el comienzo, y que su compañía es mi constante fuente de felicidad. Y a frijol e inquilino con mucho amor, por desvelarse por turnos para acompañarme en la escritura.

A mis amigas por el incondicional apoyo tanto en los momentos de alegría como en los difíciles, por acompañarme en este camino, desde esperarme afuera del laboratorio en una noche oscura y por hasta cruzar el oceano conmigo.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Congreso nacional Poster.

Andrea Bayona-Hernández, Susana Guerra, Irma Angélica Jiménez-Ramirez, Alma Laura Rodríguez-Piña, Wilma Aracely González Kantun, Enrique Castaño. "New method to identify IncRNA that interacts with lipids in plants" XX National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress, the 13th Joint Symposium between Mexico and the USA, and the 3rd ASPB Mexican Section Meeting to be held in Oaxaca, Mexico from 16 to 20 October 2023.

Articulo publicado

LIPRNAseq: a method to discover lipid interacting RNAs by sequencing. (2023) Molecular Biology Reports. https://doi.org/10.1007/s11033-023-08548-5

Andrea Bayona-Hernandez¹., Susana Guerra¹., Irma Angélica Jiménez-Ramirez¹., Martin Sztacho²., Pavel Hozak²., Luis Carlos Rodriguez-Zapata³., Alejandro Pereira-Santana^{4,5}., Enrique Castaño¹

INDICE

INTRODUCCIÓN		1
CAPITULO I		3
Antecedentes		3
1.1 RNA no codifican	te	3
1.2 Funciones de los	IncRNA	4
1.3 LncRNA asociado	os a cáncer	6
1.4 IncRNA asociado	s a la regulación del metabolismo lipídico	6
1.5 Interacción entre	RNA y lípidos.	7
1.6 IncRNA candidate	os para interactuar con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.	12
1.6.1 TERC		12
1.6.2 HANR		14
1.6.3 RP11-132A1.4		14
1.7 Fosfatidilinositol 4	1,5-bisfosfato (PIP ₂) en el núcleo	15
1.8 Fibrilarina		18
Justificación		20
HIPOTESIS		21
OBJETIVOS		21
Objetivo general		21
Objetivos específicos	;	21

	Estrategia Experimental	22
CA	PITULO II	23
	2.1 MATERIALES Y MÉTODOS	23
	Líneas celulares	23
	Cultivo de líneas celulares de mamíferos	23
	Extracción de RNA de la fracción nuclear de células HeLa	23
	Protocolo de unión a RNA por pull-down.	23
	Preparación de bibliotecas y secuenciación de IncRNA.	24
	Selección de IncRNA	25
	Obtención de cDNA de IncRNA	25
	Clonación de secuencias de IncRNA	25
	Transformación por choque térmico de células de E. coli	25
	Condiciones de amplificación de los IncRNA seleccionados	26
	Ensayo pull down para evaluar la interacción de los IncRNAs con PIP ₂	26
	Transfección transitoria de líneas celulares	27
	Generación de líneas celulares estables	27
	Detección de fibrilarina-SNAP con el sistema de inmunofluorescencia indirecta	27
	Ensayo FISH para localizar IncRNA	28
	Inmunolocalización	28
	Microscopía	29
CA	PITULO II	30

2.2 Resultados

2.2.1 Diseño de una estrategia experimental para la obtención de una base de da IncRNA que potencialmente interactúen con lípidos.		
2.2.2 Extracción de RNA nuclear de cultivo de células HeLa	31	
2.2.3 Datos obtenidos de la secuenciación de RNA unido a lípidos	31	
2.2.4 Selección de secuencias de RNA con unión a PIP ₂	32	
2.2.5 Clonación de IncRNA en vector pGEM T-easy	35	
2.2.6 Análisis de interacción de IncRNA con PIP ₂	36	
2.2.7 Análisis de FISH para la localización de HANR y PIP ₂ en líneas celulares	37	
2.2.8 Análisis de colocalización de PIP ₂ y fibrilarina.	40	
DISCUSIÓN	43	
CAPITULO III		
LIPRNAseq: a method to discover lipid interacting RNAs by sequencing	46	
CAPITULO IV		
Discusión, Conclusiones Generales y Perspectivas63		
Discusión	63	
Conclusiones generales	64	
Perspectivas	64	
Bibliografía		

Listado de Figuras

CAPITULO I

Figura 1.1 Representación de los diferentes tipos de origen de los IncRNA por su posición e genoma.	el el
Figura 1.2 Sitio de unión de LINK-A con PIP3.	8
Figura 1.3 Análisis de interacción de PRA (PI3P RNA aptamer) con lípidos.	9
Figura 1.4 Análisis de interacción del Incrna SNHG9 con PA y LAST1	10
Figura 1.5 Ensayo de interacción de PMAR72 con lípidos.	11
Figura 1.6 Ensayo de interacción del IncRNA LIPTER con lípidos.	12
Figura 1.7 Estructura secundaria del IncRNA TERC	13
Figura 1.8 Colocalización entre fibrillarina con etiqueta SNAP y PIP ₂ en células de mamíferos.	15
Figura 1.9 Colocalización de PIP ₂ con UBF y Fibrilarina.	16
Figura 1.10 Distribución de PIP ₂ en el núcleo utilizando anticuerpos específicos anti-PIP ₂ .	17
Figura1.11 Diagrama de la estrategia experimental para la búsqueda de IncRNA con interacción PIP ₂ .	con 22
CAPITULO II	
Figura 2.1 Representación esquemática del flujo de trabajo en el protocolo LIPID-Seq.	30
Figura 2.2 Extracción de RNA nuclear de cultivo de células HeLa.	31
Figura 2.3 Scatter plot de análisis KEGG de los RNA con mayor afinidad a PIP2 en relación al cor	ntrol. 32
Figura 2.4 Diagramas de análisis de las bases de datos de RNAseq.	33
Figura 2. 5 Gráfico de la cantidad de interacción entre RNA no codificante y PIP ₂ en relación a per control.	ərlas 34

Figura 2. 6 Alíneamiento de secuencias de IncRNA y fragmento de LINK-A responsable interacción con PIP3.	de la 35
Figura 2.7 Clonación de los IncRNA seleccionados.	36
Figura 2.8 Resultados de ensayo de pulldown de RNA.	37
Figura 2.9 Análisis de la secuencia de HANR para la búsqueda de un fragmento especifico pa diseño de una sonda de hibridación.	ara el 38
Figura 2.10 Análisis del ensayo de FISH para la localización de HANR y la colocalización cor en células U2OS.	ι ΡΙΡ ₂ 39
Figura 2.11 Fibrilarina WT con etiqueta de SNAP y etiqueta de GFP.	41
Figura 2. 12 Análisis de localización de fibrilarina y PIP ₂ .	42
CAPITULO III	
Figura 3.1 Schematic representation of workflow in LIPID-Seq protocol used.	53
Figura 3.2 The volcano plots show the differentially enriched genes between the Control seph beads and the PIP ₂ -coated ones.	arose 54
Figura 3.3 Venn diagram showing the distribution of genes present in the study with the intera of the control and lipid-coated beads.	action 55
Figura 3. 4 Heatmap generated with the RNA-seq data.	56
Figura suplementaria 1 S1. Image of HeLa Cells showing the nucleus and PIP_2 location.72	59
Figura suplementaria 2 S2. Procedure for the source of RNA	59
Figura suplementaria 3 S3. Venn diagram showing the distribution of genes present in the stud the interaction of the control and lipid-coated beads.	y with 60
Figura suplementaria 4 S4. Heatmap generated with the RNA-seq data.	61
Figura suplementaria 5 S5. Analysis of Gene Ontology of PIP ₂ VS CONTROL data.	61
Figura suplementaria 6 S6 RT-PCR of LINK A and two sequences from the analysis of pitaya	cells. 62

Abreviaturas

ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PIP	Fosfatidilinositol
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4, 5 bisfosfato
PI3P	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3, 4, 5 trisfosfato
IncRNA	long non-coding RNA
HANR	HCC associated long non-coding RNA
HCC	Hepatocellular carcinoma
ncRNA	non coding RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
ScaRNA	Small Cajal body-specific RNA
PA	Ácido fosfatídico
DFC	Dense fibrilar component

RESUMEN

Los IncRNA son moléculas de RNA mayores a 200 nucleótidos que carecen de la capacidad para codificar a proteínas pero que han mostrado tener funciones de alta importancia en diferentes procesos metabólicos y enfermedades como el cáncer. Estos interactúan, además de con proteínas y RNA, con lípidos. Se ha observado que estas interacciones poseen funciones en procesos biológicos importantes. Se sabe que existen IncRNAs como LINK-A, el cual tiene interacción con fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PIP3), y el IncRNA SNHG9 con ácido fosfatídico (PA) y que participan en funciones importantes en la progresion del cáncer y en la resistencia a tratamientos contra esta enfermedad. Otro ejemplo es el IncRNA LIPTER, que se ha descrito que interactua con ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilinositol 4 fosfato (PI4P), y está involucrado en la regulación de lipotoxicidad en el tejido cardiaco. En este estudio se abordó la búsqueda de IncRNAs que potencialmente interactuen con fosfatidilinositol-,4,5-bisfosfato (PIP₂), el cual es un fosfolípido de membrana que se ha reportado formar parte de estructuras nucleares, y además está involucrado en procesos celulares como la transcripción. En éste trabajo se desarrolló una técnica para la búsqueda de posibles candidatos, donde se extrajo RNA de la fracción nuclear de células HeLa y se realizó un pulldown con perlas recubiertas de lípidos y la posterior secuenciación del RNA unido a las perlas. Después de seleccionar IncRNAs candidatos resultantes de la secuenciación, se utilizaron ensayos de precipitación por afinidad con perlas recubiertas de lípidos (pulldown), asi como un análisis de localización en líneas celulares con ensayos de hibridación in situ (FISH). Los resultados obtenidos destacan al IncRNA HANR como uno de los candidatos que demostraron poseer unión a PIP₂, tanto de forma in vitro con los ensayos de afinidad, como en la detección en líneas celulares, en las que esta colocalización reside principalmente en el núcleo y se observa que existe colocalización con la señal correspondiente a PIP2.

ABSTRACT

IncRNAs are RNA transcrips longer than 200 nucleotides that lack the ability to encode proteins but have been shown to have highly important functions in different metabolic processes and diseases such as cancer. These interact, in addition to proteins and RNA, with lipids, an interaction that has functions in important biological processes. It is known that there are IncRNAs such as LINK-A which interacts with phosphatidylinositol-3,4,5trisphosphate (PIP3), and the IncRNA SNHG9 that interacts with phosphatidic acid (PA) and that have important functions in cancer progression and resistance to treatments against this disease. Another example is the IncRNA LIPTER, which has been described to interact with phosphatidic acid (PA) and phosphatidylinositol 4 phosphate (PI4P),), and is involved in the regulation of lipotoxicity in cardiac tissue.. Therefore, this work addresses the search for IncRNAs that potentially interact with phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2), which is a membrane phospholipid that has been reported to be part of nuclear structures and is also involved in cellular processes such as transcription. In this work, we developed a technique for the search of possible IncRNA candidates, where RNA was extracted from the nuclear fraction of HeLa cells and a pulldown was performed with lipid-coated beads and the subsequent sequencing of the RNA bound to those beads. After selecting the IncRNAs candidates resulting from the sequencing, affinity precipitation assays with lipidcoated beads (pulldown) were performed, as well as a localization analysis in cell lines with in situ hybridization assays (FISH). The results obtained highlight IncRNA HANR as one of the candidates that demonstrated binding to PIP2, both in vitro with the affinity assays, and in cell lines, in which this co-localization resides mainly in the nucleus, and it was observed that there was colocalization with the PIP2 signal

INTRODUCCIÓN

Los long-no-coding RNA (IncRNA) se caracterizan por estar compuestos de más de 200 nucleótidos y no contener marcos de lectura abierta, lo que potencialmente no codificarían para proteínas. Estos RNAs son importantes ya que participan en la estructura celular, en la formación de estructuras nucleares como las motas nucleares y *paraspeckles*, en el correcto ensamble de la telomerasa, y son esenciales para matener la estabilidad genómica, entre otros aspectos (Bridges et al., 2021; Q. Zhang et al., 2011). Los IncRNA han sido descritos dentro de diversos procesos celulares, pero también como marcadores y reguladores de la progresión de ciertos tipos de cáncer, siendo esos posibles blancos terapéuticos (C. Lin & Yang, 2018).

Las funciones regulatorias de los IncRNA también extienden su influencia en el metabolismo lipídico e impactan en el desarrollo de cáncer y en el desarrollo de otras enfermedades (Duan et al., 2023). Los mecanismos a través de los cuales se involucra son diversos, propio de lo IncRNA, como la de reguladores de la transcripción, a nivel postranscripcional, en la traducción o de forma postraduccional (Muret et al., 2019). Entre estos IncRNA se encuentra LASER y HOXC-AS1 que están involucrados en la regulación de la homeostasis del colesterol (Huang et al., 2016; C. Li et al., 2019).

Las interacciones que protagonizan este estudio son las de los IncRNA con lípidos, que a la fecha, aún es un campo en exploración pero con resultados interesantes para la comprensión de sus funciones en procesos biológicos. LINK-A que es de los primeros registros de IncRNA con interacción con fosfolipidos, este interactúa con fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃) y es observado en tejidos de cáncer de mama y mostró que tiene una función de regulación sobre la proteína AKT donde influye en la activación de la proteína y en la resistencia a fármacos inhibidores de AKT (A. Lin et al., 2017^a).

Por otro lado, otros ejemplos de estas interacciones IncRNA- lípidoson el IncRNA SNHG9 que interactúa con ácido fosfatidico (PA), formando un complejo con la proteína LAST1. Esto promueve la formación de gotas por separación de fases incidiendo en su disponibilidad para interactuar con proteínas como YAP (Yes Associated Protein), influyendo en su regulación, y en la progresion del cáncer (R. H. Li et al., 2021). Además de los IncRNA relacionados a la progresion de cáncer, se han identificado IncRNA que interactuan con lípidos para el correcto funcionamiento de las células, como el IncRNA

LIPTER que es indispensable para el transporte de gotas lipídicas y el adecuado funcionamiento de los cardiomiocitos; este interactua con ácido fosfatidico (PA) y fosfatidilinositol 4 fosfato (PI4P), que están en la superficie de las gotas lipídicas y a su vez con una proteína de transporte MYH10. La formación de este complejo se vuelve clave para el correcto transporte de las gotas lipídicas hacia la mitocodria y así evitar la lipotoxicidad (L. Han et al., 2023).

Este trabajo se centra en la búsqueda de IncRNAs que presenten interacción con PIP2 mediante el desarrollo de la técnica LIPRNAseq (Bayona-Hernandez et al., 2023). Con esta técnica se pudo obtener una base de datos RNAs con posible interacción con PIP2, de los cuales se tomaron candidatos para su análisis. De este estudio el IncRNA HANR mostró tener interacción con PIP2 en ensayos de precipitación por afinidad (pull-down) y en los análisis de localización en cultivos celulares; utilizando una sonda de hibridación para un análisis de FISH y comparandolo con las localización de PIP2 detectado con anticuerpos, observando sitios de colocalización que sugieren que HANR y PIP2 interaccionan en la célula.

CAPITULO I

Antecedentes

1.1 RNA no codificante

Los RNA no codificantes, como su nombre lo indica, no codifican a proteínas, estos se dividen principalmente en RNA cortos no codificantes y largos no codificantes, siendo los RNA cortos menores a 200 nucleótidos. Los ncRNA cortos son importantes en diversos procesos biológicos, como los snoRNA que son conocidas RNAs guía para la metilación y pseudouridilación de otros RNA en sitios específicos como el RNA ribosomal. Poseen sitios específicos llamadas cajas C/D y H/ACA, que son secuencias conservadas necesarias para su localización y el reclutamiento de proteínas (Amin et al., 2019; Holley & Topkara, 2011).

Los RNA largos no codificantes (IncRNA) se caracterizan por tener más de 200 nucleótidos, la mayor parte de ellos son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II), y pueden tener estructuras similares a RNA mensajeros como son una CAP y una cola de poli A. Gran parte de los IncRNA son estabilizados con la poliadenilación, o en caso de carecer de ella mediante estructuras secundarias cómo la formación de triple hélice en sus extremos 3', estas características del extremo 3' pueden facilitar la exportación nuclear (Bridges et al., 2021). Estos IncRNA se han reportado en diversos organismos incluyendo animales, plantas, levaduras, procariontes e incluso en algunos virus. No obstante, se encuentran poco conservados entre especies, a diferencia de otros tipos de RNA como los mensajeros, miRNA o snoRNA, pero gracias a la creciente caracterización de estos, se ha determinado que se pueden encontrar ortólogos en otras especies a través de análisis de sintenia (Bridges et al., 2021; Ma et al., 2013; X. Zhang et al., 2019; Li et al., 2014).

