

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGENICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LUCAS GOEDERT

**Caracterização genômica e funcional do RMEL3, um RNA longo não
codificante de expressão enriquecida em melanoma.**

Ribeirão Preto

2019

LUCAS GOEDERT

**Caracterização genômica e funcional do RMEL3, um RNA longo não
codificante de expressão enriquecida em melanoma.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Goedert, Lucas

Caracterização genômica e funcional do RMEL3, um RNA longo não codificante de expressão enriquecida em melanoma. Ribeirão Preto, 2019.

133f.:il; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular;

Orientadora: Espreafico, Enilza Maria.

1.Melanoma. 2. IncRNA. 3.MAPK. 4.ENSG00000250961.

Nome: GOEDERT, Lucas

Título: Caracterização genômica e funcional do RMEL3, um RNA longo não codificante de expressão enriquecida em melanoma.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora

Dr(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dr(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dr(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dr(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dr(a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos meus pais, Carlos e Lúcia, pelo apoio, incentivo e amor incondicionais. Vocês são meu alicerce e sempre me ajudaram a tomar decisões de forma consciente sem nunca medir esforços para tornar os meus sonhos possíveis.

À minha noiva Jessica por todo amor e companheirismo. Obrigado por me apoiar em todos os desafios que tivemos que passar para chegar até aqui. Sou eternamente grato por todo cuidado e carinho que você tem comigo.

Aos meus padrinhos, Liberto e Maria da Penha, e meus avós Francisco e Maria, por todas as boas lembranças e por terem compartilhado dos meus sonhos.

À minha família pela torcida, apoio e incentivo aos meus objetivos.

Aos meus amigos pelos conselhos e companheirismo mesmo quando distantes.

Aos meus amigos de laboratório Jackeline, Yasmim, Johnny, Airton, Santiago, Rui, Marcela, Cistiano, Mariani, Roberto, Rodrigo, Cibele, André, Anelisa, Carmen, Marcelo, Carlos, Maiaro, Felipe, Silmara e Joana por todos os momentos compartilhados, pelas ótimas discussões científicas, convivência e boas risadas.

AGRADECIMENTOS PROFISSIONAIS

À minha orientadora Professora Dra Enilza Maria Espreafico que me acolheu em seu laboratório e me ajudou a desenvolver meu pensamento científico, extraindo o melhor de mim.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Ao professor e colaborador Professor Dr Wilson Araújo da Silva Jr.

À Profa. Dra. Eleonora Leucci da KU Leuven por me receber em seu laboratório para execução de parte dos experimentos realizados nesse trabalho e aos colegas do *Laboratory for RNA Cancer Biology* da KU Leuven (Bélgica) pelo companheirismo.

Às secretárias do Programa de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Gabriela, Camila e Lúcia, que sempre foram muito prestativas e não mediram esforços para me ajudar em processos administrativos.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio nos processos nº 2014/07726-0 e 2017/16363-6.

Aos demais órgãos de fomento como Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Centro de Terapia Celular (CTC) e à Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por toda infra-estrutura, auxílio administrativo e financeiro a mim concedido.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) e a Universidade de São Paulo.

RESUMO

GOEDERT, Lucas. **Caracterização genômica e funcional do RMEL3, um RNA longo não codificante de expressão enriquecida em melanoma.** 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2019.

Trabalhos anteriores do nosso grupo identificaram RMEL3 como um RNA longo não codificante (lncRNA) com expressão enriquecida em melanoma. No presente trabalho, através da análise dos dados públicos de melanoma do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), confirmou-se a expressão enriquecida de RMEL3 em melanoma comparado a tecidos normais e a outros tipos de cânceres. Identificamos que pacientes de melanoma portadores da mutação BRAF^{V600E} apresentam maior expressão de RMEL3 e demonstramos que o bloqueio dessa oncoproteína reduz os níveis de expressão de RMEL3 em 60%, revelando-a como um regulador a montante desse lncRNA. O silenciamento de RMEL3 mediado por shRNA reduziu drasticamente a formação de colônias (90%) e a migração (85%) na linhagem celular de melanoma A375, o que é amparado por dados de maior expressão de RMEL3 em tumores fenotipicamente invasivos e em processo de início de metástase. O fenótipo observado é, pelo menos parcialmente, explicado pelo perfil transcriptômico associado a esse lncRNA, onde há a regulação de processos como sinalização de p53 e transição epitélio-mesenquimal, assim como, forte correlação com componentes e efetores das vias MAPK e PI3K. Identificamos a existência de diferentes isoformas de RMEL3 com distribuições intracelulares distintas, o que permite sua atuação em funções moleculares independentes. A análise do banco de dados do TCGA revelou a possibilidade de RMEL3 atuar como uma esponja para microRNAs favorecendo a expressão de genes pró-tumorigênicos como FGF2 e Bcl-2 e, além disso, a expressão de RMEL3 mostrou-se fortemente correlacionada com uma hipermetilação do genoma e parece contrabalancear a hipometilação induzida por BRAF^{V600E}, afetando alvos diferentes. Além disso, o ensaio de *pulldown* do transcrito nativo de RMEL3 seguido de espectrometria de massas identificou diversas proteínas ligantes de RMEL3 envolvidas com processos que, conhecidamente, sustentam a progressão tumoral como glicólise e a via de MAPK. Dessa forma, o conjunto de dados de pacientes do TCGA e os dados funcionais demonstram que RMEL3 é importante para sinalização de MAPK e PI3K e o seu silenciamento afeta negativamente aspectos que compõem a malignidade de melanomas com a mutação de BRAF^{V600E}.

Palavras-chave: Melanoma; lncRNA; MAPK; ENSG00000250961.

ABSTRACT

GOEDERT, Lucas. **Genomic and functional characterization of RMEL3, a long noncoding RNA with melanoma-enriched expression.** 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2019.

Previous work by our group identified RMEL3 as a long non-coding RNA (lncRNA) with melanoma enriched expression. In the present work, through the analyses of the melanoma public data of The Cancer Genome Atlas (TCGA), we confirmed RMEL3 enriched expression in melanoma compared to normal tissues and other types of cancers. We identified that melanoma patients bearing the BRAF^{V600E} mutation have a higher RMEL3 expression and have shown that the blockage of this oncoprotein reduces the expression levels of RMEL3 by 60%, revealing the activated BRAF as an upstream regulator of this lncRNA. RMEL3 shRNA-mediated silencing drastically reduced colony formation (90%) and migration (85%) in the A375 melanoma cell line, which is supported by data showing higher RMEL3 expression in phenotypically invasive tumors and in tumors at the onset of metastasis. The observed phenotype is, at least partially, explained by the transcriptomic profile associated with this lncRNA, which includes alterations in p53 signaling and epithelial-mesenchymal transition, as well as a strong correlation with components and effectors of the MAPK and PI3K pathways. We identified the existence of different RMEL3 isoforms with distinct intracellular distributions, which support their performance in independent molecular functions. The analysis of the TCGA database revealed the possibility of RMEL3 acting as a sponge for microRNAs favoring the expression of pro-tumorigenic genes like FGF2 and Bcl-2 and, in addition, the expression of RMEL3 was shown to be strongly correlated with a genome hypermethylation and appears to counterbalance BRAF^{V600E}-induced hypomethylation, affecting different targets. Furthermore, the pulldown assay of the RMEL3 native transcript followed by mass spectrometry identified a number of RMEL3 binding proteins involved in processes that are known to support tumor progression, such as glycolysis and the MAPK pathway. Thus, the TCGA patient data set and functional data demonstrate that RMEL3 is important for MAPK and PI3K signaling and its silencing negatively affects aspects that support the malignancy of melanomas harboring the BRAF^{V600E} mutation.

Keywords: Melanoma; lncRNA; MAPK; ENSG00000250961.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1 Melanoma	11
1.2 Incidência	11
1.3 Via de sinalização das MAPK e PI3K no melanoma	13
1.4 Principais Etiologias	17
1.4.1 Mutações em BRAF	17
1.4.2 Mutações em RAS, NF1 e CDKN2A	18
1.5 Principais abordagens terapêuticas	19
1.6 RNAs longos não codificantes em melanoma	21
2. Objetivo	25
3. Metodologia	26
3.1 Chipseq	26
3.2 Cultivo Celular	26
3.3 Extração do RNA de células de melanoma	26
3.4 Tratamento com <i>DNase I</i>	27
3.5 Transcrição Reversa	27
3.6 Real Time PCR	28
3.7 Digestão de RNA total com o RNase R	28
3.8 Fracionamento subcelular	28
3.9 Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência de RNA (RNA-FISH)	29
3.10 Análise dos dados do TCGA	29
3.11 Tratamento em células de melanoma com PLX4032	30
3.12 Clonagem	31
3.13 Produção e transdução de partículas lentivirais	33
3.14 Ensaio clonogênico	33
3.15 Ensaio de migração	34
3.16 <i>Pulldown</i> do RMEL3	34

3.17 Espectrometria de massas.....	35
3.18 Análise estatística e confecção de gráficos	35
4. Resultados.....	37
4.1 O locus do RMEL3	37
4.2 Expressão e localização subcelular dos transcritos.....	39
4.3 A expressão de RMEL3 é enriquecida em melanoma e varia com a progressão da doença.....	42
4.4 RMEL3 em melanomas BRAF^{V600E} X BRAF^{V600K}	45
4.5 A expressão de RMEL3 altera o perfil transcricional das células de melanoma	50
4.6 Impacto do silenciamento do RMEL3	52
4.7 Identificação de microRNAs correlacionados com a expressão de RMEL3	54
4.8 Possível envolvimento com processos de metilação	57
4.9 Em busca do mecanismo molecular.....	62
5. Discussão	66
6. Conclusão	74
7. Referências	75
8. Apêndices	92

1. Introdução

1.1 Melanoma

Melanoma é o tipo de câncer decorrente da transformação maligna de melanócitos, as células produtoras de pigmentos responsáveis pela cor da pele, localizadas na camada basal da epiderme (Bandarchi *et al.*, 2013). São células com possuem prolongada sobrevivência na epiderme e, portanto, normalmente, apresentam baixa taxa de renovação. Durante a embriogênese, os melanócitos se originam das células da crista neural, as quais possuem alta plasticidade celular que reflete na elevada habilidade migratória do melanoma (Yaar e Park, 2012), caracterizando-o como um câncer de alta mortalidade devido sua alta capacidade metastática e intensa ativação de vias anti-apoptóticas, apesar da sua baixa incidência (Soengas e Lowe, 2003).

A forma mais comum do melanoma é aquela que se origina de melanócitos presentes na pele (melanoma cutâneo), mas ocasionalmente pode surgir de melanócitos localizados em tecidos mucosos (melanoma de mucosa) e no globo ocular (melanoma uveal) (Kuk *et al.*, 2016). A etiologia do melanoma se dá de forma complexa e multifatorial, incluindo exposição aos raios ultravioleta e suscetibilidade genética (Shenenberger, 2012). Aproximadamente 10% dos melanomas cutâneos acometem pessoas com histórico familiar com dois ou mais parentes próximos afetados, o que indica que genes de alta penetrância estão envolvidos na fisiopatologia desse câncer e, possivelmente, interajam com fatores ambientais (Gandini *et al.*, 2005).

1.2 Incidência

A incidência do melanoma cutâneo está aumentando mais rapidamente do que qualquer outro tumor sólido nas duas últimas décadas e, segundo estimativas, uma duplicação adicional das taxas de incidência é esperada nos próximos vinte anos (Garbe e Leiter, 2009). No Brasil, no ano de 2018 a estimativa de novos casos foi de 6,26 por 100 mil habitantes, sendo 2920 homens e 3340 mulheres. Dentro dessa perspectiva, a região sul apresenta o

maior número de casos e o estado de Santa Catarina possui a maior incidência entre homens e mulheres, respectivamente, 6,14 e 5,33 casos por 100 mil habitantes (Figura 1). No último ano com registro, 2015, foram documentadas 1794 mortes devido à doença, sendo 1012 homens e 782 mulheres.

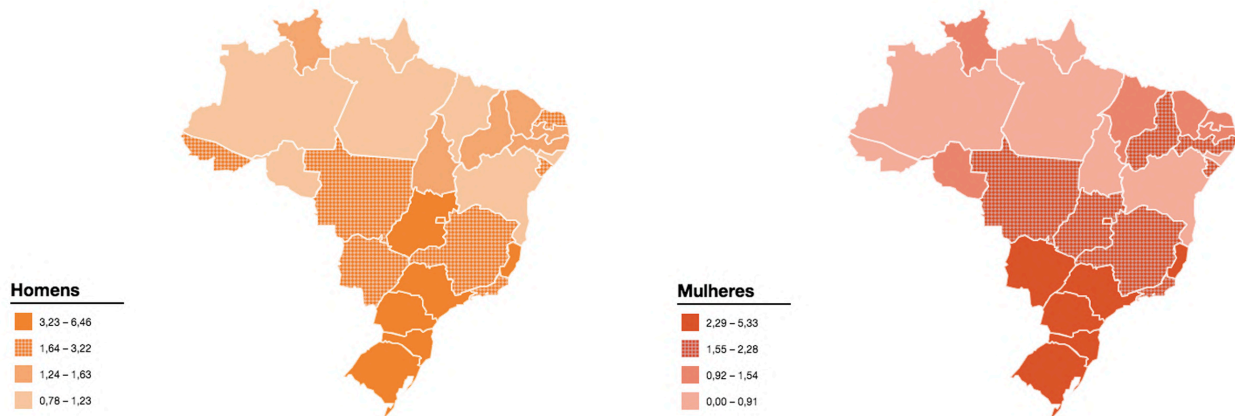


Figura 1: Estimativa das taxas de incidência de melanoma por 100 mil habitantes no Brasil em 2018.

Historicamente, a região oeste do estado de Santa Catarina é o local que apresentou a maior incidência de melanoma cutâneo já registrada em território brasileiro e estão acima das estimativas proposta pelo INCA, sendo representada por 12.2 casos por 100 mil habitantes no ano de 2008 (Moreno *et al.*, 2012). Este fato é provavelmente consequência das características fenotípicas da população que é composta principalmente por descendentes europeus (caucasianos) e também por sua contínua exposição à radiação ultravioleta, devido a sua localização ao sul do Brasil, onde há maior incidência desse tipo de radiação (Moreno *et al.*, 2012).

Já na região norte do continente americano, nos Estados Unidos, a incidência anual é de 23,6 casos por 100 mil habitantes no ano de 2016 (Glazer *et al.*, 2016), enquanto que no continente europeu, a Áustria detém a maior taxa

de incidência (21,5 casos por 100 mil homens e 17,5 casos por 100 mil mulheres) (Eggermont *et al.*, 2014).

No âmbito global, há cerca de 160 000 novos casos por ano. A cidade de Queensland, Austrália, apresenta a maior incidência registrada (56 casos por 100 mil homens e 41 casos por 100 mil as mulheres por ano) (Eggermont *et al.*, 2014).

1.3 Via de sinalização das MAPK e PI3K no melanoma

Com o advento das técnicas de larga escala como sequenciamento genômico, foi possível identificar alguns dos principais eventos oncogênicos ligados ao desenvolvimento do melanoma. A maioria dos melanomas cutâneos apresenta mutações ativadoras em genes constituintes da via de sinalização das Proteínas Quinase Ativadas por Mitógeno (MAPK), como os proto-oncogenes NRAS ou BRAF, componentes da sinalização RAS-RAF-MEK-ERK (Broekaert *et al.*, 2010), resultando na ativação da sinalização dessa via em até 90% dos casos de melanoma (Davies *et al.*, 2002). A via das MAPK, em condições fisiológicas, conecta sinais extracelulares, tais como fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores e quimiocinas, ao núcleo, o que leva à expressão de genes responsáveis pela transdução de sinal que regulam processos fundamentais como proliferação, crescimento e diferenciação celular, embriogênese e apoptose (Amaral *et al.*, 2017).

Dentro de um contexto fisiológico, quando um ligante interage com o seu Receptor de Tirosina Quinase (RTQ) na membrana plasmática, como por exemplo, o receptor KIT (Proto-oncogene Receptor de Proteína Tirosina Quinase), estimula a atividade da família de proteínas intracelular RAS. As proteínas RAS alternam entre a forma inativa (ligada ao GDP – Guanosina Difosfato) e a forma ativa (ligada ao GTP - Guanosina Difosfato Trifosfato), na qual recrutam para a membrana o seu principal efetor que é a família

RAF, um grupo de Quinases Serina/ Treonina, que compreende ARAF, BRAF e CRAF.

As proteínas RAF sinalizam, através da fosforilação, a ativação de uma quinase a jusante, Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitógeno (MEK), que posteriormente fosforila e ativa a Quinase Regulada por Sinal Extracelular (ERK), a qual transloca para o núcleo e ativa fatores transcricionais que promovem a transcrição de genes cuja atividade é necessária, por exemplo, para a proliferação e crescimento celular (Figura 2) (Mandala e Voit, 2013). A complexidade desta via é ainda aumentada pela pluralidade dos componentes das famílias proteicas que a constituem, como RAS (HRAS, NRAS e KRAS), RAF (ARAF, BRAF e CRAF), MEK (MEK1 e MEK2) e ERK (ERK1 e ERK2), as quais podem exercer funções não redundantes possuindo alvos preferenciais (Mandala e Voit, 2013).

Além disso, na via de MAPK, há efeitos que independem da atividade de quinase de seus constituintes, como ARAF e CRAF que exercem uma interação inibitória sobre STK3 (Serina/treonina Quinase 3), impedindo sua atividade pró-apoptótica (O'Neill *et al.*, 2004; Rauch *et al.*, 2010). Foi demonstrado também que CRAF interage com Rok- α e é essencial para sua localização no citoesqueleto de vimentina aumentando a migração celular (Ehrenreiter *et al.*, 2005). Adicionalmente, as proteínas ERK1/2 também exercem efeito independente da sua atividade de quinase, quando após serem ativadas e translocadas para o núcleo, desalojam a proteína Rb da sua interação com a Lamina A, facilitando sua imediata fosforilação e conseqüentemente ativação de E2F e entrada no ciclo celular (Rodriguez *et al.*, 2010).

Além do forte estímulo proliferativo induzido pela via de MAPK, há também a co-ativação da principal via de sobrevivência celular, a PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) - Akt - mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos). O complexo mTOR (mTORC1) responde a fatores de crescimento, metabolismo energético, disponibilidade de aminoácidos e estresse celular. Fatores de crescimento, por exemplo,

ativam a quinase lipídica PI3K que, por sua vez, gera o fosfolipídio PIP3 (Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). Tal produto recruta a proteína quinase AKT para a membrana plasmática, onde é ativada pela PDK1 (quinase 1 dependente de fosfoinosítídeos) e pelo complexo mTOR 2 (mTORC2). A proteína AKT, sendo a principal efetora dessa via, fosforila diversos fatores pró-sobrevivência, proliferativos e de motilidade (Dralle *et al.*, 2015). Tal processo é negativamente regulado pela fosfatase PTEN que desfosforila PIP3 (Figura 2), evitando a ativação da via.

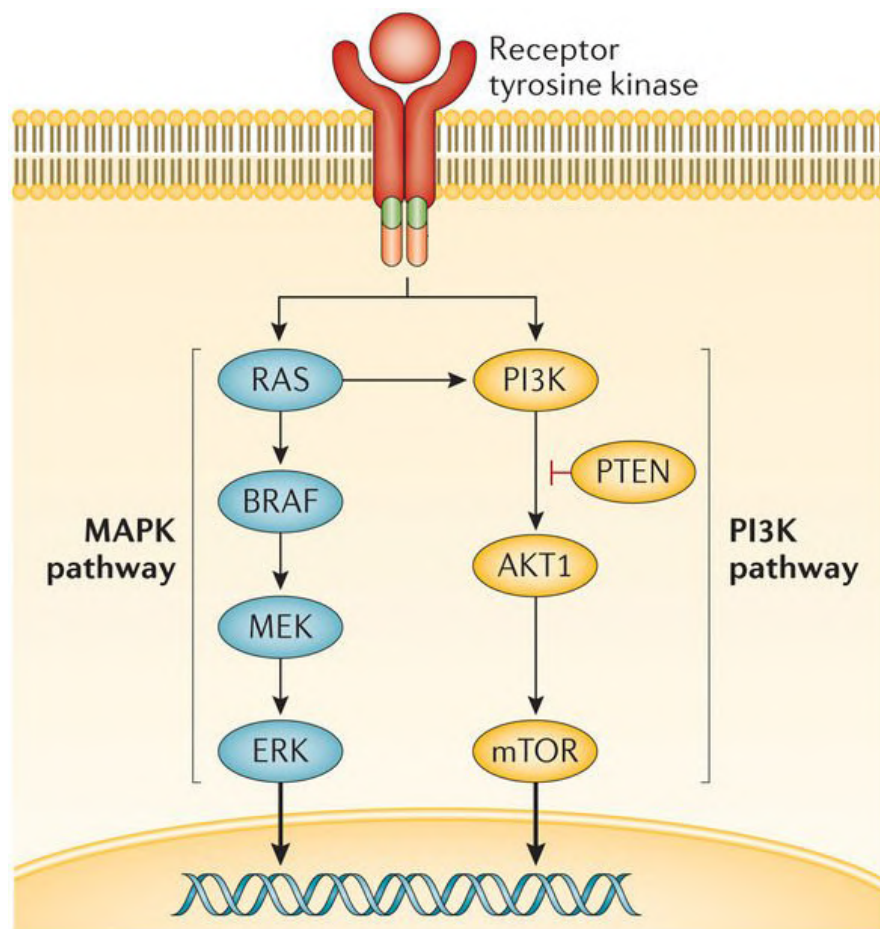


Figura 2: Representação das vias de MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) e PI3K (PI3K/AKT/mTOR). A via de MAPK é ativada pela ligação de fatores de crescimento aos receptores de tirosina quinase (RTQ) que levam a fosforilação em cadeia de RAS/RAF/MEK/ERK, os quais culminam na ativação de fatores de transcrição responsáveis pela proliferação e crescimento celular. Concomitantemente, a ativação de RTQ pode recrutar o fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), que é um lipídeo citoplasmático e uma proteína quinase, para a membrana celular. A PI3K fosforila o grupo hidroxila 3' dos fosfoinosítídeos para produzir fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que é um segundo mensageiro que sinaliza através da AKT para ativar várias enzimas, quinases e fatores de transcrição, incluindo alvo de rapamicina

em mamíferos (mTOR) que levam a sobrevivência celular. Por outro lado, a fosfatase e o homólogo da tensina (PTEN) catalisa a desfosforilação da PIP3, atuando como um regulador negativo de sua atividade. Figura adaptada (Dralle *et al.*, 2015).

Curiosamente, em um contexto fisiológico, há uma regulação recíproca entre as vias de MAPK e PI3K, podendo ser inibitória ou indutora (Aksamitiene *et al.*, 2012). Em melanoma, ambas as vias encontram-se normalmente ativadas, o que torna o melanoma altamente agressivo, pois a ativação paralela da via de PI3K reduz o feedback negativo induzido por ERK em células com hiperativação da via de MAPK (Sturm *et al.*, 2010; Birtwistle e Kolch, 2011).

Esse complexo sistema de regulação recíproca entre MAPK e PI3K acontece em diferentes níveis, a exemplo da conhecida interação entre RAS e PI3K para ativação dessa última via (Castellano e Downward, 2011); e ERK e seu substrato de quinase p90RSK que fosforilam e inibem a proteína GSK3 (Cohen e Frame, 2001) que deixa de bloquear a proteína PTEN, regulador negativo central da via de PI3K (Al-Khoury *et al.*, 2005). Adicionalmente, por vezes, o efeito fenotípico final da hiperativação da via de MAPK dá-se pela via de PI3K, a exemplo das proteínas MEK1/2 que, quando fosforiladas, interagem e ativam AKT para indução da migração celular mediada por Foxo1 (Procaccia *et al.*, 2017).

Há também a ativação da via de MAPK induzida por PI3K, onde Akt induz a sinalização de Rac/Cdc42/PAK e, por consequência, PAK (proteína serina/treonina quinase 1) fosforila CRAF, aumentando sua dimerização com MEK (Chaudhary *et al.*, 2000). Adicionalmente, PAK pode fosforilar diretamente MEK, induzindo a formação do complexo MEK/ERK2 para sinalização da via de MAPK (Eblen *et al.*, 2002).

Dessa maneira, pacientes acometidos por melanomas que apresentam ativação simultânea das vias de MAPK e PI3K têm um mau prognóstico e são beneficiados pelo tratamento conjunto de inibidores de MAPK e PI3K (Irvine *et*

al., 2018). Nesse contexto, há forte interesse na descobertas de novos mecanismos capazes de induzir a co-ativação dessas vias.

1.4 Principais Etiologias

1.4.1 Mutações em BRAF

Mutações em BRAF ocorrem em cerca de 50 a 70% dos melanomas cutâneos e constituem a principal etiologia desse tipo de câncer (Thomas, 2006). Cerca de 30 mutantes de BRAF foram identificadas em tumores, sendo aproximadamente 90% com mutação localizada no segmento codificador para o sítio de ativação da proteína no éxon 15. Dentre essas mutações, as mais frequentes são V600E (troca de valina por ácido glutâmico) e menos frequentes V600K (troca de valina por lisina), e os outros 10% ocorrem em uma estrutura de Laço P codificado no éxon 11, também responsável por um segmento de ativação de BRAF. Mutações nesses dois segmentos do gene conferem uma atividade de quinase elevada por mutação ativadora constitutiva, dessa maneira, ativando constantemente a via de MAPK (Wan *et al.*, 2004).

A alta incidência de mutações em BRAF em pacientes com melanoma advém da importância de BRAF na biologia dos melanócitos, nos quais o Hormônio Estimulante de Melanócitos, alpha-melanocortina (α -MSH), ativa BRAF na cascata de sinalização da ERK, promovendo a proliferação celular (Garnett e Marais, 2004). Além das atividades conhecidas de BRAF^{V600E} como estimulador de MEK/ERK, diversas outras funções têm sido reportadas no contexto do câncer, como: potencial replicativo sem pontos de checagem, evasão de senescência e apoptose, invasão de tecidos e metástases (através de regulação positiva de várias proteínas envolvidas na migração, sinalização de integrinas, contractilidade celular), angiogênese (através da ativação de HIF-1 α e VEGF, dependente de MEK), bem como a evasão da resposta imune (Maurer *et al.*, 2011).

Essas características conferem ao melanoma portador de BRAF^{V600E} um comportamento agressivo, justificando seu mau prognóstico e alto índice de

mortalidade (Mandala e Voit, 2013). A alta incidência de mutações em BRAF e o fenótipo agressivo de melanomas portando mutações nessa proteína resultaram no desenvolvimento de drogas que visam inibir sua atividade oncogênica. Além disso, inibidores de BRAF^{V600} aumentam a imunogenicidade do tumor, permitindo tratamentos combinados com imunoterapias (Kudchadkar *et al.*, 2012), fomentando ainda mais investimentos nessa diretriz.

1.4.2 Mutações em RAS, NF1 e CDKN2A

Mutações em genes da família RAS que causam sua ativação constitutiva (Bis e Tsao, 2013) através da prevenção da hidrólise do GTP, resultam em uma estimulação constante das proteínas a jusante (Posch e Ortiz-Urda, 2013) e foram identificadas em 28% dos tumores de melanoma cutâneo, sendo a grande maioria das mutações em NRAS (Tcga, 2015).

O terceiro gene relacionado à via de MAPK mais mutado em melanoma é o NF1 que codifica a neurofibromina, uma proteína ativadora da GTPase que regula negativamente a atividade das proteínas RAS, acelerando a hidrólise do GTP ligado às mesmas. Mutações que induzem perda de função desta proteína foram descritas em 14% dos melanomas cutâneos e funcionam como uma alternativa para ativação da via de MAPK em melanoma (Tcga, 2015).

Por fim, devemos ressaltar o gene CDKN2A que codifica para o Inibidor 2A de Quinases Dependente de Ciclina, o qual foi o primeiro locus cuja mutação foi identificada como fator de risco para o melanoma familiar. Além disso, é uma mutação secundária comumente encontrada em conjunto com mutações em BRAF, RAS e NF1, necessária para burlar a senescência induzida por oncogene através da perda de supressor tumoral. O CDKN2A codifica duas proteínas supressoras de tumor diferentes, a p16INK4A e a p14ARF, ambas envolvidas na regulação do ciclo celular. A p16INK4 normalmente inibe as Quinases Dependentes de Ciclinas 4 (CDK4) e 6 (CDK6), impedindo assim a fosforilação da proteína do Retinoblastoma (pRB). A pRB, quando mantida no estado não fosforilado, permanece ligada

a fatores transcripcionais como o E2F, necessário para a transição G1/S, o que leva à parada do ciclo celular (De Snoo e Hayward, 2005).

A p14ARF, no entanto, exerce sua função supressora de tumor agindo como agonista de p53, uma vez que bloqueia a degradação de p53 induzida pela HDM2 (Minuto Duplo Humano 2), permitindo a apoptose e outros eventos de controle do ciclo celular (De Snoo e Hayward, 2005). A HDM2 é uma proteína ubiquitina-ligase que suprime a atividade transcripcional do supressor de tumor p53 e promove a sua degradação (Patel e Player, 2008).

1.5 Principais abordagens terapêuticas

A complexidade da etiologia do melanoma reflete na variedade de tratamentos disponíveis que inclui a remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo-direcionada e imunoterapia (Korn *et al.*, 2008; Balch *et al.*, 2009).

A excisão cirúrgica representa o tratamento de escolha quando o melanoma é diagnosticado no estágio inicial e é curativa na maioria dos casos. Nos pacientes com tumores em estágio avançado, aproximadamente um terço já tem envolvimento visceral e cerebral ao diagnóstico, com prognóstico grave e menor probabilidade de ter uma resposta ao tratamento (Ross e Gershenwald, 2011). Para esses pacientes as alternativas terapêuticas incluem inibidores da BRAF^{V600} e da quinase MEK, bem como inibidores dos pontos de verificação imunológico.

BRAF^{V600} por ser a mutação oncogênica mais comum em melanomas cutâneos resultou na primeira terapia alvo direcionada nesse câncer. Dentro desse contexto, inibidores de BRAF mutada, como o Vemurafenib (PLX4032) (Flaherty *et al.*, 2010) e Dabrafenib (Menzies *et al.*, 2012) foram desenvolvidos e, apesar da excelente remissão tumoral induzida nos meses iniciais de terapia, 90% dos pacientes apresenta recidiva da doença após 6 meses de tratamento, devido ao desenvolvimento de resistência adquirida (Mandala e Voit, 2013).

Na maioria dos casos, a resistência adquirida aos inibidores de BRAF ocorre devido à heterogeneidade do tumor. Esse fato pode ser explicado em virtude da existência de pequenas populações de células de melanoma capazes de sobreviver ao tratamento inicial, adquirindo resistência plena tipicamente depois de 3 a 6 meses após o início do tratamento (Paraiso *et al.*, 2010). Entre os diversos mecanismos de resistência adquirida ao tratamento com inibidores de BRAF mutada podemos ressaltar: 1- Superexpressão dos Receptores Tirosina Quinase (Nazarian *et al.*, 2010), em particular, o Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas - Beta (PDGFRB) e o Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1R) que estão implicados na ativação das vias PI3K/AKT por estimulação de mTOR, promovendo a progressão tumoral (Atefi *et al.*, 2011); 2- Amplificações genômicas de BRAF através de ganho em número de cópias do gene, aumentando a tolerância para as drogas (Shi *et al.*, 2012); 3- Mutações secundárias em outras proteínas da via de MAPK, como em NRAS, por exemplo, fazem com que proteínas alternativas à BRAF sejam ativadas, como demonstrado para a CRAF, permitindo a continuação da cascata de sinalização (Nazarian *et al.*, 2010; Atefi *et al.*, 2011). Além disso, mutações ativadoras constitutivas em MEK fazem com que esta quinase aja sem estimulação prévia de BRAF (Villanueva *et al.*, 2013). 4- Superexpressão de outras MAPK como COT (Oncogene de Câncer de Tireoide), uma agonista da via de MAPK capaz de ativar ERK por mecanismos ligados a MEK que não dependem da ativação prévia por BRAF (Johannessen *et al.*, 2010).

Tais mecanismos, majoritariamente, reativam a via de MAPK que exerce seu efeito através da proteína MEK, o que levou a uma segunda corrida de inibidores alvo direcionados para melanoma. Os inibidores de MEK como Cobimetinib e Trametinib, ao contrário dos inibidores de BRAF^{V600} tem como alvo a proteína MEK na sua forma nativa (não mutada), atuante em qualquer célula que a expressa. Dessa forma, atualmente, a principal utilização dos inibidores de MEK se dá pela administração combinada com inibidores de BRAF^{V600}, resultando em maior eficiência que a terapia com os inibidores utilizados individualmente (Long *et al.*, 2015).

Mais recentemente, os tratamentos imunoterápicos com anticorpos anti-CTLA-4 (Antígeno-4 associado ao Linfócito T Citotóxico) e anti-PD1 (receptor 1 de morte celular programada), conhecidos, respectivamente, como Ipilimumab e Nivolumab, mostraram resultados promissores como tratamentos adicionais no combate ao melanoma. Sua atuação baseia-se no bloqueio da regulação negativa das células T citotóxicas induzida pelas células tumorais a fim de burlar o sistema imune, ao subverter um mecanismo de proteção do organismo contra doenças autoimunes. Dessa forma, tais anticorpos bloqueiam os receptores de regulação negativa das células T citotóxicas, mantendo-as ativas por mais tempo. Essa abordagem terapêutica, resultou em uma progressão livre de doença de 11.5 meses e um sobrevida geral maior que 37 meses para tratamento combinando de Ipilimumab e Nivolumab (Wolchok *et al.*, 2017), enquanto o tratamento de Dabrafenib + Trametinib resulta em progressão livre de doença de 11.4 meses e uma sobrevida geral de 25.1 meses (Long *et al.*, 2015).

1.6 RNAs longos não codificantes em melanoma

Visto que os mecanismos moleculares e epigenômicos responsáveis pelo processo tumoral do melanoma ainda não são completamente conhecidos e que as terapias disponíveis no combate ao melanoma ainda apresentam limitações quanto a sua eficácia e duração, é imprescindível continuar a caracterização dos eventos moleculares que sustentam esse câncer. Além disso, é desejável identificar marcadores moleculares expressos em distintas fases da progressão tumoral que auxiliem no direcionamento do tratamento e na avaliação prognóstica (Mandala e Voit, 2013).

Dentre os marcadores moleculares com melhor especificidade encontram-se genes que possuem expressão restrita a tecidos tumorais, os quais, além de constituírem potentes ferramentas diagnósticas e prognósticas, são especialmente importantes para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Sousa *et al.*, 2010). Nos últimos anos, com o avanço das técnicas

moleculares, um categoria de RNAs, os RNAs longos não codificantes (lncRNAs), está sendo detalhadamente caracterizada.

Os lncRNAs são definidos como transcritos de mais de 200 nucleotídeos que não codificam proteínas. São, em sua maioria, genes com pouca conservação (basicamente restrita à primatas), sua expressão apresenta alta especificidade celular e podem ser classificados de acordo com a sua localização genômica e biogênese: quando expressos a partir de regiões intergênicas, são denominados lincRNAs; de genes vestigiais que perderam sua capacidade de codificação de proteína (ncRNAs transcritos por pseudogenes); da fita oposta de mRNA (lncRNA antisense); ou podem ser gerados pela maquinaria de *splicing* a partir de genes codificadores de proteína (Goedert *et al.*, 2015). Os lncRNAs estão virtualmente localizados em todos os compartimentos subcelulares, o que garante uma diversidade de funções. Suas contribuições biológicas foram descritas em variados processos como: reguladores da transcrição em *cis* ou *trans*; sequestradores de microRNAs; moduladores de cromatina; reguladores do processamento de mRNA, controladores do processo de tradução e eventos pós-traducionais; além de participar de complexos multiproteicos, entre outros (Sanchez Calle e Kawamura, 2018).

No melanoma, diversos lncRNAs exercem funções fundamentais para o processo tumorigênico, como SAMMSON que é essencial para o direcionamento de proteínas mitocôndrias para a mitocôndria através da sua interação com a proteína p32, auxiliando o funcionamento normal dessa organela (Leucci *et al.*, 2016); o lncRNA SLNCR1 que medeia a invasão do melanoma atuando como estabilizador do complexo formado pelos fatores transicionais AR e Brn3a (Schmidt *et al.*, 2016); e o lncRNA UCA1 que induz a proliferação do melanoma através do sequestro do miR-507, aumentando a disponibilidade de FOXM1 (Wei *et al.*, 2016).

Nesse contexto, há grande entusiasmo quanto ao potencial de utilização de inibidores de lncRNAs para o tratamento terapêutico como agentes

monoterápicos ou como complemento à terapias já existentes. Exemplo disso foi demonstrado através da inibição de SAMMSON em conjunto com o fármaco Dabrafenib (inibidor de BRAF^{V600}), onde a remissão do volume tumoral em camundongos xenotransplantados com células de melanoma alcançou o dobro de eficiência quando comparado ao uso de Dabrafenib como monoterapia (Leucci *et al.*, 2016). É importante salientar que a principal barreira da efetiva utilização de diversos fármacos como oncoterápicos são os efeitos adversos, que no caso dos lncRNAs podem ser prevenidos, dada sua expressão tecidual restrita. Diversos fármacos produzem eventos indesejáveis provenientes da inibição dos alvos em células normais que naturalmente os expressam, enquanto que a alta especificidade tecidual dos lncRNAs (muitas vezes são expressos somente em patologias específicas) eventualmente garantirá atuação específica (Hulstaert *et al.*, 2017).

Neste contexto e com intuito de identificar genes com expressão restrita a melanoma, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma ferramenta de bioinformática chamada *EST2TSE (EST to Tissue Specific Expression)* que identificou 29 clusters de EST (Expressed Sequence Tags) do Unigene originados exclusivamente de melanoma (Sousa *et al.*, 2010). Dentre esses 29 clusters foram escolhidos alguns genes putativos para validação experimental, entre eles RMEL3 (*Restricted to Melanoma 3*), o qual confirmou sua expressão enriquecida em melanoma em um pequeno painel de células e tecidos.

Análises de bioinformática demonstraram sua conservação em primatas e localização na região 5q11.2, sendo formado por múltiplos éxons (Sousa *et al.*, 2010). Além de apresentar ORFs (*Open Reading Frames*) pequenas e baixo potencial codificante, outras características reforçam a hipótese que o RMEL3 constitui um RNA longo não codificante, como, por exemplo, o fato de possuir expressão tecido específica e não ser conservado em outros grupos além dos primatas. Embora os transcritos de lncRNAs pareçam ser menos conservados do que RNAs que codificam proteínas, as regiões promotoras dos lncRNAs são frequentemente conservadas, assim como os promotores de muitos genes codificadores de proteínas (Pang *et al.*, 2006; Derrien *et al.*, 2012). Essa

característica garante sua importância no contexto fisiológico saudável e em condições patológicas, especialmente no surgimento e progressão do câncer.

2. Objetivo

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar o RMEL3 quanto a sua estrutura gênica, atividade transcricional e funções moleculares, tendo como objetivos específicos:

- 1) Determinar as múltiplas isoformas produtos do Locus RMEL3 e suas localizações subcelulares em células de melanoma.
- 2) Buscar e estabelecer correlações quanto a sua expressão e o perfil de mutações, transcriptoma, miRNAs, metilação e dados clínicos de um painel de 475 pacientes de melanoma do TCGA.
- 3) Determinar os conjuntos de transcritos correlacionados direta ou inversamente com RMEL3 em amostras de melanoma do TCGA e compará-los com os transcritos desregulados em função do silenciamento de RMEL3 em uma linhagem de melanoma (A375-SM), buscando determinar o possível envolvimento do RMEL3 com vias de sinalização e processos celulares relevantes em melanoma, especialmente a regulação de componentes chave das vias de MAPK e PI3K.
- 4) Determinar o efeito do silenciamento do RMEL3 sobre os aspectos clínicos correlacionados a esse lncRNA que foram identificados nos dados do TCGA.
- 5) Determinar possíveis proteínas ligantes do lncRNA RMEL3 em células de melanoma

3. Metodologia

3.1 Chipseq

Os dados de CHIPseq foram pesquisados e acessados através do banco CistromeDB (Zheng *et al.*, 2019). Os dados de H3K27ac nas linhagens A375 (Zhou *et al.*, 2016), SKMEL28 (Verfaillie *et al.*, 2015) e CHL-1 (Gelato *et al.*, 2018), os dados de H3K4me3 da linhagem MelJuSo (Pang *et al.*, 2013) e os dados de POLR2A nas células A375 (Tan *et al.*, 2016) foram visualizados pelo Genome Browser.

3.2 Cultivo Celular

As linhagens de melanoma SKMEL28 e WM902B foram cultivadas em meio RPMI e a linhagem A375 em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As linhagens de melanoma A375R e SKMEL28R, que são resistentes ao PLX4032, foram cultivadas no mesmo meio das suas respectivas linhagens parentais acrescido de 100nM de PLX4032. A linhagem HEK-293T de rim embrionário humano, foi utilizada para a produção de partículas lentivirais e foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino. Todas as linhagens citadas foram mantidas em estufa úmida contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

3.3 Extração do RNA de células de melanoma

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies). As células foram lavadas com PBS 1X gelado e foi acrescentado 1 mL de Trizol para cada 10 cm² de diâmetro da placa de cultivo celular pelo tempo necessário para que as células fossem lisadas. O material foi transferido para tubo de centrífuga de 1,5 mL ao qual foram acrescentados 200 µL de clorofórmio (Merck) para cada 1mL de Trizol utilizado, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. Após incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, o material foi centrifugado a 12000 xg por 15 minutos, à 4°C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo de centrífuga ao qual foram

acrescentados 500 μ L de álcool isopropílico (Fisher) gelado, seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 12000 xg por 10 minutos para precipitação do RNA. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. Após centrifugação a 12000 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o tubo ficou sobre a bancada invertido por 10 minutos para a secagem do precipitado de RNA. O RNA foi diluído em 15 μ L de água tratada com DEPC (Diethyl pirocarbonato – Sigma-Aldrich).

3.4 Tratamento com *DNase I*

Para eliminar eventual contaminação com DNA genômico, todo o volume de RNA extraído no passo anterior foi tratado com DNase I (DNA free™ - Ambion) em tampão DNase I 10X num volume reacional de 20 μ L, por 30 minutos a 37°C. Após este período foram adicionados 1 μ L do reagente inativador e seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Prosseguiu-se com uma centrifugação a 10000 xg por 1 minuto e 30 segundos. O RNA tratado presente no sobrenadante foi transferido para um tubo novo e quantificado por espectrofotometria.

3.5 Transcrição Reversa

Para síntese do cDNA, foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) a partir de 500 ng de RNA total tratado com DNase. Para síntese do cDNA, o RNA foi misturado a 2 μ L do tampão de reação (10X) da transcriptase reversa, suplementado com 0,8 μ L do mix de dNTPs (25X), 2 μ L de *primer* randômico (10X) e 1 μ L da enzima *Multiscrib RT™*, em um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas e a transcriptase reversa foi inativada por aquecimento a 85°C por 5 minutos.

3.6 Real Time PCR

Para o ensaio de PCR em tempo real foi utilizado o agente intercalante *SYBR Green*. Quantidades iguais de cada cDNA foram utilizadas para verificar a expressão dos genes utilizando *primers* específicos e *SYBR Green PCR Power Mix 2x (Bioline, USA)* como agente detector. Para evitar ampliações de produtos não desejáveis, todos os *primers* foram desenhados flanqueando regiões intrônicas. O valor de *cycle threshold* (Ct) foi convertido para a expressão relativa de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando TBP (*tata binding protein*) como controlo endógeno.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados para o qRT-PCR.

Transcrito	Primer Senso (5'>3')	Primer Antisenso (5'>3')
RMEL3 Long	AGCCTTTCTGGGGACAAATGA	TTCTGCAGTGCCATCGTCT
RMEL3 Iso 2	GGATATGACTCAGTAGAATGCTGAT	CCATCGTCTGTTCCAGCCTT
LOC only	CCTGCCTGGTGAGGTCTCTA	CCATGCCTGCCTCAGGAAAT
RMEL3 Circular	AGCCCATGTGCTCCAAGAAA	TGGAACGAAATCCTCCCCTC
RMEL3 All	GAGGGGAGGATTTTCGTTCCA	TTCCTCTGGTTTTTCTTGGAGCA
RMEL3 RT	ATGTGCTCCAAGAAAACCAGAG	CTTTGTACAGGAATACCCAAC
TBP	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA
circHIPK3	ATGTTGGTGGATCCTGTTTCG	CCAAGACTTGTGAGGCCATA
circTXN7	TGAGGCTTCCAAACTTCCTG	CCGCTCCGACATTCTTTCC
16S	CTCGATGTTGGATCAGGACA	CCTGGACTCCGGTCTGA
MALAT1	AAAGCAAGGTCTCCCCACAAG	GGTCTGTGCTAGATCAAAAGGCA
TINCR	TGTGGCCCAAACCTCAGGGATACAT	AGATGACAGTGGCTGGAGTTGTCA
SAMMSON	CCTCTAGATGTGTAAGGGTAGT	TTGAGTTGCATAGTTGAGGAA

3.7 Digestão de RNA total com o RNase R

A quantidade de 5 µg de RNA total foi digerida com 5U de RNase R (ABM) por 30 min a 37°C em um volume final de 20 µL. O RNA foi precipitado novamente com a adição de 80 µL de H₂O, 10 µL de acetado de Na 3 M e 250 µL de etanol absoluto e incubado durante 14 horas a -80°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 16800 xg por 20 minutos a 4°C e o pellet de RNA foi ressuspendido em 12 µL de H₂O.

3.8 Fracionamento subcelular

Os extratos nucleares e citoplasmáticos totais foram isolados de placas de cultivo celular de 20 cm de diâmetro usando o Nuclei EZ prep (Sigma-Aldrich) de acordo instruções do fabricante. qRT-PCR para MALAT1 (enriquecido no núcleo) e 16S (enriquecido no citoplasma) foram usados para avaliar a pureza das frações.

3.9 Hibridização *in situ* por fluorescência de RNA (RNA-FISH)

Para a detecção do RMEL3 no nível intracelular, um conjunto de 5 sondas de DNA marcadas com 5' Cy3 (5'>3' GAGAACAAGTCTGGGAGAGT, CTCATTGTCCCCAGAAAG, GGATCGGCTGTTCTCAAAT, ACATAAGATTCTGCAGTGCC, CTGATGGAACGAAATCCTCC) foi desenhado utilizando o software *Stellaris Probe Designer* (Biosearch Technologies). As células foram cultivadas em lâminas e fixadas em paraformaldeído a 4% durante 10 min à temperatura ambiente e permeabilizadas em etanol a 70% durante 1 hora a 4°C. A hibridização foi realizada durante a noite a 37°C em 2X SSC (Citrato de Sódio Salino), formamida a 10% e dextrano a 10%. As células foram contrastadas com DAPI e visualizadas usando um Nikon C2.

3.10 Análise dos dados do TCGA

As informações clínicas, de exoma e de variação no número de cópias gênicas dos pacientes de melanoma e de outros cânceres do TCGA foram obtidos diretamente da plataforma online do TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) em dezembro de 2015 ou através da plataforma CbioPortal (Gao *et al.*, 2013).

A quantificação gênica do dados de RNAseq foi realizada com o software RSEM (Li e Dewey, 2011). Foram adicionadas as posições dos éxons de RMEL3 Long (GRCh37): éxon1 (CHR5: 56,690,887-56,691,005), éxon2 (CHR5: 56,789,902-56,790,052), éxon3 (CHR5: 56,792,607-56,792,744) e éxon4 (CHR5: 56,828,763-56,829,251) para quantificar o nível de expressão desse gene. Os

dados brutos de RNAseq do projeto do TCGA foram baixados da plataforma Cancer Genomics Hub (CGHub) (Wilks *et al.*, 2014).

O portal do MD Anderson MBatch foi utilizado para verificar se havia algum efeito de lote (*batch effect*) e nenhum efeito significativo foi encontrado (<http://bioinformatics.mdanderson.org/main/TCGABatchEffects:Overview>). Para comparar os níveis de expressão, foi utilizada a unidade de transcritos por milhão (TPM) (Wagner *et al.*, 2012) obtidos como resultado da quantificação pelo software RSEM. Os dados de expressão dos melanócitos (GSE38495) foram obtidos a partir de (Ramskold *et al.*, 2012). Para análise da expressão diferencial entre os grupos de RMEL3 High e Low foi utilizado o pacote EdgeR (Robinson *et al.*, 2010). Em todas as análises diferenciais, os valores-p foram ajustados para taxa de falsa descoberta (FDR) <0,05 como método de correção de teste de múltiplas hipóteses. A ontologia gênica foi avaliada com DAVID (Huang Da *et al.*, 2009) e o enriquecimento de vias com *Ingenuity Pathway Analysis* e KEGG (Kanehisa, 2002).

Todos os dados de metilação de amostras de tecido tumoral utilizados no estudo foram coletadas do banco de dados público TCGA na versão legacy, disponíveis até junho de 2017. Esses dados foram gerados pelo arranjo de metilação de DNA Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array, nível 4 do TCGA, contendo valores de Beta Metilação para aproximadamente 450.000 sondas do genoma referência humano hg19. Os valores de metilação foram baixados através do pacote R/Bioconductor TCGAbiolinks (Colaprico *et al.*, 2016) e a diferença de metilação entre os grupos foi aferida através do Teste não paramétrico de Wilcoxon, com a função `wilcox.test`. Os valores-p foram corrigidos pelo teste de hipótese múltipla False Discovery Rate (FDR) a 1%.

3.11 Tratamento em células de melanoma com PLX4032

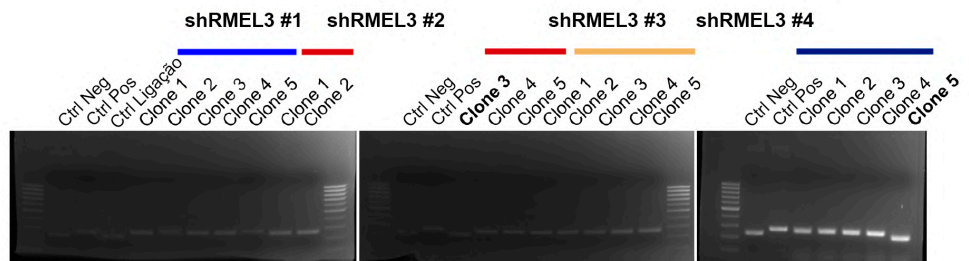
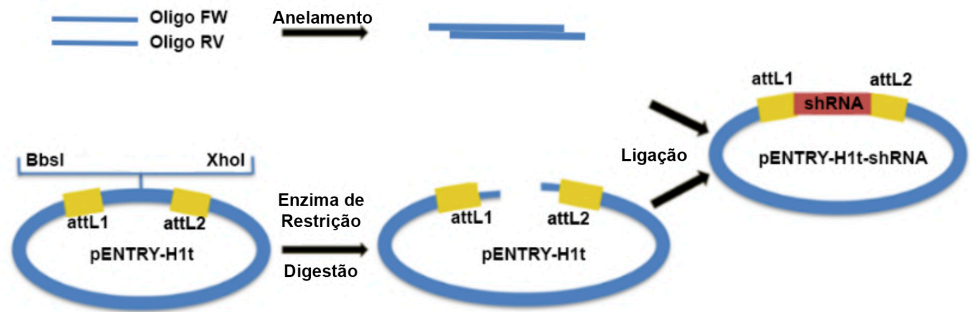
As células de melanoma A375, SKMEL28 e WM902B foram tratadas com a droga PLX4032 ou DMSO que inibe BRAF^{V600} por um período de 48 horas nas concentrações de 0.5 uM e 1 uM.