Los IncRNA se pueden clasificar en diversas categorias, tomando en cuenta por ejemplo el contexto de su ubicación génica, como por ejemplo localizan en regiones intergenicas, intronicas, y en potenciadores, o también tomando en cuenta si están en sentido o en antisentido. En la figura 1.1, se ejemplifica los diversos casos: dependiendo si su posición esta entre dos genes que codifican a proteínas, localizados entre intrones de un gen que codifica a proteínas, transcritos de una hebra sentido de regiones exonicas de genes codificantes a proteínas, transcritos desde la hebra antisentido del gen codificante y los que transcriben de regiones potenciadoras. Además, pueden clasificarse por como actuan sobre

las regiones de ADN si es cis, por su acción en genes de proximidad cercana, o en trans, si es que su acción la ejerce en genes distantes (Duan et al., 2023).



Figura 1.1 Representación de los diferentes tipos de origen de los IncRNA por su posición en el genoma. Imagen tomada de Duan et al., 2023

1.2 Funciones de los IncRNA

Los IncRNA tienen importancia en diversos procesos biológicos como en la organización de la cromatina, mantenimiento telomérico, regulación transcripcional y el postranscripcional, integridad estructural, apoptosis, en la separación de fases generalmente reclutando proteínas (Q. Guo et al., 2021a), respuestas a estrés, progresión del cáncer, entre otros (Bridges et al., 2021; Ma et al., 2013). Un ejemplo es el IncRNA telomeric repeat-containing RNAs (TERRA), que puede reclutar proteínas modificadoras de la cromatina TRF2 y PRC2 facilitando la formación de heterocromatina en tolómeros (Deng et al., 2009; Herman et al., 2022), además que TERRA puede plegarse en sitios G4 en la cromatina y modular la disponibilidad de diversos sitios a la proteína ATRX, evitando su unión a regiones subteloméricas (Tsai et al., 2022).

Los IncRNA puede tener diversas funciones dependiendo de su localización dentro de la célula, las funciones de estos en diferentes compartimentos subcelulares están influenciados por las interaccciones moleculares locales (Bridges et al., 2021). En el núcleo se han observado que interactúan con proteínas y otros tipos de RNA para contribuir con la arquitectura nuclear, y regular de forma epigenética la expresión de genes, por medio del reclutamiento de factores como proteínas, mediando modificaciones como metilaciones, entre otros. También pueden regular la expresión de genes actuando en cis, de diferentes

maneras: modulando directamente genes vecinos, uniendose de forma directa a partes del gen o del promotor, influenciando el reclutamiento de factores de transcripción específicos, o cuando cierta secuencia de DNA dentro del loci del IncRNA puede activar o reprimir la expresión de genes en su vecinidad. Para los IncRNA que muestran una regulación en trans, estos pueden modular la expresión de genes en regiones lejanas. Dentro de citoplasma los IncRNA pueden jugar papeles importantes como la regulación de la estabilidad de RNAm, secuestrando miRNAs, y en la modulación de las funciones o de la actividad de diversas proteínas, entre otros (Bridges et al., 2021; Nadhan et al., 2022).

Los IncRNA tienen la capacidad de interactuar con diversas moléculas, por lo que determinar tanto su localización como sus interactores, ayudaría a comprender sus funciones. Algunos de los IncRNA mejor caracterizados, como MALAT1 (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) y NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1), se acumulan en motas nucleares y paraspeckles, respectivamente. NEAT1 es un IncRNA indispensable para la formación de los parspeckles por las interacciones con proteínas RBP (RNA-Binding-Protein) con dominios de unión a RNA como NONO y otras proteínas formando estructuras de andamio conocidas como nido de pájaro. NEAT1 cuenta con dominios encargados de funciones específicas, como el dominio central descrito como NEAT 1_2 requerido para el ensamble de los paraspeckles (Bridges et al., 2021; Yamazaki et al., 2018).

La participación de los IncRNA ha sido descrito en diversos procesos celulares y también se han identificado como marcadores y reguladores de la progresión de ciertos tipos de cáncer, por lo que se consideran como posibles blancos terapéuticos. En los últimos años se ha vuelto una estrategia frecuente realizar perfiles de expresión IncRNA en diferentes tipos de cáncer, lo que ha permitido una mejor comprensión de los factores que intervienen en esta enfermedad (J. Li et al., 2019; C. Lin & Yang, 2018).

Existen otros IncRNA asociados a la senescencia, como es el caso del IncRNA TERC, que está directamente relacionado con el mantenimiento de la longitud de los telómeros. De este modo se relaciona con la prevención de la senescencia y el envejecimiento prematuros. Algunas de sus funciones es servir como base para la síntesis de repeticiones teloméricas y por formar una especie de andamio para el acoplamiento de proteínas como disquerina, TERT, nop10 y GAR que forman parte del complejo telomérico y que regulan la longitud de los telómeros (Grammatikakis et al., 2014; Y. Wang et al., 2016).

1.3 LncRNA asociados a cáncer

El cáncer es considerado como una condición patológica caracterizada por la proliferación descontrolada de las células y que causa una alteración en la homeostasis en los tejidos. Los IncRNA, a través de diversos estudios han mostrado desempeñar papeles importantes en las vías que modulan los diferentes tipos de cáncer, siendo considerados tanto oncogenes como supresores de tumores (Nadhan et al., 2022).

Un ejemplo es el IncRNA MALAT-1 que ha mostrado ser un regulador en procesos como la metástasis, inmunidad, progresión y resistencia a fármacos. Este IncRNA está implicado en diversas vías de señalización incluyendo PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa) /AKT (proteína cinasa B), WNT/β-catenina, factor nuclear kappa B (NF-κB), y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), asi como su presencia en diversos tipos de cáncer de tipo cervical, de prostata, gastrico, hepatico, entre otros (D. Xu et al., 2024).

Aunque se ha demostrado el importante papel de los IncRNA en distintos tipos de cáncer, su uso como blancos terapéuticos está aún en desarrollo y que requiere más estudios en comparación con los tratamientos tradicionales. Dentro de los primeros avances prometedores para su aplicación en pruebas clínicas, está el empleo de nanoparticulas lipídicas para la administración de tratamientos basados en IncRNA (S. Han et al., 2023).

1.4 IncRNA asociados a la regulación del metabolismo lipídico

Los IncRNA se encuentran involucrados en diversos procesos regulatorios, uno de ellos es la regulación del metabolismo lipídico, que a su vez impacta en el desarrollo de cáncer y de otras enfermedades (Duan et al., 2023). Numerosos estudios han abordado IncRNAs involucrados en el metabolismo lipídico, como Inc-HC, el IncLSTR y APOA1-AS, que están invoucrados en la homeostasis de triglicéridos, colesterol y ácidos biliares, entre otros relacionados, sea de forma directa e indirecta, con en el metabolismo lipídico (Muret et al., 2019).

Entre los hallazgos recientes el IncRNA LINC00473 además de estar involucrado en la progresión de diversos tipos de cáncer, es un regulador clave de la función de los adipocitos termogénicos humanos, LINC00473 originalmente se encuentra en el núcleo, pero es transportado al citoplasma, al elevarse los niveles de cAMP, observándose en la interfase entre las mitocondrias y adiposomas. Además, la relación de LINC00473 con proteínas

como PLIN1 y con la oxidación de lípidos impacta en el metabolismo energético de los adipocicitos (Tran et al., 2020).

En los hepatocitos el IncRNA LASER tiene un papel fundamental en la regulación en los niveles de colesterol. Mediante el atenuamiento por RNA de silenciamiento de LASER se observó que se reducen los niveles de colesterol intracelular y que la expresión de genes implicados en el metabolismo del colesterol también se ven afectados. Entre ellos se detectó la reducción en los niveles de las proteínas PCSK9 y HNF-1 α . LASER interactúa con la proteína LSD1 (lysine-specific demethylase 1) y reprime la desmetilación de histonas H3K4me en el promotor del gen HNF-1 α que es un activador transcripcional clave de la expresión del gen PCSK9, que a su vez ha reportado ser un regulador de la expresion de la proteína LDLR (LDL receptor). El aumento de PCSK9 induce la degradación intracelular de LDLR, lo que está relacionado con el aumento del LDL circulante (Ai et al., 2012; C. Li et al., 2019).

Otro IncRNA relacionado con la regulación del metabolismo lipídico es HOXC-AS1 (HOXC cluster antisense RNA 1). Este IncRNA está involucrado en la aterosclerosis, pues junto con la proteína HOXC6 disminuyen cuando se presenta ésta enfermedad. HOXC-AS1 promueve la expresión de HOXC6 a nivel de RNAm y proteína pues, cuando se sobreexpresa ocurre un aumento en los niveles de ambos. Por otro lado, la sobreexpresión de HOXC-AS1 disminuye la acumulación de colesterol inducida por Ox-LDL. Este hallazgo contribuye al entendimiento de los procesos de homeostasis del colesterol, así como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la aterosclerosis (Huang et al., 2016).

1.5 Interacción entre RNA y lípidos.

La primera descripción de la interacción de IncRNA con fosfolípidos se le atribuye al IncRNA LINK-A (RNA intergénico largo no codificante para la activación de la quinasa) que interactúa directa y específicamente con la proteína AKT y PIP₃. En este trabajo los IncRNA asociados a lípidos, se identificaron aislando las fracciones lipídicas en tejidos de pacientes con cáncer de mama (TNBC) (A. Lin et al., 2017A). Utilizando análisis de fatblot se identificó entre los aislados al IncRNA LINCO1139 (que fue renombrado como LINK-A). Este IncRNA mostró una mayor interacción con con PIP3 y PC (fosfatidilcolina) y también con PIP₂ en menor medida. LINK-A posee una región de unión a PIP₃, así como, a PIP₂ (figura 1.2 a). De igual forma, detallan la composición de la horquilla de IncRNA LINK-A a partir de la que se realizaron mutantes para determinar los sitios indispensable para la interacción con PIP3

y PIP₂. Se observó que la región entre los 1080 y 1140 participa en la unión a PIP3 (fig. 1.2a), señalando en rojo los 2 nt (C-C) indispensables para esta interacción (fig. 1.2b). En el panel c) se muestran las mutantes en esta región que conservan, o incluso superan la cantidad de interacción con PIP₃ de la secuencia original. Además de la interacción con lípidos, LINK-A interactúa con el dominio PH de la proteína AKT, y se observó que, en presencia de LINK-A, aumentó la interacción pre-existente entre AKT y PIP3. Esta asociación sugiere la formación de un complejo que promueve un cambio conformacional en AKT, haciendo que los sitios de fosforilación se encuentren más accesibles a cinasas. Este IncRNA se expresa altamente en cáncer de mama, lo que se ha observado se relaciona con una resistencia a los inhibidores de AKT, lo cual tiene importancia en el ámbito clínico y en la búsqueda de marcadores y tratamientos para esta enfermedad (A. Lin et al., 2017a).



Figura 1.2 Sitio de unión de LINK-A con PIP3. A) Se muestra la representación de las regiones encargadas de la interacción con fosfatidilcolina, PI(3, 4, 5)P₃ y PI(4, 5)P₂. B) Modelo de la horquilla en la que interacciona con PIP3 y IncLINK-A donde se señala en rojo los 2 nucleotidos indispensables para su interacción. C) Mutantes que mostraron una señal de unión similar o mayor a la original (A. Lin et al., 2017a).

Otro ejemplo de interacción entre RNA y fosfoinosítidos es el aptámero PRA (PI3P RNA aptamer) que interactúa de forma específica con PI3P. Utilizando un método de selección descrito como SELEX, los autores realizaron una búsqueda de secuencias que se unieran de forma específica a PI3P, obteniendo una secuencia de 40 nucleótidos con esta característica (Donia et al., 2019). A partir de la secuencia de LINK-A se realizó un alíneamiento con la secuencia del aptámero en la búsqueda de sitios conservados. Una vez identificados, estos sitios fueron usados en el diseño de mutaciones puntuales para determinar los nucleótidos responsables de la interacción con PI3P. Se realizó un análisis de interacción del aptámero con tiras con diferentes lípidos (figura 1.3). En esta figura se observa una descripción de los lípidos fijos en una tira (a), el ensayo con este aptámero (b)

y el análisis control con un RNA de secuencia aleatoria (a). Adicional al potencial del aptámero como herramienta para localización de PI3P, se observó que la sobreexpresion de este RNA resultó en la inhibición de la autofagia. PI3P se encuentra presente en endosomas y estructuras autofagicas. Esto hace que el aptámero PRA sea una posible herramienta para el desarrollo de fármacos orientados al control de la autofagia (Donia et al., 2019).



Figura 1. 3 Análisis de interacción de PRA (PI3P RNA aptamer) con lípidos. a) Representación esquemática de los lípidos utilizados en la tira, b) resultado de interacción del aptámero y los lípidos de la membrana de nitrocelulosa y c) el panel derecho muestra el resultado de interacción con una RNA control sin unión con lípidos (Donia et al., 2019).

Por otro lado, el IncRNA SNHG9 mostró tener interacción con ácido fosfatidico (PA) así como con la proteína LAST1. Esta interacción promueve un mecanismo de regulación en la formación de tumores y en la proliferación de cáncer de mama (R. H. Li et al., 2021). Basándose en un análisis in sílico de la estructura secundaria de SNHG9, se definieron secciones pertenecientes a horquillas y se eliminaron para encontrar la región responsable de la interacción, las secciones eliminadas corresponden a las horquillas que se nombraron como D1 (deleción 7-25 nt), D2 (deleción 30-43 nt), D3 (deleción 60-177 nt) y D4 (deleción 204-231 nt) (figura 1.4 a). Un un ensayo de fat-blot con el producto de la transcripción in vitro de las diferentes mutantes y de SNHG9 de longitud completa, determinó que D4 es la responsable de la interacción con PA (fig. 1.4b). En la figura 1.4c se observa que la proteína LAST1 interactúa por si misma con PA, aunque la incubación con el transcrito in vitro de

SNHG9 favorece la interacción lípido-proteína (fig. 1.4 d). Más aún, las horquillas D1 y D2 parecen ser las responsables de la interacción con LAST1, mientras que D4 participa en la interacción con PA. Esta interacción mostró promover la separación de fases de LAST1 y regular la actividad cinasa de esta proteína, y es un posible método de regulación en cáncer. El modelo propuesto se basa en que debido a la formación de separación de fases de LAST1, ésta se encuentra disponible en menor medida en el citoplasma, lo que limita su capacidad para fosforilar a la proteína YAP (Yes Associated Protein) (R. H. Li et al., 2021)



Figura 2.4 Análisis de interacción del Incrna SNHG9 con PA y LAST1. A) Estructura secundaria de SNHG9 con las diferentes secciones analizadas marcadas en una elipse punteada. B) Fatblot realizado con SNHG9 de longitud completa y sus mutantes por eliminación. C) dot blot de la proteína LAST1 y PA. D) Fat blot con membranas preincubadas sin y con SNHG9 y posteriormente incubadas con LAST1 y detectada por anticuerpos contra GST (R. H. Li et al., 2021).

Un estudio utilizando el sistema APEX-seq (peroxidase-mediated protein biotinylation combined with sequencing) aplicado a la búsqueda de RNAs asociados a la membrana plasmática (maAPEX-seq) permitió identificar 75 RNAs candidatos asociados a la memebrana. Entre los más notables se encontró al IncRNA AL121772.1 (PMAR72). Para

los análisis de interacción con lípidos, se realizó un fat blot con el IncRNA PMAR72 transcrito in vitro biotinilado. En la figura 1.5a se observa que PMAR72 mostró una señal de interacción a lípidos, principalmente a SM (esfingomielina), y también a colesterol y PIP3. Por otro lado en los análisis de hibridación de PMAR72 (figura 1.5b) con sondas marcadas con 5'FAM (verde) y DilC₁₈ (rojo), señal asociada a la membrana plasmática, mostrando que colocaliza con áreas específicas de la membrana (Wu et al., 2021).



Figura 1. 5 Ensayo de interacción de PMAR72 con lípidos. a) la izquierda se observa el ensayo de interacción lípidos y RNA de levaduras y a la derecha el RNA PMAR72 que muestra interacción con esfingomielina y otros lípidos como colesterol y PI3P. b) Análisis de hibridación con sondas (verde) y tinción de DilC₁₈ (rojo) (Wu et al., 2021).

El IncRNA LIPTER fue recientemente descrito como un componente esencial en el correcto funcionamiento de los cardiomiocitos. Este efecto se centra en los LD (liquid droplets), sintetizados en el reticulo endoplásmico, que muestran un núcleo lipídico neutro y está rodeado por una monocapa de fosfolípidos. Este IncRNA se encarga de facilitar el transporte de LD, gracias a la interacción con la proteína MYH10. Este complejo es posible gracias a la afinidad que tiene LIPTER por las moléculas de PI4P y PA localizadas en la superficie de estos, así como a la proteína MYH10. Este proceso es esencial para el correcto funcionamiento del tejido cardiaco, reduciendo la probabilidad de cardiomiopatías, pues el transporte adecuando de gotas lipídicas reduce la posibilidad de lipotoxicidad. Un análisis de fat blot (figura 1.6) mostró la interacción selectiva de LIPTER con PA y PI4P (L. Han et al., 2023).



Figura 1.6 Ensayo de interacción del IncRNA LIPTER con lípidos. Se muestra un análisis de fatblot ARN-lípidos de la interacción de LIPTER y su secuencia antisentido AS-LIPTER usando una tira con diferentes lípidos (L. Han et al., 2023).

También, se han realizado análisis de la interacción entre lípidos de membrana y RNA, donde se observó que estos lípidos puden servir como un tipo de plataforma para la regulación de RNA. Se ha observado que as interacciones lípidos-RNA dependen del contenido nucleotidico, emparejamiento de bases y el largo de estos. Esto provee una forma de utilizarlos para modular la afinidad a ciertas membranas. Utilizando membranas en gel de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y diferentes RNA sintéticos se observó que los de mayor contenido de guaninas mostraron una afinidad mayor, a membranas gel del lípidos. Aunque estas son poco comunes en la naturaleza, pueden tener otro tipo de aplicaciones (Czerniak & Saenz, 2022). La interacción entre los RNA y los fosfolípidos puede deberse a la estructura tridimensional del RNA. El análisis estructural de las secuencias de RNA que interaccionan con lípidos sugieren que las estructuras en forma de bucle pueden ser importantes para dicha unión (C. Lin & Yang, 2018).

1.6 IncRNA candidatos para interactuar con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

Existe diversos IncRNA candidatos para interactuar con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), estos fueron obtenidos de los análisis de secuenciación con la técnica LIPRNAseq (Bayona-Hernandez et al., 2023) y algunos de ellos se describen a continuación

1.6.1 TERC

El IncRNA TERC es un componente del complejo de la telomerasa, que corresponde a una transcriptasa inversa encargada de la adición de repeticiones de ADN en los telómeros, desempeñando así, un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad del

genoma. En este complejo ribonucleoproteico, el IncRNA TERC proporciona una plantilla para la síntesis de repeticiones de ADN en los telomeros (Y. Wang et al., 2016; Q. Zhang et al., 2011).

Recientes estudios sugieren que este IncRNA, además de estar involucrado como templado en el complejo de la telomerasa, también es un marcador de enfermedades, como la diskeratosis congenita. Además, se sugiere que está involucrado en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y la insuficiencia cardíaca. El aumento de este IncRNA se ha reportado en diferentes tipos de cáncer (T. Cao et al., 2018; Y. Cao et al., 2008). En la figura 1.7 se muestra la región H/ACA que es necesaria para el correcto tráfico, estabilidad y la conformación catalíticamente activa (resaltado en verde), la región templado para el complejo de la telomerasa o dominio pseudoknot (resaltado en morado), dominio de interacción con proteínas del complejo telomerico (marcado en rojo) y también posee otras regiones de las cuales se desconoce la función (gris) (Ivanyi-Nagy et al., 2018).



Figura 1.7 Estructura secundaria del IncRNA TERC. En la figura se destacan los dominios principales de acuerdo a su función (Ivanyi-Nagy et al., 2018).

1.6.2 HANR

El IncRNA RPL13AP20 también conocido como HANR (HCC associated long non-coding RNA) esta ampliamente relacionado a procesos de proliferación de células cáncerigenas y la quimioresistencia en células cancerosas de hígado (HCC). Este IncRNA se encuentra en mayor cantidad en pacientes con baja predicción de supervivencia (Xiao et al., 2018). HANR interactúa con diversas moléculas, como la proteína GSKIP, regulando la producción de p-GSK3β y aumentando la proliferación de células de HCC. También interacciona con los microRNA miRNA-335, regulando negativamente su expresión en pacientes de glioma y con el miRNA-140-5p, relacionado a NSCLC (non-small cell lung cáncer) (S.-J. LI et al., 2020; W.-J. WA NG et al., 2020; Xiao et al., 2018).

Recientemente se ha descrito que el IncRNA HANR tiene un papel en la regulación del metabolismo de glucosa en células de cáncer de mama triple negativo (TNBC). En estas células se encontron altos niveles de HANR en pacientes con TNBC, principalmente en aquellos con tumores de grados avanzados y metástasis de huesos. Se observó mediante el silenciamiento de HANR en TNBC que la proliferación celular disminuye, así como la progresión del ciclo celular y una apoptosis mejorada (G. Han et al., 2024). Utilizando un análisis de pulldown se identificaron posibles candidatos de unión para HANR siendo HK2 el más sobresaliente y confirmandolo con ensayos de inmunoprecipitación contra HK2 de un extracto de células de TNBC y la unión de HK2 a HANR se determinó además mediante qPCR, la importancia de esta interacción recae en la importancia de HK2 en la glicolisis pero más estudios son requeridos para elucidar por completo este mecanismo de regulación(G. Han et al., 2024)

1.6.3 RP11-132A1.4

El RNA denominado RP11-132A1.4, también conocido como EMSLR (Homo sapiens E2F1 RNAm stabilizing IncRNA), es un IncRNA que aumenta su expresión en células de cáncer de pulmón LUAD (lung adenocarcinoma) y de carcinoma de células escamosas de pulmón LUSC (lung squamous cell carcinoma). Participa en la regulación del IncRNA LncPRESS1, ayudado por la metiltransferasa Dnmt1. A su vez es regulado por las proteínas E2F1 y c-MYC las cuales favorecen su expresión (Priyanka et al., 2022; C. Wang et al., 2019).

1.7 Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en el núcleo

Los lípidos no sólo actúan como elementos estructurales en las membranas o como participantes en el metabolismo energetico, sino que también, tienen un rol importante en la señalización, y en diversas modificaciones postranscripcionales, entre otras funciones (Duan et al., 2023). La presencia de fosfoinosítidos en el núcleo se encuentra principalmente en las motas nucleares, el nucléolo, los espacios entre la heterocromatina y en los espacios intercromatinicos, así como en las isletas lipídicas nucleares (Castano et al., 2019; Sztacho et al., 2018).

Los fosfoinosítidos (PIPs) son fosfolípidos a los que se les atribuyen diversas funciones como, ser precursores de segundos mensajeros o en la formación de complejos de proteínas. También tienen una gran importancia en la arquitectura de las membranas celulares, la dinámica del citoesqueleto, la remodelación de la cromatina, y en la interacción con proteínas como NM1, facilitando así la formación de complejos de la RNA Pol II, entre otras funciones (Sztacho et al., 2018). PIP₂ colocaliza, con RNA y otras moléculas, como las proteínas UBF y fibrilarina, que se encuentran involucradas en el proceso de replicación. PIP₂ se localiza principalmente en el componente fibrilar denso, como se observa en la figura 1.8 que muestra la localización de PIP₂ en relación con la localización de fibrilarina.



Figura 1.8 Colocalización entre fibrillarina con etiqueta SNAP y PIP₂ **en células de mamíferos.** En la figura se muestra a Fibrilarina en verde y PIP₂ en color rojo. (Guillen-Chable et al., 2020).

En el trabajo de Sobol y colaboradores (2013) se analizó el efecto que ejercía la inhibición de la transcripción sobre la colocalización de PIP₂ y de la fibrilarina en la región del componente fibrilar denso de los nucléolos. Para esto, la transcripción se inhibió, por adición de actinomicina D (AMD) y 5,6-dicloro-beta-D-ribofuranosilbencimidazol (DRB), que actúan sobre la RNApol I y RNApol II, respectivamente. En la figura 1.9 b se muestra que la inhibición de la actividad de Pol I, ocasiona que la colocalización de PIP₂/fibrilarina se pierda, como se ve en la intensidad de la señal registrada. La figura 1.9 c muestra que la adición de DRB, que inhibe Pol II cambió la colocalización de PIP₂/fibrillarina, que se pierde. La figura 1.9 a muestra las interacciones sin tratamientos, a manera de control (Sobol et al., 2013).



Figura 1.9 Colocalización de PIP² **con UBF y Fibrilarina**. (A) Los estudios de inmunocolocalización muestran complejos de PIP² con Pol I, UBF y fibrillarina (B) La inhibición de la transcripción de Pol I por AMD provocó que la colocalización de PIP²/fibrillarina fuera interrumpida. (C) La inhibición de la transcripción de Pol II por DRB provocó la perdida de la colocalización de PIP²/fibrillarina (Sobol et al., 2013).

En el núcleo se encuentran presentes estructuras descritas como isletas lipídicas nucleares (NLI) La superficie de éstas está formada en su mayoría por fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂). Se realizó un mapeo de la localización nuclear de PIP₂, utilizando anticuerpos específicos y con el uso de microscopia de iluminación de súper resolución estructurada (SIM). Esto llevó a asignar una distribución específica de 4%, 28% y 68% en nucléolos, nucleoplasma y en las manchas nucleares del espacio nuclear, respectivamente (figura 1. 10). En la mayoría de los NLI se presenta RNA en la periferia, de acuerdo con eso, lo que sugiere que se requiere de RNA para su integridad. De hecho, el tratamiento con RNAsa también rompe las estructuras de NLI y la mayoría de estas estructuras colocalizan con RNA (Sobol et al., 2018).

Se ha demostrado que el RNA es necesario para la localización de PIP₂ en manchas nucleares. Esto sugiere que la interacción con el complejo RNA proteína podría estabilizar PIP₂, en ausencia de estructuras membranosas intranucleares. (Yildirim et al., 2013)



Figura 1.10 Distribución de PIP₂ en el núcleo mediante anticuerpos específicos. Imágenes realizadas por microscopia de iluminación de súper resolución estructurada (SIM). Se determinó que

la distribución es del 4%, 28%, 68% en nucléolo (azul), en nucleoplasma (rojo) y en las manchas nucleares (amarillo), respectivamente (Sobol et al., 2018).

1.8 Fibrilarina

La fibrilarina es una proteína nucleolar esencial para la vida y que se encuentra altamente conservada en diversos organismos eucariotes. Esta metil transferasa está involucrada en una gran cantidad de procesos celulares, y entre sus principales funciones, se encuentran la metilación y el procesamiento de pre-rRNA, durante el proceso de biogénesis ribosomal, la metilación de la histona H2A y su participación en el proceso de progresión de algunos tipos de virus. Esta proteína esta involucrada en procesos celulares como la homeostasis celular y el análisis de regiones conservadas proporciona información sobre funciones conservadas a través de la evolución (Rodriguez-Corona et al., 2015).

Fibrilarina esta compuesta de 4 dominios principales que son: el dominio GAR que es una región rica en glicinas y argininas a la que se le atribuye la localización nucleolar, una región espaciadora, un dominio metil transferasa y un dominio alfa hélice (Rodriguez-Corona et al., 2015). Se han realizado análisis de esta proteína entre diferentes especies, y esta ha mostrado estar altamente conservada en relación con su estructura a través de los clados Archaea y Eukarya, especialmente el dominio metil transferasa. A diferencia del dominio GAR que se encuentra ausente en las arqueas, lo que sugiere que este puede haber sido adquirido en etapas tempranas en la evolución de las eucariotas (Pereira-Santana et al., 2020).

Esta proteína también interactúa con RNA no codificantes como U3, un snoRNA, que funcionan como andamio para la formación de complejos junto con otras proteínas. Se sugiere que la fibrilarina es esencial para llevar acabo la mayor parte de las actividades postranscripcionales en la síntesis ribosomal, el procesamiento del pre rRNA, modificaciones en el rRNA y el ensamblaje ribosomal (Dennis et al., 2001; Lechertier et al., 2009).

Se ha establecido que existen interacciones entre fibrilarina y varios fosfolípidos como ácido fosfatídico y PIP₂, dichas interacción regulan funciones de esta proteína, como su actividad ribonucleasa (Guillen-Chable et al., 2020). La relación entre PIP₂ y fibrilarina se ha observado en su colocalización en líneas celulares, localizandose principalmente en los nucleolos (Hoboth et al., 2021), colocalización que a su vez es dependiente de la producción

de rRNA (Sobol et al., 2013). Las estructuras nucleolares donde se localiza fibrilarina está principalmente en el componente fibrilar denso (DFC) rodeando a PIP₂ (Guillen-Chable et al., 2020), También se ha demostrado la interacción directa entre estos en análisis in vitro, y que la adición de PIP₂ tiene influencia en la unión entre el snRNA U6 y fibrilarina, donde en un análisis de movilidad en gel, se observó que el patrón de migración del complejo U6/ fibrilarina cambió en presencia de PIP₂ (Yildirim et al., 2013). También ha sido descrito que la presencia de ácido fosfatídico modula la actividad del complejo de fibrilarina (Fibrilarina, Nop58, Nop56, 15.5K) como ribonucleasa, a su vez que la presencia de PIP₂ inhibe la actividad ribonucleasa del complejo de fibrilarina, pero de manera dependiente de la concentración (Guillen-Chable et al., 2020).

Los IncRNA tienen importancia en multiples procesos celulares y están involucrados como señalizadores o reguladores en la homeostasis y estructuras de la célula, asi como su participación en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. El estudio de sus interacciones con otras biomoléculas puede ayudar a comprender una variedad de procesos celulares más amplio, como la interaccón con lipidos como el PIP₂, que es aún un campo poco explorado. Éste fosfoinosítido, es uno de lo más abundantes dentro del núcleo celular y participa en procesos como la replicación interactuando con complejos de proteínas como fibrilarina y con RNA. El análisis de IncRNAs dentro del núcleo que interactúen con PIP₂ es un área que aún necesita ser investigada, por lo que este trabajo se enfoca en la búsqueda de posibles candidatos, en este trabajo también se pretende hacer uso de la fibrilarina como posible parte de la formación de complejos entre IncRNA-PIP₂ y de la colocalización previamente reportada con PIP₂. Debido a antecedentes que sugieren una participación de PIP₂ en la regulación de la interacción de fibrilarina y RNA no codificante como en el caso de U6.

Justificación

Los IncRNAs son importantes reguladores en diversos procesos celulares, arquitectura celular, regulación transcripcional y postranscripcional, organización de la cromatina, entre otros. Los estudios de las interacciones de IncRNA con otras biomoléculas han sido principalmente con proteínas, DNA y otros RNA, pero la importancia de la interacción con fosfolipidos aún es un campo en exploración. El análisis de IncRNA que interaccionan con lípidos puede ofrecer avances en la comprensión de diversos procesos celulares, así como mecanismos en la regulación de una variedad de rutas metabólicas y su influencia en enfermedades como la arteroclerosis y en diversos tipos de cáncer.

Previamente se han desarrollado herramientas en las búsqueda de RNAs con características específicas, a su vez utilizando la selección por afinidad y la secuenciación. En estre trabajo se buscan posibles candidatos para la interacción con PIP₂ en el núcleo, lo que es un tema poco abordado a la fecha, pero que puede ser de alta importancia para la comprensión de procesos regulatorios en las células que han pasado desapercibidos por el desconocimiento de la interacción entre estas moléculas.
HIPOTESIS

LncRNAs interaccionan de forma directa con fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) en el núcleo de líneas celulares humanas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los IncRNAs que interactúan directamente con fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) y su localización en las células.

Objetivos específicos

-Identificar los IncRNAs que interaccionan con PIP₂ en humanos.

-Determinar la localización de IncRNA seleccionados en líneas celulares humanas y su colocalización con PIP₂

-Analizar la localización de estos IncRNAs y su relación con PIP₂ y fibrilarina utilizando cultivos celulares.

Estrategia Experimental

En la figura 1.11 se muestra un diagrama de la estrategia experimental utilizada en este trabajo:

- Desarrollo de una técnica de selección de RNAs con interacción con PIP₂
- Análisis de secuencias en las bases de datos obtenidas, para la búsqueda de IncRNA candidatos.
- Amplificación y clonación de secuencias en un vector pGEM.
- Análisis de interacción de IncRNA con PIP₂, usando la técnica de pulldown.
- Diseño de sondas específicas marcadas, para ensayos de FISH
- Análisis de colocalización entre PIP₂ y IncRNA en líneas celulares.



Figura 1.11 Diagrama de la estrategia experimental para la búsqueda de IncRNA con interacción con PIP₂.

CAPITULO II

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizaron líneas celulares HeLa y UO2S de osteosarcoma (Yildirim et al., 2013).

Cultivo de líneas celulares de mamíferos

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) enriquecido con 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO₂. Para su mantenimiento se tripsinizaron para resembrarlas en cajas de Petri y se cambiaron de plato una vez alcanzado el 80 - 90% de confluencia. Para los ensayos de microscopia en células que serían transfectadas, se colocaron cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm en el fondo de las caja petri para permitir que las células crezcan sobre ellos en una monocapa.

Extracción de RNA de la fracción nuclear de células HeLa

El RNA nuclear se extrajo de un cultivo de 500 ml de células HeLa con confluencia al 70%. Las células se centrifugaron a 300 x g a 4 °C durante 1 min para recolectar las células, luego se lavaron tres veces con PBS a 4 °C. Después de retirar el PBS, se agregaron 3 ml del buffer de lisis (Tris PH7 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl2 2 mM, NP40 al 0,5%, RNAse Block (Agilent Technologies) 1 en 100 μ l) a 4 °C, se resuspendió y se centrifugó a 1000 x g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante correspondiente a la fracción citoplasmática y el sedimento se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis y se centrifugó a 1000 x g a 4 °C durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante, se agregaron 1.2 ml de buffer de lisis al sedimento y se transfirieron a un tubo limpio, y se agregaron 2.4 ml de ribozol y 2,4 ml de cloroformo, seguido de vórtex y centrifugación durante 5 minutos a 12 000 x g. Solo se tomó la parte superior y se precipitó con 0.7 ml de isopropanol por 1 ml del volumen resultante y luego se centrifugó durante 15 min a 12 000 x g a 4 °C. La eliminación del disolvente y el sedimento se lavaron en etanol al 80 % y finalmente se secaron al aire y se resuspendieron en agua libre de RNAasa.