3.12 Clonagem

Para a abordagem de silenciamento, oligonucleotídeos que representam os shRNAs para RMEL3 #1 (CCACTGCAGGGTTTCAGTCACATGA), #2 (GCCGATCCGAATGCTGATTGA), #3 (GCTGATTGAATTGGCTTCTCA) e #4 (GGGAATGGCTATCATTGATGA) foram anelados com tampão de anelamento (100 mM KAc, 30 mM HEPES-KOH pH 7,4 e 2 mM MgAc) e ligado a um vetor pENTRY-H1t digerido (BbsI e XhoI). O vetor ligado foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* DH5a (Thermo Fisher) e as bactérias transformadas foram selecionadas por crescimento durante a noite em placas de LB ágar contendo Kanamicina. Uma análise por PCR (*primer* senso 5'>3' GACATAATAGCAACAGAC e *primer* antisenso 5'>3' TTGGAGCGGGTTGATGAC) foi conduzida para identificar os clones positivos (Figura 3, passo 1). Os plasmídeos positivos foram enviados para sequenciamento para garantir a integridade da sequência do shRNA. Um clone positivo foi usado para realizar a reação LR (abordagem gateway - Thermo Fisher) de acordo com as instruções do fabricante com o vetor FH1T-ccDb induzível por Doxíciclina, seguido de transformação bacteriana, seleção de crescimento (ampicilina), análise de PCR (mesmo *primers* utilizados anteriormente, Figura 3, passo 2) e sequenciamento.

Clonagem dos shRNAs

Passo 1



Passo 2

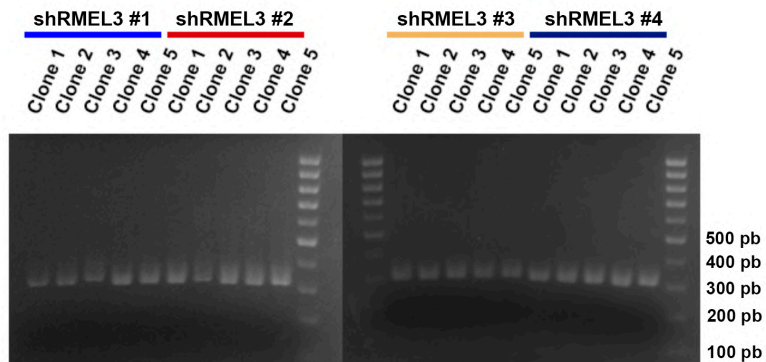
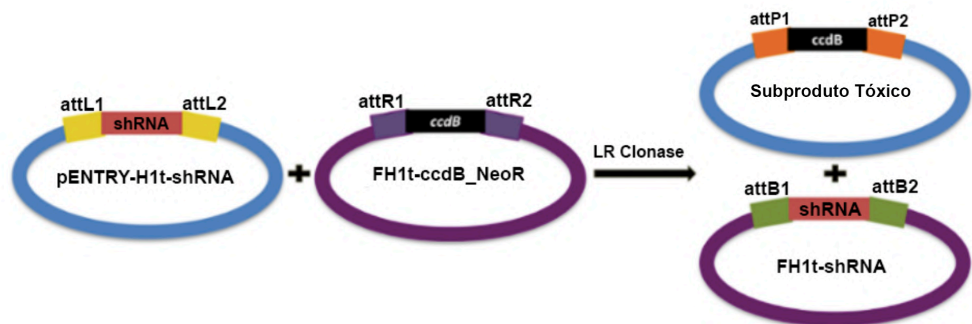


Figura 3: Ilustração representativa da abordagem de clonagem de gateway, onde os oligonucleotídeos com a sequência alvo do shRNA foram anelados e ligados ao pENTRY-H1t digerido (BbsI e XhoI) e os clones resultantes foram analisados por PCR (passo 1, clones com nomes em negrito significa que eles eram negativos). Após a confirmação por sequenciamento, o plasmídeo pENTRY-H1t + shRNA foi clonado por LR no vetor FH1t de destino. O clone

negativo carregaria o gene ccDB tóxico, portanto, não cresceria na placa de seleção. Os clones bacterianos que cresceram foram analisados por PCR, mostrando que todos os clones eram positivos para o shRNA (passo 2), os quais foram confirmados por sequenciamento.

3.13 Produção e transdução de partículas lentivirais

O sistema de produção de lentivírus de 3ª geração foi utilizado em células HEK-293T semeadas em placa de 6 poços. Para tal abordagem, inicialmente foi adicionado 9 µl de PEI (Polietilenoimina) a 50 µl de Opti-MEM (Thermo) e incubado por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 525 ng do plasmídeo pHCMVg, 375 ng do plasmídeo pDMLg/pRRE e 600 ng do plasmídeo pRSV-Rev e 1,5 µg do plasmídeo de interesse (contendo o shRNA) com 50 µl de Opti-MEM. Em seguida, o PEI incubado com Opti-MEM foi adicionado à mistura de plasmídeos e incubado por 20 min à temperatura ambiente. Essa solução foi adicionada às células e a placa de cultivo contendo as células foi centrifugada a 900 xg por 20 min à temperatura ambiente. Após 8h de transfecção o meio das células foi trocado por meio DMEM suplementado com 30% de soro fetal bovino. O meio de cultura das células contendo o lentivírus foi coletado em 48h e 72h horas após a transfecção e foi filtrado com filtro 0,45 µm. Um volume de 1 ml de meio contendo o lentivírus foi usado para transduzir células A375 com 1 µl de Polibreno (Sigma). As células transduzidas com os shRNAs foram selecionadas com 800 µg/ml de G148 (Invivogen) por 7 dias.

3.14 Ensaio clonogênico

As células expressando os diferentes shRNAs tendo como alvo o RMEL3 foram semeadas em placas de 6 poços (1000 ou 50000 células/poço) e cultivadas durante 4 ou 8 dias em estufa úmida à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ sob indução de 200 ng/ml de Doxíciclina para expressão do shRNA contra o RMEL3. Subsequentemente, as células foram simultaneamente fixadas e coradas com 30% metanol e com solução de cristal

violeta 0,5% por 15 minutos para visualização de colônias. As colônias foram fotografadas e contadas para determinar a percentagem de clonogenicidade.

3.15 Ensaio de migração

As células expressando os diferentes shRNAs tendo como alvo o RMEL3 foram semeadas em placas de 96 poços (1000 células/poço) e cultivadas até atingirem 95% de confluência. Utilizando um ponteira de plástico estéril, foi feita uma ranhura (remoção das células nesse área do risco) no centro de cada poço, seguida de duas lavagens com PBS e adição de meio DMEM com soro fetal bovino reduzido a 1%, a fim de criar ambiente com escassez de nutrientes e propício a migração celular. As células foram mantidas em estufa úmida à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ sob indução de 200 ng/ml de Doxiciclina para expressão do shRNA contra o RMEL3 e fotografadas logo após a realização da ranhura e 24h e 48h depois.

3.16 *Pulldown* do RMEL3

Para o *pulldown* do RMEL3 e suas proteínas ligantes, 100 µg de Beads de *Streptavidin Sepharose High Performance* (GE Healthcare) foram lavadas por 3 vezes no tampão de *pulldown* (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂) e, em seguida, foram acopladas a 500 pmol de 4 sondas biotinizadas (5'>3' GAGAACAAGTCTGGGAGAGT, CTTCATTTGTCCCCAGAAAG, GGATCGGCTGTTCTCAAAT, CCACTGCAGGGTTTCAGTCACATGA) contra RMEL3 durante 16h a 4°C. Um total de 200 x10⁶ células por amostra foram lisadas em 3 ml de tampão (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 60 U Superase-In por ml (Ambion), 1 mM ditioneitol (DTT) e um coquetel de inibidores da protease) e incubados durante 2:30h a 4°C em rotação. O complexo *beads*/sondas/RNA capturado foi lavado 4 vezes no mesmo tampão (precipitado por centrifugação a 3000 xg por 3 min e depois ressuspendido no tampão), as amostras foram divididas em duas, uma seguida por extração de RNA em trizol e a outra alíquota foi fervida por 15 min a 85°C

com 120 μL de tampão de amostra (2X). A fração contendo as proteínas foi extraída recolhendo o sobrenadante após centrifugação da amostra a 3000 xg durante 3 min. Como controle negativo, foram utilizadas 4 sondas contra PCA3 (5'>3' GCACTTGCTATTTCTTCTGT, CTCTGTTTTTCTGATGCCAG, GCTGCAGCCACACAAATCTC, ATGCAGATCTTCCTGGTCTC), um lncRNA não expresso em melanoma.

3.17 Espectrometria de massas

As amostras obtidas no ensaio de *pulldown* RMEL3 foram processadas por uma curta separação em gel de SDS-PAGE (Biorad) para remover contaminantes. Após a excisão, lavagem e secagem da banda de gel, foi adicionado tampão de digestão (50 mM NH_4HCO_3 , 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tripsina) para submergir totalmente a banda do gel seco e a amostra foi digerida durante 16h a 37°C. As misturas de peptídeos geradas foram acidificadas, secas e redissolvidas numa solução a 2% de CH_3CN (Acetonitrilo) e 0,1% de ácido fórmico. Em seguida a solução peptídica foi introduzida em um sistema de espectrometria de massas em tandem de cromatografia líquida (LC-MS/MS) e executada conforme descrito anteriormente (Leucci *et al.*, 2016).

3.18 Análise estatística e confecção de gráficos

Nos gráficos que contêm um número de amostras suficientes, os dados foram testados para a normalidade de distribuição através do *D'Agostino-Pearson omnibus normality test*. Nos casos de distribuição normal, o teste paramétrico t de student foi utilizado. Nos casos de distribuição não-normal, o teste não paramétrico de U de Mann-Whitney foi aplicado. Para as comparações com mais de um grupo com amostras independentes foi utilizado o teste de one-way ANOVA ou teste de Friedman de acordo com a distribuição dos dados. Como padrão, no gráficos que aparecem asteriscos, interpreta-se: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Para a confecção dos gráficos de box-plot e volcano plot foi utilizado o software Graphpad Prism 7. Para os gráficos de

Heatmap foi usada a função de Heatmap.2 do pacote gplots no ambiente R e a ferramenta online ClustVis, a qual também foi utilizada para o gráfico de PCA (Análise de Componentes Principais).

4. Resultados

4.1 O locus do RMEL3

Em contraste com os mRNAs, os lncRNAs geralmente apresentam uma menor conservação de sequência primária entre as espécies e exibem uma expressão tecido-específica, além de apresentar uma média de 2.3–3.9 isoformas por locus (Ziegler e Kretz, 2017). Todas essas características culminam em uma complexidade na análise dos lncRNAs e isso é refletido na diferença de anotação dos lncRNAs em diferentes repositórios (Ngoc *et al.*, 2018).

O locus do RMEL3 abriga diversos transcritos. Quando consideramos a anotação do banco de dados do ENSEMBL (Chen *et al.*, 2010), há descrito somente a forma mais longa do RMEL3 (RMEL3 Long - 897 pb) que possui 4 éxons (ENST00000506106.1) e é considerado um lncRNA antisense devido a presença do gene codificante de proteína ACTBL2, o qual é transcrito da fita negativa. Entretanto, outro banco de anotações especializado em lncRNAs, o LNCipedia (Volders *et al.*, 2019), descreve a presença de uma isoforma mais curta do RMEL3 que possui 394 pb, o qual chamamos de RMEL3 Iso 2. Adicionalmente, encontramos a descrição de um isoforma de formato circular no banco de dados circBASE (Glazar *et al.*, 2014), o qual chamamos de RMEL3 Circular e é constituído pelos éxons 2 e 3 do RMEL3 Long e que são compartilhados pelos demais transcritos. Finalmente há também a presença de um transcrito predito como lncRNA chamado LOC102724122 no NCBI (Ncbi, 2018) que sobrepõe-se aos éxons 2, 3 e 4 do RMEL3 Long (Figura 4).

Visto a complexidade do locus do RMEL3, conduzimos uma análise de dados de CHIPseq disponíveis no banco de dados Cistrome Data Browser (Zheng *et al.*, 2019). Utilizamos como proteínas alvo a H3K27ac (proteína Histona 3 acetilada no resíduo de lisina da posição 27) que indica elementos regulatórios ativos como *enhancers* (Creyghton *et al.*, 2010); a proteína H3K4me3 (proteína Histona 3 trimetilada no resíduo de lisina da posição 4) associada a promotores ativos (Lauberth *et al.*, 2013); e a POLR2A (subunidade

A da RNA polimerase II) como forma a identificar a região promotora e o local de início de transcrição do RMEL3.

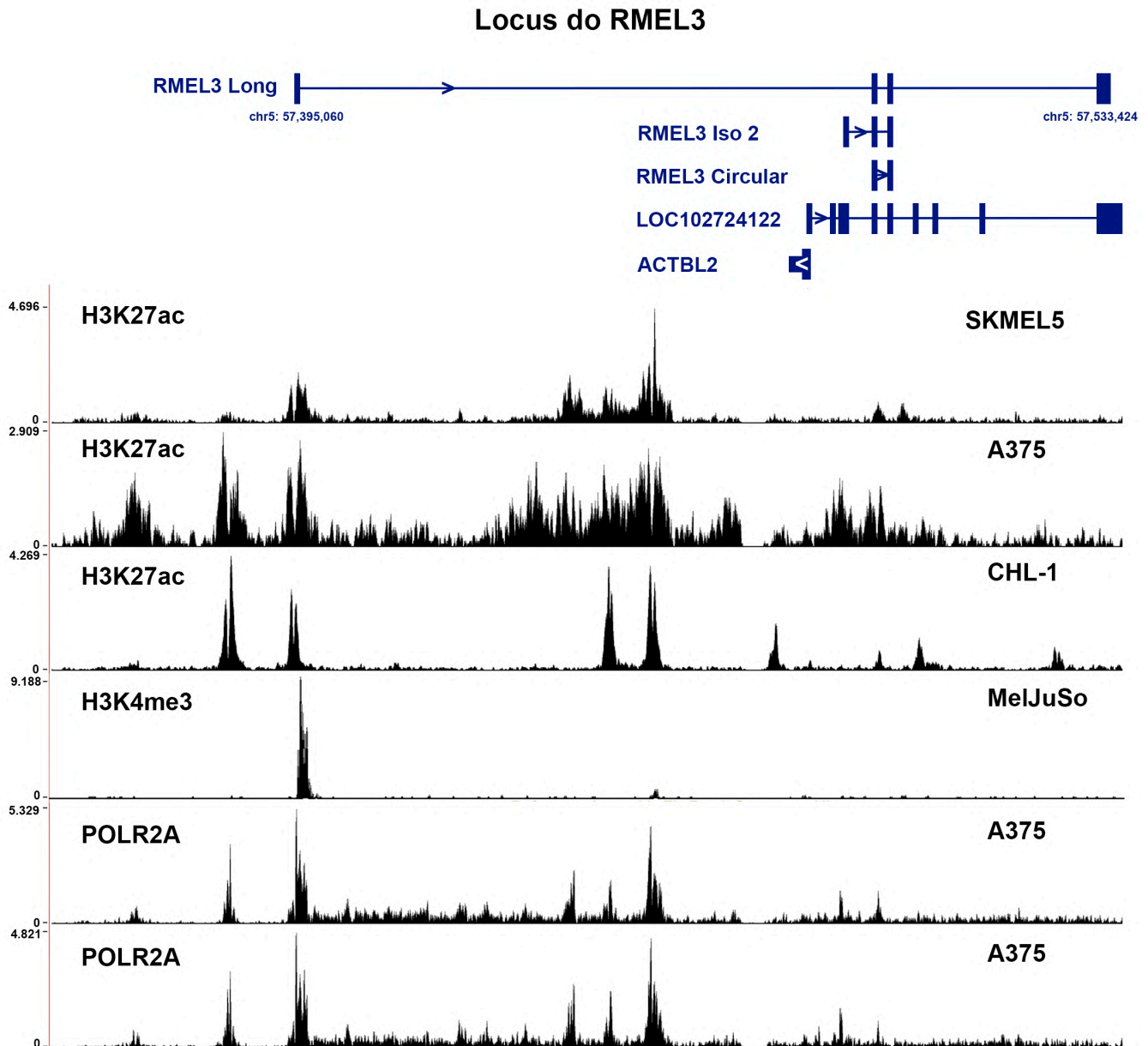
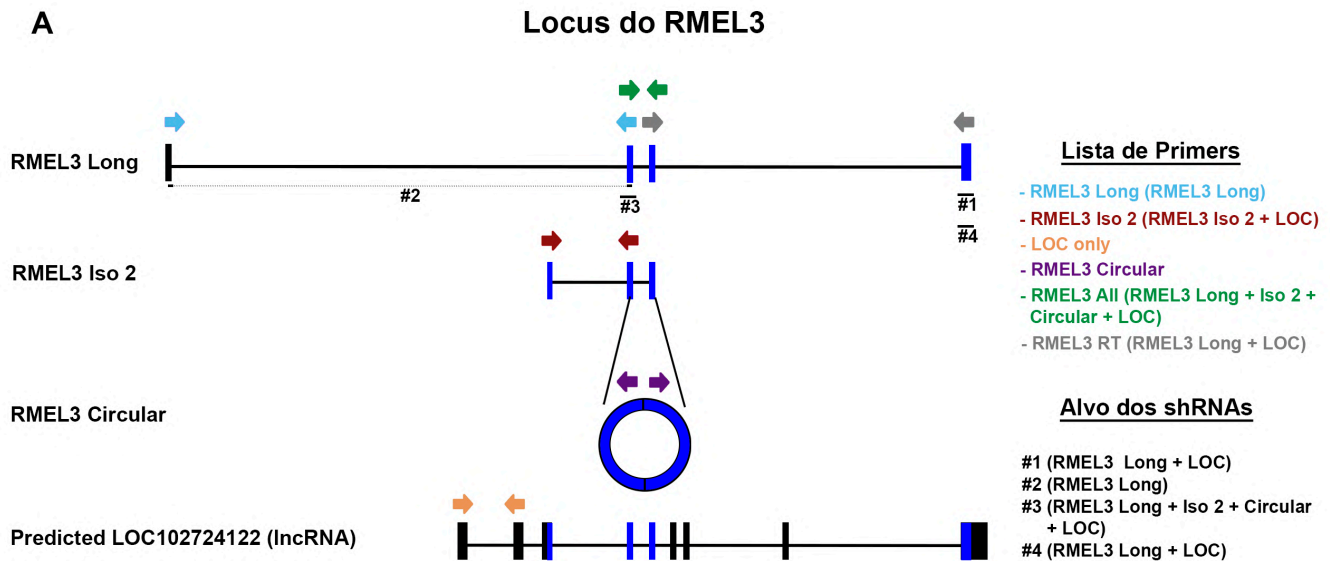


Figura 4: Parte superior da imagem é a representação gráfica da organização éxon/intron dos diferentes transcritos primários do locus do RMEL3. Parte inferior da imagem apresenta dados de CHIPseq para H3K27ac e H3K4me3 que são comumente encontradas em regiões com transcrição ativa e POLR2A que indica o sítio de início de transcrição. À direita de cada gráfico de CHIPseq está indicada a linhagem celular utilizada no experimento.

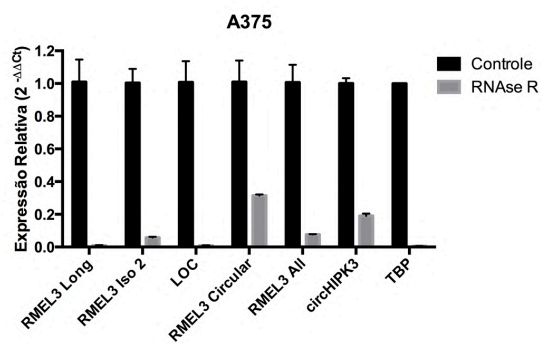
Notavelmente, para o transcrito RMEL3 Long, há um pico bem definido de cada uma das proteínas marcadoras (H3K27ac, H3K4me3 e POLR2A) que se sobrepõe ao primeiro éxon dessa isoforma, o que indica uma região transcricionalmente ativa, possivelmente correspondente ao seu promotor. Entretanto, nota-se também um pico igualmente definido na região a montante ao local do primeiro éxon para as proteínas H3K27ac e POLR2A (Figura 4). Tal característica pode denotar a presença de uma região promotora alternativa ou a presença de um *enhancer*, ambos conhecidos por aumentar a complexidade dos padrões de transcrição temporal e espacial (Landry *et al.*, 2003). Para os demais transcritos, as definições dos picos são menos pronunciadas e há também a presença de picos no íntron 1 do RMEL3 Long, os quais estão muito distantes do início dos demais transcritos, o que demonstra a complexidade do locus (Figura 4).

4.2 Expressão e localização subcelular dos transcritos

Feito a caracterização genômica inicial do locus de RMEL3, utilizamos diferentes pares de *primers* de qRT-PCR para avaliar o perfil de expressão dos transcritos (Figura 5A). Primeiramente, validamos a existência do formato circular do RMEL3. Para tal finalidade, digerimos extratos de RNA total com RNase R, conhecida por degradar RNAs lineares, e, como podemos observar, os níveis detectados do RMEL3 circular são equiparáveis ao RNA circular circHIPK3 (Zheng *et al.*, 2016), utilizado como controle positivo (Figura 5B). Posteriormente, avaliamos o grau de expressão das diferentes isoformas de RMEL3 em 3 linhagens de melanoma. O RMEL3 Long é o transcrito detectado em maior abundância nas linhagens testadas. As demais isoformas apresentam expressão reduzida, enquanto o LOC102724122 possui expressão ínfima (Figura 5C). A transcrição elevada de RMEL3 Long, aliada às marcas bem definidas de H3K27ac, H3K4me3 e POLR2A (Figura 4), possivelmente indicam que esse seja o transcrito canônico do locus.



B



C

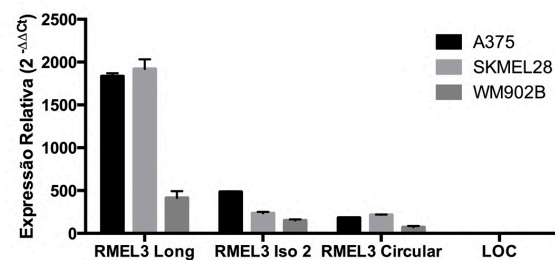


Figura 5: A. Representação gráfica dos transcritos primários do locus do RMEL3 dispondo seus íntrons (linhas) e éxons (retângulos). As regiões de éxons compartilhadas por mais de um transcrito estão coloridas em azul. São representadas as regiões de reconhecimento dos *primers* e shRNAs utilizados. **B.** Expressão relativa dos transcritos do locus RMEL3 medida por qRT-PCR e calculado com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando circATXN7 como controle endógeno na linhagem de melanoma A375 tratada com RNase R para confirmação da existência de transcrito em formato circular. O gráfico representa a média \pm SEM (desvio padrão da média) de 3 replicatas biológicas. **C.** Expressão relativa dos transcritos do locus RMEL3 medida por qRT-PCR e calculada com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando TBP como controle endógeno em diferentes linhagens celulares de melanoma. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 replicatas biológicas.

Como está se tornando amplamente conhecido, os lncRNAs exercem diferentes funções dentro das células através de uma diversidade de mecanismos moleculares. Durante o processo de caracterização de um lncRNA, é importante identificar sua localização subcelular, devido ao fato de que suas

funções são geralmente relacionadas à sua localização na célula, o que pode fornecer pistas úteis ou uma visão preliminar de suas funções biológicas. Desta forma, realizamos um experimento de fracionamento subcelular e identificamos que o transcrito RMEL3 Long e o RMEL3 Iso 2 são igualmente distribuídos entre núcleo e citoplasma, enquanto o RMEL3 Circular é altamente enriquecido na fração citoplasmática e o LOC é exclusivamente nuclear (Figura 6A).

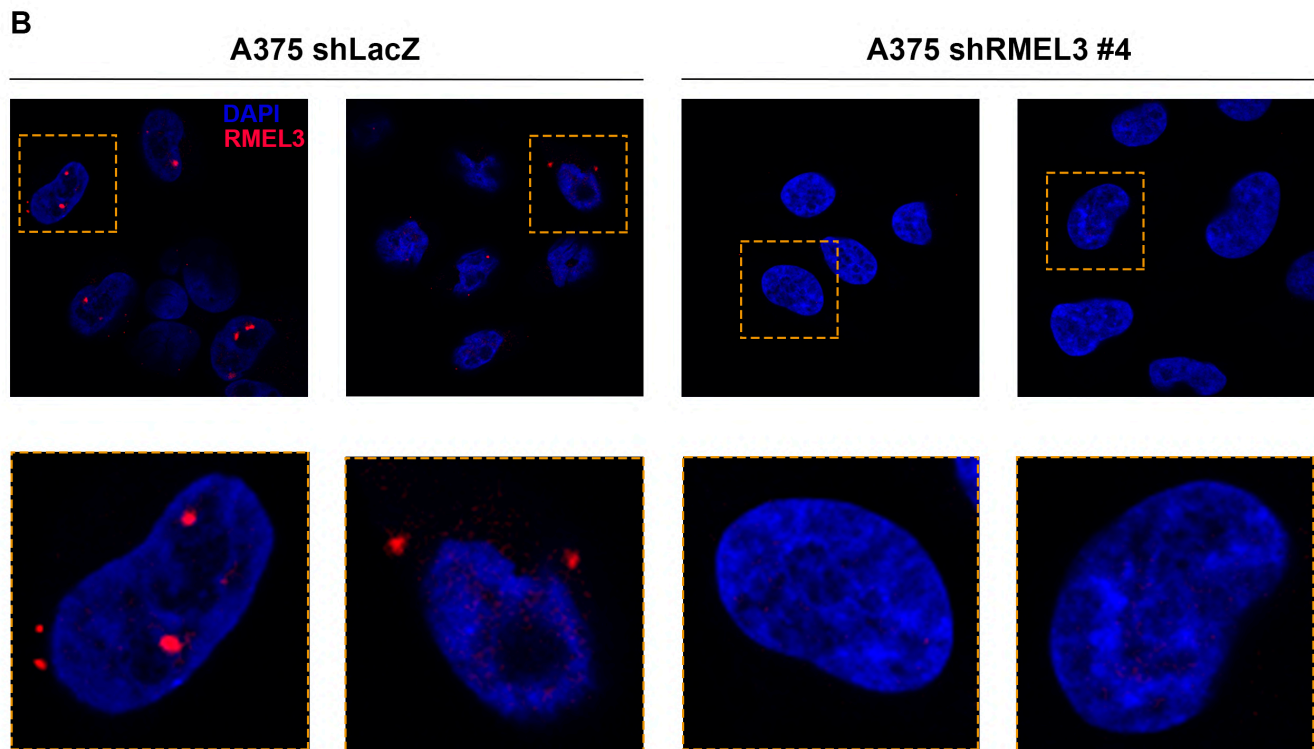
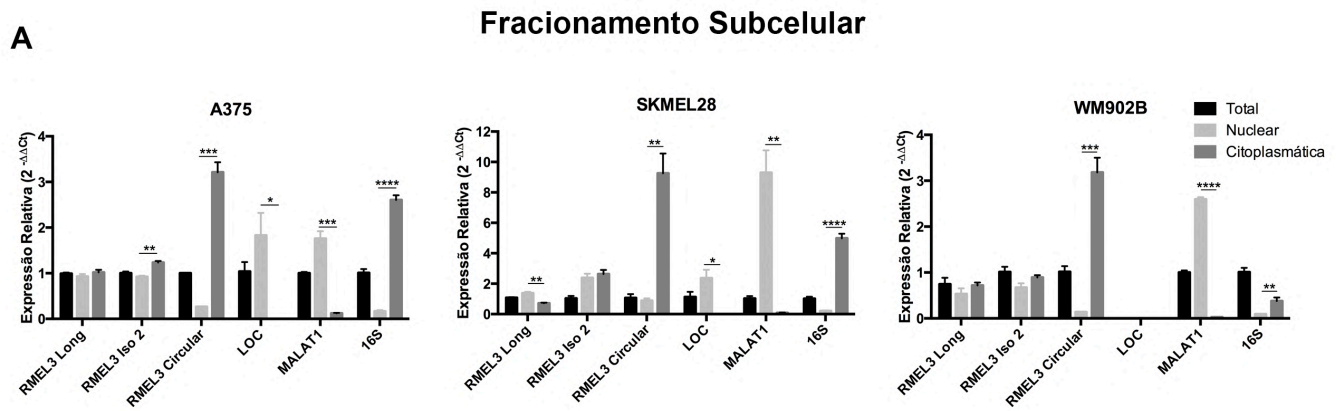


Figura 6: A. Expressão relativa dos diferentes transcritos do locus RMEL3 medida por qRT-PCR e calculada com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando TBP como controle endógeno nas frações subcelulares de diferentes linhagens de melanoma. MALAT1 (enriquecido no núcleo) e 16S (enriquecido no citoplasma) foram utilizados para aferir a pureza do fracionamento. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 replicatas biológicas. **B.** RNA-FISH de RMEL3 em células de melanoma A375 expressando o controle shLacZ ou shRMEL3 #4. Imagens da parte superior apresentam menor ampliação e regiões demarcadas são ampliadas e mostradas nas imagens da parte inferior.

Para evidenciar a localização subcelular mais precisa do lncRNA RMEL3 nas células, conduzimos a hibridização *in situ* por fluorescência de RNA (RNA-FISH). Inicialmente, tentamos usar 3 sondas que eram específicas para o transcrito RMEL3 Long, tendo como alvo o primeiro éxon exclusivo dessa isoforma, no entanto, não conseguimos atingir um sinal visível, então 2 sondas extras foram adicionadas, porém essas sondas adicionais são compartilhadas por todas as isoformas. Como esperado, confirmamos a distribuição da marcação para RMEL3 tanto no núcleo quanto no citoplasma e, curiosamente, identificamos um padrão de pontos bem destacados, o que, provavelmente, representa vários transcritos de RMEL3 juntos (Figura 6B). Para confirmar a especificidade do sinal detectado, o RNA-FISH também foi feito em células A375 silenciadas para RMEL3 usando o shRMEL3 #4, demonstrando a perda de sinal após o silenciamento (Figura 6B).

4.3 A expressão de RMEL3 é enriquecida em melanoma e varia com a progressão da doença

Com o intuito de estender a caracterização de RMEL3 e confirmar resultados previamente obtidos pelo nosso grupo (Sousa *et al.*, 2010), analisamos os dados de melanoma disponíveis publicamente no TCGA (The Cancer Genome Atlas) para identificar características clínicas e moleculares associadas a expressão do RMEL3. Devemos ressaltar que todas as análises realizadas com os dados do TCGA utilizaram a expressão da forma canônica do transcrito (RMEL3 Long/ ENST00000506106.1, anotada no ENSEMBL).

Inicialmente, confirmamos a expressão enriquecida de RMEL3 em melanoma comparada a melanócitos (Figura 7A) e a outros 16 tecidos normais

(Figura 7B). Além disso, a expressão do RMEL3 é significativamente maior em pacientes com melanoma comparado a uma diversidade de outros tumores (Figura 7C), demonstrando seu potencial para utilização como marcador para diagnóstico de melanoma.

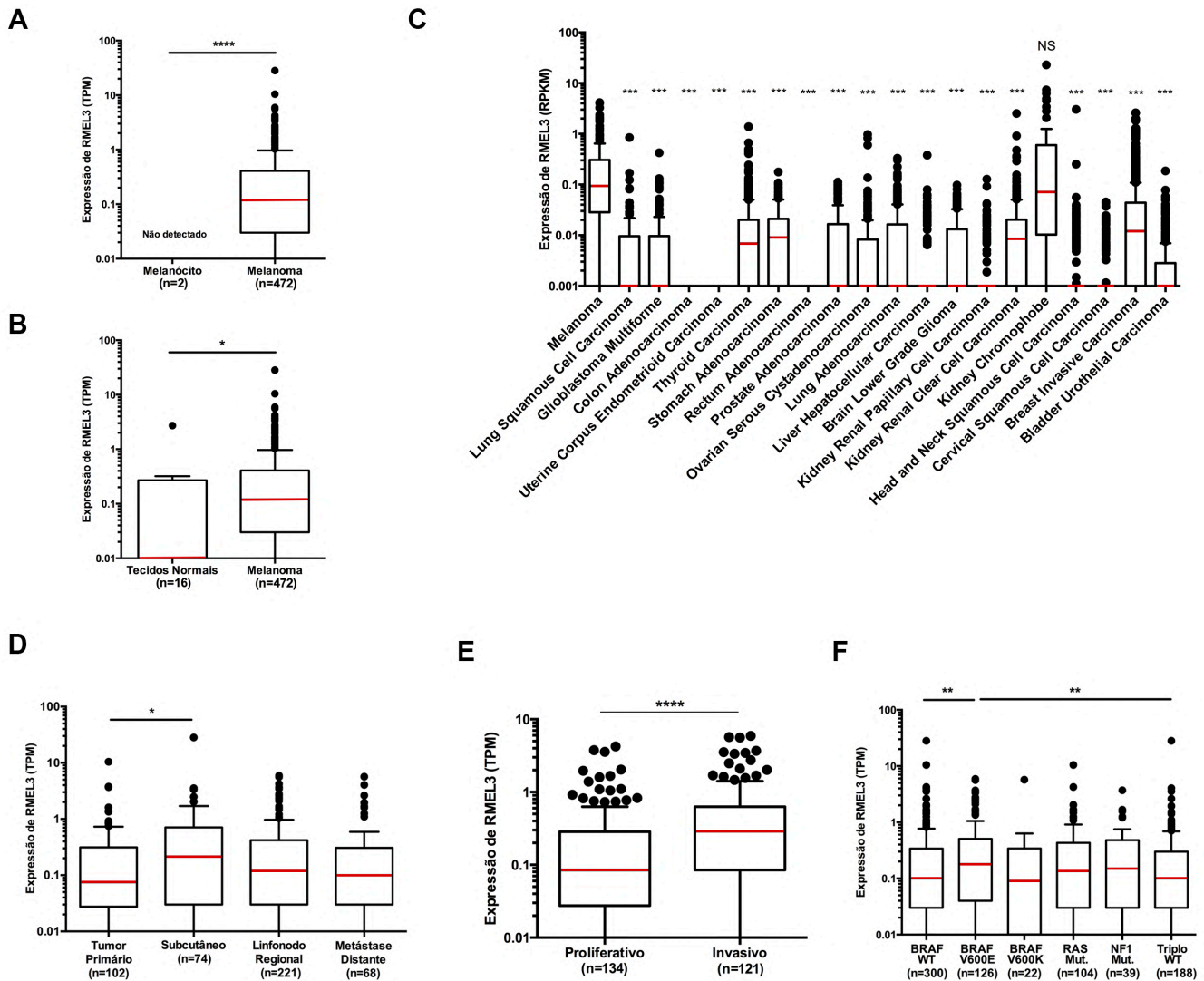


Figura 7: **A.** Expressão de RMEL3 em amostras de melanoma do TCGA e em melanócitos (GSE38495). **B.** Expressão de RMEL3 em amostras de melanoma do TCGA e em tecidos saudáveis do *Illumina Body Map Project* (adiposo, adrenal, cérebro, mama, cólon, coração, rim, leucócitos, fígado, pulmão, nódulo linfático, ovário, próstata, músculo esquelético, testículos e tireoide) exibindo expressão de RMEL3. **C.** Expressão de RMEL3 em diferentes tipos de tumores do TCGA. **D.** Pacientes do TCGA classificadas por local do tecido tumoral e exibindo a expressão de RMEL3. **E.** Expressão de RMEL3 em pacientes de melanoma do TCGA dividido entre os fenótipos de melanoma proliferativo e invasivo. **F.** Pacientes do TCGA classificados de

acordo com diferentes mutações somáticas: BRAF Selvagem (WT), BRAF^{V600E}, BRAF^{V600K}, RAS, NF1 e triplo selvagem para BRAF/RAS/NF1.

Em amostras clínicas que representam a progressão do melanoma [tumores primários (n=102), tumores subcutâneos (cutâneo regional e metástase em trânsito, n=74), linfonodos regionais (n=221) e metástases distantes (n=68)], a expressão de RMEL3 aumenta em tumores subcutâneos em comparação com os tumores primários (Figura 7D), relacionando-o com uma possível participação no processo de transição epitélio-mesenquimal e início de metástase. Tal correlação com o processo de metástase é também observada quando comparamos pacientes com melanoma de fenótipo proliferativo e invasivo (Verfaillie *et al.*, 2015), sendo a expressão de RMEL3 maior nesse último (Figura 7E).

A expressão de RMEL3 é também significativamente aumentada em melanomas com mutação BRAF^{V600E} em comparação com pacientes BRAF selvagem ou triplo selvagem para BRAF/RAS/NF1 (Tcga, 2015) (Figura 7F). Essa correlação específica de RMEL3 com a mutação BRAF^{V600E} e, portanto, com a via de MAPK foi confirmada pela inibição da versão mutante de BRAF através do tratamento de diferentes linhagens celulares de melanoma com o fármaco PLX4032 (Figura 8A).

Nota-se que a expressão do RMEL3 Long é altamente dependente da atividade de BRAF, visto que sua expressão reduz cerca de 60% em todas as linhagens testadas. Em contrapartida, a expressão de RMEL3 Iso 2 é reduzida somente na linhagem WM902B e RMEL3 Circular reduz na linhagem A375. Curiosamente, a expressão de LOC, tende a aumentar após a inibição de BRAF^{V600E}, embora na maioria da linhagens não há uma diferença estatística significativa (Figura 8A). Visto essa forte correlação de RMEL3 com BRAF^{V600E}, nos questionamos como se dá a expressão desse lncRNA em linhagens de melanoma resistentes a inibidores de BRAF^{V600E}. Nesse contexto, não observamos uma alteração de expressão consistente entre linhagens de melanoma sensíveis e resistentes ao PLX4032 (Figura 8B). Devemos, é claro,

considerar que há uma limitação de amostragem biológica testada (apenas 2 linhagens celulares foram testadas) e também ponderar que as duas linhagens podem apresentar mecanismos de resistência distintos como citado anteriormente na introdução, resultando em padrões de expressão específicos.

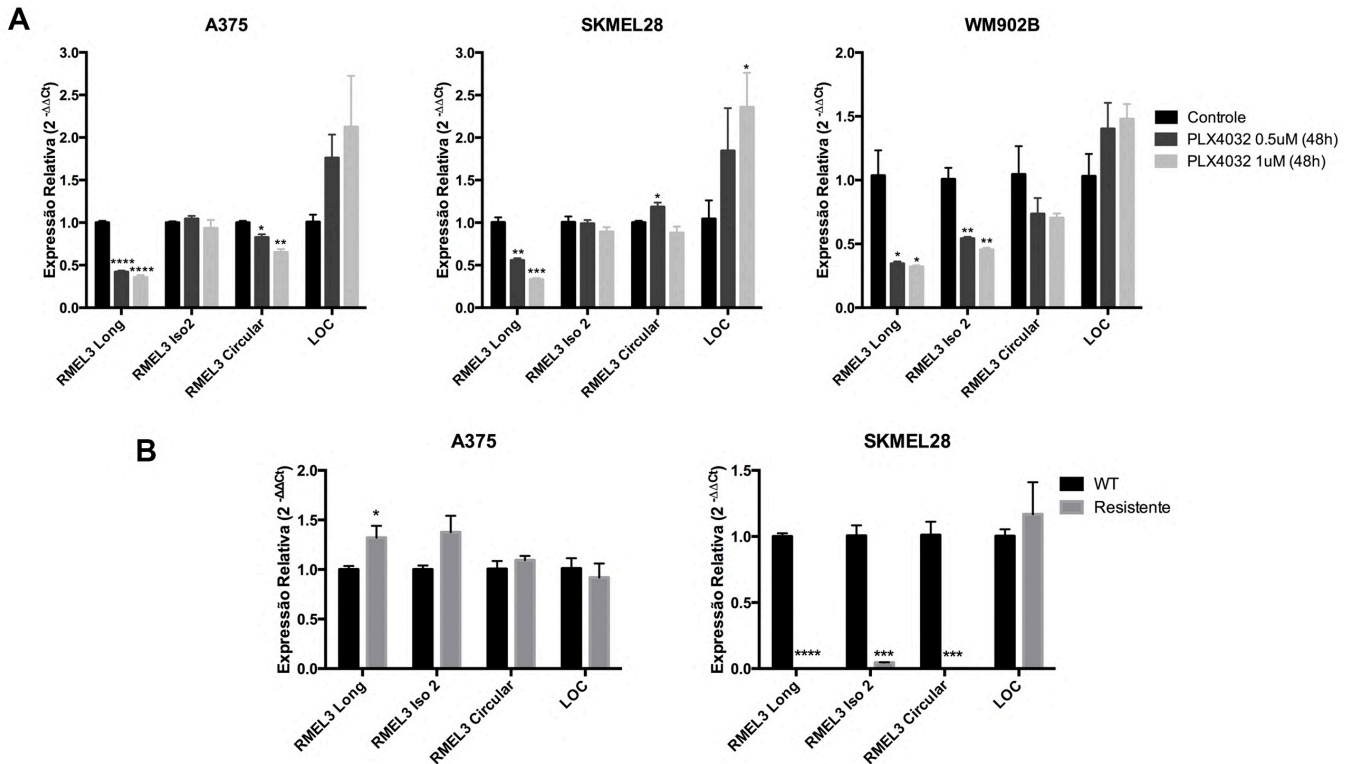


Figura 8. A. Expressão relativa dos transcritos do locus RMEL3 medida por qRT-PCR e calculada com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando TBP como controle endógeno em diferentes linhagens de melanoma tratadas com duas concentrações de PLX4032 por 48h, tempo de inibição da via de MAPK insuficiente para causar morte celular. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 replicatas biológicas. **B.** Expressão relativa dos transcritos do locus RMEL3 medida por qRT-PCR e calculada com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando TBP como controle endógeno em diferentes linhagens de melanoma sensíveis e resistentes ao PLX4032. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 replicatas biológicas.

4.4 RMEL3 em melanomas BRAF^{V600E} X BRAF^{V600K}

Curiosamente, como demonstrado na Figura 7F, a expressão de RMEL3 em melanomas BRAF^{V600E} é significativamente maior do que em melanomas BRAF WT, entretanto, a maior expressão desse lncRNA não é observada em tumores BRAF^{V600K}. Sabidamente, ambas as mutações BRAF^{V600E} (GTG>GAG)

e BRAF^{V600K} (GTG>AAG) induzem uma atividade de quinase similar, resultando na ativação constitutiva da via de MAPK (Rubinstein *et al.*, 2010), mas, apesar disso, elas são associadas à características clinicopatológicas distintas. Desta forma, nos questionamos qual é a característica genômica inerente a tumores BRAF^{V600E} que possa ser responsável pela maior taxa de transcrição de RMEL3. Com esse intuito, conduzimos uma análise comparativa entre os genótipos mutacionais BRAF^{V600E} e BRAF^{V600K} em melanoma. Embora a diferença de expressão de RMEL3 entre esses dois genótipos, inicialmente, não apresente diferença estatística (Figura 9A), após a remoção dos pacientes *outliers* pelo método ROUT, a comparação passa a ser significativa (Figura 9B). A razão pela qual escolhemos comparar BRAF^{V600E} com BRAF^{V600K} e não com BRAF WT que apresenta diferença estatística sem tratamento de outliers (Figura 7F), tem com intuito entender como duas mutações no mesmo gene (BRAF^{V600E} e ^{V600K}), responsáveis pela ativação da mesma via de MAPK, possuem efeitos diferentes, principalmente focando na expressão de RMEL3.

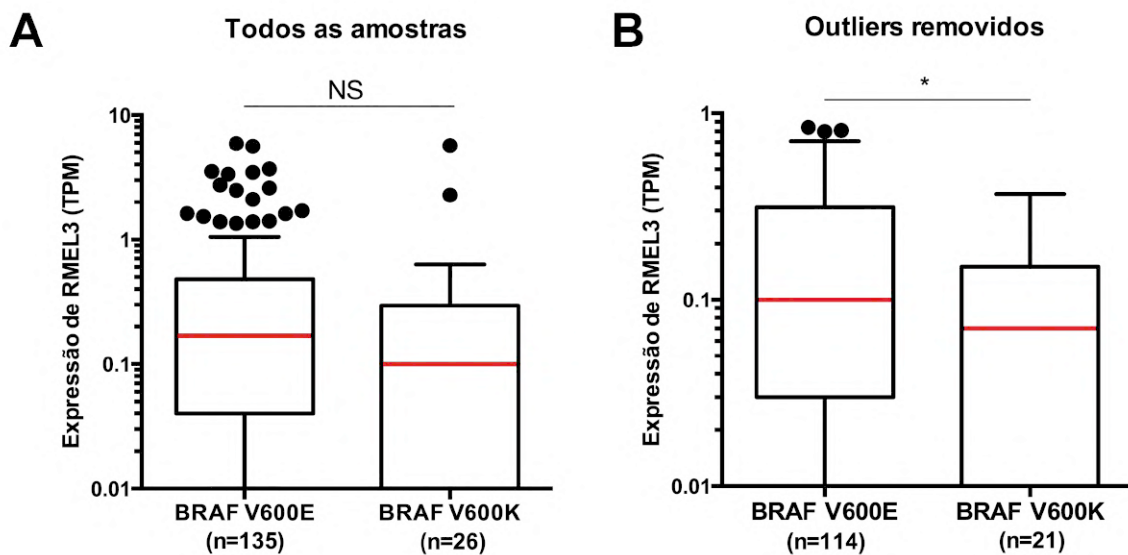


Figura 9: **A.** Expressão de RMEL3 em amostras de melanoma com BRAF^{V600E} e BRAF^{V600K} do TCGA. **B.** Expressão de RMEL3 em amostras de melanoma com BRAF^{V600E} e BRAF^{V600K} após o a remoção dos pacientes outliers pelo método ROUT.

Para identificar as diferenças genéticas entre os tumores BRAF^{V600E} (n=26) e BRAF^{V600K} (n=136), dividimos os pacientes com melanoma do TCGA em dois grupos, mantendo os pacientes *outliers* para RMEL3 para ter mais robustez de análise. Conforme relatado anteriormente na literatura, identificamos que a presença da mutação BRAF^{V600K} é prevalente no gênero masculino e em pacientes idosos (Krauthammer *et al.*, 2012), embora não tenha sido identificada correlação com estágio tumoral avançado (Tabela 2).

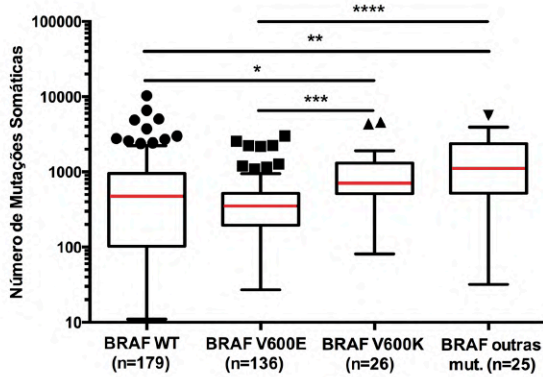
Tabela 2: Associação dos dados clínicos com a presença de mutação BRAF^{V600E} e BRAF^{V600K}.

Variáveis	Total	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600K}	Teste exato de Fisher teste t bicaudal
Sexo				
Homem	98 (60%)	76 (56%)	22 (85%)	0.007
Mulher	64 (40%)	60 (44%)	4 (15%)	
Idade (anos)				
<50	69 (43%)	64 (48%)	5 (19%)	0.008
≥50	91 (57%)	70 (52%)	21 (81%)	
Espessura Breslow				
<4mm	80 (65%)	70 (67%)	10 (55%)	0.42
≥4mm	43 (35%)	35 (33%)	8 (45%)	
Estágio do Tumor				
I e II	67 (48%)	53 (45%)	14 (61%)	0.25
III e IV	73 (52%)	64 (55%)	9 (39%)	
Ulceração do Tumor				
Não	53 (43%)	47 (44%)	6 (35%)	0.60
Sim	71 (57%)	60 (56%)	11 (65%)	

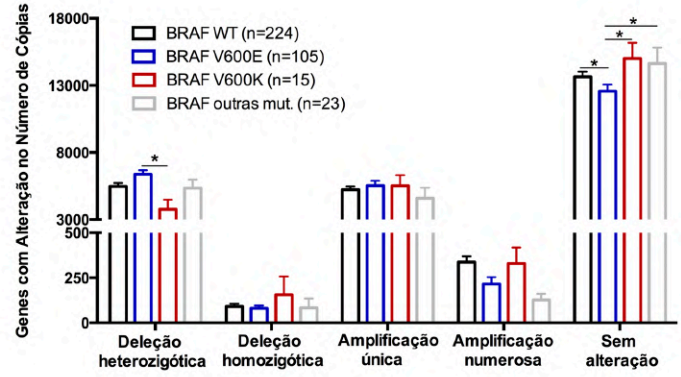
Os dados de mutações somáticas demonstraram que os tumores BRAF^{V600K} têm maior incidência de mutações somáticas no genoma comparados aos tumores BRAF WT e BRAF^{V600E} (Figura 10A), o que foi indiretamente esperado devido ao estudo anterior relatando maior incidência de mutações em pacientes idosos e com tumores em áreas expostas ao sol (Krauthammer, 2012). Além disso, esse dado pode indicar que o sistema de reparo de danos ao DNA está em melhor funcionamento nos tumores BRAF^{V600E}, além de claro, por

ser tratar de pacientes mais jovens, o acúmulo de mutações ser menor do que em pacientes com idade avançada.