Protocolo de unión a RNA por pull-down.

Para el análisis de unión de RNA-PIP₂, se realizaron ensayos de pull-down utilizando perlas de agarosa recubiertas con lípidos y perlas de control sin ellos. Para el ensayo, se realizó

un paso de limpieza previa, se agregaron 200 µg de RNA en 500 µl de buffer de unión (1mM MgCl2, 150 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7, RNAse block), a 100 µl de perlas de control con 1 µl de RNAse Block (Agilent Technologies) durante 5 minutos de incubación. Luego, se lavaron previamente 100 µl de perlas recubiertas de lípidos con PBS RNAse Free y se cambiaron en tubos limpios, y el RNA pre-limpiado se añadió a las perlas limpias y se incubó durante 30 minutos en rotación en una cámara fría; este procedimiento se realizó para cada tipo de lípido y perlas de control sin lípidos. Los tubos Eppendorf se centrifugaron a 100 x g durante 1 minuto para eliminar el RNA no unido, se lavaron tres veces con 500 de PBS RNAse Free y se repitió el proceso de centrifugación para evitar tomar las perlas y cambiar los tubos durante cada lavado. Para la elusión del RNA unido, se agregaron 100 µl de PBS RNAse Free, luego se agregaron 200 µl de Ribozol y 200 µl de cloroformo, se mezclaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 x g. Finalmente se tomó la parte superior y se precipitó con 700 µl de isopropanol por cada 1 ml del volumen resultante, y la pastilla se lavó con etanol y se almacenó a -80 °C. La extracción de RNA resultante se utilizó para el proceso de secuenciación. A todas las soluciones declaradas libres de RNAasa se les añadió RNAse Block (Agilent Technologies) 1 µl por ml. El reactivo Ribozol™ es una solución de fenol monofásico que se utiliza en el protocolo de extracción de RNA. Las perlas utilizadas para los pull-downs son perlas de control #P-B000, perlas recubiertas de PI(4,5)P2 #P-B045a (también descritas como PIP₂) de Echelon Biosciences Inc. Las perlas están compuestas de agarosa, las perlas de control son perlas de agarosa bloqueadas utilizadas como control negativo, las perlas recubiertas de lípidos están compuestas de agarosa con 10 nanomoles del lípido por 1 ml de perlas con un tamaño de 45 a 165 micrómetros de diámetro.

Preparación de bibliotecas y secuenciación de IncRNA.

Para la construcción de la biblioteca, se eliminó el RNA ribosómico utilizando el kit NEB Ribo-ZeroTM, se fragmentó el RNA para someter a transcripción inversa y síntesis de cDNA, y se prepararon bibliotecas específicas de cadena. Las muestras se secuenciaron utilizando la plataforma Illumina Novaseq 6000 con una longitud de lectura de 150 pb de extremo emparejado. Después del control de calidad, las lecturas se mapearon con el software STAR (Dobin et al., 2013) contra el genoma de referencia Homo sapiens GRCh37/hg19. Se utilizó el software RSEM (B. Li & Dewey, 2011) para realizar recuentos de genes para cada muestra. Para el análisis bioinformatico, se utilizó el método de normalización del recuento de lecturas TMM (media recortada de valores M). El análisis de

enriquecimiento diferencial se realizó utilizando el paquete EdgeR R (Robinson et al., 2009). Se utilizó log2 (FoldChange)> 1 y padj <0,005 como estándares de detección de genes enriquecidos diferencialmente en las secuencias iniciales pero se ajustó a log2 (FoldChange)> 1 y padj <0,001 para realizar los análisis y graficos de Heatmap, diagramas de Venn y diagramas de volcano de secuencias enriquecidas. La secuenciación y el análisis bioinformático fueron realizados para IncRNA-seq por Novogene Company.

Selección de IncRNA

Las bases de datos que se obtuvieron de la secuenciación fueron filtradas para obtener una selección con los RNA no codificantes, tamaño menor a 2000 nucleotidos y aquellas que tuvieran bibliografía previamente reportada.

Los datos sin procesar de ncRNA-Seq de las bibliotecas obtenidas se depositaron en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Con los codigos de accesion BioProject: PRJNA937906. BioSamples: SAMN33421422-Hs_CONTROL, SAMN33421423-Hs_PIP2.

Obtención de cDNA de IncRNA

La obtención del cDNA se realizó con el Kit transcriptasa reversa (RT) Superscript III de Invitrogen utilizando cebadores específicos para cada IncRNA.

Clonación de secuencias de IncRNA

Las secuencias amplificadas correspondientes a los IncRNAs se insertaron en el vector de clonación pGEM®-T Easy de Promega.

Transformación por choque térmico de células de E. coli

Para la transformación de células de *Escherichia coli (E. coli*) DH5 α se utilizaron células competentes obtenidas por el método de cloruro de calcio. Para esto se utilizó una relación 1:100 plásmido/células competentes adicionando, 200 ng del plásmido en 200 µL de células competentes, se incubaron a 4 °C por 30 minutos y después se colocaron a 42°C por 90 segundos y se regresó a 4 °C. Se adicionó 800 µL de LB y se agitó por 45 minutos a 37 °C a 200 rpm y se plaquearon 200 µL en cajas con LB medio LB sólido con el antibiótico de selección. Se incubó por 12 horas a 37°C y se seleccionó una la colonia de las que crecieron y se dejó en crecimiento para extracción de plásmido.

Condiciones de amplificación de los IncRNA seleccionados

Los primers utilizados para amplificar y clonar las secuencias correspondientes a los IncRNA seleccionados son las siguientes:

TERC:FwTERC_5'-GGGTTGCGGAGGGTGGGCCT-3' RvTERC_5'-GCATGTGTGAGCCGAGTCCTG-3';

HANR:FwHANR_5'-CTTTCCCAAGCGGCTGCCGA-3',RvHANR_5'-TGAGGAATTAACAGTCTTTATTGGGCT-3';

EMSLR: FwEMSLR_5'-ATGCAGCCGGCACGCACCTC-3', RvEMSLR_ 5'-CCCAGCAGATTTTGTTCACCTGAA-3'

Las condiciones de amplificacion fueron las que se encuentran descritas en la tabla 1, con las Tm correspondientes para los IncRNA HANR, TERC, EMSLR (63 °C, 65.4 °C, 65 °C, respectivamente).

	Temperatura	Tiempo			
Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos			
	98°C	10 segundos			
28 Ciclos	Tm	30 segundos			
	72°C	1 minutos			
Extensión final	72°C	10 minutos			
Hold	4°C	-			

Tabla 1 .Condiciones para la reacción de PCR para la amplificacion de secuencias de IncRNA.

Ensayo pull down para evaluar la interacción de los IncRNAs con PIP₂

Para determinar la unión del IncRNA a $PI(4,5)P_2$, se llevó a cabo un ensayo de pull-down. Se utilizaron perlas de agarosa recubiertas con $PI(4,5)P_2$, compuestas de agarosa con 10 nanomoles de $PI(4,5)P_2$ unido por mI de perlas. Este procedimiento se realizó con perlas sin lipidos a modo de control y con perlas recubiertas de PIP_2 . Se utilizaron 20 µl de perlas de agarosa en un tubo limpio libre de nucleasas y se lavó con agua libre de nucleasas y posteriormente con 100 µl de buffer de unión (1mM MgCl2, 150 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7, RNAse block), se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, y se agregó 100 µl de buffer de unión con 1µg de RNA, incubando durante 30 minutos en hielo, se centrifugó y se descartó el sobrenadante, por último se realizaron 3 lavados con buffer de unión cambiando el tubo en cada lavado, este RNA recuperado se usó como templado para el análisis de RT-PCR con cebadores específicos.

Transfección transitoria de líneas celulares

Las líneas celulares U2OS, previamente tripsinizadas, fueron colocadas en cajas de Petri con cubreobjetos redondos de 12 mm en el fondo y después de 24 horas se usaron para transfección con un 70% de confluencia.

La composición de la mezcla de transfección consistió en 1 µg de DNA plasmídico de Fibrilarina-EGFP y 6 µL de polietilenimina (PEI) en 300 µL de medio Optimem por cada caja de 35mm. La mezcla de transfección se preparó en dos tubos eppendorf con 150 µL de medio Optimem sin suero cada uno para diluir el DNA y PEI en tubos separados, se mezclaron ambos tubos, pipeteando suavemente para mezclar y se incubó a temperatura ambiente (25°C) 15 minutos para permitir la formación de los complejos. Se adicionó la mezcla de PEI con el vector, incubando por 3 horas y posteriormente cambiando a un medio DMEM con suero. Los cultivos de células en transfección fueron incubados durante 48 horas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂.

Generación de líneas celulares estables

En una caja de 60mm con un 80% de confluencia de células U2OS de osteosarcoma se realizó la transfección con 1.5 µg de DNA plasmídico de fibrilarina-pSNAPf y 9 µl de PEI. Transcurridas 48 horas post transfección se les adicionó 5 ml de medio con suero y 1000 µg/ml de Geneticina G-418 de Sigma-Aldrich como agente de selección, se incubó por 9 días y se evaluó la cantidad de colonias positivas. Se lavó la caja de Petri con PBS, se tripsinizaron las células y se cambiaron a otra caja con medio nuevo y con la misma dósis de antibiótico.

Detección de fibrilarina-SNAP con el sistema de inmunofluorescencia indirecta

El vector pSNAPf fue usado para la clonación de fibrilarina, este es un plásmido de expresión de mamíferos destinado a la clonación y la expresión estable o transitoria de

fusiones de proteínas SNAP-tag en células de mamíferos. Para la detección de fibrilarina con etiqueta SNAP se usó el reactivo rojo fluorescente SNAP-Cell[®] TMR-Star como sustrato. Esta detección se realizó en las líneas celulares U2OS con transfección estable de Fibrilarina-SNAP.

Ensayo FISH para localizar IncRNA

Para la localización del IncRNA HANR en líneas celulares se utilizó un ensayo de FISH, diseñando una sonda marcada con biotina para la hibridación de forma específica. Los cubreobjetos con las células U2OS se lava 2 veces con PBS a temperatura ambiente y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente y permeabilizaron con triton-X100 0.5% por 5 minutos. Posteriormente se realizaron 4 lavados por 5 minutos con PBS. Se bloqueó con BSA al 5% en PBS por 30 minutos y posteriormente 5 lavados con PBS por 5 minutos y 2 lavados por 5 minutos con solución A (2ml de buffer A, 7ml de agua libre de nucleasas, 1ml de formamida desionizada). Se hibridó por toda la noche (maximo 16 horas) en oscuridad a 37 °C con la solución de hibridación (50 ug/ml de la sonda de hibridación, 2 µM MgCl2, 0.5% blocking reagent from 10% stock, 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 mg/ml yeast tRNA (#15401029)). Los cubreobjetos fueron sellados para evitar que la muestra se seque. Posteriormente se realizó un lavado de 30 minutos a 37°C en oscuridad (2 ml del buffer de lavado A, 7ml de agua libre de nucleasas, 1 ml de formamida desionizada), después un lavado con el buffer B por minutos a temperatura ambiente, 3 lavados por 5 minutos con PBS y se procedió al protocolo de inmunolocalización.

Los buffer utilizados para el ensayo son de la marca Stellaris Buffer A (SMF-WA1-60, BiosearchTech), Stellaris Buffer B (SMF-WB1-20 BiosearchTech).

Inmunolocalización

Se tomaron células con un 80% de confluencia en un cubreobjetos. Las células se fijaron con PFA al 4% en PBS 20 min y permeabilización con triton-X100 0.5% en PBS por 5 minutos, seguido de 3 lavados con PBS por 5 minutos a temperatura ambiente, después se bloqueó 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 3% en PBS. Posteriormente se incubó en anticuerpo primario contra PIP₂ y biotina por 1 hora, y se hicieron 3 lavados con PBS por 5 minutos, seguido de 1 hora de incubación en anticuerpo secundario con marcado fluorescente y 3 lavados con PBS por 5 minutos. Se realizó una incubación con DAPI en PBS 0.1ug/1ml, seguido de un lavado en agua y el cubreobjetos se secó al aire. Finalmente

se montó con 3 μ L de vectashield en un portaobjetos. Los canales que se usaron fueron DAPI, PIP₂ y biotina (300, 647 y 488 nm, respectivamente).

Microscopía

La microscopía de campo amplio se realizó en un Leica DM6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania; cubos de filtro: DAPI (Ex: 360/40, Em: 470/40), TRITC (Ex: 546/12; Em: 600/40) ,) utilizando un objetivo HCX PL APO 100x/1.40-0.70 OIL, una Leica EL6000 con una fuente de luz HXP 120W/45C Vis Hg, líquido de inmersión tipo F (Leica Microsystems), una cámara Leica DFC350 FX y el software Las X. Las células HeLa se tiñeron con Pyronina Y (100 nM) para la visualización de RNA y DAPI (300 nM). El microscopio utilizado para los ensayos de FISH fue el microscopio confocal Leica Stellaris objetivo de aumento 63x.

CAPITULO II

2.2 Resultados

2.2.1 Diseño de una estrategia experimental para la obtención de una base de datos de lncRNA que potencialmente interactúen con lípidos.

Se diseño una estrategia (LIPRNA-seq) para la obtención de una base de datos de RNA con posible interacción con PIP₂, descrito en la figura 2.1, donde se observa el flujo de este protocolo. El enfoque de esta base de datos fueron los RNA nucleares por lo que se separo la fracción nuclear y citoplasmática de un cultivo de células HeLa y haciendo una extracción de RNA con trizol de la fracción nuclear, este fue pre limpiado con perlas de sefarosa control sin lípidos y posteriormente se hicieron ensayos de pulldown con perlas recubiertas de PIP₂ y perlas control. El RNA recuperado fue enviado a secuenciar a la empresa Novogene con un enfoque particular en la obtención de IncRNAs. Por ultimo, se realizó el análisis de los resultados de la secuenciación.



Figura 2.1 Representación esquemática del flujo de trabajo en el protocolo LIPID-Seq. Comenzando con la extracción de RNA de los células HeLa (1), seguido de la limpieza previa del RNA para eliminar el RNA inespecífico (2), el ensayo de pull-down con perlas recubiertas de lípidos y control respectivamente (3), lavado de RNA no unido (4), recuperación del RNA unido a las perlas con una extracción con trizol (5), secuenciación de los RNA (6), la obtención de librerias (7) y el análisis de los daros obtenidos de la secuenciación (8) Modificado de Bayona-Hernandez et al., 2023.

2.2.2 Extracción de RNA nuclear de cultivo de células HeLa

Para este estudio se utilizaron cultivos celulares de células HeLa crecidas en agitación. Se tomó alrededor de un litro de cultivo y la pastilla resultante fue utilizada para la extracción de RNA nuclear, en la figura 2.2 se muestra de forma representativa una imagen de células HeLa antes y después de un proceso de eliminación de la membrana por el uso de detergentes. No obstante, para la obtención de RNA se tomó la fracción nuclear para la extracción y se trató con DNAsa. Este se utilizó en los experimentos posteriores, tanto para el método LIPRNA-seq como los pulldown de cada RNA particular seleccionado. El cultivo de células HeLa permitio obtener una cantidad de RNA en concentración de 1000 ng/ μ L. Como se observa en la figura 2.2, después del tratamiento con DNAsa, la banda correspondiente al DNA ya no es visible, reduciendo así la interferencia de DNA en la detección de RNAs en el proceso de secuenciación.



Figura 2.2 Extracción de RNA nuclear de cultivo de células HeLa. Células HeLa con Pironina Y (RNA) y DAPI (DNA). Extracción de RNA nuclear e incubación con DNAsa.

2.2.3 Datos obtenidos de la secuenciación de RNA unido a lípidos

Entre los resultados obtenidos de la secuenciación, se encontraron secuencias con una mayor afinidad de unión a PIP₂ que se contrasta con las que tienen mayor afinidad a las perlas control. Se detectaron un total de 14,623 secuencias, entre las que 3258 muestran con mayor afinidad a PIP₂. En el gráfico de dispersión de enriquecimiento KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) de la figura 2.3 se describen los procesos asociados a los genes con mayor afinidad a PIP₂. En este se muestra una representación de la cantidad de genes asociados a procesos biológicos, listados en el eje Y, en relación al tamaño y color de cada punto. El tamaño representa el número de secuencias relacionadas,

como se muestra en la escala de la derecha y dependiendo de la escala de colores desde rojo como más significativo hasta morado, donde se representa el valor ajustado de p. Como se puede apreciar en la figura 2.3, la función más prominente asociada a estos RNA es a las vías en cáncer. Entre otros procesos con alto número de RNA asociados, se encuentran las relacionadas al transporte de RNA, biogénesis ribosomal en eucariontes y spliceosoma.





2.2.4 Selección de secuencias de RNA con unión a PIP₂

La obtención de las bases de datos de RNA-seq fue resultado del método LIPRNAseq permitió realizar un análisis de las secuencias significativamente más afines PIP₂ en comparación con las control sin lípidos. En el Heatmap mostrado en la figura 2.4a muestran secciones en rojo que representan los genes más afines a PIP₂ en la última columna. También se muestra un mapa de volcano en la figura 2.4b donde se analizan un total de

3258 secuencias y de las cuales 2448 secuencias tienen una mayor afinidad por PIP_2 de forma diferencial.



Figura 2.4 Diagramas de análisis de las bases de datos de RNAseq. a) Heatmap de secuencias resultantes de la secuenciación, el color rojo representando los más afines y en azul los menos afines, b) Mapa de volcano de las secuencias diferencialmente afines a PIP₂.

De un total de 14,623 secuencias, 3987 mostraron mayor afinidad con PIP2, de la base de datos obtenida se filtraron únicamente los RNA no codificantes, dando como resultado 311 secuencias. Como criterios adicionales de selección se tomaron en cuenta la presencia de regiones C/D y H/ACA que se encuentran presentes en RNAs no codificantes que se localizan en el núcleo como los snoRNAs y ScaRNAs (Massenet et al., 2017). También se buscaron regiones de unión a lípidos previamente reportados en el lncRNA LINK-A que posee una horquilla con una región de unión a PIP3 (AGACUC) y sus mutantes (A. Lin et al., 2017b). La secuencias seleccionadas fueron: ENSG00000270141 (TERC) de 541 bases, y con una interacción 19 veces mayor afinidad a PIP₂ en relación al control, ENSG00000234498 (RPL13AP20), también conocida como HANR, de 660 bases y 24.6 veces más afín a PIP₂ y ENSG0000232445 (RP11-132A1.4), también conocida como EMSLR, de 705 bases con 75 veces más afín a PIP₂ en relación al control (perlas sin lípidos). En la figura 2.5 se muestra una grafica con las secuencias no codificantes y se encuentran marcadas las 3 secuencias seleccionadas.



Figura 2. 5 Gráfico de la afinidad de interacción entre los RNA no codificante y PIP₂.

Se realizó un análisis de las secuencias de RNA candidatos en los que ayudados por un análisis en clustal (Madeira et al., 2022), se realizó un alíneamiento entre estas secuencias y la sección de la secuencia de LINK-A con unión a PIP3 que también mostró ser responsable de la unión a PIP₂, pero de forma más tenue (figura 2.6). Para este análisis se consideró la existencia de regiones que alinearan para estimar posibles interacciones con PIP₂. De acuerdo a los resultados obtenidos de este alineamiento, con la región de unión a PIP₃ del IncRNA LINK-A que se usó de referencia, las regiones de posible interacción con lípidos para estos IncRNA son; HANR 429-459 (figura 2.6 a), TERC 36-58 (figura 2.6 b) y EMSLR 583-605 (figura 2.6 c). Si bien las regiones de alineamiento no son idénticas, se espera que se tenga algún grado de interacción con lípidos.



Figura 2. 6 Alineamiento de secuencias de IncRNA con el fragmento de LINK-A, responsable de la interacción con PIP3. Se muestran los 3 IncRNA a) HANR, b) TERC y c) EMSLR.

2.2.5 Clonación de IncRNA en vector pGEM T-easy

La amplificación de las secuencias fue a partir de RNA nuclear, los cebadores se encuentran especificados en materiales y métodos. La secuencia de EMSLR se reporta en 1098 bases y comparte el mismo ID del gen con RP11-132A1.4, se tomó la secuencia parcial obtenida de la secuenciación de 705 bases para el diseño de cebadores y la clonacion en el vector. La secuencia de TERC clonada fue de 451 bases, coincidiendo con la secuencia reportada como componente de RNA de la telomerasa. La secuencia de HANR de 660 bases es conocida también como RPL13AP20. En la figura 2.7 se muestran las secuencias clonadas en el vector PGEM T-easy digerido con EcoRI, para liberar el inserto. También se observa la clonación de un aptámero de RNA en el vector pcDNA 3.1 (+) de 254 pb.



Figura 2.7 Análisis electroforético de los productos de clonación de los IncRNA seleccionados. Clonación en el vector PGEM T easy de EMSLR, HANR y TERC y la clonación de un aptámero de RNA en el vector pcDNA 3.1 (+).

2.2.6 Análisis de interacción de IncRNA con PIP₂

Se realizaron análisis de pulldown utilizando RNA nuclear y perlas recubiertas de PIP₂ y control. El RNA unido después del ensayo se usó para RT-PCR con cebadores específicos para cada secuencia. Para los IncRNA TERC y EMSLR no fue posible obtener un resultado determinante, a diferencia de HANR, donde si se observaron bandas de diferente intensidad entre PIP₂ y control. El IncRNA HANR fue el que mostró resultados más concluyentes respecto a la unión con las perlas recubiertas de PIP₂ (figura 2.8). Se observa que las bandas más intensas corresponden a las de PIP₂ y el tamaño corresponde a los 660pb, esperados de HANR.



Figura 2.8 Resultados de ensayo de pulldown de RNA. Pulldown con perlas control sin lípidos y perlas recubiertas de PIP₂ y RT-PCR con cebadores específicos para el IncRNA HANR

2.2.7 Análisis de FISH para la localización de HANR y PIP₂ en líneas celulares

Para el diseño de la sonda necesaria para la hibridación por FISH, se analizó la secuencia de HANR de 660 bases con el fin de seleccionar una región específica de este IncRNA. Tomando fragmentos de la secuencia, y realizando análisis de BLAST, se encontró un fragmento específico para HANR. La secuencia seleccionada se encuentra remarcada en amarillo en la figura 2.9 y a partir de esta se diseño una sonda o cebador complementario para reconocer esta sección particular. También se observa en la parte inferior de la figura 2.9 los resultados del análisis de BLAST, en los que solamente la secuencia deseada fue reconocida. De este modo, se obtuvo un fragmento de 39 bases y se diseñó su secuencia complementaria (5' CTCCACGTTCTTCTCGGCCTGTTTCCATAGCCTCATGAA 3'), con una marca de biotina en el extremo 5'. Para que este cebador marcado se hibride a esta secuencia específica para HANR.

Homo sapiens ribosomal protein L13a pseudogene 20 (RPL13AP20), non-coding RNA HANR

-Probe<u>HANR</u>biotin CTCCACGTTCTTCCGGCCTGTTTCCATAGCCTCATGAA

Sequences producing significant alignments		Download \checkmark		Se	ect co	olumns	s 🎽 Sh	✓ Show 100 ♥ ②		
Select all 2 sequences selected		GenBa	nk G	araphic	MSA Viewer					
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
	Homo sapiens ribosomal protein L13a pseudogene 20 (RPL13AP20), non-coding RNA	Homo sapiens	73.1	73.1	100%	1e-11	100.00%	660	NR_003932.2	
Ľ	Homo sapiens 12 BAC RPCI11-392P7 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence Homo sapiens			73.1	100%	1e-11	100.00%	161577	AC007688.15	

Figura 2.9 Análisis de la secuencia de HANR para la búsqueda de un fragmento específico para el diseño de una sonda de hibridación. Se muestra la secuencia correspondiente a HANR y el análisis BLAST realizado a la región seleccionada, resaltada en amarillo, para el diseño de la sonda.

Para los análisis de hibridación por FISH se utilizaron células U2OS con un 80% de confluencia y anticuerpos contra PIP₂ y biotina. Adicionalmente, se tiñeron los núcleos con DAPI. Además del análisis por microscopía de las células en los diferentes canales, se realizó un análisis de intensidad de señal en las regiones correspondientes a biotina y se comparó con la señal correspondiente a PIP₂. En la figura 2.10 se muestran tres células distintas en las que se observa que el patrón de los picos de intensidad de señal en HANR corresponden con un pico en la intensidad de la señal en el canal de PIP₂. La región analizada es la señalada en el recuadro amarillo de la figura 2.10 a, b y c, que se observa aumentada junto a la gráfica del análisis de intensidad de cada célula.

En la figura 2.10 a se analiza la región de mayor intensidad en el canal correspondiente a HANR. Para el análisis de intensidad de señal se trazó un segmento un poco mayor a 4 micrones. En este se observa el pico de mayor intensidad del canal correspondiente a PIP₂ y HANR es cercano a la marca de los 2 micrones, mostrando un patrón de intensidad similar. En la figura 2.10 b en el que el segmento de análisis es también poco mayor a los 4 micrones, el pico de intensidad se localiza entre los 2 y 3 micrones y mostrando una especie de meseta que se conserva en ambos canales. Por último el la figura 2.10 c con un segmento de análisis de poco menos de 4 micrones, se observa que la señal esta en 4 puntos a lo largo del segmento de análisis, con el punto más alto en la marca de los 2

micrones para ambos canales. La consistencia de comportamiento en la intensidad de señal para HANR y PIP₂ sugiere que existen regiones de colocalización en ambas moléculas.





Figura 2.10 Análisis del ensayo de FISH para la localización de HANR y la colocalización con PIP₂ en células U2OS. Las figuras a, b y c muestran diferentes células con un análisis de intensidad de señal en la región de más intesidad del canal medio que corresponde a HANR, localizado con anticuerpos contra biotina. Los canales corresponden a la señal de DAPI, HANR y PIP₂ y una sección aumentada de la región de interés, junto con un análisis de intensidad de señal en la sección inferior de cada panel.

2.2.8 Análisis de colocalización de PIP₂ y fibrilarina.

Se tomó a fibrilarina como punto de referencia para la localización de estructuras nucleares, debido a que se localiza de forma consistente en el nucléolo y cuerpos cajales. PIP₂ se localiza dentro de los nucléolos, rodeado de fibrilarina y también se ha reportado la interacción entre ambas moléculas (Guillen-Chable et al., 2020; Yildirim et al., 2013).

Se realizaron ensayos de transfección con fibrilarina-GFP y de fibrilarina-SNAP para comprar ambas etiquetas en un trabajo previo (Bayona Hernández, A., 2019). En las imágenes se observan diferencias en la cantidad de señal, pero la localización coincide en los nucléolos (figura 2.11 a). Se realizó una medición de la intensidad de señal trazando una línea a través de estructuras subnucleolares y los resultados mostraron que el comportamiento de fibrilarina con cualquiera de las dos etiquetas fué el mismo (figura 2.11 b).

La comparación entre Fib-GFP y Fib-SNAP se realizó para mostrar que la localización de la proteína es la misma en ambos sistemas, por lo que el uso de SNAP como etiqueta permite obtener un método de visualización en la célula adaptable al uso de marcadores de otras moléculas con etiquetas en diferentes longitudes de onda y cambiar el sustrato en función de las necesidades del estudio.



Figura 2.11 Fibrilarina WT con etiqueta de SNAP y etiqueta de GFP. a) Imagen de súper resolución y b) análisis de intensidad de pixel en la que se muestra Fib silvestre-GFP (verde) y Fib silvestre-SNAP (rojo).

Para la localización de PIP₂ se usó un anticuerpo secundario que se percibe a 555nm. Por ello, el compuesto que se le seleccionado para la detección de FIB-SNAP cambio a uno detectable a 488nm (Oregon Green) (figura 2.12) en comparación con la figura 2.11 en la que Fib-SNAP tenía un compuesto que lo hacía detectable a los 555nm (TMR-Star).

En el análisis, se observa que PIP₂ se comporta de forma esperada en el núcleo, como es reportado en la bibliografía (Hoboth et al., 2021), formando agregados, algunas de estas en estructuras dentro de los nucléolos (figura 2.12 a, flechas naranja) y unas de mayor tamaño ,como motas nucleares (figura 2.12 a, flechas azules). La columna merge de la figura 2.12, muestra un acoplamiento, en el que se observa con mayor claridad la distribución PIP₂ en relación a fibrilarina. En el panel inferior se muestra un análisis de intensidad de señal en el que se mide un segmento que atraviesa un nucléolo y donde el punto máximo de intensidad de la señal de fibrilarina y la de PIP₂ se encuentran una junto a la otra (figura 2.12 b).



Figura 2. 12 Análisis de localización de fibrilarina y PIP₂. Fibrilarina silvestre (rojo) y PIP₂ (gris) en células de mamíferos con acercamientos y análisis de intensidad de señal fibrilarina silvestre (rojo) y PIP₂ (negro).

DISCUSIÓN

Las interacciones RNA-lípido han mostrado tener un papel regulatorio importante en diversos procesos celulares y enfermedades que hasta ahora había pasado desapercibido. Este trabajo se enfocó en la búsqueda de lncRNAs que interactúen con lípidos en el núcleo, (figura 2.2), diferentes de los ubicados en la membrana plasmática que, hasta ahora son los más reportados. Por ejemplo, PMART72 y su interacción con lípidos de la membrana plasmática (Wu et al., 2021). Otro ejemplo es SNHG9 que promueve la separación de fases y acumulación de la proteína LAST1, con la que interactua en el citoplasma (R. H. Li et al., 2021), o LIPTER que interactúa con el exterior de los adiposomas para su correcto transporte hacia diferentes sitios, como la mitocondria (L. Han et al., 2023).

Para la búsqueda de RNAs con interacciones con lípidos, se han desarrollado diversas técnicas en las que se utilizan mecanismos de selección por afinidad, tales como el sistema SELEX usado en la búsqueda de un aptámero con unión a PI3P (Donia et al., 2019) y APEX-seq que realiza un análisis de RNA asociados a membrana (Wu et al., 2021). En este trabajo se desarrolló el sistema LIPRNAseq (Bayona-Hernandez et al., 2023), que similar a las técnicas anteriormente mecionadas, se basa en la búsqueda de secuencias por afinidad, buscando RNAs que se unan o tengan afinidad a perlas de sefarosa recubiertas de lípidos (PIP₂) y su posterior secuenciación. Los resultados de este método fueron prometedores en cuanto a la cantidad de secuencias obtenidas de forma diferencial en las que se logran apreciar una gran cantidad con afinidad a PIP₂, en relación con el control (perlas de sefarosa sin lipidos), visto en los diagramas de volcan y heatmap de la figura 2.4, siendo el resultado más notorio de que existen poblaciones con afinidad diferencial a PIP₂.

Existen diversos artículos donde se describen interacciones entre lípidos y IncRNA, asi como las funciones biologicas que tienen. Donde muestran que la interacción tiene influencia en la formación de complejos con proteínas, que tienen efectos en el control de vías de regulación, promoviendo la proliferación de cáncer, o en la resistencia a fármacos como los inhibidores de AKT (A. Lin et al., 2017). También pueden formar parte de la regulación y correcto funcionamiento de procesos celulares, como es el caso de LIPTER que es requerido para el correcto transporte de gotas lipídicas gracias a su interacción con PA y PI4P y con proteínas transportadoras, evitando enfermedades como cardiomiopatias (L. Han et al., 2023). En la figura 2.3 se muestran análisis de KEEG de los RNA con afinidad

a PIP₂, donde gran parte de esta poblacion de RNAs está asociada a procesos relacionados al metabolismo de cáncer.

En este trabajo se encontró que el IncRNA HANR posee una probable interacción con PIP₂, esto se observa en la figura 2.8 con el análisis de pulldown, en el que las bandas correspondientes a la interaccion con PIP₂ son más intensas que en las control, y en la figura 2.10, con un análisis de localización por FISH en líneas celulares U2OS donde se observa que la señal de HANR en el núcleo colocaliza en ciertos puntos o regiones con la señal de PIP₂. Se realizó un análisis de estas imágenes en las regiones de colocalización, donde se observó que los picos de intensidad de señal coinciden. Si bien su función específica es aún desconocida no por ello es menos importante para su análisis futuro. Ya se han descrito lncRNAs que interactuan con lipidos como PIP3 (A. Lin et al., 2017), PA (R. H. Li et al., 2021), PI4P (L. Han et al., 2023), entre otros, con funciones biológicas descritas, pero la interaccion con PIP₂ en el núcleo aún es un campo por explorar.

Se ha reportado que, adicional a la interacción lípido-RNA, también se observa la formación de complejos con proteínas, como la proteína AKT que forma un complejo con LINK-A-PIP3 (A. Lin et al., 2017), La localización de la interaccion de HANR y PIP₂ observada en la figura 2.10, puede dar una idea de las posibles proteínas con las que puede estar interactuando, una de las cuales es fibrilarina.

Fibrilarina en una proteína en los nucleolos y cuerpos cajales, como puede verse en la figura 2.11 donde se observa a fibrilarina con una etiqueta de GFP y otra de SNAP, esta proteína esta relacionada con PIP₂, pues están involucradas en procesos como la transcripción, y adicionalmente se ha reportado que fibrilarina puede interactuar de manera directa a PIP₂ (Yildirim et al., 2013). Además de su localización en las motas nucleares y NLI, se le encuentra en estructuras como los nucléolos (Hoboth et al., 2021), rodeado por fibrilarina (Guillen-Chable et al., 2020), como se aprecia en la figura 2.12. Si bien no se cuenta con una imagen evaluando directamente la colocalización de fibrilarina, HANR y PIP₂, se puede observar que en los análisis de FISH (figura 2.10) la interacción de PIP₂ y RNA se da en regiones nucleares similares a los sitios donde fibrilarina y PIP₂ interactúan (figura 2.12), lo que sugiere la posibilidad de interacción o formación de complejos entre estas moléculas en el núcleo. Para corroborar dicha interacción, se requerirían análisis adicionales proporcionado la base para estudios más detallados en este campo.