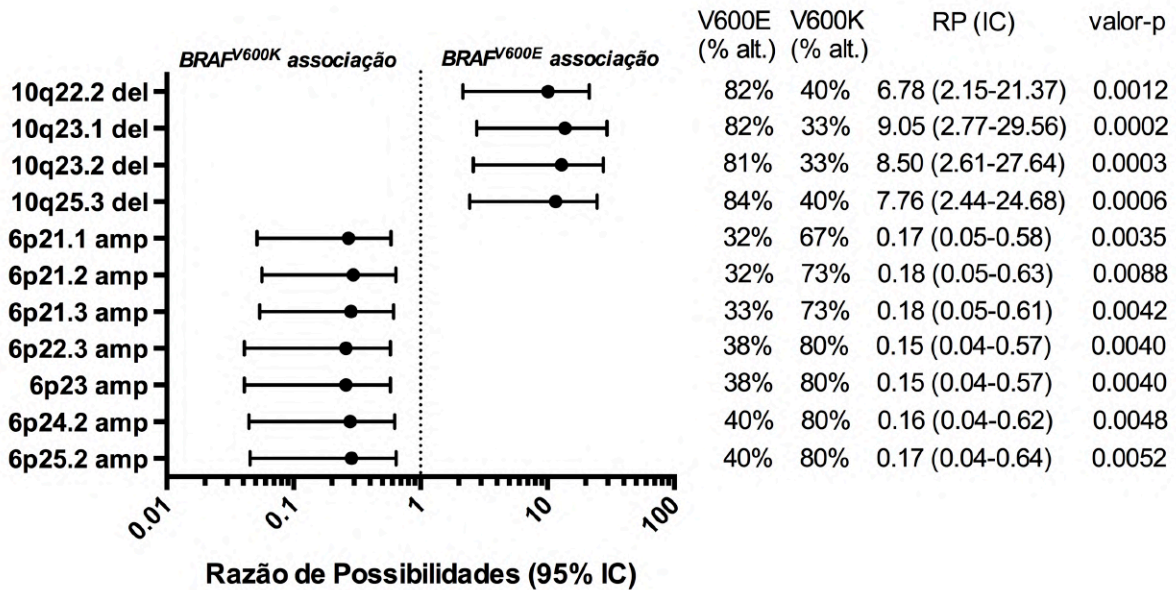
A



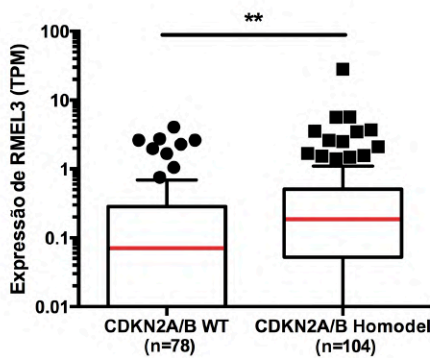
B



C



D



E

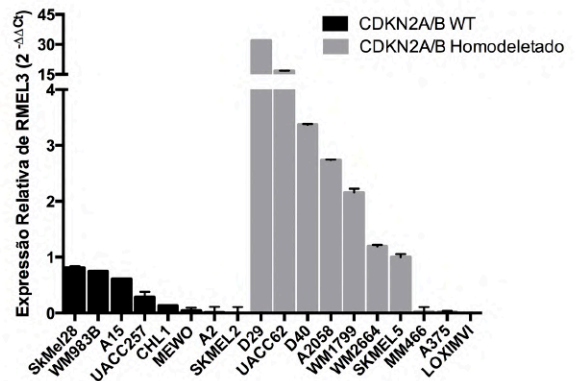


Figura 10: **A.** Contagem do número total de mutações somáticas em cada grupo de BRAF. **B.** Contagem de alterações no número de cópias em cada grupo de BRAF. **C.** Gráfico representando a distribuição das alterações do número de cópias entre os grupos BRAF^{V600E} e BRAF^{V600K}, indicando o valor de Razão de Possibilidades da associação e o intervalo de confiança (IC). **D.** Expressão de RMEL3 em pacientes de melanoma do TCGA com ou sem homodeleção do locus CDKN2A/B. **E.** Expressão relativa dos transcritos do locus RMEL3 medida por qRT-PCR e calculado com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando TBP como controle endógeno em diferentes linhagens de melanoma com e sem a homodeleção do locus CDKN2A/B. Dados históricos do laboratório que foram reanalisados.

Ao considerar as alterações do número de cópias (CNA), identificou-se que tumores BRAF^{V600K} apresentam mais genes não alterados do que os tumores BRAF^{V600E}, possivelmente devido ao número de hemideleções reduzido (Figura 10B). Esta proporção de alto número de mutações/CNA baixo já foi relatada em tumores expostos ao sol em pacientes idosos (Krauthammer *et al.*, 2012), embora tenha sido descrito em pacientes do tipo BRAF WT. Isso pode indicar que essas características são mais suscetíveis de serem encontradas em tumores induzidos pela idade avançada e exposição ao sol, ao invés do estado de BRAF, mas são enriquecidos no melanoma ^{V600K} devido à correlação direta desse genótipo com essas características clinicopatológicas. Curiosamente, várias deleções na região do cromossomo 10q estão altamente associadas aos tumores BRAF^{V600E}, enquanto que as amplificações no cromossomo 6p estão fortemente correlacionadas com os melanomas BRAF^{V600K} (Figura 10C).

Estas duas regiões foram relatadas como sendo comumente alteradas em melanoma (Curtin *et al.*, 2005; Krauthammer *et al.*, 2012), onde as perdas envolvendo cromossomo 10q são frequentes em melanomas sem danos causados pelo sol (Curtin *et al.*, 2005), enquanto que as amplificações de 6p foram associadas com idade mais avançada, tumores mais espessos e pacientes com pior sobrevida (Namiki *et al.*, 2005). Tais alterações podem induzir processos biológicos que resultam na maior expressão de RMEL3. Exemplo disso é quando consideramos somente homodeleções que identificou uma ocorrência 20% maior de deleções no locus CDKN2A/B em tumores BRAF^{V600E} comparados a BRAF^{V600K} (dado não mostrado). A expressão aumentada de RMEL3 em pacientes e linhagens celulares com homodeleção de

CDKN2A/B foi validada no conjunto de dados do TCGA (Figura 10D) e utilizando as amostras de linhagens celulares publicadas anteriormente (Figura 10E) (Goedert *et al.*, 2016). Dessa maneira, a homodeleção de CDKN2A/B pode cooperar com a mutação BRAF^{V600E} para ativar um programa transcriptômico que induz a maior expressão de RMEL3.

4.5 A expressão de RMEL3 altera o perfil transcricional das células de melanoma

Visto a correlação de diversas características clinicopatológicas com a expressão de RMEL3, nos questionamos quais seriam as características moleculares que estão associados com esse lncRNA que nos ajudariam a decifrar sua importância para o melanoma. Para tal finalidade, dois grupos de pacientes foram separados de acordo com os níveis de expressão de RMEL3 em relação ao conjunto total dos pacientes do TCGA. Grupo RMEL3 Low (n=105), constituído de pacientes com expressão de RMEL3 abaixo do percentil 25 e o grupo RMEL3 High (n=117), constituído de pacientes com expressão de RMEL3 acima do percentil 75 (Figura 11A). Posteriormente, dados de RNAseq foram utilizados para identificar os genes diferencialmente expressos na comparação RMEL3 High/RMEL3 Low (log2 fold change <-2 ou >2; valor-p ajustado <0.00001; n=260 genes; Figura 11B e 11C) e que, portanto, seriam correlacionados com RMEL3 (Tabela Suplementar S1).

Posteriormente, uma porção mais ampla desses genes diferencialmente expressos (log2 fold change <-0.5 ou >0.5; valor-p ajustado <0.05; n=3445 genes) foi comparada aos genes afetados pela silenciamento de RMEL3 (log2 fold change <-0.5 ou > 0.5; p <0.01; n=2.942), experimento realizado por Cristiano Gonçalves Pereira (aluno egresso do laboratório) (Goedert *et al.*, 2016), para fornecer uma lista de genes dependentes de RMEL3 de alta confiança e validados por diferentes análises (Tabela suplementar S2). Tal abordagem nos permite filtrar os genes relacionados a RMEL3, excluindo correlações específicas da linhagem celular utilizada para o silenciamento e

focando na relação com genes com maior propensão de atuar em conjunto com RMEL3 *in vivo* (através da análise dos pacientes do TCGA).

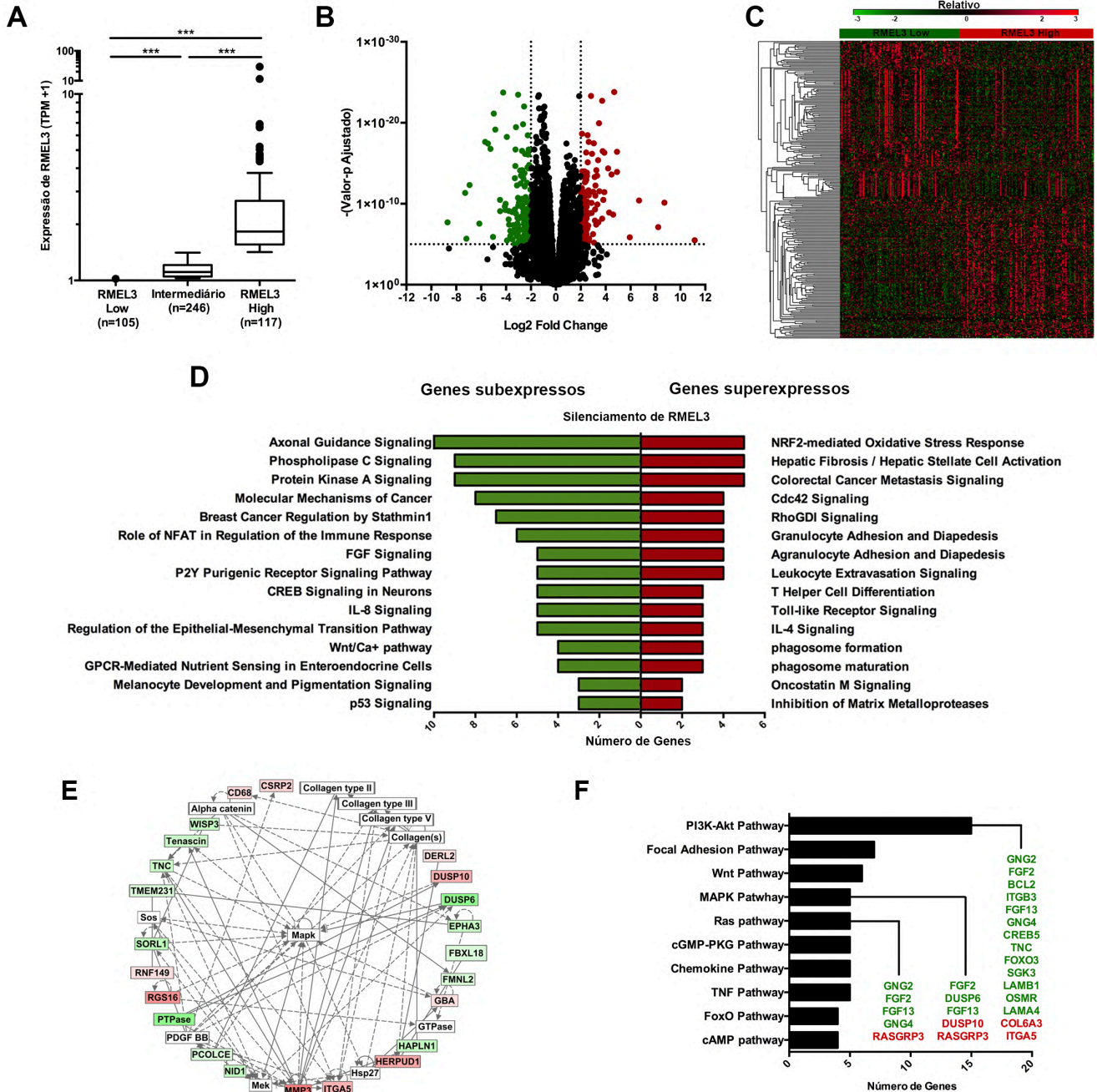


Figura 11: A. Pacientes do TCGA foram classificados em dois grupos de expressão de RMEL3. Grupo RMEL3 Low (n=105), constituído de pacientes com expressão de RMEL3 abaixo do percentil 25 e o grupo RMEL3 High (n=117), constituído de pacientes com expressão de RMEL3 acima do percentil 75 da expressão total de RMEL3 em todos os pacientes do TCGA. B.

Volcano plot e Heatmap (C) exibindo os genes diferencialmente expressos (\log_2 fold change <-2 ou >2 ; valor-p ajustado <0.00001) entre RMEL3 High X RMEL3 Low. D. Enriquecimento de vias canônicas dos genes validados pelo software Ingenuity Pathway Analysis. E. Interação gênica da sinalização célula-a-célula. Quadrados vermelhos são genes superexpressos e quadrados verdes são genes reprimidos após o silenciamento de RMEL3. Quadrados brancos são moléculas conectivas não diferencialmente expressas. F. Genes diferencialmente expressos a partir da análise do TCGA e que foram validados pelo silenciamento de RMEL3 demonstrando as vias de sinalização em que atuam. Genes de cor verde são reprimidos após o silenciamento de RMEL3 e genes de cor vermelha são superexpressos.

Nesse contexto, um total de 177 genes positivamente diferencialmente expressos nos dados do TCGA exibiu diminuição de expressão após o silenciamento de RMEL3 nas células A375-SM. Em contrapartida, um conjunto de 139 genes negativamente diferencialmente expressos no TCGA tiveram sua expressão aumentada após o silenciamento de RMEL3.

Buscando identificar em quais processos biológicos esse genes validados estariam envolvidos, realizamos uma análise de enriquecimento de vias que identificou a participação desses genes correlacionados a RMEL3 em vias de sinalização da proteína quinase A, mecanismos moleculares de câncer, sinalização por FGF, regulação da transição epitélio-mesenquimal, inibição de metaloproteases de matriz, entre outros (Figura 11D). Essas vias metabólicas compõem redes biológicas importantes para o melanoma, como o exemplo da sinalização célula-a-célula que tem como elemento central a MAPK (Figura 11E). Além disso, vários genes validados são constituintes das vias PI3K-Akt, MAPK e Ras (Figura 11F) e podem cooperar para o fenótipo associado ao RMEL3.

4.6 Impacto do silenciamento do RMEL3

Observadas as importantes correlações entre RMEL3 e os processos biológicos essenciais à progressão do melanoma, investigamos o impacto do silenciamento do RMEL3 no melanoma. É importante notar que já observamos anteriormente um impacto drástico da clonogenicidade das células utilizando a abordagem do siRNA (Goedert *et al.*, 2016), porém isso foi limitado a apenas um siRNA e não levou em consideração as isoformas identificadas recentemente.

Com isso em mente e para adicionar uma confiança extra nos resultados anteriores, construímos 4 shRNAs diferentes (Metodologia, Figura 3) que visam diferentes regiões dos transcritos (Figura 5A). O shRMEL3 #4 mostrou ser altamente eficiente no silenciamento do RMEL3 (Figura 12A), reduzindo drasticamente a proliferação das células de melanoma A375 testadas (Figura 12B e 12C). O shRMEL3 #3 também mostrou ser capaz de silenciar o RMEL3, porém de forma menos eficiente que o shRMEL3 #4 (Figura 12A), o que resultou em um fenótipo menos agressivo, embora estatisticamente não significativo para esse ensaio de 4 dias (Figura 12B e 12C). É importante notar que shRMEL3 #4 tem como alvo apenas RMEL3 Long e LOC (que possui expressão ínfima), o que nos permite concluir que RMEL3 Long é provavelmente a isoforma proeminente do locus. Em relação aos shRMEL3 #1 e #2, notamos que eles não foram eficientes em induzir o silenciamento do RMEL3 (Figura 12A), embora a capacidade clonogênica das células shRMEL3 #2 tenha sido reduzida (Figura 12B e 12C), o que provavelmente é o resultado de um efeito *off-target*. Ao realizar um ensaio mais longo (8 dias de indução com doxíciclina), os resultados são ainda mais pronunciados, especialmente a redução da formação de colônias de A375 shRMEL3 #3 (Figura 12D e 12E).

Observamos também uma forte redução da migração celular após o silenciamento de RMEL3 (Figura 12F e 12G). Tal observação dá suporte as correlações vistas anteriormente, como expressão elevada de RMEL3 nos tumores subcutâneos (Figura 7D) e fenotipicamente invasivos (Figura 7E), assim como corrobora com a redução de genes envolvidos na regulação da transição epitélio-mesenquimal e aumento da inibição de metaloproteases de matriz após o silenciamento de RMEL3 (Figura 11D).

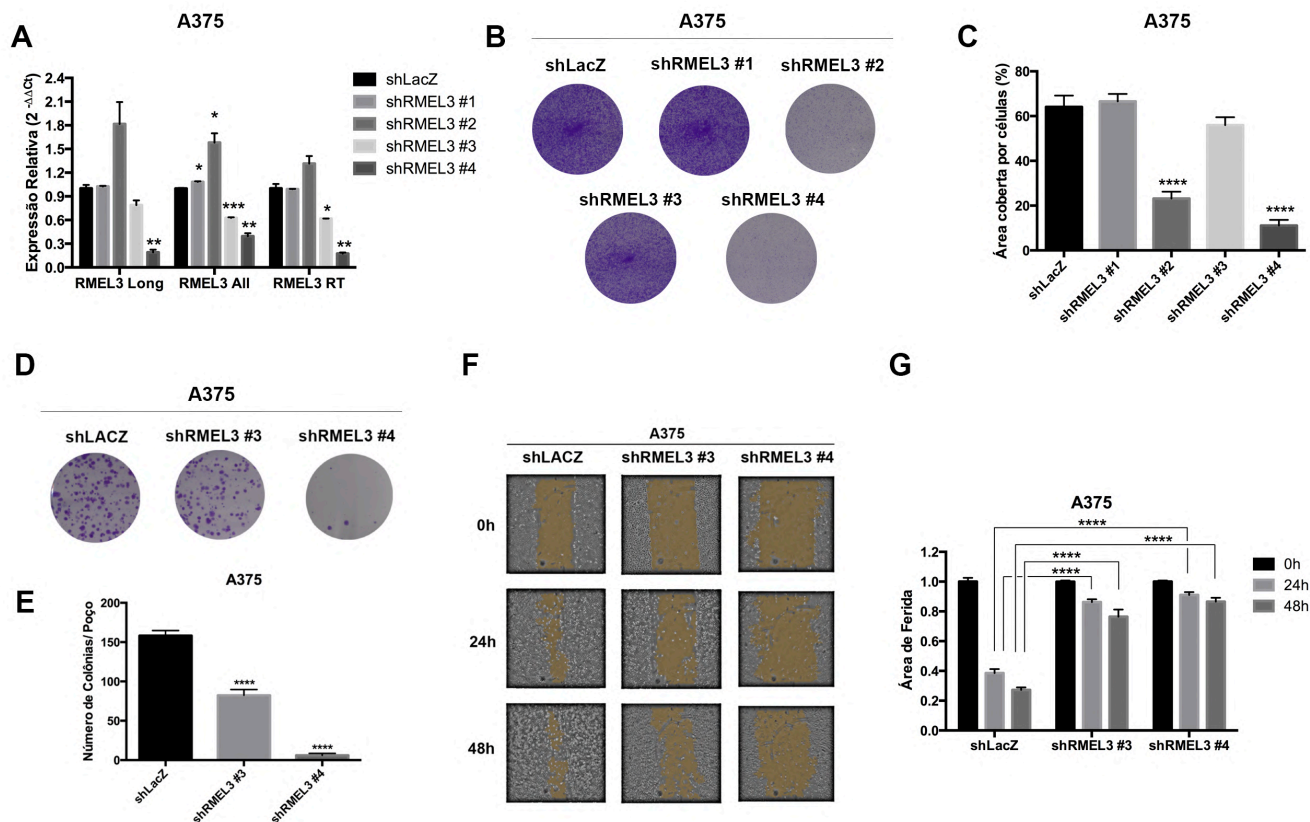


Figura 12: **A.** Expressão relativa dos transcritos do locus RMEL3 medida por qRT-PCR e calculada com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando TBP como controle endógeno na linhagem de melanoma A375 expressando estavelmente shRNAs contra o RMEL3 e controle (shLacZ). O gráfico representa a média \pm SEM de 3 replicatas biológicas. **B.** Ensaio clonogênico na linhagem de melanoma A375 expressando estavelmente shRNAs contra o RMEL3 após 4 dias de indução por Doxiciclina (50.000 células semeadas). **C.** Representação gráfica da porcentagem da área coberta por células referente ao experimento da Figura 12B. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 replicatas biológicas. **D.** Ensaio clonogênico da linhagem de melanoma A375 expressando estavelmente shRNAs contra RMEL3 e controle (shLacZ) após 8 dias de indução com doxiciclina (1000 células semeadas). **E.** Representação gráfica da contagem de colônias pertencentes ao experimento da Figura 12D. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 réplicas biológicas. **F.** Ensaio de *Wound Healing* nas células A375 shLacZ, shRMEL3 #3 e shRMEL3 #4 sob efeito de Doxiciclina avaliados na hora da realização da ferida e após 24h e 48h para medir o grau de migração das células. **G.** Representação gráfica da área da ferida (inversamente proporcional à migração celular) referente ao experimento da Figura 12F. O gráfico representa a média \pm SEM de 5 réplicas biológicas

4.7 Identificação de microRNAs correlacionados com a expressão de RMEL3

Visto o papel fundamental de RMEL3 em diversos aspectos da progressão e manutenção do melanoma, amparado por dados provenientes de

pacientes e de dados de interferência *in vitro*, prosseguimos com a identificação do mecanismo molecular de ação desse lncRNA.

Um possível mecanismo de ação de RMEL3 pode ser através da regulação de microRNAs. LncRNAs já foram demonstrados como sequestradores de microRNAs, impedindo assim que os alvos desses microRNAs sejam reprimidos, além de poderem induzir ou reprimir a transcrição dos genes de microRNAs específicos. De modo a aferir tal possibilidade para o RMEL3, realizamos uma análise de expressão diferencial de microRNAs entre os grupos RMEL3 High e Low. Como resultado um total de 30 microRNAs demonstraram ser alterados no grupo RMEL3 High comparado ao Low, sendo 16 microRNAs subexpressos e 14 microRNAs superexpressos (\log_2 fold change >1 ou <-1 ; valor-p ajustado $<1 \times 10^{-5}$; Figura 13A). Isso significa que quando na presença de altos níveis de RMEL3, há 16 microRNAs com expressão reduzida. Novamente, para filtrar os microRNAs com maior propensão de serem alvos verdadeiros de RMEL3, buscamos por alvos validados desses microRNAs no banco de dados mirTarbase (Chou *et al.*, 2018) e comparamos com a lista de genes correlacionado com o RMEL3 na análise do TCGA e que foram afetados pelo seu silenciamento (genes validados) (Tabela suplementar S2). Dessa maneira, obtivemos uma lista de potenciais microRNAs que podem estar sendo regulados por RMEL3 e assim exercer um papel importante para a progressão do melanoma (Figure 13B). Para identificar se os microRNAs negativamente correlacionados a RMEL3 podem estar sendo reprimidos pela atividade de sequestro do RMEL3, realizamos uma análise de predição de interação entre o lncRNA e os 14 microRNAs negativamente correlacionados com RMEL3 que apresentaram alvos diretamente afetados pelo silenciamento desse lncRNA (Figure 13C). Como resultado, observamos que a grande maioria deles possuem uma energia mínima livre de interação < -20 kcal/mol, o qual é considerado um *cut-off* para predições com maior propensão de serem verdadeiras. Dessa maneira, esse análise proveu uma lista de microRNAs que podem ser regulados por RMEL3, auxiliando na sua atividade oncogênica.

Como exemplo disso, observamos que diversos microRNAs negativamente correlacionados a RMEL3 possuem como alvo o mRNA da proteína antiapoptótica BCL2 que apresenta sua expressão e quantidade proteica reduzida após o silenciamento de RMEL3 (Goedert *et al.*, 2016). Esse conjunto de evidências permite supor que RMEL3 possa parcialmente atuar como sequestrador de microRNAs.

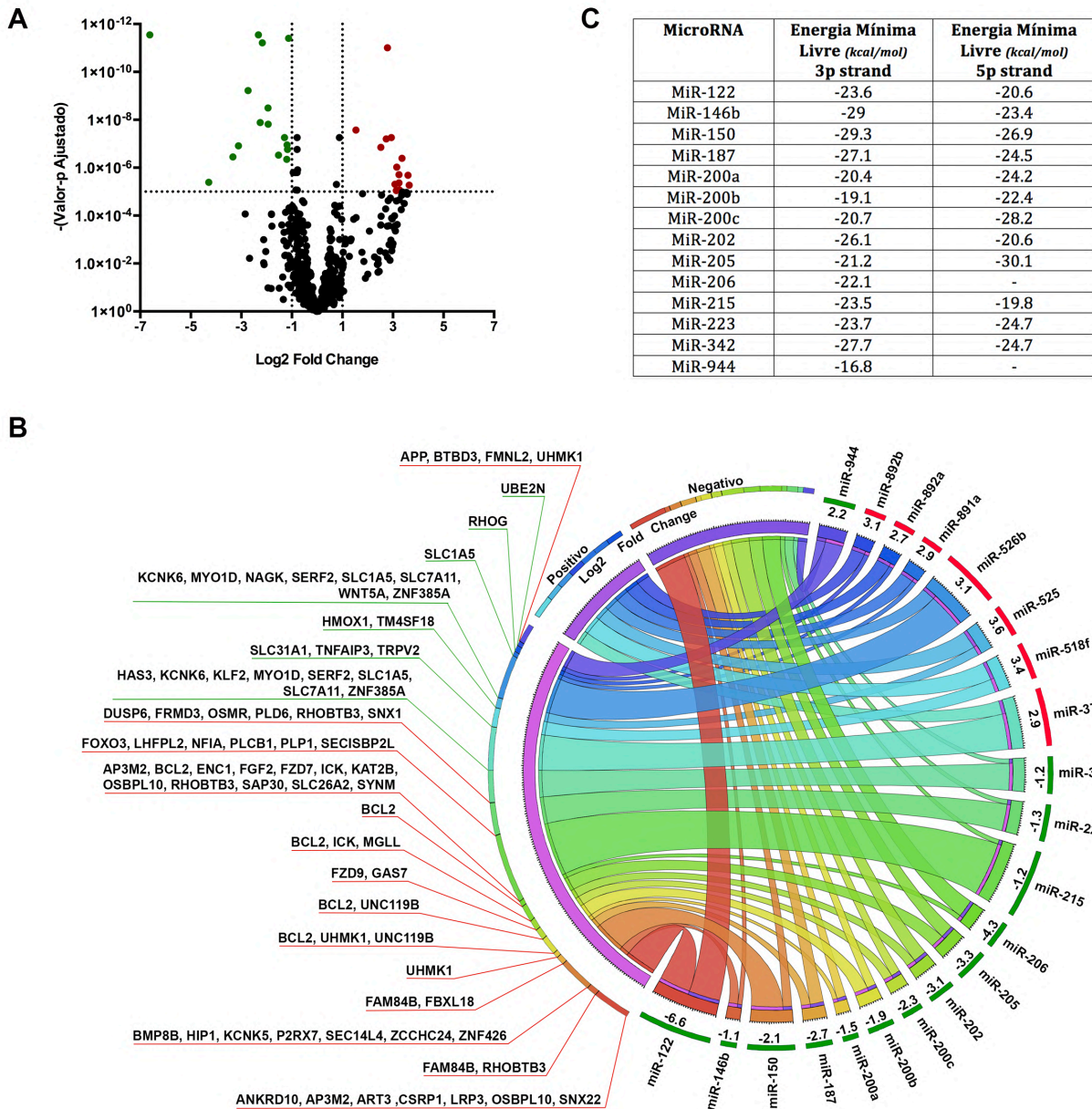


Figura 13: **A.** Volcano plot dos microRNAs diferencialmente expressos entre os grupos RMEL3 High e Low. **B.** Circos plot representando microRNAs que possuem genes alvos diferencialmente expressos na análise do TCGA (entre os grupos RMEL3 High e Low) e que foram alterados após o silenciamento de RMEL3. Log2 fold change dos microRNAs estão dispostos ao lado do respectivo nome. Na seção dos genes alvos, as linhas vermelhas indicam genes superexpressos no grupo RMEL3 High da análise do TCGA, os quais sofreram redução após o silenciamento de RMEL3; Linhas verdes indicam genes com baixa expressão no TCGA e após o silenciamento de RMEL3 sofrem aumento de expressão. **C.** Lista de microRNAs negativamente expressos no grupo RMEL3 High e suas respectivas energias mínima livre de interação com RMEL3 Long.

4.8 Possível envolvimento com processos de metilação

Além de sequestrador de microRNA, diversos lncRNAs já foram descritos como reguladores de processos de metilação de DNA (Sanchez Calle e Kawamura, 2018) e a correlação de RMEL3 com a presença da mutação BRAF^{V600E} evidenciou a necessidade de estudarmos essa possibilidade.

A alteração na metilação genômica induzida por BRAF^{V600E} já foi descrita por diversos estudos, entre eles, alguns apontando para o perfil de hipometilação associado à perda de expressão da DNA metiltransferase 3A – DNMT3A (Guo *et al.*, 2015), enquanto outros demonstram que BRAF^{V600E} promove o silenciamento epigenético através de superexpressão do oncogene MAFG (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G*), um repressor transcricional ligante de DNA (Fang *et al.*, 2016). A alta expressão de MAFG, aumenta sua ligação à regiões promotoras, induzindo o recrutamento de co-repressores como BTB, BACH1, CHD8 e DNMT3B, resultando na hipermetilação e silenciamento transcricional (Fang *et al.*, 2016). Adicionalmente, outros estudos apontam para uma alteração balanceada entre hipo e hipermetilação (Hou *et al.*, 2012) e propõem que a perda de metilação ocorra gradativamente com a progressão do melanoma (Ecsedi *et al.*, 2014).

Visto a importância da alteração na metilação correlacionada à BRAF^{V600E}, realizamos diversas análises de metilação diferencial, sendo a primeira entre melanomas BRAF WT e BRAF^{V600E} para identificar o perfil de metilação dos pacientes que estão sendo utilizados, visto que há resultados divergentes relatados.

Em nossa análise, as amostras BRAF^{V600E} apresentaram uma perda de metilação, totalizando 55998 *probes* diferencialmente metiladas (valor-p ajustado <0.05), sendo que 4892 *probes* apresentaram uma diferença de metilação de pelo menos 0.1 no valor de Beta metilação (Figura 14A e 14B), corroborando com relatos anteriores (Hou *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015).

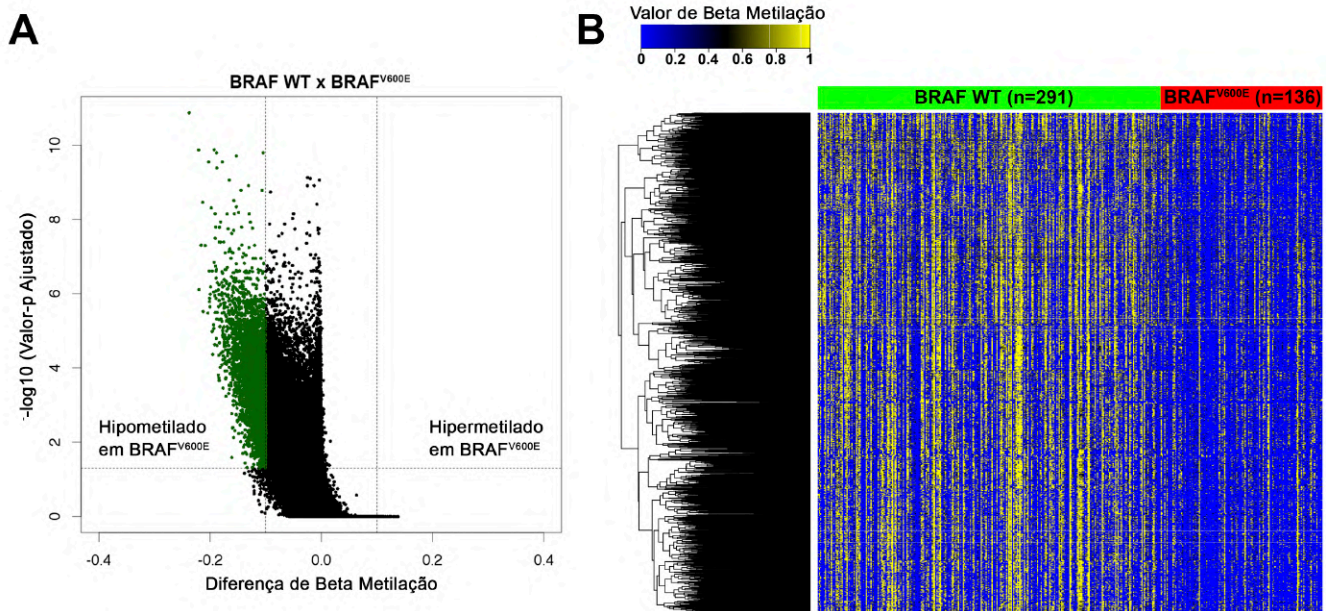


Figura 14: A e B. Volcano plot e Heatmap indicando as *probes* diferencialmente metiladas (valor-p ajustado <0.05 e diferença de valor de Beta metilação >|0.1|) entre BRAF WT e BRAF^{V600E}, demonstrando uma hipometilação do genoma em BRAF^{V600E}.

Posteriormente, conduzimos uma análise de metilação diferencial entre os grupos RMEL3 High e RMEL3 Low, sendo os mesmo grupos utilizados para fazer a expressão diferencial utilizada na Figura 11A. Como resultado, observamos que a alta expressão de RMEL3 correlaciona com uma hipermetilação do genoma, perfil oposto do grupo BRAF^{V600E}. Esse resultado é de fato interessante, pois imaginávamos que devido a correlação de RMEL3 e BRAF^{V600E}, o perfil de metilação correlacionado com o grupo de alta expressão de RMEL3 seguiria um padrão de hipometilação.

A comparação entre os grupos de RMEL3 identificou um ganho de metilação, totalizando 65037 *probes* diferencialmente metiladas (valor-p ajustado <0.05), sendo que 14400 *probes* apresentaram uma diferença de metilação de pelo menos 0.1 no valor de Beta metilação (Figura 15A e 15B). Curiosamente, diversas dessas *probes* se localizam em genes que copõem a lista do genes validados (correlacionados com RMEL3 nos pacientes do TCGA e afetados pelo silenciamento desse lncRNA) (n=55; Tabela Suplementar S3). Dentre eles está o supressor tumoral KLF2 (kruppel-like factor 2), que apresenta uma correlação de expressão negativa com RMEL3 e passa a ser expresso quando esse lncRNA é silenciado, além do FGF2 que apresenta padrão oposto.

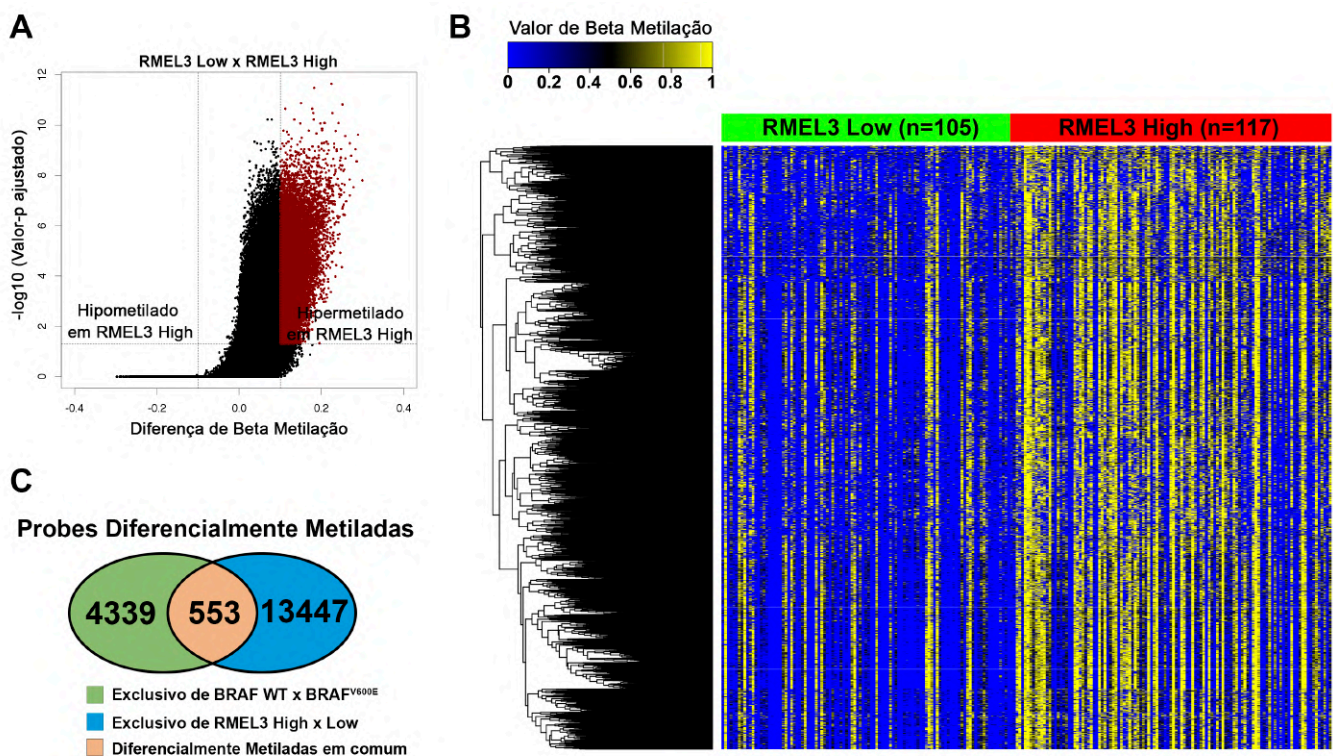


Figura 15: A e B. Volcano plot e Heatmap indicando as *probes* diferencialmente metiladas (valor-p ajustado <0.05 e diferença de valor de Beta metilação >|0.1|) entre RMEL3 High e Low, demonstrando uma hipermetilação do genoma em RMEL3 High. **C.** Diagrama de Venn indicando as *probes* diferencialmente metiladas mutuamente exclusivas e comuns na comparação BRAF WT/^{V600E} e RMEL3 High/Low, considerando as *probes* que apresentaram diferença de valor de Beta metilação >|0.1|.

Interessantemente, quando comparamos as *probes* diferencialmente metiladas entre BRAF WT/^{V600E} e RMEL3 High/Low (valor-p ajustado <0.05 e diferença de valor de Beta metilação >|0.1|), apenas 553 *probes* apresentaram-se diferencialmente metiladas nas duas comparações (Figura 15C), o que corresponde a 11% das *probes* identificadas em BRAF WT/^{V600E} e a 4% das *probes* diferencialmente metiladas de RMEL3 High/Low. Visto isso, percebe-se que BRAF^{V600E} e RMEL3 estão correlacionados com a regulação de metilação em regiões distintas, indicando que esses dois genes podem cooperar para influenciar um perfil de metilação que favoreça a progressão do câncer.

Após esses resultados, questionamos se a correlação de RMEL3 com a hipermetilação seria mantida quando analisamos somente pacientes BRAF^{V600E}, pois tal mutação está associada com hipometilação genômica no conjunto de pacientes analisados (Figura 14A e 14B). Para tal, selecionamos todos os pacientes com essa mutação em BRAF e os dividimos em dois grupos em relação a RMEL3. RMEL3 Low constituído dos pacientes com expressão de RMEL3 abaixo do percentil 25 e o grupo RMEL3 High composto pelos pacientes com expressão de RMEL3 acima do percentil 75 calculado a partir da expressão de RMEL3 em todos os pacientes BRAF^{V600E}.

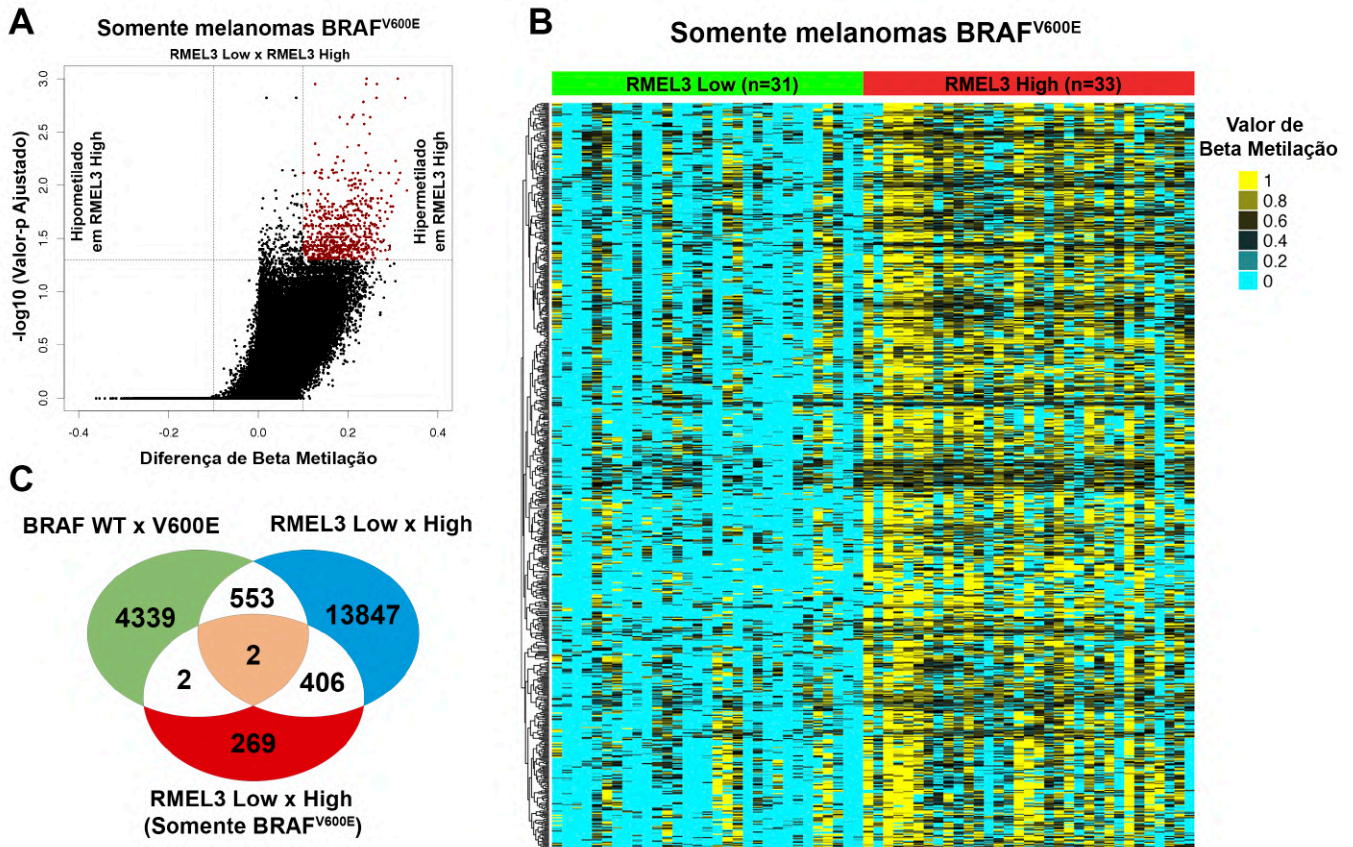


Figura 16: **A** e **B**. Volcano plot e Heatmap indicando as *probes* diferencialmente metiladas (valor-p ajustado <0.05 e diferença de valor de Beta metilação $>|0.1|$) entre RMEL3 High e Low (em tumores BRAF^{V600E}), demonstrando uma hipermetilação do genoma em RMEL3 High. **C**. Diagrama de Venn indicando as *probes* diferencialmente metiladas mutuamente exclusivas e comuns na comparação BRAF WT/^{V600E}, RMEL3 High/Low e RMEL3 High/Low (em tumores BRAF^{V600E}), considerando as *probes* que apresentaram diferença de valor de Beta metilação $>|0.1|$.

Como resultado, observamos que a comparação RMEL3 High/Low (em melanomas BRAF^{V600E}) retornou um total de 855 *probes* diferencialmente metiladas (valor-p ajustado <0.05), mantendo o perfil de maior metilação no grupo RMEL3 High, sendo que um total de 676 *probes* apresentaram uma diferença de metilação de pelo menos 0.1 no valor de Beta metilação (Figura 16A e 16B). Desse total de 676 *probes*, 408 *probes* (60%) também foram identificadas como diferencialmente metiladas na comparação RMEL3 High/Low no conjunto total de pacientes do TCGA (Figura 16C), demonstrando, realmente, que RMEL3 está associado a um maior grau de metilação em diversos genes.

4.9 Em busca do mecanismo molecular

Visto as diferentes possibilidades de atuação de RMEL3 observadas pelas análises dos pacientes do TCGA, utilizamos a abordagem de *pulldown* do RNA endógeno através da hibridização de sondas de DNA marcadas com biotina seguido de espectrometria de massas para identificar as proteínas que interagem com esse lncRNA. Tal experimento demonstrou que o transcrito nativo de RMEL3 é capturado especificamente, enquanto o lncRNA TINCR não é detectado (Figura 17A). Entretanto, também foi possível detectar, de forma menos abundante, outro lncRNA enriquecido em melanoma conhecido como SAMMSON (Figura 17A). Embora as sondas utilizadas não tenham nenhuma complementariedade com SAMMSON, tal enriquecimento pode ser resultado da função biológica do RMEL3 como estabilizador de algum plataforma proteica onde SAMMSON pode participar ou ser um artefato da captura do RMEL3 ligado a complexos de processamento de RNA, de forma que outros RNAs que estivessem sendo processados no mesmo complexo que o RMEL3 fossem capturados indiretamente.

A clusterização hierárquica das amostras pela distância Euclidiana demonstrada acima da imagem do Heatmap (Figura 17B), evidencia que a replicata número 3 (controle e RMEL3) do experimento de *pulldown* agrupam entre si, enquanto o esperado é que as amostras do grupo controle clusterizassem juntas. Isso indica que a pureza dessa replicata foi comprometida em alguma etapa do experimento de *pulldown*, o que também foi confirmado pela Análise de Componentes Principais (Figura 17C), onde a amostra C3 (controle replicata 3) e R3 (RMEL3 replicata 3) estão mais próximas entre si do que seus respectivos grupos. Dessa maneira, para as análises posteriores e para futura validação das proteínas ligantes de RMEL3, consideramos somente as replicatas 1 e 2 do experimento de *pulldown* (Figura 17D).

Dentre as proteínas identificadas como ligantes de RMEL3, diversas chamam atenção e já foram descritas como sendo importantes para processos

biológicos que sustentam a tumorigênese (Figura 17E) e, dentre elas, 3 estão diretamente relacionadas com a via de MAPK (FAM83D, ARAF e STK3).

A proteína FAM83D exerce seu efeito de indução de proliferação e motilidade celular através da inibição do subcomponente FBXW7 do complexo ubiquitina-ligase SCF e, por consequência, aumenta a disponibilidade de fatores pro-oncogênicos como MTOR, JUN e MYC que seriam levados a degradação proteossomal (Wang *et al.*, 2013). Além disso, foi demonstrada uma função relevante de FAM83D para sinalização da via de MAPK através da interação com a proteína CRAF (RAF-1), aumentando seu direcionamento à membrana plasmática onde sofre ativação da GTPase RAS e leva à fosforilação sequencial das proteínas MEK e ERK (Wang *et al.*, 2015), resultando em proliferação e migração celular. CRAF também estimula a sinalização da via de MAPK através da interação com a proteína BRAF, onde há um aumento recíproco da capacidade de quinase das duas proteínas (Desideri *et al.*, 2015). Essa interação heterodimérica sofre influência de outra proteína da família RAF, sendo a proteína ARAF (identificada como ligante de RMEL3) responsável pela estabilização desse complexo, tornando-o um complexo ternário altamente eficaz, principalmente sob efeito de subdoses de inibidores pan-RAF (Rebocho e Marais, 2013), influenciando a resistência terapêutica em diversos casos.

Controversamente, em melanomas com mutação BRAF^{V600E}, CRAF tem um efeito inibitório sobre BRAF^{V600E} (Karreth *et al.*, 2009) e tal inibição é, provavelmente, uma consequência da conformação estrutural que o complexo adquire após a ligação de CRAF em BRAF^{V600E}. Prova disso é que a inibição de CRAF em melanomas BRAF^{V600E} tem um efeito positivo sobre a ativação da via de MAPK (Karreth *et al.*, 2009). De forma interessante, tal característica explicaria porque mutações em BRAF^{V600E} e em genes da família RAS são mutuamente exclusivas, pois sabidamente mutações em RAS favorecem a sinalização da via de MAPK via CRAF. Caso isso acontecesse em um tumor BRAF^{V600E} resultaria na anulação do efeito oncogênico induzido por BRAF^{V600E} e induzido por RAS, pois CRAF e BRAF^{V600E} se complexariam inibindo a via de MAPK (Karreth *et al.*, 2009). Curiosamente, em melanomas BRAF^{V600E} os níveis

de CRAF são naturalmente reduzidos, favorecendo a ativação da via de MAPK através de BRAF^{V600E} (Karreth *et al.*, 2009).

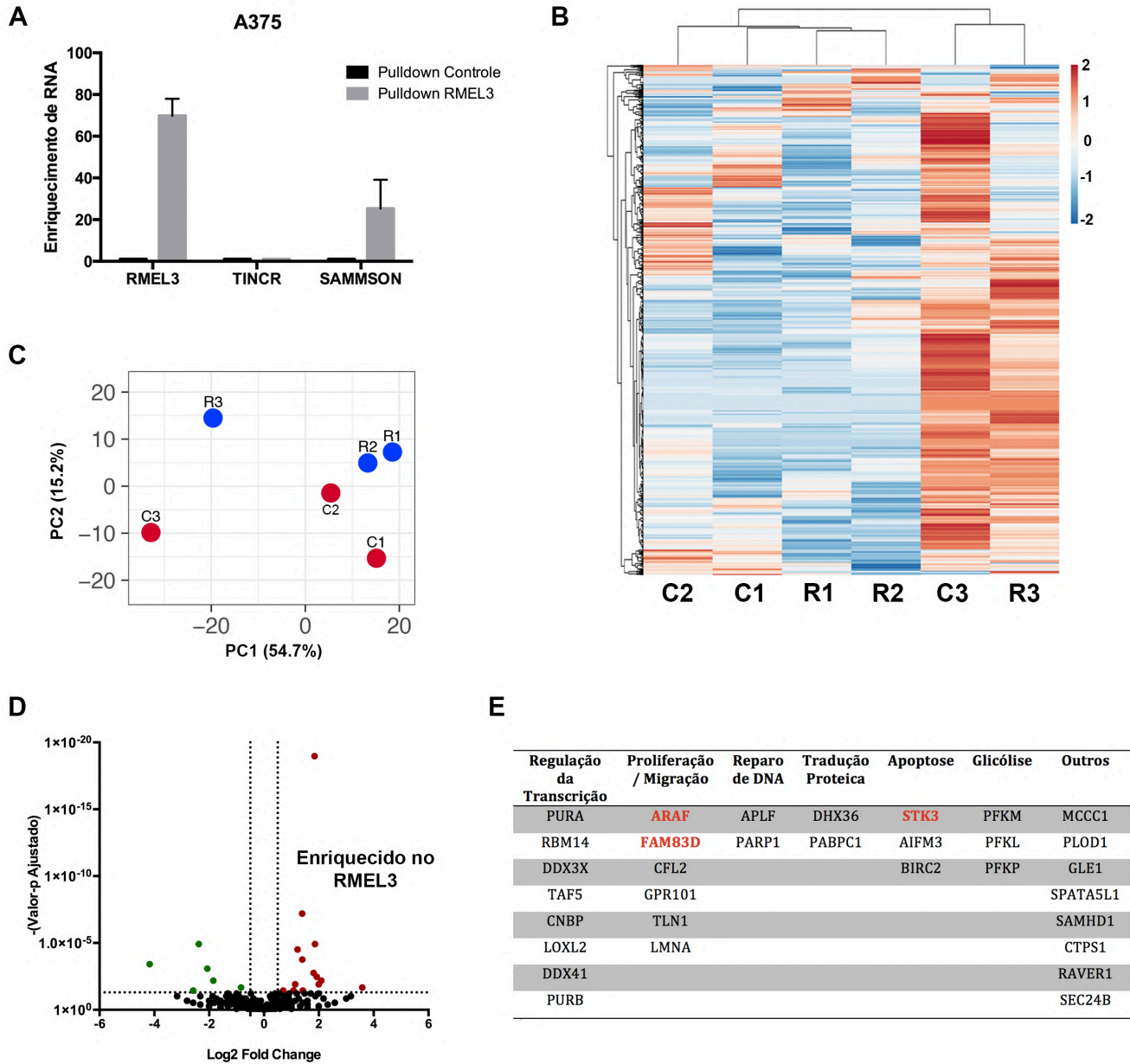


Figura 17: **A.** Experimento de *pull-down* de RNA endógeno utilizando *probes* que reconhecem o RMEL3. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 replicatas biológicas. TINCR e SAMMSON foram utilizados como controle para aferir a pureza/especificidade do experimento **B.** Heatmap de todas as proteínas identificadas pela espectrometria de massas referente ao ensaio de *pull-down*. Clusterização das colunas por distância Euclidiana e as linhas foram clusterizadas

por correlação de Spearman (C= controle; R= RMEL3; e números indicam a replicata) **C.** Gráfico de Análise de Componentes Principais, dispondo o PC1 e PC2. **D.** Volcano plot da reanálise da espectrometria de massas referente ao ensaio de *pulldown* utilizando somente as replicatas 1 e 2. **E.** Tabela das proteínas enriquecidas no grupo do RMEL3 referente ao ensaio de *pulldown*.

Além da regulação da via de MAPK, as proteínas ARAF e CRAF exercem outro importante papel na manutenção pró-oncogênica em melanomas e isso se dá independente da sua atividade de quinase, através da interação e inibição do efeito pró-apoptótico de STK3 (identificada como ligante de RMEL3) (O'Neill *et al.*, 2004; Rauch *et al.*, 2010). Dessa maneira, a interação de RMEL3 com ARAF, STK3 e FAM83D estreita ainda mais a correlação desse lncRNA com a via de MAPK.

5. Discussão

Na última década a incidência do melanoma atingiu níveis históricos. Em contrapartida, o tratamento do melanoma também foi revolucionado com a aprovação de inibidores de tirosina quinase e inibidores do checkpoint imunológico que demonstraram ter um impacto significativo no prognóstico de pacientes com melanoma (Leonardi *et al.*, 2018). Entretanto, apesar de avanços significativos, a remissão tumoral completa sem recorrência da doença é rara e é alcançada, majoritariamente, com a ressecção cirúrgica quando o melanoma é diagnosticado nos estágios iniciais. Dessa maneira, faz-se necessária a identificação de novas moléculas que possam ser utilizadas como método diagnóstico e que sirvam como alvo terapêutico alternativo. Entre essas moléculas, os lncRNAs ganham notoriedade devido sua especificidade tecidual de expressão.

Nesse trabalho, confirmamos as descobertas anteriores do nosso grupo (Sousa *et al.*, 2010) e demonstramos que o lncRNA RMEL3 é altamente enriquecido em melanoma, tanto comparado a tecidos normais (Figura 7A e 7B) quando a outros cânceres (Figura 7C). Tradicionalmente, o diagnóstico de melanoma é baseado em exame dermatoscópico seguido de análise de amostras de tecido contendo células tumorais. A especificidade do nível de expressão de RMEL3, caso validado para uso nesse contexto específico, pode representar uma ferramenta adicional aos patologistas para casos de difícil diagnóstico ou para diagnósticos precoces através de biópsias líquidas, caso essa lncRNA seja secretado da célula (Leonardi *et al.*, 2018).

Além da potencial utilização como método diagnóstico, nosso conjunto de dados evidencia uma possível utilização de RMEL3 como alvo terapêutico. Identificamos a correlação de RMEL3 com as principais alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do melanoma, tais como a deleção do locus CDKN2A/B (Figura 10D e 10E) e a mutação oncogênica BRAF^{V600E} (Figura 7F), sugerindo que RMEL3 pode estar envolvido na progressão desse câncer. Consistentemente, o silenciamento de RMEL3 induziu um potente bloqueio na proliferação/sobrevivência da linhagem de melanoma A375 (Figura 12 B-E), o

qual já foi observado em diversas outras linhagens de melanoma contendo a mutação BRAF^{V600E} (Goedert *et al.*, 2016), mas dessa vez, demonstramos esse efeito utilizando um segundo método de silenciamento. Observamos também um forte impacto na migração celular (Figura 12F e 12G) que é suportada pelas correlações vistas nos pacientes do TCGA, como expressão elevada de RMEL3 nos tumores subcutâneos (Figura 7D) e fenotipicamente invasivos (Figura 7E). A reprogramação transcricional de células de melanoma proliferativas em uma subpopulação de células fenotipicamente invasivas é um evento crítico na origem e disseminação metastática e o estado invasivo é caracterizado por altos níveis de genes de transição epitélio-mesenquimal e genes envolvidos na sinalização do TGF- β (Verfaillie *et al.*, 2015).

Dessa maneira, essa reprogramação e o efeito do fenótipo invasivo induzido por RMEL3 é, provavelmente, sustentado pelo perfil transcriptômico pró-tumorigênico associado a esse lncRNA, como sinalização por FGF, regulação da transição epitélio-mesenquimal, ativação de metaloproteases de matriz, entre outros (Figura 11D). Adicionalmente, vários genes associados a RMEL3 constituem componentes e alvos das vias Ras-MAPK e PI3K-Akt (Figura 11F) que são amplamente ativadas em melanoma e são essenciais para o comportamento maligno desse câncer (Hill *et al.*, 2013).

Além disso, assinaturas moleculares compartilhadas entre o silenciamento de RMEL3 e a supressão de BRAF também destaca a associação de RMEL3 com BRAF^{V600E} e, portanto, com a via de MAPK (Goedert *et al.*, 2016). Alterações comuns são a regulação positiva dos genes FOXD3 (Abel *et al.*, 2013); WNT5A (Anastas *et al.*, 2014); JUN, STAT3 (Jiang *et al.*, 2013); fibronectina (Fedorenko *et al.*, 2016); e outras moléculas envolvidas no metabolismo energético (Parmenter *et al.*, 2014).

A ligação entre RMEL3 e a via de MAPK demonstrou ser ainda mais íntima quando observamos uma forte redução da expressão, principalmente, de RMEL3 Long quando bloqueamos a atividade de BRAF^{V600E} com a administração de PLX4032 (Figura 8A). Esse resultado indica que BRAF é um

regulador atuando à montante de RMEL3. Curiosamente, dados adicionais do nosso grupo de pesquisa também demonstraram, no nível proteico, que o silenciamento de RMEL3 diminui a quantidade de BRAF (Goedert *et al.*, 2016), indicando uma provável retroalimentação positiva entre essas duas moléculas que atuam em conjunto para sustentar o melanoma.

Além da forte correlação com a via de MAPK, RMEL3 também interfere na sinalização de PI3K (Figura 11F). O silenciamento de RMEL3 aumenta a concentração do supressor tumoral PTEN (Goedert *et al.*, 2016) que normalmente bloqueia a transformação maligna induzida por BRAF^{V600E} (Hayward, 2003; Dankort *et al.*, 2009) e, como esperado, foram detectados níveis reduzidos de pAkt (T308) e Akt (Goedert *et al.*, 2016). Essa forte correlação com os genes de PI3K proporciona uma vantagem poderosa para progressão do melanoma, uma vez que a ativação paralela da PI3K pode compensar o feedback negativo induzido por ERK (Sturm *et al.*, 2010; Birtwistle e Kolch, 2011) em células BRAF^{V600E} (Shull *et al.*, 2012).

Conjuntamente, essas mudanças proteicas podem refletir a inativação das vias de sinalização de MAPK e PI3K após o silenciamento de apenas um lncRNA e justifica o forte impacto na sobrevivência e migração celular (Figura 12B-G). Além disso, nosso grupo de pesquisa também demonstrou que a redução de expressão de RMEL3 afeta a progressão do ciclo celular (Goedert *et al.*, 2016) através do acúmulo de células em G1 que pode ser explicado pela diminuição da proteína RB fosforilada e ciclina-B1, bem como níveis aumentados dos principais efetores da parada do ciclo celular em G1 como p21 e p27 (Goedert *et al.*, 2016). Consistentemente com a diminuição da ciclina-B1, o fator de transcrição FOXM1 que tem um pico de expressão em G2/M e ativa a expressão de ciclina-B1 (Down *et al.*, 2012), também é regulado negativamente (Goedert *et al.*, 2016). Adicionalmente, foi detectado um aumento da ciclina-E1 após o silenciamento de RMEL3, o que parece ser contraditório, entretanto quando direcionada ao citoplasma, a ciclina-E1 promove parada em G1 e senescência (Yoshida *et al.*, 2013). Dessa forma, essa impressionante reorganização transcriptômica e proteica através do silenciamento do RMEL3,

nos leva a acreditar que esse lncRNA exerça um papel fundamental para a manutenção do estado maligno das células de melanoma.

Nesse contexto, ainda permanece não esclarecido como se dá a regulação das vias de MAPK e PI3K pelo RMEL3, entretanto apontamos para diferentes possibilidades. Primeiramente devemos considerar que identificamos diferentes isoformas para o transcrito de RMEL3 (Figura 4 e Figura 5A e 5C), as quais podem exercer funções não redundantes. Em segundo lugar a distribuição subcelular das isoformas é distinta, sendo que as isoformas RMEL3 Long e Iso 2 são igualmente distribuídas entre núcleo e citoplasma, enquanto RMEL3 Circular é enriquecido no citoplasma e LOC é nuclear (Figura 6A). Tal característica permite considerar qualquer possibilidade de mecanismo já descrita para os lncRNAs.

Visto isso, o conhecimento da presença do transcrito de RMEL3 no citoplasma (onde os microRNAs se tornam ativos) e a predição de interação de RMEL3 com diversos microRNAs (Figura 13C) identificados com baixa expressão quando RMEL3 encontra-se altamente expresso (Figura 13A), nos alertou para uma possível atuação como sequestrador de microRNAs. Como esperado, diversos alvos desses microRNAs correlacionados com RMEL3 ajudam a explicar o fenótipo agressivo do melanoma correlacionado com RMEL3 e poderão ser confirmados em estudos futuros. Como exemplo disso, observamos que diversos microRNAs (miR-200b, miR-200c, miR-206, miR-206, miR-215) negativamente correlacionados a RMEL3 possuem como alvo o mRNA da proteína antiapoptótica BCL2 (Figura 13B) que apresenta sua expressão e quantidade proteica reduzida após o silenciamento de RMEL3 (Goedert *et al.*, 2016), o que proporcionaria elevado estímulo a apoptose. Essa relação direta com a apoptose é sustentada ainda por um outro conjunto de alterações após o silenciamento de RMEL3 (Goedert *et al.*, 2016) como uma intensa diminuição da proteína transglutaminase que pode inibir a apoptose induzida por Bax (Cho *et al.*, 2010); aumento dos níveis de moléculas pró-apoptóticas de p38 (Cai *et al.*, 2006) e caspase-8 (Juo *et al.*, 1998); e diminuição de YAP (pS127), que é fosforilada por Akt para reduzir a expressão de Bax mediada por p73 (Basu *et*

al., 2003). Todas essas alterações, possivelmente, amparam a proteção contra a apoptose induzida por privação de soro em células que supreepressam RMEL3 (Cardoso *et al.*, 2019).

No contexto de migração celular, vale ressaltar o importante papel de FGF2. Esse transcrito é alvo de regulação pelo miR-215, o qual identificamos como inversamente correlacionado com RMEL3 e, portanto, a hipótese de sequestro do miR-215 por RMEL3 acarretaria em uma maior expressão de FGF2. A proteína FGF2 tem atuação direta nas vias de MAPK e PI3K, seu mRNA correlaciona positivamente com RMEL3 e é reduzido após o silenciamento desse lncRNA (Figura 11F). FGF2 induz a migração de células de melanoma através de mecanismo mediado por Sindecano-4 e proteínas FAK (Chalkiadaki *et al.*, 2009) e, conseqüentemente, sua redução pode explicar a menor migração celular observada na linhagem A375 silenciada para RMEL3 (Figura 12F e 12G).

Adicionalmente, a retenção nuclear de parte dos transcritos de RMEL3 possibilita sua ação na regulação do processo de metilação genômica que, além de ser o mecanismo de ação dos lncRNA mais detalhadamente descrito, é de extrema importância para a progressão do melanoma. Nesse câncer, diferentes estudos apontaram uma associação de BRAF^{V600E} com um perfil de hipometilação (Guo *et al.*, 2015), enquanto outros demonstram que BRAF^{V600E} é associado a uma hipermetilação genômica (Fang *et al.*, 2016), além de autores que defendem um balanço entre hipo e hipermetilação (Hou *et al.*, 2012).

Com o intuito de investigar se RMEL3 está associado à alterações de metilação em pacientes de melanoma, conduzimos diversas análises que apontaram para uma hipermetilação associada à alta expressão de RMEL3 (Figura 15A e 15B). De forma interessante, esse é um padrão oposto ao correlacionado à BRAF^{V600E} (hipometilação - Figura 14A e 14B) em nosso conjunto de pacientes e afeta diferentes locais de metilação (Figura 16C). Vale ressaltar que as sondas de metilação localizadas no locus do RMEL3 não apresentam diferença de metilação, o que indica que a correlação de RMEL3

com a hipermetilação no genoma não afeta seu próprio locus e pode ser um efeito causal da atuação desse lncRNA e não uma associação indireta de sua maior expressão por regulação de metilação em seu gene.

Diversas dessas sondas de metilação correlacionadas com RMEL3 estão localizadas em genes que são afetados pelo silenciamento de RMEL3 e estão correlacionados com esse lncRNA nos dados do TCGA. Dentre os genes, está o FGF2 que, como mencionado anteriormente, está diretamente implicado nas vias de MAPK e PI3K. Inicialmente a hipermetilação no gene de FGF2 parece ser contraditória com a alta expressão desse gene induzido por RMEL3. No entanto, essa alteração de metilação de FGF2 dá-se no corpo do gene (Tabela Suplementar S3), evento que é associado a maior expressão gênica, pois tem papel fundamental para o processo de *splicing*, visto que junções íntron-éxon são ricas em motivos de metilação (Yang *et al.*, 2014). Outro gene identificado nessa análise é o supressor de tumor KLF2 que tem sua expressão reduzida na presença de RMEL3 e possui maiores níveis de metilação no grupo de pacientes com alta expressão de RMEL3. Curiosamente, em câncer pancreático, o silenciamento epigenético de KLF2 é induzido pelo lncRNA SNHG15 através de sua interação com EZH2 e seu direcionamento para promover a metilação da histona H3 no promotor desse gene (Ma *et al.*, 2017). Além do silenciamento epigenômico associado à modulação de histonas, há lncRNAs que atuam na metilação direta no DNA como DACOR1 que interage com DNMT1 e induz a regulação de mais de 300 loci genômicos em células de cólon (Merry *et al.*, 2015).

Dessa maneira é perfeitamente possível que o RMEL3 induza a hipermetilação de certos loci para aumentar ou diminuir a expressão dos genes que proporcionem a progressão do melanoma. Estudos mais específicos serão necessários para avaliar se o envolvimento de RMEL3 com o processo de metilação se dá de forma direta e causal, especialmente porque não identificamos nenhuma proteína ligante de RMEL3 que tenha papel fundamental no mecanismo metilação (Figura 17E).

Em contrapartida, diversas proteínas que interagem com RMEL3 estão ligadas à via de MAPK como ARAF, FAM83D e STK3, as quais exercem funções compatíveis com o que é observado nos ensaios que foram conduzidos com células silenciadas para RMEL3. Além disso, sabendo-se da provável retroalimentação positiva entre BRAF^{V600E} e RMEL3, visto que a inibição de BRAF^{V600E} reduz a expressão de RMEL3 (Figura 8A) e que o silenciamento deste lncRNA reduz a concentração proteica de BRAF^{V600E} (Goedert *et al.*, 2016), inúmeras hipóteses de atuação de RMEL3 podem ser postuladas.

Primeiramente, devemos salientar que a interação de RMEL3 com o complexo heterodimérico ARAF/STK3 seria altamente vantajosa. Como descrito anteriormente, apesar da redução de expressão de CRAF em melanomas BRAF^{V600E}, tais células ainda se beneficiam de uma inibição induzida por siRNA de CRAF, visto que há um aumento da ativação da via de MAPK (Karreth *et al.*, 2009). Dessa forma, pode-se concluir que ainda há uma inibição parcial de CRAF sobre BRAF^{V600E} nessas células e, como citado anteriormente, ARAF atua como estabilizador desse complexo. Estamos questionando se BRAF^{V600E} induz a expressão de RMEL3 para que ARAF seja preferencialmente direcionada para atuar como inibidor de STK3 (inibindo apoptose). Dessa forma a disponibilidade de ARAF como estabilizadora de complexos BRAF^{V600E}/CRAF seria reduzida, facilitando a sinalização de BRAF^{V600E}, conforme representado no modelo hipotético (Figura 18B), comparado a sinalização em um melanócito normal (Figura 18A) e em caso de silenciamento do RMEL3 (Figura 18C). Curiosamente, em células de melanoma com mutação NRAS^{Q161R}, a estabilização da interação CRAF/STK3 é mediada pelo lncRNA OVAAL (Sang *et al.*, 2018), o que permite supor o mesmo papel para RMEL3 em estabilizar a interação ARAF/STK3 em células BRAF^{V600E}.

Em segundo lugar, a interação de RMEL3 com FAM83D é deveras interessante. A inibição de FAM83D diminui o direcionamento de CRAF para a membrana plasmática onde é ativado pelas proteínas RAS (Wang *et al.*, 2015). Hipotetizamos aqui, portanto, que a expressão induzida de RMEL3 por

BRAF^{V600E}, poderia atuar como um inibidor da interação de FAM83D e CRAF, diminuindo o efeito inibitório de CRAF sobre BRAF^{V600E}.

Dessa forma, postulamos, em síntese, que a expressão induzida de RMEL3 por BRAF^{V600E} pode servir como um sistema de defesa para manutenção da elevada estimulação da via de MAPK, sendo mantido através de uma retroalimentação positiva entre BRAF^{V600E} e RMEL3.

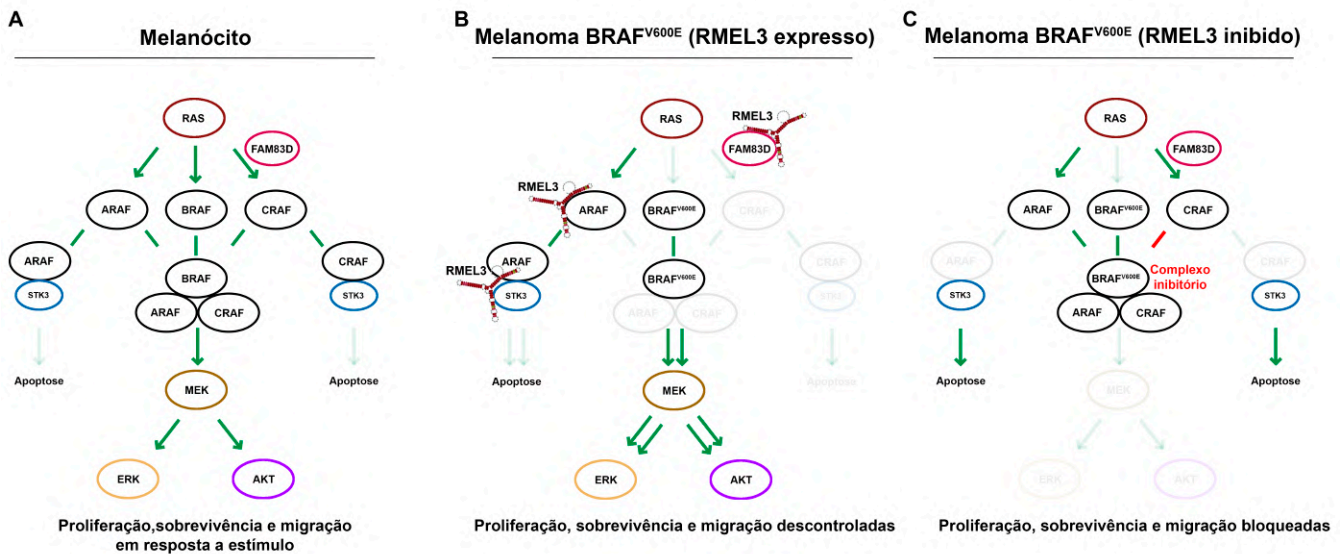


Figura 18: **A.** Sinalização da via de MAPK em melanócitos, onde FAM83D é requerido para o direcionamento de CRAF para membrana plasmática onde é ativado por RAS para posterior formação do complexo ternário entre BRAF, CRAF e ARAF. Demonstrado também que ARAF e CRAF podem inibir a apoptose induzida por STK3 através de interação inibitória. **B.** Melanomas BRAF^{V600E} com alta expressão de RMEL3 onde, possivelmente, RMEL3 interage com FAM83D para impedir a ativação de CRAF ou direcioná-lo preferencialmente para inibição de STK3 e reduzir a interação inibitória de CRAF com BRAF^{V600E}. Adicionalmente, RMEL3 deve aumentar a interação de ARAF e STK3 para inibir a apoptose. Nesse caso há a manutenção da forte sinalização da via de MAPK induzido por BRAF^{V600E} que pode ocorrer via ERK ou AKT. **C.** Melanomas BRAF^{V600E} com a expressão de RMEL3 silenciada, não há impedimento da ação de CRAF, a qual irá formar o complexo inibitório sobre BRAF^{V600E}, recrutando maiores quantidades da proteína estabilizadora ARAF, dessa maneira diminuindo sua ação antiapoptótica. Há redução da sinalização da via de MAPK e/ou maior morte celular induzida por apoptose.

6. Conclusão

Através de uma abordagem integrada de análises de dados de pacientes de melanoma e experimentos *in vitro* identificamos características adicionais que ajudam a elucidar o funcionamento do lncRNA RMEL3. Inicialmente implicado pela sua especificidade de expressão ao melanoma, demonstramos que o RMEL3 participa de processos biológicos e redes transcriptômicas recorrentemente associados a malignidade desse câncer, principalmente através da interação com componentes das vias de MAPK e PI3K.

7. Referências

ABEL, E. V. et al. Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. **J Clin Invest**, v. 123, n. 5, p. 2155-68, May 2013. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3635724/pdf/JCI65780.pdf>>.

AKSAMITIENE, E.; KIYATKIN, A.; KHOLODENKO, B. N. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. **Biochem Soc Trans**, v. 40, n. 1, p. 139-46, Feb 2012. ISSN 0300-5127. Disponível em: <<http://www.biochemsoctrans.org/content/ppbiost/40/1/139.full.pdf>>.

AL-KHOURI, A. M. et al. Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. **J Biol Chem**, v. 280, n. 42, p. 35195-202, Oct 21 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/280/42/35195.full.pdf>>.

AMARAL, T. et al. MAPK pathway in melanoma part II-secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. **Eur J Cancer**, v. 73, p. 93-101, Mar 2017. ISSN 0959-8049. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28162869>>.

ANASTAS, J. N. et al. WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. **J Clin Invest**, v. 124, n. 7, p. 2877-90, Jul 2014. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4071371/pdf/JCI70156.pdf>>.

ATEFI, M. et al. Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28973, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237573/pdf/pone.0028973.pdf>>.

BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 36, p. 6199-206, Dec 20 2009. ISSN 0732-183x. Disponível em: <<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2793035/pdf/zlj6199.pdf>>.

BANDARCHI, B. et al. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **J Clin Pathol**, v. 66, n. 8, p. 644-8, Aug 2013. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/66/8/644.full.pdf> >.

BASU, S. et al. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. **Mol Cell**, v. 11, n. 1, p. 11-23, Jan 2003. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535517> >.

BIRTWISTLE, M. R.; KOLCH, W. Biology using engineering tools: the negative feedback amplifier. **Cell Cycle**, v. 10, n. 13, p. 2069-76, Jul 1 2011. ISSN 1551-4005. Disponível em: < https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3154361/pdf/cc1013_2069.pdf >.

BIS, S.; TSAO, H. Melanoma genetics: the other side. **Clin Dermatol**, v. 31, n. 2, p. 148-55, Mar-Apr 2013. ISSN 1879-1131 (Electronic) 0738-081X (Linking). Disponível em: < [https://http://www.cidjournal.com/article/S0738-081X\(12\)00173-3/pdf](https://http://www.cidjournal.com/article/S0738-081X(12)00173-3/pdf) >.

BROEKAERT, S. M. et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 23, n. 6, p. 763-70, Dec 2010. ISSN 1755-1471. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3107973/pdf/nihms-296009.pdf> >.

CAI, B. et al. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. **J Biol Chem**, v. 281, n. 35, p. 25215-22, Sep 1 2006. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/281/35/25215.full.pdf> >.

CARDOSO, C. et al. The lncRNA RMEL3 protects immortalized cells from serum withdrawal-induced growth arrest and promotes melanoma cell proliferation and tumor growth. v. 32, n. 2, p. 303-314, Mar 2019. ISSN 1755-1471. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30457212> >.

CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 261-74, Mar 2011. ISSN 1947-6019. Disponível em: < >

https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3128635/pdf/10.1177_1947601911408079.pdf >.

CHALKIADAKI, G. et al. Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 6, p. 1323-31, Jun 2009. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19110070> >.

CHAUDHARY, A. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. **Curr Biol**, v. 10, n. 9, p. 551-4, May 4 2000. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822. Disponível em: < <https://http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982200004759?via%3Dihub> >.

CHEN, Y. et al. Ensembl variation resources. **BMC Genomics**, v. 11, p. 293, May 11 2010. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894800/pdf/1471-2164-11-293.pdf> >.

CHO, S. Y. et al. Transglutaminase 2 inhibits apoptosis induced by calcium-overload through down-regulation of Bax. **Exp Mol Med**, v. 42, n. 9, p. 639-50, Sep 30 2010. ISSN 1226-3613. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2947021/pdf/emm-42-639.pdf> >.

CHOU, C. H. et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. D1, p. D296-d302, Jan 4 2018. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29126174> >.

COHEN, P.; FRAME, S. The renaissance of GSK3. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 10, p. 769-76, Oct 2001. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072.

COLAPRICO, A. et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. v. 44, n. 8, p. e71, May 5 2016. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4856967/pdf/gkv1507.pdf> >.

CREYGHTON, M. P. et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 50, p. 21931-6, Dec 14 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: <

<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3003124/pdf/pnas.201016071.pdf> >.

CURTIN, J. A. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med**, v. 353, n. 20, p. 2135-47, Nov 17 2005. ISSN 0028-4793.

DANKORT, D. et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. **Nat Genet**, v. 41, n. 5, p. 544-52, May 2009. ISSN 1061-4036. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2705918/pdf/nihms-103221.pdf> >.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-54, Jun 27 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12068308> >.

DE SNOO, F. A.; HAYWARD, N. K. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. **Cancer Lett**, v. 230, n. 2, p. 153-86, Dec 18 2005. ISSN 0304-3835 (Print) 0304-3835 (Linking). Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16297704> >.

DERRIEN, T. et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome Res**, v. 22, n. 9, p. 1775-89, Sep 2012. ISSN 1088-9051. Disponível em: <
<https://genome.cshlp.org/content/22/9/1775.full.pdf> >.

DESIDERI, E.; CAVALLO, A. L.; BACCARINI, M. Alike but Different: RAF Paralogs and Their Signaling Outputs. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 967-970, May 21 2015. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<https://http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867415005012?via%3Dihub> >.

DOWN, C. F. et al. Binding of FoxM1 to G2/M gene promoters is dependent upon B-Myb. **Biochim Biophys Acta**, v. 1819, n. 8, p. 855-62, Aug 2012. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513242> >.

DRALLE, H. et al. Follicular cell-derived thyroid cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15077, Dec 10 2015. ISSN 2056-676x.

EBLEN, S. T. et al. Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 17, p. 6023-33, Sep 2002. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC134005/pdf/0199.pdf> >.

ECSEDI, S. et al. DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96612, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4022506/pdf/pone.0096612.pdf> >.

EGGERMONT, A. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816-27, Mar 1 2014. ISSN 0140-6736. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24054424> >.

EHRENREITER, K. et al. Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. **J Cell Biol**, v. 168, n. 6, p. 955-64, Mar 14 2005. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2171799/pdf/200409162.pdf> >.

FANG, M. et al. Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. v. 113, n. 5, p. 1250-5, Feb 2 2016. ISSN 0027-8424. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4747705/pdf/pnas.201525619.pdf> >.

FEDORENKO, I. V. et al. Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. **Oncogene**, v. 35, n. 10, p. 1225-35, Mar 10 2016. ISSN 0950-9232. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4679729/pdf/nihms-685787.pdf> >.

FLAHERTY, K. T. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. **N Engl J Med**, v. 363, n. 9, p. 809-19, Aug 26 2010. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: <
<https://http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1002011> >.

GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. **Eur J Cancer**, v. 41, n.

14, p. 2040-59, Sep 2005. ISSN 0959-8049 (Print) 0959-8049. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125929> >.

GAO, J. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. **Sci Signal**, v. 6, n. 269, p. pl1, Apr 2 2013. ISSN 1945-0877. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160307/pdf/nihms622586.pdf> >.

GARBE, C.; LEITER, U. Melanoma epidemiology and trends. **Clin Dermatol**, v. 27, n. 1, p. 3-9, Jan-Feb 2009. ISSN 0738-081x. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095149> >.

GARNETT, M. J.; MARAIS, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell**, v. 6, n. 4, p. 313-9, Oct 2004. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108 (Linking). Disponível em: < [https://http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108\(04\)00279-X.pdf](https://http://www.cell.com/cancer-cell/pdf/S1535-6108(04)00279-X.pdf) >.

GELATO, K. A.; SCHOCKEL, L.; KLINGBEIL, O. Super-enhancers define a proliferative PGC-1alpha-expressing melanoma subgroup sensitive to BET inhibition. v. 37, n. 4, p. 512-521, Jan 25 2018. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5799712/pdf/onc2017325a.pdf> >.

GLAZAR, P.; PAPAVALASILEIOU, P.; RAJEWSKY, N. circBase: a database for circular RNAs. **Rna**, v. 20, n. 11, p. 1666-70, Nov 2014. ISSN 1355-8382. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4201819/pdf/1666.pdf> >.

GLAZER, A. M. et al. Analysis of Trends in US Melanoma Incidence and Mortality. **JAMA Dermatol**, Dec 21 2016. ISSN 2168-6068. Disponível em: < https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/articlepdf/2593033/jamadermatology_Glazer_2016_Id_160028.pdf >.

GOEDERT, L. et al. RMEL3, a novel BRAFV600E-associated long noncoding RNA, is required for MAPK and PI3K signaling in melanoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 24, p. 36711-36718, Jun 14 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5095033/pdf/oncotarget-07-36711.pdf> >.

GOEDERT, L. et al. Long Noncoding RNAs in HPV-Induced Oncogenesis. **Advances in Tumor Virology**, v. 2016, n. 6, p. 9, 2015.

GUO, X.; XU, Y.; ZHAO, Z. In-depth genomic data analyses revealed complex transcriptional and epigenetic dysregulations of BRAFV600E in melanoma. **Mol Cancer**, v. 14, p. 60, Mar 14 2015. ISSN 1476-4598. Disponível em: < https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4373107/pdf/12943_2015_Article_328.pdf >.

HAYWARD, N. K. Genetics of melanoma predisposition. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3053-62, May 19 2003. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18547303> >.

HILL, V. K. et al. The genetics of melanoma: recent advances. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 14, p. 257-79, 2013. ISSN 1527-8204. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23875803> >.

HOU, P. et al. The BRAF(V600E) causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. **Cell Cycle**, v. 11, n. 2, p. 286-95, Jan 15 2012. ISSN 1551-4005. Disponível em: < https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3293379/pdf/cc1102_0286.pdf >.

HUANG DA, W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131956> >.

HULSTAERT, E. et al. Long non-coding RNAs in cutaneous melanoma: clinical perspectives. **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 43470-43480, Jun 27 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5522162/pdf/oncotarget-08-43470.pdf> >.

IRVINE, M. et al. Oncogenic PI3K/AKT promotes the step-wise evolution of combination BRAF/MEK inhibitor resistance in melanoma. v. 7, n. 9, p. 72, Sep 20 2018. ISSN 2157-9024 (Print) 2157-9024. Disponível em: < https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6148266/pdf/41389_2018_Article_81.pdf >.

JIANG, X. et al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 3, p. 598-609, Feb 1 2013. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432. Disponível em: < <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/19/3/598.full.pdf> >.

JOHANNESSEN, C. M. et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 968-72, Dec 16 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3058384/pdf/nihms248195.pdf> >.

JUO, P. et al. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. **Curr Biol**, v. 8, n. 18, p. 1001-8, Sep 10 1998. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740801> >.

KANEHISA, M. The KEGG database. **Novartis Found Symp**, v. 247, p. 91-101; discussion 101-3, 119-28, 244-52, 2002. ISSN 1528-2511 (Print) 1528-2511. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12539951> >.

KARRETH, F. A. et al. C-Raf inhibits MAPK activation and transformation by B-Raf(V600E). **Mol Cell**, v. 36, n. 3, p. 477-86, Nov 13 2009. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <https://http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276509007825?via%3Dihub> >.

KORN, E. L. et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 4, p. 527-34, Feb 1 2008. ISSN 0732-183x. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235113> >.

KRAUTHAMMER, M. et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. **Nat Genet**, v. 44, n. 9, p. 1006-14, Sep 2012. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3432702/pdf/nihms390374.pdf> >.

KUDCHADKAR, R.; PARAISO, K. H.; SMALLEY, K. S. Targeting mutant BRAF in melanoma: current status and future development of combination therapy

strategies. **Cancer J**, v. 18, n. 2, p. 124-31, Mar-Apr 2012. ISSN 1528-9117. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314865/pdf/nihms-357914.pdf> >.

KUK, D. et al. Prognosis of Mucosal, Uveal, Acral, Nonacral Cutaneous, and Unknown Primary Melanoma From the Time of First Metastasis. **Oncologist**, v. 21, n. 7, p. 848-54, Jul 2016. ISSN 1083-7159. Disponível em: <
https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943393/pdf/theoncologist_15522.pdf >.

LANDRY, J. R.; MAGER, D. L.; WILHELM, B. T. Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes. **Trends Genet**, v. 19, n. 11, p. 640-8, Nov 2003. ISSN 0168-9525 (Print) 0168-9525. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585616> >.

LAUBERTH, S. M. et al. H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1021-36, Feb 28 2013. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<https://cloudfront.escholarship.org/dist/prd/content/qt62n2t1s4/qt62n2t1s4.pdf?t=pbavkk> >.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **Int J Oncol**, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, Apr 2018. ISSN 1019-6439. Disponível em: <
<https://http://www.spandidos-publications.com/ijo/52/4/1071/download> >.

LEUCCI, E. et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. **Nature**, v. 531, n. 7595, p. 518-22, Mar 24 2016. ISSN 0028-0836.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 323, Aug 4 2011. ISSN 1471-2105. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3163565/pdf/1471-2105-12-323.pdf> >.

LONG, G. V. et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. **Lancet**, v. 386, n. 9992, p. 444-51, Aug 1 2015. ISSN 0140-6736. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26037941> >.

MA, Z. et al. Long non-coding RNA SNHG15 inhibits P15 and KLF2 expression to promote pancreatic cancer proliferation through EZH2-mediated H3K27me3. **Oncotarget**, v. 8, n. 48, p. 84153-84167, Oct 13 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5663584/pdf/oncotarget-08-84153.pdf> >.

MANDALA, M.; VOIT, C. Targeting BRAF in melanoma: biological and clinical challenges. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 87, n. 3, p. 239-55, Sep 2013. ISSN 1879-0461 (Electronic) 1040-8428 (Linking). Disponível em: < [https://http://www.croh-online.com/article/S1040-8428\(13\)00029-2/pdf](https://http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(13)00029-2/pdf) >.

MAURER, G.; TARKOWSKI, B.; BACCARINI, M. Raf kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities. **Oncogene**, v. 30, n. 32, p. 3477-88, Aug 11 2011. ISSN 1476-5594 (Electronic) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <https://http://www.nature.com/articles/onc2011160.pdf> >.

MENZIES, A. M.; LONG, G. V.; MURALI, R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. **Drug Des Devel Ther**, v. 6, p. 391-405, 2012. ISSN 1177-8881 (Electronic) 1177-8881 (Linking). Disponível em: < <https://http://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=14682> >.

MERRY, C. R. et al. DNMT1-associated long non-coding RNAs regulate global gene expression and DNA methylation in colon cancer. **Hum Mol Genet**, v. 24, n. 21, p. 6240-53, Nov 1 2015. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4599679/pdf/ddv343.pdf> >.

MORENO, M. et al. Epidemiological profile of patients with cutaneous melanoma in a region of southern Brazil. **J Skin Cancer**, v. 2012, p. 917346, 2012. ISSN 2090-2913. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321574/pdf/JSC2012-917346.pdf> >.

NAMIKI, T. et al. Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by metaphase comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gains may predict poor outcome. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 157, n. 1, p. 1-11, Feb 2005. ISSN 0165-4608 (Print) 0165-4608. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15676140> >.

NAZARIAN, R. et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 973-7, Dec 16 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3143360/pdf/nihms303402.pdf> >.

NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. D1, p. D8-d13, Jan 4 2018. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615191> >.

NGOC, P. C. T. et al. Identification of novel lncRNAs regulated by the TAL1 complex in T-cell acute lymphoblastic leukemia. v. 32, n. 10, p. 2138-2151, Oct 2018. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29654272> >.

O'NEILL, E. et al. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. **Science**, v. 306, n. 5705, p. 2267-70, Dec 24 2004. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://science.sciencemag.org/content/sci/306/5705/2267.full.pdf> >.

PANG, B. et al. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. **Nat Commun**, v. 4, p. 1908, 2013. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674280/pdf/ncomms2921.pdf> >.

PANG, K. C.; FRITH, M. C.; MATTICK, J. S. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. **Trends Genet**, v. 22, n. 1, p. 1-5, Jan 2006. ISSN 0168-9525 (Print) 0168-9525. Disponível em: < <https://http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952505003227?via%3Dihub> >.

PARAISO, K. H. et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. **Br J Cancer**, v. 102, n. 12, p. 1724-30, Jun 8 2010. ISSN 1532-1827 (Electronic) 0007-0920 (Linking). Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883709/pdf/6605714a.pdf> >.

PARMENTER, T. J. et al. Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis.

Cancer Discov, v. 4, n. 4, p. 423-33, Apr 2014. ISSN 2159-8274. Disponível em: < <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/candisc/4/4/423.full.pdf> >.

PATEL, S.; PLAYER, M. R. Small-molecule inhibitors of the p53-HDM2 interaction for the treatment of cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 17, n. 12, p. 1865-82, Dec 2008. ISSN 1744-7658 (Electronic) 1354-3784 (Linking). Disponível em: < <https://http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543780802493366> >.

POSCH, C.; ORTIZ-URDA, S. NRAS mutant melanoma--undrugable? **Oncotarget**, v. 4, n. 4, p. 494-5, Apr 2013. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking). Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3720596/pdf/oncotarget-04-494.pdf> >.

PROCACCIA, S. et al. Direct binding of MEK1 and MEK2 to AKT induces Foxo1 phosphorylation, cellular migration and metastasis. **Sci Rep**, v. 7, p. 43078, Feb 22 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5320536/pdf/srep43078.pdf> >.

RAMSKOLD, D. et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. **Nat Biotechnol**, v. 30, n. 8, p. 777-82, Aug 2012. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3467340/pdf/nihms379463.pdf> >.

RAUCH, J. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H blocks MST2-mediated apoptosis in cancer cells by regulating A-Raf transcription. **Cancer Res**, v. 70, n. 4, p. 1679-88, Feb 15 2010. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/70/4/1679.full.pdf> >.

REBOCHO, A. P.; MARAIS, R. ARAF acts as a scaffold to stabilize BRAF:CRAF heterodimers. **Oncogene**, v. 32, n. 26, p. 3207-12, Jun 27 2013. ISSN 0950-9232.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-40, Jan 1 2010. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2796818/pdf/btp616.pdf> >.

RODRIGUEZ, J. et al. ERK1/2 MAP kinases promote cell cycle entry by rapid, kinase-independent disruption of retinoblastoma-lamin A complexes. **J Cell Biol**, v. 191, n. 5, p. 967-79, Nov 29 2010. ISSN 0021-9525. Disponível em: < https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995174/pdf/JCB_201004067.pdf >.

ROSS, M. I.; GERSHENWALD, J. E. Evidence-based treatment of early-stage melanoma. **J Surg Oncol**, v. 104, n. 4, p. 341-53, Sep 2011. ISSN 0022-4790. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858828> >.

RUBINSTEIN, J. C. et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. **J Transl Med**, v. 8, p. 67, Jul 14 2010. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2917408/pdf/1479-5876-8-67.pdf> >.

SANCHEZ CALLE, A.; KAWAMURA, Y. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. v. 109, n. 7, p. 2093-2100, Jul 2018. ISSN 1347-9032. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6029823/pdf/CAS-109-2093.pdf> >.

SANG, B. et al. Dual functions for OVAAL in initiation of RAF/MEK/ERK prosurvival signals and evasion of p27-mediated cellular senescence. v. 115, n. 50, p. E11661-e11670, Dec 11 2018. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://http://www.pnas.org/content/pnas/115/50/E11661.full.pdf> >.

SCHMIDT, K. et al. The lncRNA SLNCR1 Mediates Melanoma Invasion through a Conserved SRA1-like Region. **Cell Rep**, v. 15, n. 9, p. 2025-37, May 31 2016. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889529/pdf/nihms777385.pdf> >.

SHENENBERGER, D. W. Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective. **Am Fam Physician**, v. 85, n. 2, p. 161-8, Jan 15 2012. ISSN 0002-838x. Disponível em: < <https://http://www.aafp.org/afp/2012/0115/p161.pdf> >.

SHI, H. et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. **Nat Commun**, v. 3, p. 724, Mar 6 2012. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: <
<https://http://www.nature.com/articles/ncomms1727.pdf> >.

SHULL, A. Y. et al. Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43369, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3422312/pdf/pone.0043369.pdf> >.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-51, May 19 2003. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232. Disponível em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12789290> >.

SOUSA, J. F. et al. Novel primate-specific genes, RMEL 1, 2 and 3, with highly restricted expression in melanoma, assessed by new data mining tool. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13510, Oct 20 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2958148/pdf/pone.0013510.pdf> >.

STURM, O. E. et al. The mammalian MAPK/ERK pathway exhibits properties of a negative feedback amplifier. **Sci Signal**, v. 3, n. 153, p. ra90, Dec 21 2010. ISSN 1945-0877. Disponível em: <
<http://stke.sciencemag.org/content/3/153/ra90.long> >.

TAN, J. L. et al. Stress from Nucleotide Depletion Activates the Transcriptional Regulator HEXIM1 to Suppress Melanoma. **Mol Cell**, v. 62, n. 1, p. 34-46, Apr 7 2016. ISSN 1097-2765. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4836061/pdf/nihms-772627.pdf> >.

TCGA. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681-96, Jun 18 2015. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091043> >.

THOMAS, N. E. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. **Melanoma Res**, v. 16, n. 2, p. 97-103, Apr 2006. ISSN 0960-8931 (Print) 0960-8931 (Linking). Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567964> >.

VERFAILLIE, A. et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. **Nat Commun**, v. 6, p. 6683, Apr

9 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4403341/pdf/ncomms7683.pdf> >.

VILLANUEVA, J. et al. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. **Cell Rep**, v. 4, n. 6, p. 1090-9, Sep 26 2013. ISSN 2211-1247 (Electronic). Disponível em: <
[https://http://www.cell.com/cell-reports/pdf/S2211-1247\(13\)00464-6.pdf](https://http://www.cell.com/cell-reports/pdf/S2211-1247(13)00464-6.pdf) >.

VOLDERS, P. J. et al. LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. **Nucleic Acids Res**, v. 47, n. D1, p. D135-d139, Jan 8 2019. ISSN 0305-1048. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6323963/pdf/gky1031.pdf> >.

WAGNER, G. P.; KIN, K.; LYNCH, V. J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. **Theory Biosci**, v. 131, n. 4, p. 281-5, Dec 2012. ISSN 1431-7613. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22872506> >.

WAN, P. T. et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 855-67, Mar 19 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <
[https://http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(04\)00215-6.pdf](https://http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(04)00215-6.pdf) >.

WANG, D. et al. FAM83D activates the MEK/ERK signaling pathway and promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 458, n. 2, p. 313-20, Mar 6 2015. ISSN 0006-291x. Disponível em: <
<https://http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X15001473?via%3Dihub> >.

WANG, Z. et al. FAM83D promotes cell proliferation and motility by downregulating tumor suppressor gene FBXW7. **Oncotarget**, v. 4, n. 12, p. 2476-86, Dec 2013. ISSN 1949-2553. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3926842/pdf/oncotarget-04-2476.pdf> >.

WEI, Y. et al. LncRNA UCA1-miR-507-FOXO1 axis is involved in cell proliferation, invasion and G0/G1 cell cycle arrest in melanoma. **Med Oncol**, v. 33, n. 8, p. 88, Aug 2016. ISSN 1357-0560.

WILKS, C. et al. The Cancer Genomics Hub (CGHub): overcoming cancer through the power of torrential data. **Database (Oxford)**, v. 2014, 2014. ISSN 1758-0463. Disponible em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267794> >.

WOLCHOK, J. D. et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. **N Engl J Med**, v. 377, n. 14, p. 1345-1356, Oct 5 2017. ISSN 0028-4793. Disponible em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5706778/pdf/nihms921563.pdf> >.

YAAR, M.; PARK, H. Y. Melanocytes: a window into the nervous system. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 3 Pt 2, p. 835-45, Mar 2012. ISSN 0022-202x. Disponible em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158549> >.

YANG, X. et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. **Cancer Cell**, v. 26, n. 4, p. 577-90, Oct 13 2014. ISSN 1535-6108. Disponible em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4224113/pdf/nihms631195.pdf> >.

YOSHIDA, A.; YONEDA-KATO, N.; KATO, J. Y. CSN5 specifically interacts with CDK2 and controls senescence in a cytoplasmic cyclin E-mediated manner. **Sci Rep**, v. 3, p. 1054, 2013. ISSN 2045-2322. Disponible em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3542532/pdf/srep01054.pdf> >.

ZHENG, Q. et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. **Nat Commun**, v. 7, p. 11215, Apr 6 2016. ISSN 2041-1723. Disponible em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4823868/pdf/ncomms11215.pdf> >.

ZHENG, R. et al. Cistrome Data Browser: expanded datasets and new tools for gene regulatory analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 47, n. D1, p. D729-d735, Jan 8 2019. ISSN 0305-1048. Disponible em: < <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6324081/pdf/gky1094.pdf> >.

ZHOU, B. et al. INO80 governs superenhancer-mediated oncogenic transcription and tumor growth in melanoma. **Genes Dev**, v. 30, n. 12, p. 1440-

53, Jun 15 2016. ISSN 0890-9369. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926866/pdf/1440.pdf> >.

ZIEGLER, C.; KRETZ, M. The More the Merrier-Complexity in Long Non-Coding RNA Loci. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 8, p. 90, 2017. ISSN 1664-2392 (Print) 1664-2392. Disponível em: <
<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403818/pdf/fendo-08-00090.pdf> >.