CAPITULO III

LIPRNAseq: a method to discover lipid interacting RNAs by sequencing

Published: 22 June 2023

Molecular Biology Reports

Andrea Bayona-Hernandez¹., Susana Guerra¹., Irma Angélica Jiménez-Ramirez¹., Martin Sztacho²., Pavel Hozak²., Luis Carlos Rodriguez-Zapata³., Alejandro Pereira-Santana^{4,5}., Enrique Castaño¹

Affiliations

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43, Número 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida CP 97205, Yucatán, México

2 Department of Biology of the Cell Nucleus, Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

3 Unidad de Biotecnologia, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43, Número 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida CP 97205, Yucatán, México

4 Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Subsede Sureste, Parque Científico Tecnológico de Yucatán, Km 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná-Puerto, 97302, Mérida, Yucatán, México

5 Dirección de Cátedras, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Ciudad de México, 03940, México

Correspondence author: Enrique Castaño de la Serna, Email: enriquec@cicy.mx

Abstract

Background: Current biological research extensively describes the interactions of molecules such as RNA with other nucleic acids or proteins. However, the relatively recent discovery of nuclear phospholipids playing biologically relevant processes outside membranes as well as RNA-lipid interactions shows the need for new methods to explore the identity of these RNAs.

Methods and Results: In this study, we describe the method for LIPID-RNA isolation followed by sequencing and analysis of the RNA that has the ability to interact with the selected lipids. Here we utilized specific phospholipid coated beads for selective RNA binding. We tested RNA from organisms belonging to different realms (human, plant, and yeast), and tested their ability to bind a specific lipid.

Conclusions: The results show several RNAs differentially enriched in the pull-down of phosphatidyl Inositol 4,5 bisphosphate coated beads. This method is helpful to screen lipidbinding RNA, which may have relevant biological functions. The method can be used for different lipids and comparison of different pull-downs can narrow the selection of RNA to be selected for further studies.

Keywords: RNA sequence, Lipid-RNA, Phase separation, Phosphoinositide

Abbreviations:

PIP2: Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate

PI4P: Phosphatidylinositol 4 phosphate

PA: Phosphatidic acid

PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

IncRNA: Long non-coding RNA

Introduction

During the last few years, the importance of lipids outside membranes and inside nuclear processes has come to light as new techniques are available. Several processes where proteins and lipids interact in defined regions for a particular function are coming forward. Examples of this include phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) involved with the transcription machinery of Pol I and Pol II (Hoboth et al., 2021; Sobol et al., 2018; Yildirim et al., 2013) or RNA processing, where liquid-liquid phase separation has gained acceptance as part of the mechanism for molecules or factors to form complexes (Q. Guo et al., 2021b; Y. E. Guo et al., 2019; Hoboth et al., 2021). In addition, the discovery of more protein-lipid binding motifs, as well as new ways to use these domains to define the locations of the lipids in the cells, has gained momentum (Castano et al., 2019; Kalasova et al., 2016). The early pictures of some lipids show a dynamic network of proteins and lipids in the nucleus (Sobol et al., 2013, 2018), particularly proteins involving RNA synthesis, processing, and translation. However, recently the first description of direct interaction between RNA and lipids was discovered with the IncRNA LINK-A (long non-coding intergenic RNA for kinase activation) interacting directly with AKT and phosphatidylinositol 3.4.5-trisphosphate (PIP3) (A. Lin et al., 2017b). From tissues of patients with triple-negative breast cancer (TNBC) and normal tissue were isolated total RNA and RNA from the lipid fractions, using a IncRNA array. Nine show lipid enrichment, LINC01139 with the highest enrichment. Using lipidcoated beads followed by quantitative PCR and techniques such as fat blot analysis using lipids attached to membranes validated the interaction. This technique made it possible to determine the RNA LINC01139 binds to the lipid in the membrane (later renamed LINK-A). LINK-A showed the greatest interaction with lipids, mainly with PIP3, phosphatidylcholine (PC), and phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) (A. Lin et al., 2017b). Recent reports have identified more IncRNAs that interact with lipids, such as the SNHG9 IncRNA, which interacts with phosphatidic acid (PA) and the LAST1 protein. This interaction promotes a regulatory mechanism in promoting tumors and the proliferation of breast cancer (R. H. Li et al., 2021). Another example of interaction between RNA and lipids is an RNA aptamer that interacts with phosphatidylinositol 3-phosphate (PI(3)P). To generate this aptamer, a SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) selection method with a 40-nucleotide sequence from LINK-A to create the aptamer that specifically binds to PI(3)P (Donia et al., 2019).

Several studies have used sequencing to elucidate the expression or enrichment of IncRNA by comparing their expression on differential conditions in healthy and tumor tissue and the search for prognosis-related RNA (Yamada et al., 2018; Zhou et al., 2016) as well as search for differentially expressed IncRNA in Schizophrenia (Ni et al., 2021), or the differential expression of RNA in stressful conditions (Ji et al., 2020), cold acclimation in fish (Jiang et al., 2018) drought (S. Li et al., 2017) and other conditions show a reliable and widely used strategy.

Several studies use the affinity to specific molecules to sort RNAs of interest before the RNA sequencing process. This interaction is the core of the strategy of several methods as using a protein-binding matrix for the RNA, to characterize RNAs that bind specific proteins (Lambert et al., 2014). The search of RNAs that interact with specific genome regions, in this case with telomeres using enChIP-RNA-Seq, which uses a combination of an engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) and RNA sequencing (Fujita et al., 2015).

Different from other RNA interactions as with proteins, other RNAs, or DNA, little is known about the interaction with lipids and even less about established methods to analyze those interactions. In this work, we describe lipid-interacting RNA sequencing (LIRNAseq), a technique that enables the analysis of RNA with the potential ability to interact with lipids.

Materials and methods

Nuclear RNA extraction from mammal cell culture.

Nuclear RNA was extracted from 500 ml of 70% confluence HeLa cell culture. The cells were centrifuged at 300 x g at 4 °C for 1 min to collect the cells, then washed three times with PBS at 4 °C. After removing the PBS, 3 ml of the lysis buffer (50 mM Tris PH7, 150 mM NaCl, 2mM MgCl2, 0.5% NP40, RNAse Block (Agilent Technologies) 1 in 100 μ l) was added at 4 °C, resuspended, and centrifuged at 1000 x g at 4 °C. The supernatant corresponding to the cytoplasmic fraction was removed, and the pellet was resuspended in 3 ml of lysis buffer and centrifuged at 1000 x g at 4 °C for 1 min. The supernatant was removed, 1.2 ml of lysis buffer was added to the pellet and transferred to a clean tube, and 2.4 ml of ribozol and 2.4 ml of chloroform were added followed by vortex and centrifugation for 5 min at 12 000 x g. Only the upper part was taken and precipitated with 0.7 ml of isopropanol per 1 ml of the resulting volume and then centrifuged for 15 min at 12 000 x g

at 4 °C. Removal of the solvent and the pellet were washed in 80% ethanol and finally airdried and resuspended in RNAse-free water pH 7.0.

Extraction of total RNA from Saccharomyces cerevisiae

RNA extraction used 50 ml of yeast cell culture; the cell pellet after centrifugation disrupted with 0.1 mm glass beads. Once the cell extract was ready, RNA was obtained with the PureLink[™] RNA Mini Kit (No. 12183020) Invitrogen. According to the manufacturer's instructions, with the addition of Dnase I (Rnase-free) New England BioLabs (No. M0303S).

Extraction of total RNA from Stenocereus queretaroensis.

RNA extraction was performed with PureLink[™] RNA Mini Kit (No. 12183020) Invitrogen. 100 ml of cell culture of *Stenocereus queretaroensis* (Weber) Buxbaum cell line sqR1 were filtered and then pulverized using liquid nitrogen and a mortar; The RNA extracted was evaluated using a Nanodrop and treated with Dnase I (Rnase-free) New England BioLabs (No. M0303S).

RNA Binding protocol.

For the RNA-PIP₂ binding analysis, pull-down assays were performed using agarose beads coated with lipids and control beads without them. The beads used for pull-downs described in this study are Control beads #P-B000, PI(4,5)P₂ coated beads #P-B045a (also described as PIP₂), PI(4)P coated beads #P-B004a and Phosphatidic acid (PA) coated beads #P-B0PA from Echelon Biosciences Inc. The beads are composed of agarose, control beads are blocked agarose beads used as a negative control, the lipid-coated beads are composed of agarose with 10 nanomoles of bound lipid per 1 mL of beads and the size are in a range from 45 to 165 micrometers in diameter. For the assay we made a pre-clearing step, 200 µg of RNA was added to 100 µl control beads with 1µl of RNAse Block (Agilent Technologies) for 5 min of incubation. Then 100 µl of lipid-coated beads were prewashed with PBS RNAse Free and changed in clean tubes, and the precleared RNA was added to the clean beads and incubated for 30 min in cold room rotation, this procedure was made for each type of lipid-coated beads and control beads without lipids. The Eppendorf tubes were spined at 1000 g for 1 minute to remove the unbound RNA, washed three times with 500 µl PBS RNAse Free, and repeated the centrifugation process to avoid taking the beads and changing tubes during each wash. For the bound RNA extraction, add 100 µl PBS

RNAse Free, then 200 μ I of Ribozol and 200 μ I of chloroform were added, mixed, and centrifuged for 10 min at 14000 x g. Finally, the upper part was taken and precipitated with 700 μ I of isopropanol per 1 mI of the resulting volume, and the pellet was washed with ethanol and stored at -80 °C. The resulting RNA extraction was used for the sequencing process. All the solutions stated as RNAse free were added with RNAse Block (Agilent Technologies) 1 μ I per mI. RibozolTM Reagent is a single-phase phenol solution used in the RNA extraction protocol.

Library preparation and sequencing of IncRNA

For the library construction, the ribosomal RNA was depleted using the NEB Ribo-ZeroTM kit, the RNA was fragmented and undergo reverse transcription into cDNA, and Strand-specific libraries were prepared. The samples were sequenced using the platform Illumina Novaseq 6000 with a paired-end 150 bp read length. After quality control the reads were mapped with STAR software for humans (Dobin et al., 2013) and HISAT2 (Kim et al., 2015) for Yeast and for *Stenocereus queretaroensis* against the corresponding reference genomes (Homo sapiens GRCh37/hg19 reference genome; Saccharomyces cerevisiae S288c (GCA_000146045.2); and for *Stenocereus queretaroensis* our de novo transcriptome assembly used as reference). RSEM software (B. Li & Dewey, 2011) was used to perform gene counts for each sample. For the bioinformatic analysis, the TMM (Trimmed Mean of M-values) read count normalization method was used. The differential enrichment analysis was performed using the EdgeR R package (Robinson et al., 2009). We used log2(FoldChange) > 1 & padj < 0.001 as a differentially enriched gene screening standard. The sequencing and bioinformatic analysis were made for IncRNA-seq by Novogene Company.

Data Availability

The ncRNA-Seq raw data of all libraries were deposited in the National Center of Biotechnology Information (NCBI). For Stenocereus queretaroensis the BioProject accession: PRJNA937651. The accession numbers for BioSamples are SAMN33414163-Sqcontrol, SAMN33414165-SQPIP2, SAMN33414164-SQPA, SAMN33414166-SQTotal. For Saccharomyces cerevisiae the BioProject accession: PRJNA937750. The accession numbers for BioSamples are SAMN33417987-Sc_total, SAMN33417988-Sc_control, SAMN33417989-Sc_PIP2. For human the BioProject accession: PRJNA937906. The

accession numbers for BioSamples are SAMN33421421-Hs_INPUT, SAMN33421422-Hs_CONTROL, SAMN33421423-Hs_PIP2, SAMN33421424-Hs_P4.

Microscopy

Wide-field microscopy was performed on a Leica DM6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; filter cubes: DAPI (Ex: 360/40, Em: 470/40), TRITC (Ex: 546/12; Em: 600/40),) using an HCX PL APO 100x/1.40-0.70 OIL objective, a Leica EL6000 with an HXP 120W/45C Vis Hg light source, Type F immersion liquid (Leica Microsystems), a Leica DFC350 FX camera, and Las X software. HeLa Cells, Pitaya cells and Yeast were stain with Pyroning Y (100 nM) and DAPI (300 nM).

Results

Sample preparation for sequencing

In this study, RNA-lipid interaction sequencing was performed for human cells (HeLa cells), Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), and plant suspension cells of Pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) as seen in Fig. 1. We use PIP₂-coated beads as a matrix for RNA binding as PIP₂ is known to be localize in the nucleus (Kalasova et al., 2016), and as seen in Fig. S1. The general schematic workflow is shown in Fig. 1. After sequencing the RNA-lipid interacting molecules from different samples, bound mRNA and IncRNA were obtained. Thus, the RNA sequences were analyzed and compared among treatments to determine potentially interact with PIP₂.



Figura 3. 1 Schematic representation of workflow in LIPID-Seq protocol used. Starting with RNA extraction from the different sourced organisms contemplates in this study (1), followed by the preclearing of the RNA to get rid of the unspecific RNA (2). The pull-down assay with sepharose beads as control and lipid-coated beads respectively (3), the washing of any not bounded RNA and repeating this step two times (4), and finally the recovery of the lipid-bounded RNA using trizol extraction (5). These samples were sent to Novogene Co for IncRNA sequencing processing (6) and for the obtention of the RNA library (7) and data obtention used for further analysis (8).

The RNA extraction process was adequate for each type of organism used, the amounts obtained were for human: 200 ng/ul: 260/280 2.0 OD 260/230 2.2 RIN 8.9, for yeast: 187 ng/ul: OD 260/280 1.92 OD 260/230 2.77 RIN 9.1 and for pitaya: 173.9 ng/ul 260/280: 2.10 260/230: 2.01 RIN 8.40. The RNA extraction process in HeLa cells focuses only on nuclear RNA aiming to find RNA molecules that interact with lipids in the nucleus, shown in Fig. S2(a) after Cytoplasmic RNA removal. For Yeast, as well as for Pitaya we used total RNA extraction seen in Fig. S2(b) and S2c respectively. The images of the cells used for this study were stained with DAPI for DNA shown in blue and showing RNA in red stained with Pyronin Y (Fig. S2).

Analysis of differentially bound genes

From the data obtained, we wanted to check if the pull-down of RNA with different lipids shows different populations or if the binding was due to hydrophobicity. The criterion to define significant differentially bound genes (DBG) was a padj < 0.001 and log2(Fold

Change)> 1 for the analysis of the three sources of RNA. To have an overview of DBG per condition, we show volcano plots for each cell type (Fig. 2). For HeLa cells, the analysis shown corresponds to the most enriched genes for the PIP₂ conditions vs. control in which the gray dots denote sequences that are not differentially significant, the blue dots sequences that have low affinity to bound PIP₂ compared to the agarose control beads, and the red dots indicate sequences that have the highest affinity to bound with PIP₂ coated beads compared to the control beads without lipids. Fig. 2(a) shows a total of 2448 PIP₂ improved bound RNAs for human nuclear RNA over the 810 non-specific bound sequences. Fig. 2(b) for total plant RNA has a higher yield of 10622 sequences over the non-specific bound of 2725. The higher numbers are probably due to the use of total RNA in pitaya versus only nuclear RNA from human cells. However, the type of organism can also reflect huge differences, as in Yeast RNA, which only showed 39 sequences with higher binding to PIP₂ Fig. 2(c).



Figura 3.2 The volcano plots show the differentially enriched genes between the Control sepharose beads and the PIP₂-coated ones. The red dots represent the most differentially enriched and the green the least enriched. The horizontal axis indicates the fold change of genes and the vertical coordinate indicates the statistically significant degree of changes in gene enrichment levels. Significant criteria of differential enriched genes are log2(FoldChange) > 1 and padj < 0.001

The shared and unique RNA interacting sequences from the lipid-coated beads among treatments were represented as Venn diagrams (Fig. 3) to show the affinity for each selected lipid. For humans of a total of 18104 the proportion of the sequences is shown in Fig. 3(a), this analysis has 1400 for PIP₂ (purple). With *S. queretaroensis* analysis of the 24102 total genes analyzed, 5643 are differentially bound in the PIP₂ presence (purple) Fig. 3(b). For Yeast, of the total of 5243 genes shown in the Venn diagram in Fig. 3(c), 921 (purple) sequences are specific for PIP₂ binding. For HeLa were also analyzed interactions with PI4P were included in the total of sequences and for Pitaya cells analysis with PA was made and is shown in the Fig. S3(a) and S3(b).



Figura 3.3 Venn diagram showing the distribution of genes present in the study with the interaction of the control and lipid-coated beads. For humans, Stenocereus queretaroensis and Saccharomyces cerevisiae analysis of control and PIP₂ enriched genes are shown. In Yellow are represented the sequences that are only enriched in Control beads, and purple shows the specific enriched sequences for PIP₂ and the merge in pink are the sequences present in both conditions.