8. Apêndices

Tabela Suplementar S1: Lista de genes identificados como diferencialmente expressos (log2 fold change <-2 ou >2; valor-p ajustado <0.00001; n=260 genes) na análise do TCGA (RMEL3 High/Low).

mRNA	log2 FC	FDR	mRNA	log2 FC	FDR	mRNA	log2 FC	FDR
OTOR	11.15	3.22E-06	TMEM100	2.21	3.09E-09	RHCG	-2.52	1.19E-08
SLC17A6	8.72	7.25E-11	CNTN4	2.21	1.78E-10	CLCA2	-2.54	7.36E-07
REG1A	8.21	7.82E-08	STAC2	2.20	1.16E-08	FCRL2	-2.54	2.21E-08
SPOCK3	6.69	4.00E-11	ABCA9	2.19	4.64E-14	ARHGAP8	-2.54	3.39E-09
GAD2	5.94	1.40E-06	CHRDL1	2.19	1.79E-08	CXCL14	-2.55	7.56E-11
MYBPC1	4.91	1.19E-14	MEGF10	2.16	1.98E-08	S100P	-2.55	1.88E-08
C2orf82	4.91	3.83E-17	DMRTA1	2.16	3.86E-08	DHRS9	-2.55	9.83E-23
TMPRSS9	4.69	1.60E-24	COL9A3	2.15	1.43E-10	SULT2B1	-2.56	1.04E-09
GRIA2	4.61	2.16E-09	SOD3	2.13	9.94E-15	PCSK9	-2.56	3.15E-08
MRGPRX3	4.47	2.41E-14	KCNIP1	2.13	3.57E-07	AJAP1	-2.60	1.10E-09
CNTNAP4	4.28	1.25E-09	SYNM	2.11	2.29E-19	NAPSA	-2.60	8.04E-14
ST8SIA5	4.20	4.32E-15	ABCA10	2.09	1.14E-12	TBX1	-2.62	3.04E-14
ENTPD2	3.90	3.74E-12	MGP	2.08	1.25E-11	CD177	-2.63	3.75E-09
SLC9A3	3.89	4.86E-17	FREM2	2.06	4.23E-08	AGTR1	-2.63	9.88E-11
VCX3A	3.81	3.35E-11	GPR133	2.06	4.60E-10	G0S2	-2.64	1.54E-20
PTN	3.76	3.13E-17	SERPINA5	2.04	9.27E-08	SH3RF2	-2.65	2.64E-09
CNTN6	3.72	6.89E-09	OLIG1	2.04	2.25E-07	CXCL3	-2.66	3.10E-11
C1QTNF3	3.72	1.88E-23	CHRM1	2.02	1.79E-06	TNS4	-2.68	3.24E-10
VIT	3.49	2.82E-12	TTYH1	2.02	1.57E-08	BNIP1	-2.69	1.60E-10
FAM131B	3.47	1.13E-20	FAM107A	2.02	2.32E-11	SLC16A6	-2.71	7.06E-15
VCX	3.42	1.96E-08	THBS2	2.01	4.28E-12	FCRL1	-2.71	1.86E-06
KLHDC8A	3.39	4.07E-16	THSD7A	2.01	1.03E-12	FLNC	-2.71	2.97E-17
LGALS12	3.33	1.24E-10	ST6GALNA C1	-2.00	3.40E-08	ADAMTS8	-2.73	2.45E-11
WNT16	3.31	3.42E-14	SP5	-2.00	3.70E-07	AP1M2	-2.75	9.26E-06
ITIH5	3.25	7.06E-15	LYPD3	-2.01	7.13E-08	S100A14	-2.79	1.52E-07
TSPAN8	3.24	3.73E-08	TIMD4	-2.03	9.30E-07	TP63	-2.79	3.26E-14
ART3	3.18	5.62E-13	SYNC	-2.04	4.30E-15	CES1	-2.80	3.42E-14
RELN	3.17	1.02E-11	COL7A1	-2.04	1.01E-09	CSTA	-2.83	3.13E-13
WISP3	3.15	4.90E-10	ANPEP	-2.04	1.76E-12	S100A8	-2.84	7.70E-11
C2orf40	3.14	1.21E-08	BTBD11	-2.04	3.42E-11	SLC24A4	-2.86	7.73E-15
ABCA8	3.12	4.94E-14	TMEM156	-2.05	3.35E-11	TMEM45B	-2.87	4.49E-09

LCN2	3.07	6.30E-06	MGST1	-2.06	2.54E-09	TCF21	-2.90	2.19E-06
FAM19A2	3.04	3.42E-18	PKP3	-2.07	2.30E-06	ITGB6	-2.92	5.96E-09
ABCC11	3.01	3.32E-12	KRT80	-2.07	3.54E-07	GJB5	-2.93	1.24E-06
ATP1A2	2.99	5.70E-07	PRH2	-2.07	5.53E-10	RAB25	-2.94	9.52E-06
PLN	2.91	6.75E-17	MMP1	-2.09	1.91E-07	AIM1L	-2.97	7.15E-11
GAP43	2.88	1.37E-09	CCL21	-2.09	4.15E-06	SLC15A1	-2.99	7.73E-06
GAL3ST1	2.86	7.94E-11	ANO2	-2.11	1.09E-08	SDR16C5	-3.00	4.94E-06
ARHGAP6	2.82	4.91E-24	AQP3	-2.11	1.24E-10	MCF2	-3.02	1.01E-07
CHAD	2.67	2.04E-06	SPIB	-2.11	1.79E-09	TCL1A	-3.02	1.72E-10
COL11A2	2.65	9.42E-12	C9orf169	-2.12	2.86E-10	DNER	-3.03	4.25E-08
MSMP	2.64	2.29E-18	CLIC3	-2.14	6.44E-11	EPN3	-3.03	9.60E-07
COL9A1	2.64	3.73E-06	TPRG1	-2.15	1.61E-15	PDPN	-3.03	3.39E-24
F5	2.62	2.26E-12	ADCY2	-2.16	1.18E-06	GSDMC	-3.04	1.85E-11
ZCCHC12	2.61	4.19E-12	RHOV	-2.18	1.98E-09	CYP4F22	-3.06	3.65E-07
TPTE	2.60	5.13E-08	EPHA4	-2.18	4.30E-15	TEKT5	-3.08	5.54E-09
BMX	2.60	1.89E-09	DPP4	-2.18	1.96E-17	FCER2	-3.09	2.65E-08
ATP1B2	2.56	7.56E-16	DNASE1L3	-2.19	1.69E-09	ATP6V0D2	-3.12	5.35E-13
RGS5	2.55	3.32E-19	CXCR5	-2.19	1.58E-07	PDZK1IP1	-3.13	1.02E-06
KANK4	2.53	1.22E-07	EVPL	-2.20	7.77E-07	RRAD	-3.20	3.51E-20
KCNA6	2.52	1.93E-09	MAL2	-2.20	1.64E-06	CAPNS2	-3.21	1.69E-09
COL22A1	2.51	5.34E-11	TGM1	-2.20	1.09E-07	LAMC2	-3.24	1.97E-17
NTRK1	2.50	3.26E-12	ZNF750	-2.22	7.78E-07	CCBE1	-3.26	2.16E-15
SORCS2	2.50	1.46E-14	PROM2	-2.22	2.96E-08	TNMD	-3.27	4.23E-07
CRLF1	2.50	1.10E-09	GPR85	-2.23	8.45E-17	LGR5	-3.28	1.12E-07
MYT1	2.49	3.59E-14	BNC1	-2.23	6.50E-06	SCUBE1	-3.29	7.04E-14
SERPINA3	2.48	2.32E-10	SCNN1B	-2.24	1.03E-08	SLPI	-3.30	5.10E-10
HCN1	2.47	6.51E-09	PLAU	-2.26	3.52E-19	WFDC5	-3.31	9.87E-06
SYTL5	2.46	5.81E-07	C3orf55	-2.27	4.01E-07	CR2	-3.39	3.05E-07
SEMA3E	2.46	3.18E-06	CDA	-2.27	3.20E-15	PI3	-3.41	4.36E-08
ADRA2B	2.45	1.02E-13	EPCAM	-2.28	4.75E-06	TMPRSS1 1D	-3.49	2.55E-06
NPY6R	2.45	6.03E-06	EPHX3	-2.30	1.04E-09	GPX2	-3.51	1.07E-09
TESC	2.44	4.79E-17	SNCAIP	-2.32	2.59E-13	FCAMR	-3.66	9.89E-07
NDST3	2.43	2.86E-07	MMP10	-2.32	8.61E-06	GRHL2	-3.66	2.20E-07
FREM1	2.42	1.11E-09	WFDC1	-2.35	2.18E-09	KRT15	-3.75	7.98E-10
DHH	2.39	1.68E-13	CCDC64B	-2.35	5.53E-06	DEFB1	-3.75	3.73E-08
GRIK3	2.37	2.12E-08	FGFR2	-2.36	8.06E-09	NR5A1	-3.79	8.60E-09
CHRM3	2.37	9.94E-11	S100A9	-2.36	6.16E-11	SERPINB4	-3.92	3.50E-06
INHA	2.34	2.22E-13	S100A2	-2.37	8.22E-10	CHIT1	-3.93	5.62E-19
FOXJ1	2.33	3.01E-06	CNFN	-2.39	4.50E-10	TMPRSS4	-4.04	6.07E-10
PPP1R1B	2.32	1.46E-07	BANK1	-2.39	2.10E-08	SERPINB7	-4.04	1.02E-10
MAGEC2	2.32	6.63E-06	FERMT1	-2.40	1.76E-06	AMY1A	-4.09	2.18E-10

TMEM59L	2.31	2.07E-09	MS4A1	-2.41	4.59E-07	HES2	-4.23	1.85E-24
CAPS	2.30	9.83E-15	CD19	-2.41	3.75E-06	GADL1	-4.47	8.32E-10
TRIM67	2.30	4.09E-10	PRG4	-2.43	5.90E-07	FGF5	-4.48	3.29E-11
ABCA6	2.29	1.26E-11	VPREB3	-2.43	1.51E-11	DES	-4.86	6.87E-20
WFDC2	2.28	2.16E-07	NCCRP1	-2.43	1.58E-09	AQPEP	-4.98	7.37E-22
MAMDC2	2.28	3.97E-08	ALDH3B2	-2.44	3.22E-07	SULT1E1	-5.04	1.26E-06
EMILIN3	2.28	2.99E-09	BLK	-2.46	1.95E-08	CPN2	-5.25	1.64E-17
POU3F3	2.28	8.09E-09	HS3ST2	-2.47	7.12E-17	PAEP	-5.45	3.69E-18
ANGPTL7	2.28	1.77E-06	FAM129C	-2.47	3.21E-08	LIX1	-5.67	2.26E-18
ACAN	2.28	3.69E-12	STAP1	-2.47	4.60E-10	SFTPA2	-6.14	2.79E-08
RYR2	2.27	8.82E-11	C20orf26	-2.49	8.28E-08	SLC38A8	-6.93	4.92E-13
LIFR	2.23	4.58E-12	VIPR1	-2.50	7.24E-13	SMR3B	-7.18	2.05E-06
HRASLS5	2.23	1.39E-06	KLK13	-2.50	7.46E-06	SFTPB	-7.28	4.62E-12
ITGA10	2.22	3.42E-09	HP	-2.51	2.65E-06	KRT9	-8.69	1.95E-08
TGFA	2.21	3.61E-11	DACH1	-2.52	1.65E-14			

Tabela Suplementar S2: Lista de genes validados entre as análises de RMEL3 do TCGA [RMEL3 High/Low (log₂ fold change <-0.5 ou >0.5; valor-p ajustado <0.05)] e microarranjo da célula A375-SM silenciada para RMEL3 (log₂ fold change <-0.5 ou > 0.5; p <0.01).

Gene	TCGA		Microarranjo		Gene	TCGA		Microarranjo	
	log ₂ FC	FDR	log ₂ FC	Valor-p		log ₂ FC	FDR	log ₂ FC	Valor-p
REG1A	8.21	7.8E-08	-1.96	1.4E-05	RHPN2	0.54	9.1E-04	-1.04	4.0E-06
C2orf82	4.91	3.8E-17	-2.10	5.8E-08	PNMAL1	0.54	2.2E-02	-0.89	6.1E-05
MRGPRX3	4.47	2.4E-14	-2.13	3.3E-03	FAM53A	0.54	9.2E-04	-1.60	8.4E-04
ART3	3.18	5.6E-13	-1.03	6.1E-05	LPGAT1	0.53	7.9E-09	-1.51	2.9E-06
WISP3	3.15	4.9E-10	-1.15	8.2E-04	SSBP2	0.53	8.5E-04	-0.93	1.2E-04
LCN2	3.07	6.3E-06	-2.48	1.0E-09	MGLL	0.53	1.9E-02	-1.80	5.3E-05
ATP1B2	2.56	7.6E-16	-2.84	5.3E-11	ANKRD10	0.53	5.5E-05	-1.35	2.1E-06
TESC	2.44	4.8E-17	-2.35	3.1E-11	CTDSPL	0.53	9.4E-05	-1.86	1.2E-06
FREM1	2.42	1.1E-09	-2.26	3.1E-06	GLT8D2	0.53	4.7E-02	-1.30	3.9E-05
HAPLN1	2.38	1.8E-04	-1.20	1.4E-07	FCGR2A	0.53	4.1E-03	-0.76	5.8E-03
SEC14L4	2.34	7.2E-04	-1.18	1.2E-05	GCNT2	0.52	1.7E-02	-1.12	7.1E-06
REG3G	2.33	2.3E-04	-2.33	1.2E-07	GNG4	0.52	4.0E-02	-1.19	2.7E-04
PPP1R1B	2.32	1.5E-07	-3.03	3.7E-07	S100B	0.52	3.5E-02	-2.03	2.7E-06
MAMDC2	2.28	4.0E-08	-3.06	2.0E-16	LEPROT	0.52	1.2E-05	-0.74	5.7E-04
TGFA	2.21	3.6E-11	-3.55	2.6E-20	MAN1A2	0.51	1.3E-06	-2.30	2.1E-08
COL9A3	2.15	1.4E-10	-0.86	1.2E-03	ZNF426	0.51	2.6E-05	-3.77	2.8E-05
SYNM	2.11	2.3E-19	-1.12	4.0E-06	WDR90	0.51	5.4E-06	-0.77	4.1E-03
MGP	2.08	1.3E-11	-0.72	6.8E-04	ITPR1	0.51	8.2E-03	-1.45	7.2E-05
SERPINA5	2.04	9.3E-08	-1.00	1.1E-04	TNC	0.50	4.8E-02	-1.02	3.1E-03
OLIG1	2.04	2.3E-07	-1.12	8.7E-03	GBA	-0.50	6.7E-05	0.69	2.0E-03
IGFBP3	1.97	3.8E-14	-2.06	6.8E-14	PHLDB3	-0.51	2.5E-06	1.54	2.2E-03
CSPG5	1.94	1.7E-11	-5.32	4.1E-04	SERF2	-0.51	4.9E-09	1.05	6.4E-05
CSGALNA CT1	1.88	5.0E-24	-1.59	1.4E-09	MLKL	-0.51	1.1E-03	0.59	9.8E-03
DNAH9	1.78	2.9E-04	-1.22	9.6E-05	LY96	-0.52	6.7E-03	0.75	7.1E-04
FGFRL1	1.65	1.1E-12	-3.57	4.7E-11	ATP6V0B	-0.52	6.5E-09	0.64	3.4E-03
DCT	1.62	3.7E-05	-3.12	2.3E-11	SLC41A2	-0.53	7.3E-04	1.69	2.4E-04
FAM84B	1.54	3.5E-09	-2.12	5.2E-09	SEC61A2	-0.53	3.0E-06	2.45	9.8E-10
SNX22	1.53	3.7E-12	-0.95	3.2E-04	RASGRP3	-0.53	1.3E-02	2.80	1.2E-08
SLC5A3	1.53	4.0E-16	-2.05	1.9E-08	SEC13	-0.54	1.6E-12	1.00	2.2E-04
TF	1.40	1.5E-03	-1.65	8.7E-11	C4orf48	-0.54	3.1E-03	1.66	1.8E-04
ITGB3	1.37	8.1E-07	-1.34	3.3E-08	FKBP15	-0.54	2.1E-12	0.91	5.8E-04
SLC26A2	1.36	4.8E-15	-1.74	3.0E-03	UBE2N	-0.54	6.3E-14	0.98	3.8E-04

BAALC	1.36	8.7E-05	-0.96	1.9E-05		NRP1	-0.54	5.5E-03	2.07	4.1E-05
KCNK5	1.35	3.9E-09	-1.43	2.2E-03		CROT	-0.54	1.0E-05	1.45	2.9E-06
XYLT1	1.29	6.4E-08	-1.23	3.6E-07		DERL2	-0.55	1.1E-08	0.64	3.9E-03
PCOLCE	1.29	5.1E-07	-0.76	5.6E-03		VAMP8	-0.55	2.6E-03	0.67	2.3E-03
CADM1	1.28	1.4E-07	-0.82	8.4E-03		CDC42EP2	-0.55	5.1E-04	1.13	3.7E-05
PLCB1	1.27	8.2E-09	-2.39	1.2E-03		HERPUD1	-0.55	4.6E-07	2.13	7.2E-13
RHOBTB3	1.27	2.7E-13	-1.37	1.3E-08		SLC1A5	-0.55	4.6E-05	0.72	1.6E-03
MAGEA1	1.26	4.1E-02	-0.98	9.5E-04		ARL4A	-0.56	1.3E-04	1.30	4.7E-03
PLP1	1.22	1.4E-08	-1.11	5.5E-04		ANXA6	-0.56	2.2E-05	2.02	1.1E-04
LAMA4	1.22	1.5E-14	-0.65	2.8E-03		SPAG1	-0.56	4.5E-04	1.44	6.1E-06
CREB5	1.21	8.8E-08	-1.15	9.2E-05		ADK	-0.56	5.5E-07	0.72	7.9E-03
GAS7	1.17	8.0E-12	-0.99	9.3E-06		PLEKHO1	-0.56	2.9E-04	0.62	6.1E-03
OSMR	1.16	1.7E-06	-0.67	8.3E-03		SRI	-0.56	1.4E-08	0.63	8.5E-03
SGK3	1.16	1.6E-12	-0.77	4.8E-04		LACTB	-0.56	5.7E-07	1.07	3.0E-05
MPZ	1.15	1.5E-03	-2.12	8.5E-10		MYOF	-0.57	2.6E-03	2.56	1.6E-14
RAB3IP	1.13	1.3E-05	-0.69	2.0E-03		ERP29	-0.57	1.4E-11	0.58	8.8E-03
NID1	1.13	2.3E-07	-1.22	4.5E-04		DCBLD1	-0.57	3.0E-04	0.83	6.7E-03
ZCCHC24	1.11	1.1E-16	-0.84	1.8E-03		PLEKHG1	-0.58	7.3E-04	1.42	3.2E-03
PCMTD2	1.10	2.0E-14	-0.90	2.0E-04		P2RX4	-0.59	6.4E-07	1.11	3.6E-04
EPHA3	1.10	1.9E-04	-1.16	4.0E-05		ZFP36	-0.59	5.5E-04	0.79	4.9E-04
TLE2	1.07	8.0E-06	-1.41	1.2E-03		TUBB6	-0.60	3.9E-06	0.88	1.6E-04
NLGN1	1.06	1.1E-05	-0.89	1.3E-03		ACAT2	-0.60	7.7E-06	0.85	1.7E-04
NPAS1	1.05	5.5E-05	-1.61	9.9E-10		CCDC107	-0.61	4.2E-07	1.15	1.3E-03
GPX3	1.05	1.1E-04	-2.80	1.4E-06		TOM1	-0.61	2.1E-10	0.64	4.1E-03
STK32A	1.04	8.1E-05	-2.95	2.5E-13		COL6A3	-0.61	3.7E-03	0.77	4.4E-03
SOX8	1.03	1.6E-04	-2.81	4.5E-16		FUCA1	-0.61	8.8E-05	1.47	6.3E-08
NPW	1.02	4.8E-03	-1.84	1.6E-05		SQRDL	-0.61	2.6E-04	2.18	8.0E-12
CXXC5	1.02	1.4E-10	-0.62	3.6E-03		ELOVL4	-0.62	2.1E-02	1.19	3.7E-03
P2RX7	1.00	4.5E-06	-1.53	1.1E-09		ZDHHC12	-0.62	1.7E-10	0.75	2.3E-03
TNFRSF19	1.00	3.2E-06	-0.72	8.3E-04		LIPA	-0.62	2.5E-06	1.37	3.8E-06
CHRNA6	1.00	1.3E-02	-0.79	6.9E-03		RHOG	-0.62	2.3E-11	0.60	7.7E-03
AFAP1L2	1.00	1.3E-05	-0.73	2.4E-03		SRGN	-0.63	5.5E-04	0.72	2.2E-03
BMP8B	0.98	4.2E-04	-1.06	2.0E-03		DHRS1	-0.64	3.2E-06	0.76	1.4E-03
ARNT2	0.97	1.4E-08	-1.30	5.2E-08		ZNF385A	-0.64	2.3E-05	1.47	4.7E-05
RLBP1	0.94	1.7E-02	-2.05	1.0E-06		GLIPR1	-0.65	2.6E-03	5.16	3.7E-38
AIF1L	0.94	1.1E-05	-2.30	2.0E-15		NAGK	-0.65	2.4E-13	0.95	5.8E-05
AEBP1	0.93	4.7E-08	-0.92	2.1E-04		RASD1	-0.65	1.1E-02	1.23	1.5E-03
C3orf70	0.92	4.4E-05	-2.59	5.1E-14		ABCB1	-0.66	1.7E-03	3.24	7.1E-14
SSFA2	0.91	1.4E-15	-0.92	8.1E-05		CYFIP2	-0.66	1.3E-03	1.84	1.4E-04
OAF	0.91	8.4E-06	-1.02	4.5E-06		HLA-DMA	-0.66	1.6E-03	1.82	2.2E-10
CECR7	0.91	1.3E-05	-0.79	5.6E-03		RNF149	-0.67	3.6E-13	0.60	6.0E-03

GNG2	0.91	2.6E-08	-2.90	2.1E-16		PIK3IP1	-0.67	2.5E-04	1.07	1.1E-03
SORL1	0.91	2.1E-04	-1.33	4.5E-07		QPCTL	-0.69	2.9E-08	1.01	1.0E-03
KBTBD7	0.90	8.1E-11	-1.04	7.8E-04		LYPD1	-0.69	1.7E-02	3.72	4.2E-12
CLMN	0.90	1.0E-08	-1.28	1.4E-04		CITED1	-0.69	1.6E-02	1.33	1.9E-07
FZD7	0.89	1.3E-05	-1.11	8.1E-05		TCIRG1	-0.71	2.7E-08	0.94	1.3E-04
LAMB1	0.87	4.6E-08	-0.70	1.0E-03		TTYH3	-0.72	2.2E-06	1.26	2.5E-06
ARHGEF16	0.85	6.2E-03	-4.48	3.1E-03		ANKRD29	-0.72	2.2E-03	2.19	3.5E-04
HIP1	0.85	1.5E-12	-1.87	2.3E-10		LMTK3	-0.72	3.3E-03	2.42	1.4E-03
APOD	0.84	4.5E-03	-2.34	7.9E-10		TRPV2	-0.73	1.8E-05	0.78	1.6E-03
HSPA12A	0.83	8.3E-07	-0.67	6.4E-03		C14orf2	-0.73	8.5E-13	0.69	1.8E-03
TRIL	0.82	1.4E-02	-1.38	2.6E-04		COMTD1	-0.73	3.1E-06	1.08	9.7E-05
HPS5	0.82	5.8E-09	-1.03	2.0E-05		ARHGAP30	-0.74	1.1E-03	2.54	1.5E-05
TMOD1	0.81	1.4E-05	-3.60	2.7E-09		CHCHD10	-0.74	4.5E-06	1.22	4.0E-07
KAT2B	0.81	6.0E-07	-1.13	1.7E-03		SLC22A18AS	-0.74	2.9E-03	0.99	3.2E-03
OSBPL10	0.79	5.4E-05	-2.44	6.5E-16		ICAM3	-0.74	5.3E-07	0.88	2.5E-04
PDZD4	0.79	9.0E-04	-1.28	1.7E-04		KCNK6	-0.74	1.6E-05	1.50	2.2E-03
ENC1	0.78	6.2E-06	-0.85	1.2E-03		CDKAL1	-0.75	3.5E-07	1.14	2.2E-04
RXRG	0.77	2.7E-02	-1.11	7.6E-06		MICB	-0.75	2.9E-05	1.61	3.4E-06
PRR4	0.77	8.6E-03	-1.19	1.1E-04		TNFRSF25	-0.76	5.9E-04	1.30	2.1E-04
KANK2	0.76	3.0E-08	-1.09	6.1E-03		SEC61B	-0.76	1.2E-13	0.65	3.8E-03
SELENBP1	0.75	1.1E-03	-1.40	1.3E-04		ARHGDI8	-0.76	3.8E-05	1.54	5.0E-09
JMY	0.75	1.7E-11	-1.88	2.2E-04		SLC31A1	-0.77	3.4E-11	0.72	1.8E-03
BTBD3	0.74	3.1E-09	-0.65	2.3E-03		EMR1	-0.77	8.4E-03	1.81	3.2E-04
GTF2IRD2B	0.73	3.4E-07	-0.81	3.9E-03		XKR8	-0.77	6.6E-06	2.04	4.7E-10
LRP3	0.72	1.5E-04	-1.12	9.4E-04		TM4SF18	-0.78	4.1E-04	1.68	3.8E-03
NFIA	0.72	6.6E-06	-2.63	4.2E-13		DGKA	-0.78	1.7E-05	1.06	1.3E-04
PPFIBP2	0.72	1.6E-07	-1.08	1.2E-03		ITGA5	-0.78	5.8E-05	1.87	5.1E-11
GLCE	0.72	1.7E-09	-1.32	7.3E-08		TICAM2	-0.78	1.6E-04	0.88	5.9E-03
FGF2	0.71	4.0E-03	-2.45	3.0E-07		HLA-DMB	-0.78	4.1E-04	1.88	5.0E-11
MEGF8	0.70	2.0E-11	-1.08	5.1E-03		TDO2	-0.80	4.7E-04	2.61	3.3E-03
CTSF	0.69	2.9E-05	-1.21	4.3E-06		WIPI1	-0.80	1.7E-06	1.00	1.2E-04
FMNL2	0.69	5.1E-05	-0.81	1.2E-03		PRKAG2	-0.81	2.2E-08	1.52	4.6E-05
PDZRN3	0.69	5.7E-04	-1.56	3.0E-03		UCN2	-0.82	2.8E-02	0.96	6.8E-05
RPGR	0.68	2.7E-07	-0.99	1.5E-03		FAM101B	-0.83	1.9E-07	1.48	4.2E-07
TMEM231	0.68	1.2E-08	-0.72	9.0E-03		CTSC	-0.83	2.4E-09	1.24	3.8E-07
PLD6	0.67	8.1E-05	-0.77	6.0E-03		ARHGAP22	-0.84	2.1E-04	2.27	9.6E-09
MEIS3P1	0.67	2.2E-08	-0.94	5.1E-05		IL21R	-0.86	1.9E-03	4.76	8.7E-06
CBX6	0.66	4.3E-06	-0.85	4.7E-04		INPP5D	-0.87	1.3E-04	3.75	9.6E-04
SNHG8	0.66	4.8E-06	-1.16	5.1E-04		NCALD	-0.87	1.7E-05	1.02	3.8E-05
NANOS1	0.66	1.2E-03	-0.90	2.8E-03		CD68	-0.88	5.0E-08	0.95	4.0E-05

CSRP1	0.66	1.4E-07	-0.83	1.5E-04		S100A11	-0.89	3.7E-12	0.61	5.4E-03
MBLAC2	0.66	2.2E-09	-1.51	1.1E-06		KLF2	-0.90	4.2E-09	0.95	5.2E-04
FZD9	0.65	1.1E-02	-1.25	1.5E-07		DUSP10	-0.91	2.3E-07	1.91	3.8E-03
TMED4	0.64	6.3E-13	-1.06	7.1E-06		HMOX1	-0.95	7.6E-09	3.18	4.4E-16
AFAP1L1	0.63	1.9E-05	-0.65	6.5E-03		NKD1	-0.95	4.6E-04	2.53	4.1E-06
MRPS6	0.62	9.6E-06	-0.59	4.9E-03		VSNL1	-0.96	2.2E-02	5.68	2.8E-08
HIST1H2A C	0.62	1.9E-03	-0.99	5.7E-05		NPL	-0.96	1.7E-08	0.58	8.7E-03
APP	0.62	3.5E-04	-0.74	3.4E-03		WT1	-0.96	3.4E-02	1.55	2.7E-03
ARHGEF6	0.62	1.0E-03	-0.56	8.9E-03		POPDC3	-0.97	5.3E-04	1.17	1.1E-03
ZMIZ1	0.62	3.5E-10	-0.56	8.6E-03		ANKRD9	-0.97	5.6E-08	1.52	9.1E-09
LHFPL2	0.62	9.2E-09	-0.85	1.1E-04		MYO1D	-0.98	2.0E-07	1.46	2.1E-07
FRMD3	0.62	5.4E-03	-1.68	1.8E-07		CSRP2	-0.98	4.3E-05	1.06	2.2E-04
FGF13	0.61	1.7E-02	-1.28	1.9E-06		GLRX	-0.99	1.2E-11	0.83	2.6E-04
P2RX6	0.61	1.4E-02	-0.83	4.9E-03		PRDM1	-0.99	1.4E-07	3.76	1.8E-12
FBXL18	0.61	1.4E-08	-0.72	1.8E-03		SLC7A11	-1.01	5.0E-04	1.89	3.3E-06
HIST2H4A	0.61	6.1E-04	-1.61	6.8E-09		CDH15	-1.05	9.7E-03	0.78	9.6E-04
TUB	0.60	1.8E-02	-1.64	4.7E-04		SLC14A1	-1.05	1.4E-02	1.09	2.5E-03
ZNF462	0.60	3.5E-07	-0.88	2.3E-04		LCP1	-1.06	3.1E-06	1.52	1.7E-05
GMCL1	0.60	1.9E-09	-0.94	2.1E-03		HAS3	-1.07	1.8E-05	2.17	3.0E-07
SNHG7	0.59	2.9E-04	-0.66	5.7E-03		ADRA2A	-1.07	2.9E-05	1.19	5.0E-03
SNX1	0.59	1.1E-09	-2.30	6.8E-11		MICAL1	-1.07	3.6E-13	0.68	5.4E-03
SIPA1L2	0.59	1.2E-04	-0.71	9.3E-04		SCARB1	-1.10	2.3E-09	1.00	1.5E-05
MZF1	0.59	1.1E-07	-0.63	6.7E-03		ZNF185	-1.13	2.3E-07	1.68	1.2E-03
RCAN3	0.58	2.0E-05	-2.20	5.9E-06		RGS16	-1.13	1.3E-05	2.66	2.4E-15
CCDC50	0.58	1.3E-06	-0.67	1.8E-03		AKR1C2	-1.14	3.7E-03	1.14	6.3E-06
BEST1	0.58	9.3E-03	-0.98	5.8E-05		CORO1A	-1.15	4.4E-06	3.01	1.8E-05
DUSP6	0.58	2.1E-04	-2.25	1.0E-04		FOSL1	-1.17	1.1E-05	1.21	1.3E-06
SNUPN	0.58	6.8E-06	-0.58	8.2E-03		CKMT1A	-1.22	2.1E-02	2.02	8.1E-03
UNC119B	0.58	5.4E-10	-1.30	5.6E-05		CSTB	-1.24	2.3E-18	0.55	1.0E-02
SAP30	0.57	3.4E-05	-2.00	2.6E-05		TNFAIP3	-1.24	1.6E-12	1.19	1.7E-03
TMEM170 B	0.57	3.3E-06	-1.34	4.0E-04		CCL2	-1.24	3.5E-09	2.97	9.0E-04
BCL2	0.57	1.2E-03	-2.21	1.7E-04		WNT5A	-1.31	5.1E-06	0.93	7.2E-03
IGSF11	0.57	1.5E-02	-3.32	2.2E-10		TM4SF19	-1.35	1.1E-04	0.91	1.2E-04
ICK	0.57	2.5E-05	-0.60	9.1E-03		COL13A1	-1.41	4.3E-07	1.03	3.1E-03
ICA1	0.57	2.6E-03	-1.25	3.3E-03		SLC2A6	-1.47	1.7E-18	1.72	8.1E-10
ADAT1	0.56	1.7E-07	-0.98	6.0E-05		TMEM45A	-1.47	5.3E-10	1.83	5.8E-10
FARP2	0.56	9.1E-05	-1.05	2.4E-03		FABP4	-1.48	9.4E-05	2.78	6.3E-03
SLC12A2	0.56	2.9E-07	-0.64	7.9E-03		PLAUR	-1.53	3.0E-12	2.12	2.4E-12
UHMK1	0.56	2.6E-04	-3.31	1.1E-09		FAM180A	-1.54	1.3E-04	2.92	2.2E-03
PTCH1	0.55	9.5E-04	-2.93	9.0E-05		TRIML2	-1.98	9.5E-05	3.99	7.8E-12

PYGB	0.55	2.5E-04	-0.96	1.3E-05		KRT80	-2.07	3.5E-07	1.45	3.4E-03
CBX7	0.55	5.7E-04	-1.24	2.7E-05		MMP1	-2.09	1.9E-07	4.20	5.3E-15
SECISBP2 L	0.54	2.0E-08	-0.86	4.0E-04		MMP3	-2.09	1.3E-05	3.18	1.4E-13
FOXO3	0.54	2.5E-06	-0.79	4.6E-03		DNER	-3.03	4.3E-08	1.17	5.4E-06
AP3M2	0.54	1.8E-05	-1.50	9.1E-09		KRT15	-3.75	8.0E-10	2.03	2.5E-03

Tabela Suplementar S3: Lista de genes validados entre as análises de RMEL3 do TCGA (RMEL3 High/Low) e microarranjo da célula A375-SM silenciada para RMEL3 indicando as *probes* de metilação que foram identificadas na análise de RMEL3 High/Low.

Gene	TCGA	Microarranjo	Metilação				Gene	Local	Ilha CpG
	log2 FC	log2 FC	Código sonda	Média Low	Média High	FDR			
ABCB1	-0.66	3.24	cg25477497	0.4732	0.6125	0.000469022	ABCB1	Body	N_Shore
ABCB1	-0.66	3.24	cg19861260	0.4179	0.5957	4.68E-05	ABCB1	Body	N_Shore
ANKRD10	0.53	-1.35	cg08067983	0.5450	0.6761	1.88E-05	ANKRD10	Body	
ARHGAP22	-0.84	2.27	cg15881404	0.4291	0.5609	0.000125454	ARHGAP22	Body	Island
ARHGDI B	-0.76	1.54	cg08251901	0.6407	0.7574	0.000145529	ARHGDI B	TSS1500	
ARHGDI B	-0.76	1.54	cg22614759	0.5565	0.6750	2.77E-05	ARHGDI B	5'UTR	
C2orf82	4.91	-2.10	cg06283342	0.4530	0.5922	1.39E-05	C2orf82	Body	Island
C2orf82	4.91	-2.10	cg05709124	0.2266	0.3864	2.84E-06	C2orf82	3'UTR	Island
CHRNA6	1.00	-0.79	cg27051318	0.2169	0.3245	0.005334646	CHRNA6	TSS200	
CHRNA6	1.00	-0.79	cg07906724	0.4145	0.5616	0.000118016	CHRNA6	TSS1500	
CLMN	0.90	-1.28	cg05239310	0.2801	0.4778	1.63E-08	CLMN	3'UTR	
COL9A3	2.15	-0.86	cg08021508	0.6204	0.7520	6.24E-07	COL9A3	Body	Island
COMTD1	-0.73	1.08	cg15336438	0.2212	0.3314	0.000123616	COMTD1	Body	Island
COMTD1	-0.73	1.08	cg26483332	0.1524	0.2631	0.000119837	COMTD1	3'UTR	N_Shore
CORO1A	-1.15	3.01	cg02358862	0.6309	0.7664	6.77E-06	CORO1A	Body	S_Shore
CORO1A	-1.15	3.01	cg27583010	0.6210	0.7531	5.86E-05	CORO1A	Body	S_Shelf
CORO1A	-1.15	3.01	cg06749872	0.6316	0.7423	1.55E-06	CORO1A	Body	S_Shelf
CSPG5	1.94	-5.32	cg23009042	0.3617	0.5286	2.26E-08	CSPG5	3'UTR	
DCBLD1	-0.57	0.83	cg23172480	0.5186	0.6318	4.82E-05	DCBLD1	TSS1500	N_Shore
DCBLD1	-0.57	0.83	cg02575483	0.5808	0.7166	2.37E-08	DCBLD1	Body	
DCBLD1	-0.57	0.83	cg07643096	0.5388	0.6607	0.000101175	DCBLD1	TSS1500	N_Shore
DCBLD1	-0.57	0.83	cg27642470	0.6358	0.7532	2.25E-06	DCBLD1	TSS1500	N_Shore
DGKA	-0.78	1.06	cg01167556	0.5188	0.6520	5.78E-05	DGKA	TSS1500	N_Shelf
FBXL18	0.61	-0.72	cg13290371	0.5297	0.6444	5.30E-07	FBXL18	3'UTR	N_Shelf
FBXL18	0.61	-0.72	cg25343388	0.6694	0.7734	1.92E-08	FBXL18	Body	S_Shore
FBXL18	0.61	-0.72	cg22108567	0.3979	0.5440	1.95E-06	FBXL18	Body	S_Shore

									e
FGF2	0.71	-2.45	cg17547898	0.6941	0.7953	1.44E-06	FGF2	Body	
FOSL1	-1.17	1.21	cg07420137	0.6203	0.7715	1.24E-06	FOSL1	Body	S_Shelf
FRMD3	0.62	-1.68	cg13858974	0.6474	0.7536	0.000116186	FRMD3	Body	N_Shelf
FUCA1	-0.61	1.47	cg08896387	0.6414	0.7482	0.000926991	FUCA1	Body	N_Shelf
GAS7	1.17	-0.99	cg05160751	0.5883	0.7045	0.001285995	FUCA1	Body	N_Shelf
GAS7	1.17	-0.99	cg25379762	0.6642	0.7802	4.18E-08	GAS7	Body	N_Shelf
GAS7	1.17	-0.99	cg04267691	0.5307	0.6862	2.16E-08	GAS7	Body	
GAS7	1.17	-0.99	cg06130714	0.6241	0.7651	1.40E-07	GAS7	Body	
GAS7	1.17	-0.99	cg26996616	0.6036	0.7444	8.23E-08	GAS7	Body	
GAS7	1.17	-0.99	cg06377635	0.5347	0.6672	2.03E-06	GAS7	Body	
GAS7	1.17	-0.99	cg17192115	0.3766	0.5027	0.001761985	GAS7	Body	
GAS7	1.17	-0.99	cg12697325	0.4733	0.5906	8.35E-06	GAS7	Body	
HAPLN1	2.38	-1.20	cg18156471	0.6692	0.7885	9.39E-06	HAPLN1	5'UTR	
HLA-DMB	-0.78	1.88	cg21578596	0.5904	0.7167	7.32E-10	HLA-DMB	Body	
ICAM3	-0.74	0.88	cg05323251	0.5337	0.6445	5.87E-06	ICAM3	Body	S_Shelf
ICAM3	-0.74	0.88	cg14145194	0.6361	0.7604	1.13E-06	ICAM3	Body	
ICAM3	-0.74	0.88	cg18054725	0.3415	0.4543	5.62E-06	ICAM3	TSS200	
ITGA5	-0.78	1.87	cg20909017	0.3451	0.4575	0.000296625	ITGA5	Body	
ITGA5	-0.78	1.87	cg03826594	0.3612	0.4939	0.032297035	ITGA5	Body	Island
ITGA5	-0.78	1.87	cg02419321	0.5455	0.6624	1.10E-05	ITGA5	Body	N_Shore
KCNK5	1.35	-1.43	cg18705155	0.2998	0.4105	0.010457309	KCNK5	Body	N_Shelf
KLF2	-0.90	0.95	cg02668248	0.6362	0.7411	0.000129528	KLF2	Body	Island
KLF2	-0.90	0.95	cg05906166	0.3042	0.4372	0.000281551	KLF2	Body	Island
LCP1	-1.06	1.52	cg06477663	0.7379	0.8550	8.48E-05	LCP1	TSS1500	
LHFPL2	0.62	-0.85	cg03627295	0.5523	0.6614	3.23E-06	LCP1	1stExon	
LHFPL2	0.62	-0.85	cg17771150	0.5637	0.7037	6.02E-06	LCP1	5'UTR	
LHFPL2	0.62	-0.85	cg02642549	0.5287	0.6386	0.001739924	LHFPL2	Body	Island
LMTK3	-0.72	2.42	cg09371853	0.2953	0.4129	0.001073635	LMTK3	Body	N_Shore
MAMDC2	2.28	-3.06	cg14403200	0.4620	0.5794	4.90E-05	MAMDC2	Body	Island
MAMDC2	2.28	-3.06	cg02515233	0.4247	0.5341	3.11E-05	MAMDC2	1stExon	Island
MPZ	1.15	-2.12	cg13210580	0.5151	0.6312	0.000848405	MPZ	Body	
MYO1D	-0.98	1.46	cg00164282	0.5419	0.6533	0.001834813	MYO1D	Body	
NAGK	-0.65	0.95	cg18991240	0.4843	0.6066	0.000262933	NAGK	Body	S_Shelf
NID1	1.13	-1.22	cg24495667	0.5855	0.7401	1.33E-08	NID1	Body	
NKD1	-0.95	2.53	cg16750777	0.7175	0.8458	8.42E-09	NKD1	Body	Island
NKD1	-0.95	2.53	cg00083833	0.4318	0.5871	9.63E-06	NKD1	Body	Island
NLGN1	1.06	-0.89	cg17482360	0.7543	0.8678	1.55E-07	NLGN1	Body	
NLGN1	1.06	-0.89	cg23642200	0.4497	0.6334	2.15E-05	NLGN1	5'UTR	

NLGN1	1.06	-0.89	cg06304401	0.4139	0.5929	6.62E-05	NLGN1	5'UTR	
NLGN1	1.06	-0.89	cg23440822	0.4794	0.6517	4.32E-05	NLGN1	5'UTR	
NLGN1	1.06	-0.89	cg13582793	0.4271	0.5737	8.34E-05	NLGN1	5'UTR	
NLGN1	1.06	-0.89	cg21120436	0.5099	0.6507	0.00027089	NLGN1	5'UTR	
NLGN1	1.06	-0.89	cg24600895	0.3887	0.5053	0.000222316	NLGN1	5'UTR	
NRP1	-0.54	2.07	cg25179876	0.4947	0.6057	0.001761985	NRP1	Body	
NRP1	-0.54	2.07	cg17425818	0.3579	0.4974	0.000786217	NRP1	Body	
OSBPL10	0.79	-2.44	cg02099390	0.5302	0.6341	0.000686325	OSBPL10	Body	
P2RX4	-0.59	1.11	cg16460342	0.6229	0.7321	2.19E-06	P2RX4	Body	
PCOLCE	1.29	-0.76	cg22082800	0.3980	0.5510	2.75E-07	PCOLCE	Body	Island
PCOLCE	1.29	-0.76	cg26100986	0.2709	0.4651	6.66E-06	PCOLCE	Body	Island
PCOLCE	1.29	-0.76	cg10612492	0.4756	0.6626	2.30E-07	PCOLCE	Body	Island
PCOLCE	1.29	-0.76	cg25680486	0.3597	0.5246	4.29E-07	PCOLCE	Body	Island
PDZRN3	0.69	-1.56	cg23337650	0.5275	0.6425	0.000344476	PDZRN3	Body	
PLEKHO1	-0.56	0.62	cg23369564	0.4505	0.5707	0.002250771	PLEKHO1	Body	S_Shore
POPDC3	-0.97	1.17	cg05874450	0.0979	0.2041	0.015306271	POPDC3	5'UTR	N_Shore
PPP1R1B	2.32	-3.03	cg05897163	0.6505	0.7656	1.99E-06	PPP1R1B	TSS1500	N_Shore
PRDM1	-0.99	3.76	cg26351406	0.1493	0.2801	0.047371138	PRDM1	TSS200	N_Shore
PRDM1	-0.99	3.76	cg08369079	0.5048	0.6102	0.002516098	PRDM1	Body	
PRDM1	-0.99	3.76	cg02108623	0.5049	0.6495	9.18E-05	PRDM1	Body	S_Shore
PRDM1	-0.99	3.76	cg08302325	0.6797	0.7810	1.03E-05	PRDM1	Body	
PRDM1	-0.99	3.76	cg22196848	0.1178	0.2577	0.001661043	PRDM1	5'UTR	Island
RHOG	-0.62	0.60	cg03085719	0.4099	0.5500	3.97E-07	RHOG	5'UTR	N_Shore
SORL1	0.91	-1.33	cg07356488	0.6433	0.7577	7.24E-06	SORL1	Body	
SORL1	0.91	-1.33	cg08441314	0.6064	0.7376	0.000105438	SORL1	Body	
SORL1	0.91	-1.33	cg20069407	0.5171	0.7120	5.83E-08	SORL1	Body	
SORL1	0.91	-1.33	cg05921138	0.5675	0.7122	9.01E-06	SORL1	Body	
SORL1	0.91	-1.33	cg03055520	0.4622	0.6069	4.33E-08	SORL1	Body	
TNFAIP3	-1.24	1.19	cg25934495	0.7130	0.8176	0.000104596	TNFAIP3	Body	
TNFAIP3	-1.24	1.19	cg22014112	0.5460	0.7788	8.51E-09	TNFAIP3	Body	S_Shelf
TRIL	0.82	-1.38	cg00361495	0.3577	0.5111	0.001142501	TRIL	1stExon	Island
TRPV2	-0.73	0.78	cg09093656	0.3057	0.4254	0.002080281	TRPV2	Body	
TTYH3	-0.72	1.26	cg22788953	0.8252	0.9259	4.79E-08	TTYH3	Body	
TTYH3	-0.72	1.26	cg12300084	0.6951	0.8572	2.37E-08	TTYH3	Body	N_Shelf
TTYH3	-0.72	1.26	cg11319427	0.7528	0.8820	1.01E-06	TTYH3	Body	N_Shelf
TTYH3	-0.72	1.26	cg12903094	0.7718	0.8952	0.001044307	TTYH3	Body	N_Shelf
TTYH3	-0.72	1.26	cg03041617	0.6686	0.7900	0.002975687	TTYH3	Body	N_Shelf
TUBB6	-0.60	0.88	cg07307078	0.2678	0.3942	0.014178703	TUBB6	TSS1500	Island

TUBB6	-0.60	0.88	cg16546503	0.2788	0.4532	9.26E-05	TUBB6	TSS1500	N_Shore
TUBB6	-0.60	0.88	cg03507241	0.2663	0.4058	0.009881304	TUBB6	TSS1500	Island
WNT5A	-1.31	0.93	cg18562578	0.4178	0.5181	0.020316025	WNT5A	Body	Island
WNT5A	-1.31	0.93	cg26712080	0.1231	0.2675	0.000662034	WNT5A	Body	Island
WNT5A	-1.31	0.93	cg20746482	0.3609	0.4907	0.01613867	WNT5A	Body	N_Shore
WNT5A	-1.31	0.93	cg26554505	0.2215	0.3342	0.007625538	WNT5A	Body	N_Shore
WNT5A	-1.31	0.93	cg08666668	0.4177	0.5281	0.000549959	WNT5A	Body	N_Shore
WNT5A	-1.31	0.93	cg02867696	0.4420	0.5510	0.000920777	WNT5A	Body	N_Shore
WNT5A	-1.31	0.93	cg18010752	0.3338	0.4390	0.002844427	WNT5A	Body	N_Shore
WNT5A	-1.31	0.93	cg24216596	0.5862	0.6911	0.003552058	WNT5A	Body	N_Shore
WNT5A	-1.31	0.93	cg17679453	0.4830	0.5858	0.000608073	WNT5A	Body	N_Shore
WNT5A	-1.31	0.93	cg18562578	0.4178	0.5181	0.020316025	WNT5A	Body	Island
XKR8	-0.77	2.04	cg24311947	0.1504	0.2545	0.033240753	XKR8	TSS200	Island
XKR8	-0.77	2.04	cg13804316	0.2855	0.4393	3.58E-05	XKR8	Body	S_Shore
XKR8	-0.77	2.04	cg00563229	0.1938	0.3180	0.010107158	XKR8	TSS1500	Island
XKR8	-0.77	2.04	cg10519271	0.3928	0.5161	0.000285846	XKR8	1stExon	Island
XKR8	-0.77	2.04	cg00265863	0.2084	0.3225	0.016307651	XKR8	TSS200	Island
XKR8	-0.77	2.04	cg20809881	0.2131	0.3206	0.038171831	XKR8	TSS1500	Island
XYLT1	1.29	-1.23	cg07531182	0.4972	0.5988	4.35E-05	XYLT1	Body	
XYLT1	1.29	-1.23	cg04113258	0.4997	0.6387	2.17E-06	XYLT1	Body	
ZMIZ1	0.62	-0.56	cg24982682	0.4400	0.5524	8.69E-05	ZMIZ1	5'UTR	
ZMIZ1	0.62	-0.56	cg14371731	0.3517	0.5650	3.46E-06	ZMIZ1	Body	Island
ZMIZ1	0.62	-0.56	cg17853216	0.2048	0.3548	0.000987985	ZMIZ1	Body	Island
ZMIZ1	0.62	-0.56	cg26654807	0.2223	0.3660	0.001606597	ZMIZ1	Body	Island
ZMIZ1	0.62	-0.56	cg20543544	0.4954	0.6371	4.35E-07	ZMIZ1	Body	Island
ZMIZ1	0.62	-0.56	cg17705334	0.2028	0.3307	0.006900969	ZMIZ1	Body	Island
ZMIZ1	0.62	-0.56	cg23346408	0.2226	0.3387	0.007849654	ZMIZ1	Body	N_Shore

Lucas Goedert^{1,2}, Jessica R. Plaçá^{2,3}, Emily M. Nunes⁴,
Gabriela N. de Bom⁵ and Enilza M. Espreafico^{1,2}

¹Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ²National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy and Center for Cell-Based Therapy, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ³Clinical Oncology, Stem Cell and Cell Therapy Program, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ⁴Molecular Biology Laboratory, Center for Translational Research in Oncology, Cancer Institute of São Paulo—ICESP, São Paulo, Brazil. ⁵Biochemistry and Bioprospection Program, Center of Chemistry, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT: Long noncoding RNAs (lncRNAs) play important roles in a wide range of oncogenic processes, including malignant transformation, epigenetic reprogramming, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis development. lncRNAs induced by oncogenic viral proteins were shown to play critical roles in tumor initiation and progression. Despite this, little is known about Human papillomavirus (HPV)-induced modulation of host's lncRNAs. In this review, we gathered published information about altered lncRNAs upon HPV status (infection/protein activity), making use of descriptive research works and published gene expression microarray experiments. A diversity of lncRNAs demonstrated to be altered, including metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1), H19, and maternally expressed gene 3 (MEG3). Their functions in several cancers were reviewed, indicating that they may represent potential candidates for future research on HPV-induced oncogenesis.

KEYWORDS: human papillomavirus, lncRNA, cancer, ncRNA, virus

CITATION: goedert et al. long noncoding rNAs in HPV-induced oncogenesis. *Advances in Tumor Virology* 2016;6 1–9 doi:10.4137/ATv.s29816.

TYPE: review

RECEIVED: July 17, 2015. **RESUBMITTED:** November 22, 2015. **ACCEPTED FOR PUBLICATION:** November 24, 2015.

ACADEMIC EDITOR: Frank J. Jenkins, editor in chief

PEER REVIEW: Three peer reviewers contributed to the peer review report. Reviewers' reports totaled 461 words, excluding any confidential comments to the academic editor.

FUNDING: This work was supported by grants to eme from Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de são Paulo (FAPes P-2014/18189-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-311347/2011). FAPESP provided fellowships to lg (2014/07726-0) and emn (2013/20470-1). coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior provided fellowship to Jr P and gnd. eme was awarded with a CNPq research fellowship (311347/2011-8). lg, Jr P, and eme are members of the center for cell therapy, ce Pid/FAPes P (2013/08135-2).

The authors confirm that the funder had no influence over the study design, content of the article, or selection of this journal.

COMPETING INTERESTS: Authors disclose no potential conflicts of interest.

COPYRIGHT: © the authors, publisher and licensee Libertas Academica Limited. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY-NC 3.0).

CORRESPONDENCE: goedertlucas@gmail.com

Paper subject to independent expert blind peer review. All editorial decisions made by independent academic editor. Upon submission manuscript was subject to anti-plagiarism scanning. Prior to publication all authors have given signed confirmation of agreement to article publication and compliance with all applicable ethical and legal requirements, including the accuracy of author and contributor information, disclosure of competing interests and funding sources, compliance with ethical requirements relating to human and animal study participants, and compliance with any copyright requirements of third parties. This journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Provenance: the authors were invited to submit this paper.

Published by Libertas Academica. Learn more about this journal.

Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are epitheliotropic viruses that belong to the *Papillomaviridae* family and present specificity for different anatomic sites.^{1,2} Close to 200 HPV types were described by DNA genome sequencing.^{1–3} The great majority is classified into three genera based on the major capsid protein L1 genomic homology^{2–5}: alpha-papillomavirus, isolated predominantly from genital lesions;^{6,7} beta-papillomavirus that, reinforced by ultraviolet B irradiation, may be involved in the development of nonmelanoma skin cancer (NMSC), which was first observed in patients with Epidermodysplasia verruciformis;^{8–10} and gamma-papillomavirus that, with mu and nu genera, is predominantly observed in cutaneous lesions. HPV genera tropism to anatomical sites allows another clinical grouping: alpha viruses associated as “mucosal” or “genital” types and beta and gamma viruses as cutaneous types.^{3,4,9}

These viruses can also be classified by their involvement in the genesis of benign or malignant lesions.^{3,11,12} Some viral types such as HPV6 and 11 were associated with benign proliferations such as common warts and condyloma, being considered as nononcogenic or low-risk types.^{13,14} On the other

hand, HPV16, 18, 31, and 33 were classified as oncogenic or high-risk types in consequence of their strong association with premalignant and malignant cervical lesions.^{1,3,9,15}

HPV Biology and Cancer

HPVs have a nonenveloped capsid of 50 nm in diameter that includes a molecule of double-stranded circular DNA with approximately 8 kb in length.¹⁶ HPV genome contains an average of eight open reading frames, divided into three regions.⁴ Effector proteins are transcribed from the early region (second region), which constitutes six open reading frames (E1, E2, E4, E5, E6, and E7), encoding proteins mainly involved in DNA replication, gene transcription (E1 and E2), and cellular transformation (E5, E6, and E7);⁴ the first region is a long control region that contains the regulatory function of E6 and E7 transcription; and the third is a late region, which is the genomic site of L1 and L2 that transcribes, respectively, the major capsid protein and minor capsid protein, involved in the assembly of viral particles.^{4,17}

HPV is responsible for one of the most frequent sexually transmitted infections in both men and women^{17,18} and is strongly associated with uterine cervix,¹⁹ vulva,²⁰ and anal



tumors in women.^{17,21,22} In men, HPV infection is associated with penile and anal cancers,²³ while head and neck tumors are well described in both genders.^{24,25} The prevalence of viral infection differs among anatomical sites: HPV DNA is highly detected in cervical cancer,¹⁹ close to 50% in vulva²⁰ and penile tumors,²³ as well as 20% in oropharynx cancers.^{17,26}

It is established that for the development of HPV-associated carcinoma, the activities of the high-risk E6 and E7 proteins are necessary.^{10,27} The oncogenic protein E6 promotes tumor suppressor p53 protein degradation via the ubiquitin-proteasome pathway,²⁸ and telomerase activation by the heterodimer HPV E6/E6-associated protein (E6AP), reinforced by degradation of the hTERT repressor NFX1-91²⁹⁻³² and E6 binding to hTERT promoter.³³ Other cellular proteins were identified as E6-interacting proteins, such as PDZ family members (e.g. hDIg, hScribble, MUPP1, PTPN13, PATG, and MAG1),³⁴ which are related to HPV-induced malignancy,³⁵ and the transcriptional coactivator p300/chitin-binding protein that results in the downregulation of p53 activity.³⁶ E6 has also been shown to abolish extrinsic apoptotic signaling by directly binding to the tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR-1),³⁷ thus, avoiding its interaction with the TNFR1-associated death domain, which results in the inhibition of TNFR-1 DD-mediated apoptosis.³⁷ Intrinsic apoptosis can also be blocked by E6-induced degradation of Bak proapoptotic protein.³⁸

On the other hand, E7 oncoprotein binds to and induces the degradation of the tumor suppressor retinoblastoma protein (RB)³⁹ and affects the expression of S-phase genes by directly disrupting pRB/E2F complex.^{40,41} E7 promotes cell proliferation by interacting with the retinoblastoma family members p107⁴² and p130,⁴³ cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor proteins p27⁴⁴ and p21,⁴⁵ and histone deacetylases.^{46,47} The function of E7 can be remarkably extended to promote cell survival by upregulating interleukin-6⁴⁸ and the antiapoptotic Mcl-1²⁶ and activating the AKT/PKB pathway.^{49,50}

Although HPV protein interaction with the host's proteins has advanced in the past decades, the complete HPV oncogenic mechanisms remain to be fully elucidated. Investigation of HPV-induced modulation of host's lncRNAs emerges as a possibility to provide new advances in this field.

Long Noncoding RNAs

Recent studies in transcriptome have demonstrated that nearly 80% of human genome produces noncoding RNAs (ncRNAs),⁵¹ indicating that a much larger fraction of the genome may be involved in the post-transcriptional events in gene expression.⁵²

Several classes of ncRNAs have been identified, including microRNA, small nucleolar RNAs (snoRNAs), and PIWI-interacting RNAs (piRNAs). In the past few years, an important component of ncRNA class has been studied: the long ncRNAs (lncRNAs) that are defined as RNAs longer than 200 nucleotides.⁵³ Strong evidences describe that human

genome has more than 14000 lncRNA genes units, associated with the regulation of distinct mechanisms and harboring expression patterns depending on the cell type, developmental stage, or disease situation, such as cancer.⁵⁴⁻⁵⁷

lncRNAs can regulate several processes in eukaryotic organisms, although most of their functions and biochemical properties are still unknown. They can be classified according to their genomic location and biogenesis: being expressed from intergenic regions (lincRNA) such as lincRNA-p21⁵⁸ and Pint lncRNA,⁵⁹ from vestigial genes that lost their coding potential (pseudogene-encoded lncRNAs) as BRAFP1,⁶⁰ INTS6P1,⁶¹ and HMGA1P6;⁶² from the opposite strand of mRNA (antisense lncRNA) as PCNA-AS1⁶³ and MDC1-AS;⁶⁴ or can be generated by the splicing machinery,^{54,65,66} constituting long intronic ncRNA as ci-ankrd52.⁶⁷

lncRNAs influence gene expression by several pathways and are often associated with epigenetic regulation by silencing specific genes⁶⁸ and acting as chromatin modulators^{69,70} and histone modifiers.^{52,71} lncRNAs can also alter gene expression through alternative splicing,⁷² modulating the rates of RNA polymerase II initiation/elongation,⁷³ and forming paraspeckles structures.⁷⁴ In post-transcriptional levels, lncRNA can act in translation⁷⁵ and/or stability of target mRNAs⁶³ and as decoys for microRNAs, altering protein turnover.⁶⁶

Recent findings have revealed changes in expression levels of lncRNAs upon stresses (e.g. diseases), and their implications in pathophysiology are becoming better understood, particularly in cancer.⁷⁶

Viral Cancers and Long Noncoding RNAs

Virus-induced modulation of lncRNAs is arising as oncogenic mechanisms for tumor development and progression. In fact, specifically in hepatocellular carcinoma (HCC), lncRNA's modulation by viral proteins has been implicated to increase protumorigenic features by influencing pivotal pathways of carcinogenesis.

In HCC, highly upregulated in liver cancer (HULC) lncRNA plays a central role in hepatitis B virus (HBV) X protein (Hbx)-mediated hepatocarcinogenesis. Hbx directly activates HULC gene promoter via binding to the cAMP-responsive element-binding protein.⁷⁷ Once activated, HULC downregulates the tumor suppressor p18 expression, which leads to enhanced cell proliferation *in vitro* and *in vivo*.⁷⁷ Interestingly, HULC knockdown abolishes the Hbx-enhanced cell proliferation through upregulating p18. This demonstrates the essential role of HULC in Hbx-mediated hepatocarcinogenesis.⁷⁷

Hbx expression can also modulate tumor suppressor lncRNAs, such as lncRNA-Dreh. Hbx transgenic mice have decreased lncRNA-Dreh expression, which abolishes its function of inhibiting HCC growth and metastasis *in vitro* and *in vivo*.⁷⁸ This lncRNA was reported to inhibit tumor metastasis by combining with the intermediate filament protein vimentin, which appears to change the normal



cytoskeleton structure, thereby inhibiting cell migration.⁷⁸ In humans, the ortholog lncRNA-Dreh is downregulated in HBV-associated HCC tissues and has a potential to be applied as an independent prognostic factor for patient survival.⁷⁸

Moreover, HBV integration site in human genome is an important feature in HCC. Chimeric Hbx-LINE1 is an lncRNA produced in consequence of HBV integration (viral-human gene fusion), which can be detected in 23.3% of HBV-associated HCC tumors.⁷⁹ Hbx-LINE1 activates Wnt/ β -catenin signaling, promotes cell motility through epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and correlates with poorer patient survival.⁷⁹

These brief examples point out an importance to study virus-induced modulation of host's lncRNAs in virus-related cancers.

HPV and lncRNA

Although HPV-induced modulation of host's microRNAs has been recently explored demonstrating its increasing importance for HPV oncogenesis (for detailed review refer to Refs.^{80–84}), long ncRNAs have not gained much importance yet, despite their oncogenic functions have been shown in other viral cancers.^{77,79}

To date, as per the authors' knowledge, only a couple of examples as metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) lncRNA and mitochondrial lncRNAs have been directly linked to HPV oncogenic protein activity. MALAT1 expression was shown to be directly affected by HPV16 E6/7 activity, altering CaSki cells proliferation,⁸⁵ and is upregulated in oral keratinocytes transfected with HPV16 E6 and E6/7.⁸⁶ HPV proteins can also induce SncmtRNA-1 and -2 expression and downregulate ASncmtRNA-1 and -2 mitochondrial lncRNAs transcript levels.^{87–89} ASncmtRNA-1 and -2 were shown to have a decreased expression in early cervical carcinoma,⁹⁰ whereas ASncmtRNA-2 is induced in aging in endothelial cells, where it appears to affect replicative senescence by possibly participating in the cell cycle arrest in G2/M phase.⁹¹ On the other hand, SncmtRNA-1 correlation with cell proliferation suggests a function for this transcript in cell cycle progression.^{87,88}

Besides that, a diversity of works have performed gene expression microarray^{92,93} to compare transcriptome alteration upon HPV infection and/or activity, providing candidate's list of HPV-modulated lncRNAs. By analyzing these works, it is noticeable that some lncRNAs are differentially expressed according to HPV status, an indication that they may contribute to oncogenesis. Table 1 summarizes what have been published in this field, and the next section shows the evidence of important oncogenic functions of some well-characterized lncRNAs in cancer.

Cancer-related lncRNAs

MALAT1. MALAT1, also known as nuclear-enriched abundant transcript 2, is a highly expressed lncRNA in

lung,⁹⁴ pancreas,⁹⁴ and a diversity of other healthy tissues and is located on chromosome 11q13, being conserved in several species.⁹⁴ MALAT1 transcription is initiated from multiple promoters,^{94–96} although it is not known which promoter is predominantly used to drive the expression in specific tissues.⁹⁷ Its biological function still remains to be clarified but given its interaction with several splicing factors, such as SRSF1 (ASF/SF2), SC35 (SRSF2), and SRSF3,^{98–101} and also considering its nuclear localization in SC35 speckles, MALAT1 might be involved in the regulation of alternative splicing.⁹⁶

MALAT1 is overexpressed in numerous cancers and exerts oncogenic functions, which can lead to cell proliferation and cancer progression.⁹⁷ The implication of MALAT1 in lung cancer gained much attention after its discovery in non-small cell lung cancer (NSCLC).⁹⁴ In lung cancer, it is known that this lncRNA does not affect alternative splicing but regulates the gene expression of metastasis-associated genes (e.g. GPC6, ADAMTS12, MCAM, and PRKCE),¹⁰² and MALAT1 knockdown inhibits EBC-1 tumor metastasis in the lung, elucidating its involvement in the metastatic cascade *in vivo*.¹⁰²

The oncogenic functions of MALAT1 were also demonstrated to be relevant in colorectal cancer.¹⁰³ The functional motif fragment at the 3' end of the lncRNA is involved in the proliferation, migration, and invasion *in vitro*,¹⁰³ and MALAT1 promotes migration and invasion through PRKA kinase anchor protein 9 *in vivo*.¹⁰⁴ Its involvement in metastasis is recurrent in a variety of cancers,⁹⁷ while it was shown to have a major function in gall bladder cancer cells by activating the ERK/MAPK;¹⁰⁵ in osteosarcoma metastasis by inducing PI3K/Akt pathway;¹⁰⁶ and in esophageal squamous cell carcinoma contributing to the proliferation and metastasis by modifying the ATM-CHK2 pathway.¹⁰⁷

In cervical cancer, MALAT1 knockdown in CaSki cells affects cell viability, proliferation, and migration,¹⁰⁸ inducing the expression of caspase-3, -8, and Bax, and suppressing the expression of Bcl-2 and Bcl-xL.¹⁰⁸ More interestingly, MALAT1 expression was shown to be downregulated by HPV16 E6/E7 knockdown in CaSki cells⁸⁵ and upregulated in oral keratinocytes transfected with HPV16 E6 and E6/7,⁸⁶ which suggest that this virus may upregulate MALAT1 expression directly through E6/E7 proteins to promote cell proliferation.⁸⁵ Indeed, the increased expression of MALAT1 was observed in different cells containing p53 mutations (C33A, HSG), those containing DNA tumor viruses that sequester p53 (CaSki, SiHa) and p53-negative cells (SAOS), compared to wild-type p53 (OKF6-Tert).⁸⁶ BK virus-infected HSG or Vero cells and murine model of polyomavirus-associated SGD have increased expression of MALAT1 compared to control cells and wild-type animals.⁸⁶ This information suggests that MALAT1 overexpression may be a common feature of some viruses that share the p53 inactivation/degradation as infection mechanism, as seen in HPV.

**Table 1.** Altered lncRNAs upon HPV status (infection/HPV protein activity).

lncRNA	CELL TYPE	EXPERIMENT	EXPRESSION ALTERATION (FC)	p-VALUE	REFERENCE
cd Kn2B-As	oropharyngeal or oral tumor	HPV Active vs HPV inactive	4.5	p < 0.02	92
		HPV Active vs HPV negative	4.4		
ego T	oropharyngeal or oral tumor	HPV Active vs HPV inactive	4.4	p < 0.02	92
		HPV Active vs HPV negative	4.2		
ncrn A00185	oropharyngeal or oral tumor	HPV Active vs HPV inactive	-2.8	p < 0.02	92
		HPV Active vs HPV negative	9.1		
		HPV inactive vs HPV negative	-3.2		
Prins	oropharyngeal or oral tumor	HPV Active vs HPV inactive	6.4	p < 0.02	92
		HPV Active vs HPV negative	3.8		
TTTy14	oropharyngeal or oral tumor	HPV Active vs HPV inactive	4.1	p < 0.02	92
		HPV Active vs HPV negative	2.7		
TTTy15	oropharyngeal or oral tumor	HPV Active vs HPV inactive	3.2	p < 0.02	92
		HPV Active vs HPV negative	4.2		
		HPV inactive vs HPV negative	-3.8		
Xis T	oropharyngeal or oral tumor	HPV Active vs HPV inactive	2.1	p < 0.02	92
		HPV Active vs HPV negative	-12.7		
		HPV inactive vs HPV negative	2.2		
linc 00152	oropharyngeal or oral tumor	HPV Active vs HPV negative	-2	p < 0.02	92
meg 3	HFK	HPV 16 e6 transduction	-1.73	p < 0.05	93
		HPV 16 e7 transduction	-1.49		
		HPV 16 e6/e7 transduction	-2.25		
Pc nA-As	HFK	HPV 16 e6 transduction	-1.22	p < 0.02	93
		HPV 16 e7 transduction	1.61		
		HPV 16 e6/e7 transduction	1.07		
H19	HFK	HPV 16 e6 transduction	1.28	p < 0.001	93
		HPV 16e7 transduction	1.01		
		HPV 16 e6/e7 transduction	1.64		
mAl AT1	cas ki	HPV 16 e6/7 knockdown	downregulated	p < 0.05	85
sncmtrn A-2	HFK	e6/7 transduction	upregulated	p < 0.05	89
Asncmtrn A-1	HFK698, HF18	HPV 16/18 e2 knockdown	downregulated	p < 0.05	89
Asncmtrn A-2	HFK698, HF18	HPV 16/18 e2 knockdown	downregulated	p < 0.05	89

H19. H19 was the first discovered lncRNA.^{109–111} H19 is a paternally imprinted gene (transcribed from maternal allele), which locates on chromosome 11p15.5¹¹² near to IGF2 paternally expressed gene.¹¹³ H19/IGF2 locus is also the genetic location of other transcripts, as the tumor growth inhibitor antisense protein HOTS,¹¹⁴ the miR-675 precursor,¹¹⁵ and the long intergenic antisense transcript called 91H,¹¹⁶ conferring enriched complexity to this locus.¹¹⁷

H19 is highly expressed during embryonic development, in the extraembryonic tissues (placenta) and in most fetal tissues, while its expression is repressed after birth,^{118,119} being detected at basal levels in some adult tissues such as cardiac, skeletal muscles,¹⁰⁹ mammary, and uterus.¹²⁰ Besides that, H19 expression is frequently upregulated in cancer cells, such as breast cancer,¹²¹ esophageal cancer,¹²² bladder cancer,¹²³ and

cervical cancer,¹²⁴ highlighting its involvement in oncogenic processes.

H19 overexpression exerts protumorigenic features through a variety of mechanisms. It acts as competing endogenous RNA (ceRNA/microRNA sponge) for miR-138 and miR-200a.¹²⁵ This activity antagonizes these microRNAs' functions and leads to derepression of their endogenous targets vimentin, ZEB1, and ZEB2, promoting epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer that culminates in accelerated *in vivo* tumor growth.¹²⁵ Similarly, H19 was shown to antagonize let-7 activity, thereby derepressing its target HMGA2 to promote EMT, invasion, and migration in pancreatic ductal adenocarcinoma.¹²⁶

H19 properties as miR675 precursor also exert oncogenic activities. In gastric cancer, H19 was shown to directly



upregulate ISM1 and indirectly suppress CALN1 expression via miR-675, enhancing carcinogenesis and metastasis.¹²⁷ H19/miR-675 function in gastric cancer is extended to the suppression of RUNX1, leading to cancer cell proliferation.¹²⁸ In colorectal cancer, miR-675 targets the retinoblastoma protein, leading to a direct increase of tumor cell growth.¹²⁹

Besides microRNA regulation (e.g. ceRNA function) and H19/miR-675 mRNA targeting, H19 activity was demonstrated to promote tumor progression of breast cancer cells¹³⁰ and, in HCC, H19 ectopic expression enhances the tumorigenic potential of the cells *in vivo*.¹³¹

If HPV can directly induce H19 expression, it will be an answer for future research, but a plausible candidate mechanism calls attention. It was already shown that c-Myc significantly induces the expression of the H19 in different cell types (e.g. breast epithelial, fibroblast, and glioblastoma) through direct binding to conserved E-boxes near the imprinting control region, which facilitates histone acetylation and transcriptional initiation of the H19 promoter from the maternal allele.¹³² At the same time, it is known that HPV16 infection is tightly associated with c-Myc amplification¹³³ and, more interestingly, HPV18 E7 is able to conjugate to c-Myc, mediating its transcriptional activity.¹³⁴ With this information in mind and considering that H19 is upregulated in HPV16 E6 and/or E7-expressing cells, it is possible that HPV can induce H19 long noncoding RNA expression through c-Myc-induced activity.

MEG3. Maternally expressed gene 3 (MEG3), long noncoding RNA, is a paternally imprinted gene located on chromosome 14q32. MEG3 gene belongs to the DLK1-MEG3 imprinting locus, which consists of three known protein-coding genes, including DLK1, RTL1, and DIO3, snoRNAs, microRNAs, and at least three lncRNAs.¹³⁵

MEG3 expression is detectable in many normal human tissues, where the brain and pituitary gland have the highest levels.¹³⁶ On the other hand, MEG3 expression is lost in a variety of cancer cell lines, including brain,¹³⁶⁻¹³⁸ cervix, breast, and colon.¹³⁶ How MEG3 expression is downregulated in cancer still remains to be fully elucidated; however, a subset of high-grade meningioma tumors present MEG3 DNA allelic loss,¹³⁹ and MEG3 loss of expression due to promoter hypermethylation was described in pituitary tumors¹⁴⁰ and multiple myeloma.¹⁴¹

MEG3 has tumor suppressor activity by suppressing MDM2 expression, resulting in increased activation of p53 by avoiding MDM2-mediated p53 degradation.¹⁴² As a consequence, active p53 stimulates GDF15 expression in human cancer cells, culminating in a reduced proliferation. However, MEG3 is also capable to inhibit cell proliferation even in the absence of p53.¹⁴² MEG3 and p53 direct interaction was also demonstrated using ectopic expression of MEG3, which resulted in the enhanced activity of p53, inhibiting cell proliferation and promoting cell apoptosis in U251 and U87 MG human glioma cell lines.¹³⁸

In NSCLC, induced expression of MEG3 increased apoptosis and reduced cell proliferation by affecting p53 expression.¹⁴³ MEG3 antitumor effect was also demonstrated in bladder cancer, where downregulation of this lncRNA inhibited cell apoptosis and increased cell proliferation by activating autophagy.¹⁴⁴

A possible HPV-modulated MEG3 downregulation would be advantageous for HPV infection and tumorigenesis since HPV16/18 E6 oncoprotein-induced p53 degradation²⁸ would probably be reinforced by the increased function of MDM2 as a result of loss of MEG3 function, besides all other MEG3 tumor suppressor mechanisms.

Other lncRNAs. lncRNA PRINS (Psoriasis Susceptibility-related RNA Gene Induced by Stress) is involved with psoriasis susceptibility due to its higher expression in uninvolved epidermis of patients with psoriasis compared with both psoriatic lesional and healthy epidermis.¹⁴⁵ PRINS expression is increased under stress environment, such as viral infection (herpes simplex virus), ultraviolet B irradiation, and translational inhibition, while it was showed to be regulated by the proliferation and differentiation state of keratinocytes.¹⁴⁵ Although nuclear factor kappa B (NF- κ B) is involved in the cellular stress response, PRINS works independently of this pathway¹⁴⁶ and may mediate nucleophosmin response in the skin in stress conditions.¹⁴⁷ PRINS showed to positively regulate G1P3, an interferon-inducible gene with antiapoptotic effects in cancer cells and, at least in patients with psoriasis, it can contribute to a decreased sensitivity to spontaneous keratinocyte apoptosis.¹⁴⁸

LINC00152 is a lncRNA that is significantly increased in gastric carcinoma compared to normal tissue and correlates with invasion.¹⁴⁹ LINC00152 knockdown inhibits several oncogenic features, such as cell proliferation, colony formation, cell migration, and invasion in gastric cancer and also promotes cell cycle arrest at G1 phase and triggers late apoptosis.¹⁵⁰ In HCC, the plasma levels of LINC00152 significantly predicted the diagnosis of this cancer.¹⁵¹

Eosinophil granule ontogeny transcript (EGOT) is a lncRNA expressed from the antisense strand of an intron of the inositol triphosphate receptor type 1 gene.¹⁵² EGOT is expressed in high levels in human bone marrow and in mature eosinophils and is rapidly upregulated in response to interleukin-5 stimulation of CD34 hematopoietic progenitors, regulating the granule protein major basic protein and eosinophil-derived neurotoxin mRNA levels.¹⁵³ In breast cancer, the expression of EGOT is lower compared to noncancerous tissues and these low levels correlate with different malignant properties such as larger tumor size, lymph node metastasis, and decreased overall survival, elucidating an independent prognostic predictor for patients with breast cancer.¹⁵⁴

The antisense PCNA-AS (or PCNA-AS1) lncRNA is expressed from the promoter region located within the first intron of PCNA gene.¹⁵⁵ PCNA-AS is highly expressed in HCC and its induced overexpression promotes tumor growth



in vitro and *in vivo* by increasing the proliferative PCNA mRNA stability via RNA hybridization.⁶³

The antisense lncRNA CDKN2B-AS, most commonly known as ANRIL (antisense noncoding RNA in the INK4 Locus), is located within CDKN2B-CDKN2A gene cluster at chromosome 9p21.¹⁵⁶ High ANRIL expression is detected in several cancers: in HCC, which is associated with poor prognosis¹⁵⁷ and regulates apoptosis by epigenetically silencing KLF2;⁶⁸ in lung cancer, which associates with worse prognosis and its knockdown decreases cell proliferation, migration, and invasion *in vitro*;¹⁵⁸ in gastric cancer, promoting tumor progression by epigenetically silencing miR-99a/miR-449a and controlling mTOR and CDK6/E2F1 pathway targets;¹⁵⁹ in esophageal squamous cell carcinoma, inhibiting p15INK4b through the TGFb1 pathway;¹⁶⁰ and in non-small cell lung cancer, decreasing KLF2 and P21 expression, and therefore, culminating in cell proliferation and apoptosis inhibition.¹⁶¹ ANRIL correlation with HPV-associated cancers is yet to be investigated; however, ANRIL downregulation in HPV active samples versus inactive/or negative (Table 1) may reflect the CDKN2A/CDKN2B locus hypermethylation detected in some HPV-positive cancers.¹⁶²

The lncRNA XIST gene is located in the X inactivation center, being transcribed from the inactive X chromosome.¹⁶³ XIST is required for the extra female X chromosome inactivation.¹⁶⁴ Its spreads from its site of transcription and coats the X chromosome, mediating the formation of facultative heterochromatin.¹⁶⁵ XIST involvement with cancer is still under investigation; however, the loss of Barr Body is a recurrent characteristic in cancer types such as breast cancer^{166–170} and ovarian cancer,¹⁷⁰ which can be associated with the overexpression of X-linked genes, contributing to cancer progression.¹⁷¹

Final Remarks

HPV infection is the leading cause of cervical cancer and is detected in a variety of other cancers. Its involvement with malignant transformation and tumor development has been widely investigated, mainly focusing in HPV E6 and E7 activity and their induced modulation in host's transcriptomics/proteomics. With the discovery of lncRNAs and their association with oncogenic processes in different cancers, including in viral tumors, HPV-induced modulation of host's lncRNA is starting to be investigated. In this review, we discussed the initial research work in this field as mitochondrial lncRNAs and MALAT-1 that were shown to have altered expression by HPV proteins, affecting cell proliferation. More importantly, we deeply explored published papers that performed gene expression microarrays to search annotated lncRNAs altered by HPV infection, activity, or HPV protein expression (Table 1). Among genes presented in Table 1, some lncRNAs, such as MALAT1, H19, and MEG3, are extensively involved in oncogenic processes and may play an essential role in HPV-induced carcinogenesis and, in the future, they may arise as potential targets for therapeutic treatment, diagnosis, or prognosis factors.

Author Contributions

Conceived the manuscript: LG. Wrote the first draft of the manuscript: LG, JRP, EMN, GND, and EME. Contributed to the writing of the manuscript: LG, JRP, EMN, GND, and EME. Jointly developed the structure and arguments for the paper: LG, JRP, EMN, GND, and EME. Made critical revisions and approved the final version: LG, JRP, EMN, GND, and EME. All authors reviewed and approved the final manuscript.

REFERENCES

- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(1):1–17.
- Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology.* 2015;476:341–344.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010; 401(1):70–79.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17–27.
- Ghittoni R, Accardi R, Chiocca S, et al. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *Ecancermedicinescience.* 2015;9:526.
- Badaracco G, Venuti A, Sedati A, et al. HPV16 and HPV18 in genital tumors: significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol.* 2002;67(4):574–582.
- Bernard HU. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. *Infect Genet Evol.* 2013;18:357–361.
- Nindl I, Gottschling M, Stockfleth E. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis Markers.* 2007;23(4):247–259.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321–322.
- Orth G, Jablonska S, Favre M, et al. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(3):1537–1541.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6): 518–527.
- Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, et al. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995;33(4):901–905.
- Anic GM, Lee JH, Stockwell H, et al. Incidence and human papillomavirus (HPV) type distribution of genital warts in a multinational cohort of men: the HPV in men study. *J Infect Dis.* 2011;204(12):1886–1892.
- Lacey CJ, Lowndes CM, Shah KV. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine.* 2006;24(suppl 3): S3/35–41.
- Bulk S, Berkhof J, Bulkman NW, et al. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. *Br J Cancer.* 2006;94(1): 171–175.
- Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286–2302.
- Biological Agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2012;100(pt B):1–441.
- Lacey CJ. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J Clin Virol.* 2005;32(suppl 1):S82–S90.
- Bruni L, Diaz M, Castellsague X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1789–1799.
- Siriaunkgul S, Settakorn J, Sukpan K, et al. HPV detection and genotyping in vulvar squamous cell carcinoma in northern Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(8):3773–3778.
- Schottentfeld D, Beebe-Dimmer J. The cancer burden attributable to biologic agents. *Ann Epidemiol.* 2015;25(3):183–187.
- de Martel C, Plummer M, Franceschi S. Infections causing cancers: world burden and potential for prevention. *Public Health Forum.* 2014;22(3):12e1–12e4.
- Giuliano AR, Nielson CM, Flores R, et al. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *J Infect Dis.* 2007;196(8):1146–1152.



24. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467–475.
25. Moscicki AB, Palefsky JM. Human papillomavirus in men: an update. *J Low Genit Tract Dis.* 2011;15(3):231–234.
26. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine.* 2012;30(suppl 5):F12–F23.
27. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, et al. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes.* 2010;40(1):1–13.
28. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63(6):1129–1136.
29. Van Doorslaer K, Burk RD. Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk. *Virology.* 2012;433(1):216–219.
30. Zhao XY, Cui Y, Jiang SF, et al. Human telomerase gene and high-risk human papillomavirus infection are related to cervical intraepithelial neoplasia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(2):693–697.
31. Katzenellenbogen RA, Egelkroun EM, Vliet-Gregg P, et al. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol.* 2007;81(8):3786–3796.
32. Gewin L, Myers H, Kiyono T, et al. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.* 2004;18(18):2269–2282.
33. Veldman T, Liu X, Yuan H, et al. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8211–8216.
34. Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, et al. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol.* 2003;77(12):6957–6964.
35. Nagasaka K, Kawana K, Osuga Y, et al. PDZ domains and viral infection: versatile potentials of HPV-PDZ interactions in relation to malignancy. *Biomed Res Int.* 2013;2013:369712.
36. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, et al. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol.* 1999;73(8):6209–6219.
37. Filippova M, Song H, Connolly JL, et al. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21730–21739.
38. Jackson S, Harwood C, Thomas M, et al. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* 2000;14(23):3065–3073.
39. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996;56(20):4620–4624.
40. Wu EW, Clemens KE, Heck DV, et al. The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. *J Virol.* 1993;67(4):2402–2407.
41. Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2014;26:13–21.
42. McIntyre MC, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology.* 1996;215(1):73–82.
43. Barrow-Laing L, Chen W, Roman A. Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. *Virology.* 2010;400(2):233–239.
44. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, et al. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* 1996;13(11):2323–2330.
45. Funk JO, Waga S, Harry JB, et al. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 1997;11(16):2090–2100.
46. Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, et al. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 1999;18(9):2449–2458.
47. Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* 2009;34(1):113–123.
48. Cheng YW, Lee H, Shiau MY, et al. Human papillomavirus type 16/18 up-regulates the expression of interleukin-6 and antiapoptotic Mcl-1 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(15):4705–4712.
49. Pim D, Massimi P, Dilworth SM, et al. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene.* 2005;24(53):7830–7838.
50. Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30(suppl 5):F55–F70.
51. Chan WL, Huang HD, Chang JG. lncRNAMap: a map of putative regulatory functions in the long non-coding transcriptome. *Comput Biol Chem.* 2014;50:41–49.
52. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell.* 2014;157(1):77–94.
53. Kapusta A, Feschotte C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. *Trends Genet.* 2014;30(10):439–452.
54. Novikova IV, Hennelly SP, Tung CS, et al. Rise of the RNA machines: exploring the structure of long non-coding RNAs. *J Mol Biol.* 2013;425(19):3731–3746.
55. Maass PG, Luft FC, Bähring S. Long non-coding RNA in health and disease. *J Mol Med (Berl).* 2014;92(4):337–346.
56. Mazar J, Zhao W, Khalil AM, et al. The functional characterization of long noncoding RNA SPRY4-IT1 in human melanoma cells. *Oncotarget.* 2014;5(19):8959–8969.
57. Sousa JF, Torrieri R, Silva RR, et al. Novel primate-specific genes, RMEL 1, 2 and 3, with highly restricted expression in melanoma, assessed by new data mining tool. *PLoS One.* 2010;5(10):e13510.
58. Hall JR, Messenger ZJ, Tam HW, et al. Long noncoding RNA lincRNA-p21 is the major mediator of UVB-induced and p53-dependent apoptosis in keratinocytes. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1700.
59. Marin-Bejar O, Marchese FP, Athie A, et al. Pint lincRNA connects the p53 pathway with epigenetic silencing by the Polycomb repressive complex 2. *Genome Biol.* 2013;14(9):R104.
60. Karreth FA, Reschke M, Ruocco A, et al. The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo. *Cell.* 2015;161(2):319–332.
61. Peng H, Ishida M, Li L, et al. Pseudogene INTS6P1 regulates its cognate gene INTS6 through competitive binding of miR-17–5p in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(8):5666–5677.
62. Esposito F, De Martino M, Petti MG, et al. HMG1A1 pseudogenes as candidate proto-oncogenic competitive endogenous RNAs. *Oncotarget.* 2014;5(18):8341–8354.
63. Yuan SX, Tao QF, Wang J, et al. Antisense long non-coding RNA PCNA-AS1 promotes tumor growth by regulating proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2014;349(1):87–94.
64. Xue Y, Ma G, Zhang Z, et al. A novel antisense long noncoding RNA regulates the expression of MDC1 in bladder cancer. *Oncotarget.* 2015;6(1):484–493.
65. Grammatikakis I, Panda AC, Abdelmohsen K, et al. Long noncoding RNAs (lncRNAs) and the molecular hallmarks of aging. *Aging (Albany NY).* 2014;6(12):992–1009.
66. Greco S, Gorospe M, Martelli F. Noncoding RNA in age-related cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;83:142–155.
67. Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell.* 2013;51(6):792–806.
68. Huang MD, Chen WM, Qi FZ, et al. Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell apoptosis by epigenetic silencing of KLF2. *J Hematol Oncol.* 2015;8:50.
69. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, et al. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature.* 1996;379(6561):131–137.
70. Saxena A, Carninci P. Long non-coding RNA modifies chromatin: epigenetic silencing by long non-coding RNAs. *Bioessays.* 2011;33(11):830–839.
71. Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as a modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 2010;329(5992):689–693.
72. Gonzalez I, Munita R, Agirre E, et al. A lncRNA regulates alternative splicing via establishment of a splicing-specific chromatin signature. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(5):370–376.
73. Mariner PD, Walters RD, Espinoza CA, et al. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol Cell.* 2008;29(4):499–509.
74. Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell.* 2009;33(6):717–726.
75. Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol Cell.* 2012;47(4):648–655.
76. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 2012;9(6):703–719.
77. Du Y, Kong G, You X, et al. Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18. *J Biol Chem.* 2012;287(31):26302–26311.
78. Huang JF, Guo YJ, Zhao CX, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-related long noncoding RNA (lncRNA) down-regulated expression by HBx (Dreh) inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by targeting the intermediate filament protein vimentin. *Hepatology.* 2013;57(5):1882–1892.
79. Lau CC, Sun T, Ching AK, et al. Viral-human chimeric transcript predisposes risk to liver cancer development and progression. *Cancer Cell.* 2014;25(3):335–349.
80. Zheng ZM, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1809(11–12):668–677.
81. Kaczkowski B, Morevati M, Rossing M, et al. A decade of global mRNA and miRNA profiling of HPV-positive cell lines and clinical specimens. *Open Virol J.* 2012;6:216–231.
82. Gomez-Gomez Y, Organista-Nava J, Gariglio P. Deregulation of the miRNAs expression in cervical cancer: human papillomavirus implications. *Biomed Res Int.* 2013;2013:407052.



83. Jimenez-Wences H, Peralta-Zaragoza O, Fernandez-Tilapa G. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep.* 2014;31(6):2467–2476.
84. Hartwig FP, Goedert L, Wagner MS, et al. Tumor cell development: a role for viruses and telomerase activity? *Adv Tumor Virol.* 2014;4:7–16. (4294-ATV-Tumor-Cell-Development:-A-Role-for-Viruses-and-Telomerase-Activity?.pdf).
85. Jiang Y, Li Y, Fang S, et al. The role of MALAT1 correlates with HPV in cervical cancer. *Oncol Lett.* 2014;7(6):2135–2141.
86. Jeffers LK, Duan K, Ellies LG, et al. Correlation of transcription of MALAT-1, a novel noncoding RNA, with deregulated expression of tumor suppressor p53 in small DNA tumor virus models. *J Cancer Ther.* 2013;4(3):774–786.
87. Villegas J, Burzio V, Villota C, et al. Expression of a novel non-coding mitochondrial RNA in human proliferating cells. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(21):7336–7347.
88. Burzio VA, Villota C, Villegas J, et al. Expression of a family of noncoding mitochondrial RNAs distinguishes normal from cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(23):9430–9434.
89. Villota C, Campos A, Vidaurre S, et al. Expression of mitochondrial non-coding RNAs (ncRNAs) is modulated by high risk human papillomavirus (HPV) oncogenes. *J Biol Chem.* 2012;287(25):21303–21315.
90. Villegas JDK, Avila R, Villota C, et al. The mitochondrial antisense ncRNAs are down-regulated in early cervical carcinoma. *Cancer Sci Ther.* 2013;7(004):1–4.
91. Bianchessi V, Badi I, Bertolotti M, et al. The mitochondrial lncRNA ASncmRNA-2 is induced in aging and replicative senescence in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;81:62–70.
92. Tomar S, Graves CA, Altomare D, et al. Human papillomavirus status and gene expression profiles of oropharyngeal and oral cancers from European American and African American patients. *Head Neck.* 2015. [Epub ahead of print].
93. Gyongyosi E, Szalmas A, Ferenczi A, et al. Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16 oncoproteins. *Arch Virol.* 2015;160(2):389–398.
94. Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2003;22(39):8031–8041.
95. Wilusz JE, Freier SM, Spector DL. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell.* 2008;135(5):919–932.
96. Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, et al. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics.* 2007;8:39.
97. Gutschner T, Hammerle M, Diederichs S. MALAT1—a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(7):791–801.
98. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell.* 2010;39(6):925–938.
99. Anko ML, Muller-McNicoll M, Brandl H, et al. The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biol.* 2012;13(3):R17.
100. Sanford JR, Wang X, Mort M, et al. Splicing factor SFRS1 recognizes a functionally diverse landscape of RNA transcripts. *Genome Res.* 2009;19(3):381–394.
101. Yang L, Lin C, Liu W, et al. ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell.* 2011;147(4):773–788.
102. Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M, et al. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res.* 2013;73(3):1180–1189.
103. Xu C, Yang M, Tian J, et al. MALAT-1: a long non-coding RNA and its important 3' end functional motif in colorectal cancer metastasis. *Int J Oncol.* 2011;39(1):169–175.
104. Yang MH, Hu ZY, Xu C, et al. MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(1):166–174.
105. Wu XS, Wang XA, Wu WG, et al. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the ERK/MAPK pathway. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(6):806–814.
106. Dong Y, Liang G, Yuan B, et al. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Tumour Biol.* 2015;36(3):1477–1486.
107. Hu L, Wu Y, Tan D, et al. Up-regulation of long noncoding RNA MALAT1 contributes to proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;34:7.
108. Guo F, Li Y, Liu Y, et al. Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2010;42(3):224–229.
109. Pachnis V, Belayew A, Tilghman SM. Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(17):5523–5527.
110. Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, et al. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol.* 1990;10(1):28–36.
111. Angrand PO, Vennin C, Le Bourhis X, et al. The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. *Front Genet.* 2015;6:165.
112. Zhang Y, Tycko B. Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat Genet.* 1992;1(1):40–44.
113. Giannoukakis N, Deal C, Paquette J, et al. Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet.* 1993;4(1):98–101.
114. Onyango P, Feinberg AP. A nucleolar protein, H19 opposite tumor suppressor (HOTS), is a tumor growth inhibitor encoded by a human imprinted H19 antisense transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(40):16759–16764.
115. Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA.* 2007;13(3):313–316.
116. Berteaux N, Aptel N, Cathala G, et al. A novel H19 antisense RNA overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. *Mol Cell Biol.* 2008;28(22):6731–6745.
117. Matouk IJ, Raveh E, Abu-lail R, et al. Oncofetal H19 RNA promotes tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(7):1414–1426.
118. Pachnis V, Brannan CI, Tilghman SM. The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. *EMBO J.* 1988;7(3):673–681.
119. Poirier F, Chan CT, Timmons PM, et al. The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo. *Development.* 1991;113(4):1105–1114.
120. Adriaenssens E, Lottin S, Dugimont T, et al. Steroid hormones modulate H19 gene expression in both mammary gland and uterus. *Oncogene.* 1999;18(31):4460–4473.
121. Berteaux N, Lottin S, Monte D, et al. H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. *J Biol Chem.* 2005;280(33):29625–29636.
122. Hibi K, Nakamura H, Hirai A, et al. Loss of H19 imprinting in esophageal cancer. *Cancer Res.* 1996;56(3):480–482.
123. Byun HM, Wong HL, Birnstein EA, et al. Examination of IGF2 and H19 loss of imprinting in bladder cancer. *Cancer Res.* 2007;67(22):10753–10758.
124. Kim SJ, Park SE, Lee C, et al. Alterations in promoter usage and expression levels of insulin-like growth factor-II and H19 genes in cervical carcinoma exhibiting biallelic expression of IGF-II. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1586(3):307–315.
125. Liang WC, Fu WM, Wong CW, et al. The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015;6(26):22513–22525.
126. Ma C, Nong K, Zhu H, et al. H19 promotes pancreatic cancer metastasis by derepressing let-7's suppression on its target HMGA2-mediated EMT. *Tumour Biol.* 2014;35(9):9163–9169.
127. Li H, Yu B, Li J, et al. Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer. *Oncotarget.* 2014;5(8):2318–2329.
128. Zhuang M, Gao W, Xu J, et al. The long non-coding RNA H19-derived miR-675 modulates human gastric cancer cell proliferation by targeting tumor suppressor RUNX1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448(3):315–322.
129. Tsang WP, Ng EK, Ng SS, et al. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(3):350–358.
130. Lottin S, Adriaenssens E, Dupressoir T, et al. Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2002;23(11):1885–1895.
131. Matouk IJ, DeGroot N, Mezan S, et al. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. *PLoS One.* 2007;2(9):e845.
132. Baryshte-Lovejoy D, Lau SK, Boutros PC, et al. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2006;66(10):5330–5337.
133. Abba MC, Laguens RM, Dulout FN, et al. The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. *Mutat Res.* 2004;557(2):151–158.
134. Wang YW, Chang HS, Lin CH, et al. HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(2):402–412.
135. Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J Mol Endocrinol.* 2012;48(3):R45–R53.
136. Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, et al. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5119–5126.
137. Astuti D, Latif F, Wagner K, et al. Epigenetic alteration at the DLK1-GTL2 imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, pheochromocytoma and Wilms' tumour. *Br J Cancer.* 2005;92(8):1574–1580.
138. Wang P, Ren Z, Sun P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. *J Cell Biochem.* 2012;113(6):1868–1874.
139. Zhang X, Gejman R, Mahta A, et al. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. *Cancer Res.* 2010;70(6):2350–2358.
140. Zhao J, Dahle D, Zhou Y, et al. Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):2179–2186.



141. Benetatos L, Dasoula A, Hatzimichael E, et al. Promoter hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3) imprinted gene in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2008;8(3):171–175.
142. Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, et al. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*. 2007;282(34):24731–24742.
143. Lu KH, Li W, Liu XH, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer*. 2013;13:461.
144. Ying L, Huang Y, Chen H, et al. Downregulated MEG3 activates autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer. *Mol Biosyst*. 2013;9(3):407–411.
145. Sonkoly E, Bata-Csorgo Z, Pivarcsi A, et al. Identification and characterization of a novel, psoriasis susceptibility-noncoding RNA gene, PRINS. *J Biol Chem*. 2005;280(25):24159–24167.
146. Bari L, Bacsa S, Sonkoly E, et al. Comparison of stress-induced PRINS gene expression in normal human keratinocytes and HaCaT cells. *Arch Dermatol Res*. 2011;303(10):745–752.
147. Szegedi K, Goblos A, Bacsa S, et al. Expression and functional studies on the noncoding RNA, PRINS. *Int J Mol Sci*. 2012;14(1):205–225.
148. Szegedi K, Sonkoly E, Nagy N, et al. The anti-apoptotic protein G1P3 is over-expressed in psoriasis and regulated by the non-coding RNA, PRINS. *Exp Dermatol*. 2010;19(3):269–278.
149. Pang Q, Ge J, Shao Y, et al. Increased expression of long intergenic non-coding RNA LINC00152 in gastric cancer and its clinical significance. *Tumour Biol*. 2014;35(6):5441–5447.
150. Zhao J, Liu Y, Zhang W, et al. Long non-coding RNA Linc00152 is involved in cell cycle arrest, apoptosis, epithelial to mesenchymal transition, cell migration and invasion in gastric cancer. *Cell Cycle*. 2015;14(19):3112–3123.
151. Li J, Wang X, Tang J, et al. HULC and Linc00152 act as novel biomarkers in predicting diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(2):687–696.
152. Rose D, Stadler PF. Molecular evolution of the non-coding eosinophil granule ontogeny transcript. *Front Genet*. 2011;2:69.
153. Wagner LA, Christensen CJ, Dunn DM, et al. EGO, a novel, noncoding RNA gene, regulates eosinophil granule protein transcript expression. *Blood*. 2007;109(12):5191–5198.
154. Xu SP, Zhang JF, Sui SY, et al. Downregulation of the long noncoding RNA EGOT correlates with malignant status and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biol*. 2015. [Epub ahead of print].
155. Tommasi S, Pfeifer GP. In vivo structure of two divergent promoters at the human PCNA locus. Synthesis of antisense RNA and S phase-dependent binding of E2F complexes in intron 1. *J Biol Chem*. 1999;274(39):27829–27838.
156. Pasmant E, Laurendeau I, Heron D, et al. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res*. 2007;67(8):3963–3969.
157. Hua L, Wang CY, Yao KH, et al. High expression of long non-coding RNA ANRIL is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(3):3076–3082.
158. Lin L, Gu ZT, Chen WH, et al. Increased expression of the long non-coding RNA ANRIL promotes lung cancer cell metastasis and correlates with poor prognosis. *Diagn Pathol*. 2015;10:14.
159. Zhang EB, Kong R, Yin DD, et al. Long noncoding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of gastric cancer and promotes tumor growth by epigenetically silencing of miR-99a/miR-449a. *Oncotarget*. 2014;5(8):2276–2292.
160. Chen D, Zhang Z, Mao C, et al. ANRIL inhibits p15(INK4b) through the TGFbeta1 signaling pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Immunol*. 2014;289(1–2):91–96.
161. Nie FQ, Sun M, Yang JS, et al. Long noncoding RNA ANRIL promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(1):268–277.
162. Stephen JK, Chen KM, Shah V, et al. Consistent DNA hypermethylation patterns in laryngeal papillomas. *Int J Head Neck Surg*. 2010;1(2):69–77.
163. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*. 1991;349(6304):38–44.
164. Herzing LB, Romer JT, Horn JM, et al. Xist has properties of the X-chromosome inactivation centre. *Nature*. 1997;386(6622):272–275.
165. Engreitz JM, Pandya-Jones A, McDonel P, et al. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science*. 2013;341(6147):1237973.
166. Perry M. Evaluation of breast tumour sex chromatin (Barr body) as an index of survival and response to pituitary ablation. *Br J Surg*. 1972;59(9):731–734.
167. Borah V, Shah PN, Ghosh SN, et al. Further studies on the prognostic importance of Barr body frequency in human breast cancer: with discussion on its probable mechanism. *J Surg Oncol*. 1980;13(1):1–7.
168. Ghosh SN, Shah PN. Probable mechanism for the loss of Barr body in human female tumor with special reference to breast cancer. *Med Hypotheses*. 1981;7(8):1099–1104.
169. Ghosh SN, Shah PN. Significance of the Barr body in human female tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1981;4(3):269–274.
170. Pageau GJ, Hall LL, Ganesan S, et al. The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):628–633.
171. Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell*. 2006;9(2):121–132.

RMEL3, a novel BRAF^{V600E}-associated long noncoding RNA, is required for MAPK and PI3K signaling in melanoma

Lucas Goedert^{1,2,*}, Cristiano G. Pereira^{1,*}, Jason Roszik^{3,*}, Jessica R. Praça^{2,4}, Cibele Cardoso¹, Guo Chen³, Wanleng Deng³, Vashisht Gopal Yennu-Nanda³, Wilson A. Silva Jr.^{2,5}, Michael A. Davies⁴, Enilza M. Espreafico¹

¹Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

²National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy and Center for Cell-Based Therapy, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

³Department of Melanoma Medical Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, United States of America

⁴Clinical Oncology, Stem Cell and Cell Therapy Program, Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁵Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, and Center for Integrative System Biology – CISBi-NAP/USP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Enilza M. Espreafico, **e-mail:** emesprea@fmrp.usp.br

Keywords: lncRNA, ncRNA, TCGA, ENSG00000250961, ENST00000506106.1

Received: August 28, 2015

Accepted: April 16, 2016

Published: May 4, 2016

ABSTRACT

Previous work identified RMEL3 as a lncRNA with enriched expression in melanoma. Analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) data confirmed RMEL3 enriched expression in melanoma and demonstrated its association with the presence of BRAF^{V600E}. RMEL3 siRNA-mediated silencing markedly reduced (95%) colony formation in different BRAF^{V600E} melanoma cell lines. Multiple genes of the MAPK and PI3K pathways found to be correlated with RMEL3 in TCGA samples were experimentally confirmed. RMEL3 knockdown led to downregulation of activators or effectors of these pathways, including FGF2, FGF3, DUSP6, ITGB3 and GNG2. RMEL3 knockdown induces gain of protein levels of tumor suppressor PTEN and the G1/S cyclin-Cdk inhibitors p21 and p27, as well as a decrease of pAKT (T308), BRAF, pRB (S807, S811) and cyclin B1. Consistently, knockdown resulted in an accumulation of cells in G1 phase and subG0/G1 in an asynchronously growing population. Thus, TCGA data and functional experiments demonstrate that RMEL3 is required for MAPK and PI3K signaling, and its knockdown decrease BRAF^{V600E} melanoma cell survival and proliferation.

INTRODUCTION

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer. Targeted therapies against BRAF^{V600} mutations, which are present in ~50% of metastatic melanomas, achieve impressive initial clinical responses and benefit, but the development of acquired resistance to these agents is almost universal [1]. The identification of additional melanoma oncogenic mechanisms initiated by oncogenic BRAF will facilitate the development of more long-term effective therapeutic approaches.

Among different molecular candidates, there is growing data to support that long noncoding RNAs (lncRNAs) play a significant role in this disease [2]. A diversity of lncRNAs was described to promote cell proliferation, migration and metastasis in melanoma cells [3–5]. lncRNAs commonly exhibit context-dependent activity and cell type-specific expression [6], reinforcing their possible application for therapeutic targeting.

Previous work from our laboratory identified RMEL3 (ENSG00000250961) as a potential lncRNA with

extremely enriched and specific expression in melanoma [7]. Analysis of melanoma cells also suggested a positive correlation between RMEL3 expression and the presence of the BRAF^{V600E} mutation [7].

In the present study, we have investigated RMEL3 interaction networks to elucidate its significance in this disease. This study supports that RMEL3 knockdown inhibits MAPK and PI3K pathways in melanoma.

RESULTS

RMEL3 expression is enriched in melanoma and varies across disease progression

We analyzed the publicly available melanoma TCGA data to identify significant clinical and molecular associations of RMEL3 expression. Analysis of RNA expression data from 472 TCGA melanomas, 16 normal tissues (from Illumina Body Map Project) and 2 melanocytes (GSE38495) [8] confirmed significantly increased expression of RMEL3 in the tumors (Figure 1A). Also, RMEL3 expression is significantly greater in melanoma than a diversity of other tumors (Figure 1B). In clinical samples representing melanoma progression [primary tumors (n=102), subcutaneous tumors (regional cutaneous and in-transit metastasis, n=74), regional lymph node (n=221) and distant metastasis (n=68)], RMEL3 expression was increased in subcutaneous tumors compared to primary tumors (Figure 1C). RMEL3 expression was also significantly increased in melanomas with a BRAF^{V600E} mutation compared to those with a wild type BRAF or triple wild type for BRAF/RAS/NF1 [9] (Figure 1D), an association also observed in a panel of human melanoma cell lines (Figure 1E).