The analysis of the differentially bound IncRNA to the different types of lipid-coated beads is seen in Fig. 4 and Fig. S4 as Heatmaps for human (HeLa cells), Pitaya cells (*S. queretaroensis*), and Yeast (*S. cerevisiae*). We compared the prebound (pre-cleared) RNA used for the experiments and is shown as Total. Bound RNA from the lipid-coated beads that show a higher red signal indicates an enriched population of particular RNAs for this condition indicating preferential binding to the particular lipid. Differential RNA was observed from the heatmap between the different conditions showing that binding was not due to non-specific precipitation with the beads but to the particular type of beads used. For the analysis of Fig. 4, we take into consideration the sequences present in Total, control, and PIP₂.

Additional data with PI4P and PA data of the pull-down libraries are shown in Fig. S4. As part of the analysis was the gene ontology of the sequences, there are shown the biological processes for the three organisms in the Fig. S5. We tested the ability of the lipid beads to pull down specific RNA in RT-PCR of Link A as known to bind to PIP3 and was compared to its binding to PIP₂ as it was not shown in the PIP₂ library. The results shown in Fig. S6 that there is a specific binding of Link A to PIP3 beads, also we selected two candidate RNA (NT ID: XR_002284730 and XR_707783) and tested by RT-PCR, in both cases the pull-downs were selective for the particular lipid they were shown in the library as seen in Fig. S6.



Figura 3. 4 Heatmap generated with the RNA-seq data. The heatmap generated with the RNAseq data shows the distinct enrichment pattern of RNAs interacting in the pull-down assay with control (sepharose beads without lipids) and PIP₂-coated beads and the pre-clared RNA (Total). Red indicate genes that are highly enriched and blue denotes genes with low enrichment levels. The color ranges from red to blue represents the values from highest to lowest.

Discussions

The interaction between RNA and lipids reflects a new type of molecular interactions in the cell (Albi & Viola Magni, 2004), as such new methodologies need to emerge to further study their functional role. The molecular separation is essential for the initial screening methodology to define the role of the particular molecule of interest. Previously it was shown
that IncRNA LINK-A regulates AKT protein when bound to PIP3 interaction. Fat blot assays were used to test the presence of LINK-A and the mutants to specific lipids (A. Lin et al., 2017b). Key nucleotides of the RNA were found in the loop region as being responsible for PIP3 interaction, that interaction successfully enhanced the binding to AKT (A. Lin et al., 2017b). A similar mechanism for the IncRNA SNHG9 interacting with phosphatidic acid (PA) was shown as this RNA-Lipid enhances the interaction of the protein LAST1 again using Fat blots to define the lipid RNA interaction (R. H. Li et al., 2021). Here we provide a pull-down methodology, that compared to Fat blot, may provide more versatility in testing large collections of RNA bound to lipids. The method can also be set for direct identification by RT-PCR of the selected candidate. In Fig. S6 we compared PIP₂ versus PIP3 beads for the specific pull-down of Link A and found similar results as previously published (A. Lin et al., 2017b). For the libraries we used PIP₂ as is a well-known phospholipid to be involved in several nuclear functions (Balaban et al., 2023; Kalasova et al., 2016; Sobol et al., 2018; Y. H. Wang & Sheetz, 2022).

The discovery of IncRNAs potentially binding lipids opens a new set of biological questions. It may reflect a particular molecular process, where RNA interaction with specific lipids increases in particular pools for a defined role in the cell (Balaban et al., 2023; Sobol et al., 2018). In addition, it may be part of a dynamic mechanism of lipid modifications and liquid-liquid phase separation (Q. Guo et al., 2021b; Lu et al., 2020). Phase separation can increase local concentration of particular molecules and provide structure with functional roles (Gibson et al., 2019; Maccaroni et al., 2022). Furthermore, lipids found in membranous structures can also be tested and as shown by Czerniak the gel-liquid phase separation were RNA with G-Quadruplex Structures interact with both gel and fluid membranes (Czerniak & Saenz, 2022).

Limitations of Study

The current methodology uses specific bound lipids to select for RNA, however it cannot discern between RNAs that bind only one particular type of lipid as some RNAs may have an affinity for binding several lipids. An additional limitation has to do with the initial removal of RNAs with the control beads as a way to reduce background, however, this may remove a population of RNA that may also bind lipids. Finally, the lipids bound to the beads may allow for the specific head of the lipid to get access to the RNA but the length of the lipid tail may need to be addressed at a later point. Little has been done to address this last issue of the different sizes of tails in lipids and their effect on protein or RNA binding. The last

limitation has to do with the sequencing, here we focus on making IncRNA library, so many other RNAs may be overlooked due to the intrinsic settings of the library to be made.

Acknowledgments

We would like to tank Pavel Kriz and Wilma Gonzalez for their technical help.

Grants

(Internship LTC19048 and LTC20024) and the project: BIOCEV – Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), from the European Regional Development Fund. COST Pan-European Network in Lipidomics and EpiLipidomics (EpiLipidNET CA19105 action). The Microscopy Centre was supported by the MEYS CR (LM2018129 Czech-BioImaging) and by the European Regional Development Fund-Project "Modernization and support of research activities of the national infrastructure for biological and medical imaging CzechBioImaging" (no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775) and by CONACYT grant FC2016/1572

Author Contributions

AB, SG, AJ, and EC designed the experiments; AB and EC performed the experiments with human; AB and SG performed the experiments with *S. queretaroensis*; AJ and EC performed the experiments with Yeast; AB and APS carried out the bioinformatics; PH and LC help with the data analysis and editing of the manuscript. AB, AJ, APS, and EC wrote the manuscript with the input of all the authors.

Declaration

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

The authors declare that there is no conflict of interest

Ethical approval

This article does not contain any studies with any animals or human participants performed by any of the authors.

Supplementary Figures



Supplementary Fig. S1. Image of HeLa Cells showing the nucleus and PIP₂ location. Primary antibodies: anti-PIP₂ mouse monoclonal IgM antibody 4 µg/ml (ab11039, Abcam) Secondary antibody Goat anti-mouse IgM conjugated with Alexa 555 (A21426, Invitrogen; 10 µg/ml), DAPI



Supplementary Fig. S2. Procedure for the source of RNA, A Steps used for the preparation of nuclear RNA from HeLa cells. The current images show HeLa cells prior cytoplasmic RNA removal and after followed by Trizol extraction and then DNAse I treatment to produce the RNA label as total. B, Steps used for the preparation of RNA from Yeast, as before the RNA was treated with DNAse I

to remove unwanted DNA. C, Steps used for the preparation of RNA from *S. queretaroensis*. All cells were stained with DAPI (blue) and Pyronine Y for RNA staining (red).



Supplementary Fig. S3. Venn diagram showing the distribution of genes present in the study with the interaction of the control and lipid-coated beads. For human control and PIP₂ and PI4P, for *Stenocereus queretaroensis* control and PIP₂ and PA and for Saccharomyces cerevisiae analysis of control and PIP₂ enriched genes are shown. In Yellow are represented the sequences that are only enriched in Control beads, and purple shows the specific enriched sequences for PIP₂ and ones in cian if for PI4P enriched (human cells) and green for PA (pitaya cells).



Supplementary Fig. S4. Heatmap generated with the RNA-seq data. The heatmap generated with the RNA-seq data shows the distinct enrichment pattern of RNAs interacting in the pull-down assay with control (sepharose beads without lipids) and lipid-coated beads. Total (pre-cleared RNA), control (without lipids), and PIP₂ are shown for all, and PI4P analysis for humans and PA for pitaya. The color ranges from red to blue representing the values from highest to lowest.



Supplementary Fig. S5. Analysis of Gene Ontology of PIP₂ **VS CONTROL data.** Showing the biological process predicted for a) humans and b) pitaya and c) cellular component, biological process and molecular function for Yeast.



Supplementary Fig. S6 RT-PCR of LINK A and two sequences from the analysis of pitaya cells. Here is shown the binding of the sequences with lipids, with a pulldown of RNA with lipid-coated beads followed by RT-PCR. a) A pull-down of RNA with PIP3-coated beads (with stronger signal) and PIP₂-coated beads (weaker band) showing results similar to previous publications. b) XR_707783 was a sequence enriched in the PA interaction in the differential analysis and c) XR_002284730 was a sequence enriched in PIP₂ differential analysis.

CAPITULO IV

Discusión, Conclusiones Generales y Perspectivas

Discusión

Las interacciones IncRNA-lípido tienen funciones importantes en la formación de complejos, funcionando de manera regulatoria, tal es el caso de SNHG9 (R. H. Li et al., 2021), que al promover la formación de complejos con PA y LAST1 en el citoplasma, evita la disponibilidad de LAST1, que permite en la migración al núcleo de la proteína YAP, permitiendo la activación de ciertos genes. La localización de la interacción de los IncRNA con ciertas moléculas, como en este caso PIP₂, puede indicar el tipo de función que puedan tener (Bridges et al., 2021) por lo que la localización nuclear de la interacción de HANR y PIP₂ podría darnos una idea de las posibles funciones de dicha interacción. Diversos lncRNA que se localizan en el núcleo se han visto involucrados en procesos como la interacción y remodelación de la cromatina, regulación transcripcional, organización de estructuras, entre otras funciones (Bridges et al., 2021).

La demanda del uso de metodologías para la obtención de bases de datos de RNA de forma selectiva ha ido en aumento, ya sea por su presencia en algunos tipos de cáncer (Yamada et al., 2018), por ser tejido específicas (L. Han et al., 2023), presentan unión a moléculas específicas (Lambert et al., 2014) o para la búsqueda de secuencias de unión a organelos, como la membrana plasmática (Wu et al., 2021). Este trabajo se suma a las técnicas existentes para el análisis de RNA debido a que fue capaz de encontrar distintas poblaciones dependiendo del tipo de lípido, y de manera organelo selectiva utilizando RNA nuclear, método que también fue analizado en diferentes organismos (Bayona-Hernandez et al., 2023).

El IncRNA HANR tiene un papel importante en ciertas enfermedades, como el cáncer, promoviendo la formación de tumores en higado (Shi et al., 2018; Xiao et al., 2018), pulmón (S.-J. LI et al., 2020), o colonrectales (M. Xu et al., 2020) y gliomas (W.-J. WA NG et al., 2020). Esto se debe, principalmente a sus interacciones con micro RNA, lo que modula diversas rutas en estos tipos de cáncer. También presenta una interacción directa con la proteína hexoquinasa 2 (H2K), proteína implicada en la glucólisis (G. Han et al., 2024). En este trabajo se observó que también tiene la capacidad de interactuar con el fosfolípido PIP₂, lo que abre las posibilidades para las funciones celulares de dicha interacción recién

descrita. Además de que el reciente descubrimiento de su interacción directa con la proteína H2K abre la posibilidad de que este IncRNA interactúe con otras proteínas.

Los análisis de HANR con sondas marcadas con biotina en ensayos de FISH, muestran una colocalización con PIP₂ en los núcleos, lo que difiere de otros IncRNA que interaccionan con lípidos, como PMAR72 (Wu et al., 2021) que se localiza en la membrana plasmática o SNHG9 (R. H. Li et al., 2021) localizado principalmente en el citoplásma formando complejos con la proteína LAST1.

Conclusiones generales

En este trabajo se logró generar una base de datos de IncRNAs con posible interacción con PIP₂, de los IncRNA analizados, HANR mostró tener interacción con PIP₂ lo cual fue demostrado utilizando ensayos de pulldown y con análisis de hibridación por FISH en líneas celulares, donde se obsevó que dicha interacción se lleva a cabo en el núcleo.

Perspectivas

Definir sitios específicos de interacción de este IncRNA con PIP₂ seria importante para definir las funciones de dicha interacción. Entre las propuestas se encuentran la búsqueda de posibles sitios realizando mutantes eliminando los posibles sitios responsables de la interacción con PIP₂ y realizar el análisis de pulldown con el transcrito in vitro de las mutantes utilizando perlas recubiertas de PIP₂.

Bibliografía

- Ai, D., Chen, C., Han, S., Ganda, A., Murphy, A. J., Haeusler, R., Thorp, E., Accili, D., Horton, J. D., & Tall, A. R. (2012). Regulation of hepatic LDL receptors by mTORC1 and PCSK9 in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122. https://doi.org/10.1172/JCI61919DS1
- Albi, E., & Viola Magni, M. P. (2004). The role of intranuclear lipids. In *Biology of the Cell* (Vol. 96, Issue 8, pp. 657–667). Elsevier. https://doi.org/DOI: 10.1016/j.biolcel.2004.05.004
- Amin, N., McGrath, A., & Chen, Y. P. P. (2019). Evaluation of deep learning in non-coding RNA classification. *Nature Machine Intelligence*, 1(5), 246–256. https://doi.org/10.1038/s42256-019-0051-2
- Balaban, C., Sztacho, M., Antiga, L., Miladinović, A., Harata, M., & Hozák, P. (2023). PIP2 Effector Protein MPRIP Regulates RNA Polymerase II Condensation and
 Transcription. *Biomolecules*, *13*(3), 426. https://doi.org/10.3390/biom13030426
- Bayona-Hernandez, A., Guerra, S., Jiménez-Ramirez, I. A., Sztacho, M., Hozak, P., Rodriguez-Zapata, L. C., Pereira-Santana, A., & Castaño, E. (2023). LIPRNAseq: a method to discover lipid interacting RNAs by sequencing. *Molecular Biology Reports*. https://doi.org/10.1007/s11033-023-08548-5
- Bayona-Hernandez, A (2019). Estudio de la fibrilarina mediante mutagénesis. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Repositorio CICY.
- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: IncRNA localization and function. *The Journal of Cell Biology*, 220(2), 1–17. https://doi.org/10.1083/jcb.202009045
- Cao, T., Rajasingh, S., Samanta, S., Dawn, B., Bittel, D. C., & Rajasingh, J. (2018). Biology and clinical relevance of noncoding sno/scaRNAs. In *Trends in Cardiovascular Medicine* (Vol. 28, Issue 2, pp. 81–90). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2017.08.002

- Cao, Y., Bryan, T. M., & Reddel, R. R. (2008). Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells. *Cancer Science*, 99(6), 1092–1099. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00815.x
- Castano, E., Yildirim, S., Fáberová, V., Krausová, A. četa, Uličcná, L., Paprčcková, D., Sztacho, M., & Hozák, P. (2019). Nuclear Phosphoinositides—Versatile Regulators of Genome Functions. *Cells*, 5, 1–19. https://doi.org/DOI: 10.3390/cells8070649
- Czerniak, T., & Saenz, J. P. (2022). Lipid membranes modulate the activity of RNA through sequence-dependent interactions. *PNAS*. https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.2119235119
- Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., & Lieberman, P. M. (2009). TERRA RNA Binding to TRF2 Facilitates Heterochromatin Formation and ORC Recruitment at Telomeres. *Molecular Cell*, 35(4), 403–413. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.025
- Dennis, P. P., Omer, A., & Lowe, T. (2001). *Dennis_et_al-2001-Molecular_Microbiology. A guided tour small RNA function in Archaea. 40.*
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635
- Donia, T., Jyoti, B., Suizu, F., Hirata, N., Tanaka, T., Ishigaki, S., F, P. T. J., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Chiorini, J. A., & Noguchi, M. (2019). Identification of RNA aptamer which specifically interacts with PtdIns(3)P. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(1), 146–154. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.034
- Duan, J., Huang, Z., Nice, E. C., Xie, N., Chen, M., & Huang, C. (2023). Current advancements and future perspectives of long noncoding RNAs in lipid metabolism and signaling. *Journal of Advanced Research*, 48, 105–123. https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.08.007
- Fujita, T., Yuno, M., Okuzaki, D., Ohki, R., & Fujii, H. (2015). Identification of non-coding RNAs associated with telomeres using a combination of enChIP and RNA sequencing. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123387

- Gibson, B. A., Doolittle, L. K., Schneider, M. W. G., Jensen, L. E., Gamarra, N., Henry, L., Gerlich, D. W., Redding, S., & Rosen, M. K. (2019). Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell*, *179*(2), 470-484.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.037
- Grammatikakis, I., Panda, A. C., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2014). Long noncoding RNAs (IncRNAs) and the molecular hallmarks of aging. *Aging*, *6*(12), 992–1009. https://doi.org/10.18632/aging.100710
- Guillen-Chable, F., Corona, U. R., Pereira-Santana, A., Bayona, A., Rodríguez-Zapata, L.
 C., Aquino, C., Šebestová, L., Vitale, N., Hozak, P., & Castano, E. (2020). Fibrillarin
 Ribonuclease Activity is Dependent on the GAR Domain and Modulated by
 Phospholipids. *Cells*, 9(5), 1–22. https://doi.org/10.3390/cells9051143
- Guo, Q., Shi, X., & Wang, X. (2021a). RNA and liquid-liquid phase separation. In *Non-coding RNA Research* (Vol. 6, Issue 2, pp. 92–99). KeAi Communications Co. https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2021.04.003
- Guo, Q., Shi, X., & Wang, X. (2021b). RNA and liquid-liquid phase separation. *Non-Coding RNA Research*, 6(2), 92–99. https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2021.04.003
- Guo, Y. E., Manteiga, J. C., Henninger, J. E., Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Hannett, N. M., Spille, J. H., Afeyan, L. K., Zamudio, A. V., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Boija, A., Decker, T. M., Rimel, J. K., Fant, C. B., Lee, T. I., Cisse, I. I., Sharp, P. A., Taatjes, D. J., & Young, R. A. (2019). Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature*, *572*(7770), 543–548. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1464-0
- Han, G., Bai, X., Li, F., Huang, L., Hao, Y., Li, W., Bu, P., Zhang, H., Liu, X., & Xie, J. (2024).
 Long non-coding RNA HANR modulates the glucose metabolism of triple negative breast cancer via stabilizing hexokinase 2. *Heliyon*, 10(1). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23827
- Han, L., Huang, D., Wu, S., Liu, S., Wang, C., Sheng, Y., Lu, X., Broxmeyer, H. E., Wan, J.,
 & Yang, L. (2023). Lipid droplet-associated IncRNA LIPTER preserves cardiac lipid metabolism. *Nature Cell Biology*, *25*(7), 1033–1046. https://doi.org/10.1038/s41556-023-01162-4