RMEL3 knockdown decreases clonogenic capacity

RMEL3 knockdown in BRAF^{V600E} melanoma cells, such as the A375-SM cell line, which has high RMEL3 expression (Figure 2A), markedly reduced colony formation (Figure 2B and 2C). BRAF^{V600E} RMEL3-low expressing cells (Figure 2A) are also affected (Figure 2B and 2C). RMEL3 knockdown in a BRAF wild type cell line also reduced colony count, however less dramatically. In contrast, SKOV3 ovarian cancer cell line, which has no RMEL3 expression, was not affected, demonstrating that the observed effects were not due to siRNA overall cytotoxicity or non-specific targeting (Figure 2B and 2C).

RMEL3 expression alters melanoma cell expression profile

To identify molecular features that are associated with RMEL3, two groups were separated according to RMEL3 expression levels from the total set of TCGA. RMEL3

Low group (n=105), constituted of patients with RMEL3 expression below 25th percentile and RMEL3 High group (n=117), constituted of patients with RMEL3 expression above the 75th percentile (Figure 3A). RNA-seq data was used to identify differentially expressed genes between the groups (log₂ fold change <-2 or >2, adj. p-value <0.00001, n= 260 genes; Figure 3B and 3C; Supplementary Table S1).

Microarray analysis was performed following RMEL3 knockdown in the human melanoma cell line A375-SM (Figure 3D) to functionally validate genes regulated by RMEL3 (Supplementary Table S2). RMEL3-regulated genes identified by gene knockdown (log₂ fold change <-0.5 or >0.5, p-value <0.01, n=2942; Supplementary Table S2) were compared to the melanoma TCGA data (log₂ fold change <-0.5 or >0.5, adj. p-value <0.05, n=3445; Supplementary Table S3) to provide a high confidence list of RMEL3-correlated genes (Supplementary Table S4). A total of 177 genes positively differentially expressed in RMEL3 High tumors in the TCGA exhibited decreased expression following RMEL3 knockdown in the A375-SM cells. A set of 139 genes negatively differentially expressed in RMEL3 High group increased expression after RMEL3 knockdown. Pathway enrichment analysis of the validated genes implicates RMEL3 in protein kinase A signaling, molecular mechanisms of cancer, FGF signaling, regulation of epithelial-mesenchymal transition, inhibition of matrix metalloproteases, among others (Figure 3E, Supplementary Table S5). These pathways compose biological networks, as the example of cell-to-cell signaling and interaction, which has as central constituent the MAPK pathway (Figure 3F). Indeed, several validated genes are constituents of the PI3K-Akt, MAPK and Ras pathways (Figure 3G).

RMEL3 influences melanoma critical proteins to promote cell cycle progression and survival

The effects of RMEL3 knockdown on protein networks were assessed by Reverse Phase Protein Array (RPPA) analysis. RMEL3 knockdown in A375-SM melanoma cells altered a total of 91 proteins (p<0.05; Supplementary Table S6). We observed a decrease of the MAPK and PI3K-Akt components BRAF, Akt, pAkt (T308) and increased levels of PTEN (Figure 4A). RMEL3 knockdown reduced cell cycle regulators just as pRB (S807, S811) and Cyclin-B1, and increased p27 (Figure 4B). Pro-apoptotic proteins were increased, as the example of caspase-8 and p38, and anti-apoptotic proteins reduced, such as Bcl2 (Figure 4C). Consistent with the impact of RMEL3 knockdown in the clonogenic ability, we showed by western blot an increase of the p21 and p27 G1/S cyclin-Cdk inhibitors, and a decrease of cyclin B1 (Figure 4D). RMEL3 knockdown caused an accumulation of cells in the G1 cell cycle phase and an increase in cell death rates (subG0/G1) (Figure 4E). The observed

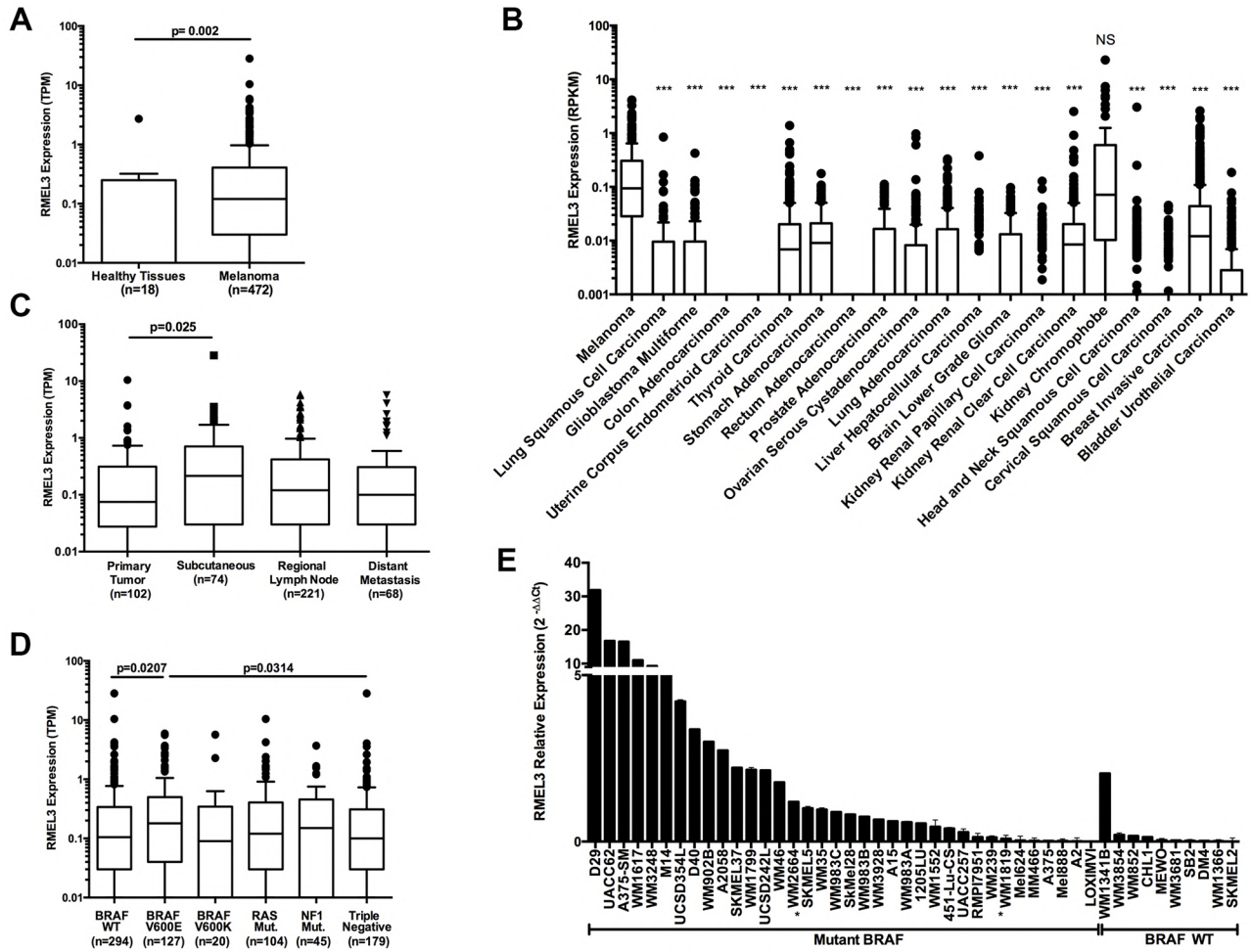


Figure 1: RMEL3 expression is enriched in melanoma, varies across tumor progression and is associated with BRAF^{V600E}. **A.** TCGA melanoma, Illumina Body Map Project healthy tissues (adipose, adrenal, brain, breast, colon, heart, kidney, leukocyte, liver, lung, lymph node, ovary, prostate, skeletal muscle, testis and thyroid) and two melanocytes cell lines displaying RMEL3 expression*. **B.** RMEL3 expression across different TCGA tumor types*. **C.** TCGA patients classified by tumor tissue site and RMEL3 expression is displayed*. **D.** TCGA patients classified according to gene somatic mutations: BRAF Wild Type (WT), BRAF^{V600E}, BRAF^{V600K}, RAS, NF1, and Triple negative for BRAF/RAS/NF1*. **E.** Different melanoma cell lines harboring BRAF Wild Type (WT) or mutant BRAF (without asterisk are BRAF^{V600E}; one asterisk are V600D) displaying RMEL3 relative expression measured with qRT-PCR and calculated with 2^{-ΔΔCt} method using TBP (TATA binding protein) as endogenous control. *Tukey's box-and-whisker plot. #Mann-Whitney test assigned p-value between columns individual comparisons.

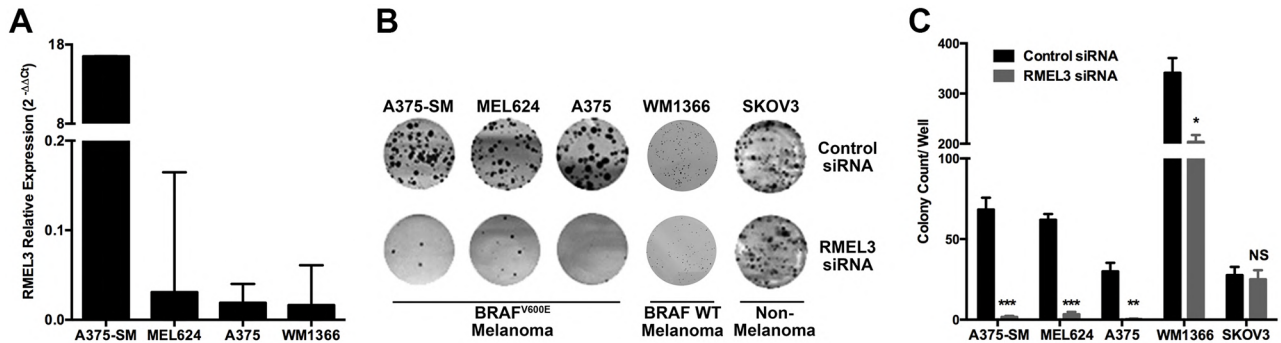


Figure 2: RMEL3 is required for cell clonogenic capacity. **A.** RMEL3 relative expression measured with qRT-PCR and calculated with 2^{-ΔΔCt} method using TBP (TATA binding protein) as endogenous control in different melanoma cell lines. **B.** Clonogenic assay with RMEL3-silenced melanoma cell lines and with SKOV3 ovarian cancer cell line, which does not express RMEL3. **C.** Correspondent graph plotting of 3 biological replicates of clonogenic assays.

results suggest that RMEL3 might work by suppressing mechanisms of G1/S checkpoint and apoptosis, thereby promoting cell cycle progression.

DISCUSSION

In this work we confirmed previous findings of our group [7] that RMEL3 is highly restricted to

melanoma (Figure 1A and 1B). A close correlation between RMEL3 and BRAF^{V600E} (Figure 1D and 1E) was observed and suggested that RMEL3 may be involved in cell proliferation and/or survival. Consistently RMEL3 knockdown induced a potent blockage over BRAF^{V600E} melanoma cell growth and survival (Figure 2A–2C).

RMEL3 validated genes are involved in pro-tumorigenic pathways, such as protein kinase A signaling,

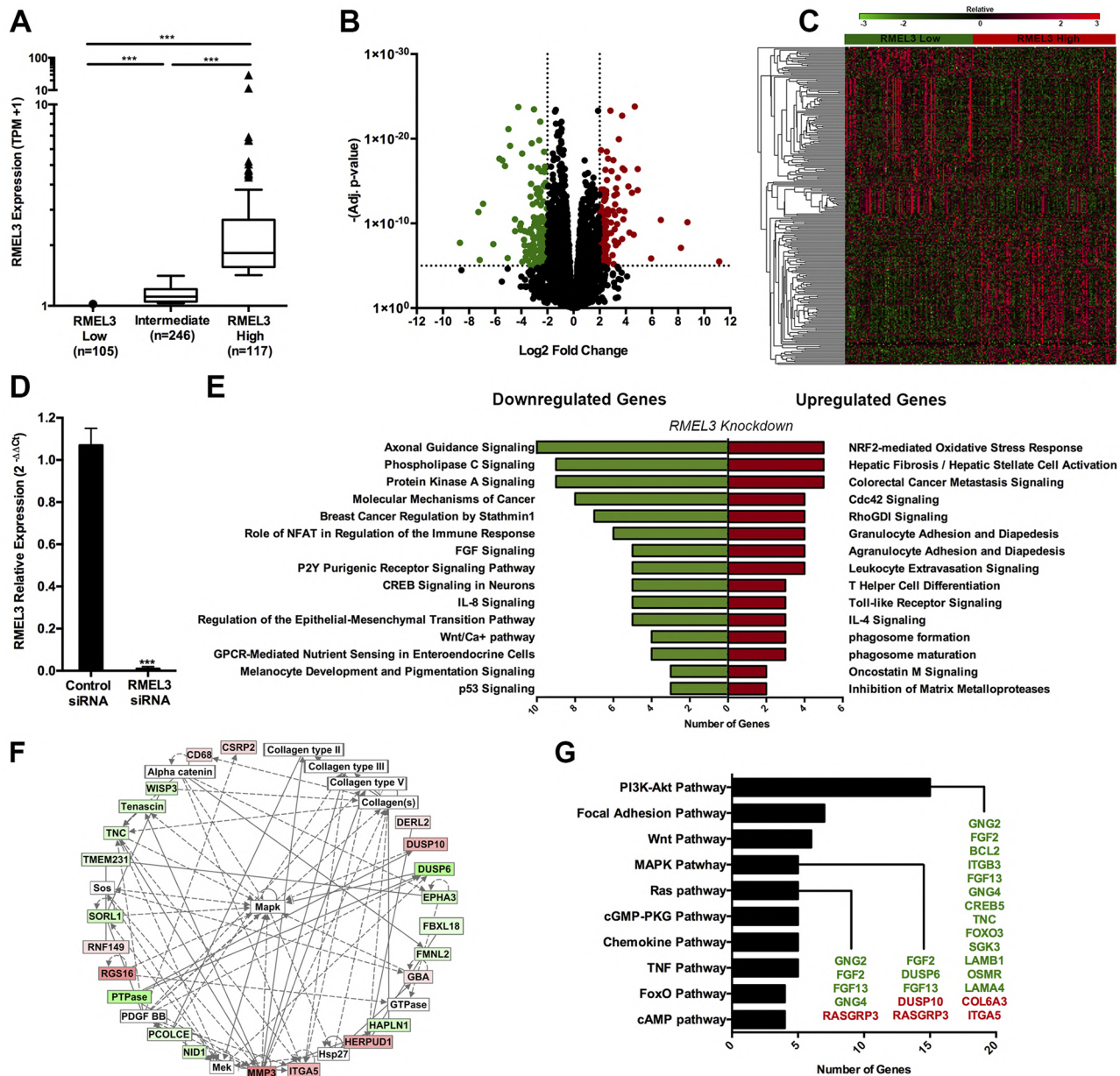


Figure 3: RMEL3 knockdown alters melanoma cell expression profile. A. TCGA patients were classified into two groups of RMEL3 expressions. RMEL3 Low group (n=105), constituted of patients with RMEL3 expression below 25th percentile and RMEL3 High group (n=117), constituted of patients with RMEL3 expressions above the 75th percentile of the total RMEL3 expression set*. Tukey's box-and-whisker plot. B. Volcano plot and Heatmap C. displaying differentially expressed genes (log2 fold change <-2 or >2, adj. p-value <0.00001) between RMEL3 Low and High groups. D. A375-SM RMEL3 knockdown efficiency*. E. Canonical pathways enrichment of the validated genes by Ingenuity Pathway Analysis software. F. Cell-to-cell signaling and interaction network. Red squares are upregulated genes and green squares are downregulated after RMEL3 knockdown. White squares are connective molecules not differentially expressed. G. Pathways involvement of differentially expressed genes from TCGA analysis validated by RMEL3 knockdown. Green colored genes are downregulated after RMEL3 knockdown and red colored genes are upregulated. *Mann-Whitney test assigned p-value between columns individual comparisons.

FGF signaling and regulation of epithelial-mesenchymal transition (Figure 3E). These results provide support to a possible involvement of RMEL3 in the in-transit metastasis process, evidenced by the increase of RMEL3 expression in the subcutaneous tumors (Figure 1C).

Importantly, several validated genes constitute components and transcription targets of the Ras-MAPK and PI3K-Akt pathways (Figure 3G), which are commonly active in melanoma [10]. Shared molecular signatures between RMEL3 knockdown and BRAF suppression also highlights the association of RMEL3 with BRAF. Common alterations are the upregulation of FOXD3 transcription factor [11]; WNT5A [12]; JUN, STAT3 [13]; fibronectin [14]; and other molecules involved in energy metabolism [15].

We also demonstrated, at the proteins levels, that RMEL3 knockdown decreased BRAF levels and increased the tumor suppressor PTEN concentration (Figure 4A), which commonly blocks BRAF^{V600E}-induced malignancy [16, 17]. As expected, we detected reduced levels of pAkt (T308) and Akt (Figure 4A). This strong correlation with PI3K genes (Figure 3E and Figure 4A) would provide a powerful advantage to melanoma progression, since parallel activation of the PI3K may offset the negative feedback induced by ERK [18, 19] in BRAF^{V600E} cells [20].

RMEL3 knockdown also altered protein levels of cell cycle and apoptosis regulators. For instance, decreased protein levels of phosphorylated RB and cyclin-B1,

as well as increased levels of the major effectors of G1 cell cycle arrest p21 and p27 were detected (Figure 4B and 4D). These results are consistent with the drastic reduction of clonogenic ability (Figure 2B–2C), G1 arrest and an increase in cell death rates (subG0/G1) (Figure 4E) caused by RMEL3 knockdown. Consistent with cyclin-B1 decrease, FOXM1 transcription factor that peaks in G2/M and activates cyclin-B1 expression [21] is also intensely downregulated (Figure 4B). On the other hand, the increase of cyclin-E1 after knockdown appears to be contradictory, however when targeted to the cytoplasm, cyclin-E1 promotes G1 arrest and senescence [22], which could be also reinforced by increased PAI-1 protein concentration (Figure 4B), a mediator of Ras senescence [23].

Interestingly, several changes tend to shift the balance towards apoptosis, including decrease of anti-apoptotic Bcl2 [24] mRNA expression (Supplementary Table S2) and protein levels (Figure 4C); an intense downregulation of transglutaminase protein that can inhibit bax-induced apoptosis [25]; increased pro-apoptotic p38 [26] and caspase-8 [27] protein levels; and decrease of YAP (pS127), which is phosphorylated by Akt to reduce p73-mediated induction of Bax expression [28]. Altogether, these protein changes may reflect inactivation of the critical MAPK and PI3K signaling pathways after RMEL3 knockdown.

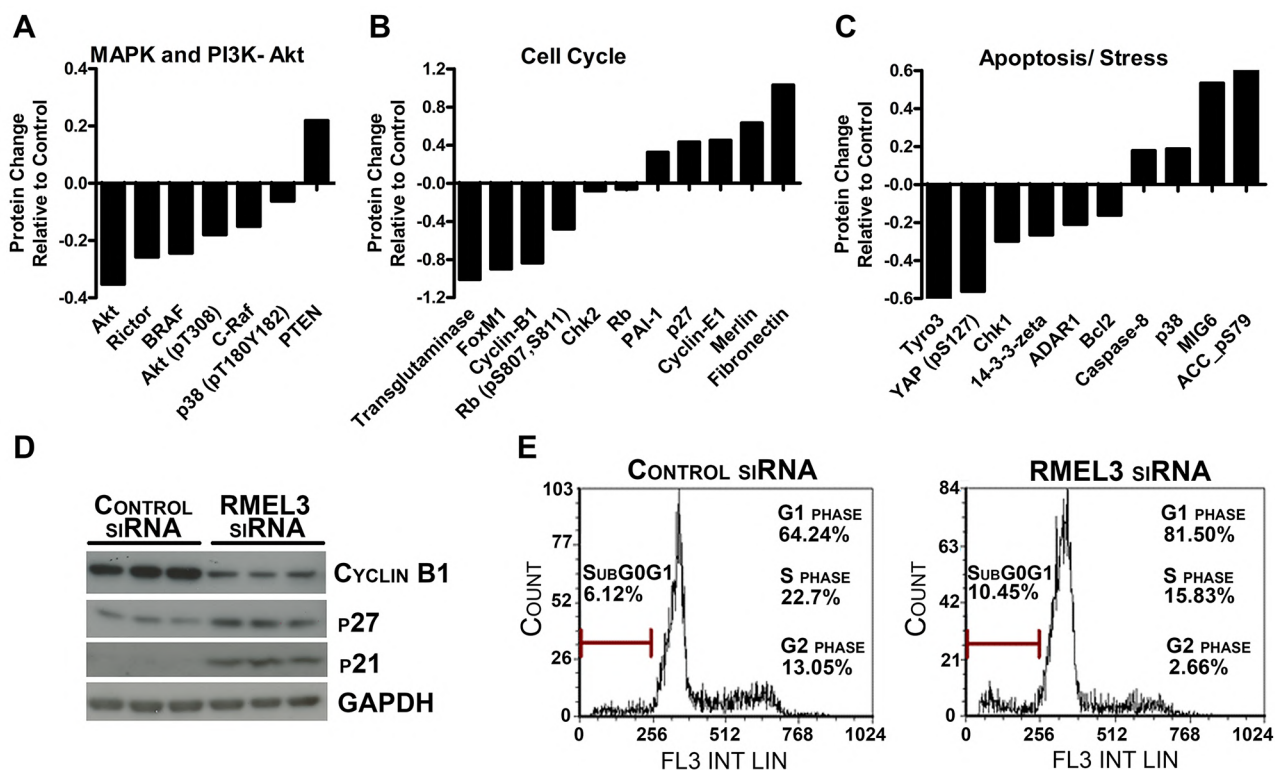


Figure 4: RMEL3 knockdown modulates important melanoma protein levels. A, B, C. Protein relative concentration alteration assessed by RPPA in A375-SM RMEL3-silenced cells involved in the MAPK/ PI3K-Akt pathways, cell cycle and apoptosis. D. Western blot confirmation of important cell cycle regulatory proteins of A375-SM RMEL3-silenced cells. E. Cell cycle analysis of A375-SM RMEL3-silenced cells using propidium iodide as DNA stain.

In conclusion, this work provides strong evidence that RMEL3, initially implicated by its specificity to melanoma, can affect malignancy through MAPK and PI3K stimulation. Further characterization is ongoing to determine the mechanisms of RMEL3 functions and its potential value as a therapeutic target.

MATERIALS AND METHODS

TCGA data analysis

Skin Cutaneous Melanoma Clinical information and Exome (Level 2) data were directly downloaded from TCGA online platform (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) as December 2015. Analysis of TCGA RNA sequencing data was performed using the RSEM software [29]. We added RMEL3 exons positions (GRCh37): Exon1 (Chr5:56,690,887-56,691,005), Exon2 (Chr5:56,789,902-56,790,052), Exon3 (Chr5:56,792,607-56,792,744) and Exon4 (Chr5:56,828,763-56,829,251) to the input gene description database to be able to estimate the expression level of this gene. Raw RNA sequencing data from the TCGA skin cutaneous melanoma (SKCM) project were downloaded from the Cancer Genomics Hub (CGHub) [30]. MD Anderson MBatch batch effects portal (<http://bioinformatics.mdanderson.org/main/TCGABatchEffects:Overview>) was used to verify TCGA Batch effects and no RNAseq significant batch effects were found.

To compare expression levels, we used the transcripts per million (TPM) [31] results of RSEM. Melanocytes sequencing read data (GSE38495) were obtained from [8].

For differential expression analysis between RMEL3 High and Low expression groups it was used EdgeR package [32]. In all differential analysis, p-values were adjusted for False Discovery Rate (FDR) <0.05 as multiple hypothesis test correction method. Gene ontology was assessed with DAVID [33] and pathway enrichment with KEGG [34].

Melanoma cell lines, RNA extraction and cDNA synthesis

Human melanoma cell lines were grown in RPMI media supplemented with 5% of fetal bovine serum (Life Technologies) and incubated at 37°C and 5% of CO₂. For RMEL3 expression analysis, melanoma cells were seeded in 10 cm plates overnight, followed by cell lysis and RNA purification using the mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion AM1560) according to manufacturer's instructions. Isolated RNA was treated with Dnase I (DNA-free kit, Ambion), quantified by spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer) and the amount of 1µg of the purified RNA was converted into cDNA using the High-

Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, CA).

Expression analysis by qRT-PCR

Equal amounts of each cDNAs were used to verify RMEL3 expression by qRT-PCR with specific primers (5'>3' sense ATGTGCTCCAAGAAAACCAGAG and antisense CTTTGTACAGGAATACCCAAC) and SYBR Green PCR Power Mix 2x as detector agent (Applied Biosystems, CA) in a Mastercycler ep realplex real-time PCR system (Eppendorf). Cycle threshold (Ct) was converted to relative expression according to the 2^{-ΔΔCT} method, using TBP (TATA-box binding protein) as endogenous control.

siRNA transfection

Cells seeded in 6-well plates a day before were transfected with different concentrations of siRNA using two transfection reagents, Dharmafect 1 (Dharmacon) or Xtremegene (Roche Applied Science). The parameters of transfection were set for each cell line and checked by Real Time PCR. Before leading to the subsequent experiments, the optimal condition was defined when the level of gene knockdown was higher than 90%. After appropriate treatments and incubations, cells were harvested for qPCR, western blotting, RPPA or used for clonogenicity analysis. The siRNA Stealth Universal Negative Control (Invitrogen) was used as a control, for RMEL3 a Stealth siRNA system (Invitrogen) was used. RMEL3 siRNA sequence: CCACUGCAGGGUUCAGUCACAUGA.

Gene expression profiling – microarray

Total RNA extracted as described above was subjected to whole-genome gene expression profiling using Sentrix HumanHT12 v4 beadchip arrays (Illumina). RNA amplification (TotalPrep RNA Amplification Kit, Life Technologies), array hybridization and data acquisition were performed at the University of Texas Health Science Center at Houston Microarray Core laboratory. The background was subtracted and arrays were quantile normalized. Differential expression analyses were performed among controls (cell lines transfected with siRNA Negative Control) and siRNA targeting RMEL3 gene using the GenomeStudio software (Illumina, Inc.). This data was uploaded to NCBI GEO platform as GSE72675.

Reverse phase protein array

Cells were seeded in six well plates overnight and transfected in triplicates with control siRNA and RMEL3 siRNA. Protein lysates extracted from melanoma cells after 72 hours of transfection were quantified, normalized, denatured and submitted for RPPA analysis. Normalization

and quality control were applied to RPPA data before further analyses (detailed description of the RPPA method and data normalization are available at <http://www.mdanderson.org/education-and-research/resources-for-professionals/scientific-resources/core-facilities-and-services/functional-proteomics-rppa-core/index.html>).

Western blots

The same protein lysates used for RPPA were also used for Western Blot analysis. Briefly, 30µg of protein was fractionated by 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with blocking solution (5% Milk in TBS-T) for 1 hour at room temperature, and then blotted with relevant antibody (anti-p21; anti-p27 and anti-CCNB1 from Cell Signaling) diluted on a BSA 1% solution overnight at 4°C in the concentration of 1:1000. HRP-conjugated secondary antibody was detected by using the Enhanced Chemiluminescence Kit (GE Healthcare).

Clonogenic assay

Cells transfected with control siRNA and RMEL3 siRNA were transferred into 6 well plates (330 cells/well) and cultured for 14 days at 37°C, 5% of CO₂ atmosphere. Subsequently, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with crystal violet 0.2% for colony visualization.

Cell cycle

For cell cycle analysis, percentage of cells in each phase of the cycle was detected by propidium iodide staining. Cells kept for 72 hours after transfection with siRNAs in 24 wells plates were trypsinized, washed twice in PBS and fixed in ethanol overnight. Two hours before submitting the cells for analysis, the cells were washed in PBS twice following by incubation with propidium iodide solution (EMD Chemical) for 20 minutes at 37°C. Then, cells were analyzed on FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) using BD FACSDiva software.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Silmara Reis Banzi and Benedita Oliveira Souza for technical assistance. This work was partially supported by TCGA Research Network through the Skin Cutaneous Melanoma freely available data.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

GRANT SUPPORT

This work was supported by grants to EME from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São


Paulo (FAPESP- 2014/18189-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Research Fellowship- 311347/2011-8 and 506780/2013-9). FAPESP provided fellowships to LG (2014/07726-0) and CGP (2010/16097-5 and 2012/24056-2). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) provided fellowship to LG and JRP. CNPq provided fellowship to CC. LG, JRP, WASJ are members of Center For Cell-Therapy, CEPID/FAPESP (grant #2013/08135-2). MAD is supported by NIH/NCI 1R01CA154710-01. The MD Anderson RPPA Core is supported by NCI # CA16672.

REFERENCES

1. Chen G and Davies MA. Targeted therapy resistance mechanisms and therapeutic implications in melanoma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2014; 28:523-536.
2. Aftab MN, Dinger ME and Perera RJ. The role of microRNAs and long non-coding RNAs in the pathology, diagnosis, and management of melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014; 563:60-70.
3. Mazar J, Zhao W, Khalil AM, Lee B, Shelley J, Govindarajan SS, Yamamoto F, Ratnam M, Aftab MN, Collins S, Finck BN, Han X, Mattick JS, Dinger ME and Perera RJ. The functional characterization of long noncoding RNA SPRY4-IT1 in human melanoma cells. *Oncotarget*. 2014; 5:8959-8969.
4. Tang L, Zhang W, Su B and Yu B. Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma. *BioMed research international*. 2013; 2013:251098.
5. Khaïtan D, Dinger ME, Mazar J, Crawford J, Smith MA, Mattick JS and Perera RJ. The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer research*. 2011; 71:3852-3862.
6. Maass PG, Luft FC and Bähring S. Long non-coding RNA in health and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2014; 92:337-346.
7. Sousa JF, Torrieri R, Silva RR, Pereira CG, Valente V, Torrieri E, Peronni KC, Martins W, Muto N, Francisco G, Brohem CA, Carlotti CG, Jr., Maria-Engler SS, Chammas R and Espreafico EM. Novel primate-specific genes, RMEL 1, 2 and 3, with highly restricted expression in melanoma, assessed by new data mining tool. *PloS one*. 2010; 5:e13510.
8. Ramskold D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, Faridani OR, Daniels GA, Khrebtkova I, Loring JF, Laurent LC, Schroth GP and Sandberg R. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nature biotechnology*. 2012; 30:777-782.
9. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015; 161:1681-1696.

10. Hill VK, Gartner JJ, Samuels Y and Goldstein AM. The genetics of melanoma: recent advances. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013; 14:257-279.
11. Abel EV, Basile KJ, Kugel CH, 3rd, Witkiewicz AK, Le K, Amaravadi RK, Karakousis GC, Xu X, Xu W, Schuchter LM, Lee JB, Ertel A, Fortina P and Aplin AE. Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J Clin Invest*. 2013; 123:2155-2168.
12. Anastas JN, Kulikauskas RM, Tamir T, Rizos H, Long GV, von Euw EM, Yang PT, Chen HW, Haydu L, Toroni RA, Lucero OM, Chien AJ and Moon RT. WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *The Journal of clinical investigation*. 2014; 124:2877-2890.
13. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J and Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013; 19:598-609.
14. Fedorenko IV, Abel EV, Koomen JM, Fang B, Wood ER, Chen YA, Fisher KJ, Iyengar S, Dahlman KB, Wargo JA, Flaherty KT, Sosman JA, Sondak VK, Messina JL, Gibney GT and Smalley KS. Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. *Oncogene*. 2016; 35:1225-1235.
15. Parmenter TJ, Kleinschmidt M, Kinross KM, Bond ST, Li J, Kaadige MR, Rao A, Sheppard KE, Hugo W, Pupo GM, Pearson RB, McGee SL, Long GV, Scolyer RA, Rizos H, Lo RS, et al. Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer discovery*. 2014; 4:423-433.
16. Lin J, Hocker TL, Singh M and Tsao H. Genetics of melanoma predisposition. *Br J Dermatol*. 2008; 159:286-291.
17. Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr., You MJ, DePinho RA, McMahon M and Bosenberg M. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics*. 2009; 41:544-552.
18. Sturm OE, Orton R, Grindlay J, Birtwistle M, Vyshemirsky V, Gilbert D, Calder M, Pitt A, Kholodenko B and Kolch W. The mammalian MAPK/ERK pathway exhibits properties of a negative feedback amplifier. *Science signaling*. 2010; 3:ra90.
19. Birtwistle MR and Kolch W. Biology using engineering tools: the negative feedback amplifier. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2011; 10:2069-2076.
20. Shull AY, Latham-Schwark A, Ramasamy P, Leskoske K, Oroian D, Birtwistle MR and Buckhaults PJ. Novel somatic mutations to PI3K pathway genes in metastatic melanoma. *PloS one*. 2012; 7:e43369.
21. Down CF, Millour J, Lam EW and Watson RJ. Binding of FoxM1 to G2/M gene promoters is dependent upon B-Myb. *Biochimica et biophysica acta*. 2012; 1819:855-862.
22. Yoshida A, Yoneda-Kato N and Kato JY. CSN5 specifically interacts with CDK2 and controls senescence in a cytoplasmic cyclin E-mediated manner. *Sci Rep*. 2013; 3:1054.
23. Eren M, Boe AE, Murphy SB, Place AT, Nagpal V, Morales-Nebreda L, Urich D, Quaggin SE, Budinger GR, Mutlu GM, Miyata T and Vaughan DE. PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:7090-7095.
24. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR and Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science (New York, NY)*. 1997; 275:1132-1136.
25. Cho SY, Lee JH, Bae HD, Jeong EM, Jang GY, Kim CW, Shin DM, Jeon JH and Kim IG. Transglutaminase 2 inhibits apoptosis induced by calcium- overload through down-regulation of Bax. *Experimental & molecular medicine*. 2010; 42:639-650.
26. Cai B, Chang SH, Becker EB, Bonni A and Xia Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281:25215-25222.
27. Juo P, Kuo CJ, Yuan J and Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Current biology : CB*. 1998; 8:1001-1008.
28. Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M and Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular cell*. 2003; 11:11-23.
29. Li B and Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*. 2011; 12:323.
30. Wilks C, Cline MS, Weiler E, Diehkans M, Craft B, Martin C, Murphy D, Pierce H, Black J, Nelson D, Litzinger B, Hatton T, Maltbie L, Ainsworth M, Allen P, Rosewood L, et al. The Cancer Genomics Hub (CGHub): overcoming cancer through the power of torrential data. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2014; 2014.
31. Wagner GP, Kin K and Lynch VJ. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theorie in biosciences = Theorie in den Biowissenschaften*. 2012; 131:281-285.
32. Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2010; 26:139-140.
33. Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009; 4:44-57.
34. Kanehisa M. The KEGG database. *Novartis Foundation symposium*. 2002; 247:91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-152.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Identification of Long Noncoding RNAs Deregulated in Papillary Thyroid Cancer and Correlated with BRAF^{V600E} Mutation by Bioinformatics Integrative Analysis

Lucas Goedert^{1,2}, Jessica Rodrigues Praça^{2,3}, Cesar Seigi Fuziwara⁴, Maiaro Cabral Rosa Machado¹, Desirée Rodrigues Praça⁵, Palloma Porto Almeida⁶, Talita Perez Sanches¹, Jair Figueredo dos Santos⁷, Amanda Cristina Corveloni⁸, Illy Enne Gomes Pereira¹, Marcela Motta de Castro¹, Edna Teruko Kimura⁴, Wilson Araújo Silva Jr.^{2,9} & Enilza Maria Espreafico^{1,2}

Papillary Thyroid Cancer (PTC) is an endocrine malignancy in which BRAF^{V600E} oncogenic mutation induces the most aggressive phenotype. In this way, considering that lncRNAs are arising as key players in oncogenesis, it is of high interest the identification of BRAF^{V600E}-associated long noncoding RNAs, which can provide possible candidates for secondary mechanisms of BRAF-induced malignancy in PTC. In this study, we identified differentially expressed lncRNAs correlated with BRAF^{V600E} in PTC and, also, extended the cohort of paired normal and PTC samples to more accurately identify differentially expressed lncRNAs between these conditions. Indirectly validated targets of the differentially expressed lncRNAs in PTC compared to matched normal samples demonstrated an involvement in surface receptors responsible for signal transduction and cell adhesion, as well as, regulation of cell death, proliferation and apoptosis. Targets of BRAF^{V600E}-correlated lncRNAs are mainly involved in calcium signaling pathway, ECM-receptor interaction and MAPK pathway. In summary, our study provides candidate lncRNAs that can be either used for future studies related to diagnosis/prognosis or as targets for PTC management.

Thyroid cancer is the endocrine malignancy¹ that, although stable until the 1990s, has progressively and greatly increased thereafter^{2,3}. The vast majority of the thyroid cancers originate from the follicular cell epithelium¹, which includes papillary thyroid carcinoma (PTC) that accounts for approximately 80% of all thyroid malignancies⁴.

Thyroid oncogenesis is still under investigation, however a high frequency (70%) of activating mutations in components of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway was reported, such as BRAF^{V600E}^{5,6} and HRAS/NRAS/KRAS point mutations^{7,8}. Also, fusions involving the RET⁹ and NTRK1 tyrosine kinases¹⁰ were described to promote thyroid cancers. More recently, the set of known PTC driver alterations was extended to include EIF1AX, PPM1D, and CHEK2⁷.

¹Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ²National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy and Center for Cell-Based Therapy, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ³Clinical Oncology, Stem Cell and Cell Therapy Program, Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ⁴Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁵Biotechnology Program, Federal University of São Paulo, São José dos Campos, São Paulo, Brazil. ⁶Biotechnology Program, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. ⁷Biomedicine Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. ⁸Biomedicine Program, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. ⁹Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, and Center for Integrative System Biology – CISBi-NAP/USP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Lucas Goedert and Jessica Rodrigues Praça contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.M.E. (email: emesprea@fmrp.usp.br)

Additionally of being the most frequent mutation in many types of cancers including PTC^{7,11}, BRAF^{V600E} confers poorer prognosis compared to other oncogenes. There is a growing number of evidence demonstrating that BRAF^{V600E} correlates with metastasis, cancer recurrence¹² and higher mortality in PTC¹³. BRAF^{V600E}-expressing cells have a diversity of malignant characteristics, including increased DNA synthesis, dedifferentiation, and chromosomal instability¹⁴. Also, BRAF^{V600E} stimulates more actively MEK-dependent invasion than the expression of RET/PTC oncoprotein through the expression of matrix metalloproteinases (e.g. MMP-3, MMP-9 and MMP-13), which, in part, can explain the more aggressive BRAF^{V600E}-induced phenotype¹⁵.

Similarly to melanoma¹⁶, BRAF mutation occurs at early stages of PTC development^{11,17}. Besides all BRAF oncogenic activities, its single exacerbated stimulation of the MAPK pathway is not sufficient to sustain malignant transformation, resulting in induced senescence¹⁸ that confers a barrier to tumor progression¹⁹. To bypass BRAF-induced senescence, cells may suffer a second event that allows malignant transformation, as possibly the epigenetic silencing of tumor suppressors DAPK, TIMP3²⁰, SLC5A8^{20,21} and hMLH1²² and other BRAF-induced mechanisms that remain to be discovered¹¹. In thyroid cancers, Thyroid-stimulating Hormone (TSH) is more involved in overcoming senescence; while BRAF overexpression suppresses thyroid hormone biosynthesis and leads to elevated TSH levels *in vivo*¹⁴; it was shown that TSH signaling inhibits BRAF^{V600E}-induced senescence through DUSP6²³.

Recently, BRAF^{V600E}-associated mRNA signature was determined in a mouse model and human samples²⁴, which identified new genes not previously reported as related to BRAF mutation in thyroid cancer (e.g. MMD, ITPR3, AACs, LAD1, PVRL3, ALDH3B1, and RASA1) that will provide further support for future research on BRAF-induced PTC²⁴. However, this analysis did not evaluate the expression of long noncoding RNAs (lncRNAs), which are progressively shown to be of fundamental importance in other types of cancer^{25,26}. Such analysis is necessary for the identification of BRAF^{V600E}-correlated long noncoding RNAs.

lncRNAs are RNAs longer than 200 nucleotides that have no coding potential²⁷ and are involved in several processes, such as gene expression regulation through chromatin modulation^{28,29}, epigenetic control³⁰, association with translational apparatus³¹, improving other mRNA stability³², serving as a scaffold for protein³³, acting as decoys for miRNAs³⁴, altering protein turnover³⁵, among others.

To date, as per the authors' knowledge, only a few published studies identified differentially expressed (DE) lncRNAs between normal (N) and tumoral thyroid (T) in a limited set of paired samples^{36,37}. Although these findings laid the foundation for further investigation of lncRNAs related to PTC³⁶, they need to be confirmed in a more numerous group of patients.

In this study we confirmed previously reported lncRNAs and determined new DE lncRNAs in PTC in a larger set of samples and also identified BRAF^{V600E}-correlated lncRNAs, providing possible candidates that can constitute secondary mechanisms of BRAF-induced malignancy in PTC.

Results

Comparative analyses identified lncRNAs deregulated in PTC and correlated with BRAF^{V600E} mutation.

Comparative analysis between 59 pairs of matched normal and papillary thyroid cancer samples identified 455 differentially expressed lncRNAs (log₂ fold change > 1 or < -1; adj. p-value < 1 × 10⁻⁷; Fig. 1A), being 71 lncRNAs upregulated and 384 lncRNAs downregulated in PTC (Supplemental Table S1). The same samples presented a total of 2016 mRNAs (log₂ fold change > 1 or < -1; adj. p-value < 0.05; Supplemental Table S2) and 186 microRNAs (log₂ fold change > 1 or < -1; adj. p-value < 0.05; Supplemental Table S3) differentially expressed.

Differential expression analyses were also performed to identify BRAF^{V600E}-correlated lncRNAs. The comparison between BRAF wild type (WT) patients (n = 242) and BRAF^{V600E} patients (n = 226), determined 437 differentially expressed lncRNAs (log₂ fold change > 1 or < -1; adj. p-value 1 × 10⁻⁴; Fig. 1B), being 117 upregulated and 320 downregulated (Supplemental Table S4). The same comparison found a total of 924 mRNAs (log₂ fold change > 1 or < -1; adj. p-value < 0.05; Supplemental Table S5) and 94 microRNAs (log₂ fold change > 1 or < -1; adj. p-value < 0.05; Supplemental Table S6) differentially expressed. A total of 103 lncRNAs was differentially expressed in both analyses [(Normal × Tumor and WT × BRAF^{V600E}), (Fig. 1C, Table 1 and Supplemental Table S7)].

Experimental validation using qRT-PCR was performed to demonstrate the reliability of the bioinformatics analyses applied. From the top 25 positively DE lncRNAs and from the top 20 negatively DE lncRNAs, it were selected for validation those lncRNAs with low adjusted p-values to minimize expression variability, especially in the comparison BRAF^{WT} × BRAF^{V600E} tumor, among others characteristics (for detailed information see Methods). From a total of 5 DE lncRNAs selected for validation from the TCGA analysis (Fig. 2 and Supplemental Fig. S1, upper part), 4 DE lncRNAs were validated using thyroid cell lines (Fig. 2 and Supplemental Fig. S1, lower part), which strengthens the reliability of this bioinformatics analysis, although the experimentally tested set of lncRNAs constitutes a relatively small sampling. Considering all comparisons, we obtained a very expressive validation efficiency [from a total of 8 different comparisons (Normal × Tumor and BRAF^{WT} × BRAF^{V600E}), 6 were validated]. Downregulation of *ENSG00000235070.3* and *ENSG00000255020.1* in PTC was confirmed in the tumor cell lines TPC1 (BRAF^{WT}) and BCPAP (BRAF^{V600E}) compared to the normal immortalized cell line NTHY (Fig. 2). Also, downregulation of their expression was in accordance to the bioinformatics analysis, since lower expression for both of them was observed in BCPAP (BRAF^{V600E}) compared to TPC1 (BRAF wild type) (Fig. 2). Noteworthy, is that due to the very low abundance of *ENSG00000255020.1* in the BCPAP cell line, qRT-PCR resulted in two unspecific melting peaks, which did not influenced the results. Upregulation of *ENSG00000273132.1* in PTC was confirmed, however its overexpression in BRAF^{V600E} tumors was not observed in the cell line BCPAP compared to TPC1 (Fig. 2), maybe due to the small log₂ fold change value (1.69) of this comparison. Overexpression of *ENSG00000230498.1* in BRAF^{V600E} PTC compared to BRAF wild type tumors was

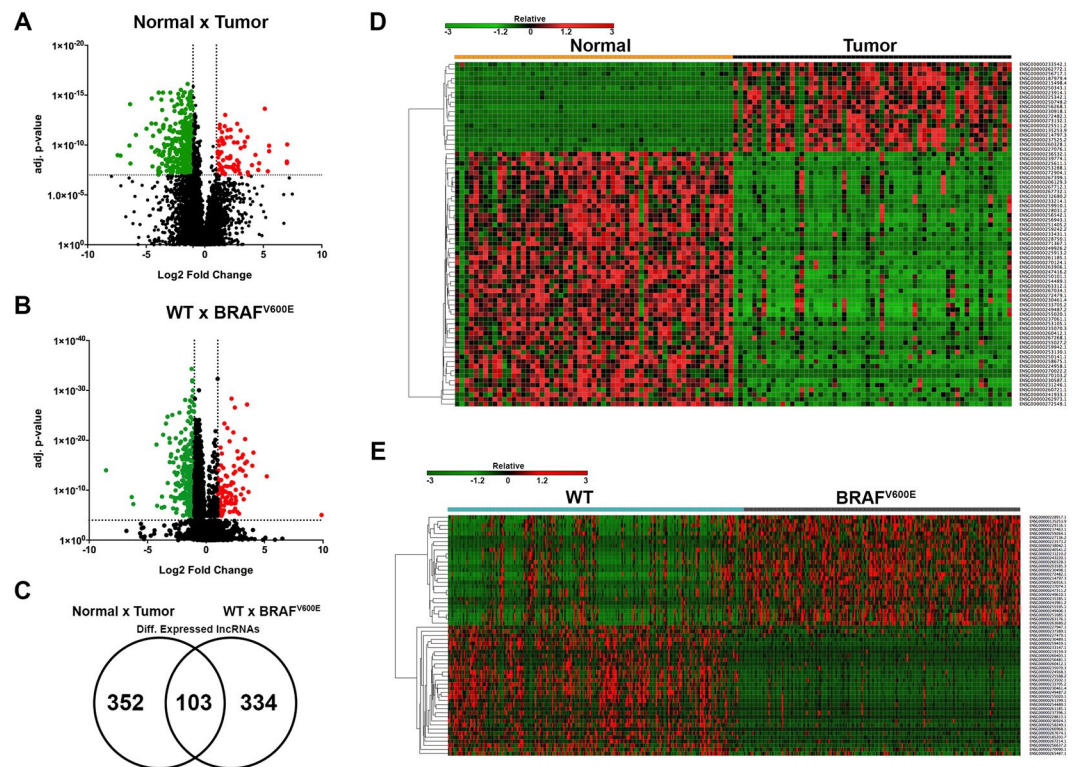


Figure 1. Differentially expressed lncRNAs between $N \times T$ and $WT \times BRAF^{V600E}$ were identified. (A) Volcano plot of DE lncRNAs between $N \times T$ (\log_2 fold change > 1 or < -1 ; adj. p-value $< 1 \times 10^{-7}$). (B) Volcano plot of DE lncRNAs between $WT \times BRAF^{V600E}$ (\log_2 fold change > 1 or < -1 ; adj. p-value $< 1 \times 10^{-4}$). (C) Venn Diagram of common DE lncRNAs between $N \times T$ and $WT \times BRAF^{V600E}$. (D) Heatmap* of DE lncRNAs between $N \times T$ (\log_2 fold change > 3 or < -3 ; adj. p-value $< 1 \times 10^{-7}$). (E) Heatmap* of DE lncRNAs between $WT \times BRAF^{V600E}$ (\log_2 fold change > 2.5 or < -2.5 ; adj. p-value $< 1 \times 10^{-4}$). *For hierarchical clustering, one minus Spearman rank correlation was performed.

Ensembl	log ₂ FC	Adj. p-value	log ₂ FC	Adj. p-value
	$N \times T$	$N \times T$	$WT \times BRAF^{V600E}$	$WT \times BRAF^{V600E}$
ENSG00000214797.3	7.01	6.39E-09	5.19	4.92E-12
ENSG00000273132.1	5.49	4.17E-10	1.69	3.70E-12
ENSG00000230918.1	5.49	1.17E-10	1.36	3.89E-05
ENSG00000260328.1	5.39	4.27E-08	4.04	2.26E-16
ENSG00000256268.1	5.12	2.27E-14	1.00	4.52E-13
ENSG00000261185.1	-6.42	1.13E-10	-2.81	3.55E-06
ENSG00000254489.1	-6.37	7.98E-15	-3.27	8.33E-11
ENSG00000260412.1	-6.33	7.11E-09	-3.77	2.59E-08
ENSG00000235070.3	-4.97	2.28E-12	-3.01	1.10E-15
ENSG00000247416.2	-4.55	6.89E-13	-2.40	1.09E-16

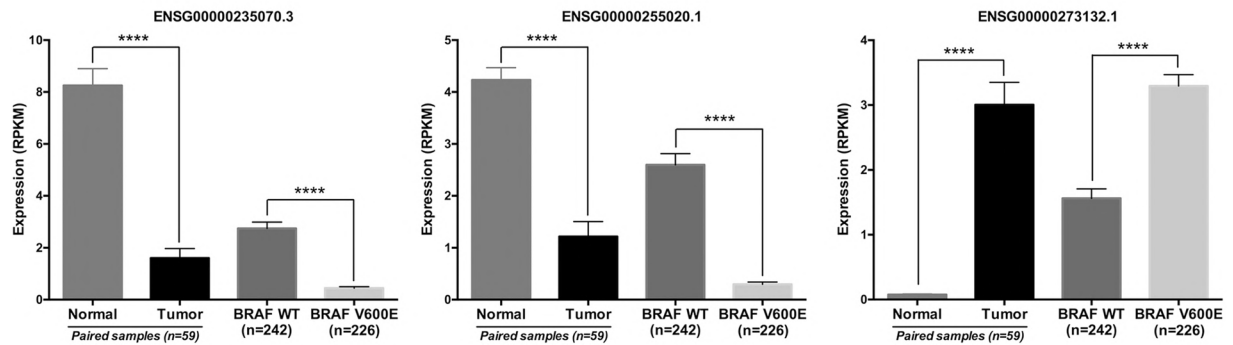
Table 1. Top 5 upregulated and 5 downregulated common DE lncRNAs between $Normal \times Tumor$ and $WT \times BRAF^{V600E}$.

also confirmed (Supplemental Fig. S1); nevertheless ENSG00000247311.2 was undetectable in both TPC1 and BCPAP cells (Supplemental Fig. S1).

Clustering lncRNAs identifies two groups with similar expression patterns. For downstream analyses, we increased the stringency of differentially expressed lncRNAs between $Normal \times Tumor$ (\log_2 fold change > 3 or < -3 ; adj. p-value $< 1 \times 10^{-7}$, $n = 73$; Fig. 1D) and between $WT \times BRAF^{V600E}$ (\log_2 fold change > 2.5 or < -2.5 ; adj. p-value $< 1 \times 10^{-4}$, $n = 59$; Fig. 1E) to analyze the lncRNAs that were most DE. Hierarchical clustering was used to organize patients or lncRNAs into groups according to the expression levels of DE lncRNAs.

Results demonstrated that this set of lncRNAs is capable of clustering, majorly, normal and cancer patients in two distinct groups (Supplemental Fig. S2A). Clustering lncRNAs by Spearman correlation among all

TCGA Analysis



Experimental Validation

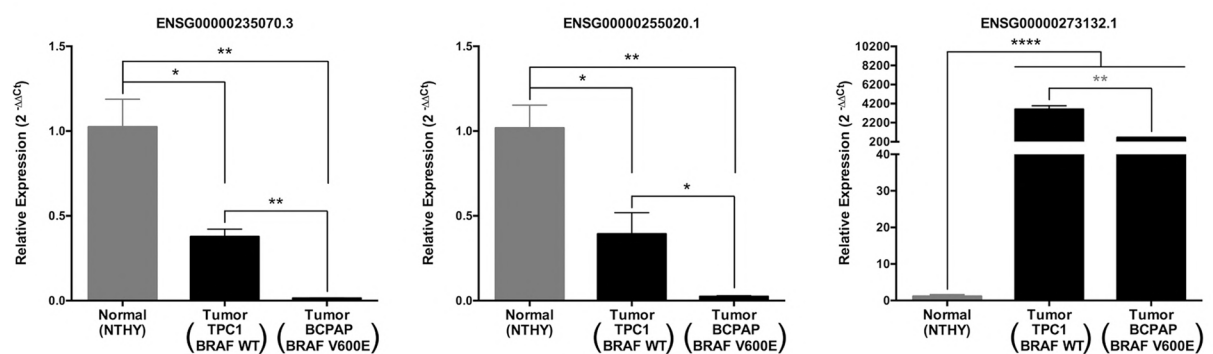


Figure 2. Experimental validation of DE lncRNAs. Upper part of panel displays the expression levels of the indicated lncRNAs in the TCGA analyses. The nonparametric Mann–Whitney test was applied due to the non-Gaussian expression distribution and p-value was assigned. Lower part of panel displays the experimental validation of these lncRNAs measured by qRT-PCR and calculated with $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using RPL19 (Ribosomal Protein L19) as endogenous control. Experiments with three biological replicates were performed using two technical replicates for each sample. These results are representative of at least two independent experiments. Values are plotted as expression mean \pm Standard Error of Mean (SEM). Unpaired two-tailed t-Test assigned the p-value.

DE lncRNAs also identified two groups of lncRNAs highly positively correlated or negatively correlated (Supplemental Fig. S3A).

Hierarchical clustering was also performed with a more stringent set of DE lncRNAs between WT and BRAF^{V600E}, which allowed the clustering of two groups enriched with WT and BRAF^{V600E} patients, respectively (Supplemental Fig. S2B). Clustering lncRNAs by Spearman correlation among all DE lncRNAs also identified two groups highly positively correlated or negatively correlated lncRNAs (Supplemental Fig. S3B).

Indirectly validated lncRNAs' targets are involved in several oncogenic processes. As almost the totality of the identified DE lncRNAs in both conditions (Normal \times Tumor and WT \times BRAF^{V600E}) is uncharacterized, we used prediction methods to identify a possible interaction between lncRNAs and mRNAs/microRNAs. Predicted mRNAs and microRNAs (targets of DE lncRNAs) were compared to differentially expressed mRNAs and microRNAs (\log_2 fold change >1 or <-1 ; adj. p-value <0.05) calculated from the same TCGA patients. Predicted mRNAs/microRNAs that were also identified as DE were considered as indirectly validated targets.

A total of 1109 DE mRNAs (Table 2 and Supplemental Table S8) and 26 DE microRNAs (Supplemental Table S9) were found to be predicted targets of the DE lncRNAs between Normal and Tumor samples and were considered as indirectly validated targets. Gene ontology and KEGG pathways enrichment of these validated mRNAs demonstrated that most of the genes are involved in surface receptors responsible for signal transduction and cell adhesion, as well as, regulation of cell death, proliferation and apoptosis (Fig. 3A). Enriched pathways (Fig. 3B) were composed of cytokine-cytokine receptor interaction, pathways in cancer (Fig. 3C), focal adhesion, MAPK pathway and calcium signaling pathway. Validated microRNAs were also used to determine enriched pathways based on their predicted targets calculated elsewhere (Fig. 3D). Genes involved in cancer and MAPK pathways were the most enriched pathways. Interestingly, some genes predicted to be targets of the validated microRNAs were also DE expressed in our analysis (Supplemental Table S2), such as upregulation of the MAPK constituents, CACNG4, CACNA1E, DUSP4, TGFBR1, FGF1, FGF2 and MAP3K1. Enriched pathways were extended to genes involved in cancer, focal adhesion and calcium signaling (Fig. 3D).

Ensembl	log2 FC	Adj. p-value	Upregulated indirectly validated targets	Downregulated indirectly validated targets
	N × T	N × T		
ENSG00000223914.1	7.04	8.69E-11	VGLL1, GDF6, FAM19A2, HRH1	RPS6KA5, RNF150, ANK2, FOSB
ENSG00000250748.2	7.01	4.56E-09	FUT3, GPR115, CAPN8, COL7A1	SVEP1, LMOD1, DPT, KCNA1
ENSG00000214797.3	7.01	6.39E-09	TMEM130, HES2, KCP, DTX4	CDHR3, PAK3, RASSF6, NWD1
ENSG00000273132.1	5.49	4.17E-10	KLK6, ELFN2, C19orf59, SHISA6	SRF, CPXM1, LAYN, FAM163A
ENSG00000230918.1	5.49	1.17E-10	GRM4, DPP4, LRP4, SHISA6	EGR1, TFPC2L1, FOXJ1, ABCA9
ENSG00000253288.1	-7.43	1.03E-09	SLC6A20, KLK10, FUT3, HRH1	HAP1, SH2D6, FOXP2, ADH1B
ENSG00000272479.1	-7.19	1.16E-09	DMBX1, TMPRSS6, TMPRSS4, PPP1R1B	CUX2, PAX1, CLCNKB, FOSB
ENSG00000261185.1	-6.42	1.13E-10	B3GNT3, ELFN2, LRP4, SHISA6	NR4A1, C1QTNF7, RNF150, FAM180B
ENSG00000254489.1	-6.37	7.98E-15	SYTL5, HPCAL4, KCNQ3, CPNE4	RBM24, PGA3, GFRA1, RNF150
ENSG00000260412.1	-6.33	7.11E-09	CLDN16, PDE4C, LRG1, SHROOM4	SLC26A4, CDHR3, PAK3, NWD1

Table 2. Top 5 upregulated and 5 downregulated DE lncRNAs between paired Normal × Tumor with examples of indirectly validated targets.

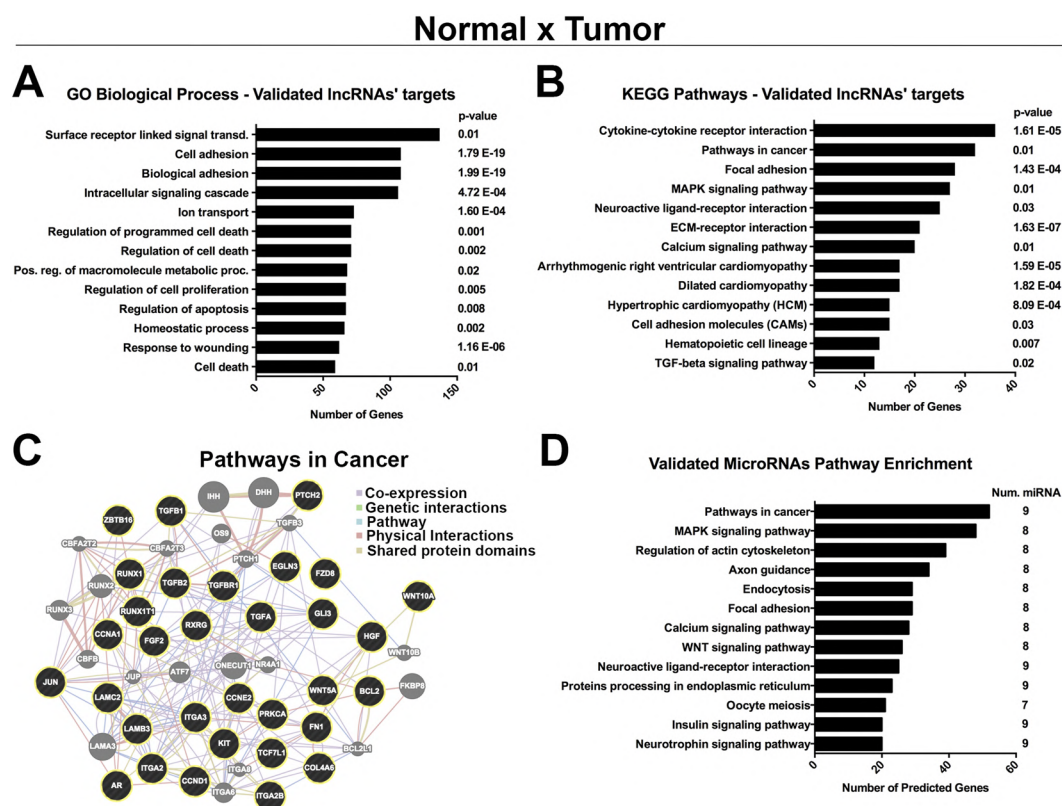


Figure 3. Indirectly validated targets of the DE lncRNAs between N × T are involved in cancer-related processes. (A) GO biological processes and (B) KEGG enriched pathways of the indirectly validated mRNA targets of the DE lncRNAs between N × T. (C) Proteins' network of genes linked to the pathways in cancer, where black circles are validated targets and grey circles are connective proteins. (D) KEGG Pathways enrichment of the indirectly validated microRNAs targets of the DE lncRNAs between N × T.

Ensembl	log2 FC	Adj. p-value	Upregulated indirectly validated targets	Downregulated indirectly validated targets
	WT × BRAF ^{V600E}	WT × BRAF ^{V600E}		
ENSG00000255595.1	9.87	5.68E-05	TCAP, ITGA2, LY6G6C, BEND6	SLC5A5, ASTN1, PART1, IRX6
ENSG00000214797.3	5.19	4.92E-12	HES2, DTX4, KCP, LDLR	RNF157, HAP1, NWD1, SLC14A2
ENSG00000260328.1	4.04	2.26E-16	TMPRSS4	PRND, TMPRSS3, PREX2, CNTNAP2
ENSG00000230498.1	3.95	5.74E-14	C1orf106, ADAMTS14, DMBX1, DUSP13	FCGBP, GCGR, SOX3, PPP2R2C
ENSG00000256916.1	3.62	3.51E-09	ELFN2, SPTBN2, MUC16, ZNF469	SSPO, ASXL3, CTNND2, CNTNAP2
ENSG00000267674.1	-8.55	3.89E-13	VSIG1, LDLR	ADM2, ST3GAL6, NWD1, SLC5A8
ENSG00000237396.1	-6.35	3.05E-08	SIGLEC6, SDK1, C1QL2, MUC21	TFCP2L1, SCUBE1, SBSN, PAX1
ENSG00000227947.1	-6.22	5.72E-07	ELFN2, EPHA10, SLC30A3, SYT1	SFTPC, GATA5, SFRP1, MATN1
ENSG00000224568.1	-4.23	8.95E-18	SLC6A14, C1orf106	HIF3A, SYT13, SLC29A4, ARSF
ENSG00000267214.1	-4.18	1.17E-06	ELFN2, COL7A1, B4GALNT3	FAM124A, SULT1A2, SLC29A4, CNTNAP2

Table 3. Top 5 upregulated and 5 downregulated DE lncRNAs between WT × BRAF^{V600E} with examples of indirectly validated targets.

Between WT and BRAF^{V600E}, 471 DE mRNAs (Table 3 and Supplemental Table S10) and 11 DE microRNAs (Supplemental Table S11) were indirectly validated. Gene ontology of these mRNAs demonstrated that most of the genes are also related to surface receptors involved in signal transduction and cell adhesion, but, additionally, with response to hormone stimulus and transmembrane transport (Fig. 4A). Enriched pathways (Fig. 4B) were constituted of calcium signaling pathway (Fig. 4C), cardiomyopathies and ECM-receptor interaction. KEGG enrichment pathway analysis of the validated DE microRNAs demonstrated participation of the MAPK and WNT pathways, as well as regulation of actin cytoskeleton and focal adhesion (Fig. 4D). Several pro-oncogenic genes were found to be upregulated in our analysis and were described as predicted targets of the validated DE microRNAs, as the example of MET and TGFBR1 genes (Supplemental Table S5).

Discussion

Long noncoding RNAs are arising as key participants in cancer establishment and progression by several oncogenic mechanisms^{30,32}. On the other hand, it is of urge interest the determination of how these lncRNAs are activated and how they can be associated with specific events or genotypes, such as point mutations. BRAF^{V600E} is the driver oncogenic mechanism with the greatest incidence in PTC⁷ and, therefore, any event correlated with this mutation will be necessary to understand BRAF^{V600E}-induced aggressiveness.

This is the first study to identify DE lncRNAs correlated with BRAF^{V600E} in PTC and, besides that, we extended the cohort of paired normal and PTC samples to more accurately determine DE lncRNAs between these conditions.

We have identified 455 DE lncRNAs between paired normal and PTC samples. A total of 76 (log2 fold change > 1 or < -1; adj. p-value < 1 × 10⁻⁷) lncRNA were previously reported as DE in thyroid cancer compared to adjacent normal thyroid³⁶ (Fig. 5A and Supplemental Table S12). This validation set, together with the lncRNAs confirmed by experimental approaches (Fig. 2 and Supplemental Fig. S1), confers consistency to our analysis. Additionally, a diversity of DE lncRNAs identified in our analysis were reported in individual studies as altered in PTC samples, such as ENSG00000259104.2^{38,39}, ENSG00000236130⁴⁰, ENSG00000226363³⁷, ENSG00000271086^{39,41}, ENSG00000223914³⁷ and ENSG00000187979³⁷.

ENSG00000259104.2 (PTCSC3), which is downregulated in the tumor samples (log2 fold change -1.40; adj. p-value 1.11E-12) was previously reported as having thyroid-specific expression and decreased expression in PTC^{38,39}. Interestingly, the risk allele [T] associated with SNP rs944289, located at PTCSC3's promoter, affects the binding site of C/EBP α and C/EBP β (PTCSC3 activators), reducing its expression. Restoration of PTCSC3 expression in PTC cells inhibited cell growth and affected the expression of genes involved in DNA replication/repair, cellular movement and cell death³⁸. Also PTCSC3 ectopic expression reduces cell proliferation and increases cell cycle arrest and apoptosis³⁹, while reducing cell motility and invasiveness through S100A4 down-regulation⁴² (Fig. 5B).

ENSG00000236130 (PTCSC2), was also reported as having decreased expression in PTC⁴⁰, which was confirmed in our analysis (N × T log2 fold change -1.03; adj. p-value 3.12E-09). The risk allele [A] of rs965513 was significantly associated with low expression of unspliced PTCSC2 in unaffected thyroid tissue, however this correlation was not extended to PTC samples⁴⁰.

BRAF WT x BRAF^{V600E}

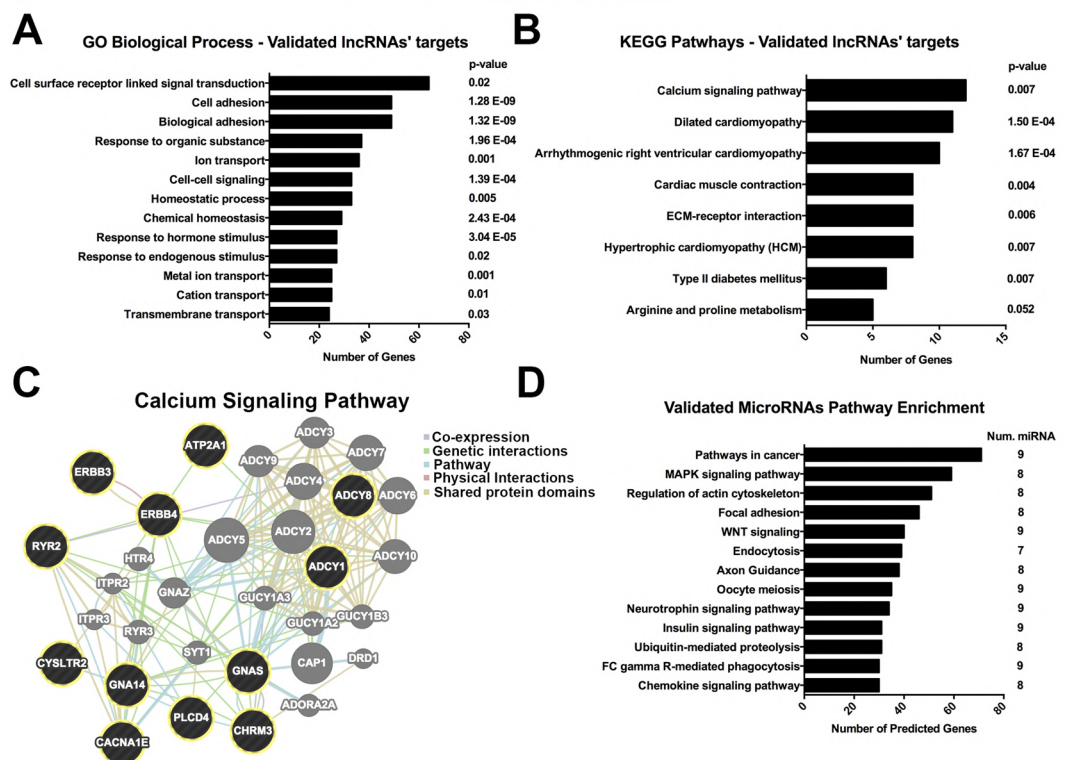


Figure 4. Indirectly validated targets of the DE lncRNAs between WT x BRAF^{V600E} are involved in oncogenic pathways. (A) GO biological processes and (B) KEGG enriched pathways of the indirectly validated mRNA targets of the DE lncRNAs between WT x BRAF^{V600E}. (C) Proteins' network of genes linked to calcium signaling pathway, where black circles are validated targets and grey circles are connective proteins. (D) KEGG pathways enrichment of the indirectly validated microRNAs targets of the DE lncRNAs between WT x BRAF^{V600E}.

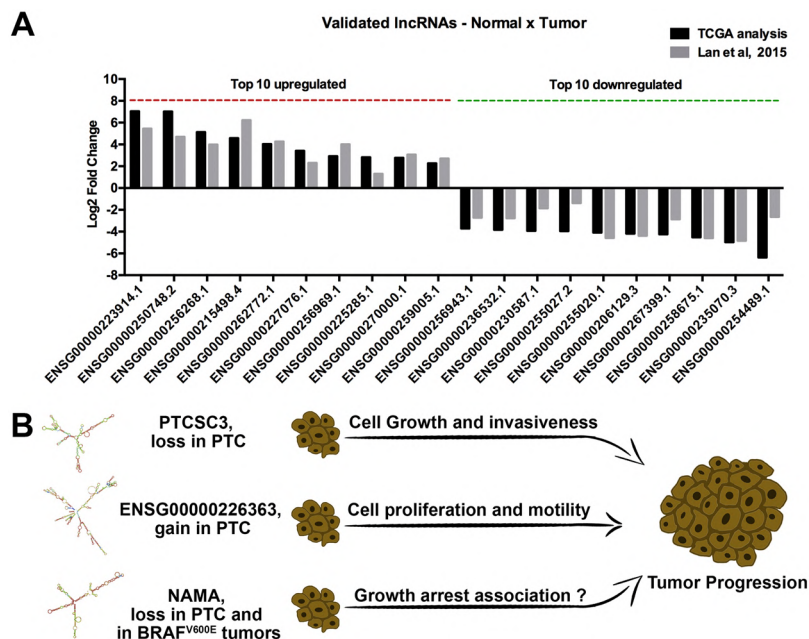


Figure 5. Experimentally validated lncRNAs are important to tumor malignancy. (A) Examples of DE lncRNAs between Normal and PTC, which were confirmed in a validation set³⁶. (B) Differentially expressed lncRNAs in PTC that alter tumor malignancy.

ENST00000426615 (*ENSG00000226363*) is another lncRNA that we identified as upregulated in PTC (N×T log₂ fold change 3.87; adj. p-value 2.36E-05), which was experimentally demonstrated to be overexpressed in this cancer, inducing cell proliferation and motility³⁷ (Fig. 5B).

Our analysis also confirmed the differential expression (N × T: log₂ fold change -2.42; adj. p-value 3.96E-11) of the previously reported lncRNA *ENSG00000271086* (NAMA), which is downregulated in PTC compared to normal tissues^{39,41} and in BRAF^{V600E} tumors compared to wild type tumors³⁹ (Fig. 5B). NAMA is induced by inhibition of the MAPK pathway, growth arrest and DNA damage⁴¹ and our analysis also demonstrated that NAMA is downregulated in BRAF^{V600E} patients (WT × BRAF^{V600E} log₂ fold change -1.66; adj. p-value 2.02E-15). All these independently validated lncRNAs demonstrate the reliability of our study (Fig. 5).

Similarity matrix based on Spearman correlation identified clusters of DE lncRNAs between Normal × Tumor (Supplemental Fig. S3A) and WT × BRAF^{V600E} (Supplemental Fig. S3B) with similar expression patterns, which can provide evidence for further studies to determine common upstream regulators.

Indirectly validated targets of the DE lncRNAs between Normal × Tumor are involved in a diversity of biological processes (Fig. 3A). For instance, it was noticed an overrepresentation of adhesion molecules, such as downregulation of CDH16, which was already reported as a potential marker for PTC⁴³. Along with CDH16, many other cadherins were identified as validated targets of DE lncRNAs, such as CDH2, CDH3, CDH4, CDH6, CDH11 and CDH24 (Supplemental Table S8). Another highly enriched biological process was the regulation of programmed cell death (Fig. 3A), represented by the upregulation of the antiapoptotic SOX4⁴⁴ and TP63⁴⁵ in PTC samples. Enriched pathways (Fig. 3B) as cytokine-cytokine receptor interaction, focal adhesion and MAPK pathways were already reported in the first study of DE lncRNA with paired Normal × PTC samples³⁶, providing further support for future research. It was observed an enrichment of MAPK-related genes, represented in our results by upregulation, in the tumor samples, of TGB1, TGFB2 and TGFB1 that were shown to activate the MAPK pathway⁴⁶. Interestingly, pathway enrichment analysis of indirectly validated microRNAs (Fig. 3D) demonstrated a convergent tendency to genes involved in cancer, MAPK pathway and focal adhesion, which were also observed with the validated mRNAs.

Indirectly validated targets of the DE lncRNAs between WT × BRAF^{V600E} tumors were demonstrated to be involved with cell surface receptors responsible for signal transduction and with cell adhesion (Fig. 4A). Pathway enrichment analysis, identified genes involved in calcium signaling and ECM-receptor interaction, which were already reported as an early transcriptome change in BRAF^{V600E}-associated mouse model²⁴. Interestingly, we also observed several genes correlated with cardiomyopathies that are mostly related to calcium regulation in cardiac muscle cells (Fig. 4B). Calcium (Fig. 4C) and MAPK cascade (represented by BRAF^{V600E} group) are tightly involved, where calcium modulates the protein interaction properties of ERKs, affecting the subcellular localization and influencing the distribution of their targets⁴⁷. Calcium can also stimulates MEK through Ras activation⁴⁸. Therefore, these results can support a future investigation to answer if BRAF^{V600E}-stimulated MAPK activation can be reinforced by calcium modulation induced by the DE lncRNAs. Additionally, MAPK stimulation may be supported by the indirectly validated microRNAs, since pathway analysis demonstrated an enrichment of microRNAs' targets in cancer and MAPK pathways (Fig. 4D). Interestingly, predicted targets of the DE microRNAs were also differentially expressed in our analysis, such as the upregulation of TGFB1 and downregulation of PRKACB (Supplemental Table S5).

Concluding, our extended cohort of paired Normal and PTC patients identified new DE lncRNAs and confirmed many other lncRNAs already reported. Additionally, to our knowledge, this is the first study to identify BRAF^{V600E}-correlated lncRNAs in PTC, which will provide support for future studies aiming to identify BRAF^{V600E}-linked events in attempt to optimize therapeutic treatment and diagnosis/prognosis of this aggressive PTC genotype.

Methods

Data analysis. Thyroid Carcinoma (THCA) clinical information, mRNA and microRNA data expression data were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) online platform (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>), as January 2016. Mutations data were retrieved through cBioPortal⁴⁹. lncRNA RPKM expression levels corresponding to TCGA patients were downloaded through TANRIC⁵⁰, which obtained the genomic coordinates of 13,870 human lncRNAs from the GENCODE Resource (version 19)⁵¹ and further filtered out those lncRNA exons that overlapped with any known coding genes based on the gene annotations of GENCODE and RefGene, resulting in 12,727 lncRNAs⁵⁰.

BRAF^{V600E} patients were selected to form the BRAF^{V600E} group (n = 226), which excluded any other type of BRAF mutations. Wild Type group (n = 242) was formed by patients without any somatic mutation in BRAF gene, but patients with mutations in HRAS, NRAS, KRAS, EIF1AX, PPM1D, RET and NTRK1 were considered. It was selected only the patients with papillary thyroid cancer diagnosis.

Differential Expression Analysis. For differential expression analysis of mRNA and microRNA was used edgeR package⁵² through TCGAbiolinks⁵³. To identify differentially expressed lncRNAs between groups, it was used the paired/unpaired Student t test to assess the statistical difference of mean expression values between the two groups⁵⁰. lncRNA with median value equal zero were excluded and fold change was calculated using median expression values. In all differential analysis, p-values were adjusted for False Discovery Rate (FDR) < 0.05 as multiple hypothesis test correction method.

RNA extraction, Reverse-transcription and qPCR. Total RNA was phenol-chloroform extracted from cell lines Nthy-ori3-1 (NTHY-immortalized human thyroid follicular epithelial cell), TPC1 (papillary thyroid carcinoma- RET/PTC1 rearrangement) and BCPAP (papillary thyroid carcinoma-BRAF^{V600E}) using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Four µg of total RNA was reverse transcribed using

M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) in the presence of 100 ng of random hexamers primers according to the manufacturer's protocol. qPCR reaction was performed using 100 ng of cDNA, 1X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers. Amplification and detection were performed using ViiA7 TM Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relative gene expression was calculated using the QGENE program and calculated with $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using RPL19 (Ribosomal Protein L19) as endogenous control.

Primers used (5'-3'): RPL19 (Fw-TCTCATGGAACACATCCACAA; Rv-TGGTCAGCCAGGAGCTTCTT), ENSG00000273132.1 (Fw-CTAGCTGCCAGCAGTGACAA; Rv-GCGAGAGCACAGATGACCAC), ENSG00000230498.1 (Fw-CCCTGGGTGATGAAGATGAG; Rv-TGGGATCCCTTTTGTGTCG), ENSG00000235070.3 (Fw-TGACTCCAAGTTCACGCAGC; Rv-GTGGATGAGTTGTGTGCTGG), ENSG00000255020.1 (Fw-AGTGACGTGGGGAAGAAACG; Rv-CGACATATTTCAAGGGCGCC) and ENSG00000247311.2 (Fw-GCTGTGAGTGACTCTTCAGC and ACAGACACACCCAGGAACAA).

To select the above DE lncRNAs for validation, it was taken in consideration one of the major characteristics of lncRNA, that is, high heterogeneous expression across the same tumor and even the same cell line. Long non-coding RNAs expression is tightly regulated by a wide range of cellular responses and, due to the markedly lower transcriptional levels of lncRNAs, the expression variability inside the same group of patients is expected. Taking this aspect in consideration, from the top 25 positively DE lncRNAs and from the top 20 negatively DE lncRNAs, it was selected for validation those lncRNAs with low adjusted p-values to avoid this variability, especially in the comparison BRAF^{WT} × BRAF^{V600E} tumor, which is the focus of this research. As another desirable characteristic, most lncRNAs selected, presented at least in one group (normal thyroid, PTC, BRAF^{WT} or BRAF^{V600E}) a median expression greater than 1 RPKM (reads per kilo base per million mapped reads). Added to that, it was given preference for those lncRNAs without isoforms (seen that many lncRNAs have annotation errors) and that present at least 2 exons, which are more stable and would allow the PCR primers to be located in different exons.

Prediction of lncRNAs targets. To identify the possible target genes of the selected (Fig. 1D and E) differentially expressed lncRNAs via cis- or trans-regulatory effects, two previously described approaches were used^{36,54}. The genes transcribed within a 10 kb window upstream or downstream of lncRNAs were considered as cis-target genes^{36,54}. The second method was used to identify trans-targets and is based on mRNA and microRNA sequence complementarity with the query lncRNA. For mRNA interactions we used a pre-computed database that catalogs the predicted lncRNA–RNA interactions⁵⁵, where the accessible regions of the query lncRNA and possible targets (mRNA/lncRNA) are extracted, the binding energies of pairs of sequences (target and query) around the seed matches are evaluated and the minimum interaction energy of the joint secondary structures is calculated⁵⁵. The 500 predicted targets (mostly constituting repeated targets with different interaction sites) with the lowest minimum free energies under -20 kcal/mol were taken in consideration for downstream analysis. For lncRNA and microRNA interaction prediction it was used *rna22*, a method for identifying microRNA-binding sites and their corresponding heteroduplexes⁵⁶. It was selected those microRNAs with a folding energy lower than -20 kcal/mol.

Indirect Validation. As interaction prediction methods are susceptible to error and to minimize this, we compared the predicted targets of the differentially expressed lncRNAs with the differentially expressed mRNAs and microRNAs³⁶ calculated with the TCGA patients, because we consider that the targets of DE lncRNAs would possibly be DE in TCGA analysis. With this approach, we intended to enrich our analysis for targets with a greater propensity to be occurring biologically.

Gene ontology, pathway enrichment and protein-protein interaction network. Indirect validated targets of the DE lncRNAs were loaded into the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)⁵⁷, which returned the gene ontology of the query genes and identified enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways⁵⁸. miRSystem⁵⁹ was used to calculate enriched pathways based on the predicted targets of the query microRNAs, which in this case, were the DE microRNAs in both conditions (Normal × Tumor and WT × BRAF^{V600E}). For protein-protein interaction network it was used Genemania⁶⁰.

References

- Segev, D. L., Umbricht, C. & Zeiger, M. A. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surgical oncology* **12**, 69–90, doi:10.1016/S0960-7404(03)00037-9 (2003).
- Vigneri, R., Malandrino, P. & Vigneri, P. The changing epidemiology of thyroid cancer: why is incidence increasing? *Current opinion in oncology* **27**, 1–7, doi:10.1097/cco.000000000000148 (2015).
- Guay, B., Johnson-Obaseki, S., McDonald, J. T., Connell, C. & Corsten, M. Incidence of differentiated thyroid cancer by socioeconomic status and urban residence: Canada 1991–2006. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* **24**, 552–555, doi:10.1089/thy.2013.0308 (2014).
- Fagin, J. A. & Mitsiades, N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **22**, 955–969, doi:10.1016/j.beem.2008.09.017 (2008).
- Cohen, Y. *et al.* BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 625–627, doi:10.1093/jnci/95.8.625 (2003).
- Kimura, E. T. *et al.* High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer research* **63**, 1454–1457 (2003).
- Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* **159**, 676–690, doi:10.1016/j.cell.2014.09.050 (2014).
- Lemoine, N. R. *et al.* Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer research* **48**, 4459–4463 (1988).
- Grieco, M. *et al.* PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* **60**, 557–563, doi:10.1016/0092-8674(90)90659-3 (1990).
- Pierotti, M. A. *et al.* Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. *Journal of endocrinological investigation* **18**, 130–133, doi:10.1007/bf03349721 (1995).

11. Knauf, J. A. & Fagin, J. A. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. *Current opinion in cell biology* **21**, 296–303, doi:10.1016/j.ceb.2009.01.013 (2009).
12. Kebebew, E. *et al.* The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Annals of surgery* **246**, 466–470, discussion 470–461, doi:10.1097/SLA.0b013e318148563d (2007).
13. Xing, M. *et al.* Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *Jama* **309**, 1493–1501, doi:10.1001/jama.2013.3190 (2013).
14. Knauf, J. A. *et al.* Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer research* **65**, 4238–4245, doi:10.1158/0008-5472.can-05-0047 (2005).
15. Mesa, C. Jr. *et al.* Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer research* **66**, 6521–6529, doi:10.1158/0008-5472.can-06-0739 (2006).
16. Pollock, P. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics* **33**, 19–20, doi:10.1038/ng1054 (2003).
17. Adeniran, A. J. *et al.* Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *The American journal of surgical pathology* **30**, 216–222, doi:10.1097/01.pas.0000176432.73455.1b (2006).
18. Michaloglou, C. *et al.* BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724, doi:10.1038/nature03890 (2005).
19. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637, doi:10.1038/nature05268 (2006).
20. Hu, S. *et al.* Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **119**, 2322–2329, doi:10.1002/ijc.22110 (2006).
21. Porra, V. *et al.* Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **90**, 3028–3035, doi:10.1210/jc.2004-1394 (2005).
22. Guan, H. *et al.* Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. *Cancer* **113**, 247–255, doi:10.1002/cncr.23548 (2008).
23. Kim, Y. H. *et al.* TSH signaling overcomes B-RafV600E-induced senescence in papillary thyroid carcinogenesis through regulation of DUSP6. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **16**, 1107–1120, doi:10.1016/j.neo.2014.10.005 (2014).
24. Rusinek, D. *et al.* BRAFV600E-Associated Gene Expression Profile: Early Changes in the Transcriptome, Based on a Transgenic Mouse Model of Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS one* **10**, e0143688, doi:10.1371/journal.pone.0143688 (2015).
25. Flockhart, R. J. *et al.* BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCR to regulate melanoma cell migration. *Genome research* **22**, 1006–1014, doi:10.1101/gr.140061.112 (2012).
26. Goedert, L. *et al.* RMEL3, a novel BRAFV600E-associated long noncoding RNA, is required for MAPK and PI3K signaling in melanoma. *Oncotarget*, **8**, doi:10.18632/oncotarget.9164 (2016).
27. Kapusta, A. & Feschotte, C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. *Trends in genetics: TIG* **30**, 439–452, doi:10.1016/j.tig.2014.08.004 (2014).
28. Penny, G. D., Kay, G. F., Sheardown, S. A., Rastan, S. & Brockdorff, N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* **379**, 131–137, doi:10.1038/379131a0 (1996).
29. Saxena, A. & Carninci, P. Long non-coding RNA modifies chromatin: epigenetic silencing by long non-coding RNAs. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **33**, 830–839, doi:10.1002/bies.201100084 (2011).
30. Huang, M. D. *et al.* Long non-coding RNA ANRIL is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates cell apoptosis by epigenetic silencing of KLF2. *Journal of hematology & oncology* **8**, 50, doi:10.1186/s13045-015-0146-0 (2015).
31. Yoon, J. H. *et al.* LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Molecular cell* **47**, 648–655, doi:10.1016/j.molcel.2012.06.027 (2012).
32. Yuan, S. X. *et al.* Antisense long non-coding RNA PCNA-AS1 promotes tumor growth by regulating proliferating cell nuclear antigen in hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* **349**, 87–94, doi:10.1016/j.canlet.2014.03.029 (2014).
33. Yoon, J. H. *et al.* Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination. *Nature communications* **4**, 2939, doi:10.1038/ncomms3939 (2013).
34. Karreth, F. A. *et al.* The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma *in vivo*. *Cell* **161**, 319–332, doi:10.1016/j.cell.2015.02.043 (2015).
35. Greco, S., Gorospe, M. & Martelli, F. Noncoding RNA in age-related cardiovascular diseases. *Journal of molecular and cellular cardiology* **83**, 142–155, doi:10.1016/j.yjmcc.2015.01.011 (2015).
36. Lan, X. *et al.* Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profile in papillary thyroid carcinoma. *Gene* **569**, 109–117, doi:10.1016/j.gene.2015.05.046 (2015).
37. Xu, B. *et al.* The Long Non-Coding RNA ENST00000537266 and ENST00000426615 Influence Papillary Thyroid Cancer Cell Proliferation and Motility. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **38**, 368–378, doi:10.1159/000438637 (2016).
38. Jendrzewski, J. *et al.* The polymorphism rs944289 predisposes to papillary thyroid carcinoma through a large intergenic noncoding RNA gene of tumor suppressor type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 8646–8651, doi:10.1073/pnas.1205654109 (2012).
39. Zheng, H. *et al.* BRAF-activated Long Non-coding RNA Modulates Papillary Thyroid Carcinoma Cell Proliferation through Regulating Thyroid Stimulating Hormone Receptor. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*. doi:10.4143/crt.2015.118 (2015).
40. He, H. *et al.* Genetic predisposition to papillary thyroid carcinoma: involvement of FOXE1, TSHR, and a novel lincRNA gene, PTCSC2. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **100**, E164–172, doi:10.1210/jc.2014-2147 (2015).
41. Yoon, H. *et al.* Identification of a novel noncoding RNA gene, NAMA, that is downregulated in papillary thyroid carcinoma with BRAF mutation and associated with growth arrest. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **121**, 767–775, doi:10.1002/ijc.22701 (2007).
42. Jendrzewski, J. *et al.* PTCSC3 Is Involved in Papillary Thyroid Carcinoma Development by Modulating S100A4 Gene Expression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **100**, 1370–1377, doi:10.1210/jc.2015-2247 (2015).
43. Li, W. B. *et al.* Identification of Genes Associated with Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) for Diagnosis by Integrated Analysis. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, doi:10.1055/s-0035-1569289 (2016).
44. Pramoongjago, P., Baras, A. S. & Moskaluk, C. A. Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3 cells. *Oncogene* **25**, 5626–5639, doi:10.1038/sj.onc.1209566 (2006).
45. Matin, R. N. *et al.* p63 is an alternative p53 repressor in melanoma that confers chemoresistance and a poor prognosis. *The Journal of experimental medicine* **210**, 581–603, doi:10.1084/jem.20121439 (2013).
46. Mulder, K. M. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine & growth factor reviews* **11**, 23–35 (2000).
47. Chuderland, D. & Seger, R. Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions. *Communicative & integrative biology* **1**, 4–5 (2008).

48. Rosen, L. B., Ginty, D. D., Weber, M. J. & Greenberg, M. E. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* **12**, 1207–1221, doi:10.1016/0896-6273(94)90438-3 (1994).
49. Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* **2**, 401–404, doi:10.1158/2159-8290.cd-12-0095 (2012).
50. Li, J. *et al.* TANRIC: An Interactive Open Platform to Explore the Function of lncRNAs in Cancer. *Cancer research* **75**, 3728–3737, doi:10.1158/0008-5472.can-15-0273 (2015).
51. Djebali, S. *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**, 101–108, doi:10.1038/nature11233 (2012).
52. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **26**, 139–140, doi:10.1093/bioinformatics/btp616 (2010).
53. Colaprico, A. *et al.* TCGAAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Research*. <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/TCGAAbiolinks.html> (2015).
54. Han, L. *et al.* lncRNA profile of glioblastoma reveals the potential role of lncRNAs in contributing to glioblastoma pathogenesis. *International journal of oncology* **40**, 2004–2012, doi:10.3892/ijo.2012.1413 (2012).
55. Terai, G., Iwakiri, J., Kameda, T., Hamada, M. & Asai, K. Comprehensive prediction of lncRNA-RNA interactions in human transcriptome. *BMC genomics* **17**(Suppl 1), 12, doi:10.1186/s12864-015-2307-5 (2016).
56. Miranda, K. C. *et al.* A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* **126**, 1203–1217, doi:10.1016/j.cell.2006.07.031 (2006).
57. Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* **37**, 1–13, doi:10.1093/nar/gkn923 (2009).
58. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **28**, 27–30, doi:10.1093/nar/28.1.27 (2000).
59. Lu, T. P. *et al.* miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets. *PLoS one* **7**, e42390, doi:10.1371/journal.pone.0042390 (2012).
60. Warde-Farley, D. *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research* **38**, W214–220, doi:10.1093/nar/gkq537 (2010).

Acknowledgements

This work was supported by grants to EME from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- 2014/18189-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Research Fellowship- 309187/2015-0 and 506780/2013-9). FAPESP provided fellowships to LG (2014/07726-0), C.S.F. (2014/50521-0) and M.C.R.M. (2015/13396-5). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) provided fellowship to L.G., J.R.P. and J.F.S. (CAPES-PROCAD-2961/2014). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) provided fellowship to P.P.A. (6693/2015). CNPq provided fellowship to D.R.P. and A.C.C. and provided financial support to E.T.K. (458505/2014-5 and 308527/2013-5). L.G., J.R.P., W.A.S.J. and E.M.E. are members of Center For Cell-Therapy, CEPID/FAPESP (grant 2013/08135-2). Some of the results published here are in whole or part based upon data generated by the TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>.

Author Contributions

L.G., J.R.P., C.S.F., M.C.R.M., D.R.P., P.P.A., T.P.S., J.F.S., A.C.C., I.E.G.P. and M.M.C. conducted the analyses and experiments. L.G., J.R.P., D.R.P., P.P.A., T.P.S., J.F.S., A.C.C., I.E.G.P., M.M.C., E.T.K., W.A.S.J. and E.M.E. contributed to the writing of the manuscript and jointly developed the structure and arguments for the paper. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-01957-0

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

- Anolik JH, Aringer M. New treatments for SLE: cell-depleting and anti-cytokine therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:859–78.
- Bertolotti A, Boniface K, Vergier B, Mossalayi D, Taieb A, Ezzedine K, et al. Type I interferon signature in the initiation of the immune response in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014;27:398–407.
- Camms Trial Investigators, Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, et al. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008;359:1786–801.
- Coppieters KT, Amirian N, Pagni PP, Baca Jones C, Wiberg A, Lasch S, et al. Functional redundancy of CXCR3/CXCL10 signaling in the recruitment of diabetogenic cytotoxic T lymphocytes to pancreatic islets in a virally induced autoimmune diabetes model. *Diabetes* 2013;62:2492–9.
- Fife BT, Kennedy KJ, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Luster AD, et al. CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001;166:7617–24.
- Harris JE, Harris TH, Weninger W, Wherry EJ, Hunter CA, Turka LA. A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN-gamma for autoreactive CD8(+) T-cell accumulation in the skin. *J Invest Dermatol* 2012;132:1869–76.
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008;358:676–88.
- Klein RS, Izikson L, Means T, Gibson HD, Lin E, Sobel RA, et al. IFN-inducible protein 10/CXC chemokine ligand 10-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004;172:550–9.
- Long MD, Martin CF, Pipkin CA, Herfarth HH, Sandler RS, Kappelman MD. Risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer among patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2012;143:390–9. e1.
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Zahorchak AF, Logar AJ, Papworth GD, et al. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 2003;101:611–20.
- Muller M, Carter SL, Hofer MJ, Manders P, Getts DR, Getts MT, et al. CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol* 2007;179:2774–86.
- Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, Surman DR, de Jong LA, Vyth-Dreese FA, et al. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J Exp Med* 2003;198:569–80.
- Palermo B, Campanelli R, Garbelli S, Mantovani S, Lantelme E, Brazzelli V, et al. Specific cytotoxic T lymphocyte responses against Melan-A/MART1, tyrosinase and gp100 in vitiligo by the use of major histocompatibility complex/peptide tetramers: the role of cellular immunity in the etiopathogenesis of vitiligo. *J Invest Dermatol* 2001;117:326–32.
- Paradisi A, Tabolli S, Didona B, Sobrino L, Russo N, Abeni D. Markedly reduced incidence of melanoma and nonmelanoma skin cancer in a nonconcurrent cohort of 10,040 patients with vitiligo. *J Am Acad Dermatol* 2014;71:1110–6.
- Rashighi M, Agarwal P, Richmond JM, Harris TH, Dresser K, Su MW, et al. CXCL10 is critical for the progression and maintenance of depigmentation in a mouse model of vitiligo. *Sci Transl Med* 2014;6:223ra23.
- Richmond JM, Frisoli ML, Harris JE. Innate immune mechanisms in vitiligo: danger from within. *Curr Opin Immunol* 2013;25:676–82.
- Teulings HE, Overkamp M, Ceylan E, Nieuweboer-Krobotova L, Bos JD, Nijsten T, et al. Decreased risk of melanoma and non-melanoma skin cancer in patients with vitiligo: a survey among 1307 patients and their partners. *Br J Dermatol* 2013;168:162–71.
- van den Boorn JG, Konijnenberg D, Dellemijn TA, van der Veen JP, Bos JD, Melief CJ, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *J Invest Dermatol* 2009;129:2220–32.
- Wang X, Wang Q, Wu J, Jiang M, Chen L, Zhang C, et al. Increased expression of CXCR3 and its ligands in vitiligo patients and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo. *Br J Dermatol* 2016;174:1318–26.
- Yamada Y, Okubo Y, Shimada A, Oikawa Y, Yamada S, Narumi S, et al. Acceleration of diabetes development in CXC chemokine receptor 3 (CXCR3)-deficient NOD mice. *Diabetologia* 2012;55:2238–45.

MYO5A Gene Is a Target of MITF in Melanocytes



Journal of Investigative Dermatology (2017) **137**, 985–989; doi:10.1016/j.jid.2016.11.026

TO THE EDITOR

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is a master regulator of melanocyte development, growth, and survival. MITF also activates *TYR*, *TYRP1*, and *DCT* for the synthesis and storage of melanin in melanosomes, as well as *RAB27A*, involved in melanosome trafficking (for review, see Cheli et al., 2010; Hartman and Czyz, 2015; Wellbrock and Arozarena, 2015). In melanocytes, the tripartite complex Rab27a/melanophilin/myosin-Va plays a crucial role in pigmentation by promoting the dispersion of the

melanosomes and the tethering/docking steps required for exocytosis and transfer of melanosomes to neighboring keratinocytes (Hume and Seabra, 2011). Mature melanosomes are transported centrifugally either along microtubules (Wu et al., 2001) or, according to a more recent model, along actin filaments by myosin-Va (Evans et al., 2014). Myosin-Va is a dimeric, actin-based molecular motor ubiquitously expressed and typically involved in the transport of organelles and vesicles (Rudolf et al., 2011), although it has also been involved in

the anchorage/delivery of proteins and mRNAs to specific sites (McCaffrey and Lindsay, 2012; Woolner and Bement, 2009). We have shown that myosin-Va is required for the maintenance of the malignant properties of melanoma cells (Alves et al., 2013) and expression of a myosin-Va-competing peptide leads to apoptosis in melanoma cells (Izidoro-Toledo et al., 2013). Myosin-Va upstream regulators are mostly uncharacterized, and, currently, only Snail has been reported as a potential positive regulator of *MYO5A* gene transcription in some cancer cell lines (Lan et al., 2010).

In this study, we investigated the involvement of MITF in the control of *MYO5A* gene expression. In an attempt to explore the connection between myosin-Va and MITF, we manipulated

Abbreviations: α -MSH, α -melanocyte-stimulating hormone; qRT-PCR, quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction

Accepted manuscript published online 6 December 2016; corrected proof published online 21 February 2017

© 2016 The Authors. Published by Elsevier, Inc. on behalf of the Society for Investigative Dermatology.

Control of nucleolar stress and translational reprogramming by lncRNAs

Yvessa Verheyden¹, Lucas Goedert^{1,2} and Eleonora Leucci^{1,*}

¹ Laboratory of RNA Cancer Biology, Department of Oncology, LKI, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium.

² Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

* Corresponding Author:

Prof. Eleonora Leucci, Laboratory for RNA Cancer Biology, Department of Oncology, KU Leuven, Campus Gasthuisberg, Onderwijs & Navorsing I, Herestraat 49, bus 818, room 06.423, 3000 LEUVEN; Phone: +32 016 33 01 16; E-mail: eleonora.leucci@kuleuven.be

ABSTRACT Under adverse environmental conditions, cells activate stress responses that favour adaptation or, in case of irreversible damage, induce cell death. Multiple stress response pathways converge to downregulate ribosome biogenesis and translation since these are the most energy consuming processes in the cell. This adaptive response allows preserving genomic stability and saving energy for the recovery. It follows that the nucleolus is a major sensor and integrator of stress responses that are then transmitted to the translation machinery through an intricate series of conserved events. Long non-coding RNAs (lncRNAs) are emerging as important regulators of stress-induced cascades, for their ability to mediate post-transcriptional responses. Consistently, many of them are specifically expressed under stress conditions and a few have been already functionally linked to these processes, thus further supporting a role in stress management. In this review we survey different archetypes of lncRNAs specifically implicated in the regulation of nucleolar functions and translation reprogramming during stress responses.

doi: 10.15698/cst2019.01.172

Received originally: 29.04.2018

in revised form: 10.10.2018,

Accepted 11.10.2018,

Published 05.12.2018.

Keywords: lncRNAs, ISR, IRES, uORFs, nucleolus, stress response, adaptation, ribosome biogenesis.

Abbreviations:

DFC – dense fibrillar components,

FC – fibrillar center,

GC – granular component,

IGS – intergenic spacer,

IRES – internal ribosome entry site,

lncRNA – long non-coding RNA,

mTOR – mammalian target of

rapamycin,

NoDS – nucleolar detention sequence,

rRNA – ribosomal RNA,

TORC – TOR complex,

treRNA – translational regulatory

lncRNA,

uORF – upstream open reading frame,

UTR – untranslated region.

INTRODUCTION

Unfavourable environmental conditions trigger cellular responses that help minimize and/or repair the damage experienced by the cell. During stress responses, most of the biosynthetic processes of the cell are reduced or shut down, to spare energy and preserve genome integrity, while selected pathways that help the recovery are specifically activated. Occurring in a context of global transcriptional repression, responses to stress often involve epigenetic and posttranscriptional events [1].

Ribosomes, the core components of the translation apparatus, are molecular machineries composed by four dif-

ferent ribosomal RNAs (rRNAs) and about 79 ribosomal proteins. Ribosome biogenesis is initiated in the nucleolus with the transcription of the rRNAs, and requires the coordinated activity of all the three polymerases together with a large number of transcription factors, nucleases and small RNAs that contribute to the processing and maturation of the rRNAs [2]. Utilizing about 80% of the cellular total energy, ribosome biogenesis is tightly regulated by the availability of nutrients and directly connected to cell cycle regulation, cell growth and apoptosis [3]. It follows that the nucleolus is a major sensor of stress and that the exposure to different stressors, including DNA damage,