- Han, S., Chen, X., & Huang, L. (2023). The tumor therapeutic potential of long non-coding RNA delivery and targeting. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 13, Issue 4, pp. 1371–1382). Chinese Academy of Medical Sciences. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.12.005
- Herman, A. B., Tsitsipatis, D., & Gorospe, M. (2022). Integrated IncRNA function upon genomic and epigenomic regulation. In *Molecular Cell* (Vol. 82, Issue 12, pp. 2252– 2266). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.027
- Hoboth, P., Sztacho, M., Šebesta, O., Schätz, M., Castano, E., & Hozák, P. (2021).
 Nanoscale mapping of nuclear phosphatidylinositol phosphate landscape by dual-color
 dSTORM. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(5). https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158890
- Holley, C. L., & Topkara, V. K. (2011). An introduction to small non-coding RNAs: miRNA and snoRNA. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 25(2), 151–159. https://doi.org/10.1007/s10557-011-6290-z
- Huang, C., Hu, Y. W., Zhao, J. J., Ma, X., Zhang, Y., Guo, F. X., Kang, C. M., Lu, J. B., Xiu, J. C., Sha, Y. H., Gao, J. J., Wang, Y. C., Li, P., Xu, B. M., Zheng, L., & Wang, Q. (2016). Long noncoding RNA HOXC-AS1 suppresses Ox-LDL-induced cholesterol accumulation through promoting HOXC6 expression in THP-1 macrophages. *DNA and Cell Biology*, 35(11), 722–729. https://doi.org/10.1089/dna.2016.3422
- Ivanyi-Nagy, R., Ahmed, S. M., Peter, S., Ramani, P. D., Ong, P. F., Dreesen, O., & Dröge, P. (2018). The RNA interactome of human telomerase rna reveals a codingindependent role for a histone mRNA in telomere homeostasis. *ELife*, 7, 1–30. https://doi.org/10.7554/eLife.40037
- Ji, H., Niu, C., Zhan, X., Xu, J., Lian, S., Xu, B., Guo, J., Zhen, L., Yang, H., Li, S., & Ma, L. (2020). Identification, functional prediction, and key IncRNA verification of cold stressrelated IncRNAs in rats liver. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-57451-7
- Jiang, P., Hou, Y., Fu, W., Tao, X., Luo, J., Lu, H., Xu, Y., Han, B., & Zhang, J. (2018). Characterization of IncRNAs involved in cold acclimation of zebrafish ZF4 cells. *PLoS ONE*, *13*(4), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195468

- Kalasova, I., Fáberová, V., Kalendová, A., Yildirim, S., Uličná, L., Venit, T., & Hozák, P. (2016). Tools for visualization of phosphoinositides in the cell nucleus. *Histochemistry* and Cell Biology, 145(4), 485–496. https://doi.org/10.1007/s00418-016-1409-8
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 12(4), 357–360. https://doi.org/10.1038/nmeth.3317
- Lambert, N., Robertson, A., Jangi, M., McGeary, S., Sharp, P. A., & Burge, C. B. (2014). RNA Bind-n-Seq: Quantitative Assessment of the Sequence and Structural Binding Specificity of RNA Binding Proteins. *Molecular Cell*, 54(5), 887–900. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.016
- Lechertier, T., Grob, A., Hernandez-Verdun, D., & Roussel, P. (2009). Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. *Experimental Cell Research*, 315(6), 928–942. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.01.016
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, *12*. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323
- Li, C., Hu, Z., Zhang, W., Yu, J., Yang, Y., Xu, Z., Luo, H., Liu, X., Liu, Y., Chen, C., Cai, Y.,
 Xia, X., Zhang, X., Wang, D. zhi, Wu, G., & Zeng, C. (2019). Regulation of Cholesterol
 Homeostasis by a Novel Long Non-coding RNA LASER. *Scientific Reports*, 9(1).
 https://doi.org/10.1038/s41598-019-44195-2
- Li, J., Gao, C., Liu, C., Zhou, C., Ma, X., Li, H., Li, J., Wang, X., Qi, L., Yao, Y., Zhang, X., Zhuang, J., Liu, L., Wang, K., & Sun, C. (2019). Four IncRNAs associated with breast cancer prognosis identified by coexpression network analysis. *Journal of Cellular Physiology*, 234(8), 14019–14030. https://doi.org/10.1002/jcp.28089
- Li, R. H., Tian, T., Ge, Q. W., He, X. Y., Shi, C. Y., Li, J. H., Zhang, Z., Liu, F. Z., Sang, L. J., Yang, Z. Z., Liu, Y. Z., Xiong, Y., Yan, Q., Li, X., Ju, H. Q., Liu, J., Wang, L. J., Shao, J. Z., Wang, W., ... Lin, A. (2021). A phosphatidic acid-binding IncRNA SNHG9 facilitates LATS1 liquid–liquid phase separation to promote oncogenic YAP signaling. *Cell Research*, *31*(10), 1088–1105. https://doi.org/10.1038/s41422-021-00530-9

- Li, S., Yu, X., Lei, N., Cheng, Z., Zhao, P., He, Y., Wang, W., & Peng, M. (2017). Genomewide identification and functional prediction of cold and/or drought-responsive IncRNAs in cassava. *Scientific Reports*, 7(March). https://doi.org/10.1038/srep45981
- Li, X., Wu, Z., Fu, X., & Han, W. (2014). LncRNAs: Insights into their function and mechanics in underlying disorders. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 762, 1– 21. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.04.002
- Lin, A., Hu, Q., Li, C., Xing, Z., Ma, G., Wang, C., Li, J., Ye, Y., Yao, J., Liang, K., Wang, S., Park, P. K., Marks, J. R., Zhou, Y., Zhou, J., Hung, M. C., Liang, H., Hu, Z., Shen, H., ... Yang, L. (2017a). The LINK-A IncRNA interacts with PtdIns(3,4,5)P3 to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors. *Nature Cell Biology*, *19*(3), 238–251. https://doi.org/10.1038/ncb3473
- Lin, A., Hu, Q., Li, C., Xing, Z., Ma, G., Wang, C., Li, J., Ye, Y., Yao, J., Liang, K., Wang, S., Park, P. K., Marks, J. R., Zhou, Y., Zhou, J., Hung, M. C., Liang, H., Hu, Z., Shen, H., ... Yang, L. (2017b). The LINK-A IncRNA interacts with PtdIns(3,4,5)P3 to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors. *Nature Cell Biology*, *19*(3), 238–251. https://doi.org/10.1038/ncb3473
- Lin, C., & Yang, L. (2018). Long Noncoding RNA in Cancer: Wiring Signaling Circuitry. *Trends in Cell Biology*, 28(4), 287–301. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.11.008
- Lu, Y., Wu, T., Gutman, O., Lu, H., Zhou, Q., Henis, Y. I., & Luo, K. (2020). Phase separation of TAZ compartmentalizes the transcription machinery to promote gene expression. *Nature Cell Biology*, 22(4), 453–464. https://doi.org/10.1038/s41556-020-0485-0
- Ma, L., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. RNA Biology, 10(6), 924–933. https://doi.org/10.4161/rna.24604
- Maccaroni, K., La Torre, M., Burla, R., & Saggio, I. (2022). Phase Separation in the Nucleus and at the Nuclear Periphery during Post-Mitotic Nuclear Envelope Reformation. In *Cells* (Vol. 11, Issue 11). MDPI. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells11111749
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services

from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W276–W279. https://doi.org/10.1093/nar/gkac240

- Massenet, S., Bertrand, E., & Verheggen, C. (2017). Assembly and trafficking of box C/D and H/ACA snoRNPs. In *RNA Biology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 680–692). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1243646
- Muret, K., Désert, C., Lagoutte, L., Boutin, M., Gondret, F., Zerjal, T., & Lagarrigue, S. (2019). Long noncoding RNAs in lipid metabolism: Literature review and conservation analysis across species. In *BMC Genomics* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central. https://doi.org/10.1186/s12864-019-6093-3
- Nadhan, R., Isidoro, C., Song, Y. S., & Dhanasekaran, D. N. (2022). Signaling by LncRNAs: Structure, Cellular Homeostasis, and Disease Pathology. In *Cells* (Vol. 11, Issue 16). MDPI. https://doi.org/10.3390/cells11162517
- Ni, C., Jiang, W., Wang, Z., Wang, Z., Zhang, J., Zheng, X., Liu, Z., Ou, H., Jiang, T., Liang, W., Wu, F., Li, Q., Hou, Y., Yang, Q., Guo, B., Liu, S., Li, S., Li, S., Yang, E., ... Zhao, C. (2021). LncRNA-AC006129.1 reactivates a SOCS3-mediated anti-inflammatory response through DNA methylation-mediated CIC downregulation in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 26(8), 4511–4528. https://doi.org/10.1038/s41380-020-0662-3
- Pereira-Santana, A., Gamboa-Tuz, S. D., Zhao, T., Eric Schranz, M., Vinuesa, P., Bayona, A., Rodríguez-Zapata, L. C., & Castano, E. (2020). Fibrillarin evolution through the tree of life: Comparative genomics and microsynteny network analyses provide new insights into the evolutionary history of fibrillarin. In *PLoS Computational Biology* (Vol. 16, Issue 10). https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008318
- Polymenidou, M. (2018). The RNA face of phase separation. *Science*, *360*(6391), 859–860. https://doi.org/10.1126/science.aat8028
- Priyanka, P., Sharma, M., Das, S., & Saxena, S. (2022). E2F1-induced IncRNA, EMSLR regulates IncRNA LncPRESS1. *Scientific Reports*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-06154-2

- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616
- Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2015). Fibrillarin from Archaea to human. *Biology of the Cell*, *107*(6), 159–174. https://doi.org/10.1111/boc.201400077
- Shi, Y., Yang, X., Xue, X., Sun, D., Cai, P., Song, Q., Zhang, B., & Qin, L. (2018). HANR promotes hepatocellular carcinoma progression via miR-214/EZH2/TGF-β axis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(1), 189–193. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.038
- S.-J. LI, Y.-X. WU, Y.-H. LIANG, Y. GAO, A.-B. WU, H.-Y. ZHENG, & Z.-X. YANG. (2020). *LncRNA HANR aggravates the progression of non-small cell lung cancer via mediating miRNA-140-5p*.
- Sobol, M., Krausová, A., Yildirim, S., Kalasová, I., Fáberová, V., Vrkoslav, V., Philimonenko, V., Marášek, P., Pastorek, L., Čapek, M., Lubovská, Z., Uličná, L., Tsuji, T., Lísa, M., Cvačka, J., Fujimoto, T., & Hozak, P. (2018). Nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate islets contribute to efficient RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of Cell Science*, *131*(8). https://doi.org/10.1242/jcs.211094
- Sobol, M., Yildirim, S., Philimonenko, V. V., Marášek, P., Castaño, E., & Hozák, P. (2013).
 UBF complexes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in nucleolar organizer regions regardless of ongoing RNA polymerase I activity. *Nucleus*, 4(6). https://doi.org/10.4161/nucl.27154
- Sztacho, M., Sobol, M., Balaban, C., Escudeiro Lopes, S. E., & Hozák, P. (2018). Nuclear phosphoinositides and phase separation: Important players in nuclear compartmentalization. *Advances in Biological Regulation*. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.09.009
- Tran, K. Van, Brown, E. L., DeSouza, T., Jespersen, N. Z., Nandrup-Bus, C., Yang, Q.,
 Yang, Z., Desai, A., Min, S. Y., Rojas-Rodriguez, R., Lundh, M., Feizi, A., Willenbrock,
 H., Larsen, T. J., Severinsen, M. C. K., Malka, K., Mozzicato, A. M., Deshmukh, A. S.,
 Emanuelli, B., ... Nielsen, S. (2020). Human thermogenic adipocyte regulation by the

long noncoding RNA LINC00473. *Nature Metabolism*, 2(5), 397–412. https://doi.org/10.1038/s42255-020-0205-x

- Tsai, R. X., Fang, K. C., Yang, P. C., Hsieh, Y. H., Chiang, I. T., Chen, Y., Lee, H. G., Lee, J. T., & Chu, H. P. C. (2022). TERRA regulates DNA G-quadruplex formation and ATRX recruitment to chromatin. *Nucleic Acids Research*, 50(21), 12217–12234. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1114
- Wang, C., Yang, Y., Zhang, G., Li, J., Wu, X., Ma, X., Shan, G., & Mei, Y. (2019). Long noncoding RNA EMS connects c-Myc to cell cycle control and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(29), 14620–14629. https://doi.org/10.1073/pnas.1903432116
- Wang, Y. H., & Sheetz, M. P. (2022). When PIP2 Meets p53: Nuclear Phosphoinositide Signaling in the DNA Damage Response. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fcell.2022.903994
- Wang, Y., Yesselman, J. D., Zhang, Q., Kang, M., & Feigon, J. (2016). Structural conservation in the template/pseudoknot domain of vertebrate telomerase RNA from teleost fish to human. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(35), E5125–E5134. https://doi.org/10.1073/pnas.1607411113
- W.-J. WANG, K. SUN, F.-Y. LI, X.-B. HUI, D. LIU, J. LIU, & X.-D. WANG. (2020). *LncRNA* HANR aggravates the malignant progression of glioma via targeting miRNA-335.
- Wu, E., Guo, X., Teng, X., Zhang, R., Li, F., Cui, Y., Zhang, D., Liu, Q., Luo, J., Wang, J., & Chen, R. (2021). Discovery of Plasma Membrane-Associated RNAs through APEX-seq. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 79(4), 905–917. https://doi.org/10.1007/s12013-021-00991-0
- Xiao, J., Lv, Y., Jin, F., Liu, Y., Ma, Y., Xiong, Y., Liu, L., Zhang, S., Sun, Y., Tipoe, G. L., Hong, A., Xing, F., & Wang, X. (2018). LncRNA HANR Promotes Tumorigenesis and Increase of Chemoresistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(5), 1926–1938. https://doi.org/10.1159/000484116

- Xu, D., Wang, W., Wang, D., Ding, J., Zhou, Y., & Zhang, W. (2024). Long noncoding RNA MALAT-1: A versatile regulator in cancer progression, metastasis, immunity, and therapeutic resistance. *Non-Coding RNA Research*. https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2024.01.015
- Xu, M., Guo, X., Wang, R. Di, Zhang, Z. H., Jia, Y. M., & Sun, X. (2020). Long non-coding RNA HANR as a biomarker for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Medicine (United States)*, *99*(7). https://doi.org/10.1097/MD.000000000019066
- Yamada, A., Yu, P., Lin, W., Okugawa, Y., Boland, C. R., & Goel, A. (2018). A RNA-Sequencing approach for the identification of novel long non-coding RNA biomarkers in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 8(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-18407-6
- Yamazaki, T., Souquere, S., Chujo, T., Kobelke, S., Chong, Y. S., Fox, A. H., Bond, C. S., Nakagawa, S., Pierron, G., & Hirose, T. (2018). Functional Domains of NEAT1 Architectural IncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Molecular Cell*, 70(6), 1038-1053.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.019
- Yildirim, Sukriye., Castano, Enrique., Sobol, Margarita., Philimonenko, V. V., Dzijak, Rastislav., Venit, Tomas., & Hozak, Pavel. (2013). Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *Journal of Cell Science*, *126*(12), 2730–2739. https://doi.org/10.1242/jcs.123661
- Zhang, Q., Kim, N. K., & Feigon, J. (2011). Architecture of human telomerase RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(51), 20325–20332. https://doi.org/10.1073/pnas.1100279108
- Zhang, X., Wang, W., Zhu, W., Dong, J., Cheng, Y., Yin, Z., & Shen, F. (2019). Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22). https://doi.org/10.3390/ijms20225573
- Zhou, M., Diao, Z., Yue, X., Chen, Y., Zhao, H., Cheng, L., & Sun, J. (2016). Construction and analysis of dysregulated IncRNA-associated ceRNA network identified novel IncRNA biomarkers for early diagnosis of human pancreatic cancer. *Oncotarget*, 7(35), 56383–56394. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10891